

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 201992706 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2020.06.29(22) Дата подачи заявки
2018.05.15(51) Int. Cl. *A61K 38/43* (2006.01)
A61P 21/00 (2006.01)
A61P 25/00 (2006.01)
A61P 43/00 (2006.01)
A61K 38/47 (2006.01)(54) РЕКОМБИНАНТНАЯ ЧЕЛОВЕЧЕСКАЯ КИСЛАЯ α -ГЛЮКОЗИДАЗА(31) 62/506,561; 62/506,574; 62/506,569;
62/529,300; 62/564,083; 62/567,334;
62/618,021; 62/624,638; 62/660,758(32) 2017.05.15; 2017.05.15; 2017.05.15;
2017.07.06; 2017.09.27; 2017.10.03;
2018.01.16; 2018.01.31; 2018.04.20

(33) US

(86) PCT/US2018/032815

(87) WO 2018/213340 2018.11.22

(71) Заявитель:
АМИКУС ТЕРАПЬЮТИКС, ИНК.
(US)(72) Изобретатель:
До Хун, Готшалль Расселл, Ханна
Ричи, Лунь И, Чхар Хин, Теслер
Сергей, Сандерленд Венди, Дилоне
Энрике (US)(74) Представитель:
Носырева Е.Л. (RU)

(57) Предусмотрена рекомбинантная кислая α -глюкозидаза и фармацевтическая композиция, содержащая рекомбинантную кислую α -глюкозидазу, где рекомбинантная кислая α -глюкозидаза получена в результате экспрессии в клетках яичника китайского хомячка (CHO) и характеризуется увеличенным содержанием N-гликановых звеньев, несущих один или два остатка маннозо-6-фосфата, по сравнению с содержанием N-гликановых звеньев, несущих один или два остатка маннозо-6-фосфата, алглюкозидазы альфа. В данном документе также предусмотрены способы получения, очистки и составления рекомбинантной кислой α -глюкозидазы или фармацевтической композиции для введения субъекту и способы лечения заболевания или нарушения, такого как болезнь Помпе, с применением рекомбинантной кислой α -глюкозидазы или фармацевтической композиции.

Структура и аффинность к рецепторам для
высокоманнозных и фосфорилированных олигосахаридов



Нефосфорилированный
высокоманнозный N-
гликан:



Моно-M6P N-гликан:
более низкая аффинность к
CI-MPR
($K_d \sim 7000$ нМ)



Бис-M6P N-гликан:
высокая аффинность к CI-
MPR ($K_d = 2$ нМ)

A1

201992706

201992706

A1

РЕКОМБИНАНТНАЯ ЧЕЛОВЕЧЕСКАЯ КИСЛАЯ АЛЬФА-ГЛЮКОЗИДАЗА**ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ**

Настоящая заявка испрашивает преимущество предварительной заявки на патент США под регистрационным номером 62/506561, поданной 15 мая 2017 года, предварительной заявки на патент США под регистрационным номером 62/506569, поданной 15 мая 2017 года, предварительной заявки на патент США под регистрационным номером 62/506574, поданной 15 мая 2017 года, предварительной заявки на патент США под регистрационным номером 62/564083, поданной 27 сентября 2017 года, предварительной заявки на патент США под регистрационным номером 62/567334, поданной 3 октября 2017 года, предварительной заявки на патент США под регистрационным номером 62/618021, поданной 16 января 2018 года, предварительной заявки на патент США под регистрационным номером 62/624638, поданной 31 января 2018 года, и предварительной заявки на патент США под регистрационным номером 62/660758, поданной 20 апреля 2018 года, для каждой из которых испрашивается приоритет и каждая из которых включена посредством ссылки в полном объеме.

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение охватывает область медицины, генетики и биохимии рекомбинантных гликопротеинов и, в частности, относится к композициям на основе рекомбинантной человеческой α -глюкозидазы (rhGAA), которые имеют повышенное общее содержание маннозо-6-фосфат-несущих N-гликанов, которые эффективно целенаправленно воздействуют на CIMPR в клетках, а затем доставляют rhGAA в лизосомы, где она может снижать аномально высокие уровни накопленного гликогена. rhGAA по настоящему изобретению проявляет превосходное свойство поглощения мышечными клетками и последующей доставки к лизосомам по сравнению с традиционными продуктами на основе rhGAA и проявляет другие фармакокинетические свойства, которые делают ее чрезвычайно эффективной для ферментозаместительной терапии субъектов с болезнью Помпе.

В настоящем изобретении предусмотрен способ лечения болезни Помпе, включающий введение индивидууму комбинации ghGAA и фармакологического шаперона. Например, в некоторых вариантах осуществления, в настоящем изобретении предусмотрен способ лечения болезни Помпе, включающий введение индивидууму комбинации ghGAA и миглустата. ghGAA по настоящему изобретению характеризуется удивительной эффективностью в лечении и реверсии прогрессирования заболевания у субъектов, страдающих болезнью Помпе.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Болезнь Помпе представляет собой наследственную лизосомную болезнь накопления, которая возникает в результате недостаточной активности кислой α -глюкозидазы (GAA). Субъект с болезнью Помпе испытывает недостаток или характеризуется пониженными уровнями кислой α -глюкозидазы (GAA), фермента, который расщепляет гликоген до глюкозы, – основного источника энергии в мышцах. Эта недостаточность фермента вызывает избыточное накопление гликогена в лизосомах, являющихся внутриклеточными органеллами, содержащими ферменты, которые в норме обеспечивают расщепление гликогена и другого клеточного дебриса или продуктов жизнедеятельности. Накопление гликогена в определенных тканях субъекта с болезнью Помпе, а именно в мышцах, нарушает способность клеток к нормальному функционированию. При болезни Помпе гликоген надлежащим образом не метаболизируется и постепенно накапливается в лизосомах, а именно, в клетках скелетных мышц, а при младенческой форме заболевания – в клетках сердечной мышцы. Накопление гликогена приводит к поражению мышечных и нервных клеток, а также других клеток в пораженных тканях.

Традиционно, в зависимости от возраста возникновения, болезнь Помпе с клинической точки зрения определяют или как раннюю младенческую форму, или как форму с поздним возникновением. Возраст возникновения имеет зависимость от тяжести генетических мутаций, вызывающих болезнь Помпе. Наиболее тяжелые генетические мутации вызывают полную потерю активности GAA и проявляются в виде заболевания с ранним возникновением в младенческом возрасте. Генетические мутации, которые ослабляют активность GAA, но полностью не устраняют ее, ассоциированы с формами болезни Помпе, имеющими отсроченное возникновение и прогрессирование. Болезнь Помпе, которая возникает в младенческом возрасте, проявляется вскоре после

рождения и характеризуется мышечной слабостью, дыхательной недостаточностью и сердечной недостаточностью. При отсутствии лечения заболевание, как правило, приводит к летальному исходу в течение двух лет. Болезнь Помпе, которая возникает позже у лиц юношеского и зрелого возраста, проявляется в пожилом возрасте и, как правило, прогрессирует медленнее, чем болезнь, возникающая в младенческом возрасте. Эта форма заболевания, хотя она в целом не оказывает негативного влияния на сердце, может также приводить к смерти из-за слабости скелетных мышц и мышц, вовлеченных в дыхание.

Современное непаллиативное лечение болезни Помпе предусматривает ферментозаместительную терапию (ERT) с применением рекомбинантной человеческой GAA (rhGAA), известной как Lumizyme®, Myozyme® или алглюкозидаза-альфа. С помощью традиционной ферментозаместительной терапии предпринимают попытки лечения болезни Помпе путем замещения недостающей GAA в лизосомах посредством введения rhGAA, восстанавливая таким образом способность клетки расщеплять лизосомный гликоген. «Lumizyme®» и «Myozyme®» представляют собой традиционные формы rhGAA, производимые или реализуемые в виде биологических препаратов компанией Genzyme, и одобренные Управлением по надзору в сфере пищевых продуктов и лекарственных средств США, которые описаны посредством ссылки на публикацию *Physician's Desk Reference* (2014) (которая включена в данный документ посредством ссылки). Алглюкозидаза-альфа имеет химическое название [199-аргинин, 223-гистидин]препро- α -глюкозидаза (человеческая); молекулярную формулу $C_{4758}H_{7262}N_{1274}O_{1369}S_{35}$; номер CAS 420794-05-0. Эти продукты вводят субъекту с болезнью Помпе, также известной как болезнь накопления гликогена II типа (GSD-II) или генерализованный гликогеноз.

Этому поглощению молекулы rhGAA клетками способствует особый углевод, маннозо-6-фосфат (M6P), который связывается с катион-независимым рецептором маннозо-6-фосфата (СIMPR), присутствующим на целевых клетках, таких как мышечные клетки. После связывания, молекула rhGAA захватывается целевыми клетками, а затем транспортируется в лизосомы внутри клеток. Однако в большинстве традиционных продуктов на основе rhGAA отсутствует высокое общее содержание моно-M6P- и бис-M6P-содержащих N-гликанов (т. е. N-гликанов, содержащих один остаток M6P, или N-гликанов, содержащих два остатка M6P, соответственно), что ограничивает их

поглощение клетками посредством CIMPR и доставку к лизосомам, делая таким образом традиционную ферментозаместительную терапию недостаточно эффективной. Например, хотя традиционные продукты на основе rhGAA при 20 мг/кг или в более высоких дозах действительно улучшают некоторые аспекты болезни Помпе, они не способны соответствующим образом, помимо прочего, (i) лечить лежащую в основе клеточную дисфункцию, (ii) восстанавливать мышечную структуру или (iii) уменьшать уровень накопленного гликогена во многих целевых тканях, таких как скелетные мышцы, с целью обеспечить реверсию прогрессирования заболевания. Более того, большие дозы создают дополнительную нагрузку на субъекта, а также медицинских работников, которые лечат субъекта, такую как увеличение времени инфузии, необходимого для внутривенного введения rhGAA. Сохраняется необходимость в дальнейших усовершенствованиях ферментозаместительной терапии для лечения болезни Помпе, таких как rhGAA с улучшенным поглощением тканями, улучшенной ферментативной активностью, улучшенной стабильностью или сниженной иммуногенностью.

Гликозилирование GAA или rhGAA может быть модифицировано *in vitro* ферментативным путем с помощью фосфотрансферазы и экспонирующих ферментов, описанных Canfield, et al. в патенте США № 6534300, для получения МБР-групп. Ферментативное гликозилирование не может соответствующим образом контролироваться, при этом можно получать rhGAA с нежелательными иммунологическими и фармакологическими свойствами. Модифицированная ферментативным путем rhGAA может содержать только высокоманнозные олигосахариды, все из которых могут быть потенциально фосфорилированы *in vitro* посредством фосфотрансферазы или экспонирующего фермента и могут содержать в среднем 5-6 МБР-групп на GAA. Паттерны гликозилирования, полученные путем ферментативной обработки GAA *in vitro*, являются труднодоступными в связи с тем, что дополнительные концевые остатки маннозы, в частности, нефосфорилированные концевые остатки маннозы, оказывают негативное воздействие на фармакокинетику модифицированной rhGAA. Когда такой модифицированный ферментативным путем продукт вводят *in vivo*, – эти маннозные группы обеспечивают повышение непродуктивного выведения GAA, повышение поглощения иммунными клетками GAA, модифицированной ферментативным путем, и снижение терапевтической эффективности rhGAA как результат того, что меньшее количество GAA достигает

целевых тканей, таких как миоциты скелетной мышцы. Например, концевые нефосфорилированные остатки маннозы являются известными лигандами для рецепторов маннозы в печени и селезенке, которые приводят к быстрой очистке модифицированной ферментативным путем rhGAA и снижению целенаправленного воздействия rhGAA на целевые ткани. Более того, паттерн гликозилирования модифицированной ферментативным путем GAA, содержащей высокоманнозные N-гликаны с концевыми нефосфорилированными остатками маннозы, имеет сходство с гликопротеинами, продуцируемыми в дрожжах, плесневых грибах, и повышают риск инициирования иммунной или аллергической реакции, а именно, опасной для жизни тяжелой аллергической (анафилактической) реакции или реакции гиперчувствительности по сравнению с модифицированной ферментативным путем rhGAA.

Ввиду таких недостатков традиционных продуктов на основе rhGAA и способов *in vitro* для фосфорилирования rhGAA авторы настоящего изобретения тщательно искали и идентифицировали пути получения rhGAA с оптимизированным профилем N-гликанов для улучшенного биораспределения и поглощения лизосомами и, таким образом, для минимизации непродуктивного выведения rhGAA при введении. Настоящее изобретение предоставляет пациентам со стабильным или снижающимся уровнем болезни Помпе эффективную терапию, которая обеспечивает реверсию прогрессирования заболевания на клеточном уровне. Авторы настоящего изобретения также сообщают, что rhGAA по настоящему изобретению обеспечивает реверсию прогрессирования заболевания, в том числе способствует более эффективному выведению лизосомального гликогена, по сравнению с текущим стандартом лечения, и тому, что пациенты, подвергавшиеся лечению с помощью rhGAA по настоящему изобретению, демонстрируют неожиданные и значительные улучшения состояния здоровья, в том числе улучшения в мышечной силе, двигательной функции и/или легочной функции, и/или в том числе реверсию прогрессирования заболевания, как продемонстрировано в различных результатах эффективности (например, примеры 10 и 11) из клинических исследований.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ

Настоящее изобретение относится к способу лечения заболевания или нарушения, такого как болезнь Помпе, у субъекта, предусматривающему введение популяции рекомбинантных молекул человеческой кислой α -глюкозидазы (rhGAA).

Описанные в данном документе молекулы rhGAA могут экспрессироваться в клетках яичника китайского хомячка (CHO) и содержать семь потенциальных сайтов N-гликозилирования. В некоторых вариантах осуществления профиль N-гликозилирования популяции молекул rhGAA, как описано в данном документе, определяют с помощью жидкостной хроматографии с тандемной масс-спектрометрией (LC-MS/MS). В некоторых вариантах осуществления молекулы rhGAA в среднем содержат 3-4 остатка маннозо-6-фосфата (M6P). В некоторых вариантах осуществления молекулы rhGAA в среднем содержат по меньшей мере 0,5 моль бисфосфорилированных N-гликановых групп (бис-M6P) в пересчете на моль rhGAA в первом потенциальном сайте N-гликозилирования. В некоторых вариантах осуществления rhGAA содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 95% идентичную последовательности под SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления rhGAA содержит аминокислотную последовательность, идентичную последовательности под SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 30% молекул rhGAA содержат одно или более N-гликановых звеньев, несущих один или два остатка M6P. В некоторых вариантах осуществления молекулы rhGAA содержат в среднем от приблизительно 0,5 до приблизительно 7,0 моль N-гликановых звеньев, содержащих один или два остатка M6P в пересчете на моль rhGAA. В некоторых вариантах осуществления молекулы rhGAA содержат в среднем по меньшей мере 2,5 моль остатков M6P в пересчете на моль rhGAA и по меньшей мере 4 моль остатков сиаловой кислоты в пересчете на моль rhGAA. В некоторых вариантах осуществления молекулы rhGAA, содержащие в среднем 3-4 остатка M6P на молекулу и в среднем приблизительно 0,5 моль бис-M6P в пересчете на моль rhGAA в первом потенциальном сайте N-гликозилирования, дополнительно содержат в среднем от приблизительно 0,4 до приблизительно 0,6 моль монофосфорилированных N-гликанов (моно-M6P) в пересчете на моль rhGAA во втором потенциальном сайте N-гликозилирования, от приблизительно 0,4 до приблизительно 0,6 моль бис-M6P в пересчете на моль rhGAA в

четвертом потенциальном сайте N-гликозилирования и от приблизительно 0,3 до приблизительно 0,4 моль моно-М6Р в пересчете на моль rhGAA в четвертом потенциальном сайте N-гликозилирования. В некоторых вариантах осуществления молекулы rhGAA дополнительно содержат в среднем от приблизительно 4 моль до приблизительно 7,3 моль остатков сиаловой кислоты в пересчете на моль rhGAA, в том числе от приблизительно 0,9 до приблизительно 1,2 моль сиаловой кислоты в пересчете на моль rhGAA в третьем потенциальном сайте N-гликозилирования, от приблизительно 0,8 до приблизительно 0,9 моль сиаловой кислоты в пересчете на моль rhGAA в пятом потенциальном сайте N-гликозилирования и от приблизительно 1,5 до приблизительно 4,2 моль сиаловой кислоты в пересчете на моль rhGAA в шестом потенциальном сайте N-гликозилирования. В некоторых вариантах осуществления популяция молекул rhGAA составлена в фармацевтическую композицию. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция, содержащая популяцию молекул rhGAA, дополнительно содержит по меньшей мере один буфер, выбранный из группы, состоящей из цитрата, фосфата и их комбинации, и по меньшей мере одно вспомогательное вещество, выбранное из группы, состоящей из маннита, полисорбата 80 и их комбинации. В некоторых вариантах осуществления pH фармацевтической композиции составляет от приблизительно 5,0 до приблизительно 7,0, от приблизительно 5,0 до приблизительно 6,0 или приблизительно 6,0. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция дополнительно содержит воду, подкисляющее средство, подщелачивающее средство или их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция характеризуется pH 6,0 и содержит приблизительно 5-50 мг/мл популяции молекул rhGAA, приблизительно 10-100 мМ натрий-цитратного буфера, приблизительно 10-50 мг/мл маннита, приблизительно 0,1-1 мг/мл полисорбата 80 и воды и необязательно содержит подкисляющее средство и/или подщелачивающее средство. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция характеризуется pH 6,0 и содержит приблизительно 15 мг/мл популяции молекул rhGAA, приблизительно 25 мМ натрий-цитратного буфера, приблизительно 20 мг/мл маннита, приблизительно 0,5 мг/мл полисорбата 80 и воды и необязательно содержит подкисляющее средство и/или подщелачивающее средство.

В некоторых вариантах осуществления популяцию молекул rhGAA вводят в дозе, составляющей от приблизительно 1 мг/кг до приблизительно 100 мг/кг. В некоторых

вариантах осуществления популяцию молекул rhGAA вводят в дозе, составляющей приблизительно 20 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления популяцию молекул rhGAA вводят раз в два месяца, раз в месяц, раз в две недели, раз в неделю, два раза в неделю или ежедневно, например раз в две недели. В некоторых вариантах осуществления популяцию молекул rhGAA вводят внутривенно.

В некоторых вариантах осуществления популяцию молекул rhGAA вводят одновременно или последовательно с фармакологическим шапероном, таким как миглустат (также называемый AT2221), или его фармацевтически приемлемой солью. В некоторых вариантах осуществления миглустат или его фармацевтически приемлемую соль вводят перорально, например, в дозе, составляющей от приблизительно 200 до приблизительно 600 мг и необязательно приблизительно 260 мг. В некоторых вариантах осуществления популяцию молекул rhGAA вводят внутривенно в дозе, составляющей от приблизительно 5 мг/кг до приблизительно 20 мг/кг, и миглустат или его фармацевтически приемлемую соль вводят перорально в дозе, составляющей от приблизительно 233 мг до приблизительно 500 мг. В некоторых вариантах осуществления популяцию молекул rhGAA вводят внутривенно в дозе, составляющей от приблизительно 5 мг/кг до приблизительно 20 мг/кг, и миглустат или его фармацевтически приемлемую соль вводят перорально в дозе, составляющей от приблизительно 50 мг до приблизительно 200 мг. В одном варианте осуществления популяцию молекул rhGAA вводят внутривенно в дозе, составляющей приблизительно 20 мг/кг, и миглустат или его фармацевтически приемлемую соль вводят перорально в дозе, составляющей приблизительно 260 мг. В некоторых вариантах осуществления миглустат или его фармацевтически приемлемую соль вводят до (например, приблизительно за один час до введения популяции молекул rhGAA). В по меньшей мере одном варианте осуществления субъект воздерживается от приема пищи в течение по меньшей мере двух часов до и по меньшей мере двух часов после введения миглустата или его фармацевтически приемлемой соли.

В вариантах осуществления настоящего изобретения демонстрируется эффективность rhGAA, описанной в данном документе, для лечения и реверсии прогрессирования заболевания у субъекта с болезнью Помпе.

В некоторых вариантах осуществления популяцию молекул rhGAA вводят в дозе, способной обеспечивать реверсию прогрессирования заболевания у субъекта.

Например, после лечения мышца или мышечное волокно у субъекта характеризуются уменьшенным размером лизосом и/или нормализацией накопления аутофагосом. В некоторых вариантах осуществления после лечения менее 65% мышечных волокон, проанализированных у субъекта, характеризуются накоплением аутофагосом. В некоторых вариантах осуществления после лечения по меньшей мере 36% мышечных волокон, анализируемых у субъекта, имеют нормальный или почти нормальный внешний вид. В некоторых вариантах осуществления субъект, испытывающий реверсию прогрессирования заболевания после лечения, представляет собой пациента, у которого провели замену ERT, например, пациента, у которого провели замену ERT, ранее подвергавшегося лечению алглюкозидазой альфа в течение по меньшей мере двух лет.

В некоторых вариантах осуществления популяцию молекул rhGAA вводят в дозе, способной обеспечивать снижение содержания гликогена в мышце субъекта быстрее, чем при введении той же дозы алглюкозидазы альфа. rhGAA может способствовать снижению содержания гликогена в по меньшей мере приблизительно 1,25, 1,5, 1,75, 2,0 или 3,0 раза быстрее, чем такая же доза алглюкозидазы альфа. В некоторых вариантах осуществления популяцию молекул rhGAA вводят в дозе, дополнительно способствующей снижению содержания гликогена в мышце субъекта более эффективно, чем алглюкозидаза альфа, введенная в той же дозе при оценке после одного, двух, трех, четырех, пяти или шести введений. В некоторых вариантах осуществления популяция молекул rhGAA способствует снижению содержания гликогена на по меньшей мере приблизительно 10%, 20%, 30%, 50%, 75% или 90% более эффективно, чем алглюкозидаза альфа при введении в той же дозе. В некоторых вариантах осуществления после лечения субъект характеризуется более низкими уровнями биомаркера накопления гликогена тетрасахарида гексозы в моче (Hex4). В по меньшей мере одном варианте осуществления уровни Hex4 у субъекта снижаются на по меньшей мере 30% через шесть месяцев после лечения относительно исходного уровня. Например, субъект, способный ходить или неспособный ходить, ранее подвергавшийся лечению с помощью ферментозаместительной терапии (пациент, у которого провели замену ERT), может характеризоваться снижением уровней Hex4 на по меньшей мере 35% через шесть месяцев после лечения относительно исходного уровня. В другом случае субъект, способный ходить, который ранее не получал ферментозаместительную терапию (пациент, не получавший ERT), может

характеризоваться снижением уровней Hex4 на по меньшей мере 45% через шесть месяцев после лечения относительно исходного уровня.

В некоторых вариантах осуществления популяцию молекул rhGAA вводят в дозе, способной обеспечивать улучшение двигательной функции у субъекта. Улучшение двигательной функции можно измерять с помощью теста двигательной функции, такого как тест с шестиминутной ходьбой (6MWT), тест с вставанием со стула и ходьбой с отсчетом времени, тест с подъемом по четырем ступеням, тест с ходьбой на 10 метров, тест Говерса, тест «ходьба-подъем по лестнице-прием Говерса-вставание со стула» (GSGC) или их комбинации. В некоторых вариантах осуществления субъект через шесть месяцев после лечения (по сравнению с исходным уровнем) демонстрирует увеличение расстояния в тесте 6MWT на по меньшей мере 20 метров, уменьшение времени в тесте с вставанием со стула и ходьбой с отсчетом времени на по меньшей мере 1 секунду, уменьшение времени в тесте с подъемом по четырем ступеням на по меньшей мере 0,6 секунды, уменьшение времени в тесте с ходьбой на десять метров на по меньшей мере 0,7 секунды, уменьшение времени в тесте Говерса на по меньшей мере 1 секунду и/или уменьшение показателя GCSC на по меньшей мере 1. Например, у пациента, способного ходить, у которого провели замену ERT, через шесть месяцев после лечения (по сравнению с исходным уровнем) может наблюдаться увеличение в тесте 6MWT на по меньшей мере 20 метров, уменьшение времени в тесте с вставанием со стула и ходьбой с отсчетом времени на по меньшей мере 1,5 секунды, уменьшение времени в тесте с подъемом по четырем ступеням на по меньшей мере 0,6 секунды и/или уменьшение времени в тесте Говерса на по меньшей мере 1 секунду. В другом примере у пациента, способного ходить, который не получал ERT, через шесть месяцев после лечения (по сравнению с исходным уровнем) может наблюдаться увеличение расстояния в тесте 6MWT на по меньшей мере 40 метров, уменьшение времени в тесте с вставанием со стула и ходьбой с отсчетом времени на по меньшей мере 1 секунду, уменьшение времени в тесте с подъемом по четырем ступеням на по меньшей мере 0,6 секунды, уменьшение времени в тесте с ходьбой на десять метров на по меньшей мере 0,7 секунды и/или уменьшение показателя GSGC на по меньшей мере 1. В некоторых вариантах осуществления у пациента, у которого провели замену ERT, наблюдается улучшение в по меньшей мере одном тесте двигательной функции после лечения относительно результата теста двигательной функции пациента после предыдущей ERT с использованием алглюкозидазы альфа.

В некоторых вариантах осуществления популяцию молекул rhGAA вводят в дозе, способной обеспечивать улучшение силы верхней части тела у субъекта. В некоторых вариантах осуществления популяцию молекул rhGAA вводят субъекту, способному ходить, и она дополнительно способствует улучшению силы нижней части тела и/или силы всего тела у субъекта.

В некоторых вариантах осуществления улучшение силы верхней части тела измеряют с использованием показателя силы при мануальном тестировании мышц. Показатель силы при мануальном тестировании мышц пациента может улучшиться на по меньшей мере 1 (для пациента, способного ходить, у которого провели замену ERT) или на по меньшей мере 5,5 (для пациента, неспособного ходить, у которого провели замену ERT) через шесть месяцев после лечения относительно исходного уровня. В некоторых вариантах осуществления у пациента, у которого провели замену ERT, наблюдается улучшение силы верхней части тела после лечения относительно силы верхней части тела пациента после предыдущей ERT с использованием алглюкозидазы альфа.

В некоторых вариантах осуществления популяцию молекул rhGAA вводят в дозе, способной обеспечивать улучшение силы верхней конечности, что измеряют с помощью тестирования количественных показателей мышц или мануального тестирования мышц на приведение плеча, отведение плеча, сгибание локтя и/или разгибание локтя. Например, через шесть месяцев после лечения по сравнению с исходным уровнем у пациента, неспособного ходить, у которого провели замену ERT, может наблюдаться улучшение в приведении плеча на по меньшей мере 8 фунт-сил, улучшение в отведении плеча на по меньшей мере 1 фунт-силу, улучшение в сгибании локтевого сустава на по меньшей мере 2 фунт-силы и/или улучшение в разгибании локтя на по меньшей мере 5 фунт-сил.

В некоторых вариантах осуществления популяцию молекул rhGAA вводят в дозе, способной обеспечивать улучшение легочной функции у субъекта. Улучшение двигательной функции может быть измерено с помощью теста легочной функции, такого как тест форсированной жизненной емкости легких в положении стоя (сидя), тест с определением максимального давления при выдохе (MEP), тест с определением максимального давления при вдохе (MIP) или их комбинации. В некоторых вариантах осуществления субъект через шесть месяцев после лечения (по сравнению с исходным уровнем) демонстрирует улучшение FVC на по меньшей мере 4%, улучшение MEP на

по меньшей мере 16 см H₂O и/или улучшение MIP на по меньшей мере 0,3 см H₂O. Например, у пациента, способного ходить, у которого провели замену ERT, через шесть месяцев после лечения (по сравнению с исходным уровнем) может наблюдаться улучшение MEP на по меньшей мере 16 см H₂O. В другом случае у пациента, способного ходить, не получавшего ERT, через шесть месяцев после лечения (по сравнению с исходным уровнем) может наблюдаться улучшение FVC на по меньшей мере 4% и/или улучшение MIP на по меньшей мере 11 см H₂O. В некоторых вариантах осуществления у пациента, у которого провели замену ERT, наблюдается улучшение в по меньшей мере одном тесте легочной функции после лечения относительно результата теста легочной функции пациента после предыдущей ERT с использованием алглюкозидазы альфа.

В некоторых вариантах осуществления популяцию молекул rhGAA вводят в дозе, способной обеспечивать снижение утомляемости у субъекта, которую измеряют с помощью показателя по шкале оценки выраженности утомляемости (FSS). Например, субъект может представлять собой пациента, неспособного ходить, у которого провели замену ERT, и продемонстрировать снижением показателя FSS на по меньшей мере 3,5 через шесть месяцев после лечения относительно исходного уровня. В другом примере субъект может представлять собой пациента, способного ходить, у которого провели замену ERT, и продемонстрировать снижение показателя FSS на по меньшей мере 8 через шесть месяцев после лечения относительно исходного уровня. В другом примере субъект может представлять собой пациента, способного ходить, который не получал ERT, и продемонстрировать снижение показателя FSS на по меньшей мере 5 через шесть месяцев после лечения относительно исходного уровня. В некоторых вариантах осуществления у пациента, у которого провели замену ERT, наблюдается более низкий показатель FSS после лечения по сравнению с показателем FSS пациента после предыдущей ERT с использованием алглюкозидазы альфа.

В некоторых вариантах осуществления популяцию молекул rhGAA вводят в дозе, способной обеспечивать снижение уровней по меньшей мере одного биомаркера повреждения мышц, например креатинкиназы (СК), аланинаминотрансферазы (ALT), аспаратаминотрансферазы (AST) или их комбинации. В некоторых вариантах осуществления уровни СК у субъекта через шесть месяцев после лечения снижаются на по меньшей мере 15% относительно исходного уровня, уровни ALT у субъекта через

шесть месяцев после лечения снижаются на по меньшей мере 5% относительно исходного уровня и/или уровни AST субъекта через шесть месяцев после лечения снижаются на по меньшей мере 5% относительно исходного уровня. Например, субъект может представлять собой пациента, способного ходить, у которого провели замену ERT, и демонстрировать снижение уровней СК на по меньшей мере 15%, снижение уровней ALT на по меньшей мере 15% и/или снижение уровней AST на по меньшей мере 10% через шесть месяцев после лечения относительно исходного уровня. В другом примере субъект может представлять собой пациента, неспособного ходить, у которого провели замену ERT, и демонстрировать снижение уровней СК на по меньшей мере 20%, снижение уровней ALT на по меньшей мере 5% и/или снижение уровней AST на по меньшей мере 5% через шесть месяцев после лечения относительно исходного уровня. В еще одном примере субъект может представлять собой пациента, способного ходить, который не получал ERT, и демонстрировать снижение уровней СК на по меньшей мере 35%, снижение уровней ALT на по меньшей мере 35% и/или снижение уровней AST на по меньшей мере 30% через шесть месяцев после лечения относительно исходного уровня.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

На фиг. 1А показаны нефосфорилированный высокоманнозный N-гликан, моно-M6P N-гликан и бис-M6P N-гликан. На фиг. 1В показана химическая структура группы M6P. Каждый квадрат представляет N-ацетилглюкозамин (GlcNAc), каждый круг представляет маннозу и каждый P представляет фосфат.

На фиг. 2А описано продуктивное нацеливание rhGAA на целевые ткани (например, мышечные ткани субъекта с болезнью Помпе) посредством N-гликанов, несущих M6P. На фиг. 2В изображено непродуктивное выведение лекарственного средства из нецелевых тканей (например, печени и селезенки) или связывание N-гликанов без M6P с нецелевыми тканями.

Фиг. 3 представляет собой схематическую диаграмму иллюстративного способа получения, захвата и очистки рекомбинантного лизосомного белка.

Фиг. 4 показана ДНК-конструкция для трансформации клеток CHO с помощью ДНК, кодирующей rhGAA.

Фиг. 5 представляет собой график, на котором показаны результаты аффинной хроматографии с использованием CIMPR для rhGAA АТВ200 с захватом (вариант осуществления 2) и без захвата (вариант осуществления 1) на анионообменной колонке (АЕХ).

На фиг. 6А-6Н показаны результаты сайт-специфического анализа N-гликозилирования rhGAA АТВ200 с применением двух различных аналитических методик LC-MS/MS. На фиг. 6А показана занятость сайтов семи потенциальных сайтов N-гликозилирования для АТВ200. На фиг. 6В показаны два анализа профиля N-гликозилирования первого потенциального сайта N-гликозилирования для АТВ200. На фиг. 6С показаны два анализа профиля N-гликозилирования второго потенциального сайта N-гликозилирования для АТВ200. На фиг. 6D показаны два анализа профиля N-гликозилирования третьего потенциального сайта N-гликозилирования для АТВ200. На фиг. 6Е показаны два анализа профиля N-гликозилирования четвертого потенциального сайта N-гликозилирования для АТВ200. На фиг. 6F показаны два анализа профиля N-гликозилирования пятого потенциального сайта N-гликозилирования для АТВ200. На фиг. 6G показаны два анализа профиля N-гликозилирования шестого потенциального сайта N-гликозилирования для АТВ200. На фиг. 6Н показан суммарный относительный процент монофосфорилированных и бисфосфорилированных соединений для первого, второго, третьего, четвертого, пятого и шестого потенциальных сайтов N-гликозилирования.

На фиг. 7 представлен график, отображающий профили элюирования с помощью Polywax для Lumizyme® (алглюкозидаза альфа, более тонкая линия, элюирование слева) и АТВ200 (более толстая линия, элюирование справа).

На фиг. 8 представлена таблица, в которой приведена сводная информация о структурах N-гликанов Lumizyme® в сравнении с тремя различными препаратами rhGAA АТВ200, обозначенными как ВР-rhGAA, АТВ200-1 и АТВ200-2.

На фиг. 9А и 9В представлены графики, показывающие результаты аффинной хроматографии с использованием CIMPR для Lumizyme® и Myozyme®, соответственно.

На фиг. 10А представлен график, на котором сравнивается аффинность связывания с CIMPR для rhGAA АТВ200 (левая кривая) и для Lumizyme® (правая кривая). На

фиг. 10В представлена таблица, в которой сравнивается содержание бис-М6Р в rhGAA Lumizyme® и АТВ200.

На фиг. 11А представлен график, на котором сравнивается активность rhGAA АТВ200 (левая кривая) с активностью rhGAA Lumizyme® (правая кривая) в нормальных фибробластах при различных концентрациях GAA. На фиг. 11В представлена таблица, в которой сравнивается активность rhGAA АТВ200 (левая кривая) с активностью rhGAA Lumizyme® (правая кривая) в фибробластах, полученных от субъекта с болезнью Помпе, при различных концентрациях GAA. На фиг. 11С представлена таблица, в которой сравнивается $K_{\text{поглощения}}$ фибробластов, полученных от здоровых субъектов и субъектов с болезнью Помпе.

На фиг. 12 показана стабильность АТВ200 в кислых или нейтральных рН-буферах, оцененных в анализе термостабильности с применением SYPRO Orange, поскольку флуоресценция красителя увеличивается, когда белки денатурируют.

На фиг. 13 показано содержание гликогена в тканях мышей WT или мышей Gaa KO, обработанных носителем, алглюкозидазой альфа или АТВ200/АТ2221, определенное с применением расщепления амилоглюкозидазой. Столбцы представляют собой среднее \pm SEM для 7 мышей/группа. * $p < 0,05$ в сравнении с алглюкозидазой альфа при множественном сравнении с применением способа Даннетта в рамках однофакторного анализа ANOVA.

На фиг. 14 показаны LAMP1-положительные везикулы в мышечных волокнах мышей Gaa KO, обработанных носителем, алглюкозидазой альфа, или мышей АТВ200/АТ2221, или мышей WT. Изображения были взяты из vastus lateralis и представляли 7 мышей на каждую группу. Увеличение = 200x (1000x во вставках).

На фиг. 15А показаны LC3-положительные агрегаты в мышечных волокнах мышей Gaa KO, обработанных носителем, алглюкозидазой альфа, или мышей АТВ200/АТ2221, или мышей WT. Изображения были взяты из vastus lateralis и представляли 7 мышей на каждую группу. Увеличение составляет 400x. На фиг.15В показан вестерн-блот-анализ белка LC3 II. В каждую дорожку загружали всего 30 мг белка.

На фиг. 16 показана экспрессия дисферлина в мышечных волокнах мышей Gaa KO, обработанных носителем, алглюкозидазой альфа, или мышей АТВ200/АТ2221, или

мышей WT. Изображения были взяты из vastus lateralis и представляли 7 мышечных волокон на каждую группу. Увеличение составляет 200x.

На фиг. 17 изображено коиммунофлуоресцентное окрашивание LAMP1 (зеленый) (см., например, «В») и LC3 (красный) (см., например, «А») в отдельных волокнах, выделенных из белых волокон икроножной мышцы у мышей Gaa KO, обработанных носителем, алглюкозидазой альфа или АТВ200. «С» обозначает выведение аутофагического дебриса и отсутствие увеличенной лизосомы. От каждого животного были исследованы минимум 30 волокон.

На фиг. 18 показана стабилизация АТВ200 с помощью АТ2221 соответственно при 17 мкМ и АТ2221 при 170 мкМ по сравнению с одним АТВ200.

На фиг. 19А и 19В показана схема исследования АТВ200-02. Низкая доза = 130 мг. Высокая доза = 260 мг. На фиг. 26А «6MWT» = тест с 6-минутной ходьбой; «FVC» = форсированная жизненная емкость; «QOW» = раз в две недели. «а» = анализировали данные по безопасности от 2 индикаторных пациентов из когорты 1 при каждом уровне дозы перед введением дозы в когортах 2 и 3; «b» = в ходе стадий 2 и 3 АТ2221 вводили перорально перед началом внутривенной инфузии АТВ200. Все дозы АТВ200 вводили путем внутривенной инфузии в течение 4 часов. «с» = первые 2 пациента в когортах 2 и 3 служили в качестве индикаторных пациентов для своих соответствующих когорт. На фиг. 19С приведены основные характеристики пациентов, зарегистрированных в когортах 1, 2 и 3. «NA» = не применимо. «SD» = стандартное отклонение. «а» = пациенты когорты 1 должны были принимать алглюкозидазу альфа в течение 2-6 лет в начале исследования. LOPD = болезнь Помпе с поздним возникновением.

На фиг. 20 представлены фармакокинетические данные для АТ2221. «AUC» = площадь под кривой; «CL/F» = плазменный клиренс, скорректированный с учетом пероральной биодоступности АТ2221; «C_{max}» = максимальная концентрация лекарственного средства; «CV» = коэффициент изменчивости; «t_{1/2}» = период полувыведения; «t_{max}» = время до максимальной концентрации лекарственного средства; «V_Z/F» = кажущийся объем распределения во время конечной фазы, скорректированный с учетом пероральной биодоступности АТ2221. «а» = среднее геометрическое (CV%); «b» = медиана (мин. - макс.); «с» = среднее арифметическое (CV%).

На фиг. 21 показан общий белок GAA по сигнатуре пептида T09 для когорт 1 и 3. «AUC» = площадь под кривой; «CL_T» = общий клиренс тела; «C_{max}» = максимальная концентрация лекарственного средства; «CV» = коэффициент изменчивости; «MD» = многократные дозы; «t_{1/2}» = период полувыведения; «t_{max}» = время до максимальной концентрации лекарственного средства; «F_{rel}» = отношение AUC 20 мг/кг АТВ 200 отдельно и 10 мг/кг АТВ200 отдельно к 5 мг/кг АТВ200 отдельно и 20 мг/кг АТВ200 + низкая доза или высокая доза АТ2221 по сравнению с 20 мг/кг АТВ200 отдельно. «a» = среднее геометрическое (CV%); «b» = медиана (мин. - макс.); «c» = среднее арифметическое (CV%); «d» = n=11; «e» = n=5. Низкая доза = 130 мг. Высокая доза = 260 мг.

На фиг. 22A, 22B, 22C, 22D, 22E и 22F изображен общий белок GAA по когортам. Низкая доза = 130 мг. Высокая доза = 260 мг. На фиг. 22A показаны профили среднего значения концентрации общего белка GAA в зависимости от времени для когорты 1 (однократная доза). На фиг. 22B показаны профили среднего значения концентрации общего белка GAA в зависимости от времени для когорты 1 (многократная доза). На фиг. 22C показаны профили среднего значения концентрации общего белка GAA в зависимости от времени для когорты 1 против когорты 3 (однократная доза). На фиг. 22D показаны профили среднего значения концентрации общего белка GAA в зависимости от времени для когорты 1 против когорты 3 (многократная доза). На фиг. 22E показано сравнение общего белка GAA при 20 мг/кг АТВ200 через 12 часов после введения дозы. * = p < 0,05; ** = p < 0,01; *** p < 0,001. На фиг. 22F показано сравнение общего белка GAA при 20 мг/кг АТВ200 через 24 часа после введения дозы; * = p < 0,05; ** = p < 0,01; «ns» = не значимо.

На фиг. 23 показан дисперсионный анализ (ANOVA) общего белка GAA по сигнатуре пептида T09. Площадь под кривой (AUC) представлена в мкг·ч./мл; «CI» = доверительный интервал.

На фиг. 24A приведено краткое описание анализов и доступных промежуточных данных в отношении теста с 6-минутной ходьбой («6MWT»), показывающих изменение по сравнению с исходным уровнем («CFBL») через 6, 9 и 12 месяцев для пациентов в когорте 1 и когорте 3.

На фиг. 24В представлены данные 6MW для отдельных пациентов когорты 1 и когорты 3.

На фиг. 24С приведено краткое описание анализов и доступных промежуточных данных в отношении других тестов двигательной функции: тест двигательной функции «встань и иди» с отсчетом времени; тест с подъемом по четырем ступеням; тест с ходьбой на десять метров (10М); тест Говерса и тест двигательной функции «ходьба-подъем по лестнице-прием Говерса-вставание со стула» («GSGC»), которые отображают изменение по сравнению с исходным уровнем («CFBL») через 6, 9 и 12 месяцев для пациентов в когорте 1 и когорте 3. GSGC представляет собой комбинированный показатель из четырех оценок двигательной функции, которая оценивается наблюдателем: ходьба (ходьба на 10 метров), подъем по 4 ступеням, прием Говерса (вставание с пола) и вставание со стула. Каждый тест оценивают от 1 (нормально) до 7 (не может быть выполнено; максимальный показатель 6 для теста «вставание со стула»). Общие показатели варьируются в диапазоне от 4 до 27. «а» = n=9, пропущенные значения не получены из-за отказа пациента выполнить тест; «b» = медианное изменение от исходного уровня составило -1,5, и у 7/9 пациентов наблюдалось снижение; «с» = медианное изменение от исходного уровня составило -0,8, и у 4/5 пациентов наблюдалось снижение.

На фиг. 25 приведено краткое описание анализов и доступных промежуточных данных в отношении тестирования мышечной силы (QMT), показывающих изменение по сравнению с исходным уровнем («CFBL») через 6 и 9 месяцев для пациентов в когорте 2. QMT = количественный тест мышц. Показанные значения представляют фунт-силы для правой и левой сторон, взятых вместе. «а» = отведение плеча, недоступное для субъекта; «b» = оценивание: (1) видимое мышечное движение, но отсутствие движения в суставе; (2) движение в суставе, но не против силы тяжести; (3) движение против силы тяжести, но не против добавленного сопротивления; (4) движение против сопротивления, но меньше, чем нормальное; (5) нормальная сила.

На фиг. 26А приведено краткое описание анализа и доступных промежуточных данных на основании показателей мануального теста мышц (ММТ) у пациентов в когорте 1. Показатели ММТ рассчитывали для верхней части тела (максимальный показатель: 40), нижней части тела (максимальный показатель: 40), а также всего тела (максимальный

показатель: 80). Увеличение силы при мануальном тестировании мышц наблюдалось у пациентов в когорте 1 через 6, 9 и 12 месяцев. «SD» = стандартное отклонение.

На фиг. 26В приведено краткое описание анализа и доступных промежуточных данных на основании показателей мануального теста мышц (ММТ) у пациентов в когорте 2. Показатели ММТ рассчитывали для верхней части тела (максимальный показатель: 40). Увеличение силы при мануальном тестировании мышц наблюдалось у пациентов в когорте 2 через 6 и 9 месяцев. «SD» = стандартное отклонение. Результаты ММТ в целом соответствовали результатам QMT (показано на фиг. 28).

На фиг. 26С приведено краткое описание анализа и доступных промежуточных данных на основании показателей мануального теста мышц (ММТ) у пациентов в когорте 3. Показатели ММТ рассчитывали для верхней части тела (максимальный показатель: 40), нижней части тела (максимальный показатель: 40), а также всего тела (максимальный показатель: 80). Увеличение силы при мануальном тестировании мышц наблюдалось у пациентов в когорте 3 в каждый из 6, 9 и 12 месяцев. «SD» = стандартное отклонение.

На фиг. 27 приведено краткое описание анализов и доступных промежуточных данных на основании форсированной жизненной емкости легких в положении сидя («FVC»), максимального давления при вдохе («MIP») и максимального давления при выдохе («MEP»), которые отражают изменение относительно исходного уровня («CFBL») через 6, 9 и 12 месяцев для пациентов в когорте 1 и когорте 3. «а» = FVC не доступно для субъекта. MEP и MIP измеряли в см H₂O.

На фиг. 28 представлено краткое описание анализа и доступные промежуточные данные на основании шкалы оценки выраженности утомляемости (FSS), вопросника для самооценки, состоящего из девяти вопросов, каждый из которых оценивается по шкале от 1 до 7. Общий показатель варьируется от 9 до 63, причем более высокие значения представляют более высокий уровень утомляемости из-за болезненного состояния. Нормативное значение в здоровой популяции составляет ~ 21. На фиг. 28 показано изменение по сравнению с исходным уровнем («CFBL») через 6, 9 и 12 месяцев для пациентов в когорте 1, когорте 2 и когорте 3.

На фиг. 29А-29С показано среднее процентное изменение маркеров по сравнению с исходным уровнем маркера повреждения (аланинаминотрансферазы, аспаратаминотрансферазы и креатинкиназы) во всех когортах пациентов. На фиг. 29А

представлены данные от пациентов из когорты 1 за 58 недель, на фиг. 29B представлены данные от пациентов из когорты 2 за 24 недели и на фиг. 29C представлены данные от пациентов из когорты 3 за 36 недель. На фиг. 29D показано среднее процентное изменение по сравнению с исходным уровнем маркеров повреждения мышц (СК = креатинкиназа) и субстрата заболевания (Hex4 = тетрасахарид гексозы в моче) в течение периода не более 12 месяцев для пациентов в когорте 1, когорте 2 и когорте 3. «BL» = исходное значение. «SE» = стандартная ошибка. «WK» = неделя. «M» = месяц.

На фиг. 30 приведены данные по безопасности из исследования ATB200-02. «AE» = нежелательные явления. «IAR» = реакция, связанная с инфузией; «A» = указано на основании промежуточного анализа данных (максимум 20+ месяцев); «B» = включает в себя боль в верхней и нижней части живота.

На фиг. 31 приведены доступные данные по эффективности и безопасности из исследования ATB200-02.

На фиг. 32A-32H показаны результаты анализа сайт-специфического N-гликозилирования ghGAA ATB200, в том числе профиль N-гликозилирования для седьмого потенциального сайта N-гликозилирования, с применением анализа LC-MS/MS расщепленной протеазой ATB200. На фиг. 32A-32H представлены средние данные для десяти партий ATB200, полученных в разных масштабах.

На фиг. 32A показана средняя занятость сайтов семи потенциальных сайтов N-гликозилирования для ATB200. Сайты N-гликозилирования предоставлены в соответствии с SEQ ID NO: 1. CV = коэффициент вариаций.

На фиг. 32B-32H представлен анализ сайт-специфического N-гликозилирования всех семи потенциальных сайтов N-гликозилирования для ATB200 с номерами сайтов, предоставленными в соответствии с SEQ ID NO: 5. Столбцы представляют максимальный и минимальный процент видов N-гликанов, определенных как конкретная группа N-гликанов, для десяти проанализированных партий ATB200. На фиг. 32B показан профиль N-гликозилирования первого потенциального сайта N-гликозилирования для ATB200. На фиг. 32C показан профиль N-гликозилирования второго потенциального сайта N-гликозилирования для ATB200. На фиг. 32D показан профиль N-гликозилирования третьего потенциального сайта N-гликозилирования для

ATB200. На фиг. 32E показан профиль N-гликозилирования четвертого потенциального сайта N-гликозилирования для ATB200. На фиг. 32F показан профиль N-гликозилирования пятого потенциального сайта N-гликозилирования для ATB200. На фиг. 32G показан профиль N-гликозилирования шестого потенциального сайта N-гликозилирования для ATB200. На фиг. 32H показан профиль N-гликозилирования седьмого потенциального сайта N-гликозилирования для ATB200.

На фиг. 33A-33B дополнительно характеризуются и суммируется профиль N-гликозилирования ATB200, как показано также на фиг. 32A-32H. На фиг. 33A показано картирование гликана в 2-антраниловой кислоте (2-AA) и анализ ATB200 с помощью LC/MS-MS, и суммированы виды N-гликанов, идентифицированных в ATB200, в процентах от общей флуоресценции. Данные картирования гликана 2-AA и анализа LC-MS/MS также представлены в таблице 5. На фиг. 33B суммированы средняя занятость сайтов и средний профиль N-гликана, в том числе общее фосфорилирование, монофосфорилирование, бисфосфорилирование и сиалирование для всех семи потенциальных сайтов N-гликозилирования для ATB200. ND = не выявлено.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

Перед описанием нескольких иллюстративных вариантов осуществления настоящего изобретения следует понять, что настоящее изобретение не ограничено подробностями конструкции или стадиями способа, указанными в следующем описании. Настоящее изобретение допускает другие варианты осуществления и может быть осуществлено на практике или выполнено различными путями.

I. Определения

Термины, используемые в данном описании, как правило, имеют их обычные значения в данной области техники, в контексте настоящего изобретения и в конкретном контексте, в котором используется каждый термин. Определенные термины обсуждаются ниже или в других местах в данном описании, чтобы обеспечить дополнительное указание для практикующего специалиста при описании композиций и способов по настоящему изобретению, а также их получении и применении. Формы единственного числа относятся к одному или более (т. е. по меньшей мере одного) грамматических объектов. Термин «или» означает и используется взаимозаменяемо с термином «и/или», если контекст явно не указывает на иное. В настоящей заявке

использование формы единственного числа включает форму множественного числа, если специально не указано иное. Более того, использование термина «включающий», а также других форм, таких как «включает» и «включенный», не является ограничивающим. Любой описываемый в данном документе диапазон следует понимать как включающий конечные точки и все значения между конечными точками. В настоящем описании, за исключением случаев, когда контекст требует иного в силу языковых особенностей или необходимого подразумеваемого значения, слово «содержать» или его варианты, такие как «содержащий», используются во включительном смысле, т. е. для указания присутствия изложенных признаков, но без исключения присутствия или добавления дополнительных признаков в различных вариантах осуществления настоящего изобретения.

Термин «GAA» относится к человеческой кислой α -глюкозидазе (GAA) – ферменту, который катализирует гидролиз α -1,4- и α -1,6-гликозидных связей лизосомного гликогена, а также к вставочным, родственным или замещенным вариантам аминокислотной последовательности GAA и к фрагментам более длинной последовательности GAA, которая проявляет ферментативную активность. Человеческая кислая α -глюкозидаза человека кодируется геном GAA (ID гена 2548 в Национальном центре биотехнологической информации (NCBI)), который был картирован в длинном плече хромосомы 17 (местоположение 17q25.2-q25.3). Примером последовательности ДНК, кодирующей GAA, является NP 000143.2, которая включена посредством ссылки. К настоящему времени в гене GAA человека было идентифицировано больше 500 мутаций, многие из которых ассоциированы с болезнью Помпе. Мутации, приводящие к неправильному сворачиванию или неправильному процессингу фермента кислой α -глюкозидазы, включают в себя T1064C (Leu355Pro) и C2104T (Arg702Cys). Кроме того, мутации GAA, которые влияют на созревание и процессинг фермента, включают в себя Leu405Pro и Met519Thr. Для осуществления активности белка кислой α -глюкозидазы требуется наличие консервативного гексапептида WIDMNE в аминокислотных остатках 516-521. Как используется в данном документе, сокращенное название «GAA» подразумевается как обозначающее фермент человеческую кислую α -глюкозидазу, в то время как выделенное курсивом сокращенное название «GAA» подразумевается как обозначающее ген человека, кодирующий кислую α -глюкозидазу человека. Выделенное курсивом сокращенное название «Gaa» подразумевается как обозначающее гены, отличные от человеческих,

кодирующие ферменты кислые α -глюкозидазы, отличные от человеческих, в том числе без ограничения гены крыс или мышей, а сокращенное название «Gaa» подразумевается как обозначающее ферменты кислые α -глюкозидазы, отличные от человеческих.

Термин «rhGAA» подразумевается как обозначающий рекомбинантный фермент человеческую кислую α -глюкозидазу и используется для различения эндогенного GAA от синтетического или рекомбинантного GAA (например, GAA, полученного из клеток CHO, трансформированных ДНК, кодирующей GAA). Термин «rhGAA» охватывает популяцию отдельных молекул rhGAA. Характеристики популяции молекул rhGAA предоставлены в данном документе. Термин «традиционный продукт на основе rhGAA» подразумевается как обозначающий продукты, содержащие алглюкозидазу альфа, такие как Lumizyme® или Myozyme®.

Термин «генетически модифицированный» или «рекомбинантный» относится к клеткам, а именно, к клеткам CHO, которые экспрессируют конкретный продукт гена, а именно rhGAA, после введения нуклеиновой кислоты, содержащей кодирующую последовательность, которая кодирует продукт гена, в сочетании с регуляторными элементами, которые регулируют экспрессию кодирующей последовательности. Введение нуклеиновой кислоты можно осуществлять с помощью способов, известных из уровня техники, в том числе путем целенаправленного воздействия на ген и гомологичной рекомбинации. Используемый в данном документе термин также включает клетки, которые были подвергнуты изменению с помощью методик генной инженерии для экспрессии или сверхэкспрессии эндогенного гена или продукта гена, в нормальном состоянии не экспрессируемого такой клеткой, например, с помощью технологии активации генов.

Используемый в данном документе термин «очищенный» относится к материалу, который выделяли в условиях, которые снижают или устраняют присутствие посторонних материалов, т. е. контаминантов, в том числе нативных материалов, из которых получен материал. Например, очищенный белок предпочтительно практически не содержит других белков или нуклеиновых кислот, с которыми он ассоциирован в клетке; очищенная молекула нуклеиновой кислоты предпочтительно практически не содержит белков или других посторонних молекул нуклеиновых кислот, с которыми ее можно обнаружить в клетке. Используемый в данном документе термин «практически

не содержит» используется в процессе работы в контексте аналитического тестирования материала. Предпочтительно, очищенный материал, практически не содержащий контаминантов, является на по меньшей мере 95% чистым; более предпочтительно на по меньшей мере 97% чистым и еще более предпочтительно на по меньшей мере 99% чистым. Чистоту можно оценивать с помощью хроматографии, гель-электрофореза, иммунологического анализа, анализа по определению состава, биологического анализа, ферментного анализа и других способов, известных из уровня техники. В конкретном варианте осуществления очищенный означает, что уровень контаминантов ниже уровня, приемлемого для регуляторных органов по безопасному введению человеку или нечеловекоподобному животному. Рекомбинантные белки, например rhGAA, можно выделять из клеток CHO или очищать от них с применением способов, известных из уровня техники, в том числе с помощью хроматографической сортировки по размеру, аффинной хроматографии или анионообменной хроматографии. В некоторых вариантах осуществления rhGAA очищают с применением способа, предусматривающего анионообменную хроматографию с последующей аффинной хроматографией с иммобилизованным металлом, необязательно с последующей очисткой с применением третьей хроматографической колонки.

Используемый в данном документе термин «алглюкозидаза-альфа» подразумевается как обозначающий рекомбинантную человеческую кислую α -глюкозидазу, идентифицированную как [199-аргинин,223-гистидин]препро- α -глюкозидаза (человеческая); регистрационный номер 420794-05-0 согласно Химической реферативной службе. Алглюкозидаза-альфа одобрена для реализации в США в виде продуктов под названиями Lumizyme® и Myozyme® от Genzyme.

Используемый в данном документе термин «АТВ200» подразумевается как обозначающий рекомбинантную человеческую кислую α -глюкозидазу, описанную в международной заявке PCT/US2015/053252, раскрытие которой включено в данный документ посредством ссылки.

Используемый в данном документе термин «гликан» подразумевается как обозначающий полисахаридную цепь, ковалентно связанную с аминокислотным остатком в белке или полипептиде. Используемый в данном документе термин «N-гликан» или «N-связанный гликан» подразумевается как обозначающий

полисахаридную цепь, присоединенную к аминокислотному остатку в белке или полипептиде посредством образования ковалентной связи с атомом азота аминокислотного остатка. Например, N-гликан может быть ковалентно связан с атомом азота боковой цепи аспарагинового остатка. Гликаны могут содержать одно или более моносахаридных звеньев, и при этом моносахаридные звенья могут быть ковалентно связаны с образованием прямой цепи или разветвленной цепи. В по меньшей мере одном варианте осуществления N-гликановые звенья, присоединенные к ghGAA, могут содержать одно или более моносахаридных звеньев, каждое из которых независимо выбрано из N-ацетилглюкозамина, маннозы, галактозы, фукозы, маннозо-6-фосфата или сиаловой кислоты. N-гликановые звенья в белке можно определить с помощью любой подходящей аналитической методики, такой как масс-спектрометрия. В некоторых вариантах осуществления N-гликановые звенья присоединены к ghGAA, и их можно определить с помощью жидкостной хроматографии с тандемной масс-спектрометрией (LC-MS/MS) с использованием таких приборов, как масс-спектрометр Orbitrap Velos Pro™ от Thermo Scientific, масс-спектрометр Orbitrap Fusion Lumos Tribid™ от Thermo Scientific или масс-спектрометр Xevo® G2-XS QToF от Waters.

Используемый в данном документе термин «высокоманнозный N-гликан» подразумевается как обозначающий N-гликан, содержащий от одного до шести или больше маннозных звеньев. В одном варианте осуществления высокоманнозное N-гликановое звено может содержать бис(N-ацетилглюкозаминовою) цепь, связанную с аспарагиновым остатком и дополнительно связанную с разветвленной полиманнозной цепью. Используемые в данном документе взаимозаменяемые термины «М6Р» или «маннозо-6-фосфат» подразумеваются как обозначающие маннозное звено, фосфорилированное в положении 6; т. е. содержащее фосфатную группу, связанную с гидроксильной группой в положении 6. В некоторых вариантах осуществления одно или более маннозных звеньев одного или более N-гликановых звеньев фосфорилированы в положении 6 с образованием маннозо-6-фосфатных звеньев. В одном варианте осуществления термины «М6Р» или «маннозо-6-фосфат» обозначают как сложный фосфодиффир маннозы, содержащий N-ацетилглюкозамин (GlcNAc) в качестве «кэпа» в фосфатной группе, так и маннозное звено, содержащее доступную фосфатную группу, лишенную кэпа GlcNAc. В по меньшей мере одном варианте осуществления N-гликаны белка могут содержать несколько групп М6Р, при этом по

меньшей мере одна группа М6Р содержит кэп GlcNAc и по меньшей мере одна другая группа М6Р лишена кэпа GlcNAc.

Используемый в данном документе термин «комплексный N-гликан» подразумевается как обозначающий N-гликан, содержащий типы сахаров, отличные от GlcNAc и маннозы, например, одно или более галактозных звеньев и/или звеньев сиаловой кислоты. В по меньшей мере одном варианте осуществления комплексный N-гликан может представлять собой высокоманнозный N-гликан, в котором одно или более маннозных звеньев дополнительно связаны с одним или более моносахаридными звеньями, каждое из которых независимо выбрано из N-ацетилглюкозамина, галактозы и сиаловой кислоты. Используемый в данном документе термин «гибридный N-гликан» подразумевается как обозначающий N-гликан, содержащий по меньшей мере одну высокоманнозную ветвь и по меньшей мере одну комплексную ветвь. Репрезентативные конструкции для нефосфорилированных моно-М6Р и бис-М6Р N-гликанов показаны на фиг. 1А. маннозо-6-фосфатная группа показана на фиг. 1В.

Используемый в данном документе термин «нормализация» лизосом в мышце относится к процессу восстановления пораженной мышцы до лизосомальной морфологии мышцы дикого типа путем уменьшения размера и количества накопленного гликогена, таким образом, что пораженная мышца будет фактически соответствовать нормальной лизосомальной морфологии, что в конечном итоге приводит к реверсии прогрессирования заболевания.

Используемый в данном документе термин «реверсия прогрессирования заболевания» означает, среди прочего, адекватное (i) уменьшение или устранение накопления гликогена, (ii) уменьшение или устранение набухания лизосом и/или дисфункции и (iii) уменьшение или устранение накопления дэбриса в виде аутофагосом. Реверсия прогрессирования заболевания может проявляться у пациента с болезнью Помпе, способного ходить, получавшего ERT, в виде двух или более из следующих «клинических улучшений»: (a) среднего увеличения расстояния в тесте с шестиминутной ходьбой на по меньшей мере 20 метров, (b) среднего улучшения максимального давления при выдохе на по меньшей мере 16 см H₂O и (c) среднего снижения показателя по шкале оценки выраженности утомляемости на по меньшей мере 7. Реверсия прогрессирования заболевания может проявляться у пациента с болезнью Помпе, неспособного ходить, получавшего ERT, в виде двух или более из

следующих «клинических улучшений»: (a) среднего улучшения показателя приведения плеча на по меньшей мере 8 фунт-сил, (b) среднего улучшения в разгибании локтя на по меньшей мере 5 фунт-сил, и (c) среднего снижения показателя по шкале оценки выраженности утомляемости на по меньшей мере 3,5. Реверсия прогрессирования заболевания может проявляться у пациента с болезнью Помпе, не получавшего ERT, в виде двух или более из следующих «клинических улучшений»: (a) среднего увеличения расстояния в тесте с шестиминутной ходьбой на по меньшей мере 40 метров, (b) среднего улучшения форсированной жизненной емкости в положении стоя (сидя) на по меньшей мере 4%, (c) среднего улучшения максимального давления при вдохе на по меньшей мере 11 см H₂O и (d) среднего снижения показателя по шкале оценки выраженности утомляемости на по меньшей мере 5.

Преимущество способа лечения, раскрытого в данном документе, по сравнению с введением алглюкозидазы альфа, заключается в том, что пациенты с болезнью Помпе, подвергавшиеся лечению с помощью первого из вышеупомянутых, демонстрируют длительное клиническое улучшение. Например, улучшения могут наблюдаться через два-три года после назначения первого лечения или после него, включая, например, четыре, пять или шесть лет после назначения первого лечения. Напротив, после двух лет ферментнозаместительной терапии с применением стандарта лечения (например, алглюкозидазой альфа) пациенты с болезнью Помпе либо (i) сохраняют свои достижения от исходного уровня до лечения, но не обнаруживают заметного улучшения в течение двух или трехлетнего предела или (ii) испытывают постепенное снижение и потерю любых достижений, достигнутых через два или три года после стандартного лечения. Kuperus et al. 2017. Long-term benefit of enzyme replacement therapy in Pompe disease: A 5-year prospective study. *Neurology*. 89:2365-2373. Напротив, rhGAA, описанная в данном документе, выводит лизосомальный гликоген более эффективно, чем это происходит с помощью стандарта лечения, и было показано, что она вызывает улучшения у пациентов (например, «способных ходить, у которых провели замену ERT», когорты 1 исследования ATB200-02), улучшение у которых не ожидается после приема ферментнозаместительной терапии в течение по меньшей мере двух лет. Клинические данные до настоящего момента дают возможность предположить, что применение rhGAA или фармацевтической композиции, описанных в данном документе, обеспечит постоянное улучшение результатов лечения пациентов даже после двухлетнего периода после лечения. Таким образом, в некоторых вариантах

осуществления пациент, подвергавшийся лечению с помощью rhGAA или фармацевтической композиции, описанных в данном документе, продолжает демонстрировать прогресс в одном или более клинических улучшениях в течение более двух лет после лечения (например, демонстрирует дополнительные достижения, превышающие достижение, полученное к данному времени или в течение двухлетнего предела).

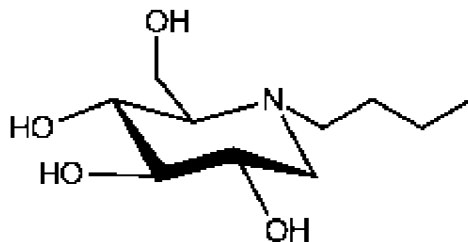
Используемый в данном документе термин «реверсия лизосомальной патологии» означает частичное или полное выведение гликогена, который накопился в клетке из-за отсутствия оптимальной активности GAA.

Как используется в данном документе, форсированная жизненная емкость или «FVC» представляет собой количество воздуха, которое можно принудительно выдохнуть из легких субъекта после максимально возможного глубокого вдоха.

Используемый в данном документе термин «тест с шестиминутной ходьбой» (6MWT) представляет собой тест для измерения расстояния, которое человек может пройти в общей сложности за шесть минут по твердой ровной поверхности. Тест проводится для определения самого дальнего расстояния, которое может пройти испытуемый за шесть минут.

Используемый в данном документе термин «тест с ходьбой на десять метров» (10MWT) представляет собой тест для измерения времени, которое требуется человеку в прогулочной обуви, чтобы пройти десять метров по плоской поверхности.

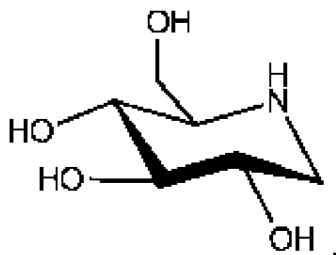
Используемое в данном документе соединение миглустат, также известное как N-бутил-1-дезоксиджиримицин, или NB-DNJ, или (2R,3R,4R,5S)-1-бутил-2-(гидроксиметил)пиперидин-3,4,5-триол, представляет собой соединение, имеющее следующую химическую формулу:



Один состав на основе миглустата коммерчески реализуется под торговым названием Zavesca® в качестве средства монотерапии при болезни Гоше 1 типа. В некоторых вариантах осуществления миглустат обозначается как AT2221.

Как обсуждается ниже, фармацевтически приемлемые соли миглустата также можно применять в настоящем изобретении. В случае использования соли миглустата дозу соли корректируют так, чтобы доза миглустата, полученная пациентом, была эквивалентной количеству, которое было бы получено при использовании миглустата в форме свободного основания.

Используемое в данном документе соединение дувоглустат, также известное как 1-дезоксиноджиримицин, или DNJ, или (2R,3R,4R,5S)-2-(гидроксиметил)пиперидин-3,4,5-триол, представляет собой соединение, имеющее следующую химическую формулу:



Используемый в данном документе термин «фармакологический шаперон» или иногда просто термин «шаперон» подразумевается как обозначающий молекулу, которая специфически связывается с кислой α -глюкозидазой и характеризуется одним или более из следующих эффектов:

- улучшает образование стабильной молекулярной конформации белка;
- улучшает надлежащий транспорт белка из эндоплазматического ретикулума в другое местоположение в клетке, предпочтительно нативное местоположение в клетке, для того, чтобы предотвратить разложение белка, ассоциированное с эндоплазматическим ретикуломом;
- предотвращает агрегацию конформационно нестабильных или неправильно свернутых белков;

- по меньшей мере частично восстанавливает и/или улучшает функцию, стабильность и/или активность белка дикого типа и/или
- улучшает фенотип или функцию клетки, содержащей кислую α -глюкозидазу.

Таким образом, фармакологический шаперон для кислой α -глюкозидазы представляет собой молекулу, которая связывается с кислой α -глюкозидазой, что обуславливает надлежащие сворачивание, транспорт, отсутствие агрегации и активность кислой α -глюкозидазы. Этот термин, используемый в данном документе, включает без ограничения активные сайт-специфические шапероны (ASSC), которые связываются с активным сайтом фермента, ингибиторы или антагонисты и агонисты. В по меньшей мере одном варианте осуществления фармакологический шаперон может являться ингибитором или антагонистом кислой α -глюкозидазы. Используемый в данном документе термин «антагонист» подразумевается как обозначающий любую молекулу, которая связывается с кислой α -глюкозидазой и либо частично, либо полностью блокирует, ингибирует, снижает или нейтрализует активность кислой α -глюкозидазы. В по меньшей мере одном варианте осуществления фармакологический шаперон представляет собой миглустат. Другой неограничивающий пример фармакологического шаперона для кислой α -глюкозидазы представляет собой дувоглустат.

Используемый в данном документе термин «активный сайт» подразумевается как обозначающий участок белка, который ассоциирован с конкретной биологической активностью белка и является необходимым для нее. В по меньшей мере одном варианте осуществления активный сайт может представлять собой сайт, в котором происходит связывание с субстратом или другим партнером по связыванию и который предоставляет аминокислотные остатки, непосредственно участвующие в образовании и разрушении химических связей. В настоящем изобретении активные сайты могут предусматривать каталитические сайты ферментов, антигенсвязывающие сайты антител, лигандсвязывающие домены рецепторов, связывающие домены регуляторов или рецепторсвязывающие домены секретируемых белков. Активные сайты также могут охватывать домены трансактивации, домены, участвующие в белок-белковых взаимодействиях, или ДНК-связывающие домены факторов транскрипции и регуляторов.

Используемый в данном документе термин «AUC» или «площадь под кривой» подразумевается как обозначающий математический расчет для оценки общего воздействия указанного лекарственного средства на организм с течением времени. На графике отображено, как концентрация введенного субъекту лекарственного средства в крови изменяется с течением времени после введения дозы, при этом переменная концентрации лекарственного средства отложена по оси y , а время отложено по оси x . Площадь между кривой концентрации лекарственного средства и осью x для заданного временного интервала является AUC. AUC применяют в качестве ориентира для составления схем введения доз и для сравнения биодоступности различных лекарственных средств, определяющей их доступность в организме.

Используемый в данном документе термин « C_{max} » подразумевается как обозначающий максимальную концентрацию лекарственного средства в плазме крови, достигаемую после введения субъекту.

Используемый в данном документе термин «объем распределения» или « V » подразумевается как обозначающий теоретический объем, который мог бы требоваться для того, чтобы содержать общее количество вводимого лекарственного средства в той же концентрации, которая наблюдается в плазме крови, и представляет степень, в которой лекарственное средство распределяется в тканях организма, а не в плазме крови. Более высокие значения V указывают на более высокую степень распределения в тканях. «Центральный объем распределения» или « V_c » подразумевается как обозначающий объем распределения в крови и тканях, хорошо перфузированных кровью. «Периферический объем распределения» или « V_2 » подразумевается как обозначающий объем распределения в периферической ткани.

Используемые в данном документе взаимозаменяемые термины «клиренс», «системный клиренс» или « CL » подразумеваются как обозначающие объем плазмы крови, который полностью очищается от вводимого лекарственного средства за единицу времени. «Периферический клиренс» подразумевается как обозначающий объем периферической ткани, очищаемый от вводимого лекарственного средства за единицу времени.

Используемый в данном документе термин «фармацевтически приемлемый» подразумевается как обозначающий молекулярные сущности и композиции, которые

являются физиологически переносимыми и обычно не вызывают нежелательные реакции при введении человеку. Используемый в данном документе термин «фармацевтически приемлемый» предпочтительно означает одобренный регулирующим ведомством федерального правительства или правительства штата или упомянутый в Фармакопее США или другой общепризнанной фармакопее для применения в животных организмах, а более конкретно у людей. Используемый в данном документе термин «носитель» подразумевается как обозначающий разбавитель, адъювант, вспомогательное вещество или инертную среду, с которыми вводится соединение. Подходящие фармацевтические носители известны из уровня техники и в по меньшей мере одном варианте осуществления описаны E. W. Martin в «Remington's Pharmaceutical Sciences», 18-е издание или другие издания.

Термин «фармацевтически приемлемая соль», используемый в данном документе, подразумевается как обозначающий соль, которая в рамках тщательной медицинской оценки является подходящей для применения в контакте с тканями людей и низших животных без неспецифической токсичности, болезненной чувствительности, аллергической реакции и т. п., соответствует разумному отношению риск/польза, обычно является водо- или жирорастворимой или диспергируемой и является эффективной для предполагаемого применения. Термин включает фармацевтически приемлемые соли присоединения кислоты и фармацевтически приемлемые соли присоединения основания. Перечни подходящих солей находятся, например, в S. M. Berge et al., J. Pharm. Sci., 1977, 66, стр. 1-19, включенном в данный документ посредством ссылки. Используемый в данном документе термин «фармацевтически приемлемая соль присоединения кислоты» предназначен для обозначения тех солей, которые сохраняют биологическую эффективность и свойства свободных оснований, и которые не являются биологически или иным образом нежелательными, образованных с неорганическими кислотами. Используемый в данном документе термин «фармацевтически приемлемая соль присоединения основания» предназначен для обозначения тех солей, которые сохраняют биологическую эффективность и свойства свободных кислот, и которые не являются биологически или иным образом нежелательными, образованных с неорганическими основаниями.

Используемый в данном документе термин «буфер» означает раствор, содержащий слабую кислоту и сопряженное с кислотой основание, который помогает предотвратить изменения показателя pH.

Как используется в данном документе, термины «терапевтически эффективная доза» и «эффективное количество» подразумеваются как обозначающие количество кислой α -глюкозидазы, и/или миглустата, и/или их комбинации, которое является достаточным для того, чтобы вызвать терапевтический ответ у субъекта. Терапевтический ответ может представлять собой любой ответ, который пользователь (например, врач-консультант) распознает как эффективный ответ на терапию, охватывающий любые суррогатные клинические маркеры или симптомы, описанные в данном документе и известные из уровня техники. Таким образом, в по меньшей мере одном варианте осуществления терапевтический ответ может представлять собой уменьшение интенсивности или ингибирование одного или более симптомов или маркеров болезни Помпе, известных из уровня техники. Симптомы или маркеры болезни Помпе включают без ограничения пониженную активность кислой α -глюкозидазы в тканях; кардиомиопатию; кардиомегалию; прогрессирующую мышечную слабость, особенно в туловище или нижних конечностях; глубокую гипотонию; макроглоссию (и в некоторых случаях протрузию языка); затрудненное глотание, сосание и/или прием пищи; дыхательную недостаточность; гепатомегалию (умеренную); вялость мышц лица; арефлексию; непереносимость физической нагрузки; одышку при физической нагрузке; ортопноэ; апноэ во время сна; утренние головные боли; сонливость; лордоз и/или сколиоз; уменьшенные глубокие сухожильные рефлексы; боль в пояснице и несоответствие ключевым этапам двигательного развития. Следует отметить, что концентрация миглустата, которая оказывает ингибирующий эффект на кислую α -глюкозидазу, может составлять «эффективное количество» для целей настоящего изобретения ввиду разбавления (и последующего сдвига связывания из-за изменения равновесного состояния и pH), биодоступности и метаболизма миглустата при введении *in vivo*.

Терапевтический ответ может также включать молекулярные ответы, такие как накопление гликогена, пролиферация лизосом и образование аутофагических зон. Терапевтические ответы можно оценивать путем сравнения физиологических и молекулярных реакций мышечной биопсии до и после лечения с помощью ghGAA, как

описано в данном документе. Например, количество гликогена, присутствующего в образцах биопсии, можно использовать как маркер для определения терапевтического ответа. Другой пример включает биомаркеры, такие как LAMP-1, LC3 и дисферлин, которые можно использовать как индикатор лизосомной дисфункции накопления. Например, образцы биопсии мышц, собранные до и после лечения с помощью rhGAA, описанной в данном документе, можно окрашивать с использованием антитела, которое распознает один из биомаркеров.

Используемый в данном документе термин «ферментозаместительная терапия» или «ERT» подразумевается как обозначающий введение ненативного очищенного фермента индивидууму с дефицитом такого фермента. Вводимый белок может быть получен из природных источников или посредством рекомбинантной экспрессии. Термин также обозначает введение очищенного фермента индивидууму, которому по другим причинам необходимо введение очищенного фермента или получающему пользу от этого. В по меньшей мере одном варианте осуществления такой индивидуум страдает от недостаточности фермента. Вводимый фермент может представлять собой очищенный рекомбинантный фермент, полученный *in vitro*, или белок, очищенный из выделенной ткани или жидкости, такой как, например, плацента или молоко животных, или из растений.

Используемый в данном документе термин «комбинированная терапия» подразумевается как обозначающий любой вид терапии, при котором два или более отдельных терапевтических средств вводят одновременно или последовательно. В одном варианте осуществления результаты комбинированной терапии являются улучшенными по сравнению с эффектом каждого вида терапии, осуществляемого в отдельности. Усиление может включать любое улучшение эффекта различных видов терапии, которое может приводить к благоприятному результату по сравнению с результатами, достигаемыми с помощью видов терапии, осуществляемых в отдельности. Усиленный эффект или результаты могут включать синергическое усиление, где усиленный эффект превышает аддитивные эффекты каждой терапии, осуществляемой в отдельности; аддитивное усиление, где усиленный эффект практически равен аддитивному эффекту каждой терапии, осуществляемой в отдельности; или эффект, меньший чем аддитивный, где усиленный эффект является более слабым, чем аддитивный эффект каждой терапии, осуществляемой в

отдельности, но все же лучшим, чем эффект каждой терапии, осуществляемой в отдельности. Усиленный эффект можно измерить с помощью любых способов, известных из уровня техники, с помощью которых можно измерить эффективность или результат лечения.

Термин «одновременно», используемый в данном документе, подразумевается как обозначающий «в то же время, что и» или «в разумно короткий период времени до или после», что будет понятно специалисту в данной области. Например, если два средства для лечения вводят одновременно друг с другом, то одно средство для лечения можно вводить до или после другого средства для лечения, делая поправку на время, необходимое для подготовки последнего из двух средств для лечения. Следовательно, «одновременное введение» двух средств для лечения включает без ограничения введение одного средства для лечения вслед за другим через приблизительно 30 минут или меньше, приблизительно 30 минут, 20 минут или меньше, приблизительно 20 минут, приблизительно 15 минут, приблизительно 10 минут, приблизительно 9 минут, приблизительно 8 минут, приблизительно 7 минут, приблизительно 6 минут, приблизительно 5 минут, приблизительно 4 минуты, приблизительно 3 минуты, приблизительно 2 минуты, приблизительно 1 минуту или менее чем 1 минуту.

«Болезнь Помпе» относится к аутосомно-рецессивной LSD, характеризующейся дефицитом активности кислой альфа-глюкозидазы (GAA), которая ухудшает метаболизм лизосомного гликогена. Дефицит фермента приводит к накоплению лизосомного гликогена и приводит к прогрессирующей слабости скелетной мускулатуры, снижению сердечной деятельности, дыхательной недостаточности и/или ухудшению деятельности ЦНС на поздних стадиях заболевания. Генетические мутации в гене GAA приводят или к уменьшению экспрессии, или к получению мутантных форм фермента с измененной устойчивостью и/или с биологической активностью, которые в конечном итоге приводят к возникновению заболевания (см., в основном, Hirschhorn R, 1995, Glycogen Storage Disease Type II: Acid α -Glucosidase (Acid Maltase) Deficiency, *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, Scriver et al., eds., McGraw-Hill, New York, 7th ed., pages 2443-2464). Три установленные клинические формы болезни Помпе (младенческая, юношеская и взрослая) коррелируют с уровнем остаточной активности α -глюкозидазы (Reuser A J et al., 1995, *Glycogenesis Type II (Acid Maltase Deficiency)*, *Muscle & Nerve Supplement* 3, S61-S69). Младенческая форма

болезни Помпе (I типа или A), наиболее часто встречающаяся и наиболее тяжелая, характеризуется задержкой в развитии, общим пониженным тонусом, гипертрофией сердца и кардиореспираторной недостаточностью в течение второго года жизни. Юношеская форма болезни Помпе (II типа или B) является промежуточной по тяжести и характеризуется преобладанием симптомов, связанных с мышцами, без кардиомегалии. Индивидуумы с юношеской формой болезни Помпе обычно умирают до достижения 20-летнего возраста из-за дыхательной недостаточности. Болезнь Помпе у взрослых (III тип или C) часто проявляется в виде медленно прогрессирующей миопатии, возникающей в подростковом возрасте или уже в конце шестого десятилетия (Felicia K J et al., 1995, Clinical Variability in Adult-Onset Acid Maltase Deficiency: Report of Affected Sibs и Review of the Literature, *Medicine* 74, 131-135). Было показано, что при болезни Помпе α -глюкозидаза интенсивно посттрансляционно модифицируется посредством гликозилирования, фосфорилирования и протеолитического процессинга. Для оптимального катализа гликогена требуется химическое превращение предшественника размером 110 килодальтон (кДа) в зрелые формы размером 76 и 70 кДа путем протеолиза в лизосоме. Используемый в данном документе термин «болезнь Помпе» относится ко всем типам болезни Помпе. Лекарственные формы и схемы дозирования, раскрытые в данном документе, можно использовать для лечения, например, болезни Помпе I типа, II типа или III типа.

«Субъектом» или «пациентом» является предпочтительно человек, при этом можно также подвергать лечению других млекопитающих и нечеловекоподобных животных, имеющих нарушения, которые включают накопление гликогена. Субъектом может быть плод, новорожденный, ребенок, юноша или взрослый с болезнью Помпе или с другим нарушением, связанным с депонированием или накоплением гликогена. Примером индивидуума, который подлежит лечению, является индивидуум (плод, новорожденный, ребенок, юноша, подросток или взрослый человек) с GSD-II (например, с младенческой GSD-II, юношеской GSD-II или GSD-II, возникшей во взрослом возрасте). Индивидуум может содержать остаточную активность GAA или активность, не поддающуюся измерению. Например, индивидуум с GSD-II может иметь активность GAA, которая составляет менее чем приблизительно 1% от нормальной активности GAA (младенческая GSD-II), активность GAA, которая составляет приблизительно 1-10% от нормальной активности GAA (ювенильная GSD-II), или активность GAA, которая составляет приблизительно 10-40% от нормальной

активности GAA (GSD-II у взрослого). В некоторых вариантах осуществления субъект или пациент представляет собой пациента, «получавшего ERT» или «у которого провели замену ERT», относящегося к пациенту с болезнью Помпе, который ранее получал ферментнозаместительную терапию. В некоторых вариантах осуществления субъект или пациент представляет собой пациента «не получавшего ERT», относящегося к пациенту с болезнью Помпе, который ранее не получал ферментнозаместительную терапию. В определенных вариантах осуществления субъект или пациент является способным ходить (например, пациент, способный ходить, у которого провели замену ERT, или пациент, способный ходить, не получавший ERT). В определенных вариантах осуществления субъект или пациент является неспособным ходить (например, пациент, неспособный ходить, у которого провели замену ERT). Статус способного или неспособного может быть определен с помощью теста с шестиминутной ходьбой (6MWT). В некоторых вариантах осуществления пациент, способный ходить, является пациент с болезнью Помпе, который способен пройти по меньшей мере 200 метров в тесте 6MWT. В некоторых вариантах пациентом, неспособным ходить, является пациент с болезнью Помпе, который не может ходить без посторонней помощи или который прикован к инвалидной коляске.

Термины «лечить» и «лечение», используемые в данном документе, относятся к облегчению одного или более симптомов, ассоциированных с заболеванием, к предупреждению или отсрочке возникновения одного или более симптомов заболевания и/или к уменьшению тяжести или частоты возникновения одного или более симптомов заболевания. Например, лечение может означать улучшение кардиологического статуса (например, увеличение конечно-диастолических и/или конечно-систолических объемов или уменьшение, облегчение или предупреждение прогрессирующей кардиомиопатии, которую, как правило, обнаруживают при GSD-II) или функции легких (например, увеличение жизненной емкости легких по сравнению с емкостью на исходном уровне и/или нормализация сниженного насыщения кислородом во время крика); улучшение неврологического развития и/или двигательных навыков (например, увеличение показателя при оценке по шкале AIMS); снижение уровней гликогена в ткани индивидуума, пораженного этим заболеванием; или любые комбинации этих эффектов. В одном предпочтительном варианте осуществления

лечение включает улучшение кардиологического статуса, в частности, выражающегося в уменьшении или предупреждении GSD-II-ассоциированной кардиомиопатии.

Термины «улучшать», «увеличивать» и «снижать», используемые в данном документе, указывают на уровни, которые связаны с измерением на исходном уровне, а именно, с измерением у того же индивидуума до начала лечения, описанного в данном документе, или измерения у контрольного индивидуума (или у многих контрольных индивидуумов) при отсутствии лечения, описанного в данном документе. Контрольный индивидуум является индивидуумом, страдающим такой же формой GSD-II (либо младенческой, ювенильной, либо возникшей во взрослом возрасте), как и подлежащий лечению индивидуум, который имеет приблизительно такой же возраст, что и индивидуум, подлежащий лечению (чтобы обеспечивать возможность сопоставления стадий заболевания индивидуума, получающего лечение, и контрольного(-ых) индивидуума(-ов)).

Используемые в данном документе термины «приблизительно» и «примерно» подразумеваются как обозначающие приемлемую степень погрешности для измеряемой величины с учетом природы или точности измерений. Например, степень погрешности может указываться количеством значащих чисел, предусмотренных для измерения, как понимается в данной области техники, и включает без ограничения изменение на ± 1 наиболее точного значащего числа, представленного для измерения. Типичные иллюстративные степени погрешности находятся в пределах 20 процентов (%), предпочтительно в пределах 10% и более предпочтительно в пределах 5% от указанного значения или диапазона значений. Числовые величины, приведенные в данном документе, являются примерными, если не указано иное, что означает то, что термин «приблизительно» или «примерно» может являться предположительным, если не указано точно.

II. Рекомбинантная человеческая кислая α -глюкозидаза (rhGAA)

В некоторых вариантах осуществления рекомбинантная человеческая кислая α -глюкозидаза представляет собой фермент, содержащий аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления rhGAA кодируется нуклеотидной последовательностью, представленной под SEQ ID NO: 2.

Таблица 1. Нуклеотидные последовательности и белковые последовательности

SEQ ID NO:	Последовательности
1	<p>MGVRHPPCSHRLLAVCALVSLATAALLGHILLHDFLLVPRELSGSSPVLEET HPAHQQGA</p> <p>SRPGPRDAQAHPGRPRAVPTQCDVPPNSRFDCAPDKAITQEQCEARGCCYIP AKQGLQGA</p> <p>QMGQPWCFFPPSYPSYKLENLSSSEMGYTATLTRTTPTFFPKDILTLRLDVM METENRLH</p> <p>FTIKDPANRRYEVPLETPRVHSRAPSPLYSVFEFSEEPFGVIVHRQLDGRVLLN TTVAPLF</p> <p>FADQFLQLSTSLPSQYITGLAEHLSPLMLSTSWTRITLWNRDLAPTPGANLY GSHPFYLA</p> <p>LEDGGS AHGVFLLNSNAMDVVLQPSALSWRSTGGILDVYIFLGPEPKSVV QQYLDVVG Y</p> <p>PFMPPYWGLGFHLRCRWGYSSTAITRQVVENMTRAHFPLDVQWNDLDYMD SRRDFTFNKDG</p> <p>FRDFPAMVQELHQGGRRYMMIVDPAISSSGPAGSYRPYDEGLRRGVFITNE TGQPLIGKV</p> <p>WPGSTAFPDFTNPTALAWWEDMVAEFHDQVPFDGMWIDMNEPSNFIRGSE DGCPNNELEN</p> <p>PPYVPGVVGGTLQAATICASSHQFLSTHYNLHNL YGLTEAIASHRALVKAR GTRPFVISR</p> <p>STFAGHG RYAGHWTGDVWSSWEQLASSVPEILQFNLLGVPLVGADVCGFL GNTSEELCVR</p> <p>WTQLGAFYPFMRNHNSLLSLPQEPYSFSEPAQQAMRKALTRYALLPHLYT LFHQAHVAG</p> <p>ETVARPLFLEFPKDSSTWTVDHQLLWGEALLITPVLQAGKAEVTGYFPLGT WYDLQTVPI</p> <p>EALGSLPPPPAAPREPAIHSEGQWVTLPAPLDTINVHLRAGYIIPLQGPGLTT TESRQQP</p> <p>MALAVALT KGGGEARGELFWDDGESLEVLERGAYTQVIFLARNNTIVNELV RVTSEGAGLQ</p> <p>LQKVTVLGVATAPQQVLSNGVPVSNFTYSPDTKVLDICVSLLMGEQFLVSW C</p>
2	<p>cagttgggaaagctgaggtgtcggcggggccgagggtgaggtcggggatgaggcagcaggtaggacagtgaacct cggtgacgcgaaggaccccggccacctctaggtctcctcgtccgcccgtgtcagcagggaggctctgggcctgc cgcagctgacggggaaactgaggcacggagcgggcctgtaggagctgtccaggccatctccaacctgggagtgag gcaccgccctgtcccaccggtctctggccgtctgcgccctcgtgtccttggcaaccgctgactcctggggcacatc ctactccatgatttctgctggtccccgagagctgagtggtcctcctccagctctggaggagactcaccagctcacca</p>

	<p>gcaggagagccagcagaccagggccccgggatgccagccacacccccggccgtcccagagcagtgcccacacagt gagcgtcccccaacagccgcttcgattgcgccctgacaagccatcaccaggaacagtgcgaggccccggg ctgctgtacatccctgcaaagcaggggctgcagggagcccagatggggcagccctggtgcttctcccaccagcta ccccagctacaagctggagaacctgagctcctcgtaaatgggctacacggccacctgacctaccacccccacct cttccccaaaggacatcctgacctgcccgtggacgtgatgatggagactgagaaccgctccaacttcacgatcaagat ccagtaacaggcgtacgaggtgccctggagacccccgctgtccacagccgggaccgtccccactctacagcgt ggagttctccgaggagcccttcgggggtgacgtgcaccggcagctggacggccgctgctgctgaacacgacggtg cgccccgttcttggcgaccagttcctcagctgtccacctcgtgccctcgcagtatacacaggcctcggcagcacc tcagtcccctgatgctcagcaccagctggaccaggatcaccctgtggaaccgggacctgcgccacgcccgtgcg aacctctacgggtctcacccttctacctggcgctggaggacggcgggctggcacacgggggttctctgctaacagca atgccatggatgtgctcctgcagccgagccctgccctagctggaggctgacaggtgggacctggtatctacatctc ctgggcccagagcccagagcgtggtgcagcagctgacctggacgttggggataccccgttcatgccccatactgggg cctgggcttccacctgtgccgtggggctactcctccaccgctatcaccgccaggtggtggagaacatgaccagggc ccacttcccctggacgtccaatggaacgacctggactacatggactcccggaggggacttcagttcaacaaggatgg cttccgggacttcccggccatggtgcaggagctgcaccagggcggccggcgtacatgatgatcgtggatcctgccat cagcagctcgggccccgagctacaggccctacgacgagggtctgcggagggggttttcatcaccaacgag accggccagccgctgattgggaaggatggccccgggtccactgccttcccgaacttcaacaacccacagccctggcc tggtgggaggacatggtggctgagttccatgaccaggtgcccttcagcggcatgtggattgacatgaacgagccttca acttcatcagaggctctgaggacggctgccccaaacatgagctggagaaccacccctacgtgcctgggggtggtgggg ggacctccaggcggccaccatctgtgctccagccaccagtttctccacacactacaacctgcacaacctctacgg cctgaccgaagccatcgcctcccacaggcgctggtgaaggctcgggggacacgcccatttggatctcccgtcagc ctttgctggccacggccgatacggccgacctggacggggacgtgtggagctcctgggagcagctcgcctcctccg tgcagaaatcctgcagtttaacctgctgggggtgcctctggctcggggccgacgtctgcggcttctgggcaaacctc agaggagctgtgtgctgctggaccagctgggggcttctacccttcatgcggaaccacaacagcctgctcagctg ccccaggagccgtacagctcagcagccggcccagcagggccatgaggaaaggccctcacctcgctacgcactcc tccccacctctacacactgttccaccaggccccagctcgggggggagaccgtggccccggcccccttctctggagttcc caaggactctagcactggactgtggaccaccagctcctgtgggggggaggccctgctcatcaccagtgctccaggc cggaaggccgaagtgactggctacttcccctgggcacatggtacgacctgcagacggtgccaatagaggcccttgg cagctcccacccccacctgcagctccccgtgagccagccatccacagcagggggcagtggggtgacgtgcccggc ccccctggacaccatcaacgtccacctccgggctgggtacatcatccccctgcaggccctggcctcaaacacagag tcccgccagcagccatggcctggctgtggccctgaccaaggggtggagagggcccagggggagctgttctgggacg atggagagagcctggaagtgtgagcagcaggggctacacacaggtcatcttctggccaggaataacacgatcgtg aatgagctggtacgtgtgaccagtgaggggagctggcctgcagctgcagaagggtactgtcctgggcgtggccacggc gccccagcaggtctctccaacggtgtccctgttccaacttacctacagccccgacaccaaggtcctggacatctgtg tctcgtgttgatgggagagcagtttctcagctggtgttagccggcggagtggttagtctctccagagggaggct ggttccccagggaagcagagcctgtgtcgggcagcagctgtgtcgggctgggggttgcagtgctacctggagc tgggactaaccattcaagccgccatcgttcttccacctcctgggcccgggctctggcccccaacgtgtctagg agagcttctccctagatcgcactgtgggcccgggctggagggtgctctgtgtaataagattgaaggtttgcctcc tcacctgttccggcatcgggtagtattagccacccccctccatctgttcccagcaccggagaagggggtgctcaggt ggaggtgtggggatgacacctgagctcctgctcgcgctgctgctctgccccaacgcgaccgcttcccggctgccc gagggtggtgctgcccggcggcagcaagcctgggaactcaggaaaattcacaggacttgggagattctaaatctt aagtcaattatttaataaaagggcatttgggaatc</p>
<p>3</p>	<p>MGVRHPPCSHRLLAVCALVSLATAALLGHILLHDFLLVPRELSGSSPVLEET HPAHQQGA SRPGPRDAQAHPGRPRAVPTQCDVPPNSRFD CAPDKAITQE QCEARGCCYIP AKQGLQGA QMGQPWCFFPPSYPSYKLENLSSSEMGYTATLTRTTPFFPKDILTLRLDVM METENRLH</p>

	<p>FTIKDPANRRYEVPLETPRVHSRAPSPLYSVFSEEPFGVIVHRQLDGRVLLN TTVAPLF</p> <p>FADQFLQLSTSLPSQYITGLAEHLSPLMLSTSWTRITLWNRDLAPTPGANLY GSHPFYLA</p> <p>LEDGGSAHGVFLLNSNAMDVVLQSPALSWRSTGGILDVYIFLGPEPKSVV QQYLDVVG Y</p> <p>PFMPYWG LGFHL CRW GYSSTAITRQVVENMTRAHFPLDVQWNDLDYMD SRRDFTFNKDG</p> <p>FRDFPAMVQELHQGGRRYMMIVDPAISSSGPAGSYRPYDEGLRRGVFITNE TGQPLIGKV</p> <p>WPGSTAFP DFTNPTALAWWEDMVAEFHDQVPFDGMWIDMNEPSNFIRGSE DGCPNNELEN</p> <p>PPYVPGVVG GTLQAATICASSHQFLSTHYNLHNL YGLTEAIASHRALVKAR GTRPFVISR</p> <p>STFAGHGRYAGHWTGDVWSSWEQLASSVPEILQFNLLGVPLVGADVCGFL GNTSEELCVR</p> <p>WTQLGAFYPFMRNHNSLLSLPQEPYSFSEPAQQAMRKALTRYALLPHLYT LFHQAHVAG</p> <p>ETVARPLFLEFPKDSSTWTVDHQLLWGEALLITPVLQAGKAEVTGYFPLGT WYDLQTVPI</p> <p>EALGSLPPPPAAPREPAIHSEGQWVTLPAPLDTINVHLRAGYIIPLQGPGLTT TESRQQP</p> <p>MALAVALTGGGEARGELFWDDGESLEVLERGAYTQVIFLARNNTIVNELV RVTSEGAGLQ</p> <p>LQKVTVLGVATAPQQVLSNGVPVSNFTYSPDTKVLDICVSLLMGEQFLVSW C</p>
4	<p>MGVRHPPCSHRLLA VCALVSLATAALLGHILLHDFLLVPRELSGSSPVLEET HPAHQQA</p> <p>SRPGPRDAQAHPGRPRAVPTQCDVPPNSRFD CAPDKAITQE QCEARGCCYIP AKQGLQGA</p> <p>QMGQPWCFFPPSYPSYKLENLSSEMGYTATLTRTTPTFFPKDILTRLRDVM METENRLH</p> <p>FTIKDPANRRYEVPLET PHVHSRAPSPLYSVFSEEPFGVIVRRQLDGRVLLN TTVAPLF</p> <p>FADQFLQLSTSLPSQYITGLAEHLSPLMLSTSWTRITLWNRDLAPTPGANLY GSHPFYLA</p> <p>LEDGGSAHGVFLLNSNAMDVVLQSPALSWRSTGGILDVYIFLGPEPKSVV QQYLDVVG Y</p> <p>PFMPYWG LGFHL CRW GYSSTAITRQVVENMTRAHFPLDVQWNDLDYMD SRRDFTFNKDG</p> <p>FRDFPAMVQELHQGGRRYMMIVDPAISSSGPAGSYRPYDEGLRRGVFITNE</p>

	<p>TGQPLIGKV</p> <p>WPGSTAFPFTNPTALAWWEDMVAEFHDQVPFDGMWIDMNEPSNFIRGSE DGCPNNELEN</p> <p>PPYVPGVVGGLQAATICASSHQFLSTHYNLHNLGLTEAIASHRALVKAR GTRPFVISR</p> <p>STFAGHGRYAGHWTGDVWSSWEQLASSVPEILQFNLLGVPLVGADVCGFL GNTSEELCVR</p> <p>WTQLGAFYPFMRNHNSLLSLPQEPYSFSEPAQQAMRKALTRYALLPHLYT LFHQAHVAG</p> <p>ETVARPLFLEFPKDSSTWTVDHQLLWGEALLITPVLQAGKAEVTGYFPLGT WYDLQTVPV</p> <p>EALGSLPPPPAAPREPAIHSEGQWVTLPAPLDTINVHLRAGYIIPLQGPGLTT TESRQQP</p> <p>MALAVALTGGGEARGELFWDDGESLEVLERGAYTQVIFLARNNTIVNELV RVTSEGAGLQ</p> <p>LQKVTVLGVATAPQQVLSNGVPVSNFTYSPDTKVLDICVSLLMGEQFLVSW C</p>
<p>5</p>	<p>QQGASRPGPRDAQAHPGRPRAVPTQCDVPPNSRFDCAFDKAITQEQCEARG CCYIPAKQG</p> <p>LQGAQMGPWCFFPPSYPSYKLENLSSSEMGYTATLRTTPTFFPKDILTLR LDVMMETE</p> <p>NRLHFTIKDPANRRYEVPLETPRVHSRAPSPLYSVEFSEEPFGVIVHRQLDGR VLLNTTV</p> <p>APLFFADQFLQLSTSLPSQYITGLAEHLSPLMLSTSWTRITLWNRDLAPTPGA NLYGSHP</p> <p>FYLALEDGGSAHGVFLLNSNAMDVVLQSPALSWRSTGGILDVYIFLGPEP KSVVQQYLD</p> <p>VVGYPFMPYWGGLGFHLCRWGYSSATAIRQVVENMTRAHFPLDVQWNDL DYMDSRRDFTF</p> <p>NKDGFRDFPAMVQELHQGGRRYMMIVDPAISSSGPAGSYRPHYDEGLRRGV FITNETGQPL</p> <p>IGKVWPGSTAFPFTNPTALAWWEDMVAEFHDQVPFDGMWIDMNEPSNFI RGSEDGCPNN</p> <p>ELENPPYVPGVVGGLQAATICASSHQFLSTHYNLHNLGLTEAIASHRALV KARGTRPF</p> <p>VISRSTFAGHGRYAGHWTGDVWSSWEQLASSVPEILQFNLLGVPLVGADV CGFLGNTSEE</p> <p>LCVRWTQLGAFYPFMRNHNSLLSLPQEPYSFSEPAQQAMRKALTRYALLP HLYTLFHQA</p> <p>HVAGETVARPLFLEFPKDSSTWTVDHQLLWGEALLITPVLQAGKAEVTGYF PLGTWYDLQ</p>

TVPIEALGSLPPPPAAPREPAIHSEGQWVTLPAPLDTINVHLRAGYIIPLQGGPGLTTTES
RQQPMALAVALTKEGGEARGELFWDDGESLEVLERGAYTQVIFLARNTIVNELVRVTSEG
AGLQLQKVTVLGVATAPQQVLSNGVPVSNFTYSPDTKVLDICVSLLMGEQFLVSWC

В некоторых вариантах осуществления rhGAA характеризуется аминокислотной последовательностью GAA дикого типа, представленной под SEQ ID NO: 1, как описано в патенте США № 8592362, и имеет номер доступа в GenBank AHE24104.1 (GI:568760974). В некоторых вариантах осуществления rhGAA характеризуется аминокислотной последовательностью GAA дикого типа, кодируемой SEQ ID NO: 2, последовательность mRNA которой имеет номер доступа в GenBank Y00839.1. В некоторых вариантах осуществления rhGAA характеризуется аминокислотной последовательностью GAA дикого типа, представленной под SEQ ID NO: 3. В некоторых вариантах осуществления rhGAA характеризуется аминокислотной последовательностью GAA, представленной под SEQ ID NO: 4, и имеет номер доступа в Национальном центре биотехнологической информации (NCBI) NP_000143.2. В некоторых вариантах осуществления rhGAA представляет собой алглюкозидазу альфа, фермент человеческую кислотную α -глюкозидазу, кодируемую наиболее преобладающим из девяти наблюдаемых гаплотипов гена GAA.

В некоторых вариантах осуществления rhGAA изначально экспрессируется как имеющая полноразмерную последовательность GAA дикого типа из 952 аминокислот, приведенная под SEQ ID NO: 1, и при этом rhGAA подвергается внутриклеточному процессингу, при котором удаляется часть аминокислот, например первые 56 аминокислот. Соответственно, rhGAA, секретлируемая клеткой-хозяином, может содержать более короткую аминокислотную последовательность, чем rhGAA, которая изначально экспрессировалась в клетке. В одном варианте осуществления более короткий белок характеризуется аминокислотной последовательностью, представленной под SEQ ID NO: 5, которая отличается от SEQ ID NO: 1 только тем, что первые 56 аминокислот, содержащие сигнальный пептид и пептид-предшественник, были удалены с получением таким образом белка, содержащего 896 аминокислот. Также возможны другие отличия в количестве аминокислот, как например, наличие 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 или больше делеций, замен и/или вставок по

сравнению с аминокислотной последовательностью, описанной под SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления продукт на основе rhGAA содержит смесь молекул рекомбинантной человеческой кислой α -глюкозидазы, имеющих разную длину в аминокислотах.

В некоторых вариантах осуществления rhGAA содержит аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90%, 95%, 98% или 99% идентична последовательности под SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 5. Для расчета идентичности двух последовательностей можно использовать различные алгоритмы и/или программы для выравнивания, в том числе FASTA или BLAST, которые доступны как часть программного пакета для анализа последовательностей GCG (Висконсинский университет, Мэдисон, Висконсин, США), и их можно использовать, например, с настройками по умолчанию. Например, предусмотрены полипептиды, на по меньшей мере 90%, 95%, 98% или 99% идентичные конкретным полипептидам, описанным в данном документе, и предпочтительно проявляющие практически такие же функции, а также полинуклеотиды, кодирующие такие полипептиды. Если не указано иное, то расчет показателя сходства будет основываться на применении BLOSUM62. В случае применения BLASTP процентное значение сходства основывается на положительных показателях BLASTP, а процентное значение идентичности последовательностей основывается на показателе идентичностей в BLASTP. «Показатели идентичности» согласно BLASTP показывают количество и долю общих остатков в парах последовательностей с высоким показателем подобия, которые являются идентичными; и «положительные показатели» согласно BLASTP показывают количество и долю остатков, для которых показатели выравнивания имеют положительные значения и которые имеют схожесть друг с другом. В настоящем изобретении предусмотрены и охватываются аминокислотные последовательности, характеризующиеся этими степенями идентичности или сходства или любой промежуточной степенью идентичности или сходства с аминокислотными последовательностями, раскрытыми в данном документе. Полинуклеотидные последовательности сходных полипептидов выводятся с помощью генетического кода и могут быть получены с помощью традиционных способов, в частности, посредством восстановления по их аминокислотным последовательностям с использованием генетического кода.

В некоторых вариантах осуществления rhGAA подвергается посттрансляционным и/или химическим модификациям в одном или более аминокислотных остатках белка. Например, метиониновые и триптофановые остатки могут подвергаться окислению. В качестве другого примера N-концевой глутамин может образовывать пироглутамат. В качестве другого примера аспарагиновые остатки могут подвергаться дезамидированию до аспарагиновой кислоты. В качестве еще одного примера остатки аспарагиновой кислоты могут подвергаться изомеризации до изоаспарагиновой кислоты. В качестве еще одного примера неспаренные цистеиновые остатки в белке могут образовывать дисульфидные связи со свободным глутатионом и/или цистеином. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления фермент изначально экспрессируется как содержащий аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 5, или аминокислотную последовательность, кодируемую SEQ ID NO: 2, и при этом фермент подвергается одной или более из этих посттрансляционных и/или химических модификаций. Такие модификации также входят в объем настоящего изобретения.

III. N-связанное гликозилирование rhGAA

В одиночной молекуле rhGAA существует семь потенциальных сайтов N-связанного гликозилирования. Эти потенциальные сайты гликозилирования находятся в следующих положениях SEQ ID NO: 5: N84, N177, N334, N414, N596, N826 и N869. Подобным образом, для полноразмерной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1 эти потенциальные сайты гликозилирования находятся в следующих положениях: N140, N233, N390, N470, N652, N882 и N925. Другие варианты rhGAA могут содержать аналогичные сайты гликозилирования в зависимости от местоположения аспарагиновых остатков. Обычно последовательности Asn-X-Ser или Asn-X-Thr в аминокислотной последовательности белка указывают на потенциальные сайты гликозилирования, за исключением того, что X не может являться His или Pro.

Молекулы rhGAA, описанные в данном документе, могут содержать в среднем 1, 2, 3 или 4 маннозо-6-фосфатные (M6P) группы на своих N-гликанах. Например, только один N-гликан в молекуле rhGAA может нести M6P (монофосфорилированный или моно-M6P), отдельный N-гликан может нести две группы M6P (бисфосфорилированный или бис-M6P) или каждый из двух разных N-гликанов в одной и той же молекуле rhGAA может нести отдельные группы M6P. В некоторых

вариантах осуществления молекулы rhGAA, описанные в данном документе, в среднем содержат 3-4 группы М6Р на своих N-гликанах. Молекулы рекомбинантной человеческой кислой α -глюкозидазы также могут содержать N-гликаны, не несущие группы М6Р. В другом варианте осуществления в среднем rhGAA содержит более чем 2,5 моль М6Р в пересчете на моль rhGAA и более чем 4 моль сиаловой кислоты в пересчете на моль rhGAA. В некоторых вариантах осуществления в среднем rhGAA содержит приблизительно 3-3,5 моль М6Р в пересчете на моль rhGAA. В некоторых вариантах осуществления в среднем rhGAA содержит приблизительно 4-5,4 моль сиаловой кислоты в пересчете на моль rhGAA. В среднем по меньшей мере приблизительно 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10% или 20% от общего количества N-гликанов в rhGAA может присутствовать в виде моно-М6Р N-гликана, например, приблизительно 6,25% от общего количества N-гликанов могут нести отдельную М6Р-группу, и в среднем по меньшей мере приблизительно 0,5, 1, 1,5, 2,0, 2,5, 3,0% от общего количества N-гликанов в rhGAA находятся в форме бис-М6Р N-гликана, и в среднем менее чем 25% от общего количества rhGAA по настоящему изобретению не содержит фосфорилированного N-гликана, связывающегося с CIMPR. В некоторых вариантах осуществления в среднем от приблизительно 10% до приблизительно 14% от общего количества N-гликанов на rhGAA являются монофосфорилированными. В некоторых вариантах осуществления в среднем от приблизительно 7% до приблизительно 25% от общего количества N-гликанов на rhGAA являются бисфосфорилированными. В некоторых вариантах осуществления в среднем rhGAA содержит приблизительно 1,3 моль бис-М6Р в пересчете на моль rhGAA.

rhGAA, описанная в данном документе, может характеризоваться средним содержанием N-гликанов, несущих М6Р, в диапазоне от 0,5 до 7,0 моль М6Р в пересчете на моль rhGAA или любое промежуточное значение в поддиапазоне, в том числе 0,5, 1,0, 1,5, 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5 или 7,0 моль М6Р в пересчете на моль rhGAA. rhGAA можно фракционировать для получения препаратов на основе rhGAA с разными средними количествами N-гликанов, несущих М6Р или несущих бис-М6Р, что таким образом дает возможность осуществлять дополнительную индивидуальную адаптацию нацеливания rhGAA на лизосомы в целевых тканях путем отбора конкретной фракции или посредством избирательного объединения различных фракций.

В некоторых вариантах осуществления не более 60% N-гликанов в rhGAA может быть полностью сиалировано, например, не более 10%, 20%, 30%, 40%, 50% или 60% N-гликанов может быть полностью сиалировано. В некоторых вариантах осуществления не более чем 50% N-гликанов в rhGAA являются полностью сиалированными. В некоторых вариантах осуществления от 4% до 20% от общего количества N-гликанов являются полностью сиалированными. В других вариантах осуществления не более чем 5%, 10%, 20% или 30% N-гликанов в rhGAA несут сиаловую кислоту и концевой остаток галактозы (Gal). Данный диапазон включает все промежуточные значения и поддиапазоны, например, от 7 до 30% от общего количества N-гликанов в rhGAA могут нести сиаловую кислоту и концевую галактозу. В еще одних вариантах осуществления не более чем 5%, 10%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19% или 20% N-гликанов в rhGAA имеют только концевую галактозу и не содержат сиаловую кислоту. Этот диапазон включает все промежуточные значения и поддиапазоны, например, от 8% до 19% общих N-гликанов в rhGAA в композиции могут содержать только концевую галактозу и не содержать сиаловую кислоту.

В некоторых вариантах осуществления от 40%, 45%, 50%, 55% до 60% от общего количества N-гликанов в rhGAA представляют собой N-гликаны комплексного типа; или не более чем 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7% от общего количества N-гликанов в rhGAA в композиции представляют собой N-гликаны гибридного типа; не более чем 5%, 10%, 15%, 20% или 25% N-гликанов высокоманнозного типа в rhGAA являются нефосфорилированными; по меньшей мере 5% или 10% N-гликанов типа в rhGAA являются монофосфорилированными; и/или по меньшей мере 1% или 2% N-гликанов высокоманнозного типа в rhGAA являются бисфосфорилированными. Эти значения включают все промежуточные значения и поддиапазоны. rhGAA может соответствовать одному или более диапазонам содержания, описанным выше.

В некоторых вариантах осуществления rhGAA может нести в среднем от 2,0 до 8,0 моль остатков сиаловой кислоты в пересчете на моль rhGAA. Этот диапазон включает все промежуточные значения и поддиапазоны, в том числе 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5 и 8,0 моль остатков сиаловой кислоты в пересчете на моль rhGAA. Не ограничиваясь какой-либо теорией, полагают, что присутствие N-гликановых звеньев, несущих остатки сиаловой кислоты, может предотвратить непродуктивное выведение rhGAA посредством асиалогликопротеиновых рецепторов.

В различных вариантах осуществления ghGAA содержит определенный профиль N-гликозилирования в определенных потенциальных сайтах N-гликозилирования. В некоторых вариантах осуществления ghGAA содержит семь потенциальных сайтов N-гликозилирования. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 20% ghGAA являются фосфорилированными по первому потенциальному сайту N-гликозилирования (например, N84 в SEQ ID NO: 5 и N140 в SEQ ID NO: 1). Например, по меньшей мере 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% ghGAA могут быть фосфорилированы по первому потенциальному сайту N-гликозилирования. Это фосфорилирование может представлять собой результат присутствия звеньев моно-М6Р и/или бис-М6Р. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% ghGAA несут звено моно-М6Р в первом потенциальном сайте N-гликозилирования. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% ghGAA несут звено бис-М6Р в первом потенциальном сайте N-гликозилирования. В некоторых вариантах осуществления ghGAA в среднем содержит приблизительно 1,4 моль М6Р (моно-М6Р и бис-М6Р) в пересчете на моль ghGAA в первом потенциальном сайте N-гликозилирования. В некоторых вариантах осуществления ghGAA в среднем содержит по меньшей мере 0,5 моль бис-М6Р в пересчете на моль ghGAA в первом потенциальном сайте N-гликозилирования. В некоторых вариантах осуществления ghGAA в среднем содержит приблизительно 0,25 моль моно-М6Р в пересчете на моль ghGAA в первом потенциальном сайте N-гликозилирования. В некоторых вариантах осуществления ghGAA в среднем содержит от приблизительно 0,2 моль до приблизительно 0,3 моль сиаловой кислоты в пересчете на моль ghGAA в первом потенциальном сайте N-гликозилирования. В по меньшей мере одном варианте осуществления ghGAA характеризуется занятостью первого потенциального сайта N-гликозилирования, как изображено на фиг. 6А, и профилем N-гликозилирования, как изображено на фиг. 6В. В по меньшей мере одном варианте осуществления ghGAA характеризуется занятостью первого потенциального сайта N-гликозилирования, как изображено на фиг. 32А, и профилем N-гликозилирования, как изображено на фиг. 32В или фиг. 33В.

В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 20% ghGAA являются фосфорилированными по второму потенциальному сайту N-гликозилирования

(например, N177 в SEQ ID NO: 5 и N223 в SEQ ID NO: 1). Например, по меньшей мере 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% rhGAA могут быть фосфорилированы по второму сайту N-гликозилирования. Это фосфорилирование может представлять собой результат присутствия звеньев моно-М6Р и/или бис-М6Р. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% rhGAA несут звено моно-М6Р во втором сайте N-гликозилирования. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% rhGAA несут звено бис-М6Р во втором сайте N-гликозилирования. В некоторых вариантах осуществления rhGAA в среднем содержит приблизительно 0,5 моль М6Р (моно-М6Р и бис-М6Р) в пересчете на моль rhGAA во втором потенциальном сайте N-гликозилирования. В некоторых вариантах осуществления rhGAA в среднем содержит от приблизительно 0,4 моль до приблизительно 0,6 моль моно-М6Р в пересчете на моль rhGAA во втором потенциальном сайте N-гликозилирования. В по меньшей мере одном варианте осуществления rhGAA характеризуется занятостью второго потенциального сайта N-гликозилирования, как изображено на фиг. 6А, и профилем N-гликозилирования, как изображено на фиг. 6С. В по меньшей мере одном варианте осуществления rhGAA характеризуется занятостью второго потенциального сайта N-гликозилирования, как изображено на фиг. 32А, и профилем N-гликозилирования, как изображено на фиг. 32С или фиг. 33В.

В одном или более вариантах осуществления по меньшей мере 5% rhGAA являются фосфорилированными в третьем потенциальном сайте N-гликозилирования (например, N334 в SEQ ID NO: 5 и N390 в SEQ ID NO: 1). В других вариантах осуществления менее чем 5%, 10%, 15%, 20% или 25% rhGAA являются фосфорилированными по третьему потенциальному сайту N-гликозилирования. Например, третий потенциальный сайт N-гликозилирования может содержать комбинацию нефосфорилированных высокоманнозных N-гликанов, двух-, трех- и четырехантенных комплексных N-гликанов и гибридных N-гликанов в качестве основных форм. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 3%, 5%, 8%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45% или 50% rhGAA являются сialiрированными по третьему потенциальному сайту N-гликозилирования. В некоторых вариантах осуществления rhGAA в среднем содержит от приблизительно 0,9 моль до приблизительно 1,2 моль

сиаловой кислоты в пересчете на моль rhGAA в третьем потенциальном сайте N-гликозилирования. В по меньшей мере одном варианте осуществления rhGAA характеризуется занятостью третьего потенциального сайта N-гликозилирования, как изображено на фиг. 6A, и профилем N-гликозилирования, как изображено на фиг. 6D. В по меньшей мере одном варианте осуществления rhGAA характеризуется занятостью третьего потенциального сайта N-гликозилирования, как изображено на фиг. 32A, и профилем N-гликозилирования, как изображено на фиг. 32D или фиг. 33B.

В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 20% rhGAA являются фосфорилированными по четвертому потенциальному сайту N-гликозилирования (например, N414 в SEQ ID NO: 5 и N470 в SEQ ID NO: 1). Например, по меньшей мере 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% rhGAA могут быть фосфорилированы по четвертому потенциальному сайту N-гликозилирования. Это фосфорилирование может представлять собой результат присутствия звеньев моно-М6P и/или бис-М6P. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% rhGAA несут звено моно-М6P в четвертом потенциальном сайте N-гликозилирования. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% rhGAA несут звено бис-М6P в четвертом потенциальном сайте N-гликозилирования. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 3%, 5%, 8%, 10%, 15%, 20% или 25% rhGAA являются сиалированными по четвертому потенциальному сайту N-гликозилирования. В некоторых вариантах осуществления rhGAA в среднем содержит приблизительно 1,4 моль М6P (моно-М6P и бис-М6P) в пересчете на моль rhGAA в четвертом потенциальном сайте N-гликозилирования. В некоторых вариантах осуществления rhGAA в среднем содержит от приблизительно 0,4 моль до приблизительно 0,6 моль бис-М6P в пересчете на моль rhGAA в четвертом потенциальном сайте N-гликозилирования. В некоторых вариантах осуществления rhGAA в среднем содержит от приблизительно 0,3 моль до приблизительно 0,4 моль моно-М6P в пересчете на моль rhGAA в четвертом потенциальном сайте N-гликозилирования. В по меньшей мере одном варианте осуществления rhGAA характеризуется занятостью четвертого потенциального сайта N-гликозилирования, как изображено на фиг. 6A, и профилем N-гликозилирования, как изображено на фиг. 6E. В по меньшей мере одном варианте осуществления rhGAA характеризуется занятостью

четвертого потенциального сайта N-гликозилирования, как изображено на фиг. 32А, и профилем N-гликозилирования, как изображено на фиг. 32Е или фиг. 33В.

В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 5% rhGAA являются фосфорилированными по пятому потенциальному сайту N-гликозилирования (например, N596 в SEQ ID NO: 5 и N692 в SEQ ID NO: 1). В других вариантах осуществления менее чем 5%, 10%, 15%, 20% или 25% rhGAA являются фосфорилированными по пятому потенциальному сайту N-гликозилирования. Например, пятый потенциальный сайт N-гликозилирования может содержать фукозилированные двухантенные комплексные N-гликаны в качестве основных форм. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 3%, 5%, 8%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% rhGAA являются сиалированными по пятому потенциальному сайту N-гликозилирования. В некоторых вариантах осуществления rhGAA в среднем содержит от приблизительно 0,8 моль до приблизительно 0,9 моль сиаловой кислоты в пересчете на моль rhGAA в пятом потенциальном сайте N-гликозилирования. В по меньшей мере одном варианте осуществления rhGAA характеризуется занятостью пятого потенциального сайта N-гликозилирования, как изображено на фиг. 6А, и профилем N-гликозилирования, как изображено на фиг. 6F. В по меньшей мере одном варианте осуществления rhGAA характеризуется занятостью пятого потенциального сайта N-гликозилирования, как изображено на фиг. 32А, и профилем N-гликозилирования, как изображено на фиг. 32F или фиг. 33В.

В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 5% rhGAA являются фосфорилированными по шестому сайту N-гликозилирования (например, N826 в SEQ ID NO: 5 и N882 в SEQ ID NO: 1). В других вариантах осуществления менее чем 5%, 10%, 15%, 20% или 25% rhGAA являются фосфорилированными по шестому сайту N-гликозилирования. Например, шестой сайт N-гликозилирования может содержать комбинацию из двух-, трех- и четырехантенных комплексных N-гликанов в качестве основных форм. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 3%, 5%, 8%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% rhGAA являются сиалированными по шестому сайту N-гликозилирования. В некоторых вариантах осуществления rhGAA в среднем содержит от приблизительно 1,5 моль до приблизительно 4,2 моль сиаловой кислоты в пересчете

на моль rhGAA в шестом потенциальном сайте N-гликозилирования. В некоторых вариантах осуществления rhGAA в среднем содержит приблизительно 0,9 моль ацетилированной сиаловой кислоты в пересчете на моль rhGAA в шестом потенциальном сайте N-гликозилирования. В по меньшей мере одном варианте осуществления rhGAA характеризуется занятостью шестого потенциального сайта N-гликозилирования, как изображено на фиг. 6A, и профилем N-гликозилирования, как изображено на фиг. 6G. В по меньшей мере одном варианте осуществления rhGAA характеризуется занятостью шестого потенциального сайта N-гликозилирования, как изображено на фиг. 32A, и профилем N-гликозилирования, как изображено на фиг. 32G или фиг. 33B.

В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 5% rhGAA являются фосфорилированными по седьмому потенциальному сайту N-гликозилирования (например, N869 в SEQ ID NO: 5 и N925 в SEQ ID NO: 1). В других вариантах осуществления менее чем 5%, 10%, 15%, 20% или 25% rhGAA являются фосфорилированными по седьмому потенциальному сайту N-гликозилирования. В некоторых вариантах осуществления менее чем 40%, 45%, 50%, 55%, 60% или 65% rhGAA содержат какой-либо N-гликан в седьмом потенциальном сайте N-гликозилирования. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 30%, 35% или 40% rhGAA содержат N-гликан в седьмом потенциальном сайте N-гликозилирования. В некоторых вариантах осуществления rhGAA в среднем содержит приблизительно 0,86 моль сиаловой кислоты в пересчете на моль rhGAA в седьмом потенциальном сайте N-гликозилирования. В по меньшей мере одном варианте осуществления все N-гликаны, идентифицированные в седьмом потенциальном сайте N-гликозилирования, представляют собой комплексные N-гликаны. В по меньшей мере одном варианте осуществления rhGAA характеризуется занятостью седьмого потенциального сайта N-гликозилирования, как изображено на фиг. 6A или как изображено на фиг. 32A, и профилем N-гликозилирования, как изображено на фиг. 32H или фиг. 33B.

В некоторых вариантах осуществления rhGAA в среднем содержит 3-4 остатка М6Р на молекулу rhGAA и от приблизительно 4 до приблизительно 7,3 моль сиаловой кислоты в пересчете на моль rhGAA. В некоторых вариантах осуществления rhGAA дополнительно содержит в среднем по меньшей мере приблизительно 0,5 моль бис-

М6Р в пересчете на моль ghGAA в первом потенциальном сайте N-гликозилирования, от приблизительно 0,4 до приблизительно 0,6 моль моно-М6Р в пересчете на моль ghGAA во втором потенциальном сайте N-гликозилирования, от приблизительно 0,9 до приблизительно 1,2 моль сиаловой кислоты в пересчете на моль ghGAA в третьем потенциальном сайте N-гликозилирования, от приблизительно 0,4 до приблизительно 0,6 моль бис-М6Р в пересчете на моль ghGAA в четвертом потенциальном сайте N-гликозилирования, от приблизительно 0,3 до приблизительно 0,4 моль моно-М6Р в пересчете на моль ghGAA в четвертом потенциальном сайте N-гликозилирования, от приблизительно 0,8 до приблизительно 0,9 моль сиаловой кислоты в пересчете на моль ghGAA в пятом потенциальном сайте N-гликозилирования и от приблизительно 1,5 до приблизительно 4,2 моль сиаловой кислоты в пересчете на моль ghGAA в шестом потенциальном сайте N-гликозилирования. В по меньшей мере одном осуществлении ghGAA дополнительно содержит в среднем приблизительно 0,86 моль сиаловой кислоты в пересчете на моль ghGAA в седьмом потенциальном сайте N-гликозилирования. В по меньшей мере одном варианте осуществления ghGAA содержит семь занятых потенциальных сайтов N-гликозилирования и профиль N-гликозилирования, как изображено на фиг. 6А-6Н. В по меньшей мере одном варианте осуществления ghGAA содержит семь занятых потенциальных сайтов N-гликозилирования и профиль N-гликозилирования, как изображено на фиг. 32А-32Н и фиг. 33А-33В.

Способы получения ghGAA раскрыты в предварительной заявке на патент США № 62/057842, поданной 30 сентября 2014 г., полное содержание которой включено в данный документ посредством ссылки.

После поступления в лизосому, ghGAA может ферментативным путем расщеплять накопленный гликоген. Однако традиционные продукты на основе ghGAA характеризуются низкими общими уровнями N-гликанов, несущих моно-М6Р и бис-М6Р, и таким образом в недостаточной степени нацеливаются на мышечные клетки, результатом чего является неудовлетворительная доставка ghGAA в лизосомы. Большинство молекул ghGAA в этих традиционных продуктах не содержит фосфорилированных N-гликанов, из-за чего они характеризуются недостаточной аффинностью к CIMPR. Рецептор маннозы также может освобождаться от высокоманнозных нефосфорилированных N-гликанов, что приводит к

непродуктивному выведению средства для ERT (фиг. 2B). В отличие от этого, как показано на фиг. 2A, rhGAA, описанная в данном документе, может содержать большее количество моно-М6P- и бис-М6P-содержащих N-гликанов, что приводит к продуктивному поглощению rhGAA в определенных тканях, таких как мышцы.

IV. Получение и очистка N-связанной гликозилированной формы rhGAA

Как описано в международной заявке PCT/US2015/053252, полное содержание которой включено в настоящее описание посредством ссылки, клетки, такие как клетки яичника китайского хомячка (CHO), можно использовать для получения описанной в ней rhGAA. Путь экспрессии rhGAA с высоким содержанием М6P в клетках CHO является предпочтительным по сравнению с изменением гликанового профиля rhGAA посттрансляционно, по меньшей мере частично, потому что только благодаря ему возможно преобразование путем деградации гликана в форму rhGAA с оптимальным гидролизом гликогена, с повышением таким образом терапевтической эффективности.

В некоторых вариантах осуществления rhGAA предпочтительно вырабатывается одной или более клеточными линиями CHO, которые трансформированы ДНК-конструкцией, кодирующей описанную в них rhGAA. Такие линии клеток CHO могут содержать несколько копий гена, как например, 5, 10, 15 или 20 или больше копий полинуклеотида, кодирующего GAA. ДНК-конструкции, которые экспрессируют аллельные варианты кислой α -глюкозидазы или аминокислотные последовательности других вариантов кислой α -глюкозидазы, как например таких, которые на по меньшей мере 90%, 95%, 98% или 99% идентичны SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 5, можно сконструировать и экспрессировать в клетках CHO. Специалисты в данной области могут выбрать альтернативные векторы, подходящие для трансформации клеток CHO, для получения таких ДНК-конструкций.

Способы получения таких клеточных линий CHO описаны в международной заявке PCT/US2015/053252, полное содержание которой включено в данный документ посредством ссылки. Вкратце, эти способы включают трансформацию клетки CHO с помощью ДНК, кодирующей GAA или вариант GAA, отбор клетки CHO, в хромосому(-ы) которой(-ых) стабильно интегрируется ДНК, кодирующая GAA, и которая стабильно экспрессирует GAA, и отбор клетки CHO, которая экспрессирует GAA, характеризующуюся высоким содержанием гликанов, несущих М6P или бис-М6P, и

необязательно отбор клетки CHO, содержащей N-гликаны с высоким содержанием сиаловой кислоты и/или имеющей низкое содержание нефосфорилированных высокоманнозных N-гликанов. Отобранные CHO можно применять для получения rhGAA и композиций на основе rhGAA путем культивирования линий клеток CHO и извлечения указанной композиции из культуры клеток CHO. В некоторых вариантах осуществления rhGAA, полученная из отобранных клеточных линий CHO, содержит большое количество N-гликанов, несущих моно-М6Р или бис-М6Р, которые обеспечивают нацеливание на CIMPR. В некоторых вариантах осуществления rhGAA, полученная как описано в данном документе, характеризуется низкими уровнями содержания комплексных N-гликанов с концевой галактозой. В некоторых вариантах осуществления отобранные клеточные линии CHO называются GA-ATB200 или ATB200-X5-14. В некоторых вариантах осуществления отобранные клеточные линии CHO включают субкультуру или производное такой культуры клеток CHO. В некоторых вариантах осуществления rhGAA, полученная из отобранных клеточных линий CHO, обозначается как ATB200.

rhGAA, полученную как описано в данном документе, можно очищать с помощью следующих способов, описанных в международной заявке PCT/US2017/024981 и в предварительной заявке США № 62/506569, обе из которых включены в настоящее описание посредством ссылки во всей своей полноте. Иллюстративный процесс получения, захвата и очистки rhGAA, полученной из клеточных линий CHO, показан на фиг. 3.

Вкратце, биореактор 601 содержит культуру клеток, таких как клетки CHO, которые экспрессируют и секретируют rhGAA в окружающую жидкую культуральную среду. Биореактор 601 может представлять собой любой подходящий биореактор для культивирования клеток, такой как перфузионный биореактор, биореактор с однократной загрузкой или биореактор с периодической загрузкой. Культуральную среду удаляют из биореактора через период времени, достаточный для получения rhGAA. Такое удаление среды может быть непрерывным для перфузионного биореактора или может быть периодическим для реактора с однократной или периодической загрузкой. Среду можно фильтровать с помощью системы 603 фильтрации для удаления клеток. Система 603 фильтрации может представлять собой любую подходящую систему фильтрации, в том числе систему фильтрации с

переменным тангенциальным потоком (ATF), систему фильтрации с тангенциальным потоком (TFF) и/или систему центробежной фильтрации. В различных вариантах осуществления в системе фильтрации используется фильтр с размером пор от приблизительно 10 нанометров до приблизительно 2 микрометров.

После фильтрации фильтрат загружают в систему 605 захвата белка. Система 605 захвата белка может содержать одну или более хроматографических колонок. Если используется более чем одна хроматографическая колонка – тогда колонки можно разместить последовательно, так что загрузка следующей колонки может начаться сразу после загрузки первой колонки. В качестве альтернативы, процесс удаления среды можно остановить на время переключения колонок.

В различных вариантах осуществления система 605 захвата белка включает одну или более анионообменных (AEX) колонок для непосредственного захвата rhGAA, в частности rhGAA, имеющей высокое содержание МР. После загрузки rhGAA в систему 605 захвата белка rhGAA элюируют из колонки(-ок) с помощью изменения рН и/или содержания солей в колонке. Иллюстративные условия для колонки для AEX приведены в таблице 2.

Таблица 2. Иллюстративные условия для колонки для AEX

Процедура	Буфер	Скорость потока (см/ч.)	Объем (CV)	Температура (°C)
Санитарная обработка перед использованием	0,1-10 М NaOH	≤ 25-2500	≥ 1-3 (≥ 10-120 мин.)	15–25
Предварительное уравнивание	20-2000 мМ фосфатный буфер (PB), рН 6,9-7,3	≤ 25-2500	≥ 1-5	15–25
Уравнивание	4-400 мМ PB, рН 6,9-7,3	≤ 25-2500	≥ 1-5	2–15
Загрузка	Н/д	≤ 10-1000	Н/д	2–15
Промывание 1	4-400 мМ PB, рН 6,9-7,3	≤ 25-2500	≥ 2-10	2–15
Промывание 2	4-400 мМ PB, рН 6,9-7,3	≤ 25-2500	≥ 2-10	15–25
Элюирование	4-400 мМ PB, 20-2000 мМ NaCl, рН 6,1-6,5	≤ 25-2500	Н/д	15–25
Десорбирование	4-400 мМ PB, 0,1-10 М NaCl, рН 6,1-6,5	≤ 25-2500	≥ 1-5	15–25

Санитарная обработка после использования	0,1-10 М NaOH	$\leq 25-2500$	$\geq 1-3$ ($\geq 10-120$ мин.)	15–25
Хранение	0,01-1,0 М NaOH	$\leq 25-2500$	$\geq 1-5$	15–25

Элюированную rhGAA можно подвергать дополнительным стадиям очистки и/или стадиям обеспечения качества. Например, элюированную rhGAA можно подвергнуть стадии 607 уничтожения вирусов. Такое уничтожение вирусов 607 может включать одно или более из уничтожения с помощью низкого pH, уничтожения поверхностно-активными веществами или другой методики, известной из уровня техники. rhGAA после стадии 607 уничтожения вирусов можно вводить во вторую хроматографическую систему 609 для дополнительной очистки rhGAA. В качестве альтернативы, элюированную rhGAA из системы 605 захвата белка можно подавать непосредственно во вторую хроматографическую систему 609. В различных вариантах осуществления вторая хроматографическая система 609 включает одну или более колонок для аффинной хроматографии на иммобилизованных ионах металлов (IMAC) для дополнительного удаления примесей. Иллюстративные условия для колонки для IMAC приведены в таблице 3 ниже.

Таблица 3. Иллюстративные условия для колонки для IMAC

Процедура	Буфер	Скорость потока (см/ч.)	Объем (CV)
Ополаскивание	4-400 мМ РВ, pH 6,3-6,7	$\leq 25-2500$	$\geq 1-5$
Санитарная обработка перед использованием	0,01-1,0 М NaOH	$\leq 25-2500$	$\geq 1-3$ (10–30 мин.)
Уравновешивание	4-400 мМ РВ, pH 6,5	$\leq 25-2500$	$\geq 1-5$
Промывание с помощью WFI	Вода для инъекций (WFI)	$\leq 25-2500$	$\geq 1-3$
Хелатирование	0,01-1,0 М ацетат меди	$\leq 25-2500$	$\geq 1-5$
Промывание с помощью WFI	WFI	$\leq 25-2500$	$\geq 2-10$
Промывание	2-200 мМ ацетат натрия, 0,05-5 М	$\leq 25-2500$	$\geq 2-10$

кислым буфером	NaCl, pH 3,5-4,5		
Уравновешивание	4-400 mM PB, pH 6,3-6,7	$\leq 25-2500$	$\geq 1-5$
Холостой прогон с элюирующим буфером	4-400 mM PB, 15-1500 mM глицин, pH 6,1-6,5	$\leq 25-2500$	$\geq 2-20$
Уравновешивание	4-400 mM PB, pH 6,3-6,7	$\leq 25-2500$	$\geq 1-5$
Загрузка	Н/д	$\leq 25-2500$	$\geq 1-5$
Промывание 1	4-400 mM PB, pH 6,3-6,7	$\leq 25-2500$	$\geq 2-10$
Промывание 2	4-400 mM PB, 0,1-10 M NaCl, 5-30% пропиленгликоль, pH 6,3-6,7	$\leq 25-2500$	$\geq 2-10$
Промывание 3	4-400 mM PB, pH 6,3-6,7	$\leq 25-2500$	$\geq 2-10$
Элюирование	4-400 mM PB, 15-1500 mM глицин, pH 6,1-6,5	$\leq 25-2500$	Н/д
Десорбирование	4-400 mM PB, 50-5000 mM имидазол, pH 6,3-6,7	$\leq 25-2500$	$\geq 1-5$
Санитарная обработка после использования	0,01-1M NaOH	$\leq 25-2500$	$\geq 1-3$ (10–30 мин.)
Ополаскивание	4-400 mM PB, pH 6,3-6,7	$\leq 25-2500$	$\geq 1-5$
Хранение	5-30% этанол	$\leq 25-2500$	$\geq 1-5$

После загрузки rhGAA во вторую хроматографическую систему 609 рекомбинантный белок элюируют из колонки(-ок). Элюированную rhGAA можно подвергать стадии 611 уничтожения вирусов. Как и стадия 607 уничтожения вирусов, стадия 611 уничтожения вирусов может включать одно или более из уничтожения с помощью низкого pH, уничтожения поверхностно-активными веществами или другой методики, известной из уровня техники. В некоторых вариантах осуществления используют только одну из стадий 607 или 611 уничтожения вирусов, или процедуры уничтожения вирусов выполняют на одной и той же стадии в процессе очистки.

rhGAA после стадии 611 уничтожения вирусов можно вводить в третью хроматографическую систему 613 для дополнительной очистки рекомбинантного белкового продукта. В качестве альтернативы, элюированный рекомбинантный белок из второй хроматографической системы 609 можно подавать непосредственно в третью хроматографическую систему 613. В различных вариантах осуществления третья

хроматографическая система 613 включает одну или более колонок для катионообменной хроматографии (СЕХ) и/или колонок для эксклюзионной хроматографии (SEC) для дополнительного удаления примесей. Затем продукт на основе rhGAA элюируют из третьей хроматографической системы 613. Иллюстративные условия для колонки для СЕХ приведены в таблице 4 ниже.

Таблица 4. Иллюстративные условия для колонки для СЕХ

Процедура	Буфер	Скорость потока (см/ч.)	Объем (CV)
Санитарная обработка перед использованием	0,1-10 М NaOH	≤ 25-2500	≥ 1-3 (≥ 10-120 мин.)
Уравновешивание	2-200 мМ цитрат натрия, pH 4,0-5,0	≤ 30-3000	≥ 2-10
Загрузка	Н/д	≤ 30-3000	Н/д
Промывание	2-200 мМ цитрат натрия, pH 4,0-5,0	≤ 30-3000	≥ 2-10
Элюирование	2-200 мМ цитрат натрия, 15-1500 мМ NaCl, pH 4,0-5,0	≤ 30-3000	≥ 2-10
Десорбирование	2-200 мМ цитрат натрия, 0,1-10 М NaCl, pH 4,0-5,0	≤ 30-3000	≥ 1-5
Санитарная обработка после использования	0,1-10 М NaOH	≤ 25-2500	≥ 1-3 (≥ 10-120 мин.)
Хранение	0,01-1,0 М NaOH	≤ 30-3000	≥ 1-5

Продукт на основе rhGAA также можно подвергать дополнительной обработке. Например, для удаления вирусов можно применять другую систему 615 фильтрации. В некоторых вариантах осуществления при такой фильтрации можно использовать фильтры с размерами пор от 5 до 50 мкм. Другая обработка продукта может включать стадию 617 корректировки продукта, на которой рекомбинантный белковый продукт можно стерилизовать, фильтровать, концентрировать, хранить и/или добавлять к нему дополнительные компоненты для получения конечного состава продукта.

Используемый в данном документе термин «АТВ200» относится к rhGAA с высоким содержанием N-гликанов, несущих моно-M6P и бис-M6P, которую получают из клеточной линии GA-АТВ200 и очищают с применением способов, описанных в данном документе.

V. Фармацевтическая композиция

В различных вариантах осуществления предусмотрена фармацевтическая композиция, содержащая rhGAA, описанную в данном документе, либо по отдельности, либо в комбинации с другими терапевтическими средствами и/или фармацевтически приемлемым носителем.

В одном или более вариантах осуществления описанная в данном документе фармацевтическая композиция содержит фармацевтически приемлемую соль.

В некоторых вариантах осуществления используемая в данном документе фармацевтически приемлемая соль представляет собой фармацевтически приемлемую соль присоединения кислоты. Фармацевтически приемлемая соль присоединения кислоты может включать в том числе без ограничения хлористоводородную кислоту, бромистоводородную кислоту, серную кислоту, сульфаминовую кислоту, азотную кислоту, фосфорную кислоту и т. п., и органические кислоты, в том числе без ограничения уксусную кислоту, трифторуксусную кислоту, адипиновую кислоту, аскорбиновую кислоту, аспарагиновую кислоту, бензолсульфоновую кислоту, бензойную кислоту, масляную кислоту, камфорную кислоту, камфорсульфоновую кислоту, коричную кислоту, лимонную кислоту, диглюконовую кислоту, этансульфоновую кислоту, глутаминовую кислоту, гликолевую кислоту, глицерофосфорную кислоту, гемисульфатную кислоту, гексановую кислоту, муравьиную кислоту, фумаровую кислоту, 2-гидроксиэтансульфоновую кислоту (изетионовую кислоту), молочную кислоту, гидроксималеиновую кислоту, яблочную кислоту, малоновую кислоту, миндальную кислоту, мезитиленсульфоновую кислоту, метансульфоновую кислоту, нафталинсульфоновую кислоту, никотиновую кислоту, 2-нафталинсульфоновую кислоту, щавелевую кислоту, памовую кислоту, пектиновую кислоту, фенилуксусную кислоту, 3-фенилпропионовую кислоту, пивалевую кислоту, пропионовую кислоту, пировиноградную кислоту, салициловую кислоту, стеариновую

кислоту, янтарную кислоту, сульфаниловую кислоту, винную кислоту, п-толуолсульфоновую кислоту, ундекановую кислоту и т. п.

В некоторых вариантах осуществления используемая в данном документе фармацевтически приемлемая соль представляет собой фармацевтически приемлемую соль присоединения основания. Фармацевтически приемлемая соль присоединения основания может включать без ограничения аммиак или гидроксид, карбонат или бикарбонат аммония или катион металла, такого как натрий, калий, литий, кальций, магний, железо, цинк, медь, марганец, алюминий и т. п. Соли, полученные из фармацевтически приемлемых органических нетоксичных оснований, включают без ограничения соли первичных, вторичных и третичных аминов, четвертичные аммониевые соединения, замещенные амины, в том числе встречающиеся в природе замещенные амины, циклические амины и основные ионообменные смолы, такие как метиламин, диметиламин, триметиламин, этиламин, диэтиламин, триэтиламин, изопропиламин, трипропиламин, трибутиламин, этаноламин, диэтанолламин, 2-диметиламиноэтанол, 2-диэтиламиноэтанол, дициклогексиламин, лизин, аргинин, гистидин, кофеин, гидрабамин, холин, бетаин, этилендиамин, глюкозамин, метилглюкамин, теобромин, пурины, пиперазин, пиперидин, N-этилпиперидин, соединения тетраметиламмония, соединения тетраэтиламмония, пиридин, N,N-диметиланилин, N-метилпиперидин, N-метилморфолин, дициклогексиламин, дибензиламин, N,N-дибензилфенэтиламин, 1-эфенамин, N,N'-дибензилэтилендиамин, полиаминные смолы и т. п.

В некоторых вариантах осуществления rhGAA или ее фармацевтически приемлемая соль могут быть составлены в виде фармацевтической композиции, адаптированной для внутривенного введения. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция представляет собой раствор в стерильном изотоническом водном буфере. При необходимости, композиция может также содержать солубилизирующее средство и местный анестетик для уменьшения болевого ощущения в месте инъекции. Ингредиенты для фармацевтической композиции поставляют по отдельности либо смешанными друг с другом в стандартной лекарственной форме, например, в виде сухого лиофилизированного порошка или безводного концентрата в герметически закрытом контейнере, таком как ампула или саше, с указанием количества активного средства. Если композиция предназначена для введения посредством инфузии, то ее

можно вносить в инфузионную бутылку, содержащую стерильную фармацевтически чистую воду, солевой раствор или смесь декстроза/вода. В некоторых вариантах осуществления инфузию можно осуществлять в больнице или клинике. В некоторых вариантах осуществления инфузию можно осуществлять вне больницы или клиники, например, по месту жительства субъекта. При введении композиции посредством инъекции может предусматриваться ампула со стерильной водой для инъекции или с солевым раствором для того, чтобы ингредиенты можно было смешать перед введением.

В некоторых вариантах осуществления rhGAA или ее фармацевтически приемлемая соль могут быть составлены для перорального введения. Перорально вводимые композиции можно составлять в форме таблеток, капсул, вагинальных суппозиториях, эликсиров, растворов или суспензий, гелей, сиропов, жидкостей для полоскания рта или сухого порошка для смешивания с водой или другим подходящим носителем перед применением, необязательно с вкусовыми добавками и красителями, для путей применения с немедленным, замедленным, измененным, пролонгированным, прерывистым или контролируемым высвобождением. Также можно применять твердые композиции, такие как таблетки, капсулы, леденцы, пастилки, пилюли, болюсы, порошки, пасты, гранулы, суппозитории, драже или препараты в виде предварительно приготовленных смесей. Твердые и жидкие композиции для перорального применения можно получать в соответствии со способами, хорошо известными из уровня техники. Такие композиции могут также содержать один или более фармацевтически приемлемых носителей и вспомогательных веществ, которые могут находиться в твердой или жидкой форме. Таблетки и капсулы можно получить посредством традиционных способов с использованием фармацевтически приемлемых вспомогательных веществ, в том числе без ограничения связующих средств, наполнителей, смазывающих веществ, разрыхлителей или смачивающих средств. Подходящие фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества известны из уровня техники и включают без ограничения прежелатинизированный крахмал, поливинилпирролидон, повидон, гидроксипропилметилцеллюлозу (HPMC), гидроксипропилэтилцеллюлозу (HPEC), гидроксипропилцеллюлозу (HPC), сахарозу, желатин, аравийскую камедь, лактозу, микрокристаллическую целлюлозу, гидрофосфат кальция, стеарат магния, стеариновую кислоту, глицерилбегенат, тальк, диоксид кремния, кукурузный, картофельный или маниоковый крахмал, крахмалгликолят

натрия, лаурилсульфат натрия, цитрат натрия, карбонат кальция, двухосновный фосфат кальция, глицин, кроскармеллозу натрия и комплексные силикаты. Таблетки можно покрывать с помощью способов, хорошо известных из уровня техники.

В некоторых вариантах осуществления описанная в данном документе фармацевтическая композиция может быть составлена в соответствии с международной заявкой PCT/US2017/024982 и предварительной заявкой на патент США № 62/506574, обе из которых включены в настоящее описание посредством ссылки во всей их полноте. Например, в некоторых вариантах осуществления pH фармацевтической композиции, описанной в данном документе, составляет от приблизительно 5,0 до приблизительно 7,0 или от приблизительно 5,0 до приблизительно 6,0. В некоторых вариантах осуществления pH находится в диапазоне, составляющем от приблизительно 5,5 до приблизительно 6,0. В некоторых вариантах осуществления pH фармацевтической композиции составляет $\leq 6,0$. В некоторых вариантах осуществления pH можно регулировать для достижения целевого pH путем использования регуляторов pH (например, подщелачивающих средств и подкисляющих средств), таких как гидроксид натрия и/или хлористоводородная кислота.

Описанная в данном документе фармацевтическая композиция может содержать буферную систему, такую как цитратная система, фосфатная система и их комбинация. Цитрат и/или фосфат могут представлять собой цитрат натрия или фосфат натрия. Другие соли включают калиевые или аммониевые соли. В одном или более вариантах осуществления буфер содержит цитрат. В дополнительных вариантах осуществления буфер содержит цитрат натрия (например, смесь дигидрата цитрата натрия и моногидрата лимонной кислоты). В одном или более вариантах осуществления буферные растворы, содержащие цитрат, могут содержать цитрат натрия и лимонную кислоту. В некоторых вариантах осуществления присутствует как цитратный, так и фосфатный буферы.

В некоторых вариантах осуществления описанная в данном документе фармацевтическая композиция содержит по меньшей мере одно вспомогательное вещество. Вспомогательное вещество может функционировать как средство, регулирующее тоничность, наполнитель и/или стабилизатор. Средства, регулирующие тоничность, представляют собой компоненты, которые способствуют обеспечению того, чтобы состав имел осмотическое давление, такое же как осмотическое давление

человеческой крови или подобное ему. Наполнители представляют собой ингредиенты, которые придают дополнительный объем составу (например, лиофилизированному) и обеспечивают лиофилизату необходимую структуру. Стабилизаторы представляют собой соединения, которые могут предотвращать или сводить к минимуму агрегацию состава на гидрофобных поверхностях раздела воздушной и водной фаз. Одно вспомогательное вещество может одновременно осуществлять функцию средства, регулирующего тоничность, и наполнителя. Например, маннит может функционировать как средство, регулирующее тоничность, а также обеспечивать преимущества как наполнитель.

Примеры средств, регулирующих тоничность, включают хлорид натрия, маннит, сахарозу и трегалозу. В некоторых вариантах осуществления средство, регулирующее тоничность, включает маннит. В некоторых вариантах осуществления общее количество средства(средств), регулирующего(-их) тоничность, находится в диапазоне, составляющем от приблизительно 10 мг/мл до приблизительно 50 мг/мл. В дополнительных вариантах осуществления общее количество средства(средств), регулирующего(-их) тоничность, находится в диапазоне, составляющем от приблизительно 10, 11, 12, 13, 14 или 15 мг/мл до приблизительно 16, 20, 25, 30, 35, 40, 45 или 50 мг/мл.

В некоторых вариантах осуществления вспомогательное вещество содержит стабилизатор. В некоторых вариантах осуществления стабилизатор представляет собой поверхностно-активное вещество. В некоторых вариантах осуществления стабилизатор представляет собой полисорбат 80. В одном или более вариантах осуществления общее количество стабилизатора находится в диапазоне, составляющем от приблизительно 0,1 мг/мл до приблизительно 1,0 мг/мл. В дополнительных вариантах осуществления общее количество стабилизатора находится в диапазоне, составляющем от приблизительно 0,1, 0,2, 0,3, 0,4 или 0,5 мг/мл до приблизительно 0,5, 0,6, 0,7, 0,8 0,9 или 1,0 мг/мл. В еще одних вариантах осуществления общее количество стабилизатора составляет приблизительно 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9 или 1,0 мг/мл.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит (a) rhGAA (как например, АТВ2000), (b) по меньшей мере один буфер, выбранный из группы, состоящей из цитрата, фосфата и их комбинации, и (c) по меньшей мере одно вспомогательное вещество, выбранное из группы, состоящей из маннита, полисорбата

80 и их комбинации, и имеет рН в диапазоне (i) от приблизительно 5,0 до приблизительно 6,0 или (ii) от приблизительно 5,0 до приблизительно 7,0. В некоторых вариантах осуществления композиция дополнительно содержит воду. В некоторых вариантах осуществления композиция может дополнительно содержать подкисляющее средство и/или подщелачивающее средство.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит (a) rhGAA (как например, АТВ200) в концентрации, составляющей приблизительно 5-50 мг/мл, приблизительно 5-30 мг/мл или приблизительно 15 мг/мл, (b) натрий-цитратный буфер в концентрации, составляющей приблизительно 10-100 мМ или приблизительно 25 мМ, (c) маннит в концентрации, составляющей приблизительно 10-50 мг/мл или приблизительно 20 мг/мл, (d) полисорбат 80, присутствующий в концентрации, составляющей приблизительно 0,1-1 мг/мл, приблизительно 0,2-0,5 мг/мл или приблизительно 0,5 мг/мл и (e) воду, и имеет рН приблизительно 6,0. В по меньшей мере одном варианте осуществления фармацевтическая композиция содержит (a) 15 мг/мл rhGAA (например, АТВ200) (b) 25 мМ натрий-цитратного буфера, (c) 20 мг/мл маннита, (d) 0,5 мг/мл полисорбата 80 и (e) воду, и имеет рН приблизительно 6,0. В некоторых вариантах осуществления композиция может дополнительно содержать подкисляющее средство и/или подщелачивающее средство.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтическую композицию, содержащую rhGAA, разбавляют перед введением субъекту, нуждающемуся в этом.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция, описанная в данном документе, содержит шаперон. В некоторых вариантах осуществления шаперон представляет собой миглустат или его фармацевтически приемлемую соль. В другом варианте осуществления шаперон представляет собой дувоглустат или его фармацевтически приемлемую соль.

В некоторых вариантах осуществления описанную в данном документе rhGAA составляют в одну фармацевтическую композицию, в то время как шаперон, такой как миглустат, составляют в другую фармацевтическую композицию. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическую композицию, содержащую миглустат, вводят в виде состава, коммерчески доступного как Zavesca® (Actelion Pharmaceuticals).

В некоторых вариантах осуществления описанную в данном документе фармацевтическую композицию можно подвергать процессу лиофилизации (сублимационного высушивания) для получения осадка или порошка. Соответственно, другой аспект настоящего изобретения относится к фармацевтической композиции, подвергнутой лиофилизации. Лيوфилированная смесь может содержать описанную в данном документе rhGAA (например, АТВ200), буфер, выбранный из группы, состоящей из цитрата, фосфата и их комбинаций; и по меньшей мере одно вспомогательное вещество, выбранное из группы, состоящей из трегалозы, маннита, полисорбата 80 и их комбинации. В некоторых вариантах осуществления к лиофилированной смеси можно добавлять другие ингредиенты (например, другие вспомогательные вещества). Фармацевтическая композиция, содержащая лиофилированный препарат, может быть предоставлена во флаконе, после чего ее можно хранить, транспортировать, восстанавливать и/или вводить пациенту.

VI. Способы лечения

A. Лечение заболеваний

Другой аспект настоящего изобретения относится к способу лечения заболевания или нарушения, связанного с нарушением регуляции накопления гликогена, путем введения rhGAA или фармацевтической композиции, описанных в данном документе. В некоторых вариантах осуществления заболевание представляет собой болезнь Помпе (также известную как дефицит кислой мальтазы (AMD) и болезнь накопления гликогена II типа (GSD II)). В некоторых вариантах осуществления rhGAA представляет собой АТВ200. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит АТВ200.

rhGAA или фармацевтическую композицию, описанные в данном документе, вводят подходящим путем. В одном варианте осуществления rhGAA или фармацевтическую композицию вводят внутривенно. В других вариантах осуществления rhGAA или фармацевтическую композицию вводят путем непосредственного введения в целевую ткань, такую как сердечная или скелетная мышца (например, внутримышечно), или в нервную систему (например, путем непосредственной инъекции в головной мозг; интравентрикулярно; интратекально). В некоторых вариантах осуществления rhGAA

или фармацевтическую композицию вводят перорально. Если требуется, можно одновременно использовать более чем один путь.

В некоторых вариантах осуществления терапевтические эффекты rhGAA или фармацевтической композиции, описанных в данном документе, могут быть оценены на основании одного или более из следующих критериев: (1) улучшение кардиологического статуса (например, увеличение конечно-диастолических и/или конечно-систолических объемов или уменьшение, облегчение или предупреждение прогрессирующей кардиомиопатии, которую, как правило, обнаруживают при GSD-II), (2) функции легких (например, увеличение жизненной емкости легких по сравнению с емкостью на исходном уровне и/или нормализация сниженного насыщения кислородом во время крика); (3) улучшение неврологического развития и/или двигательных навыков (например, увеличение показателя при оценке по шкале AIMS) и (4) снижение уровней гликогена в ткани индивидуума, пораженного заболеванием.

В некоторых вариантах осуществления кардиологический статус субъекта улучшается на 10%, 20%, 30%, 40% или 50% (или любой процент между указанными значениями) после введения одной или более доз rhGAA или фармацевтической композиции, описанных в данном документе, по сравнению с субъектом, подвергавшимся лечению с помощью носителя, или субъектом до лечения. Кардиологический статус субъекта можно оценивать с помощью измерения конечно-диастолических и/или конечно-систолических объемов и/или с помощью клинической оценки кардиомиопатии. В некоторых вариантах осуществления легочная функция субъекта улучшается на 10%, 20%, 30%, 40% или 50% (или любой процент между указанными значениями) после введения одной или более доз rhGAA или описанной в данном документе фармацевтической композиции по сравнению с субъектом, подвергавшимся лечению с помощью носителя, или субъектом до лечения. В некоторых вариантах осуществления улучшение достигается через 1 неделю, 2 недели, 3 недели, 1 месяц, 2 месяца или больше после введения (или любой период времени между указанными значениями). В некоторых вариантах осуществления АТВ200 или фармацевтическая композиция, содержащая АТВ200, улучшает легочную функцию у субъекта через 1 неделю, 2 недели, 3 недели, 1 месяц, 2 месяца или больше после введения (или любой период времени между указанными значениями).

В некоторых вариантах осуществления легочная функция субъекта улучшается на 10%, 20%, 30%, 40% или 50% (или любой процент между указанными значениями) после введения одной или более доз rhGAA или фармацевтической композиции, описанных в данном документе, по сравнению с субъектом, подвергавшимся лечению с помощью носителя, или субъектом до лечения. Легочную функцию субъекта можно оценивать по жизненной емкости легких по сравнению с емкостью на исходном уровне и/или нормализации сниженного насыщения кислородом во время крика. В некоторых вариантах осуществления легочная функция субъекта улучшается на 10%, 20%, 30%, 40% или 50% (или любой процент между указанными значениями) после введения одной или более доз rhGAA или описанной в данном документе фармацевтической композиции по сравнению с субъектом, подвергавшимся лечению с помощью носителя, или субъектом до лечения. В некоторых вариантах осуществления улучшение достигается через 1 неделю, 2 недели, 3 недели, 1 месяц, 2 месяца или больше после введения (или любой период времени между указанными значениями). В некоторых вариантах осуществления АТВ200 или фармацевтическая композиция, содержащая АТВ200, улучшает легочную функцию у субъекта через 1 неделю, 2 недели, 3 недели, 1 месяц, 2 месяца или больше после введения (или любой период времени между указанными значениями).

В некоторых вариантах осуществления неврологическое развитие и/или двигательные навыки субъекта улучшаются на 10%, 20%, 30%, 40% или 50% (или любой процент между указанными значениями) после введения одной или более доз rhGAA или фармацевтической композиции, описанных в данном документе, по сравнению с субъектом, подвергавшимся лечению с помощью носителя, или субъектом до лечения. Неврологическое развитие и/или двигательные навыки субъекта можно оценивать путем определения показателя AIMS. AIMS представляет собой закрепленную шкалу из 12 пунктов, которая устанавливается и оценивается клиницистом (см. Rush JA Jr., Handbook of Psychiatric Measures, American Psychiatric Association, 2000, 166-168). Пункты 1-10 оцениваются по 5-балльной закрепленной шкале. Пункты 1-4 оценивают рото-лицевые движения. Пункты 5-7 относятся к дискинезии конечностей и туловища. Пункты 8-10 относятся к общей степени тяжести, как оценивает экзаменатор, а также осведомленности пациента о движениях и связанным с ними дискомфортом. Пункты 11-12 представляют собой вопросы «да/нет», касающиеся проблем с зубами и/или зубными протезами (такие проблемы могут привести к ошибочному диагнозу

дискинезии). В некоторых вариантах осуществления неврологическое развитие и/или двигательные навыки субъекта улучшаются на 10%, 20%, 30%, 40% или 50% (или любой процент между указанными значениями) после введения одной или более доз АТВ200 или фармацевтической композиции, содержащей АТВ200, по сравнению с субъектом, подвергавшимся лечению с помощью носителя, или субъектом до лечения. В некоторых вариантах осуществления улучшение достигается через 1 неделю, 2 недели, 3 недели, 1 месяц, 2 месяца или больше после введения (или любой период времени между указанными значениями). В некоторых вариантах осуществления АТВ200 или фармацевтическая композиция, содержащая АТВ200, улучшает неврологическое развитие и/или двигательные навыки субъекта через 1 неделю, 2 недели, 3 недели, 1 месяц, 2 месяца или больше после введения (или любой период времени между указанными значениями).

В некоторых вариантах осуществления уровень гликогена в определенных тканях субъекта уменьшается на 10%, 20%, 30%, 40% или 50% (или любой процент между указанными значениями) после введения одной или более доз rhGAA или фармацевтической композиции, описанных в данном документе, по сравнению с субъектом, подвергавшимся лечению с помощью носителя, или субъектом до лечения. В некоторых вариантах осуществления ткань представляет собой мышцу, такую как четырехглавая мышца, трицепс и икроножная мышца. Уровень гликогена в ткани можно анализировать с применением способов, известных из уровня техники. Определение уровней гликогена на основе расщепления амилоглюкозидазой хорошо известно и описано в публикациях, таких как: Amalfitano et al. (1999), «Systemic correction of the muscle disorder glycogen storage disease type ii after hepatic targeting of a modified adenovirus vector encoding human acid-alpha-glucosidase,» Proc Natl Acad Sci USA, 96:8861-8866. В некоторых вариантах осуществления уровень гликогена в мышце субъекта уменьшается на 10%, 20%, 30%, 40% или 50% (или любой процент между указанными значениями) после введения одной или более доз rhGAA или описанной в данном документе фармацевтической композиции по сравнению с субъектом, подвергавшимся лечению с помощью носителя, или субъектом до лечения. В некоторых вариантах осуществления уменьшение достигается через 1 неделю, 2 недели, 3 недели, 1 месяц, 2 месяца или больше от введения (или любой период времени между указанными значениями). В некоторых вариантах осуществления АТВ200 или фармацевтическая композиция, содержащая АТВ200, уменьшает уровень

гликогена в мышце субъекта через 1 неделю, 2 недели, 3 недели, 1 месяц, 2 месяца или больше после введения (или любой период времени между указанными значениями).

В. Биомаркеры

Для оценки и сравнения терапевтических эффектов ферментозаместительной терапии у субъекта с болезнью Помпе можно использовать биомаркеры накопления гликогена в мышечном волокне у субъекта, такие как тетрасахарид гексозы в моче (Hex4). В некоторых вариантах осуществления терапевтический эффект rhGAA или фармацевтической композиции, содержащей rhGAA, на накопление гликогена оценивают путем измерения уровней Hex4 у субъекта.

Для оценки и сравнения терапевтических эффектов ферментозаместительной терапии у субъекта с болезнью Помпе можно использовать биомаркеры повреждения или поражения мышц, такие как креатинкиназа (СК), аланинаминотрансфераза (ALT) и аспаратаминотрансфераза (AST). В некоторых вариантах осуществления терапевтический эффект rhGAA или фармацевтической композиции, содержащей rhGAA, в отношении поражения мышц оценивают путем измерения уровней СК, ALT и/или AST у субъекта. В по меньшей мере одном варианте осуществления терапевтический эффект rhGAA или фармацевтической композиции, содержащей rhGAA, в отношении поражения мышц оценивают путем измерения уровней СК у субъекта.

Биомаркеры, такие как LAMP-1, LC3 и дисферлин, также можно использовать для оценки и сравнения терапевтических эффектов rhGAA или фармацевтической композиции, описанных в данном документе. При болезни Помпе неспособность GAA гидролизовать лизосомальный гликоген приводит к аномальному накоплению в некоторых тканях крупных лизосом, заполненных гликогеном. (Raben et al., JBC 273: 19086-19092, 1998.) Исследования на мышечной модели болезни Помпе показали, что увеличение лизосом в скелетных мышцах не может адекватно объяснить снижение механических показателей, и что наличие крупных включений, содержащих деградированные миофибриллы (т. е. накопление аутофагосом), способствует ухудшению мышечной функции. (Raben et al., Human Mol Genet 17: 3897-3908, 2008.) В сообщениях также предполагается, что нарушение аутофагического потока связано с плохим терапевтическим результатом у пациентов с болезнью Помпе. (Nascimbeni et

al., *Neuropathology and Applied Neurobiology* doi: 10.1111/nan.12214, 2015; Fukuda et al., *Mol Ther* 14: 831-839, 2006.) Кроме того, болезнь Помпе с поздним началом распространена при неклассифицированных мышечных дистрофиях конечностей (LGMD) (Preisler et al., *Mol Genet Metab* 110: 287-289, 2013), и представляет собой группу генетически гетерогенных нервно-мышечных заболеваний с более чем 30 генетически определенными подтипами различной степени тяжести. Исследование ИНС выявило значительно повышенное саркоплазматическое присутствие дисферлина в волокнах скелетных мышц мышцей Gaa KO.

Для измерения уровня экспрессии генов и/или уровня белка таких биомаркеров можно использовать различные известные способы. Например, можно получать образец от субъекта, подвергавшегося лечению с помощью rhGAA или фармацевтической композиции, описанных в данном документе, такой как биопсия тканей, в частности мышцы. В некоторых вариантах осуществления образец представляет собой биопсию мышцы у субъекта. В некоторых вариантах осуществления мышца выбрана из четырехглавой мышцы, трицепса и икроножной мышцы. Образец, полученный от субъекта, можно окрашивать с помощью одного или более антител или других средств для выявления, которые выявляют такие биомаркеры, или могут быть идентифицированы и количественно определены с помощью масс-спектрометрии. Образцы можно таким же или альтернативным путем обрабатывать для выявления присутствия нуклеиновых кислот, таких как mRNA, для кодирования биомаркеров, например с помощью способов RT-qPCR.

В некоторых вариантах осуществления уровень экспрессии гена и/или уровень содержания белка одного или более биомаркеров измеряют при биопсии мышцы, полученной от индивидуума до и после лечения с помощью rhGAA или фармацевтической композиции, описанных в данном документе. В некоторых вариантах осуществления уровень экспрессии гена и/или уровень содержания белка одного или более биомаркеров измеряют при биопсии мышцы, полученной от индивидуума, подвергавшегося лечению с помощью носителя. В некоторых вариантах осуществления уровень экспрессии гена и/или уровень содержания белка одного или более биомаркеров уменьшается на 10%, 20%, 30%, 40% или 50% (или любой процент между указанными значениями) после введения одной или более доз rhGAA или фармацевтической композиции, описанных в данном документе, по сравнению с

субъектом, подвергавшимся лечению с помощью носителя, или субъектом до лечения. В некоторых вариантах осуществления уровень экспрессии гена и/или уровень содержания белка одного или более биомаркеров уменьшается на 10%, 20%, 30%, 40% или 50% (или любой процент между указанными значениями) после введения одной или более доз АТВ200 или фармацевтической композиции, содержащей АТВ200, по сравнению с субъектом, подвергавшимся лечению с помощью носителя, или субъектом до лечения. В некоторых вариантах осуществления уменьшение достигается через 1 неделю, 2 недели, 3 недели, 1 месяц, 2 месяца или больше от введения (или любой период времени между указанными значениями). В некоторых вариантах осуществления АТВ200 или фармацевтическая композиция, содержащая АТВ200, уменьшает уровень экспрессии гена и/или уровень содержания белка одного или более биомаркеров через 1 неделю, 2 недели, 3 недели, 1 месяц, 2 месяца или больше после введения (или любой период времени между указанными значениями).

C. Дозы rhGAA

Фармацевтический состав или восстановленную композицию вводят в терапевтически эффективном количестве (например, при величине дозы, которая при введении с равными интервалами является достаточной для лечения заболевания, в частности, для уменьшения выраженности симптомов, ассоциированных с заболеванием, предупреждения или задержки возникновения заболевания и/или для уменьшения тяжести или частоты возникновения симптомов заболевания). Количество, которое является терапевтически эффективным при лечении заболевания, может зависеть от природы и степени выраженности эффектов заболевания и может быть определено с помощью стандартных клинических методик. Кроме того, для содействия в подборе оптимальных диапазонов дозы можно необязательно использовать анализы *in vitro* или *in vivo*. В по меньшей мере одном варианте осуществления rhGAA, описанную в данном документе, или фармацевтическую композицию, содержащую rhGAA, вводят в дозе, составляющей от приблизительно 1 мг/кг до приблизительно 100 мг/кг, например, от приблизительно 5 мг/кг до приблизительно 30 мг/кг, как правило, от приблизительно 5 мг/кг до 20 мг/кг. В по меньшей мере одном варианте осуществления rhGAA или фармацевтическую композицию, описанные в данном документе, вводят в дозе, составляющей приблизительно 5 мг/кг, приблизительно 10 мг/кг, приблизительно 15 мг/кг, приблизительно 20 мг/кг, приблизительно 25 мг/кг,

приблизительно 30 мг/кг, приблизительно 35 мг/кг, приблизительно 40 мг/кг, приблизительно 50 мг/кг, приблизительно 50 мг/кг, приблизительно 60 мг/кг, приблизительно 70 мг/кг, приблизительно 80 мг/кг, приблизительно 90 мг/кг или приблизительно 100 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления rhGAA вводят в дозе, составляющей 5 мг/кг, 10 мг/кг, 20 мг/кг, 50 мг/кг, 75 мг/кг или 100 мг/кг. В по меньшей мере одном варианте осуществления rhGAA или фармацевтическую композицию вводят в дозе, составляющей приблизительно 20 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления rhGAA или фармацевтическую композицию вводят одновременно или последовательно с фармакологическим шапероном. В некоторых вариантах осуществления фармакологический шаперон представляет собой миглустат. В по меньшей мере одном варианте осуществления миглустат вводят в виде пероральной дозы, составляющей приблизительно 260 мг. Эффективная доза для конкретного индивидуума может варьироваться (например, увеличиваться или уменьшаться) с течением времени в зависимости от потребностей индивидуума. Например, количество можно увеличивать в случаях соматического заболевания или стресса, или в случае появления или увеличения количества антител к кислой α -глюкозидазе, или при ухудшении симптомов заболевания.

В некоторых вариантах осуществления терапевтически эффективная доза rhGAA или фармацевтической композиции, описанных в данном документе, ниже, чем у традиционных продуктов на основе rhGAA. Например, если терапевтически эффективная доза традиционного продукта на основе rhGAA составляет 20 мг/кг, – доза rhGAA или фармацевтической композиции, описанных в данном документе, необходимая для того, чтобы вызывать такие же или лучшие терапевтические эффекты по сравнению с традиционным продуктом на основе rhGAA, может составлять ниже чем 20 мг/кг. Терапевтические эффекты можно оценивать на основе одного или более вышеописанных критериев (например, кардиологический статус, уровень гликогена или экспрессия биомаркера). В некоторых вариантах осуществления терапевтически эффективная доза rhGAA или фармацевтической композиции, описанных в данном документе, на по меньшей мере приблизительно 5%, 10%, 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или больше ниже, чем таковая у традиционных продуктов на основе rhGAA.

В некоторых вариантах осуществления терапевтический эффект rhGAA или фармацевтической композиции, описанных в данном документе, включает улучшение двигательной функции, улучшение мышечной силы (верхней части тела, нижней части тела или всего тела), улучшение легочной функции, сниженную утомляемость, пониженные уровни по меньшей мере одного биомаркера повреждения мышц, пониженные уровни по меньшей мере одного биомаркера накопления гликогена или их комбинации. В некоторых вариантах осуществления терапевтический эффект rhGAA или фармацевтической композиции, описанных в данном документе, включает реверсию лизосомальной патологии в мышечном волокне, более быстрое и/или более эффективное снижение содержания гликогена в мышечном волокне, увеличение расстояния при прохождении теста с шестиминутной ходьбой, уменьшение времени в тесте с вставанием со стула и ходьбой с отсчетом времени, уменьшение времени в тесте с подъемом по четырем ступеням, уменьшение времени в тесте с ходьбой на десять метров, уменьшение показателя «ходьба-подъем по лестнице-прием Говерса-вставание со стула», увеличение силы в верхней конечности, улучшение приведения плеча, улучшение отведения плеча, улучшение сгибания локтя, улучшение разгибания локтя, улучшение силы верхней части тела, улучшение силы нижней части тела, улучшение силы всего тела, улучшение форсированной жизненной емкости в положении стоя (сидя), улучшение максимального давления при выдохе, улучшение максимального давления при вдохе, снижение показателя по шкале оценки выраженности утомляемости, снижение уровней тетрасахарида гексозы в моче, снижение уровней креатинкиназы, снижение уровней аланинаминотрансферазы, снижение уровней аспаратаминотрансферазы или любую их комбинацию.

В некоторых вариантах осуществления rhGAA или фармацевтическая композиция, описанные в данном документе, обеспечивают требуемые терапевтические эффекты быстрее, чем традиционные продукты на основе rhGAA при введении в той же дозе. Терапевтические эффекты можно оценивать на основе одного или более вышеописанных критериев (например, кардиологический статус, уровень гликогена или экспрессия биомаркера). Например, если однократная доза обычного продукта на основе rhGAA способствует снижению уровней гликогена в ткани индивидуума, подвергавшегося лечению, на 10% в неделю, – такая же степень снижения может быть достигнута менее чем за неделю при введении такой же дозы rhGAA или фармацевтической композиции, описанных в данном документе. В некоторых

вариантах осуществления при введении одинаковых доз rhGAA или фармацевтической композиции, описанных в данном документе, можно достигать требуемых терапевтических эффектов в по меньшей мере приблизительно 1,25, 1,5, 1,75, 2,0, 3,0 или больше раз быстрее, чем при введении традиционных продуктов на основе rhGAA.

В некоторых вариантах осуществления терапевтически эффективное количество rhGAA (или композиции или лекарственного средства, содержащего rhGAA) вводят более чем один раз. В некоторых вариантах осуществления rhGAA или фармацевтическую композицию, описанные в данном документе, вводят через равные интервалы, в зависимости от природы и степени эффектов заболевания, и на постоянной основе. Введение с «равными интервалами», как используется в данном документе, указывает на то, что терапевтически эффективное количество вводят периодически (в отличие от разовой дозы). Интервал можно определять с помощью стандартных клинических методик. В некоторых вариантах осуществления rhGAA вводят раз в два месяца, раз в месяц, каждые две недели, раз в неделю, два раза в неделю или ежедневно. В некоторых вариантах осуществления rhGAA вводят внутривенно дважды в неделю, раз в неделю или раз в две недели. Интервал введения для потребности отдельного индивидуума не обязательно должен быть фиксированным интервалом и может варьироваться с течением времени в зависимости от потребностей индивидуума. Например, интервал между дозами может быть уменьшен при соматическом заболевании или стрессе, или при появлении или увеличении антител к rhGAA, или при ухудшении симптомов заболевания.

В некоторых вариантах осуществления в случае применения одинаковых доз, rhGAA или фармацевтическую композицию, описанные в данном документе, можно вводить реже, чем традиционные продукты на основе rhGAA, и при этом они способны оказывать такой же или лучший терапевтический эффект по сравнению с традиционными продуктами на основе rhGAA. Например, если традиционный продукт на основе rhGAA вводят при 20 мг/кг в неделю, то rhGAA или фармацевтическая композиция, описанные в данном документе, могут обеспечивать такие же или лучшие терапевтические эффекты по сравнению с традиционным продуктом на основе rhGAA при введении при 20 мг/кг, даже если rhGAA или фармацевтическую композицию вводят реже, например раз в две недели или раз в месяц. Терапевтические эффекты можно оценивать на основе одного или более вышеописанных критериев (например,

кардиологический статус, уровень гликогена или экспрессия биомаркера). В некоторых вариантах осуществления интервал между двумя дозами rhGAA или фармацевтической композиции, описанных в данном документе, длиннее, чем интервал между дозами традиционного продукта на основе rhGAA. В некоторых вариантах осуществления интервал между двумя дозами rhGAA или фармацевтической композиции в по меньшей мере приблизительно 1,25, 1,5, 1,75, 2,0, 3,0 или больше раз длиннее, чем интервал между дозами традиционных продуктов на основе rhGAA.

В некоторых вариантах осуществления при одинаковых условиях лечения (например, при одинаковой дозе, вводимой с одинаковым интервалом) rhGAA или фармацевтическая композиция, описанные в данном документе, обеспечивают терапевтические эффекты в степени, превосходящей таковую, обеспечиваемую традиционными продуктами на основе rhGAA. Терапевтические эффекты можно оценивать на основе одного или более вышеописанных критериев (например, кардиологический статус, уровень гликогена или экспрессия биомаркера). Например, по сравнению с традиционным продуктом на основе rhGAA, вводимым при 20 мг/кг в неделю, rhGAA или фармацевтическая композиция, вводимые при 20 мг/кг в неделю, могут в более высокой степени снижать уровни гликогена в ткани индивидуума, подвергшегося лечению. В некоторых вариантах осуществления при введении в тех же условиях лечения, rhGAA или фармацевтическая композиция, описанные в данном документе, обеспечивают терапевтические эффекты, которые в по меньшей мере приблизительно 1,25, 1,5, 1,75, 2,0, 3,0 раза или больше выше по сравнению с традиционными продуктами на основе rhGAA.

D. Комбинированная терапия

В некоторых вариантах осуществления rhGAA или фармацевтическую композицию, содержащую rhGAA, описанные в данном документе, вводят одновременно или последовательно с фармакологическим шапероном. В некоторых вариантах осуществления rhGAA или фармацевтическую композицию вводят другим путем по сравнению с фармакологическим шапероном. Например, фармакологический шаперон можно вводить перорально, тогда как rhGAA или фармацевтическую композицию вводят внутривенно.

В разных вариантах осуществления фармакологический шаперон представляет собой миглустат. В некоторых вариантах осуществления миглустат вводят в пероральной дозе, составляющей от приблизительно 50 мг до приблизительно 600 мг. В по меньшей мере одном варианте осуществления миглустат вводят в пероральной дозе, составляющей от приблизительно 200 мг до приблизительно 600 мг или в пероральной дозе, составляющей приблизительно 200 мг, приблизительно 250 мг, приблизительно 300 мг, приблизительно 350 мг, приблизительно 400 мг, приблизительно 450 мг, приблизительно 500 мг, приблизительно 550 мг или приблизительно 600 мг. В по меньшей мере одном варианте осуществления миглустат вводят в пероральной дозе, составляющей от приблизительно 233 мг до приблизительно 500 мг. В по меньшей мере одном варианте осуществления миглустат вводят в пероральной дозе, составляющей от приблизительно 250 до приблизительно 270 мг или в пероральной дозе, составляющей приблизительно 250 мг, приблизительно 255 мг, приблизительно 260 мг, приблизительно 265 мг или приблизительно 270 мг. В по меньшей мере одном варианте осуществления миглустат вводят в виде пероральной дозы, составляющей приблизительно 260 мг.

Специалистам в данной области будет понятно, что пероральная доза миглустата, находящаяся в диапазоне от приблизительно 200 мг до 600 мг или в любом меньшем диапазоне в указанных пределах, может являться подходящей для взрослого пациента в зависимости от его/ее веса тела. Например, для пациентов, имеющих значительно более низкий вес тела, чем приблизительно 70 кг, в том числе без ограничения младенцев, детей или взрослых с недостаточным весом, лечащий врач может считать подходящей меньшую дозу. Следовательно, в по меньшей мере одном варианте осуществления миглустат вводят в виде пероральной дозы, составляющей от приблизительно 50 мг до приблизительно 200 мг, или в виде пероральной дозы, составляющей приблизительно 50 мг, приблизительно 75 мг, приблизительно 100 мг, 125 мг, приблизительно 150 мг, приблизительно 175 мг или приблизительно 200 мг. В по меньшей мере одном варианте осуществления миглустат вводят в виде пероральной дозы, составляющей от приблизительно 65 мг до приблизительно 195 мг, или в виде пероральной дозы, составляющей приблизительно 65 мг, приблизительно 130 мг или приблизительно 195 мг.

В некоторых вариантах осуществления rhGAA вводят внутривенно в дозе, составляющей от приблизительно 5 мг/кг до приблизительно 20 мг/кг, и миглустат вводят перорально в дозе, составляющей от приблизительно 50 мг до приблизительно 600 мг. В некоторых вариантах осуществления rhGAA вводят внутривенно в дозе, составляющей от приблизительно 5 мг/кг до приблизительно 20 мг/кг, и миглустат вводят перорально в дозе, составляющей от приблизительно 50 мг до приблизительно 200 мг. В некоторых вариантах осуществления rhGAA вводят внутривенно в дозе, составляющей от приблизительно 5 мг/кг до приблизительно 20 мг/кг, и миглустат вводят перорально в дозе, составляющей от приблизительно 200 мг до приблизительно 600 мг. В некоторых вариантах осуществления rhGAA вводят внутривенно в дозе, составляющей от приблизительно 5 мг/кг до приблизительно 20 мг/кг, и миглустат вводят перорально в дозе, составляющей от приблизительно 233 мг до приблизительно 500 мг. В одном варианте осуществления rhGAA вводят внутривенно в дозе, составляющей приблизительно 20 мг/кг, и миглустат вводят перорально в дозе, составляющей приблизительно 260 мг.

В некоторых вариантах осуществления миглустат и rhGAA вводят одновременно. Например, миглустат можно вводить в течение 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 минуты до или после введения rhGAA. В некоторых вариантах осуществления миглустат вводят в течение 5, 4, 3, 2 или 1 минуты до или после введения rhGAA.

В некоторых вариантах осуществления миглустат и rhGAA вводят последовательно. В по меньшей мере одном варианте осуществления миглустат вводят до введения rhGAA. В по меньшей мере одном варианте осуществления миглустат вводят менее чем за три часа до введения rhGAA. В по меньшей мере одном варианте осуществления миглустат вводят приблизительно за два часа до введения rhGAA. Например, миглустат можно вводить за приблизительно 1,5 часа, приблизительно 1 час, приблизительно 50 минут, приблизительно 30 минут или приблизительно 20 минут до введения rhGAA. В по меньшей мере одном варианте осуществления миглустат вводят за приблизительно один час до введения rhGAA.

В некоторых вариантах осуществления миглустат вводят после введения rhGAA. В по меньшей мере одном варианте осуществления миглустат вводят в течение трех часов после введения rhGAA. В по меньшей мере одном варианте осуществления миглустат вводят в течение двух часов после введения rhGAA. Например, миглустат можно

вводить в течение приблизительно 1,5 часов, приблизительно 1 часа, приблизительно 50 минут, приблизительно 30 минут или приблизительно 20 минут после введения rhGAA.

В некоторых вариантах субъект воздерживается от приема пищи в течение по меньшей мере двух часов до и в течение по меньшей мере двух часов после введения миглустата.

Е. Набор

Другой аспект настоящего изобретения относится к наборам, содержащим rhGAA или фармацевтическую композицию, описанные в данном документе. В одном или более вариантах осуществления набор содержит контейнер (например, флакон, пробирку, пакет и т. д.), содержащий rhGAA или фармацевтическую композицию (подвергнутые или не подвергнутые лиофилизации) и инструкции по восстановлению, разбавлению и введению.

ПРИМЕРЫ

Пример 1. Получение клеток CHO, продуцирующих rhGAA, характеризующуюся высоким содержанием N-гликанов, несущих моно- или бис-M6P

Клетки DG44 CHO (DHFR-) трансфицировали с помощью ДНК-конструкции, которая экспрессирует rhGAA. ДНК-конструкция показана на фиг. 4. После трансфекции клетки CHO, содержащие стабильно интегрированный ген GAA, отбирали на среде без гипоксантина/тимидина (-HT). Экспрессию GAA в этих клетках индуцировали путем обработки метотрексатом (MTX, 500 нМ).

Популяции клеток, которые экспрессировали GAA в больших количествах, идентифицировали с помощью анализов активности фермента GAA, и их использовали для создания отдельных клонов, продуцирующих rhGAA. Отдельные клоны получали в культуральных чашках с полужидкой средой, собирали с помощью системы ClonePix и переносили в планшеты с 24 глубокими лунками. Отдельные клоны анализировали в отношении активности фермента GAA для идентификации клонов, экспрессирующих GAA на высоком уровне. В кондиционированных средах для определения активности GAA использовали субстрат 4-MU- α -глюкозидаза. Клоны, вырабатывающие GAA на более высоких уровнях, которые измеряли с помощью анализов фермента GAA, дополнительно оценивали в отношении жизнеспособности, способности к росту,

продуктивности выработки GAA, структуры N-гликанов и стабильной экспрессии белка. С помощью данной процедуры выделяли линии клеток CHO, в том числе линию клеток CHO GA-ATB200, экспрессирующую rhGAA с повышенным содержанием моно-М6P- или бис-М6P-N-гликанов.

Пример 2. Очистка rhGAA

Несколько партий rhGAA в соответствии с настоящим изобретением получали во встряхиваемых колбах и в перфузионных биореакторах с использованием линии клеток CHO GA-ATB200, продукт на основе которых называется «ATB200». Жидкостную хроматографию со слабым анионным обменом («WAX») использовали для фракционирования rhGAA ATB200 по концевому фосфату и сиаловой кислоте. Профили элюирования получали путем элюирования средства для ERT с помощью возрастающего количества соли. Контроль профилей осуществляли с помощью УФ-излучения (A280 нм). Подобное связывание CIMPR-рецептора (по меньшей мере ~ 70%) наблюдали для очищенной rhGAA ATB200 из разных производственных партий (фиг. 5), что указывало на то, что rhGAA ATB200 может стабильно продуцироваться.

Пример 3. Определение характеристик олигосахаридов rhGAA ATB200

rhGAA ATB200 анализировали в отношении профилей сайт-специфических N-гликанов с помощью отдельных аналитических методик на основе LC-MS/MS. Результаты первых двух методик LC-MS/MS показаны на фиг. 6A-6H. Результаты третьей методики LC-MS/MS с картированием гликана 2-AA показаны на фиг. 32A-32H, фиг. 33A-33B и в таблице 5.

В первом анализе LC-MS/MS белок подвергали денатурации, восстановлению, алкилированию и расщеплению перед проведением анализа по методу LC-MS/MS. В ходе денатурации и восстановления белка 200 мкг образца белка, 5 мкл Tris-HCl при 1 моль/л (конечная концентрация 50 мМ), 75 мкл гуанидина-HCl при 8 моль/л (конечная концентрация 6 М), 1 мкл EDTA при 0,5 моль/л (конечная концентрация 5 мМ), 2 мкл DTT при 1 моль/л (конечная концентрация 20 мМ) и воду Milli-Q® добавляли в пробирку объемом 1,5 мл с получением общего объема 100 мкл. Образец перемешивали и инкубировали при 56°C в течение 30 минут в бане сухого нагрева. В ходе алкилирования денатурированный и восстановленный образец белка смешивали с 5 мкл йодацетамида при 1 моль/л (IAM, конечная концентрация 50 мМ), затем

инкубировали при 10-30°C в темноте в течение 30 минут. После алкилирования к образцу добавляли 400 мкл предварительно охлажденного ацетона и смесь подвергали заморозке с охлаждением при -80°C в течение 4 часов. Затем образец центрифугировали в течение 5 мин. при 13000 об/мин. и 4°C и надосадочную жидкость удаляли. К осадку добавляли 400 мкл предварительно охлажденного ацетона, который затем центрифугировали в течение 5 мин. при 13000 об/мин. и 4°C и надосадочную жидкость удаляли. Затем образец высушивали воздухом на льду в темноте для удаления остаточного ацетона. Для растворения белка к образцу добавляли сорок микролитров 8 М мочевины и 160 мкл NH₄HCO₃ при 100 мМ. Затем в ходе расщепления трипсином к 50 мкг белка добавляли буфер для расщепления трипсином до конечного объема 100 мкл и добавляли 5 мкл трипсина при 0,5 мг/мл (соотношение белка и фермента 20/1 вес/вес). Раствор тщательно перемешивали и инкубировали в течение ночи (16 ± 2 часа) при 37°C. Для гашения реакции добавляли 2,5 мкл 20% TFA (конечная концентрация 0,5%). Затем образец анализировали с помощью масс-спектрометра Orbitrap Velos ProTM от Thermo Scientific.

При втором анализе по методу LC-MS/MS образец ATB200 получали в соответствии с аналогичной процедурой денатурации, восстановления, алкилирования и расщепления за исключением того, что в качестве алкилирующего реагента вместо IAM использовали йодуксусную кислоту (IAA), а затем анализировали с помощью масс-спектрометра Orbitrap Fusion Lumos TribidTM от Thermo ScientificTM.

Результаты первого и второго анализов показаны на фиг. 6А-6Н. На фиг. 6А-6Н результаты первого анализа представлены столбиками, расположенными слева (темно-серого цвета), а результаты второго анализа представлены столбиками, расположенными справа (светло-серого цвета). Номенклатура символов для представления гликанов соответствует Varki, A., Cummings, R.D., Esko J.D., et al., Essentials of Glycobiology, 2nd edition (2009).

Как видно на фиг. 6А-6Н два анализа давали сходные результаты, хотя между результатами было некоторое различие. Это различие может быть обусловлено рядом факторов, в том числе применяемым прибором и полнотой анализа N-гликанов. Например, если некоторые формы фосфорилированных N-гликанов не были идентифицированы и/или не были определены количественно, то общее число фосфорилированных N-гликанов может быть представлено в недостаточной мере, и

процентная доля rhGAA, несущей фосфорилированные N-гликаны в данном сайте, может быть представлена в недостаточной мере. В качестве другого примера, если некоторые формы нефосфорилированных N-гликанов не были идентифицированы и/или не были определены количественно, то общее число нефосфорилированных N-гликанов может быть представлено в недостаточной степени, и процентная доля rhGAA, несущей фосфорилированные N-гликаны в данном сайте, может быть представлена чрезмерно большим количеством.

На фиг. 6A показана занятость сайтов N-гликозилирования в АТВ200. Как можно видеть на фиг. 6A, первый, второй, третий, четвертый, пятый и шестой сайты N-гликозилирования главным образом были заняты, при этом посредством обоих анализов было выявлено, что в каждом потенциальном сайте от более 90% до не более приблизительно 100% молекул фермента АТВ200 содержали N-гликан. Однако седьмой потенциальный сайт N-гликозилирования являлся N-гликозилированным в приблизительно половине случаев.

На фиг. 6B показан профиль N-гликозилирования первого потенциального сайта N-гликозилирования, N84. На фиг. 6B можно видеть, что основной формой N-гликанов были бис-М6P N-гликаны. Как в первом, так и во втором анализах было выявлено, что более 75% АТВ200 содержали бис-М6P в первом сайте, что соответствует в среднем приблизительно 0,8 моль бис-М6P в пересчете на моль АТВ200 в первом сайте.

На фиг. 6C показан профиль N-гликозилирования второго потенциального сайта N-гликозилирования, N177. Как можно видеть на фигуре 6C, основными формами N-гликанов являлись моно-М6P N-гликаны и нефосфорилированные высокоманнозные N-гликаны. Как в первом, так и во втором анализах было выявлено, что более 40% АТВ200 содержали моно-М6P во втором сайте, что соответствует в среднем от приблизительно 0,4 до приблизительно 0,6 моль моно-М6P в пересчете на моль АТВ200 во втором сайте.

На фиг. 6D показан профиль N-гликозилирования третьего потенциального сайта N-гликозилирования, N334. На фиг. 6D можно видеть, что основными формами N-гликанов являлись нефосфорилированные высокоманнозные N-гликаны, двух-, трех- и четырехантенные комплексные N-гликаны и гибридные N-гликаны. Как в первом, так и во втором анализах было выявлено, что более 20% АТВ200 содержали остаток

сиаловой кислоты в третьем сайте, что соответствует в среднем от приблизительно 0,9 до приблизительно 1,2 моль сиаловой кислоты в пересчете на моль АТВ200 в третьем сайте.

На фиг. 6Е показан профиль N-гликозилирования четвертого потенциального сайта N-гликозилирования, N414. Как можно видеть на фиг. 6Е, основными формами N-гликанов являлись бис-М6Р- и моно-М6Р N-гликаны. Как в первом, так и во втором анализах было выявлено, что более 40% АТВ200 содержали бис-М6Р в четвертом сайте, что соответствует в среднем от приблизительно 0,4 до приблизительно 0,6 моль бис-М6Р в пересчете на моль АТВ200 во втором сайте. Как в первом, так и во втором анализах было выявлено, что более 25% АТВ200 содержали моно-М6Р в четвертом сайте, что соответствует в среднем от приблизительно 0,3 до приблизительно 0,4 моль моно-М6Р в пересчете на моль АТВ200 во втором сайте.

На фиг. 6F показан профиль N-гликозилирования пятого потенциального сайта N-гликозилирования, N596. На фиг. 6F можно видеть, что основными формами N-гликанов являлись фукозилированные двухантенные комплексные N-гликаны. Как в первом, так и во втором анализах было выявлено, что более 70% АТВ200 содержали остаток сиаловой кислоты в пятом сайте, что соответствует в среднем от приблизительно 0,8 до приблизительно 0,9 моль сиаловой кислоты в пересчете на моль АТВ200 в пятом сайте.

На фиг. 6G показан профиль N-гликозилирования шестого потенциального сайта N-гликозилирования, N826. Как можно видеть на фиг. 6G, основными формами N-гликанов являлись двух-, трех- и четырехантенные комплексные N-гликаны. Как в первом, так и во втором анализах было выявлено, что более 80% АТВ200 содержали остаток сиаловой кислоты в шестом сайте, что соответствует в среднем от приблизительно 1,5 до приблизительно 1,8 моль сиаловой кислоты в пересчете на моль АТВ200 в шестом сайте.

Анализ N-гликозилирования в седьмом сайте, N869, показал примерно 40% N-гликозилирование, при этом наиболее распространенными N-гликанами являлись А4S3S3GF (12%), А5S3G2F (10%), А4S2G2F (8%) и А6S3G3F (8%).

На фиг. 6H показана сводная информация о фосфорилировании по каждому из семи потенциальных сайтов N-гликозилирования. На фиг. 6H можно видеть, что как в

первом, так и во втором анализах выявляли высокие уровни фосфорилирования по первому, второму и четвертому потенциальным сайтам N-гликозилирования. В обоих анализах выявили, что более 80% АТВ200 были моно- или бисфосфорилированными в первом сайте, более 40% АТВ200 были монофосфорилированными во втором сайте и более 80% АТВ200 были моно- или бисфосфорилированными в четвертом сайте.

Другой анализ N-гликозилирования АТВ200 проводили в соответствии со способом LC-MS/MS, как описано ниже. Этот анализ обеспечил получение среднего профиля N-гликозилирования по десяти партиям АТВ200 (фиг. 32А-32Н, фиг. 33А-33В).

N-связанные гликаны из АТВ200 ферментативно высвобождали с помощью PNGазы-F и метили 2-антраниловой кислотой (2-АА). N-гликаны, меченные 2-АА, дополнительно обрабатывали с помощью твердофазной экстракции (SPE) для удаления избытка солей и других загрязнений. Очищенные 2-АА N-гликаны растворяли в ацетонитриле/воде (20/80; об./об.) и 10 микрограмм наносили на аналитическую колонку с аминопolyмером (арНега™, Supelco) для высокоэффективной жидкостной хроматографии с флуоресцентным выявлением (HPLC-FLD) и анализа с использованием масс-спектрометрии высокого разрешения (HRMS).

Жидкостно-хроматографическое (LC) разделение осуществляли в нормальных фазовых условиях в режиме градиентного элюирования с подвижной фазой А (2% уксусной кислоты в ацетонитриле) и подвижной фазой В (5% уксусной кислоты; 20-миллимолярный ацетат аммония в воде, доведенный до рН 4,3 гидроксидом аммония). Исходная композиция подвижной фазы составляла 70% А/30% В. Для флуоресцентного выявления параметрами для детектора (RF-20Ахs, Shimadzu) являлись: возбуждение (Ex) – 320 нм; излучение (Em) – 420 нм. Анализ HRMS проводили с использованием квадрупольного времяпролетного масс-спектрометра (Sciex X500В QTOF), работающего в режиме независимого сбора данных (IDA). Полученные файлы данных преобразовывали в файлы mzML с помощью MSConvert от ProteoWizard, а затем использовали программное обеспечение GRITS Toolbox 1.2 Morning Blend (UGA) для поиска в базе данных гликанов и последующего аннотирования идентифицированных N-гликанов. N-гликаны идентифицировали с использованием как моноизотопных масс-предшественников (масса/заряд), так и массы/заряда ионного продукта. Экспериментальные ионные продукты и закономерности фрагментации были подтверждены *in-silico* с использованием приложения GlycoWorkbench 2.

Для определения относительного количества N-связанных гликанов из АТВ200, данные, полученные в эксперименте HPLC-FLD-QTOF MS/MS, обрабатывали следующим образом. Все пики N-гликанов на хроматограмме FLD объединяли и каждому пику присваивали процент от общего количества площади всех пиков на хроматограмме FLD. Флуоресцентный сигнал, выраженный в виде площади пика, является количественной мерой числа каждого N-гликана в образце (фиг. 33А). Однако в большинстве случаев несколько видов N-гликанов содержались в одном и том же пике FLD. Следовательно, данные масс-спектрометра также требовались для получения относительной количественной оценки каждого вида N-гликанов (таблица 5). Сигнал интенсивности ионов для каждого N-гликана «извлекали» из данных для создания хроматографического пика, называемого экстрагированной ионной хроматограммой (ХИС). ХИС выравнивают с хроматографическим пиком FLD и она является специфичной только для одного вида N-гликанов. Пик ХИС, созданный из сигнала интенсивности ионов, затем интегрировали, и эта площадь пика является относительной количественной мерой количества присутствующего гликана. Обе области пиков FLD и площади пиков масс-спектрометра ХИС использовали для обеспечения относительного количественного определения всех N-связанных видов гликанов АТВ200, представленных в данном документе.

Результаты анализа по методу LC-MS/MS представлены в таблице 5 ниже. Номенклатура символов для представления гликанов соответствует Wopereis W, et al. 2006. Abnormal glycosylation with hypersialylated O-glycans in patients with Sialuria. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1762:598–607; Gornik O, et al. 2007. Changes of serum glycans during sepsis and acute pancreatitis. *Glycobiology*. 17:1321–1332 <https://doi.org/10.1093/glycob/cwm106>; Kattla JJ, et al. 2011. Biologic protein glycosylation. In: Murray Moo-Young (ed.), *Comprehensive Biotechnology*, Second Edition, 3:467–486; Tharmalingam-Jaikaran T, et al. N-glycan profiling of bovine follicular fluid at key dominant follicle developmental stages. 2014. *Reproduction*. 148:569–580; Clerc F, et al. Human plasma protein N-glycosylation. 2015. *Glycoconj J*. DOI 10.1007/s10719-015-9626-2 и Blackler RJ, et al. 2016. Single-chain antibody-fragment M6P-1 possesses a mannose 6-phosphate monosaccharide-specific binding pocket that distinguishes N-glycan phosphorylation in a branch-specific manner. *Glycobiology*. 26-2:181–192.

Таблица 5. Тип и распространенность олигосахаридов, идентифицированных на АТВ200, на основе картирования 2-АА гликана и идентификации LC-MS/MS

Высокоманнозные N-гликаны	% всего	Комплексные N-гликаны	% всего	Комплексные N-гликаны	% всего	Комплексные N-гликаны	% всего
2P-M7	11,39	FA2G2S1	3,89	A3G3S1+1Ac	0,65	FA2G2S1+1Ac	0,29
P-M7	7,97	FA2G2S2	3,42	A3G2S2+1Ac	0,64	A4G3	0,29
M6	6,89	A2G2S2	3,32	A1G1S1	0,63	A4G4+3KDN	0,29
P-M6	3,42	FA2G2	2,77	A4G3S1	0,61	A4G4S3	0,28
M5	2,06	FA4G4S3	2,26	FA3G3	0,61	FA5G4	0,24
P-M5	1,67	A2G2S1	2,25	A1G1	0,6	A4G3S2	0,21
2P-M8	1,27	FA3G3S1	2,12	FA2G2S2+1Ac	0,57	FA1	0,21
P-M8	1,17	A3G3S2	1,8	A3G2S1	0,57	FA4G4	0,21
BP-M6	0,9	FA2G1	1,66	A3G2S1	0,56	A3G1	0,21
M7	0,81	A2G2	1,46	A2G2S2+1Ac	0,5	FA4G3S2	0,21
BP-M7	0,69	FA3G3S1	1,42	FA3G2	0,45	FA3G2S2	0,21
M4	0,14	A4G4S1	1,28	A3G3+3KDN	0,45	A1	0,2
BP2-M5	0,04	FA3G3S2	1,25	A4G3S1	0,45	A4G2	0,19
BP2-M6	0,01	FA4G4(1LN)S3	1,1	A2G1S1	0,41	FA4G3	0,19
Гибридные N-гликаны	% всего	FA4G4S1	1,08	A3G2	0,4	FA3	0,18
FA1P-M6	2,16	A3G3	1,08	FA4G4S1+LN	0,4	A1G1S1	0,18
M5A1G1S1	1,56	FA4G4S4	1,07	FA3G2S1	0,39	A4G1S1	0,16
FP-M6A1G1S1	0,42	FA3G3S3	1,04	FA2	0,38	FA1G1	0,15
A1M5	0,36	FA4G4S2	0,94	FA4G4S2+LN	0,38	FA3G1	0,14
A1G1M5	0,32	A2G1	0,94	A3G2S2	0,37	FA5G4S2	0,12
P-M6A1G1S1	0,17	FA2G1S1	0,94	A2	0,34	A3G1S1	0,11

Общее содержание	Всего	A4G4	0,91	FA4G4(2LN) S3	0,33	A3	0,11
Высокоманнозные N-гликаны	38%	FA1G1S1	0,91	FA2G2Sg1	0,32	FA3G3S3+1 Ac	0,1
Гибридные N-гликаны	5%	FA2G2S2 +2Ac	0,76	FA4G4(1LN) S4	0,31	A2G2S1+1A c	0,09
Комплексные N-гликаны	57%	A4G4S2	0,69	A3G3S3	0,29	FA3G1S1	0,06

На основании этого 2-АА и анализа LC-MS/MS, и как дополнительно суммировано на фиг. 33С, исследуемая АТВ200 характеризуется средним содержанием М6Р, составляющим 3-5 моль в пересчете на моль АТВ200 (с учетом как моно-М6Р, так и бис- М6Р), и содержанием сиаловой кислоты, составляющим 4-7 моль в пересчете на моль АТВ200.

Как показано на фиг. 32А-32Н и суммировано на фиг. 33В, первый потенциальный сайт N-гликозилирования АТВ200 характеризуется средним содержанием М6Р, составляющим приблизительно 1,4 моль М6Р/моль АТВ200, что соответствует среднему содержанию моно-М6Р, составляющему приблизительно 0,25 моль моно-М6Р/моль АТВ200 и среднему содержанию бис-М6Р, составляющему приблизительно 0,56 моль бис-М6Р/моль АТВ200; второй потенциальный сайт N-гликозилирования АТВ200 характеризуется средним содержанием М6Р, составляющим приблизительно 0,5 моль М6Р/моль АТВ200, при этом первичные фосфорилированные виды N-гликана представляют собой моно-М6Р N-гликаны; третий потенциальный сайт N-гликозилирования АТВ200 характеризуется средним содержанием сиаловой кислоты, составляющим приблизительно 1 моль сиаловой кислоты/моль АТВ200; четвертый потенциальный сайт N-гликозилирования АТВ200 характеризуется средним содержанием М6Р, составляющим приблизительно 1,4 моль М6Р/моль АТВ200, что соответствует среднему содержанию моно-М6Р, составляющему приблизительно 0,35 моль моно-М6Р/моль АТВ200 и среднему содержанию бис-М6Р, составляющему приблизительно 0,52 моль бис-М6Р/моль АТВ200; пятый потенциальный сайт N-гликозилирования АТВ200 характеризуется средним содержанием сиаловой кислоты, составляющим приблизительно 0,86 моль сиаловой кислоты/моль АТВ200; шестой потенциальный сайт N-гликозилирования АТВ200 характеризуется средним

содержанием сиаловой кислоты, составляющим приблизительно 4,2 моль сиаловой кислоты/моль АТВ200; и седьмой потенциальный сайт N-гликозилирования АТВ200 характеризуется средним содержанием сиаловой кислоты, составляющим приблизительно 0,86 моль сиаловой кислоты/моль АТВ200.

Также согласно этому 2-АА и аналитической методике LC-MS/MS в среднем приблизительно 65% N-гликанов в первом потенциальном сайте N-гликозилирования АТВ200 представляют собой высокоманнозные N-гликаны, приблизительно 89% N-гликанов во втором потенциальном сайте N-гликозилирования АТВ200 представляют собой высокоманнозные N-гликаны, более половины N-гликанов в третьем потенциальном сайте N-гликозилирования АТВ200 являются сиалированными (почти 20% полностью сиалированы), и приблизительно 85% N-гликанов в третьем потенциальном сайте N-гликозилирования АТВ200 представляют собой комплексные N-гликаны, приблизительно 84% N-гликанов в четвертом потенциальном сайте N-гликозилирования АТВ200 представляют собой высокоманнозные N-гликаны, приблизительно 70% N-гликанов в пятом потенциальном сайте N-гликозилирования АТВ200 являются сиалированными (приблизительно 26% полностью сиалированы), и приблизительно 100% N-гликанов в пятом потенциальном сайте N-гликозилирования АТВ200 представляют собой комплексные N-гликаны, приблизительно 85% N-гликанов в шестом потенциальном сайте N-гликозилирования АТВ200 являются сиалированными (почти 27% полностью сиалированы), и приблизительно 98% N-гликанов в шестом потенциальном сайте N-гликозилирования АТВ200 представляют собой комплексные N-гликаны, и приблизительно 87% N-гликанов в седьмом потенциальном сайте N-гликозилирования АТВ200 являются сиалированными (почти 8% полностью сиалированы), и приблизительно 100% N-гликанов в седьмом потенциальном сайте N-гликозилирования АТВ200 представляют собой комплексные N-гликаны.

Пример 4. Аналитическое сравнение АТВ200 с Myozyme®/Lumizyme®

Очищенные N-гликаны АТВ200 и Lumizyme® оценивали с помощью MALDI-TOF для определения структур отдельных N-гликанов, выявляемых в каждом средстве для ERT. Lumizyme® получали из коммерческого источника. Как показано на фиг. 7 АТВ-200 демонстрирует четыре выступающие пика элюирования справа от Lumizyme®. Это подтверждает то, что АТВ200 была фосфорилирована в большей степени, чем

Lumizyme®, поскольку эту оценку проводили по концевому заряду, а не по аффинности к CIMPR. Как суммировано на фиг. 8, обнаружили, что образцы АТВ200 содержали меньшие количества нефосфорилированных N-гликанов высокоманнозного типа, чем Lumizyme®.

Для оценки возможностей традиционных rhGAA в Myozyme® и Lumizyme® взаимодействовать с CIMPR, два традиционных препарата на основе rhGAA вводили в колонку с CIMPR (который связывается с rhGAA, содержащей группы М6Р) и собирали элюат. Связанный материал элюировали свободным градиентом М6. Фракции собирали в 96-луночный планшет и активность GAA анализировали с помощью субстрата, представляющего собой 4MU- α -глюкозидазу. Относительные количества несвязанной (элюат) и связанной rhGAA определяли на основании активности GAA и регистрировали в виде доли от общего количества фермента. На фиг. 9А и 9В показан профиль связывания rhGAA в Myozyme® и Lumizyme®: 73% rhGAA в Myozyme® (фиг. 9В) и 78% rhGAA в Lumizyme® (фиг. 9А) не связывается с CIMPR. В самом деле, только 27% rhGAA в Myozyme® и 22% rhGAA в Lumizyme® содержали М6Р, который способен продуктивно нацеливать ее на CIMPR в мышечных клетках. В отличие от этого, как показано на фиг. 5, при тех же условиях было обнаружено, что более чем 70% rhGAA в АТВ200 связывается с CIMPR.

В дополнение к наличию более высокой процентной доли rhGAA, которая может связываться с CIMPR, важно понимать качество такого взаимодействия. Связывание Lumizyme® и АТВ200 с рецепторами определяли с помощью анализа связывания с CIMPR на планшетах. Вкратце, планшеты, покрытые CIMPR, использовали для захвата GAA. На иммобилизованный рецептор наносили rhGAA в различных концентрациях и несвязанную rhGAA вымывали. Количество оставшейся rhGAA определяли по активности GAA. Как показано на фиг. 10А, АТВ200 связывалась с CIMPR значительно лучше, чем Lumizyme®. На фиг. 10В показано относительное содержание бис-М6Р N-гликанов в Lumizyme® (традиционный продукт на основе rhGAA) и АТВ200 в соответствии с настоящим изобретением. В случае с Lumizyme® в среднем только 10% молекул содержат бисфосфорилированный N-гликан. Напротив, в среднем каждая молекула rhGAA в АТВ200 содержит по меньшей мере один бисфосфорилированный N-гликан.

В целом, более высокое содержание N-гликанов М6Р в АТВ200 по сравнению с Lumizyme® указывает на то, что более высокая доля молекул rhGAA в АТВ200 может воздействовать на мышечные клетки. Как показано выше, высокая процентная доля монофосфорилированных и бисфосфорилированных структур, определенная с помощью MALDI, согласуется с профилями связывания с CIMPR, которые иллюстрируют значительно большую степень связывания АТВ200 с CIMPR-рецептором. Анализ N-гликанов посредством масс-спектрометрии MALDI-TOF подтвердил, что в среднем каждая молекула АТВ200 содержит по меньшей мере одну природную бис-М6Р-N-гликановую структуру. Такое повышенное содержание N-гликанов с бис-М6Р в АТВ200 непосредственно коррелирует со связыванием с CIMPR с высокой аффинностью в анализах связывания с использованием планшета с рецептором М6Р (K_D приблизительно 2-4 нМ).

Сравнивали относительное поглощение клетками rhGAA АТВ200 и Lumizyme® с использованием линии нормальных клеток-фибробластов и линии клеток-фибробластов при болезни Помпе. В сравнения включали 5-100 нМ АТВ200 в соответствии с настоящим изобретением и 10-500 нМ традиционного продукта на основе rhGAA Lumizyme®. После 16-часового инкубирования, находящуюся снаружи rhGAA инактивировали с помощью основания TRIS и клетки промывали 3 раза с помощью PBS перед их сбором. Интернализированную GAA измеряли посредством гидролиза 4MU- α -глюкозида, и данные наносили на график относительно общего содержания клеточного белка, и результаты показаны на фиг. 11А-11С.

Было показано, что АТВ200 эффективно интернализировалась в клетки. Как показано на фиг. 11А-11В, АТВ200 интернализируется как нормальными клетками-фибробластами, так и клетками-фибробластами при болезни Помпе, и при этом она интернализируется в большей степени, чем традиционный продукт на основе rhGAA Lumizyme®. АТВ200 насыщает клеточные рецепторы при приблизительно 20 нМ, тогда как в случае с Lumizyme® необходимо приблизительно 250 нМ для насыщения клеточных рецепторов. Константа эффективности поглощения ($K_{\text{поглощения}}$), экстраполированная из этих результатов, составляет 2-3 нМ для АТВ200 и 56 нМ для Lumizyme®, как показано на фиг. 11С. Эти результаты позволяют предположить, что АТВ200 представляет собой хорошо нацеливаемое средство для лечения болезни Помпе.

Пример 5. АТВ200 и фармакологический шаперон

Стабильность АТВ200 в кислых или нейтральных рН-буферах оценивали в анализе термостабильности с применением SYPRO Orange, поскольку флуоресценция красителя увеличивается, когда белки денатурируют. Как показано на фиг. 12, добавление АТ2221 стабилизировало АТВ200 при рН 7,4 зависимым от концентрации образом, сравнимым со стабильностью АТВ200 при рН 5,2, – условие, которое имитирует кислую среду лизосомы. Как показано в таблице 6, добавление АТ2221 увеличило температуру плавления (T_m) АТВ200 почти на 10°C.

Таблица 6. Стабильность АТВ200 в комбинации с АТ2221

Условия исследования	T_m (°C)
рН 7,4	56,2
рН 7,4 + 10 мкМ АТ2221	61,6
рН 7,4 + 30 мкМ АТ2221	62,9
рН 7,4 + 100 мкМ АТ2221	66,0
рН 5,2	67,3

Пример 6. Совместное введение АТВ200 и АТ2221 мышам Gaa KO

Терапевтические эффекты АТВ200 и АТ2221 оценивали и сравнивали с эффектами алглюкозидазы альфа у мышей Gaa KO. Для исследования использовали самцов Gaa KO (от 3 до 4 месяцев) и мышей соответствующего возраста (WT). Алглюкозидазу альфа вводили посредством внутривенной болюсной (IV) инъекции в хвостовую вену. В режиме совместного введения АТ2221 вводили посредством орального зонда (PO) за 30 минут до IV инъекции АТВ200. Лечение осуществляли раз в две недели. Подвергавшихся лечению мышей умерщвляли через 14 дней после последнего введения и собирали различные ткани для дальнейшего анализа. В таблице 7 суммирован план исследования.

Таблица 7. План исследования с совместным введением

Генотип	Лечение	Доза лекарственного средства за одно введение (раз в две недели)	Количество введений

Gaa KO	Носитель	Н/д	6
Gaa KO	Алглюкозидаза альфа	20 мг/кг	6
Gaa KO	АТВ200/АТ2221	20 мг/кг (АТВ200) 10 мг/кг (АТ2221)	6
WT (Sve 129)	Не подвергавшиеся лечению	Н/д	Н/д

Содержание гликогена в тканях определяли с использованием расщепления амилоглюкозидазой, как обсуждалось выше. Как показано на фиг. 13, комбинация из 20 мг/кг АТВ200 и 10 мг/кг АТ2221 способствовала значительному снижению содержания гликогена в четырех различных тканях (четырёхглавая мышца, трицепс, икроножная мышца и сердце) по сравнению с такой же дозой алглюкозидазы альфа.

Образцы тканей также анализировали в отношении изменения биомаркеров в соответствии со способами, обсуждаемыми в: Khanna R, et al. (2012), «The pharmacological chaperone AT2220 increases recombinant human acid α -glucosidase uptake and glycogen reduction in a mouse model of Pompe disease», Plos One 7(7): e40776 и Khanna, R et al. (2014), «The Pharmacological Chaperone AT2220 Increases the Specific Activity and Lysosomal Delivery of Mutant Acid α -Glucosidase, and Promotes Glycogen Reduction in a Transgenic Mouse Model of Pompe Disease», PLoS ONE 9(7): e102092. Как показано на фиг. 14, значительное увеличение и укрупнение LAMP1-положительных везикул было замечено в мышечных волокнах животных Gaa KO по сравнению с WT, что свидетельствует о пролиферации лизосом. Совместное введение АТВ200/АТ2221 приводило к большему количеству волокон с нормализованным уровнем LAMP1, в то время как оставшиеся LAMP1-положительные везикулы также уменьшились в размере (вставки).

Аналогично, интенсивные LC3-положительные агрегаты в мышечных волокнах не подвергавшихся лечению мышей Gaa KO указывают на наличие аутофагических зон и накопление аутофагосом. LC3-положительные агрегаты (красный) были преимущественно снижены у мышей, подвергавшихся лечению с помощью совместного введения АТВ200/АТ2221 по сравнению с мышами, получавшими алглюкозидазу альфа (фиг. 15А). При оценке экспрессии LC3 с использованием

вестерн-блоттинга было сделано аналогичное наблюдение. Как показано на фиг. 15B, у большинства животных, подвергавшихся лечению с помощью АТВ200/АТ2221, наблюдали значительное снижение уровней LC3 II, липидированной формы, которая связана с аутофагосомами, что свидетельствует об улучшении аутофагического потока. Для сравнения, влияние алглукозидазы альфа на аутофагию было незначительным.

Также оценивали дисферлин – белок, участвующий в восстановлении мембраны и дефицит/неправильная миграция которого связаны с рядом мышечных дистрофий. Как показано на фиг. 16, дисферлин (коричневый) в большом количестве накапливался в саркоплазме мышей Gaа KO. По сравнению с алглукозидазой альфа, АТВ200/АТ2221 способствовала восстановлению дисферлина в сарколемме в большем количестве мышечных волокон.

Эти данные согласуются с улучшениями на клеточном уровне, продемонстрированными у пациентов с болезнью Помпе, подвергавшихся лечению с помощью АТВ200 и миглустата (например, пациенты характеризуются пониженным уровнем биомаркеров накопления гликогена и повреждения мышц), что приводит не только к эффективному лечению болезни Помпе, но также к реверсии прогрессирования заболевания. Клинические данные пациентов с болезнью Помпе человека обобщены в примерах 8-13 ниже.

Пример 7. Анализ отдельного волокна

Как показано на фиг. 17, у большинства мышечных волокон, подвергавшихся лечению с помощью носителя, были обнаружены сильно увеличенные лизосомы (зеленый) (см., например, «B») и наличие массивного накопления аутофагосом (красный) (см., например, «A»). Мыши, подвергавшиеся лечению с помощью Myozyme®, не продемонстрировали каких-либо существенных различий по сравнению с мышцами, подвергшимися лечению с помощью носителя. Напротив, большинство волокон, выделенных из мышечных волокон, подвергавшихся лечению с помощью АТВ200, продемонстрировали резко уменьшенный размер лизосом (см., например, «C»). Кроме того, участок с накоплением аутофагосом также был уменьшен в различных степенях (см., например, «C»). В результате значительная часть проанализированных мышечных волокон (36-60%) от мышечных волокон, подвергавшихся лечению с помощью АТВ200, оказалась нормальной или

почти нормальной. В таблице 8 ниже приведен анализ отдельного волокна, показанный на фиг. 17.

Таблица 8. Анализ отдельного волокна

Лечение	Анализируемые животные	Общее количество проанализированных волокон (n)	Увеличение лизосом	Волокна с накоплением аутофагосом	Волокна с нормальным или почти нормальным внешним видом
WT	2	65	-	-	100%
Носитель	2	65	+	> 90%	< 10%
Алглюкозид аза альфа	4	150	+	> 90%	< 10%
АТВ200	5	188	Резкое уменьшение размера у большей части волокон	40-64%*	36-60%

* Включены волокна с различной степенью снижения накопления аутофагосом. В целом, степень накопления была меньше в группе, подвергавшихся лечению с помощью АТВ200, по сравнению с группой, подвергавшихся лечению с помощью алглюкозидазы альфа или носителя.

В целом, данные указывают на то, что АТВ200 с ее более высоким содержанием М6Р, как отдельно, так и дополнительно стабилизированная фармакологическим шапероном АТ2221 при нейтральном рН крови, более эффективна для целенаправленного воздействия на ткани и лизосомного транспорта по сравнению с алглюкозидазой альфа при введении мышам Gaa KO в соответствии со стабилизацией АТВ200 посредством АТ2221, как показано на фиг. 18. Как результат, введение АТВ200 и совместное введение АТВ200/АТ2221 были более эффективными по сравнению с алглюкозидазой альфа при коррекции некоторых патологий, связанных с заболеванием, таких как накопление гликогена, пролиферация лизосом и образование аутофагических зон. Благодаря этим положительным терапевтическим эффектам совместное введение АТВ200 и АТВ200/АТ2221 повышает вероятность восстановления мышечного волокна

от поражения и даже обеспечивает реверсию поражения с помощью удаления гликогена, накопленного в клетке из-за отсутствия оптимальной активности GAA. Как и в примере 6, эти данные также согласуются с улучшениями на клеточном уровне, продемонстрированными у пациентов с болезнью Помпе, которые приводят как к эффективному лечению болезни Помпе, так и к реверсии прогрессирования заболевания после введения АТВ200 и миглустата. Клинические данные пациентов с болезнью Помпе человека обобщены в примерах 8-13 ниже.

Пример 8. Исследование АТВ200-02: изучение с участием человека АТВ200/АТ2221 у пациентов с болезнью Помпе.

Доклинические исследования проводили на нокаутных мышах Gaa, чтобы оценить фармакокинетику (PK) и эффективность снижения содержания гликогена при различных вариантах ферментозаместительной терапии АТВ200 (ERT) и дозах шаперона АТ2221. Эти данные использовали для оценки сопоставимых доз шаперона АТ2221 у людей. Затем исследование АТВ200-02 (NCT02675465) разработали как открытое исследование с фиксированной последовательностью приема препаратов, нарастающей дозой, впервые проводимое у человека, фазы 1/2 для оценки безопасности, переносимости, PK, фармакодинамики (PD) и эффективности АТВ200 при совместном введении с АТ2221 пациентам с болезнью Помпе. На фиг. 9А-19В показана схема исследования АТВ200-02. Пациенты, способные ходить, которые ранее получали ферментозаместительную терапию алглюкозидазой альфа, называются пациентами, способными ходить, у которых провели замену ERT (или способными ходить, у которых провели замену ERT), или пациентами когорты 1. Пациенты, неспособные ходить, которые ранее получали ферментозаместительную терапию алглюкозидазой альфа, называются пациентами, неспособными ходить, у которых провели замену ERT (или неспособными ходить, у которых провели замену ERT), или пациентами когорты 2. Пациенты, способные ходить, которые ранее не получали ферментозаместительную терапию алглюкозидазой альфа, называются пациентами, которые не получали ERT (или способными ходить, у которых провели замену ERT), или пациентами когорты 3.

В исследовании АТВ200-02 приняли участие шестнадцать клинических центров в пяти странах. В исследовании использовали следующие ключевые критерии включения: мужчины и женщины в возрасте 18-65 лет, которым был поставлен диагноз болезнь

Помпе на основании документально подтвержденного дефицита ферментативной активности GAA или фенотипирования GAA, и которые получали ферментозаместительную терапию алглюкозидазой альфа в течение 2-6 лет (или ≥ 2 лет для когорты 2) до начала испытания (когорты 1). Подходящими субъектами были субъекты, получающие алглюкозидазу альфа с частотой один раз в две недели, которым были проведены 2 последние инфузии без нежелательных явлений, связанных с приемом лекарственного средства (АЕ), которые приводят в результате к временному прекращению введения доз (когорты 1 и 2) Субъекты должны были быть в состоянии пройти от 200 до 500 метров в тесте с 6-минутной ходьбой (6MWT) (когорты 1 и 3), иметь форсированную жизненную емкость в положении стоя (FVC), составляющую 30-80% от прогнозируемого нормального значения (когорты 1 и 3), или быть прикованным к инвалидной коляске и неспособным ходить без посторонней помощи (когорты 2). Протоколы для теста 6MWT и FVC можно найти, например, в Lachman and Schoser, *Journal of Rare Diseases*, 2013, 8:160 и в Bittner and Singh, *The 6 Minute Walk Test, Cardiology Advisor*, 2013. На фиг. 19С представлены исходные характеристики для 20 субъектов. Безопасность, переносимость и биомаркеры оценивали для когорт 1, 2 и 3. Следующие функциональные оценки оценивали для когорт 1 и 3: 6MWT, другие двигательные функциональные тесты (тесты на время и тест ходьба-подъем по лестнице-прием Говерса-вставание со стула (GSGC)), мануальный тест мышц и оценку легочной функции (FVC, с определением максимального давления при вдохе (MIP)/с определением максимального давления при выдохе (MEP)). Протоколы для тестов на время и тестов GSGC можно найти, например, в Lachman and Schoser, *Journal of Rare Diseases*, 2013, 8:160 и в Bittner and Singh, *The 6 Minute Walk Test, Cardiology Advisor*, 2013. Для когорты 2 функциональные оценки включали тесты мышечной силы.

Пример 9. Промежуточные результаты РК в испытании АТВ200-02

Краткое описание фармакокинетических данных для АТ2221 представлено на фиг. 20. Концентрации общего белка GAA в плазме для АТВ200 при 5 мг/кг, 10 мг/кг и 20 мг/кг определяли с помощью валидированного количественного анализа по методу LC-MS/MS для rhGAA-специфического(-их) «сигнатурного»(-ых) пептида(-ов) T09 (первичное) и T50 (подтверждающее) для 11 пациентов когорты 1, которые завершили стадии 1 и 2, а также для пяти пациентов когорты 2, которые завершили исследование РК на стадии 3. Для стадии 1 образцы крови для определения концентрации общего

белка GAA в плазме отбирали до начала инфузии АТВ200 и через 1, 2, 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 6, 8, 10, 12 и 24 часа после начала инфузии. Для стадии 2 и стадии 3 образцы крови для определения концентрации общего белка GAA в плазме отбирали до начала инфузии и через 1, 2, 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 6, 8, 10, 12 и 24 часа после начала инфузии.

Анализы АТ2221 РК также выполняли для 11 пациентов когорты 1, которые завершили стадии 1 и 2, а также для пяти пациентов когорты 2, которые завершили исследование РК на стадии 3. Образцы крови для определения концентраций АТ2221 в плазме крови отбирали непосредственно перед пероральным введением АТ2221 (момент времени 0) и через 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 4, 5, 6, 9, 11 и 25 часов после перорального введения АТ2221. Количество АТ2221 в плазме крови определяли с помощью валидированного анализа по методу LC-MS/MS.

Как показано на фиг. 21, уровни АТВ200 увеличивались в пропорции, слегка превышающей дозу при введении отдельно. Совместное введение АТВ200 при 20 мг/кг с одной высокой дозой (260 мг) АТ2221 увеличило общую площадь воздействия белка GAA под кривой (AUC) на приблизительно 17% по сравнению с АТВ200 при 20 мг/кг, введенных отдельно (фиг. 21, фиг. 22C). Совместное введение АТВ200 в дозе 20 мг/кг при множественных высоких дозах (260 мг) АТ2221 увеличило общую площадь воздействия белка GAA под кривой (AUC) на приблизительно 29% по сравнению с АТВ200 при 20 мг/кг, введенных отдельно (фиг. 21, фиг. 22D). Увеличение периода полувыведения и частичного AUC-24 ч. наблюдали на логарифмической шкале во время конечной фазы элиминации (фиг. 21, фиг. 22A, фиг. 22B). Как показано на фиг. 21, период полувыведения (α -фаза) увеличился на 40%, что согласуется со стабилизирующим эффектом высокой дозы АТ2221 в отношении АТВ200 в плазме. Увеличение периода полувыведения сопровождалось увеличением частичной AUC от времени достижения максимальной концентрации в плазме до 24 часов после введения дозы на 42,2% (фиг. 21, фиг. 22B). Дополнительное доказательство стабилизации АТВ200 с помощью АТ2221 наблюдали в сравнениях через 12 и 24 часа после введения дозы АТ2221 с низкой и высокой дозой по сравнению с АТВ200 отдельно (фиг. 22E и 22F). Не было статистически значимой разницы в воздействии на весь белок GAA в плазме между пациентами, не получавшими ERT (когорта 3), и пациентами, у которых провели замену ERT (когорта 1) (фиг. 23). Распределение РК сигнатурного пептида T50 не отличалось от такового у сигнатурного пептида T09 (соотношение AUC: 1,00).

Пример 10. Промежуточные результаты эффективности в испытании АТВ200-02

Как показано на фиг. 24А и 24В, показатели теста 6MWT улучшались для пациентов, способных ходить, у которых провели замену ERT, и для пациентов, не получавших ERT, на 6-м месяце с сохраняющимся преимуществом, наблюдаемым до месяца 12. Показатель теста 6MWT увеличился у 7/10, 8/10 и 8/8 пациентов, у которых провели замену ERT, соответственно через 6, 9 и 12 месяцев. Показатель теста 6MWT увеличился у 5/5, 5/5 и 2/2 пациентов, которые не получали ERT, соответственно через 6, 9 и 12 месяцев.

Как показано на фиг. 24С, фиг. 26А и фиг. 26С, улучшения в тестах двигательной функции и силы при мануальном тестировании мышц, наряду с 6MWT, соответствовали общему улучшению мышечной функции как у пациентов, у которых провели замену ERT, так и у пациентов, не получавших ERT, в течение 12 месяцев.

Как показано на фиг. 25 и фиг. 26В, у всех пациентов, неспособных ходить, у которых провели замену ERT, наблюдалось последовательное и существенное увеличение силы верхних конечностей через 6 и 9 месяцев.

Как показано на фиг. 27, FVC была стабильной или повышенной у 5/9, 6/9 и 3/7 пациентов, у которых провели замену ERT, соответственно через 6, 9 и 12 месяцев, и FVC была стабильной или повышенной у 5/5, 5/5 и 2/2 пациентов, не получавших ERT, соответственно через 6, 9 и 12 месяцев. Также, как показано на фиг. 27, максимальное давление при вдохе (MIP) было стабильным, а максимальное давление при выдохе (MEP) увеличивалось у пациентов, способных ходить, у которых провели замену ERT, в то время как MIP увеличивалось, а MEP было стабильным у пациентов, не получавших ERT.

Шкала оценки выраженности утомляемости (FSS) представляет вопросник для самооценки, состоящий из девяти вопросов, каждый из которых оценивается по шкале от 1 до 7. Общий показатель варьируется от 9 до 63, причем более высокие значения представляют более высокий уровень утомляемости из-за болезненного состояния. Нормативное значение в здоровой популяции составляет приблизительно 21 (Grace J et al. *Parkinsonism Relat Disord.* 2007;13:443-445). Как показано на фиг. 28, все когорты характеризовались значительной утомляемостью на исходном уровне, и все когорты продемонстрировали улучшение FSS после приема АТВ200/АТ2221.

Пример 11. Промежуточные результаты в испытании АТВ200-02 Маркеры повреждения мышц

Оценивали следующие маркеры поражения мышц: фермент креатинкиназа (СК), аланинаминотрансфераза (ALT) и аспаратаминотрансфераза (AST). Результаты, полученные после девяти месяцев клинического испытания, представлены на фиг. 29А-29С (максимальные данные за 58 недель, 24 недели и 36 недель соответственно для когорт 1, 2 и 3; более низкие значения п отражают то, что некоторые данные либо не могли быть проанализированы, либо еще не были проанализированы). Среднее снижение по сравнению с исходным уровнем, наблюдаемое в соответствующие моменты времени, составляло приблизительно 30-35% для пациентов, способных ходить, у которых провели замену ERT (n=9), 5-20% для пациентов, неспособных ходить, у которых провели замену ERT (n=4), и 40-55% для пациентов, не получавших ERT (n=5). Результаты для фермента СК, доступные после двенадцати месяцев клинического испытания, представлены на фиг. 29D (данные максимум за 12 месяцев для когорт 1, 2 и 3; более низкие значения п отражают то, что некоторые данные либо не могли быть проанализированы, либо еще не были проанализированы).

Тетрасахарид гексозы в моче (Hex4) оценивали как маркер накопления гликогена. Результаты для Hex4, доступные после двенадцати месяцев клинического испытания, представлены на фиг. 29D (данные максимум за 12 месяцев для когорт 1, 2 и 3; более низкие значения п отражают то, что некоторые данные либо не могли быть проанализированы, либо еще не были проанализированы).

Пример 12. Промежуточные результаты безопасности в испытании АТВ200-02

Самая длительная продолжительность лечения составила более 20 месяцев. Нежелательные явления (АЕ), как правило, были легкими и проходящими, с очень низкой частотой реакций, связанных с инфузией (менее чем 1%), после более чем 400 полных инфузий во всех трех когортах. Эти случаи контролировались стандартной премедикацией.

Наиболее распространенными АЕ, которые, как сообщалось, были связаны с лечением в течение не более 72 недель, являлись тошнота (3/20), тремор (3/20), головная боль (3/20), утомляемость (3/20), диарея (2/20), мышечный спазм (2/20) и отек суставов (2/20).

Наиболее распространенными АЕ, которые, как сообщалось, были связаны с лечением в течение не более 20+ месяцев, являлись боли в животе (включая боль в верхней и нижней частях живота) (8/20), диарея (8/20), назофарингит (6/20), тошнота (5/20), головная боль (5/20) и инфекция верхних дыхательных путей (5/20) (фиг. 30). Сообщалось об одном серьезном АЕ, которое не имело отношения к исследуемому лекарственному средству (госпитализация по поводу инфекции нижних дыхательных путей). Ни один пациент не прекратил участие в исследовании вследствие АЕ.

В 550+ инфузиях было три случая реакций, связанных с инфузией (IAR), которые контролировались стандартной премедикацией. Одно явление IAR (обесцвечивание кожи) произошло у пациента, неспособного ходить, у которого провели замену ERT (когорта 2). Два явления IAR (локализованный зуд, эритема и ощущение жжения) произошли у пациента, не получавшего ERT (когорта 3) (фиг. 30).

Пример 13. Краткое описание и итоги промежуточных результатов в испытании АТВ200-02

Как показано на фиг. 31, в промежуточных данных из исследования АТВ200-02 есть соответствие, показывающее значительные и неожиданные параллельные улучшения маркеров повреждения мышц и накопления субстрата, тестов мышечной функции (тесты на время и выносливость), силы при мануальном тестировании мышц и стабилизацию и/или улучшение респираторных функциональных тестов в разных когортах. Мышечная функция улучшилась у 16/18 и 10/10 пациентов соответственно через 6 и 9 месяцев. Увеличение расстояния в тесте 6MWT было постоянным и длительным у пациентов, способных ходить, у которых провели замену ERT, и у пациентов, не получавших ERT, до 12-го месяца, так же как и в других тестах двигательной функции у пациентов, способных ходить, у которых провели замену ERT, и пациентов, не получавших ERT. Качественные и количественные измерения показали увеличение силы верхних конечностей у пациентов, неспособных ходить, у которых провели замену ERT, в месяцы 6 и 9. FVC, MIP и MEP в целом были стабильными у пациентов, у которых провели замену ERT, и увеличивались у пациентов, не получавших ERT. Улучшение показателя утомляемости наблюдалось во всех когортах. Уровни биомаркеров (например, уровни СК и Hex4) снижались во всех когортах, и комбинация АТВ200/АТ2221 в целом хорошо переносилась.

Таким образом, многомерное воздействие терапии предполагает, что комбинированный режим АТВ200/АТ2221 потенциально может быть важным вариантом лечения для пациентов с болезнью Помпе. Такие клинические результаты подтверждают результаты исследований по анализу отдельных волокон, описанных в примере 7, которые демонстрируют, что лечение эффективно при устранении патологии мышечных волокон. Дальнейшее изучение клинического испытания продолжается.

Формула изобретения

1. Способ лечения болезни Помпе у субъекта, нуждающегося в этом, предусматривающий введение субъекту популяции молекул рекомбинантной человеческой кислой α -глюкозидазы (rhGAA) из клеток яичника китайского хомячка (CHO);

где молекулы rhGAA содержат семь потенциальных сайтов N-гликозилирования;

где молекулы rhGAA в среднем содержат 3-4 остатка маннозо-6-фосфата (M6P);

где молекулы rhGAA в среднем содержат по меньшей мере приблизительно 0,5 моль бис-маннозо-6-фосфата (бис-M6P) в пересчете на моль rhGAA в первом потенциальном сайте N-гликозилирования, как определено с помощью жидкостной хроматографии с тандемной масс-спектрометрией (LC-MS/MS); и

где популяцию молекул rhGAA вводят в дозе, способной обеспечивать реверсию прогрессирования заболевания у субъекта.

2. Способ по п. 1, где реверсия прогрессирования заболевания включает уменьшение размера лизосом в мышце субъекта.

3. Способ по п. 1 или п. 2, где реверсия прогрессирования заболевания включает прекращение накопления аутофагосом в мышце субъекта.

4. Способ по п. 3, где менее чем 65% мышечных волокон, проанализированных у субъекта, характеризуются накоплением аутофагосом после лечения.

5. Способ по любому из пп. 1-4, где субъект является пациентом, у которого провели замену ERT.

6. Способ по п. 5, где пациента, у которого провели замену ERT, ранее подвергался лечению с помощью α -глюкозидазы альфа в течение по меньшей мере двух лет.

7. Способ по любому из пп. 1-6, где по меньшей мере 36% мышечных волокон, проанализированных у субъекта, имеют нормальный или почти нормальный внешний вид после лечения.

8. Способ лечения болезни Помпе у субъекта, нуждающегося в этом, предусматривающий введение субъекту популяции молекул рекомбинантной человеческой кислой α -глюкозидазы (rhGAA) из клеток яичника китайского хомячка (CHO);

где молекулы rhGAA содержат семь потенциальных сайтов N-гликозилирования;

где молекулы rhGAA в среднем содержат 3-4 остатка маннозо-6-фосфата (M6P);

где молекулы rhGAA в среднем содержат по меньшей мере приблизительно 0,5 моль бис-маннозо-6-фосфата (бис-M6P) в пересчете на моль rhGAA в первом потенциальном сайте N-гликозилирования, как определено с применением LC-MS/MS; и

где содержание гликогена в мышце субъекта после лечения снижается быстрее, чем в случае введения алглюкозидазы альфа в той же дозе.

9. Способ по п. 8, где содержание гликогена в мышце субъекта после лечения снижается со скоростью, которая в по меньшей мере приблизительно 1,25, 1,5, 1,75, 2,0 или 3,0 раза выше, чем скорость при введении алглюкозидазы альфа в той же дозе.

10. Способ по п. 8 или п. 9, где содержание гликогена в мышце субъекта после лечения снижается более эффективно, чем в случае введения алглюкозидазы альфа в той же дозе, при оценке спустя одно, два, три, четыре, пять или шесть введений.

11. Способ по п. 10, где содержание гликогена в мышце субъекта после лечения снижается на по меньшей мере приблизительно 10%, 20%, 30%, 50%, 75% или 90% более эффективно, чем в случае введения алглюкозидазы альфа в той же дозе.

12. Способ по п. 10 или п. 11, где содержание гликогена оценивают после шести введений.

13. Способ по любому из пп. 8-12, где субъект характеризуется пониженными уровнями тетрасахарида гексозы в моче после лечения.

14. Способ по п. 13, где уровни тетрасахарида гексозы в моче через шесть месяцев после лечения снижаются на по меньшей мере 30% по сравнению с исходным уровнем.

15. Способ по п. 13, где субъект является пациентом, способным ходить, у которого провели замену ERT, или пациентом, неспособным ходить, у которого провели замену ERT, и где у субъекта уровни тетрасахарида гексозы в моче через шесть месяцев после лечения снижаются на по меньшей мере 35% по сравнению с исходным уровнем.

16. Способ по п. 13, где субъект является пациентом, способным ходить, не получавшим ERT, и при этом у субъекта уровни тетрасахарида гексозы в моче через шесть месяцев после лечения снижаются на по меньшей мере 45% по сравнению с исходным уровнем.

17. Способ лечения болезни Помпе у субъекта, нуждающегося в этом, предусматривающий введение субъекту популяции молекул рекомбинантной человеческой кислой α -глюкозидазы (rhGAA) из клеток яичника китайского хомячка (CHO);

где молекулы rhGAA содержат семь потенциальных сайтов N-гликозилирования;

где молекулы rhGAA в среднем содержат 3-4 остатка маннозо-6-фосфата (M6P);

где молекулы rhGAA в среднем содержат по меньшей мере приблизительно 0,5 моль бис-маннозо-6-фосфата (бис-M6P) в пересчете на моль rhGAA в первом потенциальном сайте N-гликозилирования, как определено с применением LC-MS/MS;
и

где популяцию молекул rhGAA вводят в дозе, способной обеспечивать улучшение двигательной функции у субъекта.

18. Способ по п. 17, где улучшенную двигательную функцию у субъекта измеряют с помощью по меньшей мере одного теста двигательной функции, выбранного из группы, состоящей из теста с шестиминутной ходьбой (6MWT), теста с вставанием со стула и ходьбой с отсчетом времени, теста с подъемом по четырем ступеням, теста с ходьбой на 10 метров, теста Говерса, теста «ходьба-подъем по лестнице-прием Говерса-вставание со стула» (GSGC) и их комбинаций.

19. Способ по п. 18, где по сравнению с исходным уровнем расстояние, которое проходит субъект, в тесте 6MWT через шесть месяцев после лечения увеличивается на по меньшей мере 20 метров, время прохождения субъектом теста с вставанием со стула и ходьбой с отсчетом времени через шесть месяцев после лечения уменьшается на по меньшей мере 1 секунду, время прохождения теста с подъемом по четырем ступеням через шесть месяцев после лечения уменьшается на по меньшей мере 0,6 секунды, время прохождения субъектом теста с ходьбой на десять метров через шесть месяцев после лечения уменьшается на по меньшей мере 0,7 секунды, время прохождения субъектом теста Говерса через шесть месяцев после лечения уменьшается на по меньшей мере 1 секунду или показатель GSGC у субъекта через шесть месяцев после лечения уменьшается на по меньшей мере 1.

20. Способ по п. 18, где субъект является пациентом, способным ходить, у которого провели замену ERT, и где по сравнению с исходным уровнем расстояние, которое проходит субъект, в тесте 6MWT через шесть месяцев после лечения увеличивается на по меньшей мере 20 метров, время прохождения субъектом теста с вставанием со стула и ходьбой с отсчетом времени через шесть месяцев после лечения уменьшается на по меньшей мере 1,5 секунды, время прохождения субъектом теста с подъемом по четырем ступеням через шесть месяцев после лечения уменьшается на по меньшей мере 0,6 секунды или время прохождения субъектом теста Говерса через шесть месяцев после лечения уменьшается на по меньшей мере 1 секунду.

21. Способ по п. 18, где субъект является пациентом, способным ходить, не получавшим ERT, и где по сравнению с исходным уровнем расстояние, которое проходит субъект, в тесте 6MWT через шесть месяцев после лечения увеличивается на по меньшей мере 40 метров, время прохождения субъектом теста с вставанием со стула и ходьбой с отсчетом времени через шесть месяцев после лечения уменьшается на по меньшей мере 1 секунду, время прохождения субъектом теста с подъемом по четырем ступеням через шесть месяцев после лечения уменьшается на по меньшей мере 0,6 секунды, время прохождения субъектом теста с ходьбой на десять метров через шесть месяцев после лечения уменьшается на по меньшей мере 0,7 секунды или показатель GSGC у субъекта через шесть месяцев после лечения уменьшается на по меньшей мере 1.

22. Способ по п. 18, где субъект ранее получал ферментозаместительную терапию с помощью алглюкозидазы альфа, где у субъекта наблюдается улучшение в по меньшей мере одном тесте двигательной функции после лечения с помощью популяции rhGAA по сравнению с результатом теста двигательной функции субъекта после предыдущей ферментозаместительной терапии с помощью алглюкозидазы альфа.

23. Способ лечения болезни Помпе у субъекта, нуждающегося в этом, предусматривающий введение субъекту популяции молекул рекомбинантной человеческой кислой α -глюкозидазы (rhGAA) из клеток яичника китайского хомячка (CHO);

где молекулы rhGAA содержат семь потенциальных сайтов N-гликозилирования;

где молекулы rhGAA в среднем содержат 3-4 остатка маннозо-6-фосфата (M6P);

где молекулы rhGAA в среднем содержат по меньшей мере приблизительно 0,5 моль бис-маннозо-6-фосфата (бис-M6P) в пересчете на моль rhGAA в первом потенциальном сайте N-гликозилирования, как определено с применением LC-MS/MS; и

где популяцию молекул rhGAA вводят в дозе, способной обеспечивать улучшение силы верхней части тела у субъекта.

24. Способ по п. 23, где улучшенную силу верхней части тела у субъекта измеряют с помощью показателя силы при мануальном тестировании мышц.

25. Способ по п. 24, где субъект является пациентом, способным ходить, у которого провели замену ERT, и через шесть месяцев после лечения демонстрирует улучшение показателя силы при мануальном тестировании мышц верхней части тела на по меньшей мере 1 по сравнению с исходным уровнем.

26. Способ по п. 24, где субъект является пациентом, неспособным ходить, у которого провели замену ERT, и через шесть месяцев после лечения демонстрирует улучшение показателя силы при мануальном тестировании мышц верхней части тела на по меньшей мере 5,5 по сравнению с исходным уровнем.

27. Способ по п. 23, где улучшенная сила верхней части тела у субъекта представляет собой улучшенную силу верхней конечности, где силу верхней конечности измеряют с помощью тестирования количественных показателей мышц или мануального тестирования мышц по меньшей мере одной мышечной группы верхней конечности, выбранного из группы, состоящей из приведения плеча, отведения плеча, сгибания локтя и/или разгибания локтя.

28. Способ по п. 27, где субъект является пациентом, неспособным ходить, у которого провели замену ERT, и где по сравнению с исходным уровнем приведение плеча у субъекта через шесть месяцев после лечения улучшается на по меньшей мере 8 фунт-сил, и отведение плеча у субъекта через шесть месяцев после лечения улучшается на по меньшей мере 1 фунт-силу, сгибание локтя у субъекта через шесть месяцев после лечения улучшается на по меньшей мере 2 фунт-силы или разгибание локтя у субъекта через шесть месяцев после лечения улучшается на по меньшей мере 5 фунт-сил.

29. Способ по п. 23, где субъект является способным ходить и дополнительно характеризуется улучшенной силой нижней части тела и/или силой всего тела после лечения.

30. Способ по п. 23, где субъект ранее получал ферментозаместительную терапию с помощью алглюкозидазы альфа, где у субъекта наблюдается улучшение силы верхней части тела после лечения с помощью популяции rhGAA по сравнению с силой верхней части тела у субъекта после предыдущей ферментозаместительной терапии с помощью алглюкозидазы альфа.

31. Способ лечения болезни Помпе у субъекта, нуждающегося в этом, предусматривающий введение субъекту популяции молекул рекомбинантной человеческой кислой α -глюкозидазы (rhGAA) из клеток яичника китайского хомячка (CHO);

где молекулы rhGAA содержат семь потенциальных сайтов N-гликозилирования;

где молекулы rhGAA в среднем содержат 3-4 остатка маннозо-6-фосфата (M6P);

где молекулы rhGAA в среднем содержат по меньшей мере приблизительно

0,5 моль бис-маннозо-6-фосфата (бис-М6Р) в пересчете на моль rhGAA в первом потенциальном сайте N-гликозилирования, как определено с применением LC-MS/MS; и

где популяцию молекул rhGAA вводят в дозе, способной обеспечивать улучшение легочной функции у субъекта.

32. Способ по п. 31, где улучшенную легочную функцию у субъекта измеряют с помощью по меньшей мере одного теста легочной функции, выбранного из группы, состоящей из теста форсированной жизненной емкости (FVC) в положении стоя, теста с определением максимального давления при выдохе (MEP), теста с определением максимального давления при вдохе (MIP) и их комбинаций.

33. Способ по п. 32, где по сравнению с исходным уровнем FVC у субъекта через шесть месяцев после лечения улучшается на по меньшей мере 4%, MEP у субъекта через шесть месяцев после лечения улучшается на по меньшей мере 16 см H₂O или MIP у субъекта через шесть месяцев после лечения улучшается на по меньшей мере 0,3 см H₂O.

34. Способ по п. 32, где субъект является пациентом, способным ходить, у которого провели замену ERT, и где по сравнению с исходным уровнем MEP у субъекта через шесть месяцев после лечения улучшается на по меньшей мере 16 см H₂O.

35. Способ по п. 32, где субъект является пациентом, способным ходить, не получавшим ERT, и где по сравнению с исходным уровнем FVC у субъекта через шесть месяцев после лечения улучшается на по меньшей мере 4% или MIP у субъекта через шесть месяцев после лечения улучшается на по меньшей мере 11 см H₂O.

36. Способ по п. 32, где субъект ранее получал ферментозаместительную терапию с помощью алглюкозидазы альфа, где у субъекта наблюдается улучшение в по меньшей мере одном тесте легочной функции после лечения с помощью популяции rhGAA по сравнению с результатом теста легочной функции субъекта после предыдущей ферментозаместительной терапии с помощью алглюкозидазы альфа.

37. Способ лечения болезни Помпе у субъекта, нуждающегося в этом, предусматривающий введение субъекту популяции молекул рекомбинантной

человеческой кислой α -глюкозидазы (rhGAA) из клеток яичника китайского хомячка (CHO);

где молекулы rhGAA содержат семь потенциальных сайтов N-гликозилирования;

где молекулы rhGAA в среднем содержат 3-4 остатка маннозо-6-фосфата (М6Р);

где молекулы rhGAA в среднем содержат по меньшей мере приблизительно 0,5 моль бис-маннозо-6-фосфата (бис-М6Р) в пересчете на моль rhGAA в первом потенциальном сайте N-гликозилирования, как определено с применением LC-MS/MS; и

где популяцию молекул rhGAA вводят в дозе, способной обеспечивать снижение утомляемости у субъекта, которую измеряют с помощью показателя по шкале оценки выраженности утомляемости (FSS).

38. Способ по п. 37, где показатель FSS у субъекта через шесть месяцев после лечения уменьшается на по меньшей мере 3,5 по сравнению с исходным уровнем.

39. Способ по п. 38, где субъект является пациентом, неспособным ходить, у которого провели замену ERT.

40. Способ по п. 37 или п. 38, где субъект является пациентом, способным ходить, у которого провели замену ERT, и где показатель FSS у субъекта через шесть месяцев после лечения уменьшается на по меньшей мере 8 по сравнению с исходным уровнем.

41. Способ по п. 37 или п. 38, где субъект является пациентом, способным ходить, не получавшим ERT, и где показатель FSS у субъекта через шесть месяцев после лечения уменьшается на по меньшей мере 5 по сравнению с исходным уровнем.

42. Способ по п. 37, где субъект ранее получал ферментозаместительную терапию с помощью алглюкозидазы альфа, где субъект характеризуется более низким показателем FSS после лечения с помощью популяции rhGAA по сравнению с показателем FSS у субъекта после предыдущей ферментозаместительной терапии с помощью алглюкозидазы альфа.

43. Способ лечения болезни Помпе у субъекта, нуждающегося в этом, предусматривающий введение субъекту популяции молекул рекомбинантной человеческой кислой α -глюкозидазы (rhGAA) из клеток яичника китайского хомячка (CHO);

где молекулы rhGAA содержат семь потенциальных сайтов N-гликозилирования;

где молекулы rhGAA в среднем содержат 3-4 остатка маннозо-6-фосфата (M6P);

где молекулы rhGAA в среднем содержат по меньшей мере приблизительно 0,5 моль бис-маннозо-6-фосфата (бис-M6P) в пересчете на моль rhGAA в первом потенциальном сайте N-гликозилирования, как определено с применением LC-MS/MS; и

где популяцию молекул rhGAA вводят в дозе, способной обеспечивать снижение уровней по меньшей мере одного биомаркера повреждения мышц, выбранного из группы, состоящей из креатинкиназы, аланинаминотрансферазы (ALT), аспаратаминотрансферазы (AST) и их комбинаций.

44. Способ по п. 43, где по меньшей мере один биомаркер повреждения мышц представляет собой креатинкиназу.

45. Способ по п. 43, где по сравнению с исходным уровнем уровни креатинкиназы у субъекта через шесть месяцев после лечения снижаются на по меньшей мере 15%, уровни ALT у субъекта через шесть месяцев после лечения снижаются на по меньшей мере 5% или уровни AST у субъекта через шесть месяцев после лечения снижаются на по меньшей мере 5%.

46. Способ по п. 43, где субъект является пациентом, способным ходить, у которого провели замену ERT, и где по сравнению с исходным уровнем уровни креатинкиназы у субъекта через шесть месяцев после лечения снижаются на по меньшей мере 15%, уровни ALT у субъекта через шесть месяцев после лечения снижаются на по меньшей мере 15% или уровни AST у субъекта через шесть месяцев после лечения снижаются на по меньшей мере 10%.

47. Способ по п. 43, где субъект является пациентом, неспособным ходить, у которого провели замену ERT, и где по сравнению с исходным уровнем уровни

креатинкиназы у субъекта через шесть месяцев после лечения снижаются на по меньшей мере 20%, уровни ALT у субъекта через шесть месяцев после лечения снижаются на по меньшей мере 5% или уровни AST у субъекта через шесть месяцев после лечения снижаются на по меньшей мере 5%.

48. Способ по п. 43, где субъект является пациентом, способным ходить, не получавшим ERT, и где по сравнению с исходным уровнем уровни креатинкиназы у субъекта через шесть месяцев после лечения снижаются на по меньшей мере 35%, уровни ALT у субъекта через шесть месяцев после лечения снижаются на по меньшей мере 35% или уровни AST у субъекта через шесть месяцев после лечения снижаются на по меньшей мере 30%.

49. Способ по любому из пп. 1-48, где популяцию молекул rhGAA вводят в дозе, составляющей от приблизительно 1 мг/кг до приблизительно 100 мг/кг.

50. Способ по любому из пп. 1-49, где популяцию молекул rhGAA вводят в дозе, составляющей приблизительно 20 мг/кг.

51. Способ по любому из пп. 1-50, где популяцию молекул rhGAA вводят раз в два месяца, раз в месяц, раз в две недели, раз в неделю, два раза в неделю или ежедневно.

52. Способ по п. 51, где популяцию молекул rhGAA вводят раз в две недели.

53. Способ по любому из пп. 1-52, где популяцию молекул rhGAA вводят внутривенно.

54. Способ по любому из пп. 1-53, где популяцию молекул rhGAA вводят одновременно или последовательно с фармакологическим шапероном.

55. Способ по п. 54, где фармакологический шаперон представляет собой миглустат или его фармацевтически приемлемую соль.

56. Способ по п. 55, где миглустат или его фармацевтически приемлемую соль вводят перорально.

57. Способ по п. 55 или п. 56, где миглустат или его фармацевтически приемлемую соль вводят в дозе, составляющей от приблизительно 200 мг до приблизительно 600 мг.

58. Способ по п. 57, где миглустат или его фармацевтически приемлемую соль вводят в дозе, составляющей приблизительно 260 мг.
59. Способ по п. 57, где популяцию молекул rhGAA вводят внутривенно в дозе, составляющей от приблизительно 5 мг/кг до приблизительно 20 мг/кг, и миглустат или его фармацевтически приемлемую соль вводят перорально в дозе, составляющей от приблизительно 233 мг до приблизительно 500 мг.
60. Способ по п. 56, где миглустат или его фармацевтически приемлемую соль вводят перорально в дозе, составляющей от приблизительно 50 мг до приблизительно 200 мг.
61. Способ по п. 56, где популяцию молекул rhGAA вводят внутривенно в дозе, составляющей приблизительно 20 мг/кг, и миглустат или его фармацевтически приемлемую соль вводят перорально в дозе, составляющей приблизительно 260 мг.
62. Способ по любому из пп. 55-61, где миглустат или его фармацевтически приемлемую соль вводят до введения rhGAA.
63. Способ по п. 62, где миглустат или его фармацевтически приемлемую соль вводят за приблизительно один час до введения rhGAA.
64. Способ по п. 62 или п. 63, где субъект воздерживается от приема пищи в течение по меньшей мере двух часов до и по меньшей мере двух часов после введения миглустата или его фармацевтически приемлемой соли.
65. Способ по любому из пп. 1-64, где молекулы rhGAA содержат аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 95% идентичную последовательности под SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 5.
66. Способ по любому из пп. 1-65, где молекулы rhGAA содержат аминокислотную последовательность, идентичную последовательности под SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 5.
67. Способ по любому из пп. 1-66, где по меньшей мере 30% молекул rhGAA содержат одно или более N-гликановых звеньев, несущих один остаток маннозо-6-фосфата (моно-M6P) или бис-M6P, как определено с применением LC-MS/MS.

68. Способ по любому из пп. 1-67, где молекулы rhGAA содержат в среднем от приблизительно 0,5 моль до приблизительно 7,0 моль моно-М6Р или бис-М6Р в пересчете на моль rhGAA, как определено с применением LC-MS/MS.

69. Способ по любому из пп. 1-68, где молекулы rhGAA содержат в среднем по меньшей мере 2,5 моль М6Р в пересчете на моль rhGAA и по меньшей мере 4 моль сиаловой кислоты в пересчете на моль rhGAA, как определено с применением LC-MS/MS.

70. Способ по любому из пп. 1-69, где в пересчете на моль rhGAA молекулы rhGAA в среднем содержат:

(a) от приблизительно 0,4 до приблизительно 0,6 моль моно-М6Р во втором потенциальном сайте N-гликозилирования;

(b) от приблизительно 0,4 до приблизительно 0,6 моль бис-М6Р в четвертом потенциальном сайте N-гликозилирования и

(c) от приблизительно 0,3 до приблизительно 0,4 моль моно-М6Р в четвертом потенциальном сайте N-гликозилирования;

где (a)-(c) определены с применением LC-MS/MS.

71. Способ по п. 70, где в пересчете на моль rhGAA молекулы rhGAA дополнительно содержат от приблизительно 4 моль до приблизительно 7,3 моль сиаловой кислоты; и

где в пересчете на моль rhGAA молекулы rhGAA в среднем содержат:

(a) от приблизительно 0,9 до приблизительно 1,2 моль сиаловой кислоты в третьем потенциальном сайте N-гликозилирования;

(b) от приблизительно 0,8 до приблизительно 0,9 моль сиаловой кислоты в пятом потенциальном сайте N-гликозилирования и

(c) от приблизительно 1,5 до приблизительно 4,2 моль сиаловой кислоты в шестом потенциальном сайте N-гликозилирования;

где (a)-(c) определены с применением LC-MS/MS.

72. Способ по любому из пп. 1-71, где популяцию молекул rhGAA составляют в виде фармацевтической композиции.

73. Способ по п. 72, где фармацевтическая композиция дополнительно содержит по меньшей мере один буфер, выбранный из группы, состоящей из цитрата, фосфата и их комбинации, и по меньшей мере одно вспомогательное вещество, выбранное из группы, состоящей из маннита, полисорбата 80 и их комбинации; где фармацевтическая композиция характеризуется рН, составляющим от приблизительно 5,0 до приблизительно 7,0.

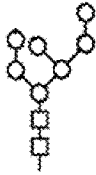
74. Способ по п. 73, где фармацевтическая композиция характеризуется рН, составляющим от приблизительно 5,0 до приблизительно 6,0.

75. Способ по п. 73 или п. 74, где фармацевтическая композиция дополнительно содержит воду, подкисляющее средство, подщелачивающее средство или их комбинацию.

76. Способ по п. 73, где в фармацевтической композиции популяция молекул rhGAA присутствует в концентрации, составляющей приблизительно 5-50 мг/мл, по меньшей мере один буфер представляет собой натрий-цитратный буфер, присутствующий в концентрации, составляющей приблизительно 10-100 мМ, по меньшей мере одно вспомогательное вещество представляет собой маннит, присутствующий в концентрации, составляющей приблизительно 10-50 мг/мл, и полисорбат 80, присутствующий в концентрации, составляющей приблизительно 0,1-1 мг/мл, и при этом фармацевтическая композиция дополнительно содержит воду и необязательно содержит подкисляющее средство и/или подщелачивающее средство; где фармацевтическая композиция характеризуется рН, составляющим приблизительно 6,0.

77. Способ по п. 76, где в фармацевтической композиции популяция молекул rhGAA присутствует в концентрации, составляющей приблизительно 15 мг/мл, натрий-цитратный буфер присутствует в концентрации, составляющей приблизительно 25 мМ, маннит присутствует в концентрации, составляющей приблизительно 20 мг/мл, и полисорбат 80 присутствует в концентрации, составляющей приблизительно 0,5 мг/мл.

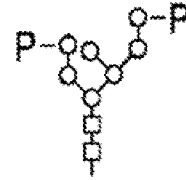
**Структура и аффинность к рецепторам для
высокоманнозных и фосфорилированных олигосахаридов**



**Нефосфорилированный
высокоманнозный N-
гликан:**

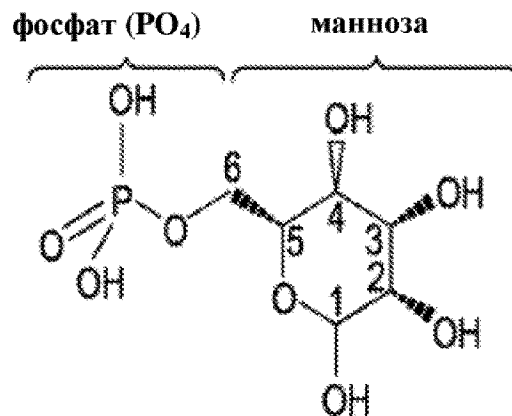


Моно-M6P N-гликан:
более низкая аффинность к
CI-MPR
($K_n \sim 7000$ нМ)



Бис-M6P N-гликан:
высокая аффинность к CI-
MPR ($K_n = 2$ нМ)

Фиг. 1А

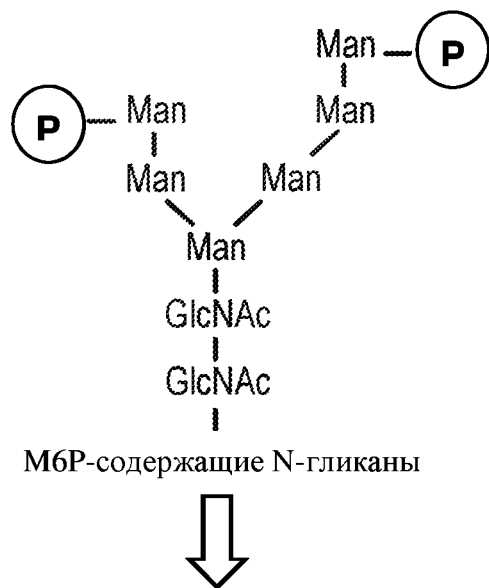


Фиг. 1В

Сравнение продуктивного и непродуктивного целенаправленного воздействия на гликан-специфические рецепторы

Продуктивные

Продуктивное нацеливание лекарственного средства



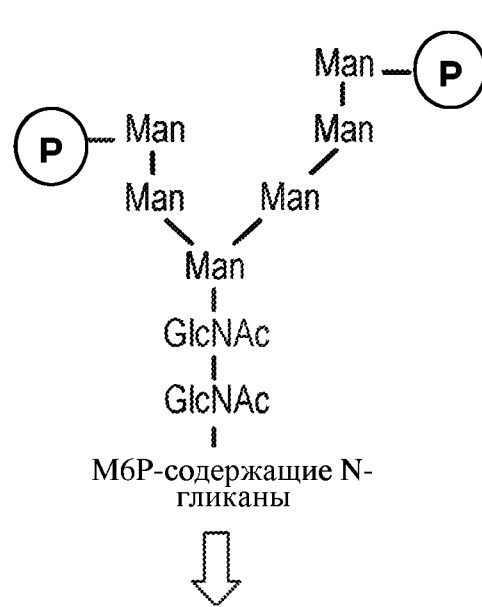
↓

Целевые ткани
(M6P-R; сердце, скелетные мышцы, диафрагма и т. п.)

Фиг. 2А

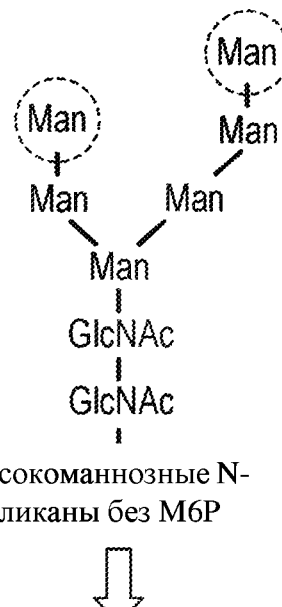
Непродуктивные

Непродуктивное выведение лекарственного средства



↓

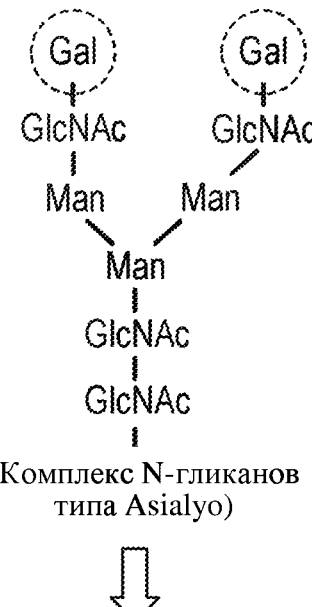
Нецелевые ткани
(M6P-R; печень, селезенка, кишечник и т. п.)



↓

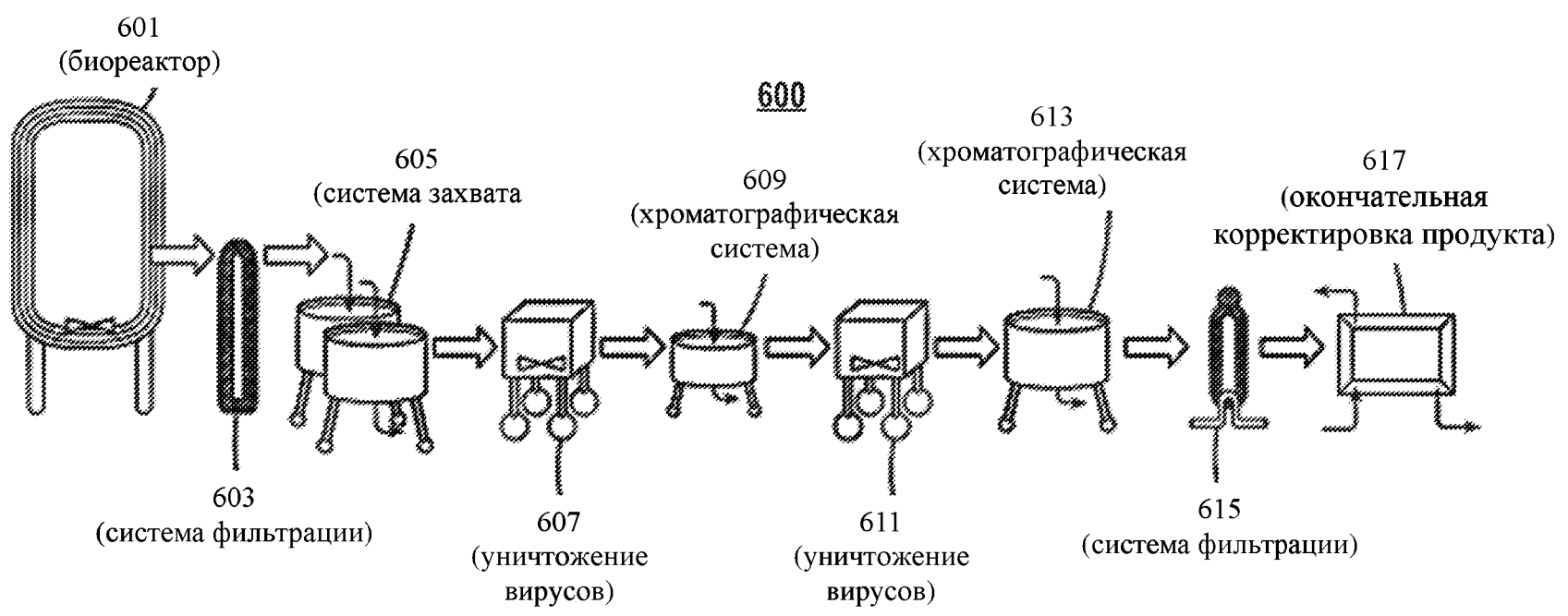
Нецелевые ткани
(рецепторы маннозы; печень и селезенка)

Фиг. 2В



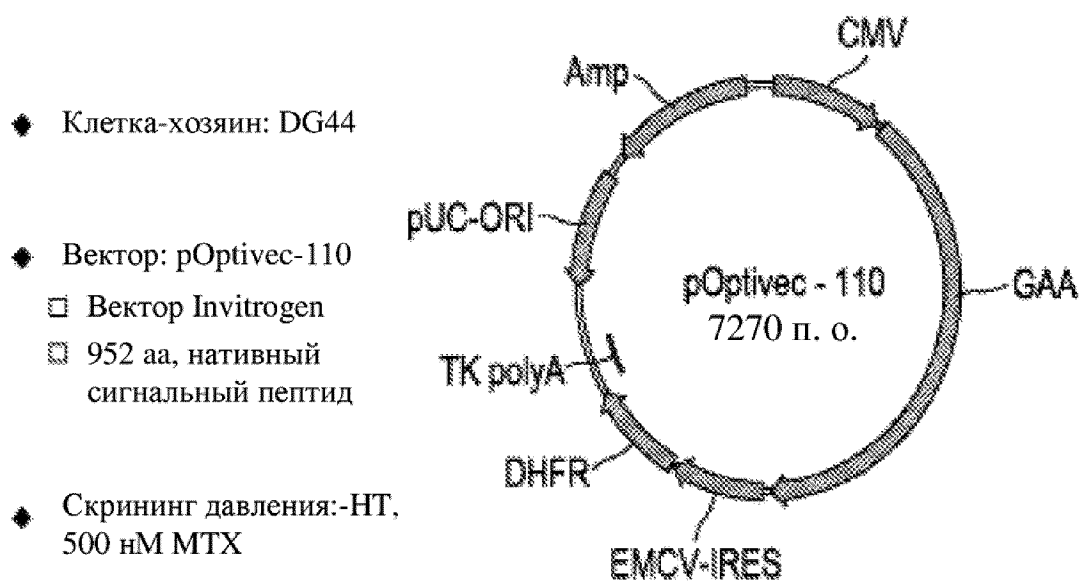
↓

Нецелевые ткани
(ASGP-R; печень)



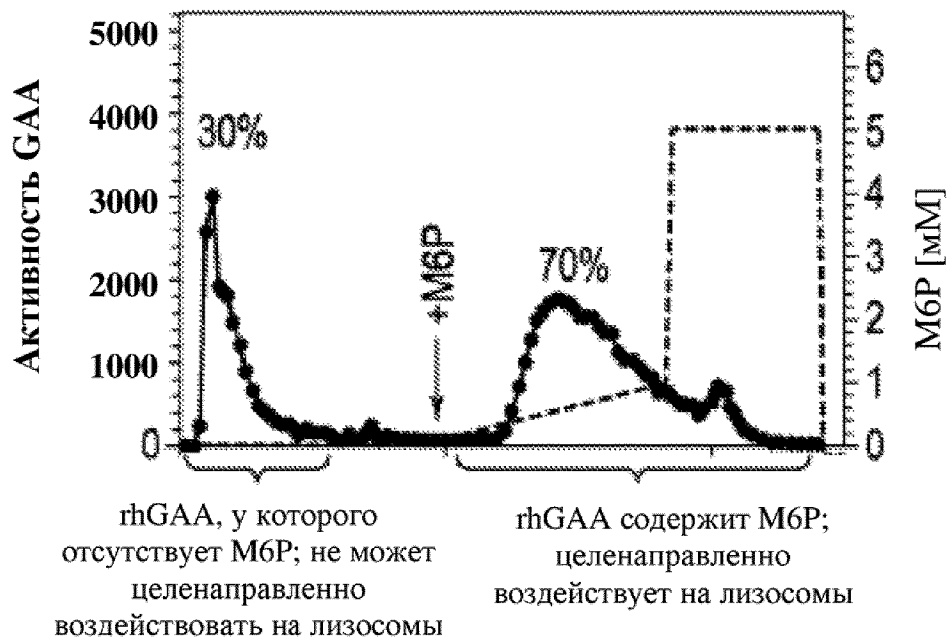
Фиг. 3

Конструкция вектора АТВ200

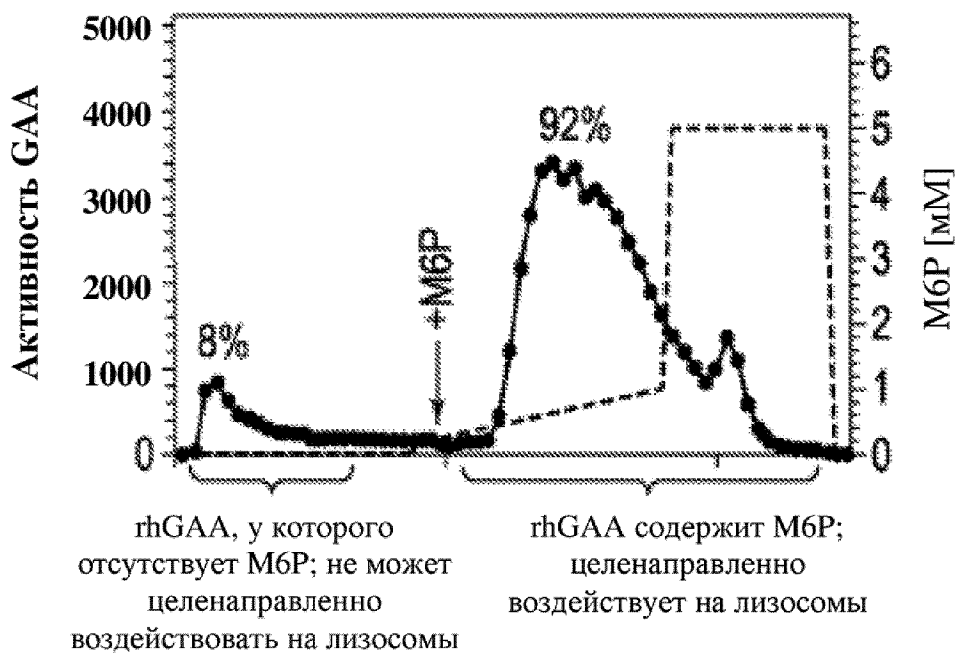


Фиг. 4

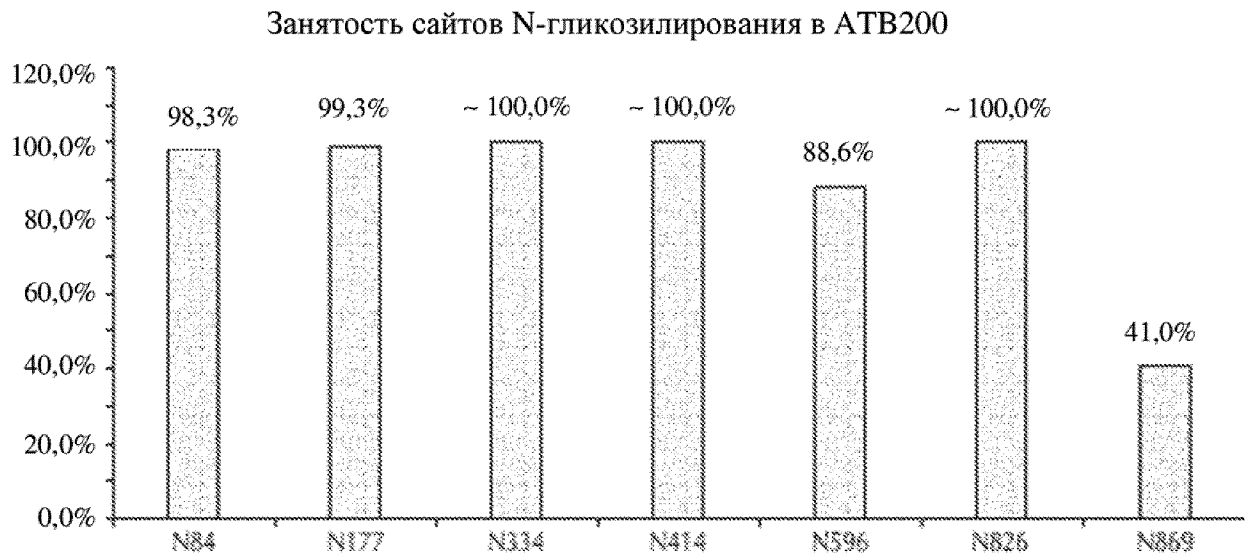
Вариант осуществления 1



Вариант осуществления 2

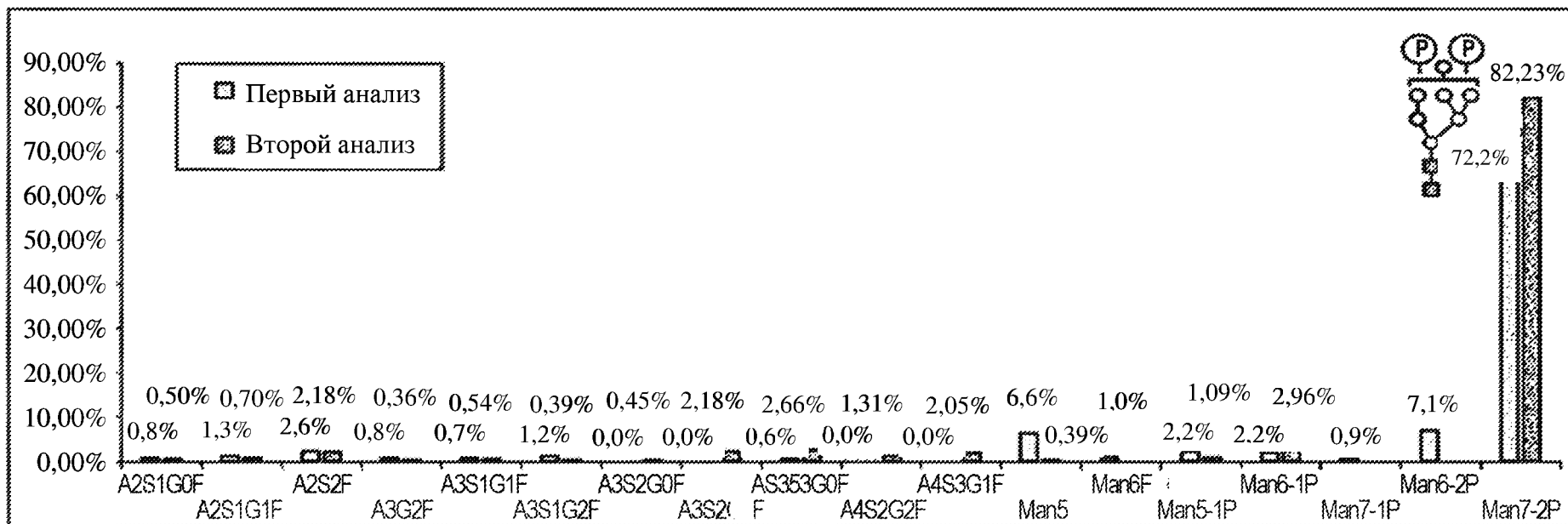


Фиг. 5



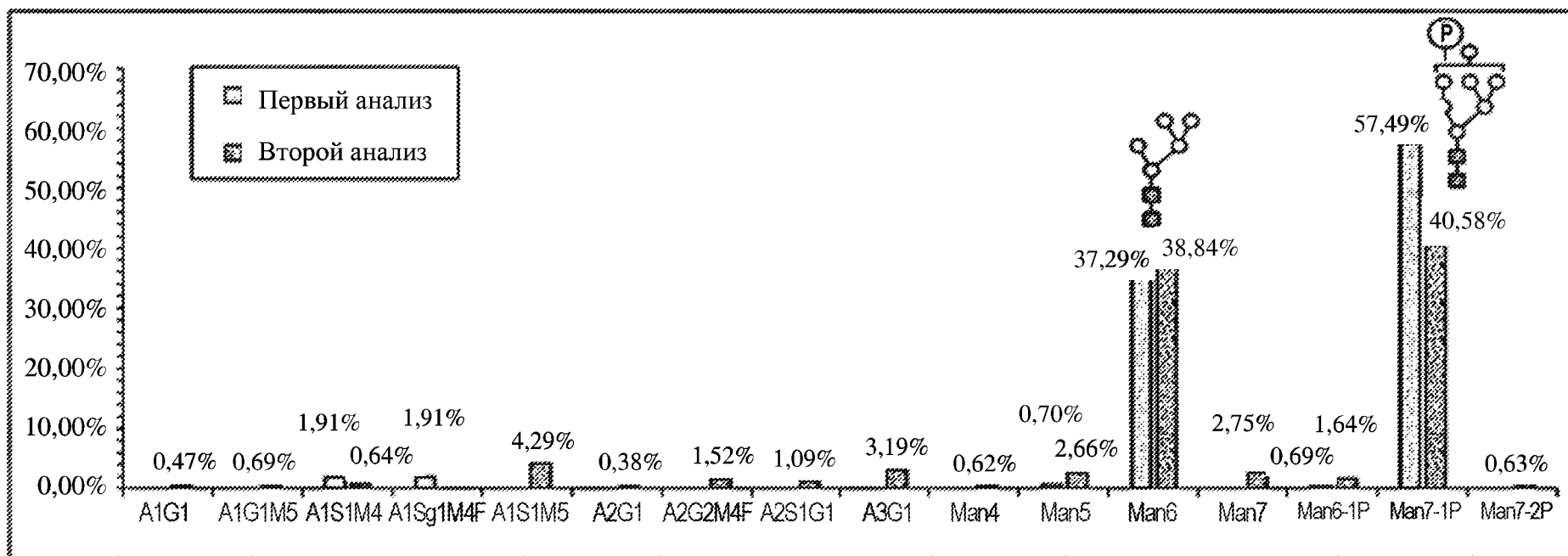
Фиг. 6А

Профиль N-гликозилирования N84



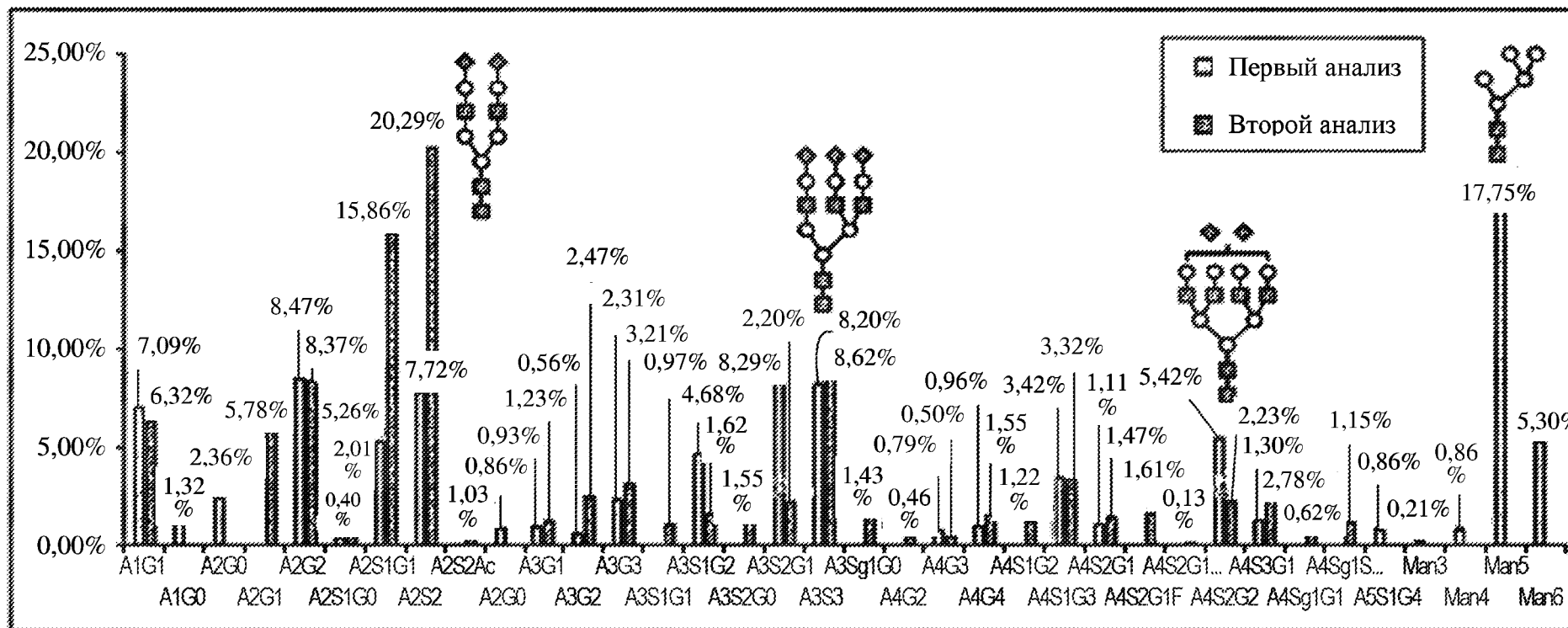
Фиг. 6В

Профиль N-гликозилирования N177



Фиг. 6С

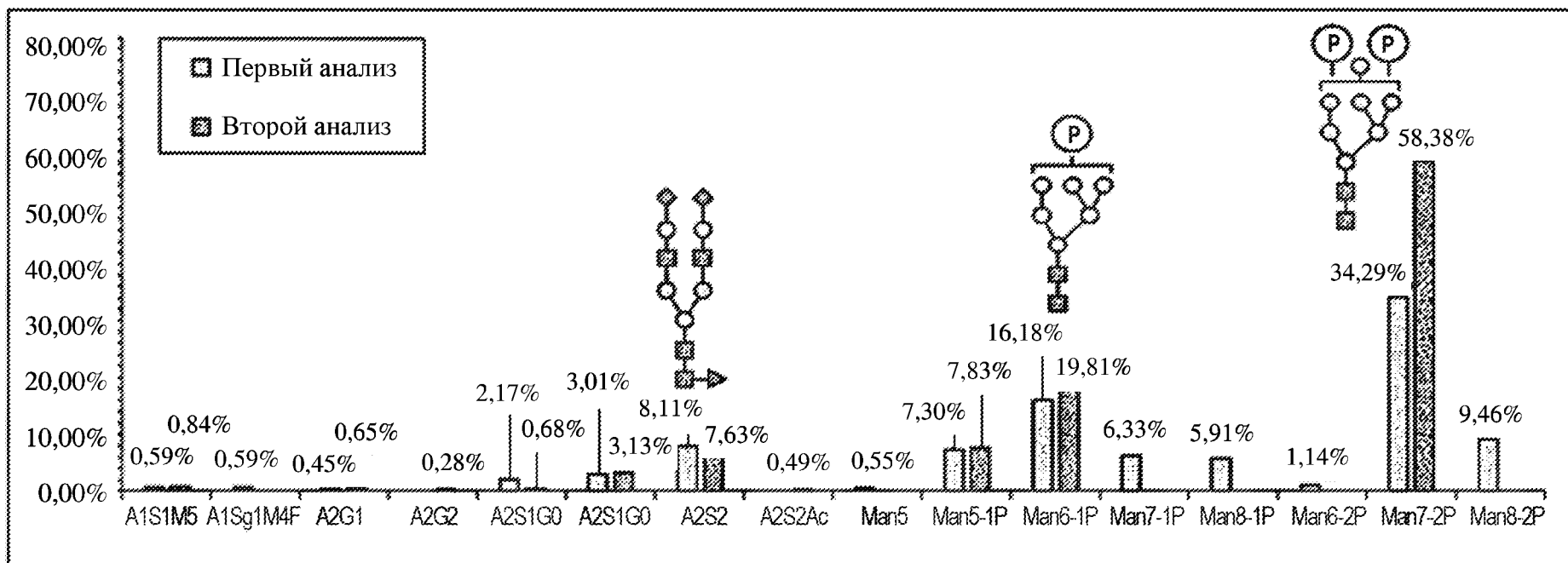
Профиль N-гликозилирования N334



Фиг. 6D

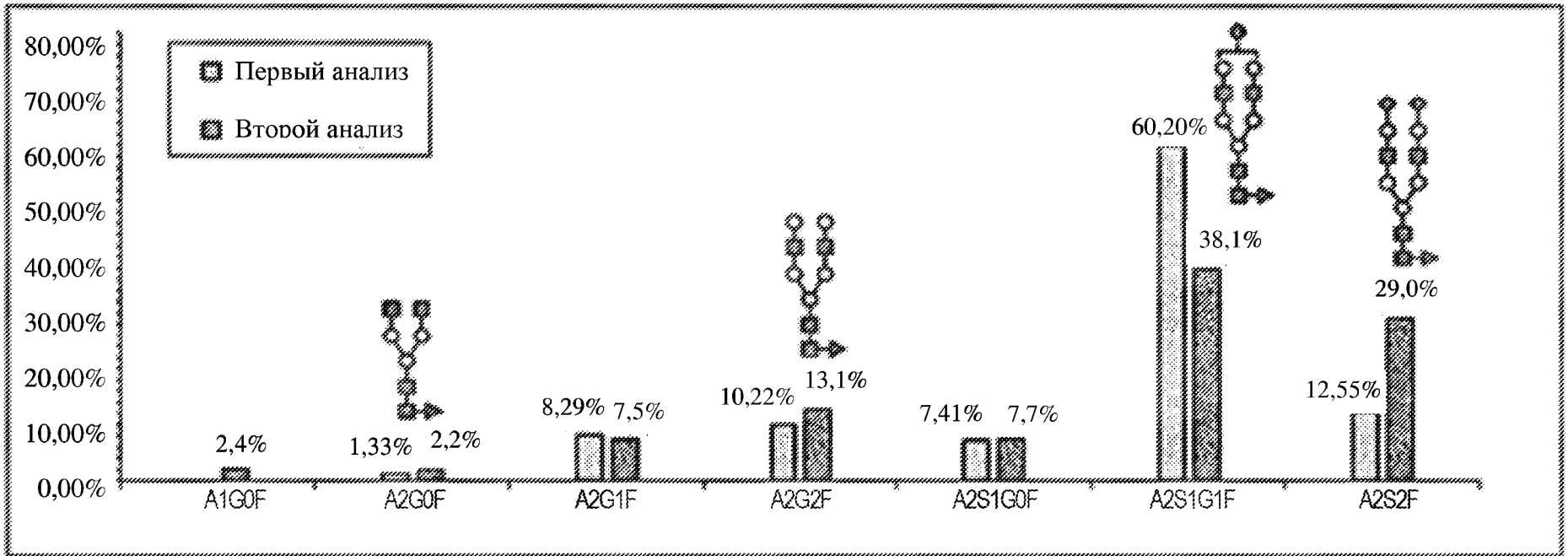
ЗАМЕНЯЮЩИЙ ЛИСТ от 10.06.2020

Профиль N-гликозилирования N414



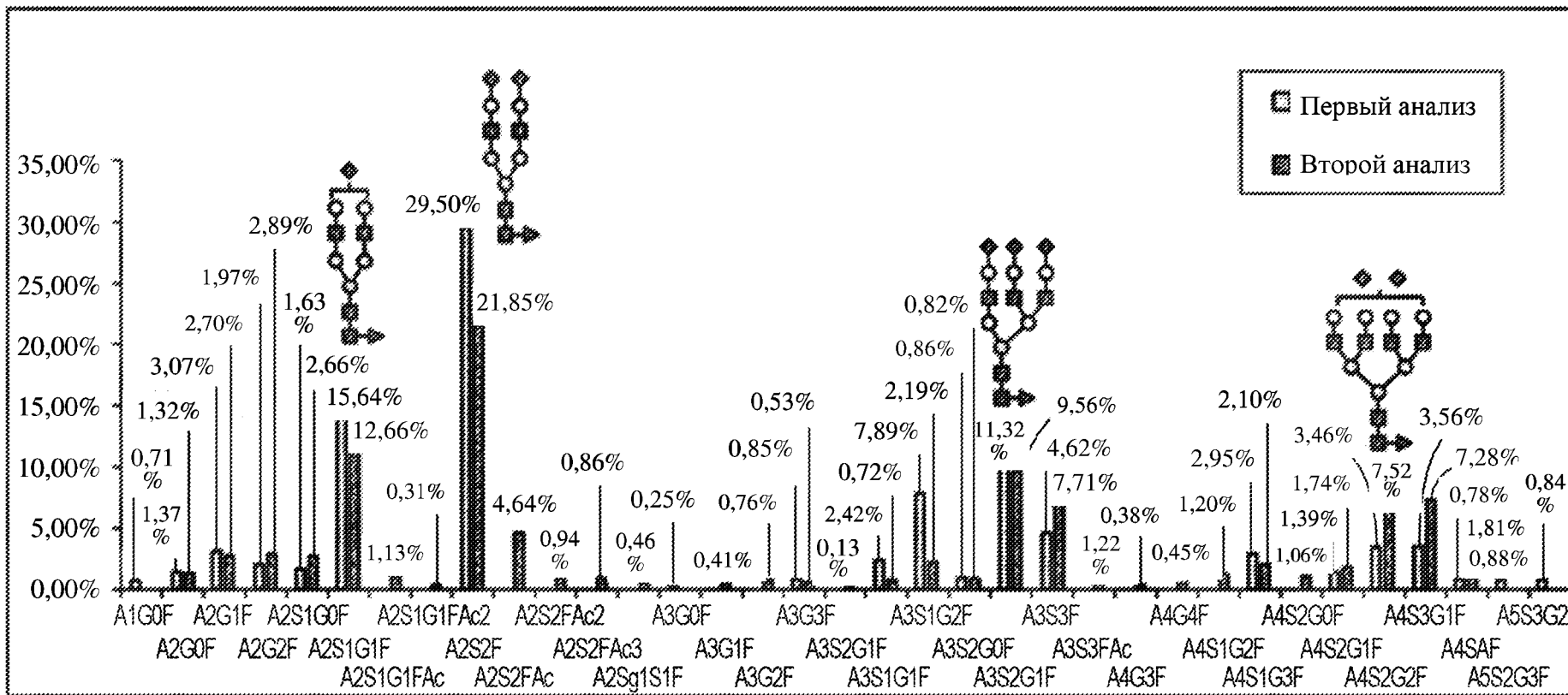
Фиг. 6Е

Профиль N-гликозилирования N596



Фиг. 6F

Профиль N-гликозилирования N826



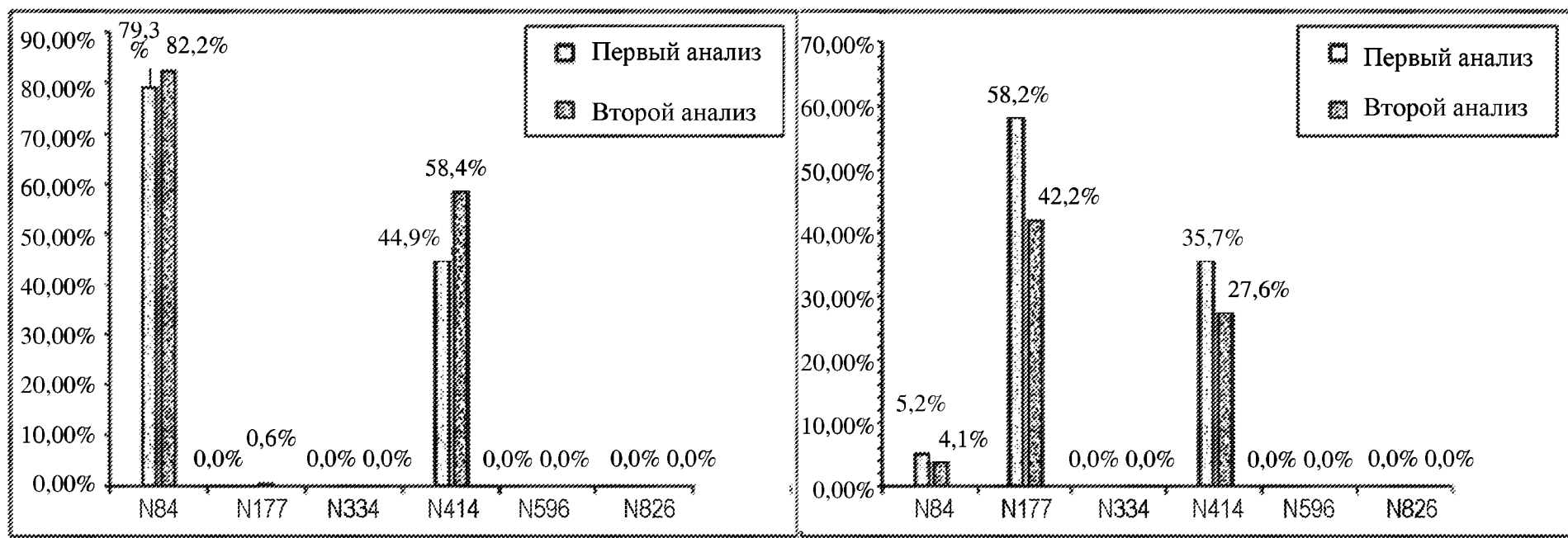
Фиг. 6G

ЗАМЕНЯЮЩИЙ ЛИСТ от 10.06.2020

Относительный процент бис-М6Р и моно-М6Р в каждом сайте N-гликозилирования

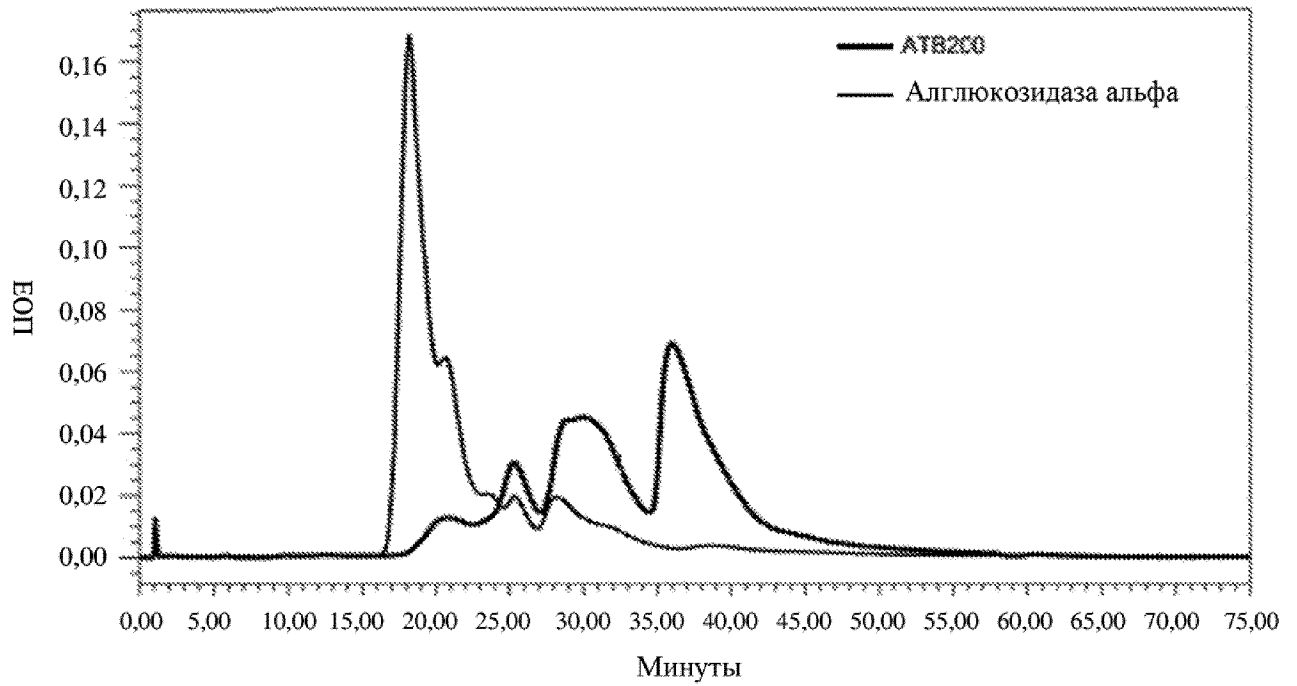
Процент видов бис-М6Р в каждом сайте N-гликозилирования

Процент видов моно-М6Р в каждом сайте N-гликозилирования



Фиг. 6Н

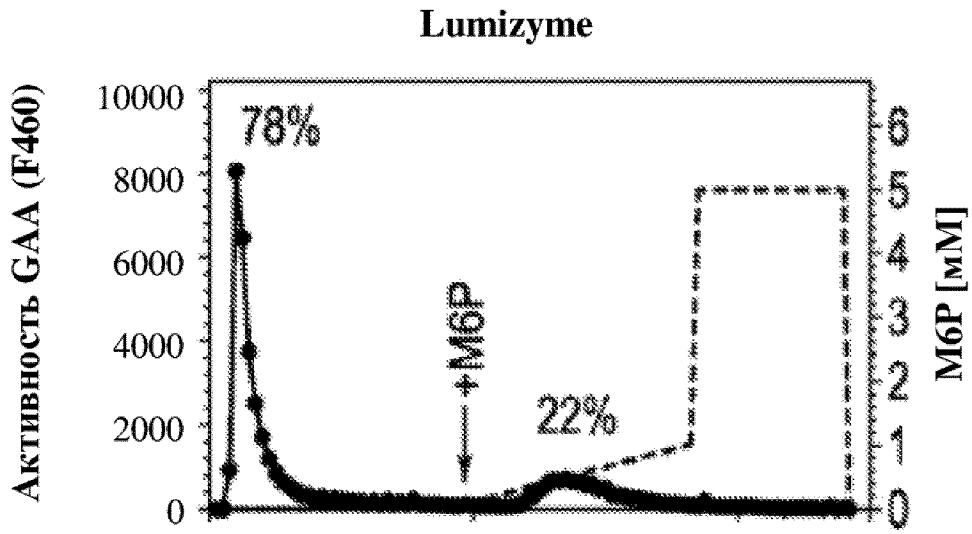
ЗАМЕНЯЮЩИЙ ЛИСТ от 10.06.2020

**Фиг. 7**

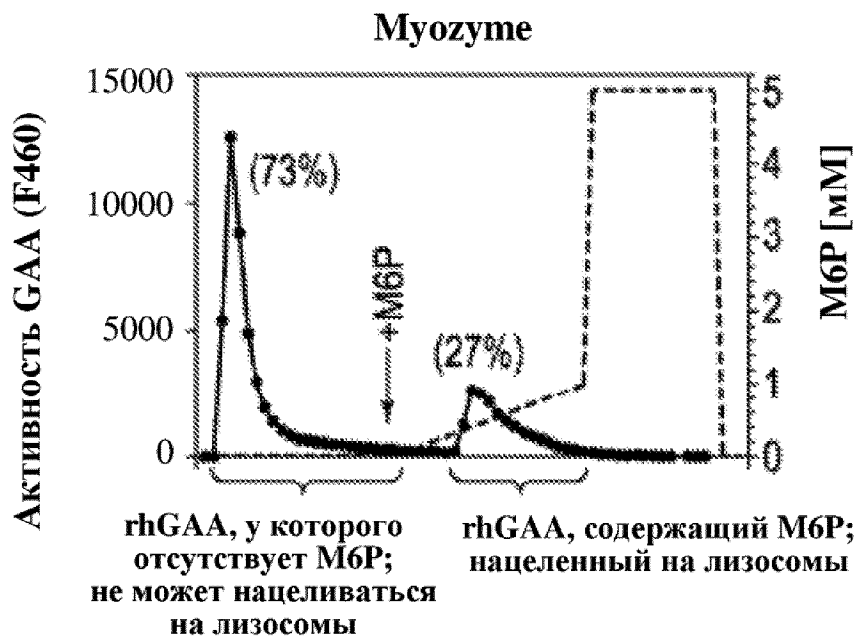
Распределение N-гликанов в препаратах на основе rhGAA

	Lumizyme	BP-rhGAA*	ATB200	
			1	2
<i>N-гликаны комплексного типа</i>	70,7%	48,9%	51,0%	47,5%
<i>N-гликаны гибридного типа</i>	6,7%	9,7%	4,4%	3,7%
<i>N-гликаны высокоманнозного типа</i>				
<i>Нефосфорилированные</i>	15,8%	23,7%	14,0%	9,9%
<i>Моно-М6P</i>	5,2%	10,4%	13,4%	14,2%
<i>Бис-М6P</i>	1,6%	6,8%	17,2%	24,7%

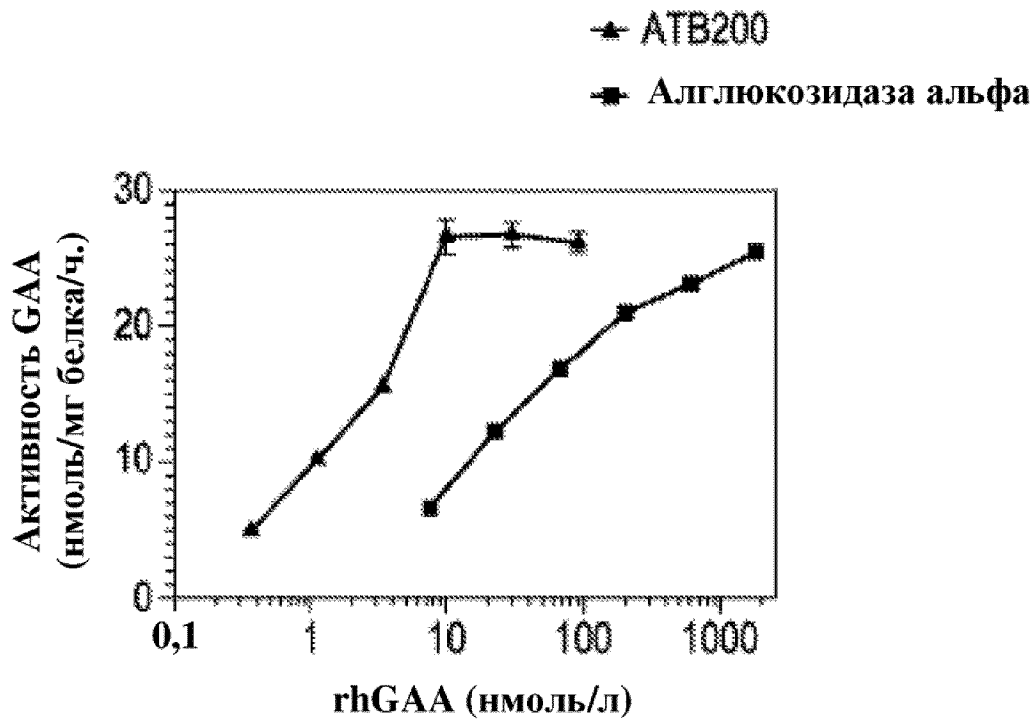
Фиг. 8



Фиг. 9А



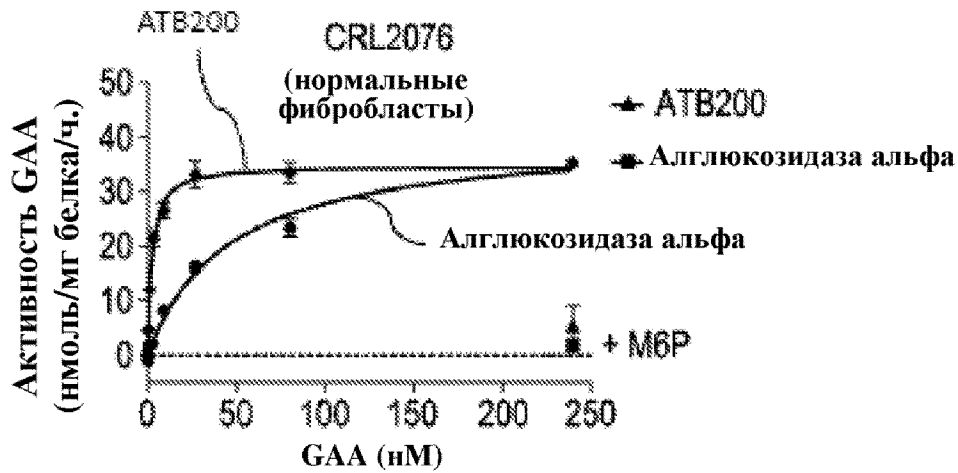
Фиг. 9В



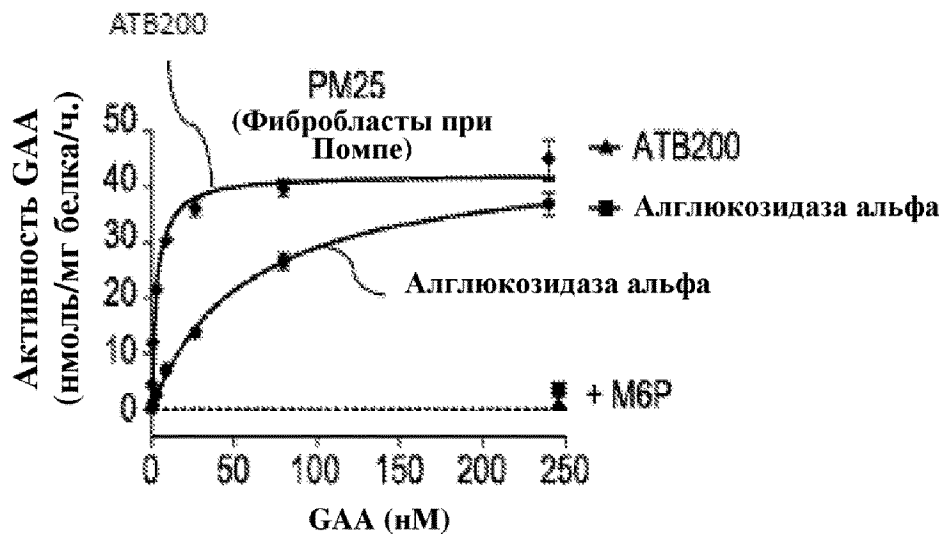
Фиг. 10А

Гликан	Алглюкозидаза альфа (мол. бис-гликан/мол. белок)	АТВ200 (мол. бис-гликан/мол. белок)
<i>Bis-M6P</i>	0,1	1,3

Фиг. 10В



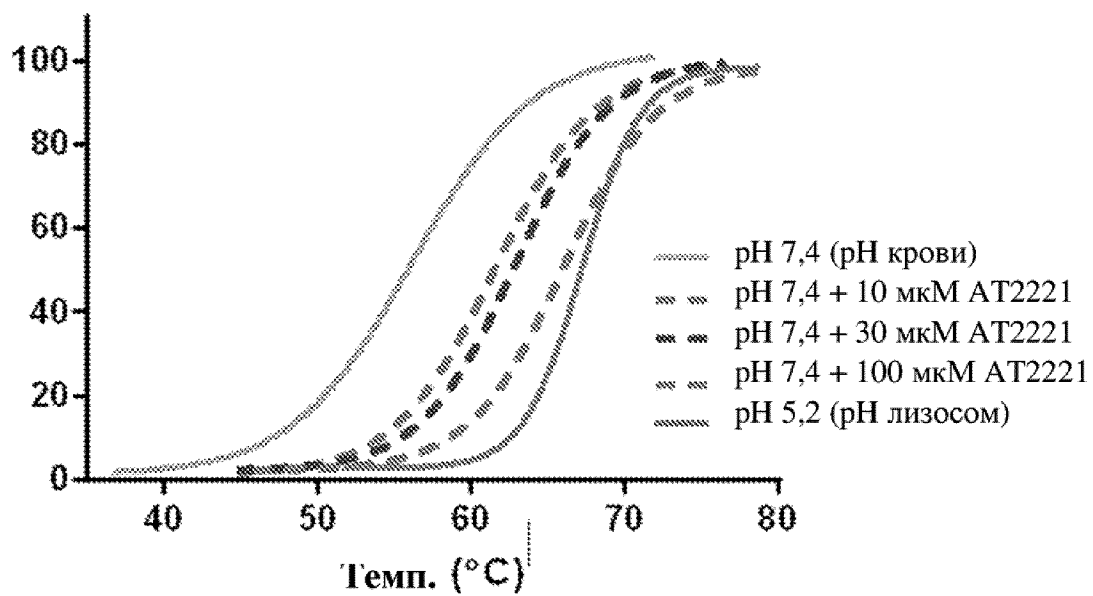
Фиг. 11А



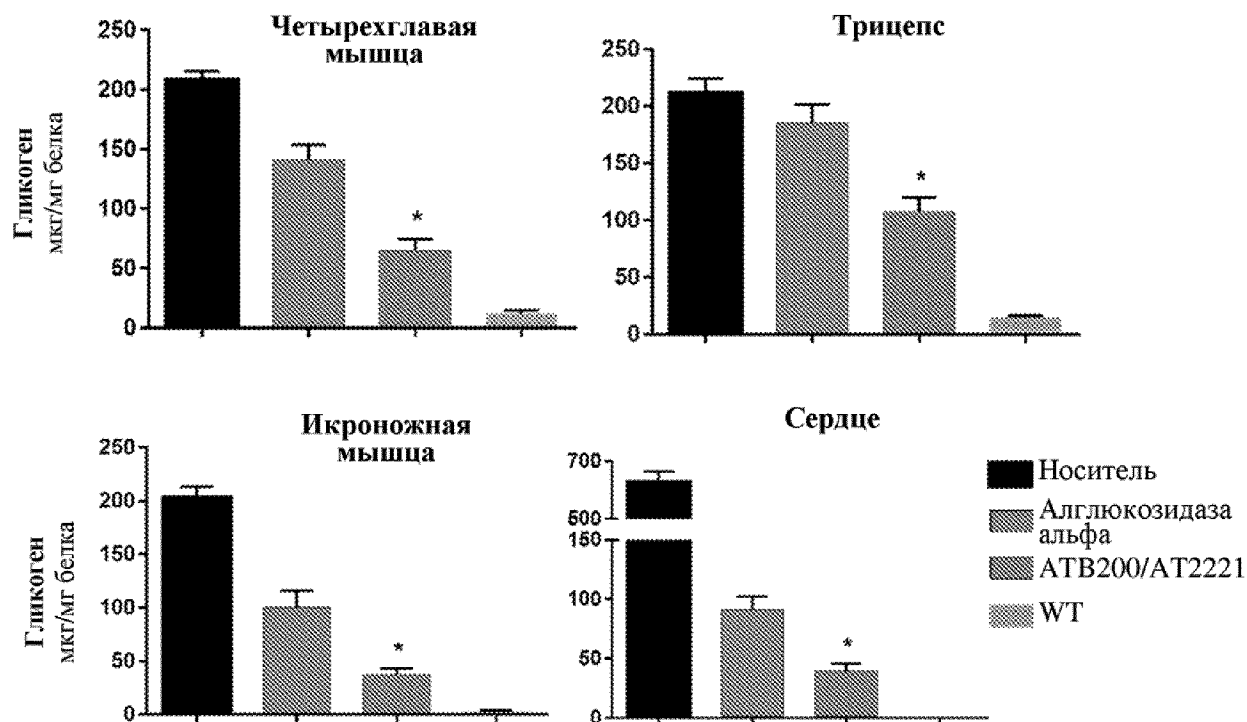
Фиг. 11В

Клеточная линия	K _{погл.} (нМ)	
	AT200	Lymizyme
нормальные	2	56
при Помпе	3	57

Фиг. 11С

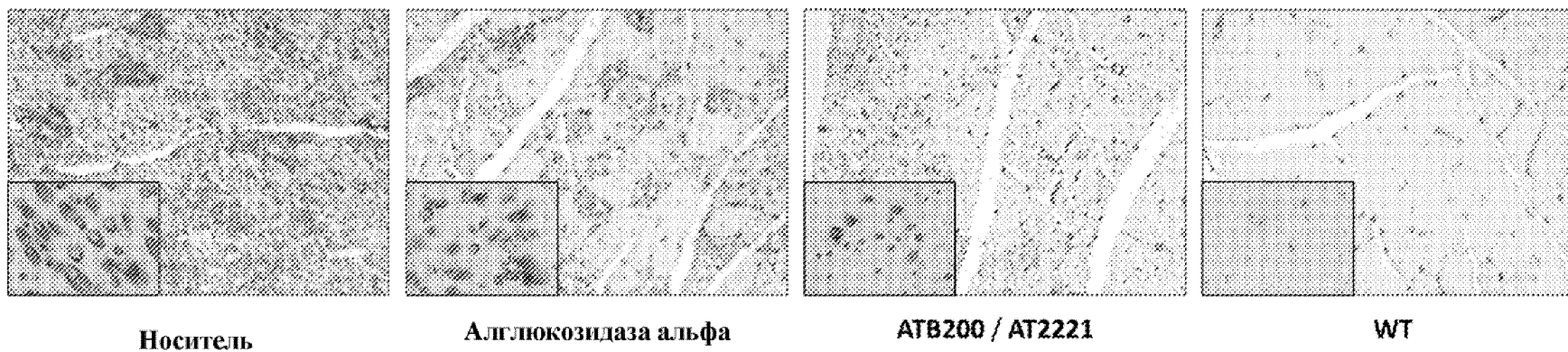


Фиг. 12



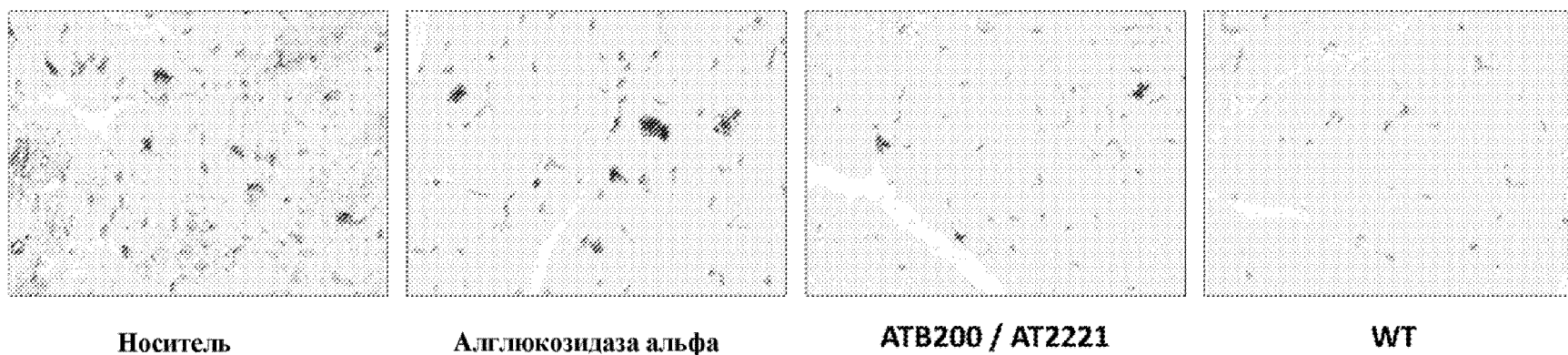
Фиг. 13

Исследование ИHC LAMP1 в *vastus lateralis* четырехглавой мышцы



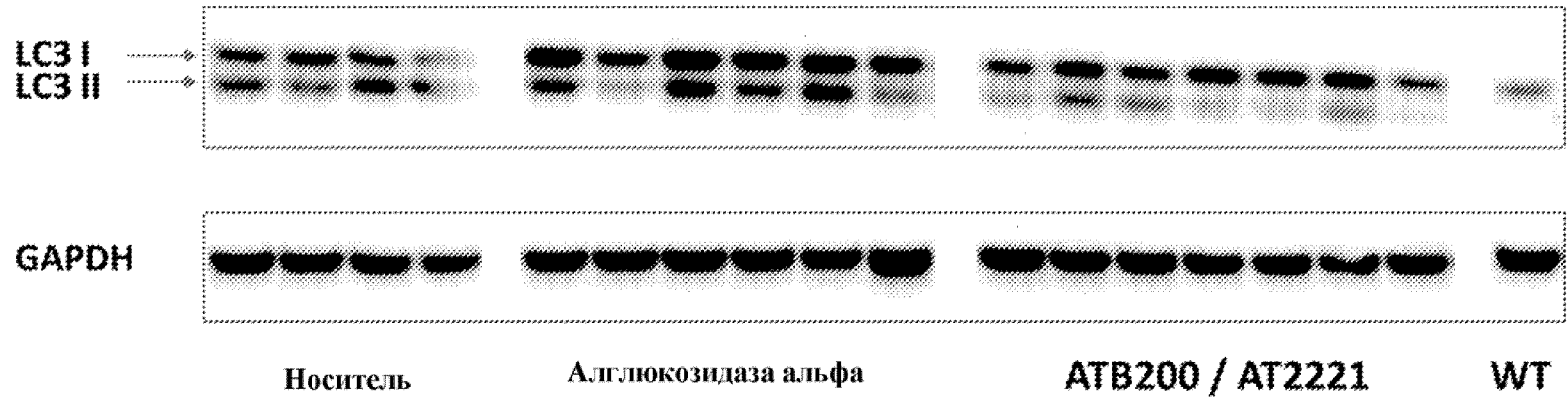
Фиг. 14

Исследование ИHC LC3 в *vastus lateralis* четырехглавой мышцы



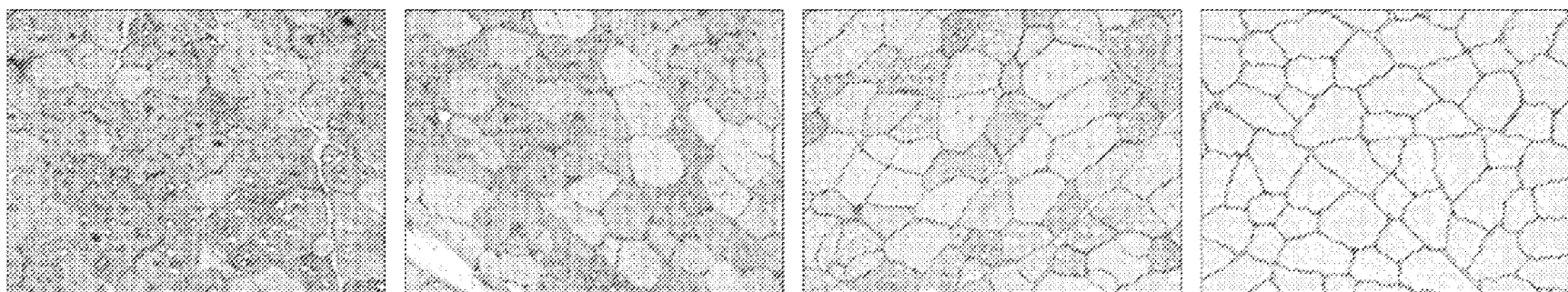
Фиг. 15А

Исследование WB LC3 в четырехглавой мышце



Фиг. 15В

Исследование ИНС дистерлина в *vastus lateralis* четырехглавой мышцы



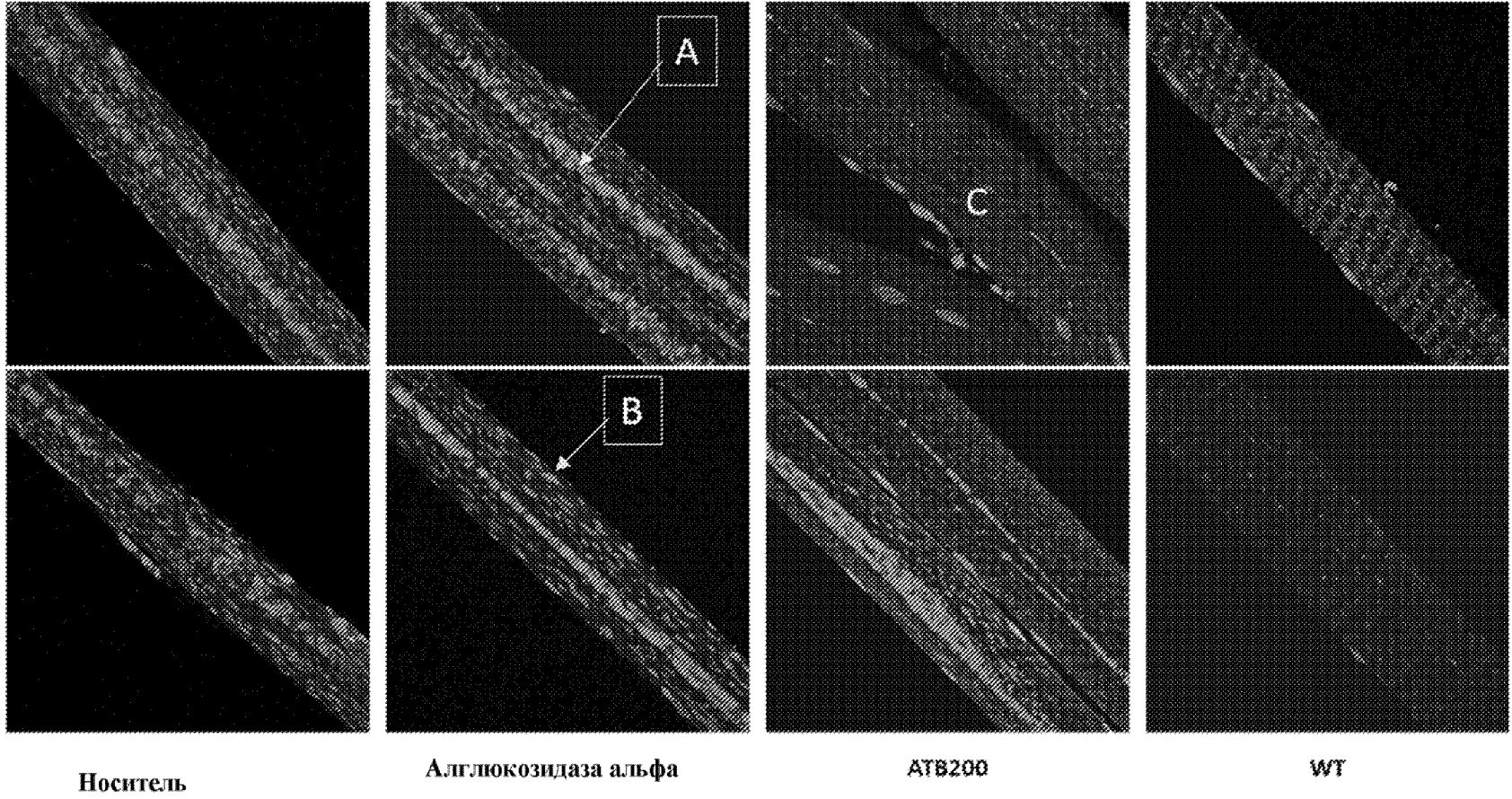
Носитель

Алглюкозидаза альфа

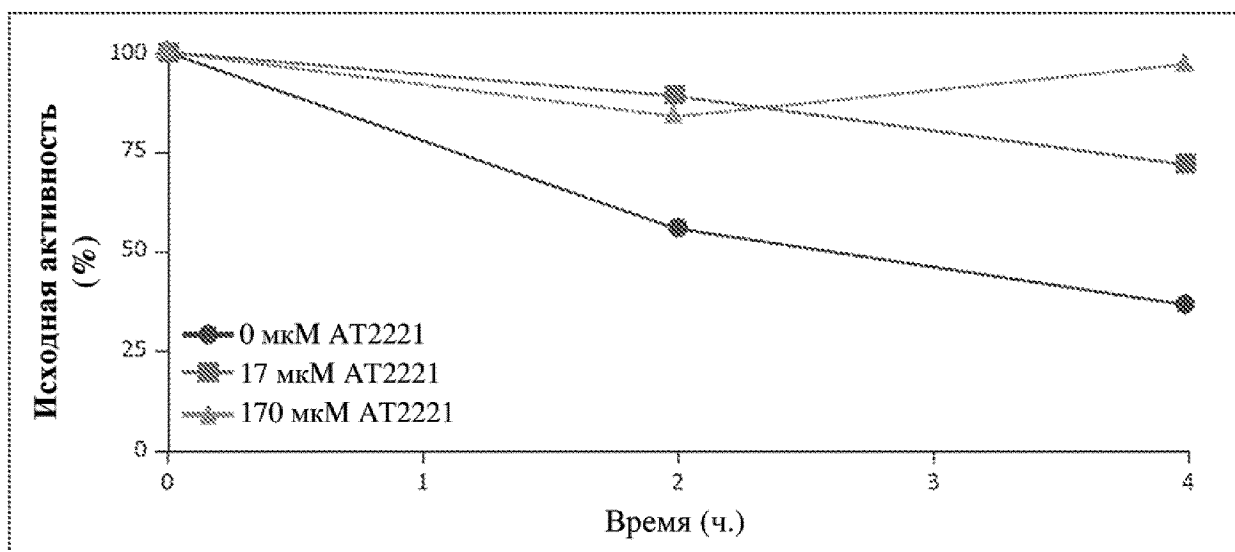
ATB200 / AT2221

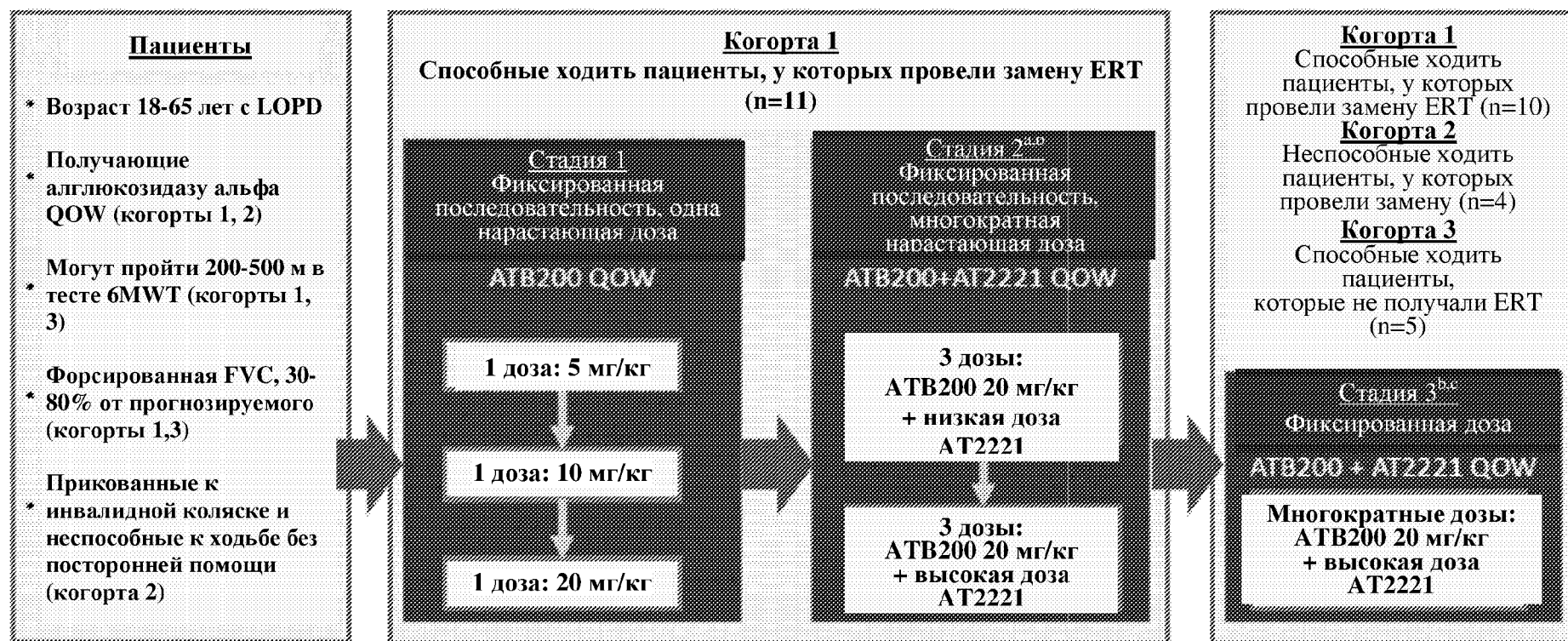
WT

Фиг. 16



Фиг. 17

Стабилизация АТВ200 с помощью АТ2221**Фиг. 18**



6MWT = тест с 6-минутной ходьбой; FVC = форсированная жизненная емкость; QOW = раз в две недели.

^aАнализировали данные по безопасности от 2 индикаторных пациентов из когорты 1 при каждом уровне дозы перед введением дозы в когортах 2 и 3. Во время стадий 2 и 3 AT2221 вводили перорально перед началом внутривенной инфузии ATB200. Все дозы ATB200 вводили путем внутривенной инфузии в течение 4 часов. ^cПервые 2 пациента в когортах 2 и 3 служили в качестве индикаторных пациентов для своих соответствующих когорт.

1. Johnson FK et al., представленный на 13-м ежегодном WORLDSymposiumTM; 13-17 февраля 2017 г.; Сан-Диего, Калифорния, США. Постер № LB-26 2. Roberts M et al., представленный на 22-м Международном конгрессе Всемирного общества первично-мышечных заболеваний; 3-7 октября 2017 г.; Сен-Мало, Франция. Постер № I.R.P.3.

Фиг. 19А

Фаза 1/2: клиническое исследование для оценки безопасности, переносимости, фармакокинетики (PK) и фармакодинамики (PD) АТВ200 + шаперон (АТВ200/АТ2221) в 16 исследовательских центрах в 5 странах



Фиг. 19В

Исходные характеристики (N=20)

Пациенты, включенные в три когорты, представляют общую популяцию LOPD со значительным ухудшением на исходном уровне			
	Когорта 1 Способные ходить пациенты, у которых провели время ERT (N=11)	Когорта 2 Неспособные ходить пациенты, у которых провели время ERT (N=4)	Когорта 3 Испытавшие ERT (N=5)
Возраст, лет, в среднем (мин., макс.)	49,4 (28, 66)	36,0 (18, 56)	49,4 (24, 65)
Пол, муж.:жен.	9:2	3:1	1:4
Время на алглюкозидазе альфа, лет, в среднем (SD)	4,8 (1,42) ^a	8,9 (3,8)	NA
6MWT, метры, в среднем (SD)	392,0 (93,4)	NA	399,5 (83,5)
Форсированная FVC, % от прогнозируемого, в среднем (SD)	52,3 (13,2)	NA	53,4 (20,3)

NA = не применимо; SD = стандартное отклонение.

^aПациенты когорты 1 должны были принимать алглюкозидазу альфа в течение 2-6 лет в начале исследования.

Фиг. 19C

Краткое описание фармакокинетики AT2221

Лечение	C_{max} (нг/мл) ^a	t_{max} (ч) ^b	AUC ₀₋₂₄ (нг·ч/мл) ^c	AUC _{0-∞} (нг·ч/мл) ^c	$t_{1/2}$ (ч) ^c	CL/F (л/ч) ^c	V_z/F (л) ^c
Низкая доза MD (N=11)	1504 (23,9)	3,0 (1,5-4,0)	11968 (24,5)	12913 (25,6)	6,5 (29,3)	10,3 (21,3)	97,3 (39,8)
Высокая доза MD (N=16)	3086 (29,4)	3,0 (1,0-4,0)	24095 (25,9)	25506 (25,9)	5,9 (18,3)	10,5 (22,9)	90,5 (34,1)

CL/F = плазменный клиренс, скорректированный с учетом пероральной биодоступности AT2221; V_z/F = кажущийся объем распределения во время конечной фазы, скорректированный с учетом пероральной биодоступности AT2221.

^aСреднее геометрическое значение (CV%). ^bМедианное значение (min-max). ^cСреднее арифметическое значение (CV%).

Фиг. 20

Общий белок ГАА по сигнатуре пептида T09

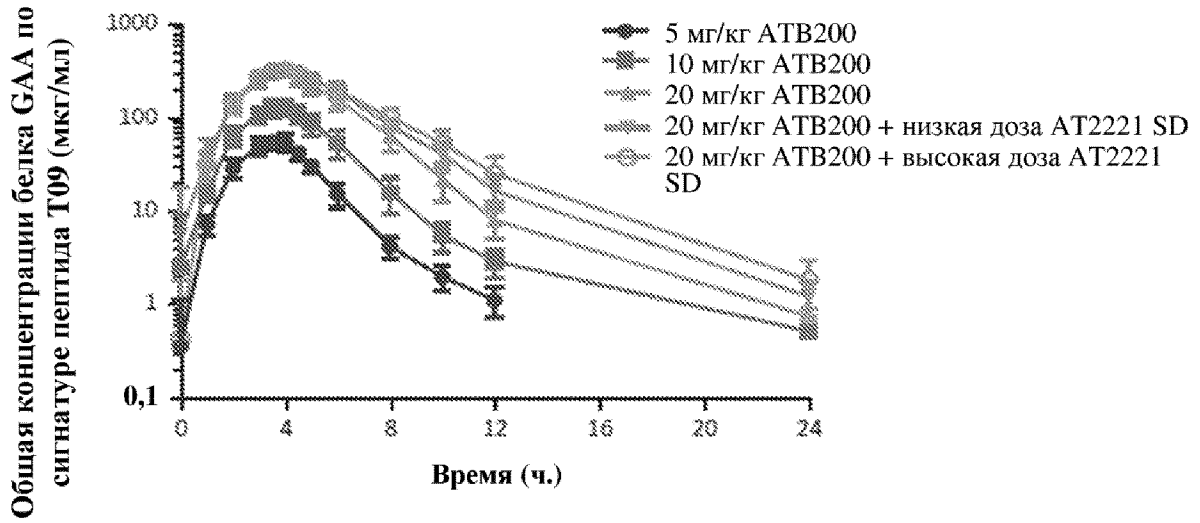
Когорта	Лечение	C_{max} (нг/мл) ^a	t_{max} (ч) ^a	AUC _{0-24h} (нг·ч/мл) ^a	AUC _{0-∞} (нг·ч/мл) ^a	$F_{отн.}$ ^b	$t_{1/2}$ (ч) ^c	CL _T (л/ч) ^c
1	5 мг/кг АТВ200 отдельно ^d	58.4 (19.1)	4,0 (3,0-4,0)	108 (25,1)	211 (17,2)		1,1 (10,2)	2,2 (16,9)
1	10 мг/кг АТВ200 отдельно ^d	135 (18,3)	4,0 (3,5-4,0)	287 (25,6)	538 (24,4)	2,6 (9,4)	1,3 (10,6)	1,7 (22,4)
1	20 мг/кг АТВ200 отдельно ^d	325 (13,5)	4,0 (3,5-4,0)	844 (20,8)	1418 (16,9)	6,9 (7,4)	1,5 (8,5)	1,3 (18,4)
1	20 мг/кг АТВ200 + низкая доза АТ2221 MD ^d	335 (15,4)	4,0 (3,5-5,0)	1062 (23,8)	1662 (20,5)	1,17 (7,7)	1,8 (21,8)	1,1 (20,5)
1	20 мг/кг АТВ200 + высокая доза АТ2221 MD ^d	345 (18,5)	4,0 (3,5-4,0)	1203 (24,2)	1821 (21,5)	1,28 (9,4)	2,1 (16,1)	1,0 (22,7)
3	20 мг/кг АТВ200 + высокая доза АТ2221 MD ^c	322 (14,3)	4,0 (4,0-4,5)	1147 (20,9)	1775 (19,3)	Н/д	2,2 (9,9)	0,8 (28,4)

AUC = площадь под кривой; CL_T = общий клиренс тела; C_{max} = максимальная концентрация лекарственного средства; CV = коэффициент изменчивости; MD = многократные дозы; t_{1/2} = период полувыведения; t_{max} = время до максимальной концентрации лекарственного средства; F_{отн.} = отношение AUC 20 мг/кг и 10 мг/кг к 5 мг/кг и 20 мг/кг + низкая доза или высокая доза АТ2221 по сравнению с 20 мг/кг отдельно.

^aСреднее геометрическое значение (CV%). ^bМедианное значение (min-max). Среднее арифметическое значение (CV%). ^dn=11. ^en=5.

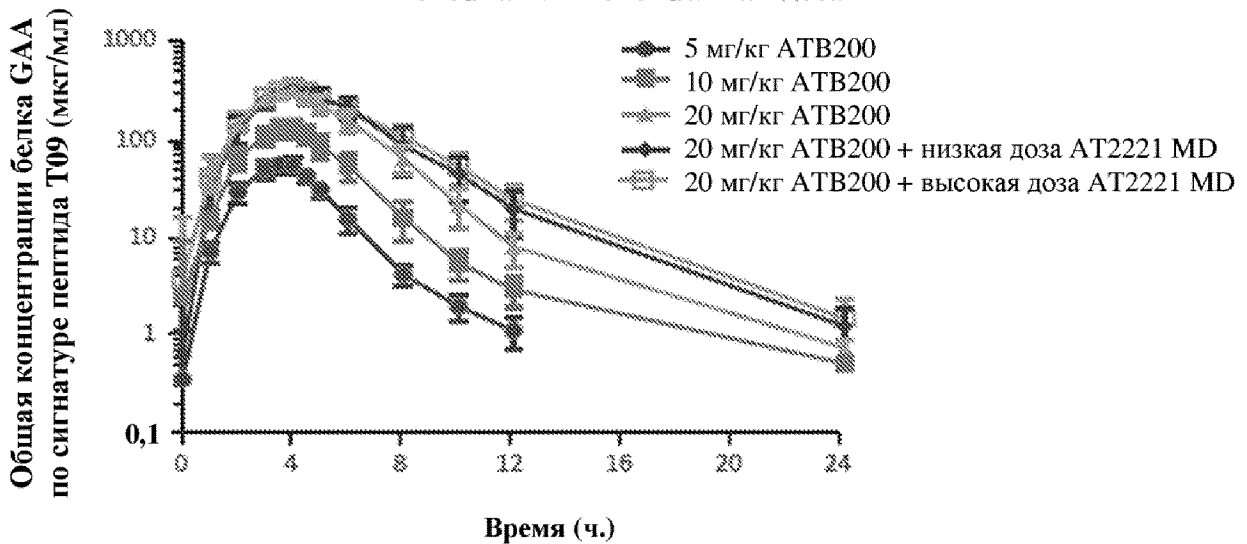
Фиг. 21

**Профили среднего значения концентрации общего белка ГАА
в зависимости от времени
Когорта 1: однократная доза**



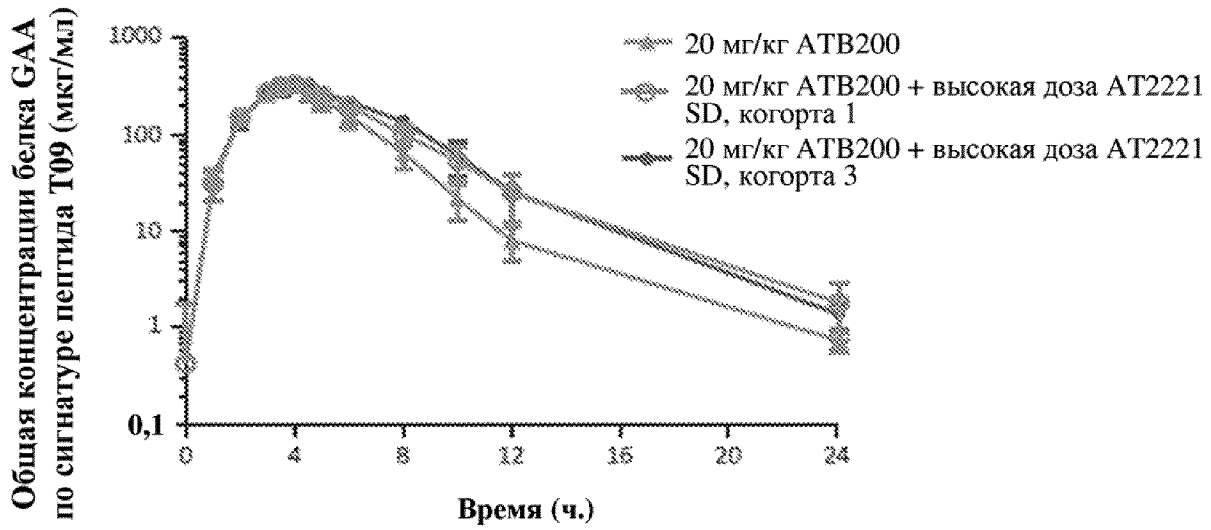
Фиг. 22А

**Профили среднего значения концентрации общего белка ГАА
в зависимости от времени
Когорта 1: многократная доза**



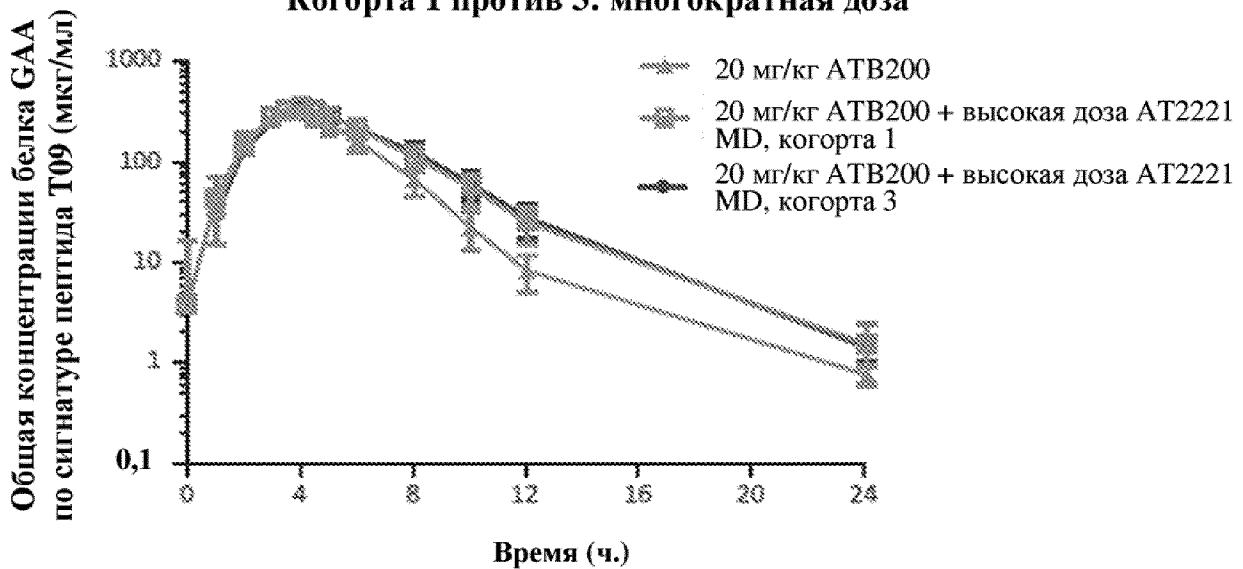
Фиг. 22В

**Профили среднего значения концентрации общего белка
ГАА в зависимости от времени
Когорта 1 против 3: однократная доза**

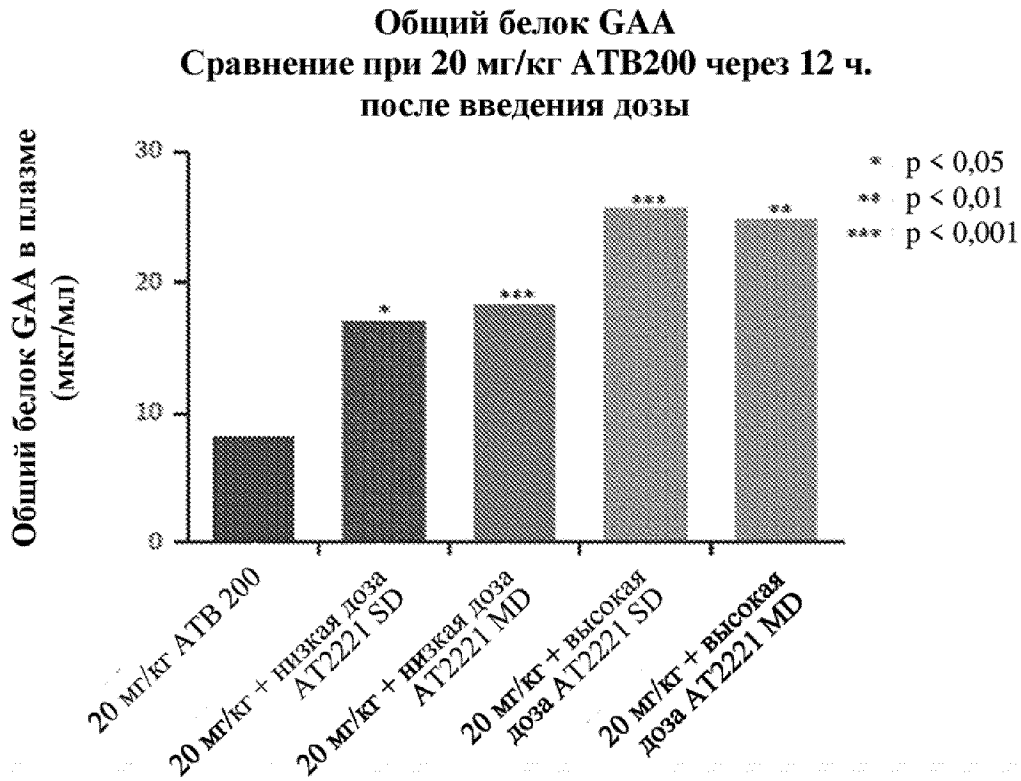


Фиг. 22С

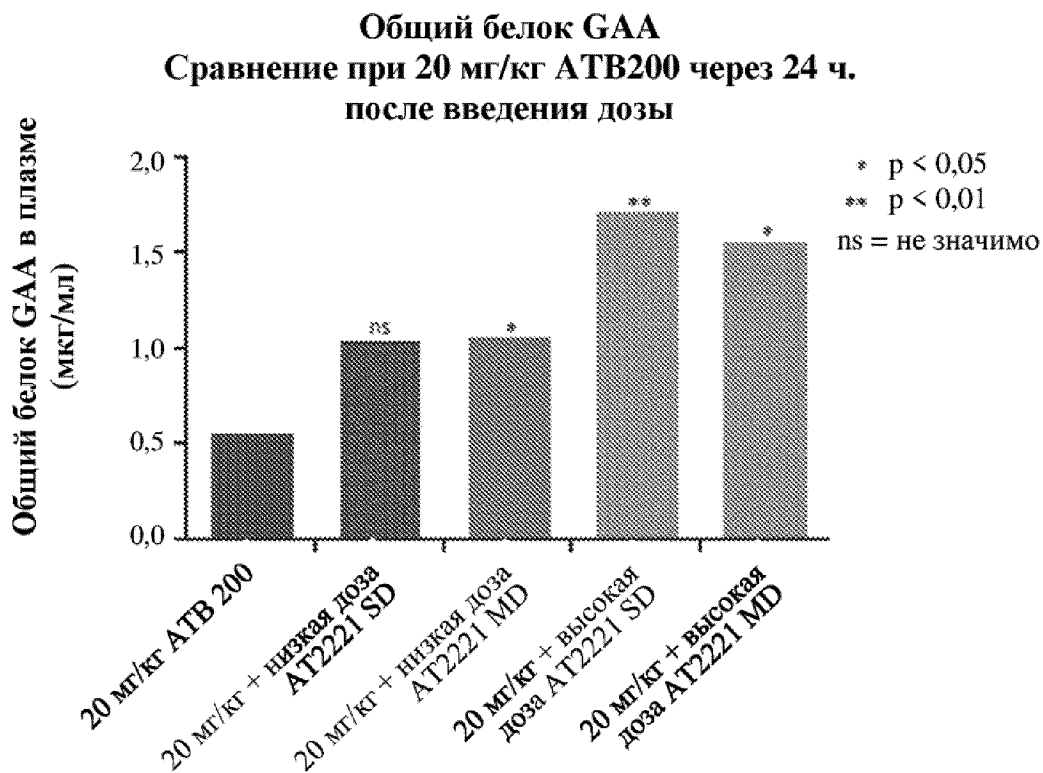
**Профили среднего значения концентрации общего белка
ГАА в зависимости от времени
Когорта 1 против 3: многократная доза**



Фиг. 22D



Фиг. 22Е



Фиг. 22F

ANOVA для общего белка GAA по сигнатуре пептида T09

Эталон	Тест	Отношение AUC % отн.	90% нижняя граница CI	90% верхняя граница CI
Когорта 1 SD	Когорта 1 MD	98,0	94,9	101,2
Когорта 1 SD	Когорта 3 SD	100,1	82,3	121,8
Когорта 1 MD	Когорта 3 MD	97,5	80,2	118,6

AUC = площадь под кривой; CI = доверительный интервал.

Фиг. 23

Тест с 6-минутной ходьбой

Показатели теста 6MWT улучшились для способных ходить пациентов, у которых провели замену ERT, и для пациентов, не получавших ERT, в месяц 6 с сохраняющимся преимуществом, наблюдаемым до месяца 12

Тест с 6-минутной ходьбой (м); в среднем

Когорта 1 способные ходить пациенты, у которых провели замену ERT	Исходный уровень (n=10)	CFWL мес. 6 (n=10)	CFWL мес. 9 (n=10)	CFWL мес. 12 (n=8)
	397,2 (96,8)	+23,9 (52,2)	+24,5 (40,8)	+57,4 (34,4)
Когорта 3 Не получавшие ERT	Исходный (n=5)	CFWL мес. 6 (n=5)	CFWL мес. 9 (n=5)	CFWL мес. 12 (n=2)
	399,5 (83,5)	+41,8 (29,4)	+63,5 (23,1)	+86,8 (11,1)

- Показатель теста 6MWT увеличился у 7/10, 8/10 и 8/8 пациентов, у которых провели замену ERT, соответственно через 6, 9 и 12 месяцев
- Показатель теста 6MWT увеличился у 5/5, 5/5 и 2/2 пациентов, которые не получали ERT, соответственно через 6, 9 и 12 месяцев

Фиг. 24А

Пациент	Исходный уровень	Изменение относительно исходного уровня		
		Месяц 6	Месяц 9	Месяц 12
Когорта 1: способные ходить пациенты, у которых провели замену ERT				
1	544	+51	+56	+112
2	379	+125	+110	+103
3	339	+21	+45	+73
4	332	+8	+26	+45
5	456	-5	+8	+41
6	500	+55	+20	+33
7	220	+29	+21	+30
8	410	+38	+11	+22
9	464	-4	-9	—
10	328	-78	-43	—
В среднем (SD)	397,2 (96,8)	+23,9 (52,2)	+24,5 (40,8)	+57,4 (34,4)
Когорта 3: не получавшие ERT				
1	480	+41	+72	+95
2	384	+62	+78	+79
3	460	+79	+89	—
4	406	+14	+44	—
5	267	+13	+35	—
В среднем (SD)	399,5 (83,5)	+41,8 (29,4)	+63,5 (23,1)	+86,8 (11,1)

Фиг. 24В

Другие тесты двигательных функций

	Оценка, с	Исходный уровень, в среднем (SD)	Изменение относительно исходного уровня в месяц 6, в среднем (SD)	Изменение относительно исходного уровня в месяц 9, в среднем (SD)	Изменение относительно исходного уровня в месяц 12, в среднем (SD)
Когорта 1: пациенты, у которых провели замену ERT		n=10	n=10	n=10	n=8
Тест "встань и иди" с отсчетом времени		10,5 (6,6)	-1,8 (3,5)	-1,2 (3,3)	-1,0 (2,2)
Подъем по 4 ступеням		4,1 (2,7)	-0,6 (1,6)	-0,4 (1,6)	-1,0 (1,5)
Ходьба на 10 м		7,4 (3,0)	+0,1 (1,9)	-0,1 (1,6)	-0,5 (1,7)
Тест Говерса ^a		7,9 (2,9)	-1,1 (3,8)	4,5 ^b (13,4)	-2,6 (1,9)
Показатель GSGC		12,6 (4,8)	+0,1 (3,9)	+0,5 (4,6)	-1,9 (2,2)
Когорта 3: пациенты, не получавшие ERT		n=5	n=5	n=5	n=2
Тест "встань и иди" с отсчетом времени		9,4 (2,9)	-1,0 (1,1)	-0,6 (1,4)	-1,8 (0,5)
Подъем по 4 ступеням		4,2 (1,5)	-0,6 (0,3)	0,0 (1,5)	-0,4 (0,4)
Ходьба на 10 м		7,9 (3,0)	-0,7 (1,1)	-1,3 (1,0)	-0,6 (0,0)
Тест Говерса		13,9 (11,0)	7,9 ^c (20,9)	-1,6 (3,9)	-2,1 (1,3)
Показатель GSGC		12,2 (3,6)	-1,8 (3,8)	-2,4 (3,4)	0,0 (1,4)

GSGC = ходьба, подъем по ступеням, прием Говерса, вставание со стула.

GSGC представляет собой комбинированный показатель из 4 оценок двигательной функции, которая оценивается наблюдателем: ходьба (ходьба на 10 метров), подъем по 4 ступеням, прием Говерса (вставание с пола) и вставание со стула. Каждый тест оценивают от 1 (нормально) до 7 (не может быть выполнено); максимальный показатель составляет 6 для теста «вставание со стула». Общие показатели варьируются в диапазоне от 4 до 27.

^aN=9, пропущенные значения не получены из-за отказа пациента выполнить тест.

^bМедианное изменение от исходного уровня составило -1,5, и у 7/9 пациентов наблюдалось снижение.

^cМедианное изменение от исходного уровня составило -0,8, и у 4/5 пациентов наблюдалось снижение.

Фиг. 24С

Тестирование мышечной силы (QMT) у пациентов в когорте 2

Тестируемая группа мышц	Исходный уровень, в среднем (SD) n=4	Изменение относительно исходного уровня в месяц 6, в среднем (SD) n=4	Изменение относительно исходного уровня в месяц 9, в среднем (SD) n=4	
Количественное тестирование Мышцы – динамометр, фунты силы	Приведение плеча ^a	5,7 (8,8)	+8,1 (12,8)	+9,6 (12,3)
	Отведение плеча	16,7 (18,1)	+1,0 (6,6)	+0,5 (9,3)
	Сгибание локтя	12,7 (13,7)	+2,4 (15,9)	+6,0 (19,3)
	Разгибание локтя	12,3 (13,9)	+5,5 (4,7)	+7,5 (8,2)
Мануальное тестирование мышц, Мануальный показатель ^b	Приведение плеча ^a	5,7 (8,8)	+8,1 (12,8)	+9,6 (12,3)
	Отведение плеча	16,7 (18,1)	+1,0 (6,6)	+0,5 (9,3)
	Сгибание локтя	12,7 (13,7)	+2,4 (15,9)	+6,0 (19,3)
	Разгибание локтя	12,3 (13,9)	+5,5 (4,7)	+7,5 (8,2)

Измерение представляет фунты силы для правой и левой сторон, взятых вместе.

^aПриведение плеча, недоступное для 1 пациента.

^bОценивание: (1) видимое мышечное движение, но отсутствие движения в суставе; (2) движение в суставе, но не против силы тяжести; (3) движение против силы тяжести, но не против добавленного сопротивления; (4) движение против сопротивления, но меньше, чем нормальное; (5) нормальная сила.

Фиг. 25

**Показатель мануального тестирования мышцы в когорте 1:
способные ходить пациенты, у которых провели замену ERT**

Увеличение силы наблюдалось при мануальном тестировании мышцы у пациентов, которых перевели с ERT.

	Участок тела	Исходный уровень		Изменение относительно исходного уровня					
				Месяц 6		Месяц 9		Месяц 12	
		в среднем (SD)	n	в среднем (SD)	n	в среднем (SD)	n	в среднем (SD)	n
Способные ходить пациенты, у которых провели замену ERT	Верхняя часть тела Максимальный показатель 40	35,4 (5,7)	10	+1,2 (2,4)	10	+1,7 (2,8)	10	+2,0 (3,9)	8
	Нижняя часть тела Максимальный показатель 40	31,0 (3,0)	10	+0,9 (1,8)	9	+2,2 (2,4)	10	+2,3 (2,9)	8
	Все тело Максимальный показатель 80	66,4 (8,1)	10	+2,8 (3,4)	10	+4,0 (3,1)	10	+4,5 (2,8)	8

Фиг. 26А

**Показатель мануального тестирования мышцы в когорте 2:
неспособные ходить пациенты, у которых провели замену ERT**

Увеличение силы наблюдалось при мануальном тестировании мышц у пациентов на амбулаторном лечении.

	Участок тела	Исходный уровень		Изменение относительно исходного уровня			
				Месяц 6		Месяц 9	
		в среднем (SD)	n	в среднем (SD)	n	в среднем (SD)	n
Когорта 2: неспособные ходить пациенты, у которых провели замену ERT	Верхняя часть тела Максимальный показатель 40	13,3 (12,2)	3	+5,7 (2,1)	3	+2,3 (5,5)	3

Фиг. 26В

**Показатель мануального тестирования мышцы в когорте 3:
пациенты, не получавшие ERT**

Увеличение силы наблюдалось при мануальном тестировании мышц у пациентов, не получавших ERT, в месяцы 6, 9 и 12

	Участок тела	Исходный уровень		Изменение относительно исходного уровня					
				Месяц 6		Месяц 9		Месяц 12	
		в среднем (SD)	n	в среднем (SD)	n	в среднем (SD)	n	в среднем (SD)	n
Когорта 3: не получавшие ERT	Верхняя часть тела Макс. показатель 40	36,8 (3,4)	5	-0,2 (1,3)	5	+0,8 (1,9)	5	-0,5 (0,7)	2
	Нижняя часть тела Макс. показатель 40	29,0 (2,0)	4	+0,5 (1,9)	4	+1,3 (3,6)	4	+4,5 (0,7)	2
	Все тело Макс. показатель 80	66,9 (3,7)	5	-0,7 (3,2)	5	+1,3 (3,1)	5	+4,0 (1,4)	2

Фиг. 26С

Тесты легочной функции: FVC, MIP, MEP

	Оценка	Исходный уровень, в среднем (SD)	Изменение относительно исходного уровня в месяц 6, в среднем (SD)	Изменение относительно исходного уровня в месяц 9, в среднем (SD)	Изменение относительно исходного уровня в месяц 12, в среднем (SD)
Когорта 1: пациенты, которых перевели с ERT		n=9	n=9	n=9	n=7
	FVC, % от прогнозируемого ^a	52,6 (14,7)	-1,3 (4,1)	-1,7 (3,9)	-3,1 (4,8)
	MIP	35,7 (11,0)	+0,3 (4,6)	-0,6 (3,0)	+0,3 (3,6)
	MEP	72,6 (32,6)	+16,1 (42,1)	+23,7 (38,1)	+36,8 (45,7)
Когорта 3: не получавшие ERT		n=5	n=5	n=5	n=2
	FVC, % от прогнозируемого	53,4 (20,3)	+4,2 (5,6)	+6,2 (5,3)	+6,0 (7,1)
	MIP	32,6 (18,5)	+11,0 (5,0)	+12,0 (10,3)	-0,5 (9,2)
	MEP	60,6 (8,3)	-0,4 (12,4)	+7,2 (15,3)	-2,0 (9,9)

MEP = максимальное давление при выдохе; MIP = максимальное давления при вдохе.

^aFVC не доступно для 1 пациента.

MIP and MEP измеряли в сантиметрах водяного столба.

Фиг. 27

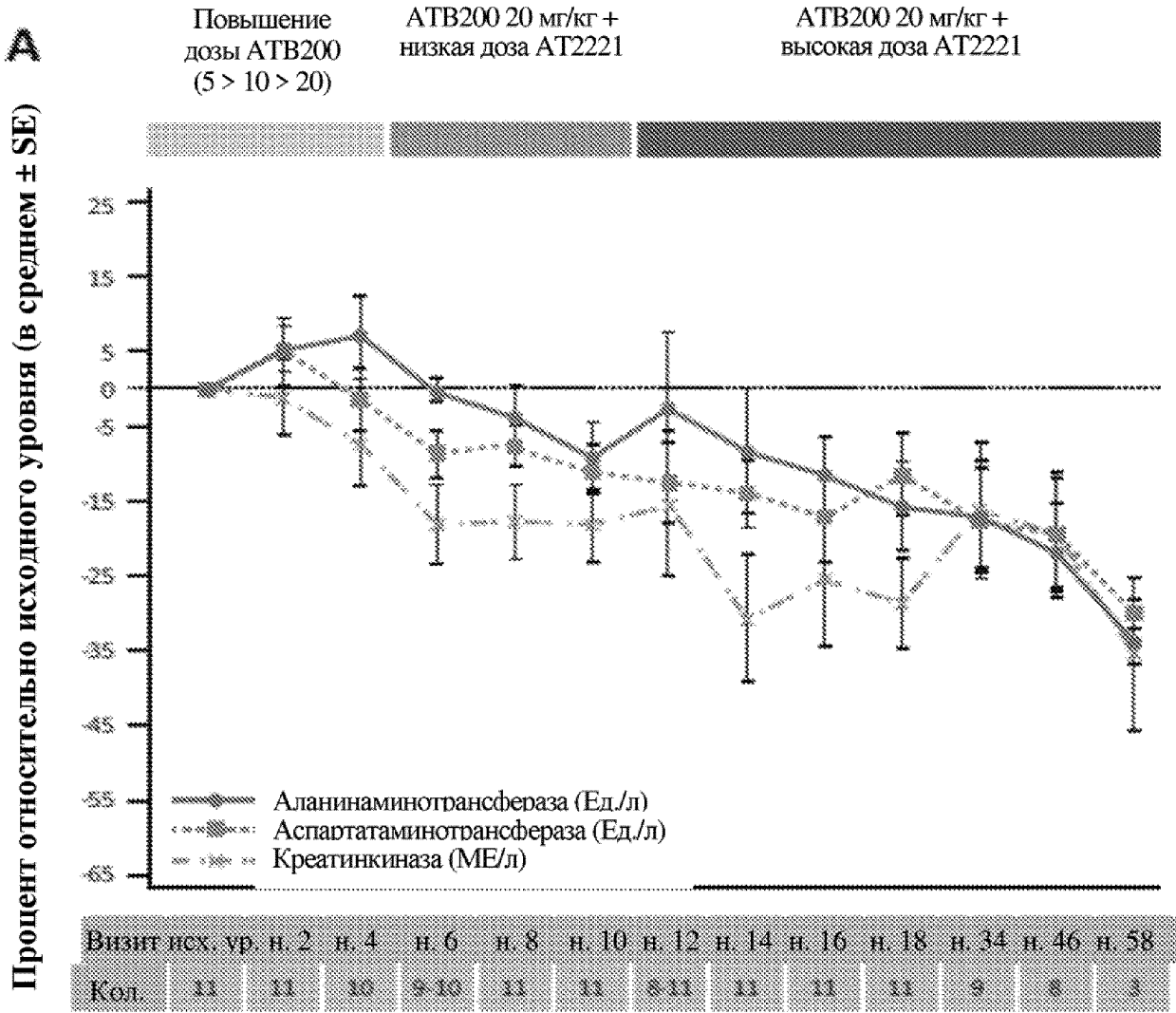
Показатель по шкале оценки выраженности утомляемости

	Исходный уровень, в среднем (SD)	Изменение относительно исходного уровня в месяц 6, в среднем (SD)	Изменение относительно исходного уровня в месяц 9, в среднем (SD)	Изменение относительно исходного уровня в месяц 12, в среднем (SD)
Когорта 1: способные ходить пациенты, у которых провели замену ERT	n=10	n=10	n=10	n=8
	53,5 (7,7)	-8,0 (10,7)	6,8 (6,8)	-7,8 (6,0)
Когорта 2: неспособные ходить пациенты, у которых провели замену ERT	n=4	n=2	n=2	—
	54,0 (8,5)	-3,5 (7,8)	-6,5 (5,0)	—
Когорта 3: не получавшие ERT	n=5	n=5	n=5	n=2
	39,2 (12,7)	-5,2 (11,7)	-7,8 (7,5)	-1,5 (2,1)

Шкала оценки выраженности утомляемости состоит из 9 вопросов, каждый из которых оценивается по шкале от 1 до 7. Общий показатель варьируется от 9 до 63, причем более высокие значения представляют более высокий уровень утомляемости из-за болезненного состояния. Нормативное значение в здоровой популяции составляет ~ 21⁵

Фиг. 28

Процент в среднем изменения относительно исходного уровня в маркерах поражения мышц у пациентов когорты 1



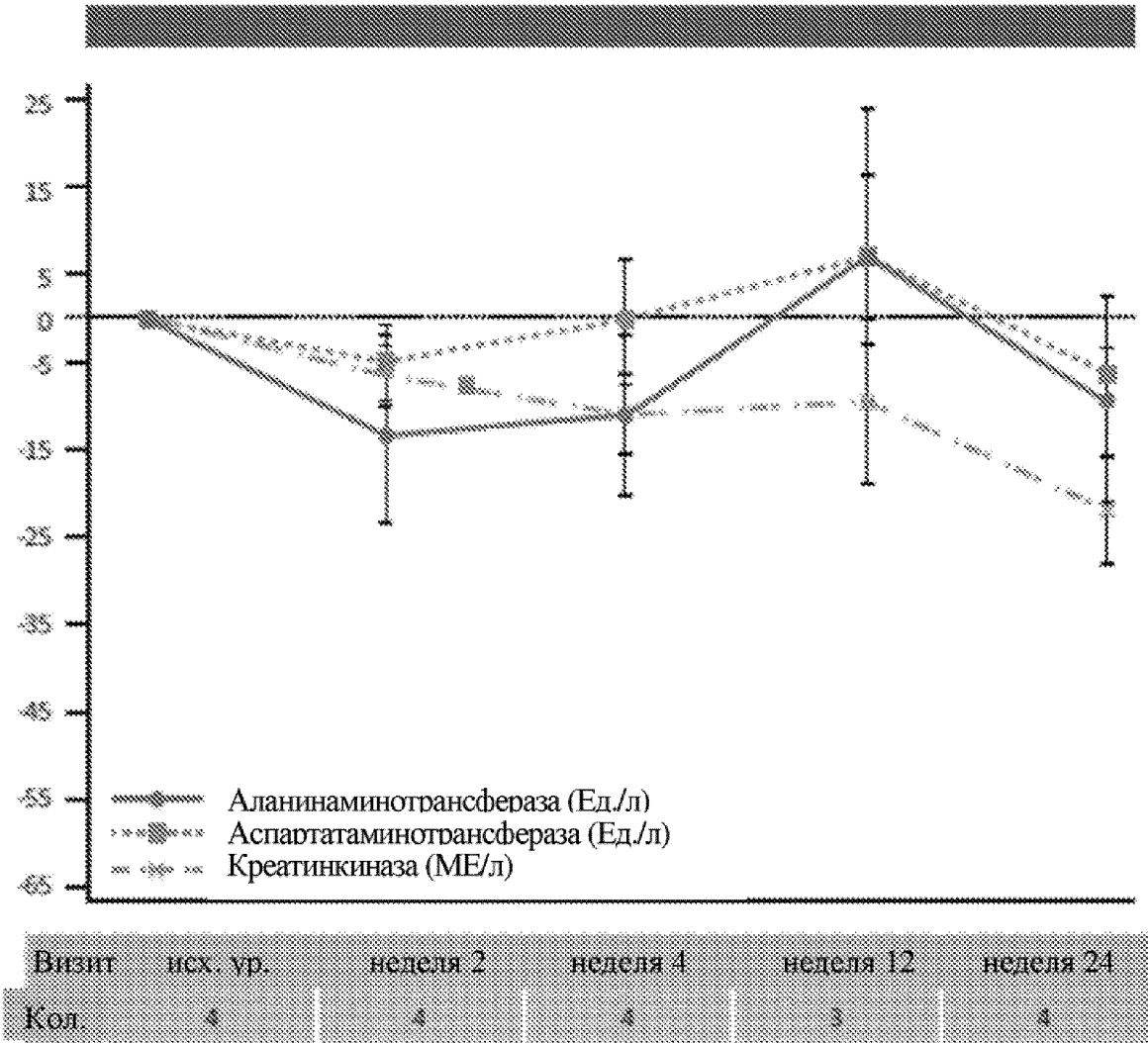
Фиг. 29А

Процент в среднем изменения относительно исходного уровня в маркерах поражения мышц у пациентов когорты 2

B

ATB200 20 мг/кг + высокая доза AT2221

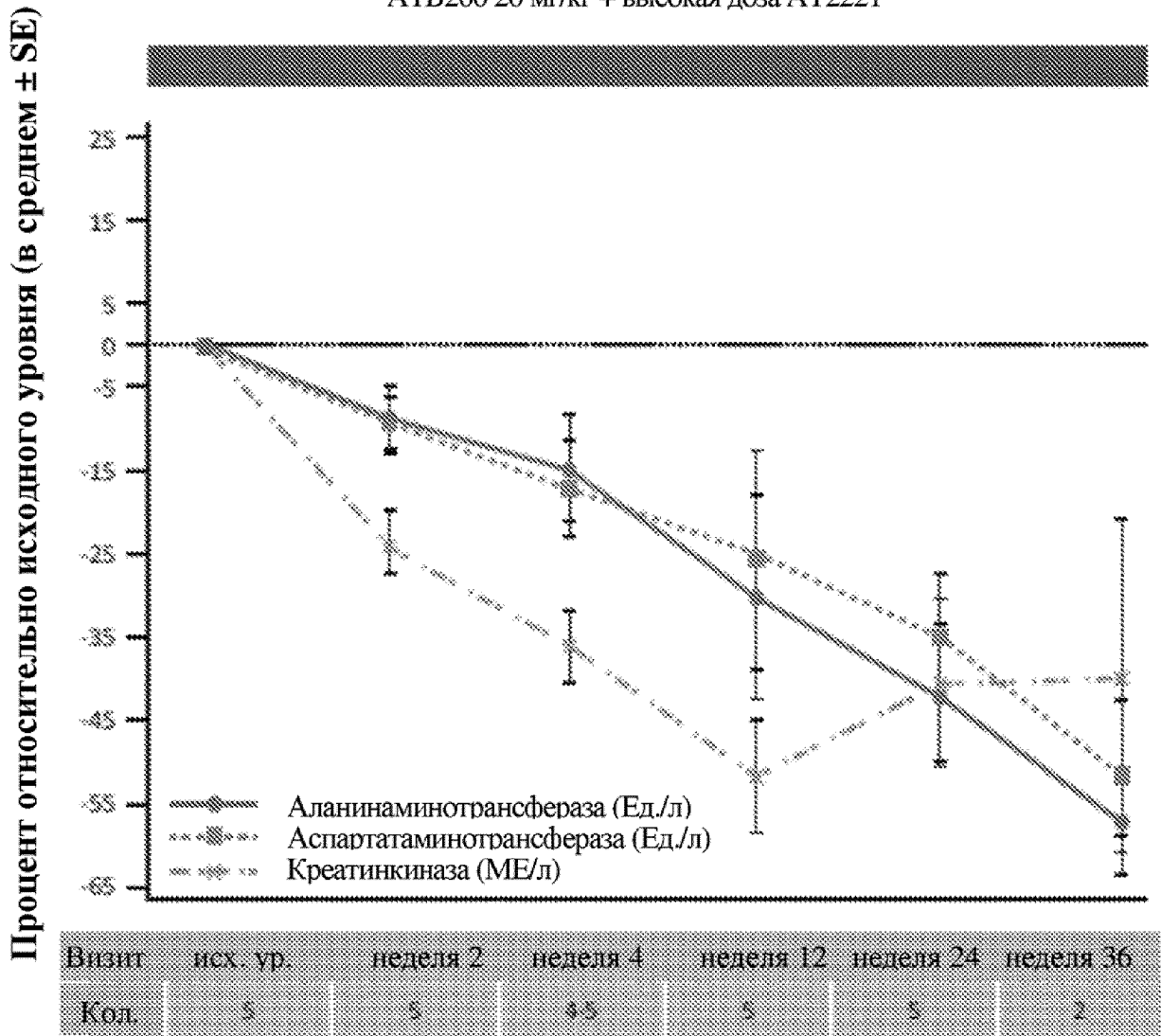
Процент относительно исходного уровня (в среднем ± SE)



Фиг. 29В

Процент в среднем изменения относительно исходного уровня в маркерах поражения мышц у пациентов когорты 3

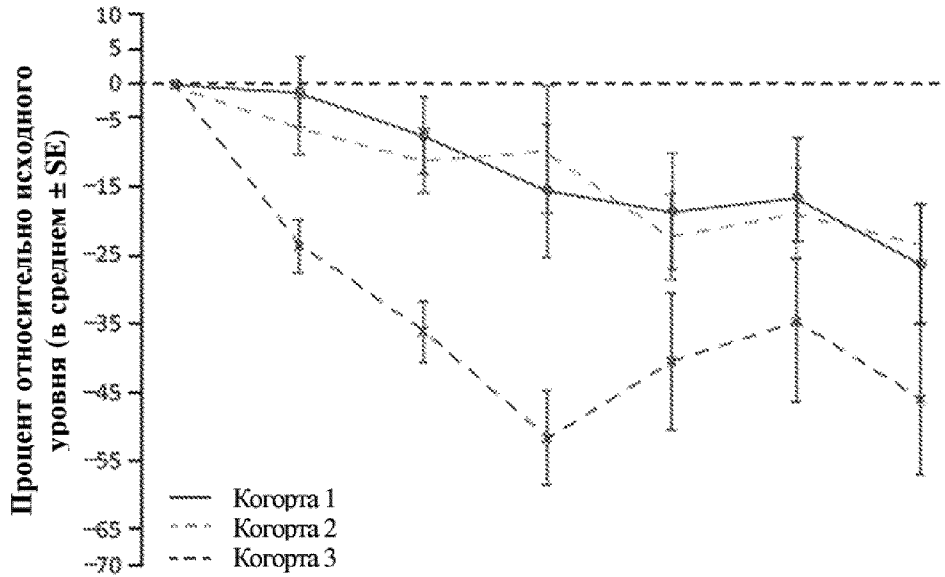
АТВ200 20 мг/кг + высокая доза АТ2221



Фиг. 29С

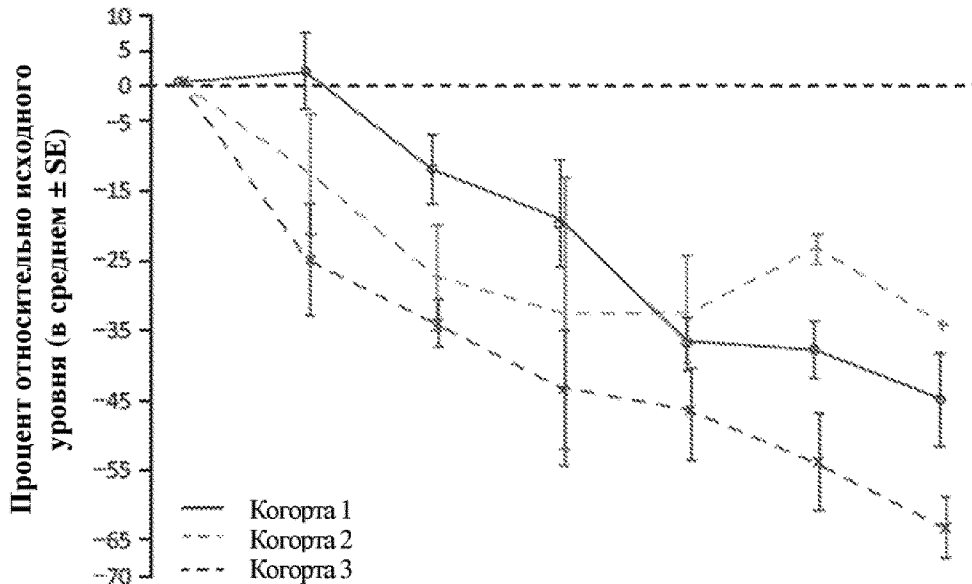
Процент в среднем изменения относительно исходного уровня в маркерах (А) поражения мышц (креатинкиназа) и (В) накопления гликогена (тетрасахарида гексозы в моче)

А



Кол.	BL	Нед. 2	Нед. 4	Мес. 3	Мес. 6	Мес. 9	Мес. 12
Когорта 1	11	11	10	8	10	10	8
Когорта 2	4	4	4	3	4	4	1
Когорта 3	5	5	4	5	5	5	2

Б



Кол.	BL	Нед. 2	Нед. 4	Мес. 3	Мес. 6	Мес. 9	Мес. 12
Когорта 1	11	11	11	11	10	9	7
Когорта 2	4	4	4	4	4	4	1
Когорта 3	5	5	5	5	5	5	2

Фиг. 29D

Сводка по безопасности (N=20)^a

Данные по безопасности для АТВ200/АТ2221 показывают, что АЕ, как правило, были мягкими и временными с очень низкими показателями IAR (< 1%) после 550+ полных инфузий во всех когортах

- Как правило, АЕ были легкими и временными
 - Наиболее распространенными АЕ, возникающими при лечении, были боль в животе^b (8/20), диарея (8/20), назофарингит (6/20), тошнота (5/20), головная боль (5/20) и инфекция верхних дыхательных путей (5/20)
- В инфузиях 550+ было три случая IAR, которые контролировались стандартной премедикацией
 - 1 явление IAR у неспособного ходить пациента, у которого провели замену ERT (обесцвечивание кожи)
 - 2 явления IAR у пациента, не получавшего ERT (локализованный зуд, эритема и ощущение жжения)
- Самая длительная продолжительность лечения составляет 20+ месяцев

АЕ, нежелательные явления; IAR, реакция, связанная с инфузией.

^aУказано на основании промежуточного анализа данных (максимум 20+ месяцев).

^bВключает в себя боль в верхней и нижней части живота.

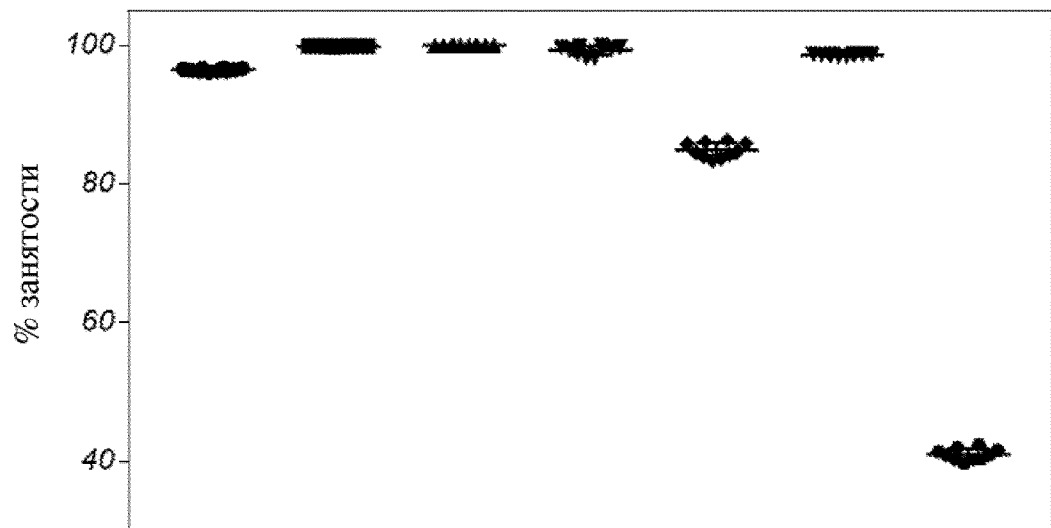
Фиг. 30

Выводы

- **Мышечная функция**
 - расстояние в тесте 6MWT продолжало улучшаться у способных ходить пациентов, у которых провели замену ERT, и у пациентов, не получавших ERT, до месяца 12
 - другие тесты двигательной функции соответствовали результатам 6MWT в обеих когортах
 - увеличение силы наблюдалось при мануальном тестировании мышц во всех когортах
 - увеличение силы мышц локтя и плеча у неспособных ходить пациентов, у которых провели замену ERT, в месяцы 6 и 9
- **Легочная функция**
 - FVC, MIP и MEP в целом были стабильными у пациентов, у которых провели замену ERT
 - FVC, MIP и MEP в целом увеличивались у пациентов, не получавших ERT
- **Показатель по шкале оценки выраженности утомляемости**
 - Улучшение показателя утомляемости наблюдалось во всех когортах
- **Биомаркеры и безопасность**
 - уровни СК и Hex4 снижались во всех когортах
 - ATB200/AT2221 в целом хорошо переносилась

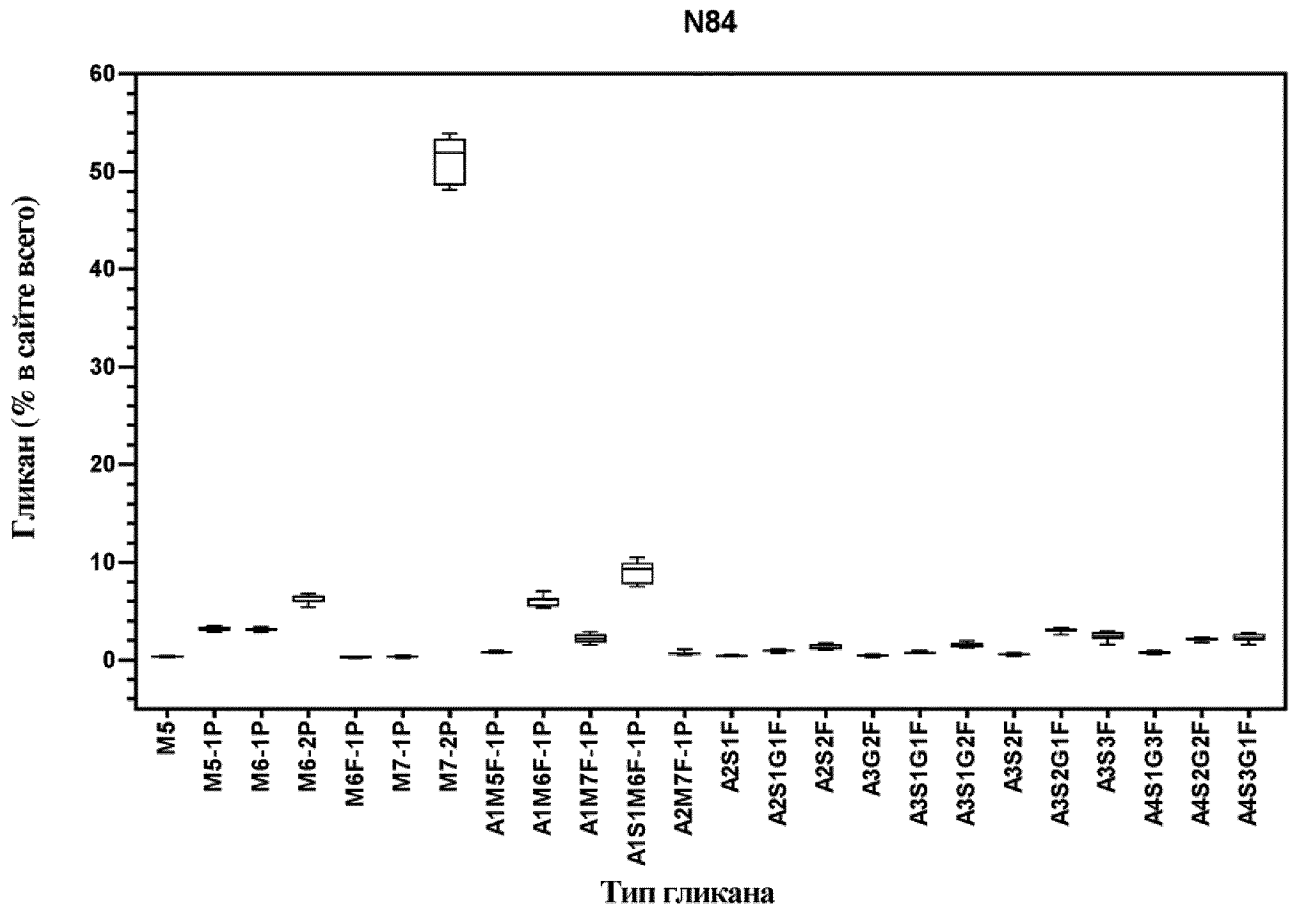
Фиг. 31

Занятость сайта гликозилирования



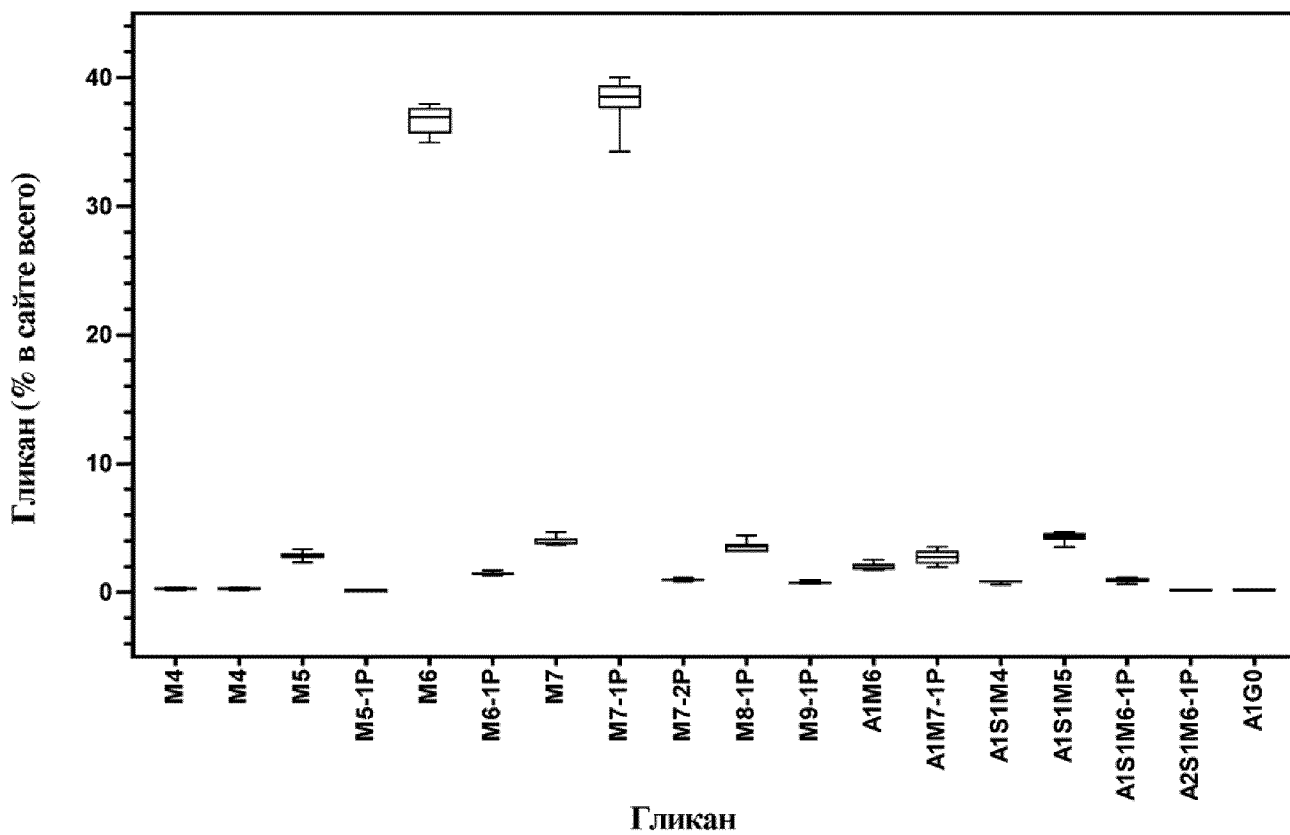
Сайт гликозилирования	Asn140	Asn233	Asn390	Asn470	Asn652	Asn882	Asn925
Средняя занятость	97	100	100	99	85	99	41
CV	0,2	0,01	0,0	0,22	0,34	0,04	0,26
N =	10						

Фиг. 32А

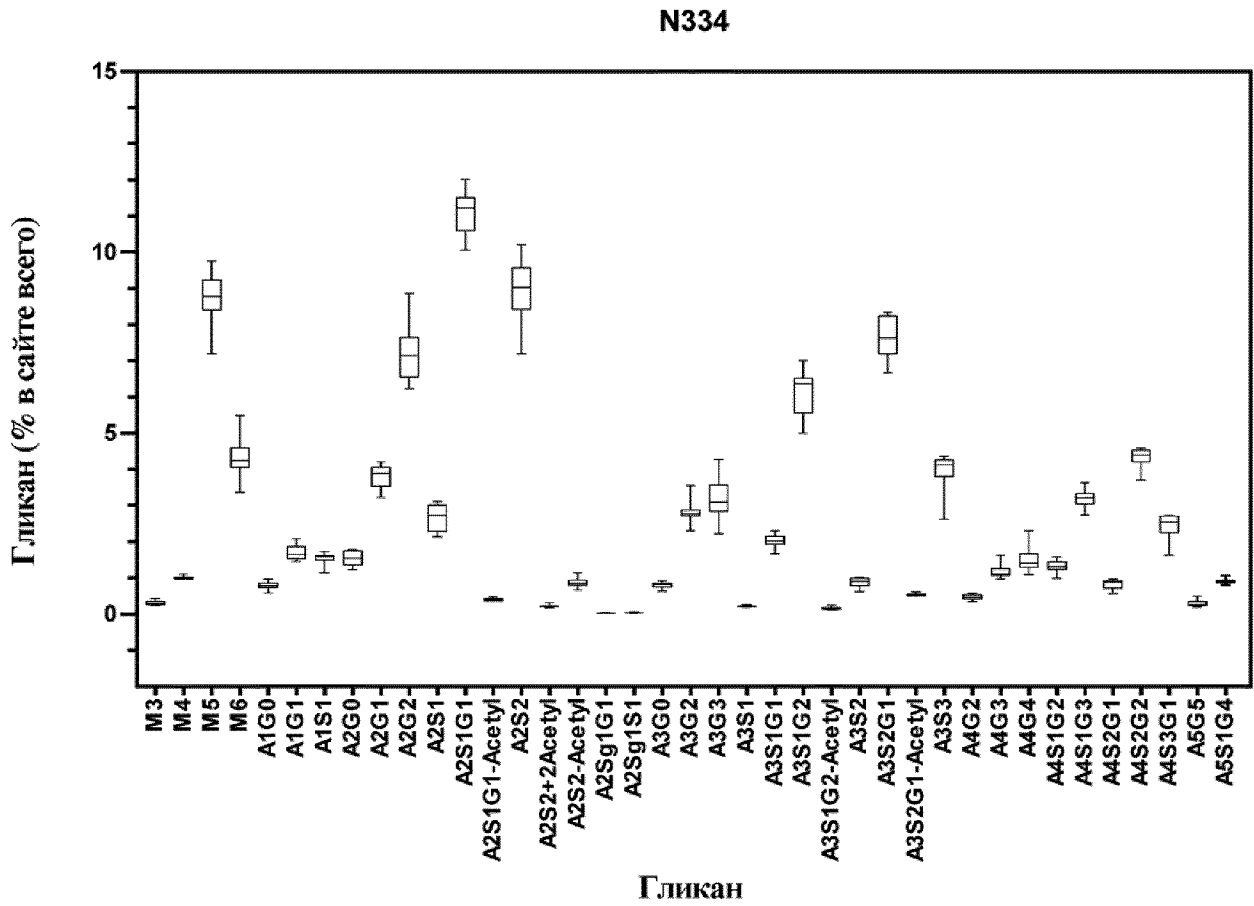


Фиг. 32В

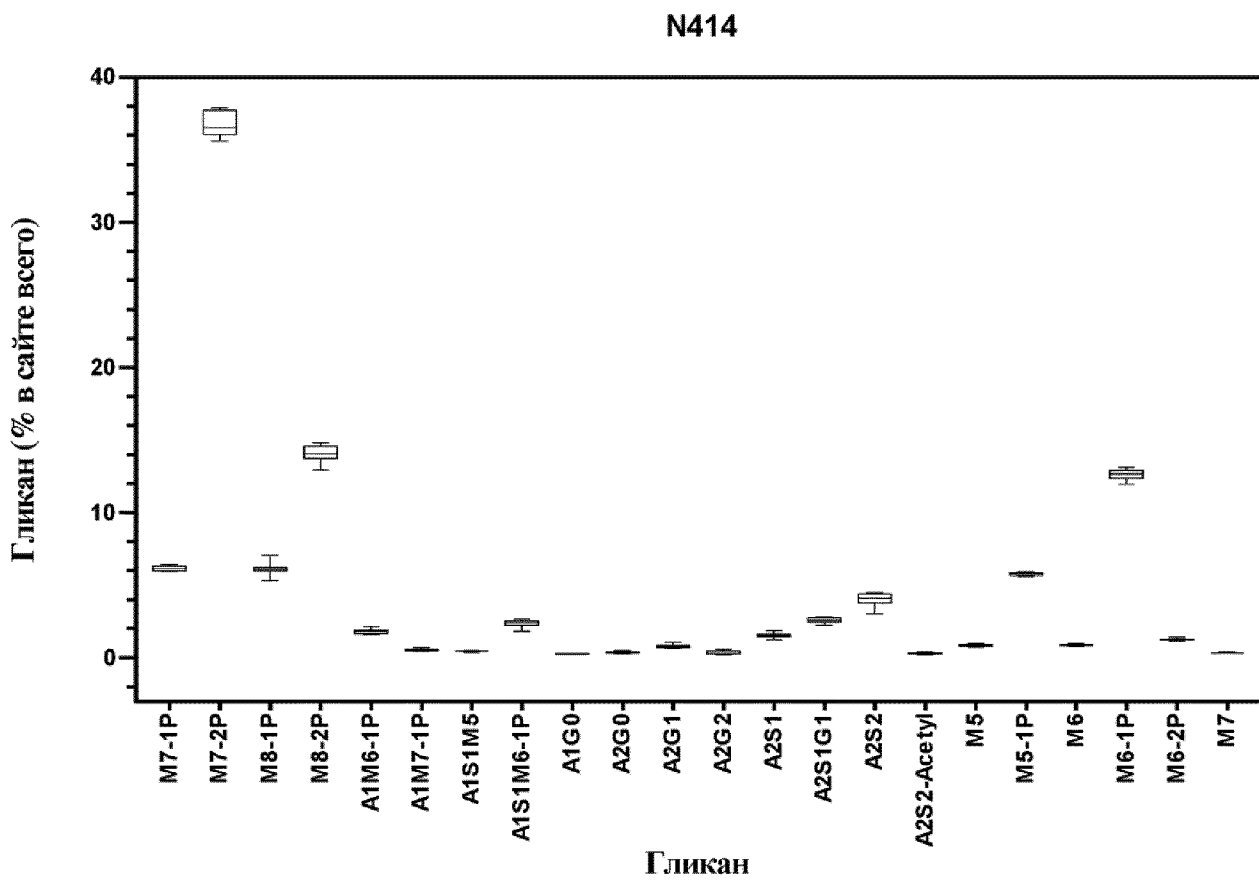
N177



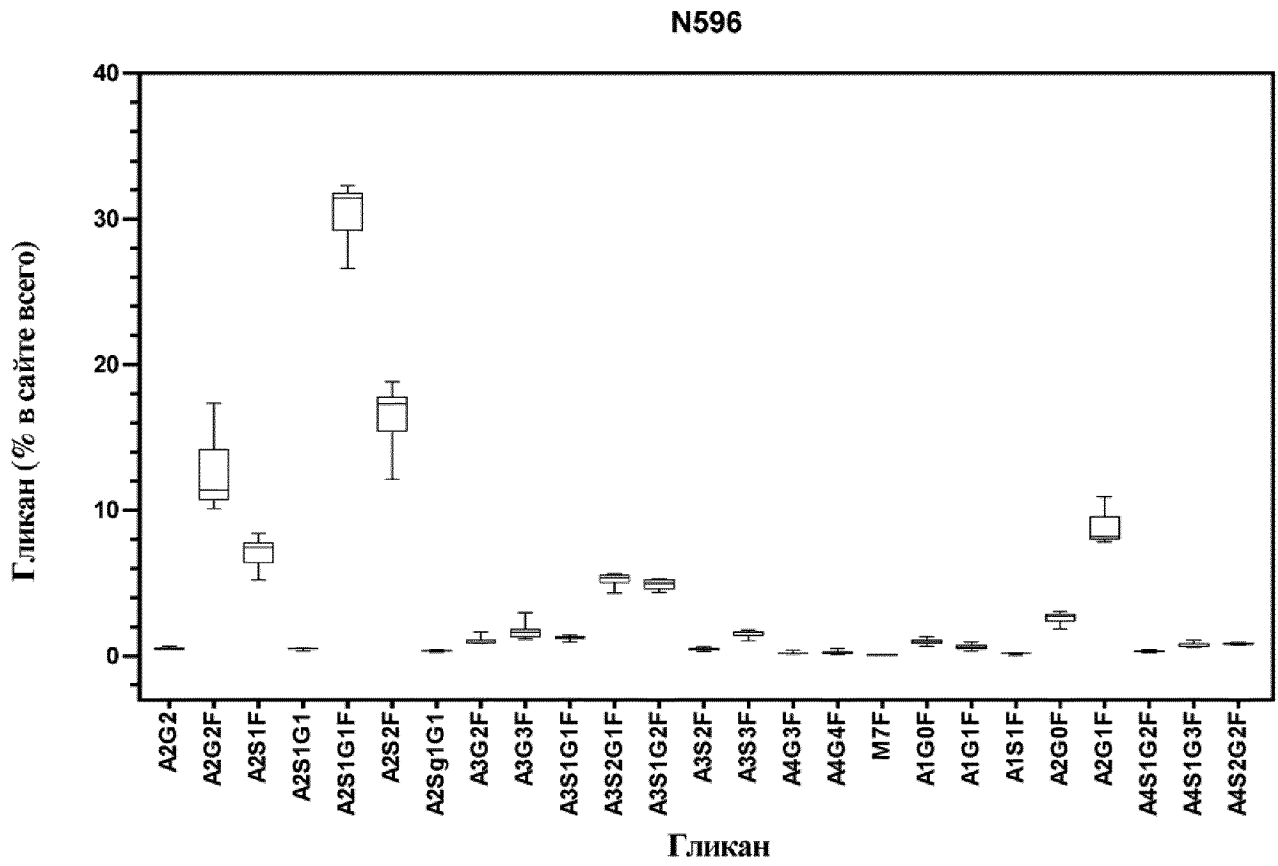
Фиг. 32С



Фиг. 32D

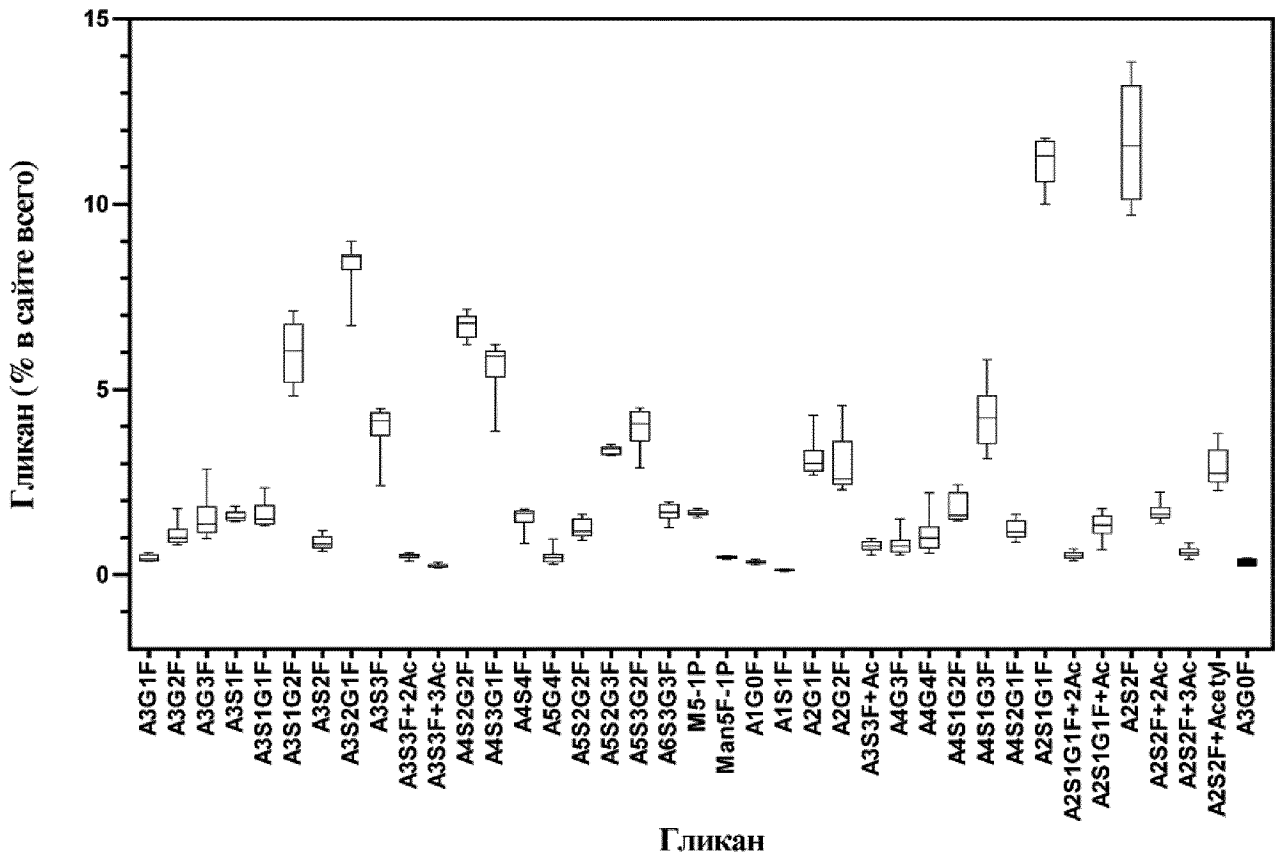


Фиг. 32Е

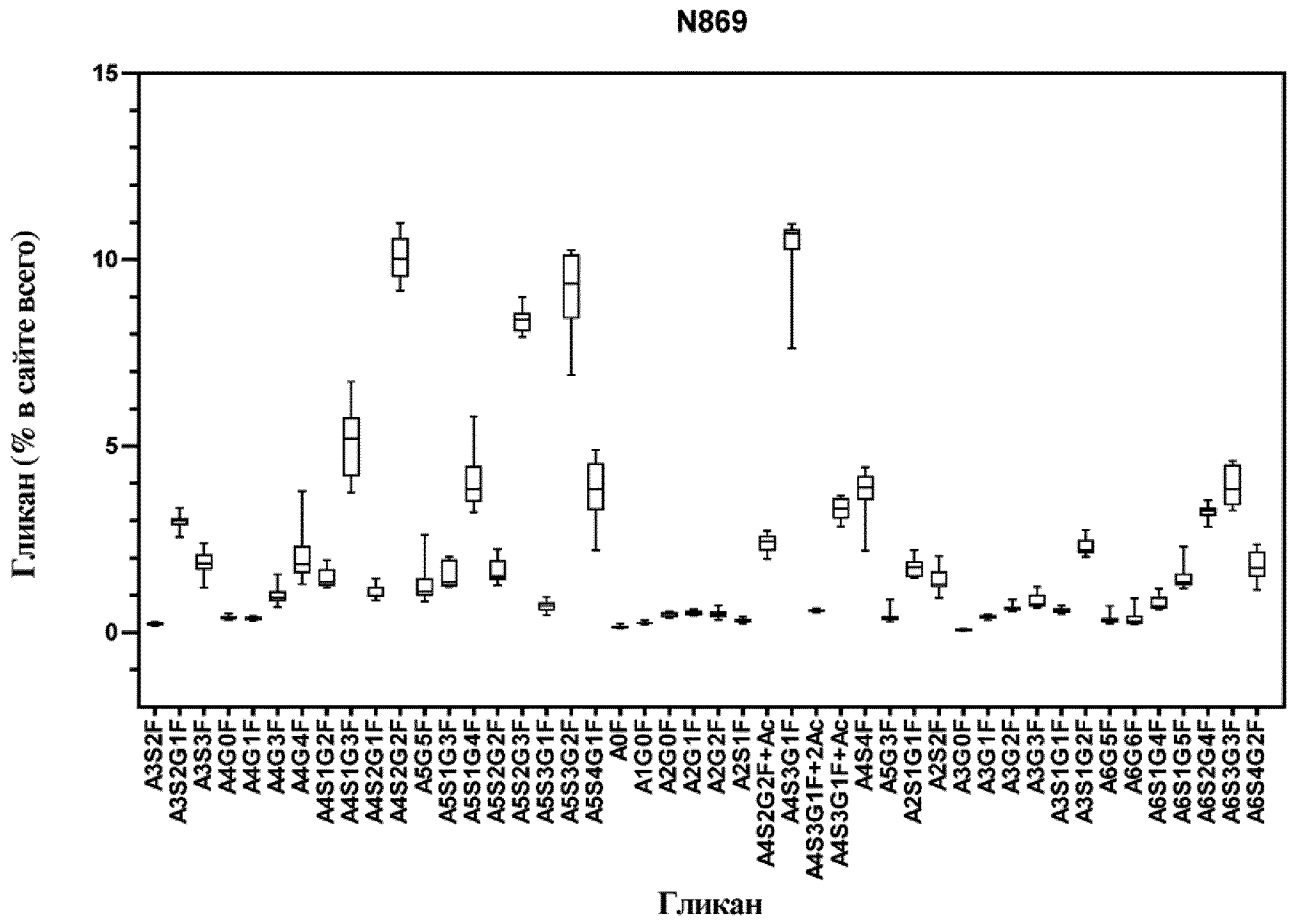


Фиг. 32F

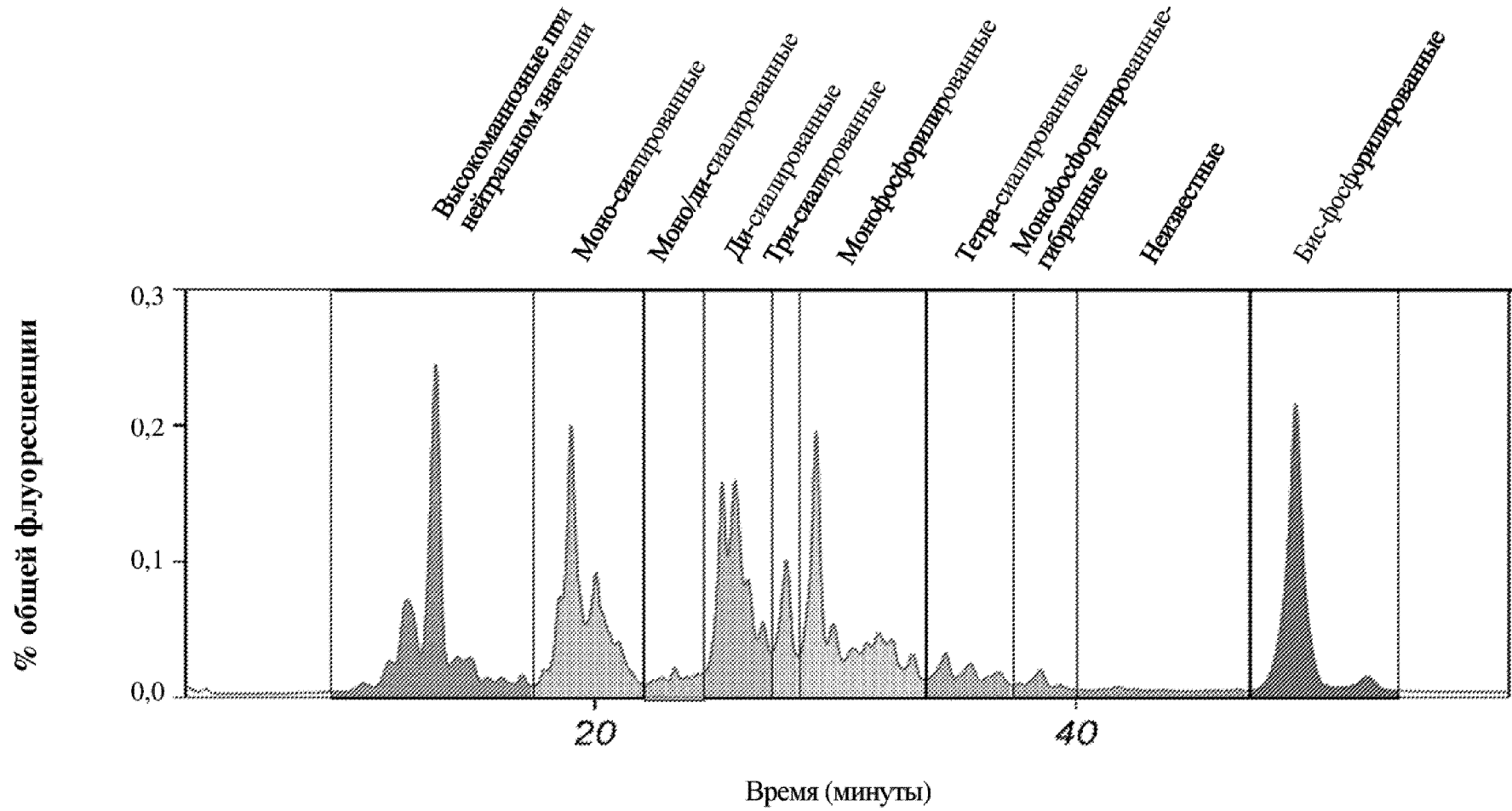
N826



Фиг. 32G



Фиг. 32Н



Фиг. 33А

Общее содержание сайт-специфических гликанов

	N84		N177		N334		N414		N596		N826		N869	
	<i>Cреднее</i>	<i>Stdev</i>	<i>Cреднее</i>	<i>Stdev</i>	<i>Cреднее</i>	<i>Stdev</i>	<i>Cреднее</i>	<i>Stdev</i>	<i>Cреднее</i>	<i>Stdev</i>	<i>Cреднее</i>	<i>Stdev</i>	<i>Cреднее</i>	<i>Stdev</i>
Фосфорилированные гликаны	83,2%	5,4%	48,9%	3,0%	ND		87,4%	3,1%	ND		2,1%	0,1%	ND	
Монофосфорилированные	25,6%	2,8%	48,0%	2,9%	ND		35,3%	1,6%	ND		2,1%	0,1%	ND	
Бисфосфорилированные	57,6%	2,6%	1,0%	0,1%	ND		52,0%	1,5%	ND		ND		ND	
Сиалированные гликаны	25,0%	3,3%	6,2%	0,6%	54,6%	4,9%	11,2%	1,2%	70,4%		85,4%	10,5%	86,7%	10,8%
Полностью сиалированные	13,7%	2,0%	6,2%	0,6%	19,3%	2,3%	8,6%	1,0%	26,0%		26,6%	4,0%	7,6%	1,4%
Высокоманнозные	64,9%	3,1%	88,9%	4,1%	14,4%	1,4%	84,7%	2,8%	0,1%	0,0%	2,1%	0,1%	ND	
Гибридные	18,7%	2,3%	10,9%	1,4%	ND		5,2%	0,6%	ND		ND		ND	
Комплексные	16,4%	2,4%	0,2%	0,0%	85,6%	9,0%	10,1%	1,2%	99,9%	11,8%	97,9%	13,9%	100,0%	14,3%
Количество гликанов	24		17		39		22		25		39		46	
МБР (моль/моль сайт)	1,36		0,50				1,38				0,02			
Моногликан (моль/моль на сайт)	0,25		0,48				0,35				0,02			
Бис-гликан (моль/моль на сайт)	0,56		0,01				0,52							
Сиаловая кислота (моль/моль сайт)	0,32	0,04	0,06	0,01	0,97	0,06	0,074	0,004	0,86	0,07	4,2	0,1	0,86	0,07
Занятость сайта	96,5%	0,2%	99,9%	0,0%	100,0%	0,0%	99,3%	0,7%	84,9%	1,1%	98,6%	0,1%	41,0%	0,8%

ND = не выявлено

Фиг. 33В