

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202390434** (13) **A2**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки
2023.06.30

(51) Int. Cl. *A61K 38/47* (2006.01)
A61K 31/445 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2016.12.29

(54) **КИСЛАЯ α -ГЛЮКОЗИДАЗА УСИЛЕННОГО ДЕЙСТВИЯ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ БОЛЕЗНИ ПОМПЕ**

(31) **62/272,890; 62/300,479; 62/315,412;
62/402,454; 62/428,867; 62/431,791;
15/394,135**

(62) **201891507; 2016.12.29**

(71) Заявитель:
**АМИКУС ТЕРАПЬЮТИКС, ИНК.
(US)**

(32) **2015.12.30; 2016.02.26; 2016.03.30;
2016.09.30; 2016.12.01; 2016.12.08;
2016.12.29**

(74) Представитель:
Рыбина Н.А. (RU)

(33) **US**

(57) Предусмотрен способ лечения болезни Помпе, включающий введение рекомбинантной кислотой α -глюкозидазы человека, имеющей оптимальное гликозилирование остатками маннозо-6-фосфата, в комбинации с количеством миглустата, эффективным для максимального увеличения поглощения тканями рекомбинантной кислотой α -глюкозидазы человека с минимизацией при этом ингибирования ферментативной активности рекомбинантной кислотой α -глюкозидазы человека.

202390434

A2

A2

202390434

КИСЛАЯ АЛЬФА-ГЛЮКОЗИДАЗА УСИЛЕННОГО ДЕЙСТВИЯ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ БОЛЕЗНИ ПОМПЕ

Область изобретения

В настоящем изобретении предусмотрен способ лечения болезни Помпе, включающий введение индивидууму комбинации кислой α -глюкозидазы и ее фармакологического шаперона. Более конкретно, в настоящем изобретении предусмотрен способ лечения болезни Помпе, включающий введение индивидууму комбинации рекомбинантной кислой α -глюкозидазы человека и миглустата.

10 Предпосылки изобретения

Болезнь Помпе, также известная как дефицит кислой мальтазы или болезнь накопления гликогена II типа, представляет собой одно из нескольких лизосомных нарушений накопления. Лизосомные нарушения накопления представляют собой группу аутосомно-рецессивных генетических заболеваний, характеризующихся накоплением клеточных гликофинголипидов, гликогена или мукополисахаридов во внутриклеточных компартментах, называемых лизосомами. Индивидуумы с этими заболеваниями являются носителями мутантных генов, кодирующих ферменты, которые являются дефектными в отношении катализа гидролиза одного или нескольких этих веществ, которые затем скапливаются в лизосомах. Другие примеры лизосомных нарушений включают болезнь Гоше, G_{M1} -ганглиозидоз, фукозидоз, формы мукополисахаридоза, болезнь Гурлер-Шейе, болезнь Ниманна-Пика типов А и В и болезнь Фабри. Болезнь Помпе также классифицируют как нервно-мышечное заболевание или метаболическую миопатию.

25 Болезнь Помпе оценивают как встречающуюся у приблизительно 1 из 40000 новорожденных и вызываемую мутацией в гене *GAA*, который кодирует фермент лизосомную α -глюкозидазу (ЕС:3.2.1.20), также общеизвестную как кислая α -

глюкозидаза. Кислая α -глюкозидаза вовлечена в метаболизм гликогена, разветвленного полисахарида, который представляет собой основную форму запасания глюкозы у животных, посредством катализа его гидролиза до глюкозы в лизосомах. Поскольку у индивидуумов с болезнью Помпе вырабатывается мутантная, дефектная кислая α -глюкозидаза, которая является неактивной или характеризуется пониженной активностью, расщепление гликогена происходит медленнее или не происходит вовсе, и при этом гликоген накапливается в лизосомах различных тканей, в частности, в поперечно-полосатых мышцах, приводя к широкому спектру клинических проявлений, в том числе к прогрессирующей мышечной слабости и дыхательной недостаточности. В частности, поражаются такие ткани, как сердечные и скелетные мышцы.

Болезнь Помпе может варьироваться в широких пределах в отношении степени дефицита фермента, тяжести и возраста возникновения, и при этом было идентифицировано более 500 различных мутаций в гене *GAA*, многие из которых вызывают симптомы заболевания различной тяжести. Заболевание классифицировали на основные типы: с ранним возникновением или младенческую форму и с поздним возникновением. Более раннее возникновение заболевания и более низкая ферментативная активность обычно ассоциированы с более тяжелым течением заболевания. Младенческая форма болезни Помпе является наиболее тяжелой, будучи обусловленной полным или практически полным дефицитом кислой α -глюкозидазы, и проявляется в виде симптомов, которые включают тяжелую недостаточность мышечного тонуса, слабость, увеличенные печень и сердце и кардиомиопатию. Язык может стать увеличенным и выступать вперед, а глотание может стать затрудненным. Наиболее сильно пораженные дети умирают от осложнений со стороны дыхательной системы и сердца, не достигнув двухлетнего возраста. Болезнь Помпе с поздним возникновением может проявиться в любом возрасте старше 12 месяцев и характеризуется отсутствием поражения сердца и лучшим краткосрочным прогнозом. Симптомы связаны с прогрессирующей дисфункцией скелетных мышц и включают общую мышечную слабость и атрофию дыхательных мышц в туловище, проксимальных частях нижних конечностей и

диафрагме. Некоторые взрослые пациенты не имеют основных симптомов или ограничений в движениях. Прогноз обычно зависит от степени поражения дыхательных мышц. У большинства субъектов с болезнью Помпе в конечном счете развивается физическое истощение, требующее применения инвалидной 5 коляски и вспомогательной вентиляции легких, при этом часто случается преждевременная смерть из-за дыхательной недостаточности.

Современные варианты лечения болезни Помпе включают заместительную ферментную терапию (ERT) с применением рекомбинантной кислой α -глюкозидазы человека (rhGAA). Традиционные продукты на основе rhGAA 10 известны под названиями алглюкозидаза-альфа, Myozyme® или Lumizyme®; Genzyme, Inc. ERT представляет собой длительное лечение, необходимое в течение всей жизни пациента, и включает введение заместительного фермента путем внутривенной инфузии. Затем заместительный фермент переносится в кровотоки и проникает в лизосомы внутри клеток, где его действие заключается в 15 расщеплении накопленного гликогена, что компенсирует дефицит активности эндогенного дефектного мутантного фермента и ослабляет таким образом симптомы заболевания. У субъектов с болезнью Помпе с возникновением в младенческом возрасте лечение с помощью алглюкозидазы-альфа, как было показано, значительно улучшает выживаемость в сравнении с историческим 20 контролем, а при болезни Помпе с поздним возникновением, как было показано, алглюкозидаза-альфа характеризуется статистически значимым, хоть и незначительным, эффектом в отношении результата теста с 6-минутной ходьбой (6MWT) и форсированной жизненной емкости легких (FVC) в сравнении с плацебо.

25 Однако состояние большинства субъектов остается стабильным либо продолжает ухудшаться, несмотря на то, что они подвергаются лечению с помощью алглюкозидазы-альфа. Причина выраженного субоптимального эффекта ERT с применением алглюкозидазы-альфа неясна, но это может быть частично обусловлено прогрессирующей природой первопричинной мышечной 30 патологии или слабым целенаправленным воздействием существующей ERT на

ткани. Например, введенный посредством инфузии фермент является нестабильным при нейтральном рН, в том числе при рН плазмы крови (приблизительно рН 7,4), и может быть необратимо инактивирован в кровотоке. Кроме того, введенная посредством инфузии алглюкозидаза-альфа демонстрирует недостаточное поглощение основными пораженными заболеваниями мышцами, возможно из-за ненадлежащего гликозилирования остатками маннозо-6-фосфата (М6Р). Такие остатки связываются с катион-независимыми рецепторами маннозо-6-фосфата (СМРР) на поверхности клетки, позволяя ферменту проникать в клетку и лизосомы в ней. Следовательно, для эффективного лечения могут быть необходимы высокие дозы фермента, чтобы надлежащее количество активного фермента могло достичь лизосом, что делает терапию дорогостоящей и времязатратной.

Кроме того, у пациентов с болезнью Помпе часто наблюдается развитие нейтрализующих антител к рекомбинантной кислой α -глюкозидазе человека из-за повторного воздействия лечения. Такие иммунные ответы могут существенно снижать переносимость лечения пациентами. Инструкция по медицинскому применению препарата алглюкозидазы-альфа в США включает черную рамку предупреждения с информацией о потенциальном риске реакции гиперчувствительности. У субъектов, получающих лечение с помощью алглюкозидазы-альфа, наблюдали опасные для жизни анафилактические реакции, в том числе анафилактический шок.

Для устранения этих недостатков разрабатывают ERT нового поколения. В одной стратегии рекомбинантные ферменты можно вводить совместно с фармакологическими шаперонами, которые могут индуцировать или стабилизировать надлежащую конформацию фермента для предотвращения или снижения разложения фермента и/или его разворачивания в неактивную форму *in vitro* (например, при хранении до введения) либо *in vivo*. Такая стратегия описана в публикациях международных патентных заявок № WO 2004/069190, WO 2006/125141, WO 2013/166249 и WO 2014/014938.

Были описаны результаты клинических испытаний совместного введения алглюкозидазы-альфа и миглустата пациентам с болезнью Помпе. В клинических испытаниях, проводимых с участием 13 субъектов с болезнью Помпе (3 с ранним возникновением (младенческой формой) и 10 с поздним возникновением) в 4 лечебных центрах в Италии, 20-40 мг/кг алглюкозидазы-альфа вводили в отдельности, а затем вводили совместно с 4 дозами по 80 мг миглустата. Результаты исследования демонстрируют увеличение воздействия активной формы кислой α -глюкозидазы в среднем в 6,8 раза (измеренного по фармакокинетическому параметру AUC (площадь под кривой зависимости концентрации от времени)) при совместном введении в сравнении с алглюкозидазой-альфа, вводимой в отдельности (Parenti, G., G. Andria, et al. (2015). «Lysosomal Storage Diseases: From Pathophysiology to Therapy.» Annu. Rev. Med. 66(1): 471-486). Кроме того, в исследовании, проводимом во Флоридском университете, оценивали фармакокинетические параметры (PK) миглустата в плазме крови при совместном введении с алглюкозидазой-альфа посредством внутривенной инфузии субъектам с болезнью Помпе (Doerfler, P. A., J. S. Kelley, et al. (2014). «Pharmacological chaperones prevent the precipitation of rhGAA by anti-GAA antibodies during enzyme replacement therapy.» Mol. Genet. Metab. 111(2): S38).

Однако, остается необходимость в дополнительных улучшениях заместительной ферментной терапии при лечении болезни Помпе. Например, описаны новые ферменты, представляющие собой рекомбинантную кислую α -глюкозидазу человека, которые могут характеризоваться одним или несколькими преимуществами перед ферментами, применяемыми в настоящее время, включающими без ограничения улучшенное поглощение тканями, улучшенную ферментативную активность, улучшенную стабильность или пониженную иммуногенность.

Краткое описание

В настоящем изобретении предусмотрен способ лечения болезни Помпе у пациента, нуждающегося в этом, при этом способ включает введение миглустата пациенту в комбинации с рекомбинантной кислой α -глюкозидазой человека (rhGAA), где рекомбинантная кислая α -глюкозидаза человека экспрессируется в клетках яичника китайского хомячка (CHO) и имеет увеличенное содержание N-гликановых звеньев, несущих один или два остатка маннозо-6-фосфата, в сравнении с содержанием N-гликановых звеньев, несущих один или два остатка маннозо-6-фосфата, в алглюкозидазе-альфа. По меньшей мере в одном варианте осуществления рекомбинантную кислую α -глюкозидазу человека вводят внутривенно в дозе, составляющей приблизительно 20 мг/кг, а миглустат вводят перорально в дозе, составляющей приблизительно 260 мг.

В другом аспекте в настоящем изобретении предусмотрена комбинация миглустата и рекомбинантной кислой α -глюкозидазы человека, определенной в данном документе, для лечения болезни Помпе у пациента, нуждающегося в этом.

В другом аспекте в настоящем изобретении предусмотрено применение комбинации миглустата и рекомбинантной кислой α -глюкозидазы человека, определенной в данном документе, в получении средства для лечения болезни Помпе у пациента, нуждающегося в этом.

В другом аспекте настоящего изобретения предусмотрен набор для комбинированной терапии болезни Помпе у пациента, нуждающегося в этом, при этом набор содержит фармацевтически приемлемую лекарственную форму, содержащую миглустат, фармацевтически приемлемую лекарственную форму, содержащую рекомбинантную кислую α -глюкозидазу человека, определенную в данном документе, и инструкции по введению фармацевтически приемлемой лекарственной формы, содержащей миглустат, и фармацевтически приемлемой лекарственной формы, содержащей рекомбинантную кислую α -глюкозидазу, пациенту, нуждающемуся в этом.

Краткое описание графических материалов

Дополнительные признаки настоящего изобретения станут очевидны из следующего письменного описания и прилагаемых фигур, на которых показано следующее.

- 5 Фигура 1 представляет собой график, демонстрирующий процентную долю развернутого белка АТВ200 при различных значениях рН, а также в присутствии и в отсутствие миглустата в зависимости от температуры.

- На фигурах 2А и 2В соответственно показаны результаты аффинной хроматографии с CIMPR для Lumizyme® и Myozyme®. Пунктирные линии
10 относятся к градиенту элюирования с помощью М6Р. При элюировании с помощью М6Р вытесняются молекулы GAA, связанные с CIMPR посредством М6Р-содержащего гликана. Как показано на фигуре 2А, 78% активной формы GAA в Lumizyme® элюировалось до добавления М6Р. На фигуре 2В показано, что 73% активной формы GAA в Myozyme® элюировалось до добавления М6Р.
15 Лишь 22% или 27% rhGAA соответственно в Lumizyme® или в Myozyme® элюировалось с помощью М6Р. На этих фигурах показано, что в большинстве молекул rhGAA в этих двух традиционных продуктах на основе rhGAA отсутствуют гликаны, имеющие М6Р, которые необходимы для поглощения клетками и нацеливания на лизосомы.

- 20 На фигуре 3 показана ДНК-конструкция для трансформации клеток CHO с помощью ДНК, кодирующей rhGAA. Клетки CHO трансформировали с помощью ДНК-конструкции, кодирующей rhGAA.

- На фигурах 4А и 4В соответственно показаны результаты аффинной хроматографии с CIMPR для rhGAA Myozyme® и АТВ200. Как очевидно из
25 фигуры 4В, приблизительно 70% молекул rhGAA в rhGAA АТВ200 содержат М6Р.

На фигурах 5А и 5В показаны результаты аффинной хроматографии с CIMPR для rhGAA АТВ200 с захватом на анионообменной колонке (АЕХ) и без него.

На фигуре 6 показаны профили элюирования с помощью Polywah для rhGAA Lumizyme® и ATB200.

На фигуре 7 показана сводная информация о структурах N-гликанов Lumizyme® в сравнении с тремя различными препаратами ATB200 на основе rhGAA, обозначенными как BP-rhGAA, ATB200-1 и ATB200-2.

На фигурах 8А-8Н показаны результаты анализа сайт-специфического N-гликозилирования rhGAA ATB200.

На фигуре 9А показано сравнение аффинности связывания с CIMPR для rhGAA ATB200 (левая кривая) с аффинностью связывания для Lumizyme® (правая кривая).

На фигуре 9В показано сравнение содержания Bis-M6P в rhGAA Lumizyme® и ATB200.

На фигуре 10А показано сравнение активности rhGAA ATB200 (левая кривая) с активностью rhGAA Lumizyme® (правая кривая) в нормальных фибробластах при различных концентрациях GAA.

На фигуре 10В показано сравнение активности rhGAA ATB200 (левая кривая) с активностью rhGAA Lumizyme® (правая кривая) в фибробластах, полученных от субъекта с болезнью Помпе, при различных концентрациях GAA.

На фигуре 10С показано сравнение ($K_{\text{поглощение}}$) фибробластов, полученных от здоровых субъектов и субъектов с болезнью Помпе.

Фигура 11 представляет собой график, демонстрирующий точность подбора популяционной фармакокинетической (PK) модели для ATB200.

Фигура 12 представляет собой график, демонстрирующий нормализованные по дозе профили зависимости концентрации миглустата и дувоглустата в плазме крови от времени.

Фигура 13А представляет собой график, демонстрирующий точность подбора популяционной РК-модели для дувоглустата в плазме крови.

Фигура 13В представляет собой график, демонстрирующий точность подбора популяционной РК-модели для дувоглустата в мышечной ткани.

5 Фигура 14 представляет собой график, демонстрирующий точность подбора популяционной РК-модели для миглустата.

Фигура 15 представляет собой график, демонстрирующий предсказанный профиль зависимости концентрации от времени, полученный в результате инфузии людям однократной внутривенной дозы (IV) 20 мг/кг АТВ200 в течение
10 4-часового периода.

Фигура 16А представляет собой график, демонстрирующий количество гликогена относительно с дозой рекомбинантной кислой α -глюкозидазы человека в сердечной мышце мыши после контакта с инертной средой (отрицательный контроль), с 20 мг/кг алглюкозидазы-альфа (Lumizyme®) или с
15 5, 10 или 20 мг/кг АТВ200.

Фигура 16В представляет собой график, демонстрирующий количество гликогена относительно с дозой рекомбинантной кислой α -глюкозидазы человека в четырехглавой мышце мыши после контакта с инертной средой (отрицательный контроль), с 20 мг/кг алглюкозидазы-альфа (Lumizyme®) или с
20 5, 10 или 20 мг/кг АТВ200.

Фигура 16С представляет собой график, демонстрирующий количество гликогена относительно с дозой рекомбинантной кислой α -глюкозидазы человека в трехглавой мышце мыши после контакта с инертной средой (отрицательный контроль), с 20 мг/кг алглюкозидазы-альфа (Lumizyme®), или с
25 5, 10 или 20 мг/кг АТВ200.

Фигура 17 представляет собой график, на котором отображено соотношение уровней гликогена у мышей, обработанных с помощью различных доз

миглустата в присутствии АТВ200, и уровней гликогена у мышей, обработанных с помощью АТВ200 в отдельности, в зависимости от соотношения значения АUC миглустата и значения АUC АТВ200.

5 Фигура 18 представляет собой график, демонстрирующий предсказанный профиль зависимости концентрации миглустата в плазме крови от времени после повторного введения доз 466 мг, 270 мг и 233 мг миглустата.

Фигура 19 представляет собой график, демонстрирующий предсказанный профиль зависимости концентрации миглустата в лизосомах тканей от времени после повторного введения доз 466 мг, 270 мг и 233 мг миглустата.

10 Фигура 20 представляет собой серию микрофотографий сердечных мышц, диафрагм и камбаловидных мышц мышей дикого типа и мышей с нокаутом *Gaa*, обработанных с помощью инертной среды, алглюкозидазы-альфа и АТВ200 в присутствии и в отсутствие миглустата, на которых показаны уровни мембранного белка, ассоциированного с лизосомами (LAMP1).

15 Фигура 21 представляет собой серию микрофотографий сердечных и камбаловидных мышц мышей дикого типа и мышей с нокаутом *Gaa*, обработанных с помощью инертной среды, алглюкозидазы-альфа и АТВ200 в присутствии и в отсутствие миглустата, на которых показаны уровни гликогена путем окрашивания реактивом Шиффа и йодной кислотой (PAS).

20 Фигура 22 представляет собой серию микрофотографий (1000x) четырехглавых мышц мышей дикого типа и мышей с нокаутом *Gaa*, обработанных с помощью инертной среды, алглюкозидазы-альфа и АТВ200 в присутствии и в отсутствие миглустата, окрашенных с помощью метиленового синего для того, чтобы показать вакуоли (указаны стрелками).

25 Фигура 23 представляет собой серию микрофотографий (400x) четырехглавых мышц мышей дикого типа и мышей с нокаутом *Gaa*, обработанных с помощью инертной среды, алглюкозидазы-альфа и АТВ200 в присутствии и в отсутствие миглустата, на которых показаны уровни маркеров аутофагии легкой цепи 3

ассоциированного с микротрубочками белка 1A/1B, конъюгированной с фосфатидилэтаноламином (LC3A II), и p62, инсулинзависимого переносчика глюкозы GLUT4 и инсулиннезависимого переносчика глюкозы GLUT1.

5 Фигуры 24A-24D представляют собой графики, демонстрирующие профили зависимости концентрации активной формы GAA от времени в плазме крови у субъектов-людей после введения дозы 5, 10 или 20 мг/кг АТВ200 или 20 мг/кг АТВ200 и 130 или 260 мг миглустата.

10 Фигуры 25A-25D представляют собой графики, демонстрирующие профили зависимости концентрации общего белка GAA в плазме крови от времени у субъектов-людей после введения дозы 5, 10 или 20 мг/кг АТВ200, 20 мг/кг АТВ200 и 130 мг миглустата или 20 мг/кг АТВ200 и 260 мг миглустата.

Фигура 26 представляет собой график, демонстрирующий профили зависимости концентрации миглустата в плазме крови от времени у субъектов-людей после введения дозы 130 мг или 260 мг миглустата.

15 Фигура 27 представляет собой серию микрофотографий фибробластов дикого типа и фибробластов при болезни Помпе, подвергнутых иммунофлуоресцентному окрашиванию для выявления уровней GAA и LAMP1.

20 Фигура 28 представляет собой серию микрофотографий мышечных волокон мышей дикого типа и мышей с нокаутом *Gaa*, на которых показаны уровни дистрофина, α - и β -дистрогликанов и дисферлина.

25 Фигуры 29A и 29B представляют собой серии микрофотографий (200x) мышечных волокон прямой мышцы бедра (RF) и латеральной широкой мышцы бедра/медиальной широкой мышцы бедра (VL/VM) мышей дикого типа и мышей с нокаутом *Gaa*, обработанных с помощью инертной среды, алглюкозидазы-альфа и АТВ200 в присутствии и в отсутствие миглустата, на которых показаны ИHC-сигналы от LAMP1.

5 Фигуры 30А и 30В представляют собой серии микрофотографий (200х) мышечных волокон RF и VL/VM мышей дикого типа и мышей с нокаутом *Gaa*, обработанных с помощью инертной среды, алглюкозидазы-альфа и АТВ200 в присутствии и в отсутствие миглустата, на которых показаны ИНС-сигналы от LC3-II.

10 Фигуры 31А и 31В представляют собой серии микрофотографий (200х) мышечных волокон RF и VL/VM мышей дикого типа и мышей с нокаутом *Gaa*, обработанных с помощью инертной среды, алглюкозидазы-альфа и АТВ200 в присутствии и в отсутствие миглустата, на которых показаны ИНС-сигналы от дисферлина.

15 Фигуры 32А-32D представляют собой графики, демонстрирующие уровни гликогена в клетках четырехглавой, трехглавой, икроножной и сердечной мышц мышей дикого типа и мышей с нокаутом *Gaa*, обработанных с помощью инертной среды, алглюкозидазы-альфа и АТВ200 в присутствии и в отсутствие миглустата.

Фигуры 33А и 33В представляют собой графики, демонстрирующие данные о виле на проволоке и мышечной силе захвата у мышей дикого типа и мышей с нокаутом *Gaa*, обработанных с помощью инертной среды, алглюкозидазы-альфа и АТВ200 в присутствии миглустата.

20 Фигуры 34А-34G представляют собой графики, демонстрирующие уровни гликогена в клетках четырехглавой, трехглавой и сердечной мышц мышей дикого типа и мышей с нокаутом *Gaa*, обработанных с помощью инертной среды, алглюкозидазы-альфа и АТВ200 в присутствии и в отсутствие миглустата.

25 Фигура 35 представляет собой серию микрофотографий мышечных волокон VL/VM мышей дикого типа и мышей с нокаутом *Gaa*, обработанных с помощью инертной среды, алглюкозидазы-альфа и АТВ200 в присутствии и в отсутствие миглустата, на которых показаны ИНС-сигналы от LAMP1, LC3 и дисферлина.

Фигура 36 представляет собой график, демонстрирующий профили зависимости концентрации активной формы GAA от времени в плазме крови у мышей с нокаутом *Gaa* после введения двух партий АТВ200, имеющих разное содержание сиаловой кислоты.

- 5 Фигуры 37А-37D представляют собой графики, демонстрирующие уровни гликогена в клетках четырехглавой, трехглавой, икроножной и сердечной мышц мышей дикого типа и мышей с нокаутом *Gaa*, обработанных с помощью инертной среды, алглюкозидазы-альфа и АТВ200.

- 10 Фигура 38 представляет собой график, демонстрирующий уровни аланинаминотрансферазы (ALT) у пациентов-людей после введения возрастающих доз АТВ200 (5, 10 и 20 мг/кг) с последующим совместным введением АТВ200 (20 мг/кг) и миглустата (130 и 260 мг).

- 15 Фигура 39 представляет собой график, демонстрирующий уровни аспаратаминотрансферазы (AST) у пациентов-людей после введения возрастающих доз АТВ200 (5, 10 и 20 мг/кг) с последующим совместным введением АТВ200 (20 мг/кг) и миглустата (130 и 260 мг).

- 20 Фигура 40 представляет собой график, демонстрирующий уровни креатинфосфокиназы (СРК) у пациентов-людей после введения возрастающих доз АТВ200 (5, 10 и 20 мг/кг) с последующим совместным введением АТВ200 (20 мг/кг) и миглустата (130 и 260 мг).

Фигура 41 представляет собой график, демонстрирующий средние уровни ALT, AST и СРК у пациентов-людей после введения возрастающих доз АТВ200 (5, 10 и 20 мг/кг) с последующим совместным введением АТВ200 (20 мг/кг) и миглустата (130 и 260 мг).

- 25 Фигура 42 представляет собой серию микрофотографий (100х и 200х) мышечных волокон латеральной широкой мышцы бедра (VL) мышей дикого типа и мышей с нокаутом *Gaa*, обработанных с помощью инертной среды,

алглюкозидазы-альфа и АТВ200 в присутствии и в отсутствие миглустата, на которых показаны сигналы от дистрофина.

Определения

5 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 настоящем описании для предоставления дополнительных указаний практикующему специалисту.

10 В настоящем описании, за исключением случаев, когда контекст требует иного в силу языковых особенностей или необходимого подразумеваемого значения, слово «содержать» или такие его варианты, как «содержит» или «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
15 изобретения.

Используемый в данном документе термин «болезнь Помпе», также упоминаемый как дефицит кислой мальтазы, болезнь накопления гликогена II типа (GSDII) и гликогеноз II типа, подразумевается как обозначающий генетическое лизосомное нарушение накопления, характеризующееся
20 мутациями в гене *GAA*, который кодирует фермент кислую α -глюкозидазу человека. Термин включает без ограничений формы заболевания с ранним и поздним возникновением, в том числе без ограничения формы болезни Помпе с возникновением в младенческом, юношеском и взрослом возрасте.

Используемый в данном документе термин «кислая α -глюкозидаза»
25 подразумевается как обозначающий лизосомный фермент, который гидролизует α -1,4-связи между D-глюкозными звеньями гликогена, мальтозы и изомальтозы. Альтернативные названия включают без ограничения лизосомную α -глюкозидазу (ЕС:3.2.1.20); глюкоамилазу; 1,4- α -D-глюканглюкогидролазу;

амилоглюкозидазу; гамма-амилазу и экзо-1,4- α -глюкозидазу. 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). К настоящему времени в гене *GAA* человека было идентифицировано более 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. Используемая в данном документе аббревиатура «GAA» подразумевается как обозначающая фермент кислую α -глюкозидазу, тогда как выделенная курсивом аббревиатура «*GAA*» подразумевается как обозначающая ген человека, кодирующий фермент кислую α -глюкозидазу человека. Выделенная курсивом аббревиатура «*Gaa*» подразумевается как обозначающая гены, отличные от человеческих, кодирующие ферменты кислые α -глюкозидазы, отличные от человеческих, в том числе без ограничения гены крыс или мышей, а аббревиатура «*Gaa*» подразумевается как обозначающая ферменты кислые α -глюкозидазы, отличные от человеческих. Таким образом, аббревиатура «rhGAA» подразумевается как обозначающая фермент рекомбинантную кислую α -глюкозидазу человека.

Используемый в данном документе термин «алглюкозидаза-альфа» подразумевается как обозначающий рекомбинантную кислую α -глюкозидазу человека, идентифицированную как [199-аргинин,223-гистидин]препро- α -глюкозидаза (человека); регистрационный номер в Chemical Abstracts 420794-05-0. Алглюкозидаза-альфа одобрена Genzyme для реализации в США с 1 октября 2014 года в виде продуктов Lumizyme® и Myozyme®.

Используемый в данном документе термин «ATB200» подразумевается как обозначающий рекомбинантную кислую α -глюкозидазу человека, описанную в

патентной заявке PCT/US2015/053252, одновременно находящейся на рассмотрении патентного ведомства, раскрытие которой включено в данный документ посредством ссылки.

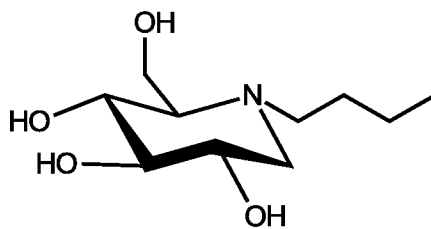
Используемый в данном документе термин «гликан» подразумевается как обозначаящий полисахаридную цепь, ковалентно связанную с аминокислотным остатком в белке или полипептиде. Используемый в данном документе термин «N-гликан» или «N-связанный гликан» подразумевается как обозначаящий полисахаридную цепь, 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 несколько моносахаридных звеньев, и моносахаридные звенья могут быть ковалентно связаны с образованием прямой цепи или разветвленной цепи. По меньшей мере в одном варианте осуществления N-гликановые звенья, присоединенные к АТВ200, могут содержать одно или несколько моносахаридных звеньев, каждое из которых независимо выбрано из N-ацетилглюкозамина, маннозы, галактозы 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 можно определить с помощью жидкостной хроматографии с tandemной масс-спектрометрией (LC-MS/MS), используя такие приборы, как масс-спектрометр Orbitrap Velos ProTM от Thermo Scientific, масс-спектрометр Orbitrap Fusion Lumos TribidTM от Thermo Scientific или масс-спектрометр Xevo® G2-XS QToF от Waters.

Используемый в данном документе термин «высокоманнозный N-гликан» подразумевается как обозначаящий N-гликан, имеющий от одного до шести или больше маннозных звеньев. По меньшей мере в одном варианте осуществления высокоманнозное N-гликановое звено может содержать бис(N-ацетилглюкозаминовую) 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. имеющее фосфатную группу, связанную с гидроксильной группой в положении 6. По меньшей мере в одном варианте осуществления одно или несколько маннозных звеньев одного или нескольких N-гликановых звеньев фосфорилированы в положении 6 с образованием маннозо-6-фосфатных звеньев. По меньшей мере в одном варианте осуществления термины «М6Р» или «маннозо-6-фосфат» обозначают как сложный фосфодиэфир маннозы, имеющий N-ацетилглюкозамин (GlcNAc) в качестве «кэпа» в фосфатной группе, так также и маннозное звено, имеющее доступную фосфатную группу, лишенную кэпа GlcNAc. По меньшей мере в одном варианте осуществления N-гликаны белка могут иметь несколько групп М6Р, при этом по меньшей мере одна группа М6Р имеет 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 одно или несколько галактозных звеньев и/или звеньев сиаловой кислоты. По меньшей мере в одном варианте осуществления комплексный N-гликан может представлять собой высокоманнозный N-гликан, в котором одно или несколько маннозных звеньев дополнительно связаны с одним или несколькими моносахаридными звеньями, каждое из которых независимо выбрано из N-ацетилглюкозамина, галактозы и сиаловой кислоты.

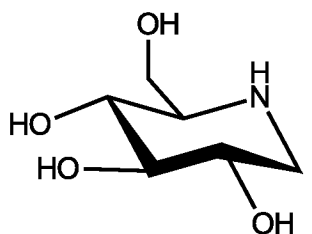
Как используется в данном документе, соединение миглустат, также известное как N-бутил-1-дезоксинаджиримицин, или NB-DNJ, или (2R,3R,4R,5S)-1-бутил-2-(гидроксиметил)пиперидин-3,4,5-триол, представляет собой соединение, имеющее следующую химическую формулу:



Один состав на основе миглустата реализуется коммерчески под торговым названием Zavesca® в качестве средства монотерапии при болезни Гоше 1 типа.

5 Как обсуждается ниже, фармацевтически приемлемые соли миглустата также можно применять в настоящем изобретении. В случае применения соли миглустата дозировку соли корректируют так, чтобы доза миглустата, получаемая пациентом, была эквивалентной количеству, которое было бы получено при применении миглустата в форме свободного основания.

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



15 Используемый в данном документе термин «фармакологический шаперон» или иногда просто термин «шаперон» подразумевается как обозначающий молекулу, которая специфично связывается с кислой α -глюкозидазой и характеризуется одним или несколькими следующими эффектами:

- улучшает образование стабильной молекулярной конформации белка;
- улучшает надлежащий транспорт белка из эндоплазматической сети в другое
- 20 местоположение в клетке, предпочтительно нативное местоположение в клетке,

для того, чтобы предотвратить разложение белка, ассоциированное с эндоплазматической сетью;

- предотвращает агрегацию конформационно нестабильных или неправильно свернутых белков;
- 5 • 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

10 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. По меньшей мере в одном варианте осуществления

15 фармакологический шаперон может представлять собой ингибитор или антагонист кислой α -глюкозидазы. Используемый в данном документе термин «антагонист» подразумевается как обозначающий любую молекулу, которая связывается с кислой α -глюкозидазой и частично либо полностью блокирует, ингибирует, снижает или нейтрализует активность кислой α -глюкозидазы. По

20 меньшей мере в 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

25 как обозначающий участок белка, который ассоциирован с конкретной биологической активностью белка и является необходимым для нее. По меньшей мере в одном варианте осуществления активный сайт может представлять собой сайт, в котором происходит связывание с субстратом или другими партнерами

по связыванию и который предоставляет аминокислотные остатки, непосредственно участвующие в образовании и разрушении химических связей. В настоящем изобретении активные сайты могут включать в себя каталитические сайты ферментов, антигенсвязывающие сайты антител, 5 лигандсвязывающие домены рецепторов, связывающие домены регуляторов или рецепторсвязывающие домены секретируемых белков. Активные сайты также могут охватывать трансактивирующие домены, домены, участвующие в белок-белковых взаимодействиях, или ДНК-связывающие домены факторов транскрипции и регуляторов.

- 10 Используемый в данном документе термин «AUC» подразумевается как обозначающий математический расчет для оценивания 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 15 переменная концентрации лекарственного средства отложена по оси y , а время отложено по оси x . Площадь между кривой изменения концентрации лекарственного средства и осью x для заданного временного интервала называется AUC («площадь под кривой»). AUC применяют в качестве ориентира для составления схем введения доз и для сравнения биодоступности различных 20 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 » 25 подразумевается как обозначающий теоретический объем, который будет необходимым 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 перфузируемых кровью. «Периферический объем распределения» или « V_2 » подразумевается как
5 обозначающий объем распределения в периферических тканях.

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
10 обозначающий объем периферической ткани, очищаемый от вводимого лекарственного средства за единицу времени.

Как используется в данном документе, «терапевтически эффективная доза» и «эффективное количество» подразумеваются как обозначающие количество кислой α -глюкозидазы и/или миглустата и/или их комбинации, которое является
15 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.
20 Таким образом, по меньшей мере в одном варианте осуществления терапевтический ответ может представлять собой уменьшение интенсивности или ингибирование одного или нескольких симптомов или маркеров болезни Помпе, таких как известные из уровня техники. Симптомы или маркеры болезни Помпе включают без ограничения пониженную активность кислой α -
25 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 кормление; дыхательную недостаточность; гепатомегалию (умеренную); вялость мышц лица; арефлексию;
30 непереносимость физической нагрузки; одышку при физической нагрузке;

ортопноз; апноэ во время сна; утренние головные боли; сонливость; лордоз и/или сколиоз; пониженные глубокие сухожильные рефлексы; боль в пояснице и несоответствие ключевым этапам двигательного развития. Следует отметить, что концентрация миглустата, которая оказывает ингибирующий эффект на 5 кислую α -глюкозидазу, может составлять «эффективное количество» для целей настоящего изобретения ввиду разбавления (и последующего сдвига связывании из-за изменения равновесного состояния), биодоступности и метаболизма миглустата при введении *in vivo*.

Используемый в данном документе термин «заместительная ферментная 10 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 15 фермента индивидууму, по другим причинам требующему введения очищенного фермента или получающему пользу от него. По меньшей мере в 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 20 растений.

Используемый в данном документе термин «комбинированная терапия» 15 подразумевается как обозначающий любой вид терапии, при котором два или больше отдельных терапевтических средств вводят одновременно или последовательно. По меньшей мере в одном варианте осуществления результаты комбинированной терапии являются улучшенными в сравнении с эффектом 25 каждого вида терапии, осуществляемого в отдельности. Усиление может включать любое улучшение эффекта различных видов терапии, которое может приводить к благоприятному результату в сравнении с результатами, достигаемыми с помощью данных видов терапии, осуществляемых в 30 отдельности. Усиленные эффект или результаты могут включать синергическое

усиление, где усиленный эффект превышает аддитивные эффекты каждого из видов терапии, осуществляемых в отдельности; аддитивное усиление, где усиленный эффект по существу равен аддитивному эффекту каждого из видов терапии, осуществляемых в отдельности; или эффект, меньший синергического, где усиленный эффект является более слабым, чем аддитивный эффект каждого из видов терапии, осуществляемых в отдельности, но все же лучшим, чем эффект каждого из видов терапии, осуществляемых в отдельности. Усиленный эффект можно измерить с помощью любых способов, известных из уровня техники, с помощью которых можно измерить эффективность или результат лечения.

Используемый в данном документе термин «фармацевтически приемлемый» подразумевает 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 у животных и, более конкретно, у людей.

Используемый в данном документе термин «носитель» подразумевает как обозначающий разбавитель, вспомогательное средство, наполнитель или инертную среду, с которыми вводят соединение. Подходящие фармацевтические носители известны из уровня техники и по меньшей мере в одном варианте осуществления описаны в «Remington's Pharmaceutical Sciences» E. W. Martin, 18-е издание или другие издания.

Используемые в данном документе термины «субъект» или «пациент» подразумеваются как обозначающие человека или животное, отличное от человека. По меньшей мере в одном варианте осуществления субъектом

является млекопитающее. По меньшей мере в одном варианте осуществления субъектом является человек.

Используемый в данном документе термин «антитело к лекарственному средству» подразумевается как обозначающий антитело, специфично связывающееся с лекарственным средством, вводимым субъекту, и образуемое субъектом в качестве по меньшей мере части гуморального иммунного ответа на введение субъекту лекарственного средства. По меньшей мере в одном варианте осуществления лекарственное средство представляет собой терапевтический белковый лекарственный препарат. Антитело к лекарственному средству, присутствующее у субъекта, может вызывать иммунные ответы в диапазоне от легких до тяжелых, в том числе без ограничения опасные для жизни иммунные ответы, которые включают без ограничения анафилактическую реакцию, синдром высвобождения цитокинов и перекрестную нейтрализацию эндогенных белков, опосредующих жизненно важные функции. Кроме того или в качестве альтернативы, антитело к лекарственному средству, присутствующее у субъекта, может уменьшать эффективность лекарственного средства.

Используемый в данном документе термин «нейтрализующее антитело» подразумевается как обозначающий антитело к лекарственному средству, действие которого заключается в нейтрализации функции лекарственного средства. По меньшей мере в одном варианте осуществления терапевтический белковый лекарственный препарат представляет собой аналог эндогенного белка, экспрессия которого у субъекта является пониженной или отсутствует. По меньшей мере в одном варианте осуществления действие нейтрализующих антител может заключаться в нейтрализации функции эндогенного белка.

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 цифр, предусмотренных для измерения, как понимается в данной области техники, и

включает без ограничения изменение на ± 1 наиболее точной значащей цифры, представленной для измерения. Типичные приводимые в качестве примера степени погрешности находятся в пределах 20 процентов (%), предпочтительно в пределах 10% и более предпочтительно в пределах 5% от указанного значения или диапазона значений. В качестве альтернативы и, в частности, в биологических системах термины «примерно» и «приблизительно» могут означать значения, которые находятся в пределах порядка величины, предпочтительно в пределах 5-кратного и более предпочтительно в пределах 2-кратного изменения указанного значения. Численные величины, приведенные в данном документе, являются приблизительными, если не указано иное, что означает, что термин «приблизительно» или «примерно» может являться предположительным, если не указано точно.

Термин «одновременно», используемый в данном документе, подразумевается как обозначающий «в то же время, что» 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 20 минут или меньше, приблизительно 20 минут, приблизительно 15 минут, приблизительно 10 минут, приблизительно 5 минут, приблизительно 2 минуты, приблизительно 1 минуту или меньше чем 1 минуту.

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 соотношению риска и пользы, обычно является водорастворимой 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. Birge et al., J. Pharm. Sci., 1977, 66, pp. 1-19, включенном в данный документ 5 посредством ссылки.

Термин «фармацевтически приемлемая соль присоединения кислоты», используемый в данном документе, подразумевается как обозначающий такие соли, которые сохраняют биологическую эффективность и свойства свободных оснований и которые не являются нежелательными с биологической точки зрения или в других отношениях, образованных с неорганическими кислотами, в том числе без ограничения с хлористоводородной кислотой, бромистоводородной кислотой, серной кислотой, сульфаминовой кислотой, азотной кислотой, фосфорной кислотой и т. п., и органическими кислотами, в том числе без ограничения уксусной кислотой, трифторуксусной кислотой, 15 адипиновой кислотой, аскорбиновой кислотой, аспарагиновой кислотой, бензолсульфоновой кислотой, бензойной кислотой, масляной кислотой, камфорной кислотой, камфорсульфоновой кислотой, коричной кислотой, лимонной кислотой, диглюконовой кислотой, этансульфоновой кислотой, глутаминовой кислотой, гликолевой кислотой, глицерофосфорной кислотой, 20 гемисульфатной кислотой, гексановой кислотой, муравьиной кислотой, fumarовой кислотой, 2-гидроксиэтансульфоновой кислотой (изетионовой кислотой), молочной кислотой, гидроксималеиновой кислотой, яблочной кислотой, малоновой кислотой, миндальной кислотой, мезитиленсульфоновой кислотой, метансульфоновой кислотой, нафталинсульфоновой кислотой, 25 никотиновой кислотой, 2-нафталинсульфоновой кислотой, щавелевой кислотой, памовой кислотой, пектиновой кислотой, фенилуксусной кислотой, 3-фенилпропионовой кислотой, пивалевой кислотой, пропионовой кислотой, пировиноградной кислотой, салициловой кислотой, стеариновой кислотой, янтарной кислотой, сульфаниловой кислотой, винной кислотой, п- 30 толуолсульфоновой кислотой, ундекановой кислотой и т. п.

Термин «фармацевтически приемлемая соль присоединения основания», используемый в данном документе, подразумевается как обозначающий такие соли, которые сохраняют биологическую эффективность и свойства свободных кислот и которые не являются нежелательными с биологической точки зрения или в других отношениях, образованных с неорганическими основаниями, в том числе без ограничения с аммиаком или гидроксидом, карбонатом или бикарбонатом аммония или катионом 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 в себя 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, метилглюкозамин, 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.

Подробное описание

В настоящем изобретении предусмотрен способ лечения болезни Помпе у пациента, нуждающегося в этом, при этом способ включает введение пациенту миглустата или его фармацевтически приемлемой соли в комбинации с рекомбинантной кислой α -глюкозидазой человека, где рекомбинантная кислая α -глюкозидаза человека экспрессируется в клетках яичника китайского хомячка (СНО) и имеет увеличенное содержание N-гликановых звеньев, несущих один или два остатка маннозо-6-фосфата, в сравнении с содержанием N-гликановых

звеньев, несущих один или два остатка маннозо-6-фосфата, в алглюкозидазе-альфа. По меньшей мере в одном варианте осуществления рекомбинантная кислая α -глюкозидаза человека имеет низкие уровни содержания комплексных гликанов с концевой галактозой. В другом аспекте в настоящем изобретении 5 предусмотрено применение миглустата и рекомбинантной кислой α -глюкозидазы человека в комбинации для лечения болезни Помпе у пациента, нуждающегося в этом.

По меньшей мере в одном варианте осуществления миглустат вводят перорально. По меньшей мере в одном варианте осуществления миглустат 10 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. По меньшей мере в одном 15 варианте осуществления миглустат вводят в пероральной дозе, составляющей от приблизительно 233 мг до приблизительно 400 мг. По меньшей мере в 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 20 260 мг, приблизительно 265 мг или приблизительно 270 мг. По меньшей мере в одном варианте осуществления миглустат вводят в пероральной дозе, 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 25 любом меньшем диапазоне в его пределах, может являться подходящей для взрослого пациента со средним весом тела, составляющим приблизительно 70 кг. 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 30 меньшую дозу. Следовательно, по меньшей мере в 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 5 приблизительно 200 мг. По меньшей мере в 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.

По меньшей мере в одном варианте осуществления миглустат вводят в виде 10 фармацевтически приемлемой лекарственной формы, подходящей для перорального введения, которая включает без ограничения таблетки, капсулы, вагинальные суппозитории, настойки, растворы или суспензии, гели, сиропы, жидкости для полоскания рта или сухой порошок для разведения водой или другой подходящей инертной средой перед применением, необязательно с 15 ароматизирующими и красящими средствами для путей применения с немедленным, отсроченным, модифицированным, замедленным, прерывистым или регулируемым высвобождением. Также можно применять твердые композиции, такие как таблетки, капсулы, леденцы, пастилки, пилюли, болусы, порошки, пасты, гранулы, суппозитории, драже или препараты в виде 20 предварительно приготовленных смесей. По меньшей мере в одном варианте осуществления миглустат вводят в виде таблетки. По меньшей мере в одном варианте осуществления миглустат вводят в виде капсулы. По меньшей мере в одном варианте осуществления лекарственная форма содержит от приблизительно 50 мг до приблизительно 300 мг миглустата. По меньшей мере в 25 одном варианте осуществления лекарственная форма содержит приблизительно 65 мг миглустата. По меньшей мере в одном варианте осуществления лекарственная форма содержит приблизительно 130 мг миглустата. По меньшей мере в одном варианте осуществления лекарственная форма содержит приблизительно 260 мг миглустата. Предполагается, что если лекарственная 30 форма содержит приблизительно 65 мг миглустата, то миглустат можно вводить в виде дозировки из четырех лекарственных форм или в общей дозе 260 мг

миглулата. Однако для пациентов, которые имеют значительно более низкий вес, чем средний вес взрослого, составляющий 70 кг, в том числе без ограничения младенцев, детей или взрослых с недостаточным весом, миглулат можно вводить в виде дозировки из одной лекарственной формы (в общей дозе 5 65 мг миглулата), двух лекарственных форм (в общей дозе 130 мг миглулата) или трех лекарственных форм (в общей дозе 195 мг миглулата).

Твердые и жидкие композиции для перорального применения можно получить в соответствии со способами, хорошо известными из уровня техники. Такие композиции могут также содержать один или несколько фармацевтически приемлемых носителей и наполнителей, которые могут иметь твердую или жидкую форму. Таблетки и капсулы можно получить посредством традиционных способов с использованием фармацевтически приемлемых наполнителей, в том числе без ограничения связующих средств, наполнителей, смазывающих веществ, разрыхлителей или смачивающих средств. Подходящие 10 фармацевтически приемлемые наполнители известны из уровня техники и включают без ограничения прежелатинизированный крахмал, поливинилпирролидон, повидон, гидроксипропилметилцеллюлозу (HPMC), гидроксипропилэтилцеллюлозу (HPEC), гидроксипропилцеллюлозу (HPC), сахарозу, желатин, гуммиарабик, 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 посредством способов, 20 хорошо известных из уровня техники. По меньшей мере в одном варианте осуществления миглулат вводят в виде состава, коммерчески доступного как Zavesca® (Actelion Pharmaceuticals).

По меньшей мере в одном варианте осуществления рекомбинантная кислая α -глюкозидаза человека экспрессируется в клетках яичника китайского хомячка 30 (CHO) и имеет увеличенное содержание N-гликановых звеньев, несущих один

или несколько остатков маннозо-6-фосфата, в сравнении с содержанием N-гликановых звеньев, несущих один или несколько остатков маннозо-6-фосфата, в алглюкозидазе-альфа. По меньшей мере в одном варианте осуществления кислая α -глюкозидаза представляет собой рекомбинантную кислую α -глюкозидазу человека, упоминаемую в данном документе как АТВ200, как описано в международной патентной заявке PCT/US2015/053252, одновременно находящейся на рассмотрении патентного ведомства. Как было показано, АТВ200 связывается с катион-независимыми рецепторами маннозо-6-фосфата (СІМРР) с высокой аффинностью ($K_D \sim 2-4$ нМ) и эффективно интернализируется фибробластами при болезни Помпе и миобластами скелетных мышц ($K_{\text{поглощение}} \sim 7-14$ нМ). Для АТВ200 были получены характеристики *in vivo* и было показано, что она характеризуется более коротким кажущимся периодом полувыведения из плазмы крови ($t_{1/2} \sim 45$ мин.), чем алглюкозидаза-альфа ($t_{1/2} \sim 60$ мин.).

По меньшей мере в одном варианте осуществления рекомбинантная кислая α -глюкозидаза человека представляет собой фермент, имеющий аминокислотную последовательность, приведенную под SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 (или кодируемую SEQ ID NO: 2), SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 5.

SEQ ID NO: 1 Met Gly Val Arg His Pro Pro Cys Ser His Arg Leu Leu Ala Val Cys Ala Leu Val Ser Leu Ala Thr Ala Ala Leu Leu Gly His Ile Leu Leu His Asp Phe Leu Leu Val Pro Arg Glu Leu Ser Gly Ser Ser Pro Val Leu Glu Glu Thr His Pro Ala His Gln Gln Gly Ala Ser Arg Pro Gly Pro Arg Asp Ala Gln Ala His Pro Gly Arg Pro Arg Ala Val Pro Thr Gln Cys Asp Val Pro Pro Asn Ser Arg Phe Asp Cys Ala Pro Asp Lys Ala Ile Thr Gln Glu Gln Cys Glu Ala Arg Gly Cys Cys Tyr Ile Pro Ala Lys Gln Gly Leu Gln Gly Ala Gln Met Gly Gln Pro Trp Cys Phe Phe Pro Pro Ser Tyr Pro Ser Tyr Lys Leu Glu Asn Leu Ser Ser Ser Glu Met Gly Tyr Thr Ala Thr Leu Thr Arg Thr Thr Pro Thr Phe Phe Pro Lys Asp Ile Leu Thr Leu Arg Leu Asp Val Met Met Glu Thr Glu Asn Arg Leu His Phe Thr Ile Lys Asp Pro Ala Asn Arg Arg Tyr Glu

Val Pro Leu Glu Thr Pro Arg Val His Ser Arg Ala Pro Ser Pro Leu
Tyr Ser Val Glu Phe Ser Glu Glu Pro Phe Gly Val Ile Val His Arg
Gln Leu Asp Gly Arg Val Leu Leu Asn Thr Thr Val Ala Pro Leu Phe
Phe Ala Asp Gln Phe Leu Gln Leu Ser Thr Ser Leu Pro Ser Gln Tyr
Ile Thr Gly Leu Ala Glu His Leu Ser Pro Leu Met Leu Ser Thr Ser
Trp Thr Arg Ile Thr Leu Trp Asn Arg Asp Leu Ala Pro Thr Pro Gly
Ala Asn Leu Tyr Gly Ser His Pro Phe Tyr Leu Ala Leu Glu Asp Gly
Gly Ser Ala His Gly Val Phe Leu Leu Asn Ser Asn Ala Met Asp Val
Val Leu Gln Pro Ser Pro Ala Leu Ser Trp Arg Ser Thr Gly Gly Ile
Leu Asp Val Tyr Ile Phe Leu Gly Pro Glu Pro Lys Ser Val Val Gln
Gln Tyr Leu Asp Val Val Gly Tyr Pro Phe Met Pro Pro Tyr Trp Gly
Leu Gly Phe His Leu Cys Arg Trp Gly Tyr Ser Ser Thr Ala Ile Thr
Arg Gln Val Val Glu Asn Met Thr Arg Ala His Phe Pro Leu Asp Val
Gln Trp Asn Asp Leu Asp Tyr Met Asp Ser Arg Arg Asp Phe Thr
Phe Asn Lys Asp Gly Phe Arg Asp Phe Pro Ala Met Val Gln Glu
Leu His Gln Gly Gly Arg Arg Tyr Met Met Ile Val Asp Pro Ala Ile
Ser Ser Ser Gly Pro Ala Gly Ser Tyr Arg Pro Tyr Asp Glu Gly Leu
Arg Arg Gly Val Phe Ile Thr Asn Glu Thr Gly Gln Pro Leu Ile Gly
Lys Val Trp Pro Gly Ser Thr Ala Phe Pro Asp Phe Thr Asn Pro Thr
Ala Leu Ala Trp Trp Glu Asp Met Val Ala Glu Phe His Asp Gln Val
Pro Phe Asp Gly Met Trp Ile Asp Met Asn Glu Pro Ser Asn Phe Ile
Arg Gly Ser Glu Asp Gly Cys Pro Asn Asn Glu Leu Glu Asn Pro Pro
Tyr Val Pro Gly Val Val Gly Gly Thr Leu Gln Ala Ala Thr Ile Cys
Ala Ser Ser His Gln Phe Leu Ser Thr His Tyr Asn Leu His Asn Leu
Tyr Gly Leu Thr Glu Ala Ile Ala Ser His Arg Ala Leu Val Lys Ala
Arg Gly Thr Arg Pro Phe Val Ile Ser Arg Ser Thr Phe Ala Gly His
Gly Arg Tyr Ala Gly His Trp Thr Gly Asp Val Trp Ser Ser Trp Glu
Gln Leu Ala Ser Ser Val Pro Glu Ile Leu Gln Phe Asn Leu Leu Gly
Val Pro Leu Val Gly Ala Asp Val Cys Gly Phe Leu Gly Asn Thr Ser
Glu Glu Leu Cys Val Arg Trp Thr Gln Leu Gly Ala Phe Tyr Pro Phe
Met Arg Asn His Asn Ser Leu Leu Ser Leu Pro Gln Glu Pro Tyr Ser

Phe Ser Glu Pro Ala Gln Gln Ala Met Arg Lys Ala Leu Thr Leu Arg
Tyr Ala Leu Leu Pro His Leu Tyr Thr Leu Phe His Gln Ala His Val
Ala Gly Glu Thr Val Ala Arg Pro Leu Phe Leu Glu Phe Pro Lys Asp
Ser Ser Thr Trp Thr Val Asp His Gln Leu Leu Trp Gly Glu Ala Leu
Leu Ile Thr Pro Val Leu Gln Ala Gly Lys Ala Glu Val Thr Gly Tyr
Phe Pro Leu Gly Thr Trp Tyr Asp Leu Gln Thr Val Pro Ile Glu Ala
Leu Gly Ser Leu Pro Pro Pro Pro Ala Ala Pro Arg Glu Pro Ala Ile
His Ser Glu Gly Gln Trp Val Thr Leu Pro Ala Pro Leu Asp Thr Ile
Asn Val His Leu Arg Ala Gly Tyr Ile Ile Pro Leu Gln Gly Pro Gly
Leu Thr Thr Thr Glu Ser Arg Gln Gln Pro Met Ala Leu Ala Val Ala
Leu Thr Lys Gly Gly Glu Ala Arg Gly Glu Leu Phe Trp Asp Asp
Gly Glu Ser Leu Glu Val Leu Glu Arg Gly Ala Tyr Thr Gln Val Ile
Phe Leu Ala Arg Asn Asn Thr Ile Val Asn Glu Leu Val Arg Val Thr
Ser Glu Gly Ala Gly Leu Gln Leu Gln Lys Val Thr Val Leu Gly Val
Ala Thr Ala Pro Gln Gln Val Leu Ser Asn Gly Val Pro Val Ser Asn
Phe Thr Tyr Ser Pro Asp Thr Lys Val Leu Asp Ile Cys Val Ser Leu
Leu Met Gly Glu Gln Phe Leu Val Ser Trp Cys

SEQ ID NO: 2 cagtgggaaagctgaggttgcgccggggccgcgggtggaggtcggggatgaggcagcagg
taggacagtgacctcgggtgacgcgaaggacccccggccacctctaggttctctctcgcgccggtt
gttcagcagggaggctctgggcctgccgcagctgacggggaaactgaggcacggagcgggc
ctgtaggagctgtccaggccatctcaacctgggagtgaggcacccgccctgtcccaccggc
tctggccgtctgcgccctcgtgtccttggcaaccgctgcaactcctggggcacatcctactccatg
atttctgctggtccccgagagctgagtggtctctccccagtcctggaggagactcaccagctc
accagcagggagccagcagaccagggccccgggatgccaggcacacccccggccgtcccag
agcagtgcccacacagtgcgacgtccccccaacagccgcttcgattgcgccctgacaaggcc
atcaccaggaacagtgcgaggccccgggctgctgctacatccctgcaaagcaggggctgcag
ggagcccagatggggcagccctggtgcttcttcccaccagctacccagctacaagctggaga
acctgagctcctctgaaatgggctacacggccaccctgaccgctaccacccccacttcttcccc
aggacatcctgacctgcggctggacgtgatgatggagactgagaaccgctccactcactcagatc
aaagatccagctaacaggcgctacgaggtgcccttggagacccccgctgtccacagccgggca

ccgtccccactctacagcgtggagtctccgaggagcccttcgggggtgatcgtgcaccggcagct
ggacggcccgctgctgctgaacacgacgggtggcgcccctgttctttgctggaccagttcctcagc
tgtccacctcgtgccctcgcagtatatcacaggcctcggcgagcacctcagtcacctgatgctca
gcaccagctggaccaggatcacctgtggaaccgggaccttgcgcccacgcccgggtgcaacc
tctacgggtctcaccctttctacctggcgtggaggacggcgggtcggcacacgggggtgtcctg
ctaacagcaatgcatggatgtggtcctgcagccgagccctgcccttagctggagggtcgacag
gtgggatcctggatgtctacatcttctgggcccagagcccaagagcgtggtgcagcagctacctg
gacgttgggatacccgctcatgccgcatactggggcctgggcttccacctgtgccgtgggg
ctactctccaccgctatcacccgccaggtggtggagaacatgaccagggcccacttccccctgg
acgtcaatggaacgacctggactacatggactcccggaggggacttcacgttcaacaaggatgg
cttccgggacttcccggccatggtgcaggagctgcaccagggcggccggcgctacatgatgatc
gtggatcctgcatcagcagctcgggcccctgccgggagctacaggccctacgacgagggtctg
cggaggggggtttcatcacaacgagaccggccagccgctgattgggaaggatggcccggg
tccactgccttccccgacttcacaacccccacagccctggcctggtgggaggacatggtggctga
gttccatgaccaggtgcccttcgacggcatgtgattgacatgaacgagccttccaacttcacag
aggctctgaggacggctgcccacaacatgagctggagaaccaccctacgtgcctgggggtggtt
ggggggaccctccaggcggccaccatctgtgcctccagccaccagtttctctccacactacaa
cctgcacaacctctacggcctgaccgaagccatcgcctcccacagggcgctggtgaaggctcgg
gggacacgcccatttggatctcccgtcgaccttctgctggccacggccgatacgcgggcccactg
gacgggggacgtgtggagctcctgggagcagctcgcctcctccgtgccagaaatcctgcagttta
acctgctgggggtgcctctggtcggggccgacgtctgcggcttctgggcaaacctcagagga
gctgtgtgtgcgctggaccagctgggggccttctacccctcatgcggaaccacaacagcctgc
tcagtctgccccaggagccgtacagctcagcgagccggcccagcaggccatgaggaaggccc
tcacctgcgctacgcactcctccccacctctacacactgttccaccaggcccacgtcgcgggg
gagaccgtggcccggccccttctctggagtccccaaggactctagcacctggactgtggacca
ccagctcctgtggggggaggccctgctcatcaccacagtgctccaggccgggaaggccgaagt
gactggctacttccccctgggcacatggtacgacctgcagacggtgccaatagaggcccttggca
gcctcccacccccacctgcagctccccgtgagccagccatccacagcgaggggcagtggggtga
cgctgccggccccctggacaccatcaacgtccacctccgggctgggtacatcatccccctgca
gggccctggcctcacaaccacagatcccgccagcagcccatggccctggctgtggccctgac
caagggtggagaggcccaggaggagctgttctgggacgatggagagagcctggaagtgtctgg

agcgaggggcctacacacaggtcatcttctggccaggaataacacgatcgtgaatgagctggta
 cgtgtgaccagtgagggagctggcctgcagctgcagaaggtgactgtcctgggcgtggccacg
 gceccccagcaggtcctctccaacgggtgcctgtctccaactcacctacagccccacaccaa
 ggtcctggacatctgtgtctcgtgttgatgggagagcagtttctcgtcagctggtgttagccgggc
 ggagtgtgttagtctctccagagggaggtggttccccaggaagcagagcctgtgtgcgggca
 gcagctgtgtgcgggcctgggggtgcatgtgtcacctggagctgggcactaaccattccaagcc
 gccgatcgttgtttcacctcctgggccggggctctggccccaacgtgtctaggagagctttc
 tcctagatgcactgtggccggggcctggagggtgctctgtgttaataagattgtaaggtttgc
 cctctcacctgtgccggcatgcgggtagtattagccacccccctcatctgttcccagcaccgg
 agaagggggtgctcaggtggaggtgtggggatgcacctgagctcctgcttcgcgcctgctgctc
 tgccccaacgcgaccgcttcccggctgccagagggctggatgcctgccggtccccgagcaag
 cctgggaactcaggaaaattcacaggactgggagattctaaatcttaagtgaattatttaataaa
 aggggcatttgaatc

SEQ ID NO: 3 Met Gly Val Arg His Pro Pro Cys Ser His Arg Leu Leu Ala Val Cys
 Ala Leu Val Ser Leu Ala Thr Ala Ala Leu Leu Gly His Ile Leu Leu
 His Asp Phe Leu Leu Val Pro Arg Glu Leu Ser Gly Ser Ser Pro Val
 Leu Glu Glu Thr His Pro Ala His Gln Gln Gly Ala Ser Arg Pro Gly
 Pro Arg Asp Ala Gln Ala His Pro Gly Arg Pro Arg Ala Val Pro Thr
 Gln Cys Asp Val Pro Pro Asn Ser Arg Phe Asp Cys Ala Pro Asp Lys
 Ala Ile Thr Gln Glu Gln Cys Glu Ala Arg Gly Cys Cys Tyr Ile Pro
 Ala Lys Gln Gly Leu Gln Gly Ala Gln Met Gly Gln Pro Trp Cys Phe
 Phe Pro Pro Ser Tyr Pro Ser Tyr Lys Leu Glu Asn Leu Ser Ser Ser
 Glu Met Gly Tyr Thr Ala Thr Leu Thr Arg Thr Thr Pro Thr Phe Phe
 Pro Lys Asp Ile Leu Thr Leu Arg Leu Asp Val Met Met Glu Thr Glu
 Asn Arg Leu His Phe Thr Ile Lys Asp Pro Ala Asn Arg Arg Tyr Glu
 Val Pro Leu Glu Thr Pro Arg Val His Ser Arg Ala Pro Ser Pro Leu
 Tyr Ser Val Glu Phe Ser Glu Glu Pro Phe Gly Val Ile Val His Arg
 Gln Leu Asp Gly Arg Val Leu Leu Asn Thr Thr Val Ala Pro Leu Phe
 Phe Ala Asp Gln Phe Leu Gln Leu Ser Thr Ser Leu Pro Ser Gln Tyr
 Ile Thr Gly Leu Ala Glu His Leu Ser Pro Leu Met Leu Ser Thr Ser

Trp Thr Arg Ile Thr Leu Trp Asn Arg Asp Leu Ala Pro Thr Pro Gly
Ala Asn Leu Tyr Gly Ser His Pro Phe Tyr Leu Ala Leu Glu Asp Gly
Gly Ser Ala His Gly Val Phe Leu Leu Asn Ser Asn Ala Met Asp Val
Val Leu Gln Pro Ser Pro Ala Leu Ser Trp Arg Ser Thr Gly Gly Ile
Leu Asp Val Tyr Ile Phe Leu Gly Pro Glu Pro Lys Ser Val Val Gln
Gln Tyr Leu Asp Val Val Gly Tyr Pro Phe Met Pro Pro Tyr Trp Gly
Leu Gly Phe His Leu Cys Arg Trp Gly Tyr Ser Ser Thr Ala Ile Thr
Arg Gln Val Val Glu Asn Met Thr Arg Ala His Phe Pro Leu Asp Val
Gln Trp Asn Asp Leu Asp Tyr Met Asp Ser Arg Arg Asp Phe Thr
Phe Asn Lys Asp Gly Phe Arg Asp Phe Pro Ala Met Val Gln Glu
Leu His Gln Gly Gly Arg Arg Tyr Met Met Ile Val Asp Pro Ala Ile
Ser Ser Ser Gly Pro Ala Gly Ser Tyr Arg Pro Tyr Asp Glu Gly Leu
Arg Arg Gly Val Phe Ile Thr Asn Glu Thr Gly Gln Pro Leu Ile Gly
Lys Val Trp Pro Gly Ser Thr Ala Phe Pro Asp Phe Thr Asn Pro Thr
Ala Leu Ala Trp Trp Glu Asp Met Val Ala Glu Phe His Asp Gln Val
Pro Phe Asp Gly Met Trp Ile Asp Met Asn Glu Pro Ser Asn Phe Ile
Arg Gly Ser Glu Asp Gly Cys Pro Asn Asn Glu Leu Glu Asn Pro Pro
Tyr Val Pro Gly Val Val Gly Gly Thr Leu Gln Ala Ala Thr Ile Cys
Ala Ser Ser His Gln Phe Leu Ser Thr His Tyr Asn Leu His Asn Leu
Tyr Gly Leu Thr Glu Ala Ile Ala Ser His Arg Ala Leu Val Lys Ala
Arg Gly Thr Arg Pro Phe Val Ile Ser Arg Ser Thr Phe Ala Gly His
Gly Arg Tyr Ala Gly His Trp Thr Gly Asp Val Trp Ser Ser Trp Glu
Gln Leu Ala Ser Ser Val Pro Glu Ile Leu Gln Phe Asn Leu Leu Gly
Val Pro Leu Val Gly Ala Asp Val Cys Gly Phe Leu Gly Asn Thr Ser
Glu Glu Leu Cys Val Arg Trp Thr Gln Leu Gly Ala Phe Tyr Pro Phe
Met Arg Asn His Asn Ser Leu Leu Ser Leu Pro Gln Glu Pro Tyr Ser
Phe Ser Glu Pro Ala Gln Gln Ala Met Arg Lys Ala Leu Thr Leu Arg
Tyr Ala Leu Leu Pro His Leu Tyr Thr Leu Phe His Gln Ala His Val
Ala Gly Glu Thr Val Ala Arg Pro Leu Phe Leu Glu Phe Pro Lys Asp
Ser Ser Thr Trp Thr Val Asp His Gln Leu Leu Trp Gly Glu Ala Leu
Leu Ile Thr Pro Val Leu Gln Ala Gly Lys Ala Glu Val Thr Gly Tyr

Phe Pro Leu Gly Thr Trp Tyr Asp Leu Gln Thr Val Pro Ile Glu Ala
Leu Gly Ser Leu Pro Pro Pro Pro Ala Ala Pro Arg Glu Pro Ala Ile
His Ser Glu Gly Gln Trp Val Thr Leu Pro Ala Pro Leu Asp Thr Ile
Asn Val His Leu Arg Ala Gly Tyr Ile Ile Pro Leu Gln Gly Pro Gly
Leu Thr Thr Thr Glu Ser Arg Gln Gln Pro Met Ala Leu Ala Val Ala
Leu Thr Lys Gly Gly Glu Ala Arg Gly Glu Leu Phe Trp Asp Asp
Gly Glu Ser Leu Glu Val Leu Glu Arg Gly Ala Tyr Thr Gln Val Ile
Phe Leu Ala Arg Asn Asn Thr Ile Val Asn Glu Leu Val Arg Val Thr
Ser Glu Gly Ala Gly Leu Gln Leu Gln Lys Val Thr Val Leu Gly Val
Ala Thr Ala Pro Gln Gln Val Leu Ser Asn Gly Val Pro Val Ser Asn
Phe Thr Tyr Ser Pro Asp Thr Lys Val Leu Asp Ile Cys Val Ser Leu
Leu Met Gly Glu Gln Phe Leu Val Ser Trp Cys

SEQ ID NO: 4

Met Gly Val Arg His Pro Pro Cys Ser His Arg Leu Leu Ala Val Cys
Ala Leu Val Ser Leu Ala Thr Ala Ala Leu Leu Gly His Ile Leu Leu
His Asp Phe Leu Leu Val Pro Arg Glu Leu Ser Gly Ser Ser Pro Val
Leu Glu Glu Thr His Pro Ala His Gln Gln Gly Ala Ser Arg Pro Gly
Pro Arg Asp Ala Gln Ala His Pro Gly Arg Pro Arg Ala Val Pro Thr
Gln Cys Asp Val Pro Pro Asn Ser Arg Phe Asp Cys Ala Pro Asp Lys
Ala Ile Thr Gln Glu Gln Cys Glu Ala Arg Gly Cys Cys Tyr Ile Pro
Ala Lys Gln Gly Leu Gln Gly Ala Gln Met Gly Gln Pro Trp Cys Phe
Phe Pro Pro Ser Tyr Pro Ser Tyr Lys Leu Glu Asn Leu Ser Ser Ser
Glu Met Gly Tyr Thr Ala Thr Leu Thr Arg Thr Thr Pro Thr Phe Phe
Pro Lys Asp Ile Leu Thr Leu Arg Leu Asp Val Met Met Glu Thr Glu
Asn Arg Leu His Phe Thr Ile Lys Asp Pro Ala Asn Arg Arg Tyr Glu
Val Pro Leu Glu Thr Pro His Val His Ser Arg Ala Pro Ser Pro Leu
Tyr Ser Val Glu Phe Ser Glu Glu Pro Phe Gly Val Ile Val Arg Arg
Gln Leu Asp Gly Arg Val Leu Leu Asn Thr Thr Val Ala Pro Leu Phe
Phe Ala Asp Gln Phe Leu Gln Leu Ser Thr Ser Leu Pro Ser Gln Tyr
Ile Thr Gly Leu Ala Glu His Leu Ser Pro Leu Met Leu Ser Thr Ser
Trp Thr Arg Ile Thr Leu Trp Asn Arg Asp Leu Ala Pro Thr Pro Gly

Ala Asn Leu Tyr Gly Ser His Pro Phe Tyr Leu Ala Leu Glu Asp Gly
Gly Ser Ala His Gly Val Phe Leu Leu Asn Ser Asn Ala Met Asp Val
Val Leu Gln Pro Ser Pro Ala Leu Ser Trp Arg Ser Thr Gly Gly Ile
Leu Asp Val Tyr Ile Phe Leu Gly Pro Glu Pro Lys Ser Val Val Gln
Gln Tyr Leu Asp Val Val Gly Tyr Pro Phe Met Pro Pro Tyr Trp Gly
Leu Gly Phe His Leu Cys Arg Trp Gly Tyr Ser Ser Thr Ala Ile Thr
Arg Gln Val Val Glu Asn Met Thr Arg Ala His Phe Pro Leu Asp Val
Gln Trp Asn Asp Leu Asp Tyr Met Asp Ser Arg Arg Asp Phe Thr
Phe Asn Lys Asp Gly Phe Arg Asp Phe Pro Ala Met Val Gln Glu
Leu His Gln Gly Gly Arg Arg Tyr Met Met Ile Val Asp Pro Ala Ile
Ser Ser Ser Gly Pro Ala Gly Ser Tyr Arg Pro Tyr Asp Glu Gly Leu
Arg Arg Gly Val Phe Ile Thr Asn Glu Thr Gly Gln Pro Leu Ile Gly
Lys Val Trp Pro Gly Ser Thr Ala Phe Pro Asp Phe Thr Asn Pro Thr
Ala Leu Ala Trp Trp Glu Asp Met Val Ala Glu Phe His Asp Gln Val
Pro Phe Asp Gly Met Trp Ile Asp Met Asn Glu Pro Ser Asn Phe Ile
Arg Gly Ser Glu Asp Gly Cys Pro Asn Asn Glu Leu Glu Asn Pro Pro
Tyr Val Pro Gly Val Val Gly Gly Thr Leu Gln Ala Ala Thr Ile Cys
Ala Ser Ser His Gln Phe Leu Ser Thr His Tyr Asn Leu His Asn Leu
Tyr Gly Leu Thr Glu Ala Ile Ala Ser His Arg Ala Leu Val Lys Ala
Arg Gly Thr Arg Pro Phe Val Ile Ser Arg Ser Thr Phe Ala Gly His
Gly Arg Tyr Ala Gly His Trp Thr Gly Asp Val Trp Ser Ser Trp Glu
Gln Leu Ala Ser Ser Val Pro Glu Ile Leu Gln Phe Asn Leu Leu Gly
Val Pro Leu Val Gly Ala Asp Val Cys Gly Phe Leu Gly Asn Thr Ser
Glu Glu Leu Cys Val Arg Trp Thr Gln Leu Gly Ala Phe Tyr Pro Phe
Met Arg Asn His Asn Ser Leu Leu Ser Leu Pro Gln Glu Pro Tyr Ser
Phe Ser Glu Pro Ala Gln Gln Ala Met Arg Lys Ala Leu Thr Leu Arg
Tyr Ala Leu Leu Pro His Leu Tyr Thr Leu Phe His Gln Ala His Val
Ala Gly Glu Thr Val Ala Arg Pro Leu Phe Leu Glu Phe Pro Lys Asp
Ser Ser Thr Trp Thr Val Asp His Gln Leu Leu Trp Gly Glu Ala Leu
Leu Ile Thr Pro Val Leu Gln Ala Gly Lys Ala Glu Val Thr Gly Tyr
Phe Pro Leu Gly Thr Trp Tyr Asp Leu Gln Thr Val Pro Val Glu Ala

Leu Gly Ser Leu Pro Pro Pro Pro Ala Ala Pro Arg Glu Pro Ala Ile
His Ser Glu Gly Gln Trp Val Thr Leu Pro Ala Pro Leu Asp Thr Ile
Asn Val His Leu Arg Ala Gly Tyr Ile Ile Pro Leu Gln Gly Pro Gly
Leu Thr Thr Thr Glu Ser Arg Gln Gln Pro Met Ala Leu Ala Val Ala
Leu Thr Lys Gly Gly Glu Ala Arg Gly Glu Leu Phe Trp Asp Asp
Gly Glu Ser Leu Glu Val Leu Glu Arg Gly Ala Tyr Thr Gln Val Ile
Phe Leu Ala Arg Asn Asn Thr Ile Val Asn Glu Leu Val Arg Val Thr
Ser Glu Gly Ala Gly Leu Gln Leu Gln Lys Val Thr Val Leu Gly Val
Ala Thr Ala Pro Gln Gln Val Leu Ser Asn Gly Val Pro Val Ser Asn
Phe Thr Tyr Ser Pro Asp Thr Lys Val Leu Asp Ile Cys Val Ser Leu
Leu Met Gly Glu Gln Phe Leu Val Ser Trp Cys

SEQ ID NO: 5 Gln Gln Gly Ala Ser Arg Pro Gly Pro Arg Asp Ala Gln Ala His Pro
Gly Arg Pro Arg Ala Val Pro Thr Gln Cys Asp Val Pro Pro Asn Ser
Arg Phe Asp Cys Ala Pro Asp Lys Ala Ile Thr Gln Glu Gln Cys Glu
Ala Arg Gly Cys Cys Tyr Ile Pro Ala Lys Gln Gly Leu Gln Gly Ala
Gln Met Gly Gln Pro Trp Cys Phe Phe Pro Pro Ser Tyr Pro Ser Tyr
Lys Leu Glu Asn Leu Ser Ser Ser Glu Met Gly Tyr Thr Ala Thr Leu
Thr Arg Thr Thr Pro Thr Phe Phe Pro Lys Asp Ile Leu Thr Leu Arg
Leu Asp Val Met Met Glu Thr Glu Asn Arg Leu His Phe Thr Ile Lys
Asp Pro Ala Asn Arg Arg Tyr Glu Val Pro Leu Glu Thr Pro Arg Val
His Ser Arg Ala Pro Ser Pro Leu Tyr Ser Val Glu Phe Ser Glu Glu
Pro Phe Gly Val Ile Val His Arg Gln Leu Asp Gly Arg Val Leu Leu
Asn Thr Thr Val Ala Pro Leu Phe Phe Ala Asp Gln Phe Leu Gln Leu
Ser Thr Ser Leu Pro Ser Gln Tyr Ile Thr Gly Leu Ala Glu His Leu
Ser Pro Leu Met Leu Ser Thr Ser Trp Thr Arg Ile Thr Leu Trp Asn
Arg Asp Leu Ala Pro Thr Pro Gly Ala Asn Leu Tyr Gly Ser His Pro
Phe Tyr Leu Ala Leu Glu Asp Gly Gly Ser Ala His Gly Val Phe Leu
Leu Asn Ser Asn Ala Met Asp Val Val Leu Gln Pro Ser Pro Ala Leu
Ser Trp Arg Ser Thr Gly Gly Ile Leu Asp Val Tyr Ile Phe Leu Gly
Pro Glu Pro Lys Ser Val Val Gln Gln Tyr Leu Asp Val Val Gly Tyr

Pro Phe Met Pro Pro Tyr Trp Gly Leu Gly Phe His Leu Cys Arg Trp
Gly Tyr Ser Ser Thr Ala Ile Thr Arg Gln Val Val Glu Asn Met Thr
Arg Ala His Phe Pro Leu Asp Val Gln Trp Asn Asp Leu Asp Tyr
Met Asp Ser Arg Arg Asp Phe Thr Phe Asn Lys Asp Gly Phe Arg
Asp Phe Pro Ala Met Val Gln Glu Leu His Gln Gly Gly Arg Arg Tyr
Met Met Ile Val Asp Pro Ala Ile Ser Ser Ser Gly Pro Ala Gly Ser Tyr
Arg Pro Tyr Asp Glu Gly Leu Arg Arg Gly Val Phe Ile Thr Asn Glu
Thr Gly Gln Pro Leu Ile Gly Lys Val Trp Pro Gly Ser Thr Ala Phe
Pro Asp Phe Thr Asn Pro Thr Ala Leu Ala Trp Trp Glu Asp Met Val
Ala Glu Phe His Asp Gln Val Pro Phe Asp Gly Met Trp Ile Asp Met
Asn Glu Pro Ser Asn Phe Ile Arg Gly Ser Glu Asp Gly Cys Pro Asn
Asn Glu Leu Glu Asn Pro Pro Tyr Val Pro Gly Val Val Gly Gly Thr
Leu Gln Ala Ala Thr Ile Cys Ala Ser Ser His Gln Phe Leu Ser Thr
His Tyr Asn Leu His Asn Leu Tyr Gly Leu Thr Glu Ala Ile Ala Ser
His Arg Ala Leu Val Lys Ala Arg Gly Thr Arg Pro Phe Val Ile Ser
Arg Ser Thr Phe Ala Gly His Gly Arg Tyr Ala Gly His Trp Thr Gly
Asp Val Trp Ser Ser Trp Glu Gln Leu Ala Ser Ser Val Pro Glu Ile
Leu Gln Phe Asn Leu Leu Gly Val Pro Leu Val Gly Ala Asp Val Cys
Gly Phe Leu Gly Asn Thr Ser Glu Glu Leu Cys Val Arg Trp Thr Gln
Leu Gly Ala Phe Tyr Pro Phe Met Arg Asn His Asn Ser Leu Leu Ser
Leu Pro Gln Glu Pro Tyr Ser Phe Ser Glu Pro Ala Gln Gln Ala Met
Arg Lys Ala Leu Thr Leu Arg Tyr Ala Leu Leu Pro His Leu Tyr Thr
Leu Phe His Gln Ala His Val Ala Gly Glu Thr Val Ala Arg Pro Leu
Phe Leu Glu Phe Pro Lys Asp Ser Ser Thr Trp Thr Val Asp His Gln
Leu Leu Trp Gly Glu Ala Leu Leu Ile Thr Pro Val Leu Gln Ala Gly
Lys Ala Glu Val Thr Gly Tyr Phe Pro Leu Gly Thr Trp Tyr Asp Leu
Gln Thr Val Pro Ile Glu Ala Leu Gly Ser Leu Pro Pro Pro Pro Ala
Ala Pro Arg Glu Pro Ala Ile His Ser Glu Gly Gln Trp Val Thr Leu
Pro Ala Pro Leu Asp Thr Ile Asn Val His Leu Arg Ala Gly Tyr Ile Ile
Pro Leu Gln Gly Pro Gly Leu Thr Thr Thr Glu Ser Arg Gln Gln Pro
Met Ala Leu Ala Val Ala Leu Thr Lys Gly Gly Glu Ala Arg Gly Glu

Leu Phe Trp Asp Asp Gly Glu Ser Leu Glu Val Leu Glu Arg Gly Ala
Tyr Thr Gln Val Ile Phe Leu Ala Arg Asn Asn Thr Ile Val Asn Glu
Leu Val Arg Val Thr Ser Glu Gly Ala Gly Leu Gln Leu Gln Lys Val
Thr Val Leu Gly Val Ala Thr Ala Pro Gln Gln Val Leu Ser Asn Gly
Val Pro Val Ser Asn Phe Thr Tyr Ser Pro Asp Thr Lys Val Leu Asp
Ile Cys Val Ser Leu Leu Met Gly Glu Gln Phe Leu Val Ser Trp Cys

- По меньшей мере в одном варианте осуществления рекомбинантная кислая α -
глюкозидаза человека имеет аминокислотную последовательность GAA дикого
типа, приведенную под SEQ ID NO: 1, как описано в патенте США № 8592362, и
5 имеет номер доступа в GenBank AHE24104.1 (GI:568760974). По меньшей мере в
одном варианте осуществления рекомбинантная кислая α -глюкозидаза человека
имеет аминокислотную последовательность GAA дикого типа, кодируемую SEQ
ID NO: 2, последовательность мРНК для которой имеет номер доступа в
GenBank Y00839.1. По меньшей мере в одном варианте осуществления
10 рекомбинантная кислая α -глюкозидаза человека имеет аминокислотную
последовательность GAA дикого типа, приведенную под SEQ ID NO: 3. По
меньшей мере в одном варианте осуществления рекомбинантная кислая α -
глюкозидаза человека имеет аминокислотную последовательность GAA,
приведенную под SEQ ID NO: 4, и имеет номер доступа в Национальном центре
15 биотехнологической информации (NCBI) NP_000143.2. По меньшей мере в
одном варианте осуществления рекомбинантная кислая α -глюкозидаза человека
представляет собой глюкозидазу-альфа, фермент кислую α -глюкозидазу
человека, кодируемую наиболее преобладающим из девяти наблюдаемых
гаплотипов гена *GAA*.
- 20 По меньшей мере в одном варианте осуществления рекомбинантная кислая α -
глюкозидаза человека изначально экспрессируется как имеющая
полноразмерную 952-аминокислотную последовательность GAA дикого типа,
приведенную под SEQ ID NO: 1, и рекомбинантная кислая α -глюкозидаза

человека подвергается внутриклеточному процессингу, при котором удаляется часть аминокислот, например, первые 56 аминокислот. Соответственно, рекомбинантная кислая α -глюкозидаза человека, секретируемая клеткой-хозяином, может иметь более короткую аминокислотную последовательность, чем рекомбинантная кислая α -глюкозидаза человека, которая изначально экспрессируется в клетке. По меньшей мере в одном варианте осуществления более короткий белок может иметь аминокислотную последовательность, приведенную 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 в результате, таким образом, белка, имеющего 896 аминокислот. Также возможны другие различия в количестве аминокислот, такие как 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 ghGAA содержит смесь молекул рекомбинантной кислой α -глюкозидазы человека, имеющих разную длину в аминокислотах.

По меньшей мере в одном варианте осуществления рекомбинантная кислая α -глюкозидаза человека подвергается посттрансляционным и/или химическим модификациям в одном или нескольких 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 другого примера, остатки аспарагиновой кислоты могут подвергаться изомеризации до изоаспарагиновой кислоты. В качестве еще одного другого примера, непарные цистеиновые остатки в белке могут образовывать дисульфидные связи со свободным глутатионом и/или цистеином. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления фермент изначально экспрессируется как имеющий аминокислотную последовательность, приведенную под SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 (или кодируемую SEQ ID NO: 2),

SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 5, и фермент подвергается одной или нескольким этим посттрансляционным и/или химическим модификациям. Такие модификации также входят в объем настоящего изобретения.

Полинуклеотидные последовательности, кодирующие GAA и такие варианты
5 GAA человека, также предусматриваются и могут применяться для рекомбинантной экспрессии rhGAA в соответствии с настоящим изобретением.

Предпочтительно, чтобы не больше чем у 70, 65, 60, 55, 45, 40, 35, 30, 25, 20, 15,
10 10 или 5% от общего количества молекул рекомбинантной кислой α -глюкозидазы человека отсутствовало N-гликановое звено, несущее один или несколько остатков маннозо-6-фосфата, или отсутствовала способность к
связыванию с катион-независимым рецептором маннозо-6-фосфата (CIMPR). В качестве альтернативы, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 99%, <
100% или больше молекул рекомбинантной кислой α -глюкозидазы человека
15 содержат по меньшей мере одно N-гликановое звено, несущее один или несколько остатков маннозо-6-фосфата, или обладают способностью к связыванию с CIMPR.

Молекулы рекомбинантной кислой α -глюкозидазы человека могут иметь 1, 2, 3
или 4 группы маннозо-6-фосфата (M6P) в своих гликанах. Например, только
один N-гликан в молекуле рекомбинантной кислой α -глюкозидазы человека
20 может нести M6P (монофосфорилированный), отдельный N-гликан может нести две группы M6P (бисфосфорилированный) или каждый из двух разных N-гликанов в одной и той же молекуле рекомбинантной кислой α -глюкозидазы человека может нести отдельные группы M6P. Молекулы рекомбинантной
кислой α -глюкозидазы человека также могут иметь N-гликаны, не несущие
25 группы M6P. В другом варианте осуществления N-гликаны в среднем содержат более 2,5 моль/моль M6P и более 4 моль/моль сиаловой кислоты, так что рекомбинантная кислая α -глюкозидаза человека содержит в среднем по меньшей мере 2,5 моля остатков маннозо-6-фосфата на моль рекомбинантной кислой α -глюкозидазы человека и по меньшей мере 4 моля сиаловой кислоты на моль

рекомбинантной кислой α -глюкозидазы человека. В среднем по меньшей мере приблизительно 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10% от общего количества гликанов в рекомбинантной кислой α -глюкозидазе человека могут находиться в виде моно-М6Р-гликана, например, приблизительно 6,25% от общего количества гликанов могут нести одну группу М6Р, и в среднем по меньшей мере приблизительно 0,5, 1, 1,5, 2,0, 2,5, 3,0% от общего количества гликанов в рекомбинантной кислой α -глюкозидазе человека находятся в виде бис-М6Р-гликана, и в среднем меньше 25% от общего количества молекул рекомбинантной кислой α -глюкозидазы человека не содержат фосфорилированный гликан, связывающийся с CIMPR.

Рекомбинантная кислая α -глюкозидаза человека может иметь значение среднего содержания N-гликанов, несущих М6Р, в диапазоне от 0,5 до 7,0 моль/моль рекомбинантной кислой α -глюкозидазы человека 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/моль рекомбинантной кислой α -глюкозидазы человека. Рекомбинантную кислую α -глюкозидазу человека можно фракционировать для получения препаратов на основе рекомбинантной кислой α -глюкозидазы человека с разным средним количеством гликанов, несущих М6Р или несущих бис-М6Р, что, таким образом, позволяет осуществлять дополнительную индивидуальную адаптацию рекомбинантной кислой α -глюкозидазы человека, нацеливающейся на лизосомы в целевых тканях, посредством осуществления отбора конкретной фракции или посредством избирательного объединения различных фракций.

До 60% N-гликанов в рекомбинантной кислой α -глюкозидазе человека могут быть полностью сиалированными, например, до 10%, 20%, 30%, 40%, 50% или 60% N-гликанов могут быть полностью сиалированными. В некоторых вариантах осуществления от 4 до 20% от общего количества N-гликанов являются полностью сиалированными. В других вариантах осуществления не больше 5%, 10%, 20% или 30% N-гликанов в рекомбинантной кислой α -глюкозидазе 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 рекомбинантной кислой α -глюкозидазе человека могут нести сиаловую кислоту и концевую галактозу. В еще нескольких других вариантах осуществления не больше 5, 10, 15, 16, 17, 18, 19 или 20% N-гликанов в рекомбинантной кислой α -глюкозидазе человека имеют только концевую галактозу и не содержат сиаловую кислоту. Данный диапазон включает все промежуточные значения и поддиапазоны, например, от 8 до 19% от общего количества N-гликанов в рекомбинантной кислой α -глюкозидазе человека в композиции могут иметь только концевую галактозу и не содержат сиаловую кислоту.

В других вариантах осуществления настоящего изобретения 40, 45, 50, 55-60% от общего количества N-гликанов в рекомбинантной кислой α -глюкозидазе человека представляют собой N-гликаны комплексного типа; или не больше 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7% от общего количества N-гликанов в рекомбинантной кислой α -глюкозидазе человека представляют собой N-гликаны гибридного типа; не больше 5, 10 или 15% N-гликанов высокоманнозного типа в рекомбинантной кислой α -глюкозидазе человека являются нефосфорилированными; по меньшей мере 5% или 10% N-гликанов высокоманнозного типа в рекомбинантной кислой α -глюкозидазе человека являются моно-M6P-фосфорилированными; и/или по меньшей мере 1 или 2% N-гликанов высокоманнозного типа в рекомбинантной кислой α -глюкозидазе человека являются бис-M6P-фосфорилированными. Эти значения включают все промежуточные значения и поддиапазоны. Рекомбинантная кислая α -глюкозидаза человека может соответствовать одному или нескольким диапазонам содержания, описанным выше.

В некоторых вариантах осуществления рекомбинантная кислая α -глюкозидаза человека будет нести в среднем от 2,0 до 8,0 моля остатков сиаловой кислоты на моль рекомбинантной кислой α -глюкозидазы человека. Данный 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 моля остатков/моль рекомбинантной кислой α -глюкозидазы человека. Не ограничиваясь какой-либо теорией,

полагают, что присутствие N-гликановых звеньев, несущих остатки сиаловой кислоты, может предотвратить непродуктивное очищение от рекомбинантной кислой α -глюкозидазы человека посредством асиалогликопротеиновых рецепторов.

5 В одном или нескольких вариантах осуществления rhGAA имеет звенья М6Р и/или сиаловой кислоты в определенных сайтах N-гликозилирования рекомбинантного лизосомного белка человека. Например, существует семь потенциальных сайтов N-связанного гликозилирования в rhGAA. Эти потенциальные сайты гликозилирования находятся в следующих положениях
10 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 иметь аналогичные сайты гликозилирования в зависимости от местоположения
15 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 представлять собой HIS или PRO.

В различных вариантах осуществления rhGAA имеет определенный профиль N-
20 гликозилирования. В одном или нескольких вариантах осуществления по меньшей мере 20% rhGAA являются фосфорилированными в первом сайте 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% rhGAA могут быть
25 фосфорилированными в первом сайте N-гликозилирования. Данное фосфорилирование может быть обусловлено наличием 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 в первом сайте N-гликозилирования. В
30 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 в первом сайте N-гликозилирования.

В одном или нескольких вариантах осуществления по меньшей мере 20% rhGAA являются фосфорилированными во втором сайте 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 фосфорилированными во втором сайте N-гликозилирования. Данное фосфорилирование может быть обусловлено наличием 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 одном или нескольких вариантах осуществления по меньшей мере 5% rhGAA являются фосфорилированными в третьем сайте N-гликозилирования (например, N334 в SEQ ID NO: 5 и N390 в SEQ ID NO: 1). В других вариантах осуществления меньше 5%, 10%, 15%, 20% или 25% rhGAA являются фосфорилированными в третьем сайте N-гликозилирования. Например, третий сайт N-гликозилирования может иметь комбинацию нефосфорилированных высокоманнозных гликанов, двух-, трех- и четырехантенных комплексных гликанов и гибридных 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 сиалированными в третьем сайте N-гликозилирования.

В одном или нескольких вариантах осуществления по меньшей мере 20% rhGAA являются фосфорилированными в четвертом сайте 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 фосфорилированными в четвертом

сайте N-гликозилирования. Данное фосфорилирование может быть обусловлено наличием 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 в четвертом 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 в четвертом сайте N-гликозилирования. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 3%, 5%, 8%, 10%, 15%, 20% или 25% rhGAA являются сиалированными в четвертом сайте N-гликозилирования.

В одном или нескольких вариантах осуществления по меньшей мере 5% rhGAA являются фосфорилированными в пятом сайте N-гликозилирования (например, N596 в SEQ ID NO: 5 и N692 в SEQ ID NO: 1). В других вариантах осуществления меньше 5%, 10%, 15%, 20% или 25% rhGAA являются фосфорилированными в пятом сайте N-гликозилирования. Например, пятый сайт N-гликозилирования может иметь фукозилированные двухантенные комплексные 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 в пятом сайте N-гликозилирования.

В одном или нескольких вариантах осуществления по меньшей мере 5% rhGAA являются фосфорилированными в шестом сайте N-гликозилирования (например, N826 в SEQ ID NO: 5 и N882 в SEQ ID NO: 1). В других вариантах осуществления меньше 5%, 10%, 15%, 20% или 25% rhGAA являются фосфорилированными в шестом сайте N-гликозилирования. Например, шестой сайт N-гликозилирования может иметь комбинацию двух-, трех- и четырехантенных комплексных 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 в шестом сайте N-гликозилирования.

В одном или нескольких вариантах осуществления по меньшей мере 5% rhGAA являются фосфорилированными в седьмом сайте N-гликозилирования (например, N869 в SEQ ID NO: 5 и N925 в SEQ ID NO: 1). В других вариантах осуществления меньше 5%, 10%, 15%, 20% или 25% rhGAA являются фосфорилированными в седьмом сайте N-гликозилирования. В некоторых вариантах осуществления меньше 40%, 45%, 50%, 55%, 60% или 65% rhGAA имеют какой-либо гликан в седьмом сайте N-гликозилирования. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 30%, 35% или 40% rhGAA имеют гликан в седьмом сайте N-гликозилирования.

10 Рекомбинантная кислая α -глюкозидаза человека предпочтительно вырабатывается клетками яичника китайского хомячка (CHO), такими как линии клеток CHO GA-ATB-200 или ATB-200-001-X5-14, или субкультурой или производной такой культуры клеток CHO. ДНК-конструкции, которые экспрессируют аллельные варианты кислой α -глюкозидазы или аминокислотные

15 последовательности других вариантов кислой α -глюкозидазы, как, например, по меньшей мере на 90%, 95%, 98% или 99% идентичные SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 5, можно сконструировать и экспрессировать в клетках CHO. Эти аминокислотные последовательности вариантов кислой α -глюкозидазы могут содержать делеции, замены и/или вставки по сравнению с SEQ ID NO: 1 или

20 SEQ ID NO: 5, как, например, иметь 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. Специалисты в данной области могут выбрать альтернативные векторы, подходящие для трансформации клеток CHO для получения таких ДНК-

25 конструкций.

Для расчета идентичности между двумя последовательностями можно применять 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,

30 Висконсин), и их можно применять, например, с настройками по умолчанию.

Например, предусмотрены полипептиды, по меньшей мере на 90%, 95%, 98% или 99% идентичные конкретным полипептидам, описанным в данном документе, и предпочтительно проявляющие по существу те же функции, а также полинуклеотиды, кодирующие такие полипептиды. Если не указано иное, расчет показателя сходства будет основываться на применении BLOSUM62. При применении BLASTP процентное значение сходства основывается на показателе «Положительные» в BLASTP, а процентное значение идентичности последовательностей основывается на показателе «Идентичные» в BLASTP. «Идентичные» в BLASTP демонстрируют число остатков в парах последовательностей с высоким показателем сходства, которые являются идентичными, и их долю от общего количества остатков; а «Положительные» в BLASTP демонстрируют число и долю остатков, для которых показатели выравнивания имеют положительные значения и которые являются сходными 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 помощью генетического кода.

Авторы настоящего изобретения обнаружили, что рекомбинантную кислую α -глюкозидазу человека, имеющую исключительную способность к нацеливанию на катион-независимые рецепторы маннозо-6-фосфата (СМРР) и клеточные лизосомы, а также паттерны гликозилирования, снижающие непродуктивное очищение от нее *in vivo*, можно получать с применением клеток яичника китайского хомячка (СНО). В этих клетках можно индуцировать экспрессию рекомбинантной кислой α -глюкозидазы человека со значительно более высокими уровнями содержания N-гликановых звеньев, несущих один или несколько остатков маннозо-6-фосфата, чем в традиционных продуктах на основе рекомбинантной кислой α -глюкозидазы человека, таких как

алглюкозидаза-альфа. Рекомбинантная кислая α -глюкозидаза человека, вырабатываемая этими клетками, примером которой является АТВ200, имеет значительно большее содержание нацеливающихся на мышечные клетки маннозо-6-фосфатных (моно-М6Р) и бис-маннозо-6-фосфатных (бис-М6Р) N-гликановых остатков, чем традиционная кислая α -глюкозидаза, такая как Lumizyme®. Не ограничиваясь какой-либо теорией, полагают, что данное обширное гликозилирование позволяет ферменту АТВ200 более эффективно поглощаться целевыми клетками, и следовательно, подвергаться более эффективному очищению из кровотока, чем другим рекомбинантным кислым α -глюкозидазам человека, таким как, например, алглюкозидаза-альфа, которая имеет намного более низкое содержание М6Р и бис-М6Р. Было показано, что АТВ200 эффективно связывается с CIMPR и эффективно поглощается скелетными мышцами и сердечной мышцей и имеет паттерн гликозилирования, который обеспечивает благоприятный фармакокинетический профиль и снижает непродуктивное очищение *in vivo*.

Также предусматривается, что уникальное гликозилирование АТВ200 может способствовать снижению иммуногенности АТВ200 в сравнении с, например, алглюкозидазой-альфа. Как признают специалисты в данной области, гликозилирование белков консервативными сахарами млекопитающих обычно улучшает растворимость продукта и ослабляет агрегацию и иммуногенность продукта. Гликозилирование косвенно изменяет иммуногенность белка посредством минимизации агрегации белка, а также посредством экранирования иммуногенных эпитопов белка от воздействия иммунной системы (*Guidance for Industry – Immunogenicity Assessment for Therapeutic Protein Products*, Министерство здравоохранения и социальных служб США, Управление по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных средств, Центр по оценке и исследованию лекарственных средств, Центр по оценке и исследованию биологических препаратов, август 2014 года). Следовательно, по меньшей мере в одном варианте осуществления введение рекомбинантной кислой α -глюкозидазы человека не индуцирует выработку антител к лекарственному средству. По меньшей мере в одном варианте осуществления

введение рекомбинантной кислой α -глюкозидазы человека индуцирует выработку антител к лекарственному средству у субъекта с меньшей частотой возникновения, чем при уровне антител к лекарственному средству, выработка которых индуцируется посредством введения алглюкозидазы-альфа.

5 Как описано в международной патентной заявке PCT/US2015/053252, одновременно находящейся на рассмотрении патентного ведомства, такие клетки, как клетки CHO, можно применять для получения rhGAA, описанной в данном документе, и данную rhGAA можно применять в настоящем изобретении. Примерами таких линий клеток CHO являются GA-ATB-200 или
10 ATB-200-001-X5-14 или их субкультура, которая вырабатывает композицию на основе rhGAA, описанную в данном документе. Такие линии клеток CHO могут содержать несколько копий гена, как, например, 5, 10, 15 или 20 или больше копий полинуклеотида, кодирующего GAA.

rhGAA с высоким содержанием М6Р и бис-М6Р, такую как rhGAA ATB200,
15 можно получать путем трансформации клеток CHO с помощью ДНК-конструкции, которая кодирует GAA. Хотя клетки CHO ранее применяли для получения rhGAA, не было признано, что трансформированные клетки CHO можно культивировать и отбирать таким образом, чтобы вырабатывалась rhGAA, имеющая высокое содержание М6Р- и бис-М6Р-гликанов, которые
20 нацеливаются на CIMPR.

Неожиданно было обнаружено, что возможно трансформировать линии клеток CHO, отбирать трансформантов, которые вырабатывают rhGAA, имеющую высокое содержание гликанов, несущих М6Р или бис-М6Р, которые нацеливаются на CIMPR, и стабильно экспрессировать эту rhGAA с высоким
25 содержанием М6Р. Таким образом, способы получения этих линий клеток CHO также описаны в международной патентной заявке PCT/US2015/053252, одновременно находящейся на рассмотрении патентного ведомства. Данный способ включает трансформацию клетки CHO с помощью ДНК, кодирующей GAA или вариант GAA, отбор клетки CHO, в хромосому(хромосомы) которой

стабильно интегрируется ДНК, кодирующая GAA, и которая стабильно экспрессирует GAA, и отбор клетки CHO, которая экспрессирует GAA, имеющую высокое содержание гликанов, несущих М6Р или бис-М6Р, и необязательно отбор клетки CHO, имеющей N-гликаны с высоким содержанием сиаловой кислоты и/или имеющей низкое содержание нефосфорилированных высокоманнозных N-гликанов. По меньшей мере в одном варианте осуществления GAA имеет низкие уровни содержания комплексных гликанов с концевой галактозой.

Эти линии клеток CHO можно применять для получения rhGAA и композиций на основе rhGAA посредством культивирования линий клеток CHO и извлечения указанной композиции из культуры клеток CHO.

Рекомбинантную кислую α -глюкозидазу человека или ее фармацевтически приемлемую соль можно составить в соответствии с обычными процедурами в виде фармацевтической композиции, приспособленной для введения людям. Например, в предпочтительном варианте осуществления композиция для внутривенного введения представляет собой раствор в стерильном изотоническом водном буфере. При необходимости композиция может также содержать солюбилизирующее средство и местный анестетик для облегчения боли в месте инъекции. Обычно ингредиенты поставляют по отдельности либо смешанными друг с другом в стандартной лекарственной форме, например, в виде сухого лиофилизованного 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, ее можно вносить в инфузионную бутылку, содержащую стерильную фармацевтически чистую воду, солевой раствор или смесь декстроза/вода. 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.

Рекомбинантную кислую α -глюкозидазу человека (или композицию или лекарственный препарат, содержащие рекомбинантную кислую α -глюкозидазу человека) вводят подходящим путем. В одном варианте осуществления рекомбинантную кислую α -глюкозидазу человека вводят внутривенно. В других вариантах осуществления рекомбинантную кислую α -глюкозидазу человека вводят путем прямого введения в целевую ткань, такую как сердечная или скелетная мышца (например, внутримышечно), или в нервную систему (например, путем прямой инъекции в мозг; интравентрикулярно; интратекально). В случае необходимости можно одновременно применять больше одного пути.

Рекомбинантную кислую α -глюкозидазу человека (или композицию или лекарственный препарат, содержащие рекомбинантную кислую α -глюкозидазу человека) вводят в терапевтически эффективном количестве (например, при величине дозы, которая при введении с равными интервалами является достаточной для лечения заболевания, как, например, путем уменьшения интенсивности симптомов, ассоциированных с заболеванием, предупреждения или задержки начала проявления заболевания и/или уменьшения тяжести или частоты возникновения симптомов заболевания). Количество, которое будет терапевтически эффективным при лечении заболевания, будет зависеть от природы и степени выраженности эффектов заболевания и может быть определено с помощью стандартных клинических методик. Кроме того, для содействия в определении оптимальных диапазонов дозы можно необязательно использовать анализы *in vitro* или *in vivo*. Точная доза, подлежащая использованию, также будет зависеть от пути введения и тяжести заболевания и должна быть определена в соответствии с заключением врача и состоянием каждого пациента. Эффективные дозы можно экстраполировать из кривых зависимости доза-ответ, полученных с помощью тестовых систем *in vitro* или в животных моделях. По меньшей мере в одном варианте осуществления рекомбинантную кислую α -глюкозидазу человека вводят путем внутривенной инфузии в дозе, составляющей от приблизительно 5 мг/кг до приблизительно 30 мг/кг, обычно от приблизительно 5 мг/кг до приблизительно 20 мг/кг. По

меньшей мере в одном варианте осуществления рекомбинантную кислую α -
глюкозидазу человека вводят путем внутривенной инфузии в дозе,
составляющей приблизительно 5 мг/кг, приблизительно 10 мг/кг,
приблизительно 15 мг/кг или приблизительно 20 мг/кг. По меньшей мере в
5 одном варианте осуществления рекомбинантную кислую α -глюкозидазу
человека вводят путем внутривенной инфузии в дозе, составляющей
приблизительно 20 мг/кг. Эффективная доза для конкретного индивидуума
может варьироваться (например, увеличиваться или уменьшаться) с течением
времени в зависимости от потребностей индивидуума. Например, количество
10 можно увеличивать во время соматического заболевания или стресса, или в
случае появления или увеличения количества антител к кислой α -глюкозидазе,
или при ухудшении симптомов заболевания.

Терапевтически эффективное количество рекомбинантной кислой α -
глюкозидазы человека (или композиции или лекарственного препарата,
15 содержащих рекомбинантную кислую α -глюкозидазу человека) вводят с
равными интервалами в зависимости от природы и степени выраженности
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
20 разовой дозы). Интервал можно определять с помощью стандартных
клинических методик. В предпочтительных вариантах осуществления
рекомбинантную кислую α -глюкозидазу человека вводят ежемесячно, два раза в
месяц; один раз в неделю; два раза в неделю или ежедневно. Интервал введения
для потребности отдельного индивидуума не обязательно должен быть
25 фиксированным интервалом и может варьироваться с течением времени в
зависимости от потребностей индивидуума. Например, интервал между дозами
можно уменьшать во время соматического заболевания или стресса, или в случае
появления или увеличения количества антител к рекомбинантной кислой α -
глюкозидазе человека, или при ухудшении симптомов заболевания. В некоторых
30 вариантах осуществления терапевтически эффективное количество,
составляющее 5, 10, 20, 50, 100 или 200 мг фермента/кг веса тела, вводят два

раза в неделю, один раз в неделю или один раз в две недели с шапероном или без шаперона.

Рекомбинантную кислую α -глюкозидазу человека по настоящему изобретению можно получать для более позднего применения, как, например, во флаконе или в шприце с однократной дозой или в бутылки или пакете для внутривенного введения. Наборы, содержащие рекомбинантную кислую α -глюкозидазу человека, а также необязательно наполнители или другие активные ингредиенты, такие как шапероны или другие лекарственные средства, можно вкладывать в упаковочный материал и снабжать инструкциями по разведению, разбавлению или введению доз для лечения субъекта, нуждающегося в лечении, такого как пациент с болезнью Помпе.

По меньшей мере в одном варианте осуществления миглустат и рекомбинантную кислую α -глюкозидазу человека вводят одновременно. По меньшей мере в одном варианте осуществления миглустат и рекомбинантную кислую α -глюкозидазу человека вводят последовательно. По меньшей мере в одном варианте осуществления миглустат вводят до введения рекомбинантной кислой α -глюкозидазы человека. По меньшей мере в одном варианте осуществления миглустат вводят менее чем за три часа до введения рекомбинантной кислой α -глюкозидазы человека. По меньшей мере в одном варианте осуществления миглустат вводят за приблизительно два часа до введения рекомбинантной кислой α -глюкозидазы человека. По меньшей мере в одном варианте осуществления миглустат вводят менее чем за два часа до введения рекомбинантной кислой α -глюкозидазы человека. По меньшей мере в одном варианте осуществления миглустат вводят за приблизительно 1,5 часа до введения рекомбинантной кислой α -глюкозидазы человека. По меньшей мере в одном варианте осуществления миглустат вводят за приблизительно один час до введения рекомбинантной кислой α -глюкозидазы человека. По меньшей мере в одном варианте осуществления миглустат вводят за от приблизительно 50 минут до приблизительно 70 минут до введения рекомбинантной кислой α -глюкозидазы человека. По меньшей мере в одном варианте осуществления

миглулат вводят за от приблизительно 55 минут до приблизительно 65 минут до введения рекомбинантной кислой α -глюкозидазы человека. По меньшей мере в одном варианте осуществления миглулат вводят за приблизительно 30 минут до введения рекомбинантной кислой α -глюкозидазы человека. По меньшей мере в 5 одном варианте осуществления миглулат вводят за от приблизительно 25 минут до приблизительно 35 минут до введения рекомбинантной кислой α -глюкозидазы человека. По меньшей мере в одном варианте осуществления миглулат вводят за от приблизительно 27 минут до приблизительно 33 минут до введения рекомбинантной кислой α -глюкозидазы человека.

10 По меньшей мере в одном варианте осуществления миглулат вводят одновременно с введением рекомбинантной кислой α -глюкозидазы человека. По меньшей мере в одном варианте осуществления миглулат вводят в течение периода 20 минут до или после введения рекомбинантной кислой α -глюкозидазы человека. По меньшей мере в одном варианте осуществления миглулат вводят в 15 течение периода 15 минут до или после введения рекомбинантной кислой α -глюкозидазы человека. По меньшей мере в одном варианте осуществления миглулат вводят в течение периода 10 минут до или после введения рекомбинантной кислой α -глюкозидазы человека. По меньшей мере в одном варианте осуществления миглулат вводят в течение периода 5 минут до или 20 после введения рекомбинантной кислой α -глюкозидазы человека.

По меньшей мере в одном варианте осуществления миглулат вводят после введения рекомбинантной кислой α -глюкозидазы человека. По меньшей мере в одном варианте осуществления миглулат вводят в течение периода до 2 часов после введения рекомбинантной кислой α -глюкозидазы человека. По меньшей 25 мере в одном варианте осуществления миглулат вводят через приблизительно 30 минут после введения рекомбинантной кислой α -глюкозидазы человека. По меньшей мере в одном варианте осуществления миглулат вводят через приблизительно один час после введения рекомбинантной кислой α -глюкозидазы человека. По меньшей мере в одном варианте осуществления 30 миглулат вводят через приблизительно 1,5 часа после введения рекомбинантной

кислой α -глюкозидазы человека. По меньшей мере в одном варианте осуществления миглустат вводят через приблизительно 2 часа после введения рекомбинантной кислой α -глюкозидазы человека.

В другом аспекте настоящего изобретения предусмотрен набор для комбинированной терапии болезни Помпе у пациента, нуждающегося в этом. Набор содержит фармацевтически приемлемую лекарственную форму, содержащую миглустат, фармацевтически приемлемую лекарственную форму, содержащую рекомбинантную кислую α -глюкозидазу человека, определенную в данном документе, и инструкции по введению фармацевтически приемлемой лекарственной формы, содержащей миглустат, и фармацевтически приемлемой лекарственной формы, содержащей рекомбинантную кислую α -глюкозидазу, пациенту, нуждающемуся в этом. По меньшей мере в одном варианте осуществления фармацевтически приемлемая лекарственная форма, содержащая миглустат, представляет собой лекарственную форму для перорального применения, описанную в данном документе, в том числе без ограничения таблетку или капсулу. По меньшей мере в одном варианте осуществления фармацевтически приемлемая лекарственная форма, содержащая рекомбинантную кислую α -глюкозидазу человека, представляет собой стерильный раствор, подходящий для инъекций, описанный в данном документе. По меньшей мере в одном варианте осуществления инструкции по введению лекарственных форм включают инструкции по введению фармацевтически приемлемой лекарственной формы, содержащей миглустат, перорально до введения фармацевтически приемлемой лекарственной формы, содержащей рекомбинантную кислую α -глюкозидазу человека, посредством внутривенной инфузии, как описано в данном документе.

Не ограничиваясь какой-либо теорией, полагают, что миглустат действует в качестве фармакологического шаперона для рекомбинантной кислой α -глюкозидазы человека АТВ200 и связывается с ее активным сайтом. Таким образом, как видно на фигуре 1, было обнаружено, что миглустат снижает процентную долю развернутого белка АТВ200 и стабилизирует активную

конформацию АТВ200, предотвращая его денатурацию и необратимую инактивацию при нейтральном рН плазмы крови и позволяя ему выдерживать условия в кровотоке достаточно долго, чтобы достичь тканей и быть ими поглощенным. Однако связывание миглустата с активным сайтом АТВ200 также может приводить к ингибированию ферментативной активности АТВ200 посредством препятствования доступу естественного субстрата гликогена к активному сайту. Полагают, что в случаях, когда миглустат и рекомбинантную кислую α -глюкозидазу человека вводят пациенту в условиях, описанных в данном документе, концентрации миглустата и АТВ200 в плазме крови и тканях являются такими, что АТВ200 стабилизируется до тех пор, пока она не сможет быть поглощена тканями и нацелиться на лизосомы, но вследствие быстрого очищения от миглустата гидролиз гликогена с помощью АТВ200 в лизосомах чрезмерно не ингибируется присутствием миглустата, и фермент сохраняет достаточную активность для того, чтобы быть терапевтически применимым.

15 Все варианты осуществления, описанные выше, можно комбинировать. Это охватывает конкретные варианты осуществления, относящиеся к:

природе фармакологического шаперона, например, миглустата; и активного сайта, для которого он является специфичным;

20 дозированию, пути введения фармакологического шаперона (миглустата) и типу фармацевтической композиции, в том числе к природе носителя и применению коммерчески доступных композиций;

природе лекарственного средства, например, терапевтического белкового лекарственного препарата, который может представлять собой аналог эндогенного белка, экспрессия которого у субъекта является пониженной или отсутствует, в подходящем случае рекомбинантной кислой α -глюкозидазы человека, например, рекомбинантной кислой α -глюкозидазы человека, экспрессируемой в клетках яичника китайского хомячка (CHO) и имеющей увеличенное содержание N-гликановых звеньев, несущих один или несколько остатков маннозо-6-фосфата, в сравнении с содержанием N-гликановых звеньев,

несущих один или несколько остатков маннозо-6-фосфата, в α -глюкозидазе-альфа; и в подходящем случае имеющей аминокислотную последовательность, приведенную под SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 (или кодируемую SEQ ID NO: 2), SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 5;

5 количеству и типу N-гликановых звеньев в рекомбинантной кислой α -глюкозидазе человека, например, N-ацетилглюкозамина, галактозы, сиаловой кислоты или комплексных N-гликанов, образованных в результате их объединения, присоединенных к рекомбинантной кислой α -глюкозидазе человека;

10 степени фосфорилирования маннозных звеньев в рекомбинантной кислой α -глюкозидазе человека с образованием маннозо-6-фосфата и/или бис-маннозо-6-фосфата;

дозированию и пути введения (например, внутривенному введению, особенно внутривенной инфузии, или прямому введению в целевую ткань)
15 заместительного фермента (рекомбинантной кислой α -глюкозидазы человека) и типу состава, в том числе к носителям и терапевтически эффективному количеству;

интервалу дозирования фармакологического шаперона (миглустата) и рекомбинантной кислой α -глюкозидазы человека;

20 природе терапевтического ответа и результатам комбинированной терапии (например, улучшенным результатам в сравнении с эффектом каждого вида терапии, осуществляемого по отдельности);

временным рамкам осуществления комбинированной терапии, например, одновременному введению миглустата и рекомбинантной кислой α -глюкозидазы
25 человека или последовательному введению, например, где миглустат вводят до рекомбинантной кислой α -глюкозидазой человека или после рекомбинантной кислой α -глюкозидазы человека или в определенное время до или после введения рекомбинантной кислой α -глюкозидазы человека; и

природе пациента, подвергаемого лечению (например, млекопитающего, такого как человек), и состоянию, от которого страдает индивидуум (например, недостаточности фермента).

Любой из вариантов осуществления, приведенных в перечне выше, можно
5 комбинировать с одним или несколькими другими вариантами осуществления в перечне.

ПРИМЕРЫ

Другие признаки настоящего изобретения станут очевидными из
нижеизложенных неограничивающих примеров, которые иллюстрируют на
10 примере принципы настоящего изобретения.

Пример 1. Ограничения существующих в настоящее время продуктов Myozyme® и Lumizyme® на основе rhGAA

Для оценки возможностей rhGAA в Myozyme® и Lumizyme®, единственных одобренных в настоящее время средств для лечения болезни Помпе, эти
15 препараты на основе rhGAA вводили в колонку с CIMPR (который связывается с rhGAA, имеющей группы M6P), а затем элюировали в градиенте свободного M6. Фракции собирали в 96-луночный планшет, и активность GAA анализировали на субстрате, представляющем собой 4MU- α -глюкозу. Относительные количества связанной и несвязанной rhGAA определяли на основании активности GAA и
20 регистрировали в виде доли от общего количества фермента.

На фигурах 2A-B описаны проблемы, связанные с традиционными средствами ERT (Myozyme® и Lumizyme®): 73% rhGAA в Myozyme® (фигура 2B) и 78% rhGAA в Lumizyme® (фигура 2A) не связывались с CIMPR, см. крайние левые пики на каждой фигуре. Только 27% rhGAA в Myozyme® и 22% rhGAA в
25 Lumizyme® содержали M6P, который может продуктивно нацеливать ее на CIMPR в мышечных клетках.

Эффективная доза Myozyme® и Lumizyme® соответствует количеству rhGAA, содержащей М6Р, которая нацеливается на CIMPR в мышечных клетках. Однако большая часть rhGAA в этих двух традиционных продуктах не нацеливается на CIMPR-рецептор в целевых мышечных клетках. Введение традиционной rhGAA, где большая часть rhGAA не нацеливается на мышечные клетки, увеличивает риск аллергической реакции или индукции иммунного ответа на ненацеливаемую rhGAA.

Пример 2. Получение клеток CHO, вырабатывающих rhGAA ATB200, имеющую высокое содержание N-гликанов, несущих моно- или бис-М6Р

10 Клетки CHO трансфицировали с помощью ДНК, которая экспрессирует rhGAA, с последующим отбором трансформантов, вырабатывающих rhGAA. ДНК-конструкция для трансформации клеток CHO с помощью ДНК, кодирующей rhGAA, показана на фигуре 3. Клетки CHO трансфицировали с помощью ДНК, которая экспрессирует rhGAA, с последующим отбором трансформантов, вырабатывающих rhGAA.

После трансфекции клетки CHO-DG44 (DHFR-), содержащие стабильно интегрированный ген GAA, отбирали на среде без гипоксантина/тимидина (-HT). Усиление экспрессии 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 использовали для создания отдельных клонов, вырабатывающих rhGAA. Отдельные клоны получали в культуральных чашках с полутвердой 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 α -глюкозидазы, представляющий собой 4-MU- α -глюкопиранозид. Клоны, вырабатывающие GAA на более высоких уровнях, что измеряли с помощью анализов фермента

ГАА, дополнительно оценивали в отношении жизнеспособности, способности к
росту, продуктивности выработки ГАА, структуры N-гликанов и стабильной
экспрессии белка. Линии клеток CHO, в том числе линию клеток CHO GA-ATB-
200, экспрессирующую rhGAA с повышенным содержанием моно-M6P- или бис-
5 M6P-N-гликанов, выделяли с помощью данной процедуры.

Пример 3. Захват и очистка rhGAA ATB200

Несколько партий rhGAA в соответствии с настоящим изобретением получали
во встряхиваемых колбах и в перфузионных биореакторах с использованием
линии клеток CHO GA-ATB-200, и измеряли связывание с CIMPR. Для
10 очищенной rhGAA ATB200 из разных производственных партий наблюдали
связывание с CIMPR-рецептором, аналогичное показанному на фигуре 4B и
фигуре 5A (~ 70%), что указывает на то, что rhGAA ATB200 можно получать
стабильно. Как показано на фигурах 2A, 2B, 4A и 4B, rhGAA Myozyme® и
Lumizyme® демонстрировали значительно меньшую степень связывания с
15 CIMPR, чем rhGAA ATB200.

Пример 4. Аналитическое сравнение ATB200 с Lumizyme®

Жидкостную хроматографию со слабым анионным обменом («WAX») использовали для фракционирования rhGAA ATB200 по концевому фосфату.
Профили элюирования получали путем элюирования средства для ERT с
20 помощью увеличивающегося количества соли. Мониторинг профилей
осуществляли с помощью UV-облучения (A280 нм). rhGAA ATB200 получали из
клеток CHO и очищали. Lumizyme® получали из коммерческого источника.
Lumizyme® демонстрировал высокий пик слева на его профиле элюирования.
rhGAA ATB200 демонстрировала четыре выраженных пика элюирования справа
25 от Lumizyme® (фигура 6). Это подтверждает, что rhGAA ATB200 была
фосфорилирована в большей степени, чем Lumizyme®, поскольку эту оценку
проводили по концевому заряду, а не по аффинности к CIMPR.

Пример 5. Получение характеристик олигосахаридов в rhGAA ATB200

Очищенные гликаны rhGAA ATB200 и Lumizyme® оценивали с помощью MALDI-TOF для определения структур отдельных гликанов, обнаруживаемых в каждом средстве для ERT (фигура 7). Было обнаружено, что образцы ATB200 содержат меньшие количества нефосфорилированных N-гликанов высокоманнозного типа, чем Lumizyme®. Более высокое содержание М6Р-гликанов в ATB200, чем в Lumizyme®, обеспечивает нацеливание rhGAA ATB200 на мышечные клетки с большей эффективностью. Высокая процентная доля монофосфорилированных и бисфосфорилированных структур, определенная с помощью MALDI, согласуется с профилями связывания с CIMPR, которые иллюстрируют значительно большую степень связывания ATB200 с CIMPR-рецептором. Анализ N-гликанов посредством масс-спектрометрии MALDI-TOF подтвердил, что в среднем каждая молекула ATB200 содержит по меньшей мере одну природную бис-М6Р-N-гликановую структуру. Это более высокое содержание бис-М6Р-N-гликанов в rhGAA ATB200 напрямую коррелирует со связыванием с CIMPR с высокой аффинностью в анализах связывания с рецептором М6Р на планшетах (KD приблизительно 2-4 нМ), фигура 9А.

rhGAA ATB200 также анализировали в отношении профилей сайт-специфических N-гликанов с помощью двух разных аналитических методик LC-MS/MS. В первом анализе 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 1 моль/л Tris-HCl (конечная концентрация 50 мМ), 75 мкл 8 моль/л гуанидина-HCl (конечная концентрация 6 М), 1 мкл 0,5 моль/л EDTA (конечная концентрация 5 мМ), 2 мкл 1 моль/л DTT (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 1 моль/л йодацетамида (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 40 мкл 8 М мочевины и 160 мкл 100 мМ NH_4HCO_3 . В ходе расщепления трипсином к 50 мкг белка затем добавляли буфер для расщепления трипсином до конечного объема 100 мкл и добавляли 5 мкл 0,5 мг/мл трипсина (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.

Во 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 применяли йодуксусную кислоту (IAA), а затем анализировали с помощью масс-спектрометра Orbitrap Fusion Lumos TribidTM от Thermo Scientific.

В третьем анализе по методу LC-MS/MS образец ATB200 получали в соответствии с аналогичной процедурой денатурации, восстановления, алкилирования и расщепления с применением йодацетамида (IAM) в качестве алкилирующего реагента, а затем анализировали с помощью масс-спектрометра Orbitrap Fusion от Thermo Scientific.

Результаты первого и второго анализов показаны на фигурах 8B-8H, а результат третьего анализа показан на фигуре 8A. На фигурах 8B-8H результаты первого анализа представлены столбиками, расположенными слева (темно-серого цвета),

а результаты второго анализа представлены столбиками, расположенными справа (светло-серого цвета). На фигурах 8В-8Н номенклатура символов для представления гликанов соответствует Varki, A., Cummings, R.D., Esko J.D., et al., *Essentials of Glycobiology*, 2nd edition (2009). На фигурах 8А-8Н сайты гликозилирования указаны по отношению к SEQ ID NO: 5: N84, N177, N334, N414, N596, N826 и N869. Для полноразмерной аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 1 эти потенциальные сайты гликозилирования находятся в следующих положениях: N140, N233, N390, N470, N652, N882 и N925.

10 Как можно видеть на фигурах 8В-8Н, первые два анализа давали сходные результаты, хотя между результатами было некоторое различие. Это различие может быть обусловлено рядом факторов, в том числе используемым прибором и полнотой анализа N-гликанов. Например, если некоторые формы фосфорилированных гликанов не были идентифицированы и/или не были
15 определены количественно, то общее число фосфорилированных гликанов может быть представлено в недостаточной мере, и процентная доля ghGAA, несущей фосфорилированные гликаны в данном сайте, может быть представлена в недостаточной мере. В качестве другого примера, если некоторые формы нефосфорилированных гликанов не были идентифицированы и/или не были
20 определены количественно, то общее число нефосфорилированных гликанов может быть представлено в недостаточной мере, и процентная доля ghGAA, несущей фосфорилированные гликаны в данном сайте, может быть представлена чрезмерно большим количеством.

На фигуре 8А показана занятость сайтов N-гликозилирования в АТВ200. Как
25 можно видеть на фигуре 8А, первый, второй, третий, четвертый, пятый и шестой сайты N-гликозилирования по большей части были заняты, при этом было выявлено, что в каждом потенциальном сайте от примерно 90% до приблизительно 100% молекул фермента АТВ200 имели гликан. Однако седьмой потенциальный сайт N-гликозилирования являлся гликозилированным
30 приблизительно в половине случаев.

На фигуре 8B показан профиль N-гликозилирования для первого сайта – N84. Как можно видеть на фигуре 8B, основной формой гликанов были бис-М6Р-гликаны. Как в первом, так и во втором анализах выявили, что более 75% АТВ200 имели бис-М6Р-гликан в первом сайте.

5 На фигуре 8C показан профиль N-гликозилирования для второго сайта – N177. Как можно видеть на фигуре 8C, основными формами гликанов были моно-М6Р-гликаны и нефосфорилированные высокоманнозные гликаны. Как в первом, так и во втором анализах выявили, что более 40% АТВ200 имели моно-М6Р-гликан во втором сайте.

10 На фигуре 8D показан профиль N-гликозилирования для третьего сайта – N334. Как можно видеть на фигуре 8D, основными формами гликанов были нефосфорилированные высокоманнозные гликаны, двух-, трех- и
15 четырехантенные комплексные гликаны и гибридные гликаны. Как в первом, так и во втором анализах выявили, что более 20% АТВ200 имели остаток сиаловой
кислоты в третьем сайте.

На фигуре 8E показан профиль N-гликозилирования для четвертого сайта – N414. Как можно видеть на фигуре 8E, основными формами гликанов были бис-М6Р- и моно-М6Р-гликаны. Как в первом, так и во втором анализах выявили, что
20 более 40% АТВ200 имели бис-М6Р-гликан в четвертом сайте. Как в первом, так и во втором анализах также выявили, что более 25% АТВ200 имели моно-М6Р-гликан в четвертом сайте.

На фигуре 8F показан профиль N-гликозилирования для пятого сайта – N596. Как можно видеть на фигуре 8F, основными формами гликанов были
25 фукозилированные двухантенные комплексные гликаны. Как в первом, так и во втором анализах выявили, что более 70% АТВ200 имели остаток сиаловой
кислоты в пятом сайте.

На фигуре 8G показан профиль N-гликозилирования для шестого сайта – N826. Как можно видеть на фигуре 8G, основными формами гликанов были двух-,

трех- и четырехантенные комплексные гликаны. Как в первом, так и во втором анализах выявили, что более 80% АТВ200 имели остаток сиаловой кислоты в шестом сайте.

5 На фигуре 8Н показана сводная информация о фосфорилировании в каждом из первых шести потенциальных сайтов N-гликозилирования. Как можно видеть на фигуре 8Н, как в первом, так и во втором анализах выявляли высокие уровни фосфорилирования в первом, втором и четвертом сайтах. В обоих анализах выявили, что более 80% АТВ200 были моно- или дифосфорилированными в первом сайте, более 40% АТВ200 были монофосфорилированными во втором
10 сайте, и более 80% АТВ200 были моно- или дифосфорилированными в четвертом сайте.

Пример 6. Получение характеристик аффинности АТВ200 к CIMPR

В дополнение к наличию более высокой процентной доли rhGAA, которая может связываться с CIMPR, важно понимать качество такого взаимодействия.
15 Связывание Lumizyme® и rhGAA 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
20 показано на фигуре 9А, rhGAA АТВ200 связывалась с CIMPR значительно лучше, чем Lumizyme®.

На фигуре 9В показано относительное содержание бис-М6Р-гликанов в Lumizyme®, традиционной rhGAA, и АТВ200 в соответствии с настоящим изобретением. В случае с Lumizyme® в среднем только 10% молекул имеют
25 бисфосфорилированный гликан. В противоположность этому, в случае с АТВ200 в среднем каждая молекула rhGAA имеет по меньшей мере один бисфосфорилированный гликан.

Пример 7. rhGAA АТВ200 более эффективно интернализировалась

фибробластами, чем Lumizyme®

Сравнивали относительное поглощение клетками rhGAA АТВ200 и Lumizyme® с использованием линии нормальных клеток-фибробластов и линии клеток-фибробластов при болезни Помпе. В сравнениях участвовали 5-100 нМ rhGAA АТВ200 в соответствии с настоящим изобретением и 10-500 нМ традиционной rhGAA Lumizyme®. После 16-часового инкубирования внешнюю 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 уровня общего клеточного белка, и результаты показаны на фигурах 10А-В.

Также было показано, что rhGAA АТВ200 эффективно интернализировалась в клетки (фигуры 10А и 10В, на которых соответственно показано, что rhGAA АТВ200 интернализируется как в нормальные клетки-фибробласты, так и в клетки-фибробласты при болезни Помпе, и что она интернализируется в большей степени, чем традиционная rhGAA Lumizyme®). rhGAA АТВ200 насыщает клеточные рецепторы при приблизительно 20 нМ, тогда как в случае с Lumizyme® необходимо приблизительно 250 нМ. Константа эффективности поглощения ($K_{\text{поглощение}}$), экстраполированная из этих результатов, составляет 2-3 нМ для АТВ200 и 56 нМ для Lumizyme®, что показано на фигуре 10С. Эти результаты позволяют предположить, что rhGAA АТВ200 представляет собой хорошо нацеливаемое средство для лечения болезни Помпе.

Пример 8. Популяционное фармакокинетическое (PK) моделирование для АТВ200 и миглустата

Фармакокинетические данные для кислой α -глюкозидазы (АТВ200), в том числе моменты времени отбора образцов, хронологию введения доз и значения концентрации кислой α -глюкозидазы в плазме крови, получали от мышей, крыс и обезьян, которым вводили АТВ200 путем внутривенной инъекции. Фармакокинетические данные для миглустата и дувоглустата в плазме крови и

ткани собирали у людей или мышей.

Моделирование и имитационные эксперименты осуществляли с помощью Phoenix® NLME™ v1.3. Для оценки РК АТВ200 в плазме крови конструировали компартментные РК-модели. Модели включали:

- 5 • описание взаимосвязи между концентрацией в плазме крови и временем;
- компонент дисперсии, характеризующий межорганизменную и внутриорганизменную изменчивость параметров модели у животных; и
- компонент, описывающий неопределенность в уровне знаний о критически важных компонентах модели.

10 Нелинейные модели со смешанными эффектами (NLME) имеют форму:

$$C_{p_{ij}} = C(D_i, t_j, \theta_i) + \varepsilon_{ij}$$

$$\theta_i = (\theta_{i1}, \dots, \theta_{im})$$

где $C_{p_{ij}}$ представляет собой концентрацию в $j^{\text{й}}$ момент времени сбора (t_j) для животного i , D_i представляет собой хронологию введения доз для животного i , θ_i представляет собой вектор РК-параметров для животного i , и ε_{ij} представляет

15 собой случайную погрешность, связанную с $j^{\text{й}}$ концентрацией для животного i .

Межсубъектную изменчивость (BSV) параметров моделировали в виде лог-нормального распределения:

$$\theta_{in} = \theta_{TVn} \exp(\eta_{in}),$$

$$(\eta_1, \dots, \eta_m) \sim MVN(0, \Omega),$$

20 где θ_{TVn} представляет собой типичное значение $n^{\text{го}}$ РК-параметра (например, клиренса) в популяции, и η_{in} представляет собой случайный межорганизменный эффект у животных в отношении $n^{\text{го}}$ параметра для животного i . Случайные эффекты (η_1, \dots, η_m) имели нормальное распределение со средним значением, составляющим 0, и оцененной дисперсией ω^2 , включенной в матрицу OMEGA

(Ω).

Предполагалось, что РК не зависят от вида, и их масштабировали в соответствии с обобщенным подходом Дедрика, согласно которому фармакокинетическое распределение масштабируют в соответствии с мощностью показателя веса тела животного:

$$CL_{(p)i} = a_{(p)} BW_i^b,$$

$$V_{(p)i} = c_{(p)} BW_i^d,$$

где CL = системный клиренс, V = объем распределения, BW = вес тела, p = периферический, b и d = аллометрические экспоненты, и a и c = типичные значения для BW = 1. В данном случае экспоненты b и d можно сравнивать с более обобщенными значениями, принятыми в литературе (b = 0,75 и d = 1,0). В анализах использовали номинальные значения BW (0,025, 0,25 и 2,5 кг).

Исходную концентрацию кислой α -глюкозидазы моделировали в виде $C_{\text{исходная}}$ = скорость синтеза кислой α -глюкозидазы/CL, и ее можно экстраполировать на людей, поскольку $C_{\text{исходная}}$ является видоспецифической, не зависит от концентрации АТВ200 и известна у людей с болезнью Помпе. Базовую модель определяли с помощью FOCE-ELS на Phoenix® для оценки того, какая из 1- или 2-компарментной модели лучше всего согласуется с данными. Источники изменчивости РК кислой α -глюкозидазы также исследовали визуально и путем выявления влияния различных эффектов, связанных с диким типом/видом/дозой, на РК.

В случае с АТВ200 двухкомпарментная модель с линейным выведением надлежащим образом характеризует профили зависимости концентрации активной формы кислой α -глюкозидазы от времени при всех уровнях дозы среди различных видов животных. Модель включала теоретический аллометрический компонент, учитывающий влияние разницы в весе тела среди различных видов животных на клиренс (CL) и объем распределения (Vc). Точность подбора популяционной РК-модели для АТВ200 показана на фигуре 11. Популяционные

PK-параметры АТВ200, полученные в неклинических исследованиях, представлены в таблице 1.

Таблица 1

PK-параметр	Типичные значения (относительная среднеквадратическая погрешность (%))	Межсубъектная изменчивость (%)
Системный клиренс (CL; л/ч.)	0,00957 x (BW/0,25) ^{0,78} (5,1) (3,2)	21,0
Центральный объем распределения (V _c ; л)	0,0101 x (BW/0,25) ^{0,83} (4,3) (1,7)	5,3
Периферический клиренс (CL _d ; л/ч.)	0,000290 x (BW/0,25) ^{0,78} (43,2)	NA
Периферический объем распределения (V ₂ ; л)	0,000653 x (BW/0,25) ^{0,83} (35,6)	NA
Скорость синтеза эндогенной кислой α- глюкозидазы (SYNT; мг/ч.)	Мышь: 0,00401 (8,1) Крыса: 0,0203 (13,3) Обезьяна: 0,00518 (16,9)	NA

BW: вес тела

- 5 Профили зависимости концентрации от времени для миглустата (200 мг) у пациентов с болезнью Помпе сравнивали с профилями, полученными после введения дувоглустата здоровым добровольцам (диапазон доз: 50, 100, 250, 600 и 1000 мг). Нормализованные по дозе профили зависимости концентрации миглустата и дувоглустата в плазме крови от времени показаны на фигуре 12.
- 10 Поскольку профили зависимости концентрации миглустата от времени у пациентов с болезнью Помпе были сходны с профилями, наблюдаемыми после введения доз дувоглустата здоровым субъектам в течение 24 ч., то PK-данные, собранные для дувоглустата в периферических тканях, использовали в качестве суррогатных для моделирования воздействия миглустата. Для получения
- 15 характеристик профилей зависимости концентрации дувоглустата в тканях от времени использовали двухкомpartmentную модель с линейным выведением.

Точность подбора PK-модели для дувоглустата показана на фигурах 13А и 13В. Конечные смоделированные PK-параметры дувоглустата в плазме крови и тканях показаны в таблице 2.

Таблица 2

PK-параметр	Типичные значения (CV, %)
Объем распределения (V; л)	44,5 (7,41)
Системный клиренс (CL; л/ч.)	9,44 (6,99)
Константа скорости всасывания (K_a ; 1/ч.)	1,10 (14,0)
Периферический объем распределения (V ₂ ; л)	8,68 (19,39)
Клиренс в центральном компартменте (CL ₂ ; л/ч.)	0,205 (23,7)
Межкомпартментный объем распределения (VQ; л)	61,8 (21,2)
Константа скорости выведения (K_{eo})	0,378 (11,1)
Межкомпартментный объем распределения в центральной компартменте (VQ ₂ ; л)	3390
Клиренс в периферическом компартменте (CL ₃ ; л/ч.)	88,0 (7,72)
Кажущийся межкомпартментный клиренс (CLQ; л/ч.)	40,6 (10,6)
Время запаздывания (ч.)	0,176 (30,7)
Относительная среднеквадратическая погрешность для центрального компартмента	0,477 (6,56)
Относительная среднеквадратическая погрешность для периферического компартмента	0,368 (8,19)

CV: коэффициент изменчивости

Популяционную PK-модель для миглустата конструировали с учетом перорального введения доз мышам с нокаутом (КО) *Gaa*. Популяционные PK-параметры миглустата у мышей с КО *Gaa* представлены в таблице 3. Точность подбора показана на фигуре 14. Модель имела остаточную аддитивную погрешность, составляющую 0,475 нг/мл.

Таблица 3

PK-параметр	Типичные значения (BSV, %)
Константа скорости всасывания (K_a ; ч. ⁻¹)	2,09 (4,56)
Системный клиренс (CL; мл/ч.)	43,3 (9,61)
Центральный объем распределения (V _c ; мл)	4,55 (45,1)
Периферический клиренс (CL _d ; мл/ч.)	4,57 (32,1)
Периферический объем распределения (V ₂ ; мл)	19,6 (23,3)

BSV: межсубъектная изменчивость

Пример 9. Моделирование фармакокинетических параметров (PK) рекомбинантной кислой α -глюкозидазы (АТВ200) у людей

Фармакокинетические модели (пример 8) использовали для осуществления имитационных экспериментов и для предсказания профилей зависимости концентрации кислой α -глюкозидазы от времени у субъектов-людей с поздней стадией болезни Помпе после введения доз АТВ200. Аллометрическая функция позволяла установить связь веса тела с клиренсом и объемом распределения, и, следовательно, позволяла предсказать PK-параметры у типичных субъектов-людей с весом тела 70 кг. Модель подвергали индивидуальной адаптации путем включения скорости синтеза эндогенной кислой α -глюкозидазы у людей (Umapathysivam K, Hopwood JJ, Meikle PJ. Determination of acid alpha-glucosidase activity in blood spots as a diagnostic test for Pompe disease. *Clin Chem.* (2001) Aug; 47(8): 1378-83).

Было предсказано, что у людей однократная IV доза 20 мг/кг АТВ200, вводимая в течение 4 часов путем инфузии, приводит к получению профиля зависимости концентрации от времени, представленного на фигуре 15. PK-параметры у типичного человека весом 70 кг и параметры воздействия, полученные после IV инфузии АТВ200 в дозе 20 мг/кг в течение 4 ч., представлены в таблице 4.

Таблица 4

Фармакокинетический параметр	Предсказанное значение
Системный клиренс (CL; л/ч.)	0,768
Центральный объем распределения (V_c ; л)	1,09
Площадь под кривой, экстраполированная до бесконечности (AUC_{0-inf} ; мг·ч./л)	1822
Максимальная концентрация (C_{max} ; мг/л)	423
Время достижения максимальной концентрации (T_{max} ; ч.)	4
Период полувыведения ($T_{1/2}$; ч.)	2,17

Предсказанные значения системного клиренса (CL) и объема распределения (V) АТВ200 у типичного пациента весом 70 кг составляли соответственно 0,768 л/ч. и 2,41 л.

В соответствии с инструкцией по медицинскому применению препарата Lumizyme® (α-глюкозидазы-альфа) системный клиренс кислой α-глюкозидазы в неделю 52 после повторного введения доз Lumizyme® у пациентов с поздней стадией болезни Помпе составляет 601 мл/ч. (0,601 л/ч.), и период полувыведения Lumizyme® составляет 2,4 ч. Согласно вышеописанной модели ожидается, что системный клиренс АТВ200 у взрослых субъектов с болезнью Помпе будет примерно на 28% превышать системный клиренс, о котором сообщается для Lumizyme®. Кроме того, ожидается, что предсказанная АUC у людей после введения АТВ200 в дозе 20 мг/кг будет на приблизительно 25% меньшей (AUC_{0-inf}: 1822 мг·ч./л), чем АUC, о которой сообщается после введения Lumizyme® в дозе 20 мг/кг (~ 2700 мкг·ч./мл).

15 Пример 10. Модели зависимости воздействие-ответ применительно к снижению уровня гликогена

Мышам с нокаутом *Gaa* вводили кислую α-глюкозидазу (АТВ200) внутривенно в дозах 5, 10 и 20 мг/кг, возрастающие пероральные дозы миглустата (1, 3 и 10 мг/кг) одновременно с внутривенными дозами 5 или 10 мг/кг АТВ200 или 20 возрастающие пероральные дозы миглустата (1, 3, 5, 10, 20 и 30 мг/кг) одновременно с внутривенными дозами 20 мг/кг АТВ200. Уровни гликогена измеряли, как описано ранее (Khanna, R, Flanagan, JJ, Feng, J, Soska, R, Frascella, M, Pellegrino, LJ 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). Рассчитывали соотношения 25 уровней гликогена, наблюдаемых после каждой обработки в рамках комбинированной терапии, и уровня гликогена, наблюдаемого после монотерапии (соотношение уровней гликогена). Результаты представлены в таблице 5.

Таблица 5

Средства для лечения		Уровень гликогена (мкг/мг белка)				Соотношение (комбинированная терапия/моно терапия)
АТВ200 (мг/кг)	Миглустат (мг/кг)	Монотерапия	Комбинированная терапия		Медианное значение (N)	
		Исследование № 1, медианное значение (N)	Исследование № 2, медианное значение (N)	Исследование № 3, медианное значение (N)		
5	NA	307 (N=7)	NA	NA	307 (N=7)	NA
10	NA	259 (N=7)	NA	NA	259 (N=7)	NA
20	NA	157 (N=7)	NA	195 (N = 14)	181 (N=21)	NA
5	1	NA	323 (N=7)	NA	323 (N=7)	1,05
	3	NA	359 (N=6)	NA	359 (N=6)	1,17
	10	NA	352 (N=7)	NA	352 (N=7)	1,15
10	1	NA	273 (N=7)	NA	273 (N=7)	1,05
	3	NA	252 (N=7)	NA	252 (N=7)	0,973
	10	NA	278 (N=7)	NA	278 (N=7)	1,07
20	1	NA	154 (N=7)	NA	154 (N=7)	0,851
	3	NA	175 (N=7)	NA	175 (N=7)	0,967
	5	NA	NA	163 (N=14)	163 (N=14)	0,900
	10	NA	97 (N=6)	145 (N=13)	118 (N=19)	0,652
	20	NA	NA	122 (N=13)	122 (N=13)	0,674
	30	NA	167 (N=6)	175 (N=14)	170 (N=20)	0,939

Кроме того, на фигурах 15A - 15C показаны эффекты введения алглюкозидазы-альфа (Lumizyme®) и АТВ200 в отношении очищения от гликогена у мышей с нокаутом *Gaa*. Животным проводили два IV болюсных введения (один раз в две недели); ткани собирали через две недели после введения последней дозы и анализировали в отношении активности кислой α -глюкозидазы и содержания гликогена.

Как видно из результатов, представленных в таблице 5, было обнаружено, что АТВ200 дозозависимым образом истощает запасы гликогена в тканях у мышей с нокаутом гена кислой α -глюкозидазы (*Gaa*). Доза 20 мг/кг АТВ200 стабильно обеспечивала удаление большей доли запасенного гликогена у мышей с нокаутом *Gaa*, чем уровни дозы 5 и 10 мг/кг. Однако, как видно на фигурах 15А - 15С, АТВ200, вводимая в дозе 5 мг/кг, демонстрировала снижение уровня гликогена в сердечной и скелетных мышцах (четырёхглавой и трёхглавой мышцах) мыши, сходное с таковым для Lumizyme®, вводимым в дозе 20 мг/кг, тогда как АТВ200, вводимая в дозе 10 и 20 мг/кг, демонстрировала значительно лучшее снижение уровней гликогена в скелетных мышцах, чем Lumizyme®.

Кроме того, дозы 10 и 20 мг/кг миглустата, которые вводили совместно с АТВ200 в дозе 20 мг/кг, приводили к снижению уровней гликогена у мышей с нокаутом *Gaa* соответственно до 118 и 122 мкг/мг белка. Введение миглустата в дозе 30 мг/кг вызывало меньшее снижение уровня гликогена. Не ограничиваясь какой-либо теорией, полагают, что при более высоких концентрациях миглустата ингибирование кислой α -глюкозидазы в лизосомах может превышать благоприятный эффект шаперона, за счет чего уменьшается разложение гликогена в лизосомах.

Фармакокинетические модели (пример 8) использовали для предсказания воздействия кислой α -глюкозидазы и миглустата, согласованного во времени со значениями уровней гликогена в лизосомах тканей, представленными в таблице 5. Соотношения воздействий миглустата/АТВ200 в равновесном состоянии (AUC) (среднее воздействие в течение 24 часов) получали для каждой тестируемой комбинации средств для лечения, наносили на график в зависимости от соответствующего соотношения уровней гликогена (таблица 5), и эти данные аппроксимировали математической функцией. Кривая зависимости воздействие-ответ показана на фигуре 17.

Как видно из результатов на фигуре 17, совместное введение доз 10 и 20 мг/кг миглустата с дозой 20 мг/кг АТВ200 обеспечивает хорошую стабильность

активной формы кислой α -глюкозидазы в плазме крови с максимальным снижением при этом уровня гликогена. Более низкие дозы миглустата (1, 3 и 5 мг/кг), как полагают, приводят к субоптимальной стабилизации активной формы кислой α -глюкозидазы, тогда как наиболее высокая доза миглустата (30 мг/кг), как полагают, приводит к чрезмерному ингибированию активной формы α -глюкозидазы в лизосомах.

Согласно фармакокинетическим моделям (пример 8) ожидается, что наблюдаемое соотношение AUC миглустата/АТВ200, составляющее 0,01159 (10 мг/кг миглустата при совместном введении с 20 мг/кг АТВ200), будет соответствовать дозе миглустата, составляющей приблизительно 270 мг, при совместном введении с 20 мг/кг АТВ200 у типичного человека весом 70 кг. Соотношения AUC, составляющие 0,01 и 0,02, будут соответствовать дозам миглустата 233 и 466 мг соответственно при совместном введении с 20 мг/кг АТВ200 у типичного субъекта весом 70 кг.

15 Пример 11. Моделирование концентраций миглустата/дувоглустата у людей

Фармакокинетические модели (пример 8) использовали для предсказания продолжительности периода, в течение которого концентрации дувоглустата (заменителя миглустата) в плазме крови или ткани будут оставаться на уровне выше IC_{50} (концентрации, обеспечивающей 50% ингибирование активности кислой α -глюкозидазы от максимально возможного) миглустата в плазме крови и лизосомах. Ингибирование активной формы кислой α -глюкозидазы определяли с помощью способов, описанных ранее (Flanagan JJ, Rossi B, Tang K, Wu X, Mascioli K, et al. (2009) «The pharmacological chaperone 1-deoxynojirimycin increases the activity and lysosomal trafficking of multiple mutant forms of acid alpha-glucosidase.» Hum Mutat 30: 1683-1692). Было определено, что значение IC_{50} миглустата при pH плазмы крови (pH 7,0) составляет 170 мкг/л, тогда как значение IC_{50} при pH лизосомного компартмента (pH 5,2) было определено как составляющее 377 мкг/л.

Результаты предсказания на основе модели представлены в таблице 6. Предсказанные профили зависимости концентрации миглустата в плазме крови и лизосомах после повторного введения доз от времени показаны соответственно на фигурах 17 и 18.

5 *Таблица 6*

Доза миглустата (мг)	Время > IC ₅₀ (ч.)	
	Плазма крови (pH 7,0)	Лизосомы (pH 5,2)
100	13,1	0
150	15,0	0
200	16,4	1,19
233	17,2	2,96
250	17,5	3,58
270	17,9	4,15
300	18,4	4,92
466	20,7	8,04
600	22,0	9,96
699	22,8	11,2

С учетом результатов, представленных в таблице 6 и на фигурах 17 и 18, ожидается, что доза 260 мг миглустата будет обеспечивать связывание и стабилизацию АТВ200 в плазме крови в течение периода до 18 часов, тогда как
 10 ингибирование активной формы кислой α -глюкозидазы в лизосомах, как ожидается, будет продолжаться только 4 часа.

Пример 12. Физиологические и морфологические характеристики мышц у мышей с нокаутом *Gaa*

Мышам с нокаутом *Gaa* проводили два IV болюсных введения рекомбинантной
 15 кислой α -глюкозидазы человека (алглюкозидазы-альфа или АТВ200) в дозе 20 мг/кг один раз в две недели. Миглустат вводили перорально в дозировке 10 мг/кг подгруппе животных, которых обрабатывали с помощью АТВ200, за 30 мин. до введения АТВ200. Контрольных мышей обрабатывали только инертной средой. Ткань камбаловидной мышцы, четырехглавой мышцы и
 20 диафрагмы собирали через две недели после введения последней дозы

- рекомбинантной кислой α -глюкозидазы человека. Ткань камбаловидной мышцы и диафрагмы анализировали в отношении уровней гликогена путем окрашивания реактивом Шиффа и йодной кислотой (PAS) и в отношении пролиферации лизосом путем измерения уровней маркерного мембранного белка, ассоциированного с лизосомами (LAMP1), экспрессия которого повышается при болезни Помпе. Полутонкие срезы четырехглавой мышцы, залитые в эпоксидную смолу (Epon), окрашивали метиленовым синим и исследовали с помощью электронной микроскопии (1000x) для определения степени наличия вакуолей. Образцы четырехглавой мышцы анализировали иммуногистохимическим способом для определения уровней маркеров аутофагии легкой цепи 3 ассоциированного с микротрубочками белка 1A/1B, конъюгированной с фосфатидилэтаноламином (LC3A II), и p62, инсулинзависимого переносчика глюкозы GLUT4 и инсулиннезависимого переносчика глюкозы GLUT1.
- 15 В аналогичном исследовании мышам с нокаутом *Gaa* проводили четыре IV болюсных введения рекомбинантной кислой α -глюкозидазы человека (алглюкозидазы-альфа или ATB200) в дозе 20 мг/кг один раз в две недели. Миглустат вводили перорально в дозировке 10 мг/кг подгруппе животных, которых обрабатывали с помощью ATB200, за 30 мин. до введения ATB200.
- 20 Контрольных мышей обрабатывали только инертной средой. Сердечную мышечную ткань собирали через две недели после введения последней дозы рекомбинантной кислой α -глюкозидазы человека и анализировали в отношении уровней гликогена путем окрашивания реактивом Шиффа и йодной кислотой (PAS) и в отношении пролиферации лизосом путем измерения уровней LAMP1.
- 25 Как видно на фигуре 20, при введении ATB200 демонстрировалось снижение пролиферации лизосом в сердечной мышечной ткани, ткани диафрагмы и скелетной мышечной ткани (ткани камбаловидной мышцы) в сравнении с традиционной обработкой алглюкозидазой-альфа, а при совместном введении миглустата с ATB200 демонстрировалось значительно большее снижение
- 30 пролиферации лизосом, приближающееся к уровням, наблюдаемым у мышей

дикого типа (WT). Кроме того, как видно на фигуре 21, при введении АТВ200 демонстрировалось снижение уровней гликогена в виде точечных отложений в сердечной и скелетной мышечной ткани (ткани камбаловидной мышцы) в сравнении с традиционной обработкой алглукозидазой-альфа, а при совместном введении миглустата с АТВ200 демонстрировалось значительно большее снижение, в этом случае также приближающееся к уровням, наблюдаемым у мышей дикого типа (WT).

Также, как видно на фигуре 22, при совместном введении миглустата с АТВ200 значительно снижалось число вакуолей в мышечном волокне четырехглавой мышцы у мышей с нокаутом *Gaa* в сравнении с необработанными мышами и мышами, обработанными алглукозидазой-альфа. Как видно на фигуре 23, уровни как LC3 II, так и p62 были увеличены у мышей с нокаутом *Gaa* в сравнении с мышами дикого типа, однако они значительно снижались при обработке с помощью АТВ200 и миглустата, что указывает на то, что увеличение аутофагии, ассоциированной с дефицитом кислой α -глюкозидазы, снижается при совместном введении АТВ200 и миглустата. Кроме того, уровни инсулинзависимого переносчика глюкозы GLUT4 и инсулиннезависимого переносчика глюкозы GLUT1 были увеличены у мышей с нокаутом *Gaa* в сравнении с мышами дикого типа, однако в этом случае также значительно снижались при обработке с помощью АТВ200 и миглустата. Повышенные уровни GLUT4 и GLUT1, ассоциированные с дефицитом кислой α -глюкозидазы, могут способствовать увеличению поглощения глюкозы мышечными волокнами и увеличению синтеза гликогена как в базальном состоянии, так и после приема пищи. Таким образом, было обнаружено, что комбинированная обработка с помощью АТВ200 и миглустата улучшает морфологические и физиологические характеристики скелетных мышц в мышинной модели болезни Помпе.

Пример 13. Токсичность АТВ200, вводимой совместно с миглустатом, у макаков-крабоедов

Ранее не участвовавших в экспериментах макаков-крабоедов из Камбоджи распределяли в группы дозирования, указанные в таблице 7. Обеспечивали акклиматизацию животных к помещению, где проводили исследование, в течение от 18 (самки) до 19 (самцы) дней. В последний день акклиматизации вес животных составлял от 2,243 кг до 5,413 кг, а их возраст составлял от 2 до 3 лет.

Таблица 7

Группа	Тестируемый препарат	Путь	Уровень дозы (мг/кг)	Концентрация дозы (мг/мл)	Число животных (самцы/самки)	Аутопсия в день 99 (самцы/самки)
1	Контроль (буфер для составления)	IV инфузия	0	0	4/4	4/4
2	Миглустат	NG	25	2,5	4/4	4/4
	АТВ200	IV инфузия	50	5		
3	Миглустат	NG	175	17,5	4/4	4/4
	АТВ200	IV инфузия	100	10		
4	Миглустат	NG	175	17,5	4/4	4/4
5	АТВ200	IV инфузия	100	10	4/4	4/4

NG: назогастральный

10 Тестируемые уровни дозы выбирали с учетом предыдущих исследований на отличных от человека приматах для получения значений воздействия (AUC), сравнимых с ожидаемыми клиническими значениями AUC у людей, которым вводили дозу 260 мг миглустата и 20 мг/кг АТВ200, или незначительно превышающих их (для группы введения 25 мг/кг миглустата и 50 мг/кг АТВ200),
 15 или примерно в 10 и 3 раза превышающих их (для групп введения 175 мг/кг миглустата и/или 100 мг/кг АТВ200), предсказанных на основе фармакокинетических моделей из примера 8 (соответственно примерно

20,9 ч·мкг/мл и примерно 1822 ч·мкг/мл). В предыдущих исследованиях на отличных от человека приматах было обнаружено, что IV доза 100 мг/кг АТВ200 дает в результате AUC, составляющую 5330 ч·мкг/мл, и пероральную дозу 175 мг/кг миглустата экстраполировали с получением AUC, составляющей 5 196 ч·мкг/мл.

АТВ200 составляли в 25 мМ натрий-фосфатном буфере с рН 6, содержащем 2,92 мг/мл хлорида натрия, 20 мг/мл маннита и 0,5 мг/мл полисорбата 80 (буфере для составления). Тестируемый препарат (АТВ200 или миглустат) и контрольный препарат/инертную среду (буфер для составления) вводили один 10 раз в две недели в течение 13 недель, начиная с дня 1 и заканчивая днем 85. АТВ200 и контрольный препарат/инертную среду вводили посредством 2-часовой (± 10 минут) внутривенной (IV) инфузии в дозах 0 мг/кг (группа 1, контрольный препарат), 50 мг/кг (группа 2) или 100 мг/кг (группы 3 и 5). Миглустат вводили назогастрально в стерильной воде для инъекций, 15 соответствующей требованиям USP, в дозах 25 мг/кг (группа 2) или 175 мг/кг (группы 3 и 4) за 30 минут (± 2 минуты) до начала инфузии АТВ200, если их давали в комбинации. Объем вводимой дозы во всех группах составлял 10 мл/кг.

Параметры, оцениваемые в ходе прижизненной фазы исследования, включали показатели веса тела, потребление пищи, данные клинических наблюдений, 20 подробных клинических наблюдений, физикальных осмотров, электрокардиографического исследования, офтальмологических оценок, клинической лабораторной диагностики (общего анализа крови, анализа на свертываемость, биохимического анализа сыворотки крови), оценку уровня антител к лекарственному средству (ADA), оценку уровня нейтрализующих 25 ADA, данные общего анализа мочи, а также токсикокинетические характеристики (ТК) миглустата и активной формы и общего белка АТВ200 в плазме крови. Посмертную аутопсию животных осуществляли в день 99 (через 14 дней после введения последней дозы). При аутопсии регистрировали макроскопические наблюдения и показатели веса органов, и ткани собирали для 30 микроскопического исследования.

Все животные доживали до момента запланированной эвтаназии, и не наблюдалось изменений, связанных с введением АТВ200, миглустата или с совместным введением АТВ200 и миглустата, в ходе физикальных осмотров или в ходе оценки потребления пищи, клинических наблюдений, подробных 5 клинических наблюдений, показателей веса тела, офтальмологических показателей или параметров ECG. Кроме того, не наблюдалось связанных с АТВ200, миглустатом или комбинацией АТВ200/миглустат изменений параметров общего анализа мочи, биохимического анализа сыворотки крови, общего анализа крови или анализа на свертываемость или в ходе оценки 10 макроскопических наблюдений, показателей веса органов или гистопатологических характеристик.

Общие уровни антител к лекарственному средству (ADA) и нейтрализующих антител (NAb)

Общие уровни антител к лекарственному средству (ADA) и нейтрализующих 15 антител (NAb) измеряли в плазме крови. Образцы крови (примерно 1,6 мл) собирали в пробирки с K₂EDTA у всех животных один раз в ходе акклиматизации, перед введением дозы (до введения миглустата) и в дни 1, 85 и 99. Образцы выдерживали в жидком льду до обработки. Плазму крови получали путем центрифугирования при температуре от 2°C до 8°C, и аликвоты (примерно 20 0,2 мл) переносили в полипропиленовые флаконы и хранили в замороженном состоянии при температуре от -60°C до -86°C в течение одного часа с момента взятия крови. Анализ образцов в отношении ADA проводили с использованием образцов, собранных у животных из групп 1, 2, 3 и 5 (образцы, полученные от животных, которым вводили только миглустат, не анализировали). Анализ 25 нейтрализующих антител проводили с помощью ферментного анализа с флуорогенным субстратом 4-метилумбеллиферил- α -D-глюкопиранозидом (4MU-Glc).

Все животные из групп дозирования АТВ200 (группы 2, 3 и 5) имели положительные результаты анализа в отношении антител к лекарственному

средству (ADA) в дни 85 и 99 (частота возникновения 100%). Титры находились в диапазоне от 25600 до 409600 в день 85 и от 51200 до 819200 в день 99. Явная тенденция к увеличению титров с увеличением уровня дозы АТВ200 не наблюдалась. Пять из 8 животных в группе 2 (50 мг/кг АТВ200 в комбинации с 25 мг/кг миглустата) имели положительные результаты анализа в отношении нейтрализующих антител (NAb) в дни 85 и 99. Два из 8 в группе 3 (100 мг/кг АТВ200 в комбинации с 175 мг/кг миглустата) имели положительные результаты анализа в отношении NAb в день 85, и 4 из 8 имели положительные результаты анализа в день 99. Два из 8 в группе 5 (100 мг/кг АТВ200 в качестве монотерапии) имели положительные результаты анализа в отношении NAb в день 85, и 3 из 8 имели положительные результаты анализа в день 99. Явный эффект ADA в отношении воздействия АТВ200 или других ТК-параметров не наблюдался.

Токсикокинетические характеристики АТВ200

15 Токсикокинетические характеристики АТВ200 измеряли в образцах крови, собранных в пробирки с K₂EDTA у животных в дни 1 и 85, в следующие моменты времени:

для групп 1, 2, 3 и 5: перед введением дозы (до введения миглустата); через 1 час после начала инфузии; через 2 часа после начала инфузии; через 2,5 часа после начала инфузии; через 3 часа после начала инфузии; через 4 часа после начала инфузии; через 6 часов после начала инфузии; через 12 часов после начала инфузии; через 26 часов после начала инфузии; через 168 часов после начала инфузии и через 336 часов после начала инфузии (собирали до введения дозы в день 15); и

25 для группы 4: перед введением дозы (до введения миглустата); через 1,5 часа после введения миглустата; через 2,5 часа после введения миглустата; через 3,5 часа после введения миглустата; через 4,5 часа после введения миглустата; через 6,5 часа после введения миглустата; через 12,5 часа после введения миглустата; через 26,5 часа после введения миглустата; через 168,5 часа после

введения миглустата и через 336,5 часа после введения миглустата (собирали до введения дозы в день 15).

Плазму крови получали путем центрифугирования при температуре от 2°C до 8°C, и аликвоты (примерно 0,1 мл) переносили в полипропиленовые флаконы и хранили в замороженном состоянии при температуре от -60°C до -86°C. Анализ активной формы кислой α -глюкозидазы АТВ200 и общего белка АТВ200 проводили с использованием образцов, полученных через 2 часа после введения дозы, от животных из группы 1 и всех образцов, собранных у животных из групп 2, 3 и 5. Уровень общего белка АТВ200 измеряли с помощью жидкостной хроматографии в сочетании с тандемной масс-спектрометрией (LC-MS/MS). Два сигнатурных пептида (ТРТТФФПК и VTSEGAGLQLQK) использовали в качестве показателя наличия АТВ200. Результаты для этих двух пептидов были стабильными, что указывает на то, что в анализируемых образцах плазмы крови присутствовала интактная АТВ200. Активную форму кислой α -глюкозидазы анализировали с использованием флуорогенного субстрата 4-метилумбеллиферил- α -D-глюкопиранозида (4MU-Glc).

Анализ токсикокинетических (ТК) данных осуществляли с использованием аудированных/верифицированных наборов данных (концентрация и время) от животных из групп 2, 3 и 5 с помощью программного обеспечения WinNonlin Phoenix версии 6.1 (Pharsight Corporation). Некомпаративный анализ данных о концентрации в плазме крови у отдельных субъектов применяли для оценки ТК-параметров активной формы кислой α -глюкозидазы и общего белка АТВ200 (по двум сигнатурным пептидам ТРТТФФПК и VTSEGAGLQLQK) после IV инфузии. Уровень дозы вводили в виде фактической дозы АТВ200 в мг, рассчитанной с учетом объема дозы, веса тела и средней концентрации дозы для каждого отдельного животного. Время начала каждого введения дозы (начало инфузии АТВ200) принимали равным нулю для всех профилей в режиме введения доз. Для всех анализов использовали номинальные значения времени сбора образцов. Площадь под кривыми зависимости концентрации в плазме крови от времени (AUC_{0-t}), полученную для АТВ200 (наборы данных анализа

уровня общего белка и активной формы), оценивали с помощью линейно-логарифмического метода трапеций. В основе регрессии, применяемой для оценки λ_z , лежали равномерно взвешенные данные о концентрации.

5 Для каждого набора данных о АТВ200 (полученного от двух сигнатурных пептидов в анализе общего АТВ200 и анализе активной формы АТВ200), рассчитывали следующие параметры:

- 10 • R^2 – квадрат коэффициента корреляции для линейной регрессии, применяемой для оценки $\lambda_{z\alpha}$. Применяется в случае, когда для определения конечной фазы (или конкретного диапазона времени) профиля зависимости концентрации от времени используется установленное число точек;
- R^2 скорр. – квадрат коэффициента корреляции для линейной регрессии, применяемой для оценки λ_z , скорректированный с учетом числа точек, используемых при оценке $\lambda_{z\beta}$. Применяется в случае, когда число точек, используемых для определения конечной фазы профиля зависимости
15 концентрации от времени, может варьироваться;
- число точек λ_z – число точек для линейного регрессионного анализа, используемое для оценки λ_z ;
- $\lambda_{z\alpha}$ – константа скорости выведения для первых трех моментов времени после t_{\max} ;
- 20 • $\lambda_{z\beta}$ – конечная константа скорости выведения;
- $t_{1/2\alpha}$ – период полувыведения по первым трем моментам времени после t_{\max} ;
- $t_{1/2\beta}$ – конечный период полувыведения из расчета λ_z ($0,693/\lambda_z$);
- t_{\max} – время достижения максимальной концентрации аналита в плазме крови;
- C_{\max} – максимальная наблюдаемая концентрация аналита в плазме крови;

- AUC_{0-t} – площадь под кривой зависимости концентрации в плазме крови от времени (AUC), измеренная от момента времени 0 (перед введением дозы) до момента времени определения последней поддающейся измерению концентрации;
- 5 • $AUC_{0-\infty}$ – AUC, экстраполированная до бесконечности времени;
- AUC_{ext} – часть AUC, экстраполированной до бесконечности времени, представленная как % от общей $AUC_{0-\infty}$;
- CL_T – общий клиренс (по $\lambda_{z\beta}$); из расчета общей дозы в мг по фактическому весу тела;
- 10 • CL_T/F – общий клиренс (из расчета $\lambda_{z\beta}$); из расчета общей дозы в мг по фактическому весу тела, деленный на биодоступную часть;
- V_{ss} – кажущийся объем распределения в равновесном состоянии;
- V_z – объем распределения в конечной фазе (из расчета $\lambda_{z\beta}$); из расчета общей дозы в мг по фактическому весу тела;
- 15 • V_z/F – объем распределения в конечной фазе (из расчета $\lambda_{z\beta}$); из расчета общей дозы в мг по фактическому весу тела, деленный на биодоступную часть; и
- соотношения накопления – $AR_{C_{max}}$ = соотношение значений C_{max} в день 85 и день 1; AR_{AUC} = соотношение значений AUC_{0-t} в день 85 и день 1.

Концентрации АТВ200 и ТК-параметры были сходными между самцами и
20 самками. Концентрации в плазме крови после 2-часовой IV инфузии АТВ200 в дозе 50 мг/кг в комбинации с 25 мг/кг миглустата поддавались измерению в пределах периода до 12-26 часов после введения дозы. При уровне дозы 100 мг/кг (со 175 мг/кг миглустата или без него) концентрации АТВ200 поддавались измерению в пределах периода до 26-168 часов после введения
25 дозы. Токсикокинетические параметры для однократной дозы (день 1) показаны в таблице 8.

Таблица 8

Группа	Обработка	Параметр	Единицы измерения	Анализ общего белка		Анализ активной формы
				ТТРТФФПК	VTSEGAG LQLQK	
2	50 мг/кг АТВ200 + 25 мг/кг миглустата	t_{\max}	ч.	2,00	2,00	2,06
		C_{\max}	мкг/мл	890	900	495
		AUC_{0-t}	ч. · мкг/мл	3060	3080	1700
		$t_{1/2\alpha}$	ч.	1,69	1,69	2,01
		$t_{1/2\beta}$	ч.	1,70	1,71	1,92
		CL_T	л/ч.	0,058	0,058	0,106
		V_{ss}	л	0,145	0,144	0,266
		V_z	л	0,144	0,143	0,296
3	100 мг/кг АТВ200 + 175 мг/кг миглустата	t_{\max}	ч.	2,00	2,00	2,25
		C_{\max}	мкг/мл	1960	1980	1150
		AUC_{0-t}	ч. · мкг/мл	10400	10400	6130
		$t_{1/2\alpha}$	ч.	2,77	2,77	3,07
		$t_{1/2\beta}$	ч.	2,72	2,70	2,54
		CL_T	л/ч.	0,034	0,034	0,057
		V_{ss}	л	0,140	0,140	0,231
		V_z	л	0,133	0,133	0,210
5	100 мг/кг АТВ200 в качестве монотерапии	t_{\max}	ч.	1,88	1,88	1,94
		C_{\max}	мкг/мл	1690	1670	1270
		AUC_{0-t}	ч. · мкг/мл	5490	5410	3230
		$t_{1/2\alpha}$	ч.	1,56	1,55	1,28
		$t_{1/2\beta}$	ч.	11,1	6,29	1,71
		CL_T	л/ч.	0,105	0,105	0,140
		V_{ss}	л	0,171	0,149	0,168
		V_z	л	0,729	0,401	0,383

Токсикокинетические параметры для повторного введения доз (день 85) показаны в таблице 9.

Таблица 9

Группа	Обработка	Параметр	Единицы измерения	Анализ общего белка		Анализ активной формы	
				ТТРТФФПК	VTSEGA GLQLQK	АТВ200	
2	50 мг/кг АТВ200 25 мг/кг миглустата	+	t_{max}	ч.	2,00	2,00	2,13
			C_{max}	МКГ/МЛ	927	921	586
			AUC_{0-t}	ч. · МКГ/МЛ	3700	3700	2390
			$t_{1/2\alpha}$	ч.	1,98	1,95	2,35
			$t_{1/2\beta}$	ч.	2,38	2,40	2,31
			CL_T	л/ч.	0,049	0,049	0,076
			V_{ss}	л	0,147	0,147	0,223
			V_z	л	0,168	0,168	0,254
3	100 мг/кг АТВ200 175 мг/кг миглустата	+	t_{max}	ч.	2,13	2,19	2,06
			C_{max}	МКГ/МЛ	2270	2270	1600
			AUC_{0-t}	ч. · МКГ/МЛ	13900	13800	9240
			$t_{1/2\alpha}$	ч.	3,62	3,72	3,34
			$t_{1/2\beta}$	ч.	4,83	4,83	2,90
			CL_T	л/ч.	0,027	0,027	0,040
			V_{ss}	л	0,140	0,140	0,186
			V_z	л	0,174	0,174	0,165
5	100 мг/кг АТВ200 качестве монотерапии	в	t_{max}	ч.	2,13	2,13	2,00
			C_{max}	МКГ/МЛ	2020	2010	1510
			AUC_{0-t}	ч. · МКГ/МЛ	7830	7790	4890
			$t_{1/2\alpha}$	ч.	1,93	1,88	1,44
			$t_{1/2\beta}$	ч.	6,62	2,63	2,03
			CL_T	л/ч.	0,045	0,045	0,070
			V_{ss}	л	0,143	0,127	0,159
			V_z	л	0,396	0,170	0,205

5
 Время достижения максимальной концентрации АТВ200 в плазме крови (t_{max}) составляло примерно 2 часа после введения дозы во всех трех группах дозирования. Концентрации АТВ200 в плазме крови и ТК-параметры в день 1 и день 85, измеренные в анализе общего белка АТВ200, были стабильными для двух оцениваемых сигнатурных пептидов ТТРТФФПК и VTSEGA GLQLQK.

Воздействие, измеренное по C_{\max} и AUC_{0-t} , было относительно более слабым при измерении в анализе активной формы кислой α -глюкозидазы. Этого и следовало ожидать, поскольку в анализе общего белка измеряли концентрацию как активного, так и неактивного фермента, тогда как в анализе активной формы кислой α -глюкозидазы измеряли концентрацию только активного фермента.

Воздействие АТВ200 увеличивалось с возрастанием дозы при уровнях дозы от 50 до 100 мг/кг. Среднее значение начального $t_{1/2\alpha}$ в день 1 (объединенные данные от самцов и самок) по первым трем моментам времени после t_{\max} находилось в диапазоне от 1,28 до 3,07 часа. Среднее значение конечного периода полувыведения ($t_{1/2\beta}$) в день 1 находилось в диапазоне от 1,70 до 11,1 часа (на более высокие значения $t_{1/2\beta}$ у животных влияли концентрации, поддающиеся измерению в пределах периода до 168 часов после введения дозы). Сходный диапазон значений наблюдали после введения дозы в день 85. При повторном введении один раз в две недели наблюдали накопление в небольшом количестве или его отсутствие. Добавление 175 мг/кг миглустата к дозе 100 мг/кг АТВ200, по-видимому, снижает клиренс АТВ200 и увеличивает ее воздействие в плазме крови примерно в 2 раза в сравнении со 100 мг/кг АТВ200 в качестве монотерапии.

Поскольку нежелательные изменения, связанные с тестируемым препаратом, не были идентифицированы, то уровень дозы, не вызывающей обнаруживаемых нежелательных эффектов (NOAEL), для АТВ200, даваемой макакам-крабоедам один раз в две недели в течение 13 недель посредством 2-часовой инфузии при введении миглустата или без него, составлял 100 мг/кг/инфузия, что было наиболее высокой тестируемой дозировкой. При данном уровне дозы усредненные по полу средние значения AUC_{0-t} и C_{\max} (общий белок) в день 85 составляли соответственно 7830 (ТТРТФФПК) и 7790 (VTSEGAGLQLQK) ч·мкг/мл и 2020 (ТТРТФФПК) или 2010 (VTSEGAGLQLQK) мкг/мл для АТВ200 в отдельности и соответственно 13900 (ТТРТФФПК) или 13800 (VTSEGAGLQLQK) ч·мкг/мл и 2270 (оба пептида) мкг/мл для комбинации со 175 мг/кг миглустата.

Токсикокинетические характеристики миглустата

Токсикокинетические характеристики миглустата измеряли в образцах крови, собранных в пробирки с K₂EDTA у животных в дни 1 и 85, в следующие моменты времени:

5 для групп 1, 2, 3 и 5: перед введением дозы (до введения миглустата); через 15 минут после введения миглустата; в 0 часов (до начала инфузии); через 0,5 часа после начала инфузии; через 1 час после начала инфузии; через 2 часа после начала инфузии; через 4 часа после начала инфузии; через 6 часов после начала инфузии; через 12 часов после начала инфузии; через 26 часов после
10 начала инфузии; через 50 часов после начала инфузии и через 74 часа после начала инфузии; и

для группы 4: перед введением дозы (до введения миглустата); через 15 минут после введения миглустата; через 30 минут после введения миглустата; через 1 час после введения миглустата; через 1,5 часа после введения миглустата;
15 через 2,5 часа после введения миглустата; через 4,5 часа после введения миглустата; через 6,5 часа после введения миглустата; через 12,5 часа после введения миглустата; через 26,5 часа после введения миглустата; через 50,5 часа после введения миглустата и через 74,5 часа после введения миглустата.

Плазму крови получали путем центрифугирования при температуре от 2°C до
20 8°C, и аликвоты (примерно 0,2 мл) переносили в полипропиленовые флаконы и хранили в замороженном состоянии при температуре от -60°C до -86°C. Анализ концентрации миглустата проводили с помощью способа LC-MS/MS, аналогичного описанному в отношении анализа концентрации дувоглустата в
25 Richie Khanna, Allan C. Powe Jr., Yi Lun, Rebecca Soska, Jessie Feng, Rohini Dhulipala, Michelle Frascella, Anadina Garcia, Lee J. Pellegrino, Su Xu, Nстры Brignol, Matthew J. Toth, Hung V. Do, David J. Lockhart, Brandon A. Wustman, Kenneth J. Valenzano. «The Pharmacological Chaperone AT2220 Increases the Specific Activity and Lysosomal Delivery of Mutant Acid Alpha-Glucosidase, and

Promotes Glycogen Reduction in Transgenic Mouse Model of Pompe Disease.» PLOS ONE (1 July 2014) 9(7): e102092.

Анализ токсикокинетических (ТК) данных для миглустата осуществляли с использованием аудированных/верифицированных наборов данных (концентрация и время) от животных из групп 2, 3 и 4 с помощью программного обеспечения WinNonlin Phoenix® версии 6.1 (Pharsight Corporation). Некомпаратментный анализ индивидуальных данных о концентрации в плазме крови применяли для оценки ТК-параметров. ТК-параметры миглустата оценивали с помощью линейно-логарифмического метода трапеций. В основе регрессии, применяемой для оценки λ_z , лежали равномерно взвешенные данные о концентрации. Рассчитывали следующие параметры:

- R^2 скорр. – квадрат коэффициента корреляции для линейной регрессии, применяемой для оценки λ_z , скорректированный с учетом числа точек, используемых при оценке λ_z . Применяется в случае, когда число точек, используемых для определения конечной фазы профиля зависимости концентрации от времени, может варьироваться;
- число точек λ_z – число точек для линейного регрессионного анализа, используемое для оценки λ_z ;
- λ_z – конечная константа скорости выведения;
- $t_{1/2}$ – конечный период полувыведения из расчета $\lambda_z (0,693/\lambda_z)$;
- t_{\max} – время достижения максимальной концентрации аналита в плазме крови;
- C_{\max} – максимальная наблюдаемая концентрация аналита в плазме крови;
- AUC_{0-t} – площадь под кривой зависимости концентрации в плазме крови от времени (AUC), измеренная от момента времени 0 (перед введением дозы) до момента времени определения последней поддающейся измерению концентрации;

- $AUC_{0-\infty}$ – AUC , экстраполированная до бесконечности времени;
 - AUC_{ext} – часть AUC , экстраполированной до бесконечности, представленная как % от общей $AUC_{0-\infty}$;
 - L_T/F – общий клиренс, деленный на биодоступную часть, из расчета общей дозы в мг по фактическому весу тела;
 - V_z/F – объем распределения в конечной фазе, деленный на биодоступную часть, из расчета общей дозы в мг по фактическому весу тела;
 - соотношения накопления – $AR_{C_{max}}$ = соотношение значений C_{max} в день 85 и день 1; и AR_{AUC} = соотношение значений AUC_{0-t} в день 85 и день 1.
- 10 Стабильный эффект пола в отношении ТК-параметров миглустата не наблюдался. Концентрации миглустата в плазме крови после назогастрального (NG) введения 25 мг/кг в комбинации с 50 мг/кг АТВ200 либо NG введения 175 мг/кг (со 100 мг/кг АТВ200 или без него) поддавались измерению в пределах периода 74,5 часа (последний момент времени измерения). Токсикокинетические
- 15 параметры для однократной дозы (день 1) и для повторного введения доз (день 85) показаны в таблице 10.

Таблица 10

Группа	Обработка	Параметр	Единицы измерения	Анализ миглустата	
				День 1	День 85
2	50 мг/кг АТВ200 + 25 мг/кг миглустата	t_{max}	ч.	2,06	2,88
		C_{max}	нг/мл	7430	7510
		AUC_{0-t}	ч. · нг/мл	47300	49100
		$t_{1/2}$	ч.	7,44	8,23
		CL_T/F	л/ч.	1,92	1,99
		V_z/F	л	20,5	23,3
3	100 мг/кг АТВ200 +	t_{max}	ч.	2,69	3,56
		C_{max}	нг/мл	20400	22000

Группа	Обработка	Параметр	Единицы измерения	Анализ миглустата	
				День 1	День 85
	175 мг/кг миглустата	AUC _{0-t}	ч. · нг/мл	182000	216000
		t _{1/2}	ч.	6,85	7,86
		CL _{T/F}	л/ч.	3,22	3,62
		V _{Z/F}	л	32,3	39,1
		t _{max}	ч.	3,00	4,13
4	175 мг/кг миглустата в качестве монотерапии	C _{max}	нг/мл	16400	14700
		AUC _{0-t}	ч. · нг/мл	173000	204000
		t _{1/2}	ч.	6,86	6,66
		CL _{T/F}	л/ч.	3,67	3,49
		V _{Z/F}	л	35,9	33,8
		t _{max}	ч.	3,00	4,13

Значение t_{max} находилось в диапазоне от примерно 2 до 4 часов после введения дозы. Воздействие миглустата увеличивалось с возрастанием дозы при уровнях дозы от 25 до 175 мг/кг. Среднее значение t_{1/2} (объединенные данные от самцов и самок) было стабильным в дни 1 и 85 и находилось в диапазоне от 6,66 до 8,23 часов. При повторном NG введении один раз в две недели наблюдали накопление в небольшом количестве или его отсутствие. Заметный эффект от совместного введения с АТВ200 в отношении общего воздействия миглустата (т. е. AUC_{0-t}) или ТК-параметров не наблюдался.

10 Поскольку нежелательные изменения, связанные с тестируемым препаратом, не были идентифицированы, то уровень дозы, не вызывающей обнаруживаемых нежелательных эффектов (NOAEL), для миглустата, даваемого макакам-крабоедам один раз в две недели в течение 13 недель назогастралью при введении АТВ200 или без него, составлял 175 мг/кг/доза, что было наиболее

15 высокой тестируемой дозировкой. При данном уровне дозы усредненные по полу средние значения AUC_{0-t} и C_{max} в день 85 составляли соответственно 204000 ч. · нг/мл и 14700 нг/мл для миглустата в отдельности и соответственно 216000 ч. · нг/мл и 22000 нг/мл для комбинации со 100 мг/кг АТВ200.

Пример 14. Протокол клинического исследования рекомбинантной кислой α -глюкозидазы (АТВ200), вводимой в отдельности и вводимой совместно с миглустатом

План исследования

5 Это открытое исследование с фиксированной последовательностью приема препаратов с нарастающими дозами, впервые проводимое с участием человека, для оценки безопасности, переносимости и фармакокинетических параметров (РК) рекомбинантной кислой α -глюкозидазы (АТВ200, лиофилизированный порошок, разведенный в стерильной воде для инъекций и разбавленный 0,9% хлоридом натрия для инъекций) для внутривенного (IV) введения в отдельности и при совместном введении с миглустатом для перорального применения (твердые желатиновые капсулы по 65 мг). Исследование проводится в 2 стадии. На стадии 1 оценивают безопасность, переносимость и РК после введения последовательных однократных нарастающих доз АТВ200 каждые 2 недели в виде примерно 4-часовой внутривенной инфузии в течение 3 периодов введения доз при 5, 10 и 20 мг/кг. На стадии 2 оценивают безопасность, переносимость и РК после введения комбинаций однократных и многократных нарастающих доз: 3 дозы по 20 мг/кг АТВ200 при совместном введении каждые 2 недели со 130 мг миглустата (две капсулы по 65 мг), принимаемого перорально за 1 час до проведения примерно 4-часовой внутривенной инфузии АТВ200, а затем 3 дозы по 20 мг/кг АТВ200 при совместном введении с 260 мг миглустата (четыре капсулы по 65 мг), принимаемого перорально за 1 час до проведения примерно 4-часовой внутривенной инфузии АТВ200.

В стадию 1 включают двенадцать субъектов с болезнью Помпе (примерно 6 амбулаторных и 6 неамбулаторных), получающих заместительную ферментную терапию (ERT). Эти же субъекты продолжают исследование на стадии 2. До включения неамбулаторных субъектов включают по меньшей мере 4 амбулаторных субъектов и вводят им дозы. Субъекты (амбулаторные), получавшие ERT, определяются как субъекты, которые получали ERT в течение

2-6 лет до включения, способны пройти по меньшей мере 200 метров в тесте с шестиминутной ходьбой (6MWT) и имеют показатель FVC, составляющий 30-80% от предсказанного нормального значения. Субъекты (неамбулаторные), получавшие ERT, определяются как субъекты, которые полностью прикованы к инвалидной коляске, неспособны ходить без посторонней помощи и получали ERT в течение ≥ 2 лет до включения. Распределение в группы лечения показано в таблице 11.

Таблица 11

Число субъектов	Популяция: получавшие ERT	Стадия 1			Стадия 2	
		Период 1 Однократная доза	Период 2 Однократная доза	Период 3 Однократная доза	Период 4 Совместное введение многократных доз	Период 5 Совместное введение многократных доз
12	~ 6 амбулаторных, ~ 6 неамбулаторных	5 мг/кг АТВ200	10 мг/кг АТВ200	20 мг/кг АТВ200	20 мг/кг АТВ200 + 130 мг миглустата	20 мг/кг АТВ200 + 260 мг миглустата

ERT = заместительная ферментная терапия.

10 Субъектам необходимо воздерживаться от приема пищи в течение по меньшей мере 2 часов до введения миглустата для перорального применения и 2 часов после него. IV введение АТВ200 следует начинать через 1 час после перорального введения миглустата.

Процедуры, предусмотренные исследованием

15 Исследование состоит из скрининга, определения исходного уровня, стадии 1 (в 3 периодах, с фиксированной последовательностью приема препаратов, с однократной нарастающей дозой АТВ200 в отдельности) и стадии 2 (в 2 периодах, с фиксированной последовательностью приема препаратов, с многократными дозами 20 мг/кг АТВ200, вводимыми совместно с
20 многократными нарастающими дозами миглустата).

Скрининг

Все субъекты предоставляют информированное согласие и проходят осмотр для определения соответствия критериям отбора. Оценки для всех субъектов охватывают медицинский анамнез, в том числе предшествующие реакции, связанные с инфузией (IAR), и случаи падения в анамнезе; рассмотрение получаемых ранее и сопутствующих лекарственных препаратов и немедикаментозных видов терапии; показатели жизненно важных функций (частота сердечных сокращений [HR], частота дыхания [RR], кровяное давление [BP] и температура); рост; вес; комплексный физикальный осмотр (PE); электрокардиограмму в 12 отведениях (ECG); клинико-лабораторные оценки безопасности (биохимический анализ сыворотки крови, общий анализ крови и общий анализ мочи); тест для диагностики беременности путем анализа мочи; оценку уровня тетрасахарида гексозы в образце мочи (Hex4) и генотипирование по *GAA* (для субъектов, для которых на момент скрининга не было возможности получить отчет о генотипировании по *GAA*). Также при необходимости получают образец крови для оценки иммуногенности путем поискового исследования (общие и нейтрализующие антитела, поисковое исследование уровней цитокинов/других биомаркеров активации иммунной системы, перекрестная реактивность с алглюкозидазой-альфа и уровень иммуноглобулина E [IgE]). Субъекта, который соответствует всем критериям включения и ни одному из критериев исключения, переводят на стадию 1, описанную в таблице 11.

Определение исходного уровня

Оценки безопасности для всех субъектов охватывают рассмотрение критериев отбора; медицинский анамнез, в том числе реакции, связанные с инфузией (IAR), и случаи падения в анамнезе, изучение нежелательных явлений (AE) и серьезных AE (SAE), рассмотрение получаемых ранее и сопутствующих лекарственных препаратов и немедикаментозных видов терапии; показатели жизненно важных функций (HR, RR, BP и температура); вес; беглый PE; ECG;

показатель по шкале жизнедеятельности при болезни Помпе, построенной с помощью анализа Раша (R-PAct); показатель по Роттердамской шкале инвалидизации и показатель по шкале оценки выраженности утомляемости; клинико-лабораторные оценки безопасности (биохимический анализ сыворотки крови, общий анализ крови и общий анализ мочи); тест для диагностики беременности путем анализа мочи; оценки фармакодинамических параметров (PD) (Hex4 и креатининфосфокиназа [СРК]); оценки иммуногенности (общие и нейтрализующие антитела, перекрестная реактивность антител с алглюкозидазой-альфа, поисковое исследование уровней цитокинов и других биомаркеров активации иммунной системы, перекрестная реактивность с алглюкозидазой-альфа и при необходимости уровень IgE); тесты легочных функций (PFT); тесты двигательных функций и тесты мышечной силы для всех субъектов.

Стадия 1, периоды 1, 2 и 3

15 Данная стадия охватывает следующее.

- Безопасность: рассмотрение АЕ, в том числе серьезных нежелательных явлений (SAE) и IAR; рассмотрение сопутствующих лекарственных препаратов и немедикаментозных видов терапии; показатели жизненно важных функций (HR, RR, BP и температура); беглый PE; ECG; клинико-лабораторные оценки безопасности (биохимический анализ сыворотки крови, общий анализ крови и общий анализ мочи) и тест для диагностики беременности путем анализа мочи

- PD: уровень Hex4 в моче и уровень СРК в сыворотке крови

- Иммунологические показатели: образцы крови для определения титров антител к рекомбинантной кислой α -глюкозидазе (титров общих и нейтрализующих антител к рекомбинантной кислой α -глюкозидазе и перекрестной реактивности антител с алглюкозидазой-альфа) и образцы крови для измерения уровней провоспалительных цитокинов и других биомаркеров активации иммунной системы. При необходимости также осуществляют измерения уровня IgE.

- 24-часовые фармакокинетические параметры (PK) при последовательном отборе образцов: в ходе периода 1 (визит 3, день 1), периода 2 (визит 4, день 15) и периода 3 (визит 5, день 29) отбор образцов крови для оценки уровней активной формы кислой α -глюкозидазы и концентраций общего белка кислой α -глюкозидазы в плазме крови проводят для всех субъектов.

Стадия 2, периоды 4 и 5

- Безопасность: рассмотрение АЕ, в том числе SAE и IAR; рассмотрение сопутствующих лекарственных препаратов и немедикаментозных видов терапии; показатели жизненно важных функций (HR, RR, BP и температура); вес; PE; ECG; клинико-лабораторные оценки безопасности (биохимический анализ сыворотки крови, общий анализ крови и общий анализ мочи) и тест для диагностики беременности путем анализа мочи

- PD: уровень Ncx4 в моче и уровень СРК в сыворотке крови

- Иммунологические показатели: образцы крови для определения титров антител к рекомбинантной кислой α -глюкозидазе (титров общих и нейтрализующих антител к рекомбинантной кислой α -глюкозидазе и перекрестной реактивности антител с алглюкозидазой-альфа) и образцы крови для измерения уровней провоспалительных цитокинов и других биомаркеров активации иммунной системы. При необходимости также осуществляют измерения уровня IgE.

- 24-часовые PK при последовательном отборе образцов: в ходе периода 4 (визит 6, день 43 и визит 8, день 71) и периода 5 (визит 9, день 85 и визит 11, день 113) отбор образцов крови для оценки уровней активной формы кислой α -глюкозидазы, концентраций общего белка кислой α -глюкозидазы и концентраций миглустата в плазме крови проводят для всех субъектов.

25 Завершение фазы исследования фармакокинетических параметров

- Безопасность: рассмотрение АЕ, в том числе SAE и IAR; рассмотрение сопутствующих лекарственных препаратов и немедикаментозных видов

терапии; показатели жизненно важных функций (HR, RR, BP и температура); вес; PE; ECG; клинико-лабораторные оценки безопасности (биохимический анализ сыворотки крови, общий анализ крови и общий анализ мочи) и тест для диагностики беременности путем анализа мочи

5 • PD: уровень Hex4 в моче и уровень СРК в сыворотке крови

• Иммунологические показатели: образцы крови для определения титров антител к рекомбинантной кислой α -глюкозидазе (титров общих и нейтрализующих антител к рекомбинантной кислой α -глюкозидазе и перекрестной реактивности антител с алглюкозидазой-альфа) и образцы крови для измерения уровней провоспалительных цитокинов и других биомаркеров активации иммунной системы. При необходимости также осуществляют измерения уровня IgE.

10

Субъекты, которые преждевременно прекращают участие в исследовании, приходят для визита досрочного прекращения и подвергаются всем оценкам, которые должны были быть осуществлены во время визита завершения исследования РК. Исследуемое лекарственное средство не вводят. Если любой из субъектов сигнальной когорты преждевременно прекращает участие в исследовании, то данного субъекта заменяет следующий амбулаторный субъект, включенный в исследование (например, если субъект 1 прекращает участие, то данного субъекта заменяет субъект 3 [амбулаторный] в качестве субъекта

15

20

сигнальной когорты).

Субъектам, которые завершили данное исследование, и/или другим субъектам, которые соответствуют установленным требованиям, предоставляется возможность участия в долгосрочном расширенном исследовании, и у них продолжают оценивать безопасность и переносимость АТВ200 при совместном

25

введении с миглустатом. Кроме того, в расширенном исследовании осуществляют функциональные оценки, касающиеся болезни Помпе, через равные интервалы.

Мониторинг безопасности

Мониторинг безопасности осуществляется медицинским наблюдателем и исследователями на постоянной основе, а также Комитетом по мониторингу безопасности (SSC) на регулярной основе.

5 *Сигнальное введение доз*

Первые 2 амбулаторных субъекта в данном исследовании являются субъектами сигнальной когорты данного исследования и являются первыми 2 субъектами, которым вводят дозу в каждом периоде исследования (периоды 1-5). В случае, если субъект сигнальной когорты преждевременно прекращает участие в исследовании, то его/ее заменяет другой амбулаторный субъект. Примечание: до того, как можно будет вводить дозу каким-либо неамбулаторным субъектам, по меньшей мере 4 амбулаторным субъектам вводят дозу 5 мг/кг АТВ200.

На стадии 1 (периоды 1, 2 и 3) субъектам вводят однократные нарастающие дозы АТВ200 (5 мг/кг [период 1], 10 мг/кг [период 2] и 20 мг/кг [период 3]).

15 После введения доз 2 субъектам сигнальной когорты в каждом периоде исследования на стадии 1 оценка доступных данных о безопасности (РЕ, показатели жизненно важных функций, АЕ, инфузионные реакции, ECG и доступные данные осуществляемых на местном уровне лабораторных тестов) осуществляется в пределах периода 24-48 часов медицинским наблюдателем и исследователями. SSC собирается для проведения формальной экспертизы безопасности, когда доступны данные о безопасности из центральной лаборатории для обоих субъектов сигнальной когорты при каждом уровне дозы. Если SSC определяет, что проблемы безопасности, которые не позволяют осуществлять введение доз при уровне дозы, соответствующем данному периоду, отсутствуют, то включают 10 дополнительных субъектов и вводят им дозы. SSC также собирается для проведения экспертизы безопасности, когда доступны данные о безопасности (в том числе данные о безопасности из

центральной лаборатории) для всех субъектов при всех 3 уровнях дозы на стадии 1.

На стадии 2 (периоды 4 и 5) вводят дозы 2 субъектам сигнальной когорты, и безопасность оценивают после введения первой дозы, как и для каждого периода на стадии 1. Если SSC определяет, что проблемы безопасности, которые не позволяют осуществлять дополнительное введение дозы 20 мг/кг АТВ200 при совместном введении со 130 мг миглустата (период 4) или 20 мг/кг АТВ200 при совместном введении с 260 мг миглустата (период 5), отсутствуют, то 10 дополнительных субъектов получают 3 дозы один раз в две недели при уровне дозы, соответствующем данному периоду. SSC повторно собирается, когда доступны все данные о безопасности (в том числе данные о безопасности из центральной лаборатории) для всех субъектов на момент завершения стадии 2. SSC также собирается специально в случае наличия SAE или идентифицированной проблемы безопасности.

15 SSC может рекомендовать любое из следующих заключений:

- продолжить исследование без изменений;
- продолжить исследование с внесением изменений (поправок);
- временно приостановить введение доз;
- окончательно прекратить введение доз.

20 Если, по мнению SSC, у субъектов сигнальной группы отсутствуют АЕ или проблемы безопасности, которые могут не позволять продолжать введение доз в рамках исследования, то введение доз будут продолжать для всех остальных субъектов при данном уровне дозы. Будет продолжать осуществляться тщательный мониторинг безопасности для субъектов медицинским наблюдателем и исследователями, проводящими данное исследование, на 25 постоянной основе и SSC через равные интервалы.

Число субъектов (планируемое)

В стадию 1 включают двенадцать взрослых субъектов с болезнью Помпе (примерно 6 амбулаторных и 6 неамбулаторных), получавших ERT. Эти же субъекты продолжают исследование на стадии 2.

5 Постановка диагноза и критерии отбора

Во время скринингового визита взрослых субъектов с болезнью Помпе, получавших ERT, оценивают с применением критериев отбора, изложенных ниже. Каждый субъект должен соответствовать всем критериям включения и ни одному из критериев исключения. Отказ от проверки на соответствие критериям
10 включения/исключения не допускается.

*Критерии включения***Субъекты, получавшие ERT (амбулаторные)**

1. Субъекты мужского и женского пола возрастом от 18 до 65 лет включительно;
2. Субъект должен предоставить подписанное информированное согласие до
15 проведения каких-либо процедур, связанных с исследованием;
3. Субъекты репродуктивного возраста должны дать согласие на использование принятых в медицине способов контрацепции в ходе исследования и в течение 30 дней после последнего совместного введения АТВ200 + миглустата;
4. У субъекта поставлен диагноз болезни Помпе на основании документально
20 подтвержденного дефицита ферментативной активности кислой α -глюкозидазы или согласно результатам генотипирования *GAA*;
5. Субъект получал ERT с применением алглюкозидазы-альфа в течение предыдущих 2-6 лет;
6. Субъект в настоящее время получает алглюкозидазу-альфа с частотой один
25 раз в две недели;

7. Субъект получал и завершил две последние инфузии без нежелательных явлений, связанных с приемом лекарственного средства, которые приводят к временному прекращению введения доз;

8. Субъект должен быть способен пройти 200-500 метров в 6MWT; и

5 9. Форсированная жизненная емкость легких (FVC) в положении стоя должна составлять от 30% до 80% от предсказанного нормального значения.

Субъекты, получавшие ERT (неамбулаторные)

10. Субъекты мужского и женского пола возрастом от 18 до 65 лет включительно;

10 11. Субъект должен предоставить подписанное информированное согласие до проведения каких-либо процедур, связанных с исследованием;

12. Субъекты репродуктивного возраста должны дать согласие на использование принятых в медицине способов контрацепции в ходе исследования и в течение 30 дней после последнего совместного введения АТВ200 + миглустата;

15 13. У субъекта поставлен диагноз болезни Помпе на основании документально подтвержденного дефицита ферментативной активности кислой α -глюкозидазы или согласно результатам генотипирования *GAA*;

14. Субъект получал ERT с применением алглюкозидазы-альфа в течение ≥ 2 лет;

20 15. Субъект в настоящее время получает алглюкозидазу-альфа с частотой один раз в две недели;

16. Субъект получал и завершил две последние инфузии без нежелательных явлений, связанных с приемом лекарственного средства, которые приводят к временному прекращению введения доз; и

17. Субъект должен быть полностью прикован к инвалидной коляске и неспособен ходить без посторонней помощи.

Критерии исключения

Субъекты, получавшие ERT (амбулаторные)

- 5 1. Субъект получал какое-либо исследуемое средство терапии болезни Помпе, отличное от алглюкозидазы-альфа, в пределах периода 30 дней до визита исходного уровня или согласно ожиданиям будет получать его в ходе исследования;
- 10 2. Субъект получал лечение с применением запрещенных лекарственных препаратов (миглитола (например, Glyset®); миглустата (например, Zavesca®); акарбозы (например, Precose®, Glucobay®); воглибозы (например, Volix®, Vocarb® и Volibo®); альбутерола и кленбутерола или любого исследуемого/экспериментального лекарственного средства) в пределах периода 30 дней до визита исходного уровня;
- 15 3. Для женщин — субъект на момент скрининга находится в состоянии беременности или осуществляет грудное вскармливание;
4. Субъект, будь то мужчина или женщина, планирует зачатие ребенка в ходе исследования;
5. Субъекту необходима инвазивная вспомогательная вентиляция легких;
- 20 6. Субъект использует неинвазивную вспомогательную вентиляцию легких \geq 6 часов в сутки в состоянии бодрствования;
7. У субъекта имеется медицинское или любое другое смягчающее состояние или обстоятельство, которое по мнению исследователя может представлять чрезмерный риск с точки зрения безопасности для субъекта или ставит под
25 сомнение его/ее способность соответствовать требованиям протокола;

8. У субъекта имеются случаи анафилактической реакции на алглюкозидазу-альфа в анамнезе;
9. У субъекта имеются случаи высоких устойчивых титров антител к рекомбинантной кислой α -глюкозидазе в анамнезе;
- 5 10. У субъекта имеются случаи аллергии или чувствительности к миглустату или другим иминосахарам в анамнезе;
11. У субъекта имеются известные случаи аутоиммунного заболевания, в том числе волчанки, аутоиммунного тиреоидита, склеродермии или ревматоидного артрита, в анамнезе; и
- 10 12. У субъекта имеются известные случаи бронхиальной астмы в анамнезе.

Субъекты, получавшие ERT (неамбулаторные)

13. Субъект получал какое-либо исследуемое средство терапии болезни Помпе, отличное от алглюкозидазы-альфа, в пределах периода 30 дней до визита исходного уровня или согласно ожиданиям будет получать его в ходе
- 15 исследования;
14. Субъект получал лечение с применением запрещенных лекарственных препаратов (миглитола (например, Glyset[®]); миглустата (например, Zavesca[®]); акарбозы (например, Precose[®], Glucobay[®]); воглибозы (например, Volix[®], Vocarb[®] и Volibo[®]); альбутерола и кленбутерола или любого
- 20 исследуемого/экспериментального лекарственного средства) в пределах периода 30 дней до визита исходного уровня;
15. Для женщин — субъект на момент скрининга находится в состоянии беременности или осуществляет грудное вскармливание;
16. Субъект, будь то мужчина или женщина, планирует зачатие ребенка в ходе
- 25 исследования;

17. У субъекта имеется медицинское или любое другое смягчающее состояние или обстоятельство, которое по мнению исследователя может представлять чрезмерный риск с точки зрения безопасности для субъекта или ставит под сомнение его/ее способность соответствовать требованиям протокола;

5 18. У субъекта имеются случаи анафилактической реакции на алглюкозидазу-альфа в анамнезе;

19. У субъекта имеются случаи высоких устойчивых титров антител к рекомбинантной кислоте α -глюкозидазы в анамнезе;

10 20. У субъекта имеются случаи аллергии или чувствительности к миглустату или другим иминосахарам в анамнезе;

21. У субъекта имеются известные случаи аутоиммунного заболевания, в том числе волчанки, аутоиммунного тиреоидита, склеродермии или ревматоидного артрита, в анамнезе; и

22. У субъекта имеются известные случаи бронхиальной астмы в анамнезе.

15 *Исследуемый препарат, дозировка и способ введения*

Стадия 1 (состоит из 3 периодов введения доз с интервалом в 2 недели):

- период 1: IV инфузия однократной дозы 5 мг/кг АТВ200;
- период 2: IV инфузия однократной дозы 10 мг/кг АТВ200 всем субъектам, которые завершили период 1; и
- 20 • период 3: IV инфузия однократной дозы 20 мг/кг АТВ200 всем субъектам, которые завершили период 2.

Стадия 2 (состоит из 2 периодов введения доз, каждый из которых включает введение 3 доз исследуемого лекарственного средства, с интервалом в 2 недели):

- период 4: 130 мг миглустата вводят перорально за 1 час до IV инфузии
- 25 однократной дозы 20 мг/кг АТВ200 всем субъектам, которые завершили период

3 (повторяют каждые 2 недели с осуществлением в общей сложности 3 введений); и

- период 5: 260 мг миглустата вводят перорально за 1 час до IV инфузии однократной дозы 20 мг/кг АТВ200 всем субъектам, получавшим ERT, которые завершили период 4 (повторяют каждые 2 недели с осуществлением в общей сложности 3 введений).

Примечание: субъектам необходимо воздерживаться от приема пищи в течение по меньшей мере 2 часов до введения миглустата для перорального применения и 2 часов после него.

- 10 **Общая продолжительность исследования:** до 22 недель (до 4 недель скринингового периода с последующими примерно 18 неделями лечения в рамках исследования [стадии 1 и 2]).

Продолжительность наблюдения РК при однократной дозе (стадия 1, периоды 1, 2 и 3): 6 недель.

- 15 **Продолжительность наблюдения РК при многократных дозах (стадия 2, периоды 4 и 5):** 12 недель.

Продолжительность наблюдения безопасности, переносимости и иммуногенности (периоды 1, 2, 3, 4 и 5): 18 недель.

Критерии оценивания

- 20 *Основные*

Оценки безопасности:

- PE
 - показатели жизненно важных функций, в том числе температура тела, RR, HR и BP
- 25 • AE, в том числе IAR

- ECG в 12 отведениях

- клинико-лабораторные оценки безопасности: биохимический анализ сыворотки крови, общий анализ крови и общий анализ мочи

PK АТВ200 и миглустата в плазме крови:

- 5
- PK-параметры, представляющие собой уровни активной формы кислой α -глюкозидазы и концентрации общего белка кислой α -глюкозидазы в плазме крови: максимальная наблюдаемая концентрация в плазме крови (C_{\max}), время до достижения максимальной наблюдаемой концентрации в плазме крови (t_{\max}), площадь под кривой зависимости концентрации лекарственного средства в
- 10
- плазме крови от момента времени 0 до момента времени определения последней поддающейся измерению концентрации (AUC_{0-t}), площадь под кривой зависимости концентрации лекарственного средства в плазме крови от момента времени 0, экстраполированная до бесконечности ($AUC_{0-\infty}$), период полувыведения ($t_{1/2}$) и общий клиренс после IV введения (CL_T)
- 15
- соотношения C_{\max} и $AUC_{0-\infty}$ активной формы кислой α -глюкозидазы и общего белка кислой α -глюкозидазы в плазме крови для всех режимов введения доз
 - PK-параметры миглустата в плазме крови: C_{\max} , t_{\max} , AUC_{0-t} , $AUC_{0-\infty}$ и $t_{1/2}$, кажущийся системный клиренс лекарственного средства после перорального введения (CL_T/F) и объем распределения во время конечной фазы после
- 20
- перорального введения (V_z/F) для каждого уровня дозы
 - относительные показатели C_{\max} и $AUC_{0-\infty}$ миглустата в плазме крови для каждого уровня дозы

Функциональные оценки (осуществляемые на исходном уровне)

Для амбулаторных субъектов:

- 25
- тесты двигательных функций
 - тест с шестиминутной ходьбой (6MWT)

- тест с 10-метровой ходьбой

• шкала оценки походки, подъема по лестнице, маневра Гауэра и вставания со стула

- тест «встань и иди» с отсчетом времени (TUG)

- 5 • тест мышечной силы (с использованием критериев медицинских исследований [MRC] и переносного динамометра) как для верхних, так и для нижних конечностей

- PFT (FVC, MIP, MEP и SNIP)

Для неамбулаторных субъектов:

- 10 • тест мышечной силы - только для верхних конечностей

• использование MRC и переносного динамометра осуществляется только для верхних конечностей

- 15 • тесты легочных функций (PFT) (форсированная жизненная емкость легких [FVC], максимальное давление при вдохе [MIP], максимальное давление при выдохе [MEP] и назальное давление при резком вдохе через нос [SNIP]).

Исходы, сообщаемые пациентами (осуществляется на исходном уровне)

- показатель по шкале оценки выраженности утомляемости

- показатель по Роттердамской шкале инвалидизации

- 20 • показатель по шкале жизнедеятельности при болезни Помпе, построенной с помощью анализа Раша (R-PAct)

Данные поисковых исследований

- титры антител к АТВ200 (общих и нейтрализующих)

- перекрестная реактивность антител к рекомбинантной кислой α -глюкозидазе с алглюкозидазой-альфа
 - уровень провоспалительных цитокинов и других биомаркеров активации иммунной системы
- 5 • PD-маркеры (Hex4 и CPK)

Способы анализа

Статистические способы

Для PK-параметров представлены данные описательной статистики. Для всех переменных, которые не являются PK-параметрами, представлены сводные статистические данные. Оценка соотношений воздействий активной формы кислой α -глюкозидазы и общего белка кислой α -глюкозидазы (C_{\max} , AUC_{0-t} и $AUC_{0-\infty}$) в отношении пропорциональности дозе при 5, 10 и 20 мг/кг АТВ200 в отдельности. Дисперсионный анализ (ANOVA) соотношений воздействий активной формы кислой α -глюкозидазы и общего белка кислой α -глюкозидазы (C_{\max} , AUC_{0-t} и $AUC_{0-\infty}$) для 20 мг/кг АТВ200 в отдельности в сравнении с 20 мг/кг АТВ200 + 130 мг миглустата и в сравнении с 20 мг/кг АТВ200 + 260 мг миглустата в каждой популяции и в целом. ANOVA соотношений воздействий активной формы кислой α -глюкозидазы и общего белка кислой α -глюкозидазы (C_{\max} , AUC_{0-t} и $AUC_{0-\infty}$) между амбулаторными и неамбулаторными субъектами для 20 мг/кг АТВ200 + 130 мг миглустата и 20 мг/кг АТВ200 + 260 мг миглустата. Оценка относительных показателей воздействия (C_{\max} , AUC_{0-t} и $AUC_{0-\infty}$) в отношении пропорциональности дозе между 130 мг и 260 мг миглустата в каждой популяции субъектов и в целом. Согласно результатам изучения иммуногенности оценивают ее эффект в отношении PK, PD и безопасности.

Промежуточные анализы

Промежуточный анализ осуществляют, когда по меньшей мере 50% (n = 6) субъектов завершат стадию 2 исследования. В рамках исследования можно осуществлять не более 2 дополнительных промежуточных анализов.

5 *Предварительные результаты изучения РК*

Сводная информация в отношении РК активной формы ГАА и общего белка ГАА для субъектов соответственно показана в таблицах 12 и 13.

В таблицах 12-15 и на фигурах 24-26 измерения для однократной дозы (SD) проводили после одного введения миглустата и АТВ200, а измерения для
10 многократных доз (MD) проводили после третьего введения миглустата и АТВ200 с периодичностью один раз в две недели.

Таблица 12

Доза	$\alpha t_{1/2}^a$	$\beta t_{1/2}^a$	t_{max}^b	C_{max}^c	AUC_{0-t}^c	$AUC_{0-\infty}^c$	$AUC_{0-\infty}/D^c$	CL_T^a	V_{ss}^a
мг/кг АТВ200 + мг миглустата	(ч.)	(ч.)	(ч.)	(мкг/мл)	(ч.*мкг/г/мл)	(ч.*мкг/мл)	(ч*мкг/мл/мг)	(л/ч.)	(л)
5	1,06 (9,7)	3,15 (5,3)	3,5 (3,5 - 4,0)	53,7 (20,4)	193 (22,5)	193 (22,5)	0,444 (15,4)	2,27 (15,9)	5,61 (21,2)
10	1,26 (22,2)	2,73 (18,2)	3,75 (3,5 - 4,5)	115 (28,3)	447 (30,7)	448 (30,6)	0,523 (17,5)	1,93 (15,0)	5,39 (21,2)
20	1,36 (25,7)	2,16 (10,2)	4,0 (3,5 - 4,0)	256 (30,4)	1020 (37,4)	1021 (37,4)	0,596 (30,1)	1,76 (37,5)	5,01 (28,0)
20 + 130, однократная доза	1,84 (16,0)	2,49 (9,9)	4,5 (4,0 - 5,0)	234 (36,0)	1209 (29,9)	1211 (29,9)	0,707 (23,7)	1,45 (25,8)	5,32 (24,8)
20 + 130, многократные дозы	1,90 (7,5)	2,53 (11,9)	4,0 (3,5 - 5,0)	230 (20,2)	1180 (19,1)	1183 (19,0)	0,690 (15,1)	1,46 (14,4)	5,55 (14,2)
20 + 260, однократная доза	2,39 (11,5)	2,70 (10,8)	4,0 (4,0 - 4,5)	228 (26,0)	1251 (17,4)	1256 (17,2)	0,733 (15,8)	1,38 (17,3)	5,71 (20,2)

^aСреднее арифметическое значение (CV, %)

^bМедианное значение (мин.-макс.)

15 ^cСреднее геометрическое значение (CV, %)

Таблица 13

Доза	$\alpha t_{1/2}^a$	$\beta t_{1/2}^a$	t_{max}^b	C_{max}^c	AUC_{0-t}^c	$AUC_{0-\infty}^c$	$AUC_{0-\infty}/D^c$	CL_T^a	V_{ss}^a
мг/кг АТВ200 + мг миглустата	(ч.)	(ч.)	(ч.)	(мкг/мл)	(ч.*мкг/г/мл)	(ч.*мкг/мл)	(ч.*мкг/мл/мг)	(л/ч.)	(л)
5	1,02 (3,0)	1,83 (13,8)	4,0 (3,5 - 4,0)	61,1 (20,0)	215 (17,1)	218 (17,0)	0,511 (7,3)	1,97 (7,7)	4,57 (6,8)
10	1,36 (5,3)	1,99 (56,9)	4,0	143 (19,5)	589 (16,6)	594 (16,6)	0,694 (12,3)	1,45 (13,4)	3,90 (14,5)
20	1,65 (12,3)	2,62 (18,5)	4,0	338 (11,1)	1547 (12,1)	1549 (12,1)	0,904 (12,8)	1,11 (14,4)	3,49 (11,6)
20 + 130, однократная доза	1,79 (10,7)	2,63 (6,6)	4,0	322 (18,2)	1676 (14,9)	1680 (14,8)	0,980 (15,0)	1,03 (17,6)	3,78 (12,2)
20 + 130, многократные дозы	1,99 (10,2)	2,47 (4,2)	4,0 (3,5 - 5,0)	355 (16,5)	1800 (12,7)	1804 (12,7)	1,05 (12,9)	0,96 (13,7)	3,70 (10,8)
20 + 260, однократная доза	2,35 (13,9)	2,73 (10,4)	4,0	350 (14,2)	1945 (15,1)	1953 (15,0)	1,14 (15,8)	0,89 (15,7)	3,63 (16,3)

^aСреднее арифметическое значение (CV, %)

^bМедианное значение (мин.-макс.)

^cСреднее геометрическое значение (CV, %)

На фигуре 24А показаны профили зависимости концентрации от времени, демонстрирующие среднее воздействие активной формы ГАА в плазме крови после введения доз 5 мг/кг, 10 мг/кг и 20 мг/кг АТВ200. На фигуре 24В также представлены профили зависимости концентрации от времени, демонстрирующие среднее воздействие активной формы ГАА в плазме крови после введения доз 5 мг/кг, 10 мг/кг и 20 мг/кг АТВ200, но при этом активная форма ГАА в плазме крови отображена на логарифмической шкале. Как можно видеть из фигур 24А-24В и таблицы 12, АТВ200 демонстрировала незначительно сверхпропорционально зависимые от дозы воздействия активной формы ГАА в плазме крови.

На фигуре 24С показаны профили зависимости концентрации от времени, демонстрирующие среднее воздействие активной формы ГАА в плазме крови после введения доз 20 мг/кг АТВ200 в отдельности, а также 20 мг/кг АТВ200 и 130 или 260 мг миглустата. На фигуре 24D также представлено среднее воздействие активной формы ГАА в плазме крови после введения доз 20 мг/кг

АТВ200 в отдельности, со 130 мг миглустата или 260 мг миглустата, но при этом активная форма ГАА в плазме крови отображена на логарифмической шкале.

На фигуре 25А показаны профили зависимости концентрации от времени, демонстрирующие среднее воздействие общего белка ГАА в плазме крови после введения доз 5 мг/кг, 10 мг/кг и 20 мг/кг АТВ200. На фигуре 25В также представлены профили зависимости концентрации от времени, демонстрирующие среднее воздействие общего белка ГАА в плазме крови после введения доз 5 мг/кг, 10 мг/кг и 20 мг/кг АТВ200, но при этом общий белок ГАА в плазме крови отображен на логарифмической шкале. Как можно видеть из фигур 25А-25В и таблицы 13, АТВ200 демонстрировала незначительно сверхпропорционально зависимые от дозы воздействия общего белка ГАА в плазме крови.

На фигуре 25С показаны профили зависимости концентрации от времени, демонстрирующие среднее воздействие общего белка ГАА в плазме крови после введения доз 20 мг/кг АТВ200 в отдельности, 20 мг/кг АТВ200 и 130 мг миглустата и 20 мг/кг АТВ200 и 260 мг миглустата. На фигуре 25D также представлено среднее воздействие общего белка ГАА в плазме крови после введения доз 20 мг/кг АТВ200 в отдельности, со 130 мг миглустата или 260 мг миглустата, но при этом общий белок ГАА в плазме крови отображен на логарифмической шкале.

Как показано в таблице 13, при совместном введении с миглустатом период полувыведения общего белка ГАА из плазмы крови увеличивался примерно на 30% в сравнении с введением АТВ200 в отдельности. Объем распределения находился в диапазоне от 3,5 до 5,7 л для всех видов обработки, что позволяет предположить, что гликозилирование АТВ200 обеспечивает возможность эффективного распределения АТВ200 в тканях.

Сводная информация о РК миглустата показана в таблице 14.

Таблица 14

Доза	$\beta t_{1/2}^a$	t_{max}^b	C_{max}^c	C_{max}/B W^c	AUC_{0-t}^c	$AUC_{0-\infty}^c$	$AUC_{0-\infty}/BW^c$	V_z/F^a	CL/F_a
мг	(ч.)	(ч.)	(мкг/мл)	(нг/мл/ кг)	(ч.*мкг /мл)	(ч.*мкг /мл)	(ч.*нг/мл/кг)	(л)	(л/ч.)
130, однократная доза	4,5 (37,0)	2,75 (1,5 - 3,5)	1647 (22,1)	19,2 (23,9)	12620 (13,1)	13157 (13,1)	154 (29,7)	65,4 (41,9)	9,93 (13,7)
130, многократная доза	5,6 (12,5)	3,0 (1,5 - 3,5)	1393 (36,8)	16,3 (36,4)	11477 (18,0)	12181 (16,4)	142 (26,9)	88,1 (26,1)	10,8 (16,2)
260, однократная доза	5,5 (25,9)	2,75 (1,0 - 5,0)	3552 (30,2)	41,5 (33,8)	26631 (25,1)	28050 (22,9)	325 (30,8)	79,2 (55,3)	9,51 (27,6)

^aСреднее арифметическое значение (CV, %)

^bМедианное значение (мин.-макс.)

^cСреднее геометрическое значение (CV, %)

На фигуре 26 показан профиль зависимости концентрации миглустата в плазме
5 крови от времени у субъектов-людей после введения дозы 130 мг или 260 мг миглустата.

Как можно видеть из таблицы 14 и фигуры 26, миглустат, вводимый перорально
за 1 час до проведения инфузии АТВ200, достигал пиковых концентраций в
плазме крови через 2 часа после проведения инфузии и демонстрировал
10 дозопропорциональную зависимость кинетических параметров.

Анализ осуществляли в отношении разных частей кривых концентрации
активной формы и общего белка GAA в плазме крови для определения
частичных AUC. В таблице 15 представлена сводная информация о частичных
AUC 0- t_{max} , t_{max} -6 ч., t_{max} -10 ч., t_{max} -12 ч. и t_{max} -24 ч. для активной формы и общего
15 белка GAA.

Таблица 15

Аналит	Обработка	Среднее арифметическое значение рAUC (нг*ч./мл) в период после введения доз (N=4)				
		0- t_{max}	t_{max} -6 ч.	t_{max} -10 ч.	t_{max} -12 ч.	t_{max} -24 ч.
Активная форма	20 мг/кг	428	382	606	630	654

ГАА						
Активная форма ГАА	20 мг/кг + 130 мг, однократная доза	456	415	722	770	832
Активная форма ГАА	20 мг/кг + 130 мг, многократные дозы	423	392	689	737	796
Активная форма ГАА	20 мг/кг + 260 мг, однократная доза	423	536	924	996	1094
Общий белок	20 мг/кг	621	603	943	981	1040
Общий белок	20 мг/кг + 130 мг, однократная доза	565	614	1041	1106	1189
Общий белок	20 мг/кг + 130 мг, многократные дозы	630	612	1079	1154	1244
Общий белок	20 мг/кг + 260 мг, однократная доза	679	824	1411	1518	1665

Как можно видеть из таблицы 15, средние процентные значения увеличения воздействия активной формы ГАА в пределах $\text{pAUC}_{t_{\max-24 \text{ ч.}}}$ для 20 мг/кг с миглустатом в сравнении с 20 мг/кг АТВ200 в отдельности составляли 21,4%, 17,8%, 40,2% для 130 мг SD, 130 мг MD и 260 мг SD соответственно.

Подобным образом, средние процентные значения увеличения воздействия общего белка ГАА в пределах $\text{pAUC}_{t_{\max-24 \text{ ч.}}}$ для 20 мг/кг с миглустатом в сравнении с 20 мг/кг АТВ200 в отдельности составляли 12,5%, 16,4%, 37,5% для 130 мг SD, 130 мг MD и 260 мг SD соответственно.

Таким образом, анализ частичной AUC демонстрирует, что при совместном введении миглустата частичная AUC АТВ200 в конечной фазе ($t_{\max-24 \text{ ч.}}$) значительно увеличивается примерно на 15% для доз 130 мг миглустата и примерно на 40% для 260 мг миглустата.

Предварительные результаты изучения уровней биомаркеров

У пациентов-людей, которых переводили с Lumizyme® на АТВ200, осуществляли мониторинг уровней аланинаминотрансферазы (ALT),

аспартатаминотрансферазы (AST) и креатинфосфокиназы (СРК). Пациенты получали нарастающие дозы АТВ200 (5, 10 и 20 мг/кг) с последующим совместным введением АТВ200 (20 мг/кг) и миглустата (130 и 260 мг). Высокие уровни фермента СРК могут указывать на повреждение или напряжение мышечной ткани, сердца или головного мозга. Повышенные уровни ALT и AST являются соответственно маркерами поражения печени и мышц вследствие болезни Помпе. Предварительный анализ уровней ALT, AST и СРК показан на фигурах 38-41.

Как можно видеть из фигур 38-41, два пациента демонстрировали начальную тенденцию к улучшению уровней всех трех биомаркеров, и у двух пациентов они оставались стабильными. У одного пациента наблюдалось снижение уровней СРК, AST и ALT соответственно на 44%, 28% и 34%. У другого пациента наблюдалось снижение уровней СРК, AST и ALT соответственно на 31%, 22% и 11%.

До сих пор серьезные нежелательные явления (SAE) отсутствовали. АЕ, как правило, были легкими и временными. До данного момента реакции, связанные с инфузией, после проведения 100+ инфузий у всех включенных пациентов отсутствовали. Все пациенты имели антитела к ghGAA на исходном уровне, который, как правило, оставался стабильным. Уровни цитокинов в ходе инфузий оставались низкими и стабильными.

Пример 15. Уровни GAA и LAMP1 в фибробластах дикого типа и фибробластах при болезни Помпе

Для выявления уровней GAA и LAMP1 в фибробластах дикого типа и фибробластах при болезни Помпе с распространенной сплайсинговой мутацией использовали иммунофлуоресцентную микроскопию. Как показано на фигуре 27, GAA находится в отдельных лизосомных компартментах в фибробластах дикого типа. На фигуре 27 также показаны обширный сигнал от GAA в фибробластах при болезни Помпе и то, что сигналы как от GAA, так и от LAMP1 в фибробластах при болезни Помпе, по-видимому, локализованы в ER и

аппарате Гольджи, а не в дистальных лизосомах. Это свидетельствует об изменении транспорта белка GAA в фибробластах при болезни Помпе.

Пример 16. Улучшение клеточной дисфункции и мышечной функции у мышей с нокаутом *Gaa*

- 5 Было показано, что нарушение катаболизма гликогена в лизосомах вследствие дефицита GAA вызывает существенную клеточную дисфункцию, о чем свидетельствует выраженная, устойчивая аутофагия, а также пролиферация и накопление мембраносвязанных внутриклеточных компартментов, заполненных накопленным гликогеном (N. Raben et al.). Иммуногистологические данные
- 10 авторов настоящего изобретения указывают на то, что для многих белков, в том числе нескольких ключевых белков, крайне необходимых для стабильности мембран мышечных клеток, таких как дистрофин, α - и β -дистрогликаны, различные саркогликаны и другие, которые составляют дистрофин-ассоциированный гликопротеиновый комплекс, а также белков, участвующих в
- 15 восстановлении мышц, таких как дисферлин, транспорт белков значительно изменяется. Для этих ключевых мышечных белков необходим надлежащий транспорт белка в мембрану мышечной клетки, где они функционируют. Как показано на фигуре 28, иммуногистологические данные авторов настоящего изобретения свидетельствуют о том, что значительная доля этих ключевых
- 20 мышечных белков характеризуется внутриклеточной локализацией в мышцах мышей с нокаутом (КО) *Gaa* в модели болезни Помпе. Эти данные позволяют предположить, что неправильный транспорт этих ключевых мышечных белков может индуцировать псевдомышечную дистрофию, которая в конечном счете приводит к мышечной слабости и негодному состоянию мышц.
- 25 Алглюкозидазу-альфа (Myozyme®) и АТВ200 с 10 мг/кг миглустата или без него оценивали у мышей с КО *Gaa* при эквивалентной дозе средства для ERT (20 мг/кг) по схеме введения доз один раз в две недели. После 2 введений алглюкозидаза-альфа незначительно снижала уровень гликогена, накопленного в лизосомах скелетных мышц (фигуры 32А-32С), и почти не оказывала эффекты в

- отношении снижения аутофагии (фигуры 30А-30В) или пролиферации лизосом (фигуры 29А-29В) в сравнении с мышами, обработанными инертной средой. В отличие от этого, в случае применения комбинации АТВ200/миглустат в идентичных условиях наблюдали существенно лучшее очищение от гликогена в лизосомах (фигуры 32А-32D). Комбинация АТВ200/миглустат также, по-видимому, улучшает общее физиологическое состояние мышц, о чем свидетельствуют сниженные уровни LC3 II (фигуры 30А-30В), общепризнанного биомаркера аутофагии, и очищение от накопленных внутриклеточных везикул, окрашенных на LAMP1 (фигуры 29А-29В), известный резидентный интегральный мембранный белок лизосом, и дисферлин (фигуры 31А-31В), известный белок клеточной поверхности, участвующий в восстановлении мышц. Кроме того, комбинация АТВ200/миглустат значительно улучшала мышечную архитектуру, которая мало чем отличалась от мышечных волокон у мышей дикого типа.
- 15 Также на фигурах 29-32 показано, что две разные партии АТВ200 (полученные в производственных процессах более раннего и более позднего поколения) давали сопоставимые результаты. На фигурах 32А-32D * указывает на статистически значимый результат в сравнении с Myozyme® в отдельности.

Пример 17. Мышечная функция у мышей с нокаутом *Gaa*

- 20 В более долгосрочных исследованиях с 12 введениями один раз в две недели комбинация 20 мг/кг АТВ200 с 10 мг/кг миглустата постепенно увеличивала функциональную мышечную силу у мышей с КО *Gaa* относительно исходного уровня, что измеряли с помощью как тестов силы захвата, так и тестов «вис на проволоке» (фигуры 33А-33В). У мышей, обработанных алглюкозидазой-альфа (Lumizyme®), которые получали аналогичную дозу средства для ERT (20 мг/кг), наблюдали снижение показателей в идентичных условиях на протяжении большей части исследования (фигуры 33А-33В). Как и в случае более краткосрочного исследования, комбинация АТВ200/миглустат характеризовалась существенно лучшим очищением от гликогена после 3

месяцев (фигуры 34A-34C) и 6 месяцев (фигуры 34D-G) обработки, чем алглукозидаза-альфа. Комбинация АТВ200/миглулат также снижала аутофагию и внутриклеточное накопление LAMP1 и дисферлина после 3 месяцев обработки (фигура 35) в сравнении с алглукозидазой-альфа. На фигуре 33А * указывает на статистически значимый результат в сравнении с Lumizyme® в отдельности ($p < 0,05$, 2-сторонний t-критерий). На фигурах 34А-34G * указывает на статистически значимый результат в сравнении с Lumizyme® в отдельности ($p < 0,05$, множественное сравнение с применением способа Даннетта в рамках однофакторного анализа ANOVA).

10 В совокупности эти данные указывают на то, что комбинация АТВ200/миглулат эффективно нацеливалась на мышцы с устранением клеточной дисфункции и улучшением мышечной функции. Важно отметить, что видимые улучшения мышечной архитектуры, а также снижение аутофагии и внутриклеточного накопления LAMP1 и дисферлина могут быть хорошими суррогатными

15 критериями улучшения физиологического состояния мышц, что коррелирует с улучшениями функциональной мышечной силы. Эти результаты позволяют предположить, что мониторинг аутофагии и уровней этих ключевых мышечных белков, которые могут оказаться полезными биомаркерами в биоптатах мышц в клинических исследованиях, может быть целесообразным практическим

20 способом оценки эффективности терапевтических методов лечения болезни Помпе у мышей с КО *Gaa*.

На фигуре 40 показано, что введение АТВ200 с миглулатом или без него в течение 6 месяцев понижало внутриклеточное накопление дистрофина у мышей с КО *Gaa*. Для комбинации АТВ200 ± миглулат наблюдали более значительное

25 снижение накопления дистрофина, чем в случае применения Lumizyme®.

Пример 18. Эффект содержания сиаловой кислоты в АТВ200 у мышей с нокаутом *Gaa*

Две партии АТВ200 с разным содержанием сиаловой кислоты оценивали в отношении фармакокинетических параметров и эффективности на мышцах с КО

Gaa. В таблице 16 представлена сводная информация о характеристиках для двух партий.

Таблица 16

Характеристика	Партия А	Партия В
Сиаловая кислота	4,0 моль/моль белка	5,4 моль/моль белка
Содержание М6Р	3,3 моль/моль белка	2,9 моль/моль белка
Удельная активность	115831 (нмоль 4mu/мг белка/ч.)	120929 (нмоль 4mu/мг белка/ч.)
Связывание с CIMPR	$K_d = 2,7$ нМ	$K_d = 2,9$ нМ

- 5 Как можно увидеть из таблицы 16, партия В имела более высокое содержание сиаловой кислоты, чем партия А, однако немного меньшее содержание М6Р, чем партия А.

На фигуре 36 показаны профили зависимости концентрации активной формы ГАА в плазме крови от времени у мышей с КО *Gaa* после однократного IV болюсного введения дозы АТВ200. Значения периода полувыведения для партий А и В представлены в таблице 17 ниже.

Таблица 17

Период полувыведения (ч.)	Среднее значение \pm SEM
Партия А	0,50 \pm 0,02
Партия В	0,60 \pm 0,03

15 Как можно увидеть из таблицы 17, партия В характеризовалась меньшим периодом полувыведения, чем партия А. Хотя уменьшение периода полувыведения было незначительным, это уменьшение периода полувыведения было статистически значимым ($p < 0,05$ для 2-стороннего t-критерия).

В связанном исследовании мышам с КО *Gaa* давали IV болюсные инъекции АТВ200 (партии А и В) и Lumizyme® в хвостовую вену один раз в две недели с

- осуществлением в общей сложности 2 инъекций. Уровни гликогена в тканях измеряли через 14 дней после последнего введения. Как показано на фигурах 37A-37D, партия В в целом была более эффективной в отношении снижения уровня гликогена, чем партия А, при аналогичных дозах. Как партия А, так и партия В превосходили Lumizyme® в отношении снижения уровня гликогена. На фигурах 37A-37D * указывает на статистически значимый результат в сравнении с Lumizyme® ($p < 0,05$, t-критерий), а ^ указывает на статистически значимый результат сравнения партии А и партии В при одной и той же дозе ($p < 0,05$, t-критерий).
- 10 Варианты осуществления, описанные в данном документе, подразумеваются как иллюстрирующие композиции и способы по настоящему изобретению и не подразумеваются как ограничивающие объем настоящего изобретения. Различные модификации и изменения, которые согласуются с описанием в целом и очевидны специалисту в данной области, подразумеваются как
- 15 включенные. Прилагаемая формула изобретения не должна ограничиваться конкретными вариантами осуществления, изложенными в примерах, однако должна обеспечивать наиболее широкую интерпретацию, согласованную с описанием в целом.
- 20 Во всей настоящей заявке цитируются патенты, патентные заявки, публикации, описания продуктов, номера доступа в GenBank и протоколы, раскрытия которых включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте во всех отношениях.

Формула изобретения

1. Применение композиции, содержащей молекулы рекомбинантной кислой α -глюкозидазы человека (rhGAA), при лечении болезни Помпе у пациента, нуждающегося в этом, в комбинации с миглустатом;

где пациент является пациентом, получавшим заместительную ферментную терапию (ERT);

где композиция вводится внутривенно в дозе, составляющей от 5 мг/кг до 20 мг/кг, и миглустат вводится перорально в дозе, составляющей 260 мг или 130 мг;

где молекулы rhGAA получены из клеток яичника китайского хомячка (CHO), при этом молекулы rhGAA содержат семь потенциальных сайтов N-гликозилирования, 40%-60% N-гликанов в молекулах rhGAA представляют собой N-гликаны комплексного типа, и по меньшей мере 50% молекул rhGAA несут бис-маннозо-6-фосфатное (бис-М6P) звено в первом потенциальном сайте N-гликозилирования.

2. Применение по п. 1, где молекулы rhGAA экспрессируются как имеющие

(i) последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO: 4; или

(ii) последовательность SEQ ID NO: 4, при этом молекулы rhGAA подвергаются посттрансляционной модификации с удалением первых 56 аминокислот.

3. Применение по п. 1 или п. 2, где по меньшей мере 55% молекул rhGAA несут бис-М6P звено в первом потенциальном сайте N-гликозилирования.

4. Применение по любому из пп. 1-3, где по меньшей мере 70% молекул rhGAA фосфорилированы в первом потенциальном сайте N-гликозилирования.

5. Применение по любому из пп. 1-4, где по меньшей мере 40% молекул rhGAA несут моно-маннозо-6-фосфатное (моно-М6P) звено во втором потенциальном сайте N-гликозилирования.

6. Применение по любому из пп. 1-5, где по меньшей мере 40% молекул rhGAA несут бис-М6Р звено в четвертом потенциальном сайте N-гликозилирования.

7. Применение по любому из пп. 1-6, где по меньшей мере 25% молекул rhGAA несут моно-М6Р звено в четвертом потенциальном сайте N-гликозилирования.

8. Применение по любому из пп. 1-7,

где композиция вводится в дозе, составляющей 20 мг/кг, посредством внутривенной инфузии в течение примерно четырех часов каждые 2 недели,

где миглустат вводится за один час до внутривенной инфузии композиции, и

где пациент воздерживается от приема пищи в течение по меньшей мере двух часов до перорального введения миглустата и по меньшей мере двух часов после него.

9. Применение по любому из пп. 1-8, где композиция вводится внутривенно в дозе, составляющей 5 мг/кг, 10 мг/кг, или 20 мг/кг.

10. Применение по любому из пп. 1-9, где композиция вводится внутривенно в дозе, составляющей 20 мг/кг, и миглустат вводится перорально в дозе, составляющей 260 мг.

11. Применение по любому из пп. 1-10, где пациент является амбулаторным пациентом.

12. Применение по любому из пп. 1-10, где пациент является неамбулаторным пациентом.

13. Применение по любому из пп. 1-12, где пациент предварительно получал ERT с применением алглюкозидазы-альфа.

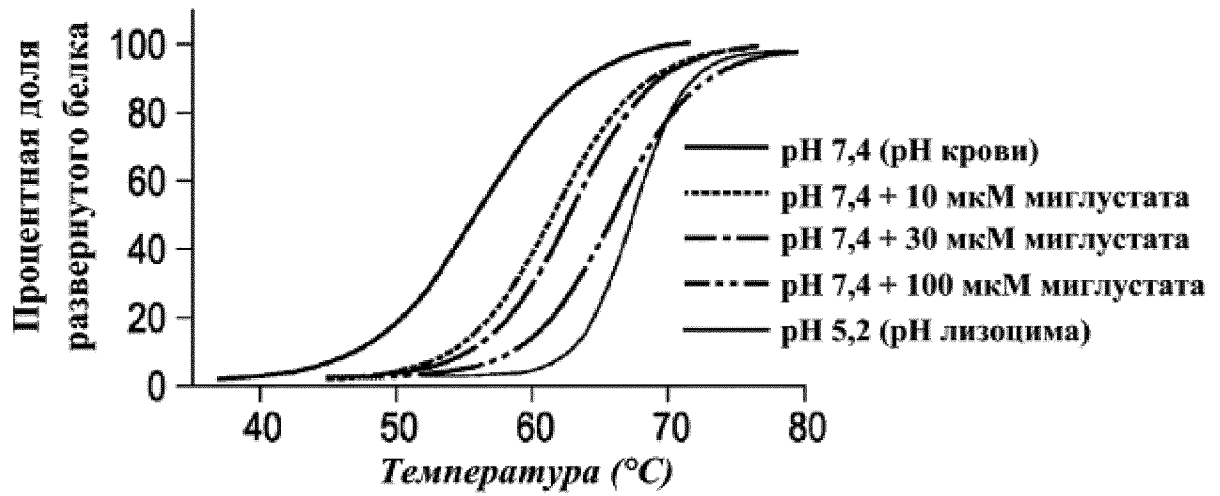
14. Применение по любому из пп. 1-13, где пациент является неамбулаторным пациентом и получал ERT с применением алглюкозидазы-альфа по меньшей мере последние 2 года.

15. Применение по любому из пп. 1-13, где пациент является амбулаторным

пациентом и получал ERT с применением алглюкозидазы-альфа последние 2-6 лет.

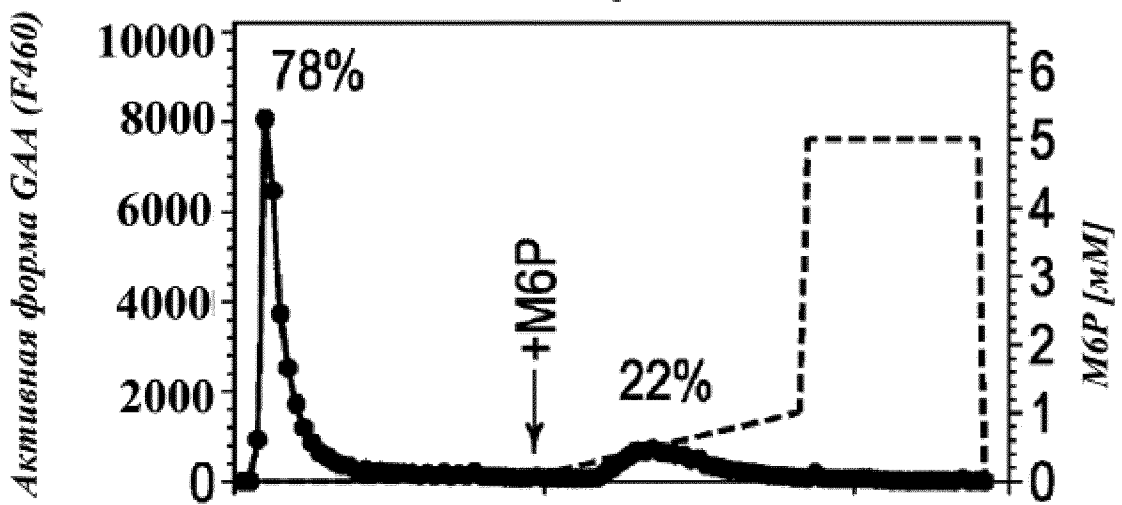
16. Применение по любому из пп. 1-15, где молекулы rhGAA имеют последовательность по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентичную SEQ ID NO: 5.

АТВ200 ± миглустат

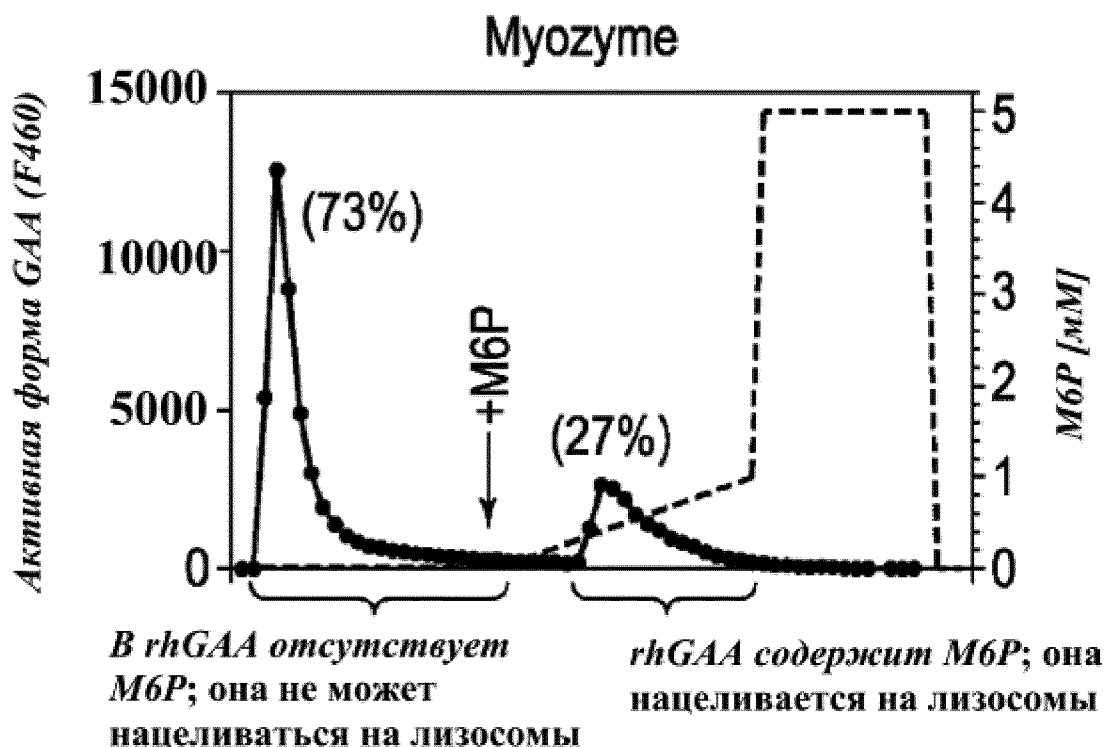


ФИГ. 1

Lumizyme

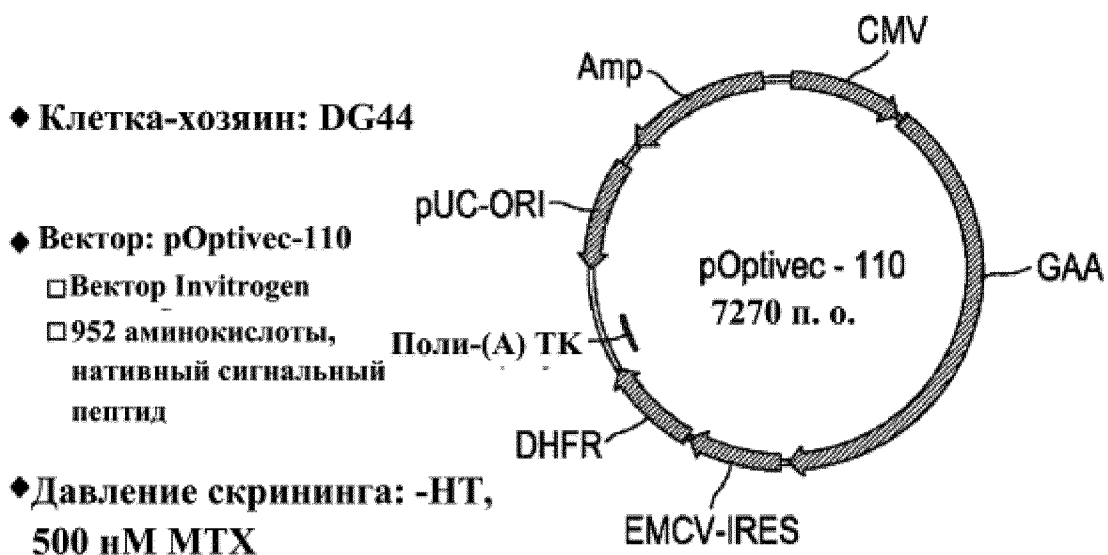


ФИГ. 2А

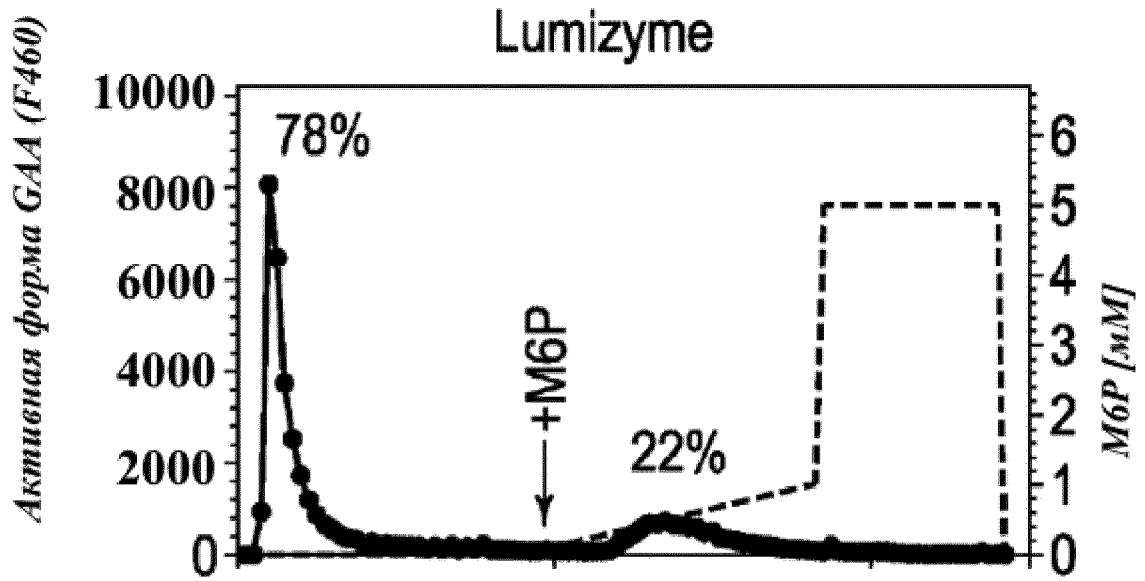


ФИГ. 2В

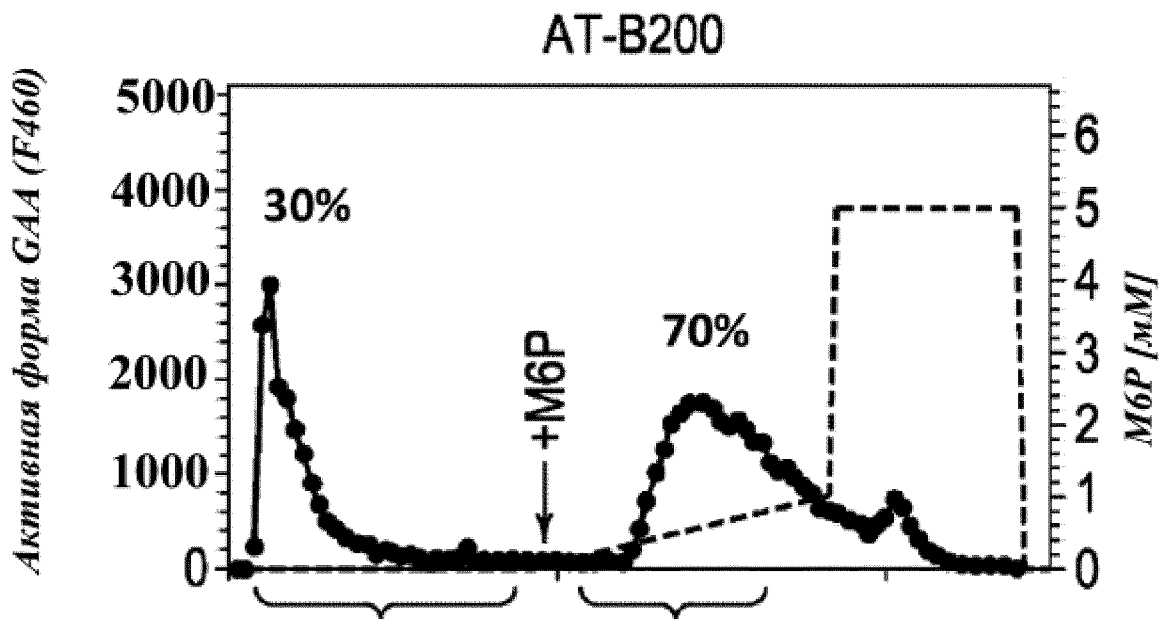
Конструкция вектора АТВ200



ФИГ. 3



ФИГ. 4А

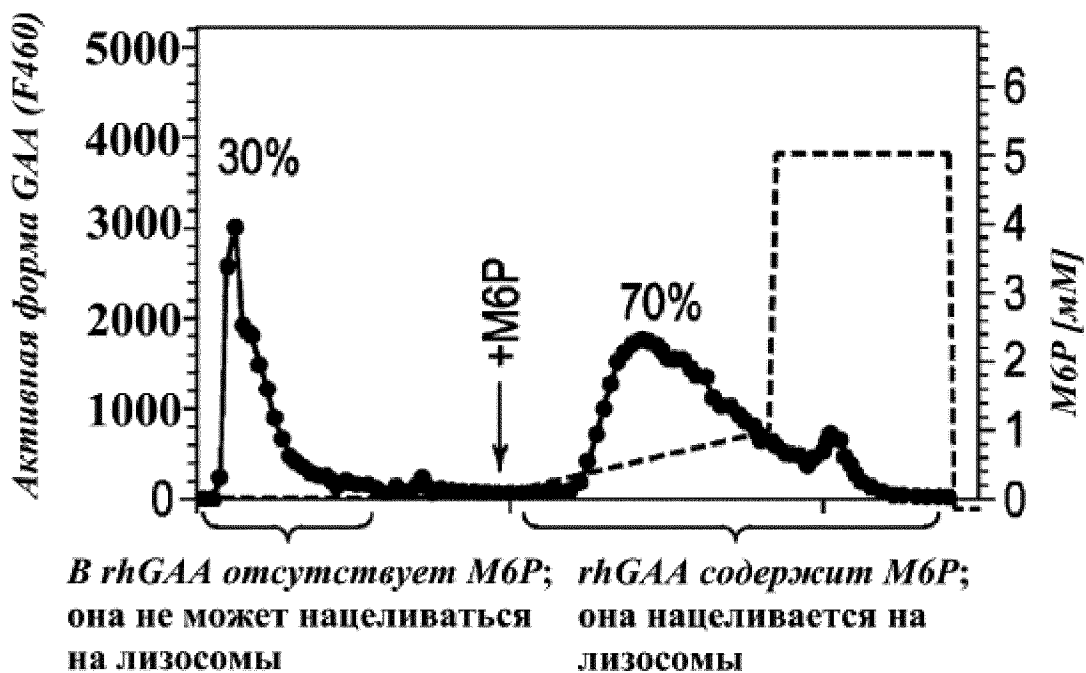


В rhGAA отсутствует M6P; она не может нацеливаться на ЛИЗОСОМЫ

rhGAA содержит M6P; она нацеливается на ЛИЗОСОМЫ

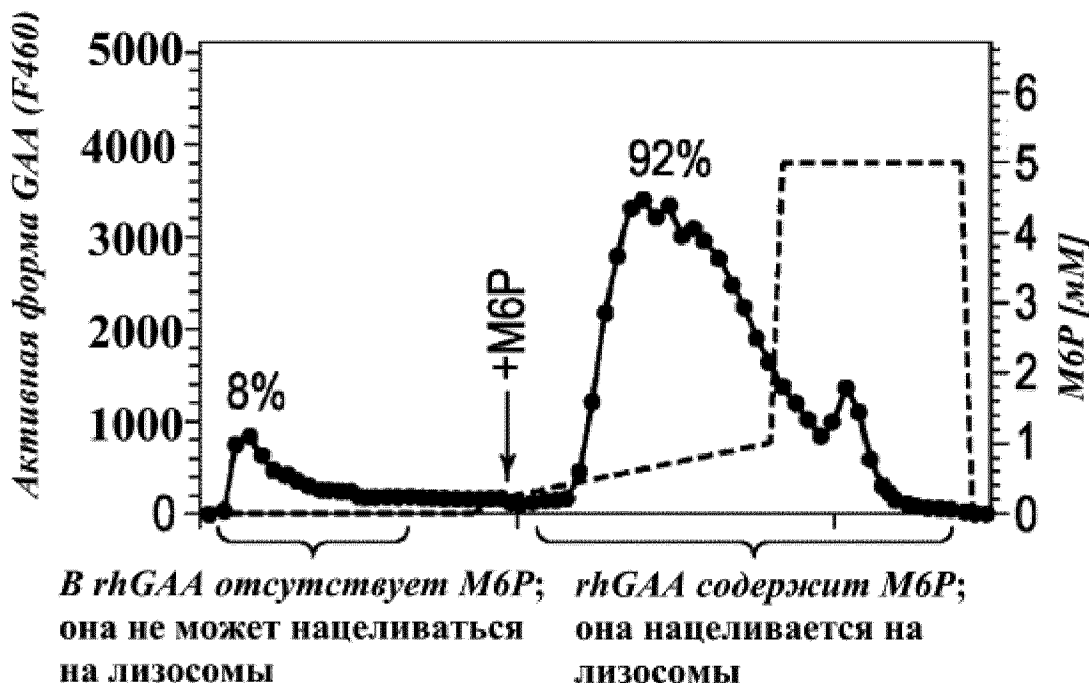
ФИГ. 4В

Вариант осуществления 1

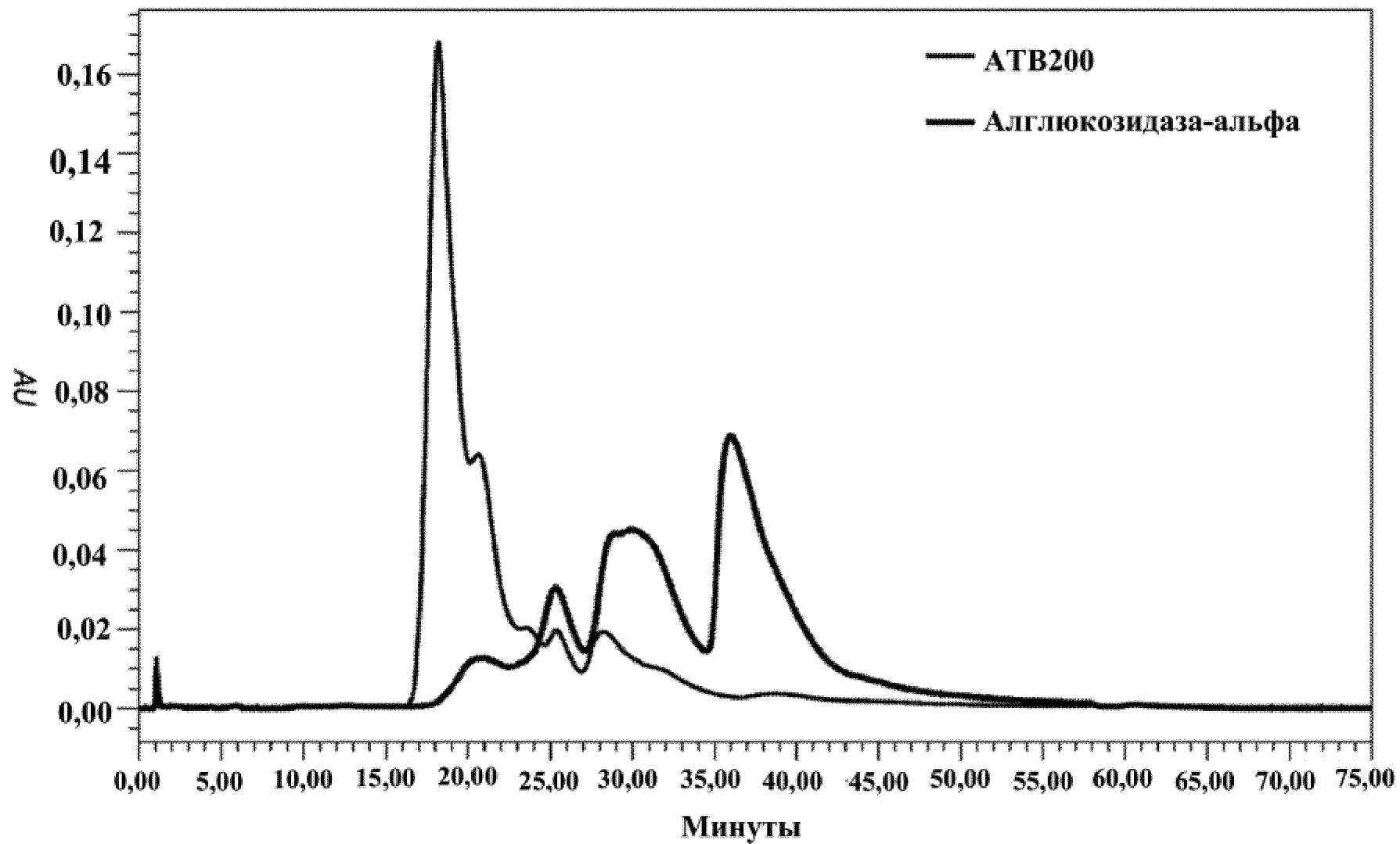


ФИГ. 5А

Вариант осуществления 2



ФИГ. 5В



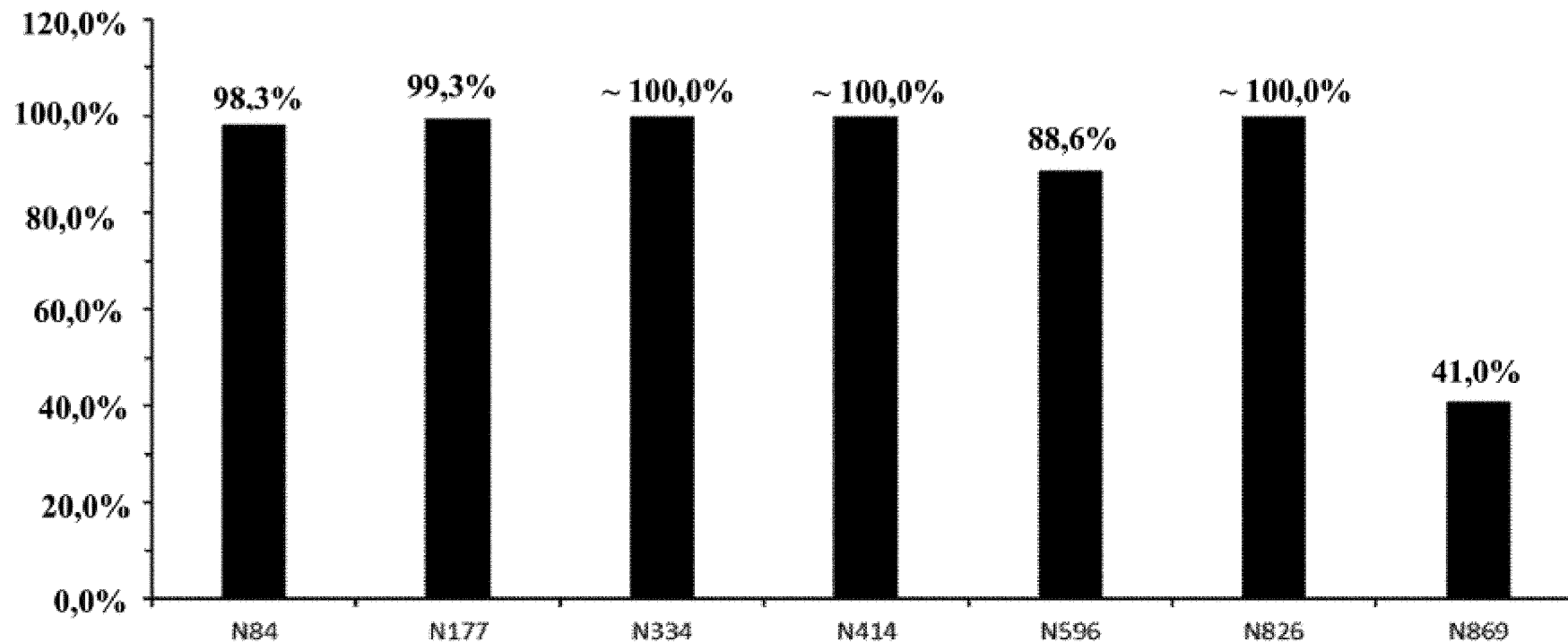
ФИГ. 6

Распределение N-гликанов в препаратах на основе rhGAA

	Lumizyme	BP-rhGAA*	ATB200	
			1	2
N-гликаны комплексного типа	70,7%	48,9%	51,0%	47,5%
N-гликаны гибридного типа	6,7%	9,7%	4,4%	3,7%
N-гликаны высокоманнозного типа				
Нефосфорилированные	15,8%	23,7%	14,0%	9,9%
Моно-M6P	5,2%	10,4%	13,4%	14,2%
Бис-M6P	1,6%	6,8%	17,2%	24,7%

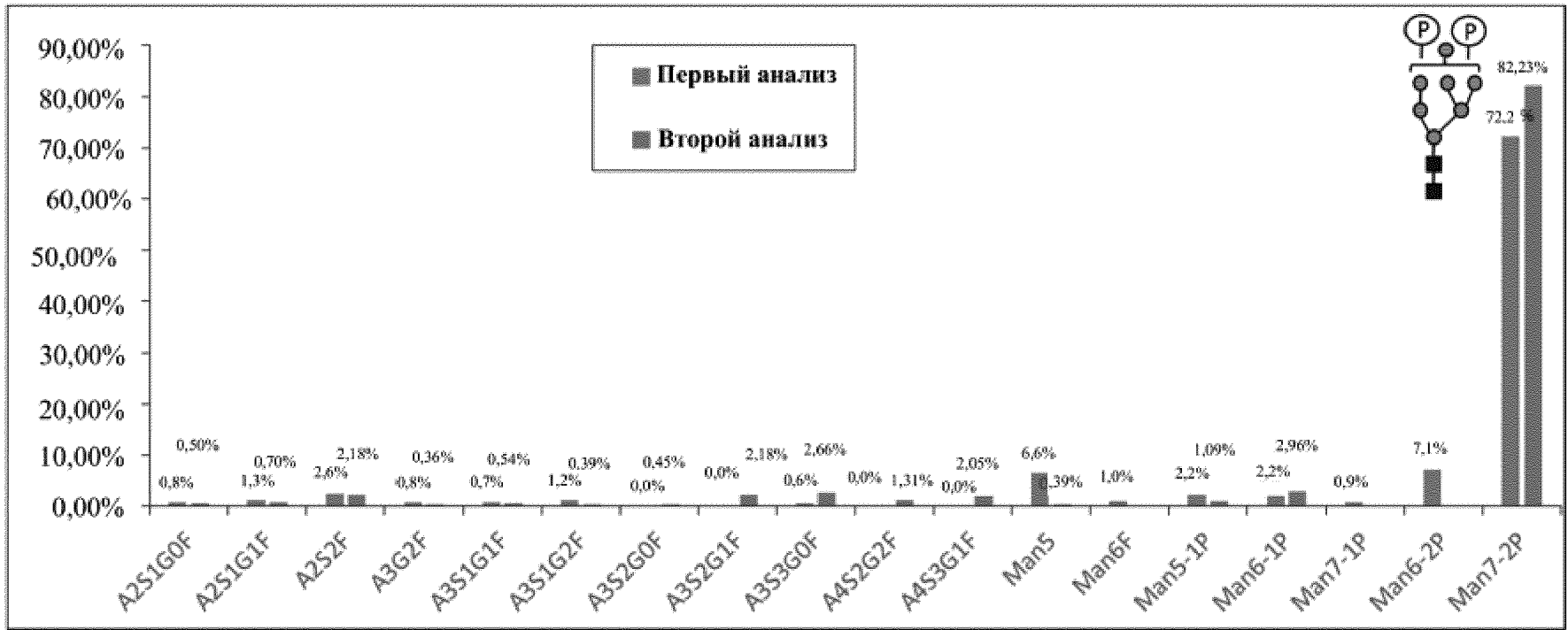
ФИГ. 7

Занятость сайтов N-гликозилирования в АТВ200



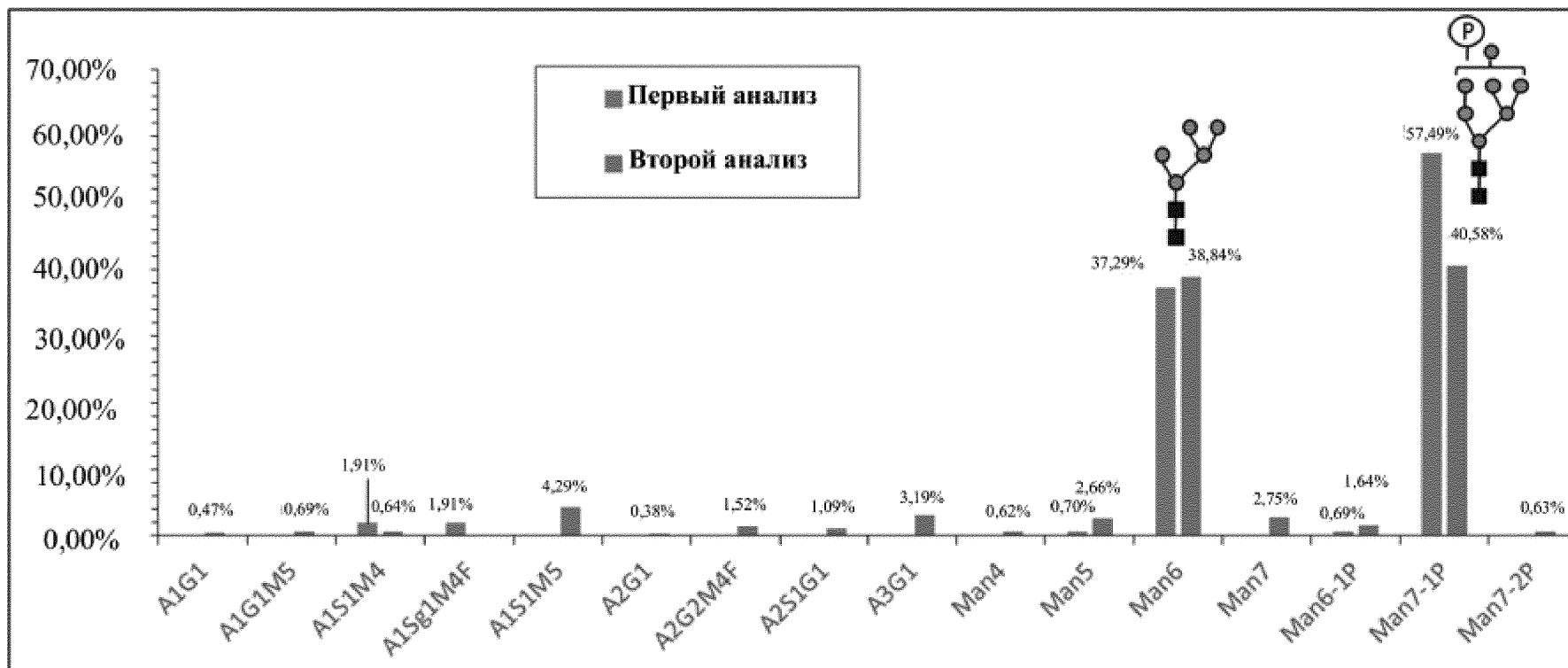
ФИГ. 8А

Профиль N-гликозилирования N84



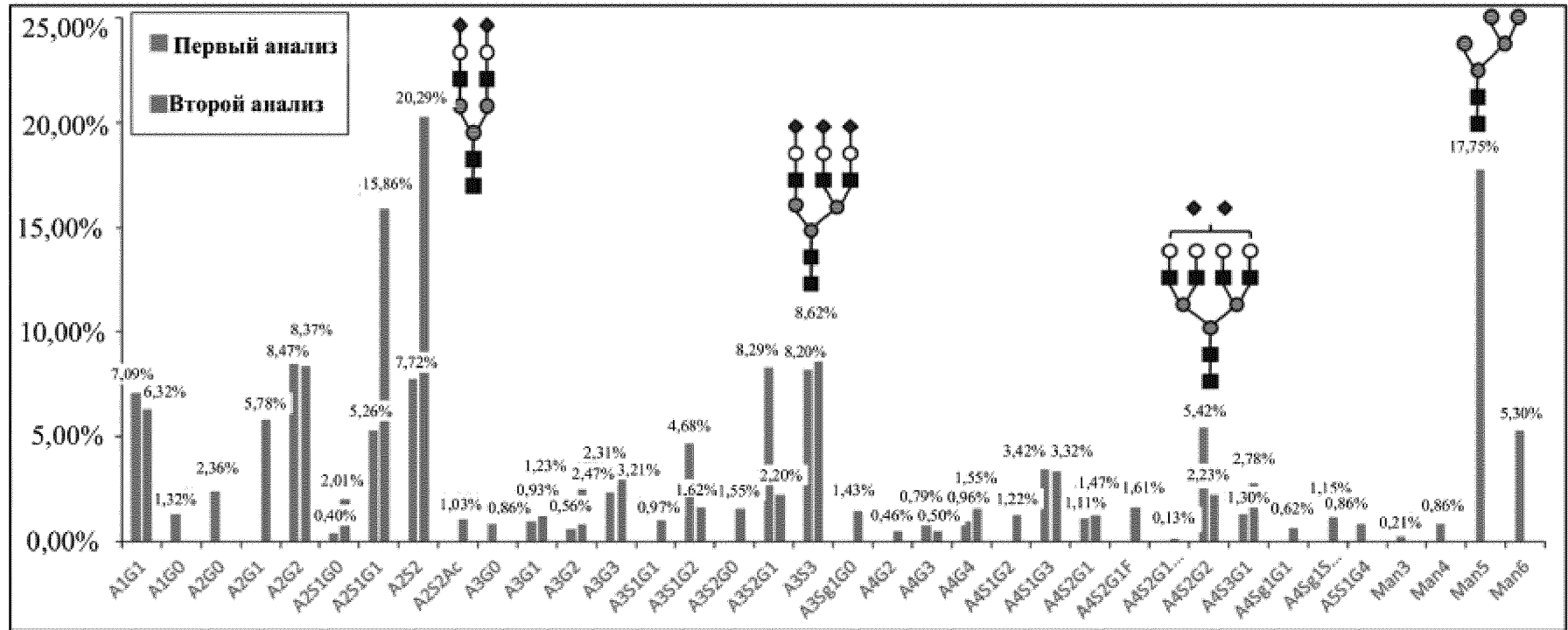
ФИГ. 8В

Профиль N-гликозилирования N177



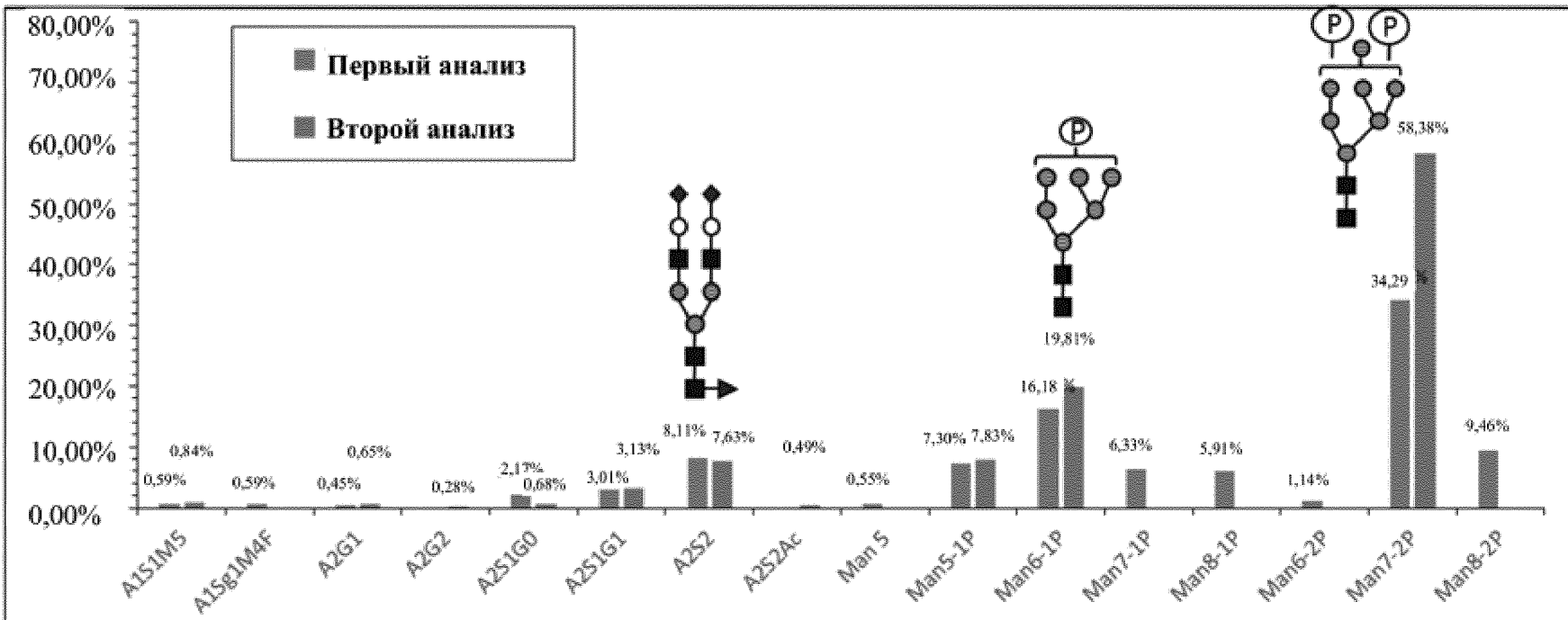
ФИГ. 8С

Профиль N-гликозилирования N334



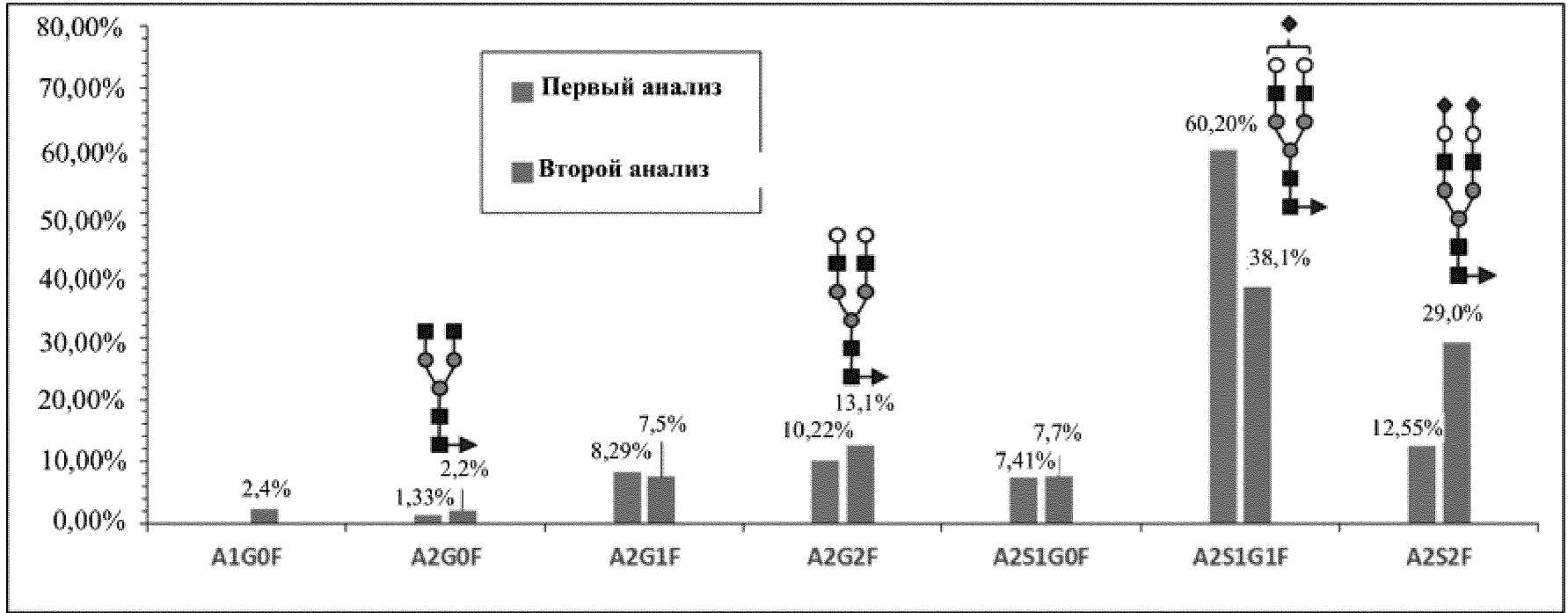
ФИГ. 8D

Профиль N-гликозилирования N414



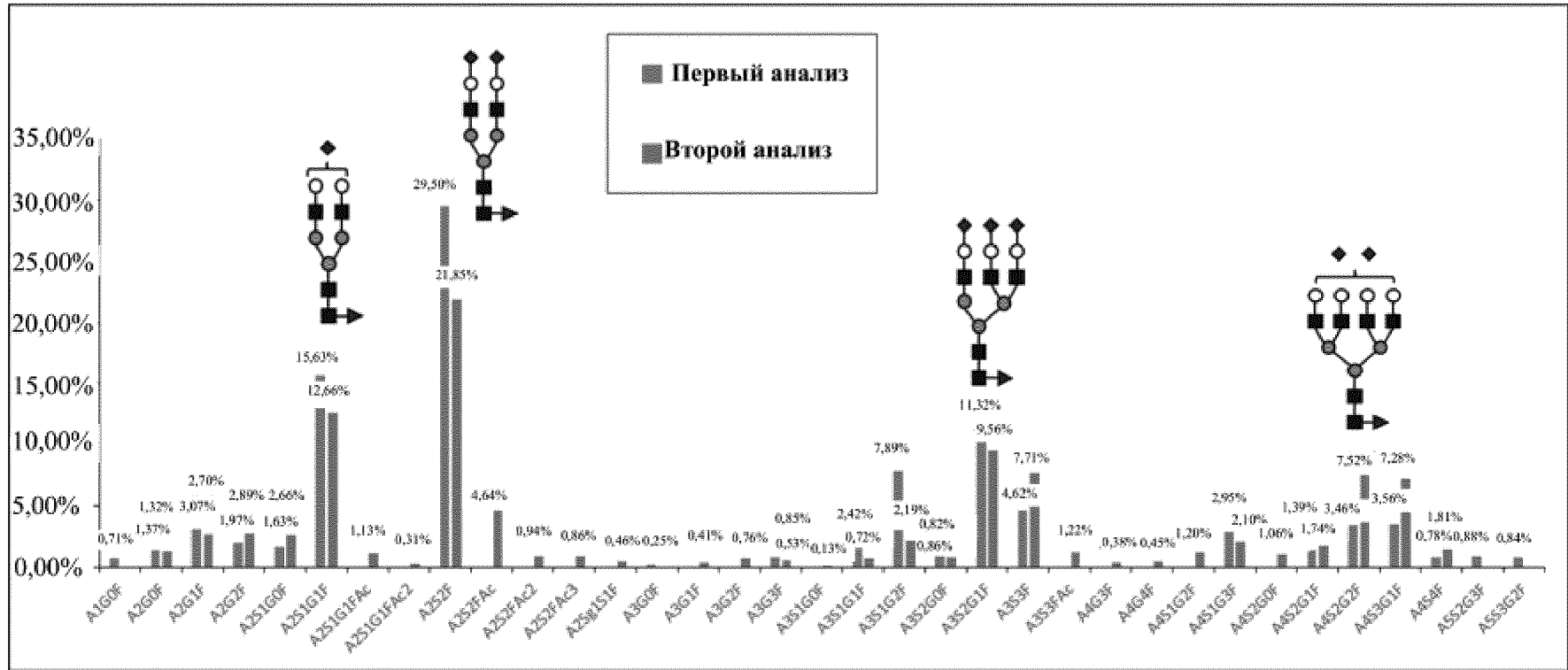
ФИГ. 8E

Профиль N-гликозилирования N596



ФИГ. 8F

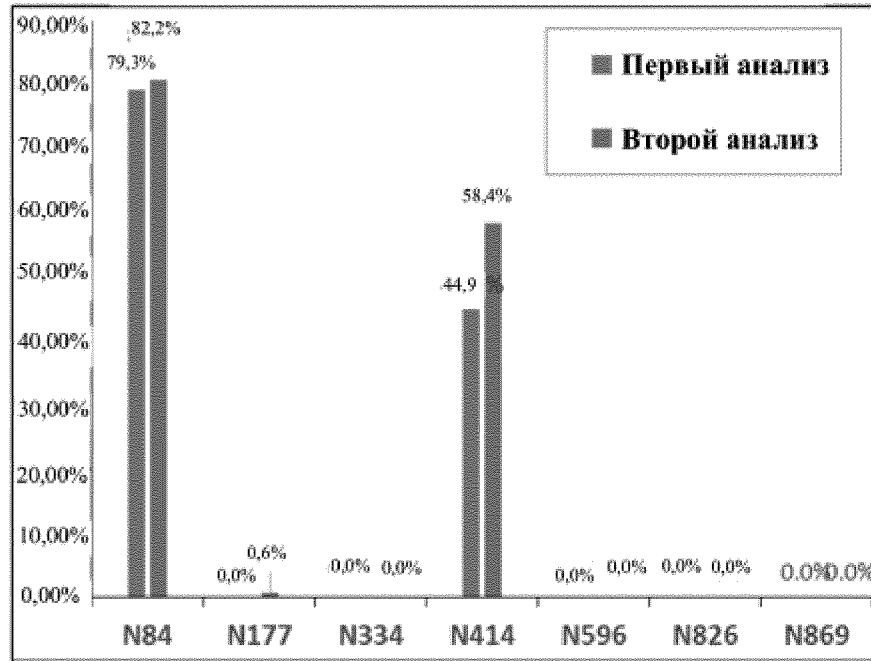
Профиль N-гликозилирования N826



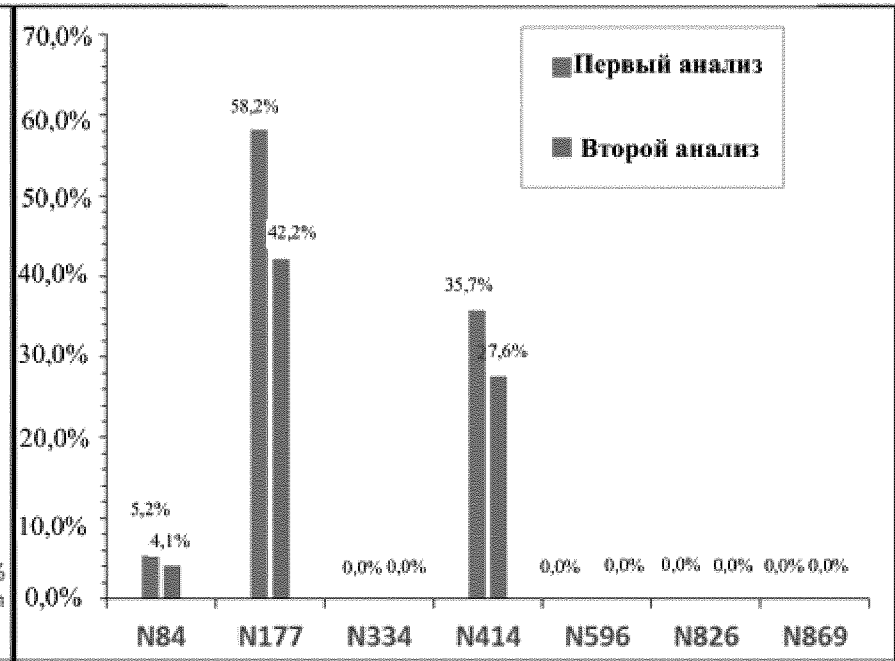
ФИГ. 8G

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

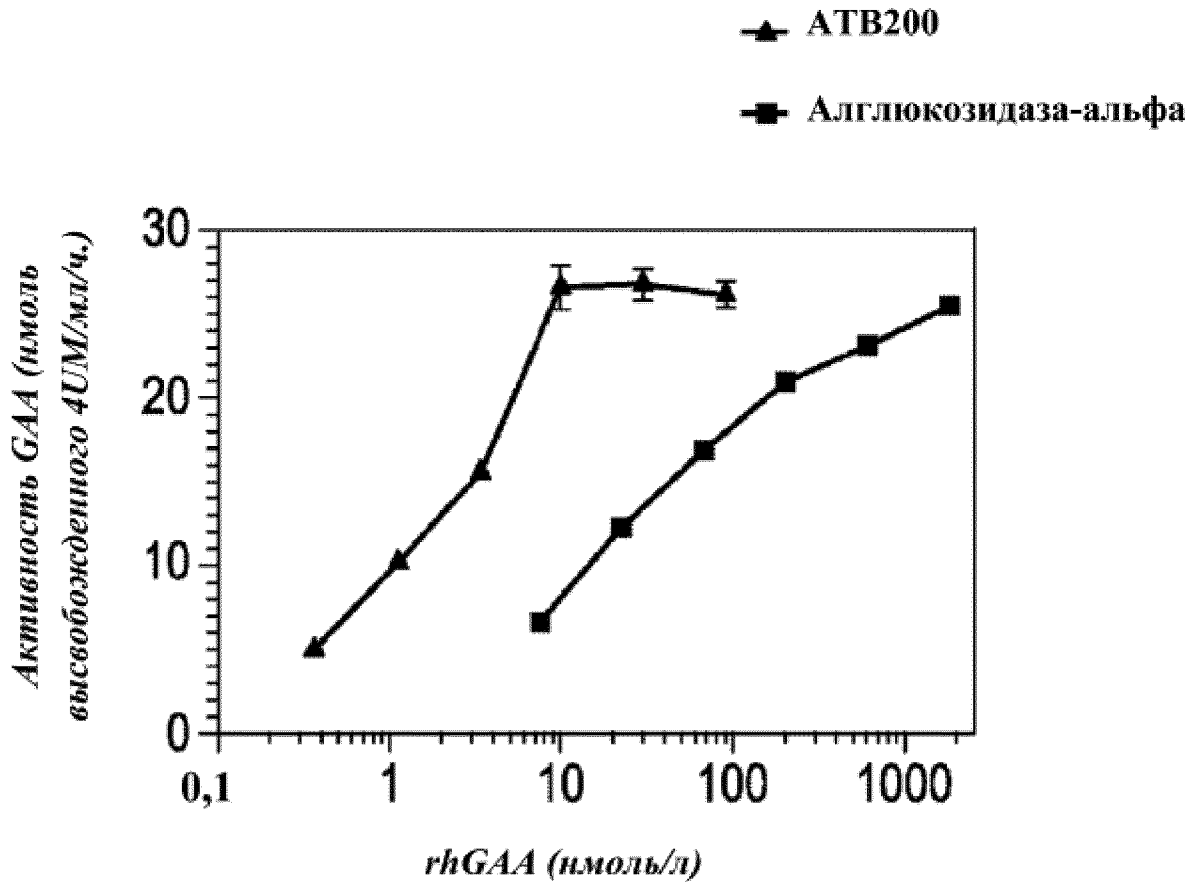
Процентная доля форм бис-М6Р в каждом сайте N-гликозилирования



Процентная доля форм моно-М6Р в каждом сайте N-гликозилирования



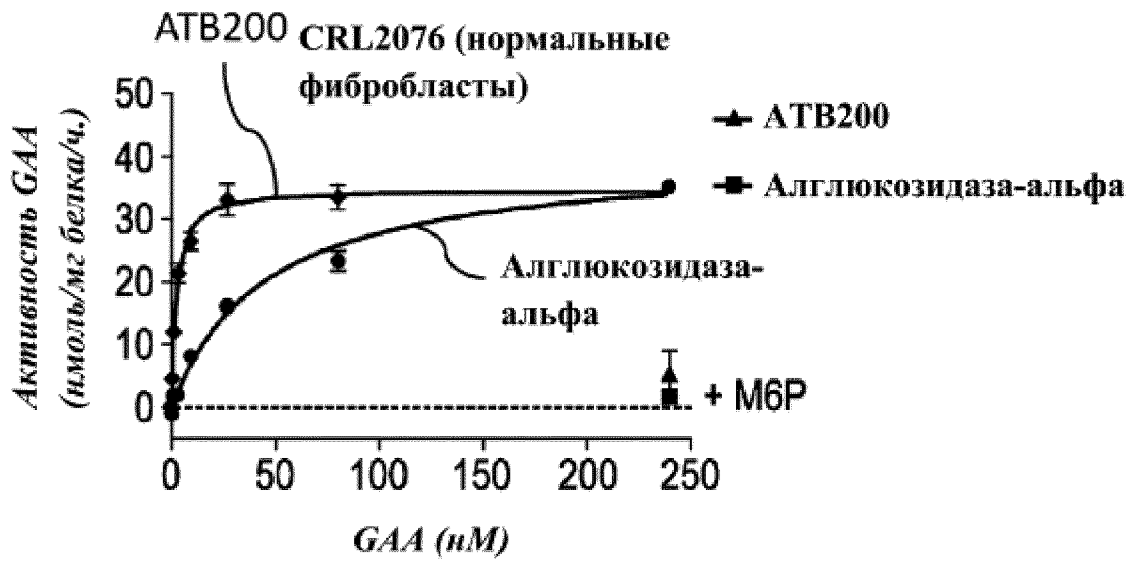
ФИГ. 8H



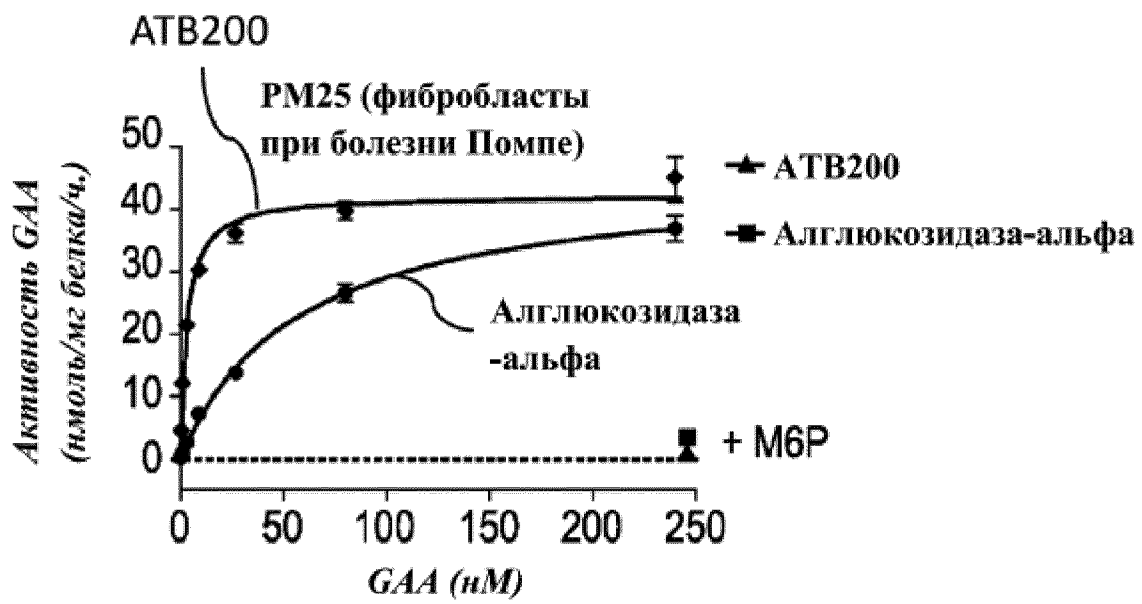
ФИГ. 9А

Гликан	Алглюкозидаза-альфа (моль бис-гликана/моль белка)	АТВ200 (моль бис-гликана/моль белка)
Бис-М6Р	0,1	1,3

ФИГ. 9В



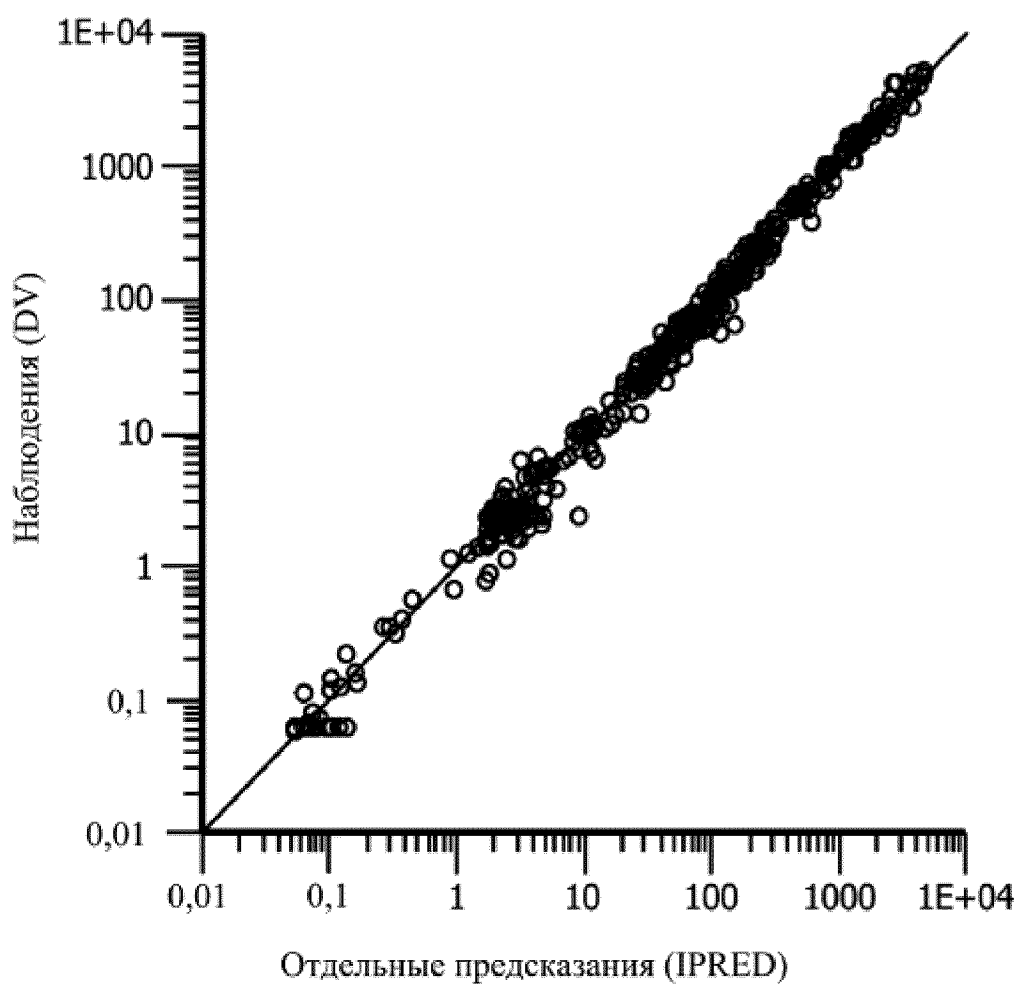
ФИГ. 10А



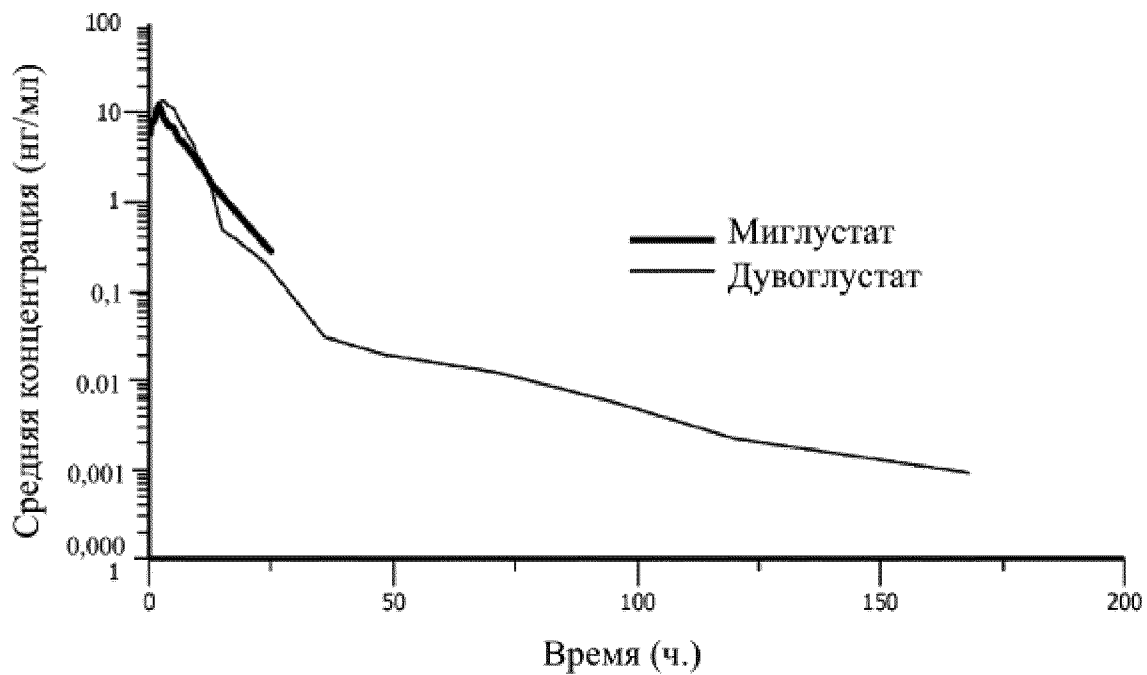
ФИГ. 10В

Линия клеток	$K_{\text{поглощение}} \text{ (нМ)}$	
	AT200	Lumizyme
Нормальные	2	56
При болезни Помпе	3	57

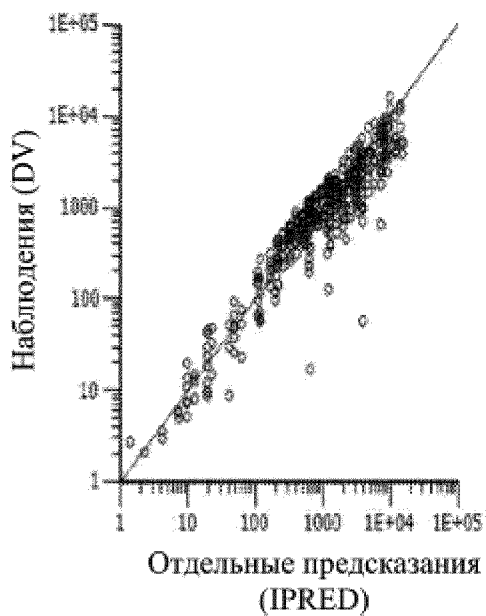
ФИГ. 10С



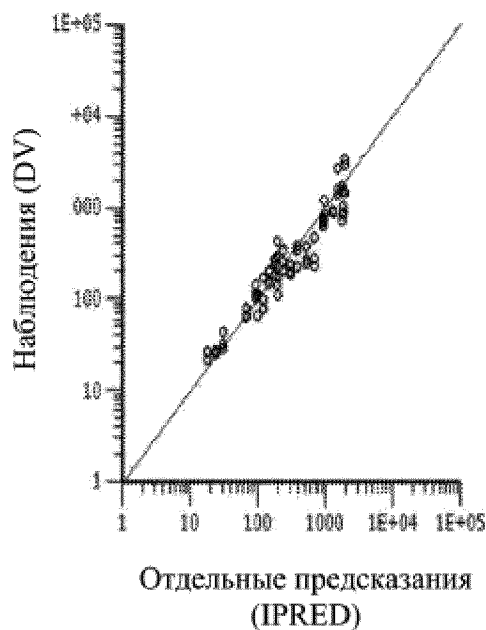
ФИГ. 11



ФИГ. 12



ФИГ. 13А

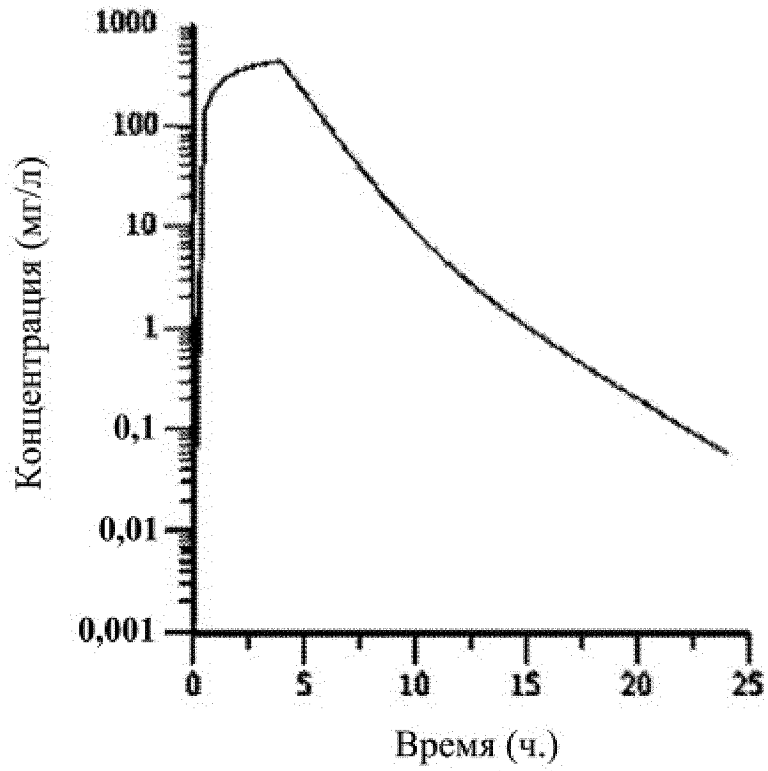


ФИГ. 13В

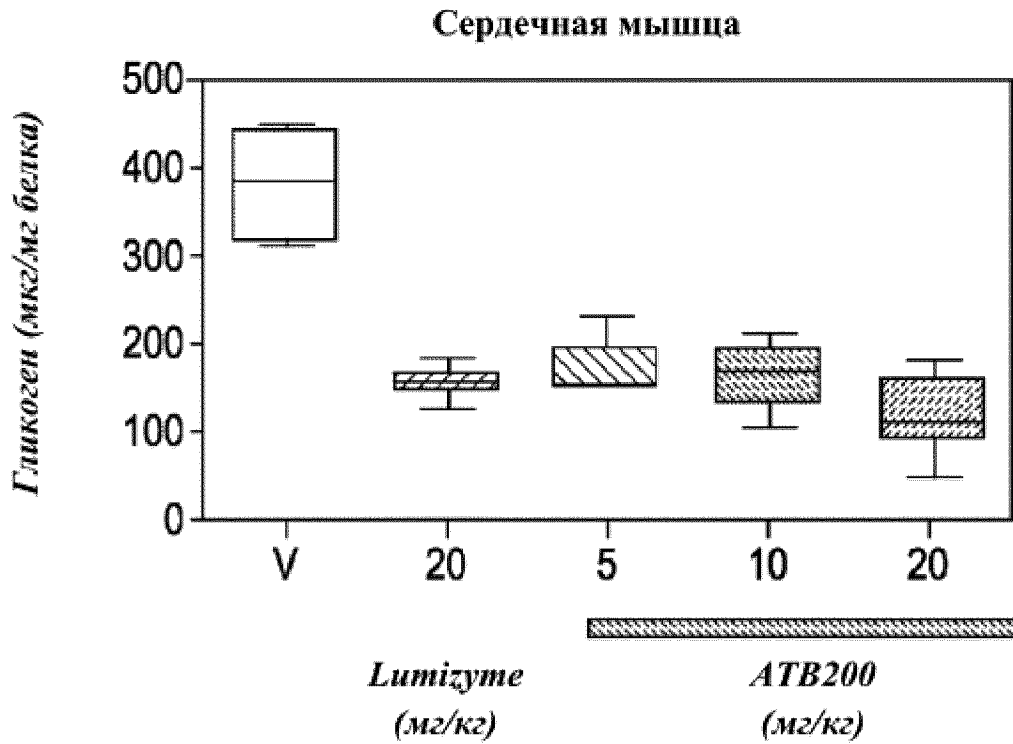
CO_b (нг/мл)



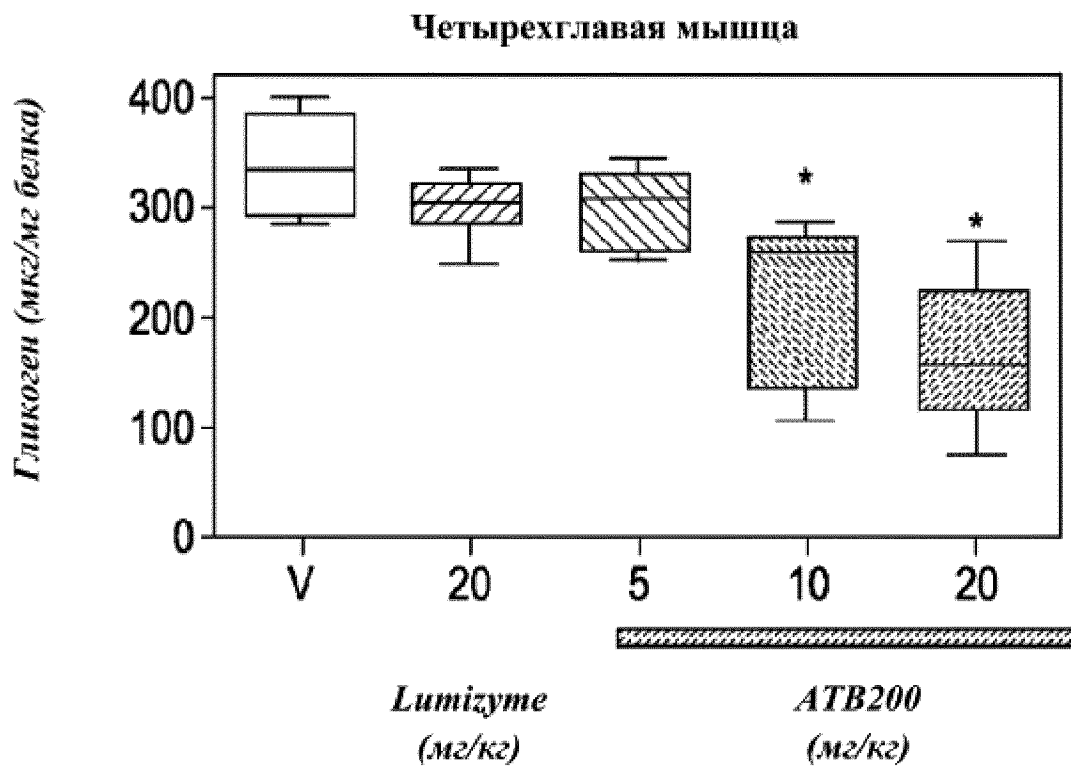
ФИГ. 14



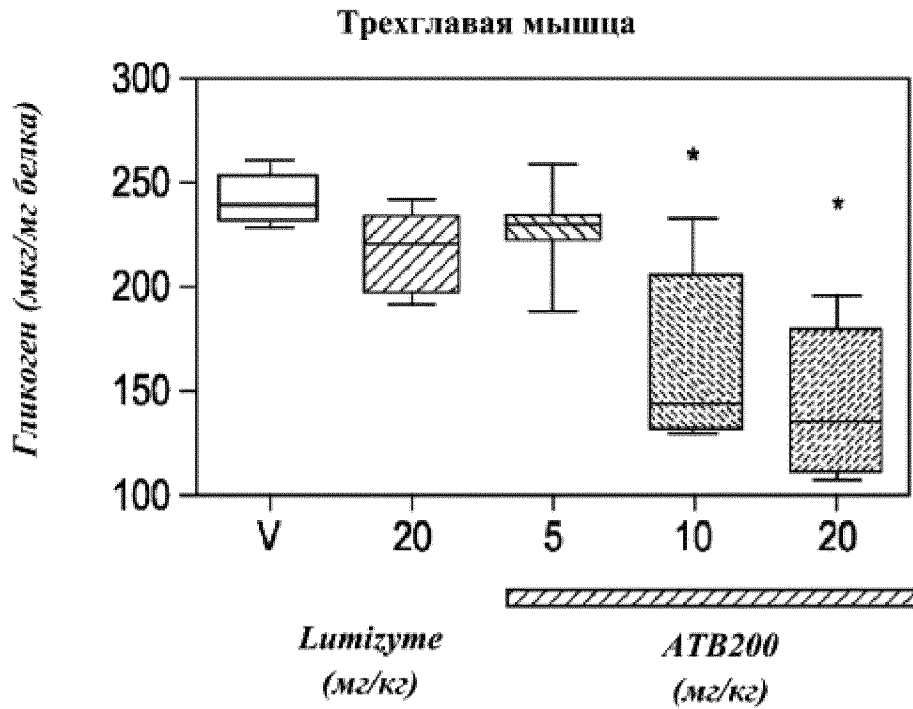
ФИГ. 15



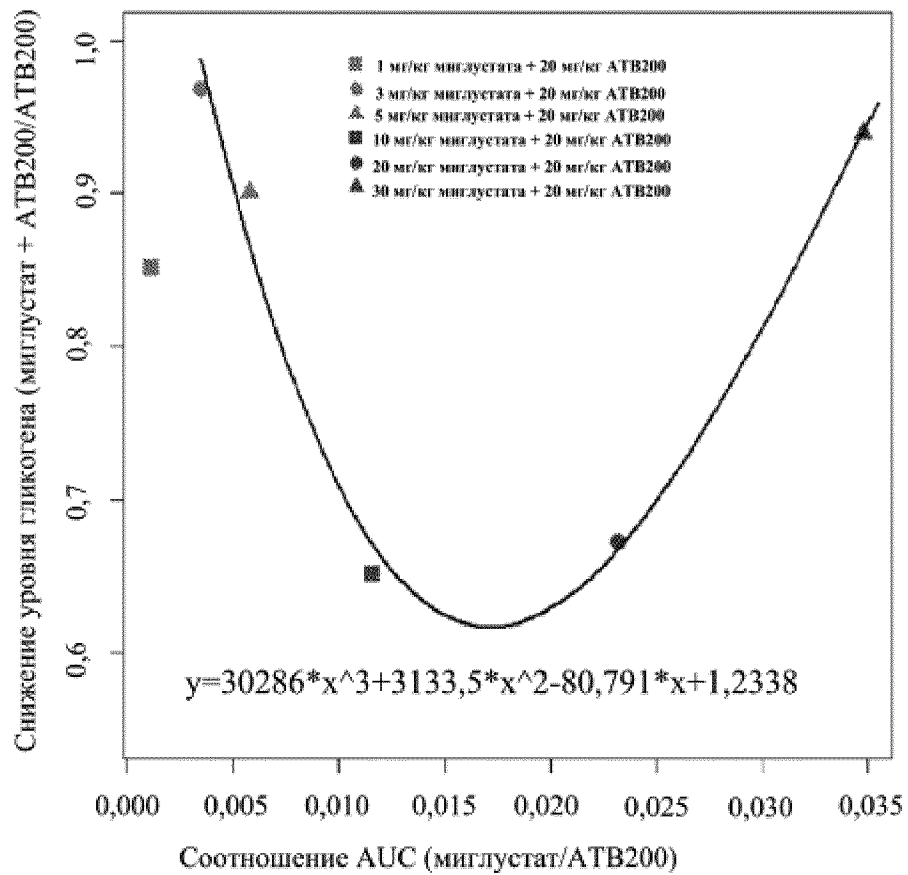
ФИГ. 16А



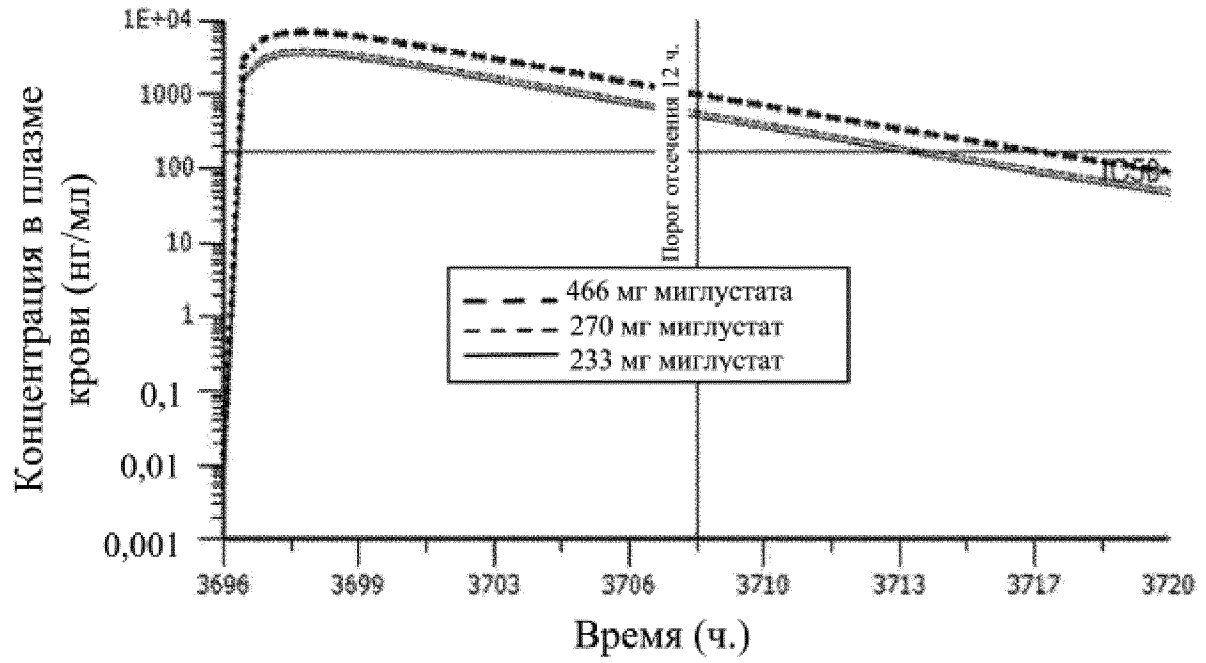
ФИГ. 16В



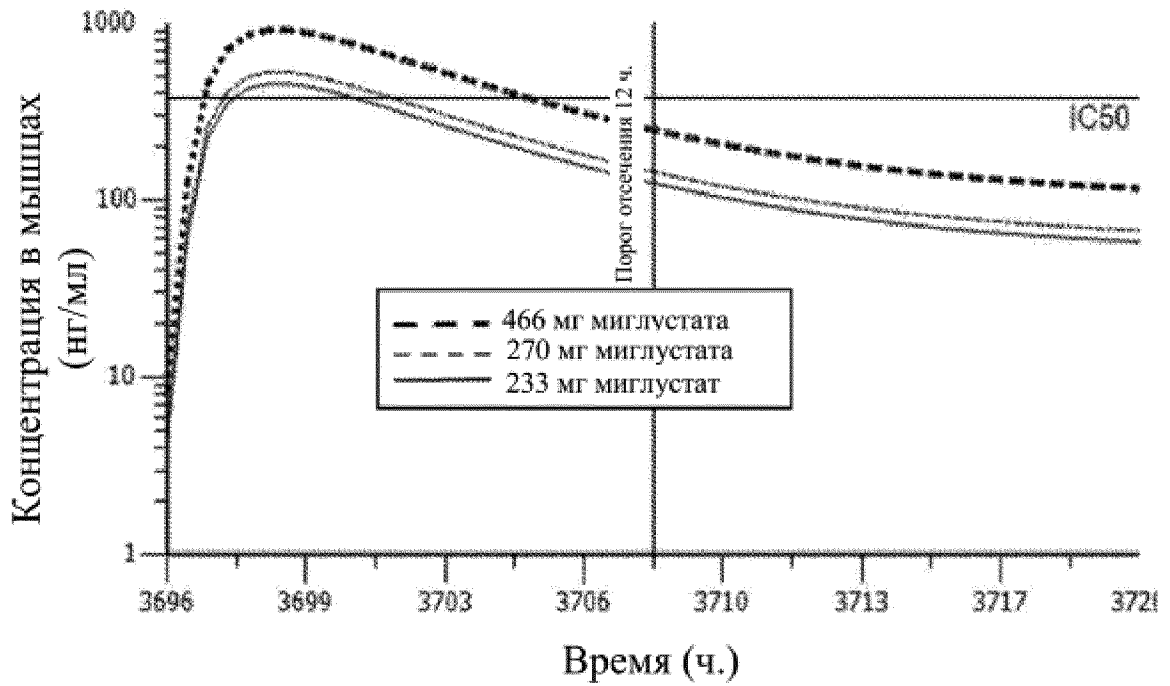
ФИГ. 16С



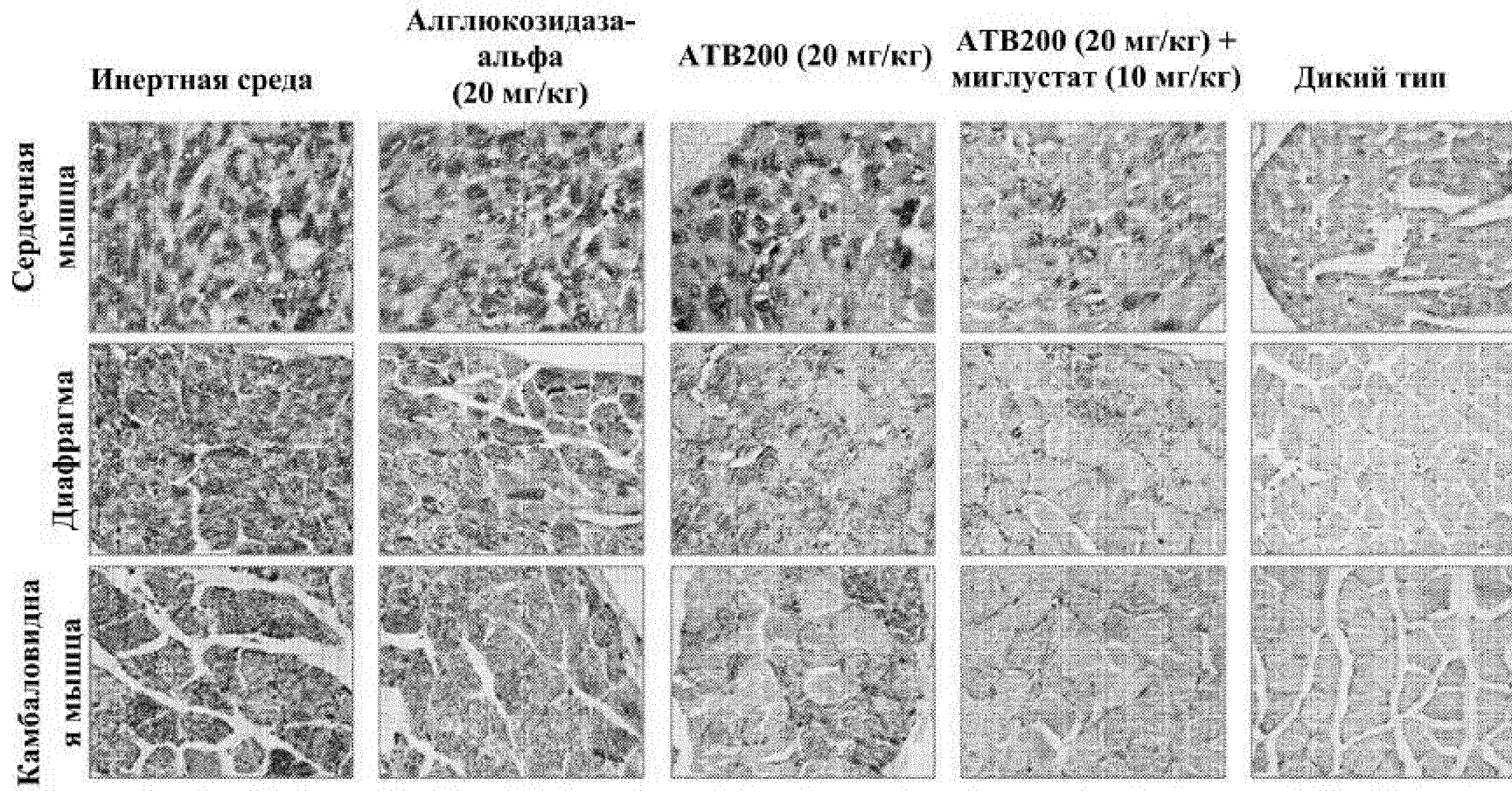
ФИГ. 17



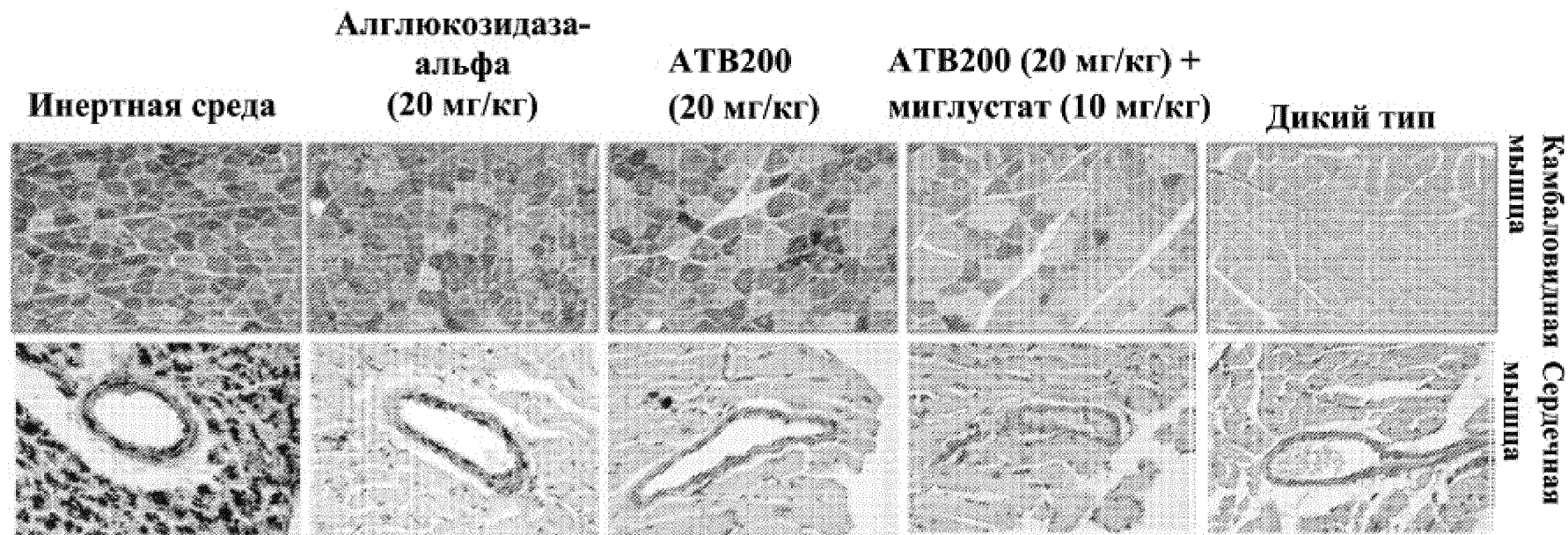
ФИГ. 18



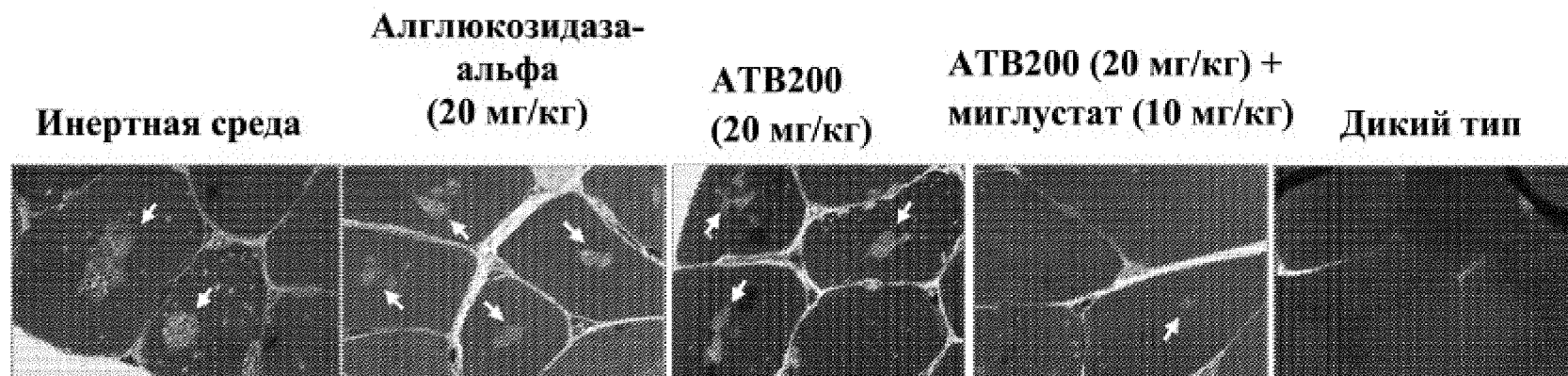
ФИГ. 19



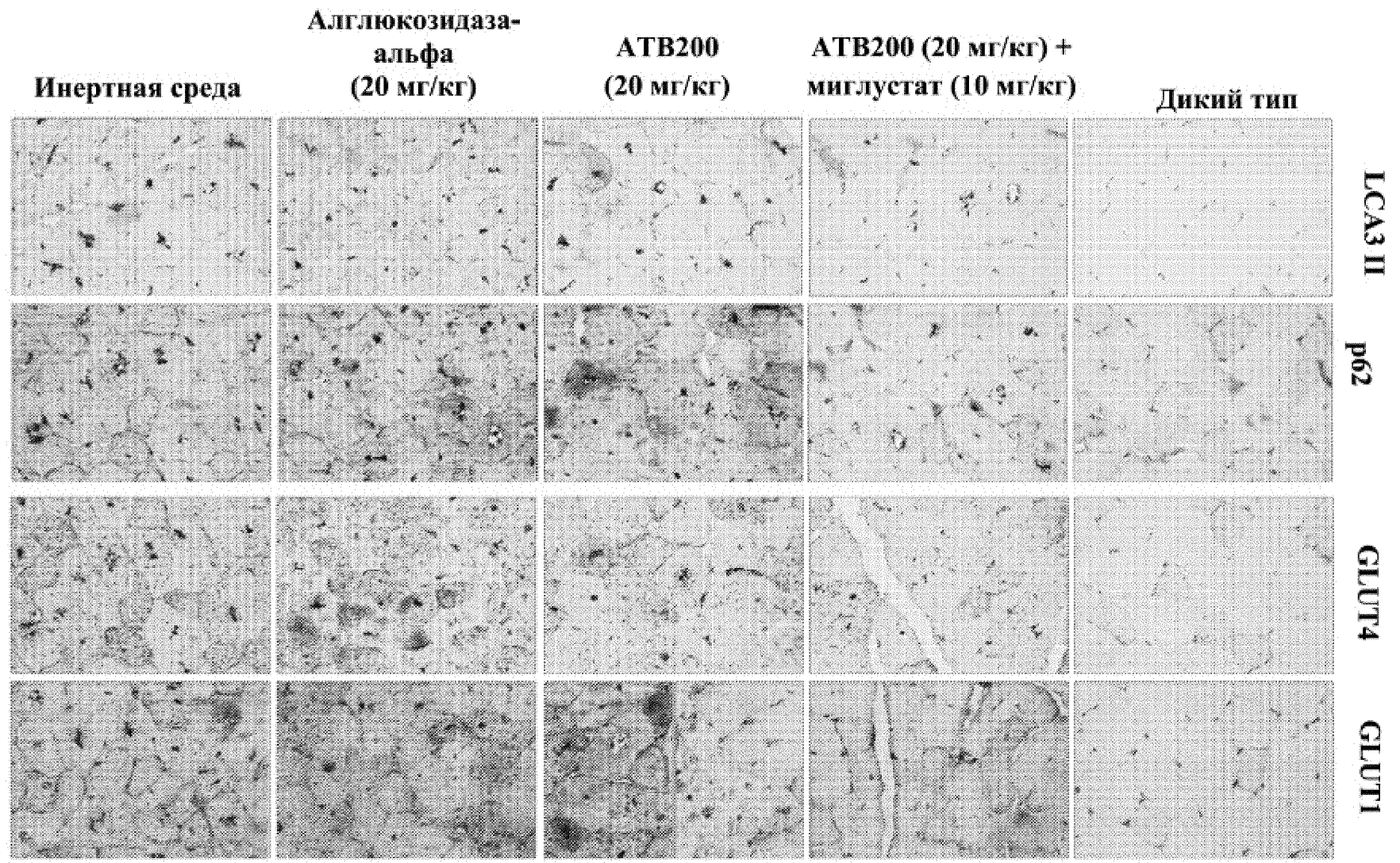
ФИГ. 20



ФИГ. 21

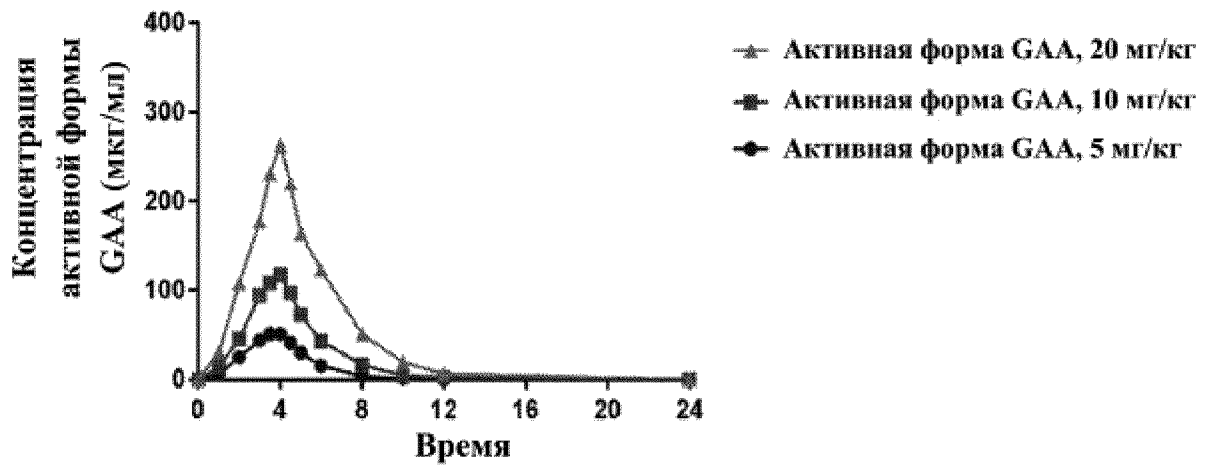


ФИГ. 22



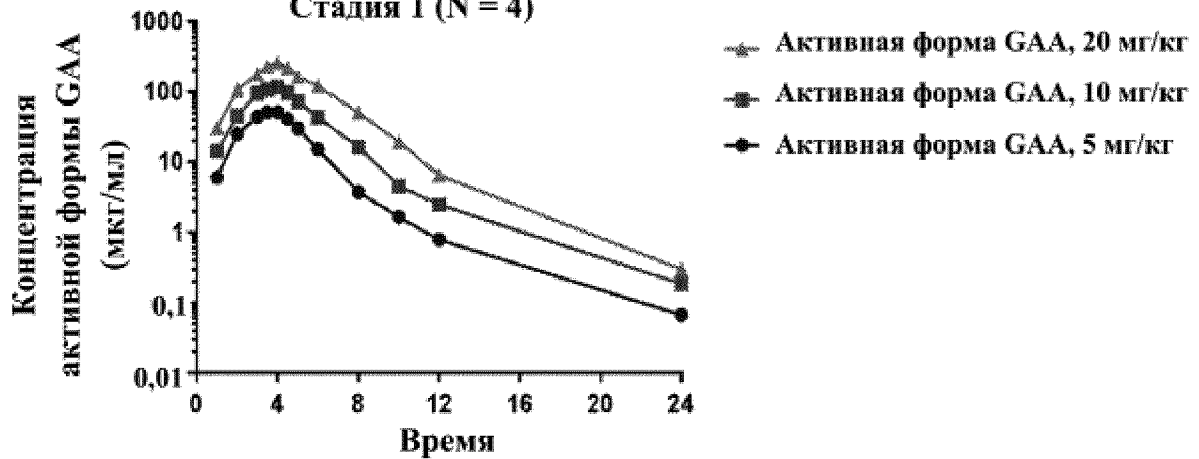
ФИГ. 23

Среднее воздействие
активной формы GAA
Стадия 1 (N = 4)



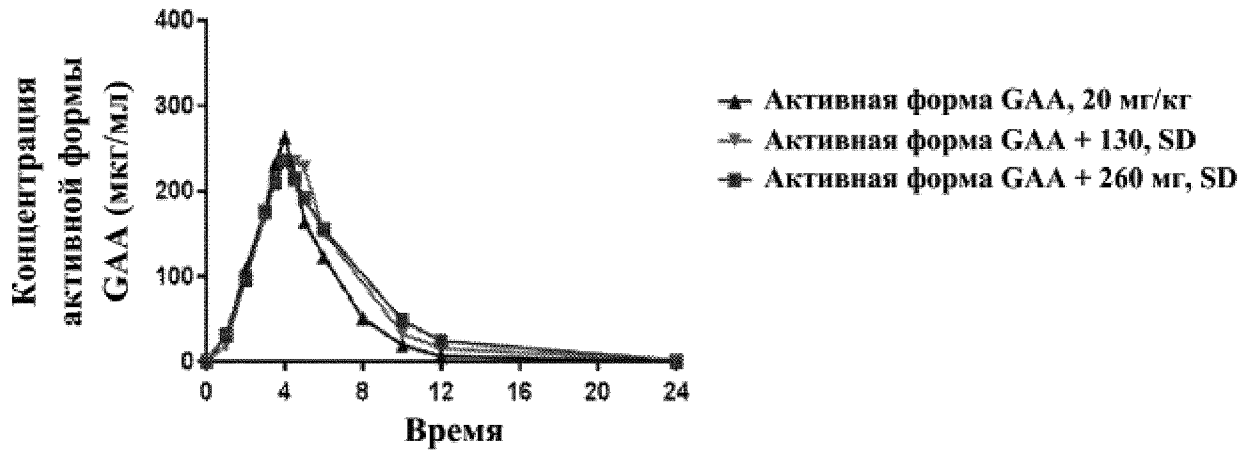
ФИГ. 24А

Среднее воздействие
активной формы GAA
Стадия 1 (N = 4)



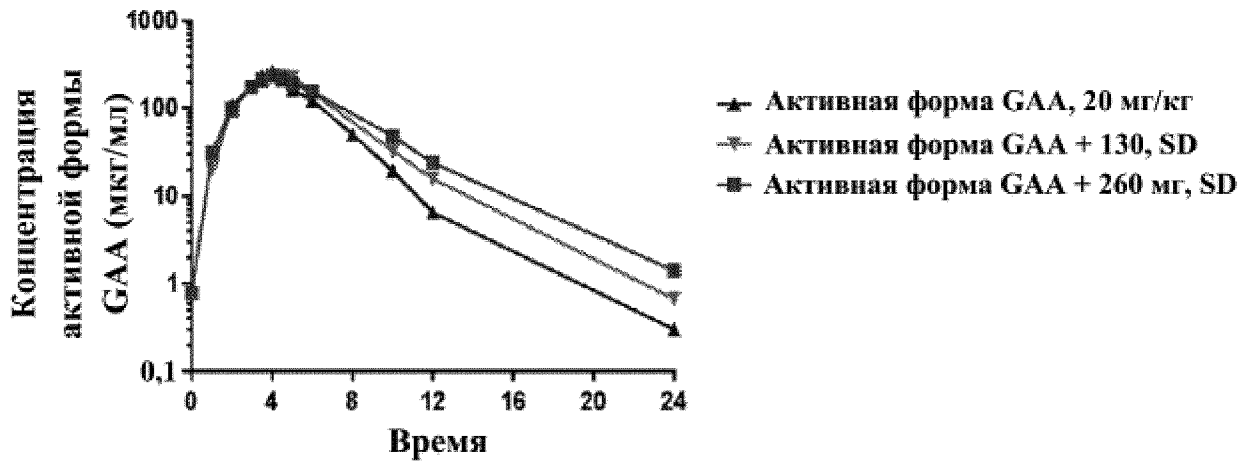
ФИГ. 24В

Среднее воздействие активной формы GAA (SD) при 20 мг/кг в отдельности в сравнении с 20 мг/кг + 130 мг или 260 мг миглустата



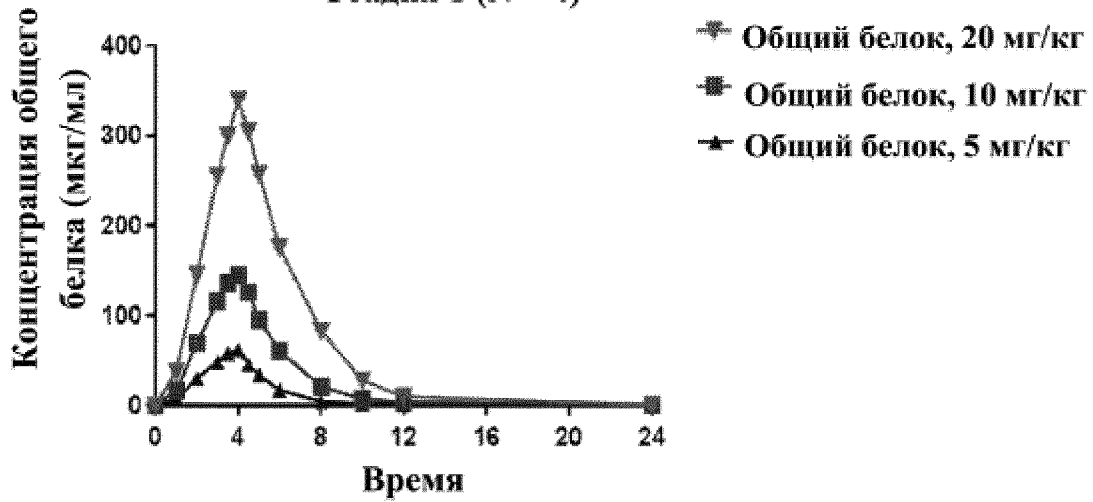
ФИГ. 24С

Среднее воздействие активной формы GAA (SD) при 20 мг/кг в отдельности в сравнении с 20 мг/кг + 130 мг или 260 мг миглустата



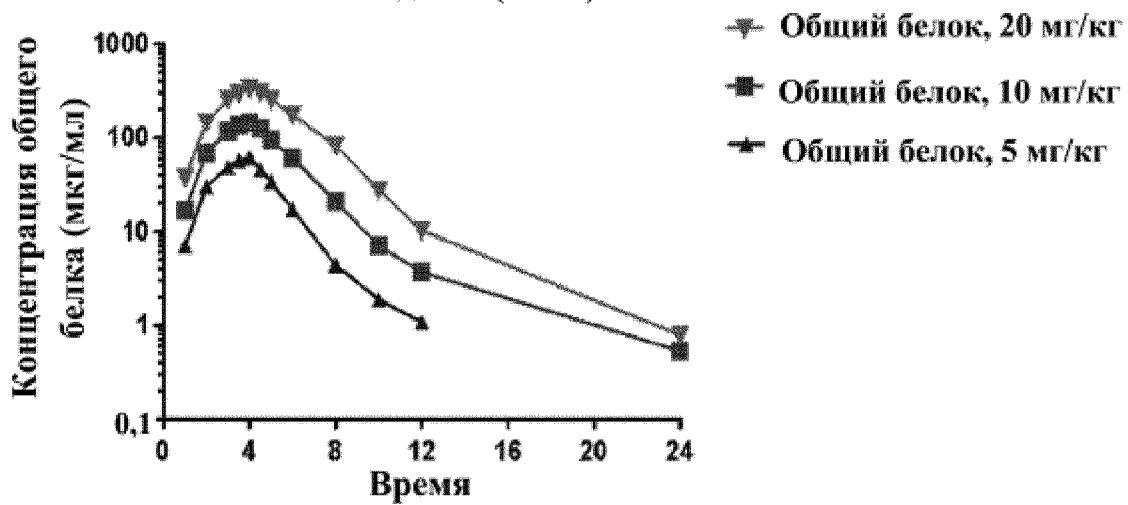
ФИГ. 24D

Среднее воздействие общего белка
Стадия 1 (N = 4)



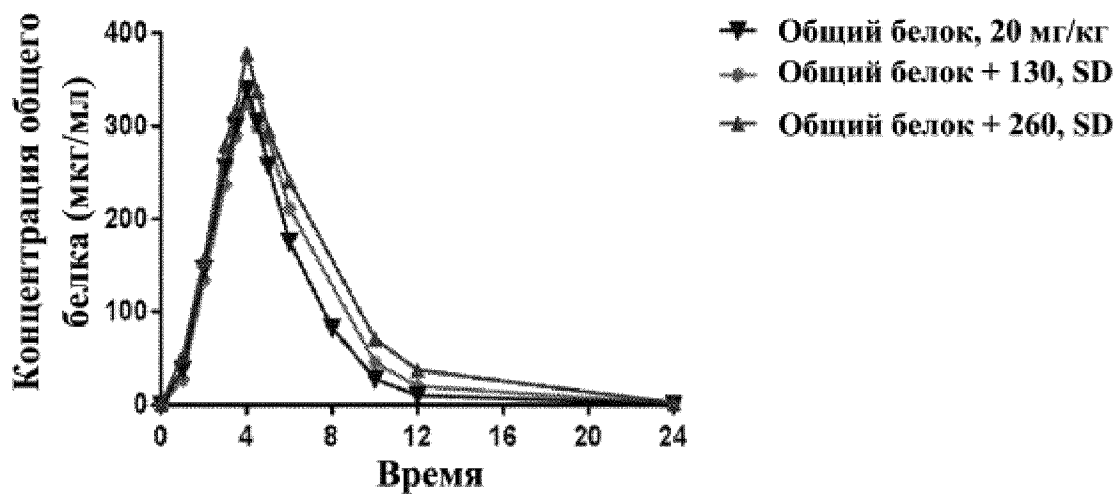
ФИГ. 25А

Среднее воздействие общего белка
Стадия 1 (N = 4)



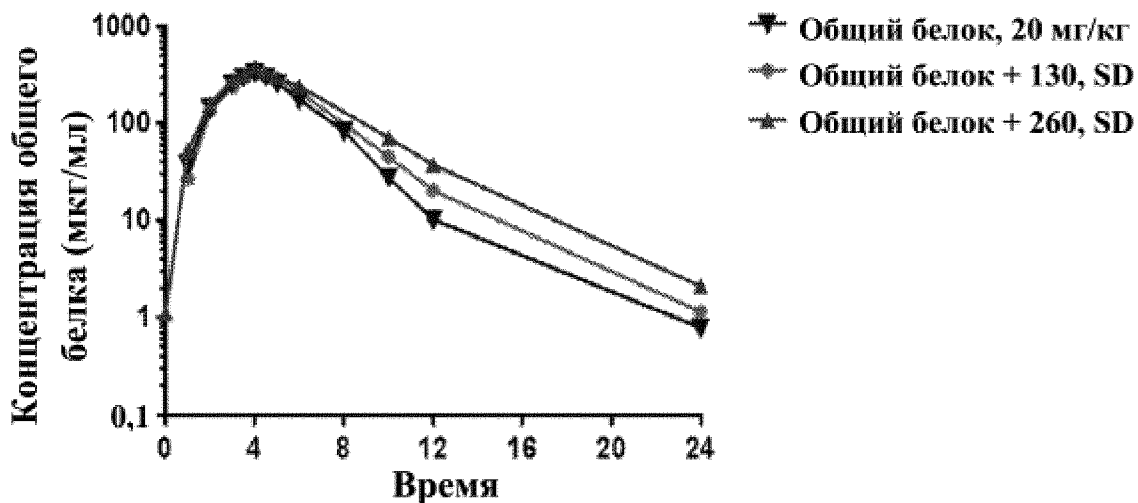
ФИГ. 25В

Среднее воздействие общего белка при 20 мг/кг в отдельности в сравнении с 20 мг/кг + 130 мг или 260 мг миглустата

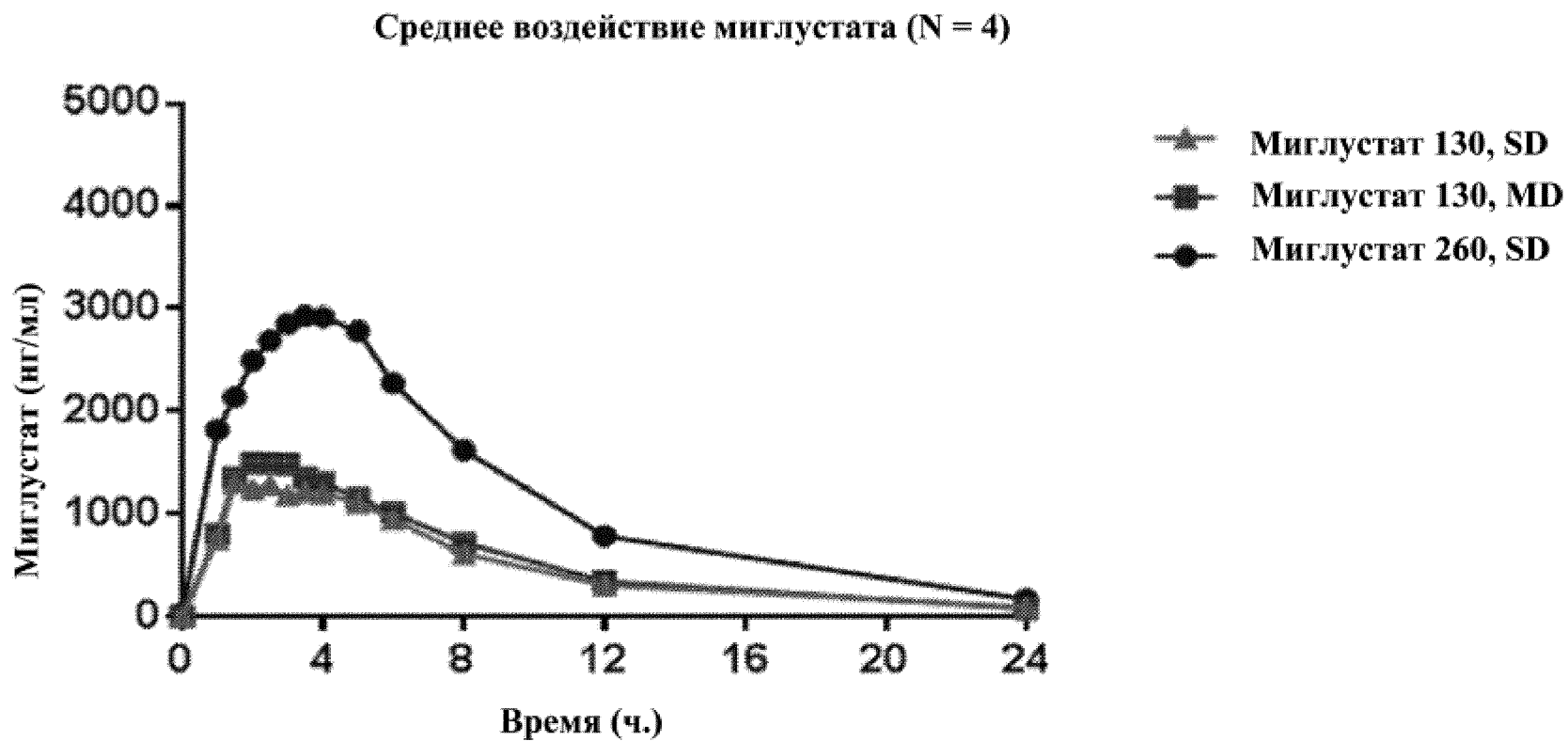


ФИГ. 25С

Среднее воздействие общего белка при 20 мг/кг в отдельности в сравнении с 20 мг/кг + 130 мг или 260 мг миглустата



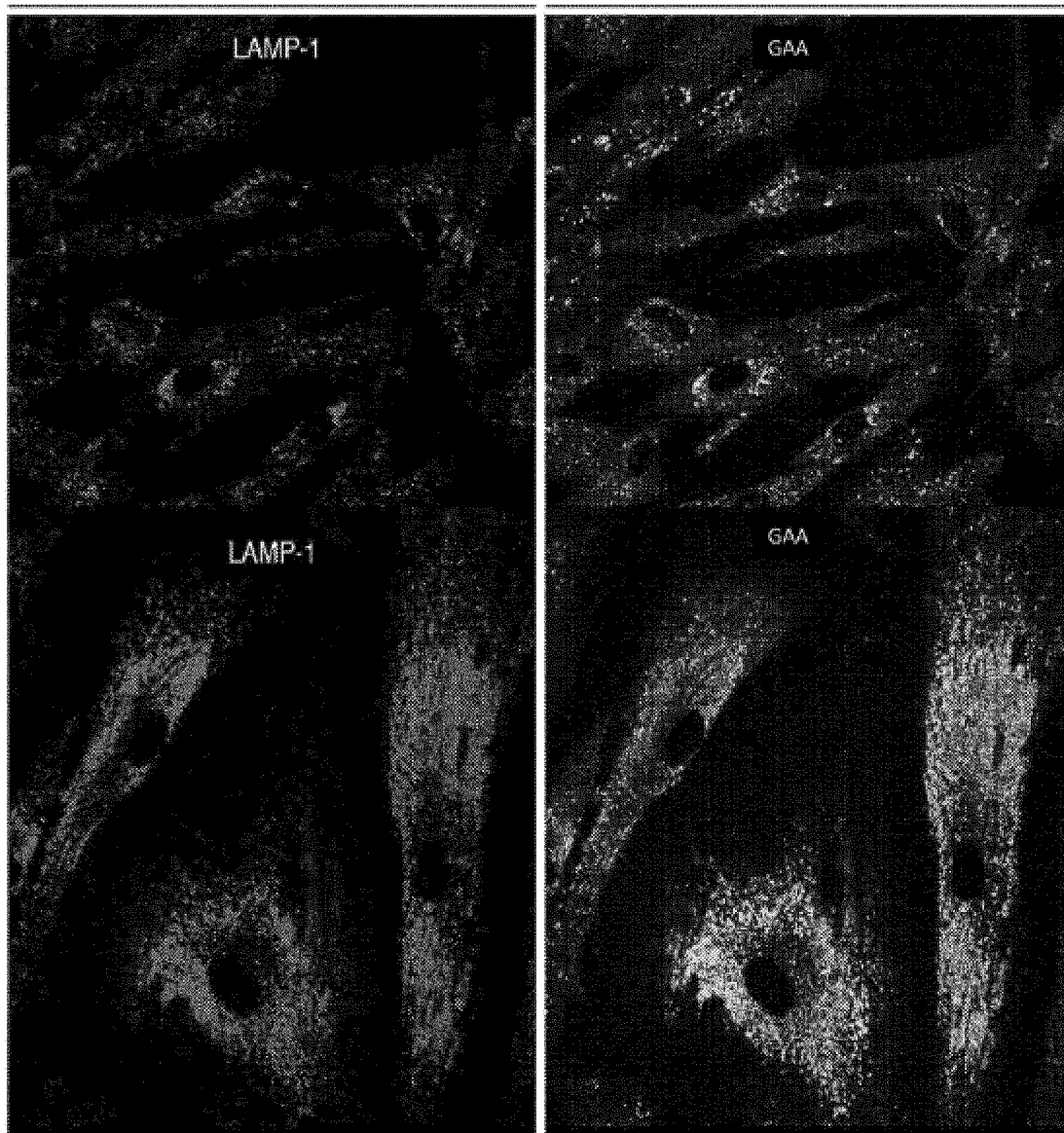
ФИГ. 25D



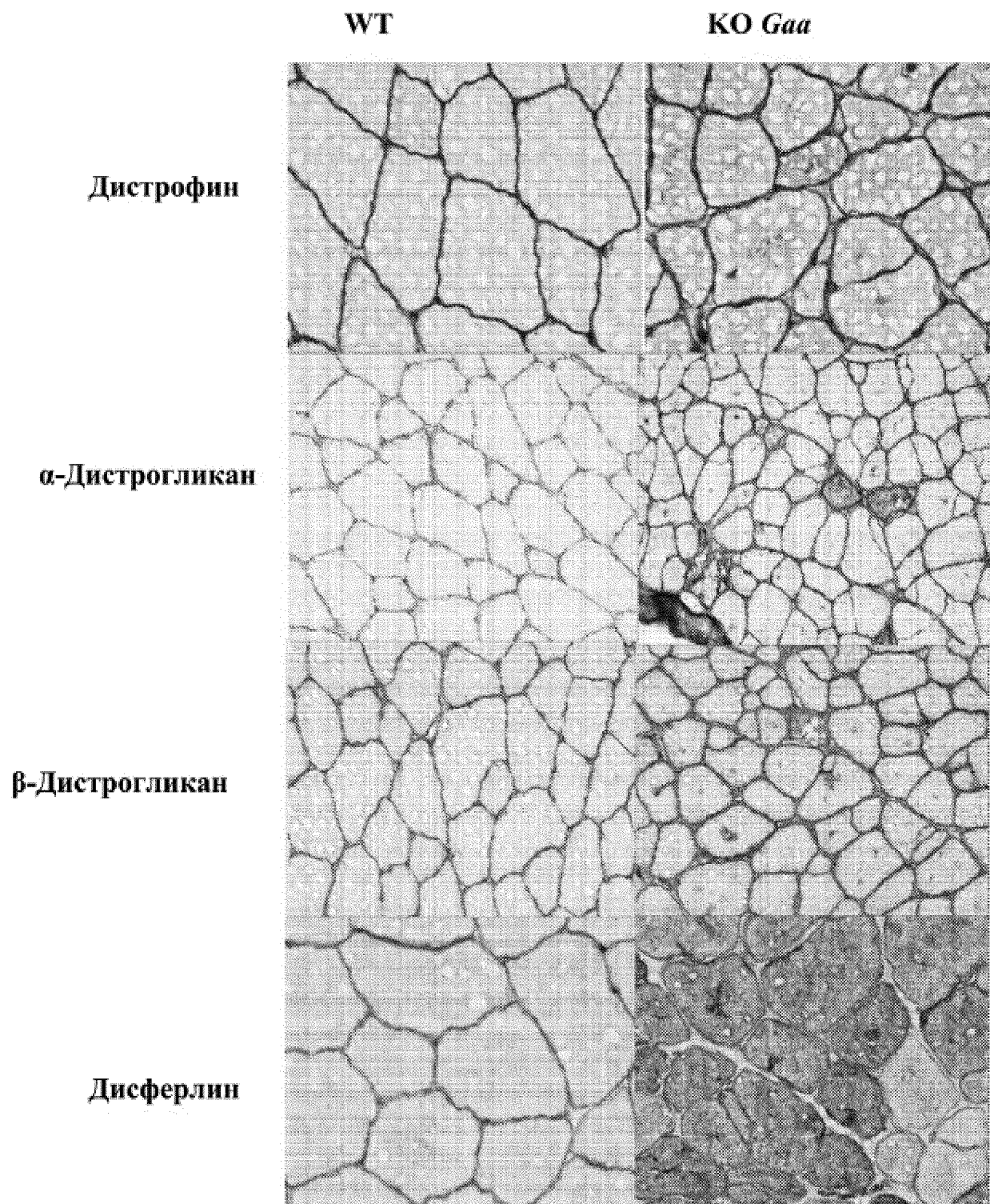
ФИГ. 26

Дикий тип

При болезни Помпе (IVS1)



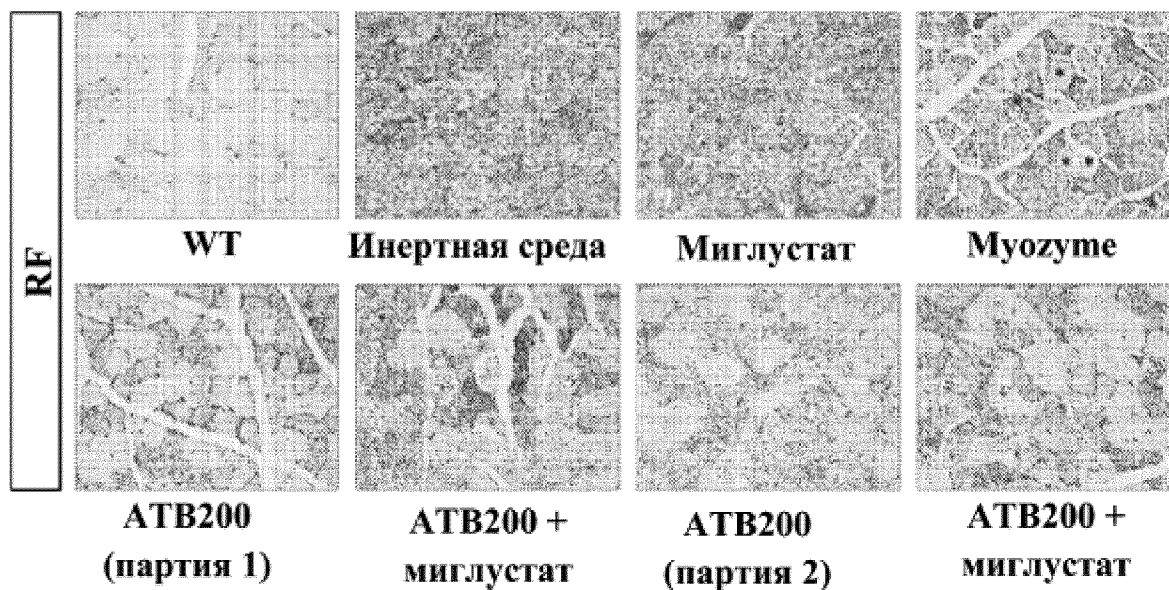
ФИГ. 27



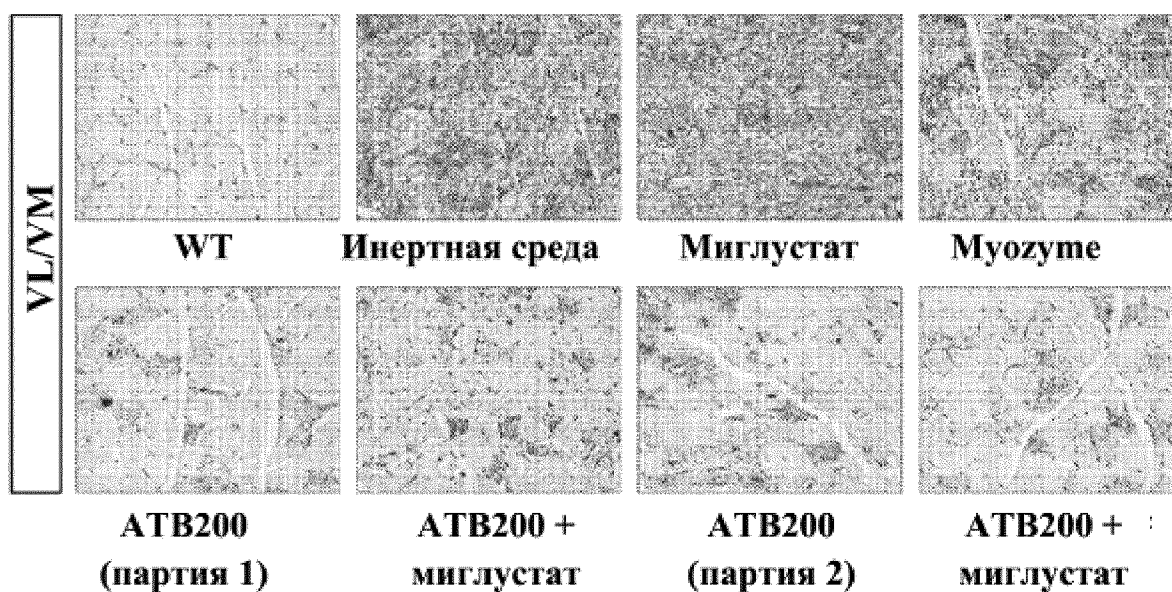
ФИГ. 28

ИНС LAMP1

Увеличение = 200x



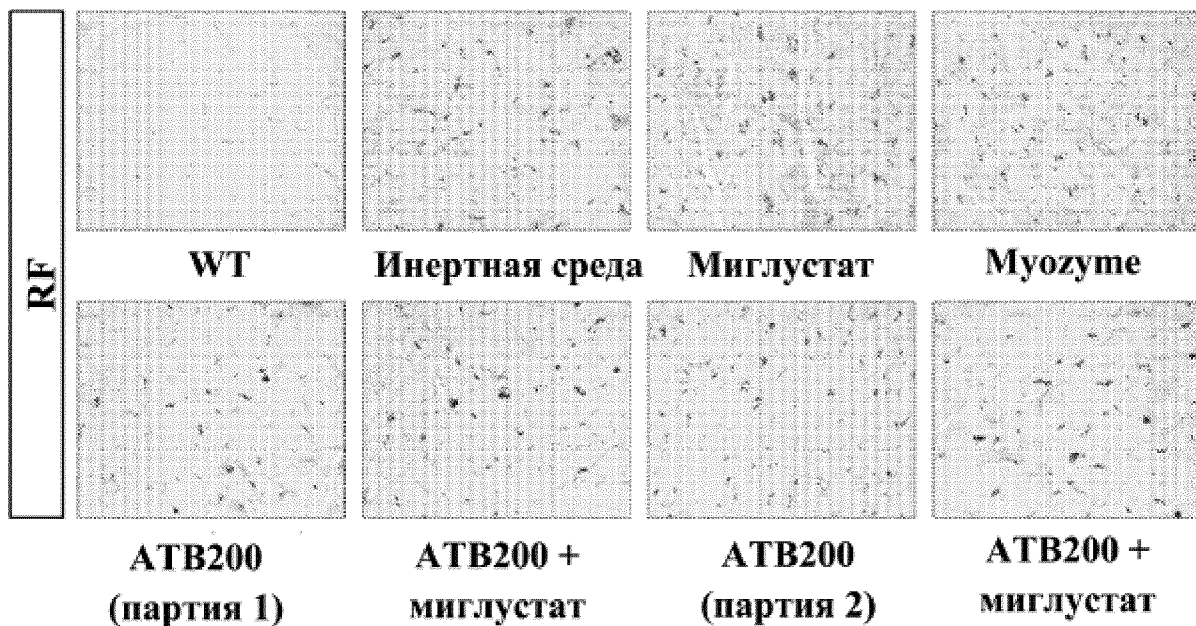
ФИГ. 29А



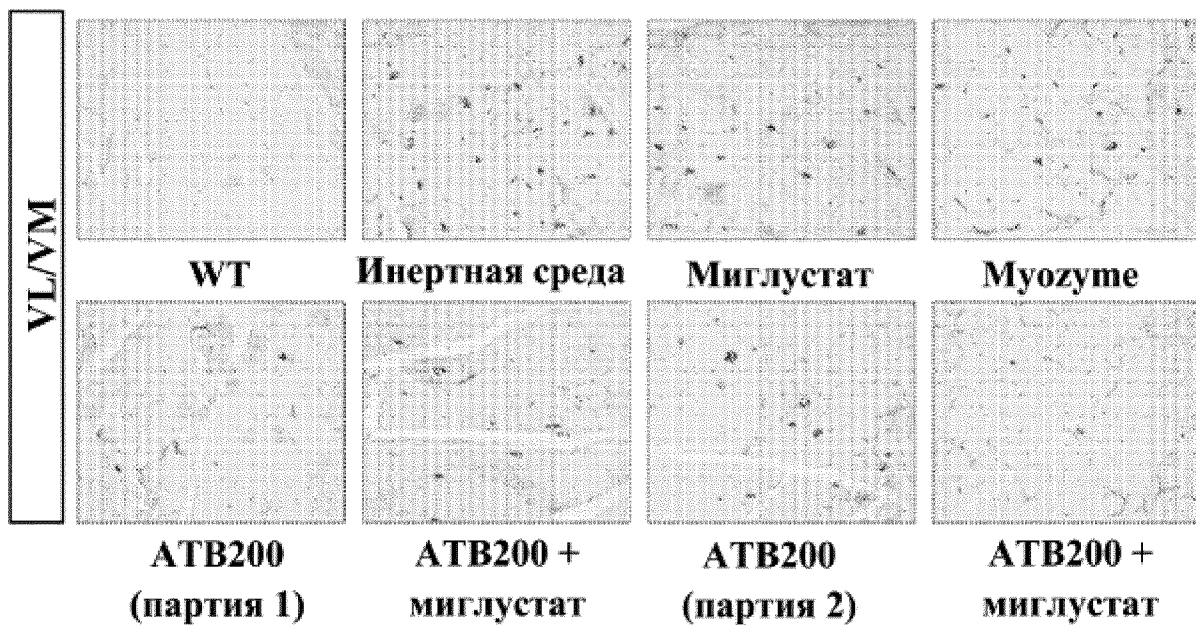
ФИГ. 29В

ИНС LC3 II

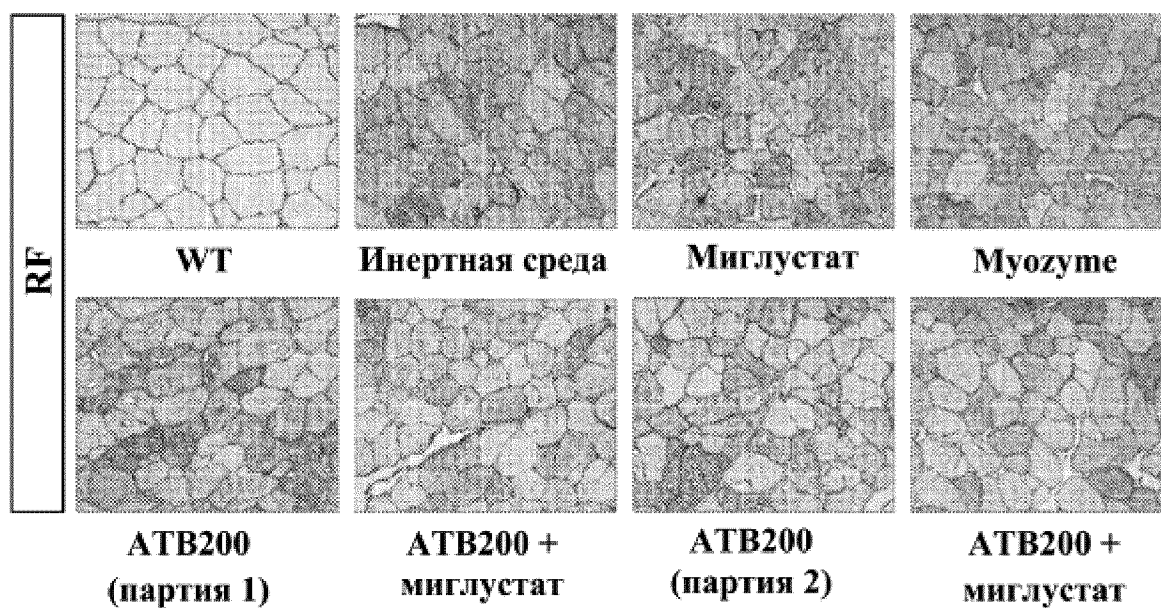
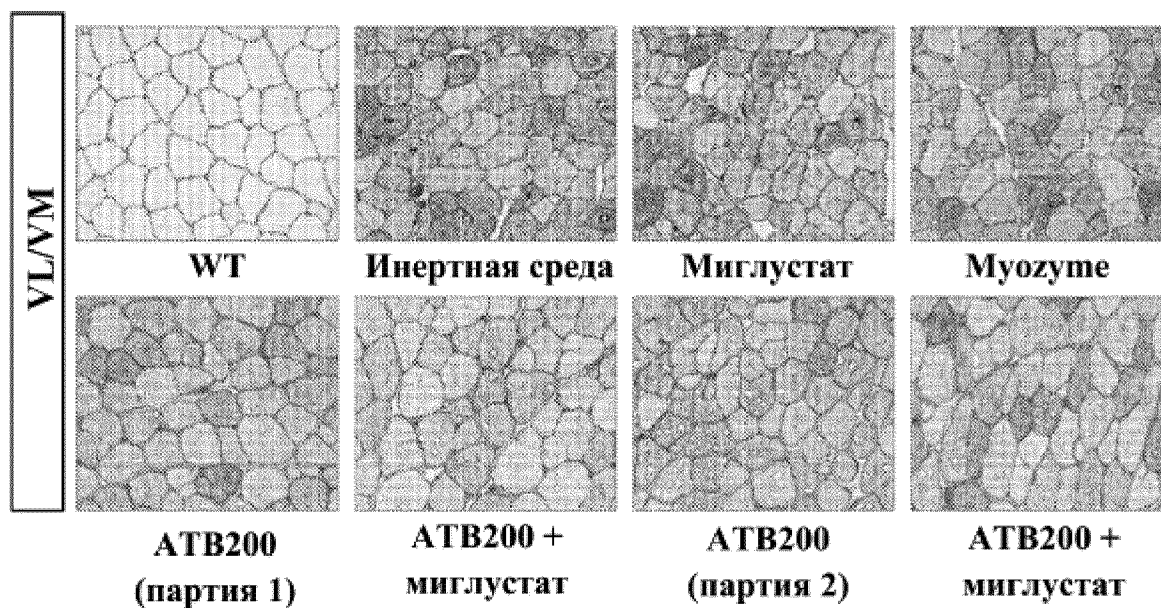
Увеличение = 200x

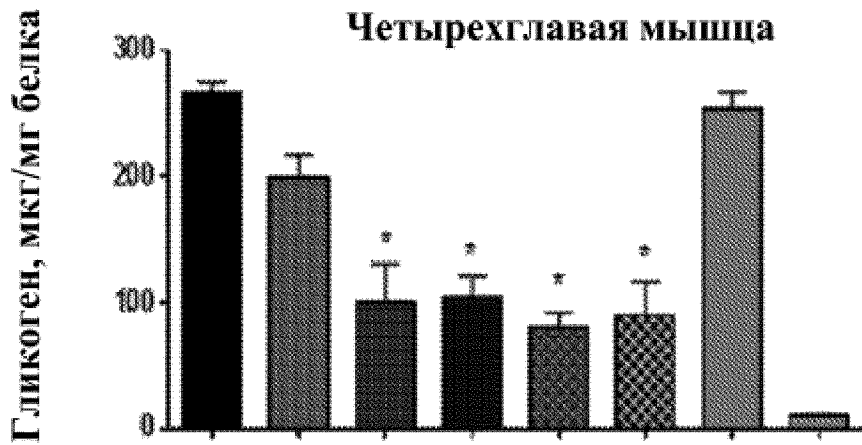


ФИГ. 30А

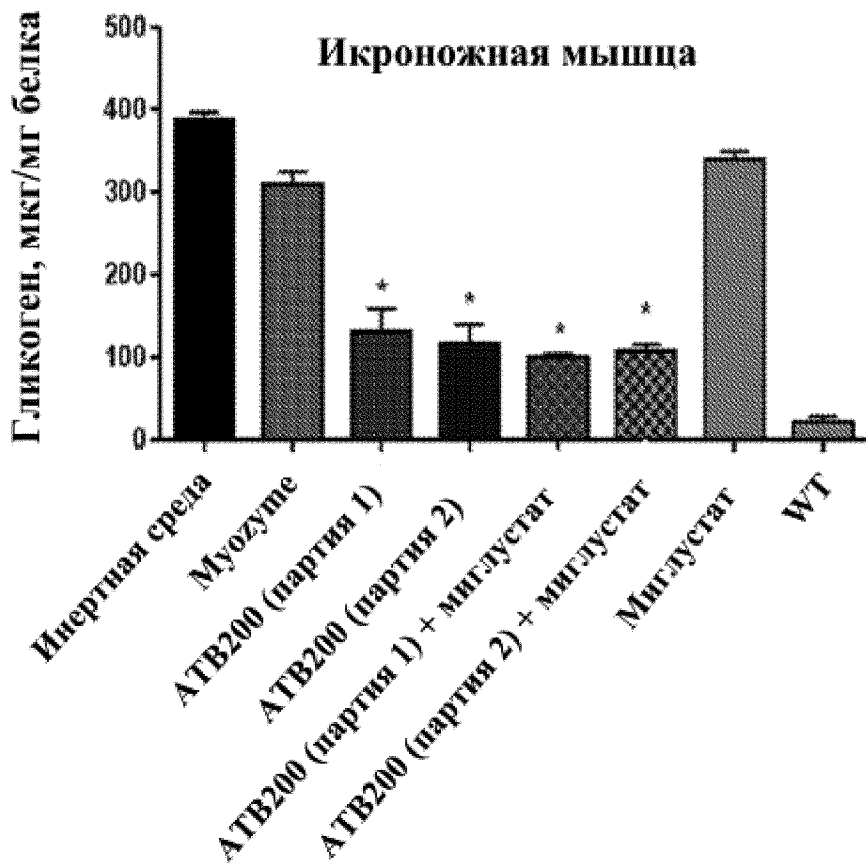


ФИГ. 30В

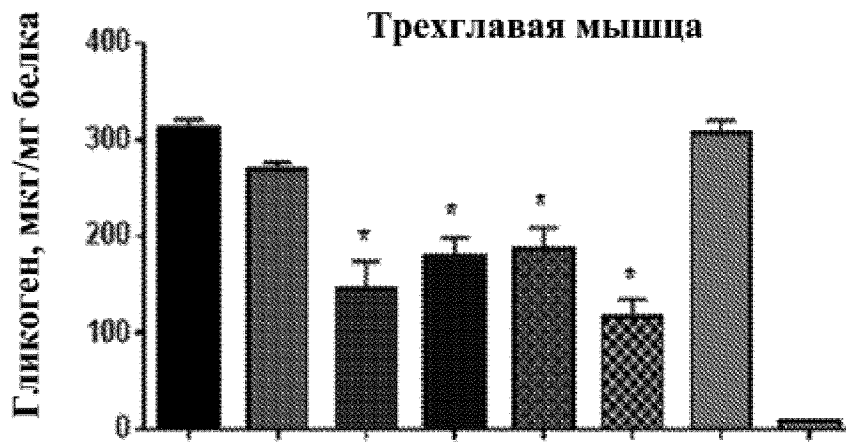
ИНС дисферлина*Увеличение = 200x***ФИГ. 31А****ФИГ. 31В**



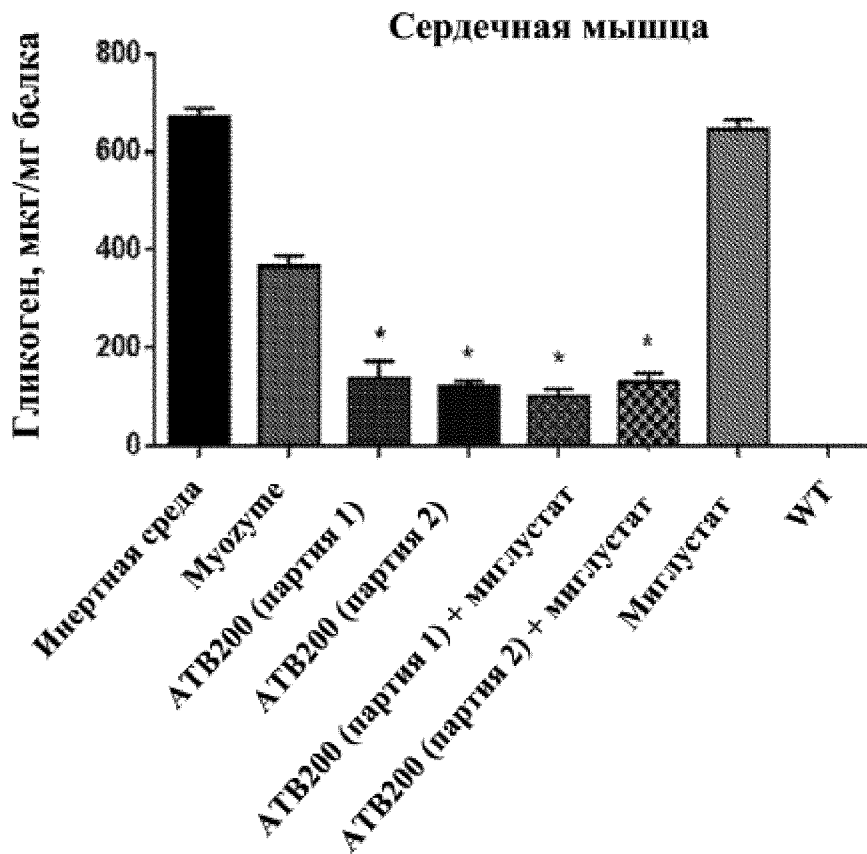
ФИГ. 32А



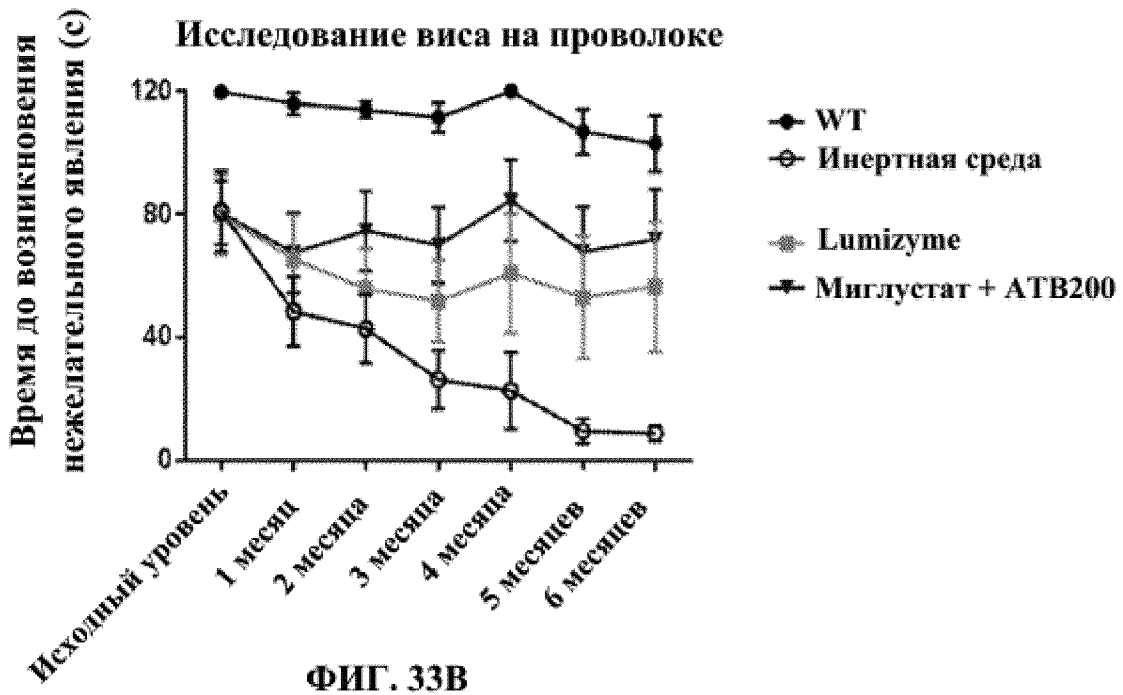
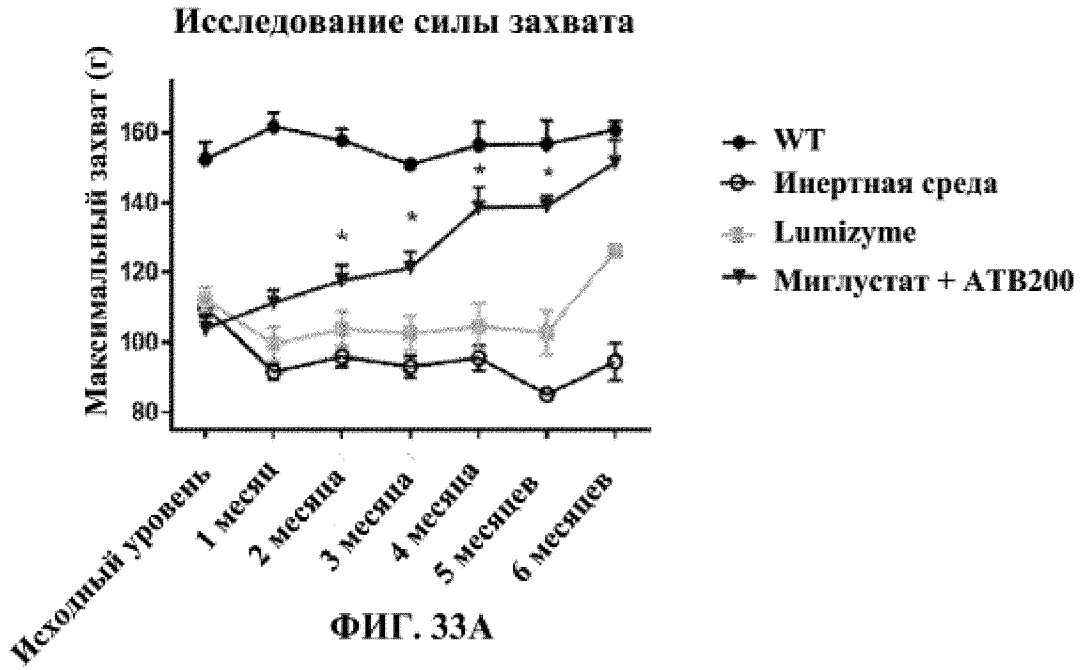
ФИГ. 32В

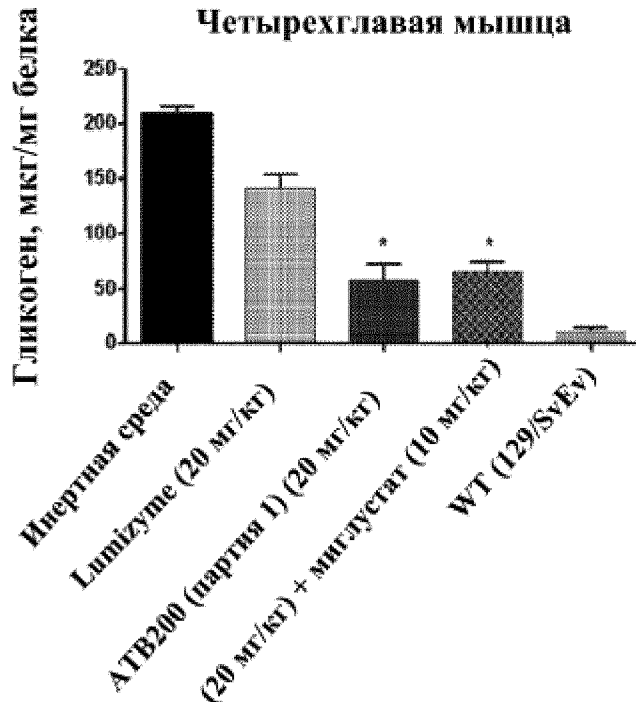


ФИГ. 32С

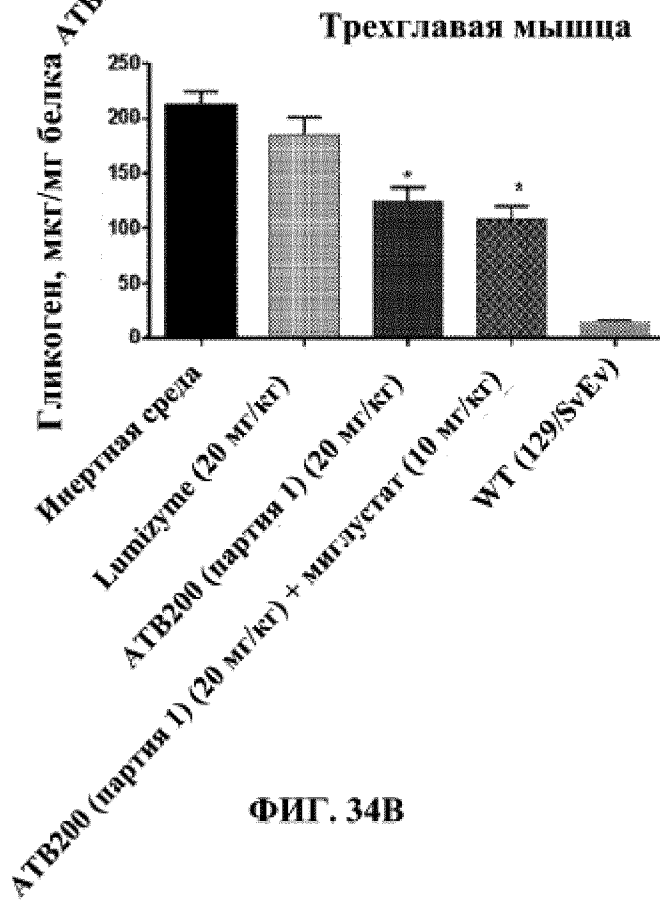


ФИГ. 32D

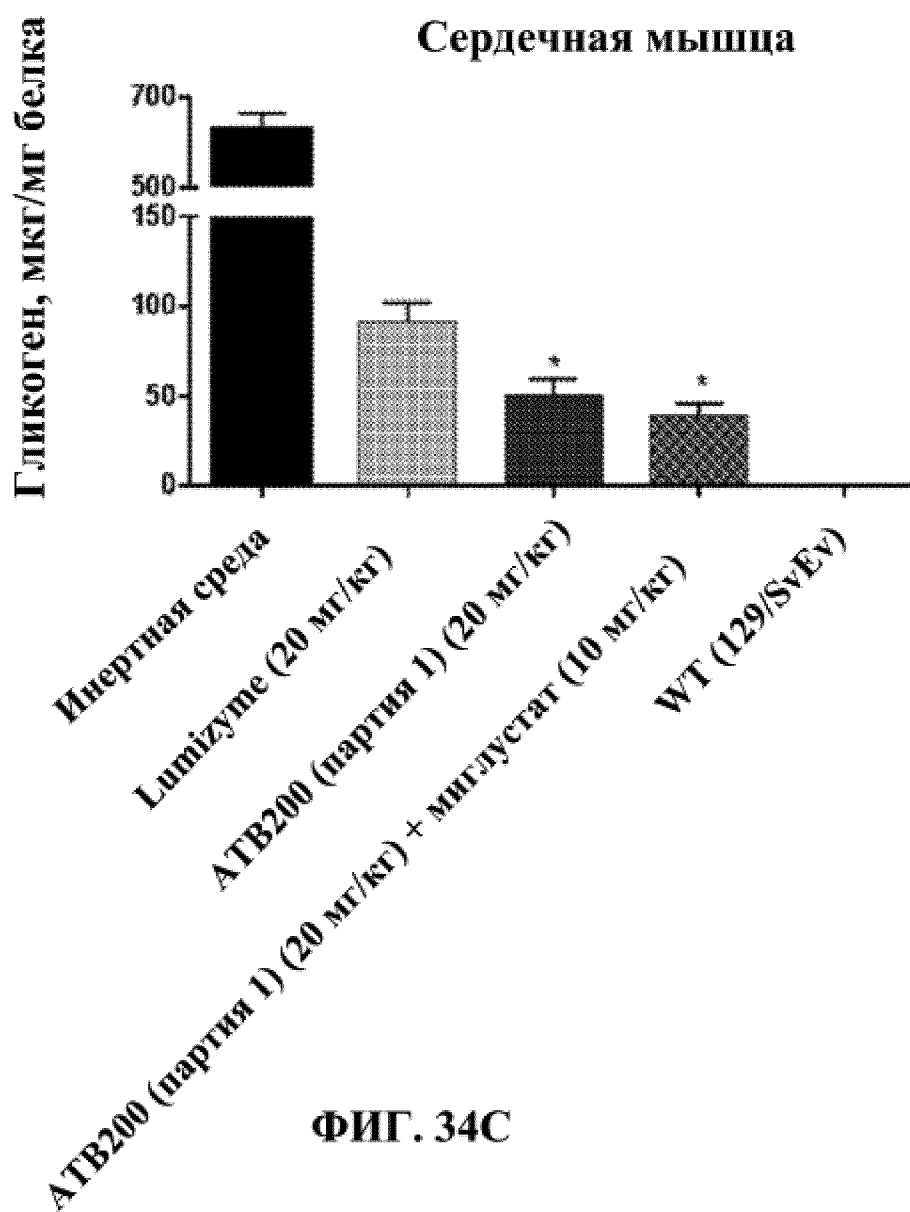


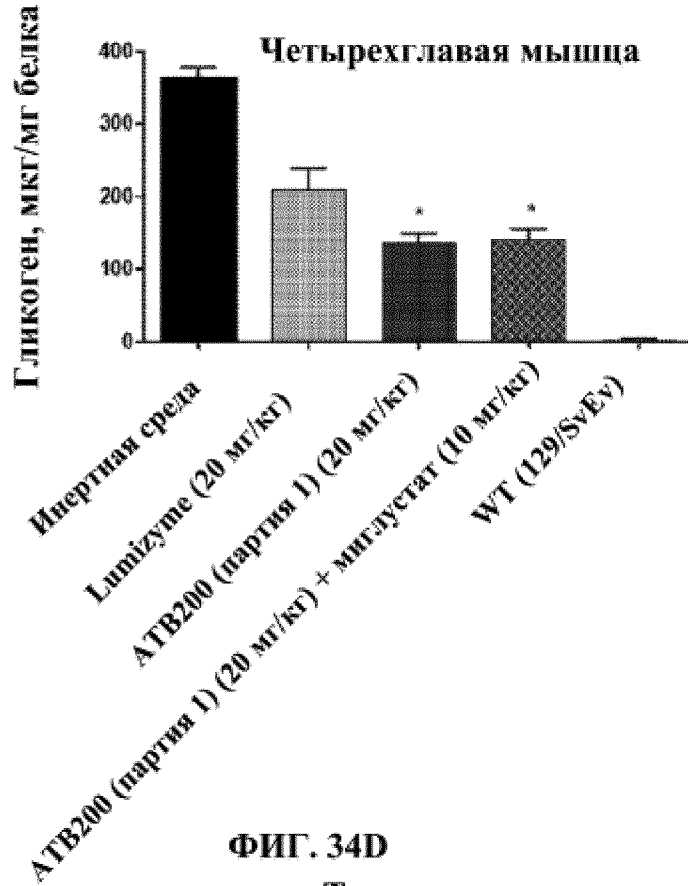


ФИГ. 34А

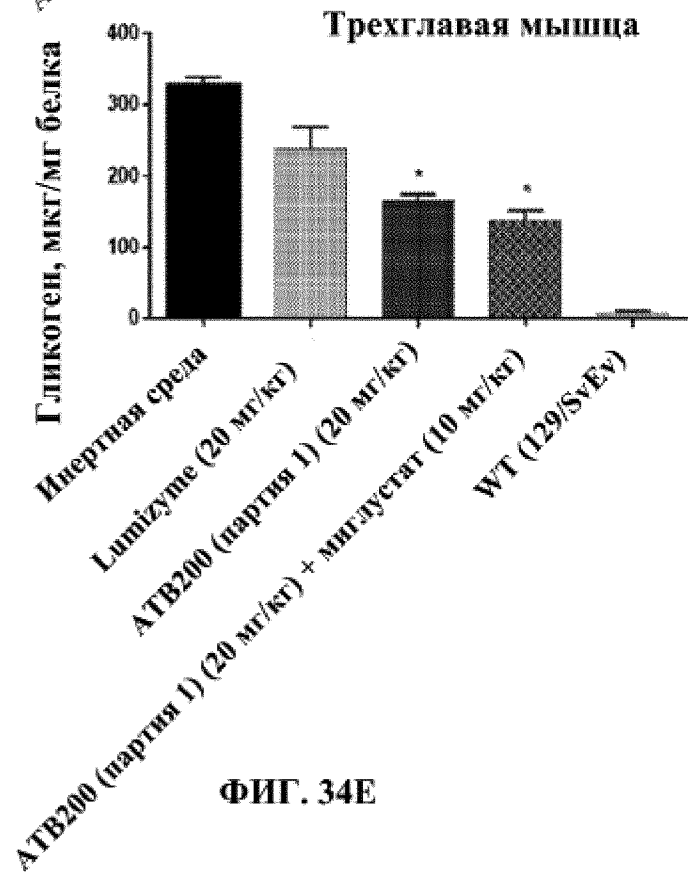


ФИГ. 34В

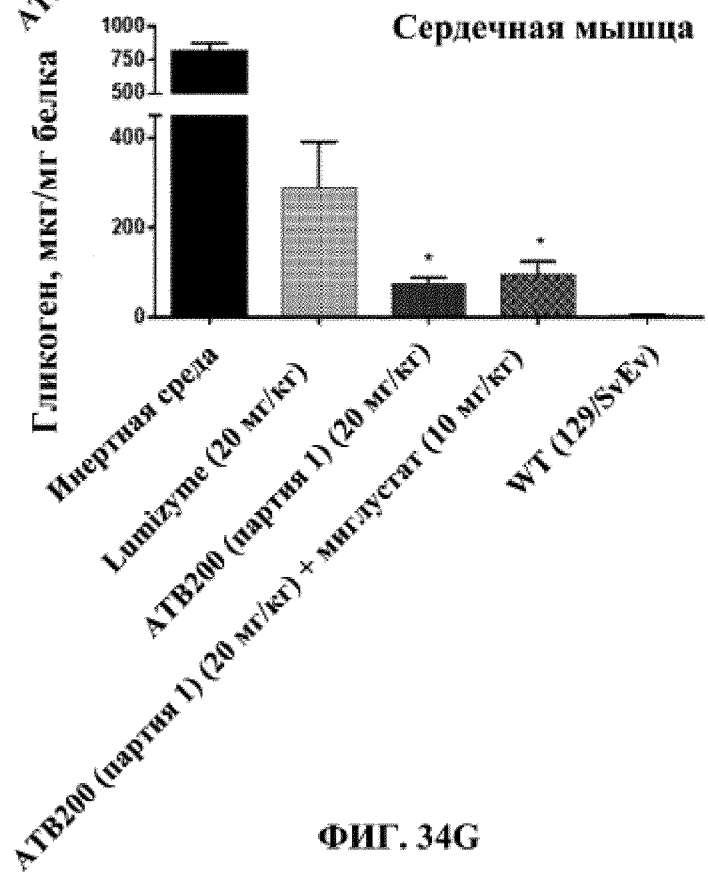
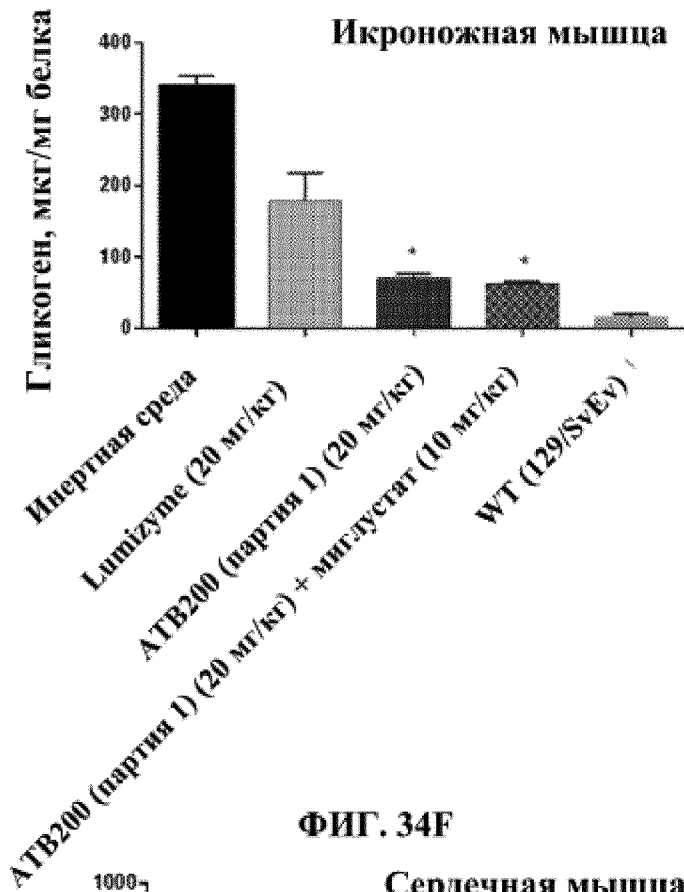


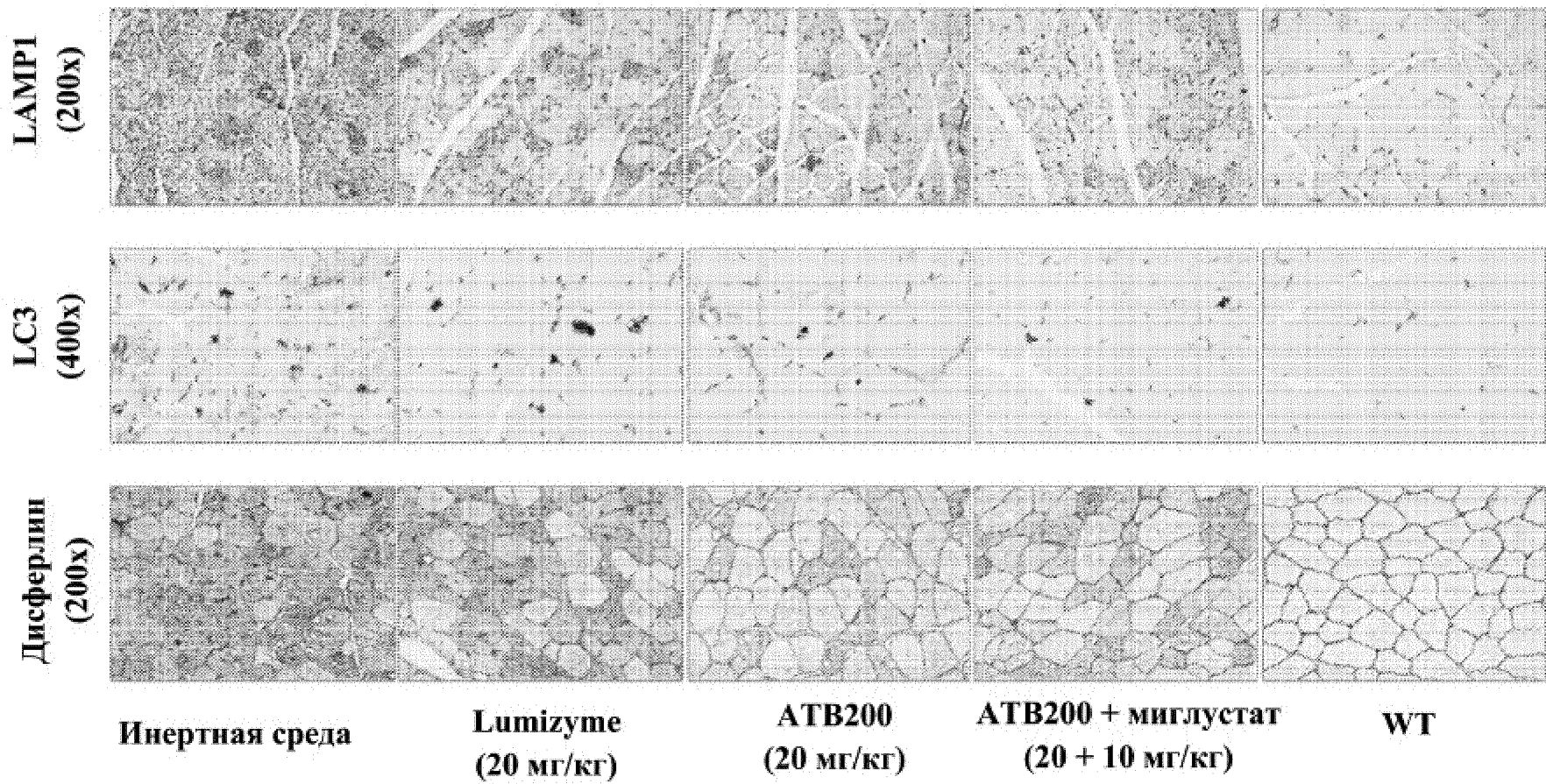


ФИГ. 34D

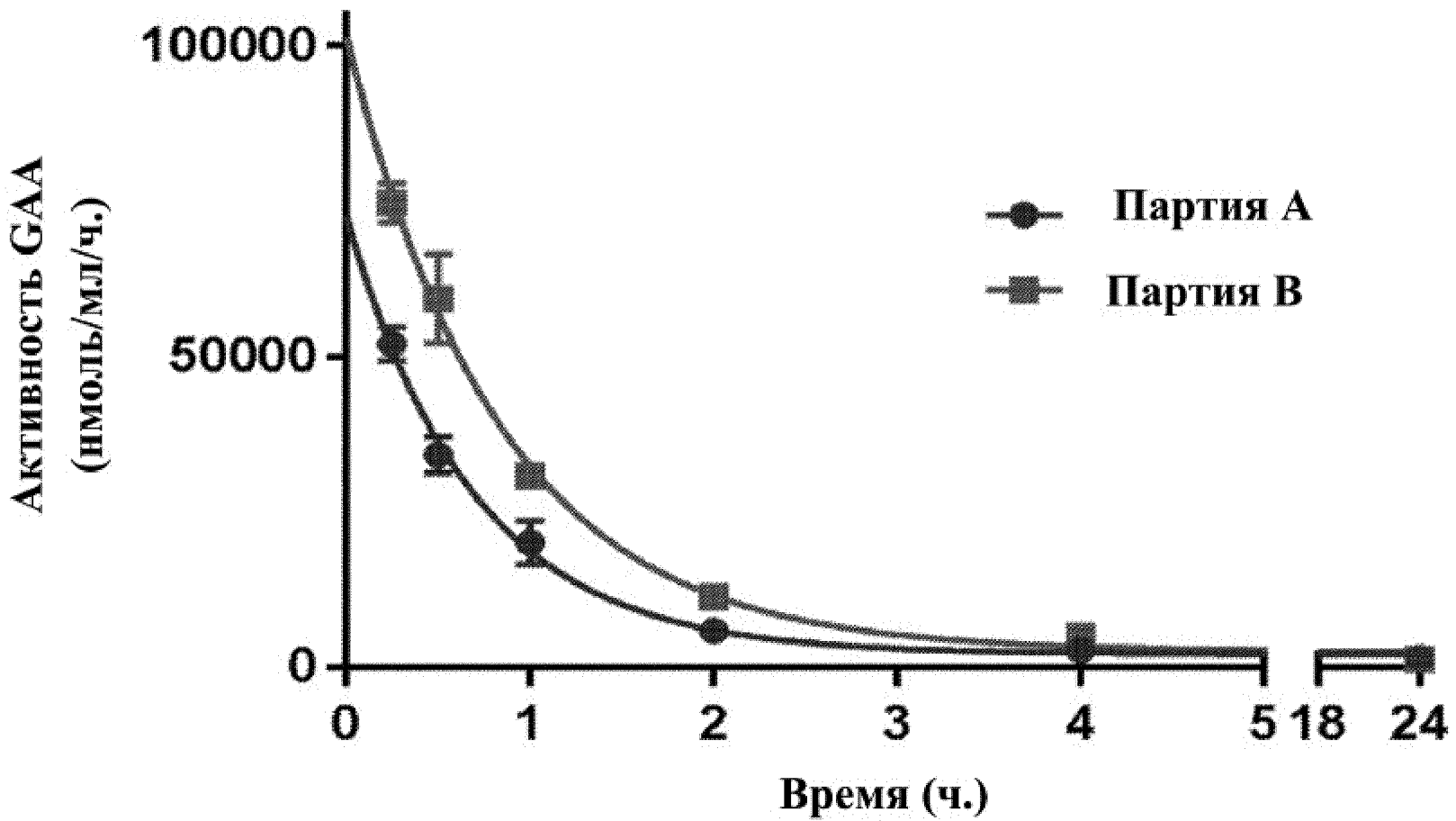


ФИГ. 34E

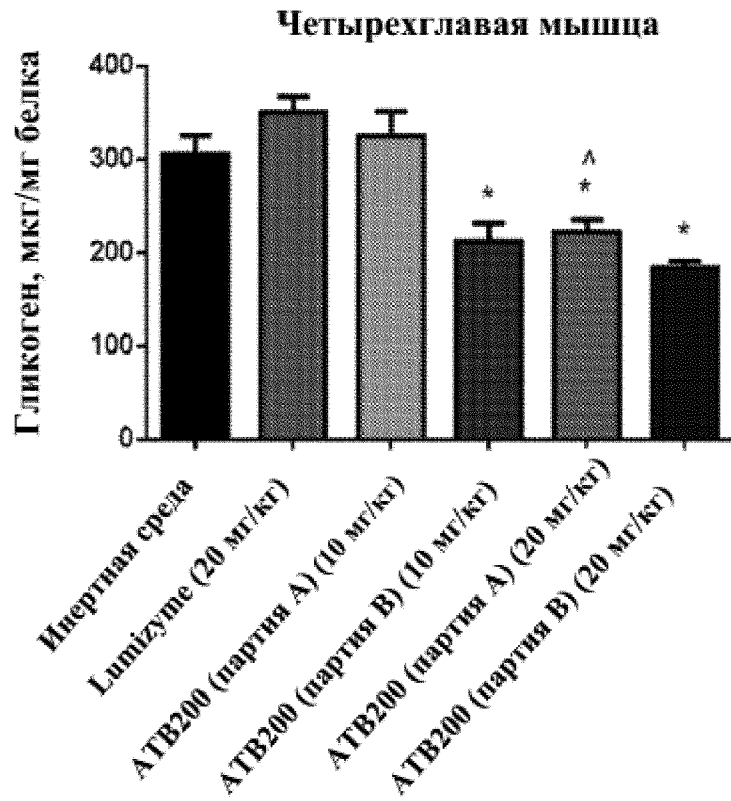




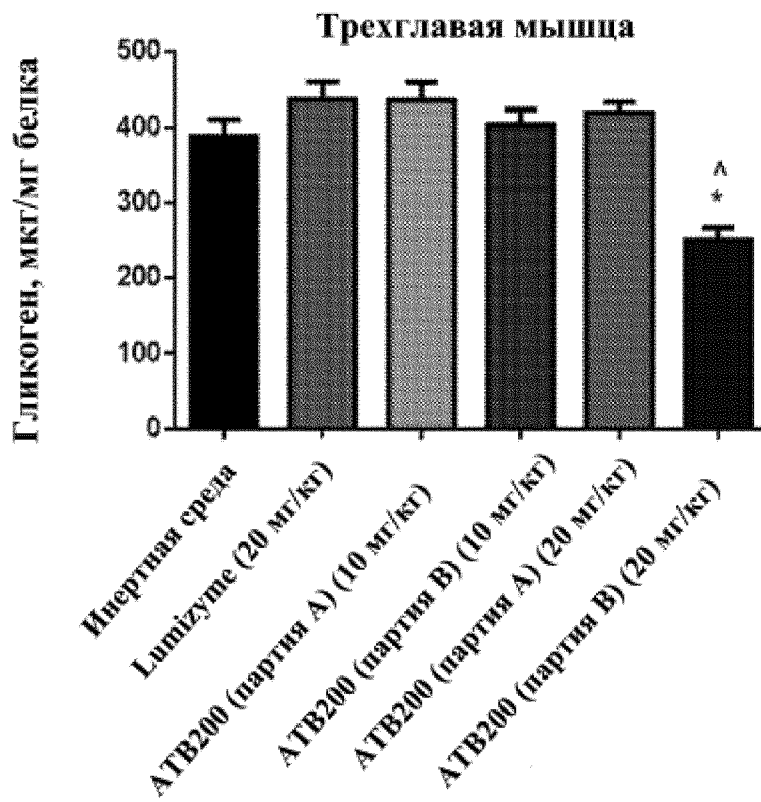
ФИГ. 35



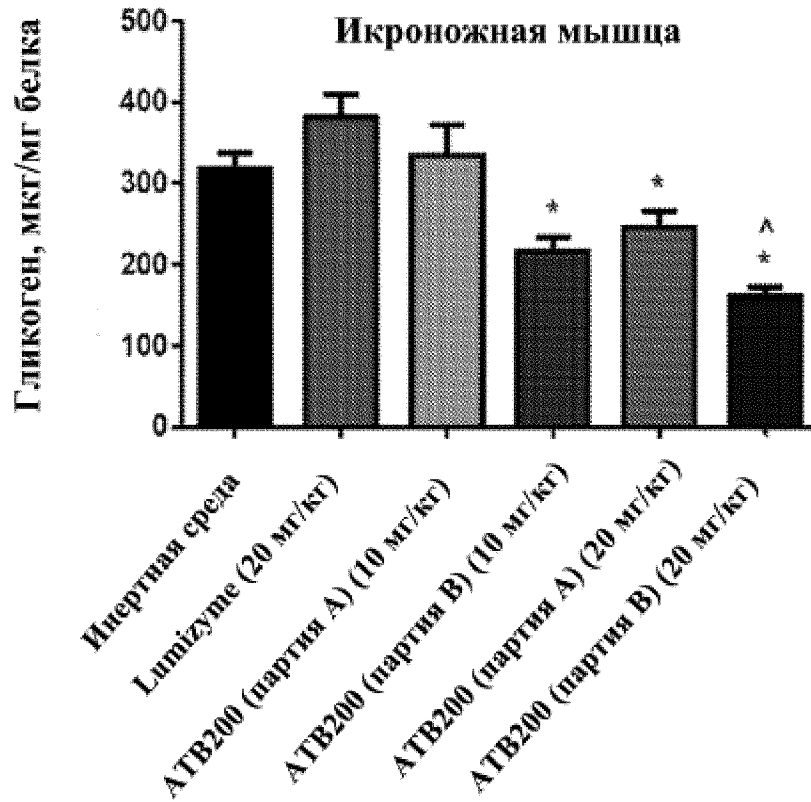
ФИГ. 36



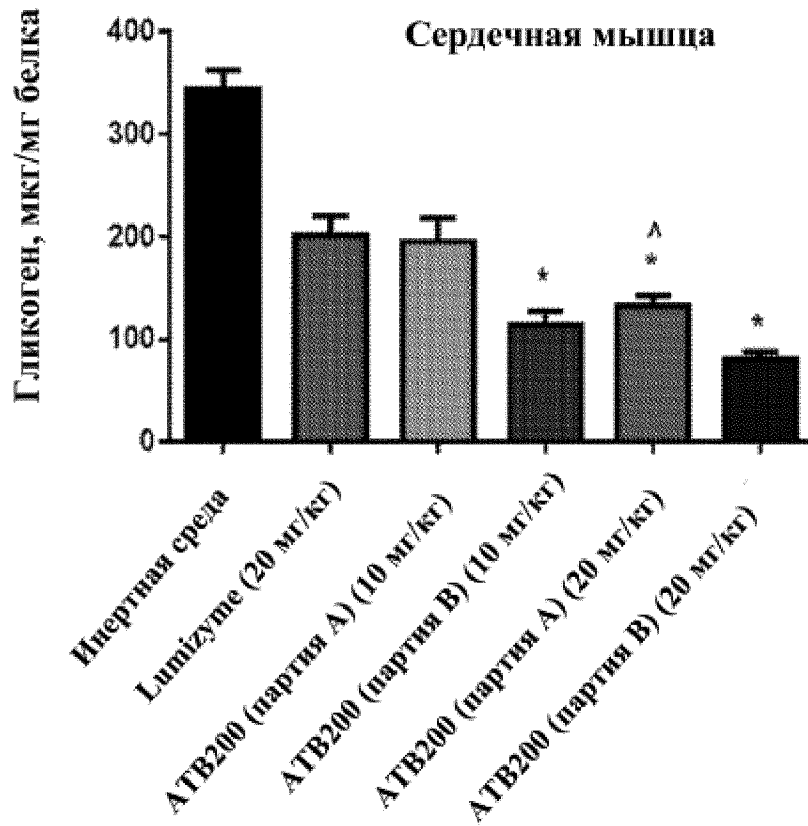
ФИГ. 37А



ФИГ. 37В

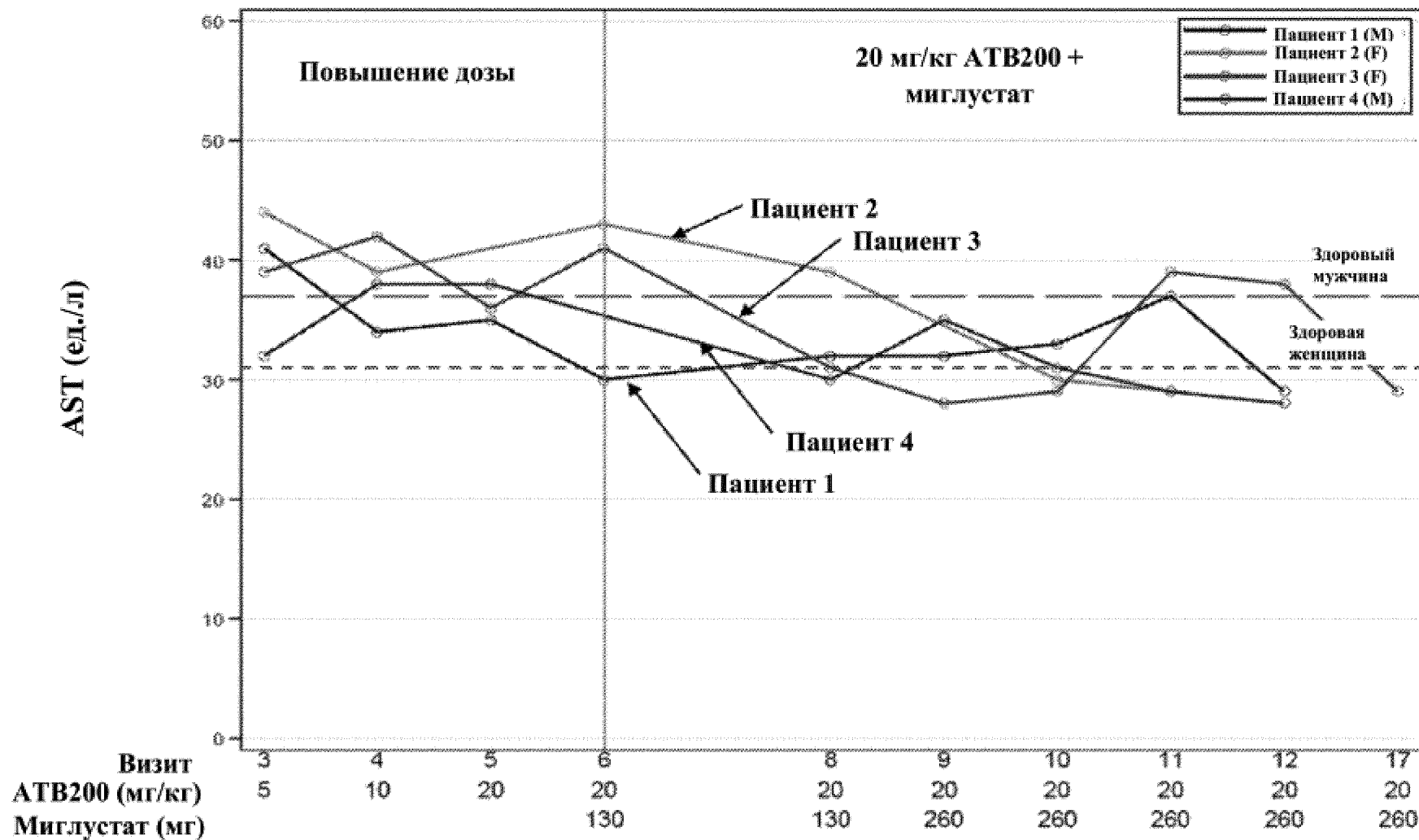


ФИГ. 37С



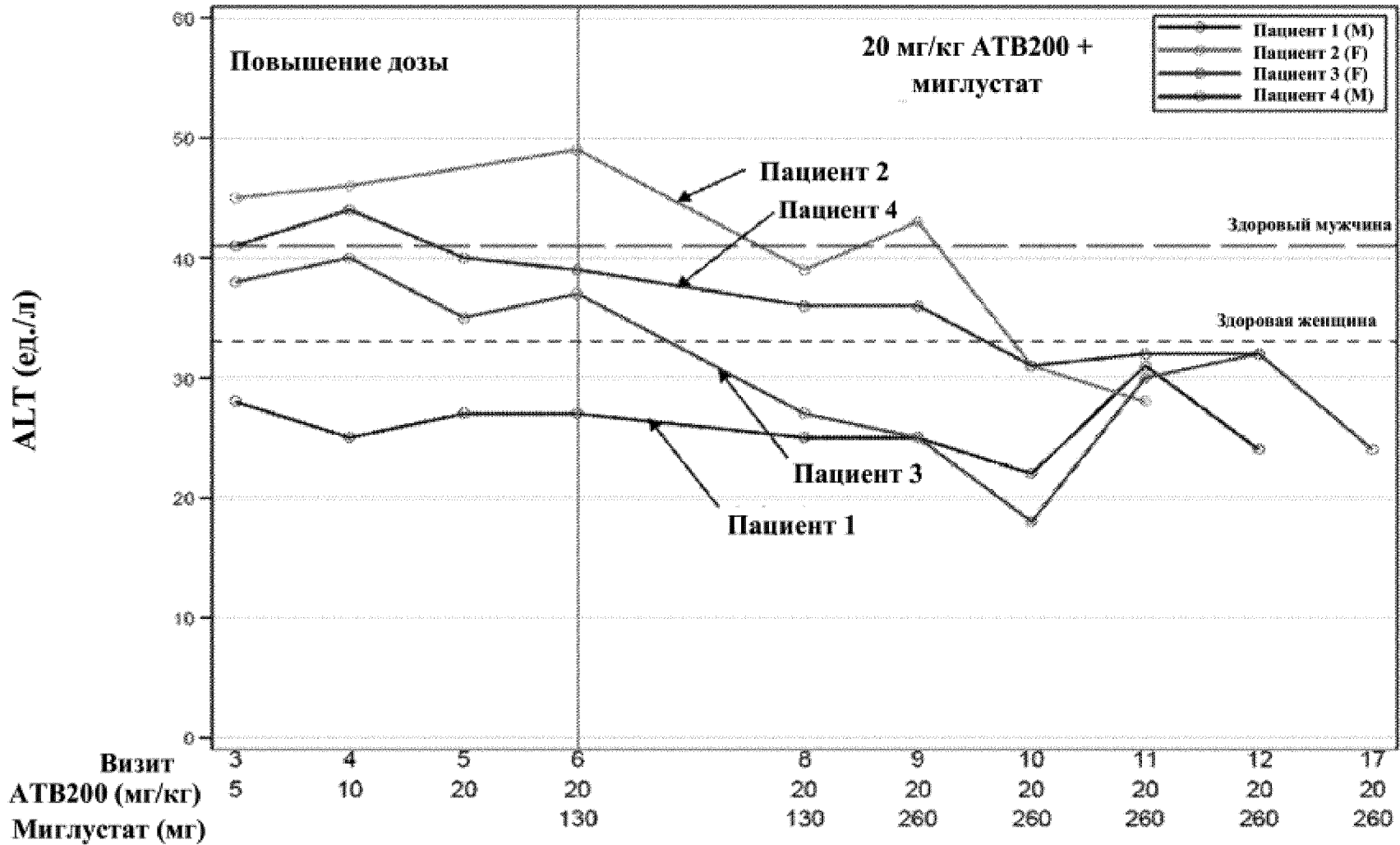
ФИГ. 37D

Предварительные данные о маркере мышечной функции: AST



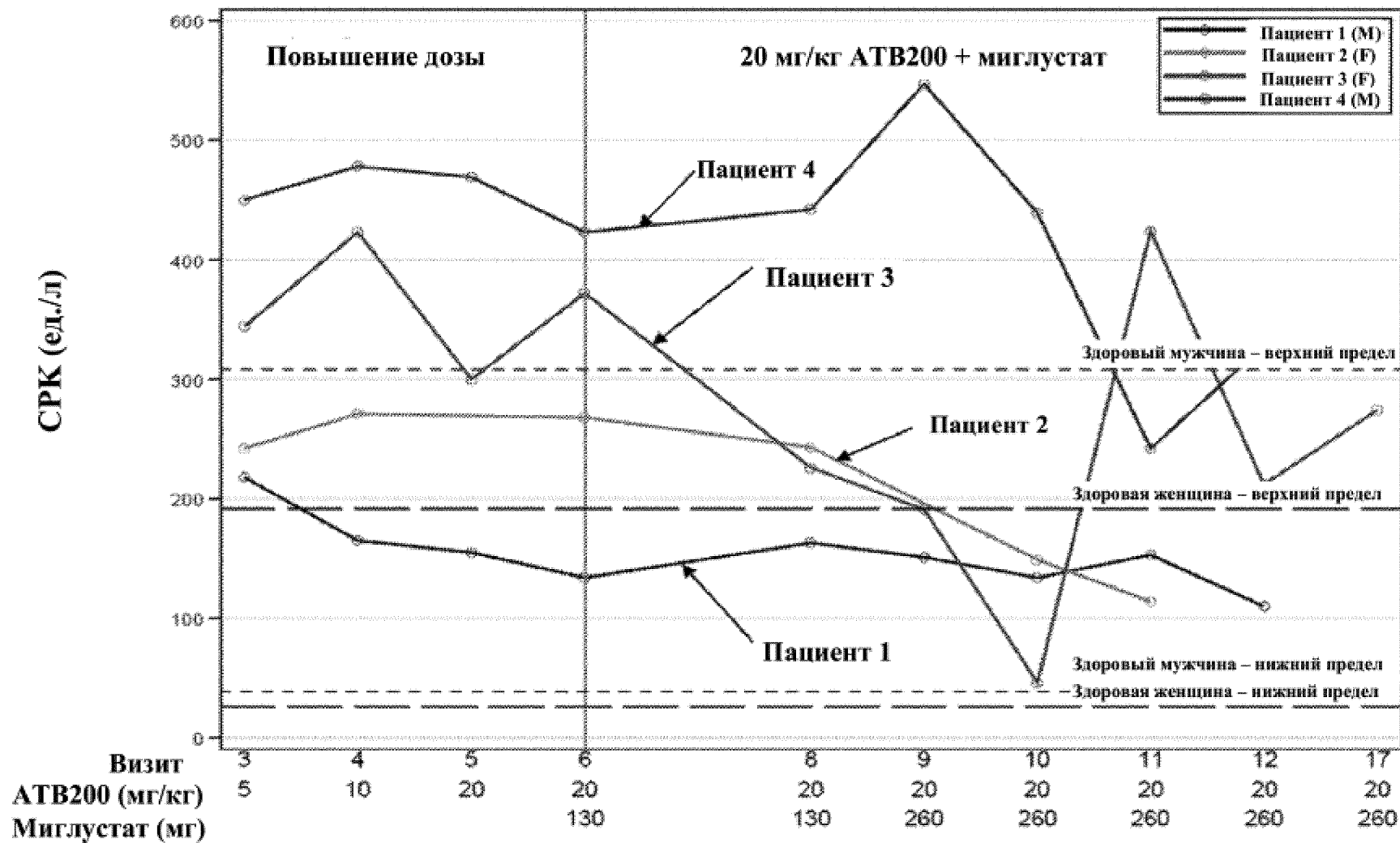
ФИГ. 38

Предварительные данные о маркере мышечной функции: ALT

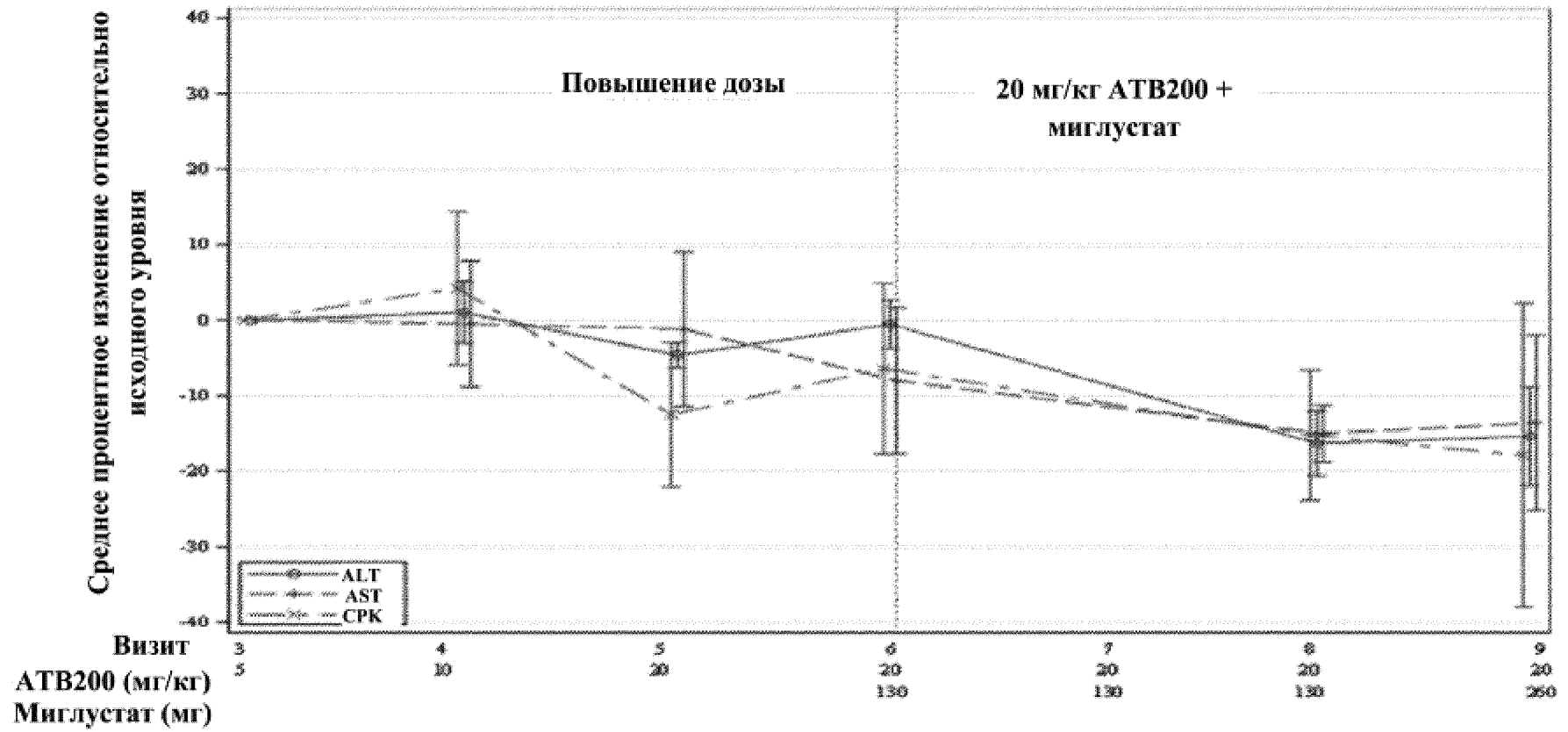


ФИГ. 39

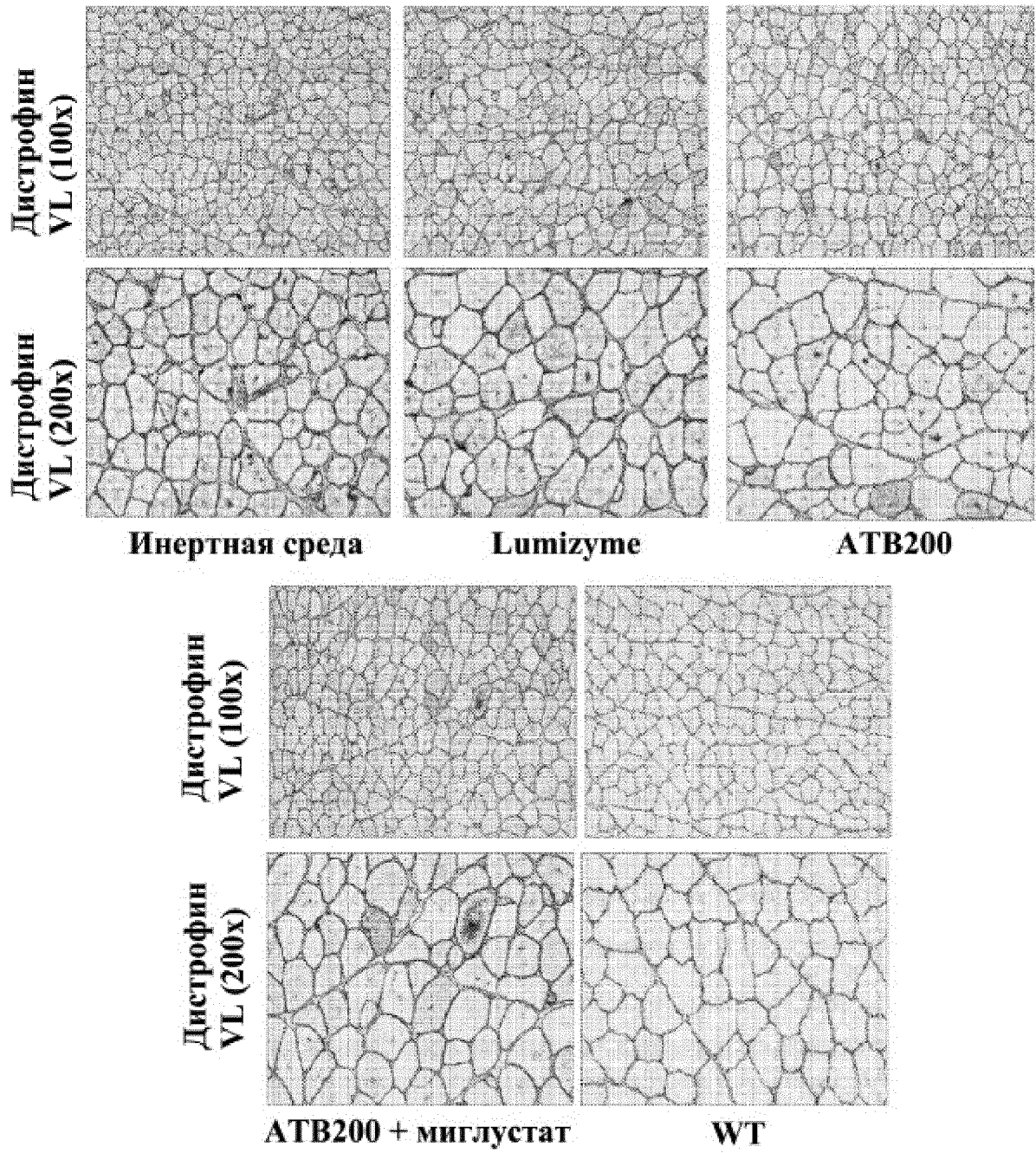
Предварительные данные о маркере мышечной функции: СРК



ФИГ. 40



ФИГ. 41



ФИГ. 42