

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **043083**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.04.25

(21) Номер заявки
201891507

(22) Дата подачи заявки
2016.12.29

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

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

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

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

(33) US

(43) 2018.12.28

(86) PCT/US2016/069243

(87) WO 2017/117407 2017.07.06

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

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

(74) Представитель:
Рыбина Н.А., Рыбин В.Н. (RU)

(56) R. Gottschall ET AL.: "Novel rhGAA with Optimal Glycosylation Is Significantly Better than Alglucosidase Alfa for Glycogen Clearance in Skeletal Muscles of Gaa KO Mice", 11th World Symp Lysosomal Dis Netw (February 9-13, Orlando), 2015, Abst 94, 12 February 2015 (2015-02-12), XP055348233, Retrieved from the Internet: URL: http://files.shareholder.com/downloads/AMTX/3343666038x0x808165/4D574EF7-3FF6-4EEF-A511-CA68AE0F173F/Gotschall_et_al_Novel_rhGAA_with_Optimal_Glycosylation.pdf [retrieved on 2017-02-21], the whole document
WO-A1-2016054231

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

B1**043083****043083****B1**

Область изобретения

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

Предпосылки изобретения

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

Болезнь Помпе оценивают как встречающуюся у приблизительно 1 из 40000 новорожденных и вызываемую мутацией в гене GAA, который кодирует фермент лизосомную α -глюкозидазу (ЕС:3.2.1.20), также общеизвестную как кислая α -глюкозидаза. Кислая α -глюкозидаза вовлечена в метаболизм гликогена, разветвленного полисахарида, который представляет собой основную форму запасаания глюкозы у животных, посредством катализа его гидролиза до глюкозы в лизосомах. Поскольку у индивидуумов с болезнью Помпе вырабатывается мутантная, дефектная кислая α -глюкозидаза, которая является неактивной или характеризуется пониженной активностью, расщепление гликогена происходит медленнее или не происходит вовсе, и при этом гликоген накапливается в лизосомах различных тканей, в частности, в поперечно-полосатых мышцах, приводя к широкому спектру клинических проявлений, в том числе к прогрессирующей мышечной слабости и дыхательной недостаточности. В частности, поражаются такие ткани, как сердечные и скелетные мышцы.

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

Современные варианты лечения болезни Помпе включают заместительную ферментную терапию (ERT) с применением рекомбинантной кислой α -глюкозидазы человека (rhGAA). Традиционные продукты на основе rhGAA известны под названиями алглюкозидаза-альфа, Myozyme® или Lumizyme®; Genzyme, Inc. ERT представляет собой длительное лечение, необходимое в течение всей жизни пациента, и включает введение заместительного фермента путем внутривенной инфузии. Затем заместительный фермент переносится в кровотоки и проникает в лизосомы внутри клеток, где его действие заключается в расщеплении накопленного гликогена, что компенсирует дефицит активности эндогенного дефектного мутантного фермента и ослабляет таким образом симптомы заболевания. У субъектов с болезнью Помпе с возникновением в младенческом возрасте лечение с помощью алглюкозидазы-альфа, как было показано, значительно улучшает выживаемость в сравнении с историческим 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, несмотря на то, что они подвергаются лечению с помощью алглюкозидазы-альфа. Причина выраженного

субоптимального эффекта ERT с применением алглюкозидазы-альфа неясна, но это может быть частично обусловлено прогрессирующей природой первопричинной мышечной 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 заболеванием мышцами, возможно из-за ненадлежащего гликозилирования остатками маннозо-6-фосфата (М6Р). Такие остатки связываются с катион-независимыми рецепторами маннозо-6-фосфата (СМРР) на поверхности клетки, позволяя ферменту проникать в клетку и лизосомы в ней. Следовательно, для эффективного лечения могут быть необходимы высокие дозы фермента, чтобы надлежащее количество активного фермента могло достичь лизосом, что делает терапию дорогостоящей и времязатратной.

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

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

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

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

Краткое описание

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

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

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

В другом аспекте настоящего изобретения предусмотрен набор для комбинированной терапии бо-

лезни Помпе у пациента, нуждающегося в этом, при этом набор содержит фармацевтически приемлемую лекарственную форму, содержащую миглустат, фармацевтически приемлемую лекарственную форму, содержащую рекомбинантную кислую α -глюкозидазу человека, определенную в данном документе, и инструкции по введению фармацевтически приемлемой лекарственной формы, содержащей миглустат, и фармацевтически приемлемой лекарственной формы, содержащей рекомбинантную кислую α -глюкозидазу, пациенту, нуждающемуся в этом.

Краткое описание графических материалов

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

Фиг. 1 представляет собой график, демонстрирующий процентную долю развернутого белка АТВ200 при различных значениях pH, а также в присутствии и в отсутствие миглуста в зависимости от температуры.

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

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

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

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

На фиг. 6 показаны профили элюирования с помощью Polywax для rhGAA Lumizyme® и АТВ200.

На фиг. 7 показана сводная информация о структурах N-гликанов Lumizyme® в сравнении с тремя различными препаратами АТВ200 на основе rhGAA, обозначенными как BP-rhGAA, АТВ200-1 и АТВ200-2.

На фиг. 8А-8Н показаны результаты анализа сайт-специфического N-гликозилирования rhGAA АТВ200.

На фиг. 9А показано сравнение аффинности связывания с CIMPR для rhGAA АТВ200 (левая кривая) с аффинностью связывания для Lumizyme® (правая кривая).

На фиг. 9В показано сравнение содержания Bis-M6P в rhGAA Lumizyme® и АТВ200.

На фиг. 10А показано сравнение активности rhGAA АТВ200 (левая кривая) с активностью rhGAA Lumizyme® (правая кривая) в нормальных фибробластах при различных концентрациях GAA.

На фиг. 10В показано сравнение активности rhGAA АТВ200 (левая кривая) с активностью rhGAA Lumizyme® (правая кривая) в фибробластах, полученных от субъекта с болезнью Помпе, при различных концентрациях GAA.

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

Фиг. 11 представляет собой график, демонстрирующий точность подбора популяционной фармакокинетической (РК) модели для АТВ200.

Фиг. 12 представляет собой график, демонстрирующий нормализованные по дозе профили зависимости концентрации миглуста и дувоглуста в плазме крови от времени.

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

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

Фиг. 14 представляет собой график, демонстрирующий точность подбора популяционной РК-модели для миглуста.

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

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

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

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

Фиг. 17 представляет собой график, на котором отображено соотношение уровней гликогена у мышей, обработанных с помощью различных доз миглустата в присутствии АТВ200, и уровней гликогена у мышей, обработанных с помощью АТВ200 в отдельности, в зависимости от соотношения значения АUC миглустата и значения АUC АТВ200.

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

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

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

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

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

Фиг. 23 представляет собой серию микрофотографий (400x) четырехглавых мышц мышей дикого типа и мышей с нокаутом Gaa, обработанных с помощью инертной среды, алглюкозидазы-альфа и АТВ200 в присутствии и в отсутствие миглустата, на которых показаны уровни маркеров аутофагии легкой цепи 3 ассоциированного с микротрубочками белка 1A/1B, конъюгированной с фосфатидилэтаноламином (LC3A II), и p62, инсулинзависимого переносчика глюкозы GLUT4 и инсулиннезависимого переносчика глюкозы GLUT1.

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

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

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

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

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

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

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

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

от дисферлина.

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

Фиг. 33А и 33В представляют собой графики, демонстрирующие 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 АТВ200 в присутствии миглустата.

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

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

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

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

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

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

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

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

Фиг. 42 представляет собой серию микрофотографий (100х и 200х) мышечных волокон латеральной широкой мышцы бедра (VL) мышей дикого типа и мышей с нокаутом Gaa, обработанных с помощью инертной среды, алглюкозидазы-альфа и АТВ200 в присутствии и в отсутствие миглустата, на которых показаны сигналы от дистрофина.

Определения

Термины, используемые в данном описании, как правило, имеют их обычные значения в данной области техники, в контексте настоящего изобретения и в конкретном контексте, в котором используется каждый термин. Определенные термины обсуждаются ниже или в других местах в настоящем описании для предоставления дополнительных указаний практикующему специалисту.

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 "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 ограничений формы заболевания с ранним и поздним возникновением, в том числе без ограничения формы болезни Помпе с возникновением в младенческом, юношеском и взрослом возрасте.

Используемый в данном документе термин "кислая α -глюкозидаза" 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 более 500 мутаций, многие из которых ассоциированы с болезнью Помпе. Мутации,

приводящие к неправильному сворачиванию или неправильному процессингу фермента кислой α -глюкозидазы, включают в себя T1064C (Leu355Pro) и C2104T (Arg702Cys). Кроме того, мутации GAA, которые влияют на созревание и процессинг фермента, включают в себя Leu405Pro и Met519Thr. Для осуществления активности белка кислой α -глюкозидазы требуется наличие консервативного гексапептида WIDMNE в аминокислотных остатках 516-521. Используемая в данном документе аббревиатура "GAA" подразумевается как обозначающая фермент кислую α -глюкозидазу, тогда как выделенная курсивом аббревиатура "GAA" подразумевается как обозначающая ген человека, кодирующий фермент кислую α -глюкозидазу человека. Выделенная курсивом аббревиатура "Gaa" подразумевается как обозначающая гены, отличные от человеческих, кодирующие ферменты кислые α -глюкозидазы, отличные от человеческих, в том числе без ограничения гены крыс или мышей, а аббревиатура "Gaa" подразумевается как обозначающая ферменты кислые α -глюкозидазы, отличные от человеческих. Таким образом, аббревиатура "rhGAA" подразумевается как обозначающая фермент рекомбинантную кислую α -глюкозидазу человека.

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

Используемый в данном документе термин "ATB200" подразумевается как обозначающий рекомбинантную кислую α -глюкозидазу человека, описанную в патентной заявке PCT/US2015/053252, одновременно находящейся на рассмотрении патентного ведомства, раскрытие которой включено в данный документ посредством ссылки.

Используемый в данном документе термин "гликан" подразумевается как 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.

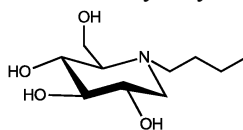
Используемый в данном документе термин "высокоманнозный N-гликан" подразумевается как обозначающий N-гликан, имеющий от одного до шести или больше маннозных звеньев. По меньшей мере в одном варианте осуществления высокоманнозное N-гликановое звено может содержать бис(N-ацетилглюкозаминную) цепь, связанную с аспарагиновым остатком и дополнительно связанную с разветвленной полиманнозной цепью.

Используемые в данном документе взаимозаменяемые термины "M6P" 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 "M6P" 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.

Как используется в данном документе, соединение миглустат, также известное как N-бутил-1-

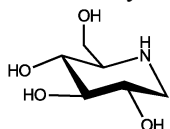
дезоксиноджиримицин, или NB-DNJ, или (2R,3R,4R,5S)-1-бутил-2-(гидроксиметил)пиперидин-3,4,5-триол, представляет собой соединение, имеющее следующую химическую формулу:



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

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.

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



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

- улучшает образование стабильной молекулярной конформации белка;
- улучшает надлежащий транспорт белка из эндоплазматической сети в другое местоположение в клетке, предпочтительно нативное местоположение в клетке, для того, чтобы предотвратить разложение белка, ассоциированное с эндоплазматической сетью;
- предотвращает агрегацию конформационно нестабильных или неправильно свернутых белков;
- по меньшей мере частично восстанавливает и/или улучшает функцию, стабильность и/или активность белка дикого типа и/или

улучшает фенотип или функцию клетки, содержащей кислую α -глюкозидазу.

Таким образом, фармакологический шаперон для кислой α -глюкозидазы представляет собой молекулу, которая связывается с кислой α -глюкозидазой, что обуславливает надлежащие сворачивание, транспорт, отсутствие агрегации и активность кислой α -глюкозидазы. Этот термин, используемый в данном документе, включает без ограничения активные сайт-специфические шапероны (ASSC), которые связываются с активным сайтом фермента, ингибиторы или антагонисты и агонисты. По меньшей мере в одном варианте осуществления фармакологический шаперон может представлять собой ингибитор или антагонист кислой α -глюкозидазы. Используемый в данном документе термин "антагонист" подразумевается как обозначающий любую молекулу, которая связывается с кислой α -глюкозидазой и частично либо полностью блокирует, ингибирует, снижает или нейтрализует активность кислой α -глюкозидазы. По 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 разрушении химических связей. В настоящем изобретении активные сайты могут включать в себя каталитические сайты ферментов, антигенсвязывающие сайты антител, лигандсвязывающие домены рецепторов, связывающие домены регуляторов или рецепторсвязывающие домены секретируемых белков. Активные сайты также могут охватывать транскрибирующие домены, домены, участвующие в белок-белковых взаимодействиях, или ДНК-связывающие домены факторов транскрипции и регуляторов.

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

организме.

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

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

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

Как используется в данном документе, "терапевтически эффективная доза" и "эффективное количество" подразумеваются как обозначающие количество кислой α -глюкозидазы и/или миглустата и/или их комбинации, которое является 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, таких как известные 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 кормление; 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 миглустата, которая оказывает ингибирующий эффект на кислую α -глюкозидазу, может составлять "эффективное количество" для целей настоящего изобретения ввиду разбавления (и последующего сдвига связывания из-за изменения равновесного состояния), биодоступности и метаболизма миглустата 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 него. По меньшей мере в одном варианте осуществления такой индивидуум страдает от недостаточности фермента. Вводимый фермент может представлять собой очищенный рекомбинантный фермент, полученный *in vitro*, или белок, очищенный из выделенной ткани или жидкости, такой как, например, плацента или молоко животных, или из 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, вспомогательное средство, наполнитель или инертную среду, с которыми вводят соединение. Подходящие фармацевтические носители известны из уровня техники и по меньшей мере в одном варианте осуществления описаны в "Remington's Pharmaceutical Sciences" E. W. Martin, 18-е издание или другие издания.

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

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

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

Используемые в данном документе термины "приблизительно" и "примерно" подразумеваются как обозначающие приемлемую степень погрешности для измеряемой величины с учетом природы или точности измерений. Например, степень погрешности может указываться количеством значащих цифр, предусмотренных для измерения, как понимается в данной области техники, и включает без ограничения изменение на ± 1 наиболее точной значащей цифры, представленной для измерения. Типичные приводимые в качестве примера степени погрешности находятся в пределах 20 процентов (%), предпочтительно в пределах 10% и более предпочтительно в пределах 5% от указанного значения или диапазона значений. В качестве альтернативы и, в частности, в биологических системах термины "примерно" и "приблизительно" могут означать значения, которые находятся в пределах порядка величины, предпочтительно в пределах 5-кратного и более предпочтительно в пределах 2-кратного изменения указанного значения. Численные величины, приведенные в данном документе, являются приблизительными, если не указано иное, что означает, что термин "приблизительно" или "примерно" может являться предположительным, если не указано точно.

Термин "одновременно", используемый в данном документе, подразумевается как обозначающий "в то же время, что" или "в разумно короткий период времени до или после", что будет понятно специалисту в данной области. Например, если два средства для лечения вводят одновременно друг с другом, то одно средство для лечения можно вводить до или после другого средства для лечения, делая поправку на время, необходимое для подготовки последнего из двух средств для лечения. Следовательно, "одновременное введение" двух средств для лечения включает без ограничения введение одного средства для лечения вслед за другим через 20 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, болезненности 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 кислот и фармацевтически приемлемые соли присоединения основания. Перечни подходящих солей находятся, например, в S. M. Birge et al., J. Pharm. Sci., 1977, 66, p. 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, образованных с неорганическими кислотами, в том числе без ограничения с хлористоводородной кислотой, бромистоводородной кислотой, серной кислотой, сульфаминовой кислотой, азотной кислотой, фосфорной кислотой и т.п., и органическими кислотами, в том числе без ограничения уксусной кислотой, трифторуксусной кислотой, 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, памовой кислотой, пектиновой кислотой, фенилуксусной кислотой, 3-фенилпропионовой кислотой, пивалеовой 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, образованных с неорганическими основаниями, в том числе без ограничения с аммиаком или гидроксидом, карбонатом или бикарбонатом аммония или катионом металла, такого как натрий, калий, литий, кальций, магний, железо, цинк, медь, марганец, алюминий и т.п. Соли, полученные из фармацевтически приемлемых органических нетоксичных оснований, включают в себя без ограничения соли первичных, вторичных и третичных аминов, четвертичные аммониевые соединения, замещенные амины, в том числе встречающиеся в природе замещенные амины, циклические амины и основные ионообменные смолы, такие как метиламин, диметиламин, триметиламин, этиламин, диэтиламин, триэтиламин, изопропиламин, трипропиламин, трибутиламин, этаноламин, диэтанолламин, 2-диметиламиноэтанол, 2-диэтиламиноэтанол, дициклогексиламин, лизин, аргинин, гистидин, кофеин, гидабаин, холин, бетаин, этилендиамин, глюкозамин, метилглюкамин, теобромин, пурины, пиперазин, пиперидин, N-этилпиперидин, соединения тетраметиламмония, соединения тетраэтиламмония, пиридин, N,N-диметиланилин, N-метилпиперидин, N-метилморфолин, дициклогексиламин, дибензиламин, N,N-дибензилфенэтиламин, 1-эфенамин, N,N'-дибензилэтилендиамин, полиаминные смолы и т.п.

Подробное описание

В настоящем изобретении предусмотрен способ лечения болезни Помпе у пациента, нуждающегося в этом, при этом способ включает введение пациенту миглустата или его фармацевтически приемлемой соли в комбинации с рекомбинантной кислой α -глюкозидазой человека, где рекомбинантная кислая α -глюкозидаза человека экспрессируется в клетках яичника китайского хомячка (CHO) и имеет увеличенное содержание N-гликановых звеньев, несущих один или два остатка маннозо-6-фосфата, в сравнении с содержанием N-гликановых звеньев, несущих один или два остатка маннозо-6-фосфата, в α -глюкозидазе-альфа. По меньшей мере в одном варианте осуществления рекомбинантная кислая α -глюкозидаза человека имеет низкие уровни содержания комплексных гликанов с концевой галактозой. В другом аспекте в настоящем изобретении предусмотрено применение миглустата и рекомбинантной кислой α -глюкозидазы человека в комбинации для лечения болезни Помпе у пациента, нуждающегося в этом.

По меньшей мере в одном варианте осуществления миглустат вводят перорально. По меньшей мере в одном варианте осуществления миглустат вводят в пероральной дозе, составляющей от приблизительно 200 мг до приблизительно 600 мг, или в пероральной дозе, составляющей приблизительно 200 мг, приблизительно 250 мг, приблизительно 300 мг, приблизительно 350 мг, приблизительно 400 мг, приблизительно 450 мг, приблизительно 500 мг, приблизительно 550 мг или приблизительно 600 мг. По меньшей мере в одном варианте осуществления миглустат вводят в пероральной дозе, составляющей от приблизительно 233 мг до приблизительно 400 мг. По меньшей мере в одном варианте осуществления миглустат вводят в пероральной дозе, составляющей от приблизительно 250 до приблизительно 270 мг, или в пероральной дозе, составляющей приблизительно 250 мг, приблизительно 255 мг, приблизительно 260 мг, приблизительно 265 мг или приблизительно 270 мг. По меньшей мере в одном варианте осуществления миглустат вводят в пероральной дозе, составляющей приблизительно 260 мг.

Специалистам в данной области будет понятно, что пероральная доза миглустата, находящаяся в диапазоне от приблизительно 200 мг до 600 мг или в 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 мг или приблизительно 200 мг. По меньшей мере в одном варианте осуществления миглустат вводят в виде пероральной дозы, составляющей от приблизительно 65 мг до приблизительно 195 мг, или в виде пероральной дозы, составляющей приблизительно 65 мг, приблизительно 130 мг или приблизительно 195 мг.

По меньшей мере в одном варианте осуществления миглустат вводят в виде 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 мг 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 получить в соответствии со способами, хорошо известными из уровня техники. Такие композиции могут также содержать один или несколько фармацевтически приемлемых носителей и наполнителей, которые могут иметь твердую или жидкую форму. Таблетки и капсулы можно получить посредством традиционных способов с использованием фармацевтически приемлемых наполнителей, в том числе без ограничения связующих средств, заполнителей, смазывающих веществ, разрыхлителей или смачивающих средств. Подходящие фармацевтически приемлемые наполнители известны из уровня техники и включают без ограничения прежелатинизированный крахмал, поливинилпирролидон, повидон, гидроксипропилметилцеллюлозу (HPMC), гидроксипропилэтилцеллюлозу (HPEC), гидроксипропилцеллюлозу (HPC), сахарозу, желатин, гуммиарабик, лактозу, микрокристаллическую целлюлозу, гидрофосфат кальция, стеарат магния, стеариновую кислоту, глицерилбегенат, тальк, диоксид кремния, кукурузный, картофельный или маниоковый крахмал, крахмалгликолят натрия, лаурилсульфат натрия, цитрат натрия, карбонат кальция, двухосновный фосфат кальция, глицин, кроскармеллозу натрия и комплексные силикаты. Таблетки можно покрывать посредством способов, 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 рекомбинантная кислая α -глюкозидаза человека 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 алглюкозидазе-альфа. По меньшей мере в одном варианте осуществления кислая α -глюкозидаза представляет собой рекомбинантную кислую α -глюкозидазу человека, упоминаемую в данном документе как ATB200, как описано в международной патентной заявке PCT/US2015/053252, одновременно находящейся на рассмотрении патентного ведомства. 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 ($K_{\text{поглощение}} \sim 7-14$ 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, SEQ ID NO: 2 (или кодируемую SEQ ID NO: 2), SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 5.

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

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

SEQ ID NO: 2 cagttgggaaagctgaggtgtcgccggggccgcgggtggaggtcggggatgaggcagcagg
 taggacagtgaacctggtagcggaaggacccggccacctctaggttctctctgctcccggtt
 gttcagcggaggaggtctgggcctgccgagctgacgggaaactgaggcacggagcgggc
 ctgtaggagctgtccaggccatctcaacctgggagtgaggcacccgccctgctccaccggc
 tctggcgtctgcgcctctgtctcttggcaaccgtgcaactcctggggcacatctactcatg
 atttctgtgttccccgagagctgagtggtctctccccagtcctggaggagactaccagctc
 accagcaggagccagcagaccaggcccgggatgccaggcacacccggcggtcccg
 agcagtgcccacacagtgcgacgtcccccaacagccgttcgattgcgcccgtgacaaggcc
 atcaccagggaacagtgcgaggcccgcggtgctgtacatccctgcaaagcaggggctgcag
 ggagcccagatggggcagccctggtgttcttcccaccagctacccagctacaagctggaga
 acctgagctcctctgaaatgggtacacggccacctgacctaccacccccaccttctccca
 aggacatctgacctgcggctggacgtgatgatggagactgagaaccgctccacttcacgatc
 aaagatccagctaacaggcgctacgaggtgcccttggagaccccgctgtccacagccgggca

ccgtccccactctacagcgtggagtctccgaggagccctcggggatcgtgcaccggcagct
ggacggccgcgtgctgctgaacacgacggtggcgccctgttctttgcgaccagttccttcage
tgtccacctcgctgccctcgagtatatacacaggcctcgccgagcacctcagtcacctgatgctca
gcaccagctggaccagatcacctgtggaaccgggacctfgcgcccacgcccgggtgcgaacc
tctacgggtctcacctttctacctggcgctggaggacggcggtcgccacacggggtgttctg
ctaaacagcaatgccatggatgtggtcctgcagccgagccctgacctagctggaggtcgacag
gtgggatcctggtatgtctacatcttctggcccagagcccaagagcgtggtgcagcagtacctg
gacgttggggatacccggtcatgccatactggggcctgggcttccacctgtgcgctgggg
ctactcctccaccgctatcacccgccaggtggtggaacatgaccagggccacttccccctgg
acgtccaatggaacgacctggactacatggactccggagggaacttcacgttcaacaaggatgg
cttccgggacttcccggccatggtgcaggagctgcaccaggcgccggcgctcatgatgatc
gtggatcctccatcagcagctcgggccctcgccggagctacaggccctacgacgggtctg
cggagggggggtttcatccaacgagaccggccagccgctgattgggaaggtatggcccggg
tccactgccttccccgacttccaaccccacagccctggcctggtggaggacatggtgctga
gttccatgaccaggtgccctgcagggcatgtgattgacatgaacgagccttccaactcatcag
aggctctgaggacggctgccccaaatgagctggagaacccacctacgtgcctgggggtggtt
ggggggaccctccaggcgccaccatctgtgcctccagccaccagtttctctccacactacaa
cctgcacaacctctacggcctgaccgaagccatcgctcccacaggcgctggtgaaggtcgg
gggacacgcccattgtgatctcccctcgaccttctggtccacggccgatacggccactg
gacgggggacgtgtgagctcctgggagcagctcgctcctcctgcccagaaatcctgcagtta
acctgctgggggtgcctctggtcggggccgacgtctgcggcttctgggcaaacctcagaggga
gctgtgtgtgcgtggaccagctggggccttctaccccttcatcggaaccacaacagcctgc
tcagtctgccccaggagccgtacagcttcagcagccggccagcaggccatgaggaagccc
tcacctgcgctacgcactcctccccacctctacacatgttccaccaggcccacgtcggggg
gagaccgtggcccgccctcttctggagtcccccaaggacttagcacctggactgtggacca
ccagctcctgtggggggaggccctgctcatcacccagtgctccaggccgggaaggccgaagt
gactggctacttccccctgggcacatgtgtacgacctgcagacggtccaatagaggcccttgca
gcctccacccccacctgcagctccccgtgagccagccatccacagcagggggcagtggtga
cgctgccggccccctggacacatcaacgtccacctcgggctgggtacatcatccccctgca
gggcccctggcctcacaaccacagagtcccgccagcagccatggccctggtgtggccctgac
caagggtggagaggccgaggggagctgttctgggacgatggagagagcctggaagtgtctg

agcgaggggacctacacacaggtcatcttctggccaggaataacacgatcgtaatgagctggta
 cgtgtgaccagtgaggagctggcctgcagctgcagaagtgactgtcctggcggtggccacg
 gcgccccagcaggtcctccaacgggtgcctgtctccaactcacctacagccccgacaccaa
 ggtcctggacatctgtgtctcgtgtgatgggagagcagtttctgcagctgggttagccgggc
 ggagtgtgttagtctcagaggaggctggtccccagggaagcagacctgtgtgcgggca
 gcagctgtgtgcgggcctgggggtgcatgtgtcacctggagctgggcactaaccattccaagcc
 gccgcacgtgtttccacctcctggccgggctctggccccaacgtgtctaggagagctttc
 tccctagatcgactgtggccggggcctggaggctgctctgtttaataagattgaagtttgc
 cctcctcacctgttgcggcatgcgggtagtattagccacccccctcatctgttccagcaccgg
 agaagggggtgctcaggtggaggtgtgggtatgcacctgagctcctgttcgcgctgtgtc
 tgccccaacgcgaccgttcccggctcccagagggtggtgctcctgccggtccccgagcaag
 cctgggaactcagaaaattcacaggacttgggagattctaatacttaagtgaatttttaataaa
 aggggcatttgaatc

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

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

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

SEQ ID NO: 4

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

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

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

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

Pro Phe Met Pro Pro Tyr Trp Gly Leu Gly Phe His Leu Cys Arg Trp
 Gly Tyr Ser Ser Thr Ala Ile Thr Arg Gln Val Val Glu Asn Met Thr
 Arg Ala His Phe Pro Leu Asp Val Gln Trp Asn Asp Leu Asp Tyr
 Met Asp Ser Arg Arg Asp Phe Thr Phe Asn Lys Asp Gly Phe Arg
 Asp Phe Pro Ala Met Val Gln Glu Leu His Gln Gly Gly Arg Arg Tyr
 Met Met Ile Val Asp Pro Ala Ile Ser Ser Ser Gly Pro Ala Gly Ser Tyr
 Arg Pro Tyr Asp Glu Gly Leu Arg Arg Gly Val Phe Ile Thr Asn Glu
 Thr Gly Gln Pro Leu Ile Gly Lys Val Trp Pro Gly Ser Thr Ala Phe
 Pro Asp Phe Thr Asn Pro Thr Ala Leu Ala Trp Trp Glu Asp Met Val
 Ala Glu Phe His Asp Gln Val Pro Phe Asp Gly Met Trp Ile Asp Met
 Asn Glu Pro Ser Asn Phe Ile Arg Gly Ser Glu Asp Gly Cys Pro Asn
 Asn Glu Leu Glu Asn Pro Pro Tyr Val Pro Gly Val Val Gly Gly Thr
 Leu Gln Ala Ala Thr Ile Cys Ala Ser Ser His Gln Phe Leu Ser Thr
 His Tyr Asn Leu His Asn Leu Tyr Gly Leu Thr Glu Ala Ile Ala Ser
 His Arg Ala Leu Val Lys Ala Arg Gly Thr Arg Pro Phe Val Ile Ser
 Arg Ser Thr Phe Ala Gly His Gly Arg Tyr Ala Gly His Trp Thr Gly
 Asp Val Trp Ser Ser Trp Glu Gln Leu Ala Ser Ser Val Pro Glu Ile
 Leu Gln Phe Asn Leu Leu Gly Val Pro Leu Val Gly Ala Asp Val Cys
 Gly Phe Leu Gly Asn Thr Ser Glu Glu Leu Cys Val Arg Trp Thr Gln
 Leu Gly Ala Phe Tyr Pro Phe Met Arg Asn His Asn Ser Leu Leu Ser
 Leu Pro Gln Glu Pro Tyr Ser Phe Ser Glu Pro Ala Gln Gln Ala Met
 Arg Lys Ala Leu Thr Leu Arg Tyr Ala Leu Leu Pro His Leu Tyr Thr
 Leu Phe His Gln Ala His Val Ala Gly Glu Thr Val Ala Arg Pro Leu
 Phe Leu Glu Phe Pro Lys Asp Ser Ser Thr Trp Thr Val Asp His Gln
 Leu Leu Trp Gly Glu Ala Leu Leu Ile Thr Pro Val Leu Gln Ala Gly
 Lys Ala Glu Val Thr Gly Tyr Phe Pro Leu Gly Thr Trp Tyr Asp Leu
 Gln Thr Val Pro Ile Glu Ala Leu Gly Ser Leu Pro Pro Pro 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 в GenBank AHE24104.1 (GL568760974). По меньшей мере в одном варианте осуществления рекомбинантная кислая α -глюкозидаза человека имеет аминокислотную последовательность GAA дикого типа, кодируемую SEQ ID NO: 2, последовательность мРНК для которой имеет номер доступа в GenBank Y00839.1. По меньшей мере в одном варианте осуществления рекомбинантная кислая α -глюкозидаза человека имеет аминокислотную последовательность GAA дикого типа, приведенную под SEQ ID NO: 3. По меньшей мере в одном варианте осуществления рекомбинантная кислая α -глюкозидаза человека имеет аминокислотную последовательность GAA, приведенную под SEQ ID NO: 4, и имеет номер доступа в Национальном центре биотехнологической информации (NCBI) NP_000143.2. По меньшей мере в одном варианте осуществления рекомбинантная кислая α -глюкозидаза человека представляет собой глюкозидазу-альфа, фермент кислую α -глюкозидазу человека, кодируемую наиболее преобладающим из девяти наблюдаемых гаплотипов гена GAA.

По меньшей мере в одном варианте осуществления рекомбинантная кислая α -глюкозидаза человека изначально экспрессируется как имеющая полноразмерную 952-аминокислотную последовательность GAA дикого типа, приведенную под SEQ ID NO: 1, и рекомбинантная кислая α -глюкозидаза человека подвергается внутриклеточному процессингу, при котором удаляется часть аминокислот, например, первые 56 аминокислот. Соответственно, рекомбинантная кислая α -глюкозидаза человека, секретируемая клеткой-хозяином, может иметь более короткую аминокислотную последовательность, чем рекомбинантная кислая α -глюкозидаза человека, которая изначально экспрессируется в клетке. По меньшей мере в одном варианте осуществления более короткий белок может иметь аминокислотную последовательность, приведенную под SEQ ID NO: 5, которая отличается от SEQ ID NO: 1 только тем, что первые 56 аминокислот, содержащие сигнальный пептид и пептид-предшественник, были удалены с получением в результате, таким образом, белка, имеющего 896 аминокислот. Также возможны другие различия в количестве аминокислот, такие как наличие 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 или больше делеций, замен и/или вставок по сравнению с аминокислотной последовательностью, описанной под SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления продукт на основе 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 другого примера, остатки аспарагиновой кислоты могут подвергаться изомеризации до изоаспарагиновой кислоты. В качестве еще одного другого примера, непарные цистеиновые остатки в белке могут образовывать дисульфидные связи со свободным глутатионом и/или цистеином. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления фермент изначально экспрессируется как имеющий аминокислотную последовательность, приведенную под SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 (или кодируемую SEQ ID NO: 2), SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 5, и фермент подвергается одной или нескольким этим посттрансляционным и/или химическим модификациям. Такие модификации также входят в объем настоящего изобретения.

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

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

Молекулы рекомбинантной кислой α -глюкозидазы человека могут иметь 1, 2, 3 или 4 группы маннозо-6-фосфата (M6P) в своих гликанах. Например, только один N-гликан в молекуле рекомбинантной кислой α -глюкозидазы человека может нести M6P (монофосфорилированный), отдельный N-гликан может нести две группы M6P (бисфосфорилированный) или каждый из двух разных N-гликанов в одной и той же молекуле рекомбинантной кислой α -глюкозидазы человека может нести отдельные группы M6P. Молекулы рекомбинантной кислой α -глюкозидазы человека также могут иметь N-гликаны, не несущие группы M6P. В другом варианте осуществления N-гликаны в среднем содержат более 2,5 моль/моль M6P и более 4 моль/моль сиаловой кислоты, так что рекомбинантная кислая α -глюкозидаза человека содержит в среднем по меньшей мере 2,5 моля остатков маннозо-6-фосфата на моль рекомбинантной кислой α -глюкозидазы человека и по меньшей мере 4 моля сиаловой кислоты на моль рекомбинантной кислой α -глюкозидазы человека. В среднем по меньшей мере приблизительно 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10% от общего количества гликанов в рекомбинантной кислой α -глюкозидазе человека могут находиться в виде моно-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 рекомбинантной кислой α -глюкозидазе человека находятся в виде бис-M6P-гликана, и в среднем меньше 25% от общего количества молекул рекомбинантной кислой α -глюкозидазы человека не содержат фосфорилированный гликан, связывающийся с CIMPR.

Рекомбинантная кислая α -глюкозидаза человека может иметь значение среднего содержания N-гликанов, несущих M6P, в диапазоне от 0,5 до 7,0 моль/моль рекомбинантной кислой α -глюкозидазы человека или любое промежуточное значение в поддиапазоне, в том числе 0,5, 1,0, 1,5, 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5 или 7,0 моль/моль рекомбинантной кислой α -глюкозидазы человека. Рекомбинантную кислую α -глюкозидазу человека можно фракционировать для получения препаратов на основе

рекомбинантной кислой α -глюкозидазы человека с разным средним количеством гликанов, несущих М6Р или несущих бис-М6Р, что, таким образом, позволяет осуществлять дополнительную индивидуальную адаптацию рекомбинантной кислой α -глюкозидазы человека, нацеливающейся на лизосомы в целевых тканях, посредством осуществления отбора конкретной фракции или посредством избирательного объединения различных фракций.

До 60% N-гликанов в рекомбинантной кислой α -глюкозидазе человека могут быть полностью сиалированными, например, до 10, 20, 30, 40, 50 или 60% N-гликанов могут быть полностью сиалированными. В некоторых вариантах осуществления от 4 до 20% от общего количества N-гликанов являются полностью сиалированными. В других вариантах осуществления не больше 5, 10, 20 или 30% N-гликанов в рекомбинантной кислой α -глюкозидазе несут сиаловую кислоту и концевой остаток галактозы (Gal).

Данный диапазон включает все промежуточные значения и поддиапазоны, например, от 7 до 30% от общего количества N-гликанов в рекомбинантной кислой α -глюкозидазе человека могут нести сиаловую кислоту и концевую галактозу. В еще нескольких других вариантах осуществления не больше 5, 10, 15, 16, 17, 18, 19 или 20% N-гликанов в рекомбинантной кислой α -глюкозидазе человека имеют только концевую галактозу и не содержат сиаловую кислоту. Данный диапазон включает все промежуточные значения и поддиапазоны, например, от 8 до 19% от общего количества N-гликанов в рекомбинантной кислой α -глюкозидазе человека в композиции могут иметь только концевую галактозу и не содержат сиаловую кислоту.

В других вариантах осуществления настоящего изобретения 40, 45, 50, 55-60% от общего количества N-гликанов в рекомбинантной кислой α -глюкозидазе человека представляют собой N-гликаны комплексного типа; или не больше 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7% от общего количества N-гликанов в рекомбинантной кислой α -глюкозидазе человека представляют собой N-гликаны гибридного типа; не больше 5, 10 или 15% N-гликанов высокоманнозного типа в рекомбинантной кислой α -глюкозидазе человека являются нефосфорилированными; по меньшей мере 5 или 10% N-гликанов высокоманнозного типа в рекомбинантной кислой α -глюкозидазе человека являются моно-М6Р-фосфорилированными; и/или по меньшей мере 1 или 2% N-гликанов высокоманнозного типа в рекомбинантной кислой α -глюкозидазе человека являются бис-М6Р-фосфорилированными. Эти значения включают все промежуточные значения и поддиапазоны. Рекомбинантная кислая α -глюкозидаза человека может соответствовать одному или нескольким диапазонам содержания, описанным выше.

В некоторых вариантах осуществления рекомбинантная кислая α -глюкозидаза человека будет нести в среднем от 2,0 до 8,0 моля остатков сиаловой кислоты на моль рекомбинантной кислой α -глюкозидазы человека. Данный диапазон включает все промежуточные значения и поддиапазоны, в том числе 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5 и 8,0 моля остатков/моль рекомбинантной кислой α -глюкозидазы человека. Не ограничиваясь какой-либо теорией, полагают, что присутствие N-гликановых звеньев, несущих остатки сиаловой кислоты, может предотвратить непродуктивное очищение от рекомбинантной кислой α -глюкозидазы человека посредством асиалогликопротеиновых рецепторов.

В одном или нескольких вариантах осуществления rhGAA имеет звенья М6Р и/или сиаловой кислоты в определенных сайтах N-гликозилирования рекомбинантного лизосомного белка человека. Например, существует семь потенциальных сайтов N-связанного гликозилирования в rhGAA. Эти потенциальные сайты гликозилирования находятся в следующих положениях SEQ ID NO: 5: N84, N177, N334, N414, N596, N826 и N869. Подобным образом, для полноразмерной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1 эти потенциальные сайты гликозилирования находятся в следующих положениях: N140, N233, N390, N470, N652, N882 и N925. Другие варианты rhGAA могут иметь аналогичные сайты гликозилирования в зависимости от местоположения 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 в первом сайте N-гликозилирования (например, N84 в SEQ ID NO: 5 и N140 в SEQ ID NO: 1). Например, по меньшей мере 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90 или 95% rhGAA могут быть фосфорилированными в первом сайте N-гликозилирования. Данное фосфорилирование может быть обусловлено наличием звеньев моно-М6Р и/или бис-М6Р. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90 или 95% rhGAA несут звено моно-М6Р в первом сайте N-гликозилирования. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90 или 95% rhGAA несут звено бис-М6Р в первом сайте N-гликозилирования.

В одном или нескольких вариантах осуществления по меньшей мере 20% rhGAA являются фосфорилированными во втором сайте N-гликозилирования (например, N177 в SEQ ID NO: 5 и N233 в SEQ ID NO: 1). Например, по меньшей мере 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90 или 95% rhGAA могут быть фосфорилированными во втором сайте N-гликозилирования. Данное фосфорилирование может быть обусловлено наличием звеньев моно-М6Р и/или бис-М6Р. В некоторых вариантах осуществле-

ния по меньшей мере 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90 или 95% rhGAA несут звено моно-М6Р во втором сайте N-гликозилирования. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90 или 95% rhGAA несут звено бис-М6Р во втором сайте N-гликозилирования. В одном или нескольких вариантах осуществления по меньшей мере 5% rhGAA являются фосфорилированными в третьем сайте N-гликозилирования (например, N334 в SEQ ID NO: 5 и N390 в SEQ ID NO: 1). В других вариантах осуществления меньше 5, 10, 15, 20 или 25% rhGAA являются фосфорилированными в третьем сайте N-гликозилирования. Например, третий сайт N-гликозилирования может иметь комбинацию нефосфорилированных высокоманнозных гликанов, двух-, трех- и четырехантенных комплексных гликанов и гибридных гликанов в качестве основных форм. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 3, 5, 8, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45% или 50% rhGAA являются сialiрированными в третьем сайте N-гликозилирования.

В одном или нескольких вариантах осуществления по меньшей мере 20% rhGAA являются фосфорилированными в четвертом сайте N-гликозилирования (например, N414 в SEQ ID NO: 5 и N470 в SEQ ID NO: 1). Например, по меньшей мере 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90 или 95% rhGAA могут быть фосфорилированными в четвертом сайте N-гликозилирования. Данное фосфорилирование может быть обусловлено наличием звеньев моно-М6Р и/или бис-М6Р. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90 или 95% rhGAA несут звено моно-М6Р в четвертом сайте N-гликозилирования. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90 или 95% rhGAA несут звено бис-М6Р в четвертом сайте N-гликозилирования. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 3, 5, 8, 10, 15, 20% или 25% rhGAA являются сialiрированными в четвертом сайте N-гликозилирования.

В одном или нескольких вариантах осуществления по меньшей мере 5% rhGAA являются фосфорилированными в пятом сайте N-гликозилирования (например, N596 в SEQ ID NO: 5 и N692 в SEQ ID NO: 1). В других вариантах осуществления меньше 5, 10, 15, 20% или 25% rhGAA являются фосфорилированными в пятом сайте N-гликозилирования. Например, пятый сайт N-гликозилирования может иметь фукозилированные двухантенные комплексные гликаны в качестве основных форм. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 3, 5, 8, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90 или 95% rhGAA являются сialiрированными в пятом сайте N-гликозилирования.

В одном или нескольких вариантах осуществления по меньшей мере 5% rhGAA являются фосфорилированными в шестом сайте N-гликозилирования (например, N826 в SEQ ID NO: 5 и N882 в SEQ ID NO: 1). В других вариантах осуществления меньше 5, 10, 15, 20 или 25% rhGAA являются фосфорилированными в шестом сайте N-гликозилирования. Например, шестой сайт N-гликозилирования может иметь комбинацию двух-, трех- и четырехантенных комплексных гликанов в качестве основных форм. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 3, 5, 8, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90 или 95% rhGAA являются сialiрированными в шестом сайте N-гликозилирования.

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

Рекомбинантная кислая α -глюкозидаза человека предпочтительно вырабатывается клетками яичника китайского хомячка (CHO), такими как линии клеток CHO GA-ATB-200 или ATB-200-001-X5-14, или субкультурой или производной такой культуры клеток CHO. ДНК-конструкции, которые экспрессируют аллельные варианты кислой α -глюкозидазы или аминокислотные последовательности других вариантов кислой α -глюкозидазы, как, например, по меньшей мере на 90, 95, 98 или 99% идентичные SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 5, можно сконструировать и экспрессировать в клетках CHO. Эти аминокислотные последовательности вариантов кислой α -глюкозидазы могут содержать делеции, замены и/или вставки по сравнению с SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 5, как, например, иметь 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 или больше делеций, замен и/или вставок по сравнению с аминокислотной последовательностью, описанной под SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 5. Специалисты в данной области могут выбрать альтернативные векторы, подходящие для трансформации клеток CHO для получения таких ДНК-конструкций.

Для расчета идентичности между двумя последовательностями можно применять различные алгоритмы и/или программы для выравнивания, в том числе FASTA или BLAST, которые доступны как часть программного пакета для анализа последовательностей GCG (Висконсинский университет, Мэдисон, Висконсин), и их можно применять, например, с настройками по умолчанию.

Например, предусмотрены полипептиды, по меньшей мере на 90, 95, 98 или 99% идентичные конкретным полипептидам, описанным в данном документе, и предпочтительно проявляющие по существу те же функции, а также полинуклеотиды, кодирующие такие полипептиды. Если не указано иное, расчет

показателя сходства будет основываться на применении BLOSUM62. При применении BLASTP процентное значение сходства основывается на показателе "Положительные" в BLASTP, а процентное значение идентичности последовательностей основывается на показателе "Идентичные" в BLASTP. "Идентичные" в BLASTP демонстрируют число остатков в парах последовательностей с высоким показателем сходства, которые являются идентичными, и их долю от общего количества остатков; а "Положительные" в BLASTP демонстрируют число и долю остатков, для которых показатели выравнивания имеют положительные значения и которые являются сходными друг с другом. В настоящем изобретении предусмотрены и охватываются аминокислотные последовательности, характеризующиеся этими степенями идентичности или сходства или любой промежуточной степенью идентичности или сходства с аминокислотными последовательностями, раскрытыми в данном документе. Полинуклеотидные последовательности сходных полипептидов выводятся с помощью генетического кода и могут быть получены с помощью традиционных способов, в частности, посредством восстановления по их аминокислотным последовательностям с помощью генетического кода.

Авторы настоящего изобретения обнаружили, что рекомбинантную кислую α -глюкозидазу человека, имеющую исключительную способность к нацеливанию на катион-независимые рецепторы маннозо-6-фосфата (CIMPR) и клеточные лизосомы, а также паттерны гликозилирования, снижающие непродуктивное очищение от нее *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 нацеливающихся на мышечные клетки маннозо-6-фосфатных (моно-M6P) и бис-маннозо-6-фосфатных (бис-M6P) N-гликановых остатков, 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 очищению из кровотока, чем другим рекомбинантным кислым α -глюкозидазам человека, таким как, например, алглюкозидаза-альфа, которая имеет намного 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 очищение *in vivo*.

Также предусматривается, что уникальное гликозилирование ATB200 может способствовать снижению иммуногенности ATB200 в сравнении с, например, алглюкозидазой-альфа. Как признают специалисты в данной области, гликозилирование белков консервативными сахарами млекопитающих обычно улучшает растворимость продукта и ослабляет агрегацию и иммуногенность продукта. Гликозилирование косвенно изменяет иммуногенность белка посредством минимизации агрегации белка, а также посредством экранирования иммуногенных эпитопов белка от воздействия иммунной системы (Guidance for Industry - Immunogenicity Assessment for Therapeutic Protein Products, Министерство здравоохранения и социальных служб США, Управление по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных средств, Центр по оценке и исследованию лекарственных средств, Центр по оценке и исследованию биологических препаратов, август 2014 года). Следовательно, по меньшей мере в одном варианте осуществления введение рекомбинантной кислой α -глюкозидазы человека не индуцирует выработку антител к лекарственному средству. По меньшей мере в одном варианте осуществления введения рекомбинантной кислой α -глюкозидазы человека индуцирует выработку антител к лекарственному средству у субъекта с меньшей частотой возникновения, чем при уровне антител к лекарственному средству, выработка которых индуцируется посредством введения алглюкозидазы-альфа.

Как описано в международной патентной заявке PCT/US2015/053252, одновременно находящейся на рассмотрении патентного ведомства, такие клетки, как клетки CHO, можно применять для получения rhGAA, описанной в данном документе, и данную rhGAA можно применять в настоящем изобретении. Примерами таких линий клеток CHO являются GA-ATB-200 или 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 нацеливаются на CIMPR.

Неожиданно было обнаружено, что возможно трансформировать линии клеток CHO, отбирать трансформантов, которые вырабатывают rhGAA, имеющую высокое содержание гликанов, несущих M6P

или бис-М6Р, которые нацеливаются на CIMPR, и стабильно экспрессировать эту rhGAA с высоким содержанием М6Р. Таким образом, способы получения этих линий клеток CHO также описаны в международной патентной заявке PCT/US2015/053252, одновременно находящейся на рассмотрении патентного ведомства. Данный способ включает трансформацию клетки CHO с помощью ДНК, кодирующей GAA или вариант GAA, отбор клетки CHO, в хромосому(хромосомы) которой стабильно интегрируется ДНК, кодирующая GAA, и которая стабильно экспрессирует GAA, и отбор клетки CHO, которая экспрессирует GAA, имеющую высокое содержание гликанов, несущих М6Р или бис-М6Р, и необязательно отбор клетки CHO, имеющей N-гликаны с высоким содержанием сиаловой кислоты и/или имеющей низкое содержание нефосфорилированных высокоманнозных N-гликанов. По меньшей мере в одном варианте осуществления GAA имеет низкие уровни содержания комплексных гликанов с концевой галактозой.

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

Рекомбинантную кислую α -глюкозидазу человека или ее фармацевтически приемлемую соль можно составить в соответствии с обычными процедурами в виде фармацевтической композиции, приспособленной для введения людям. Например, в предпочтительном варианте осуществления композиция для внутривенного введения представляет собой раствор в стерильном изотоническом водном буфере. При необходимости композиция может также содержать солюбилизирующее средство и местный анестетик для облегчения боли в месте инъекции. Обычно ингредиенты поставляют по отдельности либо смешанными друг с другом в стандартной лекарственной форме, например, в виде сухого лиофилизированного порошка или безводного концентрата в герметически закрытом контейнере, таком как ампула или саше, с указанием количества активного средства. Если композиция предназначена для введения посредством инфузии, ее можно вносить в инфузионную бутылку, содержащую стерильную фармацевтически чистую воду, солевой раствор или смесь декстроза/вода. При введении композиции посредством инъекции может предусматриваться ампула со стерильной водой для инъекции или с солевым раствором для того, чтобы ингредиенты можно было смешать перед введением.

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

Рекомбинантную кислую α -глюкозидазу человека (или композицию или лекарственный препарат, содержащие рекомбинантную кислую α -глюкозидазу человека) вводят в терапевтически эффективном количестве (например, при величине дозы, которая при введении с равными интервалами является достаточной для лечения заболевания, как, например, путем уменьшения интенсивности симптомов, ассоциированных с заболеванием, предупреждения или задержки начала проявления заболевания и/или уменьшения тяжести или частоты возникновения симптомов заболевания). Количество, которое будет терапевтически эффективным при лечении заболевания, будет зависеть от природы и степени выраженности эффектов заболевания и может быть определено с помощью стандартных клинических методик. Кроме того, для содействия в определении оптимальных диапазонов дозы можно необязательно использовать анализы *in vitro* или *in vivo*. Точная доза, подлежащая использованию, также будет зависеть от пути введения и тяжести заболевания и должна быть определена в соответствии с заключением врача и состоянием каждого пациента. Эффективные дозы можно экстраполировать из кривых зависимости доза-ответ, полученных с помощью тестовых систем *in vitro* или в животных моделях. По меньшей мере в одном варианте осуществления рекомбинантную кислую α -глюкозидазу человека вводят путем внутривенной инфузии в дозе, составляющей от приблизительно 5 мг/кг до приблизительно 30 мг/кг, обычно от приблизительно 5 мг/кг до приблизительно 20 мг/кг. По меньшей мере в одном варианте осуществления рекомбинантную кислую α -глюкозидазу человека вводят путем внутривенной инфузии в дозе, составляющей приблизительно 5 мг/кг, приблизительно 10 мг/кг, приблизительно 15 мг/кг или приблизительно 20 мг/кг. По меньшей мере в одном варианте осуществления рекомбинантную кислую α -глюкозидазу человека вводят путем внутривенной инфузии в дозе, составляющей приблизительно 20 мг/кг. Эффективная доза для конкретного индивидуума может варьироваться (например, увеличиваться или уменьшаться) с течением времени в зависимости от потребностей индивидуума. Например, количество можно увеличивать во время соматического заболевания или стресса, или в случае появления или увеличения количества антител к кислой α -глюкозидазе, или при ухудшении симптомов заболевания.

Терапевтически эффективное количество рекомбинантной кислой α -глюкозидазы человека (или композиции или лекарственного препарата, содержащих рекомбинантную кислую α -глюкозидазу человека) вводят с равными интервалами в зависимости от природы и степени выраженности эффектов заболевания и на постоянной основе. Введение с "равными интервалами", как используется в данном доку-

менте, 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 кислую 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.

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

По меньшей мере в одном варианте осуществления миглустат и рекомбинантную кислую α -глюкозидазу человека вводят одновременно. По меньшей мере в одном варианте осуществления миглустат и рекомбинантную кислую α -глюкозидазу человека вводят последовательно. По меньшей мере в одном варианте осуществления миглустат вводят до введения рекомбинантной кислой α -глюкозидазы человека. По меньшей мере в одном варианте осуществления миглустат вводят менее чем за 3 ч до введения рекомбинантной кислой α -глюкозидазы человека. По меньшей мере в одном варианте осуществления миглустат вводят за приблизительно 2 ч до введения рекомбинантной кислой α -глюкозидазы человека. По меньшей мере в одном варианте осуществления миглустат вводят менее чем за 2 ч до введения рекомбинантной кислой α -глюкозидазы человека. По меньшей мере в одном варианте осуществления миглустат вводят за приблизительно 1,5 ч до введения рекомбинантной кислой α -глюкозидазы человека. По меньшей мере в одном варианте осуществления миглустат вводят за приблизительно один час до введения рекомбинантной кислой α -глюкозидазы человека. По меньшей мере в одном варианте осуществления миглустат вводят за от приблизительно 50 мин до приблизительно 70 мин до введения рекомбинантной кислой α -глюкозидазы человека. По меньшей мере в одном варианте осуществления миглустат вводят за от приблизительно 55 мин до приблизительно 65 мин до введения рекомбинантной кислой α -глюкозидазы человека. По меньшей мере в одном варианте осуществления миглустат вводят за от приблизительно 30 мин до введения рекомбинантной кислой α -глюкозидазы человека. По меньшей мере в одном варианте осуществления миглустат вводят за от приблизительно 25 мин до приблизительно 35 мин до введения рекомбинантной кислой α -глюкозидазы человека. По меньшей мере в одном варианте осуществления миглустат вводят за от приблизительно 27 мин до приблизительно 33 мин до введения рекомбинантной кислой α -глюкозидазы человека.

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

По меньшей мере в одном варианте осуществления миглустат вводят после введения рекомбинантной кислой α -глюкозидазы человека. По меньшей мере в одном варианте осуществления миглустат вводят в течение периода до 2 ч после введения рекомбинантной кислой α -глюкозидазы человека. По меньшей мере в одном варианте осуществления миглустат вводят через приблизительно 30 мин после введения рекомбинантной кислой α -глюкозидазы человека. По меньшей мере в одном варианте осуществления миглустат вводят через приблизительно один час после введения рекомбинантной кислой α -глюкозидазы человека. По меньшей мере в одном варианте осуществления миглустат вводят через приблизительно 1,5 ч после введения рекомбинантной кислой α -глюкозидазы человека. По меньшей мере в одном варианте осуществления миглустат вводят через приблизительно 2 ч после введения рекомбинантной кислой α -глюкозидазы человека.

В другом аспекте настоящего изобретения предусмотрен набор для комбинированной терапии болезни Помпе у пациента, нуждающегося в этом. Набор содержит фармацевтически приемлемую лекарст-

венную форму, содержащую миглустат, фармацевтически приемлемую лекарственную форму, содержащую рекомбинантную кислотную α -глюкозидазу человека, определенную в данном документе, и инструкции по введению фармацевтически приемлемой лекарственной формы, содержащей миглустат, и фармацевтически приемлемой лекарственной формы, содержащей рекомбинантную кислотную 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 кислотную 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 кислотную 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 кислотной α -глюкозидазы человека ATB200 и связывается с ее активным сайтом. Таким образом, как видно на фиг. 1, было обнаружено, что миглустат снижает процентную долю развернутого белка ATB200 и стабилизирует активную конформацию ATB200, предотвращая его денатурацию и необратимую инактивацию при нейтральном pH плазмы крови и позволяя ему выдерживать условия в кровотоке достаточно долго, чтобы достичь тканей и быть ими поглощенным. Однако связывание миглустата с активным сайтом ATB200 также может приводить к ингибированию ферментативной активности ATB200 посредством препятствования доступу естественного субстрата гликогена к активному сайту. Полагают, что в случаях, когда миглустат и рекомбинантную кислотную α -глюкозидазу человека вводят пациенту в условиях, описанных в данном документе, концентрации миглустата и ATB200 в плазме крови и тканях являются такими, что ATB200 стабилизируется до тех пор, пока она не сможет быть поглощена тканями и нацелиться на лизосомы, но вследствие быстрого очищения от миглустата гидролиз гликогена с помощью ATB200 в лизосомах чрезмерно не ингибируется присутствием миглустата, 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, миглустата; и активного сайта, для которого он является специфичным;

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

- природе лекарственного средства, например, терапевтического белкового лекарственного препарата, который может представлять собой аналог эндогенного белка, экспрессия которого у субъекта является пониженной или отсутствует, в подходящем случае рекомбинантной кислотной α -глюкозидазы человека, например, рекомбинантной кислотной α -глюкозидазы человека, экспрессируемой в клетках яичника китайского хомячка (CHO) и имеющей увеличенное содержание N-гликановых звеньев, несущих один или несколько остатков маннозо-6-фосфата, в сравнении с содержанием N-гликановых звеньев, несущих один или несколько остатков маннозо-6-фосфата, в α -глюкозидазе-альфа; и в подходящем случае имеющей аминокислотную последовательность, приведенную под SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 (или кодируемую SEQ ID NO: 2), SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 5;

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

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

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

- интервалу дозирования фармакологического шаперона (миглустата) и рекомбинантной кислотной 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 миглустата и рекомбинантной кислотной α -глюкозидазы человека или последовательному введению, например, где миглустат вводят до рекомбинантной кислотной α -глюкозидазой человека или после рекомбинантной кислотной α -глюкозидазы человека или в определенное время до или после введения рекомби-

нантной кислой α -глюкозидазы человека; и

природе пациента, подвергаемого лечению (например, млекопитающего, такого как человек), и постоянно, от которого страдает индивидуум (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 M6P), а затем элюировали в градиенте свободного M6. Фракции собирали в 96-луночный планшет, и активность GAA анализировали на субстрате, представляющем собой 4MU- α -глюкозу. Относительные количества связанной и несвязанной rhGAA определяли на основании активности GAA и регистрировали в виде доли от общего количества фермента.

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

Эффективная доза Myozyme® и Lumizyme® соответствует количеству rhGAA, содержащей M6P, которая нацеливается на CIMPR в мышечных клетках. Однако большая часть rhGAA в этих двух традиционных продуктах не нацеливается на CIMPR-рецептор в целевых мышечных клетках. Введение традиционной rhGAA, где большая часть rhGAA не нацеливается на мышечные клетки, увеличивает риск аллергической реакции или индукции иммунного ответа на ненацеливаемую rhGAA.

Пример 2. Получение клеток CHO, вырабатывающих rhGAA ATB200, имеющую высокое содержание N-гликанов, несущих моно- или бис-M6P.

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. 3. Клетки CHO трансфицировали с помощью ДНК, которая экспрессирует rhGAA, с последующим отбором трансформантов, вырабатывающих rhGAA.

После трансфекции клетки CHO-DG44 (DHFR-), содержащие стабильно интегрированный ген GAA, отбирали на среде без гипоксантина/тимидина (-HT). Усиление экспрессии GAA в этих клетках индуцировали путем обработки метотрексатом (MTX, 500 нМ). Популяции клеток, которые экспрессировали GAA в больших количествах, идентифицировали с помощью анализов активности фермента GAA и использовали для создания отдельных клонов, вырабатывающих rhGAA. Отдельные клоны получали в культуральных чашках с полутвердой средой, собирали с помощью системы ClonePix и переносили в планшеты с 24 глубокими лунками. Отдельные клоны анализировали в отношении активности фермента GAA для идентификации клонов, экспрессирующих GAA на высоком уровне. В кондиционированных средах для определения активности GAA использовали субстрат α -глюкозидазы, представляющий собой 4-MU- α -глюкопиранозид. Клоны, вырабатывающие GAA на более высоких уровнях, что измеряли с помощью анализов фермента 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-M6P- или бис-M6P-N-гликанов, выделяли с помощью данной процедуры.

Пример 3. Захват и очистка rhGAA ATB200.

Несколько партий rhGAA в соответствии с настоящим изобретением получали во встряхиваемых колбах и в перфузионных биореакторах с использованием линии клеток CHO GA-ATB-200, и измеряли связывание с CIMPR. Для очищенной rhGAA ATB200 из разных производственных партий наблюдали связывание с CIMPR-рецептором, аналогичное показанному на фиг. 4B и фиг. 5A (~ 70%), что указывает на то, что rhGAA ATB200 можно получать стабильно. Как показано на фиг. 2A, 2B, 4A и 4B, 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 увеличивающегося количества соли. Мониторинг профилей осуществляли с помощью UV-облучения (A280 нм). rhGAA ATB200 получали из клеток CHO и очищали. Lumizyme® получали из коммерческого источника. Lumizyme® демонстрировал высокий пик слева на его профиле

элюирования. rhGAA ATB200 демонстрировала четыре выраженных пика элюирования справа от Lumizyme® (фиг. 6). 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. 7). Было обнаружено, что образцы ATB200 содержат меньшие количества нефосфорилированных N-гликанов высокоманнозного типа, чем Lumizyme®. Более высокое содержание М6Р-гликанов в ATB200, чем в Lumizyme®, обеспечивает нацеливание rhGAA ATB200 на мышечные клетки с большей эффективностью. Высокая процентная доля монофосфорилированных и бисфосфорилированных структур, определенная с помощью MALDI, согласуется с профилями связывания с CIMPR, которые иллюстрируют значительно большую степень связывания ATB200 с CIMPR-рецептором. Анализ N-гликанов посредством масс-спектрометрии MALDI-TOF подтвердил, что в среднем каждая молекула ATB200 содержит по меньшей мере одну природную бис-М6Р-N-гликановую структуру. Это более высокое содержание бис-М6Р-N-гликанов в rhGAA ATB200 напрямую коррелирует со связыванием с CIMPR с высокой аффинностью в анализах связывания с рецептором М6Р на планшетах (KD приблизительно 2-4 нМ), фиг. 9А.

rhGAA ATB200 также анализировали в отношении профилей сайт-специфических N-гликанов с помощью двух разных аналитических методик LC-MS/MS. В первом анализе белок подвергали денатурации, восстановлению, алкилированию и расщеплению перед проведением анализа по методу LC-MS/MS. В ходе денатурации и восстановления белка 200 мкг образца белка, 5 мкл 1 моль/л Tris-HCl (конечная концентрация 50 мМ), 75 мкл 8 моль/л гуанидина-HCl (конечная концентрация 6 М), 1 мкл 0,5 моль/л EDTA (конечная концентрация 5 мМ), 2 мкл 1 моль/л DTT (конечная концентрация 20 мМ) и воду Milli-Q® добавляли в пробирку объемом 1,5 мл с получением общего объема 100 мкл. Образец перемешивали и инкубировали при 56°C в течение 30 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 ч) 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.

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

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

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

Как можно видеть на фиг. 8В-8Н, первые два анализа давали сходные результаты, хотя между результатами было некоторое различие. Это различие может быть обусловлено рядом факторов, в том числе используемым прибором и полнотой анализа N-гликанов. Например, если некоторые формы фосфорилированных гликанов не были идентифицированы и/или не были 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 мере, и процентная доля rhGAA, несущей фосфорилированные гликаны в данном сайте, может быть представлена чрезмерно большим количеством.

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

На фиг. 8В показан профиль N-гликозилирования для первого сайта - N84. Как можно видеть на фиг. 8В, 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. 8С показан профиль N-гликозилирования для второго сайта - N177. Как можно видеть на фиг. 8С, 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. 8D показан профиль N-гликозилирования для третьего сайта - N334. Как можно видеть на фиг. 8D, 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. 8Е показан профиль N-гликозилирования для четвертого сайта - N414. Как можно видеть на фиг. 8Е, 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. 8F показан профиль N-гликозилирования для пятого сайта - N596. Как можно видеть на фиг. 8F, 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. 8G показан профиль N-гликозилирования для шестого сайта - N826. Как можно видеть на фиг. 8G, основными формами гликанов были двух-, трех- и четырехантенные комплексные гликаны. Как в первом, так и во втором анализах выявили, что более 80% АТВ200 имели остаток сиаловой кислоты в шестом сайте.

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

Пример 6. Получение характеристик аффинности АТВ200 к CIMPR.

В дополнение к наличию более высокой процентной доли rhGAA, которая может связываться с CIMPR, важно понимать качество такого взаимодействия. Связывание Lumizyme® и rhGAA АТВ200 с рецепторами определяли с помощью анализа связывания с CIMPR на планшетах. Вкратце, планшеты, покрытые CIMPR, использовали для захвата GAA. На иммобилизованный рецептор наносили rhGAA в различных концентрациях, и несвязанную rhGAA вымывали. Количество оставшейся rhGAA определяли по активности GAA. Как показано на фиг. 9А, rhGAA АТВ200 связывалась с CIMPR значительно лучше, чем Lumizyme®.

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

Пример 7. rhGAA АТВ200 более эффективно интернализировалась фибробластами, чем Lumizyme®.

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

Также было показано, что rhGAA АТВ200 эффективно интернализировалась в клетки (фиг. 10А и 10В, на которых соответственно показано, что rhGAA АТВ200 интернализируется как в нормальные

клетки-фибробласты, так и в клетки-фибробласты при болезни Помпе, и что она интернализируется в большей степени, чем традиционная rhGAA Lumizyme®). rhGAA ATB200 насыщает клеточные рецепторы при приблизительно 20 нМ, тогда как в случае с Lumizyme® необходимо приблизительно 250 нМ. Константа эффективности поглощения ($K_{\text{поглощение}}$), экстраполированная из этих результатов, составляет 2-3 нМ для ATB200 и 56 нМ для Lumizyme®, что показано на фиг. 10С. Эти результаты позволяют предположить, что rhGAA ATB200 представляет собой хорошо нацеливаемое средство для лечения болезни Помпе.

Пример 8. Популяционное фармакокинетическое (ПК) моделирование для ATB200 и миглустата.

Фармакокинетические данные для кислой α -глюкозидазы (ATB200), в том числе моменты времени отбора образцов, хронологию введения доз и значения концентрации кислой α -глюкозидазы в плазме крови, получали от мышей, крыс и обезьян, которым вводили ATB200 путем внутривенной инъекции. Фармакокинетические данные для миглустата и дувоглустата в плазме крови и ткани собирали у людей или мышей.

Моделирование и имитационные эксперименты осуществляли с помощью Phoenix® NLME™ v1.3. Для оценки ПК ATB200 в плазме крови конструировали компартментные ПК-модели. Модели включали: описание взаимосвязи между концентрацией в плазме крови и временем; компонент дисперсии, характеризующий межорганизменную и внутриорганизменную изменчивость параметров модели у животных; и компонент, описывающий неопределенность в уровне знаний о критически важных компонентах модели.

Нелинейные модели со смешанными эффектами (NLME) имеют форму:

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

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

где $C_{p_{ij}}$ представляет собой концентрацию в j -й момент времени сбора (t_j) для животного i , D_i представляет собой хронологию введения доз для животного i , θ_i представляет собой вектор ПК-параметров для животного i , и ε_{ij} представляет собой случайную погрешность, связанную с j -й концентрацией для животного i .

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

$$\theta_m = \theta_{TVm} \exp(\eta_m),$$

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

где θ_{TVm} представляет собой типичное значение n -го ПК-параметра (например, клиренса) в популяции, и η_m представляет собой случайный межорганизменный эффект у животных в отношении n -го параметра для животного i . Случайные эффекты $(\eta_1, \dots, \eta_m)$ имели нормальное распределение со средним значением, составляющим 0, и оцененной дисперсией ω^2 , включенной в матрицу OMEGA (Ω).

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

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

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

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

Исходную концентрацию кислой α -глюкозидазы моделировали в виде $C_{\text{исходная}}$ = скорость синтеза кислой α -глюкозидазы/ CL , и ее можно экстраполировать на людей, поскольку $C_{\text{исходная}}$ является видоспецифической, не зависит от концентрации ATB200 и известна у людей с болезнью Помпе. Базовую модель определяли с помощью FOCE-ELS на Phoenix® для оценки того, какая из 1- или 2-компаратментной модели лучше всего согласуется с данными. Источники изменчивости ПК кислой α -глюкозидазы также исследовали визуально и путем выявления влияния различных эффектов, связанных с диким типом/видом/дозой, на ПК.

В случае с ATB200 двухкомпаратментная модель с линейным выведением надлежащим образом характеризует профили зависимости концентрации активной формы кислой α -глюкозидазы от времени при всех уровнях дозы среди различных видов животных. Модель включала теоретический аллометрический компонент, учитывающий влияние разницы в весе тела среди различных видов животных на клиренс (CL) и объем распределения (Vc). Точность подбора популяционной ПК-модели для ATB200 показана на фиг. 11. Популяционные ПК-параметры ATB200, полученные в неклинических исследованиях, представ-

лены в табл. 1.

Таблица 1

РК-параметр	Типичные значения (относительная среднеквадратическая погрешность (%))	Межсубъектная изменчивость (%)
Системный клиренс (CL; л/ч.)	$0,00957 \times (BW/0,25)^{0,78}$ (5,1) (3,2)	21,0
Центральный объем распределения (V_c ; л)	$0,0101 \times (BW/0,25)^{0,83}$ (4,3) (1,7)	5,3
Периферический клиренс (CL _d ; л/ч.)	$0,000290 \times (BW/0,25)^{0,78}$ (43,2)	NA
Периферический объем распределения (V_2 ; л)	$0,000653 \times (BW/0,25)^{0,83}$ (35,6)	NA
Скорость синтеза эндогенной кислой α - глюкозидазы (SYNT; мг/ч.)	Мышь: 0,00401 (8,1) Крыса: 0,0203 (13,3) Обезьяна: 0,00518 (16,9)	NA

BW: вес тела.

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

Точность подбора РК-модели для дувоглустата показана на фиг. 13А и 13В. Конечные смоделированные РК-параметры дувоглустата в плазме крови и тканях показаны в табл. 2.

Таблица 2

РК-параметр	Типичные значения (CV, %)
Объем распределения (V ; л)	44,5 (7,41)
Системный клиренс (CL; л/ч.)	9,44 (6,99)
Константа скорости всасывания (K_a ; 1/ч.)	1,10 (14,0)
Периферический объем распределения (V_2 ; л)	8,68 (19,39)
Клиренс в центральном компартменте (CL ₂ ; л/ч.)	0,205 (23,7)
Межкомpartmentный объем распределения (V_Q ; л)	61,8 (21,2)
Константа скорости выведения (K_{eo})	0,378 (11,1)
Межкомpartmentный объем распределения в центральной компартменте (V_{Q2} ; л)	3390
Клиренс в периферическом компартменте (CL ₃ ; л/ч.)	88,0 (7,72)
Кажущийся межкомpartmentный клиренс (CL _Q ; л/ч.)	40,6 (10,6)
Время запаздывания (ч.)	0,176 (30,7)
Относительная среднеквадратическая погрешность для центрального компартмента	0,477 (6,56)
Относительная среднеквадратическая погрешность для периферического компартмента	0,368 (8,19)

CV: коэффициент изменчивости.

Популяционную РК-модель для миглустата конструировали с учетом перорального введения доз мышам с нокаутом (KO) Gaа. Популяционные РК-параметры миглустата у мышей с KO Gaа представлены в табл. 3. Точность подбора показана на фиг. 14. Модель имела остаточную аддитивную погрешность, составляющую 0,475 нг/мл.

Таблица 3

РК-параметр	Типичные значения (BSV, %)
Константа скорости всасывания (K_a ; ч. ⁻¹)	2,09 (4,56)
Системный клиренс (CL; мл/ч.)	43,3 (9,61)
Центральный объем распределения (V_c ; мл)	4,55 (45,1)
Периферический клиренс (CL _d ; мл/ч.)	4,57 (32,1)
Периферический объем распределения (V_2 ; мл)	19,6 (23,3)

BSV: межсубъектная изменчивость.

Пример 9. Моделирование фармакокинетических параметров (PK) рекомбинантной кислой α -

глюкозидазы (АТВ200) у людей.

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

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

Таблица 4

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

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

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

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

Мышам с нокаутом Gaa вводили кислую α -глюкозидазу (АТВ200) внутривенно в дозах 5, 10 и 20 мг/кг, возрастающие пероральные дозы миглустата (1, 3 и 10 мг/кг) одновременно с внутривенными дозами 5 или 10 мг/кг АТВ200 или возрастающие пероральные дозы миглустата (1, 3, 5, 10, 20 и 30 мг/кг) одновременно с внутривенными дозами 20 мг/кг АТВ200. Уровни гликогена измеряли, как описано ранее (Khanna, R, Flanagan, JJ, Feng, J, Soska, R, Frascella, M, Pellegrino, LJ et al. (2012). "The pharmacological chaperone AT2220 increases recombinant human acid α -glucosidase uptake and glycogen reduction in a mouse model of Pompe disease". PLoS One 7(7): e40776). Рассчитывали соотношения уровней гликогена, наблюдаемых после каждой обработки в рамках комбинированной терапии, и уровня гликогена, наблюдаемого после монотерапии (соотношение уровней гликогена). Результаты представлены в табл. 5.

Таблица 5

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

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

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

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

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

Как видно из результатов на фиг. 17, совместное введение доз 10 и 20 мг/кг миглустата с дозой 20 мг/кг АТВ200 обеспечивает хорошую стабильность активной формы кислой α -глюкозидазы в плазме крови с максимальным снижением при этом уровня гликогена. Более низкие дозы миглустата (1, 3 и 5 мг/кг), как полагают, приводят к субоптимальной стабилизации активной формы кислой α -глюкозидазы, тогда как наиболее высокая доза миглустата (30 мг/кг), как полагают, приводит к чрезмерному ингибированию активной формы α -глюкозидазы в лизосомах.

Согласно фармакокинетическим моделям (пример 8) ожидается, что наблюдаемое соотношение AUC миглустата/АТВ200, составляющее 0,01159 (10 мг/кг миглустата при совместном введении с 20

мг/кг АТВ200), будет соответствовать дозе миглустата, составляющей приблизительно 270 мг, при совместном введении с 20 мг/кг АТВ200 у типичного человека весом 70 кг. Соотношения AUC, составляющие 0,01 и 0,02, будут соответствовать дозам миглустата 233 и 466 мг соответственно при совместном введении с 20 мг/кг АТВ200 у типичного субъекта весом 70 кг.

Пример 11. Моделирование концентраций миглустата/дувоглустата у людей

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

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

Таблица 6

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

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

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

Мышам с нокаутом Гаа 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, четырехглавой мышцы и диафрагмы собирали через две недели после введения последней дозы рекомбинантной кислой α -глюкозидазы человека. Ткань камбаловидной мышцы и диафрагмы анализировали в отношении уровней гликогена путем окрашивания реактивом Шиффа и йодной кислотой (PAS) и в отношении пролиферации лизосом путем измерения уровней маркерного мембранного белка, ассоциированного с лизосомами (LAMP1), экспрессия которого повышается при болезни Помпе. Полутонкие срезы четырехглавой мышцы, залитые в эпоксидную смолу (Epon), окрашивали метиленовым синим и исследовали с помощью электронной микроскопии (1000x) для определения степени наличия вакуолей. Образцы четырехглавой мышцы анализировали иммуногистохимическим способом для определения уровней маркеров аутофагии легкой цепи 3 ассоциированного с микротрубочками белка 1A/1B, конъюгированной с фосфатидилэтаноламином (LC3A II), и p62, инсулинзависимого переносчика глюкозы GLUT4 и инсулиннезависимого переносчика глюкозы GLUT1.

В аналогичном исследовании мышам с нокаутом Гаа 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 путем окрашивания реактивом Шиффа и йодной кислотой (PAS) и в отношении пролиферации лизосом путем измерения уровней LAMP1.

Как видно на фиг. 20, 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. 21, при введении АТВ200 демонстрировалось снижение уровней гликогена в виде точечных отложений в сердечной и скелетной мышечной ткани (ткани камбаловидной мышцы) в сравнении с традиционной обработкой 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. 22, при совместном введении миглустата с АТВ200 значительно снижалось число вакуолей в мышечном волокне четырехглавой мышцы у мышей с нокаутом Гаа в сравнении с необработанными мышцами и мышцами, обработанными алглюкозидазой-альфа. Как видно на фиг. 23, уровни как LC3 II, так и p62 были увеличены у мышей с нокаутом Гаа в сравнении с мышцами 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 мышцами 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 мышечной модели болезни Помпе.

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

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

Таблица 7

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

NG: назогастральный.

Тестируемые уровни дозы выбирали с учетом предыдущих исследований на отличных от человека приматах для получения значений воздействия (AUC), сравнимых с ожидаемыми клиническими значениями AUC у людей, которым вводили дозу 260 мг миглустата и 20 мг/кг АТВ200, или незначительно превышающих их (для группы введения 25 мг/кг миглустата и 50 мг/кг АТВ200), или примерно в 10 и 3 раза превышающих их (для групп введения 175 мг/кг миглустата и/или 100 мг/кг АТВ200), предсказанных на основе фармакокинетических моделей из примера 8 (соответственно примерно 20,9 ч·мкг/мл и примерно 1822 ч·мкг/мл). В предыдущих исследованиях на отличных от человека приматах было обнаружено, что IV доза 100 мг/кг АТВ200 дает в результате AUC, составляющую 5330 ч·мкг/мл, и пероральную дозу 175 мг/кг миглустата экстраполировали с получением AUC, составляющей 196 ч·мкг/мл.

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

давали в комбинации. Объем вводимой дозы во всех группах составлял 10 мл/кг.

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

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

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

Общие уровни антител к лекарственному средству (ADA) и нейтрализующих антител (NAb) измеряли в плазме крови. Образцы крови (примерно 1,6 мл) собирали в пробирки с K_2EDTA у всех животных один раз в ходе акклиматизации, перед введением дозы (до введения миглустата) и в дни 1, 85 и 99. Образцы выдерживали в жидком льду до обработки. Плазму крови получали путем центрифугирования при температуре от 2 до 8°C, и аликвоты (примерно 0,2 мл) переносили в полипропиленовые флаконы и хранили в замороженном состоянии при температуре от -60 до -86°C в течение 1 ч с момента взятия крови. Анализ образцов в отношении ADA проводили с использованием образцов, собранных у животных из групп 1, 2, 3 и 5 (образцы, полученные от животных, которым вводили только миглустат, не анализировали). Анализ нейтрализующих антител проводили с помощью ферментного анализа с флуорогенным субстратом 4-метилумбеллиферил- α -D-глюкопиранозидом (4MU-Glc).

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

Токсикокинетические характеристики АТВ200.

Токсикокинетические характеристики АТВ200 измеряли в образцах крови, собранных в пробирки с K_2EDTA у животных в дни 1 и 85, в следующие моменты времени:

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

для группы 4: перед введением дозы (до введения миглустата); через 1,5 ч после введения миглустата; через 2,5 ч после введения миглустата; через 3,5 ч после введения миглустата; через 4,5 ч после введения миглустата; через 6,5 ч после введения миглустата; через 12,5 ч после введения миглустата; через 26,5 ч после введения миглустата; через 168,5 ч после введения миглустата и через 336,5 ч после введения миглустата (собирали до введения дозы в день 15).

Плазму крови получали путем центрифугирования при температуре от 2 до 8°C, и аликвоты (примерно 0,1 мл) переносили в полипропиленовые флаконы и хранили в замороженном состоянии при температуре от -60 до -86°C. Анализ активной формы кислой α -глюкозидазы АТВ200 и общего белка АТВ200 проводили с использованием образцов, полученных через 2 ч после введения дозы, от животных из группы 1 и всех образцов, собранных у животных из групп 2, 3 и 5. Уровень общего белка АТВ200 измеряли с помощью жидкостной хроматографии в сочетании с tandemной масс-спектрометрией (LC-MS/MS). Два сигнатурных пептида (TPTFFPK и VTSEGAGLQLQK) использовали в качестве показате-

ля наличия АТВ200. Результаты для этих двух пептидов были стабильными, что указывает на то, что в анализируемых образцах плазмы крови присутствовала интактная АТВ200. Активную форму кислой α -глюкозидазы анализировали с использованием флуорогенного субстрата 4-метилумбеллиферил- α -D-глюкопиранозида (4MU-Glc).

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

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

R^2 - квадрат коэффициента корреляции для линейной регрессии, применяемой для оценки $\lambda_{z\alpha}$. Применяется в случае, когда для определения конечной фазы (или конкретного диапазона времени) профиля зависимости концентрации от времени используется установленное число точек;

R^2 скорр. - квадрат коэффициента корреляции для линейной регрессии, применяемой для оценки λ_z , скорректированный с учетом числа точек, используемых при оценке $\lambda_{z\beta}$. Применяется в случае, когда число точек, используемых для определения конечной фазы профиля зависимости концентрации от времени, может варьироваться;

число точек λ_z - число точек для линейного регрессионного анализа, используемое для оценки λ_z ;

$\lambda_{z\alpha}$ - константа скорости выведения для первых трех моментов времени после $t_{\max}$;

$\lambda_{z\beta}$ - конечная константа скорости выведения;

$t_{1/2\alpha}$ - период полувыведения по первым трем моментам времени после $t_{\max}$;

$t_{1/2\beta}$ - конечный период полувыведения из расчета λ_z ($0,693/\lambda_z$);

$t_{\max}$ - время достижения максимальной концентрации аналита в плазме крови;

$C_{\max}$ - максимальная наблюдаемая концентрация аналита в плазме крови;

AUC_{0-t} - площадь под кривой зависимости концентрации в плазме крови от времени (AUC), измеренная от момента времени 0 (перед введением дозы) до момента времени определения последней подаваемой измерению концентрации;

$AUC_{0-\infty}$ - AUC, экстраполированная до бесконечности времени;

AUC_{ext} - часть AUC, экстраполированной до бесконечности времени, представленная как % от общей $AUC_{0-\infty}$;

CL_T - общий клиренс (по $\lambda_{z\beta}$); из расчета общей дозы в мг по фактическому весу тела;

CL_T/F - общий клиренс (из расчета $\lambda_{z\beta}$); из расчета общей дозы в мг по фактическому весу тела, деленный на биодоступную часть;

V_{ss} - кажущийся объем распределения в равновесном состоянии;

V_z - объем распределения в конечной фазе (из расчета $\lambda_{z\beta}$); из расчета общей дозы в мг по фактическому весу тела;

V_z/F - объем распределения в конечной фазе (из расчета $\lambda_{z\beta}$); из расчета общей дозы в мг по фактическому весу тела, деленный на биодоступную часть; и

соотношения накопления - $AR_{C_{\max}}$ = соотношение значений $C_{\max}$ в день 85 и день 1;

AR_{AUC} = соотношение значений AUC_{0-t} в день 85 и день 1.

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

Таблица 8

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

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

Таблица 9

Группа	Обработка	Параметр	Единицы измерения	Анализ общего белка		Анализ активной формы
				ТТРТФФПК	VTSEGA GLQLQK	
2	50 мг/кг АТВ200 + 25 мг/кг миглустата	$t_{\max}$	ч.	2,00	2,00	2,13
		$C_{\max}$	мкг/мл	927	921	586
		AUC_{0-t}	ч. · мкг/мл	3700	3700	2390
		$t_{1/2\alpha}$	ч.	1,98	1,95	2,35
		$t_{1/2\beta}$	ч.	2,38	2,40	2,31
		CL_T	л/ч.	0,049	0,049	0,076
		V_{ss}	л	0,147	0,147	0,223
		V_z	л	0,168	0,168	0,254
3	100 мг/кг АТВ200 + 175 мг/кг миглустата	$t_{\max}$	ч.	2,13	2,19	2,06
		$C_{\max}$	мкг/мл	2270	2270	1600
		AUC_{0-t}	ч. · мкг/мл	13900	13800	9240
		$t_{1/2\alpha}$	ч.	3,62	3,72	3,34
		$t_{1/2\beta}$	ч.	4,83	4,83	2,90
		CL_T	л/ч.	0,027	0,027	0,040
		V_{ss}	л	0,140	0,140	0,186
		V_z	л	0,174	0,174	0,165

5	100 мг/кг АТВ200 качестве монотерапии	в	t_{max}	ч.	2,13	2,13	2,00
			C_{max}	мкг/мл	2020	2010	1510
			AUC_{0-t}	ч. · мкг/мл	7830	7790	4890
			$t_{1/2\alpha}$	ч.	1,93	1,88	1,44
			$t_{1/2\beta}$	ч.	6,62	2,63	2,03
			CL_T	л/ч.	0,045	0,045	0,070
			V_{ss}	л	0,143	0,127	0,159
			V_z	л	0,396	0,170	0,205

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

Воздействие, измеренное по C_{max} и AUC_{0-t} , было относительно более слабым при измерении в анализе активной формы кислой α -глюкозидазы. Этого и следовало ожидать, поскольку в анализе общего белка измеряли концентрацию как активного, так и неактивного фермента, тогда как в анализе активной формы кислой α -глюкозидазы измеряли концентрацию только активного фермента. Воздействие АТВ200 увеличивалось с возрастанием дозы при уровнях дозы от 50 до 100 мг/кг. Среднее значение начального $t_{1/2\alpha}$ в день 1 (объединенные данные от самцов и самок) по первым трем моментам времени после t_{max} находилось в диапазоне от 1,28 до 3,07 ч. Среднее значение конечного периода полувыведения ($t_{1/2\beta}$) в день 1 находилось в диапазоне от 1,70 до 11,1 ч (на более высокие значения $t_{1/2\beta}$ у животных влияли концентрации, поддающиеся измерению в пределах периода до 168 ч после введения дозы). Сходный диапазон значений наблюдали после введения дозы в день 85. При повторном введении один раз в две недели наблюдали накопление в небольшом количестве или его отсутствие. Добавление 175 мг/кг миглустата к дозе 100 мг/кг АТВ200, по-видимому, снижает клиренс АТВ200 и увеличивает ее воздействие в плазме крови примерно в 2 раза в сравнении со 100 мг/кг АТВ200 в качестве монотерапии.

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

Токсикокинетические характеристики миглустата.

Токсикокинетические характеристики миглустата измеряли в образцах крови, собранных в пробирки с K_2EDTA у животных в дни 1 и 85, в следующие моменты времени:

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

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

Плазму крови получали путем центрифугирования при температуре от 2°C до 8°C, и аликвоты (примерно 0,2 мл) переносили в полипропиленовые флаконы и хранили в замороженном состоянии при температуре от -60°C до -86°C. Анализ концентрации миглустата проводили с помощью способа LC-MS/MS, аналогичного описанному в отношении анализа концентрации дувоглустата в Richie Khanna, Allan C. Powe Jr., Yi Lun, Rebecca Soska, Jessie Feng, Rohini Dhulipala, Michelle Frascella, Anadina Garcia, Lee J. Pellegrino, Su Xu, Nastry Brignol, Matthew J. Toth, Hung V. Do, David J. Lockhart, Brandon A. Wustman, Kenneth J. Valenzano. "The Pharmacological Chaperone AT2220 Increases the Specific Activity and Lysosomal Delivery of Mutant Acid Alpha-Glucosidase, and Promotes Glycogen Reduction in Transgenic Mouse Model of Pompe Disease." PLOS ONE (1 July 2014) 9(7): e102092.

Анализ токсикокинетических (ТК) данных для миглустата осуществляли с использованием аудируемых/верифицированных наборов данных (концентрация и время) от животных из групп 2, 3 и 4 с помощью программного обеспечения WinNonlin Phoenix® версии 6.1 (Pharsight Corporation). Некомпарментный анализ индивидуальных данных о концентрации в плазме крови применяли для оценки ТК-

параметров. ТК-параметры миглустата оценивали с помощью линейно-логарифмического метода трапеций. В основе регрессии, применяемой для оценки λ_z , лежали равномерно взвешенные данные о концентрации. Рассчитывали следующие параметры:

R^2 скорр. - квадрат коэффициента корреляции для линейной регрессии, применяемой для оценки λ_z , скорректированный с учетом числа точек, используемых при оценке λ_z . Применяется в случае, когда число точек, используемых для определения конечной фазы профиля зависимости концентрации от времени, может варьироваться;

число точек λ_z - число точек для линейного регрессионного анализа, используемое для оценки λ_z ;

λ_z - конечная константа скорости выведения;

$t_{1/2}$ - конечный период полувыведения из расчета λ_z ($0,693/\lambda_z$);

$t_{\max}$ - время достижения максимальной концентрации ананта в плазме крови;

$C_{\max}$ - максимальная наблюдаемая концентрация ананта в плазме крови;

AUC_{0-t} - площадь под кривой зависимости концентрации в плазме крови от времени (AUC), измеренная от момента времени 0 (перед введением дозы) до момента времени определения последней подающейся измерению концентрации;

$AUC_{0-\infty}$ - AUC, экстраполированная до бесконечности времени;

AUC_{ext} - часть AUC, экстраполированной до бесконечности, представленная как % от общей $AUC_{0-\infty}$;

L_T/F - общий клиренс, деленный на биодоступную часть, из расчета общей дозы в мг по фактическому весу тела;

V_z/F - объем распределения в конечной фазе, деленный на биодоступную часть, из расчета общей дозы в мг по фактическому весу тела;

соотношения накопления - $AR_{C_{\max}}$ = соотношение значений $C_{\max}$ в день 85 и день 1; и AR_{AUC} = соотношение значений AUC_{0-t} в день 85 и день 1.

Стабильный эффект пола в отношении ТК-параметров миглустата не наблюдался. Концентрации миглустата в плазме крови после назогастрального (NG) введения 25 мг/кг в комбинации с 50 мг/кг АТВ200 либо NG введения 175 мг/кг (со 100 мг/кг АТВ200 или без него) поддавались измерению в пределах периода 74,5 ч (последний момент времени измерения). Токсикокинетические параметры для однократной дозы (день 1) и для повторного введения доз (день 85) показаны в табл. 10.

Таблица 10

Группа	Обработка	Параметр	Единицы измерения	Анализ миглустата	
				День 1	День 85
2	50 мг/кг АТВ200 + 25 мг/кг миглустата	$t_{\max}$	ч.	2,06	2,88
		$C_{\max}$	нг/мл	7430	7510
		AUC_{0-t}	ч. · нг/мл	47300	49100
		$t_{1/2}$	ч.	7,44	8,23
		CL_T/F	л/ч.	1,92	1,99
		V_z/F	л	20,5	23,3
3	100 мг/кг АТВ200 +	$t_{\max}$	ч.	2,69	3,56
		$C_{\max}$	нг/мл	20400	22000
	175 мг/кг миглустата	AUC_{0-t}	ч. · нг/мл	182000	216000
		$t_{1/2}$	ч.	6,85	7,86
		CL_T/F	л/ч.	3,22	3,62
		V_z/F	л	32,3	39,1
4	175 мг/кг миглустата в качестве монотерапии	$t_{\max}$	ч.	3,00	4,13
		$C_{\max}$	нг/мл	16400	14700
		AUC_{0-t}	ч. · нг/мл	173000	204000
		$t_{1/2}$	ч.	6,86	6,66
		CL_T/F	л/ч.	3,67	3,49
		V_z/F	л	35,9	33,8

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

Поскольку нежелательные изменения, связанные с тестируемым препаратом, не были идентифицированы, то уровень дозы, не вызывающей обнаруживаемых нежелательных эффектов (NOAEL), для миглустата, даваемого макакам-крабоедам один раз в две недели в течение 13 недель назогастрально при введении АТВ200 или без него, составлял 175 мг/кг/доза, что было наиболее высокой тестируемой дозировкой. При данном уровне дозы усредненные по полу средние значения AUC_{0-t} и C_{max} в день 85 составляли соответственно 204000 ч·нг/мл и 14700 нг/мл для миглустата в отдельности и соответственно 216000 ч·нг/мл и 22000 нг/мл для комбинации со 100 мг/кг АТВ200.

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

План исследования.

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

В стадию 1 включают двенадцать субъектов с болезнью Помпе (примерно 6 амбулаторных и 6 неамбулаторных), получающих заместительную ферментную терапию (ERT). Эти же субъекты продолжают исследование на стадии 2. До включения неамбулаторных субъектов включают по меньшей мере 4 амбулаторных субъектов и вводят им дозы. Субъекты (амбулаторные), получавшие ERT, определяются как субъекты, которые получали ERT в течение 2-6 лет до включения, способны пройти по меньшей мере 200 метров в тесте с шестиминутной ходьбой (6MWT) и имеют показатель FVC, составляющий 30-80% от предсказанного нормального значения. Субъекты (неамбулаторные), получавшие ERT, определяются как субъекты, которые полностью прикованы к инвалидной коляске, неспособны ходить без посторонней помощи и получали ERT в течение ≥ 2 лет до включения. Распределение в группы лечения показано в табл. 11.

Таблица 11

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

ERT = заместительная ферментная терапия.

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

Процедуры, предусмотренные исследованием.

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

Скрининг.

Все субъекты предоставляют информированное согласие и проходят осмотр для определения соответствия критериям отбора. Оценки для всех субъектов охватывают медицинский анамнез, в том числе предшествующие реакции, связанные с инфузией (IAR), и случаи падения в анамнезе; рассмотрение получаемых ранее и сопутствующих лекарственных препаратов и немедикаментозных видов терапии; показатели жизненно важных функций (частота сердечных сокращений [HR], частота дыхания [RR], кровя-

ное давление [BP] и температура); рост; вес; комплексный физикальный осмотр (PE); электрокардиограмму в 12 отведениях (ECG); клиничко-лабораторные оценки безопасности (биохимический анализ сыворотки крови, общий анализ крови и общий анализ мочи); тест для диагностики беременности путем анализа мочи; оценку уровня тетрасахарида гексозы в образце мочи (Hex4) и генотипирование по GAA (для субъектов, для которых на момент скрининга не было возможности получить отчет о генотипировании по GAA). Также при необходимости получают образец крови для оценки иммуногенности путем поискового исследования (общие и нейтрализующие антитела, поисковое исследование уровней цитокинов/других биомаркеров активации иммунной системы, перекрестная реактивность с алглюкозидазой-альфа и уровень иммуноглобулина E [IgE]). Субъекта, который соответствует всем критериям включения и ни одному из критериев исключения, переводят на стадию 1, описанную в табл. 11.

Определение исходного уровня.

Оценки безопасности для всех субъектов охватывают рассмотрение критериев отбора; медицинский анамнез, в том числе реакции, связанные с инфузией (IAR), и случаи падения в анамнезе, изучение нежелательных явлений (AE) и серьезных AE (SAE), рассмотрение получаемых ранее и сопутствующих лекарственных препаратов и немедикаментозных видов терапии; показатели жизненно важных функций (HR, RR, BP и температура); вес; беглый PE; ECG; показатель по шкале жизнедеятельности при болезни Помпе, построенной с помощью анализа Раша (R-PAct); показатель по Роттердамской шкале инвалидизации и показатель по шкале оценки выраженности утомляемости; клиничко-лабораторные оценки безопасности (биохимический анализ сыворотки крови, общий анализ крови и общий анализ мочи); тест для диагностики беременности путем анализа мочи; оценки фармакодинамических параметров (PD) (Hex4 и креатининфосфокиназа [CPK]); оценки иммуногенности (общие и нейтрализующие антитела, перекрестная реактивность антител с алглюкозидазой-альфа, поисковое исследование уровней цитокинов и других биомаркеров активации иммунной системы, перекрестная реактивность с алглюкозидазой-альфа и при необходимости уровень IgE); тесты легочных функций (PFT); тесты двигательных функций и тесты мышечной силы для всех субъектов.

Стадия 1, периоды 1, 2 и 3.

Данная стадия охватывает следующее.

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

PD: уровень Hex4 в моче и уровень CPK в сыворотке крови.

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

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

Стадия 2, периоды 4 и 5.

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

PD: уровень Hex4 в моче и уровень CPK в сыворотке крови.

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

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

Завершение фазы исследования фармакокинетических параметров.

Безопасность: рассмотрение AE, в том числе SAE и IAR; рассмотрение сопутствующих лекарственных препаратов и немедикаментозных видов терапии; показатели жизненно важных функций (HR, RR,

ВР и температура); вес; РЕ; ECG; клинико-лабораторные оценки безопасности (биохимический анализ сыворотки крови, общий анализ крови и общий анализ мочи) и тест для диагностики беременности путем анализа мочи

РД: уровень Нех4 в моче и уровень СРК в сыворотке крови.

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

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

Субъектам, которые завершили данное исследование, и/или другим субъектам, которые соответствуют установленным требованиям, предоставляется возможность участия в долгосрочном расширенном исследовании, и у них продолжают оценивать безопасность и переносимость АТВ200 при совместном введении с миглустатом. Кроме того, в расширенном исследовании осуществляют функциональные оценки, касающиеся болезни Помпе, через равные интервалы.

Мониторинг безопасности.

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

Сигнальное введение доз.

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

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

После введения доз 2 субъектам сигнальной когорты в каждом периоде исследования на стадии 1 оценка доступных данных о безопасности (РЕ, показатели жизненно важных функций, АЕ, инфузионные реакции, ECG и доступные данные осуществляемых на местном уровне лабораторных тестов) осуществляется в пределах периода 24-48 ч медицинским наблюдателем и исследователями. SSC собирается для проведения формальной экспертизы безопасности, когда доступны данные о безопасности из центральной лаборатории для обоих субъектов сигнальной когорты при каждом уровне дозы. Если SSC определяет, что проблемы безопасности, которые не позволяют осуществлять введение доз при уровне дозы, соответствующем данному периоду, отсутствуют, то включают 10 дополнительных субъектов и вводят им дозы. SSC также собирается для проведения экспертизы безопасности, когда доступны данные о безопасности (в том числе данные о безопасности из центральной лаборатории) для всех субъектов при всех 3 уровнях дозы на стадии 1.

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

SSC может рекомендовать любое из следующих заключений:

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

Если, по мнению SSC, у субъектов сигнальной группы отсутствуют АЕ или проблемы безопасности, которые могут не позволять продолжать введение доз в рамках исследования, то введение доз будут продолжать для всех остальных субъектов при данном уровне дозы. Будет продолжаться осуществляться тщательный мониторинг безопасности для субъектов медицинским наблюдателем и исследователями,

проводящими данное исследование, на постоянной основе и SSC через равные интервалы.

Число субъектов (планируемое).

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

Постановка диагноза и критерии отбора.

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

Критерии включения.

Субъекты, получавшие ERT (амбулаторные).

1. Субъекты мужского и женского пола возрастом от 18 до 65 лет включительно.
2. Субъект должен предоставить подписанное информированное согласие до проведения каких-либо процедур, связанных с исследованием.
3. Субъекты репродуктивного возраста должны дать согласие на использование принятых в медицине способов контрацепции в ходе исследования и в течение 30 дней после последнего совместного введения АТВ200 + миглустата.
4. У субъекта поставлен диагноз болезни Помпе на основании документально подтвержденного дефицита ферментативной активности кислой α -глюкозидазы или согласно результатам генотипирования GAA.
5. Субъект получал ERT с применением алглюкозидазы-альфа в течение предыдущих 2-6 лет.
6. Субъект в настоящее время получает алглюкозидазу-альфа с частотой один раз в две недели.
7. Субъект получал и завершил две последние инфузии без нежелательных явлений, связанных с приемом лекарственного средства, которые приводят к временному прекращению введения доз.
8. Субъект должен быть способен пройти 200-500 метров в 6MWT; и
9. Форсированная жизненная емкость легких (FVC) в положении стоя должна составлять от 30% до 80% от предсказанного нормального значения.

Субъекты, получавшие ERT (неамбулаторные).

10. Субъекты мужского и женского пола возрастом от 18 до 65 лет включительно.
11. Субъект должен предоставить подписанное информированное согласие до проведения каких-либо процедур, связанных с исследованием.
12. Субъекты репродуктивного возраста должны дать согласие на использование принятых в медицине способов контрацепции в ходе исследования и в течение 30 дней после последнего совместного введения АТВ200 + миглустата.
13. У субъекта поставлен диагноз болезни Помпе на основании документально подтвержденного дефицита ферментативной активности кислой α -глюкозидазы или согласно результатам генотипирования GAA.
14. Субъект получал ERT с применением алглюкозидазы-альфа в течение ≥ 2 лет.
15. Субъект в настоящее время получает алглюкозидазу-альфа с частотой один раз в две недели.
16. Субъект получал и завершил две последние инфузии без нежелательных явлений, связанных с приемом лекарственного средства, которые приводят к временному прекращению введения доз; и
17. Субъект должен быть полностью прикован к инвалидной коляске и неспособен ходить без посторонней помощи.

Критерии исключения.

Субъекты, получавшие ERT (амбулаторные).

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

для субъекта или ставит под сомнение его/ее способность соответствовать требованиям протокола.

8. У субъекта имеются случаи анафилактической реакции на алглюкозидазу-альфа в анамнезе.

9. У субъекта имеются случаи высоких устойчивых титров антител к рекомбинантной кислой α -глюкозидазе в анамнезе.

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

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

12. У субъекта имеются известные случаи бронхиальной астмы в анамнезе. Субъекты, получавшие ERT (неамбулаторные)

13. Субъект получал какое-либо исследуемое средство терапии болезни Помпе, отличное от алглюкозидазы-альфа, в пределах периода 30 дней до визита исходного уровня или согласно ожиданиям будет получать его в ходе исследования.

14. Субъект получал лечение с применением запрещенных лекарственных препаратов (миглитол (например, Glyset®); миглустата (например, Zavesca®); акарбозы (например, Precose®, Glucobay®); воглибозы (например, Volix®, Vocarb® и Volibo®); альбутерола и кленбутерола или любого исследуемого/экспериментального лекарственного средства) в пределах периода 30 дней до визита исходного уровня.

15. Для женщин - субъект на момент скрининга находится в состоянии беременности или осуществляет грудное вскармливание.

16. Субъект, будь то мужчина или женщина, планирует зачатие ребенка в ходе исследования.

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

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

19. У субъекта имеются случаи высоких устойчивых титров антител к рекомбинантной кислой α -глюкозидазе в анамнезе.

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

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

22. У субъекта имеются известные случаи бронхиальной астмы в анамнезе. Исследуемый препарат, дозировка и способ введения.

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

период 1: IV инфузия однократной дозы 5 мг/кг ATB200;

период 2: IV инфузия однократной дозы 10 мг/кг ATB200 всем субъектам, которые завершили период 1; и

период 3: IV инфузия однократной дозы 20 мг/кг ATB200 всем субъектам, которые завершили период 2.

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

период 4: 130 мг миглустата вводят перорально за 1 ч до IV инфузии однократной дозы 20 мг/кг ATB200 всем субъектам, которые завершили период 3 (повторяют каждые 2 недели с осуществлением в общей сложности 3 введений); и

период 5: 260 мг миглустата вводят перорально за 1 ч до IV инфузии однократной дозы 20 мг/кг ATB200 всем субъектам, получавшим ERT, которые завершили период 4 (повторяют каждые 2 недели с осуществлением в общей сложности 3 введений).

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

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

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

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

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

Критерии оценивания.

Основные.

Оценки безопасности:

PE;

показатели жизненно важных функций, в том числе температура тела, RR, HR и BP;

AE, в том числе IAR;

ECG в 12 отведениях;

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

РК АТВ200 и миглустата в плазме крови:

РК-параметры, представляющие собой уровни активной формы кислой α -глюкозидазы и концентрации общего белка кислой α -глюкозидазы в плазме крови: максимальная наблюдаемая концентрация в плазме крови ($C_{\max}$), время до достижения максимальной наблюдаемой концентрации в плазме крови ($t_{\max}$), площадь под кривой зависимости концентрации лекарственного средства в плазме крови от момента времени 0 до момента времени определения последней поддающейся измерению концентрации (AUC_{0-t}), площадь под кривой зависимости концентрации лекарственного средства в плазме крови от момента времени 0, экстраполированная до бесконечности ($AUC_{0-\infty}$), период полувыведения ($t_{1/2}$) и общий клиренс после IV введения (CL_T);

соотношения $C_{\max}$ и $AUC_{0-\infty}$ активной формы кислой α -глюкозидазы и общего белка кислой α -глюкозидазы в плазме крови для всех режимов введения доз;

РК-параметры миглустата в плазме крови: $C_{\max}$, $t_{\max}$, AUC_{0-t} , $AUC_{0-\infty}$ и $t_{1/2}$, кажущийся системный клиренс лекарственного средства после перорального введения (CL_T/F) и объем распределения во время конечной фазы после перорального введения (V_z/F) для каждого уровня дозы;

относительные показатели $C_{\max}$ и $AUC_{0-\infty}$ миглустата в плазме крови для каждого уровня дозы.

Функциональные оценки (осуществляемые на исходном уровне).

Для амбулаторных субъектов:

тесты двигательных функций:

тест с шестиминутной ходьбой (6MWT),

тест с 10-метровой ходьбой,

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

тест "встань и иди" с отсчетом времени (TUG);

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

PFT (FVC, MIP, MEP и SNIP).

Для неамбулаторных субъектов:

тест мышечной силы - только для верхних конечностей;

использование MRC и переносного динамометра осуществляется только для верхних конечностей;

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

Исходы, сообщаемые пациентами (осуществляется на исходном уровне)

показатель по шкале оценки выраженности утомляемости;

показатель по Роттердамской шкале инвалидизации;

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

Данные поисковых исследований

титры антител к АТВ200 (общих и нейтрализующих);

перекрестная реактивность антител к рекомбинантной кислой α -глюкозидазе с алглюкозидазой-альфа;

уровень провоспалительных цитокинов и других биомаркеров активации иммунной системы;

PD-маркеры (Hex4 и CPK).

Способы анализа.

Статистические способы.

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

Промежуточные анализы.

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

Предварительные результаты изучения РК.

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

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

Таблица 12

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

^a Среднее арифметическое значение (CV, %).

^b Медианное значение (мин.-макс.).

^c Среднее геометрическое значение (CV, %).

Таблица 13

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

^a Среднее арифметическое значение (CV, %).

^b Медианное значение (мин.-макс.).

^c Среднее геометрическое значение (CV, %).

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

На фиг. 24С показаны профили зависимости концентрации от времени, демонстрирующие среднее воздействие активной формы GAA в плазме крови после введения доз 20 мг/кг АТВ200 в отдельности, а также 20 мг/кг АТВ200 и 130 или 260 мг миглустата. На фиг. 24D также представлено среднее воздействие активной формы GAA в плазме крови после введения доз 20 мг/кг АТВ200 в отдельности, со 130 мг миглустата или 260 мг миглустата, но при этом активная форма GAA в плазме крови отображена на логарифмической шкале.

На фиг. 25А показаны профили зависимости концентрации от времени, демонстрирующие среднее воздействие общего белка GAA в плазме крови после введения доз 5 мг/кг, 10 мг/кг и 20 мг/кг АТВ200. На фиг. 25В также представлены профили зависимости концентрации от времени, демонстрирующие среднее воздействие общего белка GAA в плазме крови после введения доз 5 мг/кг, 10 мг/кг и 20 мг/кг АТВ200, но при этом общий белок GAA в плазме крови отображен на логарифмической шкале. Как

можно видеть из фиг. 25А-25В и табл. 13, АТВ200 демонстрировала незначительно сверхпропорционально зависимость от дозы воздействия общего белка GAA в плазме крови.

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

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

Сводная информация о РК миглустата показана в табл. 14.

Таблица 14

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

^a Среднее арифметическое значение (CV, %).

^b Медианное значение (мин.-макс.).

^c Среднее геометрическое значение (CV, %).

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

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

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

Таблица 15

Аналит	Обработка	Среднее арифметическое значение рAUC (нг*ч./мл) в период после введения доз (N=4)				
		0- t_{max}	t_{max} -6 ч.	t_{max} -10 ч.	t_{max} -12 ч.	t_{max} -24 ч.
Активная форма	20 мг/кг	428	382	606	630	654
GAA						
Активная форма GAA	20 мг/кг + 130 мг, однократная доза	456	415	722	770	832
Активная форма GAA	20 мг/кг + 130 мг, многократные дозы	423	392	689	737	796
Активная форма GAA	20 мг/кг + 260 мг, однократная доза	423	536	924	996	1094
Общий белок	20 мг/кг	621	603	943	981	1040
Общий белок	20 мг/кг + 130 мг, однократная доза	565	614	1041	1106	1189
Общий белок	20 мг/кг + 130 мг, многократные дозы	630	612	1079	1154	1244
Общий белок	20 мг/кг + 260 мг, однократная доза	679	824	1411	1518	1665

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

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

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

Предварительные результаты изучения уровней биомаркеров.

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

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

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

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

Для выявления уровней GAA и LAMP1 в фибробластах дикого типа и фибробластах при болезни Помпе с распространенной сплайсинговой мутацией использовали иммунофлуоресцентную микроскопию. Как показано на фиг. 27, GAA находится в отдельных лизосомных компартментах в фибробластах дикого типа. На фиг. 27 также показаны обширный сигнал от GAA в фибробластах при болезни Помпе и то, что сигналы как от GAA, так и от LAMP1 в фибробластах при болезни Помпе, по-видимому, локализованы в ER и аппарате Гольджи, а не в дистальных лизосомах. Это свидетельствует об изменении транспорта белка GAA в фибробластах при болезни Помпе.

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

Было показано, что нарушение катаболизма гликогена в лизосомах вследствие дефицита GAA вызывает существенную клеточную дисфункцию, о чем свидетельствует выраженная, устойчивая аутофагия, а также пролиферация и накопление мембраносвязанных внутриклеточных компартментов, заполненных накопленным гликогеном (N. Raben et al.). Иммуногистологические данные авторов настоящего изобретения указывают на то, что для многих белков, в том числе нескольких ключевых белков, крайне необходимых для стабильности мембран мышечных клеток, таких как дистрофии, α - и β -дистрогликаны, различные саркогликаны и другие, которые составляют дистрофин-ассоциированный гликопротеиновый комплекс, а также белков, участвующих в восстановлении мышц, таких как дисферлин, транспорт белков значительно изменяется. Для этих ключевых мышечных белков необходим надлежащий транспорт белка в мембрану мышечной клетки, где они функционируют. Как показано на фиг. 28, иммуногистологические данные авторов настоящего изобретения свидетельствуют о том, что значительная доля этих ключевых мышечных белков характеризуется внутриклеточной локализацией в мышцах мышей с нокаутом (KO) Gaa в модели болезни Помпе. Эти данные позволяют предположить, что неправильный транспорт этих ключевых мышечных белков может индуцировать псевдомышечную дистрофию, которая в конечном счете приводит к мышечной слабости и негодному состоянию мышц.

Алглокозидазу-альфа (Myozyme®) и АТВ200 с 10 мг/кг миглустата или без него оценивали у мышей с KO Gaa при эквивалентной дозе средства для ERT (20 мг/кг) по схеме введения доз один раз в две недели. После 2 введений алглокозидаза-альфа незначительно снижала уровень гликогена, накопленного в лизосомах скелетных мышц (фиг. 32A-32C), и почти не оказывала эффекты в отношении снижения аутофагии (фиг. 30A-30B) или пролиферации лизосом (фиг. 29A-29B) в сравнении с мышами, обработанными инертной средой. В отличие от этого, в случае применения комбинации АТВ200/миглустат в идентичных условиях наблюдали существенно лучшее очищение от гликогена в лизосомах (фиг. 32A-32D). Комбинация АТВ200/миглустат также, по-видимому, улучшает общее физиологическое состояние мышц, о чем свидетельствуют сниженные уровни LC3 II (фиг. 30A-30B), общепризнанного биомаркера аутофагии, и очищение от накопленных внутриклеточных везикул, окрашенных на LAMP1 (фиг. 29A-29B), известный резидентный интегральный мембранный белок лизосом, и дисферлин (фиг. 31A-31B), известный белок клеточной поверхности, участвующий в восстановлении мышц. Кроме того, комбинация АТВ200/миглустат значительно улучшала мышечную архитектуру, которая мало чем отличалась от

мышечных волокон у мышей дикого типа.

Также на фиг. 29-32 показано, что две разные партии АТВ200 (полученные в производственных процессах более раннего и более позднего поколения) давали сопоставимые результаты. На фиг. 32А-32D * указывает на статистически значимый результат в сравнении с Myozyme® в отдельности.

Пример 17. Мышечная функция у мышей с нокаутом Gaa.

В более долгосрочных исследованиях с 12 введениями один раз в две недели комбинация 20 мг/кг АТВ200 с 10 мг/кг миглустата постепенно увеличивала функциональную мышечную силу у мышей с КО Gaa относительно исходного уровня, что измеряли с помощью как тестов силы захвата, так и тестов "вис на проволоке" (фиг. 33А-33В). У мышей, обработанных алглюкозидазой-альфа (Lumizyme®), которые получали аналогичную дозу средства для ERT (20 мг/кг), наблюдали снижение показателей в идентичных условиях на протяжении большей части исследования (фиг. 33А-33В). Как и в случае более краткосрочного исследования, комбинация АТВ200/миглустат характеризовалась существенно лучшим очищением от гликогена после 3 месяцев (фиг. 34А-34С) и 6 месяцев (фиг. 34D-G) обработки, чем алглюкозидаза-альфа. Комбинация АТВ200/миглустат также снижала аутофагию и внутриклеточное накопление LAMP1 и дисферлина после 3 месяцев обработки (фиг. 35) в сравнении с алглюкозидазой-альфа. На фиг. 33А * указывает на статистически значимый результат в сравнении с Lumizyme® в отдельности ($p < 0,05$, 2-сторонний t-критерий). На фиг. 34А-34G * указывает на статистически значимый результат в сравнении с Lumizyme® в отдельности ($p < 0,05$, множественное сравнение с применением способа Даннета 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 архитектуры, 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 мониторинг 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 Gaa.

На фиг. 40 показано, что введение АТВ200 с миглустатом или без него в течение 6 месяцев понижало внутриклеточное накопление дистрофина у мышей с КО Gaa. Для комбинации АТВ200 ± миглустат наблюдали более значительное снижение накопления дистрофина, чем в случае применения Lumizyme®.

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

Две партии АТВ200 с разным содержанием сиаловой кислоты оценивали в отношении фармакокинетических параметров и эффективности на мышцах с КО Gaa. В табл. 16 представлена сводная информация о характеристиках для двух партий.

Таблица 16

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

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

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

Таблица 17

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

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

В связанном исследовании мышам с КО Gaa давали IV болюсные инъекции АТВ200 (партии А и В) и Lumizyme® в хвостовую вену один раз в две недели с осуществлением в общей сложности 2 инъекций. Уровни гликогена в тканях измеряли через 14 дней после последнего введения. Как показано на фиг. 37А-37D, партия В в целом была более эффективной в отношении снижения уровня гликогена, чем партия А, при аналогичных дозах. Как партия А, так и партия В превосходили Lumizyme® в отношении снижения уровня гликогена. На фиг. 37А-37D * указывает на статистически значимый результат в срав-

нении с Lumizyme® ($p < 0,05$, t-критерий), а ^ указывает на статистически значимый результат сравнения партии А и партии В при одной и той же дозе ($p < 0,05$, t-критерий).

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 всему настоящему 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.

Перечень последовательностей

<110> Амикус Терапьютикс, Инк.

<120> КИСЛАЯ АЛЬФА-ГЛЮКОЗИДАЗА УСИЛЕННОГО ДЕЙСТВИЯ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ БОЛЕЗНИ ПОМПЕ

<130> AT-P8500-PCT

<160> 6

<170> PatentIn версия 3.5

<210> 1

<211> 952

<212> БЕЛОК

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Gly Val Arg His Pro Pro Cys Ser His Arg Leu Leu Ala Val Cys
1 5 10 15

Ala Leu Val Ser Leu Ala Thr Ala Ala Leu Leu Gly His Ile Leu Leu
20 25 30

His Asp Phe Leu Leu Val Pro Arg Glu Leu Ser Gly Ser Ser Pro Val
35 40 45

Leu Glu Glu Thr His Pro Ala His Gln Gln Gly Ala Ser Arg Pro Gly
50 55 60

Pro Arg Asp Ala Gln Ala His Pro Gly Arg Pro Arg Ala Val Pro Thr
65 70 75 80

Gln Cys Asp Val Pro Pro Asn Ser Arg Phe Asp Cys Ala Pro Asp Lys
85 90 95

Ala Ile Thr Gln Glu Gln Cys Glu Ala Arg Gly Cys Cys Tyr Ile Pro
100 105 110

Ala Lys Gln Gly Leu Gln Gly Ala Gln Met Gly Gln Pro Trp Cys Phe
115 120 125

Phe Pro Pro Ser Tyr Pro Ser Tyr Lys Leu Glu Asn Leu Ser Ser Ser
 130 135 140

Glu Met Gly Tyr Thr Ala Thr Leu Thr Arg Thr Thr Pro Thr Phe Phe
 145 150 155 160

Pro Lys Asp Ile Leu Thr Leu Arg Leu Asp Val Met Met Glu Thr Glu
 165 170 175

Asn Arg Leu His Phe Thr Ile Lys Asp Pro Ala Asn Arg Arg Tyr Glu
 180 185 190

Val Pro Leu Glu Thr Pro Arg Val His Ser Arg Ala Pro Ser Pro Leu
 195 200 205

Tyr Ser Val Glu Phe Ser Glu Glu Pro Phe Gly Val Ile Val His Arg
 210 215 220

Gln Leu Asp Gly Arg Val Leu Leu Asn Thr Thr Val Ala Pro Leu Phe
 225 230 235 240

Phe Ala Asp Gln Phe Leu Gln Leu Ser Thr Ser Leu Pro Ser Gln Tyr
 245 250 255

Ile Thr Gly Leu Ala Glu His Leu Ser Pro Leu Met Leu Ser Thr Ser
 260 265 270

Trp Thr Arg Ile Thr Leu Trp Asn Arg Asp Leu Ala Pro Thr Pro Gly
 275 280 285

Ala Asn Leu Tyr Gly Ser His Pro Phe Tyr Leu Ala Leu Glu Asp Gly
 290 295 300

Gly Ser Ala His Gly Val Phe Leu Leu Asn Ser Asn Ala Met Asp Val
 305 310 315 320

Val Leu Gln Pro Ser Pro Ala Leu Ser Trp Arg Ser Thr Gly Gly Ile
 325 330 335

Leu Asp Val Tyr Ile Phe Leu Gly Pro Glu Pro Lys Ser Val Val Gln
 340 345 350

Gln Tyr Leu Asp Val Val Gly Tyr Pro Phe Met Pro Pro Tyr Trp Gly
 355 360 365

Leu Gly Phe His Leu Cys Arg Trp Gly Tyr Ser Ser Thr Ala Ile Thr

370		375		380
Arg Gln Val Val Glu Asn Met Thr Arg Ala His Phe Pro Leu Asp Val				
385		390		400
Gln Trp Asn Asp Leu Asp Tyr Met Asp Ser Arg Arg Asp Phe Thr Phe				
	405		410	415
Asn Lys Asp Gly Phe Arg Asp Phe Pro Ala Met Val Gln Glu Leu His				
	420		425	430
Gln Gly Gly Arg Arg Tyr Met Met Ile Val Asp Pro Ala Ile Ser Ser				
	435		440	445
Ser Gly Pro Ala Gly Ser Tyr Arg Pro Tyr Asp Glu Gly Leu Arg Arg				
450		455		460
Gly Val Phe Ile Thr Asn Glu Thr Gly Gln Pro Leu Ile Gly Lys Val				
465		470		475
Trp Pro Gly Ser Thr Ala Phe Pro Asp Phe Thr Asn Pro Thr Ala Leu				
	485		490	495
Ala Trp Trp Glu Asp Met Val Ala Glu Phe His Asp Gln Val Pro Phe				
	500		505	510
Asp Gly Met Trp Ile Asp Met Asn Glu Pro Ser Asn Phe Ile Arg Gly				
	515		520	525
Ser Glu Asp Gly Cys Pro Asn Asn Glu Leu Glu Asn Pro Pro Tyr Val				
530		535		540
Pro Gly Val Val Gly Gly Thr Leu Gln Ala Ala Thr Ile Cys Ala Ser				
545		550		555
Ser His Gln Phe Leu Ser Thr His Tyr Asn Leu His Asn Leu Tyr Gly				
	565		570	575
Leu Thr Glu Ala Ile Ala Ser His Arg Ala Leu Val Lys Ala Arg Gly				
	580		585	590
Thr Arg Pro Phe Val Ile Ser Arg Ser Thr Phe Ala Gly His Gly Arg				
	595		600	605
Tyr Ala Gly His Trp Thr Gly Asp Val Trp Ser Ser Trp Glu Gln Leu				
610		615		620

043083

Ala Ser Ser Val Pro Glu Ile Leu Gln Phe Asn Leu Leu Gly Val Pro
625 630 635 640

Leu Val Gly Ala Asp Val Cys Gly Phe Leu Gly Asn Thr Ser Glu Glu
645 650 655

Leu Cys Val Arg Trp Thr Gln Leu Gly Ala Phe Tyr Pro Phe Met Arg
660 665 670

Asn His Asn Ser Leu Leu Ser Leu Pro Gln Glu Pro Tyr Ser Phe Ser
675 680 685

Glu Pro Ala Gln Gln Ala Met Arg Lys Ala Leu Thr Leu Arg Tyr Ala
690 695 700

Leu Leu Pro His Leu Tyr Thr Leu Phe His Gln Ala His Val Ala Gly
705 710 715 720

Glu Thr Val Ala Arg Pro Leu Phe Leu Glu Phe Pro Lys Asp Ser Ser
725 730 735

Thr Trp Thr Val Asp His Gln Leu Leu Trp Gly Glu Ala Leu Leu Ile
740 745 750

Thr Pro Val Leu Gln Ala Gly Lys Ala Glu Val Thr Gly Tyr Phe Pro
755 760 765

Leu Gly Thr Trp Tyr Asp Leu Gln Thr Val Pro Ile Glu Ala Leu Gly
770 775 780

Ser Leu Pro Pro Pro Pro Ala Ala Pro Arg Glu Pro Ala Ile His Ser
785 790 795 800

Glu Gly Gln Trp Val Thr Leu Pro Ala Pro Leu Asp Thr Ile Asn Val
805 810 815

His Leu Arg Ala Gly Tyr Ile Ile Pro Leu Gln Gly Pro Gly Leu Thr
820 825 830

Thr Thr Glu Ser Arg Gln Gln Pro Met Ala Leu Ala Val Ala Leu Thr
835 840 845

Lys Gly Gly Glu Ala Arg Gly Glu Leu Phe Trp Asp Asp Gly Glu Ser
850 855 860

Leu Glu Val Leu Glu Arg Gly Ala Tyr Thr Gln Val Ile Phe Leu Ala
865 870 875 880

Arg Asn Asn Thr Ile Val Asn Glu Leu Val Arg Val Thr Ser Glu Gly
885 890 895

Ala Gly Leu Gln Leu Gln Lys Val Thr Val Leu Gly Val Ala Thr Ala
900 905 910

Pro Gln Gln Val Leu Ser Asn Gly Val Pro Val Ser Asn Phe Thr Tyr
915 920 925

Ser Pro Asp Thr Lys Val Leu Asp Ile Cys Val Ser Leu Leu Met Gly
930 935 940

Glu Gln Phe Leu Val Ser Trp Cys
945 950

<210> 2
<211> 3624
<212> ДНК
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (220)..(3078)

<220>
<221> МРНК
<222> (221)..(3075)

<400> 2
cagttgggaa agctgaggtt gtcgccgggg ccgcgggtgg aggtcgggga tgaggcagca 60
ggtaggacag tgacctcggg gacgcgaagg accccggcca cctctaggtt ctccctcgccc 120
gcccgttggt cagcgaggga ggctctgggc ctgccgcagc tgacggggaa actgaggcac 180
ggagcggggc tgtaggagct gtccaggcca tctccaacc atg gga gtg agg cac 234
Met Gly Val Arg His
1 5
ccg ccc tgc tcc cac cgg ctc ctg gcc gtc tgc gcc ctc gtg tcc ttg 282
Pro Pro Cys Ser His Arg Leu Leu Ala Val Cys Ala Leu Val Ser Leu
10 15 20
gca acc gct gca ctc ctg ggg cac atc cta ctc cat gat ttc ctg ctg 330
Ala Thr Ala Ala Leu Leu Gly His Ile Leu Leu His Asp Phe Leu Leu
25 30 35
gtt ccc cga gag ctg agt ggc tcc tcc cca gtc ctg gag gag act cac 378
Val Pro Arg Glu Leu Ser Gly Ser Ser Pro Val Leu Glu Glu Thr His
40 45 50
cca gct cac cag cag gga gcc agc aga cca ggg ccc cgg gat gcc cag 426
Pro Ala His Gln Gln Gly Ala Ser Arg Pro Gly Pro Arg Asp Ala Gln
55 60 65
gca cac ccc ggc cgt ccc aga gca gtg ccc aca cag tgc gac gtc ccc 474

Ala	His	Pro	Gly	Arg	Pro	Arg	Ala	Val	Pro	Thr	Gln	Cys	Asp	Val	Pro	
70					75					80					85	
ccc	aac	agc	cgc	ttc	gat	tgc	gcc	cct	gac	aag	gcc	atc	acc	cag	gaa	522
Pro	Asn	Ser	Arg	Phe	Asp	Cys	Ala	Pro	Asp	Lys	Ala	Ile	Thr	Gln	Glu	
			90						95					100		
cag	tgc	gag	gcc	cgc	ggc	tgc	tgc	tac	atc	cct	gca	aag	cag	ggg	ctg	570
Gln	Cys	Glu	Ala	Arg	Gly	Cys	Cys	Tyr	Ile	Pro	Ala	Lys	Gln	Gly	Leu	
			105					110					115			
cag	gga	gcc	cag	atg	ggg	cag	ccc	tgg	tgc	ttc	ttc	cca	ccc	agc	tac	618
Gln	Gly	Ala	Gln	Met	Gly	Gln	Pro	Trp	Cys	Phe	Phe	Pro	Pro	Ser	Tyr	
		120					125					130				
ccc	agc	tac	aag	ctg	gag	aac	ctg	agc	tcc	tct	gaa	atg	ggc	tac	acg	666
Pro	Ser	Tyr	Lys	Leu	Glu	Asn	Leu	Ser	Ser	Ser	Glu	Met	Gly	Tyr	Thr	
	135					140					145					
gcc	acc	ctg	acc	cgt	acc	acc	ccc	acc	ttc	ttc	ccc	aag	gac	atc	ctg	714
Ala	Thr	Leu	Thr	Arg	Thr	Thr	Pro	Thr	Phe	Phe	Pro	Lys	Asp	Ile	Leu	
150					155					160					165	
acc	ctg	cgg	ctg	gac	gtg	atg	atg	gag	act	gag	aac	cgc	ctc	cac	ttc	762
Thr	Leu	Arg	Leu	Asp	Val	Met	Met	Glu	Thr	Glu	Asn	Arg	Leu	His	Phe	
				170					175					180		
acg	atc	aaa	gat	cca	gct	aac	agg	cgc	tac	gag	gtg	ccc	ttg	gag	acc	810
Thr	Ile	Lys	Asp	Pro	Ala	Asn	Arg	Arg	Tyr	Glu	Val	Pro	Leu	Glu	Thr	
			185					190					195			
ccg	cgt	gtc	cac	agc	cgg	gca	ccg	tcc	cca	ctc	tac	agc	gtg	gag	ttc	858
Pro	Arg	Val	His	Ser	Arg	Ala	Pro	Ser	Pro	Leu	Tyr	Ser	Val	Glu	Phe	
		200					205					210				
tcc	gag	gag	ccc	ttc	ggg	gtg	atc	gtg	cac	cgg	cag	ctg	gac	ggc	cgc	906
Ser	Glu	Glu	Pro	Phe	Gly	Val	Ile	Val	His	Arg	Gln	Leu	Asp	Gly	Arg	
	215					220					225					
gtg	ctg	ctg	aac	acg	acg	gtg	gcg	ccc	ctg	ttc	ttt	gcg	gac	cag	ttc	954
Val	Leu	Leu	Asn	Thr	Thr	Val	Ala	Pro	Leu	Phe	Phe	Ala	Asp	Gln	Phe	
230					235					240				245		
ctt	cag	ctg	tcc	acc	tcg	ctg	ccc	tcg	cag	tat	atc	aca	ggc	ctc	gcc	1002
Leu	Gln	Leu	Ser	Thr	Ser	Leu	Pro	Ser	Gln	Tyr	Ile	Thr	Gly	Leu	Ala	
				250					255					260		
gag	cac	ctc	agt	ccc	ctg	atg	ctc	agc	acc	agc	tgg	acc	agg	atc	acc	1050
Glu	His	Leu	Ser	Pro	Leu	Met	Leu	Ser	Thr	Ser	Trp	Thr	Arg	Ile	Thr	
			265					270					275			
ctg	tgg	aac	cgg	gac	ctt	gcg	ccc	acg	ccc	ggt	gcg	aac	ctc	tac	ggg	1098
Leu	Trp	Asn	Arg	Asp	Leu	Ala	Pro	Thr	Pro	Gly	Ala	Asn	Leu	Tyr	Gly	
		280					285					290				
tct	cac	cct	ttc	tac	ctg	gcg	ctg	gag	gac	ggc	ggg	tcg	gca	cac	ggg	1146
Ser	His	Pro	Phe	Tyr	Leu	Ala	Leu	Glu	Asp	Gly	Gly	Ser	Ala	His	Gly	
	295					300				305						
gtg	ttc	ctg	cta	aac	agc	aat	gcc	atg	gat	gtg	gtc	ctg	cag	ccg	agc	1194
Val	Phe	Leu	Leu	Asn	Ser	Asn	Ala	Met	Asp	Val	Val	Leu	Gln	Pro	Ser	
310					315					320					325	

cct gcc ctt agc tgg agg tcg aca ggt ggg atc ctg gat gtc tac atc Pro Ala Leu Ser Trp Arg Ser Thr Gly Gly Ile Leu Asp Val Tyr Ile 330 335 340	1242
ttc ctg ggc cca gag ccc aag agc gtg gtg cag cag tac ctg gac gtt Phe Leu Gly Pro Glu Pro Lys Ser Val Val Gln Gln Tyr Leu Asp Val 345 350 355	1290
gtg gga tac ccg ttc atg ccg cca tac tgg ggc ctg ggc ttc cac ctg Val Gly Tyr Pro Phe Met Pro Pro Tyr Trp Gly Leu Gly Phe His Leu 360 365 370	1338
tgc cgc tgg ggc tac tcc tcc acc gct atc acc cgc cag gtg gtg gag Cys Arg Trp Gly Tyr Ser Ser Thr Ala Ile Thr Arg Gln Val Val Glu 375 380 385	1386
aac atg acc agg gcc cac ttc ccc ctg gac gtc caa tgg aac gac ctg Asn Met Thr Arg Ala His Phe Pro Leu Asp Val Gln Trp Asn Asp Leu 390 395 400 405	1434
gac tac atg gac tcc cgg agg gac ttc acg ttc aac aag gat ggc ttc Asp Tyr Met Asp Ser Arg Arg Asp Phe Thr Phe Asn Lys Asp Gly Phe 410 415 420	1482
cgg gac ttc ccg gcc atg gtg cag gag ctg cac cag ggc ggc cgg cgc Arg Asp Phe Pro Ala Met Val Gln Glu Leu His Gln Gly Gly Arg Arg 425 430 435	1530
tac atg atg atc gtg gat cct gcc atc agc agc tcg ggc cct gcc ggg Tyr Met Met Ile Val Asp Pro Ala Ile Ser Ser Ser Gly Pro Ala Gly 440 445 450	1578
agc tac agg ccc tac gac gag ggt ctg cgg agg ggg gtt ttc atc acc Ser Tyr Arg Pro Tyr Asp Glu Gly Leu Arg Arg Gly Val Phe Ile Thr 455 460 465	1626
aac gag acc ggc cag ccg ctg att ggg aag gta tgg ccc ggg tcc act Asn Glu Thr Gly Gln Pro Leu Ile Gly Lys Val Trp Pro Gly Ser Thr 470 475 480 485	1674
gcc ttc ccc gac ttc acc aac ccc aca gcc ctg gcc tgg tgg gag gac Ala Phe Pro Asp Phe Thr Asn Pro Thr Ala Leu Ala Trp Trp Glu Asp 490 495 500	1722
atg gtg gct gag ttc cat gac cag gtg ccc ttc gac ggc atg tgg att Met Val Ala Glu Phe His Asp Gln Val Pro Phe Asp Gly Met Trp Ile 505 510 515	1770
gac atg aac gag cct tcc aac ttc atc aga ggc tct gag gac ggc tgc Asp Met Asn Glu Pro Ser Asn Phe Ile Arg Gly Ser Glu Asp Gly Cys 520 525 530	1818
ccc aac aat gag ctg gag aac cca ccc tac gtg cct ggg gtg gtt ggg Pro Asn Asn Glu Leu Glu Asn Pro Pro Tyr Val Pro Gly Val Val Gly 535 540 545	1866
ggg acc ctc cag gcg gcc acc atc tgt gcc tcc agc cac cag ttt ctc Gly Thr Leu Gln Ala Ala Thr Ile Cys Ala Ser Ser His Gln Phe Leu 550 555 560 565	1914
tcc aca cac tac aac ctg cac aac ctc tac ggc ctg acc gaa gcc atc Ser Thr His Tyr Asn Leu His Asn Leu Tyr Gly Leu Thr Glu Ala Ile 570 575 580	1962

gcc tcc cac agg gcg ctg gtg aag gct cgg ggg aca cgc cca ttt gtg Ala Ser His Arg Ala Leu Val Lys Ala Arg Gly Thr Arg Pro Phe Val 585 590 595	2010
atc tcc cgc tcg acc ttt gct ggc cac ggc cga tac gcc ggc cac tgg Ile Ser Arg Ser Thr Phe Ala Gly His Gly Arg Tyr Ala Gly His Trp 600 605 610	2058
acg ggg gac gtg tgg agc tcc tgg gag cag ctc gcc tcc tcc gtg cca Thr Gly Asp Val Trp Ser Ser Trp Glu Gln Leu Ala Ser Ser Val Pro 615 620 625	2106
gaa atc ctg cag ttt aac ctg ctg ggg gtg cct ctg gtc ggg gcc gac Glu Ile Leu Gln Phe Asn Leu Leu Gly Val Pro Leu Val Gly Ala Asp 630 635 640 645	2154
gtc tgc ggc ttc ctg ggc aac acc tca gag gag ctg tgt gtg cgc tgg Val Cys Gly Phe Leu Gly Asn Thr Ser Glu Glu Leu Cys Val Arg Trp 650 655 660	2202
acc cag ctg ggg gcc ttc tac ccc ttc atg cgg aac cac aac agc ctg Thr Gln Leu Gly Ala Phe Tyr Pro Phe Met Arg Asn His Asn Ser Leu 665 670 675	2250
ctc agt ctg ccc cag gag ccg tac agc ttc agc gag ccg gcc cag cag Leu Ser Leu Pro Gln Glu Pro Tyr Ser Phe Ser Glu Pro Ala Gln Gln 680 685 690	2298
gcc atg agg aag gcc ctc acc ctg cgc tac gca ctc ctc ccc cac ctc Ala Met Arg Lys Ala Leu Thr Leu Arg Tyr Ala Leu Leu Pro His Leu 695 700 705	2346
tac aca ctg ttc cac cag gcc cac gtc gcg ggg gag acc gtg gcc cgg Tyr Thr Leu Phe His Gln Ala His Val Ala Gly Glu Thr Val Ala Arg 710 715 720 725	2394
ccc ctc ttc ctg gag ttc ccc aag gac tct agc acc tgg act gtg gac Pro Leu Phe Leu Glu Phe Pro Lys Asp Ser Ser Thr Trp Thr Val Asp 730 735 740	2442
cac cag ctc ctg tgg ggg gag gcc ctg ctc atc acc cca gtg ctc cag His Gln Leu Leu Trp Gly Glu Ala Leu Leu Ile Thr Pro Val Leu Gln 745 750 755	2490
gcc ggg aag gcc gaa gtg act ggc tac ttc ccc ttg ggc aca tgg tac Ala Gly Lys Ala Glu Val Thr Gly Tyr Phe Pro Leu Gly Thr Trp Tyr 760 765 770	2538
gac ctg cag acg gtg cca ata gag gcc ctt ggc agc ctc cca ccc cca Asp Leu Gln Thr Val Pro Ile Glu Ala Leu Gly Ser Leu Pro Pro Pro 775 780 785	2586
cct gca gct ccc cgt gag cca gcc atc cac agc gag ggg cag tgg gtg Pro Ala Ala Pro Arg Glu Pro Ala Ile His Ser Glu Gly Gln Trp Val 790 795 800 805	2634
acg ctg ccg gcc ccc ctg gac acc atc aac gtc cac ctc cgg gct ggg Thr Leu Pro Ala Pro Leu Asp Thr Ile Asn Val His Leu Arg Ala Gly 810 815 820	2682
tac atc atc ccc ctg cag ggc cct ggc ctc aca acc aca gag tcc cgc Tyr Ile Ile Pro Leu Gln Gly Pro Gly Leu Thr Thr Thr Glu Ser Arg	2730

043083

825	830	835	
cag cag ccc atg gcc ctg gct gtg gcc ctg acc aag ggt gga gag gcc Gln Gln Pro Met Ala Leu Ala Val Ala Leu Thr Lys Gly Gly Glu Ala 840 845 850			2778
cga ggg gag ctg ttc tgg gac gat gga gag agc ctg gaa gtg ctg gag Arg Gly Glu Leu Phe Trp Asp Asp Gly Glu Ser Leu Glu Val Leu Glu 855 860 865			2826
cga ggg gcc tac aca cag gtc atc ttc ctg gcc agg aat aac acg atc Arg Gly Ala Tyr Thr Gln Val Ile Phe Leu Ala Arg Asn Asn Thr Ile 870 875 880 885			2874
gtg aat gag ctg gta cgt gtg acc agt gag gga gct ggc ctg cag ctg Val Asn Glu Leu Val Arg Val Thr Ser Glu Gly Ala Gly Leu Gln Leu 890 895 900			2922
cag aag gtg act gtc ctg ggc gtg gcc acg gcg ccc cag cag gtc ctc Gln Lys Val Thr Val Leu Gly Val Ala Thr Ala Pro Gln Gln Val Leu 905 910 915			2970
tcc aac ggt gtc cct gtc tcc aac ttc acc tac agc ccc gac acc aag Ser Asn Gly Val Pro Val Ser Asn Phe Thr Tyr Ser Pro Asp Thr Lys 920 925 930			3018
gtc ctg gac atc tgt gtc tgc ctg ttg atg gga gag cag ttt ctc gtc Val Leu Asp Ile Cys Val Ser Leu Leu Met Gly Glu Gln Phe Leu Val 935 940 945			3066
agc tgg tgt tag ccggggcggag tgtgttagtc tctccagagg gaggctggtt Ser Trp Cys 950			3118
ccccagggaa gcagagcctg tgtgcgggca gcagctgtgt gcgggcctgg gggttgcatg			3178
tgtcacctgg agctgggcac taaccattcc aagccgcgc atcgcttggt tccacctcct			3238
gggcccggggc tctggccccc aacgtgtcta ggagagcttt ctccctagat cgcactgtgg			3298
gccggggcct ggagggctgc tctgtgttaa taagattgta aggtttgccc tcctcacctg			3358
ttgccggcat gcgggtagta ttagccaccc cctccatct gttcccagca ccggagaagg			3418
gggtgctcag gtggaggtgt ggggtatgca cctgagctcc tgcttcgcgc ctgctgctct			3478
gccccaacgc gaccgcttcc cggctgccc gagggctgga tgccctgccg tccccgagca			3538
agcctgggaa ctcaggaaaa ttcacaggac ttgggagatt ctaaatttta agtgcaatta			3598
ttttaataaaa aggggcattt ggaatc			3624
<210> 3			
<211> 952			
<212> БЕЖОК			
<213> Homo sapiens			
<400> 3			
Met Gly Val Arg His Pro Pro Cys Ser His Arg Leu Leu Ala Val Cys 1 5 10 15			

Ala Leu Val Ser Leu Ala Thr Ala Ala Leu Leu Gly His Ile Leu Leu
 20 25 30

His Asp Phe Leu Leu Val Pro Arg Glu Leu Ser Gly Ser Ser Pro Val
 35 40 45

Leu Glu Glu Thr His Pro Ala His Gln Gln Gly Ala Ser Arg Pro Gly
 50 55 60

Pro Arg Asp Ala Gln Ala His Pro Gly Arg Pro Arg Ala Val Pro Thr
 65 70 75 80

Gln Cys Asp Val Pro Pro Asn Ser Arg Phe Asp Cys Ala Pro Asp Lys
 85 90 95

Ala Ile Thr Gln Glu Gln Cys Glu Ala Arg Gly Cys Cys Tyr Ile Pro
 100 105 110

Ala Lys Gln Gly Leu Gln Gly Ala Gln Met Gly Gln Pro Trp Cys Phe
 115 120 125

Phe Pro Pro Ser Tyr Pro Ser Tyr Lys Leu Glu Asn Leu Ser Ser Ser
 130 135 140

Glu Met Gly Tyr Thr Ala Thr Leu Thr Arg Thr Thr Pro Thr Phe Phe
 145 150 155 160

Pro Lys Asp Ile Leu Thr Leu Arg Leu Asp Val Met Met Glu Thr Glu
 165 170 175

Asn Arg Leu His Phe Thr Ile Lys Asp Pro Ala Asn Arg Arg Tyr Glu
 180 185 190

Val Pro Leu Glu Thr Pro Arg Val His Ser Arg Ala Pro Ser Pro Leu
 195 200 205

Tyr Ser Val Glu Phe Ser Glu Glu Pro Phe Gly Val Ile Val His Arg
 210 215 220

Gln Leu Asp Gly Arg Val Leu Leu Asn Thr Thr Val Ala Pro Leu Phe
 225 230 235 240

Phe Ala Asp Gln Phe Leu Gln Leu Ser Thr Ser Leu Pro Ser Gln Tyr
 245 250 255

Ile Thr Gly Leu Ala Glu His Leu Ser Pro Leu Met Leu Ser Thr Ser
 260 265 270

Trp Thr Arg Ile Thr Leu Trp Asn Arg Asp Leu Ala Pro Thr Pro Gly
 275 280 285

Ala Asn Leu Tyr Gly Ser His Pro Phe Tyr Leu Ala Leu Glu Asp Gly
 290 295 300

Gly Ser Ala His Gly Val Phe Leu Leu Asn Ser Asn Ala Met Asp Val
 305 310 315 320

Val Leu Gln Pro Ser Pro Ala Leu Ser Trp Arg Ser Thr Gly Gly Ile
 325 330 335

Leu Asp Val Tyr Ile Phe Leu Gly Pro Glu Pro Lys Ser Val Val Gln
 340 345 350

Gln Tyr Leu Asp Val Val Gly Tyr Pro Phe Met Pro Pro Tyr Trp Gly
 355 360 365

Leu Gly Phe His Leu Cys Arg Trp Gly Tyr Ser Ser Thr Ala Ile Thr
 370 375 380

Arg Gln Val Val Glu Asn Met Thr Arg Ala His Phe Pro Leu Asp Val
 385 390 395 400

Gln Trp Asn Asp Leu Asp Tyr Met Asp Ser Arg Arg Asp Phe Thr Phe
 405 410 415

Asn Lys Asp Gly Phe Arg Asp Phe Pro Ala Met Val Gln Glu Leu His
 420 425 430

Gln Gly Gly Arg Arg Tyr Met Met Ile Val Asp Pro Ala Ile Ser Ser
 435 440 445

Ser Gly Pro Ala Gly Ser Tyr Arg Pro Tyr Asp Glu Gly Leu Arg Arg
 450 455 460

Gly Val Phe Ile Thr Asn Glu Thr Gly Gln Pro Leu Ile Gly Lys Val
 465 470 475 480

Trp Pro Gly Ser Thr Ala Phe Pro Asp Phe Thr Asn Pro Thr Ala Leu
 485 490 495

Ala Trp Trp Glu Asp Met Val Ala Glu Phe His Asp Gln Val Pro Phe
 500 505 510

Asp Gly Met Trp Ile Asp Met Asn Glu Pro Ser Asn Phe Ile Arg Gly

043083

515		520		525
Ser Glu Asp Gly Cys Pro Asn Asn Glu Leu Glu Asn Pro Pro Tyr Val				
530		535		540
Pro Gly Val Val Gly Gly Thr Leu Gln Ala Ala Thr Ile Cys Ala Ser				
545		550		555
				560
Ser His Gln Phe Leu Ser Thr His Tyr Asn Leu His Asn Leu Tyr Gly				
		565		570
				575
Leu Thr Glu Ala Ile Ala Ser His Arg Ala Leu Val Lys Ala Arg Gly				
		580		585
				590
Thr Arg Pro Phe Val Ile Ser Arg Ser Thr Phe Ala Gly His Gly Arg				
		595		600
				605
Tyr Ala Gly His Trp Thr Gly Asp Val Trp Ser Ser Trp Glu Gln Leu				
		610		615
				620
Ala Ser Ser Val Pro Glu Ile Leu Gln Phe Asn Leu Leu Gly Val Pro				
		625		630
				635
				640
Leu Val Gly Ala Asp Val Cys Gly Phe Leu Gly Asn Thr Ser Glu Glu				
		645		650
				655
Leu Cys Val Arg Trp Thr Gln Leu Gly Ala Phe Tyr Pro Phe Met Arg				
		660		665
				670
Asn His Asn Ser Leu Leu Ser Leu Pro Gln Glu Pro Tyr Ser Phe Ser				
		675		680
				685
Glu Pro Ala Gln Gln Ala Met Arg Lys Ala Leu Thr Leu Arg Tyr Ala				
		690		695
				700
Leu Leu Pro His Leu Tyr Thr Leu Phe His Gln Ala His Val Ala Gly				
		705		710
				715
				720
Glu Thr Val Ala Arg Pro Leu Phe Leu Glu Phe Pro Lys Asp Ser Ser				
		725		730
				735
Thr Trp Thr Val Asp His Gln Leu Leu Trp Gly Glu Ala Leu Leu Ile				
		740		745
				750
Thr Pro Val Leu Gln Ala Gly Lys Ala Glu Val Thr Gly Tyr Phe Pro				
		755		760
				765

043083

Leu Gly Thr Trp Tyr Asp Leu Gln Thr Val Pro Ile Glu Ala Leu Gly
770 775 780

Ser Leu Pro Pro Pro Pro Ala Ala Pro Arg Glu Pro Ala Ile His Ser
785 790 795 800

Glu Gly Gln Trp Val Thr Leu Pro Ala Pro Leu Asp Thr Ile Asn Val
805 810 815

His Leu Arg Ala Gly Tyr Ile Ile Pro Leu Gln Gly Pro Gly Leu Thr
820 825 830

Thr Thr Glu Ser Arg Gln Gln Pro Met Ala Leu Ala Val Ala Leu Thr
835 840 845

Lys Gly Gly Glu Ala Arg Gly Glu Leu Phe Trp Asp Asp Gly Glu Ser
850 855 860

Leu Glu Val Leu Glu Arg Gly Ala Tyr Thr Gln Val Ile Phe Leu Ala
865 870 875 880

Arg Asn Asn Thr Ile Val Asn Glu Leu Val Arg Val Thr Ser Glu Gly
885 890 895

Ala Gly Leu Gln Leu Gln Lys Val Thr Val Leu Gly Val Ala Thr Ala
900 905 910

Pro Gln Gln Val Leu Ser Asn Gly Val Pro Val Ser Asn Phe Thr Tyr
915 920 925

Ser Pro Asp Thr Lys Val Leu Asp Ile Cys Val Ser Leu Leu Met Gly
930 935 940

Glu Gln Phe Leu Val Ser Trp Cys
945 950

<210> 4
<211> 952
<212> BEJOK
<213> Homo sapiens

<400> 4

Met Gly Val Arg His Pro Pro Cys Ser His Arg Leu Leu Ala Val Cys
1 5 10 15

Ala Leu Val Ser Leu Ala Thr Ala Ala Leu Leu Gly His Ile Leu Leu
20 25 30

043083

His Asp Phe Leu Leu Val Pro Arg Glu Leu Ser Gly Ser Ser Pro Val
35 40 45

Leu Glu Glu Thr His Pro Ala His Gln Gln Gly Ala Ser Arg Pro Gly
50 55 60

Pro Arg Asp Ala Gln Ala His Pro Gly Arg Pro Arg Ala Val Pro Thr
65 70 75 80

Gln Cys Asp Val Pro Pro Asn Ser Arg Phe Asp Cys Ala Pro Asp Lys
85 90 95

Ala Ile Thr Gln Glu Gln Cys Glu Ala Arg Gly Cys Cys Tyr Ile Pro
100 105 110

Ala Lys Gln Gly Leu Gln Gly Ala Gln Met Gly Gln Pro Trp Cys Phe
115 120 125

Phe Pro Pro Ser Tyr Pro Ser Tyr Lys Leu Glu Asn Leu Ser Ser Ser
130 135 140

Glu Met Gly Tyr Thr Ala Thr Leu Thr Arg Thr Thr Pro Thr Phe Phe
145 150 155 160

Pro Lys Asp Ile Leu Thr Leu Arg Leu Asp Val Met Met Glu Thr Glu
165 170 175

Asn Arg Leu His Phe Thr Ile Lys Asp Pro Ala Asn Arg Arg Tyr Glu
180 185 190

Val Pro Leu Glu Thr Pro Arg Val His Ser Arg Ala Pro Ser Pro Leu
195 200 205

Tyr Ser Val Glu Phe Ser Glu Glu Pro Phe Gly Val Ile Val His Arg
210 215 220

Gln Leu Asp Gly Arg Val Leu Leu Asn Thr Thr Val Ala Pro Leu Phe
225 230 235 240

Phe Ala Asp Gln Phe Leu Gln Leu Ser Thr Ser Leu Pro Ser Gln Tyr
245 250 255

Ile Thr Gly Leu Ala Glu His Leu Ser Pro Leu Met Leu Ser Thr Ser
260 265 270

Trp Thr Arg Ile Thr Leu Trp Asn Arg Asp Leu Ala Pro Thr Pro Gly
275 280 285

Ala Asn Leu Tyr Gly Ser His Pro Phe Tyr Leu Ala Leu Glu Asp Gly
 290 295 300

Gly Ser Ala His Gly Val Phe Leu Leu Asn Ser Asn Ala Met Asp Val
 305 310 315 320

Val Leu Gln Pro Ser Pro Ala Leu Ser Trp Arg Ser Thr Gly Gly Ile
 325 330 335

Leu Asp Val Tyr Ile Phe Leu Gly Pro Glu Pro Lys Ser Val Val Gln
 340 345 350

Gln Tyr Leu Asp Val Val Gly Tyr Pro Phe Met Pro Pro Tyr Trp Gly
 355 360 365

Leu Gly Phe His Leu Cys Arg Trp Gly Tyr Ser Ser Thr Ala Ile Thr
 370 375 380

Arg Gln Val Val Glu Asn Met Thr Arg Ala His Phe Pro Leu Asp Val
 385 390 395 400

Gln Trp Asn Asp Leu Asp Tyr Met Asp Ser Arg Arg Asp Phe Thr Phe
 405 410 415

Asn Lys Asp Gly Phe Arg Asp Phe Pro Ala Met Val Gln Glu Leu His
 420 425 430

Gln Gly Gly Arg Arg Tyr Met Met Ile Val Asp Pro Ala Ile Ser Ser
 435 440 445

Ser Gly Pro Ala Gly Ser Tyr Arg Pro Tyr Asp Glu Gly Leu Arg Arg
 450 455 460

Gly Val Phe Ile Thr Asn Glu Thr Gly Gln Pro Leu Ile Gly Lys Val
 465 470 475 480

Trp Pro Gly Ser Thr Ala Phe Pro Asp Phe Thr Asn Pro Thr Ala Leu
 485 490 495

Ala Trp Trp Glu Asp Met Val Ala Glu Phe His Asp Gln Val Pro Phe
 500 505 510

Asp Gly Met Trp Ile Asp Met Asn Glu Pro Ser Asn Phe Ile Arg Gly
 515 520 525

Ser Glu Asp Gly Cys Pro Asn Asn Glu Leu Glu Asn Pro Pro Tyr Val
 530 535 540

Pro Gly Val Val Gly Gly Thr Leu Gln Ala Ala Thr Ile Cys Ala Ser
545 550 555 560

Ser His Gln Phe Leu Ser Thr His Tyr Asn Leu His Asn Leu Tyr Gly
565 570 575

Leu Thr Glu Ala Ile Ala Ser His Arg Ala Leu Val Lys Ala Arg Gly
580 585 590

Thr Arg Pro Phe Val Ile Ser Arg Ser Thr Phe Ala Gly His Gly Arg
595 600 605

Tyr Ala Gly His Trp Thr Gly Asp Val Trp Ser Ser Trp Glu Gln Leu
610 615 620

Ala Ser Ser Val Pro Glu Ile Leu Gln Phe Asn Leu Leu Gly Val Pro
625 630 635 640

Leu Val Gly Ala Asp Val Cys Gly Phe Leu Gly Asn Thr Ser Glu Glu
645 650 655

Leu Cys Val Arg Trp Thr Gln Leu Gly Ala Phe Tyr Pro Phe Met Arg
660 665 670

Asn His Asn Ser Leu Leu Ser Leu Pro Gln Glu Pro Tyr Ser Phe Ser
675 680 685

Glu Pro Ala Gln Gln Ala Met Arg Lys Ala Leu Thr Leu Arg Tyr Ala
690 695 700

Leu Leu Pro His Leu Tyr Thr Leu Phe His Gln Ala His Val Ala Gly
705 710 715 720

Glu Thr Val Ala Arg Pro Leu Phe Leu Glu Phe Pro Lys Asp Ser Ser
725 730 735

Thr Trp Thr Val Asp His Gln Leu Leu Trp Gly Glu Ala Leu Leu Ile
740 745 750

Thr Pro Val Leu Gln Ala Gly Lys Ala Glu Val Thr Gly Tyr Phe Pro
755 760 765

Leu Gly Thr Trp Tyr Asp Leu Gln Thr Val Pro Ile Glu Ala Leu Gly
770 775 780

Ser Leu Pro Pro Pro Pro Ala Ala Pro Arg Glu Pro Ala Ile His Ser

043083

785				790				795				800				
Glu	Gly	Gln	Trp	Val	Thr	Leu	Pro	Ala	Pro	Leu	Asp	Thr	Ile	Asn	Val	
				805					810					815		
His	Leu	Arg	Ala	Gly	Tyr	Ile	Ile	Pro	Leu	Gln	Gly	Pro	Gly	Leu	Thr	
				820					825					830		
Thr	Thr	Glu	Ser	Arg	Gln	Gln	Pro	Met	Ala	Leu	Ala	Val	Ala	Leu	Thr	
				835					840					845		
Lys	Gly	Gly	Glu	Ala	Arg	Gly	Glu	Leu	Phe	Trp	Asp	Asp	Gly	Glu	Ser	
				850					855					860		
Leu	Glu	Val	Leu	Glu	Arg	Gly	Ala	Tyr	Thr	Gln	Val	Ile	Phe	Leu	Ala	
				865					870					875		
Arg	Asn	Asn	Thr	Ile	Val	Asn	Glu	Leu	Val	Arg	Val	Thr	Ser	Glu	Gly	
				885					890					895		
Ala	Gly	Leu	Gln	Leu	Gln	Lys	Val	Thr	Val	Leu	Gly	Val	Ala	Thr	Ala	
				900					905					910		
Pro	Gln	Gln	Val	Leu	Ser	Asn	Gly	Val	Pro	Val	Ser	Asn	Phe	Thr	Tyr	
				915					920					925		
Ser	Pro	Asp	Thr	Lys	Val	Leu	Asp	Ile	Cys	Val	Ser	Leu	Leu	Met	Gly	
				930					935					940		
Glu	Gln	Phe	Leu	Val	Ser	Trp	Cys									
				945					950							
<210>		5														
<211>		952														
<212>		БЕЛЛОК														
<213>		Homo sapiens														
<400>		5														
Met	Gly	Val	Arg	His	Pro	Pro	Cys	Ser	His	Arg	Leu	Leu	Ala	Val	Cys	
				5					10					15		
Ala	Leu	Val	Ser	Leu	Ala	Thr	Ala	Ala	Leu	Leu	Gly	His	Ile	Leu	Leu	
				20					25					30		
His	Asp	Phe	Leu	Leu	Val	Pro	Arg	Glu	Leu	Ser	Gly	Ser	Ser	Pro	Val	
				35					40					45		
Leu	Glu	Glu	Thr	His	Pro	Ala	His	Gln	Gln	Gly	Ala	Ser	Arg	Pro	Gly	

043083

50						55						60					
Pro	Arg	Asp	Ala	Gln	Ala	His	Pro	Gly	Arg	Pro	Arg	Ala	Val	Pro	Thr		
65						70				75					80		
Gln	Cys	Asp	Val	Pro	Pro	Asn	Ser	Arg	Phe	Asp	Cys	Ala	Pro	Asp	Lys		
				85					90					95			
Ala	Ile	Thr	Gln	Glu	Gln	Cys	Glu	Ala	Arg	Gly	Cys	Cys	Tyr	Ile	Pro		
			100					105						110			
Ala	Lys	Gln	Gly	Leu	Gln	Gly	Ala	Gln	Met	Gly	Gln	Pro	Trp	Cys	Phe		
		115					120					125					
Phe	Pro	Pro	Ser	Tyr	Pro	Ser	Tyr	Lys	Leu	Glu	Asn	Leu	Ser	Ser	Ser		
	130					135					140						
Glu	Met	Gly	Tyr	Thr	Ala	Thr	Leu	Thr	Arg	Thr	Thr	Pro	Thr	Phe	Phe		
145					150					155					160		
Pro	Lys	Asp	Ile	Leu	Thr	Leu	Arg	Leu	Asp	Val	Met	Met	Glu	Thr	Glu		
				165					170					175			
Asn	Arg	Leu	His	Phe	Thr	Ile	Lys	Asp	Pro	Ala	Asn	Arg	Arg	Tyr	Glu		
			180					185					190				
Val	Pro	Leu	Glu	Thr	Pro	His	Val	His	Ser	Arg	Ala	Pro	Ser	Pro	Leu		
		195					200					205					
Tyr	Ser	Val	Glu	Phe	Ser	Glu	Glu	Pro	Phe	Gly	Val	Ile	Val	Arg	Arg		
	210					215					220						
Gln	Leu	Asp	Gly	Arg	Val	Leu	Leu	Asn	Thr	Thr	Val	Ala	Pro	Leu	Phe		
225					230					235					240		
Phe	Ala	Asp	Gln	Phe	Leu	Gln	Leu	Ser	Thr	Ser	Leu	Pro	Ser	Gln	Tyr		
				245					250					255			
Ile	Thr	Gly	Leu	Ala	Glu	His	Leu	Ser	Pro	Leu	Met	Leu	Ser	Thr	Ser		
			260					265					270				
Trp	Thr	Arg	Ile	Thr	Leu	Trp	Asn	Arg	Asp	Leu	Ala	Pro	Thr	Pro	Gly		
		275					280					285					
Ala	Asn	Leu	Tyr	Gly	Ser	His	Pro	Phe	Tyr	Leu	Ala	Leu	Glu	Asp	Gly		
	290					295					300						

043083

Gly Ser Ala His Gly Val Phe Leu Leu Asn Ser Asn Ala Met Asp Val
305 310 315 320

Val Leu Gln Pro Ser Pro Ala Leu Ser Trp Arg Ser Thr Gly Gly Ile
325 330 335

Leu Asp Val Tyr Ile Phe Leu Gly Pro Glu Pro Lys Ser Val Val Gln
340 345 350

Gln Tyr Leu Asp Val Val Gly Tyr Pro Phe Met Pro Pro Tyr Trp Gly
355 360 365

Leu Gly Phe His Leu Cys Arg Trp Gly Tyr Ser Ser Thr Ala Ile Thr
370 375 380

Arg Gln Val Val Glu Asn Met Thr Arg Ala His Phe Pro Leu Asp Val
385 390 395 400

Gln Trp Asn Asp Leu Asp Tyr Met Asp Ser Arg Arg Asp Phe Thr Phe
405 410 415

Asn Lys Asp Gly Phe Arg Asp Phe Pro Ala Met Val Gln Glu Leu His
420 425 430

Gln Gly Gly Arg Arg Tyr Met Met Ile Val Asp Pro Ala Ile Ser Ser
435 440 445

Ser Gly Pro Ala Gly Ser Tyr Arg Pro Tyr Asp Glu Gly Leu Arg Arg
450 455 460

Gly Val Phe Ile Thr Asn Glu Thr Gly Gln Pro Leu Ile Gly Lys Val
465 470 475 480

Trp Pro Gly Ser Thr Ala Phe Pro Asp Phe Thr Asn Pro Thr Ala Leu
485 490 495

Ala Trp Trp Glu Asp Met Val Ala Glu Phe His Asp Gln Val Pro Phe
500 505 510

Asp Gly Met Trp Ile Asp Met Asn Glu Pro Ser Asn Phe Ile Arg Gly
515 520 525

Ser Glu Asp Gly Cys Pro Asn Asn Glu Leu Glu Asn Pro Pro Tyr Val
530 535 540

Pro Gly Val Val Gly Gly Thr Leu Gln Ala Ala Thr Ile Cys Ala Ser
545 550 555 560

Ser His Gln Phe Leu Ser Thr His Tyr Asn Leu His Asn Leu Tyr Gly
 565 570 575

Leu Thr Glu Ala Ile Ala Ser His Arg Ala Leu Val Lys Ala Arg Gly
 580 585 590

Thr Arg Pro Phe Val Ile Ser Arg Ser Thr Phe Ala Gly His Gly Arg
 595 600 605

Tyr Ala Gly His Trp Thr Gly Asp Val Trp Ser Ser Trp Glu Gln Leu
 610 615 620

Ala Ser Ser Val Pro Glu Ile Leu Gln Phe Asn Leu Leu Gly Val Pro
 625 630 635 640

Leu Val Gly Ala Asp Val Cys Gly Phe Leu Gly Asn Thr Ser Glu Glu
 645 650 655

Leu Cys Val Arg Trp Thr Gln Leu Gly Ala Phe Tyr Pro Phe Met Arg
 660 665 670

Asn His Asn Ser Leu Leu Ser Leu Pro Gln Glu Pro Tyr Ser Phe Ser
 675 680 685

Glu Pro Ala Gln Gln Ala Met Arg Lys Ala Leu Thr Leu Arg Tyr Ala
 690 695 700

Leu Leu Pro His Leu Tyr Thr Leu Phe His Gln Ala His Val Ala Gly
 705 710 715 720

Glu Thr Val Ala Arg Pro Leu Phe Leu Glu Phe Pro Lys Asp Ser Ser
 725 730 735

Thr Trp Thr Val Asp His Gln Leu Leu Trp Gly Glu Ala Leu Leu Ile
 740 745 750

Thr Pro Val Leu Gln Ala Gly Lys Ala Glu Val Thr Gly Tyr Phe Pro
 755 760 765

Leu Gly Thr Trp Tyr Asp Leu Gln Thr Val Pro Val Glu Ala Leu Gly
 770 775 780

Ser Leu Pro Pro Pro Pro Ala Ala Pro Arg Glu Pro Ala Ile His Ser
 785 790 795 800

Glu Gly Gln Trp Val Thr Leu Pro Ala Pro Leu Asp Thr Ile Asn Val
 805 810 815

His Leu Arg Ala Gly Tyr Ile Ile Pro Leu Gln Gly Pro Gly Leu Thr
820 825 830

Thr Thr Glu Ser Arg Gln Gln Pro Met Ala Leu Ala Val Ala Leu Thr
835 840 845

Lys Gly Gly Glu Ala Arg Gly Glu Leu Phe Trp Asp Asp Gly Glu Ser
850 855 860

Leu Glu Val Leu Glu Arg Gly Ala Tyr Thr Gln Val Ile Phe Leu Ala
865 870 875 880

Arg Asn Asn Thr Ile Val Asn Glu Leu Val Arg Val Thr Ser Glu Gly
885 890 895

Ala Gly Leu Gln Leu Gln Lys Val Thr Val Leu Gly Val Ala Thr Ala
900 905 910

Pro Gln Gln Val Leu Ser Asn Gly Val Pro Val Ser Asn Phe Thr Tyr
915 920 925

Ser Pro Asp Thr Lys Val Leu Asp Ile Cys Val Ser Leu Leu Met Gly
930 935 940

Glu Gln Phe Leu Val Ser Trp Cys
945 950

<210> 6
<211> 896
<212> БЕЖОК
<213> Homo sapiens

<400> 6

Gln Gln Gly Ala Ser Arg Pro Gly Pro Arg Asp Ala Gln Ala His Pro
1 5 10 15

Gly Arg Pro Arg Ala Val Pro Thr Gln Cys Asp Val Pro Pro Asn Ser
20 25 30

Arg Phe Asp Cys Ala Pro Asp Lys Ala Ile Thr Gln Glu Gln Cys Glu
35 40 45

Ala Arg Gly Cys Cys Tyr Ile Pro Ala Lys Gln Gly Leu Gln Gly Ala
50 55 60

Gln Met Gly Gln Pro Trp Cys Phe Phe Pro Pro Ser Tyr Pro Ser Tyr
65 70 75 80

Lys Leu Glu Asn Leu Ser Ser Ser Glu Met Gly Tyr Thr Ala Thr Leu
 85 90 95

Thr Arg Thr Thr Pro Thr Phe Phe Pro Lys Asp Ile Leu Thr Leu Arg
 100 105 110

Leu Asp Val Met Met Glu Thr Glu Asn Arg Leu His Phe Thr Ile Lys
 115 120 125

Asp Pro Ala Asn Arg Arg Tyr Glu Val Pro Leu Glu Thr Pro Arg Val
 130 135 140

His Ser Arg Ala Pro Ser Pro Leu Tyr Ser Val Glu Phe Ser Glu Glu
 145 150 155 160

Pro Phe Gly Val Ile Val His Arg Gln Leu Asp Gly Arg Val Leu Leu
 165 170 175

Asn Thr Thr Val Ala Pro Leu Phe Phe Ala Asp Gln Phe Leu Gln Leu
 180 185 190

Ser Thr Ser Leu Pro Ser Gln Tyr Ile Thr Gly Leu Ala Glu His Leu
 195 200 205

Ser Pro Leu Met Leu Ser Thr Ser Trp Thr Arg Ile Thr Leu Trp Asn
 210 215 220

Arg Asp Leu Ala Pro Thr Pro Gly Ala Asn Leu Tyr Gly Ser His Pro
 225 230 235 240

Phe Tyr Leu Ala Leu Glu Asp Gly Gly Ser Ala His Gly Val Phe Leu
 245 250 255

Leu Asn Ser Asn Ala Met Asp Val Val Leu Gln Pro Ser Pro Ala Leu
 260 265 270

Ser Trp Arg Ser Thr Gly Gly Ile Leu Asp Val Tyr Ile Phe Leu Gly
 275 280 285

Pro Glu Pro Lys Ser Val Val Gln Gln Tyr Leu Asp Val Val Gly Tyr
 290 295 300

Pro Phe Met Pro Pro Tyr Trp Gly Leu Gly Phe His Leu Cys Arg Trp
 305 310 315 320

Gly Tyr Ser Ser Thr Ala Ile Thr Arg Gln Val Val Glu Asn Met Thr

043083

				325						330						335			
Arg	Ala	His	Phe	Pro	Leu	Asp	Val	Gln	Trp	Asn	Asp	Leu	Asp	Tyr	Met				
			340					345					350						
Asp	Ser	Arg	Arg	Asp	Phe	Thr	Phe	Asn	Lys	Asp	Gly	Phe	Arg	Asp	Phe				
		355					360					365							
Pro	Ala	Met	Val	Gln	Glu	Leu	His	Gln	Gly	Gly	Arg	Arg	Tyr	Met	Met				
	370					375					380								
Ile	Val	Asp	Pro	Ala	Ile	Ser	Ser	Ser	Gly	Pro	Ala	Gly	Ser	Tyr	Arg				
385					390					395					400				
Pro	Tyr	Asp	Glu	Gly	Leu	Arg	Arg	Gly	Val	Phe	Ile	Thr	Asn	Glu	Thr				
			405						410					415					
Gly	Gln	Pro	Leu	Ile	Gly	Lys	Val	Trp	Pro	Gly	Ser	Thr	Ala	Phe	Pro				
			420					425					430						
Asp	Phe	Thr	Asn	Pro	Thr	Ala	Leu	Ala	Trp	Trp	Glu	Asp	Met	Val	Ala				
		435					440					445							
Glu	Phe	His	Asp	Gln	Val	Pro	Phe	Asp	Gly	Met	Trp	Ile	Asp	Met	Asn				
	450					455					460								
Glu	Pro	Ser	Asn	Phe	Ile	Arg	Gly	Ser	Glu	Asp	Gly	Cys	Pro	Asn	Asn				
465					470					475					480				
Glu	Leu	Glu	Asn	Pro	Pro	Tyr	Val	Pro	Gly	Val	Val	Gly	Gly	Thr	Leu				
			485						490					495					
Gln	Ala	Ala	Thr	Ile	Cys	Ala	Ser	Ser	His	Gln	Phe	Leu	Ser	Thr	His				
			500					505					510						
Tyr	Asn	Leu	His	Asn	Leu	Tyr	Gly	Leu	Thr	Glu	Ala	Ile	Ala	Ser	His				
		515					520					525							
Arg	Ala	Leu	Val	Lys	Ala	Arg	Gly	Thr	Arg	Pro	Phe	Val	Ile	Ser	Arg				
	530					535					540								
Ser	Thr	Phe	Ala	Gly	His	Gly	Arg	Tyr	Ala	Gly	His	Trp	Thr	Gly	Asp				
545					550					555					560				
Val	Trp	Ser	Ser	Trp	Glu	Gln	Leu	Ala	Ser	Ser	Val	Pro	Glu	Ile	Leu				
				565					570					575					

043083

Gln Phe Asn Leu Leu Gly Val Pro Leu Val Gly Ala Asp Val Cys Gly
580 585 590

Phe Leu Gly Asn Thr Ser Glu Glu Leu Cys Val Arg Trp Thr Gln Leu
595 600 605

Gly Ala Phe Tyr Pro Phe Met Arg Asn His Asn Ser Leu Leu Ser Leu
610 615 620

Pro Gln Glu Pro Tyr Ser Phe Ser Glu Pro Ala Gln Gln Ala Met Arg
625 630 635 640

Lys Ala Leu Thr Leu Arg Tyr Ala Leu Leu Pro His Leu Tyr Thr Leu
645 650 655

Phe His Gln Ala His Val Ala Gly Glu Thr Val Ala Arg Pro Leu Phe
660 665 670

Leu Glu Phe Pro Lys Asp Ser Ser Thr Trp Thr Val Asp His Gln Leu
675 680 685

Leu Trp Gly Glu Ala Leu Leu Ile Thr Pro Val Leu Gln Ala Gly Lys
690 695 700

Ala Glu Val Thr Gly Tyr Phe Pro Leu Gly Thr Trp Tyr Asp Leu Gln
705 710 715 720

Thr Val Pro Ile Glu Ala Leu Gly Ser Leu Pro Pro Pro Pro Ala Ala
725 730 735

Pro Arg Glu Pro Ala Ile His Ser Glu Gly Gln Trp Val Thr Leu Pro
740 745 750

Ala Pro Leu Asp Thr Ile Asn Val His Leu Arg Ala Gly Tyr Ile Ile
755 760 765

Pro Leu Gln Gly Pro Gly Leu Thr Thr Thr Glu Ser Arg Gln Gln Pro
770 775 780

Met Ala Leu Ala Val Ala Leu Thr Lys Gly Gly Glu Ala Arg Gly Glu
785 790 795 800

Leu Phe Trp Asp Asp Gly Glu Ser Leu Glu Val Leu Glu Arg Gly Ala
805 810 815

Tyr Thr Gln Val Ile Phe Leu Ala Arg Asn Asn Thr Ile Val Asn Glu
820 825 830

Leu Val Arg Val Thr Ser Glu Gly Ala Gly Leu Gln Leu Gln Lys Val
835 840 845

Thr Val Leu Gly Val Ala Thr Ala Pro Gln Gln Val Leu Ser Asn Gly
850 855 860

Val Pro Val Ser Asn Phe Thr Tyr Ser Pro Asp Thr Lys Val Leu Asp
865 870 875 880

Ile Cys Val Ser Leu Leu Met Gly Glu Gln Phe Leu Val Ser Trp Cys
885 890 895

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ лечения болезни Помпе у пациента, нуждающегося в этом, включающий введение пациенту первой композиции, содержащей молекулы рекомбинантной кислой α -глюкозидазы человека (rhGAA), и второй композиции, содержащей миглустат,

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

где молекулы rhGAA получают из клеток яичника китайского хомячка (CHO), молекулы rhGAA содержат семь потенциальных сайтов N-гликозилирования в следующих положениях SEQ ID NO: 5: N84, N177, N334, N414, N596, N826 и N869, 40-60% N-гликанов в молекулах rhGAA представляют собой N-гликаны комплексного типа, и по меньшей мере 50% молекул rhGAA имеют звено бис-маннозо-6-фосфата (бис-M6P) в первом потенциальном сайте N-гликозилирования.

2. Способ по п.1, где молекулы rhGAA содержат последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO: 5.

3. Способ по п.1, где молекулы rhGAA экспрессируются как имеющие:

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

(ii) последовательность SEQ ID NO: 4, где молекулы rhGAA подвергаются посттрансляционной модификации, при которой удаляются первые 56 аминокислот.

4. Способ по любому из пп.1-3, где по меньшей мере 55% молекул rhGAA имеют звено бис-M6P в первом потенциальном сайте N-гликозилирования.

5. Способ по любому из пп.1-4, где по меньшей мере 70% молекул rhGAA являются фосфорилированными в первом потенциальном сайте N-гликозилирования.

6. Способ по любому из пп.1-5, где по меньшей мере 40% молекул rhGAA имеют звено моно-маннозо-6-фосфата (моно-M6P) во втором потенциальном сайте N-гликозилирования.

7. Способ по любому из пп.1-6, где по меньшей мере 40% молекул rhGAA имеют звено бис-M6P в четвертом потенциальном сайте N-гликозилирования.

8. Способ по любому из пп.1-7, где по меньшей мере 25% молекул rhGAA имеют звено моно-M6P в четвертом потенциальном сайте N-гликозилирования.

9. Способ по любому из пп.1-8, где до 60% N-гликанов в молекулах rhGAA являются полностью сиалированными.

10. Способ по п.9, где от 4 до 20% N-гликанов в молекулах rhGAA являются полностью сиалированными.

11. Способ по п.9 или 10, где по меньшей мере 20% молекул rhGAA имеют сиаловую кислоту в третьем потенциальном сайте N-гликозилирования.

12. Способ по любому из пп.9-11, где по меньшей мере 70% молекул rhGAA имеют сиаловую кислоту в пятом потенциальном сайте N-гликозилирования.

13. Способ по любому из пп.9-12, где по меньшей мере 80% молекул rhGAA имеют сиаловую кислоту в шестом потенциальном сайте N-гликозилирования.

14. Способ по любому из пп.1-3, где:

(a) по меньшей мере 40% молекул rhGAA имеют звено моно-M6P во втором потенциальном сайте N-гликозилирования;

(b) по меньшей мере 20% молекул rhGAA имеют сиаловую кислоту в третьем потенциальном сайте N-гликозилирования;

(c) по меньшей мере 40% молекул rhGAA имеют звено бис-M6P в четвертом потенциальном сайте N-гликозилирования;

(d) по меньшей мере 25% молекул rhGAA имеют звено моно-M6P в четвертом потенциальном сайте

N-гликозилирования и

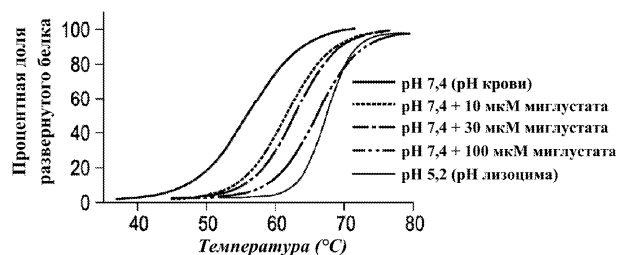
(е) по меньшей мере 70% молекул rhGAA имеют сиаловую кислоту в пятом потенциальном сайте N-гликозилирования.

15. Способ по п.14, где по меньшей мере 80% молекул rhGAA имеют сиаловую кислоту в шестом потенциальном сайте N-гликозилирования, и где от 4 до 20% N-гликанов в молекулах rhGAA являются полностью сиалированными.

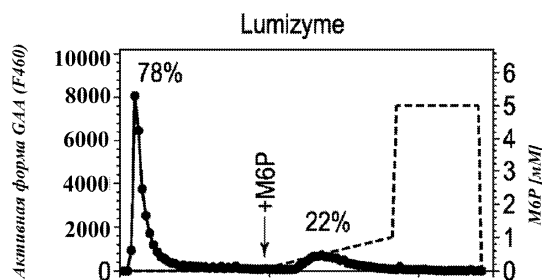
16. Способ по п.14 или 15, где по меньшей мере 55% молекул rhGAA имеют звено бис-М6Р в первом потенциальном сайте N-гликозилирования.

17. Способ по любому из пп.1-16, где первая композиция вводится в течение примерно 4 ч.

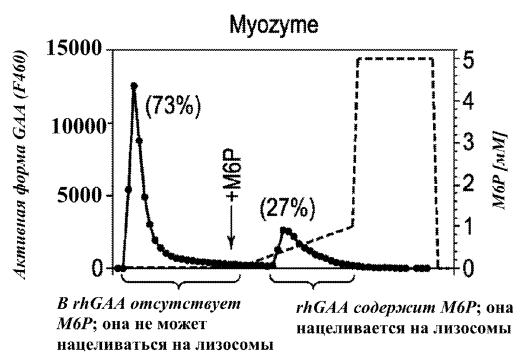
АТВ200 ± миглустат



Фиг. 1

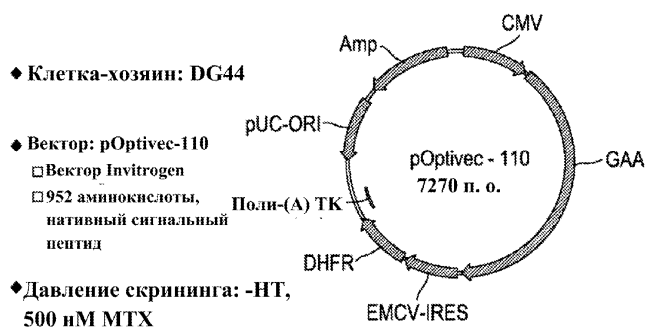


Фиг. 2А

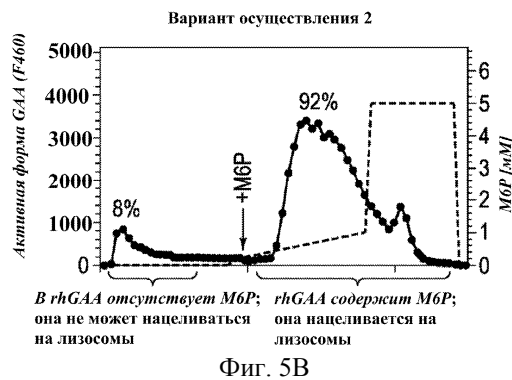
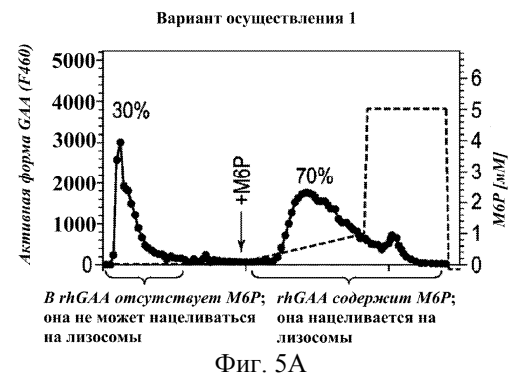
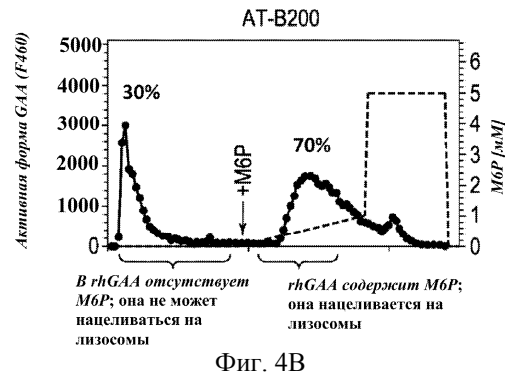
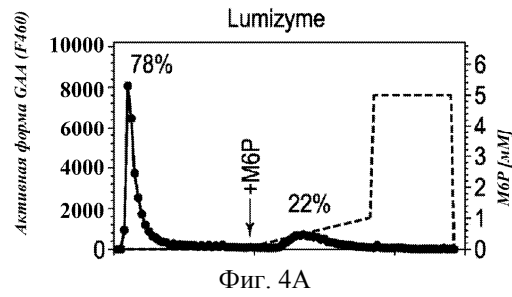


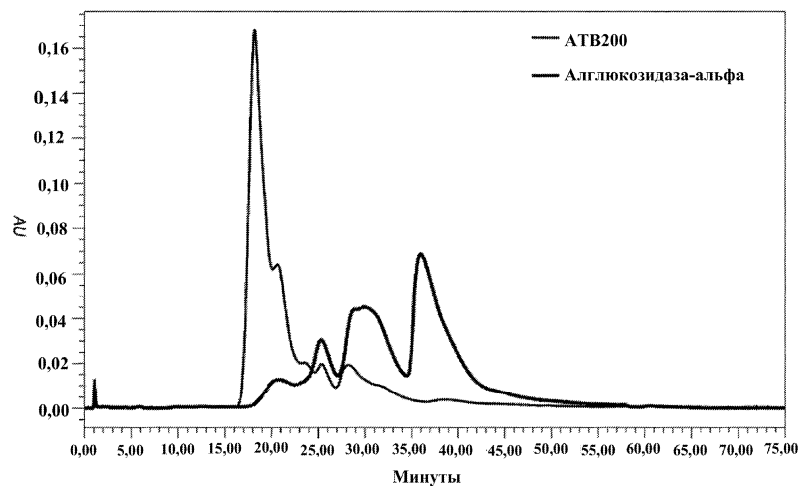
Фиг. 2В

Конструкция вектора АТВ200



Фиг. 3





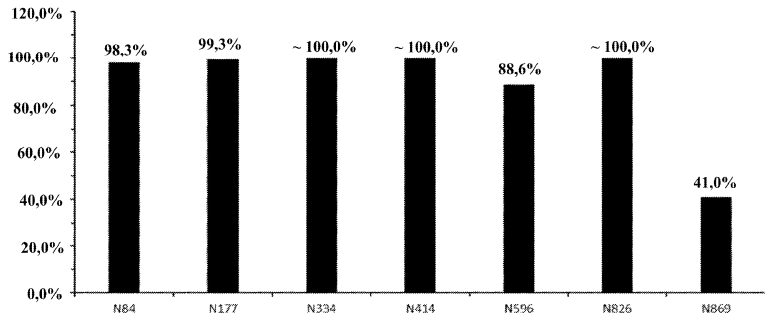
Фиг. 6

Распределение N-гликанов в препаратах на основе rhGAA

	Lumizyme	BP-rhGAA*	ATB200	
			1	2
N-гликаны комплексного типа	70,7%	48,9%	51,0%	47,5%
N-гликаны гибридного типа	6,7%	9,7%	4,4%	3,7%
N-гликаны высокоманнозного типа				
Нефосфорилированные	15,8%	23,7%	14,0%	9,9%
Моно-М6Р	5,2%	10,4%	13,4%	14,2%
Бис-М6Р	1,6%	6,8%	17,2%	24,7%

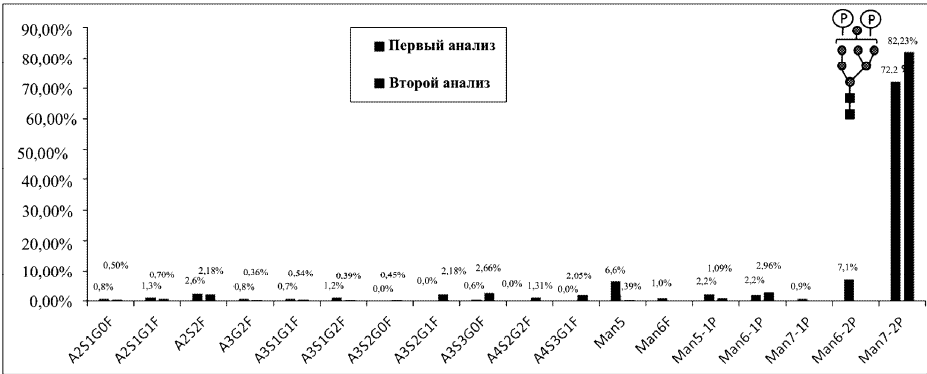
Фиг. 7

Занятость сайтов N-гликозилирования в ATB200



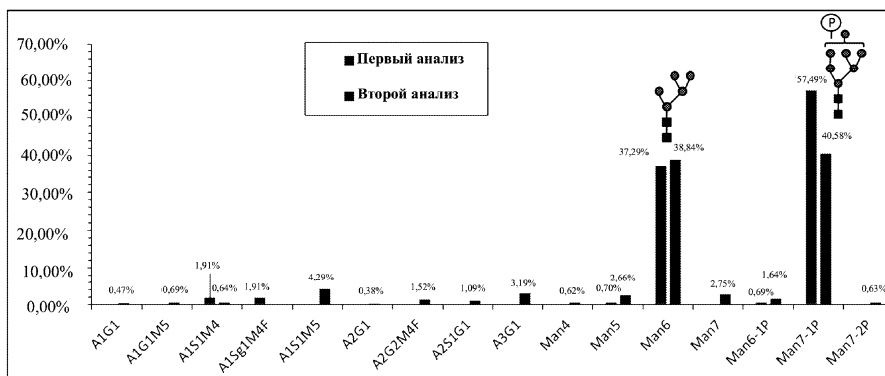
Фиг. 8А

Профиль N-гликозилирования N84



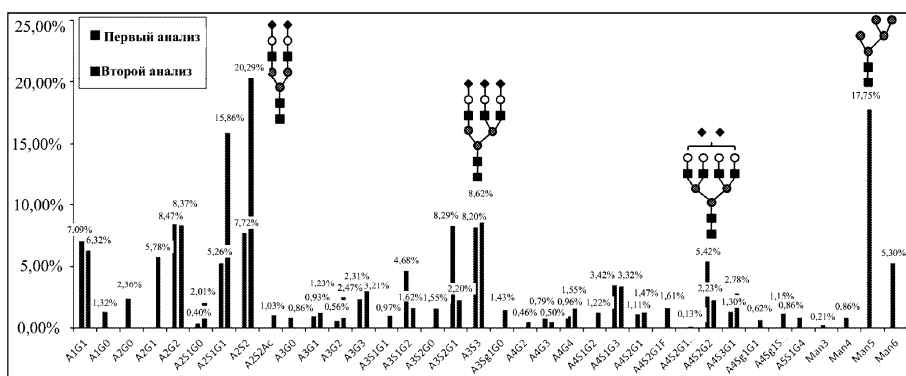
Фиг. 8В

Профиль N-гликозилирования N177



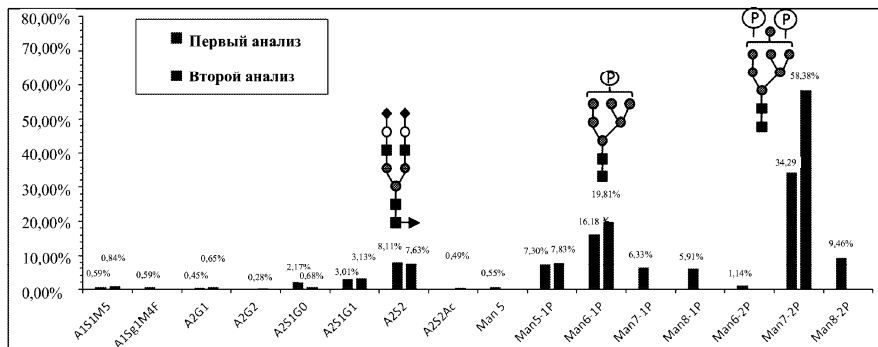
Фиг. 8С

Профиль N-гликозилирования N334



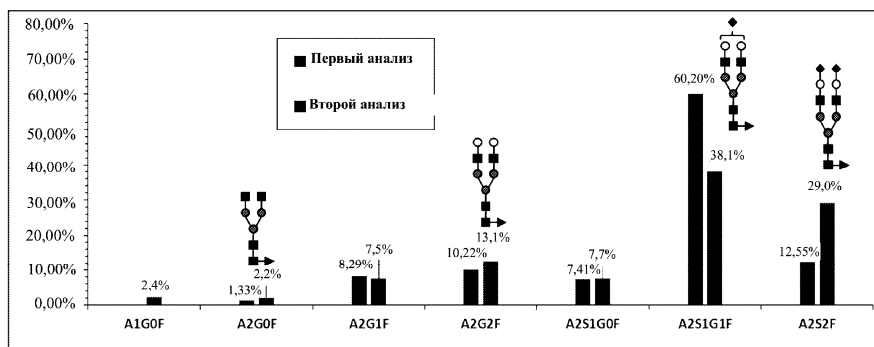
ФИГ. 8D

Профиль N-гликозилирования N414



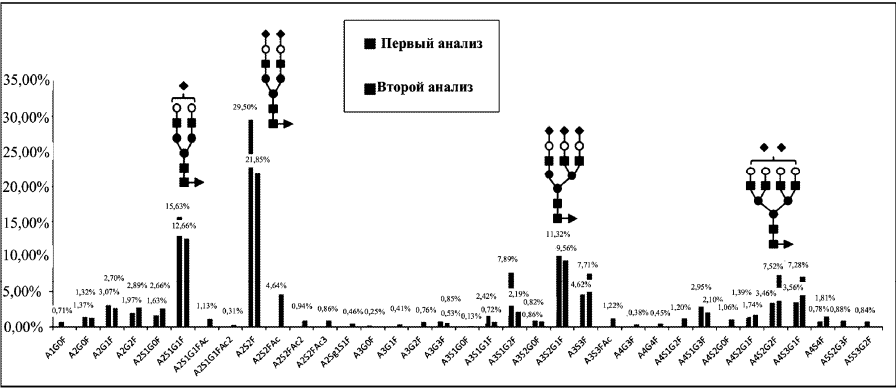
Фиг. 8Е

Профиль N-гликозилирования N596



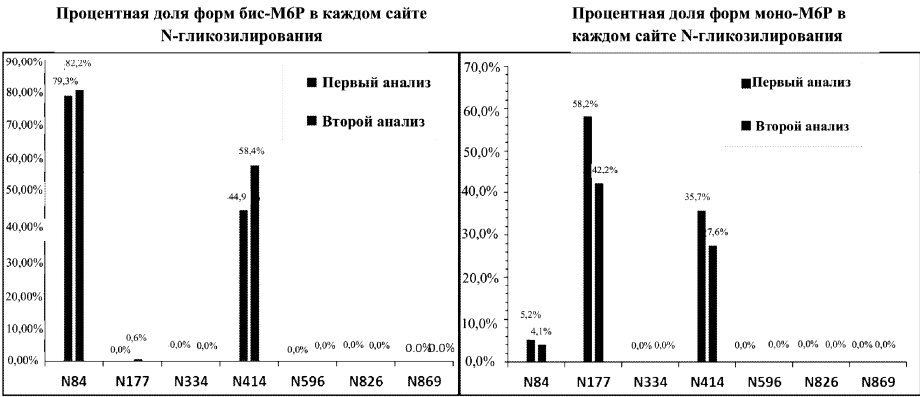
ФИГ. 8F

Профиль N-гликозирования N826

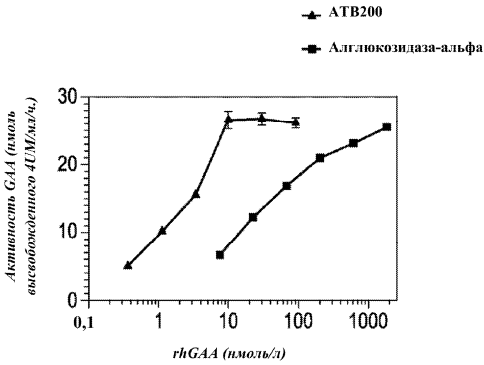


Фиг. 8G

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



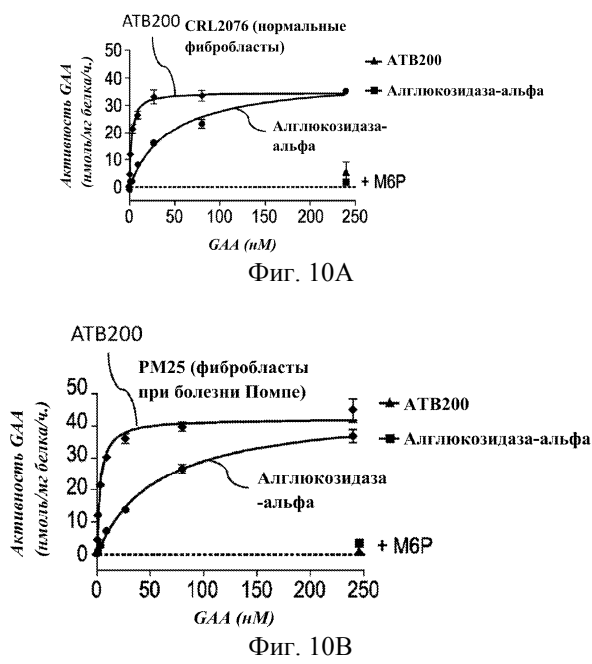
Фиг. 8H



Фиг. 9A

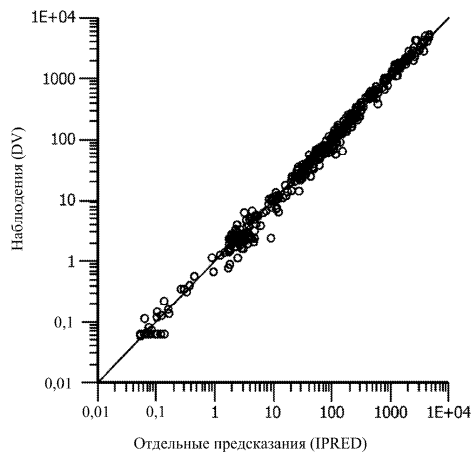
Гликан	Алглюкозидаза-альфа (моль бис-гликана/моль белка)	АТВ200 (моль бис-гликана/моль белка)
Бис-М6Р	0,1	1,3

Фиг. 9B

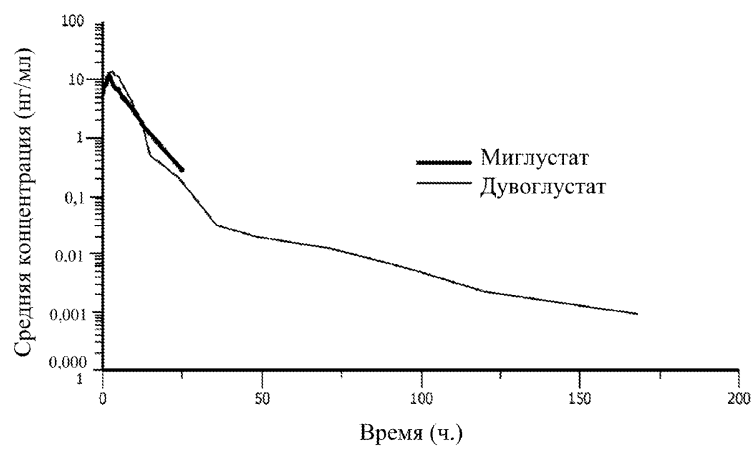


Линия клеток	$K_{\text{поглощение}} (\mu\text{M})$	
	AT200	Lumizyme
Нормальные	2	56
При болезни Помпе	3	57

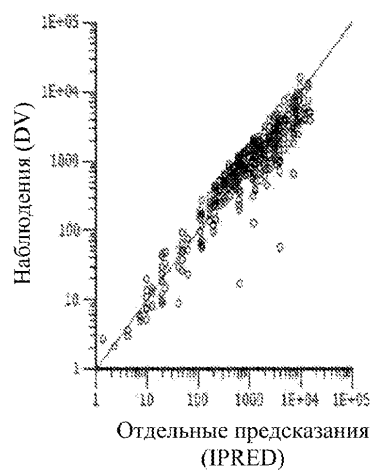
Фиг. 10С



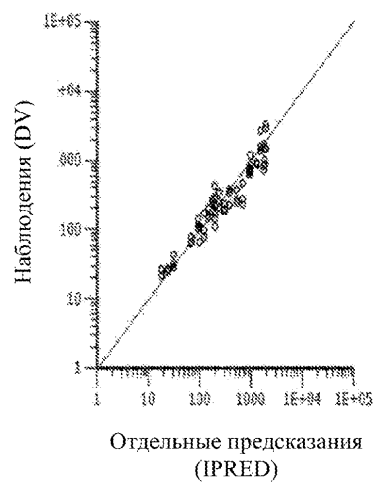
Фиг. 11



Фиг. 12



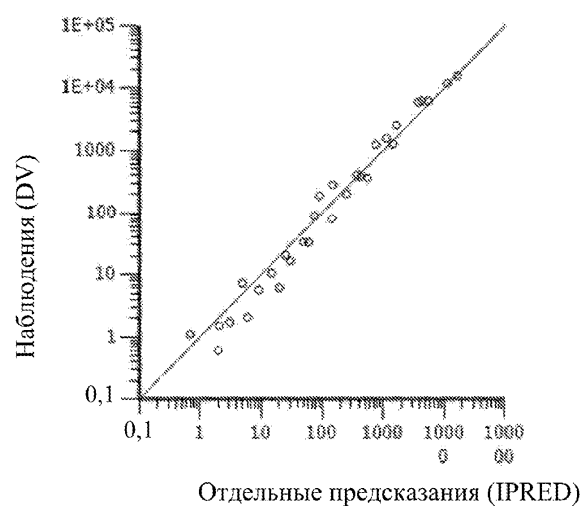
Фиг. 13A



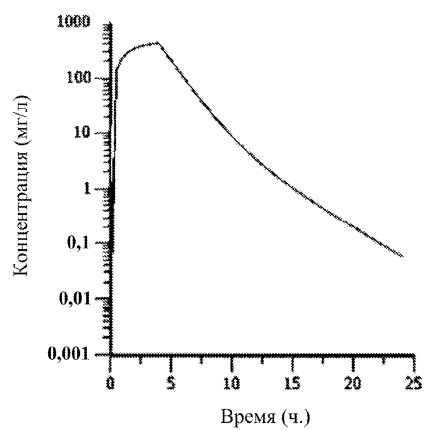
Фиг. 13B

043083

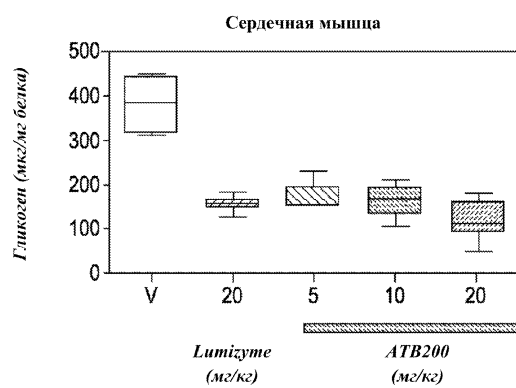
CO_b (нг/мл)



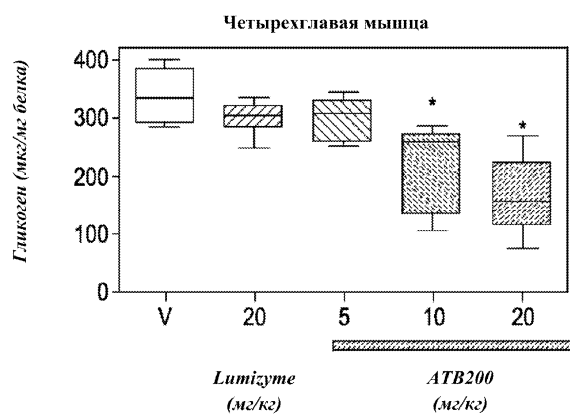
Фиг. 14



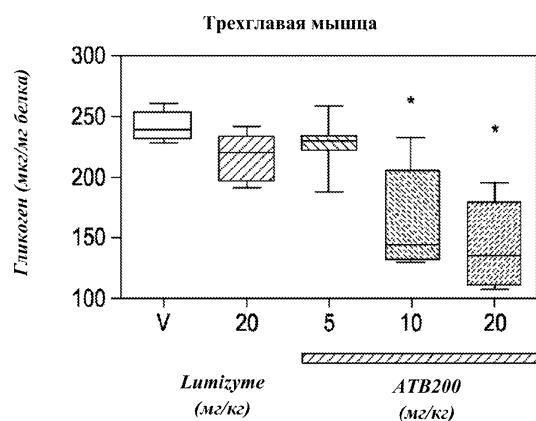
Фиг. 15



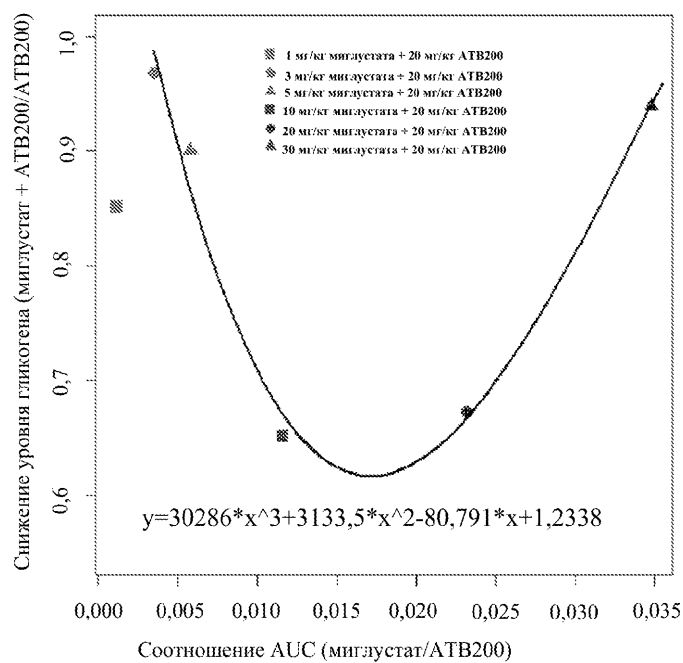
Фиг. 16А



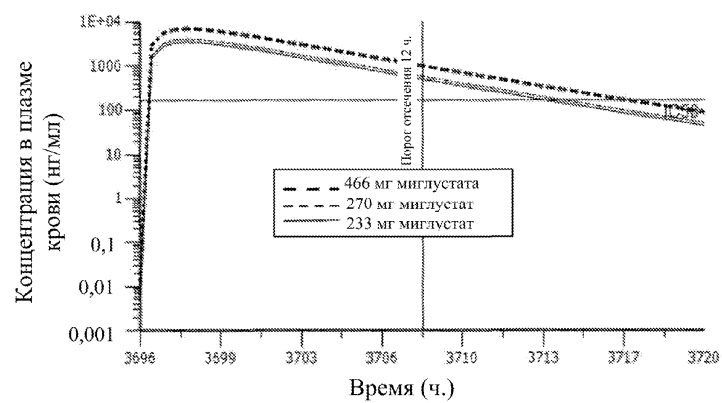
Фиг. 16В



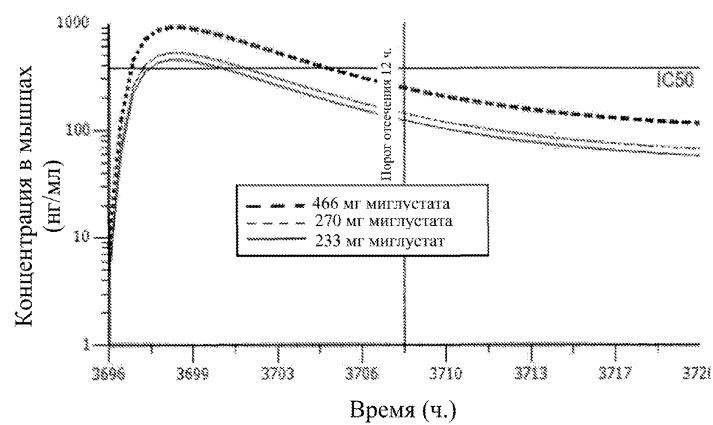
Фиг. 16С



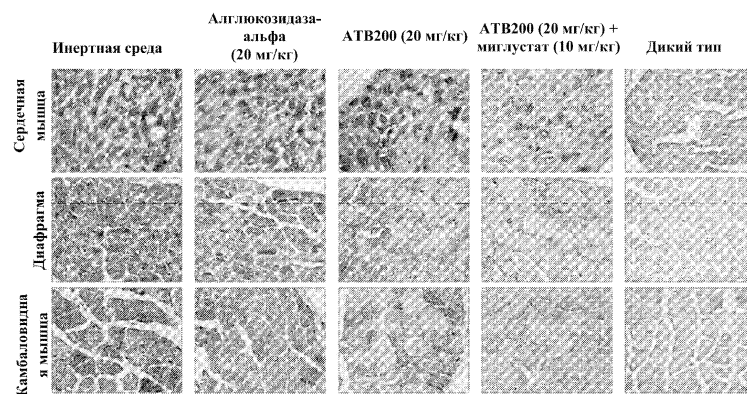
Фиг. 17



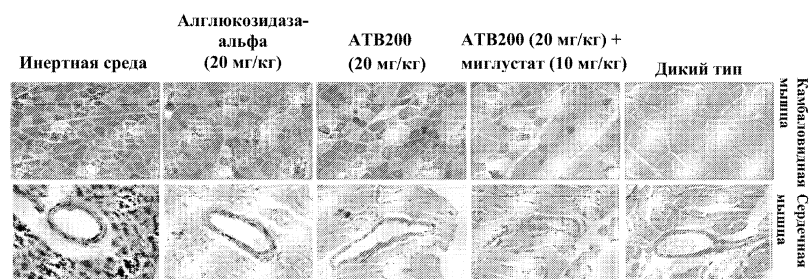
Фиг. 18



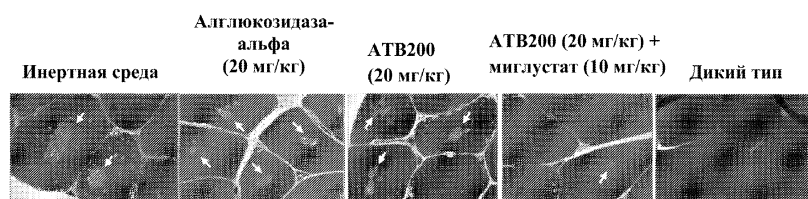
Фиг. 19



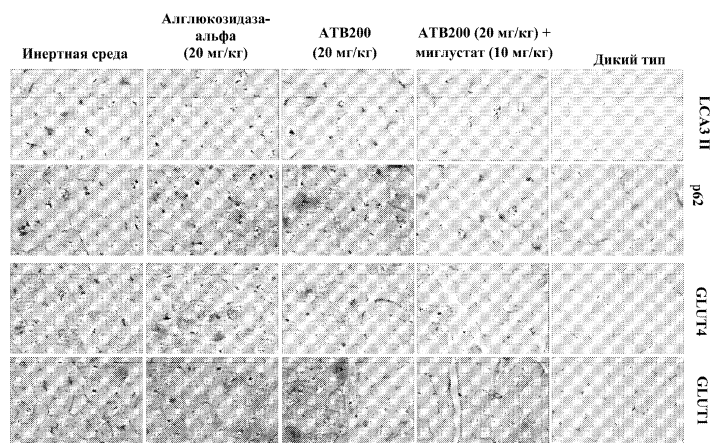
Фиг. 20



Фиг. 21

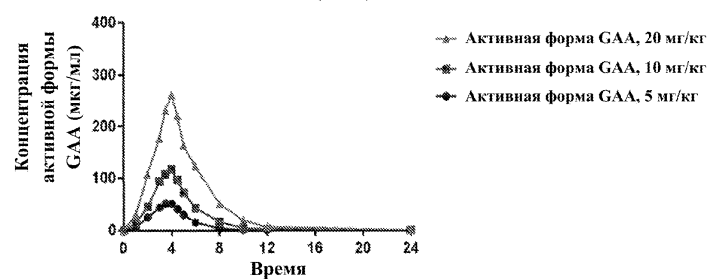


Фиг. 22



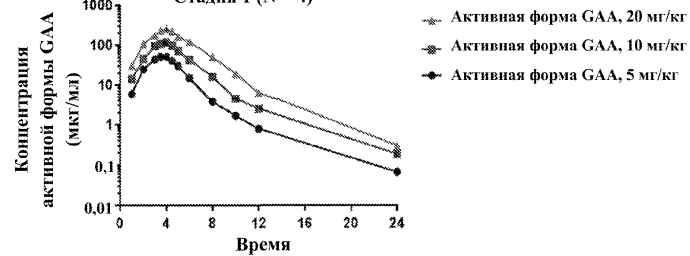
Фиг. 23

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



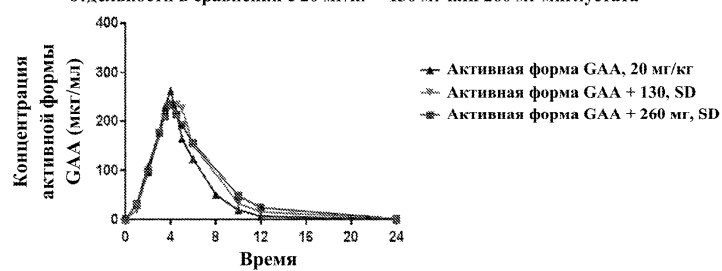
Фиг. 24А

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



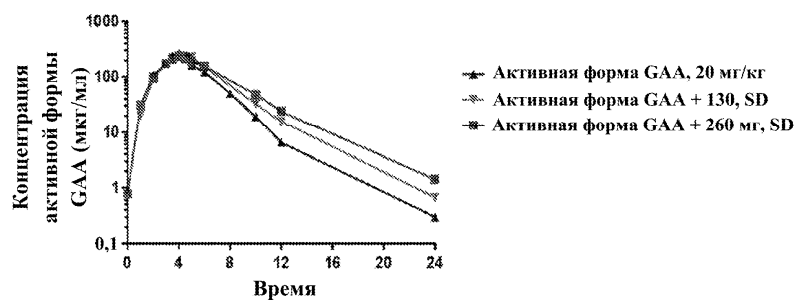
Фиг. 24В

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



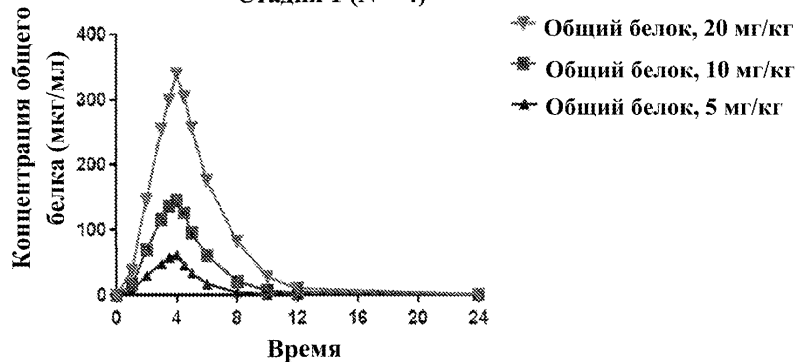
Фиг. 24С

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



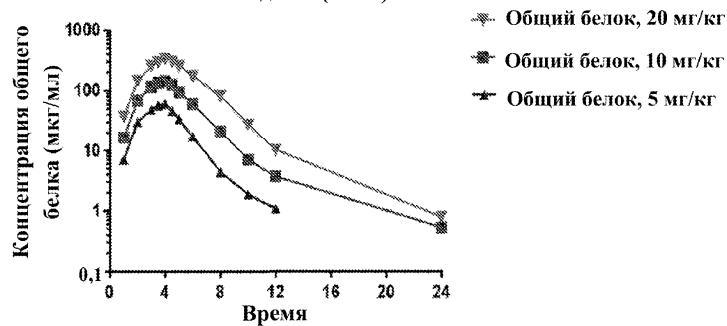
Фиг. 24D

Среднее воздействие общего белка
Стадия 1 (N = 4)



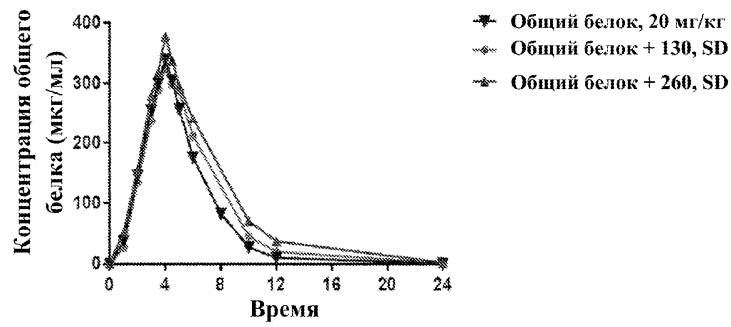
Фиг. 25А

Среднее воздействие общего белка
Стадия 1 (N = 4)

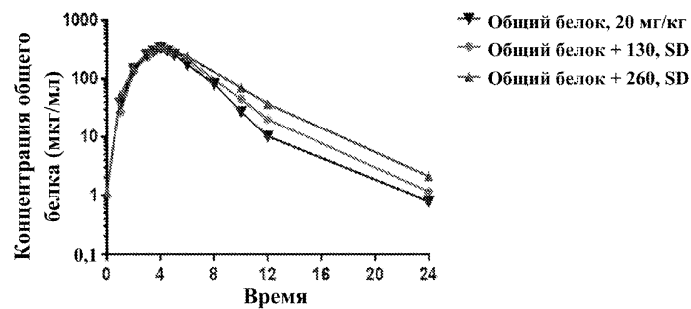


Фиг. 25В

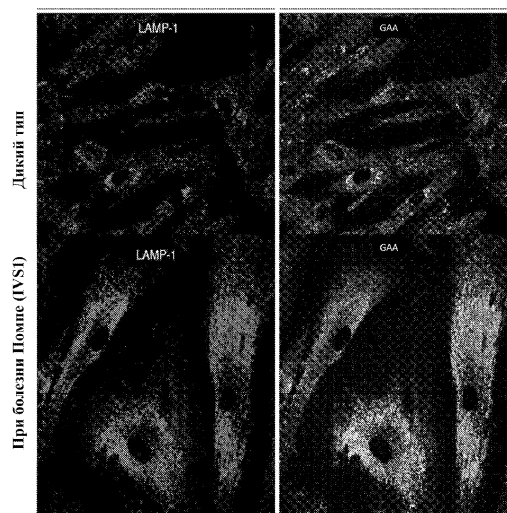
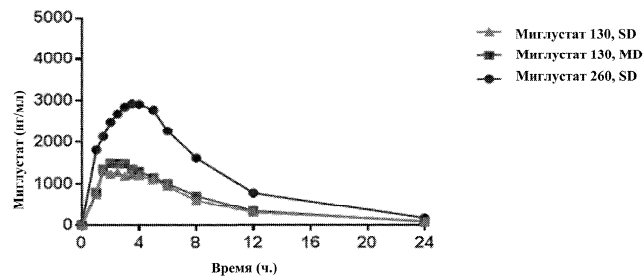
Среднее воздействие общего белка при 20 мг/кг в отдельности в сравнении с 20 мг/кг + 130 мг или 260 мг миглустата

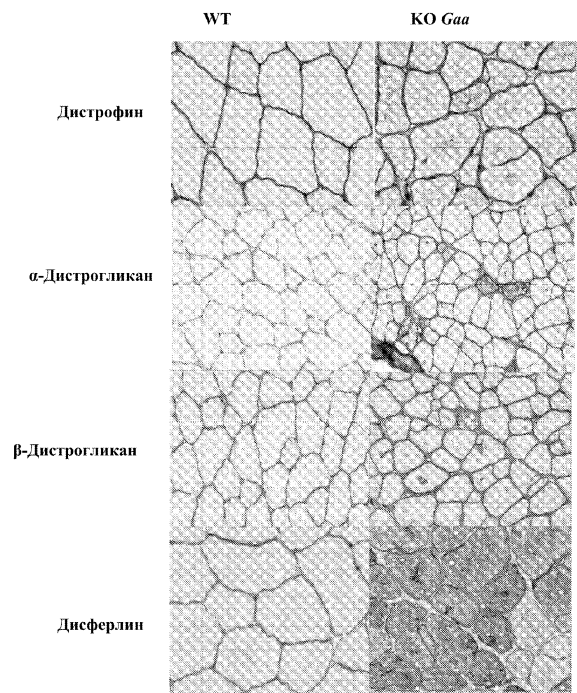


Среднее воздействие общего белка при 20 мг/кг в отдельности в сравнении с 20 мг/кг + 130 мг или 260 мг миглустата



Среднее воздействие миглустата (N = 4)

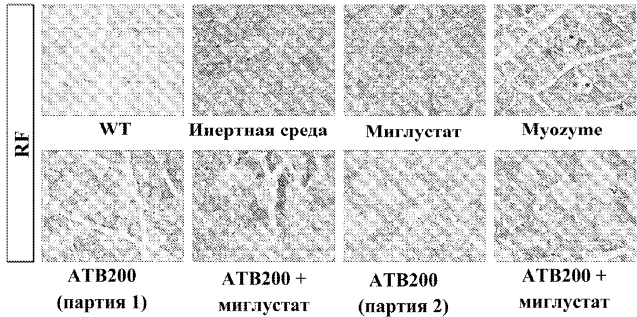




Фиг. 28

ИНС LAMP1

Увеличение = 200x



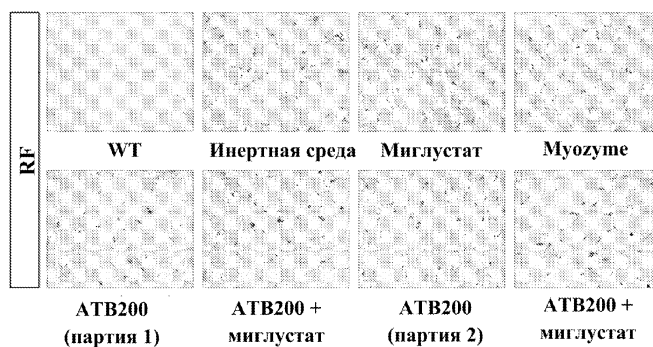
Фиг. 29А



Фиг. 29В

ИНС LC3 II

Увеличение = 200х



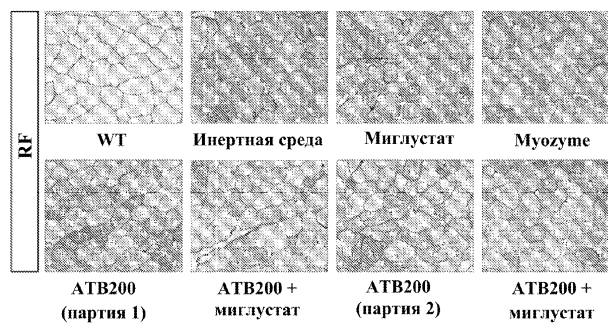
Фиг. 30А



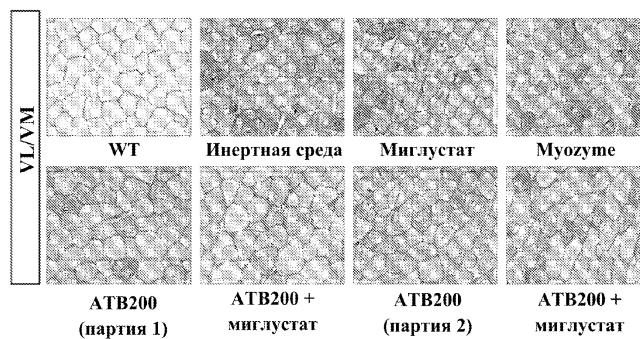
Фиг. 30В

ИНС дисферлина

Увеличение = 200х



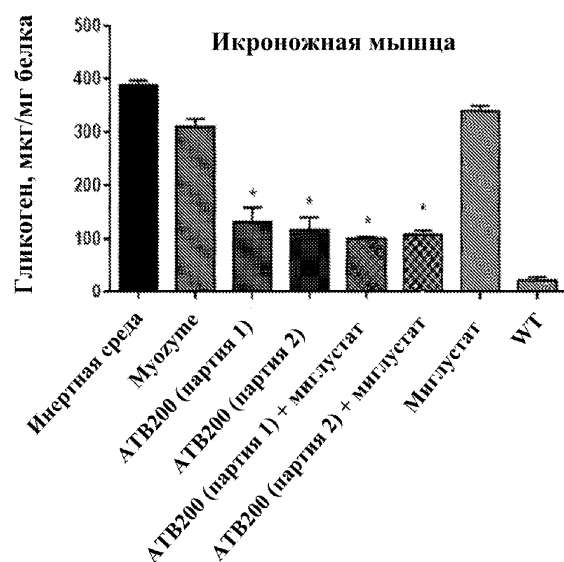
Фиг. 31А



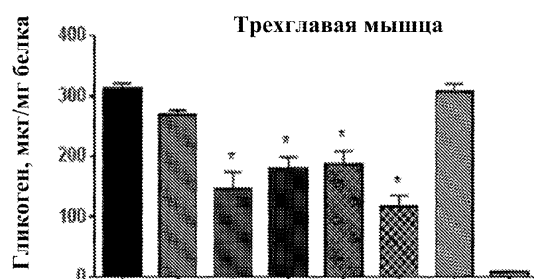
Фиг. 31В



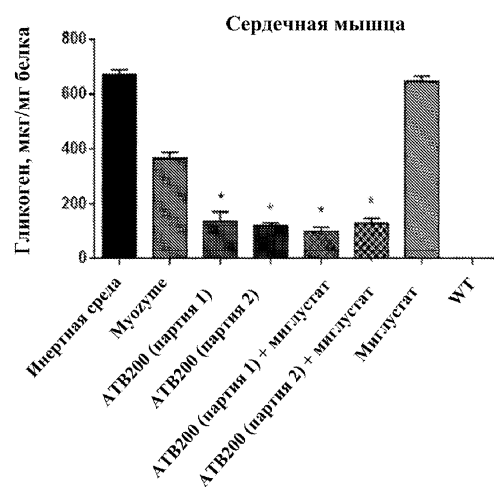
Фиг. 32А



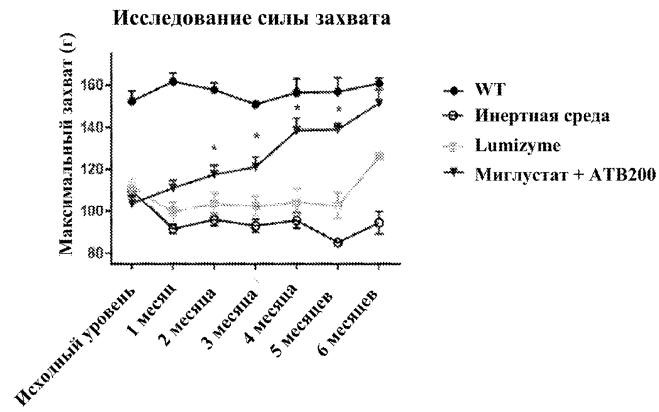
Фиг. 32В



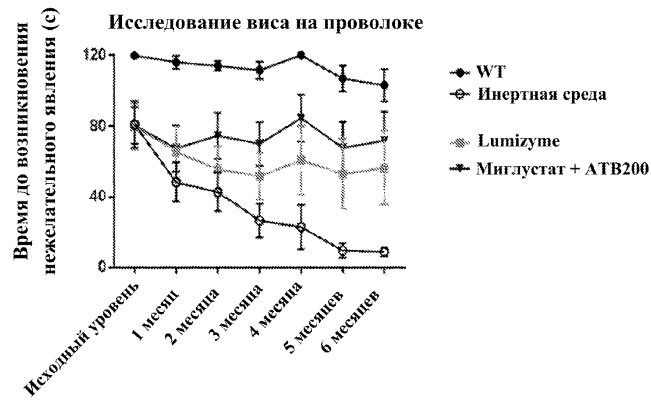
Фиг. 32С



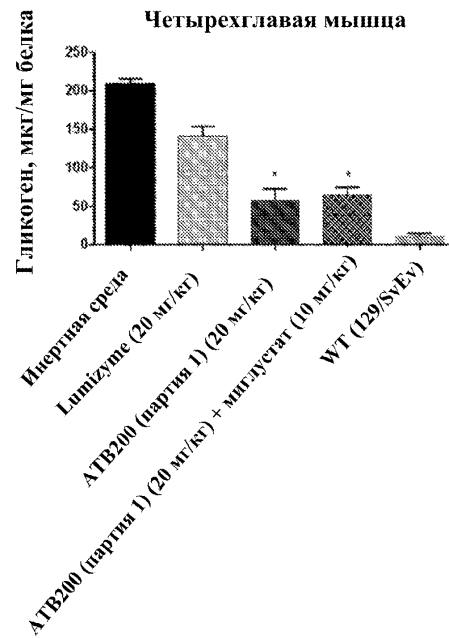
Фиг. 32D



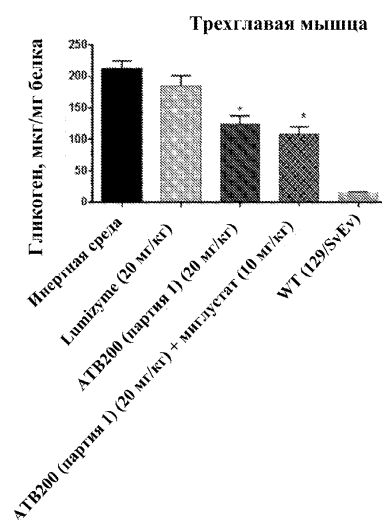
Фиг. 33А



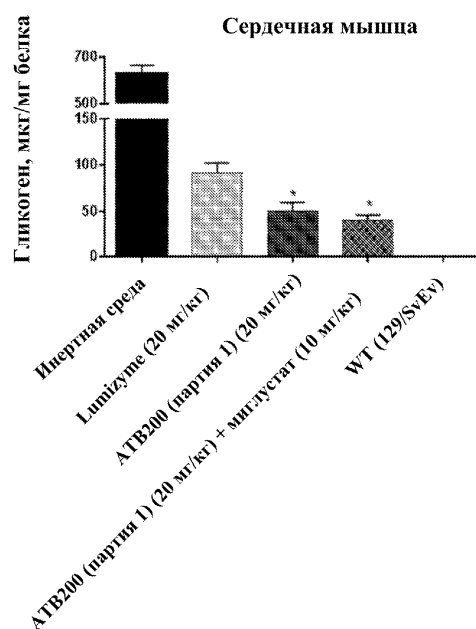
Фиг. 33В



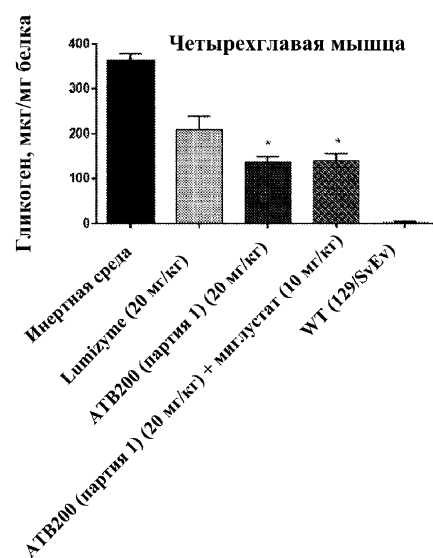
Фиг. 34А



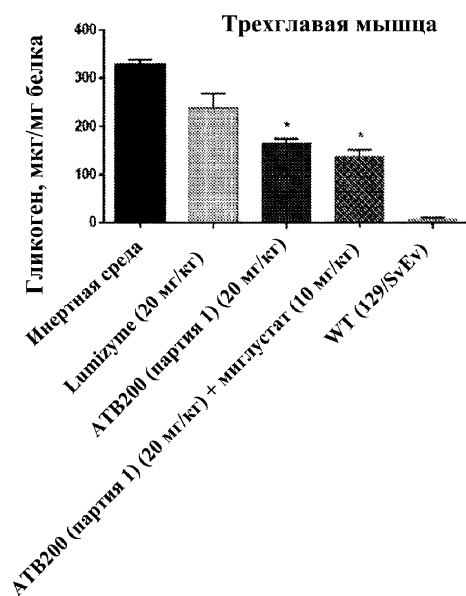
Фиг. 34В



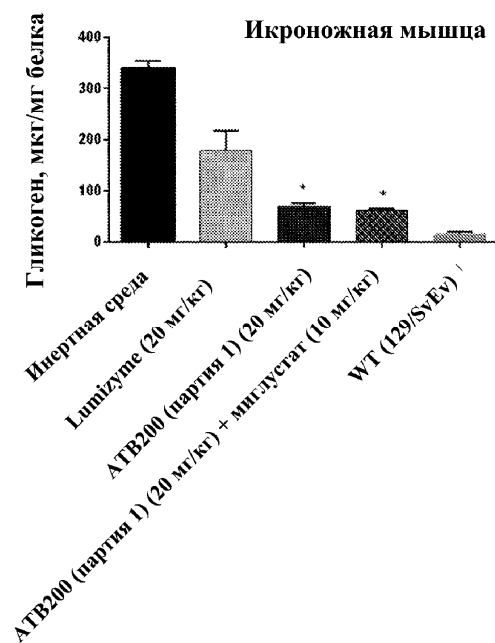
Фиг. 34С



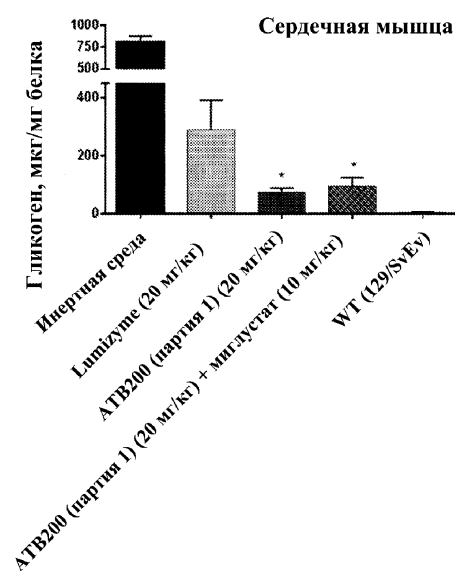
Фиг. 34D



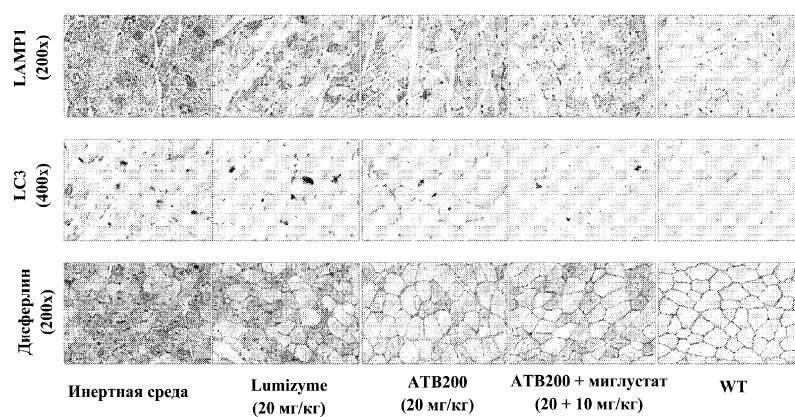
Фиг. 34Е



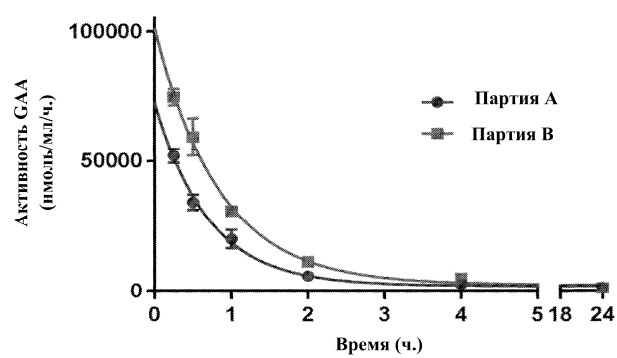
Фиг. 34F



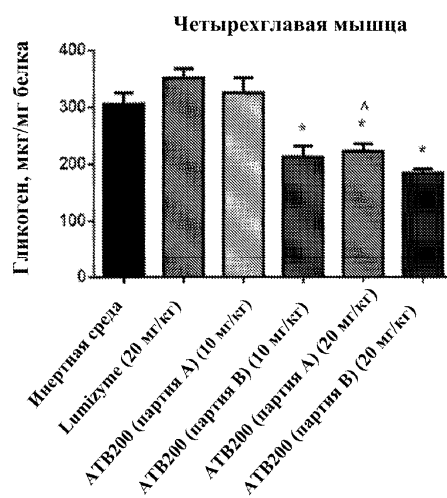
Фиг. 34G



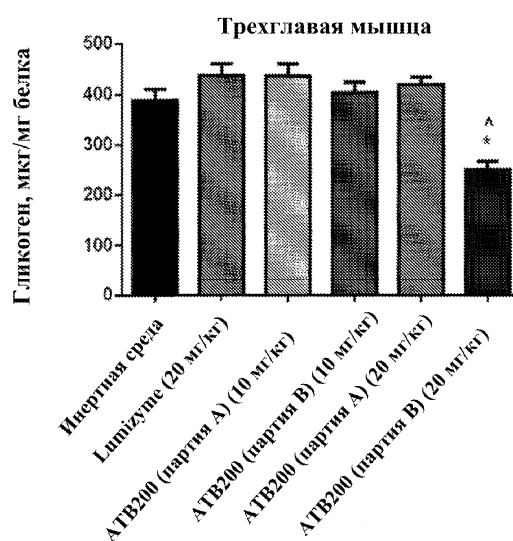
Фиг. 35



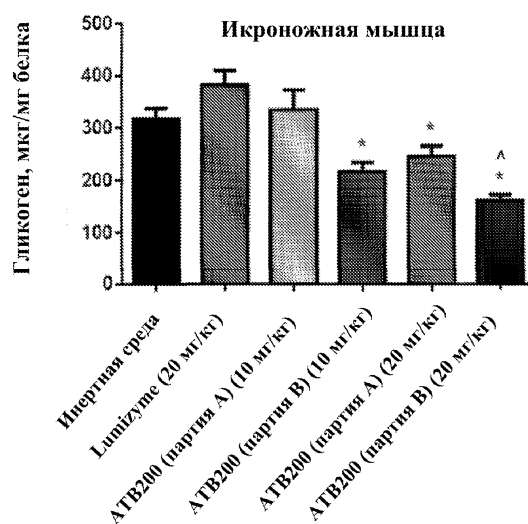
Фиг. 36



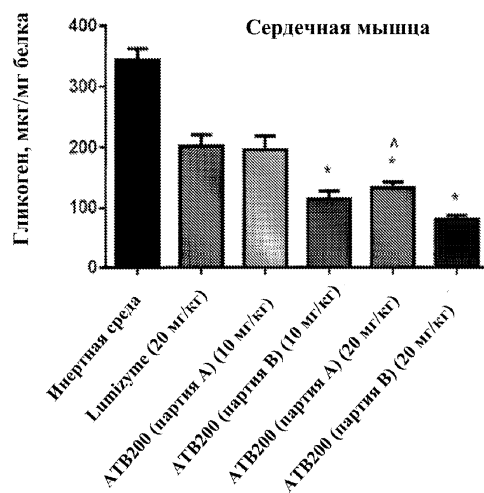
Фиг. 37А



Фиг. 37В

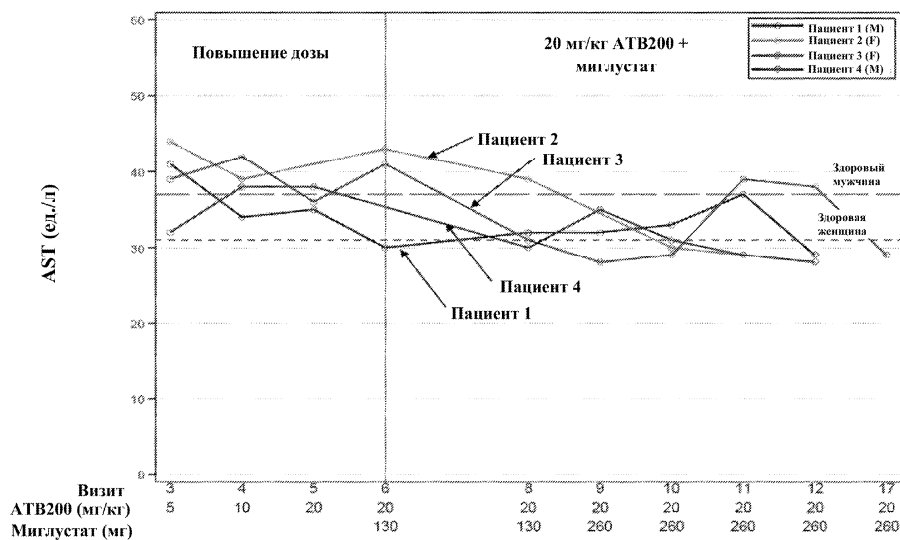


Фиг. 37С



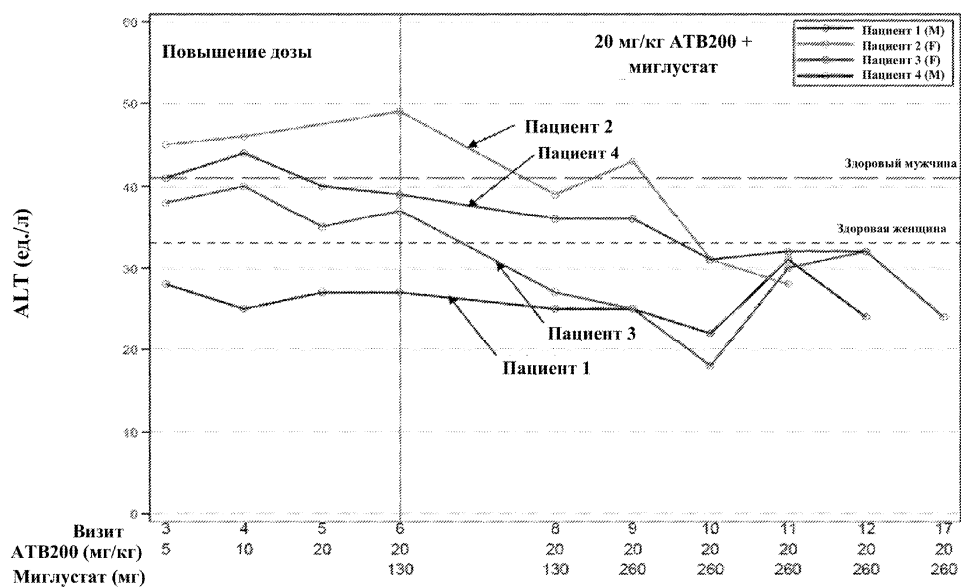
Фиг. 37D

Предварительные данные о маркере мышечной функции: AST



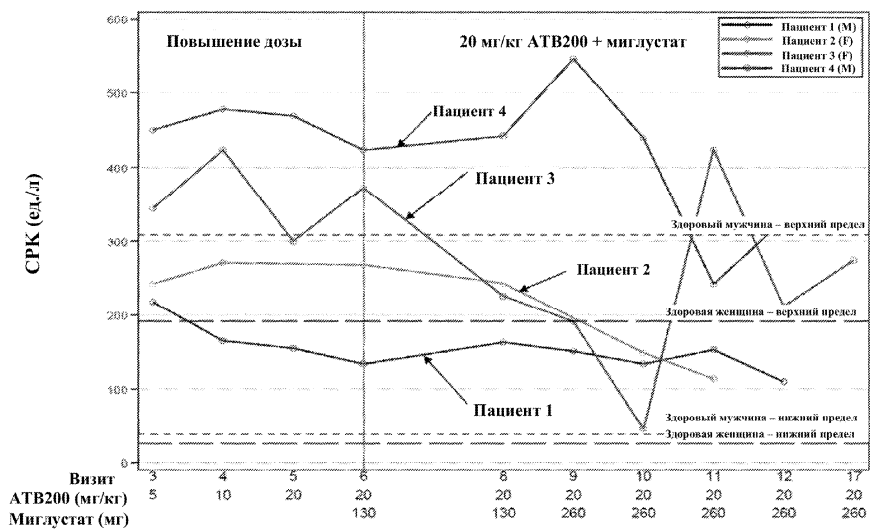
Фиг. 38

Предварительные данные о маркере мышечной функции: ALT

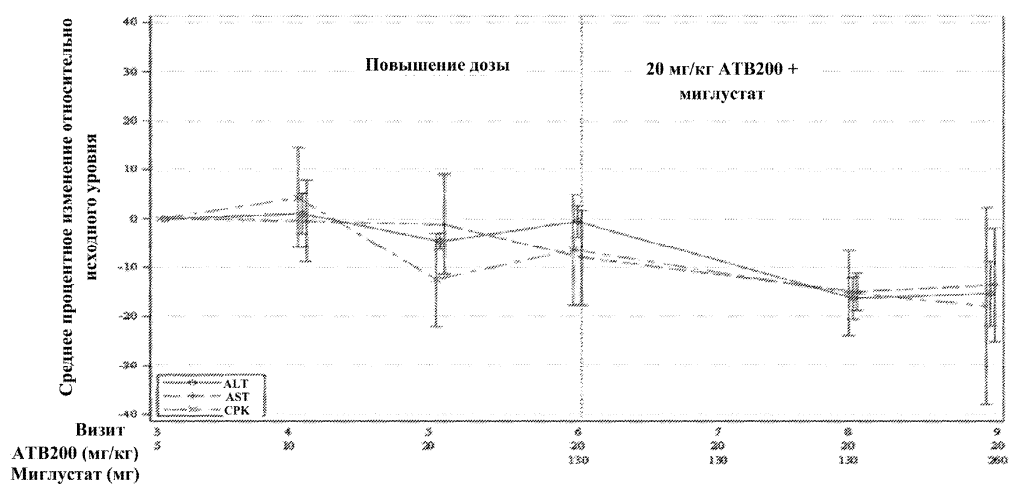


Фиг. 39

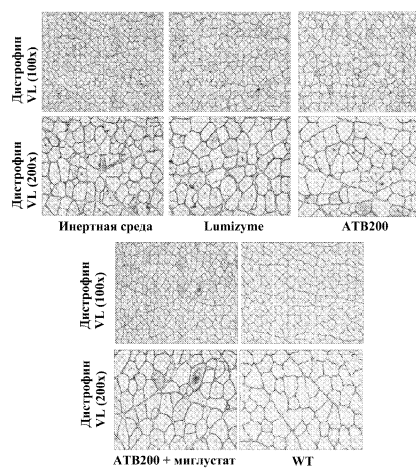
Предварительные данные о маркере мышечной функции: СРК



Фиг. 40



Фиг. 41



Фиг. 42



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

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