



(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента

2022.03.10

(21) Номер заявки

201892185

(22) Дата подачи заявки

2017.03.30

(51) Int. Cl. **CI2N 9/26** (2006.01)

(54) СПОСОБ ОТБОРА РЕКОМБИНАНТНЫХ БЕЛКОВ С ВЫСОКИМ СОДЕРЖАНИЕМ М6Р

(31) 62/315,400; 62/457,584; 15/473,994

(32) 2016.03.30; 2017.02.10; 2017.03.30

(33) US

(43) 2019.07.31

(86) PCT/US2017/024981

(87) WO 2017/173059 2017.10.05

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
АМИКУС ТЕРАПЬЮТИКС, ИНК.
(US)

(72) Изобретатель:
До Хун В., Готшалль Расселл (US)

(74) Представитель:
Носырева Е.Л. (RU)

(56) WO-A2-2013136189

WO-A2-2012042386

WO-A2-2011039634

US-A1-2002073438

VAN HOVE J. L. K. ET AL.:
"Purification of recombinant human precursor
acid alpha-glucosidase", BIOCHEMISTRY AND
MOLECULAR BIOLOGY INTERNATIONAL,
ACADEMIC PRESS, LONDON, GB, vol. 43, no.
3, 1 October 1997 (1997-10-01), pages 613-623,

XP002108774, ISSN: 1039-971, abstract, page 614,
paragraph 5

DATABASE EMBASE [Online], ELSEVIER
SCIENCE PUBLISHERS, AMSTERDAM, NL;
June 2007 (2007-06), JONGEN S. P. ET AL.:
"N-glycans of recombinant human acid [alpha]-
glucosidase expressed in the milk of transgenic
rabbits", XP002770407, Database accession no.
EMB-2007342042, abstract

WO-A2-2005077093

EP-A2-1820862

WO-A2-2009102895

TOONKOOL P. ET AL.: "Expression and
purification of dalcocinase, a beta-glucosidase
from Dalbergia cochinchinensis Pierre, in yeast
and bacterial hosts", PROTEIN EXPRESSION
AND PURIFICATION, ACADEMIC PRESS, SAN
DIEGO, CA, vol. 48, no. 2, 1 August 2006
(2006-08-01), pages 195-204, XP024908821, ISSN:
1046-5928 [retrieved on 2006-08-01], abstract

WO-A2-2006125141

DOROTA HOJA-LUKOWICZ ET AL.:
"Characterization of the oligosaccharide component
of microsomal [beta]-glucuronidase from rat
liver", BIOCHIMIE, vol. 86, no. 6, 1
June 2004 (2004-06-01), pages 363-372,
XP055375366, FR ISSN: 0300-9084, DOI: 10.1016/
j.biochi.2004.05.008, abstract

WO-A1-2016054231

(57) Описан способ получения очищенной рекомбинантной кислой альфа-глюкозидазы человека (rhGAA), где очищенная rhGAA содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 98% идентична SEQ ID NO: 2, при этом способ включает культивирование в биореакторе клеток-хозяев, которые секретируют rhGAA; удаление среды из биореактора; фильтрование среды с получением фильтрата; загрузку фильтрата в колонку для анионообменной хроматографии (AEX) для захвата rhGAA; элюирование первого белкового продукта из колонки для AEX; загрузку rhGAA, элюированной из колонки для AEX, в колонку для аффинной хроматографии на иммобилизованных ионах металлов (IMAC) и элюирование rhGAA из колонки для IMAC.

Область техники

Принципы и варианты осуществления настоящего изобретения относятся в целом к производству рекомбинантных белков, в частности лизосомных ферментов, которые характеризуются высоким содержанием маннозо-6-фосфата.

Предпосылки

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 соединений, которые затем скапливаются в лизосомах. Например, болезнь Помпе, также известная как дефицит кислой мальтазы или болезнь накопления гликогена II типа, представляет собой одно из нескольких лизосомных нарушений накопления. Другие примеры лизосомных нарушений включают болезнь Гоше, GM1-ганглиозидоз, фукозидоз, мукополисахаридозы, болезнь Гурлер-Шейе, болезнь Ниманна-Пика типов А и В и болезнь Фабри. Болезнь Помпе также классифицируют как нервно-мышечное заболевание или метаболическую миопатию.

Согласно оценкам болезнь Помпе встречается с частотой приблизительно 1 на 40000 новорожденных и вызывается мутацией в гене GAA, который кодирует фермент лизосомную α -глюкозидазу (EC:3.2.1.20), также общеизвестную как кислая α -глюкозидаза. Кислая α -глюкозидаза вовлечена в метаболизм гликогена, разветвленного полисахарида, который представляет собой основную форму накопления 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 широко варьироваться в отношении степени дефицита фермента, тяжести и возраста возникновения, при этом было идентифицировано больше 500 различных мутаций в гене GAA, многие из которых вызывают симптомы заболевания различной тяжести. Данное заболевание было классифицировано 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 тяжело 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 итоге развивается физическое истощение, требующее применения инвалидной коляски и вспомогательной вентиляции легких, при этом часто случается преждевременный летальный исход 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 известны под названиями алглюкозидаза-альфа, Myozyme® или Lumizyme® производства Genzyme, Inc. ERT представляет собой длительное лечение, требующееся в течение всей жизни пациента, и включает введение заместительного фермента путем внутривенной инфузии. Затем заместительный фермент переносится в кровоток и проникает в лизосомы внутри клеток, где его действие заключается в расщеплении накопленного гликогена, что компенсирует дефицит активности эндогенного дефектного мутантного фермента и ослабляет таким образом тяжесть симптомов 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 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.

Однако состояние большинства субъектов остается стабильным либо продолжает ухудшаться, не-

смотря 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 патологии или слабым целенаправленным воздействием существующей ERT на ткани. Например, введенный посредством инфузии фермент является нестабильным при нейтральном pH, в том числе при pH плазмы крови (приблизительно pH 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 (M6P). Такие остатки связываются с катион-независимыми рецепторами маннозо-6-фосфата (CIMPR) 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.

В rhGAA существует семь потенциальных сайтов N-связанного гликозилирования. Поскольку каждый сайт гликозилирования является гетерогенным по типу присутствующих N-связанных олигосахаридов (N-гликанов), то rhGAA состоит из сложной смеси белков с N-гликанами, имеющими варьирующую аффинность связывания в отношении рецептора M6P и других углеводных рецепторов. RhGAA, которая содержит высокоманнозные N-гликаны, имеющие одну M6P-группу (моно-M6P), связывается с CIMPR при низкой (~6000 нМ) аффинности, тогда как rhGAA, которая содержит две M6P-группы в одном и том же N-гликане (бис-M6P), связывается с высокой (~2 нМ) аффинностью. Иллюстративные конструкции для нефосфорилированных, моно-M6P- и бис-M6P-гликанов показаны на фиг. 1А. Группа маннозо-6-Р показана на фиг. 1В. Поступив внутрь лизосом, rhGAA может ферментативным путем расщеплять накопленный гликоген. Однако традиционные rhGAA имеют низкие общие уровни гликанов, несущих M6P и бис-M6P, и, таким образом, в недостаточной степени нацеливаются на мышечные клетки, результатом чего является неудовлетворительная доставка rhGAA в лизосомы. Продуктивное нацеливание лекарственного средства, представляющего собой rhGAA, показано на фиг. 2А. Большинство молекул rhGAA в данных традиционных продуктах не имеет фосфорилированных N-гликанов, из-за чего они характеризуются недостаточной аффинностью к CIMPR. Рецептор маннозы также может освобождаться от высокоманнозных нефосфорилированных гликанов, что приводит к непродуктивному выведению средства для ERT (фиг. 2В).

Также в rhGAA присутствуют другие типы N-гликанов, комплексных углеводов, которые содержат галактозу и сиаловые кислоты. Поскольку комплексные N-гликаны являются нефосфорилированными, у них отсутствует аффинность к CIMPR. Однако N-гликаны комплексного типа с доступными галактозными остатками характеризуются аффинностью к асиалогликопротеиновому рецептору печеночных гепатоцитов в диапазоне от умеренной до высокой, что приводит к быстрому непродуктивному выведению rhGAA (фиг. 2В).

Современные способы производства, применяемые для получения традиционной rhGAA, такой как Myozyme®, Lumizyme® или алглюкозидаза-альфа, незначительно увеличили содержание M6P или бис-M6P, поскольку обработка клеточных углеводов по своей природе является сложной и исключительно тяжелой для осуществления. Соответственно, остается необходимость в дальнейшем улучшении заместительной ферментной терапии для лечения болезни Помпе, таком как новые способы производства, захвата и очистки rhGAA.

Аналогично, другие рекомбинантные белки, нацеливающиеся на лизосомы, такие как другие лизосомные ферменты, также связываются с CIMPR. Однако современные способы производства, применяемые для получения других традиционных рекомбинантных белков, нацеливающихся на лизосомы, не обеспечивают получение рекомбинантных белков с высоким содержанием M6P или бис-M6P. Соответственно, также остается потребность в дальнейшем улучшении способов производства, захвата и очистки этих других рекомбинантных белков.

Краткое описание

Настоящее изобретение относится к способу получения очищенной рекомбинантной кислой альфа-глюкозидазы человека (rhGAA), где очищенная rhGAA содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 98% идентична SEQ ID NO: 2, при этом способ включает культивирование в биореакторе клеток-хозяев, которые секретируют рекомбинантный лизосомный белок человека, удаление среды из биореактора, фильтрование среды с получением фильтрата, загрузку фильтрата в колонку для анионообменной хроматографии (АЕХ) для захвата лизосомного белка и элюирования первого белкового продукта из колонки для АЕХ, загрузку rhGAA, элюированной из колонки для АЕХ, в колонку для аффинной хроматографии на иммобилизованных ионах металлов (IMAC) и элюирование rhGAA из колонки для IMAC.

В одном или нескольких вариантах осуществления очищенная rhGAA содержит первый потенциальный сайт N-гликозилирования, второй потенциальный сайт N-гликозилирования, третий потенциальный сайт N-гликозилирования, четвертый потенциальный сайт N-гликозилирования, пятый потенциальный сайт N-гликозилирования, шестой потенциальный сайт N-гликозилирования и седьмой потенциаль-

ный сайт N-гликозилирования.

В одном или нескольких вариантах осуществления способ дополнительно включает загрузку rhGAA, элюированной из колонки для IMAC, в третью хроматографическую колонку и элюирование rhGAA из третьей хроматографической колонки.

В одном или нескольких вариантах осуществления третья хроматографическая колонка выбрана из колонки для катионообменной хроматографии (СЕХ) и колонки для эксклюзионной хроматографии (SEC).

В одном или нескольких вариантах осуществления фильтрование среды выбрано из фильтрации в переменном тангенциальном потоке (АТФ) и фильтрации в тангенциальном потоке (ТФФ).

В одном или нескольких вариантах осуществления способ дополнительно включает инактивацию вирусов в одном или более из rhGAA, элюированной из колонки для АЕХ, rhGAA, элюированной из колонки для IMAC, и rhGAA, элюированной из третьей хроматографической колонки.

В одном или нескольких вариантах осуществления способ дополнительно включает фильтрование rhGAA, элюированной из колонки для IMAC, или rhGAA, элюированной из третьей хроматографической колонки, с получением отфильтрованного продукта. В одном или нескольких вариантах осуществления способ дополнительно включает лиофилизацию отфильтрованного продукта.

В одном или нескольких вариантах осуществления клетки-хозяева включают в себя клетки яичника китайского хомячка (СНО).

В одном или нескольких вариантах осуществления (i) по меньшей мере 90% очищенной rhGAA связывается с катионнезависимым рецептором маннозо-6-фосфата (СІМРР) или (ii) по меньшей мере 90% очищенной rhGAA содержит N-гликан, несущий моно-маннозо-6-фосфат (моно-М6Р) или бис-маннозо-6-фосфат (бис-М6Р).

Ниже перечислены различные варианты осуществления. Будет понятно, что перечисленные ниже варианты осуществления можно комбинировать не только так, как указано ниже, но и в других подходящих сочетаниях в соответствии с объемом настоящего изобретения.

Краткое описание графических материалов

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

На фиг. 1А показаны нефосфорилированный высокоманнозный гликан, моно-М6Р-гликан и бис-М6Р-гликан.

На фиг. 1В показана химическая структура М6Р-группы.

На фиг. 2А описано продуктивное нацеливание rhGAA на целевые ткани (например, мышечные ткани субъекта с болезнью Помпе) посредством гликанов, несущих М6Р.

На фиг. 2В изображено непродуктивное выведение лекарственного средства из нецелевых тканей (например, печени и селезенки) или связывание гликанов без М6Р с нецелевыми тканями.

На фиг. 3А графически изображен рецептор СІМРР (также известный как рецептор IGF2) и домены данного рецептора.

На фиг. 3В с помощью таблицы показана аффинность (наномолярная) связывания гликанов, несущих бис- и моно-М6Р, с СІМРР, аффинность связывания гликанов высокоманнозного типа с рецепторами маннозы и аффинность связывания десилилированного комплексного гликана с асиалогликопротеиновыми рецепторами. RhGAA, которая имеет гликаны, несущие М6Р и бис-М6Р, может продуктивно связываться с СІМРР в мышцах.

На фиг. 4А и 4В соответственно представлены графики, показывающие результаты аффинной хроматографии с СІМРР для Lumizyme® и Myozyme®. Пунктирные линии относятся к градиенту элюирования с помощью М6Р. При элюировании с помощью М6Р вытесняются молекулы GAA, связанные с СІМРР посредством М6Р-содержащего гликана. Как показано на фиг. 2А, 78% активной формы GAA в Lumizyme® элюировалось перед добавлением М6Р. На фиг. 2В показано, что 73% активной формы GAA в Myozyme® элюировалось перед добавлением М6Р. Только 22 или 27% rhGAA соответственно в Lumizyme® или в Myozyme® элюировалось с помощью М6Р. На данных фигурах показано, что большая часть rhGAA в двух данных традиционных продуктах на основе rhGAA не имеет гликанов с М6Р, которые необходимы для нацеливания на СІМРР в целевых мышечных тканях.

На фиг. 5 показана ДНК-конструкция для трансформации клеток СНО с помощью ДНК, кодирующей rhGAA. Клетки СНО трансформировали с помощью ДНК-конструкции, кодирующей rhGAA.

Фиг. 6 представляет собой схематическую диаграмму иллюстративного способа производства, захвата и очистки рекомбинантного лизосомного белка.

Фиг. 7А и 7В соответственно представляют собой графики, на которых показаны результаты аффинной хроматографии с СІМРР для rhGAA в виде Myozyme® и АТВ200. Как показано на фиг. 7В, приблизительно 70% молекул rhGAA в rhGAA АТВ200 содержат М6Р.

Фиг. 8 представляет собой график, на котором показаны результаты аффинной хроматографии с СІМРР для rhGAA АТВ200 с захватом и без захвата на анионообменной колонке (АЕХ).

Фиг. 9 представляет собой график, на котором показаны профили элюирования с помощью Polywax

для rhGAA Lumizyme® и ATB200.

Фиг. 10 представляет собой таблицу, в которой приведена сводная информация о структурах N-гликанов Lumizyme® в сравнении с тремя различными препаратами rhGAA ATB200, обозначенными как BP-rhGAA, ATB200-1 и ATB200-2.

На фиг. 11А-11Н показаны результаты анализа сайт-специфического N-гликозилирования rhGAA ATB200.

Фиг. 12А представляет собой график, на котором сравнивается аффинность связывания с CIMPR для rhGAA ATB200 (левая кривая) и для Lumizyme® (правая кривая).

Фиг. 12В представляет собой таблицу, в которой сравнивается содержание Bis-M6P в rhGAA Lumizyme® и ATB200.

Фиг. 13А представляет собой график, на котором сравнивается активность rhGAA ATB200 (левая кривая) с активностью rhGAA Lumizyme® (правая кривая) в нормальных фибробластах при различных концентрациях GAA.

Фиг. 13В представляет собой таблицу, в которой сравнивается активность rhGAA ATB200 (левая кривая) с активностью rhGAA Lumizyme® (правая кривая) в фибробластах, полученных от субъекта с болезнью Помпе, при различных концентрациях GAA.

Фиг. 13С представляет собой таблицу, в которой сравнивается $K_{\text{поглощения}}$ фибробластов, полученных от здоровых субъектов и субъектов с болезнью Помпе.

Фиг. 14А представляет собой график, на котором показано количество гликогена относительно дозы рекомбинантной кислой α -глюкозидазы человека в сердечной мышце мыши после контакта с инертной средой (отрицательный контроль), с 20 мг/мл алглюкозидазы-альфа (Lumizyme®) или с 5, 10 или 20 мг/кг ATB200.

Фиг. 14В представляет собой график, на котором показано количество гликогена относительно дозы рекомбинантной кислой α -глюкозидазы человека в четырехглавой мышце мыши после контакта с инертной средой (отрицательный контроль), с 20 мг/мл алглюкозидазы-альфа (Lumizyme®) или с 5, 10 или 20 мг/кг ATB200.

Фиг. 14С представляет собой график, на котором показано количество гликогена относительно дозы рекомбинантной кислой α -глюкозидазы человека в трехглавой мышце мыши после контакта с инертной средой (отрицательный контроль), с 20 мг/мл алглюкозидазы-альфа (Lumizyme®) или с 5, 10 или 20 мг/кг ATB200.

Фиг. 15 представляет собой таблицу, в которой показано, что комбинация rhGAA ATB200 и шаперона миглустата обеспечивает значительно лучшее выведение гликогена у мышей с нокаутом Gaa по сравнению с обработками с помощью rhGAA Lumizyme® либо ATB200 без шаперона миглустата.

Фиг. 16 представляет собой серию электронных микрофотографий сердечной мышцы, диафрагмы и камбаловидной мышцы мышей дикого типа и мышей с нокаутом Gaa, обработанных с помощью инертной среды, алглюкозидазы-альфа и ATB200 в присутствии и в отсутствие миглустата, на которых показаны уровни мембранного белка, ассоциированного с лизосомами (LAMP-1).

Фиг. 17 представляет собой серию электронных микрофотографий сердечной мышцы, диафрагмы и камбаловидной мышцы мышей дикого типа и мышей с нокаутом Gaa, обработанных с помощью инертной среды, алглюкозидазы-альфа и ATB200 в присутствии и в отсутствие миглустата, на которых показаны уровни гликогена при окрашивании реактивом Шиффа/йодной кислотой (PAS).

Фиг. 18 представляет собой серию электронных микрофотографий (1000х) четырехглавых мышц мышей дикого типа и мышей с нокаутом Gaa, обработанных с помощью инертной среды, алглюкозидазы-альфа и ATB200 в присутствии и в отсутствие миглустата, окрашенных метиленовым синим для того, чтобы показать вакуоли (указаны стрелками).

Фиг. 19 представляет собой серию электронных микрофотографий (40х) четырехглавых мышц мышей дикого типа и мышей с нокаутом Gaa, обработанных с помощью инертной среды, алглюкозидазы-альфа и ATB200 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.

Фиг. 20А и 20В, соответственно, представляют собой графики, на которых показаны результаты аффинной хроматографии с CIMPR для рекомбинантного фермента α -галактозидазы А (rh α -Gal А) до и после захвата и очистки на анионообменной (АЕХ) колонке.

Фиг. 21А и 21В представляют собой графики, на которых показаны данные о весе на проволоке и мышечной силе захвата у мышей дикого типа и мышей с нокаутом Gaa, обработанных с помощью инертной среды, алглюкозидазы-альфа и ATB200 в присутствии миглустата.

Фиг. 22А-22Г представляют собой графики, на которых показаны уровни гликогена в клетках четырехглавой мышцы, трехглавой мышцы и сердечной мышцы мышей дикого типа и мышей с нокаутом Gaa, обработанных с помощью инертной среды, алглюкозидазы-альфа и ATB200 в присутствии и в отсутствие миглустата.

Фиг. 23 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 ATB200 в присутствии и в отсутствие миглустата, на которых показаны сигналы дистрофина.

На фиг. 24 показан план исследования, представляющего собой открытое исследование фазы 1/2 с фиксированной последовательностью приема препаратов в нарастающих дозах, впервые проводимое у человека, предназначенное для оценки безопасности, переносимости, PK, PD и эффективности внутривенных инфузий ATB200, вводимой в сочетании с пероральным введением миглустата, у взрослых с болезнью Помпе.

Фиг. 25A-25B представляют собой графики, на которых показаны профили зависимости концентрации общего белка GAA в плазме крови от времени у субъектов-людей после введения дозы 5, 10 или 20 мг/кг ATB200, 20 мг/кг ATB200 и 130 мг миглустата или 20 мг/кг ATB200 и 260 мг миглустата.

Фиг. 25C представляет собой график, на котором показаны AUC для общего белка GAA в плазме крови у субъектов-людей после введения дозы 20 мг/кг ATB200, 20 мг/кг ATB200 и 130 мг миглустата или 20 мг/кг ATB200 и 260 мг миглустата.

Фиг. 25D представляет собой график, на котором показаны профили зависимости концентрации общего белка GAA в плазме крови от времени у двух отдельных субъектов-людей после введения дозы 20 мг/кг ATB200 и 260 мг миглустата.

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

Фиг. 27A-27D представляют собой графики, на которых показаны изменения уровней аланинаминотрансферазы (ALT), аспартатаминотрансферазы (AST), креатинфосфокиназы (CPK) и тетрасахарида гексозы (Hex4) у пациентов-людей после введения возрастающих доз ATB200 (5, 10 и 20 мг/кг) с последующим совместным введением ATB200 (20 мг/кг) и миглустата (130 и 260 мг).

Подробное описание

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

Хотя конкретная ссылка сделана на GAA, среднему специалисту в данной области будет понятно, что описанные в данном документе способы можно применять для получения, захвата и очистки других рекомбинантных белков, которые нацеливаются на лизосомы, включая без ограничения лизосомный фермент α -галактозидазу A.

Различные аспекты настоящего изобретения относятся к новым способам получения, захвата и очистки рекомбинантных лизосомных белков человека, таких как рекомбинантная кислая α -глюкозидаза человека (rhGAA). Другие аспекты настоящего изобретения относятся к рекомбинантным белкам, полученным описанными в данном документе способами, а также к фармацевтическим композициям, способам лечения и путям применения таких рекомбинантных белков.

Определения

Термины, используемые в данном описании, как правило, имеют их обычные значения в данной области техники, в контексте настоящего изобретения и в конкретном контексте, в котором используется каждый термин. Определенные термины обсуждаются ниже или в других местах в данном описании, чтобы обеспечить дополнительное указание для практикующего специалиста при описании композиций и способов по настоящему изобретению и их получении и применении.

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 изобретения.

Используемый в данном документе термин "лизосомный белок" относится к любому белку, который нацеливается на лизосомы, такому как лизосомный фермент. Примеры лизосомных ферментов и связанных с ними заболеваний приведены в табл. 1 ниже.

Таблица 1

Лизосомный фермент	Заболевание
Кислая α -глюкозидаза	Болезнь Помпе
α -Галактозидаза А	Болезнь Фабри
Кислая β -глюкозидаза	Болезнь Гоше
α -L-идуронидаза	Болезнь Гурлер-Шейе
Идуронатсульфатаза	Болезнь Хантера
β -галактозидаза	GM1-ганглиозидоз; болезнь Моркио В
β -глюкуронидаза	Болезнь Слая (MPS VI)
α -фукозидаза	Фукозидоз
Кислая сфингомиелиназа	Болезнь Ниманна-Пика типов А и В
β -гексозаминидаза А	Болезнь Тей-Сакса
β -гексозаминидаза В	Болезнь Сандхоффа
β -галактоцереброзидаза	Болезнь Краббе
Кислая церамидаза	Болезнь Фарбера
Гепаран-N-сульфатаза	Болезнь Санфилиппо типа А (MPS IIIa)
α -N-ацетилглюкозаминидаза	Болезнь Санфилиппо типа В (MPS IIIb)
α -глюкозаминид-N-ацетилтрансфераза	Болезнь Санфилиппо типа С (MPS IIIc)
N-ацетилглюкозамин-6-сульфатсульфатаза	Болезнь Санфилиппо D (MPS IIId)
N-ацетилгалактозамин-6-сульфатсульфатаза	Болезнь Моркио А (MPS IVb)
Арилсульфатаза А	Метахроматическая лейкодистрофия
Арилсульфатаза В	Синдром Марото-Лами (MPS VI)
Кислая липаза	Болезнь Вольфа
Кислая α -маннозидаза	α -Маннозидоз
Кислая β -маннозидаза	β -Маннозидоз
α -N-ацетилнейраминидаза	Сиалидоз
α -N-ацетилгалактозаминидаза	Болезнь Шиндлера-Канзаки
N-аспартил- β -глюкозаминидаза	Аспартилглюкозаминурия

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 мутациями в гене

GAA, который кодирует фермент кислую α -глюкозидазу человека. Термин включает без ограничения 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" 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 (EC: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 больше 500 мутаций, многие из которых ассоциированы с болезнью Помпе. Мутации, приводящие к неправильному сворачиванию или неправильному процессингу фермента кислой α -глюкозидазы, включают в себя T1064C (Leu355Pro) и C2104T (Arg702Cys). Кроме того, мутации GAA, которые влияют на созревание и процессинг фермента, включают в себя Leu405Pro и Met519Thr. Для осуществления активности белка кислой α -глюкозидазы требуется наличие консервативного гексапептида WIDMNE в аминокислотных остатках 516-521. 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 420794-05-0 согласно Химической реферативной службе. Алглюкозидаза-альфа одобрена для реализации в США с января 2016 года в виде продуктов под названиями Lumizyme® и Myozyme® от Genzyme.

Используемый в данном документе термин "ATB200" подразумевается как обозначающий рекомбинантную кислую α -глюкозидазу человека, описанную в патентной заявке PCT/US 2015/053252, одновременно находящейся на рассмотрении, раскрытие которой включено в данный документ посредством ссылки.

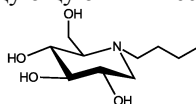
Используемый в данном документе термин "гликан" подразумевается как обозначающий полисахаридную цепь, ковалентно связанную с аминокислотным остатком в белке или полипептиде. Используемый в данном документе термин "N-гликан" или "N-связанный гликан" подразумевается как обозначающий полисахаридную цепь, присоединенную к аминокислотному остатку в белке или полипептиде посредством образования ковалентной связи с атомом азота аминокислотного остатка. Например, N-гликан может быть ковалентно связан с атомом азота боковой цепи аспарагинового остатка. Гликаны могут содержать одно или 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 ATB200, 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 Pro™ от Thermo Scientific, масс-спектрометр Orbitrap Fusion Lumos Tribid™ от Thermo Scientific или масс-спектрометр Xevo® G2-XS QToF от Waters.

Используемый в данном документе термин "высокоманнозный N-гликан" подразумевается как обозначающий N-гликан, имеющий от одного до шести или больше маннозных звеньев. По меньшей мере в одном варианте осуществления высокоманнозное N-гликановое звено может содержать бис(N-ацетилглюкозаминную) 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 M6P, при этом по меньшей мере одна группа M6P имеет кэп GlcNAc и по меньшей мере одна другая группа M6P 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.

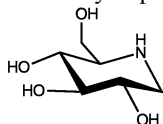
Используемое в данном документе соединение миглустат, также известное как N-бутил-1-дезоксиноджиримицин NB-DNJ, или (2R,3R,4R,5S)-1-бутил-2-(гидроксиметил)пиперидин-3,4,5-триол, представляет собой соединение, имеющее следующую химическую формулу:



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

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.

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



В случае применения соли дувоглустата дозировку соли корректируют так, чтобы доза дувоглустата, получаемая пациентом, была эквивалентной количеству, которое было бы получено при применении дувоглустата в форме свободного основания.

Используемый в данном документе термин "фармакологический шаперон" или иногда просто термин "шаперон" подразумевается как обозначающий молекулу, которая специфично связывается с лизосомным белком и характеризуется одним или несколькими следующими эффектами:

- улучшает образование стабильной молекулярной конформации белка;
- улучшает надлежащий транспорт белка из эндоплазматического ретикулума в другое местоположение в клетке, предпочтительно нативное местоположение в клетке, для того, чтобы предотвратить разложение белка, ассоциированное с эндоплазматическим ретикулумом;
- предотвращает агрегацию конформационно нестабильных или неправильно свернутых белков;
- по меньшей мере, частично восстанавливает и/или улучшает функцию, стабильность и/или активность белка дикого типа и/или
- улучшает фенотип или функцию клетки, содержащей данный белок.

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

шении химических связей.

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

Используемый в данном документе термин "заместительная ферментная терапия" или "ERT" подразумевается как обозначающий введение ненативного очищенного фермента индивидууму с дефицитом такого фермента. Вводимый белок может быть получен из природных источников или посредством рекомбинантной экспрессии. Термин также обозначает введение очищенного фермента индивидууму, по другим причинам требующему введения очищенного фермента или получающему пользу от этого. 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 растений.

Используемый в данном документе термин "комбинированная терапия" 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 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 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" подразумевается как обозначающий молекулярные сущности и композиции, которые являются физиологически переносимыми и обычно не вызывают нежелательные реакции при введении человеку. Используемый в данном документе термин "фармацевтически приемлемый" предпочтительно означает одобренный регулирующим ведомством федерального правительства или правительства штата или упомянутый в Фармакопее США или другой общепризнанной фармакопее для применения у животных и, более конкретно, у людей.

Используемый в данном документе термин "носитель" подразумевается как обозначающий разбавитель, адъювант, вспомогательное вещество 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 чисел, предусмотренных для измерения, как понимается в данной области техники, и включает без ограничения изменение на ± 1 наиболее точного значащего числа, представленного для измерения. Типичные иллюстративные степени погрешности находятся в пределах 20%, 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. Числовые величины, приведенные в данном документе, являются примерными, 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 мин или меньше, приблизительно 20 мин, приблизительно 15 мин, приблизительно 10 мин, приблизительно 5 мин, приблизительно 2 мин, приблизительно 1 мин или меньше чем 1 мин.

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 водо-или жирорастворимой или диспергируемой и является эффективной для предполагаемого применения. Термин включает фармацевтически приемлемые соли присоединения кислоты и фармацевтически приемлемые соли присоединения основания. Перечни подходящих солей находятся, например, в S. M. Birge et al., J. Pharm. Sci., 1977, 66, pp. 1-19, включенном в данный документ 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, образованные 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, 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, гемисульфатной кислотой, гексановой кислотой, муравьиной кислотой, фумаровой кислотой, 2-гидроксизтансульфоновой кислотой (изетионовой кислотой), молочной кислотой, гидроксималеиновой кислотой, яблочной кислотой, малоновой кислотой, миндальной кислотой, мезитиленсульфоновой кислотой, метансульфоновой кислотой, нафталинсульфоновой кислотой, никотиновой кислотой, 2-нафталинсульфоновой кислотой, щавелевой кислотой, павовой 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-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, образованные 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.

rhGAA ATB200

По меньшей мере в одном варианте осуществления рекомбинантный лизосомный белок человека (например, rhGAA) экспрессируется в клетках яичника китайского хомячка (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 традиционном рекомбинантном лизосомном белке человека, таком как алглюкозидаза-альфа. По меньшей мере в одном варианте осуществления кислая α -глюкозидаза представляет собой рекомбинантную кислую α -глюкозидазу человека, упоминаемую в данном документе как ATB200, что описано в международной патентной заявке PCT/US2015/053252, одновременно находящейся на рассмотрении. Как было показано, ATB200 связывается с катион-независимыми рецепторами маннозо-6-фосфата (CIMPR) с высокой аффинностью ($K_D \sim 2-4$ нМ) и эффективно интернализируется фибробластами при болезни Помпе и миоцитами скелетных мышц ($K_{\text{поглощения}} \sim 7-14$ нМ). Для ATB200 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 или SEQ ID NO: 2.

SEQ ID NO: Met Gly Val Arg His Pro Pro Cys Ser His Arg Leu Leu Ala Val
1 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

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 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 имеет номер доступа AHE24104.1 (GI:568760974) в GenBank. 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.

По меньшей мере в одном варианте осуществления рекомбинантная кислая α -глюкозидаза человека изначально экспрессируется как имеющая полноразмерную последовательность GAA дикого типа из 952 аминокислот, приведенную под SEQ ID NO: 1, и при этом 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: 2, которая отличается от SEQ ID NO: 1 только тем, что первые 56 аминокислот, содержащие сигнальный пептид и пептид-предшественник, были удалены с получением таким образом в результате белка, имеющего 896 аминокислот. Также возможны другие отличия 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: 2. В некоторых вариантах осуществления продукт на основе rhGAA 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 примера остатки аспарагиновой кислоты могут подвергаться изомеризации до изоаспарагиновой кислоты. В качестве еще одного примера неспаренные цистеиновые остатки в белке могут образовывать дисульфидные связи со свободным глутатионом и/или цистеином. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления фермент изначально экспрессируется как имеющий аминокислотную последовательность, приведенную под SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 2, и при этом фермент подвергается одной или нескольким данным посттрансляционным и/или химическим модификациям. Такие модификации также входят в объем настоящего изобретения.

Полинуклеотидные последовательности, кодирующие GAA и подобные варианты GAA человека, также предусматриваются, и их можно использовать 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 или 5% от общего количества молекул рекомбинантного лизосомного белка человека (например, rhGAA) 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 рекомбинантного лизосомного белка человека (например, rhGAA) содержат по меньшей мере одно N-гликановое звено, несущее один или несколько остатков маннозо-6-фосфата, или обладают способностью к связыванию с CIMPR.

Молекулы рекомбинантного лизосомного белка человека (например, rhGAA) могут иметь 1, 2, 3 или 4 группы маннозо-6-фосфата (M6P) в своих гликанах. Например, только один N-гликан в молекуле рекомбинантного лизосомного белка человека 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 рекомбинантного лизосомного белка человека может нести отдельные группы M6P. Молекулы рекомбинантного лизосомного белка человека также могут иметь N-гликаны, не несущие группы M6P. В другом варианте осуществления N-гликаны в среднем содержат больше 3 моль/моль M6P и больше 4 моль/моль сиаловой кислоты, так что рекомбинантный лизосомный белок человека содержит в среднем по меньшей мере 3 моль остатков маннозо-6-фосфата на моль рекомбинантного лизосомного белка человека и по меньшей мере 4 моль сиаловой кислоты на моль рекомбинантного лизосомного белка человека. В среднем по меньшей мере приблизительно 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10% от общего количества гликанов в рекомбинантном лизосомном белке человека могут находиться в виде моно-M6P-гликана, например, приблизительно 6,25% от общего количества гликанов могут нести одну группу M6P, и в среднем по меньшей мере приблизительно 0,5, 1, 1,5, 2,0, 2,5, 3,0% от общего количества гликанов в рекомбинантном лизосомном белке человека находятся в виде бис-M6P-гликана, и в среднем меньше 25% от общего количества молекул рекомбинантного лизосомного белка человека не содержат фосфорилированный гликан, связывающийся с CIMPR.

Рекомбинантный лизосомный белок человека (например, rhGAA) может иметь среднее содержание N-гликанов, несущих M6P, в диапазоне от 0,5 до 7,0 моль/моль лизосомного белка 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 лизосомного белка. Лизосомный белок можно фракционировать для получения препаратов на основе лизосомного белка с разным средним количеством гликанов, несущих M6P или несущих бис-M6P, что таким образом позволяет осуществлять дополнительную индивидуальную адаптацию нацеливания лизосомного белка на лизосомы в целевых тканях путем отбора конкретной фракции или посредством избирательного объединения различных фракций.

В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный лизосомный белок человека (например, rhGAA) будет нести в среднем от 2,0 до 8,0 моль M6P на моль рекомбинантного лизосомного белка человека (например, rhGAA). 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 моль M6P/моль рекомбинантного лизосомного белка человека (например, rhGAA).

До 60% N-гликанов в рекомбинантном лизосомном белке человека (например, rhGAA) могут быть полностью сиалилированными, например, до 10, 20, 30, 40, 50 или 60% N-гликанов могут быть полностью сиалилированными. В некоторых вариантах осуществления от 4 до 20% от общего количества N-гликанов являются полностью сиалилированными. В других вариантах осуществления не больше 5, 10, 20 или 30% N-гликанов в рекомбинантном лизосомном белке человека (например, rhGAA) несут сиаловую кислоту и концевой остаток галактозы (Gal). Данный диапазон включает все промежуточные значения и поддиапазоны, например, от 7 до 30% от общего количества N-гликанов в рекомбинантном лизосомном белке 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 рекомбинантном лизосомном белке 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 рекомбинантном лизосомном белке 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 рекомбинантном лизосомном белке человека (например, rhGAA) представляют собой N-гликаны комплексного типа; или не больше 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7% от общего количества N-гликанов в рекомбинантном лизосомном белке человека (например, rhGAA) представляют собой N-гликаны гибридного типа; не больше 5, 10 или 15% N-гликанов высокоманнозного типа в рекомбинантном лизосомном белке человека (например, rhGAA) являются нефосфорилированными; по меньшей мере 5% или 10% N-гликанов высокоманнозного типа в рекомбинантном лизосомном белке человека (например, rhGAA) являются моно-М6Р-фосфорилированными; и/или по меньшей мере 1 или 2% N-гликанов высокоманнозного типа в рекомбинантном лизосомном белке человека (например, rhGAA) являются бис-М6Р-фосфорилированными. Эти значения включают все промежуточные значения и поддиапазоны. Рекомбинантный лизосомный белок человека (например, rhGAA) может соответствовать одному или нескольким диапазонам содержания, описанным выше.

В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный лизосомный белок человека (например, rhGAA) будет нести в среднем от 2,0 до 8,0 моль остатков сиаловой кислоты на моль рекомбинантного лизосомного белка человека (например, rhGAA). 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 моль остатков/моль рекомбинантного лизосомного белка человека (например, rhGAA). Не ограничиваясь какой-либо теорией, полагают, что присутствие N-гликановых звеньев, несущих остатки сиаловой кислоты, может предотвратить непродуктивное выведение рекомбинантного лизосомного белка человека (например, rhGAA) посредством асиалогликопротеиновых рецепторов.

В одном или нескольких вариантах осуществления рекомбинантный лизосомный белок человека (например, rhGAA) имеет звенья М6Р и/или сиаловой кислоты в определенных сайтах N-гликозилирования рекомбинантного лизосомного белка человека. Например, как установлено выше, в rhGAA существует семь потенциальных сайтов N-связанного гликозилирования. Эти потенциальные сайты гликозилирования находятся в следующих положениях SEQ ID NO: 2: 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 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-гликозилирования. В одном или нескольких вариантах осуществления по меньшей мере 20% rhGAA являются фосфорилированными по первому сайту N-гликозилирования (например, N84 в SEQ ID NO: 2 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 фосфорилированными по первому сайту N-гликозилирования. Данное фосфорилирование может представлять собой результат присутствия звеньев моно-М6Р и/или бис-М6Р. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90 или 95% rhGAA несут звено моно-М6Р в первом 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 первом сайте N-гликозилирования.

В одном или нескольких вариантах осуществления по меньшей мере 20% rhGAA являются фосфорилированными по второму сайту N-гликозилирования (например, N177 в SEQ ID NO: 2 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 по второму сайту N-гликозилирования. Данное фосфорилирование может представлять собой результат присутствия звеньев моно-М6Р и/или бис-М6Р. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90 или 95% rhGAA несут звено моно-М6Р во втором сайте N-гликозилирования. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90 или 95% rhGAA несут звено бис-М6Р во втором сайте N-гликозилирования. В одном или нескольких вариантах осуществления по меньшей мере 5% rhGAA являются фосфорилированными в третьем сайте N-гликозилирования (например, N334 в SEQ ID NO: 2 и N390 в SEQ ID NO: 1). В других вариантах осуществления меньше 5, 10, 15, 20 или 25% rhGAA являются фосфорилированными по третьему сайту 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 сиалилированными по третьему сайту N-гликозилирования.

В одном или нескольких вариантах осуществления по меньшей мере 20% rhGAA являются фосфорилированными по четвертому сайту N-гликозилирования (например, N414 в SEQ ID NO: 2 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 по четвертому сайту N-гликозилирования. Данное фосфорилирование может представлять собой результат присутствия звеньев моно-M6P и/или бис-M6P. 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-M6P 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-M6P в четвертом сайте N-гликозилирования. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 3, 5, 8, 10, 15, 20 или 25% rhGAA являются сialiлированными по четвертому сайту N-гликозилирования.

В одном или нескольких вариантах осуществления по меньшей мере 5% rhGAA являются фосфорилированными по пятому сайту N-гликозилирования (например, N596 в SEQ ID NO: 2 и N692 в SEQ ID NO: 1). В других вариантах осуществления меньше 5, 10, 15, 20 или 25% rhGAA являются фосфорилированными по пятому сайту 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 сialiлированными по пятому сайту N-гликозилирования.

В одном или нескольких вариантах осуществления по меньшей мере 5% rhGAA являются фосфорилированными по шестому сайту N-гликозилирования (например, N826 в SEQ ID NO: 2 и N882 в SEQ ID NO: 1). В других вариантах осуществления меньше 5, 10, 15, 20 или 25% rhGAA являются фосфорилированными по шестому сайту N-гликозилирования. Например, шестой сайт N-гликозилирования может иметь комбинацию из 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 сialiлированными по шестому сайту N-гликозилирования.

В одном или нескольких вариантах осуществления по меньшей мере 5% rhGAA являются фосфорилированными по седьмому сайту N-гликозилирования (например, N869 в SEQ ID NO: 2 и N925 в SEQ ID NO: 1). В других вариантах осуществления меньше 5%, 10%, 15%, 20% или 25% rhGAA являются фосфорилированными по седьмому сайту 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.

В различных вариантах осуществления rhGAA имеет среднее содержание фукозы, составляющее 0-5 моль на моль rhGAA, содержание GlcNAc, составляющее 10-30 моль на моль rhGAA, содержание галактозы, составляющее 5-20 моль на моль rhGAA, содержание маннозы, составляющее 10-40 моль на моль rhGAA, содержание M6P, составляющее 2-8 моль на моль rhGAA, и содержание сиаловой кислоты, составляющее 2-8 моль на моль rhGAA. В различных вариантах осуществления rhGAA имеет среднее содержание фукозы, составляющее 2-3 моль на моль rhGAA, содержание GlcNAc, составляющее 20-25 моль на моль rhGAA, содержание галактозы, составляющее 8-12 моль на моль rhGAA, содержание маннозы, составляющее 22-27 моль на моль rhGAA, содержание M6P, составляющее 3-5 моль на моль rhGAA, и содержание сиаловой кислоты, составляющее 4-7 моль на моль rhGAA.

Рекомбинантный лизосомный белок человека (например, rhGAA) предпочтительно получают с помощью клеток яичника китайского хомячка (CHO), таких как линии клеток CHO GA-ATB-200 или ATB-200-001-X5-14, или с помощью субкультуры или производного такой культуры клеток CHO. ДНК-конструкции, которые экспрессируют аллельные варианты кислой α -глюкозидазы или аминокислотные 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: 2, 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 SEQ ID NO: 2, 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: 2. Специалисты в данной области могут выбрать альтернативные векторы, подходящие для трансформации клеток CHO, для получения таких ДНК-конструкций.

Для расчета идентичности двух последовательностей можно использовать различные алгоритмы и/или программы для выравнивания, в том числе FASTA или BLAST, которые доступны как часть программного пакета для анализа последовательностей GCG (Висконсинский университет, Мэдисон, Висконсин), и их можно использовать, 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 использованием генетического кода.

Авторы настоящего изобретения обнаружили, что рекомбинантную кислую α -глюкозидазу человека, имеющую исключительную способность к нацеливанию на катион-независимые рецепторы маннозо-6-фосфата (CIMPR) и клеточные лизосомы, а также паттерны гликозилирования, снижающие ее непродуктивное выведение *in vivo*, можно получать с применением клеток яичника китайского хомячка (CHO). 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 ATB200, имеет значительно большее содержание N-гликановых остатков маннозо-6-фосфата (M6P) и бис-маннозо-6-фосфата, обеспечивающих нацеливание на мышечные клетки, чем традиционная кислая α -глюкозидаза, такая как Lumizyme®. Не ограничиваясь какой-либо теорией, полагают, что данное обширное гликозилирование позволяет ферменту ATB200 более эффективно поглощаться целевыми клетками, и следовательно, подвергаться более эффективному выведению из кровотока, чем другим рекомбинантным кислым α -глюкозидазам человека, таким как, например, алглюкозидаза-альфа, которая имеет существенно более низкое содержание M6P и бис-M6P. Было показано, что ATB200 эффективно связывается с CIMPR и эффективно поглощается скелетными мышцами и сердечной мышцей и имеет паттерн гликозилирования, который обеспечивает благоприятный фармакокинетический профиль и снижает непродуктивное выведение *in vivo*.

Также предусматривается, что обширное гликозилирование ATB200 может способствовать снижению иммуногенности ATB200 по сравнению например, с 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 сведения к минимуму агрегации белка, а также посредством экранирования иммуногенных эпитопов белка от 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 г.). 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 более низкой частотой встречаемости, чем уровень антител к лекарственному средству, выработка которых индуцируется посредством введения алглюкозидазы-альфа.

Как описано в международной патентной заявке PCT/US 2015/053252, одновременно находящейся на рассмотрении, такие клетки, как клетки CHO, можно применять для получения rhGAA, описанной в данном документе, и данную rhGAA можно применять согласно настоящему изобретению. Примерами такой линии клеток CHO являются GA-ATB-200 или 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 M6P и бис-M6P, такую как rhGAA ATB200, 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 M6P- и бис-M6P-гликанов, которые обеспечивают нацеливание на CIMPR.

Неожиданно было обнаружено, что можно трансформировать линии клеток CHO, отбирать трансформантов, которые вырабатывают rhGAA с высоким содержанием гликанов, несущих M6P или бис-

М6Р, которые обеспечивают нацеливание на CIMPR, и стабильно экспрессировать данную rhGAA с высоким содержанием М6Р. Таким образом, способы получения этих линий клеток CHO также описаны в международной патентной заявке PCT/US 2015/053252, одновременно находящейся на рассмотрении. 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.

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

Получение, захват и очистка рекомбинантного лизосомного белка человека

Различные варианты осуществления настоящего изобретения относятся к способам получения, и/или захвата, и/или очистки рекомбинантного лизосомного белка человека (например, rhGAA). Иллюстративный способ 600 получения, захвата и очистки рекомбинантного лизосомного белка человека показан на фиг. 6.

На фиг. 6 стрелки указывают направление движения для различных жидких фаз, содержащих рекомбинантный лизосомный белок человека. Биореактор 601 содержит культуру клеток, таких как клетки CHO, которые экспрессируют и секретируют рекомбинантный лизосомный белок человека (например, rhGAA) в окружающую жидкую культуральную среду. Биореактор 601 может представлять собой любой подходящий биореактор для культивирования клеток, такой как перфузионный биореактор, биореактор с однократной загрузкой или биореактор с периодической загрузкой. В различных вариантах осуществления биореактор имеет объем от приблизительно 1 до приблизительно 20000 л. Иллюстративные объемы биореактора включают приблизительно 1 л, приблизительно 10 л, приблизительно 20 л, приблизительно 30 л, приблизительно 40 л, приблизительно 50 л, приблизительно 60 л, приблизительно 70 л, приблизительно 80 л, приблизительно 90 л, приблизительно 100 л, приблизительно 150 л, приблизительно 200 л, приблизительно 250 л, приблизительно 300 л, приблизительно 350 л, приблизительно 400 л, приблизительно 500 л, приблизительно 600 л, приблизительно 700 л, приблизительно 800 л, приблизительно 900 л, приблизительно 1000 л, приблизительно 1500 л, приблизительно 2000 л, приблизительно 2500 л, приблизительно 3000 л, приблизительно 3500 л, приблизительно 4000 л, приблизительно 5000 л, приблизительно 6000 л, приблизительно 7000 л, приблизительно 8000 л, приблизительно 9000 л, приблизительно 10000 л, приблизительно 15000 л и приблизительно 20000 л.

Как показано на фиг. 6, среда может быть удалена из биореактора. Такое удаление среды может быть непрерывным для перфузионного биореактора или может быть периодическим для реактора с однократной или периодической загрузкой. Среда фильтруется с помощью системы 603 фильтрации для удаления клеток. В некоторых вариантах осуществления клетки, удаленные из среды, повторно вводят в биореактор, и среду, содержащую выделяемый рекомбинантный лизосомный белок, можно дополнительно обработать. Система 603 фильтрации может представлять собой любую подходящую систему фильтрации, в том числе систему фильтрации в переменном тангенциальном потоке (ATF), систему фильтрации в тангенциальном потоке (TFF), систему центробежной фильтрации и т.д. В различных вариантах осуществления в системе фильтрации используют фильтр, имеющий размер пор от приблизительно 10 нм до приблизительно 2 мкм. Иллюстративные размеры пор фильтра включают приблизительно 10 нм, приблизительно 20 нм, приблизительно 30 нм, приблизительно 40 нм, приблизительно 50 нм, приблизительно 60 нм, приблизительно 70 нм, приблизительно 80 нм, приблизительно 90 нм, приблизительно 100 нм, приблизительно 150 нм, приблизительно 200 нм, приблизительно 250 нм, приблизительно 300 нм, приблизительно 350 нм, приблизительно 400 нм, приблизительно 500 нм, приблизительно 600 нм, приблизительно 700 нм, приблизительно 800 нм, приблизительно 900 нм, приблизительно 1 мкм, приблизительно 1,5 и приблизительно 2 мкм.

В различных вариантах осуществления скорость удаления среды составляет от приблизительно 1 до приблизительно 20000 л/день. Иллюстративные значения скорости удаления среды включают приблизительно 1 л/день, приблизительно 10 л/день, приблизительно 20 л/день, приблизительно 30 л/день, приблизительно 40 л/день, приблизительно 50 л/день, приблизительно 60 л/день, приблизительно 70 л/день, приблизительно 80 л/день, приблизительно 90 л/день, приблизительно 100 л/день, приблизительно 150 л/день, приблизительно 200 л/день, приблизительно 250 л/день, приблизительно 300 л/день, приблизительно 350 л/день, приблизительно 400 л/день, приблизительно 500 л/день, приблизительно 600 л/день, приблизительно 700 л/день, приблизительно 800 л/день, приблизительно 900 л/день, приблизительно 1000 л/день, приблизительно 1500 л/день, приблизительно 2000 л/день, приблизительно 2500 л/день, приблизительно 3000 л/день, приблизительно 3500 л/день, приблизительно 4000 л/день, приблизительно 5000 л/день, приблизительно 6000 л/день, приблизительно 7000 л/день, приблизительно 8000 л/день, приблизительно 9000 л/день, приблизительно 10000 л/день, приблизительно 15000 л/день и приблизительно 20000 л/день. В качестве альтернативы, скорость удаления среды можно выразить в зависимости

от объема биореактора, как, например, от приблизительно 0,1 до приблизительно 3 объемов реактора в день. Иллюстративные значения скорости удаления среды включают приблизительно 0,1, приблизительно 0,2, приблизительно 0,3, приблизительно 0,4, приблизительно 0,5, приблизительно 0,6, приблизительно 0,7, приблизительно 0,8, приблизительно 0,9, приблизительно 1, приблизительно 1,1, приблизительно 1,2, приблизительно 1,3, приблизительно 1,4, приблизительно 1,5, приблизительно 2, приблизительно 2,5 и приблизительно 3 объема реактора в день.

Для непрерывного процесса или процесса с периодической загрузкой скорость подачи свежей среды в биореактор может составлять от приблизительно 1 до приблизительно 20000 л/день. Иллюстративные скорости введения среды включают приблизительно 1 л/день, приблизительно 10 л/день, приблизительно 20 л/день, приблизительно 30 л/день, приблизительно 40 л/день, приблизительно 50 л/день, приблизительно 60 л/день, приблизительно 70 л/день, приблизительно 80 л/день, приблизительно 90 л/день, приблизительно 100 л/день, приблизительно 150 л/день, приблизительно 200 л/день, приблизительно 250 л/день, приблизительно 300 л/день, приблизительно 350 л/день, приблизительно 400 л/день, приблизительно 500 л/день, приблизительно 600 л/день, приблизительно 700 л/день, приблизительно 800 л/день, приблизительно 900 л/день, приблизительно 1000 л/день, приблизительно 1500 л/день, приблизительно 2000 л/день, приблизительно 2500 л/день, приблизительно 3000 л/день, приблизительно 3500 л/день, приблизительно 4000 л/день, приблизительно 5000 л/день, приблизительно 6000 л/день, приблизительно 7000 л/день, приблизительно 8000 л/день, приблизительно 9000 л/день, приблизительно 10000 л/день, приблизительно 15000 и приблизительно 20000 л/день. В качестве альтернативы, скорость введения среды можно выразить в зависимости от объема биореактора, как, например, от приблизительно 0,1 до приблизительно 3 объемов реактора в день. Иллюстративные значения скорости введения среды включают приблизительно 0,1, приблизительно 0,2, приблизительно 0,3, приблизительно 0,4, приблизительно 0,5, приблизительно 0,6, приблизительно 0,7, приблизительно 0,8, приблизительно 0,9, приблизительно 1, приблизительно 1,1, приблизительно 1,2, приблизительно 1,3, приблизительно 1,4, приблизительно 1,5, приблизительно 2, приблизительно 2,5 и приблизительно 3 объема реактора в день.

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

В различных вариантах осуществления система 605 захвата белка содержит одну или несколько анионообменных (АЕХ) колонок для прямого захвата продукта в виде рекомбинантного лизосомного белка человека, в частности, лизосомного белка, имеющего высокое содержание М6Р. Не желая ограничиваться какой-либо конкретной теорией, полагают, что применение АЕХ-хроматографии для захвата рекомбинантного лизосомного белка человека из отфильтрованной среды гарантирует, что захваченный рекомбинантный белковый продукт будет иметь более высокое содержание М6Р вследствие более отрицательного заряда рекомбинантного белка, имеющего одну или несколько групп М6Р. В результате нефосфорилированный рекомбинантный белок и примеси клетки-хозяина не связываются смолой колонки, так же как и высокофосфорилированный рекомбинантный белок, и нефосфорилированный рекомбинантный белок и примеси клетки-хозяина проходят через колонку. Соответственно АЕХ-хроматографию можно применять для обогащения содержания М6Р в белковом продукте (то есть для отбора белков, имеющих больше М6Р) из-за высокой аффинности М6Р-содержащих белков к АЕХ-смоле.

Кроме того, не желая ограничиваться какой-либо конкретной теорией, также полагают, что наличие прямого захвата продукта в виде рекомбинантного белка с помощью АЕХ-хроматографии гарантирует, что рекомбинантные белки, имеющие высокое содержание М6Р, удаляются из среды, содержащей протеазы и другие ферменты, которые могут разрушать белок и/или дефосфорилировать белок. В результате сохраняется высококачественный продукт.

Подходящие колонки для АЕХ-хроматографии имеют функциональные химические группы, которые связывают отрицательно заряженные белки. Иллюстративные функциональные группы включают без ограничения первичные, вторичные, третичные и четвертичные аммониевые группы или аминогруппы. Эти функциональные группы могут быть связаны с мембранами (например, целлюлозными мембранами) или традиционными хроматографическими смолами. Иллюстративные среды для колонок включают среды SP, CM Q и DEAE Sepharose® Fast Flow производства GE Healthcare Lifesciences.

Объем колонки для АЕХ-хроматографии может представлять собой любой подходящий объем, как, например, от 1 до 1000 л. Иллюстративные объемы колонки включают приблизительно 1 л, приблизительно 2 л, приблизительно 3 л, приблизительно 4 л, приблизительно 5 л, приблизительно 6 л, приблизительно 7 л, приблизительно 8 л, приблизительно 9 л, приблизительно 10 л, приблизительно 20 л, приблизительно 30 л, приблизительно 40 л, приблизительно 50 л, приблизительно 60 л, приблизительно 70 л, приблизительно 80 л, приблизительно 90 л, приблизительно 100 л, приблизительно 150 л, приблизительно 200 л, приблизительно 250 л, приблизительно 300 л, приблизительно 350 л, приблизительно 400 л и приблизительно 500 л, приблизительно 600 л, приблизительно 700 л, приблизительно 800 л, приблизительно 900 и приблизительно 1000 л.

Иллюстративные условия для анионообменной колонки приведены в табл. 2 ниже.

Таблица 2

Процедура	Буфер	Скорость потока (см/ч)	Объем (CV)	Температура (°C)
Санитарная обработка перед использованием	0,1-10 М NaOH	≤ 25-2500	≥ 1-3 (≥ 10-120 мин.)	15 – 25
Предварительное уравнивание	20-2000 мМ фосфатный буфер (PB), pH 6,9-7,3	≤ 25-2500	≥ 1-5	15 – 25
Уравнивание	4-400 мМ PB, pH 6,9-7,3	≤ 25-2500	≥ 1-5	2 – 15
Загрузка	Данные отсутствуют	≤ 10-1000	Данные отсутствуют	2 – 15
Промывание 1	4-400 мМ PB, pH 6,9-7,3	≤ 25-2500	≥ 2-10	2 – 15
Промывание 2	4-400 мМ PB, pH 6,9-7,3	≤ 25-2500	≥ 2-10	15 – 25
Элюирование	4-400 мМ PB, 20-2000 мМ NaCl, pH 6,1-6,5	≤ 25-2500	Данные отсутствуют	15 – 25
Десорбирование	4-400 мМ PB, 0,1-10 М NaCl, pH 6,1-6,5	≤ 25-2500	≥ 1-5	15 – 25
Санитарная обработка после использования	0,1-10 М NaOH	≤ 25-2500	≥ 1-3 (≥ 10-120 мин.)	15 – 25
Хранение	0,01-1,0 М NaOH	≤ 25-2500	≥ 1-5	15 – 25

После загрузки рекомбинантного лизосомного белка человека в систему 605 захвата белка рекомбинантный лизосомный белок человека элюируют из колонки(колонок) путем изменения pH и/или содержания солей в колонке.

Элюированный рекомбинантный лизосомный белок человека можно подвергнуть дополнительным стадиям очистки и/или стадиям обеспечения качества. Например, как показано на фиг. 6, элюированный рекомбинантный лизосомный белок человека можно подвергнуть стадии 607 уничтожения вирусов. Такое уничтожение вирусов 607 может включать в себя одно или несколько из уничтожения с помощью низкого pH, уничтожения детергентами или другой методики, известной из уровня техники.

Рекомбинантный белковый продукт после стадии 607 уничтожения вирусов можно вводить во вторую хроматографическую систему 609 для дополнительной очистки рекомбинантного белкового продукта. В качестве альтернативы, элюированный рекомбинантный белок из системы 605 захвата белка можно подавать непосредственно во вторую хроматографическую систему 609. В различных вариантах осуществления вторая хроматографическая система 609 содержит одну или несколько колонок для аффинной хроматографии на иммобилизованных ионах металлов (IMAC) для дополнительного удаления примесей. Иллюстративные ионы металлов включают в себя ионы кобальта, никеля, меди, железа, цинка или галлия.

Объем второй хроматографической колонки (например, колонки для IMAC) может представлять собой любой подходящий объем, как, например, от 0,1 до 100 л. Иллюстративные объемы колонки включают приблизительно 0,1 л, приблизительно 0,2 л, приблизительно 0,3 л, приблизительно 0,4 л, приблизительно 0,5 л, приблизительно 0,6 л, приблизительно 0,7 л, приблизительно 0,8 л, приблизительно 0,9 л, приблизительно 1 л, приблизительно 1,5 л, приблизительно 2 л, приблизительно 2,5 л, приблизительно 3 л, приблизительно 3,5 л, приблизительно 4 л, приблизительно 4,5 л, приблизительно 5 л, приблизительно 6 л, приблизительно 7 л, приблизительно 8 л, приблизительно 9 л, приблизительно 10 л, приблизительно 15 л, приблизительно 20 л, приблизительно 25 л, приблизительно 30 л, приблизительно 35 л, приблизительно 40 л и приблизительно 50 л, приблизительно 60 л, приблизительно 70 л, приблизительно 80 л, приблизительно 90 л и приблизительно 100 л.

Иллюстративные условия для колонки для IMAC приведены в табл. 3 ниже.

Таблица 3

Процедура	Буфер	Скорость потока (см/ч)	Объем (CV)
Ополаскивание	4-400 mM PB, pH 6,3-6,7	≤ 25 -2500	≥ 1 -5
Санитарная обработка перед использованием	0,01-1,0 M NaOH	≤ 25 -2500	≥ 1 -3 (10 – 30 мин)

Уравновешивание	4-400 мМ РВ, рН 6,5	≤ 25-2500	≥ 1-5
Промывание с помощью WFI	Вода для инъекций (WFI)	≤ 25-2500	≥ 1-3
Хелатирование	0,01-1,0 М ацетат меди	≤ 25-2500	≥ 1-5
Промывание с помощью WFI	WFI	≤ 25-2500	≥ 2-10
Промывание кислым буфером	2-200 мМ ацетат натрия, 0,05-5 М NaCl, рН 3,5-4,5	≤ 25-2500	≥ 2-10
Уравновешивание	4-400 мМ РВ, рН 6,3-6,7	≤ 25-2500	≥ 1-5
Холостой прогон с элюирующим буфером	4-400 мМ РВ, 15-1500 мМ глицин, рН 6,1-6,5	≤ 25-2500	≥ 2-20
Уравновешивание	4-400 мМ РВ, рН 6,3-6,7	≤ 25-2500	≥ 1-5
Загрузка	Данные отсутствуют	≤ 25-2500	≥ 1-5
Промывание 1	4-400 мМ РВ, рН 6,3-6,7	≤ 25-2500	≥ 2-10
Промывание 2	4-400 мМ РВ, 0,1-10 М NaCl, 5-30% пропиленгликоль, рН 6,3-6,7	≤ 25-2500	≥ 2-10
Промывание 3	4-400 мМ РВ, рН 6,3-6,7	≤ 25-2500	≥ 2-10
Элюирование	4-400 мМ РВ, 15-1500 мМ глицин, рН 6,1-6,5	≤ 25-2500	Данные отсутствуют
Десорбирование	4-400 мМ РВ, 50-5000 мМ имидазол, рН 6,3-6,7	≤ 25-2500	≥ 1-5
Санитарная обработка после использования	0,01-1М NaOH	≤ 25-2500	≥ 1-3 (10 – 30 мин)
Ополаскивание	4-400 мМ РВ, рН 6,3-6,7	≤ 25-2500	≥ 1-5
Хранение	5-30% этанол	≤ 25-2500	≥ 1-5

После загрузки рекомбинантного белка во вторую хроматографическую систему 609 рекомбинантный белок элюируют из колонки(колонок). Как показано на фиг. 6, элюированный рекомбинантный белок можно подвергнуть стадии 611 уничтожения вирусов. Как и стадия 607 уничтожения вирусов, стадия 611 уничтожения вирусов может включать в себя одно или несколько из уничтожения с помощью низкого рН, уничтожения детергентами или другой методики, известной из уровня техники. В некоторых вариантах осуществления используют только одну из стадий 607 или 611 уничтожения вирусов или процедуры уничтожения вирусов выполняют на одной и той же стадии в процессе очистки.

Как показано на фиг. 6, рекомбинантный белковый продукт после стадии 611 уничтожения вирусов можно вводить в третью хроматографическую систему 613 для дополнительной очистки рекомбинантного белкового продукта. В качестве альтернативы, элюированный рекомбинантный белок из второй хроматографической системы 609 можно подавать непосредственно в третью хроматографическую систему

613. В различных вариантах осуществления третья хроматографическая система 613 содержит одну или несколько колонок для катионообменной хроматографии (CEX) и/или колонок для эксклюзионной хроматографии (SEC) для дополнительного удаления примесей. Затем рекомбинантный белковый продукт элюируют из третьей хроматографической системы 613.

Объем третьей хроматографической колонки (например, колонки для CEX или SEC) может представлять собой любой подходящий объем, как, например, от 0,1 до 200 л. Иллюстративные объемы колонки включают приблизительно 0,1 л, приблизительно 0,2 л, приблизительно 0,3 л, приблизительно 0,4 л, приблизительно 0,5 л, приблизительно 0,6 л, приблизительно 0,7 л, приблизительно 0,8 л, приблизительно 0,9 л, приблизительно 1 л, приблизительно 1,5 л, приблизительно 2 л, приблизительно 2,5 л, приблизительно 3 л, приблизительно 3,5 л, приблизительно 4 л, приблизительно 4,5 л, приблизительно 5 л, приблизительно 6 л, приблизительно 7 л, приблизительно 8 л, приблизительно 9 л, приблизительно 10 л, приблизительно 15 л, приблизительно 20 л, приблизительно 25 л, приблизительно 30 л, приблизительно 35 л, приблизительно 40 л и приблизительно 50 л, приблизительно 60 л, приблизительно 70 л, приблизительно 80 л, приблизительно 90 л, приблизительно 100 л, приблизительно 150 и приблизительно 200 л.

Иллюстративные условия для колонки для CEX приведены в табл. 4 ниже.

Таблица 4

Процедура	Буфер	Скорость потока (см/ч)	Объем (CV)
Санитарная обработка перед использованием	0,1-10 M NaOH	$\leq 25-2500$	$\geq 1-3$ ($\geq 10-120$ мин)
Уравновешивание	2-200 mM цитрат натрия, pH 4,0-5,0	$\leq 30-3000$	$\geq 2-10$
Загрузка	Данные отсутствуют	$\leq 30-3000$	Данные отсутствуют
Промывание	2-200 mM цитрат натрия, pH 4,0-5,0	$\leq 30-3000$	$\geq 2-10$
Элюирование	2-200 mM цитрат натрия, 15-1500 mM NaCl, pH 4,0-5,0	$\leq 30-3000$	$\geq 2-10$
Десорбирование	2-200 mM цитрат натрия, 0,1-10 M NaCl, pH 4,0-5,0	$\leq 30-3000$	$\geq 1-5$
Санитарная обработка после использования	0,1-10 M NaOH	$\leq 25-2500$	$\geq 1-3$ ($\geq 10-120$ мин)
Хранение	0,01-1,0 M NaOH	$\leq 30-3000$	$\geq 1-5$

Рекомбинантный белковый продукт также можно подвергать дополнительной обработке. Например, для удаления вирусов можно применять другую систему 615 фильтрации. В некоторых вариантах осуществления при такой фильтрации можно использовать фильтры с размерами пор от 5 до 50 мкм. Другая обработка продукта может включать в себя стадию 617 корректировки продукта, на которой рекомбинантный белковый продукт можно стерилизовать, фильтровать, концентрировать, хранить и/или добавлять к нему дополнительные компоненты для получения конечного состава продукта. Например, рекомбинантный белковый продукт можно сконцентрировать в 2-10 раз, как, например, от начальной концентрации белка, составляющей от приблизительно 2 до приблизительно 20 мг/мл, до конечной концентрации белка, составляющей от приблизительно 4 до приблизительно 200 мг/мл. Этот конечный про-

дукт можно использовать для заполнения флаконов и можно лиофилизировать для будущего применения.

Введение рекомбинантного белка

Рекомбинантный лизосомный белок человека (например, rhGAA) или его 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 солубилизирующее средство и местный анестетик для уменьшения болевого ощущения в месте инъекции. Обычно ингредиенты представляют 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.

Рекомбинантный лизосомный белок человека (например, rhGAA) (или композицию или лекарственный препарат, содержащие рекомбинантный лизосомный белок человека) вводят подходящим путем. В одном варианте осуществления рекомбинантный лизосомный белок человека вводят внутривенно. В других вариантах осуществления рекомбинантный лизосомный белок человека (например, rhGAA) вводят путем прямого введения в целевую ткань, такую как сердечная или скелетная мышца (например, внутримышечно), или в нервную систему (например, путем прямой инъекции в головной мозг; интравентрикулярно; интратекально). В случае необходимости можно одновременно использовать более одного пути.

Рекомбинантный лизосомный белок человека (например, rhGAA) (или композицию или лекарственный препарат, содержащие рекомбинантный лизосомный белок 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 подборе 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 практикующего 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 кислотную α -глюкозидазу человека вводят путем внутривенной инфузии в дозе, составляющей от приблизительно 1 до приблизительно 100 мг/кг, как, например, от приблизительно 5 до приблизительно 30 мг/кг, как правило, от приблизительно 5 до приблизительно 20 мг/кг. По меньшей мере в одном варианте осуществления рекомбинантную кислотную α -глюкозидазу человека вводят путем внутривенной инфузии в дозе, составляющей приблизительно 5 мг/кг, приблизительно 10 мг/кг, приблизительно 15 мг/кг, приблизительно 20 мг/кг, приблизительно 25 мг/кг, приблизительно 30 мг/кг, приблизительно 35 мг/кг, приблизительно 40 мг/кг, приблизительно 50 мг/кг, приблизительно 55 мг/кг, приблизительно 60 мг/кг, приблизительно 70 мг/кг, приблизительно 80 мг/кг, приблизительно 90 или приблизительно 100 мг/кг. По меньшей мере в одном варианте осуществления рекомбинантную кислотную 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 можно увеличивать во время соматического заболевания или стресса, или в случае появления или увеличения количества антител к кислотной α -глюкозидазе, или при ухудшении симптомов заболевания.

Терапевтически эффективное количество рекомбинантной кислотной α -глюкозидазы человека (или композиции или лекарственного препарата, содержащих рекомбинантную кислотную 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 разовой дозы). Интервал можно определять с помощью стандартных клинических методик. В предпочтительных вариантах осуществления рекомбинантную кислотную α -глюкозидазу человека вводят ежедневно, два раза в месяц; один раз в неделю; два раза в неделю или ежедневно. Интервал введения для потребности отдельного индивидуума не обязательно должен быть фиксированным интервалом и может

варьироваться с течением времени в зависимости от потребностей индивидуума. Например, интервал между дозами 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 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.

Рекомбинантный лизосомный белок человека (например, ghGAA) 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 рекомбинантный лизосомный белок человека (например, ghGAA), а также необязательно вспомогательные вещества 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.

Комбинированная терапия с ghGAA и фармакологическим шапероном

В различных вариантах осуществления ghGAA (например, ATB200), получаемый описанными в данном документе способами, можно применять в комбинированной терапии с фармакологическим шапероном, таким как миглустат или дувоглустат.

По меньшей мере в одном варианте осуществления фармакологический шаперон (например, миглустат) вводят перорально. По меньшей мере в одном варианте осуществления миглустат вводят в пероральной дозе, составляющей от приблизительно 200 до приблизительно 400 мг, или в пероральной дозе, составляющей приблизительно 200 мг, приблизительно 250 мг, приблизительно 300 мг, приблизительно 350 мг или приблизительно 400 мг. По меньшей мере в одном варианте осуществления миглустат вводят в пероральной дозе, составляющей от приблизительно 233 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 260 мг, приблизительно 265 мг или приблизительно 270 мг. По меньшей мере в одном варианте осуществления миглустат вводят в виде пероральной дозы, составляющей приблизительно 260 мг.

Специалистам в данной области будет понятно, что пероральная доза миглустата, находящаяся в диапазоне от приблизительно 200 до 400 мг или в 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 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 или приблизительно 200 мг. По меньшей мере в одном варианте осуществления миглустат вводят в виде пероральной дозы, составляющей от приблизительно 65 до приблизительно 195 мг, или в виде пероральной дозы, составляющей приблизительно 65 мг, приблизительно 130 или приблизительно 195 мг.

По меньшей мере в одном варианте осуществления миглустат вводят в виде 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 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, болюсы, порошки, пасты, гранулы, суппозитории, драже или препараты в виде 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 до приблизительно 300 мг миглустата. По меньшей мере в 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 форма содержит приблизительно 65 мг миглустата, то миглустат можно вводить в виде дозировки из четырех лекарственных форм или в общей дозе 260 мг миглустата. 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, миглустат можно вводить в виде дозировки из одной лекарственной формы (в общей дозе 65 мг миглустата), двух лекарственных форм (в общей дозе 130 мг миглустата) или трех лекарственных форм (в общей дозе 195 мг миглустата).

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

По меньшей мере в одном варианте осуществления миглустат и рекомбинантную кислоту α -глюкозидазу человека вводят одновременно. По меньшей мере в одном варианте осуществления миглустат и рекомбинантную кислоту α -глюкозидазу человека вводят последовательно. По меньшей мере в одном варианте осуществления миглустат вводят до введения рекомбинантной кислотой α -глюкозидазы человека. По меньшей мере в одном варианте осуществления миглустат вводят менее чем за три часа до введения рекомбинантной кислотой α -глюкозидазы человека. По меньшей мере в одном варианте осуществления миглустат вводят за приблизительно два часа до введения рекомбинантной кислотой α -глюкозидазы человека. По меньшей мере в одном варианте осуществления миглустат вводят менее чем за два часа до введения рекомбинантной кислотой α -глюкозидазы человека. По меньшей мере в одном варианте осуществления миглустат вводят за приблизительно 1,5 часа до введения рекомбинантной кислотой α -глюкозидазы человека. По меньшей мере в одном варианте осуществления миглустат вводят за приблизительно один час до введения рекомбинантной кислотой α -глюкозидазы человека. По меньшей мере в одном варианте осуществления миглустат вводят за от приблизительно 50 до приблизительно 70 мин до введения рекомбинантной кислотой α -глюкозидазы человека. По меньшей мере в одном варианте осуществления миглустат вводят за от приблизительно 55 до приблизительно 65 мин до введения рекомбинантной кислотой α -глюкозидазы человека. По меньшей мере в одном варианте осуществления миглустат вводят за приблизительно 30 мин до введения рекомбинантной кислотой α -глюкозидазы человека. По меньшей мере в одном варианте осуществления миглустат вводят за от приблизительно 25 до приблизительно 35 мин до введения рекомбинантной кислотой α -глюкозидазы человека. По меньшей мере в одном варианте осуществления миглустат вводят за от приблизительно 27 до приблизительно 33 мин до введения рекомбинантной кислотой α -глюкозидазы человека.

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

По меньшей мере в одном варианте осуществления миглустат вводят после введения рекомбинантной кислотой α -глюкозидазы человека. По меньшей мере в одном варианте осуществления миглустат вводят в течение периода до 2 ч после введения рекомбинантной кислотой α -глюкозидазы человека. По меньшей мере в одном варианте осуществления миглустат вводят через приблизительно 30 мин после введения рекомбинантной кислотой α -глюкозидазы человека. По меньшей мере в одном варианте осуществления миглустат вводят через приблизительно один час после введения рекомбинантной кислотой α -глюкозидазы человека. По меньшей мере в одном варианте осуществления миглустат вводят через приблизительно 1,5 ч после введения рекомбинантной кислотой α -глюкозидазы человека. По меньшей мере в одном варианте осуществления миглустат вводят через приблизительно 2 ч после введения рекомбинантной кислотой 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 кислоту α -глюкозидазу человека, определенную в данном документе, и инструк-

ции 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. Например, 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 миглуста 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 миглуста 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 выведения миглуста гидролиз гликогена с помощью АТВ200 в лизосомах чрезмерно не ингибируется присутствием миглуста, и фермент сохраняет достаточную активность для того, чтобы быть терапевтически применимым.

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

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

- дозированию, пути введения фармакологического шаперона (например, миглуста) 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 рекомбинантного лизосомного белка человека (например, ghGAA), 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 или SEQ ID NO: 2;

- количеству и типу N-гликановых звеньев в рекомбинантном лизосомном белке человека (например, ghGAA), таких как N-ацетилглюкозамин, галактоза, сиаловая кислота или комплексные N-гликаны, образованных в результате их объединения, присоединенных к рекомбинантному лизосомному белку человека;

- степени фосфорилирования маннозных звеньев в рекомбинантном лизосомном белке человека (например, ghGAA) 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) заместительного фермента (например, рекомбинантной кислой α -глюкозидазы человека) и типу состава, в том числе к носителям и терапевтически эффективно количеству;

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

- 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 миглуста и рекомбинантной кислой α -глюкозидазы человека или последовательному введению, например, где миглустат вводят до рекомбинантной кислой α -глюкозидазы 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, вскармливаемого, такого как человек), и состоянию, от которого страдает индивидум (например, недостаточности фермента).

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

Примеры

Другие признаки настоящего изобретения станут очевидными из нижеизложенных неограничивающих примеров, которые иллюстрируют на 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 препараты на основе rhGAA вводили в колонку с CIMPR (который связывается с rhGAA, имеющей группы М6Р), а затем элюировали в градиенте свободного М6. Фракции собирали в 96-луночный планшет, и активность GAA анализировали с помощью субстрата, представляющего собой 4MU- α -глюкозу. Относительные количества связанной и несвязанной rhGAA определяли на основании активности GAA и регистрировали в виде доли от общего количества фермента.

На фиг. 4А-В описаны проблемы, связанные с традиционными средствами для ERT (Myozyme® и Lumizyme®): 73% rhGAA в Myozyme® (фиг. 4В) и 78% rhGAA в Lumizyme® (фиг. 4А) не связывались с CIMPR, см. крайние левые пики на каждой фигуре. Только 27% rhGAA в Myozyme® и 22% rhGAA в Lumizyme® содержали М6Р, 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 возникновения 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

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 фиг. 5. 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 их использовали для создания отдельных клонов, вырабатывающих rhGAA. Отдельные клоны получали в культуральных чашках с полужидкой средой, собирали с помощью системы ClonePix и переносили в планшеты с 24 глубокими лунками. Отдельные клоны анализировали в отношении активности фермента GAA для идентификации клонов, экспрессирующих GAA на высоком уровне. В кондиционированных средах для определения активности GAA использовался субстрат 4-MU- α -глюкозидаза. Клоны, вырабатывающие GAA на более высоких уровнях, которые измеряли с помощью анализов фермента GAA, дополнительно оценивали в отношении жизнеспособности, способности к росту, продуктивности выработки GAA, структуры N-гликанов и стабильной экспрессии белка. Линии клеток CHO, в том числе линию клеток CHO GA-ATB-200, экспрессирующую rhGAA с повышенным содержанием моно-М6Р-или бис-М6Р-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 очищенной rhGAA ATB200 из различных производственных партий отмечали связывание с CIMPR-рецептором, аналогичное показанному на фиг. 7В и 8 (~70%), что указывало на то, что rhGAA ATB200 может стабильно вырабатываться. Как показано на фиг. 4А, 4В, 7А и 7В, rhGAA Myozyme® и Lumizyme® демонстрировали значительно меньшую степень связывания с 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 помощью возрастающего количества соли. Контроль профилей осуществляли с помощью UV-излучения (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 от Lumizyme® (фиг. 9). Это подтверждает, что rhGAA ATB200 была фосфорилирована в большей степени, чем Lumizyme®, поскольку эту оценку проводили по конечному 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 (фиг. 10). 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 составила приблизительно 2-4 нМ), фиг. 12А.

rhGAA ATB200 также анализировали в отношении профилей сайт-специфических N-гликанов с помощью двух различных аналитических методик на основе 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 мин 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 мин. После алкилирования к образцу добавляли 400 мкл предварительно охлажденного ацетона и смесь подвергали заморозке с охлаждением при -80°C в течение 4 ч. 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 NH₄HCO₃. 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 Pro™ от Thermo Scientific.

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

Результаты первого и второго анализов показаны на фигурах 11А-11Н. На фиг. 11А-11Н результаты первого анализа представлены столбиками, расположенными слева (темно-серого цвета), а результаты второго анализа представлены столбиками, расположенными справа (светло-серого цвета). На фиг. 11В-11Г номенклатура символов для представления гликанов соответствует Varki, A., Cummings, R.D., Esko J.D., et al., *Essentials of Glycobiology*, 2nd edition (2009).

На фиг. 8А-8І можно видеть, что 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 определены количественно, то общее число фосфорилированных гликанов может быть представлено в недостаточной мере, и процентная доля rhGAA, 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 определены количественно, то общее число нефосфорилированных гликанов может быть представлено в недостаточной степени, и процентная доля rhGAA, несущей фосфорилированные гликаны в данном сайте, может быть представлена чрезмерно большим количеством. На фиг. 11А показана занятость сайтов N-гликозилирования в ATB200. Как можно видеть на фиг. 11А, первый, второй, третий, четвертый, пятый и шестой сайты N-гликозилирования главным образом были заняты, при этом посредством обоих анализов было выявлено, что в каждом потенциальном сайте от более 90% до приблизительно 100% молекул фермента ATB200 имели гликан. Однако седьмой потенциальный сайт N-гликозилирования являлся гликозилированным приблизительно в половине случаев.

На фиг. 11В показан профиль N-гликозилирования для первого сайта - N84. На фиг. 11В можно видеть, что 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.

На фиг. 11С показан профиль N-гликозилирования для второго сайта - N177. Как можно видеть на фиг. 11С, 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.

На фиг. 11D показан профиль N-гликозилирования для третьего сайта - N334. На фиг. 11D можно видеть, что основными формами гликанов были нефосфорилированные высокоманнозные гликаны, двух-, трех- и 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 фиг. 11Е показан профиль N-гликозилирования для четвертого сайта - N414. На фиг. 11Е можно видеть, что основными формами гликанов были бис-М6Р и моно-М6Р-гликаны. Как в первом, так и во втором анализах выявили, что 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 фиг. 11F показан профиль N-гликозилирования для пятого сайта - N596. На фиг. 11F можно видеть, что основными формами гликанов были 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 фиг. 11G показан профиль N-гликозилирования для шестого сайта - N826. Как можно видеть на фиг. 11G, 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.

Анализ гликозилирования в седьмом сайте, N869, показал примерно 40% гликозилирование, при этом наиболее распространенными гликанами являлись A4S3S3GF (12%), A5S3G2F (10%), A4S2G2F (8%) и A6S3G3F (8%).

На фиг. 11H показана сводная информация о фосфорилировании по каждому из семи потенциальных сайтов N-гликозилирования. На фиг. 11H можно видеть, что как в первом, так и во втором анализах выявляли высокие уровни фосфорилирования по первому, второму и четвертому сайтам. В обоих анализах выявили, что более 80% АТВ200 были моно- или дифосфорилированными по первому сайту, более 40% АТВ200 были монофосфорилированными по второму сайту и более 80% АТВ200 были моно- или дифосфорилированными по четвертому сайту.

Другой анализ гликанов АТВ200 осуществляли в соответствии со способом жидкостной хроматографии гидрофильных взаимодействий/масс-спектрометрии с флуоресцентной детекцией (HILIC FLD MS).

Результаты анализа по методу HILIC FLD MS представлены ниже в табл. 5. В табл. 5 первая цифра в трехзначном числе указывает количество ветвей в гликане, вторая цифра указывает количество звеньев коровой фукозы, а третья цифра указывает количество концевых звеньев сиаловой кислоты. При использовании данной номенклатуры "303" представляет трехантенный гликан (первая 3) с 0 звеньями коровой фукозы (2-я 0) и 3 концевыми звеньями сиаловой кислоты (последняя 3), "212" представляет двухантенный гликан с 1 звеном коровой фукозы и 2 концевыми звеньями сиаловой кислоты, "404" представляет четырехантенный гликан с 0 звеньями коровой фукозы и 4 концевыми звеньями сиаловой кислоты и т. д.

Таблица 5

Номер пика в FLD	Номер пика в MS	RT (мин.)	Структура гликана	% площади пика
1	1		BisP_Man 8	2,83%
2	2	13,41	BisP_Man 7	17,58%
	3	14,30	BisP_Man 6	1,02%
3	4	20,89	MonoP_Man 6	2,34%
4	5	21,65	MonoP_Man 5	1,16%
5	6	23,51	MonoP_Man 8	1,28%
6	7	24,33	MonoP_Man 7	4,35%
7	8	25,61	MonoP_Man 7_(+)GlcNAc	0,50%
8	9	28,76	MonoP_hMan6_101	0,48%
9	10	30,54	MonoP_Man 6_(+)GlcNAc	0,68%
10	11	33,50	Man 6	3,97%
	12	33,65	303	0,74%
11	13	34,97	Man 7	0,20%
12	14	35,64	403	0,39%
13	15	36,61	302	0,36%
14	16	38,07	302	0,61%
15	17	38,53	Man 5	1,85%
16	18	39,57	302	0,48%
	19	39,78	hMan 5_101	0,42%
	20	40,05	hMan 5_100_(-)Gal	0,30%

17	21	40,77	301_(-)Gal	0,52%
	22	40,58	301	0,50%
18	23	41,47	300_(-)Gal	0,80%
19	24	42,17	301_(-)Gal	0,11%
	25	42,13	301	0,58%
20	26	42,89	301_(-)Gal	0,07%
	27	42,79	301	0,80%
21	28	43,41	300	0,85%
	29	43,28	101	0,39%
22	30	43,94	202	0,63%
23	31	44,45	401	0,39%
24	32	45,04	MonoP_hMan6_111	0,36%
25	33	45,69	MonoP_hMan6_111	1,45%
	34	45,90	100	0,23%
	35	45,90	400	0,19%
26	36	46,87	201	0,49%
	37	47,15	202	0,34%
27	38	48,19	414	0,37%
28	39	48,94	202	1,97%

29	40	50,79	MonoP_Man 6_110_(-)Gal	1,31%
	41	51,37	414	0,62%
30	42	52,22	313	0,74%
	43	52,42	201_(-)Gal	0,46%
	44	52,42	201	1,18%
	45	53,11	hMan6_111	0,20%
31	46	53,83	200_(-)Gal	0,80%
	47	54,23	201	1,27%
	48	54,75	413	0,30%
32	49	55,47	200	1,30%
33	50	57,45,58,34	414_(+)GlcNAcGal	0,14%
	51	56,62,56,91,57,99	413	0,94%
	52	56,11,57,26,57,99	312	0,98%
34	53	60,19	413	0,33%
	54	59,39	413_(+)GlcNAcGal	0,42%
	55	59,80	312	0,52%
	56	59,49	412	0,18%
35	57	60,75	413	0,78%
	58	60,89	413_(+)GlcNAcGal	0,07%

36	59	61,79	413	0,20%
	60	61,75	312	0,16%
	61	62,12	412	0,64%
37	62	63,87	311	0,73%
	63	63,18,64,32	412	0,29%
	64	63,84	413_(+)GlcNAcGal	0,45%
	65	63,5, 64,36	311_(-)Gal	0,42%
38	66	65,73, 66,20	311	0,68%
	67	65,85, 66,49	412	0,72%
	68	65,91	310_(-)Gal	0,28%
39	69	67,37	212	1,42%
	70	67,57	310	0,34%
40	71	68,67	412_(+)GlcNAcGal	0,24%
	72	68,36	412	0,53%
41	73	68,36	412_(+)GlcNAcGal	0,17%
	74	69,03	412	0,35%
	75	69,30	413_(+)2(GlcNAcGal)	0,16%
42	76	70,66	412_(+)GlcNAcGal	0,73%
43	77	71,74	211	1,09%

	78	71,23	211_(-)Gal	0,19%
44	79	72,46	212	3,66%
45	80	74,82	221_(-)Gal(+)GalNAc	0,38%
	81	74,43,74,96	411_(+)GlcNAcGal	0,66%
46	82	75,92	410	0,42%
47	83	76,73,77,87	211_(-)Gal	1,24%
	84	77,23	211	3,64%
48	85	79,05	211	1,52%
	86	79,38	210_(-)2Gal	0,45%
49	87	80,11	210_(-)Gal	1,58%
50	88	81,15	210	2,41%
51	89	84,22-87,15	311	1,26%
52	90	95,35	Mono_Acetyl_NANA_212	0,99%
53	91	96,23	Mono_Acetyl_NANA_211	0,76%
54	92	97,37	Bis_Acetyl_NANA_212	0,42%

Исходя из этого анализа по методу HILIC FLD MS, ожидается, что тестируемая ATB200 будет иметь среднее содержание фукозы, составляющее 2-3 моль на моль ATB200, содержание GlcNAc, составляющее 20-25 моль на моль ATB200, содержание галактозы, составляющее 8-12 моль на моль ATB200, содержание маннозы, составляющее 22-27 моль на моль ATB200, содержание М6Р, составляющее 3-5 моль на моль ATB200, и содержание сиаловой кислоты, составляющее 4-7 моль на моль ATB200.

Пример 6. Получение характеристик аффинности ATB200 к CIMPR

В дополнение к наличию более высокой процентной доли rhGAA, которая может связываться с CIMPR, важно понимать качество такого взаимодействия. Связывание Lumizyme® и rhGAA ATB200 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. На фиг. 12A показано, что rhGAA ATB200 связывалась с CIMPR значительно лучше, чем Lumizyme®.

На фиг. 12B показано относительное содержание бис-М6Р-гликанов в Lumizyme®, традиционной rhGAA и ATB200 в соответствии с настоящим изобретением. В случае с Lumizyme® в среднем только 10% молекул имеют бисфосфорилированный гликан. В противоположность этому, в случае с ATB200 в среднем каждая молекула rhGAA имеет по меньшей мере один бисфосфорилированный гликан.

Пример 7. rhGAA ATB200 интернализировалась фибробластами более эффективно, чем Lumizyme

Сравнивали относительное поглощение клетками rhGAA ATB200 и Lumizyme® с использованием линии нормальных клеток-фибробластов и линии клеток-фибробластов при болезни Помпе. В сравнения включали 5-100 нМ rhGAA ATB200 в соответствии с настоящим изобретением и 10-500 нМ традиционной rhGAA Lumizyme®. После 16-часового инкубирования находящуюся снаружи rhGAA инактивировали с помощью основания TRIS, и клетки промывали 3 раза с помощью PBS перед их сбором.

Интернализированную GAA измеряли посредством гидролиза 4MU- α -глюкозида, и данные наносили на график относительно уровня общего клеточного белка, и результаты показаны на фиг. 13A-B.

Также было показано, что rhGAA ATB200 эффективно интернализировалась клетками (фиг. 13A и 13B, на которых соответственно показано, что rhGAA ATB200 интернализируется как нормальными клетками-фибробластами, так и клетками-фибробластами при болезни Помпе, и что она интернализируется в большей степени, чем традиционная rhGAA Lumizyme®). rhGAA ATB200 насыщает клеточные рецепторы при приблизительно 20 нМ, тогда как в случае с Lumizyme® необходимо приблизительно 250 нМ. Константа эффективности поглощения ($K_{\text{поглощения}}$), экстраполированная из этих результатов, состав-

ляет 2-3 нМ для АТВ200 и 56 нМ для Lumizyme®, что показано на фиг. 13С. Эти результаты позволяют предположить, что ghGAA АТВ200 представляет собой хорошо нацеливаемое средство для лечения болезни Помпе.

Пример 8. Снижение уровня гликогена у мышей с нокаутом Gaa

На фиг. 14А-14С показаны эффекты введения алглюкозидазы-альфа (Lumizyme®) и АТВ200 в отношении выведения гликогена у мышей с нокаутом Gaa. Животным проводили два IV болюсных введения (один раз в две недели); ткани отбирали через две недели после введения последней дозы и анализировали в отношении активности кислой α -глюкозидазы и содержания гликогена.

Как видно на фиг. 14А-14С, было выявлено, 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 дозы на уровне 5 и 10 мг/кг. Однако, как видно на фиг. 14А-14С, 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®.

На фиг. 15 показаны эффекты введения алглюкозидазы-альфа (Lumizyme®) и АТВ200 в отношении выведения гликогена у мышей с нокаутом Gaa, а также эффект совместного введения АТВ200 и миглустата в отношении выведения гликогена. Мышей с KO GAA возрастом двенадцать недель обрабатывали 4 инъекциями 20 мг/кг Lumizyme® или АТВ200 IV один раз в две недели; миглустат совместно вводили в дозе, составляющей 10 мг/кг, перорально за 30 мин до введения ghGAA, как указано. Ткани собирали через 14 дней после введения последней дозы фермента для измерения уровня гликогена. На фиг. 15 показано относительное снижение уровня гликогена в скелетной мускулатуре в четырёхглавой и трёхглавой мышцах, при этом АТВ200 обеспечивает более значительное снижение уровня гликогена, чем Lumizyme®, а комбинация АТВ200/миглустат обеспечивает еще более значительное снижение уровня гликогена.

Пример 9. Физиологические и морфологические характеристики мышц у мышей с нокаутом Gaa

Мышам с нокаутом Gaa проводили два IV болюсных введения рекомбинантной 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, четырёхглавой мышцы и диафрагмы собирали через две недели после введения последней дозы рекомбинантной кислой α -глюкозидазы человека. Проводили анализ ткани камбаловидной мышцы и диафрагмы в отношении уровней гликогена с помощью окрашивания реактивом Шиффа/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 четырёхглавой мышцы, залитые эпоксидной смолой (Epon), окрашивали метиленовым синим и исследовали с помощью электронной микроскопии (1000x) для определения степени присутствия вакуолей. Образцы четырёхглавой 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 GLUT 1.

В аналогичном исследовании мышам с нокаутом Gaa проводили четыре IV болюсных введения рекомбинантной 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. Сердечную мышечную ткань собирали через две недели после введения последней дозы рекомбинантной кислой α -глюкозидазы человека и анализировали в отношении уровней гликогена с помощью окрашивания реактивом Шиффа/йодной кислотой (PAS) и в отношении пролиферации лизосом путем измерения уровней LAMP1.

Как видно на фиг. 16, при введении АТВ200 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 АТВ200 демонстрировалось значительно большее снижение пролиферации лизосом, приближающееся к уровням, наблюдаемым у мышей дикого типа (WT). Кроме того, как видно на фиг. 17, 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 алглюкозидазой-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 фиг. 18, при совместном введении миглустата с АТВ200 значительно снижалось число вакуолей в мышечном волокне четырехглавой мышцы у мышей с нокаутом Гаа в сравнении с необработанными мышами и мышами, обработанными алглюкозидазой-альфа. Как видно на фиг. 19, уровни как LC3 II, так и p62 были увеличены у мышей с нокаутом Гаа 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 Гаа 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 10. Мышечная функция у мышей с нокаутом Гаа

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 Гаа относительно исходного уровня, что измеряли с помощью как тестов силы захвата, так и тестов "вис на проволоке" (фиг. 21А-21В). 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 (фиг. 21А-21В). Как и в случае более краткосрочного исследования, комбинация АТВ200/миглустат характеризовалась существенно лучшим выведением гликогена после 3 месяцев (фиг. 22А-22С) и 6 месяцев (фиг. 22D-22G) обработки, чем алглюкозидаза-альфа. Комбинация АТВ200/миглустат также снижала аутофагию и внутриклеточное накопление LAMP1 и дисферлина после 3 месяцев обработки (фиг. 23) в сравнении с алглюкозидазой-альфа. На фиг. 21А * указывает на статистически значимый результат в сравнении с Lumizyme® в отдельности ($p < 0,05$, 2-сторонний t-критерий). На фиг. 22А-22G * указывает на статистически значимый результат в сравнении с Lumizyme® в отдельности ($p < 0,05$, множественное сравнение с применением метода Даннетта в рамках однофакторного анализа ANOVA).

В совокупности эти данные указывают на то, что комбинация АТВ200/миглустат эффективно нацеливалась на мышцы с устранением клеточной дисфункции и улучшением мышечной функции. Важно отметить, что видимые улучшения мышечной структуры, а также снижение аутофагии и внутриклеточного накопления LAMP1 и дисферлина могут быть хорошими суррогатными критериями улучшения физиологического состояния мышц, что коррелирует с улучшениями функциональной мышечной силы. Эти результаты позволяют предположить, что контроль аутофагии и уровней этих ключевых мышечных белков, которые могут оказаться полезными биомаркерами в биоптатах мышц в клинических исследованиях, может быть целесообразным практическим способом оценки эффективности терапевтических методов лечения болезни Помпе у мышей с КО Гаа.

На фиг. 23 показано, что введение АТВ200 с миглустатом или без него в течение 6 месяцев снижало внутриклеточное накопление дистрофина у мышей с КО Гаа. Для комбинации АТВ200 $\pm$ миглустат наблюдали более существенное снижение накопления дистрофина, чем в случае применения Lumizyme®.

Пример 11. Захват $\text{rh}\alpha$ -Gal A

Профиль связывания CIMPR для рекомбинантной α -галактозидазы А человека ($\text{rh}\alpha$ -Gal A) в отработанной среде для культивирования клеток измеряли перед захватом продукта с помощью АЕХ-хроматографии (фиг. 20А) и после захвата продукта с помощью АЕХ-хроматографии (фиг. 20В). Пунктирная линия на обоих графиках относится к градиенту элюирования с помощью М6Р. До захвата продукта в АЕХ 80% $\text{rh}\alpha$ -Gal A может связываться с CIMPR. После захвата продукта в АЕХ общее связывание $\text{rh}\alpha$ -Gal A увеличивается до 96%.

Пример 12. Фармакокинетические данные и данные по безопасности рекомбинантной кислой α -глюкозидазы АТВ200, вводимой совместно с миглустатом пациентам, получавшим ERX и пациентам, ранее не получавшим ERX с болезнью Помпе

Данное исследование было запланировано преимущественно для оценки безопасности, переносимости и фармакокинетических параметров (РК) АТВ200, вводимой совместно с миглустатом. С помощью РК/фармакодинамической (PD) трансляционной модели на мышах с нокаутом Гаа прогнозировали, что комбинация 20 мг/кг АТВ200 с высокой дозой (например, 260 мг) миглустата у людей обеспечит оптимальное снижение уровня гликогена.

В описании ниже "высокая доза" миглустата относится к дозе, составляющей приблизительно 260 мг, а "низкая доза" миглустата относится к дозе, составляющей приблизительно 130 мг.

Цель состояла в оценке предварительных РК-данных для общего белка GAA, АТВ200 и миглустата и маркеров безопасности от 10 пациентов в данном исследовании фазы 1/2.

Оно представляет собой открытое исследование фазы 1/2 с фиксированной последовательностью приема препаратов с нарастающими дозами, впервые проводимое у человека, предназначенное для оценки безопасности, переносимости, PK, PD и эффективности внутривенных инфузий АТВ200, вводимой в сочетании с пероральным введением миглустата, у взрослых с болезнью Помпе (фиг. 24). Оценивали средние результаты PK-исследования для общего белка GAA и миглустата у первых 8 пациентов когорты 1 до визита 9 и у первых 2 пациентов когорты 3.

^aАнализировали данные по безопасности от 2 индикаторных пациентов из когорты 1 при каждом уровне дозы перед введением дозы в когортах 2 и 3.

^bВ ходе стадий 2 и 3 миглустат вводили перорально перед началом внутривенной инфузий АТВ200. Все дозы АТВ200 вводили путем внутривенной инфузий в течение 4 часов.

^cПервые 2 пациента в когортах 2 и 3 служили в качестве индикаторных пациентов для своих соответствующих когорт.

Ключевые критерии включения:

Мужчины и женщины возрастом 18-65 лет, у которых диагностировали болезнь Помпе на основании документально подтвержденного дефицита ферментативной активности GAA или согласно результатам генотипирования GAA;

Получавшие ERT с использованием алглюкозидазы-альфа в течение 2-6 лет (или ≥ 2 лет для когорты 2) до начала испытания (когорты 1);

В настоящее время получающие алглюкозидазу-альфа с частотой один раз в две недели, которым были проведены 2 последние инфузии без нежелательных явлений, связанных с приемом лекарственного средства, которые приводят к временному прекращению введения доз (когорты 1 и 2);

Должны быть в состоянии пройти от 200 до 500 м в тесте с 6-минутной ходьбой (когорты 1 и 3);

Форсированная жизненная емкость легких в положении стоя должна составлять 30-80% от прогнозированного нормального значения (когорты 1 и 3);

Должны быть прикованы к инвалидной коляске и неспособны к ходьбе без посторонней помощи (когорты 2).

PK-анализ

Собирали образцы крови для анализа концентрации и активности общего белка GAA в плазме крови.

Стадия 1: перед началом инфузии АТВ200 и через 1, 2, 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 6, 8, 10, 12 и 24 ч после начала инфузии.

Стадии 2 и 3: через 1, 2, 3, 4, 4,5, 5, 6, 7, 9, 11, 13 и 25 ч после перорального введения миглустата.

Образцы крови для определения концентраций миглустата в плазме крови отбирали непосредственно перед пероральным введением миглустата (момент времени 0) и через 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 4, 5, 6, 9, 11 и 25 ч после перорального введения миглустата. Количество миглустата в плазме крови определяли посредством валидированного анализа по методу LC-MS/MS.

Показатели концентрации общего белка GAA в плазме крови для 5, 10 и 20 мг/кг АТВ200 определяли посредством валидированного количественного анализа по методу LC-MS/MS для rhGAA-специфического(специфических) "сигнального"("сигнатурных") пептида(пептидов).

Предварительный анализ был завершен у 8 пациентов в когорте 1, которые завершили стадию 1 и 2, и у 2 пациентов в когорте 3, которые начали стадию 3.

Пациенты, которых переводили с изначальной ERT, являются репрезентативными для популяции с болезнью Помпе, с 5,02 года в среднем на ERT (табл. 6).

Таблица 6. Характеристики на исходном уровне

Характеристики на исходном уровне (N=12 ^a)	Амбулаторные, получавшие ERT (n=10)	Не проходившие лечение (n=2)
Период получения ERT (Lumizyme®/Myozyme®), среднее число лет (STDV)	5,02 (1,2)	N/A
Возраст в годах, среднее значение (диапазон)	47,7 (8,19)	33,0 (12,73)
Пол, М/Ж, %	80/20	0/100
6MWT, метры, среднее значение (STDV)	398,4 (95,92)	432,1 (67,81)
FVC в положении стоя, среднее значение в %, предсказанное (STDV)	51,9 (13,84)	51,0 (26,87)
6MWT = тест с 6-минутной ходьбой; FVC = форсированная жизненная емкость легких; N/A — данные отсутствуют; STDV = среднеквадратическое отклонение.		

^an=10 из когорты 1 (амбулаторные, переведенные с ERT)

промежуточного анализа данных;

n=2 из когорты 3 (не проходившие лечение).

Общий белок GAA

При введении в отдельности воздействие АТВ200 возрастает незначительно сверхпропорционально дозозависимым образом (табл. 7 и фиг. 25А-25D). Изменчивость, очевидно, возрастает с дозой миглустата (фиг. 25С). Совместное введение 20 мг/кг АТВ200 с высокой дозой миглустата (260 мг) повышает воздействие общего белка GAA (AUC) на примерно 25% по сравнению с АТВ200 в отдельности при 20 мг/кг. Период полураспределения (α -фаза) увеличивался на 45%, что позволяет предположить, что высокая доза миглустата стабилизирует АТВ200 в плазме крови. Увеличение периода полураспределения сопровождается увеличением AUC от времени достижения максимальной концентрации в плазме крови до примерно 12 ч после введения дозы. Увеличение AUC и периода полувыведения можно наблюдать на логарифмической шкале на протяжении конечной фазы элиминации (фиг. 25В). АТВ200 демонстрировала относительно большой объем распределения. Распределение общего белка GAA в плазме крови выглядит аналогичным для пациентов, ранее не проходивших лечение с помощью ERT (когорты 3), и пациентов, получавших ERT (когорты 1) (фиг. 25А и 25D).

Таблица 7. Общий белок GAA

Когорта	Лечение	$C_{\max}$ (нг/мл) ^a	$t_{\max}$ (ч) ^b	AUC_{0-1} (нг*ч/мл) ^c	$AUC_{0-\infty}$ (нг*ч/мл) ^a	$t_{1/2}$ (ч) ^c	$\alpha_{1/2}$ (ч) ^c	CL_T (л/ч) ^c	V_{ss} (л) ^c
1	5 мг/кг в отдельности ^d	61 (18,1)	3,8 (3,0-4,0)	215 (16,7)	218 (16,4)	1,9 (16,7)	1,1 (10,2)	2,1 (16,9)	4,62 (12,7)
1	10 мг/кг в отдельности ^d	144 (16,6)	4,0 (3,5-4,0)	578 (20,3)	584 (20,4)	1,6 (46,1)	1,3 (10,5)	1,59 (25,4)	3,87 (16,5)
1	20 мг/кг в отдельности ^d	345 (10,1)	4,0 (3,5-4,0)	1508 (14,5)	1512 (14,4)	2,1 (29,7)	1,5 (6,5)	1,22 (21,7)	3,52 (12,4)
1	20 мг/кг АТВ200 + низкая доза миглустата SD ^d	334 (16,2)	4,0 (3,5-4,0)	1694 (17,7)	1701 (17,5)	2,4 (16,6)	1,8 (10,2)	1,09 (22,9)	3,76 (13,3)
1	20 мг/кг АТВ200 + низкая доза миглустата MD ^d	353 (13,7)	4,0 (3,5-5,0)	1804 (15,7)	1808 (15,8)	2,5 (8,1)	1,9 (21,8)	1,02 (21,4)	3,73 (12,3)
1	20 мг/кг АТВ200 + высокая доза миглустата SD ^e	349 (13,9)	4,0 (3,5-4,0)	1878 (17,5)	1886 (17,5)	2,7 (13,1)	2,3 (18,9)	0,98 (26,5)	3,74 (12,3)
1	20 мг/кг АТВ200 + высокая доза миглустата MD ^d	356 (20,2)	4,0 (3,5-4,0)	1886 (21,3)	1901 (21,7)	2,5 (20,5)	2,1 (16,1)	0,98 (27,3)	3,6 (18,7)
3	20 мг/кг АТВ200 + высокая доза миглустата MD ^f	291 (21,6)	4,3 (4,0-4,5)	1597 (34,8)	1600 (34,9)	2,4 (5,4)	2 (14,5)	0,69 (28,9)	2,61 (17,3)
3	20 мг/кг АТВ200 + высокая доза миглустата MD ^f	330 (27,5)	4,0 (4,0-4,0)	1672 (32,7)	1676 (32,6)	2,6 (8,7)	1,9 (9,0)	0,66 (26,6)	2,33 (23,2)

AUC = площадь под кривой; CL_T = общий клиренс из организма; $C_{\max}$ = максимальная концентрация лекарственного средства; CV = коэффициент изменчивости; MD = многократные дозы; SD = однократная доза; $t_{1/2}$ = период полувыведения; $t_{\max}$ = время достижения максимальной концентрации лекарственного средства; V_{ss} = кажущийся объем распределения в стационарном состоянии
^aСреднее геометрическое (CV%). ^bМедиана (минимальное-максимальное). ^cСреднее арифметическое (CV%). ^dn=8. ^en=7. ^fn=2.

РК-данные для миглустата

Миглустат демонстрировал дозопропорциональную зависимость кинетических параметров (табл. 8 и фиг. 26). Показатели для миглустата в плазме крови, по-видимому, являются аналогичными для однократных и многократных доз.

Таблица 8. Сводная информация о РК-данных для миглустата

Лечение	$C_{\max}$ (нг/мл) ^a	$t_{\max}$ (ч) ^b	AUC_{0-1} (нг*ч/мл) ^a	$AUC_{0-\infty}$ (нг*ч/мл) ^a	$t_{1/2}$ (ч) ^c	CL/F (л/ч) ^c	V_z/F (л) ^c
Низкая доза, SD	1486 (29,9)	3,5 (1,5-3,5)	11807 (25,6)	12565 (26,8)	5,6 (11,7)	10,6 (23)	85,8 (23,4)
Низкая доза, MD	1518 (27,6)	3,0 (1,5-3,5)	12254 (26,4)	13094 (28,3)	5,9 (32,1)	10,2 (23,9)	86,7 (43,9)
Высокая доза, SD	3059 (36,1)	3,5 (1,5-5)	23999 (35)	25859 (34,4)	5,7 (29,9)	10,6 (33)	86,3 (45,7)
Высокая доза, MD	3569 (25,5)	3,0 (1,0-4,0)	24970 (24,1)	25972 (23)	5,3 (15,6)	10,3 (26,4)	81 (41,8)

V_z = кажущийся объем распределения в конечном состоянии. ^aСреднее геометрическое (CV%). ^bМедиана (минимальное-максимальное). ^cСреднее арифметическое (CV%).

Фармакодинамические параметры

К 11 визиту у пациентов, получавших ERT, из когорты 1 (фиг. 27А и 27В):
 уровень аланинаминотрансферазы (ALT) снижался у 5 из 8 пациентов; нормализовался у 4/4 пациентов с повышенными исходными уровнями;
 уровень аспартатаминотрансферазы (AST) снижался у 6 из 8 пациентов; нормализовался у 3/4 пациентов с повышенными исходными уровнями;
 уровень креатинфосфокиназы (СРК) снижался у 6 из 8 пациентов; нормализовался у 2/6 пациентов

с повышенными исходными уровнями;

уровни тетрасахарида глюкозы (HEX4) в моче снижались у 8 из 8 пациентов.

К неделе 4 уровни всех 4 биомаркеров снижались у 2 пациентов в когорте, не проходившей лечение (когорты 3) (фиг. 27C и 27D).

На фиг. 27A-27D данные представлены как среднее значение $\pm$ стандартное отклонение.

Безопасность

После проведения в общей сложности 155+ инфузий всем пациентам о каких-либо серьезных нежелательных явлениях (АЕ) или реакциях, связанных с инфузией, не сообщалось.

АЕ, возникшие после начала лечения, которые регистрировали у 11/13 (84%) пациентов, являлись в целом легкими и проходящими.

АЕ, связанные с лечением, которые регистрировали у 7/13 (53%) пациентов: тошнота (n=1), утомляемость (n=1), головная боль (n=1), тремор (n=2), акне (n=1), тахикардия (n=1) и гипотензия (n=1).

Выводы

АТВ200 в отдельности и в комбинации с миглустатом являлась безопасной и хорошо переносимой, при этом до настоящего времени реакции, связанные с инфузией, отсутствовали.

АТВ200 в отдельности проявляла сверхпропорциональное дозозависимое возрастание воздействия, которое дополнительно усиливалось миглустатом, что позволяет сделать предположение о стабилизирующем эффекте шаперона в отношении АТВ200.

После перевода со стандартного лечения на лечение комбинацией АТВ200/миглустат пациенты в целом проявляли улучшение в отношении уровней биомаркеров повреждения мышц, при этом многие пациенты демонстрировали нормализацию к неделе 18.

2 пациента, которые изначально не проходили лечение, получавшие лечение комбинацией АТВ200/миглустат, демонстрировали устойчивое снижение уровней всех биомаркеров повреждения мышц.

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 включенные. Прилагаемая формула изобретения не должна ограничиваться конкретными вариантами осуществления, изложенными в примерах, однако должна обеспечивать наиболее широкую интерпретацию, согласованную с описанием в целом.

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. Способ получения очищенной рекомбинантной кислой альфа-глюкозидазы человека (rhGAA), где очищенная rhGAA содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 98% идентична SEQ ID NO: 2, при этом способ включает

культивирование в биореакторе клеток-хозяев, которые секретируют rhGAA;

удаление среды из биореактора;

фильтрование среды с получением фильтрата;

загрузку фильтрата в колонку для анионообменной хроматографии (АЕХ) для захвата rhGAA;

элюирование первого белкового продукта из колонки для АЕХ;

загрузку rhGAA, элюированной из колонки для АЕХ, в колонку для аффинной хроматографии на иммобилизованных ионах металлов (ИМАС) и элюирование rhGAA из колонки для ИМАС.

2. Способ по п.1, где очищенная rhGAA содержит первый потенциальный сайт N-гликозилирования, второй потенциальный сайт N-гликозилирования, третий потенциальный сайт N-гликозилирования, четвертый потенциальный сайт N-гликозилирования, пятый потенциальный сайт N-гликозилирования, шестой потенциальный сайт N-гликозилирования и седьмой потенциальный сайт N-гликозилирования.

3. Способ по п.1 или 2, дополнительно включающий

загрузку rhGAA, элюированной из колонки для ИМАС, в третью хроматографическую колонку и

элюирование rhGAA из третьей хроматографической колонки.

4. Способ по п.3, где третья хроматографическая колонка выбрана из колонки для катионообменной хроматографии (СЕХ) и колонки для эксклюзионной хроматографии (SEC).

5. Способ по любому из пп.1-4, где фильтрование среды выбрано из фильтрации в переменном тангенциальном потоке (АТФ) и фильтрации в тангенциальном потоке (ТФФ).

6. Способ по любому из пп.1-5, дополнительно включающий инактивацию вирусов в одном или более из rhGAA, элюированной из колонки для АЕХ, rhGAA, элюированной из колонки для ИМАС, и rhGAA, элюированной из третьей хроматографической колонки.

7. Способ по п.3, дополнительно включающий фильтрование rhGAA, элюированной из колонки для IMAC, или rhGAA, элюированной из третьей хроматографической колонки, с получением отфильтрованного продукта.

8. Способ по п.7, дополнительно включающий лиофилизацию отфильтрованного продукта.

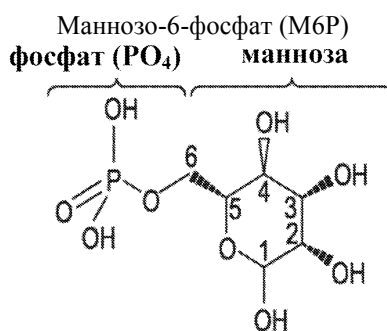
9. Способ по любому из пп.1-8, где клетки-хозяева включают в себя клетки яичника китайского хомячка (CHO).

10. Способ по любому из пп.1-9, где:

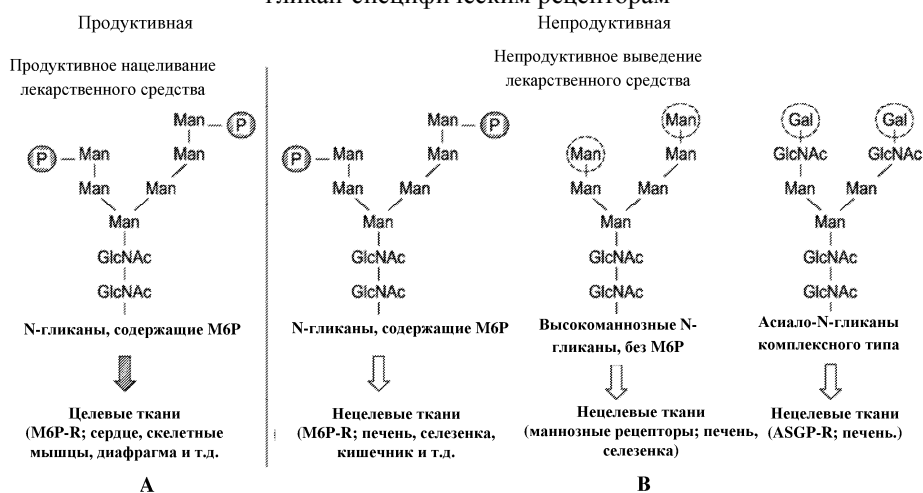
(i) по меньшей мере 90% очищенной rhGAA связывается с катионнезависимым рецептором маннозо-6-фосфата (CI-MPR) или

(ii) по меньшей мере 90% очищенной rhGAA содержит N-гликан, несущий моно-маннозо-6-фосфат (моно-M6P) или бис-маннозо-6-фосфат (бис-M6P).

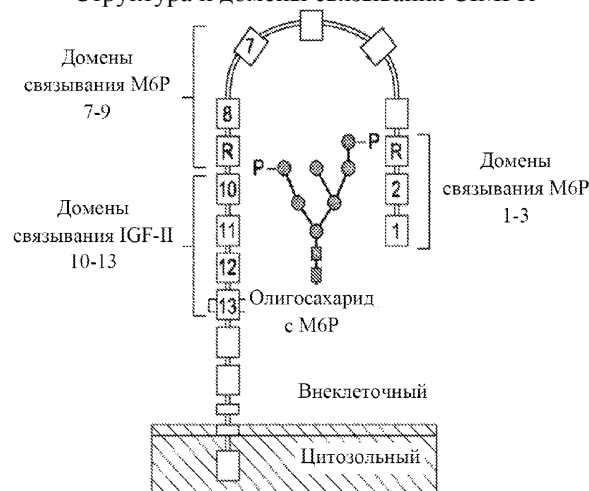
Структура высокоманнозных и фосфорилированных олигосахаридов и их аффинность связывания с рецепторами



Сравнение продуктивной и непродуктивной направленной доставки к гликан-специфическим рецепторам



Структура и домены связывания CIMPR



Фиг. 3А

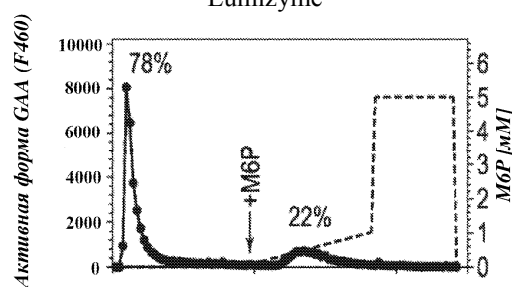
Лиганды; аффинность и местоположение *in vivo* трех гликопротеиновых рецепторов

Лиганд	Рецептор	Аффинность (нмоль)	Местоположение
Бис-фосфорилированный гликан	CIMPR	2	Все клетки
Моно-фосфорилированный гликан		7.000	
Высокоманнозный гликан	Рецептор маннозы	20 ^b	Макрофаги, дендритные клетки
Десилилированный комплексный гликан	Асиалоглико-протеиновый рецептор	7 ^c	Гепатоциты

Примечание: ^aTong *et al* 1989; ^bTaylor *et al* 1992; ^cSchwartz *et al* 1981

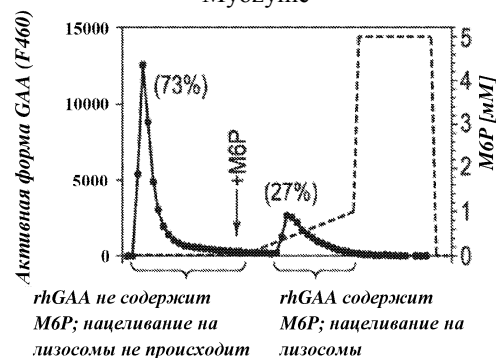
Фиг. 3В

Lumizyme



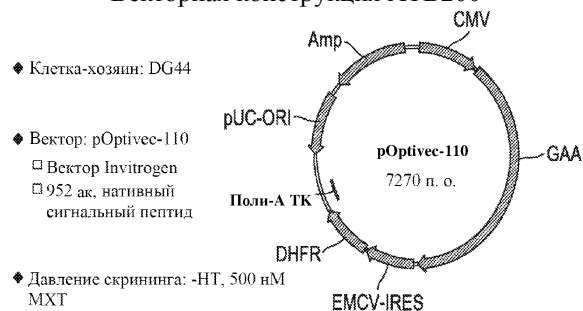
Фиг. 4А

Myozyme

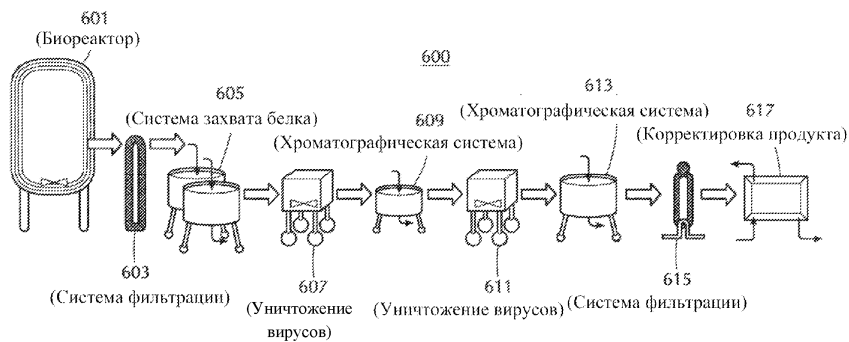


Фиг. 4В

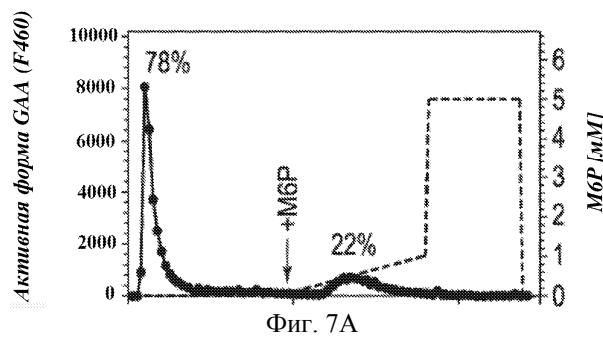
Векторная конструкция АТВ200



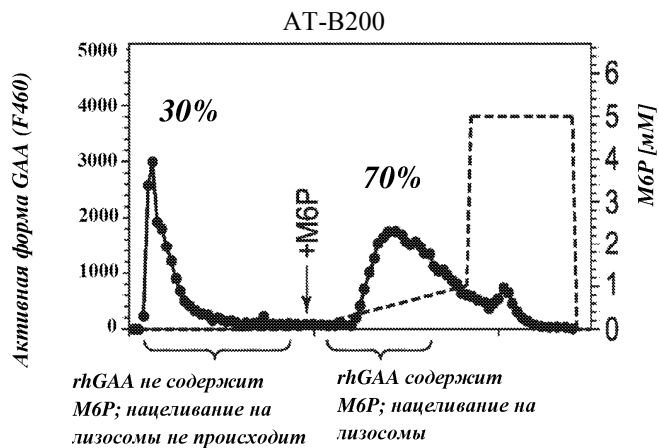
Фиг. 5



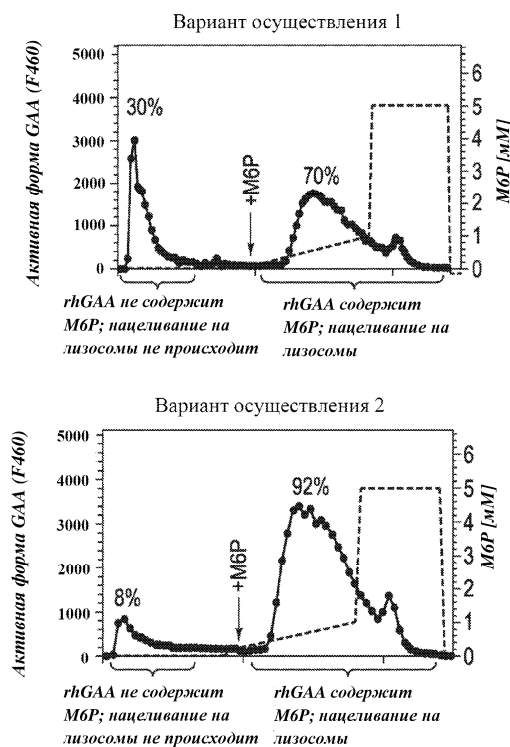
Фиг. 6



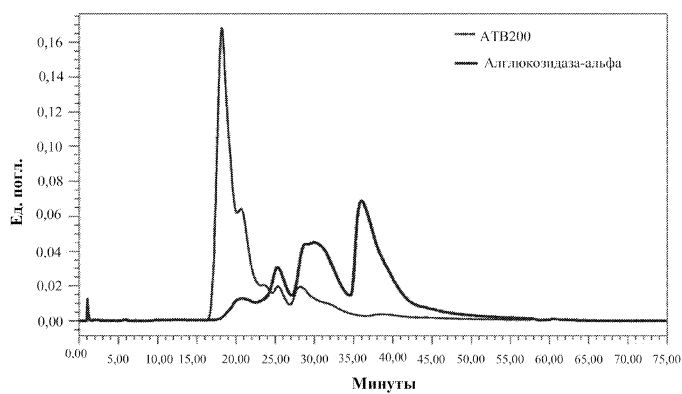
Фиг. 7А



Фиг. 7В



Фиг. 8



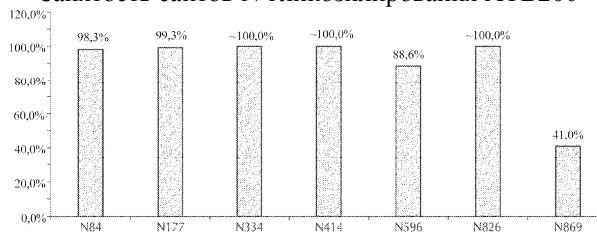
Фиг. 9

Распределение N-гланов в препаратах 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%

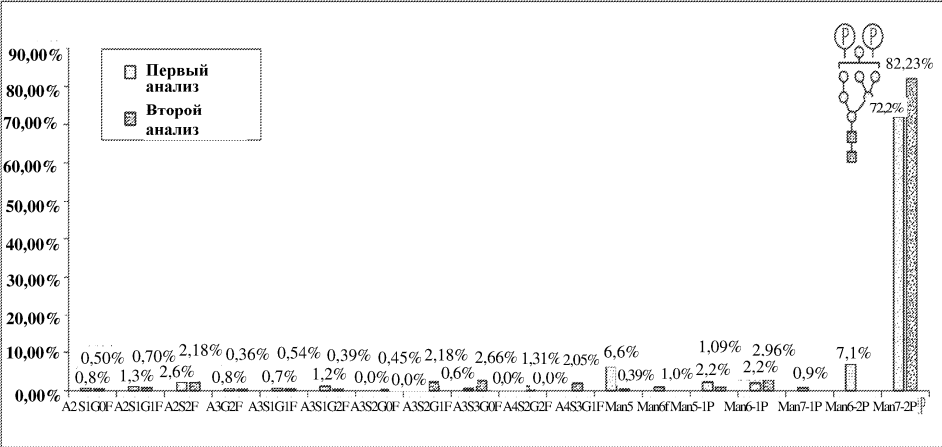
Фиг. 10

Занятость сайтов N-гликозилирования ATB200



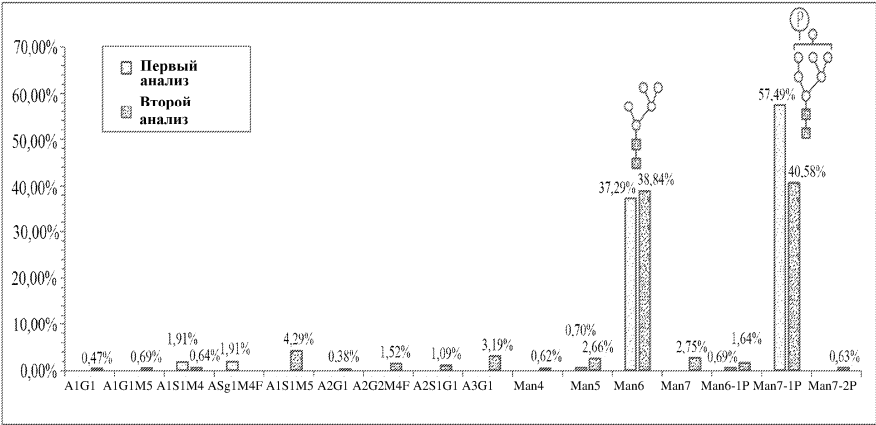
Фиг. 11А

Профиль N-гликозилирования N84



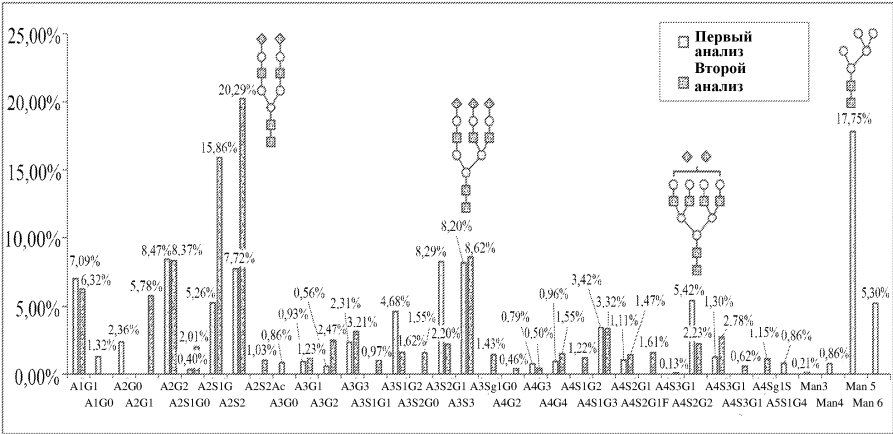
Фиг. 11В

Профиль N-гликозилирования N177

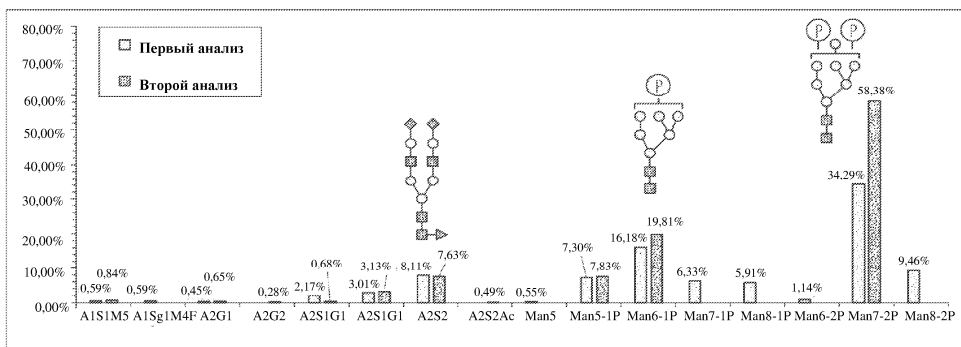


Фиг. 11С

Профиль N-гликозилирования N334

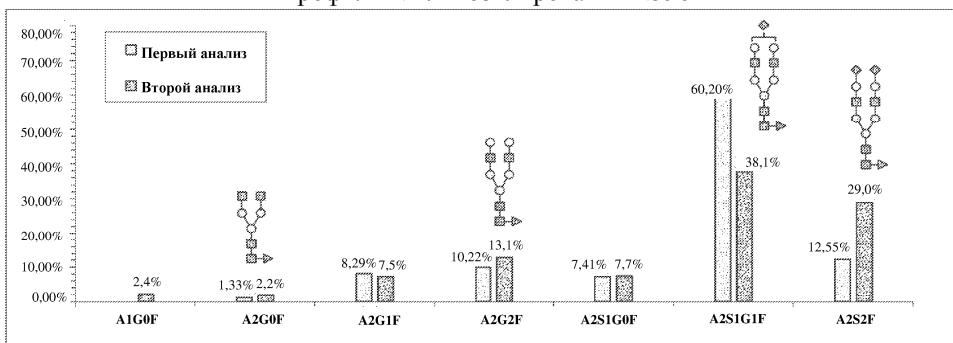


Фиг. 11D



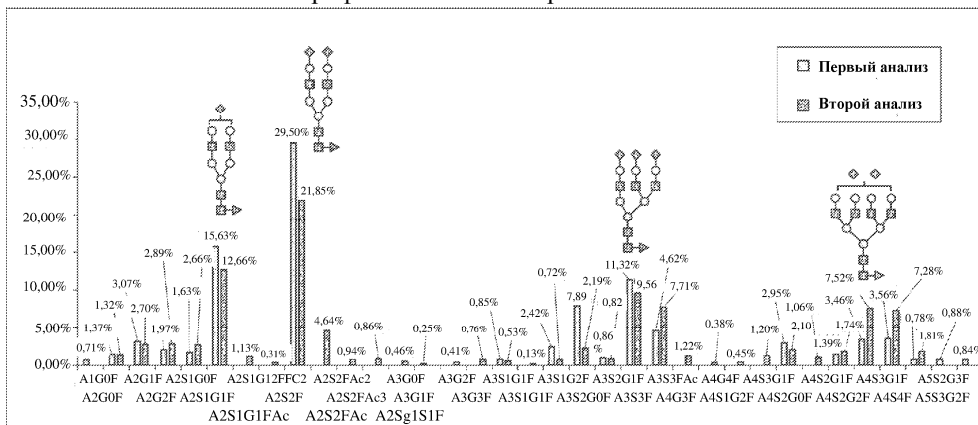
ФИГ. 11Е

Профиль N-гликозилирования N596



Фиг. 11F

Профиль N-гликозилирования N826

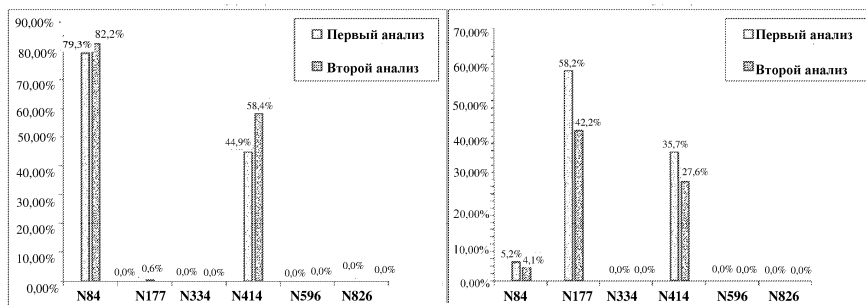


Фиг. 11G

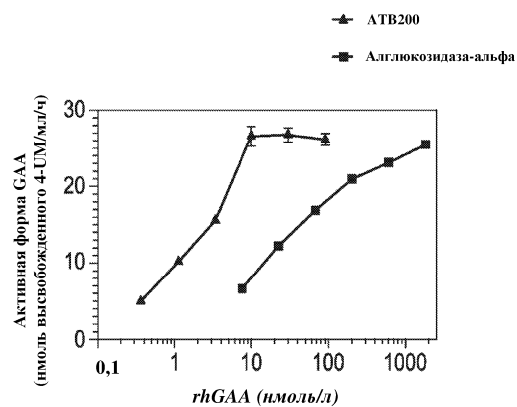
Относительный процент бис-М6Р и моно-М6Р в каждом сайте N-гликозилирования

Процент бис-М6Р форм в каждом сайте N-гликозилирования

Процент моно-М6Р форм в каждом сайте N-гликозилирования

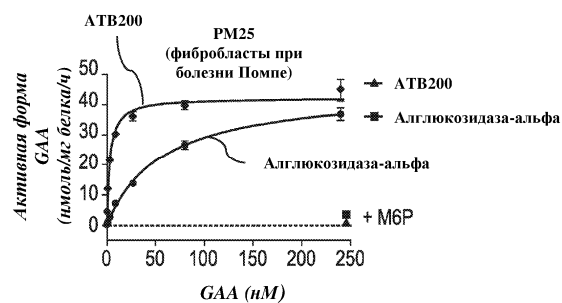
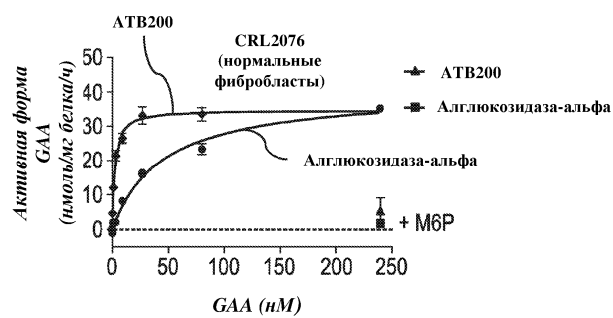


Фиг. 11Н



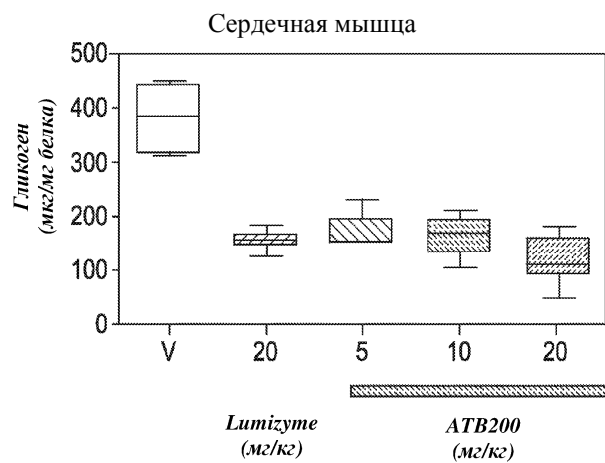
Гликан	Алглюкозидаза- альфа (моль бис- гликана/моль белка)	АТВ200 (моль бис-гликана/ моль белка)
Бис-М6Р	0,1	1,3

Фиг. 12В

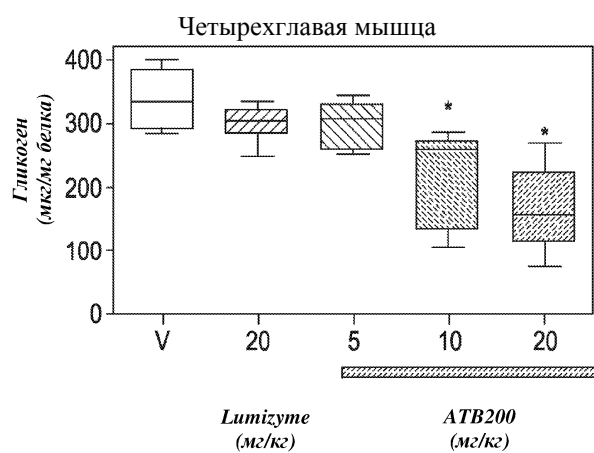


Линия клеток	K _{поглощения} (нМ)	
	АТ200	Lumizyme
Нормальные	2	56
При болезни Помпе	3	57

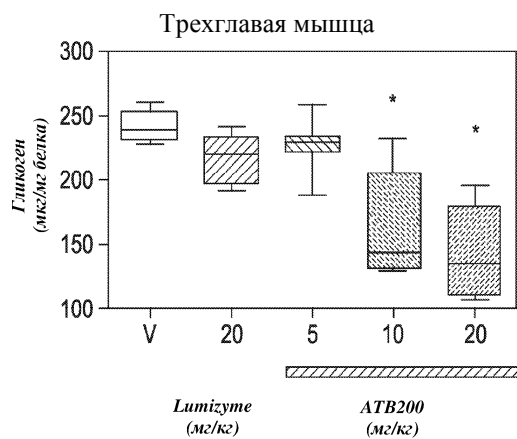
Фиг. 13С



Фиг. 14А



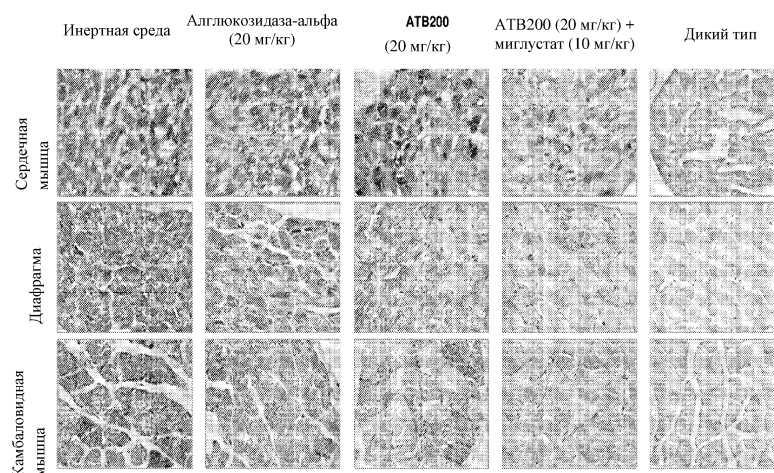
Фиг. 14В



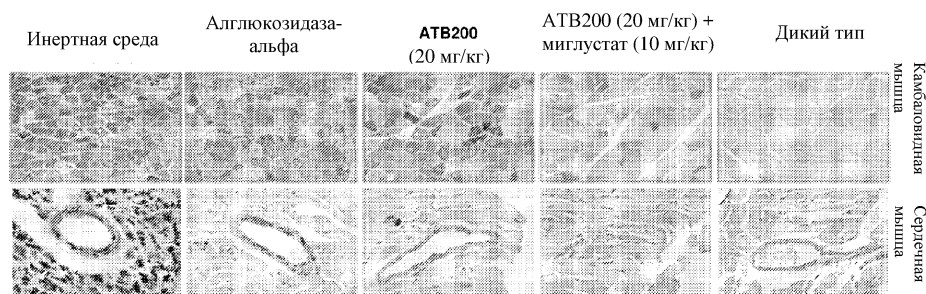
Фиг. 14С

Сравнение % снижения уровня гликогена у мышей с КО <i>Gaa</i> после введения Lumizyme или АТВ200 (с миглустатом или без него)		
Фермент ± шаперон	Четырехглавая мышца	Трехглавая мышца
Lumizyme в отдельности (20 мг/кг)	14	14
АТВ200 в отдельности (20 мг/кг)	74	62
АТВ200 + миглустат (20 мг/кг) + (10 мг/кг)	94	73

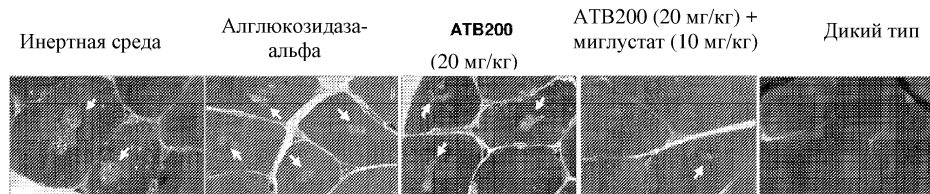
Фиг. 15



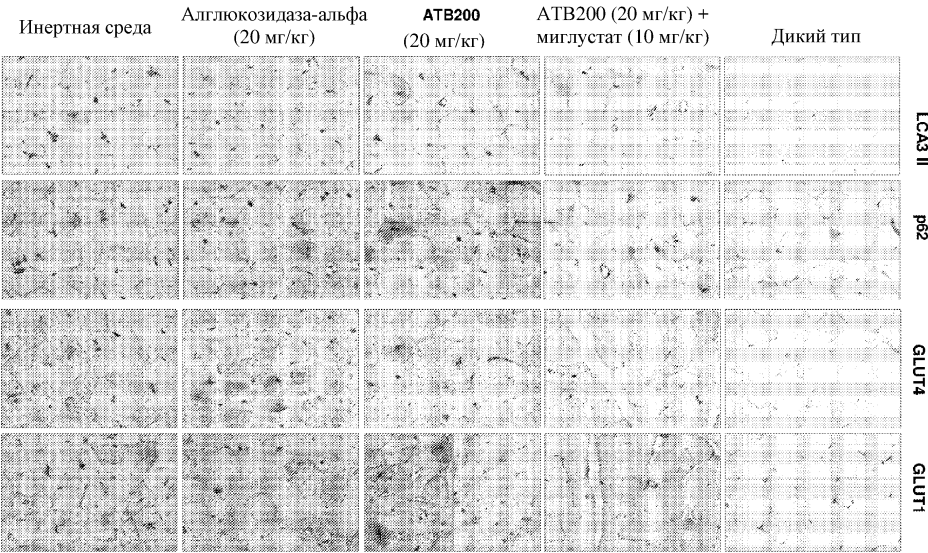
Фиг. 16



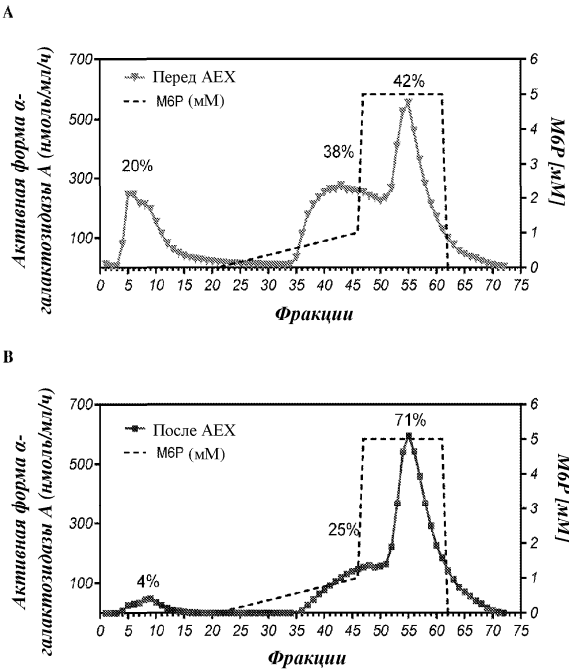
Фиг. 17



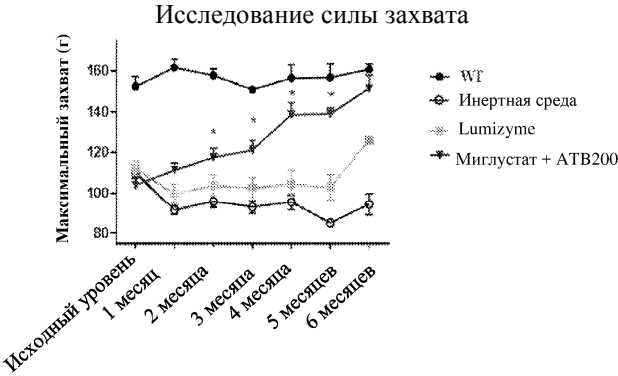
Фиг. 18



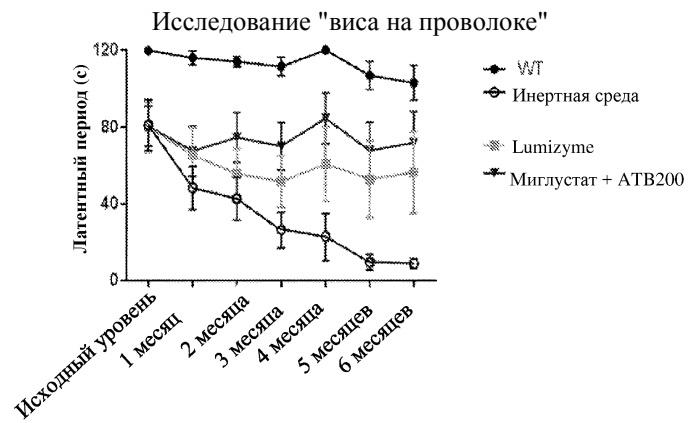
Фиг. 19



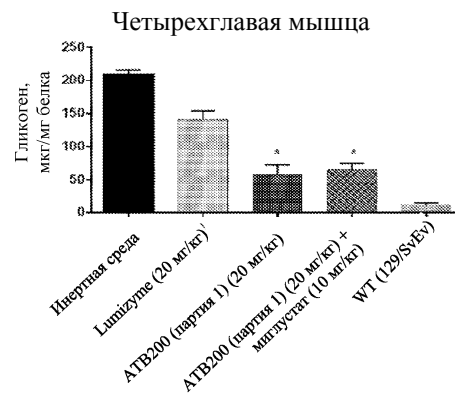
Фиг. 20



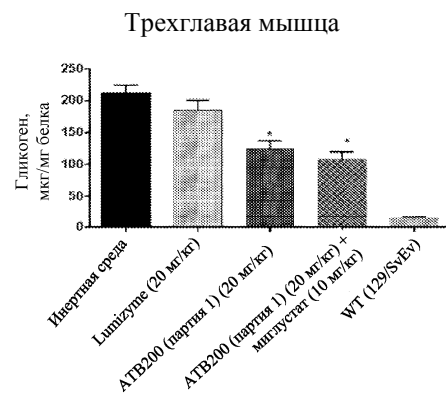
Фиг. 21А



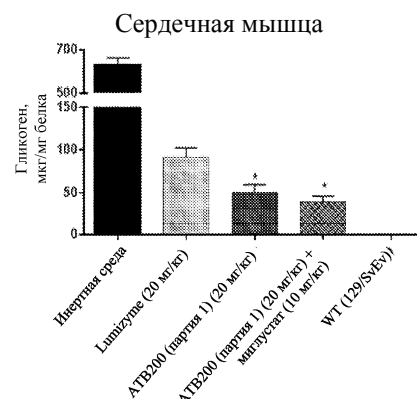
Фиг. 21В



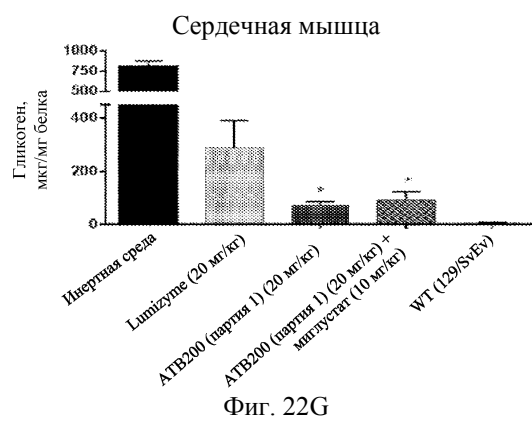
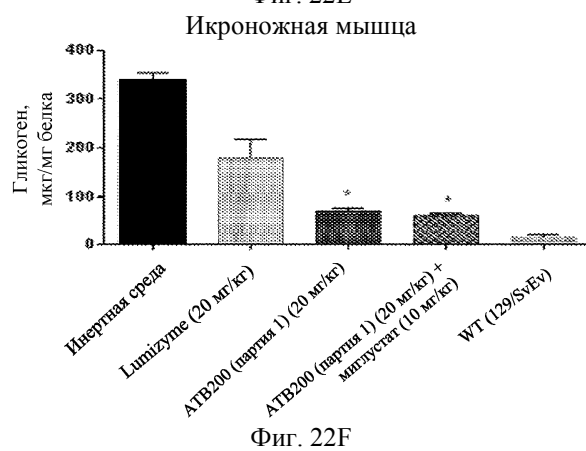
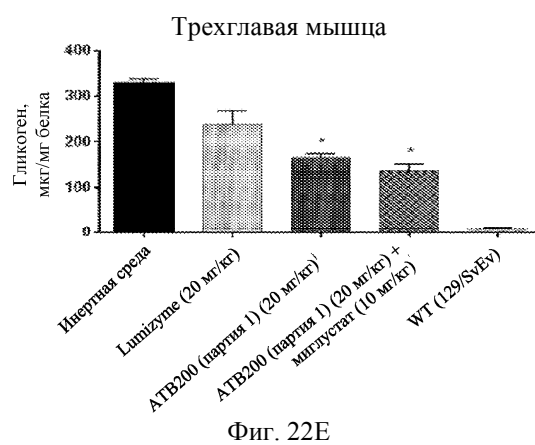
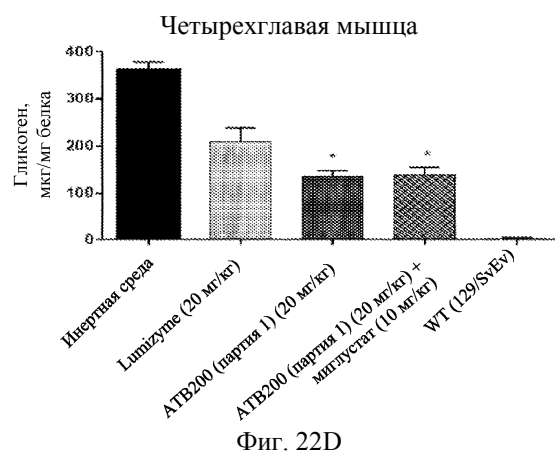
Фиг. 22А

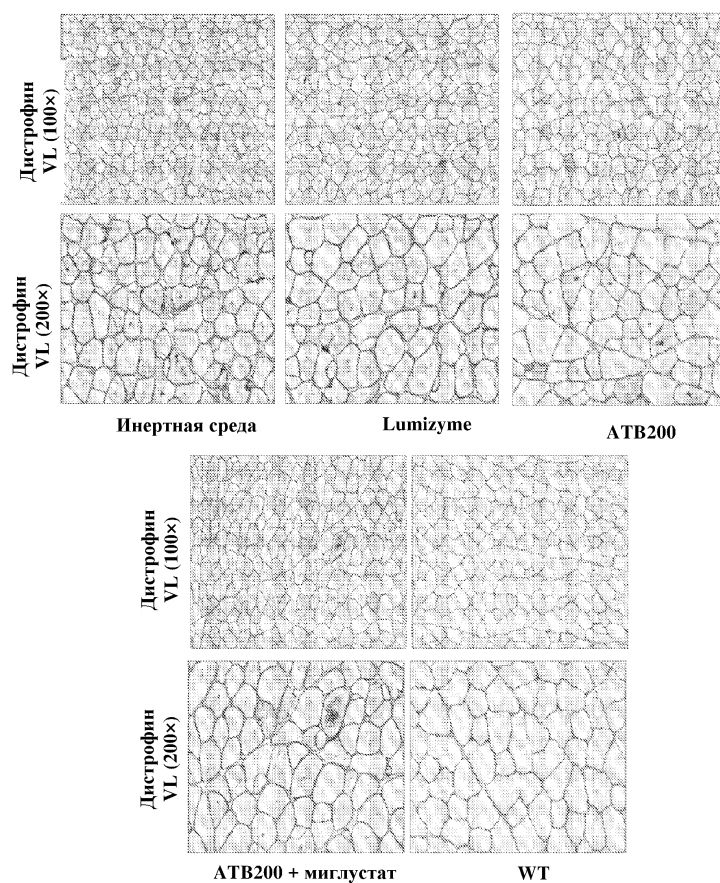


Фиг. 22В

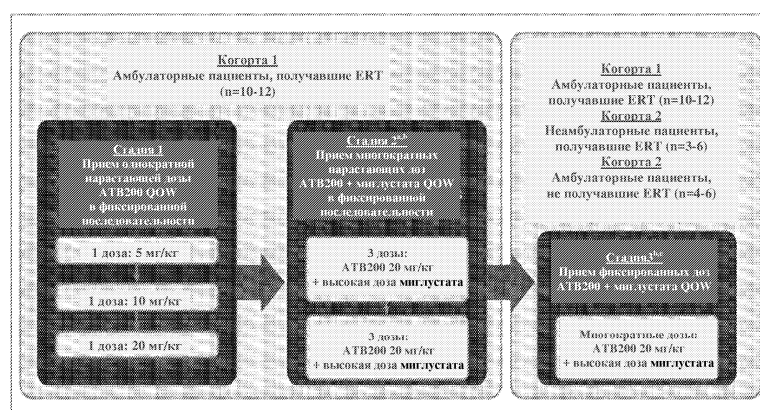


Фиг. 22С



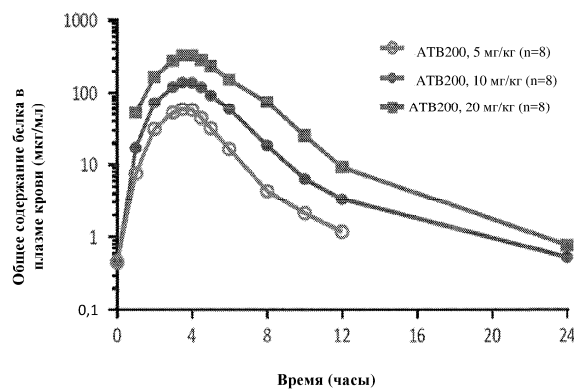


Фиг. 23

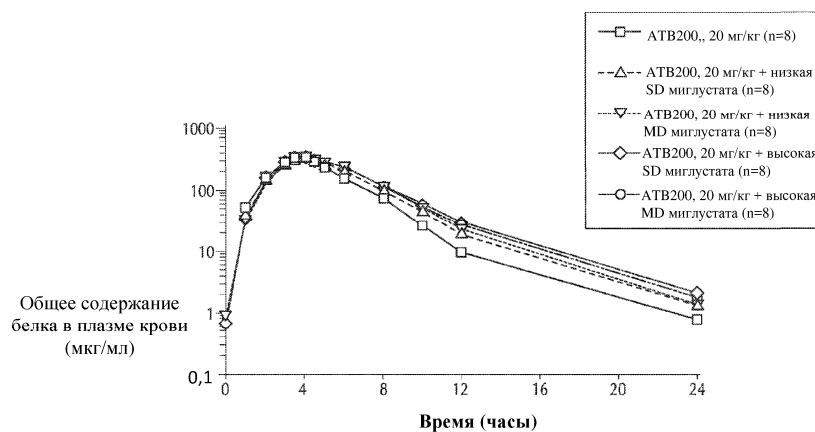


QOW = один раз в две недели

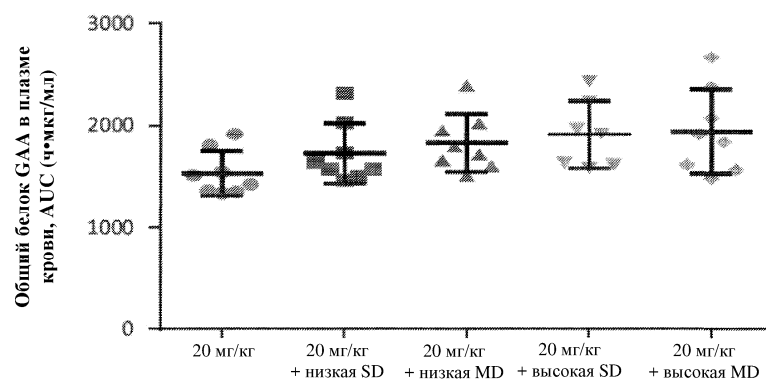
Фиг. 24



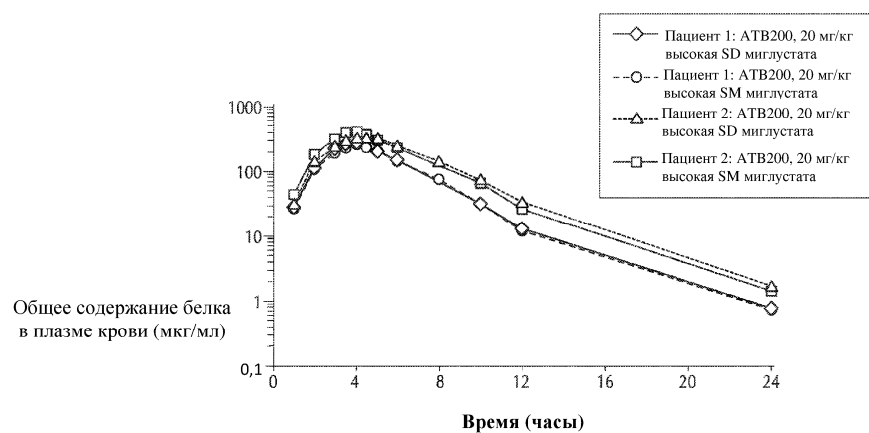
Фиг. 25А



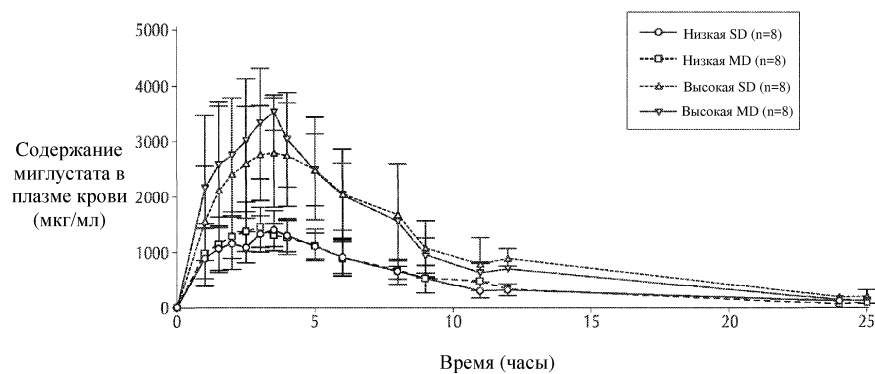
Фиг. 25В



Фиг. 25С

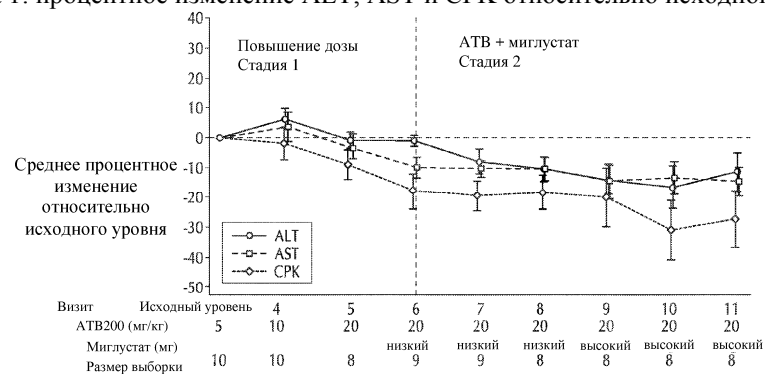


Фиг. 25D



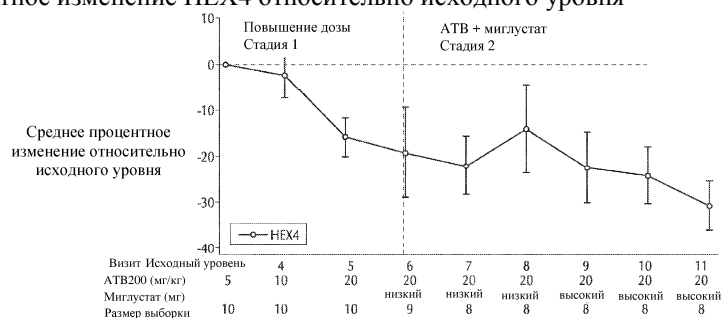
Фиг. 26

Когорта 1: процентное изменение ALT, AST и CPK относительно исходного уровня



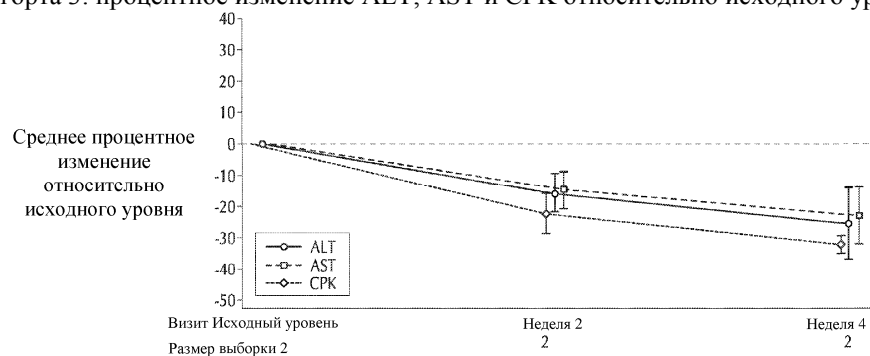
Фиг. 27А

Когорта 1: процентное изменение HEX4 относительно исходного уровня



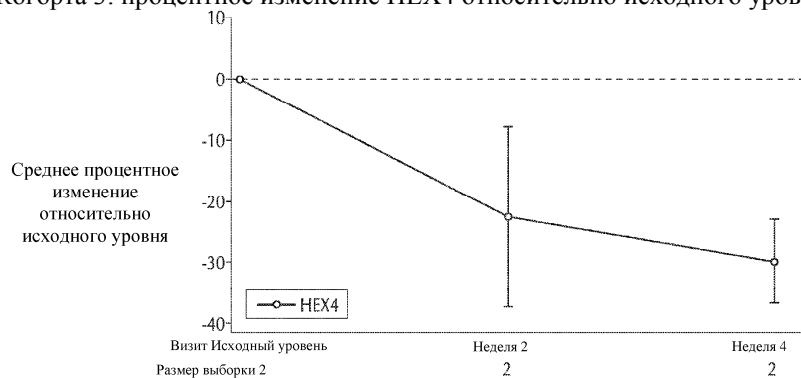
Фиг. 27В

Когорта 3: процентное изменение ALT, AST и CPK относительно исходного уровня



Фиг. 27С

Когорта 3: процентное изменение HEX4 относительно исходного уровня



Фиг. 27D



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2