

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(21) **202390463** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки  
**2023.04.13**

(51) Int. Cl. *A61K 38/47* (2006.01)  
*C12N 9/26* (2006.01)  
*A61P 3/00* (2006.01)

(22) Дата подачи заявки  
**2017.03.30**

---

(54) **СОСТАВЫ, СОДЕРЖАЩИЕ РЕКОМБИНАНТНУЮ КИСЛУЮ  $\alpha$ -ГЛЮКОЗИДАЗУ**

---

(31) **62/315,436; 62/457,588; 15/473,999**

(71) Заявитель:

(32) **2016.03.30; 2017.02.10; 2017.03.30**

**АМИКУС ТЕРАПЬЮТИКС, ИНК.**

(33) **US**

(US)

(62) **201892170; 2017.03.30**

(74) Представитель:

**Рыбина Н.А. (RU)**

---

(57) Представлены фармацевтические составы, содержащие рекомбинантную кислую  $\alpha$ -глюкозидазу, где рекомбинантная кислая  $\alpha$ -глюкозидаза получена в результате экспрессии в клетках яичника китайского хомячка (CHO) и характеризуется увеличенным содержанием N-гликановых звеньев, несущих один или два остатка маннозо-6-фосфата, в сравнении с содержанием N-гликановых звеньев, несущих один или два остатка маннозо-6-фосфата, в алглюкозидазе- $\alpha$ ; по меньшей мере один буфер, выбранный из группы, состоящей из цитрата, фосфата и их комбинаций; и по меньшей мере одно вспомогательное вещество, выбранное из группы, состоящей из маннита, полисорбата 80 и их комбинаций, где состав характеризуется показателем pH, составляющим от приблизительно 5,0 до приблизительно 7,0. Также представлены способы лечения болезни Помпе с применением данных фармацевтических составов.

**A1**

**202390463**

**202390463**

**A1**

## СОСТАВЫ, СОДЕРЖАЩИЕ РЕКОМБИНАНТНУЮ КИСЛУЮ АЛЬФА-ГЛЮКОЗИДАЗУ

### ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

- 5 Принципы и варианты осуществления настоящего изобретения в целом относятся к составам, содержащим рекомбинантную кислую  $\alpha$ -глюкозидазу, и в частности к жидким составам.

### ПРЕДПОСЫЛКИ К СОЗДАНИЮ ИЗОБРЕТЕНИЯ

- Болезнь Помпе, также известная как дефицит кислой мальтазы или болезнь  
10 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  
15 лизосомами. Индивидуумы с этими заболеваниями являются носителями мутантных генов, кодирующих ферменты, которые являются дефектными в отношении катализа гидролиза одного или нескольких этих соединений, которые затем скапливаются в лизосомах. Другие примеры лизосомных нарушений включают болезнь Гоше, GM1-ганглиозидоз, фукозидоз,  
20 мукополисахаридозы, болезнь Гурлер-Шейе, болезнь Ниманна-Пика типов А и В и болезнь Фабри. Болезнь Помпе также классифицируют как нервно-мышечное заболевание или метаболическую миопатию.

- Согласно оценкам болезнь Помпе встречается с частотой приблизительно 1 на  
40000 новорожденных и вызывается мутацией в гене GAA, который кодирует  
25 фермент лизосомную  $\alpha$ -глюкозидазу (EC:3,2.1,20), также общеизвестную как кислая  $\alpha$ -глюкозидаза. Кислая  $\alpha$ -глюкозидаза вовлечена в метаболизм гликогена, разветвленного полисахарида, который представляет собой основную форму

накопления глюкозы у животных, посредством катализа его гидролиза до глюкозы в лизосомах. Поскольку индивидуумы с болезнью Помпе продуцируют мутантную, дефектную кислую  $\alpha$ -глюкозидазу, которая является неактивной или характеризуется пониженной активностью, катаболизм гликогена происходит медленнее или вообще не происходит, при этом гликоген накапливается в лизосомах различных тканей, в частности в поперечнополосатых мышцах, приводя к широкому спектру клинических проявлений, включая прогрессирующую слабость мускулатуры и дыхательную недостаточность. В частности, поражаются такие ткани, как сердечные и скелетные мышцы.

5

10 Болезнь Помпе может широко варьироваться в отношении степени дефицита фермента, тяжести и возраста возникновения, при этом идентифицировали более 500 различных мутаций в гене GAA, многие из которых вызывают симптомы заболевания различной тяжести. Данное 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. Болезнь Помпе младенческого типа является наиболее тяжелой, приводящей к полному или практически полному дефициту кислой  $\alpha$ -глюкозидазы, и проявляется симптомами, которые включают тяжелую недостаточность мышечного тонуса, слабость, увеличенные печень и сердце и кардиомиопатию. Язык может стать увеличенным и выступать вперед, а глотание может стать затрудненным. Наиболее тяжело пораженные дети умирают от осложнений со стороны дыхательной системы и сердца, не достигнув двухлетнего возраста. Болезнь Помпе с поздним возникновением может проявиться в любом возрасте старше 12 месяцев и характеризуется отсутствием поражения сердца и лучшим краткосрочным прогнозом. Симптомы связаны с прогрессирующей дисфункцией скелетных мышц и включают общую мышечную слабость и атрофию дыхательных мышц туловища, в проксимальных частях нижних конечностей и диафрагмы. Некоторые взрослые пациенты не имеют основных симптомов или ограничений в движениях. Прогноз обычно

15

20

25

30

зависит от степени поражения дыхательных мышц. У большинства субъектов с болезнью Помпе в конечном итоге развивается физическое истощение, требующее применения инвалидной коляски и вспомогательной вентиляции легких, при этом часто случается преждевременный летальный исход из-за  
5 дыхательной недостаточности.

Современные варианты лечения болезни Помпе включают заместительную ферментную терапию (ERT) с применением рекомбинантной кислой  $\alpha$ -глюкозидазы человека (rhGAA). Традиционные продукты на основе rhGAA известны под названиями алглюкозидаза-альфа, Myozyme® или Lumizyme®  
10 производства Genzyme, Inc. ERT представляет собой длительное лечение, требующееся в течение всей жизни пациента, и включает введение заместительного фермента путем внутривенной инфузии. Затем заместительный фермент переносится в кровотока и проникает в лизосомы внутри клеток, где его действие заключается в расщеплении накопленного гликогена, что  
15 компенсирует дефицит активности эндогенного дефектного мутантного фермента и ослабляет таким образом тяжесть симптомов заболевания.

Способ, с помощью которого заместительные ферменты, такие как rhGAA, получают, хранят, транспортируют и вводят пациентам, является сложным. Используемые для ERT ферменты являются в основном относительно  
20 сложными и требующими осторожного обращения, что делает выбор сопутствующих буферов, вспомогательных веществ и т. д. ключевым. Если фермент не хранят надлежащим образом, то могут потребоваться большие количества, что делает лечение дорогостоящим и неэффективным.

Некоторые традиционные продукты на основе rhGAA предоставляются  
25 пациентам в виде лиофилизированного (высушенного сублимацией) порошка без консервантов в одноразовых флаконах. Затем rhGAA подлежат восстановлению во флаконах, после чего разведению и введению внутривенно. Хотя лиофилизация помогает сохранять фермент с момента после его изготовления и до того времени, когда он будет готов для введения пациенту,

этот процесс сам по себе может повредить фермент. Таким образом, при выборе компонентов для состава на основе rhGAA следует проявлять большую осторожность в отношении того, чтобы они способствовали сохранению концентрации и активности белка.

- 5 Кроме того, рекомбинантные ферменты часто структурно отличаются от ферментов дикого типа. Даже если аминокислоты в рекомбинантном ферменте являются идентичными своим аналогам дикого типа, могут существовать отличия в химической структуре углеводов. Таким образом, при открытии новых рекомбинантных ферментов, для этих ферментов должны
- 10 разрабатываться составы, специфические в отношении химической структуры вновь открытых ферментов.

Соответственно, существует постоянная потребность в составах для хранения и транспортировки рекомбинантных ферментов, таких как rhGAA, которые сохраняют активность и концентрацию фермента.

## 15 КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ

Один аспект настоящего изобретения относится к фармацевтическому составу. В варианте осуществления один состав содержит:

- (a) рекомбинантную кислую  $\alpha$ -глюкозидазу, где рекомбинантная кислая  $\alpha$ -глюкозидаза получена в результате экспрессии в клетках яичника китайского хомячка (СНО) и характеризуется увеличенным содержанием 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;
- 20 (b) по меньшей мере один буфер, выбранный из группы, состоящей из цитрата, фосфата и их комбинаций; и
- 25 (c) по меньшей мере одно вспомогательное вещество, выбранное из группы, состоящей из маннита, полисорбата 80 и их комбинаций,

где состав характеризуется показателем рН, составляющим от приблизительно 5,0 до приблизительно 7,0.

5 Вариант осуществления два предусматривает модификацию фармацевтического состава согласно варианту осуществления один, где рекомбинантная кислая  $\alpha$ -глюкозидаза присутствует в концентрации, составляющей от приблизительно 5 до приблизительно 50 мг/мл.

10 Вариант осуществления три предусматривает модификацию фармацевтического состава согласно варианту осуществления один или два, где рекомбинантная кислая  $\alpha$ -глюкозидаза присутствует в концентрации, составляющей приблизительно 15 мг/мл.

Вариант осуществления четыре предусматривает модификацию фармацевтического состава согласно любому из вариантов осуществления 1-3, где состав характеризуется показателем рН, составляющим от приблизительно 5,5 до приблизительно 7,0.

15 Вариант осуществления пять предусматривает модификацию фармацевтического состава согласно любому из вариантов осуществления 1-4, где состав характеризуется показателем рН приблизительно 6,0.

20 Вариант осуществления шесть предусматривает модификацию фармацевтического состава согласно любому из вариантов осуществления 1-5, где по меньшей мере один буфер содержит цитрат.

Вариант осуществления семь предусматривает модификацию фармацевтического состава согласно любому из вариантов осуществления 1-6, где по меньшей мере один буфер содержит калиевую, натриевую или аммониевую соль.

25 Вариант осуществления восемь предусматривает модификацию фармацевтического состава согласно любому из вариантов осуществления 1-7, где по меньшей мере один буфер содержит цитрат натрия.

Вариант осуществления девять предусматривает модификацию фармацевтического состава согласно любому из вариантов осуществления 1-8, где по меньшей мере один буфер присутствует в концентрации, составляющей от приблизительно 10 до приблизительно 100 мМ.

5 Вариант осуществления десять предусматривает модификацию фармацевтического состава согласно любому из вариантов осуществления 1-9, где по меньшей мере один буфер присутствует в концентрации, составляющей приблизительно 25 мМ.

10 Вариант осуществления 11 предусматривает модификацию фармацевтического состава согласно любому из вариантов осуществления 1-10, где исключены трегалоза, сахароза, глицин или их комбинации.

15 Вариант осуществления 12 предусматривает модификацию фармацевтического состава согласно любому из вариантов осуществления 1-11, где по меньшей мере одно вспомогательное вещество представляет собой маннит, присутствующий в концентрации, составляющей от приблизительно 10 до приблизительно 50 мг/мл.

20 Вариант осуществления 13 предусматривает модификацию фармацевтического состава согласно любому из вариантов осуществления 1-12, где по меньшей мере одно вспомогательное вещество представляет собой полисорбат 80, присутствующий в концентрации, составляющей от приблизительно 0,2 до приблизительно 0,5 мг/мл.

25 Вариант осуществления 14 предусматривает модификацию фармацевтического состава согласно любому из вариантов осуществления 1-13, где маннит присутствует в концентрации, составляющей приблизительно 20 мг/мл, и полисорбат 80 присутствует в концентрации, составляющей приблизительно 0,5 мг/мл.

Вариант осуществления 15 предусматривает модификацию фармацевтического состава согласно любому из вариантов осуществления 1-14 и дополнительно содержит: (d) воду.

5 Вариант осуществления 16 предусматривает модификацию фармацевтического состава согласно любому из вариантов осуществления 1-15 и дополнительно содержит: (d) подщелачивающее средство и/или (e) подкисляющее средство, где подщелачивающее средство и подкисляющее средство присутствуют в количествах, достаточных для поддержания показателя pH фармацевтического состава в диапазоне от приблизительно 5,0 до приблизительно 6,0.

10 Вариант осуществления 17 предусматривает модификацию фармацевтического состава согласно любому из вариантов осуществления 1-16, где по меньшей мере 30% молекул рекомбинантной кислой  $\alpha$ -глюкозидазы человека содержат одно или несколько N-гликановых звеньев, несущих один или два остатка маннозо-6-фосфата.

15 Вариант осуществления 18 предусматривает модификацию фармацевтического состава согласно любому из вариантов осуществления 1-17, где рекомбинантная кислая  $\alpha$ -глюкозидаза человека содержит в среднем от 0,5 до 7,0 моль N-гликановых звеньев, несущих один или два остатка маннозо-6-фосфата на моль рекомбинантной кислой  $\alpha$ -глюкозидазы человека.

20 Вариант осуществления 19 предусматривает модификацию фармацевтического состава согласно любому из вариантов осуществления 1-18, где рекомбинантная кислая  $\alpha$ -глюкозидаза человека содержит в среднем по меньшей мере 3 моль остатков маннозо-6-фосфата на моль рекомбинантной кислой  $\alpha$ -глюкозидазы человека и по меньшей мере 4 моль остатков сиаловой кислоты на моль  
25 рекомбинантной кислой  $\alpha$ -глюкозидазы человека.

Вариант осуществления 20 предусматривает модификацию фармацевтического состава согласно любому из вариантов осуществления 1-19, где рекомбинантная кислая  $\alpha$ -глюкозидаза человека содержит семь потенциальных сайтов N-

гликозилирования, по меньшей мере 50% молекул рекомбинантной кислой  $\alpha$ -  
глюкозидазы человека содержат N-гликановое звено, несущее два остатка  
маннозо-6-фосфата, в первом сайте, по меньшей мере 30% молекул  
рекомбинантной кислой  $\alpha$ -глюкозидазы человека содержат N-гликановое звено,  
5 несущее один остаток маннозо-6-фосфата, во втором сайте, по меньшей мере  
30% молекул рекомбинантной кислой  $\alpha$ -глюкозидазы человека содержат N-  
гликановое звено, несущее два остатка маннозо-6-фосфата, в четвертом сайте, и  
по меньшей мере 20% молекул рекомбинантной кислой  $\alpha$ -глюкозидазы человека  
содержат N-гликановое звено, несущее один остаток маннозо-6-фосфата, \ в  
10 четвертом сайте.

Вариант осуществления 21 предусматривает модификацию фармацевтического  
состава согласно любому из вариантов осуществления 1-20, где  
фармацевтический состав состоит фактически из:

- (a) рекомбинантной кислой  $\alpha$ -глюкозидазы,
- 15 (b1) цитрата натрия,
- (b2) моногидрата лимонной кислоты,
- (c1) маннита,
- (c2) полисорбата 80,
- (d) воды,
- 20 (e) необязательно подкисляющего средства и
- (f) необязательно подщелачивающего средства,

где состав характеризуется показателем pH, составляющим от приблизительно  
5,0 до приблизительно 6,0.

Вариант осуществления 22 предусматривает модификацию фармацевтического состава согласно любому из вариантов осуществления 1-21, где фармацевтический состав состоит фактически из:

- 5 (a) рекомбинантной кислой  $\alpha$ -глюкозидазы, присутствующей в концентрации, составляющей приблизительно 15 мг/мл;
- (b) натрий-цитратного буфера, присутствующего в концентрации, составляющей приблизительно 25 мМ;
- (c1) маннита, присутствующего в концентрации, составляющей приблизительно 20 мг/мл;
- 10 (c2) полисорбата 80, присутствующего в концентрации, составляющей приблизительно 0,5 мг/мл; и
- (d) воды;
- (e) необязательно подкисляющего средства; и
- (f) необязательно подщелачивающего средства,
- 15 где состав характеризуется показателем pH, составляющим от приблизительно 5,0 до приблизительно 6,0.

Другой аспект настоящего изобретения относится к лиофилизированной фармацевтической композиции. Соответственно, вариант осуществления 23 относится к фармацевтической композиции, содержащей состав согласно  
20 любому из вариантов осуществления 1-22, подвергнутый лиофилизации. Вариант осуществления 24 относится к фармацевтической композиции, содержащей лиофилизированную смесь, содержащую:

- 25 (a) рекомбинантную кислую  $\alpha$ -глюкозидазу, где рекомбинантная кислая  $\alpha$ -глюкозидаза получена в результате экспрессии в клетках яичника китайского хомячка (СНО) и характеризуется увеличенным содержанием 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;

(b) буфер, выбранный из группы, состоящей из цитрата, фосфата и их комбинаций; и

5 (c) по меньшей мере одно вспомогательное вещество, выбранное из группы, состоящей из трегалозы, маннита, полисорбата 80 и их комбинаций.

Другой аспект настоящего изобретения относится к способу лечения болезни Помпе. Соответственно, вариант осуществления 25 предусматривает введение  
10 нуждающемуся в этом пациенту фармацевтического состава согласно вариантам осуществления 1-22. Вариант осуществления 26 предусматривает модификацию способа согласно варианту осуществления 25, дополнительно предусматривающую разведение фармацевтического состава перед введением  
15 пациенту. Вариант осуществления 27 относится к способу лечения болезни Помпе, предусматривающему: восстановление фармацевтической композиции согласно варианту осуществления 23 или 24; и введение восстановленной фармацевтической композиции нуждающемуся в этом пациенту.

Другой аспект настоящего изобретения относится к способу получения описанных выше фармацевтических составов. Соответственно, вариант  
20 осуществления 28 относится к способу получения фармацевтического состава согласно любому из вариантов осуществления 1-22, при этом способ предусматривает: добавление в воду по меньшей мере одного буфера, по меньшей мере одного вспомогательного вещества и рекомбинантной кислой  $\alpha$ -глюкозидазы с получением раствора; необязательно доведение показателя pH  
25 раствора; и необязательно добавление дополнительного объема воды к раствору. Вариант осуществления 29 включает модификацию способа согласно варианту осуществления 28, дополнительно предусматривающую фильтрование раствора. Вариант осуществления 30 включает модификацию способа согласно варианту осуществления 27 или 28, дополнительно предусматривающую хранение  
раствора.

## КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ.

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

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

На фигуре 1В показана химическая структура М6Р-группы.

- На фигуре 2А изображено обеспечение продуктивной направленной доставки rhGAA к целевым тканям (например, мышечные ткани субъекта с болезнью Помпе) посредством гликанов, несущих М6Р.

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

- На фигурах 3А и 3В соответственно представлены графики, показывающие результаты хроматографии для определения аффинности связывания CIMPR с 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 фигуре 2А, 78% активной формы GAA в Lumizyme® элюировалось перед добавлением М6Р. На фигуре 2В показано, что 73% активной формы GAA в Myozyme® элюировались перед добавлением М6Р. Только 22% или 27% rhGAA соответственно в Lumizyme® или в Myozyme® элюировались с помощью М6Р. На данных фигурах показано, что большая часть rhGAA в двух данных традиционных продуктах на основе rhGAA не имеет гликанов с М6Р, которые необходимы для целенаправленного воздействия на CIMPR в целевых мышечных тканях.

На фигуре 4 показана ДНК-конструкция для трансформации клеток CHO с помощью ДНК, кодирующей rhGAA. Клетки CHO трансформировали с помощью ДНК-конструкции, кодирующей rhGAA.

5 Фигуры 5А и 5В соответственно представляют собой графики, на которых показаны результаты хроматографии для определения аффинности связывания CIMPR с rhGAA в виде Myozyme® и ATB200. Как показано на фигуре 5В, приблизительно 70% молекул rhGAA в rhGAA ATB200 содержат М6Р.

10 Фигура 6 представляет собой график, на котором показаны результаты хроматографии для определения аффинности связывания CIMPR с ATB200 rhGAA с захватом и без захвата на анионообменной колонке (АЕХ).

Фигура 7 представляет собой график, на котором показаны профили элюирования с помощью Polywah для rhGAA Lumizyme® и ATB200.

15 Фигура 8 представляет собой таблицу, в которой приведена сводная информация о структурах N-гликанов Lumizyme® в сравнении с тремя различными препаратами rhGAA ATB200, обозначенными как ВР-rhGAA, ATB200-1 и ATB200-2.

На фигурах 9А – 9Н показаны результаты анализа сайт-специфического N-гликозилирования rhGAA ATB200.

20 Фигура 10А представляет собой график, на котором сравнивается аффинность связывания с CIMPR для rhGAA ATB200 (левая кривая) и для Lumizyme® (правая кривая).

Фигура 10В представляет собой таблицу, в которой представлено содержание Bis-М6Р в rhGAA Lumizyme® и ATB200.

25 Фигура 11А представляет собой график, на котором сравнивается активность rhGAA ATB200 (левая кривая) с активностью rhGAA Lumizyme® (правая кривая) в нормальных фибробластах при различных концентрациях GAA.

Фигура 11В представляет собой таблицу, в которой сравнивается активность rhGAA АТВ200 (левая кривая) с активностью rhGAA Lumizyme® (правая кривая) в фибробластах, полученных от субъекта с болезнью Помпе, при различных концентрациях GAA.

- 5 Фигура 11С представляет собой таблицу, в которой сравнивается  $K_{\text{поглощения}}$  фибробластов, полученных от здоровых субъектов и субъектов с болезнью Помпе.

10 Фигура 12А представляет собой график, на котором показано количество гликогена относительно дозы рекомбинантной кислой  $\alpha$ -глюкозидазы человека в сердечной мышце мыши после контакта с инертной средой (отрицательный контроль), с 20 мг/мл алглюкозидазы-альфа (Lumizyme®) или с 5, 10 или 20 мг/кг АТВ200.

15 Фигура 12В представляет собой график, на котором показано количество гликогена относительно дозы рекомбинантной кислой  $\alpha$ -глюкозидазы человека в квадрицепсе мыши после контакта с инертной средой (отрицательный контроль), с 20 мг/мл алглюкозидазы-альфа (Lumizyme®) или с 5, 10 или 20 мг/кг АТВ200.

20 Фигура 12С представляет собой график, на котором показано количество гликогена относительно дозы рекомбинантной кислой  $\alpha$ -глюкозидазы человека в трицепсе мыши после контакта с инертной средой (отрицательный контроль), с 20 мг/мл алглюкозидазы-альфа (Lumizyme®) или с 5, 10 или 20 мг/кг АТВ200.

25 Фигура 13 представляет собой таблицу, в которой показано что комбинация rhGAA АТВ-200 и шаперона миглустат обеспечивает значительно лучшее выведение гликогена у мышей с нокаутом по Gaa по сравнению с обработками с использованием или rhGAA Lumizyme®, или АТВ200 без шаперона миглустат.

Фигура 14 представляет собой серию электронных микрофотографий сердечной мышцы, диафрагмы и камбаловидной мышцы мышей дикого типа и мышей с нокаутом по 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 (LAMP-1).

5 Фигура 15 представляет собой серию электронных микрофотографий сердечной мышцы, диафрагмы и камбаловидной мышцы мышей дикого типа и мышей с нокаутом по Gaa, обработанных с помощью инертной среды, алглюкозидазы-альфа и АТВ200 в присутствии и в отсутствие миглустата, на которых показаны уровни гликогена, окрашенного реагентом Шиффа-перйодной кислотой (PAS).

10 Фигура 16 представляет собой серию электронных микрофотографий (1000x) квадрицепсов мышей дикого типа и мышей с нокаутом по Gaa, обработанных с помощью инертной среды, алглюкозидазы-альфа и АТВ200 в присутствии и в отсутствие миглустата, окрашенных метиленовым синим для того, чтобы показать вакуоли (указаны стрелками).

15 Фигура 17 представляет собой серию электронных микрофотографий (40x) квадрицепсов мышей дикого типа и мышей с нокаутом по 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  
20 переносчика глюкозы GLUT1.

Фигуры 18А и 18В представляют собой графики, демонстрирующие данные о весе на проволоке и мышечной силе захвата у мышей дикого типа и мышей с нокаутом по Gaa, обработанных с помощью инертной среды, алглюкозидазы-альфа и АТВ200 в присутствии миглустата.

25 Фигуры 19А – 19G представляют собой графики, демонстрирующие уровни гликогена в клетках квадрицепса, трицепса и сердечной мышцы мышей дикого типа и мышей с нокаутом по Gaa, обработанных с помощью инертной среды, алглюкозидазы-альфа и АТВ200 в присутствии и в отсутствие миглустата.

Фигура 20 представляет собой серию микрофотографий (100x и 200x) мышечных волокон латеральной широкой мышцы бедра (VL) мышцей дикого типа и мышцей с нокаутом по *Gaa*, обработанных с помощью инертной среды, алглюкозидазы-альфа и АТВ200 в присутствии и в отсутствие миглустата, на которых показаны сигналы дистрофина.

На фигуре 21 показано план исследования, представляющего собой открытое исследование фазы 1/2 с фиксированной последовательностью приема препаратов в нарастающих дозах, впервые проводимое у человека, предназначенное для оценки безопасности, переносимости, PK, PD и эффективности внутривенных инфузий АТВ200, вводимой в сочетании с пероральным введением миглустата, у взрослых с болезнью Помпе.

Фигуры 22А – 22В представляют собой графики, демонстрирующие профили зависимости концентрации общего белка GAA от времени в плазме крови у субъектов-людей после введения дозы 5, 10 или 20 мг/кг АТВ200, 20 мг/кг АТВ200 и 130 мг миглустата или 20 мг/кг АТВ200 и 260 мг миглустата.

Фигура 22С представляет собой график, демонстрирующий AUC для общего белка GAA в плазме крови у субъектов-людей после введения дозы 20 мг/кг АТВ200, 20 мг/кг АТВ200 и 130 мг миглустата или 20 мг/кг АТВ200 и 260 мг миглустата.

Фигура 22D представляет собой график, на котором показаны профили зависимости концентрации в плазме крови от времени общего белка GAA у двух отдельных субъектов-людей после введения дозы 20 мг/кг АТВ200 и 260 мг миглустата.

Фигура 23 представляет собой график, демонстрирующий профили зависимости концентрации от времени миглустата в плазме крови у субъектов-людей после введения дозы 130 мг или 260 мг миглустата.

Фигуры 24А – 24D представляют собой графики, демонстрирующие изменения уровней аланинаминотрансферазы (ALT), аспаратаминотрансферазы (AST),

креатинфосфокиназы (СРК) и тетрасахарида гексозы (Hex4) 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).

## ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

5 Перед описанием нескольких иллюстративных вариантов осуществления настоящего изобретения следует понять, что настоящее изобретение не ограничено подробностями конструкции или стадиями способа, указанными в следующем описании. Настоящее изобретение допускает другие варианты осуществления и может быть осуществлено на практике или выполнено  
10 различными путями. Будет понятно, что перечисленные ниже варианты осуществления можно комбинировать не только, как указано ниже, но и в других подходящих сочетаниях в соответствии с объемом настоящего изобретения.

Неожиданно было выявлено, что путем тщательного подбора буферов и  
15 вспомогательных веществ может быть обеспечен состав для рекомбинантного белка GAA АТВ200, который обладает превосходной стабильностью и может подвергаться процессам, связанным с получением, хранением, транспортировкой, восстановлением и введением состава с сохранением активности и эффективности фермента при сведении к минимуму преципитации  
20 фермента. Соответственно, один аспект настоящего изобретения относится к составу, содержащему rhGAA, буфер и по меньшей мере одно вспомогательное вещество. В одном или нескольких вариантах осуществления rhGAA содержит АТВ200. В некоторых вариантах осуществления состав представляет собой жидкий состав. Подробности и различные варианты осуществления, касающиеся  
25 различных ингредиентов состава, приведены ниже.

### Определения

Термины, используемые в данном описании, как правило, имеют их обычные значения в данной области техники, в контексте настоящего изобретения и в

конкретном контексте, в котором используется каждый термин. Определенные термины обсуждаются ниже или в других местах в данном описании, чтобы обеспечить дополнительное указание для практикующего специалиста при описании композиций и способов по настоящему изобретению и их получению и  
5 использованию.

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  
10 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  
15 типа (GSDII) и гликогеноз II типа, подразумевается как обозначающий генетическое лизосомное нарушение накопления, характеризующееся мутациями в гене GAA, который кодирует фермент кислую  $\alpha$ -глюкозидазу человека. Термин включает без ограничений формы заболевания с ранним и поздним возникновением, в том числе без ограничения формы болезни Помпе с  
20 возникновением в младенческом, юношеском и взрослом возрасте.

Используемый в данном документе термин «кислая  $\alpha$ -глюкозидаза» подразумевается как обозначающий лизосомный фермент, который гидролизует  $\alpha$ -1,4-связи между D-глюкозными звеньями гликогена, мальтозы и изомальтозы. Альтернативные названия включают без ограничения лизосомную  $\alpha$ -  
25 глюкозидазу (EC:3,2.1,20); глюкоамилазу; 1,4- $\alpha$ -D-глюканглюкогидролазу; амилоглюкозидазу; гамма-амилазу и экзо-1,4- $\alpha$ -глюкозидазу. Кислая  $\alpha$ -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). Полная

аминокислотная последовательность GAA дикого типа приведена под SEQ ID NO: 1, как описано в патенте США № 8592362, и имеет номер доступа AHE24104,1 (GI:568760974) в GenBank.

К настоящему времени в гене GAA человека было идентифицировано более 500 мутаций, многие из которых ассоциированы с болезнью Помпе. Мутации, приводящие к некорректному фолдингу или некорректному процессингу фермента кислой  $\alpha$ -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  $\alpha$ -глюкозидазы требуется наличие консервативного гексапептида WIDMNE в аминокислотных остатках 516-521. Как используется в данном документе, аббревиатура «GAA» подразумевается как обозначающая фермент кислую  $\alpha$ -глюкозидазу, в то время как выделенная курсивом аббревиатура «*GAA*» подразумевается как обозначающая ген человека, кодирующий кислую  $\alpha$ -глюкозидазу человека. Таким образом, аббревиатура «rhGAA» подразумевается как обозначающая фермент рекомбинантную кислую  $\alpha$ -глюкозидазу человека.

Используемый в данном документе термин «алглюкозидаза-альфа» подразумевается как обозначающий рекомбинантную кислую  $\alpha$ -глюкозидазу человека, идентифицированную как [199-аргинин,223-гистидин]препро- $\alpha$ -глюкозидаза (человека); регистрационный номер 420794-05-0 согласно Химической реферативной службе. Алглюкозидаза-альфа одобрена для реализации в США с января 2016 года в виде продуктов под названиями Lumizyme® и Myozyme® от Genzyme.

Используемый в данном документе термин «ATB200» подразумевается как обозначающий рекомбинантную кислую  $\alpha$ -глюкозидазу человека, описанную в патентной заявке PCT/US2015/053252, одновременно находящейся на рассмотрении, раскрытие которой включено в данный документ посредством ссылки.

Используемый в данном документе термин «гликан» подразумевается как обозначающий полисахаридную цепь, ковалентно связанную с аминокислотным остатком в белке или полипептиде. Используемый в данном документе термин «N-гликан» или «N-связанный гликан» подразумевается как обозначающий полисахаридную цепь, присоединенную к аминокислотному остатку в белке или полипептиде посредством образования ковалентной связи с атомом азота аминокислотного остатка. Например, N-гликан может быть ковалентно связан с атомом азота боковой цепи аспарагинового остатка. Гликаны могут содержать одно или несколько моносахаридных звеньев, и моносахаридные звенья могут быть ковалентно связаны с образованием прямой цепи или разветвленной цепи. По меньшей мере в одном варианте осуществления N-гликановые звенья, присоединенные к АТВ200, могут содержать одно или несколько моносахаридных звеньев, каждое из которых независимо выбрано из N-ацетилглюкозамина, маннозы, галактозы или сиаловой кислоты. N-гликановые звенья в белке можно определить с помощью любой подходящей аналитической методики, такой как масс-спектрометрия. В некоторых вариантах осуществления N-гликановые звенья можно определить с помощью жидкостной хроматографии с тандемной 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 более маннозных звеньев. По меньшей мере в одном варианте осуществления высокоманнозное N-гликановое звено может содержать бис(N-ацетилглюкозаминовую) цепь, связанную с аспарагиновым остатком и дополнительно связанную с разветвленной полиманнозной цепью. Используемые в данном документе взаимозаменяемые термины "М6Р" или «маннозо-6-фосфат» подразумеваются как обозначающие маннозное звено, фосфорилированное в положении 6; т. е. имеющее фосфатную группу,

связанную с гидроксильной группой в положении 6. По меньшей мере в одном варианте осуществления одно или несколько маннозных звеньев одного или нескольких N-гликановых звеньев фосфорилированы в положении 6 с образованием маннозо-6-фосфатных звеньев.

5 Используемый в данном документе термин «комплексный N-гликан» подразумевает 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  
10 дополнительно связаны с одним или несколькими моносахаридными звеньями, каждое из которых независимо выбрано из N-ацетилглюкозамина, галактозы и сиаловой кислоты.

Используемые в данном документе «терапевтически эффективная доза» и «эффективное количество» подразумеваются как обозначающие количество  
15 кислой  $\alpha$ -глюкозидазы, 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  
20 одном варианте осуществления терапевтический ответ может представлять собой уменьшение интенсивности или ингибирование одного или нескольких симптомов или маркеров болезни Помпе, известных из уровня техники. Симптомы или маркеры болезни Помпе включают без ограничения пониженную  
25 активность кислой  $\alpha$ -глюкозидазы в тканях; кардиомиопатию; кардиомегалию; прогрессирующую мышечную слабость, особенно в туловище или нижних конечностях; глубокую гипотонию; макроглоссию (и в некоторых случаях протрузию языка); затрудненное глотание, сосание и/или прием пищи; дыхательную недостаточность; гепатомегалию (умеренную); вялость мышц  
30 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.

5 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  
10 фермента индивидууму, по другим причинам требующему введения очищенного фермента или получающему пользу от этого. По меньшей мере в одном варианте осуществления такой индивидуум страдает от недостаточности фермента. Вводимый фермент может представлять собой очищенный рекомбинантный фермент, полученный *in vitro*, или белок, очищенный из выделенной ткани или  
15 жидкости, такой как, например, плацента или молоко животных, или из растений.

Используемый в данном документе термин «фармацевтически приемлемый» подразумевается как обозначающий молекулярные единицы и композиции, которые являются физиологически переносимыми и обычно не вызывают  
20 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  
25 людей.

Используемый в данном документе термин «вспомогательное вещество» относится к веществу, отличному от включенных в состав активных ингредиентов, и обычно представляющему собой неактивный материал. Вспомогательное средство может способствовать транспортированию активного

лекарственного средства к месту, в котором лекарственное средство должно проявлять эффект, контролировать высвобождение активного лекарственного средства или способствовать солубилизации, или может выполнять множество других функций. Примеры вспомогательных веществ включают без ограничения

5 буферные средства, поверхностно-активные вещества, противомикробные средства, антиоксиданты, наполнители, стабилизатор, регуляторы тоничности и т. д.

Используемый в данном документе термин «буфер» подразумевается как обозначающий раствор, содержащий как слабую кислоту, так и ее сопряженное

10 слабое основание, показатель рН которого при добавлении щелочи или кислоты изменяется лишь незначительно. Как будет разъяснено еще ниже, в некоторых вариантах осуществления используемый в фармацевтическом составе буфер представляет собой цитратный и/или фосфатный буфер.

Используемые в данном документе термины «субъект» или «пациент»

15 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.

Используемые в данном документе термины «приблизительно» и «примерно»

20 подразумеваются как обозначающие приемлемую степень погрешности для измеряемой величины с учетом природы или точности измерений. Например, степень погрешности может указываться количеством значащих чисел, предусмотренных для измерения, как понимается в данной области техники, и включает без ограничения изменение на  $\pm 1$  наиболее точного значащего числа,

25 представленного для измерения. Типичные иллюстративные степени погрешности находятся в пределах 20 процентов (%), предпочтительно в пределах 10% и более предпочтительно в пределах 5% от указанного значения или диапазона значений. В качестве альтернативы и, в частности, в биологических системах термины «примерно» и «приблизительно» могут

означать значения, которые находятся в пределах порядка величины, предпочтительно в пределах 5-кратного и более предпочтительно в пределах 2-кратного изменения указанного значения. Числовые величины, приведенные в данном документе, являются примерными, если не указано иное, что означает, что термин «приблизительно» или «примерно» может являться предположительным, если не указано точно.

Ссылка в данном описании на «один вариант осуществления», «определенные варианты осуществления», «разные варианты осуществления», «один или несколько вариантов осуществления» или «вариант осуществления» означает, что конкретный признак, структура, материал или характеристика, описанные в связи с вариантом осуществления, включены по меньшей мере в один вариант осуществления настоящего изобретения. Таким образом, такие фразы как «в одном или нескольких вариантах осуществления», «в определенных вариантах осуществления», «в разных вариантах осуществления», «в одном варианте осуществления» или «в варианте осуществления», появляющиеся в различных местах в данном описании, необязательно относятся к одному и тому же варианту осуществления настоящего изобретения. Кроме того, конкретные признаки, структуры, материалы или характеристики можно объединять любым подходящим образом в одном или нескольких вариантах осуществления.

## 20 rhGAA ATB200

Состав содержит АТВ200, который представляет собой рекомбинантный белок GAA (rhGAA), подходящий для применения в заместительной ферментной терапии. Подробности, касающиеся структуры и получения АТВ200, а также вариантов, представлены ниже.

25 По меньшей мере в одном варианте осуществления АТВ200 экспрессируется в клетках яичника китайского хомячка (CHO) и характеризуется повышенным содержанием 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.

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

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

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

В одном или нескольких вариантах осуществления рекомбинантная кислая  $\alpha$ -глюкозидаза человека имеет аминокислотную последовательность GAA дикого типа, приведенную под SEQ ID NO: 2, которая соответствует аминокислотным  
15 остаткам 57-952 и является идентичной человеческому GAA дикого типа (WT) после его природного внутриклеточного протеолитического процессинга, в результате которого удаляются первые 56 остатков, содержащие сигнальный пептид и пептид-предшественник. Аминокислотную последовательность АТВ200 подтверждали путем расщепления трипсином с последующей  
20 жидкостной хроматографией/масс-спектрометрией, а также путем секвенирования белков. Напротив, существующий стандарт заместительной ферментной терапии (ERT) с использованием rhGAA (коммерчески доступными продуктами, содержащими алглюкозидазу-альфа, в большинстве стран является Myozyme®, а в США Lumizyme®, Genzyme, компании Sanofi) отличается от WT  
25 GAA и содержит замены по 3 аминокислотным остаткам: в положении 199 гистидин заменен аргинином, в положении 223 аргинин заменен гистидином, а в положении 780 валин заменен изолейцином.

По меньшей мере в одном варианте осуществления рекомбинантная кислая  $\alpha$ -глюкозидаза человека подвергается посттрансляционным и/или химическим  
30 модификациям в одном или нескольких аминокислотных остатках белка.

Например, метиониновые и триптофановые остатки могут подвергаться окислению. В качестве другого примера аспарагиновые остатки могут подвергаться дезамидированию до аспарагиновой кислоты. В качестве еще одного примера аспарагиновая кислота может подвергаться изомеризации до  
5 изоаспарагиновой кислоты. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления фермент исходно экспрессируется как имеющий аминокислотную последовательность, приведенную под SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 2, и при этом фермент подвергается одной или нескольким данным посттрансляционным и/или химическим модификациям. Такие модификации  
10 также входят в объем настоящего изобретения.

По меньшей мере в одном варианте осуществления рекомбинантная кислая  $\alpha$ -глюкозидаза человека имеет аминокислотную последовательность GAA дикого типа, изложенную под SEQ ID NO: 1, как описано в патенте США № 8592362, и имеет номер доступа AHE24104,1 (GI:568760974) в GenBank. По меньшей мере в  
15 одном варианте осуществления рекомбинантная кислая  $\alpha$ -глюкозидаза человека представляет собой глюкозидазу-альфа, фермент кислую  $\alpha$ -глюкозидазу человека, кодируемую наиболее преобладающим из девяти наблюдаемых гаплотипов гена *GAA*.

По меньшей мере в одном варианте осуществления рекомбинантная кислая  $\alpha$ -глюкозидаза человека исходно экспрессируется как имеющая полноразмерную  
20 последовательность GAA дикого типа из 952 аминокислот, изложенную под SEQ ID NO: 1, и при этом рекомбинантная кислая  $\alpha$ -глюкозидаза человека подвергается внутриклеточному процессингу, при котором удаляется часть аминокислот, например, первые 56 аминокислот. Соответственно,  
25 рекомбинантная кислая  $\alpha$ -глюкозидаза человека, секретируемая клеткой-хозяином, может иметь более короткую аминокислотную последовательность, чем рекомбинантная кислая  $\alpha$ -глюкозидаза человека, которая исходно экспрессируется в клетке. По меньшей мере в одном варианте осуществления более короткий белок может иметь аминокислотную последовательность,  
30 изложенную под SEQ ID NO: 2, которая отличается от SEQ ID NO: 1 только тем,

- что первые 56 аминокислот, содержащие сигнальный пептид и пептид-предшественник, были удалены с получением таким образом в результате белка, имеющего 896 аминокислот. Также возможны другие отличия в количестве аминокислот, такие как наличие 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 или
- 5 больше делеций, замен и/или вставок по сравнению с аминокислотной последовательностью, описанной под SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 2. В некоторых вариантах осуществления продукт на основе rhGAA содержит смесь молекул рекомбинантной кислой  $\alpha$ -глюкозидазы человека, имеющих разную длину в аминокислотах.
- 10 По меньшей мере в одном варианте осуществления рекомбинантная кислая  $\alpha$ -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
- 15 образовывать пироглутамат. В качестве другого примера аспарагиновые остатки могут подвергаться дезамидированию до аспарагиновой кислоты. В качестве еще одного примера остатки аспарагиновой кислоты могут подвергаться изомеризации до изоаспарагиновой кислоты. В качестве еще одного примера неспаренные цистеиновые остатки в белке могут образовывать дисульфидные
- 20 связи со свободным глутатионом и/или цистеином. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления фермент исходно экспрессируется как имеющий аминокислотную последовательность, приведенную под SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 2, и при этом фермент подвергается одной или нескольким данным посттрансляционным и/или химическим модификациям. Такие модификации
- 25 также входят в объем настоящего изобретения.
- Предпочтительно, чтобы не более чем у 70, 65, 60, 55, 45, 40, 35, 30, 25, 20, 15, 10 или 5% от общего количества молекул рекомбинантной кислой  $\alpha$ -глюкозидазы человека отсутствовало N-гликановое звено, несущее один или несколько остатков маннозо-6-фосфата, или отсутствовала способность к связыванию с
- 30 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  $\alpha$ -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.

5 Молекулы рекомбинантной кислой  $\alpha$ -глюкозидазы человека могут иметь 1, 2, 3 или 4 группы маннозо-6-фосфата (М6Р) в своих гликанах. Например, только один N-гликан в молекуле рекомбинантной кислой  $\alpha$ -глюкозидазы человека может нести М6Р (монофосфорилированный), отдельный N-гликан может нести две группы М6Р (бисфосфорилированный) или каждый из двух разных N-гликанов в одной и той же молекуле рекомбинантной кислой  $\alpha$ -глюкозидазы человека может нести отдельные группы М6Р. Молекулы рекомбинантной кислой  $\alpha$ -глюкозидазы человека также могут иметь N-гликаны, не несущие группы М6Р. В другом варианте осуществления N-гликаны в среднем содержат более 3 моль/моль М6Р и более 4 моль/моль сиаловой кислоты, вследствие чего рекомбинантная кислая  $\alpha$ -глюкозидаза человека содержит в среднем по меньшей мере 3 моль остатков маннозо-6-фосфата на моль рекомбинантной кислой  $\alpha$ -глюкозидазы человека и по меньшей мере 4 моль сиаловой кислоты на моль рекомбинантной кислой  $\alpha$ -глюкозидазы человека. В среднем по меньшей мере приблизительно 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10% от общего количества гликанов в рекомбинантной кислой  $\alpha$ -глюкозидазе человека могут находиться в форме моно-М6Р-гликана, например, приблизительно 6,25% от общего количества гликанов могут нести одну группу М6Р, и в среднем по меньшей мере приблизительно 0,5, 1, 1,5, 2,0, 2,5, 3,0% от общего количества гликанов в рекомбинантной кислой  $\alpha$ -глюкозидазе человека находятся в виде бис-М6Р-гликана, и в среднем менее 25% от общего количества молекул рекомбинантной кислой  $\alpha$ -глюкозидазы человека не содержат фосфорилированный гликан, связывающийся с CIMPR.

Рекомбинантная кислая  $\alpha$ -глюкозидаза человека может иметь значение среднего содержания N-гликанов, несущих М6Р, в диапазоне от 0,5 до 7,0 моль/моль рекомбинантной кислой  $\alpha$ -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  $\alpha$ -глюкозидазы человека. Рекомбинантную кислую  $\alpha$ -глюкозидазу человека можно фракционировать для получения препаратов на основе рекомбинантной кислой  $\alpha$ -глюкозидазы человека с разным средним количеством гликанов, несущих М6Р или несущих бис-М6Р, что таким образом позволяет осуществлять дополнительную индивидуальную адаптацию направленной доставки рекомбинантной кислой  $\alpha$ -глюкозидазы человека к лизосомам в целевых тканях путем отбора конкретной фракции или посредством избирательного объединения различных фракций.
- 5
- 10 В некоторых вариантах осуществления рекомбинантная кислая  $\alpha$ -глюкозидаза человека будет нести в среднем от 2,0 до 8,0 моль М6Р на моль рекомбинантной кислой  $\alpha$ -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 моль М6Р/моль рекомбинантной кислой  $\alpha$ -глюкозидазы человека.
- 15 До 60% N-гликанов в рекомбинантной кислой  $\alpha$ -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 более 5%, 10%, 20% или 30% N-гликанов в рекомбинантной кислой  $\alpha$ -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  $\alpha$ -глюкозидазе человека могут нести сиаловую кислоту и концевую галактозу. В еще нескольких других вариантах осуществления не более 5, 10, 15, 16, 17, 18, 19 или 20% N-гликанов в рекомбинантной кислой  $\alpha$ -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
- 20
- 25

кислой  $\alpha$ -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  $\alpha$ -глюкозидазе человека представляют собой N-гликаны комплексного типа; или не более 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7% от общего количества N-гликанов в рекомбинантной кислой  $\alpha$ -глюкозидазе человека представляют собой N-гликаны гибридного типа; не более 5, 10 или 15% N-гликанов высокоманнозного типа в рекомбинантной кислой  $\alpha$ -глюкозидазе человека являются нефосфорилированными; по меньшей мере 5% или 10% N-гликанов высокоманнозного типа в рекомбинантной кислой  $\alpha$ -глюкозидазе человека являются моно-M6P-фосфорилированными; и/или по меньшей мере 1 или 2% N-гликанов высокоманнозного типа в рекомбинантной кислой  $\alpha$ -глюкозидазе человека являются бис-M6P-фосфорилированными. Эти значения включают все промежуточные значения и поддиапазоны.

15 Рекомбинантная кислая  $\alpha$ -глюкозидаза человека может соответствовать одному или нескольким диапазонам содержания, описанным выше.

В некоторых вариантах осуществления рекомбинантная кислая  $\alpha$ -глюкозидаза человека будет нести в среднем от 2,0 до 8,0 моль остатков сиаловой кислоты на моль рекомбинантной кислой  $\alpha$ -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 моль остатков/моль рекомбинантной кислой  $\alpha$ -глюкозидазы человека. Не ограничиваясь какой-либо теорией, полагают, что присутствие N-гликановых звеньев, несущих остатки сиаловой кислоты, может предотвратить непродуктивное выведение рекомбинантной

20 кислой  $\alpha$ -глюкозидазы человека посредством асиалогликопротеиновых рецепторов.

В одном или нескольких вариантах осуществления rhGAA имеет звенья M6P и/или сиаловой кислоты в определенных сайтах N-гликозилирования рекомбинантного лизосомного белка человека. Например, в rhGAA существует

семь потенциальных сайтов N-связанного гликозилирования. Эти потенциальные сайты гликозилирования находятся в следующих положениях SEQ ID NO: 2: N84, N177, N334, N414, N596, N826 и N869. Подобным образом для полноразмерной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1 эти

5 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

10 сайты гликозилирования за исключением того, что X не может представлять собой HIS или PRO.

В различных вариантах осуществления rhGAA имеет определенный профиль N-гликозилирования. В одном или нескольких вариантах осуществления по меньшей мере 20% rhGAA являются фосфорилированными по первому сайту N-

15 гликозилирования (например, N84 в SEQ ID NO: 2 и N140 в SEQ ID NO: 1). Например, по меньшей мере 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% rhGAA могут быть фосфорилированными по первому сайту N-гликозилирования. Данное фосфорилирование может представлять собой результат присутствия звеньев

20 моно-М6P и/или бис-М6P. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% rhGAA несут звено моно-М6P в первом сайте N-гликозилирования. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере

25 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% rhGAA несут звено бис-М6P в первом сайте N-гликозилирования.

В одном или нескольких вариантах осуществления по меньшей мере 20% rhGAA являются фосфорилированными по второму сайту N-гликозилирования (например, N177 в SEQ ID NO: 2 и N223 в SEQ ID NO: 1). Например, по

30 меньшей мере 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%,

80%, 85%, 90% или 95% rhGAA могут быть фосфорилированными по второму сайту N-гликозилирования. Данное фосфорилирование может представлять собой результат присутствия звеньев моно-М6Р и/или бис-М6Р. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% rhGAA несут звено моно-М6Р во втором сайте N-гликозилирования. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% rhGAA несут звено бис-М6Р во втором сайте N-гликозилирования. В одном или нескольких вариантах осуществления по меньшей мере 5% rhGAA являются фосфорилированными в третьем сайте N-гликозилирования (например, N334 в SEQ ID NO: 2 и N390 в SEQ ID NO: 1). В других вариантах осуществления менее 5%, 10%, 15%, 20% или 25% rhGAA являются фосфорилированными по третьему сайту N-гликозилирования. Например, третий сайт N-гликозилирования может иметь комбинацию нефосфорилированных высокоманнозных гликанов, двух-, трех- и четырехантенных комплексных гликанов и гибридных гликанов в качестве основных форм. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 3%, 5%, 8%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45% или 50% rhGAA являются сиалированными в третьем сайте N-гликозилирования.

В одном или нескольких вариантах осуществления по меньшей мере 20% rhGAA являются фосфорилированными по четвертому сайту N-гликозилирования (например, N414 в SEQ ID NO: 2 и N470 в SEQ ID NO: 1). Например, по меньшей мере 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% rhGAA могут быть фосфорилированными по четвертому сайту N-гликозилирования. Данное фосфорилирование может представлять собой результат присутствия звеньев моно-М6Р и/или бис-М6Р. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% rhGAA несут звено моно-М6Р в четвертом сайте N-гликозилирования. В

некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% rhGAA несут звено бис-М6Р в четвертом сайте N-гликозилирования. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 3%, 5%, 8%, 10%, 15%, 20% или 25% rhGAA являются сиалированными в четвертом сайте N-гликозилирования.

В одном или нескольких вариантах осуществления по меньшей мере 5% rhGAA являются фосфорилированными по пятому сайту N-гликозилирования (например, N596 в SEQ ID NO: 2 и N692 в SEQ ID NO: 1). В других вариантах осуществления менее 5%, 10%, 15%, 20% или 25% rhGAA являются фосфорилированными по пятому сайту N-гликозилирования. Например, пятый сайт N-гликозилирования может иметь фукозилированные двухантенные комплексные гликаны в качестве основных форм. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 3%, 5%, 8%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% rhGAA являются сиалированными в пятом сайте N-гликозилирования.

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

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

5 осуществления менее 5%, 10%, 15%, 20% или 25% rhGAA являются фосфорилированными по седьмому сайту N-гликозилирования. В некоторых вариантах осуществления менее 40%, 45%, 50%, 55%, 60% или 65% rhGAA имеют какой-либо гликан в седьмом сайте N-гликозилирования. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 30%, 35% или 40% rhGAA имеют гликан в седьмом сайте N-гликозилирования.

В разных вариантах осуществления rhGAA характеризуется средним содержанием фукозы, составляющим 0-5 моль на моль rhGAA, содержанием GlcNAc, составляющим 10-30 моль на моль rhGAA, содержанием галактозы, составляющим 5-20 моль на моль rhGAA, содержанием маннозы, составляющим 10-40 моль на моль rhGAA, содержанием М6Р, составляющим 2-8 моль на моль rhGAA, и содержанием сиаловой кислоты, составляющим 2-8 моль на моль rhGAA. В разных вариантах осуществления rhGAA характеризуется средним содержанием фукозы, составляющим 2-3 моль на моль rhGAA, содержанием GlcNAc, составляющим 20-25 моль на моль rhGAA, содержанием галактозы, составляющим 8-12 моль на моль rhGAA, содержанием маннозы, составляющим 22-27 моль на моль rhGAA, содержанием М6Р, составляющим 3-5 моль на моль rhGAA, и содержанием сиаловой кислоты, составляющим 4-7 моль на моль rhGAA.

20 Рекомбинантную кислую  $\alpha$ -глюкозидазу человека предпочтительно получают с помощью клеток яичника китайского хомячка (СНО), таких как линии клеток СНО GA-ATB200 или ATB200-001-X5-14, или субкультура или производное от такой культуры клеток СНО. ДНК-конструкции, которые экспрессируют аллельные варианты кислой  $\alpha$ -глюкозидазы или аминокислотные последовательности других вариантов кислой  $\alpha$ -глюкозидазы, таких, которые, например, по меньшей мере на 90%, 95% или 99% идентичные SEQ ID NO: 1, можно сконструировать и экспрессировать в клетках СНО. Эти аминокислотные последовательности вариантов кислой  $\alpha$ -глюкозидазы могут содержать делеции, замены и/или вставки по сравнению с SEQ ID NO: 1, как, например, иметь 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или больше делеций, замен и/или вставок по сравнению с

аминокислотной последовательностью, описанной под SEQ ID NO: 1. Специалисты в данной области могут выбрать альтернативные векторы, подходящие для трансформации клеток CHO, для получения таких ДНК-конструкций.

- 5 Для расчета идентичности двух последовательностей можно использовать различные алгоритмы и/или программы для выравнивания, в том числе FASTA или BLAST, которые доступны как часть программного пакета для анализа последовательностей GCG (Висконсинский университет, Мэдисон, Висконсин), и их можно использовать, например, с настройками по умолчанию. Например,
- 10 предусмотрены полипептиды, которые по меньшей мере на 90%, 95% или 99% идентичны конкретным полипептидам, описанным в данном документе, и предпочтительно проявляющие фактически те же функции, а также полинуклеотиды, кодирующие такие полипептиды. Если не указано иное, то расчет балла сходства будет основываться на применении BLOSUM62. При
- 15 использовании BLASTP процентное значение сходства основывается на положительном балле в BLASTP, а процентное значение идентичности последовательностей основывается на балле идентичности в BLASTP. «Идентичные» в BLASTP демонстрирует количество остатков в парах последовательностей с высоким баллом, которые являются идентичными, и их
- 20 долю от общего количества остатков; а показатель «Положительные» в BLASTP демонстрирует количество и долю остатков, для которых баллы при выравнивании имеют положительные значения и которые являются сходными друг с другом. В настоящем изобретении предусмотрены и охватываются аминокислотные последовательности, характеризующиеся этими степенями
- 25 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
- 30 аминокислотным последовательностям с использованием генетического кода.

В некоторых вариантах осуществления рекомбинантную кислую  $\alpha$ -глюкозидазу человека, имеющую превосходную способность к нацеливанию на катион-независимые рецепторы маннозо-6-фосфата (СМРР) и клеточные лизосомы, а также паттерны гликозилирования, которые снижают непродуктивное очищение от нее *in vivo*, можно получать при использовании клеток яичника китайского хомячка (СНО). В этих клетках можно индуцировать экспрессию рекомбинантной кислой  $\alpha$ -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  $\alpha$ -глюкозидазы человека, таких как алглюкозидаза-альфа. Рекомбинантная кислая  $\alpha$ -глюкозидаза человека, продуцируемая этими клетками, примером которой является АТВ200, имеет значительно большее содержание N-гликановых остатков маннозо-6-фосфата (М6Р) и бис-маннозо-6-фосфата, обеспечивающих целенаправленное воздействие на мышечные клетки, чем традиционная кислая  $\alpha$ -глюкозидаза, такая как Lumizyme®. Не ограничиваясь какой-либо теорией, полагают, что данное обширное гликозилирование позволяет ферменту АТВ200 более эффективно поглощаться целевыми клетками, и следовательно, подвергаться более эффективному выведению из кровотока, чем другим рекомбинантным кислым  $\alpha$ -глюкозидазам человека, таким как, например, алглюкозидаза-альфа, которая имеет существенно более низкое содержание М6Р и бис-М6Р. Было показано, что АТВ200 эффективно связывается с СМРР и эффективно поглощается скелетными мышцами и сердечной мышцей и имеет паттерн гликозилирования, который обеспечивает благоприятный фармакокинетический профиль и снижает непродуктивное выведение *in vivo*.

Также предусматривается, что обширное гликозилирование АТВ200 может способствовать снижению иммуногенности АТВ200 по сравнению 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 сведения к минимуму агрегации белка, а также посредством экранирования иммуногенных эпитопов белка от иммунной системы (Guidance for Industry – Immunogenicity Assessment for Therapeutic Protein Products, Министерство здравоохранения и социальных служб США, Управление по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных средств, Центр по оценке и исследованию лекарственных средств, Центр по оценке и исследованию биологических препаратов, август 2014 года). Следовательно, по меньшей мере в одном варианте осуществления введение рекомбинантной кислой  $\alpha$ -глюкозидазы человека не индуцирует продуцирование антител к лекарственному средству. По меньшей мере в одном варианте осуществления введение рекомбинантной кислой  $\alpha$ -глюкозидазы человека индуцирует продуцирование антител к лекарственному средству у субъекта с достижением более низкого показателя, чем уровень антител к лекарственному средству, продуцирование которых индуцируется посредством введения алглюкозидазы-альфа.

Как описано в международной патентной заявке PCT/US2015/053252, одновременно находящейся на рассмотрении, такие клетки, как клетки CHO, можно использовать для получения rhGAA, описанной в данном документе, и данную rhGAA можно использовать согласно настоящему изобретению. Примерами такой линии клеток CHO являются GA-ATB200 или ATB200-001-X5-14 или их субкультура, которая продуцирует 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 использовали для получения rhGAA, не было признано, что трансформированные клетки CHO можно культивировать и отбирать таким образом, чтобы продуцировалась

rhGAA, имеющая высокое содержание М6Р- и бис-М6Р-гликанов, которые обеспечивают целенаправленное воздействие на CIMPR.

Неожиданно было обнаружено, что можно трансформировать линии клеток CHO, отбирать трансформантов, которые продуцируют rhGAA с высоким содержанием гликанов, несущих М6Р или бис-М6Р, которые обеспечивают целенаправленное воздействие на CIMPR, и стабильно экспрессировать данную rhGAA с высоким содержанием М6Р. Таким образом, способы получения этих линий клеток CHO также описаны в международной патентной заявке PCT/US2015/053252, одновременно находящейся на рассмотрении. Данный способ предусматривает трансформацию клетки CHO с помощью ДНК, кодирующей GAA или вариант GAA, отбор клетки CHO, в хромосому(хромосомы) которой стабильно интегрируется ДНК, кодирующая GAA, и которая стабильно экспрессирует GAA, и отбор клетки CHO, которая экспрессирует GAA, имеющую высокое содержание гликанов, несущих М6Р или бис-М6Р, и необязательно отбор клетки CHO, имеющей N-гликаны с высоким содержанием сиаловой кислоты и/или имеющей низкое содержание нефосфорилированных высокоманнозных N-гликанов. Эти линии клеток CHO можно использовать для получения rhGAA и композиций на основе rhGAA путем культивирования линий клеток CHO и извлечения указанной композиции из культуры клеток CHO.

В одном или нескольких вариантах осуществления АТВ200 присутствует в количестве, находящемся в диапазоне от приблизительно 5 до приблизительно 50 мг/мл. В дополнительных вариантах осуществления АТВ200 присутствует в количестве, находящемся в диапазоне от приблизительно 5, 8, 10 или 12 до приблизительно 18, 20, 25, 30, 35, 40, 45 или 50 мг/мл. В некоторых вариантах осуществления АТВ200 присутствует в количестве, составляющем приблизительно 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 или 30 мг/мл. В дополнительных вариантах осуществления АТВ200 присутствует в количестве, составляющем приблизительно 15 мг/мл.

### Показатель рН и буфер

Показатель рН состава может находиться в диапазоне, составляющем от приблизительно 5,0 до приблизительно 7,0 или от приблизительно 5,0 до приблизительно 6,0. В одном или нескольких вариантах осуществления

5 показатель рН находится в диапазоне, составляющем от приблизительно 5,5 до приблизительно 6,0. В некоторых вариантах осуществления состав характеризуется показателем рН, составляющим приблизительно 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9 или 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4 или 6,5. Обычной при

10 соблюдении указанных количеств компонентов, показатель рН будет находиться в диапазоне, составляющем от приблизительно 5,0 до приблизительно 6,0. Однако показатель рН можно регулировать для достижения целевого значения рН путем использования регуляторов рН (т. е. подщелачивающих средств и подкисляющих средств), таких как гидроксид натрия и/или хлористоводородная кислота.

15 Состав также содержит буфер, который выбран из группы, состоящей из а цитрата, фосфата и их комбинаций. Используемый в данном документе «буфер» означает буферный раствор, содержащий слабую кислоту и сопряженное с кислотой основание, который помогает предотвратить изменения показателя рН. Цитрат и/или фосфат могут представлять собой цитрат натрия или фосфат

20 натрия. Другие соли включают калиевые или аммониевые соли. В одном или нескольких вариантах осуществления буфер содержит цитрат. В дополнительных вариантах осуществления буфер содержит цитрат натрия (например, смесь дигидрата цитрата натрия и моногидрата лимонной кислоты). В одном или нескольких вариантах осуществления буферные растворы,

25 содержащие цитрат, могут содержать цитрат натрия и лимонную кислоту. В некоторых вариантах осуществления присутствует как цитратный, так и фосфатный буфер.

### Вспомогательные вещества

Состав также содержит по меньшей мере одно вспомогательное вещество. Некоторые варианты осуществления настоящего изобретения содержат вспомогательные вещества, которые способствуют регулированию тоничности, действующие в качестве наполнителя или в качестве стабилизаторов. В одном или нескольких вариантах осуществления по меньшей мере одно  
5 вспомогательное вещество выбрано из группы, состоящей из маннита, полисорбата и их комбинаций.

В одном или нескольких вариантах осуществления вспомогательное вещество содержит ингредиент, который может действовать как регулятор тоничности и/или наполнитель, в частности маннит. Средства, регулирующие тоничность, представляют собой компоненты, которые способствуют обеспечению того, чтобы состав имел осмотическое давление, такое же как осмотическое давление  
10 человеческой крови или подобное ему. Наполнители представляют собой ингредиенты, которые придают дополнительный объем составу (например, лиофилизированному) и обеспечивают необходимую структуру лиофилизата.

В одном или нескольких вариантах осуществления общее количество средств, регулирующих тоничность, и/или наполнителей находится в диапазоне, составляющем от приблизительно 10 до приблизительно 50 мг/мл. В дополнительных вариантах осуществления общее количество средств, регулирующих тоничность, и/или наполнителей находится в диапазоне, составляющих от приблизительно 10, 11, 12, 13, 14 или 15 до приблизительно 16,  
20 20, 25, 30, 35, 40, 45 или 50 мг/мл. В некоторых вариантах осуществления средство, регулирующее тоничность, и/или наполнитель представляет собой маннит. В одном или нескольких вариантах осуществления маннит присутствует в количестве, составляющем от приблизительно 10 до приблизительно 50 мг/мл. В дополнительных вариантах осуществления маннит присутствует в количестве, составляющем от приблизительно 10, 11, 12, 13, 14 или 15 до приблизительно 16,  
25 20, 25, 30, 35, 40, 45 или 50 мг/мл. В еще одних вариантах осуществления маннит присутствует в количестве, составляющем от приблизительно 10, 11, 12, 13, 14,  
30 15, 16, 17, 18, 19 или 20 мг/мл. В некоторых вариантах осуществления маннит

является единственным средством, регулирующим тоничность, и/или наполнителем. Примеры других средств, регулирующих тоничность, и/или наполнителей включают хлорид натрия, сахарозу и трегалозу.

В некоторых вариантах осуществления вспомогательное вещество содержит  
5 ингредиент, который может действовать в качестве стабилизатора, как, например, полисорбат 80. Стабилизаторы представляют собой соединения, которые могут предотвращать или сводить к минимуму агрегацию состава на гидрофобных поверхностях раздела воздушной и водной фаз. В некоторых вариантах осуществления стабилизатор представляет собой поверхностно-  
10 активное вещество. В одном или нескольких вариантах осуществления общее количество стабилизатора находится в диапазоне, составляющем от приблизительно 0,1 до приблизительно 1,0 мг/мл. В дополнительных вариантах осуществления общее количество стабилизатора находится в диапазоне, составляющем от приблизительно 0,1, 0,2, 0,3, 0,4 или 0,5 до приблизительно 0,5,  
15 0,6, 0,7, 0,8 0,9 или 1,0 мг/мл. В еще одних вариантах осуществления общее количество стабилизатора составляет приблизительно 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9 или 1,0 мг/мл. В некоторых вариантах осуществления полисорбат 80 является единственным стабилизатором. Таким образом, в одном или нескольких вариантах осуществления содержание полисорбата 80 находится в  
20 диапазоне, составляющем от приблизительно 0,1 до приблизительно 1,0 мг/мл. В дополнительных вариантах осуществления содержание полисорбата 80 находится в диапазоне, составляющем от приблизительно 0,1, 0,2, 0,3, 0,4 или 0,5 до приблизительно 0,5, 0,6, 0,7, 0,8 0,9 или 1,0 мг/мл. В еще одних вариантах осуществления содержание полисорбата 80 составляет приблизительно 0,1, 0,2,  
25 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8 0,9 или 1,0 мг/мл.

В одном или нескольких вариантах осуществления может быть желательным исключить определенные соединения из состава. Например, в ходе получения состава для лечения данного заболевания было бы желательным исключить определенные соединения, которые могут усугублять основное заболевание. Как  
30 отмечалось выше, индивидуумы с болезнью Помпе имеют пониженную

способность к катаболизму гликогена или у них она вообще отсутствует. Несколько широко используемых вспомогательных веществ, таких как сахароза, трегалоза и глицин, в организме могут превращаться в глюкозу, что в свою очередь может усугублять болезнь Помпе. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления, сахароза, трегалоза и/или глицин исключены из состава. Подобным образом можно исключать определенные компоненты, которые в определенных контекстах не подходят для состава. Например, в некоторых вариантах осуществления можно исключить полоксамеры.

#### Иллюстративные варианты осуществления

10 В одном или нескольких вариантах осуществления состав содержит:

(a) АТВ200 (например, рекомбинантную кислую  $\alpha$ -глюкозидазу, где рекомбинантная кислая  $\alpha$ -глюкозидаза получена в результате экспрессии в клетках яичника китайского хомячка (СНО) и характеризуется увеличенным содержанием 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);

(b) по меньшей мере один буфер, выбранный из группы, состоящей из цитрата, фосфата и их комбинаций;

(c) по меньшей мере одно вспомогательное вещество, выбранное из группы, состоящей из маннита, полисорбата 80 и их комбинаций, или состоит фактически из них,

и где состав характеризуется показателем рН, составляющим от приблизительно 5,0 до приблизительно 6,0 или 7,0.

В некоторых вариантах осуществления состав содержит:

25 (a) АТВ200 (например, рекомбинантную кислую  $\alpha$ -глюкозидазу, где рекомбинантная кислая  $\alpha$ -глюкозидаза получена в результате экспрессии в клетках яичника китайского хомячка (СНО) и характеризуется увеличенным

содержанием 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);

(b1) цитрат натрия,

5 (b2) моногидрат лимонной кислоты,

(c1) маннит,

(c2) полисорбат 80,

(d) воду,

(e) необязательно подкисляющее средство и

10 (f) необязательно подщелачивающее средство, или состоит фактически из них,

и где состав характеризуется показателем pH, составляющим от приблизительно 5,0 до приблизительно 6,0 или 7,0. В дополнительных вариантах осуществления показатель pH находится в диапазоне, составляющем от приблизительно 5,5 до приблизительно 6,0. В еще одних вариантах осуществления показатель pH  
15 составляет приблизительно 6,0.

В конкретном варианте осуществления состав содержит

(a) АТВ200 (например, рекомбинантную кислую  $\alpha$ -глюкозидазу, где рекомбинантная кислая  $\alpha$ -глюкозидаза получена в результате экспрессии в  
20 клетках яичника китайского хомячка (CHO) и характеризуется увеличенным содержанием 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), присутствующую в концентрации, составляющей приблизительно 5-30 мг/мл или приблизительно 15 мг/мл;

(b) натрий-цитратный буфер, присутствующий в концентрации, составляющей приблизительно 10-100 мМ или приблизительно 25 мМ;

(c1) маннит, присутствующий в концентрации, составляющей приблизительно 10-50 мг/мл или приблизительно 20 мг/мл;

5 (c2) полисорбат 80, присутствующий в концентрации, составляющей приблизительно 0,1-1 мг/мл или приблизительно 0,5 мг/мл; и

(d) воду;

(e) необязательно подкисляющее средство и

(f) необязательно подщелачивающее средство,

10 и где состав характеризуется показателем рН, составляющим от приблизительно 5,0 до приблизительно 6,0 или 7,0. В дополнительных вариантах осуществления показатель рН находится в диапазоне, составляющем от приблизительно 5,5 до приблизительно 6,0. В еще одних вариантах осуществления показатель рН составляет приблизительно 6,0.

## 15 Получение состава

Другой аспект настоящего изобретения относится к способам получения составов, описанных в данном документе. В одном или нескольких вариантах осуществления состав можно получить из раствора фермента. Осуществить концентрирование этого раствора и замену буфера с получением целевой

20 концентрации и необходимых буферов можно с использованием способов, известных в данной области. Затем можно добавлять дополнительные компоненты (например, вспомогательные вещества и регуляторы рН). Затем состав можно фильтровать, помещать в контейнер для хранения и хранить.

В одном или нескольких вариантах осуществления способ получения любого из

25 фармацевтических составов, описанных в данном документе, предусматривает: добавление в воду по меньшей мере одного буфера, по меньшей мере одного

вспомогательного вещества и рекомбинантной кислой  $\alpha$ -глюкозидазы с получением раствора; необязательно регулирование показателя рН раствора; и необязательно добавление дополнительного объема воды к раствору. В дополнительных вариантах осуществления способ дополнительно предусматривает фильтрацию раствора. В еще одних вариантах осуществления способ дополнительно предусматривает хранение раствора.

Иллюстративный неограничивающий способ получения состава, описанного в данном документе, приведен ниже:

1. В подходящий производственный резервуар добавляют приблизительно 85-10 90% от общего объема воды для инъекций.
2. Добавляют и растворяют требуемые вспомогательные вещества и буферы (например, дигидрат цитрата натрия, моногидрат лимонной кислоты, полисорбат 80, маннит) и перемешивают до растворения.
3. Добавляют лекарственное вещество АТВ200 и перемешивают.
- 15 4. Регулируют показатель рН до целевого значения рН (например,  $6 \pm 0,1$ ), если это необходимо, с использованием регуляторов (например, хлористоводородной кислоты или раствора гидроксида натрия).
5. Добавляют количество воды для инъекций, достаточное для достижения конечного объема и перемешивают.
- 20 6. Фильтруют раствор через стерильный фильтр в стерильный приемник.
7. В асептических условиях разливают раствор лекарственного препарата по флаконам и укупоривают пробками.
8. Закатывают все флаконы колпачками и хранят при от  $2^{\circ}$  до  $8^{\circ}\text{C}$ .

В одном или нескольких вариантах осуществления свежеприготовленный состав будет находиться в жидкой форме. Имеется в виду, что состав содержит воду. Этот жидкий состав можно подвергать процессу лиофилизации

(сублимационной сушке) для получения лиофилизата или порошка. Соответственно, другой аспект настоящего изобретения относится к фармацевтической композиции, содержащей любой из описанных выше составов, подвергнутый лиофилизации. Лيوфилизированная смесь может  
5 содержать: АТВ200; буфер, выбранный из группы, состоящей из цитрата, фосфата и их комбинаций; и по меньшей мере одно вспомогательное вещество, выбранное из группы, состоящей из трегалозы, маннита, полисорбата 80 и их комбинаций. В некоторых вариантах осуществления к лиофилизированной смеси можно добавлять другие ингредиенты (например, другие вспомогательные  
10 вещества). Фармацевтическую композицию, предусматривающую лиофилизированный препарат, может быть предоставлена во флаконе, после чего ее можно хранить, транспортировать, восстанавливать и/или вводиться пациенту.

#### Способ лечения и введения пациенту

15 Другой аспект настоящего изобретения относится к способу лечения болезни Помпе и/или использованию составов, описанных в данном документе, для лечения болезни Помпе. Состав можно вводить сразу же после приготовления или после лиофилизации и восстановления. Таким образом, в одном или нескольких вариантах осуществления способ предусматривает введение  
20 нуждающемуся в этом пациенту любого из фармацевтических составов, описанных выше. В других вариантах осуществления способ предусматривает восстановление лиофилизированной фармацевтической композиции и введение восстановленной фармацевтической композиции нуждающемуся в этом пациенту. В некоторых вариантах осуществления восстановленная  
25 фармацевтическая композиция имеет схожий или такой же компонентный состав, как и фармацевтический состав до лиофилизации и/или свежеприготовленный фармацевтический состав. В любом случае фармацевтический состав или восстановленную фармацевтическую композицию можно разводить перед введением пациенту. В дополнительных вариантах

осуществления фармацевтический состав или восстановленную фармацевтическую композицию вводят внутривенно.

В одном или нескольких вариантах осуществления композиция для внутривенного введения представляет собой раствор в стерильном изотоническом водном буфере. При необходимости композиция может также 5 содержать солюбилизующее средство и местный анестетик для уменьшения болевого ощущения в месте инъекции. Обычно ингредиенты поставляют или по отдельности, или смешанными друг с другом в стандартной лекарственной форме, например, в виде сухого лиофилизованного порошка или безводного 10 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, физиологический раствор или смесь декстроза/вода. При введении композиции посредством 15 инъекции может предусматриваться ампула со стерильной водой для инъекции или с физиологическим раствором для того, чтобы ингредиенты можно было смешать перед введением.

В других вариантах осуществления фармацевтический состав или восстановленную фармацевтическую композицию вводят путем 20 непосредственного введения в целевую ткань, такую как сердечная или скелетная мышца (например, внутримышечно), или в нервную систему (например, путем непосредственной инъекции в головной мозг; интравентрикулярно; интратекально). В случае необходимости можно одновременно использовать более одного пути.

25 Фармацевтический состав или восстановленную композицию вводят в терапевтически эффективном количестве (например, при величине дозы, которая при введении с равными интервалами является достаточной для лечения болезни, в частности, для уменьшения тяжести симптомов, ассоциированных с заболеванием, предупреждения или задержки возникновения заболевания и/или

для уменьшения тяжести или частоты возникновения симптомов заболевания). Количество, которое будет терапевтически эффективным при лечении заболевания, будет зависеть от природы и степени выраженности эффектов заболевания и может быть определено с помощью стандартных клинических методик. Кроме того, для содействия в подборе оптимальных диапазонов дозы можно необязательно использовать анализы *in vitro* или *in vivo*. По меньшей мере в одном варианте осуществления рекомбинантную кислую  $\alpha$ -глюкозидазу человека вводят путем внутривенной инфузии в дозе, составляющей от приблизительно 1 мг/кг до приблизительно 100 мг/кг, как, например, от 5 мг/кг до приблизительно 30 мг/кг, как правило, от 5 мг/кг до приблизительно 20 мг/кг. По меньшей мере в одном варианте осуществления рекомбинантную кислую  $\alpha$ -глюкозидазу человека вводят путем внутривенной инфузии в дозе, составляющей приблизительно 5 мг/кг, приблизительно 10 мг/кг, приблизительно 15 мг/кг, приблизительно 20 мг/кг, приблизительно 25 мг/кг, приблизительно 30 мг/кг, приблизительно 35 мг/кг, приблизительно 40 мг/кг, приблизительно 50 мг/кг, приблизительно 50 мг/кг, приблизительно 60 мг/кг, приблизительно 70 мг/кг, приблизительно 80 мг/кг, приблизительно 90 мг/кг или приблизительно 100 мг/кг. По меньшей мере в одном варианте осуществления рекомбинантную кислую  $\alpha$ -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  $\alpha$ -глюкозидазе, или при ухудшении симптомов заболевания.

Терапевтически эффективное количество рекомбинантной кислой  $\alpha$ -глюкозидазы человека (или композиции, или лекарственного препарата, содержащих рекомбинантную кислую  $\alpha$ -глюкозидазу человека) вводят с равными интервалами в зависимости от природы и степени выраженности

эффектов заболевания и на постоянной основе. Введение с «равными интервалами», как используется в данном документе, указывает на то, что терапевтически эффективное количество вводят периодически (в отличие от разовой дозы). Интервал можно определять с помощью стандартных клинических методик. В предпочтительных вариантах осуществления рекомбинантную кислотную  $\alpha$ -глюкозидазу человека вводят ежемесячно, один два 5 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 кислотной  $\alpha$ -глюкозидазе человека, или при ухудшении симптомов заболевания.

В одном или нескольких вариантах осуществления фармацевтический состав или восстановленную композицию вводят совместно с фармакологическим шапероном, например пероральное введение шаперона и внутривенное введение фармацевтического состава или восстановленной композиции. В разных вариантах осуществления фармакологический шаперон представляет собой миглустат. По меньшей мере в одном варианте осуществления миглустат вводят в пероральной дозе, составляющей от приблизительно 200 мг до приблизительно 400 мг, или в пероральной дозе, составляющей приблизительно 200 мг, приблизительно 250 мг, приблизительно 300 мг, приблизительно 350 мг или приблизительно 400 мг. По меньшей мере в одном варианте осуществления миглустат вводят в пероральной дозе, составляющей от приблизительно 233 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

миглулат вводят в виде пероральной дозы, составляющей приблизительно 260 мг.

По меньшей мере в одном варианте осуществления миглулат и рекомбинантную кислую  $\alpha$ -глюкозидазу человека вводят одновременно. По 5 меньшей мере в одном варианте осуществления миглулат и рекомбинантную кислую  $\alpha$ -глюкозидазу человека вводят последовательно. По меньшей мере в одном варианте осуществления миглулат вводят до введения рекомбинантной кислой  $\alpha$ -глюкозидазы человека. По меньшей мере в одном варианте осуществления миглулат вводят менее чем за три часа до введения 10 рекомбинантной кислой  $\alpha$ -глюкозидазы человека. По меньшей мере в одном варианте осуществления миглулат вводят за приблизительно два часа до введения рекомбинантной кислой  $\alpha$ -глюкозидазы человека. По меньшей мере в одном варианте осуществления миглулат вводят менее чем за два часа до введения рекомбинантной кислой  $\alpha$ -глюкозидазы человека. По меньшей мере в 15 одном варианте осуществления миглулат вводят за приблизительно 1,5 часа до введения рекомбинантной кислой  $\alpha$ -глюкозидазы человека. По меньшей мере в одном варианте осуществления миглулат вводят за приблизительно один час до введения рекомбинантной кислой  $\alpha$ -глюкозидазы человека. По меньшей мере в 20 одном варианте осуществления миглулат вводят за от приблизительно 50 минут до приблизительно 70 минут до введения рекомбинантной кислой  $\alpha$ -глюкозидазы человека. По меньшей мере в одном варианте осуществления миглулат вводят за от приблизительно 55 минут до приблизительно 65 минут до введения рекомбинантной кислой  $\alpha$ -глюкозидазы человека. По меньшей мере в 25 одном варианте осуществления миглулат вводят за приблизительно 30 минут до введения рекомбинантной кислой  $\alpha$ -глюкозидазы человека. По меньшей мере в одном варианте осуществления миглулат вводят за от приблизительно 25 минут до приблизительно 35 минут до введения рекомбинантной кислой  $\alpha$ -глюкозидазы человека. По меньшей мере в одном варианте осуществления миглулат вводят за от приблизительно 27 минут до приблизительно 33 минут до 30 введения рекомбинантной кислой  $\alpha$ -глюкозидазы человека.

## Набор

Другой аспект настоящего изобретения относится к наборам, содержащим фармацевтические составы, описанные в данном документе (в том числе подвергнутые лиофилизации). В одном или нескольких вариантах осуществления набор содержит контейнер (например, флакон, пробирку, пакет, и т. д.), содержащий фармацевтические составы (подвергнутые или не подвергнутые лиофилизации) и инструкции по восстановлению, разведению и введению.

## Примеры

### 10 ПРИМЕР ФЕРМЕНТА 1. ОГРАНИЧЕНИЯ В ОТНОШЕНИИ СУЩЕСТВУЮЩИХ В НАСТОЯЩЕЕ ВРЕМЯ ПРОДУКТОВ НА ОСНОВЕ rhGAA MYOZYME® И LUMIZYME®

Для оценки свойств rhGAA в составе Myozyme® и Lumizyme®, единственных одобренных в настоящее время средств для лечения болезни Помпе, данные препараты на основе rhGAA вводили в колонку с CIMPR (который связывается с rhGAA, имеющей М6Р-группы), а затем элюировали в градиенте свободного М6. Фракции собирали в 96-луночный планшет, и активность GAA анализировали с помощью субстрата, представляющего собой 4MU- $\alpha$ -глюкозу. Относительные количества связанной и несвязанной rhGAA определяли на основании активности GAA и регистрировали в виде доли от общего количества фермента.

На фигурах 3А - В показаны проблемы, связанные с традиционными средствами для ERT (Myozyme® и Lumizyme®): 73% rhGAA в Myozyme® (фигура 3В) и 78% rhGAA в Lumizyme® (фигура 3А) не связывались с CIMPR, см. крайние левые пики на каждой фигуре. Только 27% rhGAA в Myozyme® и 22% rhGAA в Lumizyme® содержали М6Р, который может продуктивно нацеливать ее на CIMPR в мышечных клетках.

Эффективная доза Myozyme® и Lumizyme® соответствует количеству rhGAA, содержащей М6Р, которая нацеливается на CIMPR в мышечных клетках. Однако

большая часть rhGAA в этих двух традиционных продуктах не нацеливается на CIMPR-рецептор в целевых мышечных клетках. Введение традиционной rhGAA, где большая часть rhGAA не нацеливается на мышечные клетки, увеличивает риск возникновения аллергической реакции или индукции иммунного ответа на 5 неацеливаемую rhGAA.

ПРИМЕР ФЕРМЕНТА 2. ПОЛУЧЕНИЕ КЛЕТОК СНО, ПРОДУЦИРУЮЩИХ RHGAA АТВ200, ИМЕЮЩУЮ ВЫСОКОЕ СОДЕРЖАНИЕ N-ГЛИКАНОВ, НЕСУЩИХ МОНО- ИЛИ БИС-М6Р

Клетки СНО трансфицировали с помощью ДНК, которая экспрессирует rhGAA, 10 с последующим отбором трансформантов, продуцирующих rhGAA. ДНК-конструкция для трансформации клеток СНО с помощью ДНК, кодирующей rhGAA, показана на фигуре 4. Клетки СНО трансфицировали с помощью ДНК, которая экспрессирует rhGAA, с последующим отбором трансформантов, продуцирующих rhGAA.

15 После трансфекции клетки СНО-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 20 активности фермента GAA, и их использовали для создания отдельных клонов, продуцирующих rhGAA. Отдельные клоны получали в культуральных чашках с полужидкой средой, собирали с помощью системы ClonePix и переносили в планшеты с 24 глубокими лунками. Отдельные клоны анализировали в отношении активности фермента GAA для идентификации клонов, 25 экспрессирующих GAA на высоком уровне. Используемые кондиционированные среды для определения активности GAA представляли собой субстрат – 4-MU- $\alpha$ -глюкозидазу. Клоны, продуцирующие GAA на более высоких уровнях, которые измеряли с помощью анализов фермента GAA, дополнительно оценивали в отношении жизнеспособности, способности к росту,

продуктивности по продуцированию 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 N-гликанов с моно-М6Р или бис-М6Р, выделяли с помощью данной процедуры.

#### 5 ПРИМЕР ФЕРМЕНТА 3. ЗАХВАТ И ОЧИСТКА rhGAA ATB200

Несколько партий rhGAA в соответствии с настоящим изобретением получали во встряхиваемых колбах и в перфузионных биореакторах с использованием линии клеток CHO GA-ATB-200, и измеряли связывание с CIMPR. Для очищенной rhGAA ATB200 из различных производственных партий отмечали  
10 связывание с CIMPR-рецептором, аналогичное показанному на фигуре 5B и фигуре 6 (~70%), указывающее на то, что rhGAA ATB200 может стабильно продуцироваться. Как показано на фигурах 3A - B и 5A - B, Myozyme® и Lumizyme® демонстрировали значительно меньшую степень связывания с CIMPR, чем rhGAA ATB200.

#### 15 ПРИМЕР ФЕРМЕНТА 4. АНАЛИТИЧЕСКОЕ СРАВНЕНИЕ ATB200 И LUMIZYME®

Жидкостную хроматографию со слабым анионным обменом («WAX») использовали для фракционирования rhGAA ATB200 по концевому фосфату. Профили элюирования получали путем элюирования средства для ERT с  
20 помощью возрастающего количества соли. Контроль профилей осуществляли с помощью УФ-излучения (A280 нм). rhGAA ATB200 получали из клеток CHO и очищали. Lumizyme® получали из коммерческого источника. Lumizyme® демонстрировал высокий пик слева на его профиле элюирования. rhGAA ATB200 демонстрировала четыре выраженных пика элюирования справа от  
25 Lumizyme® (фигура 7). Это подтверждает, что rhGAA ATB200 была фосфорилирована в большей степени, чем Lumizyme®, поскольку эту оценку проводили по концевому заряду, а не по аффинности к CIMPR.

ПРИМЕР ФЕРМЕНТА 5. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ХАРАКТЕРИСТИК  
ОЛИГОСАХАРИДОВ В rhGAA ATB200

Очищенные гликаны rhGAA ATB200 и Lumizyme® оценивали с помощью MALDI-TOF для определения структур отдельных гликанов, выявляемых в  
5 каждом средстве для ERT (фигура 8). Было выявлено, 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  
10 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  
15 ATB200 содержит по меньшей мере одну природную бис-М6Р-N-гликановую структуру. Это более высокое содержание бис-М6Р-N-гликанов в rhGAA ATB200 напрямую коррелирует со связыванием с CIMPR с высокой аффинностью в анализах связывания с рецептором М6Р на планшетах (KD составила приблизительно 2-4 нМ), фигура 10А.

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

восстановленный образец белка смешивали с 5 мкл 1 моль/л йодацетамида (IAM, конечная концентрация 50 мМ), затем инкубировали при 10-30°C в темноте в течение 30 минут. После алкилирования к образцу добавляли 400 мкл предварительно охлажденного ацетона, и смесь подвергали заморозке с 5 охлаждением при -80°C в течение 4 часов. Затем образец центрифугировали в течение 5 мин при 13000 об./мин и 4°C, и надосадочную жидкость удаляли. К осадку добавляли 400 мкл предварительно охлажденного ацетона, который затем центрифугировали в течение 5 мин при 13000 об./мин и 4°C, и надосадочную жидкость удаляли. Затем образец высушивали воздухом на льду в темноте для 10 удаления остаточного ацетона. Для растворения белка к образцу добавляли 40 мкл 8 М мочевины и 160 мкл 100 мМ NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>. 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 15 и инкубировали в течение ночи (16 ± 2 часа) при 37°C. Для гашения реакции добавляли 2,5 мкл 20% TFA (конечная концентрация 0,5%). Затем образец анализировали с помощью масс-спектрометра Orbitrap Velos Pro™ от Thermo Scientific.

При втором анализе по методу LC-MS/MS образец ATB200 получали в 20 соответствии с аналогичной процедурой денатурации, восстановления, алкилирования и расщепления за исключением того, что в качестве алкилирующего реагента вместо IAM использовали йодуксусную кислоту (IAA), а затем анализировали с помощью масс-спектрометра Orbitrap Fusion Lumos Tribid™ от Thermo Scientific.

25 Результаты первого и второго анализов показаны на фигурах 9А - 9Н. На фигурах 9А - 9Н результаты первого анализа представлены столбиками, расположенными слева (темно-серого цвета), а результаты второго анализа представлены столбиками, расположенными справа (светло-серого цвета). На фигурах 9В - 9G номенклатура символов для представления гликанов

соответствует Varki, A., Cummings, R.D., Esko J.D., et al., *Essentials of Glycobiology*, 2nd edition (2009).

На фигурах 9А - 9G можно видеть, что два анализа давали сходные результаты, хотя между результатами было некоторое различие. Это различие может быть обусловлено рядом факторов, в том числе используемым прибором и полнотой анализа N-гликанов. Например, если некоторые формы фосфорилированных гликанов не были идентифицированы и/или не были определены количественно, то общее число фосфорилированных гликанов может быть представлено в недостаточной мере, и процентная доля rhGAA, несущей фосфорилированные гликаны в данном сайте, может быть представлена в недостаточной мере. В качестве другого примера, если некоторые формы нефосфорилированных гликанов не были идентифицированы и/или не были определены количественно, то общее число нефосфорилированных гликанов может быть представлено в недостаточной степени, и процентная доля rhGAA, несущей фосфорилированные гликаны в данном сайте, может быть представлена чрезмерно большим количеством. На фигуре 9А показана занятость сайтов N-гликозилирования в АТВ200. Как можно видеть на фигуре 9А, первый, второй, третий, четвертый, пятый и шестой сайты N-гликозилирования главным образом были заняты, при этом посредством обоих анализов было выявлено, что в каждом потенциальном сайте от более 90% до приблизительно 100% молекул фермента АТВ200 имели гликан. Однако седьмой потенциальный сайт N-гликозилирования являлся гликозилированным приблизительно в половине случаев.

На фигуре 9В показан профиль N-гликозилирования для первого сайта – N84. На фигуре 9В можно видеть, что основной формой гликанов были бис-М6Р-гликаны. Как в первом, так и во втором анализах выявили, что более 75% АТВ200 имели бис-М6Р-гликан в первом сайте.

На фигуре 9С показан профиль N-гликозилирования для второго сайта – N177. Как можно видеть на фигуре 9С, 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 фигуре 9D показан профиль N-гликозилирования для третьего сайта – N334.

5 На фигуре 9D можно видеть, что основными формами гликанов были нефосфорилированные высокоманнозные гликаны, двух-, трех- и четырехантенные комплексные гликаны и гибридные гликаны. Как в первом, так и во втором анализах выявили, что более 20% АТВ200 имели остаток сиаловой кислоты в третьем сайте.

10 На фигуре 9E показан профиль N-гликозилирования для четвертого сайта – N414. На фигуре 9E можно видеть, что основными формами гликанов были бис-М6Р и моно-М6Р-гликаны. Как в первом, так и во втором анализах выявили, что более 40% АТВ200 имели бис-М6Р-гликан в четвертом сайте. Как в первом, так и во втором анализах также выявили, что более 25% АТВ200 имели моно-М6Р-  
15 гликан в четвертом сайте.

На фигуре 9F показан профиль N-гликозилирования для пятого сайта – N596. На фигуре 9F можно видеть, что основными формами гликанов были фукозилированные двухантенные комплексные гликаны. Как в первом, так и во втором анализах выявили, что более 70% АТВ200 имели остаток сиаловой  
20 кислоты в пятом сайте.

На фигуре 9G показан профиль N-гликозилирования для шестого сайта – N826. Как можно видеть на фигуре 9G, 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  
25 шестом сайте.

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

На фигуре 9H показана сводная информация о фосфорилировании по каждому из семи потенциальных сайтов N-гликозилирования. На фигуре 9G можно видеть, что как в первом, так и во втором анализах выявляли высокие уровни фосфорилирования по первому, второму и четвертому сайтам. В обоих анализах выявили, что более 80% АТВ200 были моно- или дифосфорилированными по первому сайту, более 40% АТВ200 были монофосфорилированными по второму сайту, и более 80% АТВ200 были моно- или дифосфорилированными по четвертому сайту.

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

Результаты анализа HILIC-FLD-MS представлены в таблице А ниже. В таблице А первая цифра в трехзначной цифре указывает количество ветвей в гликане, вторая цифра указывает количество основных звеньев фукозы, а третья цифра указывает количество концевых звеньев сиаловой кислоты. Используя данную номенклатуру, «303» представляет собой трехантенный гликан (первая 3) с 0 основной фукозы (2-я 0) и 3 концевыми сиаловыми кислотами (последняя 3), «212» представляет собой двухантенный гликан с 1 основной фукозой и 2 концевыми сиаловыми кислотами, «404» представляет собой четырехантенный гликан с 0 основной фукозы и 4 концевыми сиаловыми кислотами и т. д.

Таблица А

Пиковое число FLD	Пиковое число MS	RT (мин)	Структура гликана	% площади пика
1	1		BisP_Man 8	2,83%
2	2	13,41	BisP_Man 7	17,58%
	3	14,30	BisP_Man 6	1,02%
3	4	20,89	MonoP_Man 6	2,34%
4	5	21,65	MonoP_Man 5	1,16%
5	6	23,51	MonoP_Man 8	1,28%

<b>6</b>	7	24,33	MonoP_Man 7	4,35%
<b>7</b>	8	25,61	MonoP_Man 7 (+)GlcNAc	0,50%
<b>8</b>	9	28,76	MonoP_hMan6_101	0,48%
<b>9</b>	10	30,54	MonoP_Man 6 (+)GlcNAc	0,68%
<b>10</b>	11	33,50	Man 6	3,97%
	12	33,65	303	0,74%
<b>11</b>	13	34,97	Man 7	0,20%
<b>12</b>	14	35,64	403	0,39%
<b>13</b>	15	36,61	302	0,36%
<b>14</b>	16	38,07	302	0,61%
<b>15</b>	17	38,53	Man 5	1,85%
<b>16</b>	18	39,57	302	0,48%
	19	39,78	hMan 5_101	0,42%
	20	40,05	hMan 5_100_(-)Gal	0,30%
<b>17</b>	21	40,77	301_(-)Gal	0,52%
	22	40,58	301	0,50%
<b>18</b>	23	41,47	300_(-)Gal	0,80%
<b>19</b>	24	42,17	301_(-)Gal	0,11%
	25	42,13	301	0,58%
<b>20</b>	26	42,89	301_(-)Gal	0,07%
	27	42,79	301	0,80%
<b>21</b>	28	43,41	300	0,85%
	29	43,28	101	0,39%
<b>22</b>	30	43,94	202	0,63%
<b>23</b>	31	44,45	401	0,39%
<b>24</b>	32	45,04	MonoP_hMan6_111	0,36%
<b>25</b>	33	45,69	MonoP_hMan6_111	1,45%
	34	45,90	100	0,23%
	35	45,90	400	0,19%
<b>26</b>	36	46,87	201	0,49%
	37	47,15	202	0,34%
<b>27</b>	38	48,19	414	0,37%
<b>28</b>	39	48,94	202	1,97%
<b>29</b>	40	50,79	MonoP_Man 6_110_(-)Gal	1,31%
	41	51,37	414	0,62%
<b>30</b>	42	52,22	313	0,74%
	43	52,42	201_(-)Gal	0,46%
	44	52,42	201	1,18%
	45	53,11	hMan6_111	0,20%
<b>31</b>	46	53,83	200_(-)Gal	0,80%
	47	54,23	201	1,27%
	48	54,75	413	0,30%

<b>32</b>	49	55,47	200	1,30%
<b>33</b>	50	57,45,58,34	414_(+)GlcNAcGal	0,14%
	51	56,62,56,91,57,99	413	0,94%
	52	56,11,57,26,57,99	312	0,98%
<b>34</b>	53	60,19	413	0,33%
	54	59,39	413_(+)GlcNAcGal	0,42%
	55	59,80	312	0,52%
	56	59,49	412	0,18%
<b>35</b>	57	60,75	413	0,78%
	58	60,89	413_(+)GlcNAcGal	0,07%
<b>36</b>	59	61,79	413	0,20%
	60	61,75	312	0,16%
	61	62,12	412	0,64%
<b>37</b>	62	63,87	311	0,73%
	63	63,18,64,32	412	0,29%
	64	63,84	413_(+)GlcNAcGal	0,45%
	65	63,5, 64,36	311_(-)Gal	0,42%
<b>38</b>	66	65,73, 66,20	311	0,68%
	67	65,85, 66,49	412	0,72%
	68	65,91	310_(-)Gal	0,28%
<b>39</b>	69	67,37	212	1,42%
	70	67,57	310	0,34%
<b>40</b>	71	68,67	412_(+)GlcNAcGal	0,24%
	72	68,36	412	0,53%
<b>41</b>	73	68,36	412_(+)GlcNAcGal	0,17%
	74	69,03	412	0,35%
	75	69,30	413_(+)2(GlcNAcGal)	0,16%
<b>42</b>	76	70,66	412_(+)GlcNAcGal	0,73%
<b>43</b>	77	71,74	211	1,09%
	78	71,23	211_(-)Gal	0,19%
<b>44</b>	79	72,46	212	3,66%
<b>45</b>	80	74,82	221_(-)Gal(+)GalNAc	0,38%
	81	74,43,74,96	411_(+)GlcNAcGal	0,66%
<b>46</b>	82	75,92	410	0,42%
<b>47</b>	83	76,73,77,87	211_(-)Gal	1,24%
	84	77,23	211	3,64%
<b>48</b>	85	79,05	211	1,52%
	86	79,38	210_(-)2Gal	0,45%
<b>49</b>	87	80,11	210_(-)Gal	1,58%

50	88	81,15	210	2,41%
51	89	84,22-87,15	311	1,26%
52	90	95,35	Mono_Acetyl_NANA_212	0,99%
53	91	96,23	Mono_Acetyl_NANA_211	0,76%
54	92	97,37	Bis_Acetyl_NANA_212	0,42%

Исходя из этого анализа HILIC-FLD-MS, ожидается, что тестируемая АТВ200 будет характеризоваться средним содержанием фукозы, составляющим 2-3 моль на моль АТВ200, содержанием GlcNAc, составляющим 20-25 моль на моль АТВ200, содержанием галактозы, составляющим 8-12 моль на моль АТВ200, содержанием маннозы, составляющим 22-27 моль на моль АТВ200, содержанием М6Р, составляющим 3-5 моль на моль АТВ200, и содержанием сиаловой кислоты, составляющим 4-7 моль на моль АТВ200.

#### 10 ПРИМЕР ФЕРМЕНТА 6. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ХАРАКТЕРИСТИК АФФИННОСТИ ДЛЯ АТВ200 К СИМР

Помимо более высокой процентной доли rhGAA, которая может связываться с СИМР, важно понимать качество такого взаимодействия. Связывание Lumizyme® и rhGAA АТВ200 с рецепторами определяли с помощью анализа связывания с СИМР на планшетах. Вкратце, планшеты, покрытые СИМР, использовали для захвата GAA. На иммобилизованный рецептор наносили rhGAA в различных концентрациях, и несвязанную rhGAA вымывали. Количество оставшейся rhGAA определяли по активности GAA. На фигуре 10А показано, что rhGAA АТВ200 связывалась с СИМР значительно лучше, чем Lumizyme®.

20 На фигуре 10В 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  
25 бисфосфорилированный гликан.

ПРИМЕР ФЕРМЕНТА 7. rhGAA ATB200 БОЛЕЕ ЭФФЕКТИВНО  
ИНТЕРНАЛИЗИРОВАЛАСЬ ФИБРОБЛАСТАМИ, ЧЕМ LUMIZYME®

Сравнивали относительное поглощение клетками rhGAA ATB200 и Lumizyme® с использованием линии нормальных клеток-фибробластов и линии клеток-фибробластов при болезни Помпе. В сравнения включали 5-100 нМ rhGAA ATB200 в соответствии с настоящим изобретением и 10-500 нМ традиционной rhGAA Lumizyme®. После 16-часовой инкубации внешнюю rhGAA инактивировали с помощью основания TRIS, и клетки промывали 3 раза с помощью PBS перед их сбором. Интернализованную GAA измеряли посредством гидролиза 4MU- $\alpha$ -глюкозида, и данные наносили на график относительно уровня общего клеточного белка, и результаты показаны на фигурах 11А - В.

Также было показано, что rhGAA ATB200 эффективно интернализовалась в клетки (фигуры 11А и 11В, на которых соответственно показано, что rhGAA ATB200 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 ( $K_{\text{поглощения}}$ ), экстраполированная из этих результатов, составляет 2-3 нМ для ATB200 и 56 нМ для Lumizyme®, что показано на фигуре 11С. Эти результаты позволяют предположить, что rhGAA ATB200 представляет собой хорошо нацеливаемое средство для лечения болезни Помпе.

ПРИМЕР ФЕРМЕНТА 8. СНИЖЕНИЕ УРОВНЯ ГЛИКОГЕНА У МЫШЕЙ С  
НОКАУТОМ ПО GAA

На фигурах 12А - 12С показаны эффекты в результате введения алглюкозидазы-альфа (Lumizyme®) и ATB200 в отношении очищения от гликогена у мышей с нокаутом по *Gaa*. Животным проводили два IV болюсных введения (один раз в две недели); ткани отбирали через две недели после введения последней дозы и

анализировали в отношении активности кислой  $\alpha$ -глюкозидазы и содержания гликогена.

Как видно на фигурах 12А - 12С, было выявлено, что АТВ200 дозозависимым образом истощает запасы гликогена в тканях у мышей с нокаутом гена кислой  $\alpha$ -глюкозидазы (*Gaa*). Доза 20 мг/кг АТВ200 стабильно обеспечивала удаление 5 большей доли запасенного гликогена у мышей с нокаутом по *Gaa*, чем дозы на уровне 5 и 10 мг/кг. Однако, как видно на фигурах 12А - 12С, АТВ200, вводимая в дозе 5 мг/кг, демонстрировала снижение уровня гликогена в сердечной и скелетных мышцах (квадрицепса и трицепса) мыши, сходное с таковым для 10 Lumizyme®, вводимым в дозе 20 мг/кг, тогда как АТВ200, вводимая в дозе 10 и 20 мг/кг, демонстрировала значительно лучшее снижение уровней гликогена в скелетных мышцах, чем Lumizyme®.

На фигуре 15 показаны эффекты в результате введения алглюкозидазы-альфа (Lumizyme®) и АТВ200 в отношении очищения от гликогена у мышей с 15 нокаутом *Gaa*. Мышей с КО по *GAA* возрастом двенадцать недель обрабатывали Lumizyme® или АТВ200, 20 мг/кг IV один раз в две недели посредством 4 инъекций. Ткани отбирали через 14 дней после введения последней дозы фермента для измерения уровня гликогена. На фигуре 13 показано относительное снижение уровня гликогена в скелетной мускулатуре в 20 квадрицепсе и трицепсе, при этом АТВ200 обеспечивает более значительное снижение уровня гликогена, чем Lumizyme®.

#### ПРИМЕР ФЕРМЕНТА 9. ФИЗИОЛОГИЯ И МОРФОЛОГИЯ МЫШЦ У МЫШЕЙ С НОКАУТОМ ПО GAA

Мышам с нокаутом по *Gaa* проводили два IV болюсных введения 25 рекомбинантной кислой  $\alpha$ -глюкозидазы человека (алглюкозидазы-альфа или АТВ200) в дозе 20 мг/кг один раз в две недели. Контрольных мышей обрабатывали только средой-носителем. Ткань камбаловидной мышцы, квадрицепса и диафрагмы отбирали через две недели после введения последней дозы рекомбинантной кислой  $\alpha$ -глюкозидазы человека. Проводили анализ ткани

камбаловидной мышцы и диафрагмы в отношении уровней гликогена с помощью окрашивания реактивом Шиффа-перйодной кислотой (PAS) и в отношении пролиферации лизосом путем измерения уровней маркерного мембранного белка, ассоциированного с лизосомами (LAMP1), экспрессия которого положительно регулируется при болезни Помпе. Полутонкие срезы квадрицепса, залитые эпоксидной смолой (Epon), окрашивали метиленовым синим и исследовали с помощью электронной микроскопии (1000x) для определения степени присутствия вакуолей. Образцы квадрицепса 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 по Gaa проводили четыре IV болюсных введения рекомбинантной кислой  $\alpha$ -глюкозидазы человека (алглюкозидазы-альфа или ATB200) в дозе 20 мг/кг один раз в две недели. Контрольных мышей обрабатывали только средой-носителем. Сердечную мышечную ткань отбирали через две недели после введения последней дозы рекомбинантной кислой  $\alpha$ -глюкозидазы человека и анализировали в отношении уровней гликогена с помощью окрашивания реактивом Шиффа-перйодной кислотой (PAS) и в отношении пролиферации лизосом путем измерения уровней LAMP1.

На фигуре 14 видно, что при введении ATB200 демонстрировалось снижение пролиферации лизосом в сердечной мышечной ткани, ткани диафрагмы и скелетной мышечной ткани (ткани камбаловидной мышцы) в сравнении с традиционной обработкой алглюкозидазой-альфа. Кроме того, на фигуре 15 видно, что при введении ATB200 демонстрировалось снижение уровней гликогена в виде точечных отложений в сердечной и скелетной мышечных тканях (ткани камбаловидной мышцы) в сравнении с традиционной обработкой алглюкозидазой-альфа.

Также на фигуре 16 видно, что АТВ200 значительно снижала число вакуолей в мышечном волокне квадрицепса у мышей с нокаутом по *Gaa* в сравнении с необработанными мышами и мышами, обработанными алглукозидазой-альфа. На фигуре 17 видно, что уровни *LC3 II*, и *p62* были повышены у мышей с нокаутом по *Gaa* в сравнении с мышами дикого типа. Кроме того, уровни инсулинзависимого переносчика глюкозы GLUT4 и инсулиннезависимого переносчика глюкозы GLUT1 были повышены у мышей с нокаутом по *Gaa* в сравнении с мышами дикого типа. Повышенные уровни GLUT4 и GLUT1, ассоциированные с дефицитом кислой  $\alpha$ -глюкозидазы, могут способствовать увеличению поглощения глюкозы мышечными волокнами и увеличению синтеза гликогена как в базальном состоянии, так и после приема пищи.

#### ПРИМЕР ФЕРМЕНТА 10. МЫШЕЧНАЯ ФУНКЦИЯ У МЫШЕЙ С НОКАУТОМ ПО GAA

В более длительных исследованиях с 12 введениями один раз в две недели комбинация 20 мг/кг АТВ200 с 10 мг/кг миглустата постепенно повышала функциональную мышечную силу у мышей с КО по *Gaa* относительно исходного уровня, что измеряли с помощью как тестов силы захвата, так и тестов «вис на проволоке» (фигуры 18А - 18В). У мышей, обработанных алглукозидазой-альфа (Lumizyme®), которые получали аналогичную дозу средства для ERT (20 мг/кг), наблюдали снижение показателей в идентичных условиях на протяжении большей части исследования (фигуры 18А - 18В). Как и в случае более краткосрочного исследования, комбинация АТВ200/миглустат характеризовалась существенно лучшим очищением от гликогена после 3 месяцев (фигуры 19А - 19С) и 6 месяцев (фигуры 19D - 19G) обработки, чем алглукозидаза-альфа. Комбинация АТВ200/миглустат также снижала аутофагию и внутриклеточное накопление LAMP1 и дисферлина после 3 месяцев обработки (фигура 20) в сравнении с алглукозидазой-альфа. На фигуре 18А \* указывает на статистически значимый результат в сравнении с отдельно Lumizyme® ( $p < 0,05$ , 2-сторонний t-критерий). На фигурах 19А - 19G \* указывает на статистически значимый результат в сравнении с отдельно Lumizyme® ( $p < 0,05$ ,

множественное сравнение с применением метода Даннетта в рамках однофакторного анализа ANOVA).

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

На фигуре 20 показано, что введение АТВ200 с миглулатом или без него в течение 6 месяцев снижало внутриклеточное накопление дистрофина у мышей с КО по *Gaa*. Для комбинации АТВ200 ± миглулат наблюдали более существенное снижение накопления дистрофина, чем в случае применения Lumizyme®.

## 20 ПРИМЕР СОСТАВА 1. рН И БУФЕР

### Аналитические способы для примеров состава

Анализы примеров, описанные в данном документе в отношении внешнего вида, показателя рН, концентрации белка и т. д., осуществляли в соответствии с приведенными ниже способами, если не указано иное.

## 25 Внешний вид

Внешний вид образцов, в том числе прозрачность, цвет и наличие видимых частиц, исследовали на черном и белом фоне с применением устройства для просмотра с подсветкой YB-2.

#### Показатель pH

- 5 Показатель pH образца измеряли с помощью pH-метра SevenMulti™.

#### Концентрация белка

Концентрацию белка определяли посредством считывания при UV280 с использованием спектрофотометра NanoDrop™ 2000. Все измерения повторяли дважды с 2,5 мкл образца каждый раз и получали среднее значение.

#### 10 Эксклюзионная высокоэффективная жидкостная хроматография (SEC-HPLC)

Для показателя pH и буфера, замораживание-оттаивание и примеров вспомогательного вещества разделение мономеров белка и его высокомолекулярных форм и фрагментов осуществляли с использованием колонки TSKgel® G3000 SWXL (Tosoh Bioscience, 7,8×300 мм, 5 мкм, 25°C) на системе Agilent 1260 HPLC. Подвижная фаза состояла из 50 мМ фосфата натрия, 100 мМ хлорида натрия и 20 мМ цитрата натрия (pH 6,0±0,2). В хроматографической системе использовали скорость потока 1,0 мл/мин, объем вводимой пробы 50 мкл (как правило, 1 мг/мл) и время хроматографирования образца 20 мин с изократическим градиентом. Сигналы выявляли с помощью УФ-детектора при 280 нм (эталон: 360 нм).

В примере PS80, разделение мономеров белка и его высокомолекулярных форм и фрагментов осуществляли с использованием колонки BioSep™-SEC-s3000 (Phenomenex, 7,8×300 мм, 5 мкм, 25°C) на системе Agilent 1260 HPLC. Подвижная фаза состояла из 50 мМ фосфата натрия и 100 мМ хлорида натрия (pH 6,2±0,2). В хроматографической системе использовали скорость потока 1,15 мл/мин, объем вводимой пробы 50 мкл (как правило, 1 мг/мл) и время

хроматографирования 25 мин с изократическим градиентом. Сигналы выявляли с помощью УФ-детектора при 280 нм.

#### SDS-PAGE (при невосстанавливающих условиях)

Подлежащими регистрации значениями являются чистота и молекулярная масса белка в SDS-PAGE при невосстанавливающих условиях. Образцы денатурировали при невосстанавливающих условиях в присутствии излишка SDS с достижением однородного отрицательного заряда. При воздействии электрическим поле (165 В), данные покрытые SDS формы разделяли на основе их выявленной молекулярной массы в полиакриломидном геле. Разделенные 5 10 полосы выявляли посредством окрашивания кумасси синим.

#### Ферментативная активность в отношении 4-MUG

10 мкл образца разводили и гидролизовали (посредством GAA, 37°C в течение 60 мин) с получением флюоресцентного продукта 4-MU. Добавляли 125 мкл 1 М глицина или 0,1 М NaOH для остановки реакции.

15 Ряд стандартов 4-MU анализировали с образцами для получения стандартной калибровочной кривой на основе флюоресцентного сигнала. Превращение RFU в количество 4-MU получали посредством сравнения, опосредованного программным обеспечением, со стандартной кривой, которую подвергали регрессии в соответствии с 4-х параметрической логистической моделью 20 регрессии. Затем ферментативную активность GAA (нмоль 4-MU, высвобожденного/ч/мл GAA) в образце рассчитывали на основе стандартной кривой для 4-MU.

#### Концентрация фермента, определяемая по 4-MUG

10 мкл образца и эталонного стандарта GAA разводили и гидролизовали 25 (посредством GAA, 37°C в течение 60 мин) с получением флюоресцентного продукта 4-MU. Добавляли 125 мкл 1 М NaOH для остановки реакции.

Ряд эталонных стандартов GAA анализировали с образцами для получения стандартной калибровочной кривой на основе флуоресцентного сигнала. Превращение RFU в количество 4-MU получали посредством сравнения, опосредованного программным обеспечением, со стандартной кривой, которую

5 подвергали регрессии в соответствии с 4-х параметрической логистической моделью регрессии. Затем ферментативную концентрацию GAA (нмоль 4-MU, высвобожденного/ч/мл GAA) в образце рассчитывали на основе стандартной кривой GAA.

#### Динамическое рассеяние света (DLS)

10 Микropипетку использовали для переноса аликвоты 40 мкл неразведенного образца в одноразовую кювету объемом 40 мкл. Для каждого образца осуществляли измерения в трех параллелях.

#### Частицы: НІАС

200 мкл каждого образца разводили в 2000 мкл отфильтрованного эталонного

15 буфера. Образец тестировали три раза и использовали для каждого теста 450 мкл. Регистрировали среднее количество частиц каждого размера: 1 мкм, 3 мкм, 5 мкм, 10 мкм и 25 мкм на мл

#### Дифференциальная сканирующая калориметрия MicroCal (DSC)

Дифференциальную сканирующую калориметрию (DSC) с капиллярной ячейкой

20 применяют для измерения термостабильности белков посредством выявления разницы в количестве тепла, необходимого для повышения температуры образца и эталона, в зависимости от температуры. В частности, ее используют для измерения средней точки теплового перехода ( $T_m$ ), которая является показателем относительной стабильности белка в растворе.

25 Образцы разводили эталонным буфером до приблизительно 1 мг/мл. Аликвоту в 400 мкл эталонного буфера добавляли в каждую лунку с нечетным номером 96-луночного планшета, тогда как аликвоту в 400 мкл каждого образца добавляли в

соответствующую лунку с четным номером. Температура сканирования находится в диапазоне, составляющем от 10°C до 110°C.

#### Модулированная дифференциальная сканирующая калориметрия (mDSC)

Температуру перехода в стеклообразное состояние ( $T_g'$ ) и температуру эвтектической точки ( $T_e$ ) тестировали с использованием дифференциального сканирующего калориметра от Netzsch (DSC 204 F1). Для тестирования 15 мкл образца загружали на диск для загрузки. Сперва температуру снижали с 20°C до -60°C со скоростью 10°C/мин, и во время данной стадии из кривой охлаждения получали значение  $T_e$ . Затем температуру повышали от -60°C до 40°C со скоростью 10°C/мин, и из кривой нагревания анализировали значение  $T_g'$ .

#### М6Р

М6Р высвобождали из образца посредством гидролиза (4 М TFA, 100°C, 4 ч), и высушивали с помощью центрифужного вакуумного испарителя. Высушенный М6Р и эталонный стандарт суспендировали в очищенной воде до проведения анализа. Использовали аналитическую колонку CarboPac PA10 BioLCTM (4 мм × 250 мм, 3,5 мкм, 100 Å, 30°C) и колонку CarboPac PA10 BioLCGuard (4 мм × 50 мм, 3,5 мкм, 100 Å, 30°C). Подвижная фаза состояла из фазы А (100 мМ NaOH) и фазы В (1 М NaOAc, 100 мМ NaOH). В хроматографической системе использовали скорость потока 1 мл/мин, объем вводимой пробы 25 мкл и время хроматографирования 30 мин с градиентом. Сигналы выявляли посредством импульсного амперометрического детектирования. Содержание М6Р в образце рассчитывали на основе стандартной кривой.

#### Сиаловая кислота

Сиаловые кислоты высвобождали из молекул лекарственного средства посредством гидролиза (2 М HAc, 80°C, 2 ч), а затем метили все образцы и смешивали стандартный раствор с DMB (50°C, 17±0,5 ч в темноте) перед разделением с использованием колонки Zorbax Eclipse Plus C18 (Agilent, 4,6 мм×100 мм, 3,5 мкм, 45°C) на системе Agilent 1260 HPLC. Подвижная фаза

состояла из фазы А (9% АСN, 7% MeOH) и фазы В (100% АСN). В хроматографической системе использовали скорость потока 0,5 мл/мин, объем вводимой пробы 20 мкл и время хроматографирования 20 мин с градиентом. Сигналы выявляли с помощью флуоресцентного детектора ( $\lambda_{ex}=373$  нм,  $\lambda_{em}=448$  нм). Содержание Neu5Gc и Neu5Ac в образце рассчитывали на основе стандартной кривой.

Получали десять составов с буфером, характеризующихся показателем рН в диапазоне, составляющем от 4,0 до 8,0, содержащем 25 мМ фосфата натрия или 25 мМ цитрата натрия с 50 мМ NaCl или без него, как показано в таблице 1. Концентрация фермента АТВ200, определенная с использованием 4-MUG в качестве субстрата, составляла 1 мг/мл.

Таблица 1. Состав композиций

<u>Образец</u>	<u>Буфер</u>	<u>NaCl</u>	<u>Показатель рН</u>
P40	25 мМ фосфата натрия	50 мМ	4,0*
P50			5,0
P60			6,0
P70			7,0
P80			8,0
P60 без NaCl	25 мМ фосфата натрия	Отсутствует	6,0
C50	25 мМ цитрата натрия	50 мМ	5,0
C55			5,5
C60			6,0
C65			6,5

\* NaCl использовали для доведения показателя рН до 4,0.

### Подготовка образца

15 Материал, используемый в оценочном исследовании рН и буфера, является таковым, как описано в таблице 2 ниже.

Таблица 2. Информация о сырьевом материале из оценочного исследования рН и буфера

Конц, мг/мл		SEC, %	Ферментативная активность, Ед/л	SDS- PAGE, %	Сиаловая кислота, моль/моль белка	М6Р, моль/моль белка	СНО, ppm
УФ 280	Конц, фермента						
3,6* *	1,72	98,9	9094,2	99,7	5,37	3,1	422

\* Буфер для данного ферментативного раствора АТВ200 представлял собой 50 мМ фосфата натрия (рН 6,2), 50 мМ NaCl, 2% маннита.

\*\* Коэффициент экстинкции составлял 1,51 Ед. опт. плот. \*мл\*мг<sup>-1</sup>\*см<sup>-1</sup>

5 Готовили 25 мМ натрий-фосфатный буфер, содержащий 50 мМ NaCl при рН 4,0 (P40), 5,0 (P50), 6,0 (P60), 7,0 (P70), и 8,0 (P80), 25 мМ натрий-фосфатный буфер при рН 6,0 (P60 без NaCl), и 25 мМ натрий-цитратный буфер, содержащий 50 мМ NaCl при рН 5,0 (C50), 5,5 (C55), 6,0 (C60) и 6,5 (C65). Для рН 4,0 HCl использовали для доведения рН в натрий-фосфатном буфере (рН 4,0).

10 Ферментативный раствор АТВ200 концентрировали сперва с использованием центрифужного устройства для ультрафильтрации в условиях 15°C и 3500 об./мин в течение 40 мин. После этого в концентрированном ферментативном растворе проводили замену буфера тремя различными буферами, описанными выше, посредством двух циклов ультрафильтрации при 15°C и 3500 об./мин в течение 50 мин и 55 мин. Подвергнутые заменам буфера 15 ферментативные растворы затем анализировали в отношении концентрации белка и концентрации фермента с использованием 4-MUG в качестве субстрата.

В конечном итоге добавляли соответствующий объем каждого буфера для доведения конечной концентрации фермента АТВ200 до 1,0 мг/мл. Конечную концентрацию АТВ200 подтверждали посредством как поглощения УФ\_A280, 20 так и концентрации фермента, определенную с использованием 4-MUG в качестве субстрата.

Растворы в стерильных условиях фильтровали с помощью 0,22-мкм полиэфирсульфонового (PES) фильтра.

Каждым составом асептически заполняли стеклянные флаконы объемом 2 мл в ламинарном боксе с биологической защитой с объемом заполнения 500 мкл ~ 1000 мкл в соответствии с необходимым количеством образца для аналитических тестов. Флаконы закрывали пробкой, а затем закатывали обжимным колпачком сразу же после заполнения.

### Тестирование образца

Флаконы с каждым составом хранили при 5°C и 40°C в течение не более 8 недель, и встряхивали при 25°C при 100 об./мин на орбитальном шейкере в течение не более 5 дней (см. таблицу 3). Отбирали образец состава вначале (T0), через 5 дней (5D), 2 недели (2W), 4 недели (4W) и 8 недель (8W), как описано в таблице 3, для анализа внешнего вида, определения показателя pH, концентрации при УФ, концентрации, фермента, определенной по 4-MUG, SEC, HIAC, DLS, ферментативной активности в отношении 4-MUG и DSC.

Таблица 3. Параметры исследования в оценочном исследовании показателя pH и буфера ATB200

<u>Условия хранения</u>	<u>T0</u>	<u>5D</u>	<u>2W</u>	<u>4W</u>	<u>8W</u>
5°C	X, Y	-	X	X	X, Z
40°C с		-	X	X	X
Встряхивание, ~100 об./мин, 25°C		X	-	-	-

X: внешний вид, показатель pH, концентрация при УФ, концентрация фермента, определяемая по 4-MUG, SEC, HIAC\*, DLS, ферментативная активность 4-MUG

Y: DSC

\*: HIAC тестировали только для образцов T0 и встряхиваемых образцов

### 20 Результаты

#### Результаты термостабильности - MicroCal DSC

Результаты измерений термостабильности показаны ниже в таблице 4.

Таблица 4

<u>Образец</u>	<u>T<sub>m</sub> начало (°C)</u>	<u>T<sub>M1</sub> (°C)</u>
P40	56,34	66,25
P50	63,49	73,42
P60	60,47	72,05
P70	47,55	64,09
P80	37,21	47,72
P60 без NaCl	61,22	72,25
C50	62,66	72,60
C55	62,89	73,39
C60	59,26	70,83
C65	53,45	67,24

Более высокая T<sub>m</sub><sub>начало</sub> свидетельствует о лучшей термостабильности белка в определенном составе. Соответственно, составами, проявляющими наиболее высокую термостабильность, были P50, C55, C50, P60 без NaCl, P60 и C60. Данные результаты свидетельствуют о том, что фермент АТВ200 характеризуется лучшей термостабильностью в слабом кислотном буфере, чем в основных условиях.

#### Внешний вид – встряхивание

10 Результаты исследования внешнего вида при встряхивании показаны ниже в таблице 5.

Таблица 5

<u>Образец</u>	<u>T<sub>0</sub></u>	<u>Встряхивание, при 100 об./мин, 25°C, 5 дней</u>
P40	Бесцветный, прозрачный, не содержащий видимые частицы	Бесцветный, прозрачный, мелкие видимые частицы
P50		Бесцветный, прозрачный, очень мелкие видимые частицы

<u>Образец</u>	<u>T0</u>	<u>Встряхивание, при 100 об./мин, 25°C, 5 дней</u>
P60		Бесцветный, прозрачный, очень мелкие видимые частицы
P70		Бесцветный, прозрачный, мелкие видимые частицы
P80		Бесцветный, прозрачный, видимые частицы
P60 без NaCl		Бесцветный, прозрачный, не содержащий видимые частицы
C50		Бесцветный, прозрачный, не содержащий видимые частицы
C55		Бесцветный, прозрачный, не содержащий видимые частицы
C60		Бесцветный, прозрачный, не содержащий видимые частицы
C65		Бесцветный, прозрачный, не содержащий видимые частицы

Из таблицы видно, что после встряхивания в течение 5 дней, P60 без NaCl, C50, C55, C60 и C65 оставались бесцветными, прозрачными и не содержали видимых частиц, но при этом видимые частицы наблюдали в P40, P50, P60, P70 и P80. Эти 5 данные показывают, что натрий-цитратный буфер стабилизировал состав лучше, чем натрий-фосфатный буфер после встряхивания.

#### Показатель pH

Результаты измерений показателя рН показаны в таблице 6 ниже.

Таблица 6

<u>Образец</u>	<u>Показатель рН</u>							<u>Встряхивание, при 100 об./мин, 25°C, 5 дней</u>
	<u>T0</u>	<u>5°C</u>			<u>40°C</u>			
		<u>2W</u>	<u>4W</u>	<u>8W</u>	<u>2W</u>	<u>4W</u>	<u>8W</u>	
P40	4,293	4,233	4,273	4,380	4,618	4,537	4,606	4,296
P50	5,051	5,008	5,011	4,936	5,070	4,998	5,044	5,002
P60	6,053	6,025	5,927	5,927	6,030	5,911	5,949	6,017
P70	7,093	7,043	6,999	6,941	7,037	7,024	7,014	7,027
P80	7,864	7,823	7,749	7,767	7,834	7,834	7,767	7,883
P60 без NaCl	6,091	6,040	5,927	5,736	6,049	5,852	5,862	6,028
C50	5,069	5,034	4,986	4,971	5,030	4,997	5,016	5,011
C55	5,564	5,524	5,486	5,501	5,517	5,459	5,501	5,517
C60	6,071	6,044	6,020	5,983	6,038	6,038	5,998	6,035
C65	6,566	6,551	6,526	6,422	6,562	6,513	6,516	6,544

- Из приведенных данных видно, что и фосфатный, и цитратный буферы с 50 мМ NaCl, находящиеся в диапазоне показателя рН, составляющего от 5,0 до 6,5, были способны поддерживать обозначенное значение рН на всем протяжении исследования. В ходе замены буфера, регулирования концентрации, хранения в течение 8 недель при 5°C и 40°C и встряхивания, значительного изменения показателя рН образцов не выявили.
- 10 И наоборот, показатель рН снижался в P60 без NaCl после хранения в течение 8 недель при и 5°C, и 40°C, при этом показатель рН повышался в P40 после замены буфера и хранения в течение 8 недель при обоих температурах. Однако встряхивания не привело к какому-либо изменению показателя рН как в P40, так и в P60 без NaCl.
- 15 Концентрация белка

Результаты измерений концентрации белка показаны в таблице 7 ниже:

Таблица 7

Образец	Концентрация при УФ, мг/мл								Встряхивание, при 100 об./мин, 25°C, 5 дней
	T0	5°C			40°C				
		2W	4W	8W	2W	4W	8W	8W*	
P40	1,72	1,75	1,72	1,71	1,88	1,70	1,69	1,50	1,73
P50	1,74	1,80	1,81	1,81	1,91	1,99	1,98	1,56	1,80
P60	1,90	1,92	1,88	1,87	1,96	2,10	2,04	1,31	1,87
P70	1,79	1,76	1,75	1,73	1,83	1,75	1,72	1,66	1,74
P80	2,20	2,25	2,21	2,20	2,25	2,21	2,23	2,19	2,25
P60 без NaCl	1,82	1,85	1,82	1,81	1,87	1,90	1,92	1,58	1,86
C50	1,83	1,80	1,81	1,81	1,80	1,76	1,72	1,71	1,80
C55	1,84	1,83	1,83	1,84	1,89	1,85	1,79	1,54	1,82
C60	2,00	1,98	1,97	1,97	2,08	2,21	2,14	1,19	1,96
C65	2,03	2,05	1,98	2,00	2,17	2,19	2,39	1,26	2,06

Хранение в течение 8 недель при 5°C и встряхивание в течение 5 дней не оказывало влияния на концентрацию белка. Никаких существенных изменений среди всех составов не отмечали.

И наоборот, в ходе хранения при 40°C концентрация белка слегка повышалась в P50, P60, P60 без NaCl, C60 и C65, слегка понижалась в C50, и сохранялась в P40, P70, P80, C55. Вследствие образования видимых частиц в образцах при 40°C, образцах, которые хранили при 40°C в течение 8 недель, образцы повторно тестировали после центрифугирования при 12000 об./мин в течение 1 минуты. Результаты показали падение концентрации белка после центрифугирования в образцах, содержащих частицы, что указывало на то, что частицы, присутствующие в образцах, оказывали влияние на поглощение при 280 нм.

15 Концентрация фермента, определяемая по 4-MUG

Результаты измерений концентрации фермента 4-MUG показаны в таблице 8 ниже.

Таблица 8

Название образца	Концентрация фермента 4-MUG, мг/мл							
	T0	5°C			40°C			Встряхивание, при 100 об./мин, 25°C, 5 дней
		2W	4W	8W	2W	4W	8W	
P40	0,86	0,91	0,91	0,76	0,34	0,16	0,04	1,02
P50	0,92	1,08	1,08	1,05	0,78	0,62	0,33	1,12
P60	0,89	1,10	1,13	1,13	0,92	0,87	0,58	1,14
P70	0,82	0,93	0,92	0,86	0,00	0,00	0,00	1,00
P80	0,27	0,00	0,00	0,00	0,00	BQL	Н. о.	0,00
P60 без NaCl	0,87	1,10	1,06	1,05	1,01	0,98	0,73	1,09
C50	0,87	1,04	1,06	1,05	0,89	0,68	0,33	1,14
C55	0,90	1,15	1,11	1,09	1,03	0,96	0,63	1,13
C60	1,02	1,22	1,33	1,23	1,08	0,92	0,53	1,26
C65	1,02	1,23	1,29	1,28	0,15	0,01	0,00	1,29

5

После замены буфера концентрация фермента 4-MUG в P80 резко падала до 0,27 мг/мл. Это свидетельствовало о том, что показатель pH 8,0 значительно влиял на ферментативную активность. После хранения в течение 2 недель и при 5°C, и при 40°C концентрация фермента падала к нулю. За исключением P80, после хранения в течение 8 недель при 5°C концентрации фермента в большинстве составов являлись стабильными и незначительно падали в P40.

И напротив, хранение при 40°C явно оказывало влияние на концентрацию фермента. Через 2 недели фермент не выявляли в P70, резко падала в P40 и C65 и явно снижалась в P50. Через 4 недели концентрация фермента продолжала снижаться. В итоге, через 8 недель значения концентрации ферментов были близки к нулю в P40 и C65, падали до 0,33 мг/мл в буферах с показателем pH 5,0 (P50 и C50) и до 0,5~0,7 мг/мл в буферах с показателем pH 5,5~6,0 (P60, P60 без

15

NaCl, C55 и C60). Среди них P60 без NaCl характеризовался наиболее высокой концентрацией фермента (0,73 мг/мл) в конечном итоге. Результаты указывают на то, что концентрация фермента в наибольшей степени сохранялась в отношении концентрации фермента 4-MUG в диапазоне показателя pH 5,5~6,0, но значимой разницы между натрий-фосфатным буфером и натрий-цитратным буфером не выявляли.

В ходе исследования при встряхивании, за исключением P80, концентрация фермента значительно не изменилась.

#### Ферментативная активность в отношении 4-MUG

10 Результаты измерений ферментативной активности в отношении 4-MUG показаны в таблице 9 ниже.

Таблица 9

Название образца	Ферментативная активность в отношении 4-MUG, Ед/л							
	T0	5°C			40°C			Встряхивание, при 100 об./мин., 25°C, 5 дней
		2W	4W	8W	2W	4W	8W	
P40	4703,4	5092,7	4153,7	3697,2	1822,3	712,2	211,5	5439,9
P50	5043,8	6021,5	4947,8	5101,4	4344,4	2836,9	1561,7	5953,8
P60	4915,3	6133,7	5193,7	5487,5	5170,4	4002,9	2790,4	6087,0
P70	4481,1	5233,1	4211,5	4195,4	0,2	0,4	0,0	5360,5
P80	1402,6	1,8	1,6	0,7	0,2	BQL	0,0	0,6
P60 без NaCl	4763,7	6130,1	4862,1	5120,0	5662,4	4476,0	3549,7	5799,6
C50	4772,4	5811,8	4850,7	5110,8	4964,9	3121,6	1544,8	6057,4
C55	4957,3	6450,1	5091,7	5321,7	5740,9	4411,9	3054,1	6036,5
C60	5641,1	6829,9	6061,0	5999,2	6026,4	4243,2	2563,3	6662,8
C65	5639,3	6848,2	5892,8	6238,7	761,6	65,5	3,4	6827,8

15 Тенденция к изменению ферментативной активности в отношении 4-MUG соответствовала тенденции к изменению концентрации фермента, измеряемой по 4-MUG.

Р80 проявлял наихудшую стабильность в отношении ферментативной активности, определяемой по 4-MUG в условиях тестирования. Ферментативная активность Р80 снижалась на приблизительно 70% после замены буфера. Позже ферментативная активность была практически утрачена после хранения в течение 2 недель при 5°C и 40°C. Основное условие значительно влияло на ферментативную активность.

После хранения в течение 8 недель при 5°C ферментативная активность PS80 была полностью утрачена; в Р40 обнаружили снижение на 20%; в других составах значительного изменения не выявляли.

10 И напротив, хранение при 40°C привело к явному снижению ферментативной активности во всех составах. Через 2 недели ферментативная активность была практически полностью утрачена в Р70, резко снижалась в Р40 и С65 и явно упала в Р50. Ферментативная активность продолжила снижаться в различной степени со 2 недели к 4 неделе. В конце исследования ферментативная  
15 активность была практически утрачена в С65, упала до 211,5 Ед/л в Р40, до ~ 1550 Ед/л в Р50 и С50 и до 2500 ~ 3000 Ед/л в С60, Р60 и С55. Среди составов Р60 без NaCl сохранял наиболее высокую активность, составляющую 3549,7 Ед/л.

На основе результатов тестирования ферментативной активности в отношении  
20 4-MUG фермент был наиболее стабильным при показателе рН в диапазоне рН 5,5~6,0, но разницы между натрий-фосфатным буфером и натрий-цитратным буфером не выявляли.

#### Чистота: SEC-HPLC

Результаты измерений SEC показаны ниже в таблице 10.

25 Таблица 10

Название образца	SEC	T0	5°C			40°C			Встряхивание, при 100 об./мин, 25°C, 5 дней
			2W	4W	8W	2W	4W	8W	
P40	% мономеров	94,0	89,1	81,9	74,3	41,2	18,7	7,1	90,8
	HMW, %	1,3	1,6	2,4	2,4	Н. о.	Н. о.	Н. о.	0,7
	LMW, %	4,7	9,4	15,7	23,4	58,8	81,3	93,0	8,5
P50	% мономеров	99,3	98,1	95,4	92,8	81,1	66,1	42,0	96,6
	HMW, %	0,4	0,4	0,7	1,4	0,2	Н. о.	0,1	0,6
	LMW, %	0,4	1,6	4,0	5,9	18,6	33,9	57,9	2,8
P60	% мономеров	98,7	97,7	96,8	96,2	96,1	92,4	80,8	96,8
	HMW, %	0,8	0,9	1,2	1,9	2,1	0,6	2,7	1,1
	LMW, %	0,5	1,4	2,0	2,0	1,8	7,0	16,5	2,1
P70	% мономеров	97,7	94,6	92,4	87,0	0,5	Н. о.	0,1	93,5
	HMW, %	1,8	3,3	5,4	11,0	96,9	96,4	96,7	4,1
	LMW, %	0,5	2,1	2,3	1,9	2,7	3,6	3,2	2,4
P80	% мономеров	44,9	35,3	34,4	26,7	Н. о.	Н. о.	0,2	15,2
	HMW, %	54,5	63,0	61,4	69,3	97,3	97,2	96,5	83,7
	LMW, %	0,6	1,7	4,2	4,0	2,7	2,8	3,3	1,1
P60 без NaCl	% мономеров	96,6	98,0	97,0	96,8	94,95	92,4	83,6	95,6
	HMW, %	0,5	0,5	1,0	1,2	1,44	0,7	3,0	1,0
	LMW, %	2,9	1,5	2,0	2,0	3,62	7,0	13,5	3,4
C50	% мономеров	98,3	99,5	95,6	93,0	96,3	62,3	32,3	92,1
	HMW, %	0,2	0,2	0,4	0,2	2,0	0,1	Н. о.	0,4
	LMW, %	1,5	0,4	4,0	6,8	1,7	37,6	67,7	7,6
C55	% мономеров	98,5	99,4	99,3	95,9	94,81	88,52	68,5	92,6
	HMW, %	0,3	0,2	0,2	1,4	0,29	0,19	0,2	0,3
	LMW, %	1,3	0,4	0,5	2,7	4,9	11,3	31,3	7,1
C60	% мономеров	98,7	99,2	97,8	97,6	98,0	95,8	77,5	92,8
	HMW, %	0,3	0,3	0,8	1,1	1,1	1,0	5,5	0,8
	LMW, %	1,0	0,6	1,4	1,3	0,9	3,2	17,0	6,4
C65	% мономеров	98,8	98,9	97,6	97,9	22,4	10,0	Н. о.	91,4
	HMW, %	0,4	0,5	1,2	1,9	76,7	86,1	86,8	4,4
	LMW, %	0,8	0,6	1,2	0,3	1,0	3,9	13,2	4,2

После замены буфера чистота по SEC некоторых из составов значительно снижалась по сравнению с исходным материалом (процентное содержание мономеров по SEC: 98,9%). В P80 чистота согласно SEC упала до 44,9%, и образовывалось 54,5% агрегатов; в P40 выявляли снижение на 4,9% процентного содержания мономеров по сравнению с DS перед заменой, при этом

образовалось больше фрагментов с LMW, чем молекул с HMW (4,7% по сравнению с 1,3%); в P70 выявили незначительное снижение (1,2%) процентного содержания мономеров, соответствующее повышению количества агрегатов; в P60 без NaCl наблюдали снижение на 2,3% процентного содержания мономеров.

5 После 8 недель хранения при 5°C чистота согласно SEC составов P60, P60 без NaCl и C65 хорошо сохранялась, но чистота согласно SEC других составов значительно снижалась по сравнению с T0. В P40 чистота согласно SEC резко падала до 74,3% (T0: 94,0%) и образовывалось 23,4% фрагментов с LMW; в P50 и C50 выявили незначительное снижение (5~7%) процентного содержания  
10 мономеров и повышение процентного содержания (5~7%) фрагментов с LMW. В P80 обнаружили снижение на 18,2%, которое в основном приходилось на агрегацию (14,8%). Таким образом, как и в P70 выявили снижение на 10,7% процентного содержания мономеров и повышение на 9,2% процентного содержания фрагментов с HMW. В C55 выявили незначительное изменение  
15 процентного содержания мономеров, HMW и LMW.

Хранение при 40°C приводило к резкому изменению процентного содержания мономеров во всех составах. В P70 и P80 процентное содержание мономеров согласно SEC падало до 0~0,5% через 2 недели и в C65 оставалось 22,4%, и они в основном превращались в агрегаты через 8 недель. В P40, P50 и C50 выявляли  
20 значительное падение (50~90%) процентного содержания мономеров, связанное в основном с образованием фрагментов с LMW. В P60, P60 без NaCl и C60 через 8 недель процентное содержание мономеров согласно SEC снижалось до 80,8%, 83,6% и 77,5% соответственно.

Результаты SEC указывают на то, что показатель pH 6,0 наиболее подходит для  
25 стабильности АТВ200, при этом не было выявлено значимой разницы между натрий-фосфатным буфером и натрий-цитратным буфером. Кроме того, отсутствие хлорида натрия в составах не влияло на стабильность АТВ200.

В ходе исследования со встряхиванием чистота согласно SEC несколько понижалась в P60 и P60 без NaCl. В P40, P50, P70, P80, C50, C60 и C65 выявляли явное снижение процентного содержания мономеров.

### Полидисперсность: DLS

5 Результаты измерений DLS показаны в таблице 11 ниже.

Таблица 11

Условие исследования	Образец	Z-средн.	PdI	Pk 1	Pk 2	Pk 3	Pk 1 инт.	Pk 2 инт.	Пик 3 инт. площади
		d.нм		средняя инт. d.нм	средняя инт. d.нм	средняя инт. d.нм	площади Процент	площади Процент	
T0	P40	10,9	0,183	11,8	4080	0	96,9	3,1	0
	P50	10,7	0,181	11,4	4248	0	96,9	3,1	0
	P60	10,2	0,186	10,9	4199	0	96,6	3,4	0
	P70	9,6	0,144	11,2	0	0	100	0	0
	P80	12,6	0,150	14,1	4421	0	98,8	1,2	0
	P60 без NaCl	10,5	0,223	10,7	3952	0	93,8	6,2	0
	C50	10,3	0,133	11,4	0	0	100	0	0
	C55	9,9	0,129	11,1	0	0	100	0	0
	C60	9,7	0,114	11,0	0	0	100	0	0
	C65	9,7	0,103	10,7	0	0	100	0	0
5°C, 2 Вт	P40	12,8	0,260	13,3	437	0	89,6	10,4	0
	P50	11,8	0,266	11,7	500,7	0	88,3	11,7	0
	P60	9,9	0,161	10,7	4352	0	97,8	2,2	0
	P70	10,0	0,137	10,9	4560	0	98,9	1,1	0
	P80	13,2	0,100	14,7	0	0	100	0	0
	P60 без NaCl	7562,0	1,000	4099,0	0	0	100	0	0
	C50	11,0	0,219	11,7	3459	0	94,1	5,9	0
	C55	10,1	0,152	11,2	4409	0	98,7	1,3	0
	C60	3506,0	0,271	3745,0	9,144	0	93,6	6,4	0
	C65	355,5	1,000	4194,0	11,08	0	74,6	25,4	0
5°C, 4 Вт	P40	12,2	0,220	13,4	2891	0	94,3	5,7	0
	P50	11,8	0,255	12,0	1059	0	89,8	10,2	0
	P60	9,9	0,126	11,1	0	0	100	0	0
	P70	9,9	0,087	10,8	0	0	100	0	0
	P80	13,5	0,176	14,7	4442	0	97,5	2,5	0
	P60 без NaCl	9,6	0,102	10,6	0	0	100	0	0
	C50	11,3	0,229	11,9	2913	0	92,9	7,1	0
	C55	10,5	0,205	11,2	4067	0	95,6	4,4	0
	C60	9,9	0,116	11,1	0	0	100	0	0

	C65	10,7	0,208	12,5	4042	0	97,4	2,6	0
5°C, 8 Вт	P40	15,1	0,329	13,7	116,8	0	77,6	22,4	0
	P50	14,1	0,335	14,0	113,7	0	79,2	20,8	0
	P60	10,1	0,148	11,0	4395	0	98,3	1,7	0
	P70	10,5	0,152	11,6	4397	0	98,4	1,6	0
	P80	13,6	0,121	15,4	0	0	100	0	0
	P60 без NaCl	10,3	0,187	11,0	4055	0	96,3	3,7	0
	C50	11,8	0,281	12,3	486,6	0	88,4	11,6	0
	C55	11,8	0,265	12,3	583,3	0	89,6	10,4	0
	C60	11,8	0,261	12,2	3465	0	91,7	8,3	0
	C65	9,7	0,105	10,8	0	0	100	0	0
40°C, 2 Вт	P40	1768	0,316	2017	5272	0	96,7	3,3	0
	P50	8330	0,418	7,2	0	0	100	0	0
	P60	1318	0,952	741,5	5393	132,8	63,3	18,6	18,2
	P70	66,72	0,627	39,52	4508	0	69,4	30,6	0
	P80	2963	0,733	4504	33,27	0	87,8	12,2	0
	P60 без NaCl	106,2	0,744	143	2912	9,298	71,5	21	7,5
	C50	5874	1	4325	5,199	0	94,9	5,1	0
	C55	30,84	0,721	704,9	9,816	0	59,1	40,9	0
	C60	2574	1	168,9	5444	0	57,1	42,9	0
	C65	96,59	0,31	124,4	4622	0	96,6	3,4	0
40°C, 4 Вт	P40	2116	0,249	2178	5236	0	94,9	5,1	0
	P50	1894	0,251	2385	0	0	100	0	0
	P60	644,6	0,708	2879	475,1	79,89	58,8	34,1	7,1
	P70	34,21	0,122	39,44	0	0	100	0	0
	P80	22,64	0,096	25,18	0	0	100	0	0
	P60 без NaCl	239,5	0,53	394,6	4499	0	95	5	0
	C50	173,1	0,758	9,513	1373	5098	45,1	44,9	10
	C55	561,3	1	1932	187,7	9,455	69,1	14	9,3
	C60	419,3	0,706	1941	244,8	68,83	61,6	34,1	4,3
	C65	138,3	0,248	192,7	25,24	0	98,6	1,4	0
40°C, 8 Вт	P40	1177	0,419	1512	9,926	4,277	93,4	5	1,6
	P50	1381	0,672	1723	9,313	0	92,7	7,3	0
	P60	283	0,587	1028	191,9	37,93	62,2	34,9	2,9
	P70	36,85	0,135	43,2	0	0	100	0	0
	P80	23,2	0,114	26,46	0	0	100	0	0
	P60 без NaCl	3215	0,445	1103	0	0	100	0	0
	C50	2118	0,184	2711	5,565	0	92,1	7,9	0
	C55	145,3	1	801,3	153,6	10,1	59,8	23	14
	C60	462,7	0,918	912,6	175,8	4998	54	30,9	15,1
	C65	196,2	0,309	279,6	45,86	5177	92,1	6,9	1
Встряхивание, при 100 об./мин, 25°C, 5D	P40	13,0	0,331	11,8	190,8	0	80,1	19,9	0
	P50	11,8	0,290	11,3	267,5	0	85,2	14,8	0
	P60	10,1	0,165	11,0	4383	0	97,9	2,1	0
	P70	10,1	0,136	11,4	0	0	100	0	0
	P80	51,6	0,657	21,1	3805	0	55,6	44,4	0

P60 NaCl без	9,7	0,118	10,8	0	0	100	0	0
C50	12,7	0,319	11,8	355,7	0	82,6	17,4	0
C55	9,8	0,140	10,9	4434	0	99	1	0
C60	10,1	0,174	11,0	4397	0	97,8	2,2	0
C65	9,6	0,084	10,5	0	0	100	0	0

Данные DLS отражают гидродинамический радиус молекул белка и полидисперсность частиц. В некоторых образцах наблюдали опалесценцию, поэтому DLS использовали для анализа невидимых частиц. Результаты DLS в основном соответствовали показателям внешнего вида.

Во время хранения в течение 8 недель при 5°C как гидродинамический радиус молекул белка, так и коэффициент полидисперсности (PDI) являлись стабильными и сопоставимыми в P60, P70, P80, P60 без NaCl и C60. Гидродинамический радиус изменился с приблизительно 10 нм на несколько сотен нм во всех других пяти составах, в частности в P40, через 8 недель.

Во время хранения в течение 8 недель при 40°C наблюдалось резкое изменение гидродинамического радиуса и PDI во всех составах. Однако вследствие сложных профилей агрегатов трудно сравнивать эти составы на основе результата.

В исследовании со встряхиванием гидродинамический радиус и PDI P80 характеризовались резким повышением; в P40, P50 и C50 гидродинамический радиус и PDI характеризовались небольшим повышением; в P60, P70, P60 без NaCl, C55, C60 и C65 значимого изменения не выявляли.

В соответствии со всеми приведенными выше данными DLS, P60, P70, P60 без NaCl, C55, C60 и C65 являлись лучше, чем P40, P50, P80 и C50.

#### Частицы: HIAC

Результаты измерений HIAC в исследовании со встряхиванием показаны в таблице 12 ниже.

Таблица 12

Образец	Частица Размер (мкм)	Дифференцированный подсчет/мл	
		T0	Встряхивание, при 100 об./мин, 25°C, 5 дней
P40	≥ 5	1704	2593
	≥ 10	97	163
	≥ 25	8	0
P50	≥ 5	4600	7378
	≥ 10	600	815
	≥ 25	15	0
P60	≥ 5	1052	1245
	≥ 10	112	134
	≥ 25	0	0
P70	≥ 5	171	2860
	≥ 10	15	341
	≥ 25	0	8
P80	≥ 5	15830	15104
	≥ 10	5786	4104
	≥ 25	630	341
P60 без NaCl	≥ 5	289	149
	≥ 10	52	23
	≥ 25	0	0
C50	≥ 5	200	200
	≥ 10	23	15
	≥ 25	0	0
C55	≥ 5	223	319
	≥ 10	23	23
	≥ 25	0	0
C60	≥ 5	408	497
	≥ 10	15	23
	≥ 25	0	0
C65	≥ 5	445	512
	≥ 10	8	0
	≥ 25	0	0

Во время исследования при встряхивании P70 характеризовался значительным увеличением количества частиц после встряхивания при 25°C в течение 5 дней, а все другие составы характеризовались сопоставимыми количествами частиц.

#### Сводная информация

В целом Р60 и С60 отличались как наиболее стабильные составы по сравнению с другими. Таким образом, пришли к заключению, что АТВ200 была наиболее стабильной в диапазоне 5,0-6,0. Однако никаких отличий не было между фосфатным и цитратным буфером. Кроме того, отсутствие хлорида натрия в составе не оказывало значительного влияния на стабильность АТВ200.

### ПРИМЕР СОСТАВА 2. ЗАМОРАЖИВАНИЕ-ОТТАИВАНИЕ

Три состава оценивали в отношении стабильности во время процесса замораживания-оттаивания. Три состава обобщены в таблице 13 ниже. Целевая концентрация фермента АТВ200 составляла 5 мг/мл.

10 Таблица 13

<u>Образец</u>	<u>Буфер</u>	<u>Показатель</u> <u>pH</u>	<u>NaCl</u>
Р60	25 мМ фосфатный	6,0	50 мМ
С60	25 мМ цитратный		
СР60	25 мМ фосфатно-цитратный буфер		

### Подготовка образца

В АТВ200 DS буфер заменяли на 3 буфера для составления с помощью кассеты для диализа (20000 MWCO). Диализы проводили при 5°C с осторожным перемешиванием, при этом в каждом задействовали три замены буфера, один раз каждые 6~10 часов.

После каждого диализа добавляли соответствующий объем буфера для составления для доведения конечной концентрации при УФ до 5 мг/мл. Затем растворы в стерильных условиях фильтровали с помощью 0,22-мкм PES-фильтра. Затем каждым составом асептически заполняли стеклянные флаконы объемом 2 мл в ламинарном боксе с биологической защитой с объемом

заполнения 500 мкл ~ 1000 мкл в соответствии с необходимым количеством образца для аналитических тестов. Флаконы закрывали пробкой, а затем закатывали обжимным колпачком сразу же после заполнения.

5 Перед замораживанием-оттаиванием отбирали флаконы с каждым составом, а оставшиеся флаконы с образцами подвергали предусмотренным циклам замораживания-оттаивания. После замораживания-оттаивания флаконы с образцами отбирали в предварительно определенных точках отбора.

### Тестирование образца

10 Тестировали с использованием трех способов замораживания-оттаивания, как указано ниже.

Способ 1: неконтролируемое замораживание и оттаивание. Образцы замораживали в морозильной камере при  $-80^{\circ}\text{C}$  и оттаивали в камере при  $25^{\circ}\text{C}$ .

15 Способ 2: контролируемое замораживание и неконтролируемое оттаивание. Образцы помещали в контейнер Frosty и замораживали в морозильной камере при  $-80^{\circ}\text{C}$ . В контейнере Frosty используют изопропанол для достижения контролируемой скорости замораживания  $1^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ . Контейнер Frosty помещали в камеру при  $25^{\circ}\text{C}$  для оттаивания образцов. Скорость повышения температуры составляла примерно  $1^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ .

20 Способ 3: контролируемые замораживание и оттаивание. Лиофилизатор использовали для замораживания и оттаивания образцов. Наиболее низкая температура образца, достигнутая в ходе замораживания, составляла  $-47^{\circ}\text{C}$ . Температуру образца повышали до  $25^{\circ}\text{C}$ . Скорость изменения температуры и для замораживания, и для оттаивания контролировали из расчета приблизительно  $0,5^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ . Результаты подтверждали путем повтора  
25 эксперимента.

Осуществляли пять или три цикла замораживания-оттаивания с использованием каждого способа. Следующие тесты осуществляли в отношении образцов до и

после замораживания-оттаивания: внешний вид, концентрация (в УФ и фермента) и SEC-HPLC. Сводные данные о тестируемых параметрах приведены в таблице 14 ниже.

Таблица 14

<u>Оборудование и условие</u>	<u>Скорость и время замораживания</u>	<u>Скорость и время нагревания</u>	<u>T0</u>	<u>1 цикл F/T</u>	<u>3 цикла F/T</u>	<u>5 циклов F/T</u>
Холодильная камера, от –80°C до 25°C	Н. о., 40~60 мин.	Н. о., 40~60 мин.		X	X	X
Контейнер для замораживания Nalgene Mg. Frosty Cryo 1°C, от –80°C до 25°C	1°C/мин, 100~120 мин	~1°C/мин, 100~120 мин	X	X	X	X
Лиофилизатор, от –47°C до 25°C	0,5°C/мин, ~164 мин	0,5°C/мин, ~164 мин		X	X	X*

5 X: внешний вид, концентрация (при УФ и фермента), ферментативная активность, SEC

\*: Данный эксперимент повторяли, 3 цикла FT для первого эксперимента и 5 циклов FT для второго эксперимента.

## Результаты

### 10 Внешний вид – 1-ый этап

Результаты первого этапа анализов внешнего вида показаны в таблицах 15А и 15В ниже.

Таблица 15А

<u>Название образца</u>	<u>T0</u>	<u>Холодильная камера</u>		
		<u>1 FT</u>	<u>3 FT</u>	<u>5 FT</u>
P60	Бесцветный, слегка опалесцирующий,	Бесцветный, слегка опалесцирую	Бесцветный, слегка опалесцирую	Бесцветный, слегка опалесциру

C60	не содержащий видимых частиц	щий, небольшое количество видимых частиц	щий, больше видимых частиц, чем в 1FT	ющий, большое количество видимых частиц
CP60				

Таблица 15В

Название образца	Лиофилизатор		Контейнер Mr. Frosty		
	1 FT	3 FT	1 FT	3 FT	5 FT
P60	Бесцветный, слегка	Бесцветный, слегка	Бесцветный, слегка	Бесцветный, слегка	Бесцветный, слегка
C60	опалесцирую щий, не	опалесцирую щий, небольшое	опалесцирующ ий, небольшое	опалесцирующ ий, большее	опалесцирующ ий, большее
CP60	содержащий видимых частиц	количество видимых частиц	количество видимых частиц	видимых частиц, чем в 1FT	количество видимых частиц

5 Выяснилось, что в T0 (перед замораживанием-оттаиванием) все составы являлись бесцветными, слегка опалесцирующими и не содержащими видимые частицы, при этом соответствующие буферы для составления использовали в качестве эталона.

10 Выяснилось, что после 5 циклов быстрого замораживания-оттаивания (способ 1) все составы содержали больше видимых частиц по сравнению с их T0. CP60 содержал наименьшее количество частиц среди трех после 5 FT.

Выяснилось, что после 5 циклов медленного замораживания-оттаивания (способ 2) все составы содержали больше видимых частиц, чем в T0, хотя меньше, чем обработанные посредством способа 1. Меньшее количество частиц наблюдали в образцах CP60 после 5 циклов FT, чем в образцах P60 и C60 после 1 цикла FT.

Выяснилось, что после 3 циклов медленного замораживания-оттаивания (способ 3) все составы содержали больше видимых частиц, чем в T0. Среди трех составов какое-либо отличие отсутствовало.

### Внешний вид – 2-ой этап

5 Результаты второго этапа анализов внешнего вида показаны в таблице 23 ниже.

Таблица 16

<u>Образец</u>	<u>T0</u>	<u>Холодильная камера</u>		
		<u>1 FT</u>	<u>3 FT</u>	<u>5 FT</u>
P60	Бесцветный, слегка опалесцирующий, немного видимых частиц	Бесцветный, слегка опалесцирующий, небольшое количество видимых частиц (больше, чем в T0)	Бесцветный, слегка опалесцирующий, больше видимых частиц	Бесцветный, опалесцирующий, большое количество видимых частиц белка
C60				Бесцветный, слегка опалесцирующий, небольшое количество видимых частиц (по сравнению с 3 FT)
CP60				Бесцветный, слегка опалесцирующий, небольшое количество видимых частиц (по сравнению с 3 FT)
Буферы (P60, C60 и CP60)	Бесцветный, прозрачный, не содержащий видимые частицы			

На 2-ом этапе исследования с медленным замораживанием-оттаиванием (способ 3) осуществляли большее количество циклов FT, чем на первом этапе.

10 Появилось большое количество видимых частиц в P60 после 5 FT по сравнению с T0, тогда как небольшое количество частиц наблюдали и в C60, и в CP60.

Концентрация и ферментативная активность, определенная с использованием 4-MUG в качестве субстрата

Результаты измерений концентрации и активности фермента с использованием 4-MUG в качестве субстрата показаны в таблице 17 (способы 1-2 и первый этап способа 3) и в таблице 18 (второй этап способа 3) ниже.

Таблица 17

Название образца	T0		Холодильная камера		Контейнер Mr. Frosty		Лиофилизатор	
			5 FT		5 FT		5 FT	
	Конц., мг/мл	Активность, ед/л	Конц., мг/мл	Активность, ед/л	Конц., мг/мл	Активность, ед/л	Конц., мг/мл	Активность, ед/л
P60	3,33	18711,6	3,09	17338,9	3,23	18145,9	2,77	15840,0
S60	3,45	19353,9	3,27	18335,3	3,35	18803,1	3,37	19565,6
CP60	3,32	18659,8	3,34	18748,2	3,23	18106,9	3,01	17349,1

5

Таблица 18

Название образца	Лиофилизатор							
	T0		1FT		3FT		5FT	
	Конц., мг/мл	Активность, ед/л						
P60	3,09	17252,8	2,51	13954,9	1,45	7925,3	0,96	4973,7
S60	2,98	16608,8	3,36	18816,8	3,06	16931,2	3,80	20606,3
CP60	2,97	16561,6	2,93	16375,3	2,76	15261,8	0,99	5157,5

После 5 циклов быстрого замораживания-оттаивания (способ 1) наблюдали небольшое снижение концентрации фермента, определенной с использованием 4-MUG в качестве субстрата, в P60 при сравнении с образцом T0, тогда как какого-либо значительного отличия в S60 и CP60 не выявляли.

10

После 5 циклов медленного замораживания-оттаивания с использованием контейнера Frosty (способ 2) какого-либо значительно различия в любом из 3-х составов по сравнению с образцами T0 не наблюдали.

После 3 циклов медленного замораживания-оттаивания с использованием лиофилизатора (способ 3) наблюдали отчетливое снижение концентрации фермента как в P60, так и в CP60, но в C60 отсутствовало значительно изменение при сравнении с T0. Замораживание-оттаивание с помощью способа 3 повторяли с 5 циклами и выявляли такую же тенденцию. Концентрация фермента в образцах P60 падала на 18,8% после 1 цикла F/T и ухудшалась после 3 циклов (снижение на 53,1%) и 5 циклов (снижение на 68,9%). В CP60 концентрация фермента начинала падать после 3 циклов, и в конечном итоге снижалась до такого же уровня, что и в P60, после 5 циклов. В C60 практически отсутствовали изменения после 5 циклов медленного замораживания-оттаивания.

15 Результаты анализа концентрации фермента, определенной с использованием 4-MUG в качестве субстрата, показали, что скорость замораживания/нагрева, количество циклов F/T и тип буфера могут влиять на стабильность ATB200. Система на основе цитратного буфера (C60) обеспечивала приемлемый стабилизирующий эффект независимо от используемого способа  
20 замораживания-оттаивания.

Тенденция к изменению ферментативной активности в отношении 4-MUG являлась такой же как для концентрации фермента, определенной по 4-MUG в качестве субстрата.

Во время исследования с быстрым замораживанием-оттаиванием (способ 1)  
25 происходило небольшое снижение ферментативной активности в P60 после 5 циклов, в C60 и CP60 значительного изменения не выявляли.

Явного изменения в каком-либо образце во время исследования при медленном замораживании-оттаивании при изменении температуры 1°C/мин (способ 2) не выявляли.

В исследовании с медленным замораживанием-оттаиванием с помощью лиофилизатора (способ 3) ферментативная активность в P60 характеризовалась явным снижением и в CP60 характеризовалась небольшим снижением. Однако в C60 изменения практически отсутствовали. Во время 2-го этапа исследования с медленным замораживанием-оттаиванием согласно способу 3 ферментативная активность в P60 снижалась на 19,1% после 1 цикла, на 54,1% после 3 циклов и 71,2% после 5 циклов. В CP60 ферментативная активность начинала падать после 3 циклов, падала до аналогичного с P60 уровня после 5 циклов. В C60 после 5 циклов изменение было несущественным.

#### Чистота: SEC-HPLC

Результаты измерений чистоты показаны ниже в таблице 20 (способы 1-2 и первый этап способа 3) и таблице 21 (второй этап способа 3).

Таблица 20

Образец	SEC	T0	Холодильная камера			Контейнер Mr. Frosty			Лиофилизатор	
			1 FT	3 FT	5 FT	1 FT	3 FT	5 FT	1 FT	3 FT
P60	% мономеров	99,7	99,7	99,6	99,5	99,7	99,7	99,7	93,4	92,1
	HMW, %	0,2	0,2	0,2	0,2	0,3	0,2	0,2	5,8	7,6
	LMW, %	0,0	0,2	0,2	0,3	0,1	0,1	0,1	0,9	0,3
C60	% мономеров	99,8	99,9	99,9	99,9	99,8	99,8	99,8	99,7	99,9
	HMW, %	0,2	0,2	0,1	0,1	0,2	0,2	0,2	0,2	0,1

	LMW, %	Н. о.	0,2	Н. о.						
CP60	% мономеров	99,8	99,7	99,7	99,7	99,8	99,8	99,8	99,6	99,9
	HMW, %	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,1
	LMW, %	Н. о.	0,1	0,1	0,1	Н. о.	Н. о.	Н. о.	0,2	Н. о.

Таблица 21

Название образца	SEC	T0	Лиофилизатор		
			1 FT	3 FT	5 FT
P60	% мономеров	99,8	87,8	54,4	31,8
	HMW, %	0,2	12,2	45,6	68,2
	LMW, %	Н. о.	Н. о.	0,1	<0,1
C60	% мономеров	99,8	99,8	99,8	99,7
	HMW, %	0,2	0,2	0,2	0,3
	LMW, %	Н. о.	Н. о.	Н. о.	Н. о.
CP60	% мономеров	99,8	99,6	98,3	31,3
	HMW, %	0,2	0,4	1,7	68,7
	LMW, %	Н. о.	Н. о.	<0,1	<0,1

В каком-либо образце изменения в процентном содержании мономеров согласно SEC не выявляли после не более чем 5 циклов быстрого F/T (способ 1) или медленного F/T (способ 2).

В первом исследовании быстрого F/T (способ 3) образцы P60 показали явное снижение процентного содержания мономеров согласно SEC (в основном вследствие образования форм с HMW) после 3 циклов. При этом явного изменения не произошло в C60 и CP60. Во 2-ом исследовании с медленным F/T согласно способу 3 (0,5°C/мин) процентное содержание мономеров в образцах P60 начинало падать после 1 цикла и в конечном итоге падало на 68,1% после 5

циклов. И в СР60 процентное содержание мономеров начинало падать после 3 циклов, но в гораздо меньшей степени, чем в Р60; однако оно достигало того же уровня как и в Р60 после 5 циклов. Изменение в процентном содержании мономеров в С60 после не более чем 5 циклов отсутствовало.

- 5 Результаты чистоты согласно SEC соответствовали показателя концентрации и активности фермента, подтверждая, что скорость замораживания/нагревания, количество циклов F/T и тип буфера могут влиять на стабильность АТВ200 в ходе процесса замораживания-оттаивания. С учетом результатов SEC сделали заключение, что буферы, содержащие фосфат натрия, также не защищали
- 10 АТВ200 в ходе циклов замораживания-оттаивания.

#### Сводная информация

- АТВ200, составленная в цитратном буфере (С60), выдерживала множество циклов замораживания-оттаивания в лучшей степени, чем два других буфера (Р60 и СР60). Независимо от способа замораживания-оттаивания АТВ200
- 15 оставалась стабильной в цитратном буфере.

#### ПРИМЕР СОСТАВА 3. ВСПОМОГАТЕЛЬНОЕ ВЕЩЕСТВО

- Готовили восемь составов (Е1-8) с использованием разных вспомогательных веществ. Концентрация фермента АТВ200 в оценочном исследовании вспомогательного вещества составляла 5 мг/мл. Три буфера, два стабилизатора и
- 20 одно поверхностно-активное вещество выбирали для оценки стабильности белка в составах, описанных в таблице 22 ниже.

Таблица 22

Образец	Буфер	Показатель рН	NaCl	Трегалоза	Маннит	Полисорбат 80
Е1	25 мМ фосфатный	6,0	50 мМ	2%	/	0,05%
Е2				/	2%	0,05%
Е3	25 мМ цитратный			2%	/	0,05%
Е4				/	2%	0,05%
Е5	25 мМ фосфатный			/	2%	/

E6	25 мМ цитратный			/	2%	/
E7	25 мМ фосфатно-			2%	/	0,05%
E8	цитратный комбинированный буфер			/	2%	0,05%

### **Подготовка образца**

Отдельно готовили 25 мМ натрий-фосфатный буфер, содержащий 50 мМ NaCl при показателе pH 6,0, 25 мМ натрий-цитратный буфер, содержащий 50 мМ NaCl при показателе pH 6,0, и 25 мМ натрий-фосфатно-цитратный комбинированный буфер, содержащий 50 мМ NaCl при показателе pH 6,0. В ферментном растворе ATB200 буфер заменяли на три буфера с использованием кассеты для диализа. Диализы осуществляли при 5°C с осторожным перемешиванием, при этом в каждом задействовали 3 замены буфера, один раз каждые 6~10 часов.

После диализа трегалозу, маннит или PS80 добавляли в диализат для получения составов, перечисленных в таблице 22. И в конце добавляли соответствующий объем каждого из буферов для составления для доведения конечной концентрации ATB200 до 5 мг/мл. Растворы асептически фильтровали с помощью 0,22-мкм PES-фильтра.

Каждым составом асептически заполняли стеклянные флаконы объемом 2 мл в ламинарном боксе с биологической защитой с объемом заполнения приблизительно 1 мл. Флаконы закрывали пробкой, а затем сразу же после заполнения закатывали.

### **Тестирование образца**

Составы E1-8 тестировали при 4 различных условиях. Флаконы с каждым составом хранили при 5°C в течение 12 недель (12W) и при 40°C в течение 8 недель (8W), подвергали замораживанию-оттаиванию (0,5°C/мин) в течение 5 циклов и встряхивали при 100 об./мин в течение 5 дней при 25°C. План тестирования и отбора образцов описан в таблице 23. Образцы тестировали на

исходном уровне (T0), через 2 недели (2W), 4 недели (4W), 8 недель (8W) и 12 недель (12W).

Таблица 23

Условие обработки	T0	2W	4W	8W	12W
Хранение при 5°C	X	X	X	X	X
Хранение при 40°C		X	X	X	
Замораживание-оттаивание, от -80°C до 25°C в морозильной камере и от -47°C до 25°C с использованием лиофилизатора		1 цикл	3 цикла	5 циклов	
		X	X	X	/
Встряхивание, при 100 об./мин, 25°C	5 дней	/			
	X,(Z)				

X: Анализ внешнего вида

## 5 Результаты

### Внешний вид

Результаты анализов внешнего вида для исследования при замораживании-оттаивании показаны в таблице 24 (с использованием холодильной камеры) и таблице 25 (с использованием лиофилизатора) ниже.

## 10 Таблица 24

	T0	Морозильная камера		
		1FT	3FT	5FT
E1	Бесцветный, слегка опалесцирующий, не содержащий видимых частиц	Бесцветный, слегка опалесцирующий, не содержащий видимых частиц		
E2				
E3				
E4				
E5	опалесцирующий, не содержащий видимых частиц	Бесцветный, слегка опалесцирующий, многочисленные мелкие видимые	Бесцветный, опалесцирующий, многочисленные видимые частицы	Бесцветный, опалесцирующий, многочисленные видимые частицы

		частицы		
E6		Бесцветный, прозрачный, содержащий видимые частицы	Бесцветный, опалесцирующий, многочисленные мелкие видимые частицы	Бесцветный, опалесцирующий, многочисленные мелкие видимые частицы
E7		Бесцветный, слегка опалесцирующий, не содержащий		
E8		видимых частиц		

Таблица 25

	T0	Лиофилизатор		
		1FT	3FT	5FT
E1	Бесцветный, слегка опалесцирующий, содержащий видимых частиц	Бесцветный, слегка опалесцирующий, не содержащий видимых частиц		
E2				
E3				
E4				
E5		Бесцветный, опалесцирующий, многочисленные видимые частицы	Бесцветный, опалесцирующий, многочисленные видимые частицы	Бесцветный, опалесцирующий, многочисленные видимые частицы
E6		Бесцветный, опалесцирующий, многочисленные мелкие видимые частицы	Бесцветный, опалесцирующий, многочисленные мелкие видимые частицы	Бесцветный, опалесцирующий, многочисленные мелкие видимые частицы
E7		Бесцветный, слегка опалесцирующий, не содержащий		
E8				

В ходе исследования при замораживании-оттаивании количество видимых частиц слегка повышалось в F5 и F6, которые не содержали PS80, с увеличением количества циклов замораживания-оттаивания. В других составах отличия отсутствовали.

#### Сводная информация

Составы без PS80 (F5 и F6) не имели таких же эксплуатационных характеристик, как составы с PS80 в исследовании с замораживанием-оттаиванием, о чем свидетельствует образование видимых частиц после нескольких циклов замораживания-оттаивания.

#### 5 ПРИМЕР СОСТАВА 4. ГЕМОЛИЗ В ЦЕЛЬНОЙ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА

Серии разведений крови (1:2, 1:3, 1:4, 1:5 и 1:10) от донора-человека готовили в солевом растворе. При смешивании с деионизированной водой разведение, которое давала в результате OD при 540 нм от 0,8 до 1,2, использовали в анализе и оно называется субстратом крови. Тестировали четыре типа образцов:

10 тестируемый препарат, плацебо, положительный контроль и отрицательный контроль. Тестируемый препарат представлял собой rhGAA АТВ200 в составе с 25 мМ цитратом натрия, 2% маннита и 0,05% полисорбата 80 при показателе рН 6,0. Плацебо было таким же как и тестируемый препарат за исключением того, что в нем отсутствовала rhGAA АТВ200. Положительный контроль препарата

15 представлял собой стерильную воду для инъекций и он имел показатель рН 5. Отрицательный контроль препарата представлял собой солевой раствор (0,9 NaCl) и он имел показатель рН 5.

Тестируемый препарат (АТВ200) при 300, 600 и 1000 мкг/мл с соевым раствором, плацебо с соевым раствором, отрицательный контроль (солевой

20 раствор) и положительный контроль (вода) смешивали с субстратом крови от донора-человека. Образцы инкубировали без встряхивания в течение 1 часа при 37°C. После инкубирования пробирки центрифугировали в течение 10 минут при примерно 100xg при комнатной температуре. Количество гемоглобина в надосадочной жидкости каждого образца анализировали

25 спектрофотометрически при 540 нм.

Процент гемолиза для тестируемого препарата определяли с помощью формулы:

$$\% \text{ гемолиза} = \frac{\text{погл. ТА/плацебо с кровью} - \text{погл. солевого раствора с кровью}}{\text{погл. ТА/плацебо}}$$

Погл. воды с кровью – погл. солевого раствора с кровью

Процент гемолиза воды плюс кровь составляет 100%. Солевой раствор представлял собой отрицательный контроль. Гемолиз, равный или менее 10%, считался незначимым. Процент гемолиза рассчитывали для каждой концентрации тестируемого препарата и для плацебо.

В таблице 26 ниже показаны результаты тестируемых образцов.

Таблица 26

Обработка	Концентрация (мкг/мл)	OD <sub>540</sub> без крови	OD <sub>540</sub> с кровью	% гемолиза*
Солевой раствор <sup>a</sup>	-	-	0,016	-
Вода <sup>b</sup>	-	-	1,002	100
АТВ200	300	0,001	0,016	-0,10
АТВ200	600	0,002	0,003	-1,52
АТВ200	1000	0,003	0,004	-1,52
Плацебо для АТВ200	- <sup>c</sup>	0,000	0,003	-1,32
Плацебо для АТВ200	- <sup>d</sup>	0,000	0,003	-1,32
Плацебо для АТВ200	- <sup>e</sup>	0,003	0,028	0,91

a = отрицательный контроль для гемолиза

10 b = положительный контроль для гемолиза

c = плацебо, разведенное в солевом растворе в том же соотношении, что и 300 мкг/мл тестируемого препарата

d = плацебо, разведенное в солевом растворе в том же соотношении, что и 600 мкг/мл тестируемого препарата

15 e = плацебо, разведенное в солевом растворе в том же соотношении, что и 1000 мкг/мл тестируемого препарата

\* % гемолиза определяли с применением OD воды в качестве положительного контроля

Инкубирование субстрата крови человека с тремя образцами плацебо, разведенными в солевом растворе в том же соотношении, что и дозы трех 5 тестируемых препаратов, не вызывало какого-либо значительного гемолиза крови человека. Процент гемолиза образцов в виде разведенного плацебо рассчитали как составляющий -1,3, -1,3 и 0,9% соответственно. Инкубирование субстрата крови человека с АТВ200 при концентрациях 300, 600 и 1000 мкг/мл не вызывало какого-либо значительного гемолиза крови человека. Процент 10 гемолиза образцов в виде тестируемого препарата рассчитали как составляющий -0,1, -1,5% и -1,5% соответственно.

В заключение состав на основе АТВ200 был совместимым с кровью человека при всех разведениях.

#### 15 ПРИМЕР СОСТАВА 5. ФЛОККУЛЯЦИЯ В ПЛАЗМЕ И СЫВОРОТКЕ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА

Дозированные растворы тестируемого препарата (3 концентрации) и плацебо (3 концентрации) смешивали с равными объемами человеческой плазмы и сыворотки крови от донора. Тестируемый препарат представлял собой rhGAA АТВ200 в составе с 25 мМ цитратом натрия, 2% маннита и 0,05% полисорбата 20 80 при показателе рН 6,0. Плацебо было таким же как и тестируемый препарат за исключением того, что в нем отсутствовала rhGAA АТВ200.

Один мл каждой дозы тестируемого препарата или плацебо смешивали с равным объемом плазмы крови, сыворотки крови и солевого раствора. Образцы инкубировали в течение 30 минут при комнатной температуре. После инкубации 25 пробирки исследовали макроскопически и микроскопически в отношении преципитации или коагуляции. Аликвоту из каждой пробирки центрифугировали при 14000 об./мин в микроцентрифуге в течение 10 минут.

Каждую пробирку исследовали в отношении присутствия или отсутствия осадка. Преципитацию/коагуляцию и осадки оценивали следующим образом:

0 = отрицательный

1 = незначительные преципитация или осаждение

5 2 = минимальные преципитация или осаждение

3 = умеренные преципитация или осаждение

4 = значительные преципитация или осаждение

В таблице 27 ниже показаны результаты тестируемых образцов.

Таблица 27

Обработка	Конечная концентрация (мкг/мл)	Плазма крови			Сыворотка крови			Солевой раствор		
		Макро	Микро	Осадок	Макро	Микро	Осадок	Макро	Микро	Осадок
Плацебо для АТВ200	<sup>a</sup>	0	0	0	0	0	0	-	-	-
Плацебо для АТВ200	<sup>b</sup>	0	0	0	0	0	0	-	-	-
Плацебо для АТВ200	<sup>c</sup>	0	0	0	0	0	0	-	-	-
АТВ200	300	0	0	0	0	0	0	0	0	0
АТВ200	600	0	0	0	0	0	0	0	0	0
АТВ200	1000	0	0	0	0	0	0	0	0	0

10 a = плацебо разводили в солевом растворе в таком же соотношении, как и дозированный раствор тестируемого препарата с конечной концентрацией 300 мкг/мл

b = плацебо разводили в солевом растворе в таком же соотношении, как и дозированный раствор тестируемого препарата с конечной концентрацией

15 600 мкг/мл

с = плацебо разводили в солевом растворе в таком же соотношении, как и дозированный раствор тестируемого препарата с конечной концентрацией 1000 мкг/мл

5 Преципитацию не наблюдали макроскопически или микроскопически в плазме или сыворотке крови человека при смешивании с каждой концентрацией АТВ200. В образцах плацебо преципитацию не выявляли. Когда все образцы плацебо или АТВ200 центрифугировали, осадки не наблюдали.

Исходя из результатов данного исследования, было установлено, что состав на основе АТВ200 является совместимым с плазмой и сывороткой крови человека до конечной концентрации 1000 мкг/мл включительно.

15 ПРИМЕР. ФАРМАКОКИНЕТИЧЕСКИЕ ДАННЫЕ И ДАННЫЕ ПО БЕЗОПАСНОСТИ РЕКОМБИНАНТНОЙ КИСЛОЙ А-ГЛЮКОЗИДАЗЫ АТВ200, ВВОДИМОЙ СОВМЕСТНО С МИГЛУСТАТОМ ПАЦИЕНТАМ, ПОЛУЧАВШИМ ERT, И ПАЦИЕНТАМ, РАНЕЕ НЕ ПОЛУЧАВШИМ ERT, С БОЛЕЗНЬЮ ПОМПЕ

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

В описании ниже «высокая доза» миглустата представляет собой дозу, составляющую приблизительно 260 мг, а «низкая доза» миглустата представляет собой дозу, составляющую приблизительно 130 мг.

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

Оно представляет собой открытое, исследование фазы 1/2 с фиксированной последовательностью приема препаратов с нарастающими дозами, впервые проводимое у человека, для оценки безопасности, переносимости, PK, PD и эффективности внутривенных инфузий АТВ200, вводимой в сочетании с пероральным введением миглустата, у взрослых с болезнью Помпе (фигура 21).  
5 Оценивали средние значения показателей общего белка GAA и PK-данных для миглустата у первых 8 пациентов когорты 1 на протяжении визита 9 и у первых 2 пациентов когорты 3.

<sup>a</sup>Анализировали данные по безопасности от 2 индикаторных пациентов из когорты 1 при каждом уровне дозы перед ведением дозы в когортах 2 и 3.  
10

<sup>b</sup>В ходе стадий 2 и 3 миглустат вводили перорально перед началом внутривенной инфузии АТВ200. Все дозы АТВ200 вводили путем внутривенной инфузии в течение 4 часов.

<sup>c</sup>Первые 2 пациента в когортах 2 и 3 служили в качестве индикаторных пациентов для своих соответствующих когорт.  
15

Ключевые критерии включения:

- мужчины и женщины возрастом 18-65 лет, у которых диагностировали болезни Помпе на основании документально подтвержденного дефицита ферментативной активности GAA или согласно результатам генотипирования GAA.  
20
- Получавшие ERT с использованием алглюкозидазы-альфа в течение 2-6 лет (или  $\geq 2$  лет для когорты 2) до начала испытания (когорты 1).
- В настоящее время получающие алглюкозидазу-альфа с частотой один раз в две недели, которым были осуществлены 2 инфузии без нежелательных явлений, связанных с приемом лекарственного средства, которые приводят к временному прекращению введения доз (когорты 1 и 2)  
25

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

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

- Должны быть прикованы к инвалидной коляске и не способны к ходьбе без посторонней помощи (когорты 2)

РК-анализ:

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

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

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

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

- Показатели концентрации общего белка GAA в плазме крови для 5, 10 и 20 мг/кг АТВ200 определяли посредством валидированного количественного анализа LC-MS/MS rhGAA-специфического «сигнатурного» пептида(пептидов)

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

- Первоначальные пациенты, которых переводили с ERT, являются репрезентативными для группы с болезнью Помпе, с 5,02 года в среднем на ERT (таблица 28)

Таблица 28. Характеристики на исходном уровне

Продолжительность ERT (Lumizyme®/Myozyme®), лет, среднее значение (STDV)	5,02 (1,20)	N/A
Возраст, лет, среднее значение (диапазон)	47,7 (8,19)	33,0 (12,73)
Пол (м/ж), %	80/20	0/100
6MWT, метры, среднее значение (STDV)	398,4 (95,92)	432,1 (67,81)
FVC в положении стоя, среднее значение % от прогнозируемого значения (STDV)	51,9 (13,84)	51,0 (26,87)

6MWT = тест с 6-минутной ходьбой; FVC = форсированная жизненная емкость легких; N/A = нет данных; STDV = стандартное отклонение.

- 5 <sup>a</sup>n=10 из когорты 1 (амбулаторные, переведенные с ERT) промежуточного анализа данных; n = 2 из когорты 3 (не проходившие лечение).

#### Общий белок GAA

При отдельном введении АТВ200 возрастает незначительно сверхпропорционально дозозависимым образом (таблица 29 и фигуры 22А - 10 22D). Изменчивость, очевидно, возрастает с дозой миглустата (фигура 22С). Совместное введение 20 мг/кг АТВ200 с высокой дозой миглустата (260 мг) повышает воздействие на общий белок GAA (AUC) на примерно 25% относительно АТВ200 отдельно при 20 мг/кг. Период полураспределения ( $\alpha$ -фаза) увеличивался на 45%, что позволяет предположить, что высокая доза 15 миглустата стабилизирует АТВ200 в плазме крови. Увеличения периода

полураспределения сопровождается увеличением AUC от времени до максимальной концентрации в плазме крови до примерно 12 часов после введения дозы. Увеличение AUC и периода полувыведения можно наблюдать на логарифмической шкале на протяжении конечной фазы выведения (фигура 22B).

5. ATB200 демонстрировала относительно большой объем распределения. Распределение общего белка GAA в плазме крови выглядит аналогичным между пациентами, ранее не проходивших лечение с помощью ERT (когорта 3), и пациентами, получавшими ERT (когорта 1), (фигуры 22A и 22D).

Таблица 29. Общее количество белка GAA

1	5 мг/кг отдельно <sup>d</sup>	61 (18,1)	3,8 (3,0- 4,0)	215 (16,7)	218 (16,4)	1,9 (16,7)	1,1 (10,2)	2,1 (16,9)	4,62 (12,7)
1	10 мг/кг отдельно <sup>d</sup>	144 (16,6)	4,0 (3,5- 4,0)	578 (20,3)	584 (20,4)	1,6 (46,1)	1,3 (10,5)	1,59 (25,4)	3,87 (16,5)
1	20 мг/кг отдельно <sup>d</sup>	345 (10,1)	4,0 (3,5- 4,0)	1508 (14,5)	1512 (14,4)	2,1 (29,7)	1,5 (6,5)	1,22 (21,7)	3,52 (12,4)
1	ATB200 20 мг/кг + миглустат, SD <sup>d</sup> , низкая доза	334 (16,2)	4,0 (3,5- 4,0)	1694 (17,7)	1701 (17,5)	2,4 (16,6)	1,8 (10,2)	1,09 (22,9)	3,76 (13,3)
1	ATB200 20 мг/кг + миглустат, MD <sup>d</sup> , низкая доза	353 (13,7)	4,0 (3,5- 5,0)	1804 (15,7)	1808 (15,8)	2,5 (8,1)	1,9 (21,8)	1,02 (21,4)	3,73 (12,3)
1	ATB200 20 мг/кг + миглустат, SD <sup>e</sup> , высокая доза	349 (13,9)	4,0 (3,5- 4,0)	1878 (17,5)	1886 (17,5)	2,7 (13,1)	2,3 (18,9)	0,98 (26,5)	3,74 (12,3)
1	ATB200 20 мг/кг + миглустат, MD <sup>d</sup> , высокая доза	356 (20,2)	4,0 (3,5- 4,0)	1886 (21,3)	1901 (21,7)	2,5 (20,5)	2,1 (16,1)	0,98 (27,3)	3,6 (18,7)
3	ATB200 20 мг/кг + миглустат, MD <sup>f</sup> , высокая доза	291 (21,6)	4,3 (4,0- 4,5)	1597 (34,8)	1600 (34,9)	2,4 (5,4)	2 (14,5)	0,69 (28,9)	2,61 (17,3)
3	ATB200 20 мг/кг + миглустат, MD <sup>f</sup> , высокая доза	330 (27,5)	4,0 (4,0- 4,0)	1672 (32,7)	1676 (32,6)	2,6 (8,7)	1,9 (9,0)	0,66 (26,6)	2,33 (23,2)

AUC = площадь под кривой; CL<sub>T</sub> = общее выведение из организма; C<sub>max</sub> = максимальная концентрация лекарственного средства; CV = коэффициент вариальности; MD = многократные дозы; SD = однократная доза; t<sub>1/2</sub> = период полувыведения; t<sub>max</sub> = время до достижения максимальной концентрации лекарственного средства; V<sub>ss</sub> = кажущийся объем распределения в равновесном состоянии.

<sup>a</sup>Среднее геометрическое значение (CV, %), <sup>b</sup>медианное значение (мин. – макс.), <sup>c</sup>среднее арифметическое значение, (CV, %), <sup>d</sup>n = 8, <sup>e</sup>n = 7, <sup>f</sup>n = 2.

PK-данные для миглустата

Миглустат демонстрировал дозопропорциональную зависимость кинетических параметров (таблица 30 и фигура 23). Показатели для миглустата в плазме крови, по-видимому, являются аналогичными между однократной и многократными дозами.

Таблица 30. Сводные фармакокинетические данные для миглустата

SD, низкая доза	1486 (29,9)	3,5 (1,5-3,5)	11 807 (25,6)	12 565 (26,8)	5,6 (11,7)	10,6 (23)	85,8 (23,4)
MD, низкая доза	1518 (27,6)	3,0 (1,5-3,5)	12 254 (26,4)	13 094 (28,3)	5,9 (32,1)	10,2 (23,9)	86,7 (43,9)
SD, высокая доза	3059 (36,1)	3,5 (1,5-5)	23 999 (35)	25 859 (34,4)	5,7 (29,9)	10,6 (33)	86,3 (45,7)
MD, высокая доза	3569 (25,5)	3,0 (1,0-4,0)	24 970 (24,1)	25 972 (23)	5,3 (15,6)	10,3 (26,4)	81 (41,8)
$V_z$ = кажущийся объем распределения в терминальном состоянии, <sup>a</sup> среднее геометрическое значение (CV, %), <sup>b</sup> медианное значение (мин.- макс.), <sup>c</sup> среднее арифметическое значение, (CV, %).							

Фармакодинамика

- 10 На 11 визите у пациентов, получавших ERT, из когорты 1 (фигуры 24A и 24B):
- уровень аланинаминотрансферазы (ALT) снижался у 5 из 8 пациентов; нормализовано у 4/4 пациентов с повышенными исходными уровнями.
  - Уровень аспаратаминотрансферазы (AST) снижался у 6 из 8 пациентов; нормализовался у 3/4 пациентов с повышенными исходными уровнями.
- 15
- Уровень креатинфосфокиназы (СРК) снижался у 6 из 8 пациентов; нормализовался у 2/6 пациентов с повышенными исходными уровнями.
  - Уровни тетрасахарида глюкозы (HEX4) в моче снижались у 8 из 8 пациентов.

К 4 неделе уровни всех 4 биомаркеров снизились у 2 пациентов в когорте, не проходившей лечение (когорта 3), (фигуры 24C и 24D).

На фигурах 24A - 24D данные представлены как среднее значение  $\pm$  стандартное отклонение.

## 5 Безопасность

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

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

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

## Выводы

- АТВ200 отдельно и в комбинации с миглустатом являлся безопасным и хорошо переносимым, при этом до настоящего времени реакции, связанные с инфузией, отсутствовали.

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

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

- 2 исходных пациента, которые не получали лечение, получавшие лечение комбинацией АТВ200/миглустант, демонстрировали устойчивое снижение всех биомаркеров повреждения мышц

### ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

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

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

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

SEQ ID NO: 2 Gln Gln Gly Ala Ser Arg Pro Gly Pro Arg Asp Ala Gln Ala His  
Pro Gly Arg Pro Arg Ala Val Pro Thr Gln Cys Asp Val Pro Pro  
Asn Ser Arg Phe Asp Cys Ala Pro Asp Lys Ala Ile Thr Gln Glu  
Gln Cys Glu Ala Arg Gly Cys Cys Tyr Ile Pro Ala Lys Gln Gly  
Leu Gln Gly Ala Gln Met Gly Gln Pro Trp Cys Phe Phe Pro Pro  
Ser Tyr Pro Ser Tyr Lys Leu Glu Asn Leu Ser Ser Ser Glu Met  
Gly Tyr Thr Ala Thr Leu Thr Arg Thr Thr Pro Thr Phe Phe Pro  
Lys Asp Ile Leu Thr Leu Arg Leu Asp Val Met Met Glu Thr  
Glu Asn Arg Leu His Phe Thr Ile Lys Asp Pro Ala Asn Arg Arg  
Tyr Glu Val Pro Leu Glu Thr Pro Arg Val His Ser Arg Ala Pro  
Ser Pro Leu Tyr Ser Val Glu Phe Ser Glu Glu Pro Phe Gly Val  
Ile Val His Arg Gln Leu Asp Gly Arg Val Leu Leu Asn Thr Thr  
Val Ala Pro Leu Phe Phe Ala Asp Gln Phe Leu Gln Leu Ser Thr  
Ser Leu Pro Ser Gln Tyr Ile Thr Gly Leu Ala Glu His Leu Ser  
Pro Leu Met Leu Ser Thr Ser Trp Thr Arg Ile Thr Leu Trp Asn  
Arg Asp Leu Ala Pro Thr Pro Gly Ala Asn Leu Tyr Gly Ser His  
Pro Phe Tyr Leu Ala Leu Glu Asp Gly Gly Ser Ala His Gly Val  
Phe Leu Leu Asn Ser Asn Ala Met Asp Val Val Leu Gln Pro  
Ser Pro Ala Leu Ser Trp Arg Ser Thr Gly Gly Ile Leu Asp Val  
Tyr Ile Phe Leu Gly Pro Glu Pro Lys Ser Val Val Gln Gln Tyr  
Leu Asp Val Val Gly Tyr Pro Phe Met Pro Pro Tyr Trp Gly Leu

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

## Формула изобретения

1. Фармацевтический состав, содержащий:

(a) популяцию молекул рекомбинантной кислой  $\alpha$ -глюкозидазы человека (rhGAA), где молекулы rhGAA получены в результате экспрессии в клетках яичника китайского хомячка (CHO) и содержат семь потенциальных сайтов N-гликозилирования – первый, второй, третий, четвертый, пятый, шестой и седьмой – в аминокислотах, соответствующих положениям SEQ ID NO: 2: N84, N177, N334, N414, N596, N826 и N869, соответственно, где по меньшей мере 50% молекул rhGAA содержат глика-н, несущий бис-маннозо-6-фосфат (бис-М6P) в первом потенциальном сайте N-гликозилирования, соответствующем положению N84;

(b) по меньшей мере один буфер, выбранный из группы, состоящей из цитрата, фосфата и их комбинаций; и

(c) по меньшей мере одно вспомогательное вещество, выбранное из группы, состоящей из маннита, полисорбата 80 и их комбинаций,

где состав характеризуется показателем pH, составляющим от приблизительно 5,0 до приблизительно 7,0.

2. Фармацевтический состав по п. 1, где молекулы rhGAA присутствуют в концентрации, составляющей от приблизительно 5 мг/мл до приблизительно 50 мг/мл.

3. Фармацевтический состав по п. 2, где молекулы rhGAA присутствуют в концентрации, составляющей приблизительно 15 мг/мл.

4. Фармацевтический состав по п. 1, где состав характеризуется показателем pH, составляющим от приблизительно 5,5 до приблизительно 7,0.

5. Фармацевтический состав по п. 4, где состав характеризуется показателем pH, составляющим приблизительно 6,0.

6. Фармацевтический состав по п. 1, где по меньшей мере один буфер содержит цитрат.

7. Фармацевтический состав по п. 1, где по меньшей мере один буфер содержит калиевую, натриевую или аммониевую соль.

8. Фармацевтический состав по п. 1, где по меньшей мере один буфер содержит цитрат натрия.

9. Фармацевтический состав по п. 1, где по меньшей мере один буфер присутствует в концентрации, составляющей от приблизительно 10 мМ до приблизительно 100 мМ.

10. Фармацевтический состав по п. 9, где по меньшей мере один буфер присутствует в концентрации, составляющей приблизительно 25 мМ.

11. Фармацевтический состав по п. 1, где исключены трегалоза, сахароза, глицин или их комбинации.

12. Фармацевтический состав по п. 1, где по меньшей мере одно вспомогательное вещество представляет собой маннит, который присутствует в концентрации, составляющей от приблизительно 10 мг/мл до приблизительно 50 мг/мл.

13. Фармацевтический состав по п. 1, где по меньшей мере одно вспомогательное вещество представляет собой полисорбат 80, который присутствует в концентрации, составляющей от приблизительно 0,2 мг/мл до приблизительно 0,5 мг/мл.

14. Фармацевтический состав по п. 1, где маннит присутствует в концентрации, составляющей приблизительно 20 мг/мл, и полисорбат 80 присутствует в концентрации, составляющей приблизительно 0,5 мг/мл.

15. Фармацевтический состав по п. 1, дополнительно содержащий

(d) подщелачивающее средство и/или

(e) подкисляющее средство,

где подщелачивающее средство и/или подкисляющее средство присутствуют в количествах, достаточных для поддержания показателя рН фармацевтического состава в диапазоне от приблизительно 5,0 до приблизительно 6,0.

16. Фармацевтический состав по п. 1, где по меньшей мере 75% молекул rhGAA содержат гликан, несущий бис-М6Р в первом потенциальном сайте N-гликозилирования.

17. Фармацевтический состав по п. 1, где молекулы rhGAA содержат по меньшей мере 3 моль М6Р на моль rhGAA и/или по меньшей мере 4 моль сиаловой кислоты на моль rhGAA.

18. Фармацевтический состав по п. 1, где от приблизительно 75% до приблизительно 80% молекул rhGAA содержат гликан, несущий бис-М6Р в первом потенциальном сайте N-гликозилирования, от приблизительно 40% до приблизительно 60% молекул rhGAA содержат гликан, несущий моно-маннозо-6-фосфат (моно-М6Р) во втором потенциальном сайте N-гликозилирования, от приблизительно 40% до приблизительно 60% молекул rhGAA содержат гликан, несущий бис-М6Р в четвертом потенциальном сайте N-гликозилирования, и от приблизительно 25% до приблизительно 40% молекул rhGAA содержат гликан, несущий моно-М6Р в четвертом потенциальном сайте N-гликозилирования.

19. Фармацевтический состав по п. 1, где фармацевтический состав состоит фактически из:

- (a) популяции молекул rhGAA;
- (b) цитрата натрия;
- (c) моногидрата лимонной кислоты;
- (d) маннита;
- (e) полисорбата 80;
- (f) воды;

(g) необязательно подкисляющего средства; и

(h) необязательно подщелачивающего средства,

где состав характеризуется показателем pH, составляющим от приблизительно 5,0 до приблизительно 6,0.

20. Фармацевтический состав по п. 1, где фармацевтический состав состоит фактически из:

(a) популяции молекул rhGAA, присутствующей в концентрации, составляющей приблизительно 15 мг/мл;

(b) натрий-цитратного буфера, присутствующего в концентрации, составляющей приблизительно 25 мМ;

(c) маннита, присутствующего в концентрации, составляющей приблизительно 20 мг/мл;

(d) полисорбата 80, присутствующего в концентрации, составляющей приблизительно 0,5 мг/мл;

(e) воды;

(f) необязательно подкисляющего средства и

(g) необязательно подщелачивающего средства,

где состав характеризуется показателем pH, составляющим от приблизительно 5,0 до приблизительно 6,0.

21. Фармацевтический состав по п. 1, где популяция молекул rhGAA имеют последовательность по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO: 1.

22. Фармацевтический состав по п. 1, где популяция молекул rhGAA имеют последовательность по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98%, или по меньшей мере на 99% идентичную SEQ ID NO: 2.

23. Фармацевтическая композиция, содержащая фармацевтический состав по п. 1, подвергнутый лиофилизации.

24. Способ лечения болезни Помпе, который предусматривает введение пациенту, нуждающемуся в этом, фармацевтического состава по п. 1.

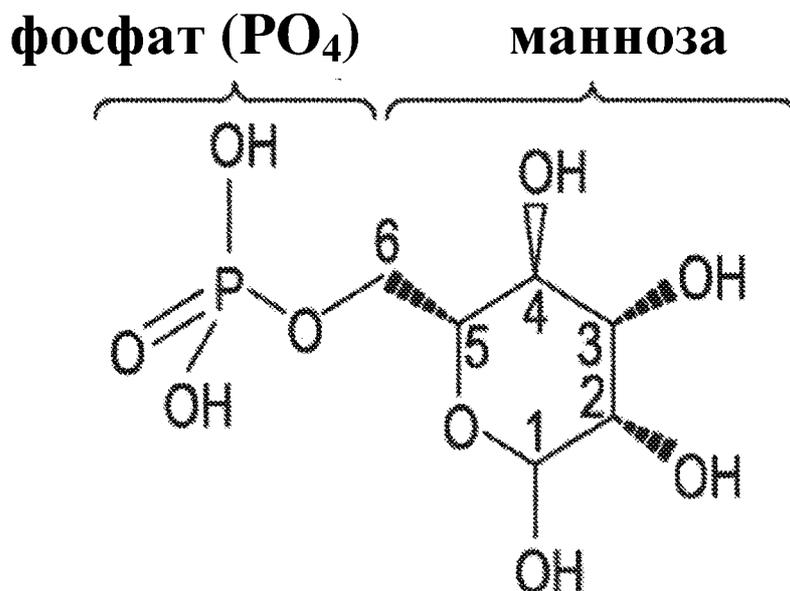
25. Способ по п. 24, дополнительно предусматривающий разведение фармацевтического состава перед введением пациенту.

Структура высокоманнозных и фосфорилированных олигосахаридов и их аффинность связывания с рецепторами



Фиг. 1А

Маннозо-6-фосфат (М6Р)

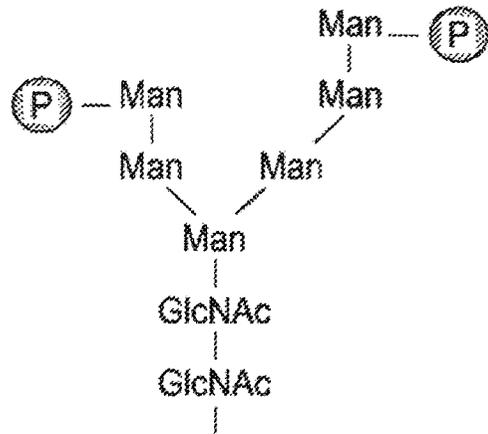


Фиг. 1В

Сравнение продуктивной и непродуктивной направленной доставки к гликан-специфическим рецепторам

**Продуктивная**

*Продуктивная  
направленная доставка*



(N-гликаны, содержащие M6P)

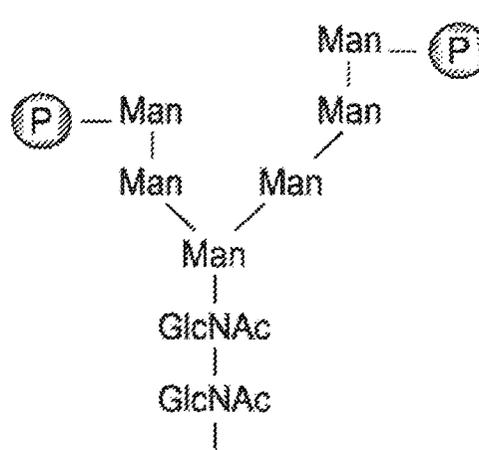


**Целевые ткани**  
(M6P-R; сердце, скелетные  
мышцы, диафрагма и т.п.)

**Фиг. 2А**

**Непродуктивная**

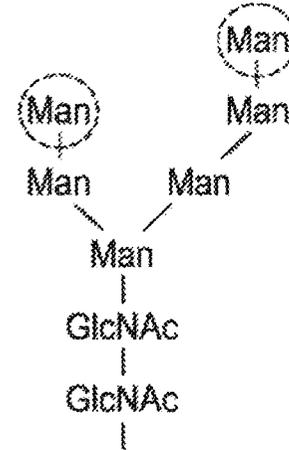
*Непродуктивное выведение  
лекарственного средства*



(N-гликаны, содержащие M6P)



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

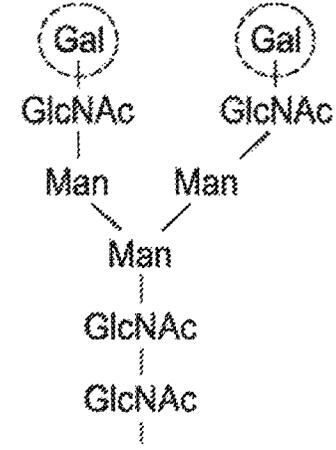


(Высокоманнозные N-гликаны  
без M6P)



**Нецелевые ткани**  
(Маннозные рецепторы;  
печень, селезенка)

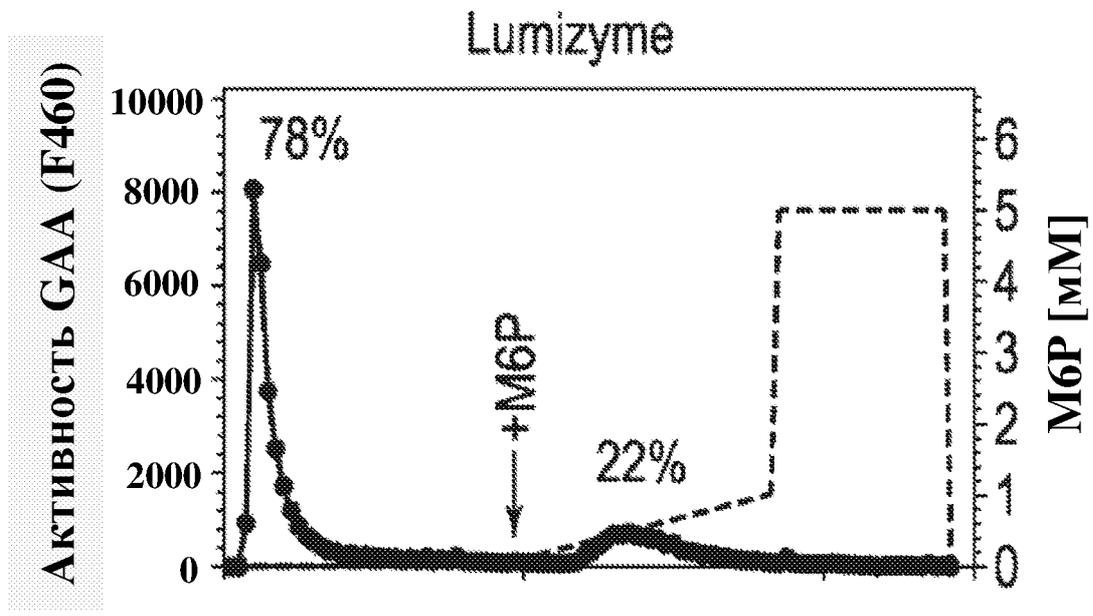
**Фиг. 2В**



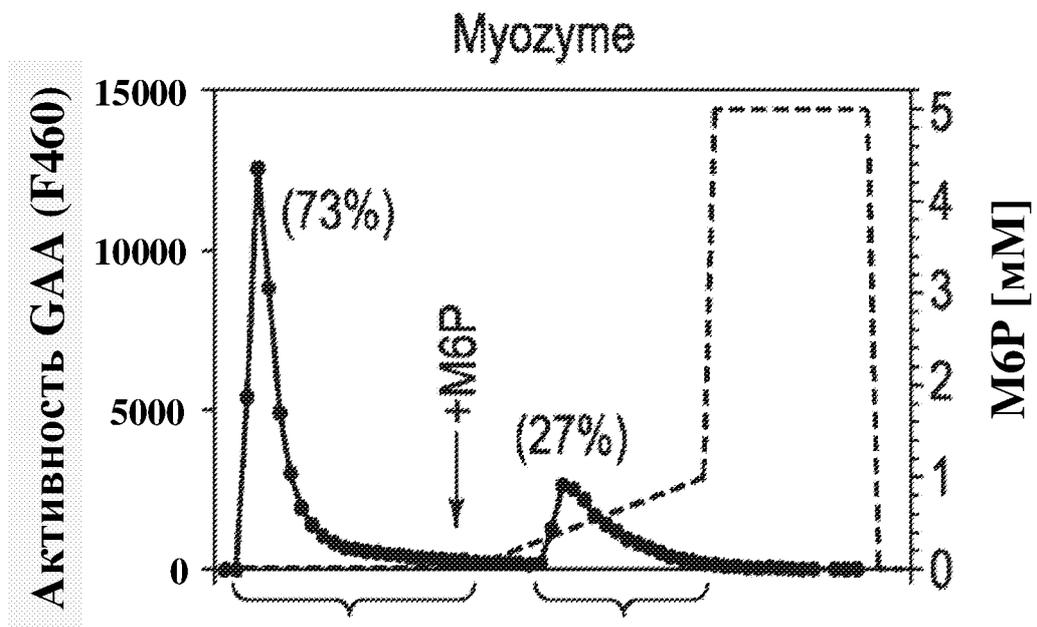
(Асиало-N-гликаны  
комплексного типа)



**Нецелевые ткани**  
(ASGP-R; печень)



Фиг. 3А



rhGAA не содержит М6Р; направленная доставка к лизосомам не происходит

rhGAA содержит М6Р; направленная доставка к лизосомам

Фиг. 3В

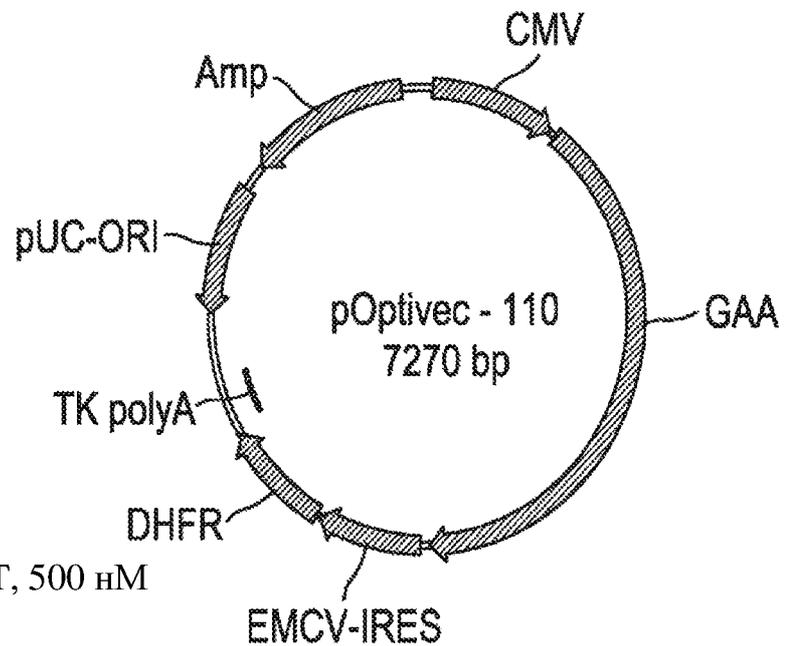
## Векторная конструкция АТВ200

◆ Клетка-хозяин: DG44

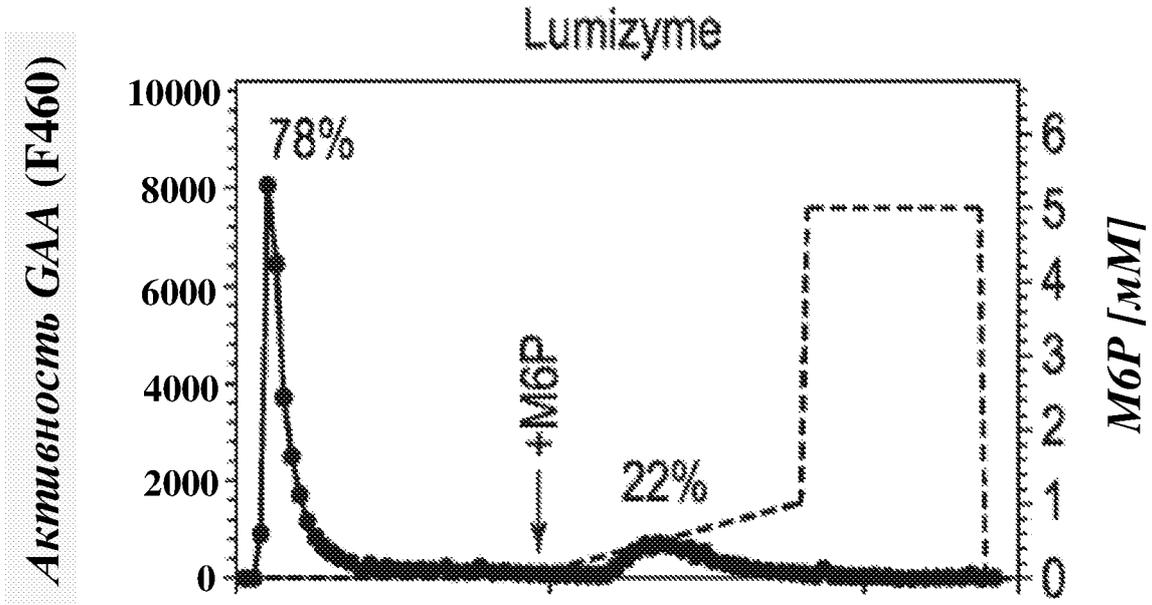
◆ Вектор: pOptivec-110

- Вектор Invitrogen
- 952 аа, нативный  
сигнальный пептид

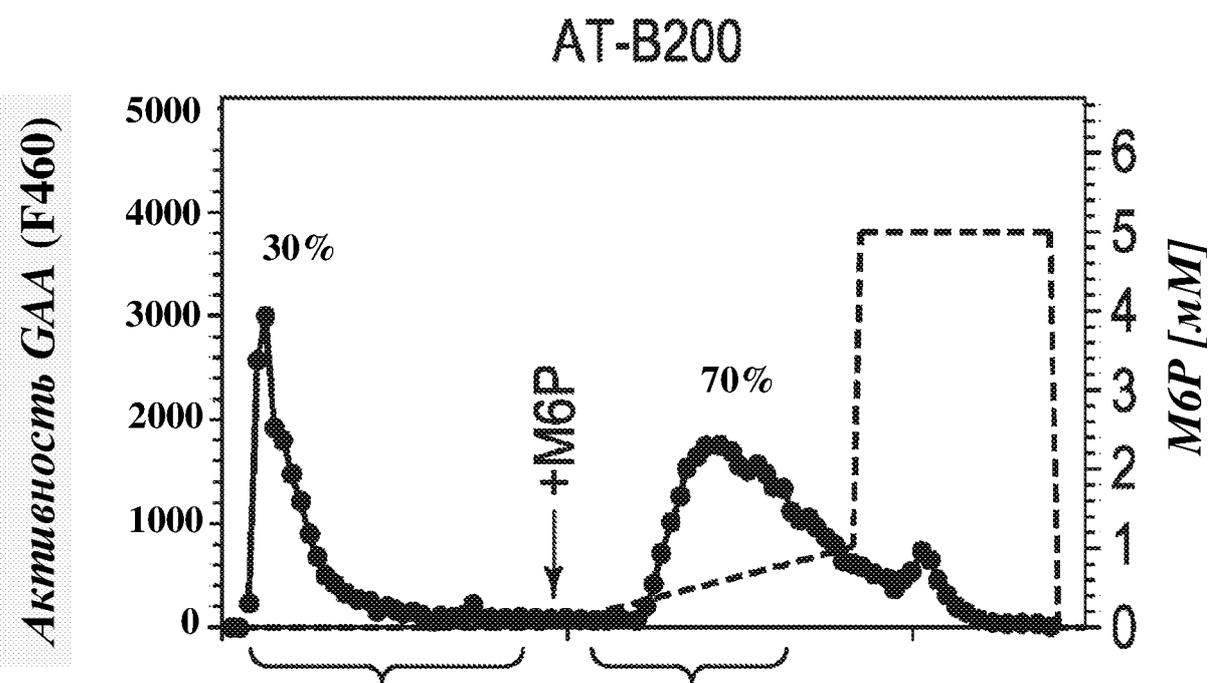
◆ Давление скрининга: -НТ, 500 нМ  
МХТ



Фиг. 4



Фиг. 5А

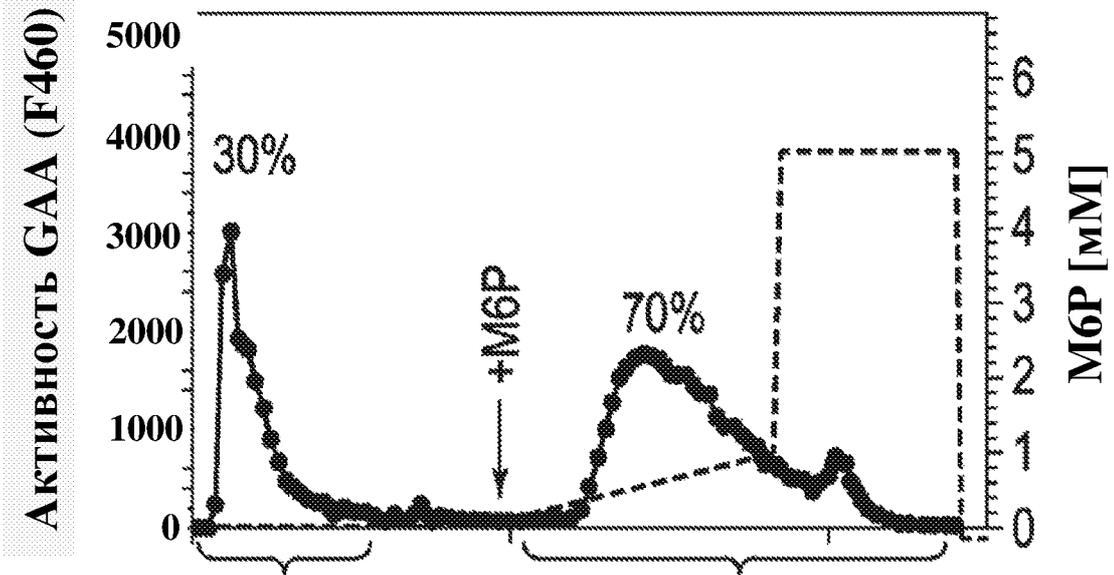


*rhGAA* не содержит М6Р;  
направленная доставка к  
лизосомам  
не происходит

*rhGAA* содержит М6Р;  
направленная доставка к  
лизосомам

Фиг. 5В

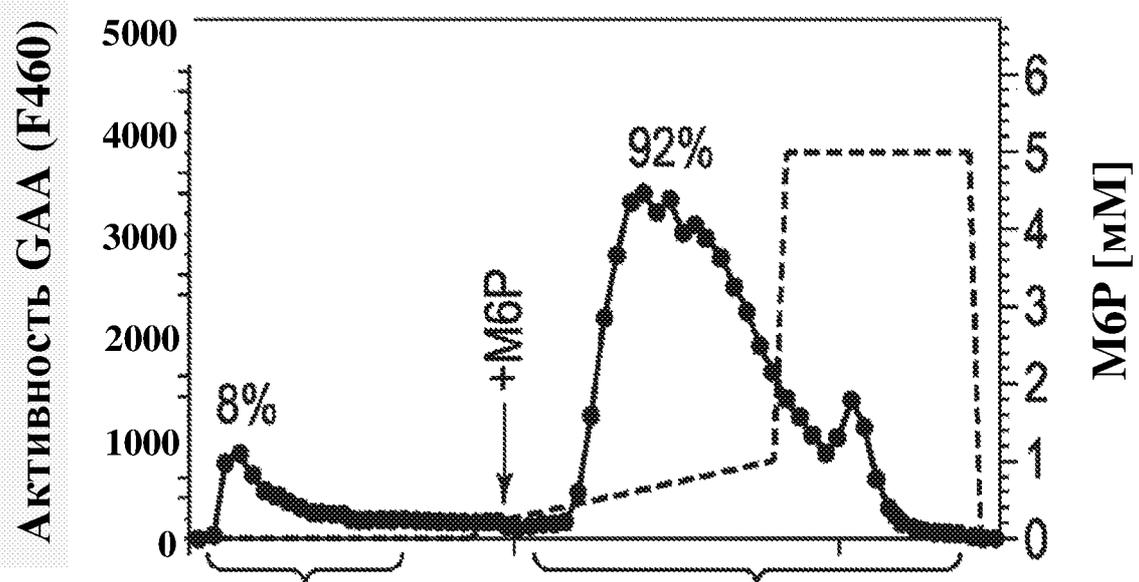
Вариант осуществления 1



rhGAA не содержит M6P;  
направленная доставка к  
лизосомам  
не происходит

rhGAA содержит M6P;  
направленная доставка к  
лизосомам

Вариант осуществления 2

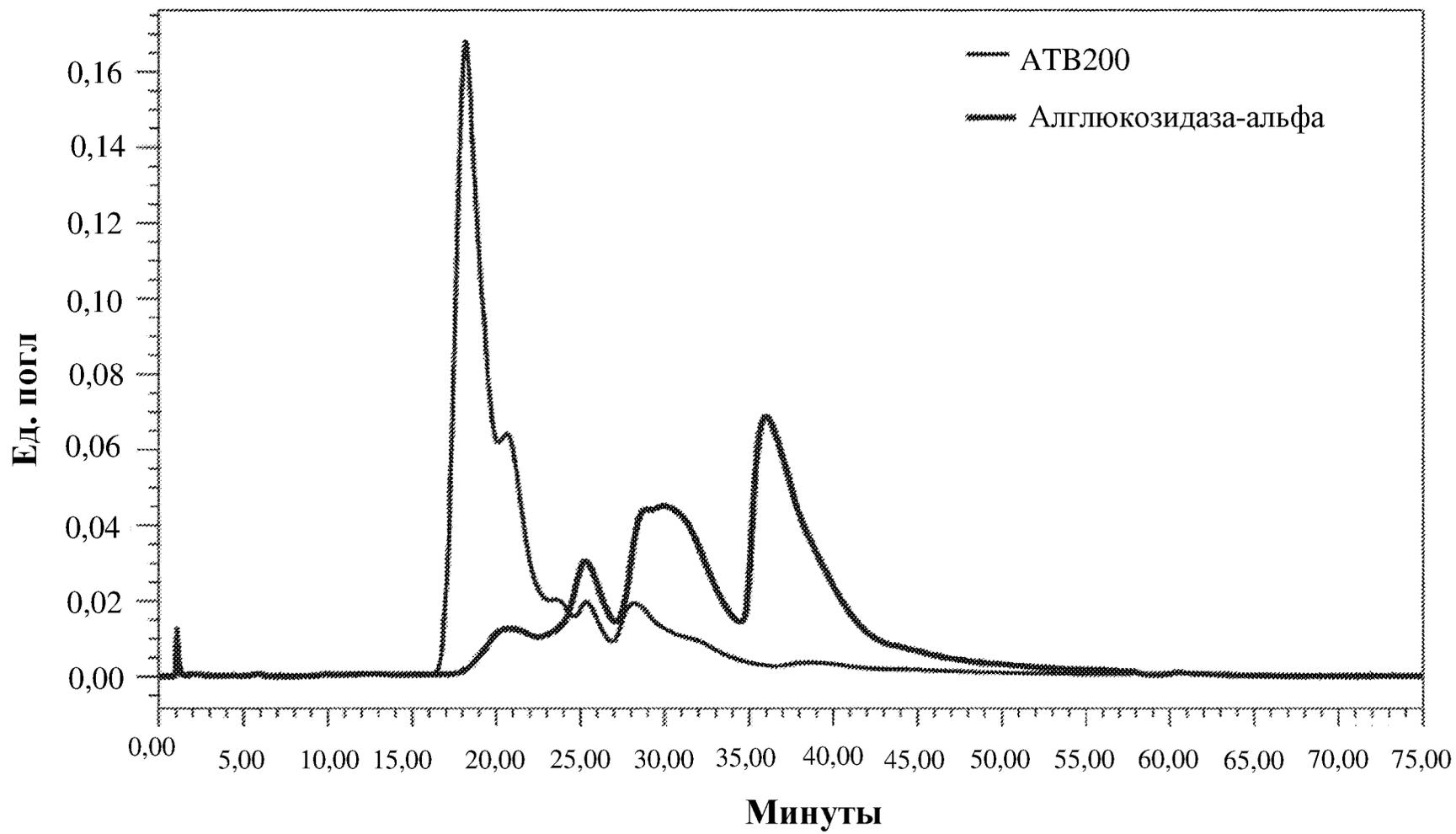


rhGAA не содержит M6P;  
направленная доставка к  
лизосомам  
не происходит

rhGAA содержит M6P;  
направленная доставка к  
лизосомам

Фиг. 6

Фиг. 7

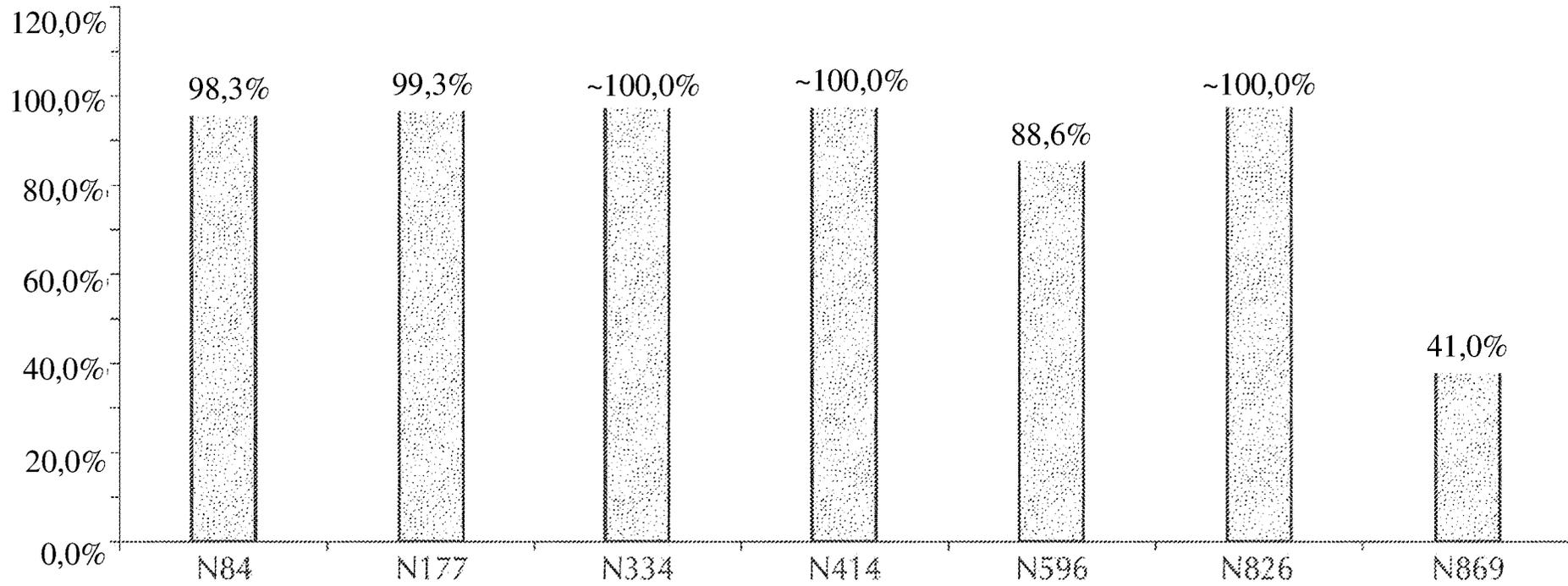


**Распределение N-гликанов в препаратах rhGAA**

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

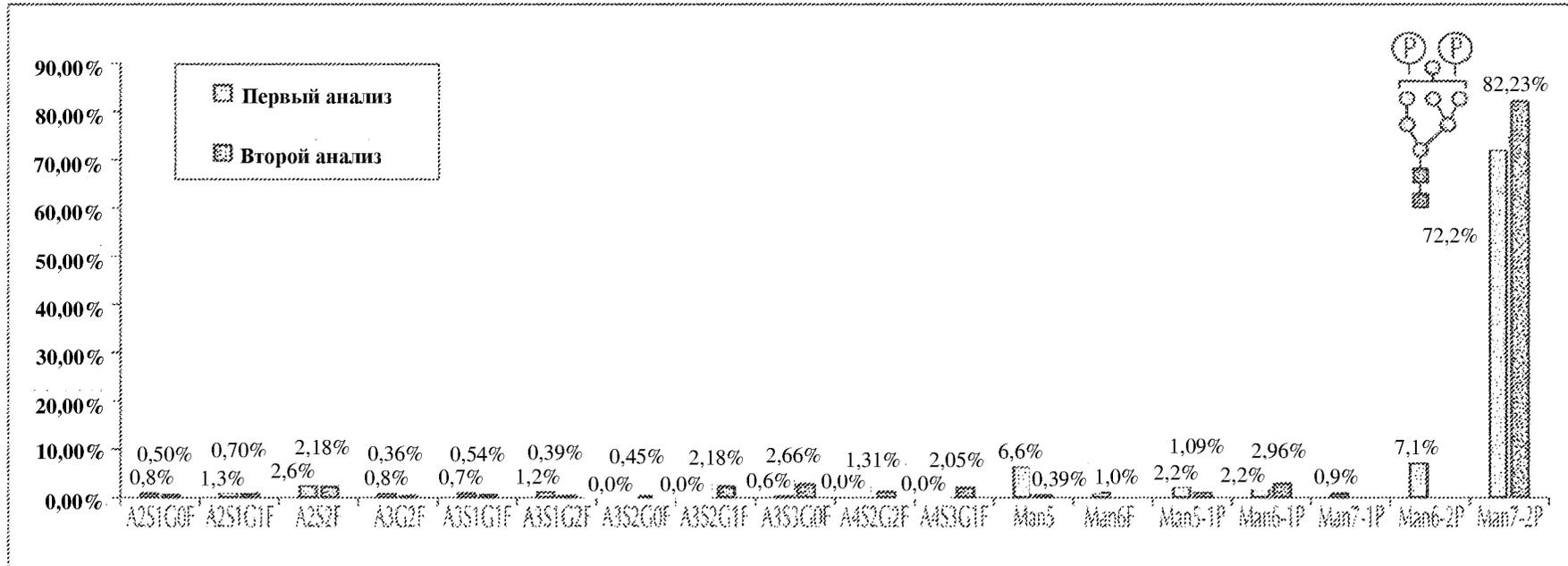
**Фиг. 8**

### Занятость сайтов N-гликозилирования АТВ200



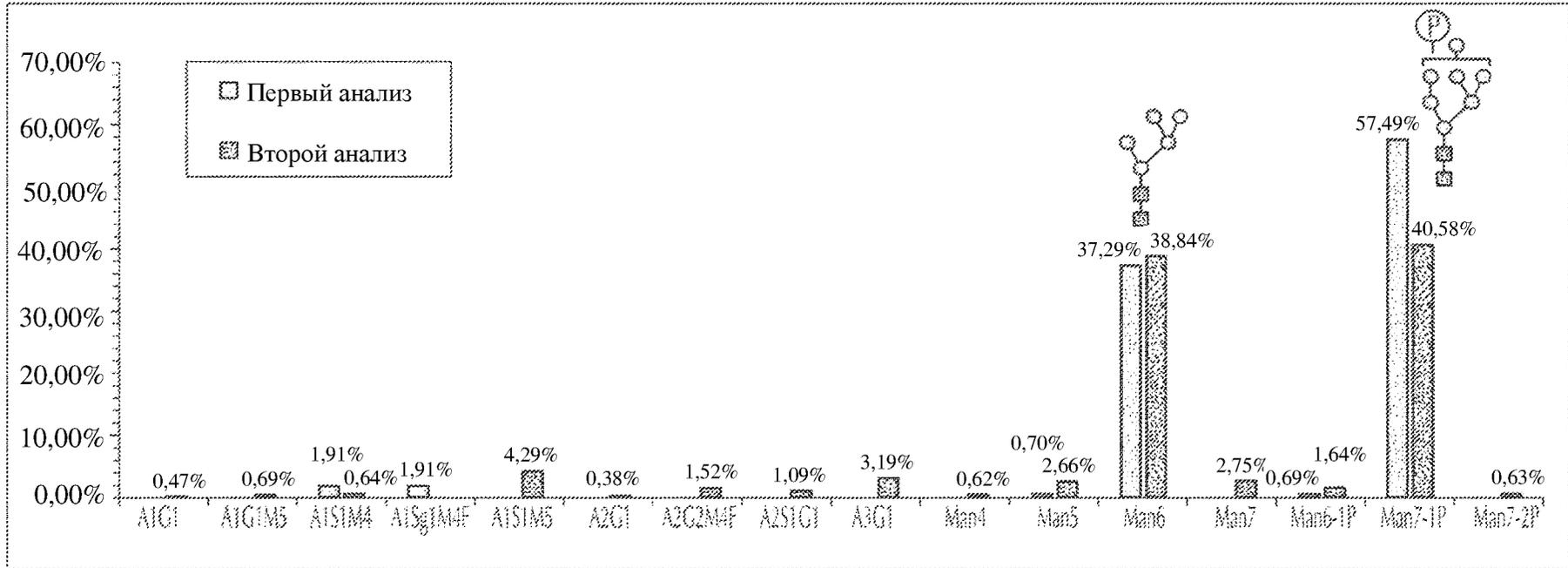
Фиг. 9А

### Профиль N-гликозилирования N84



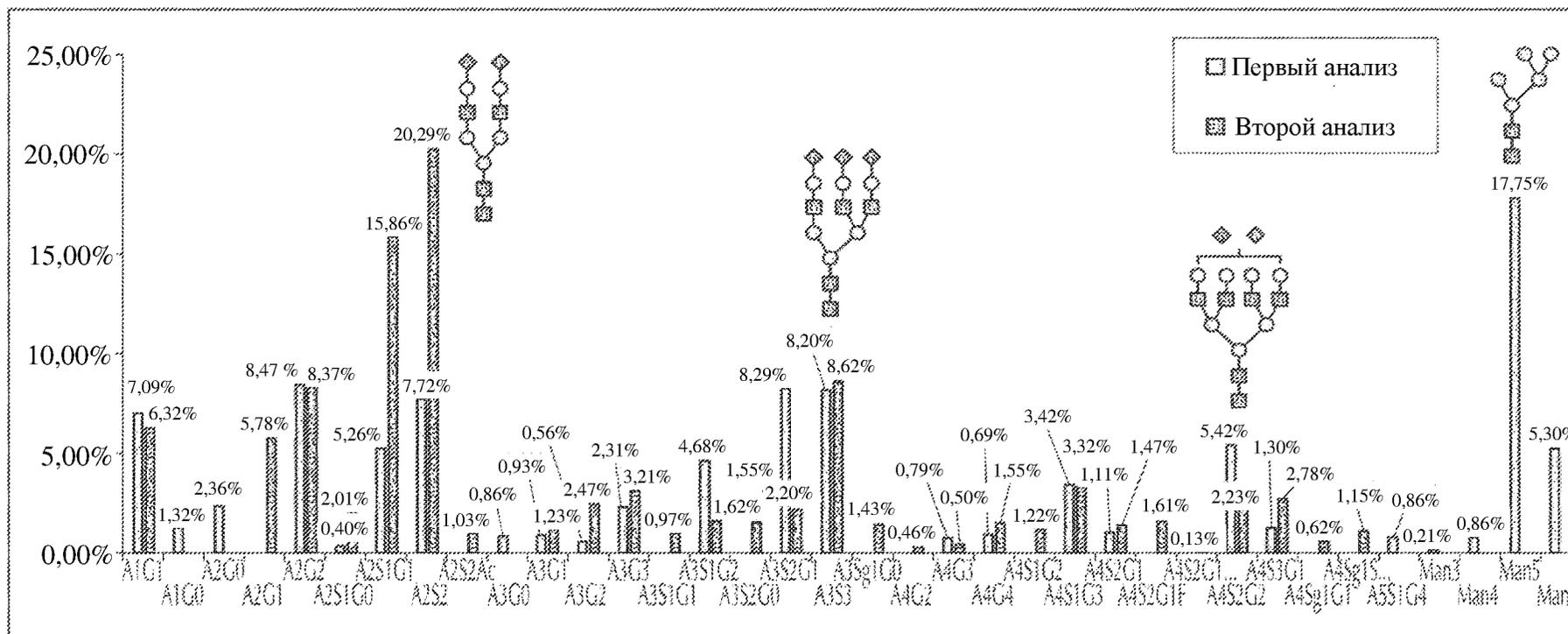
Фиг. 9В

# Профиль N-гликозилирования N177



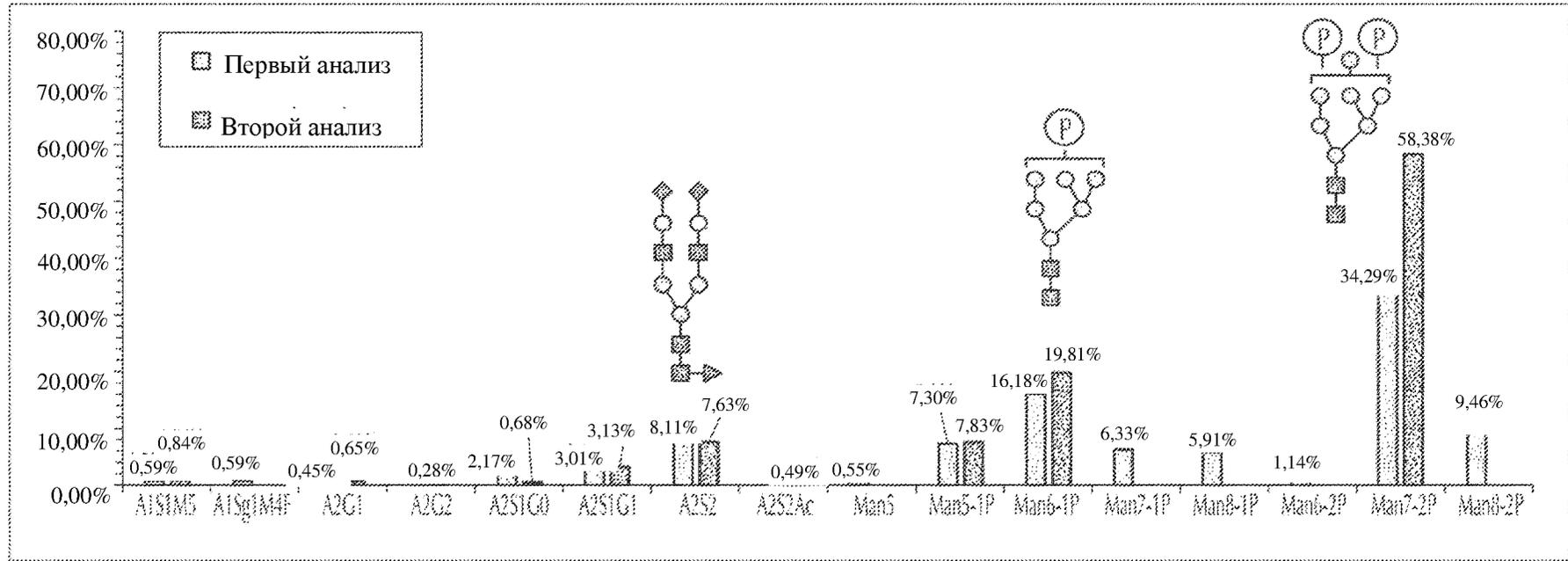
Фиг. 9С

# Профиль N-гликозилирования N334



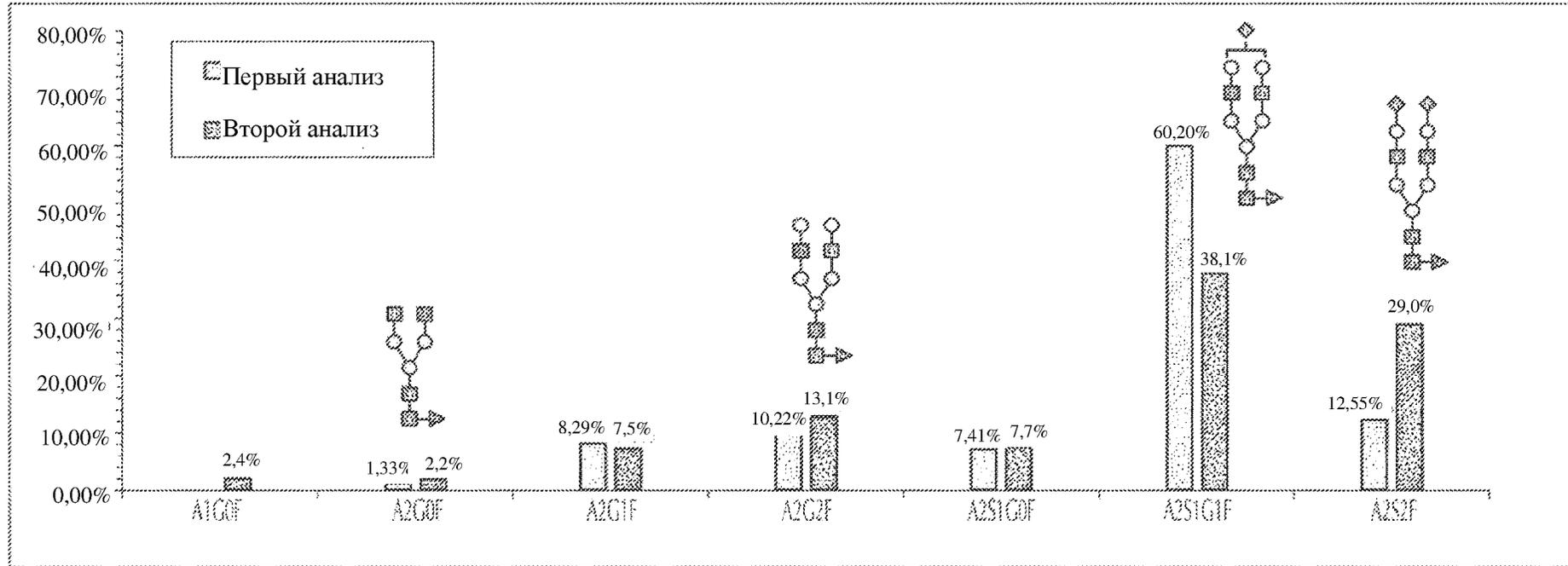
Фиг. 9D

### Профиль N-гликозилирования N414



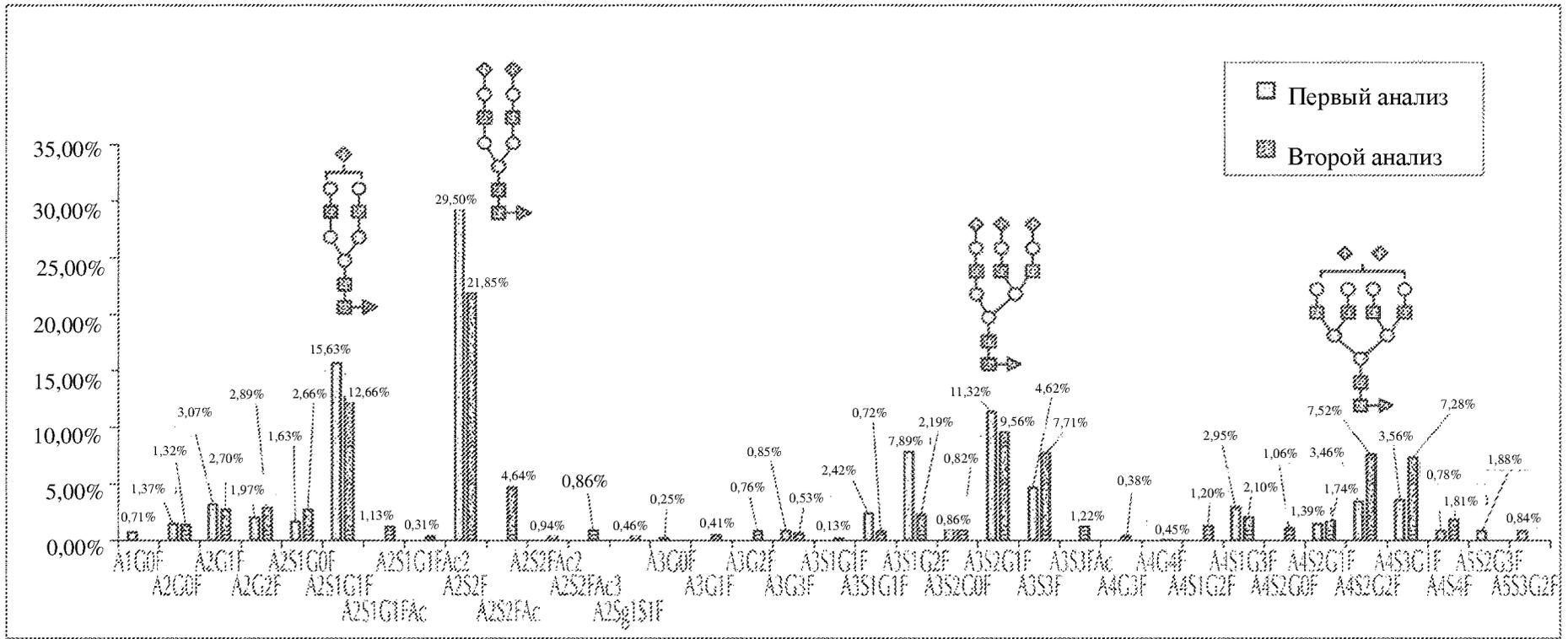
Фиг. 9E

### Профиль N-гликозилирования N596



Фиг. 9F

### Профиль N-гликозилирования N826

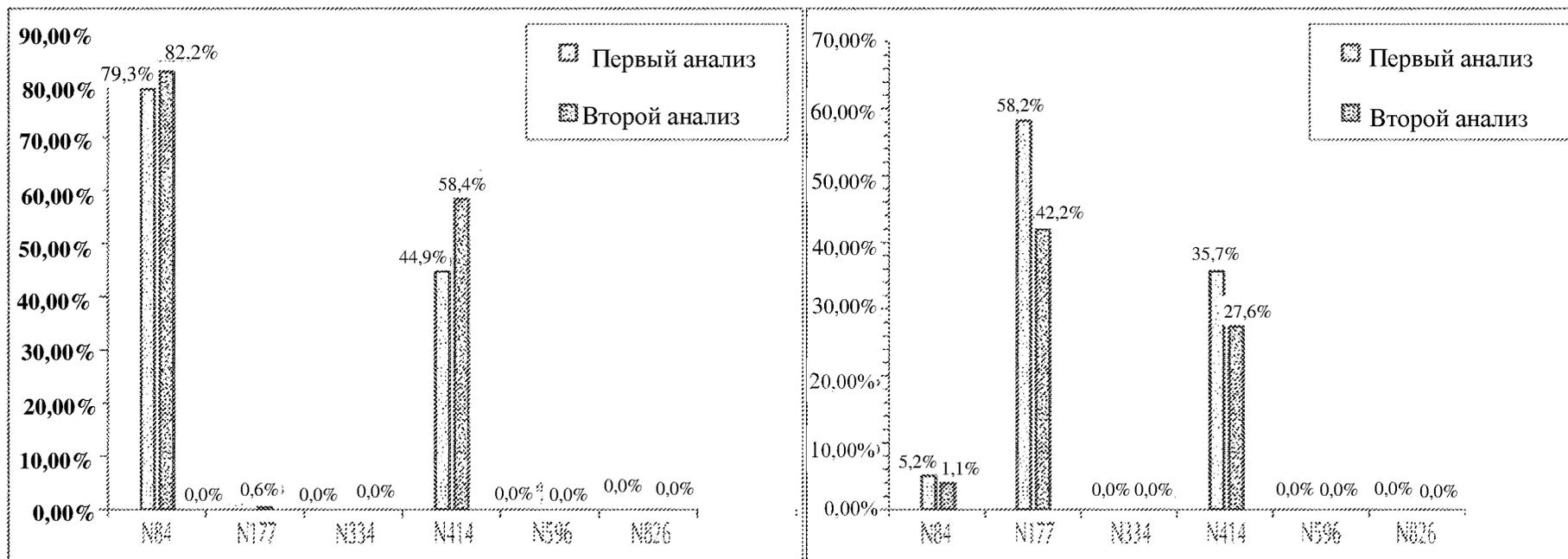


Фиг. 9G

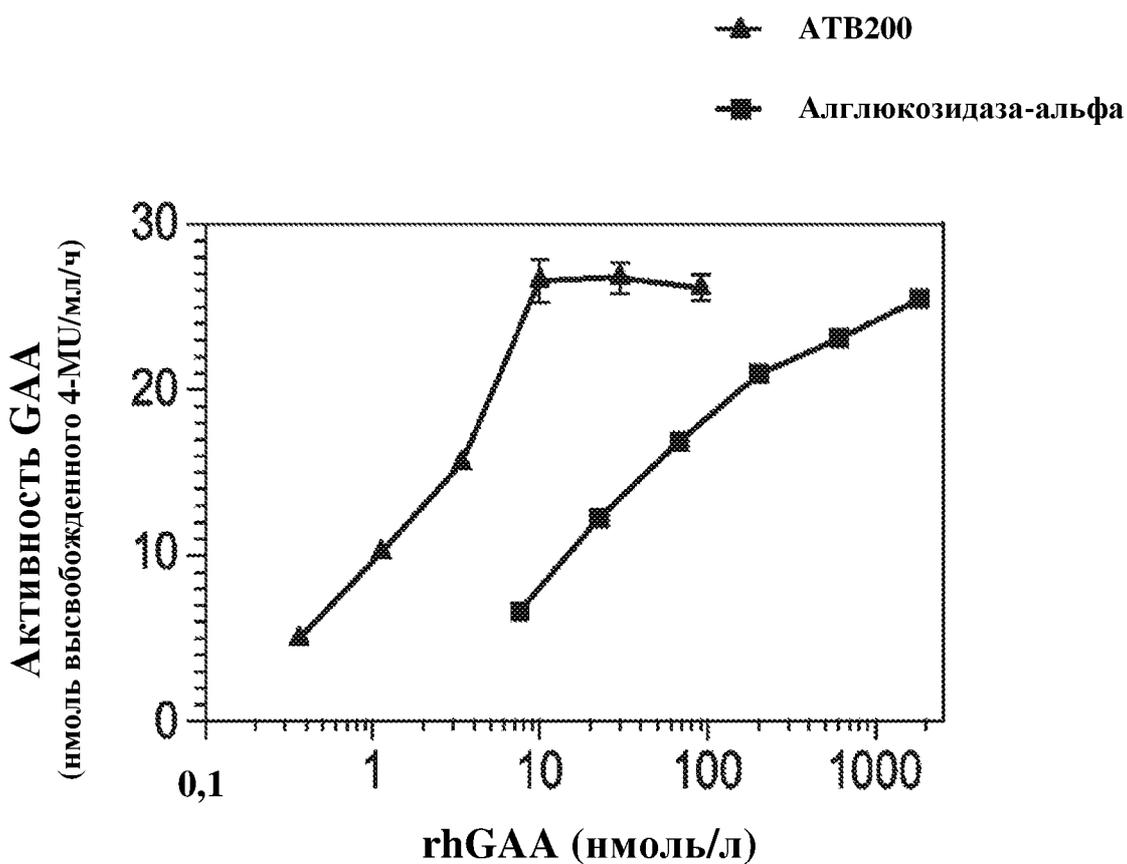
## Относительный процент моно-М6Р и бис-М6Р в каждом сайте N-гликозилирования

Процент бис-М6Р форм в каждом сайте N-гликозилирования

Процент моно-М6Р форм в каждом сайте N-гликозилирования



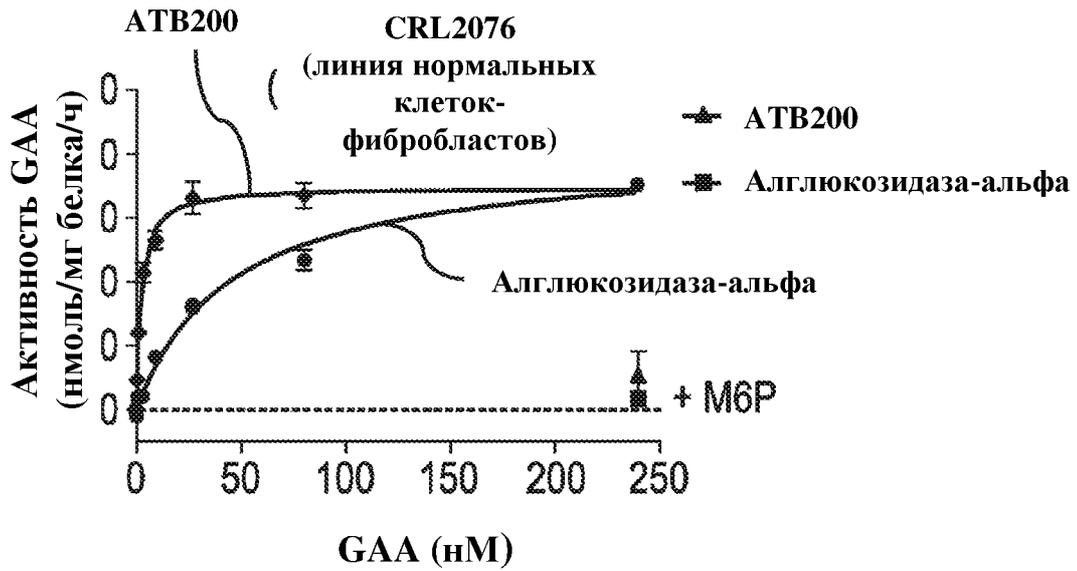
Фиг. 9H



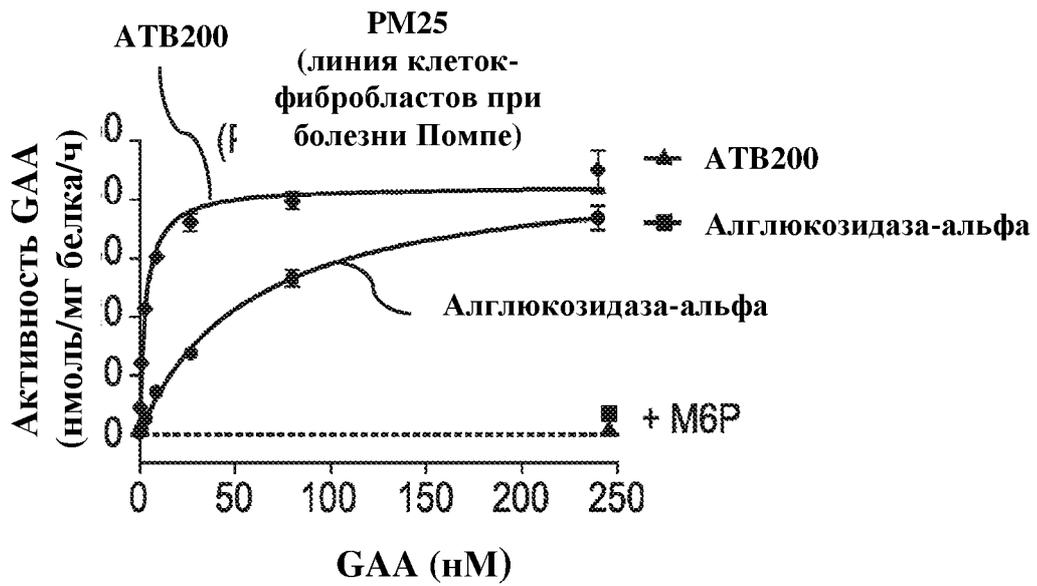
Фиг. 10А

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

Фиг. 10В



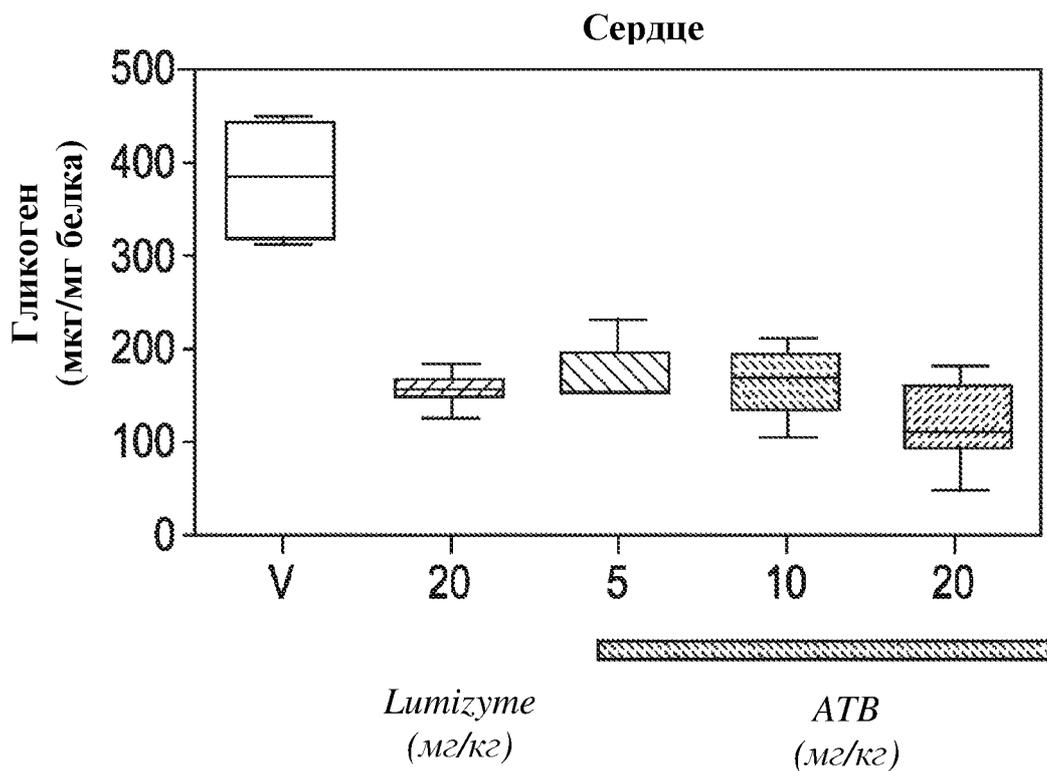
Фиг. 11А



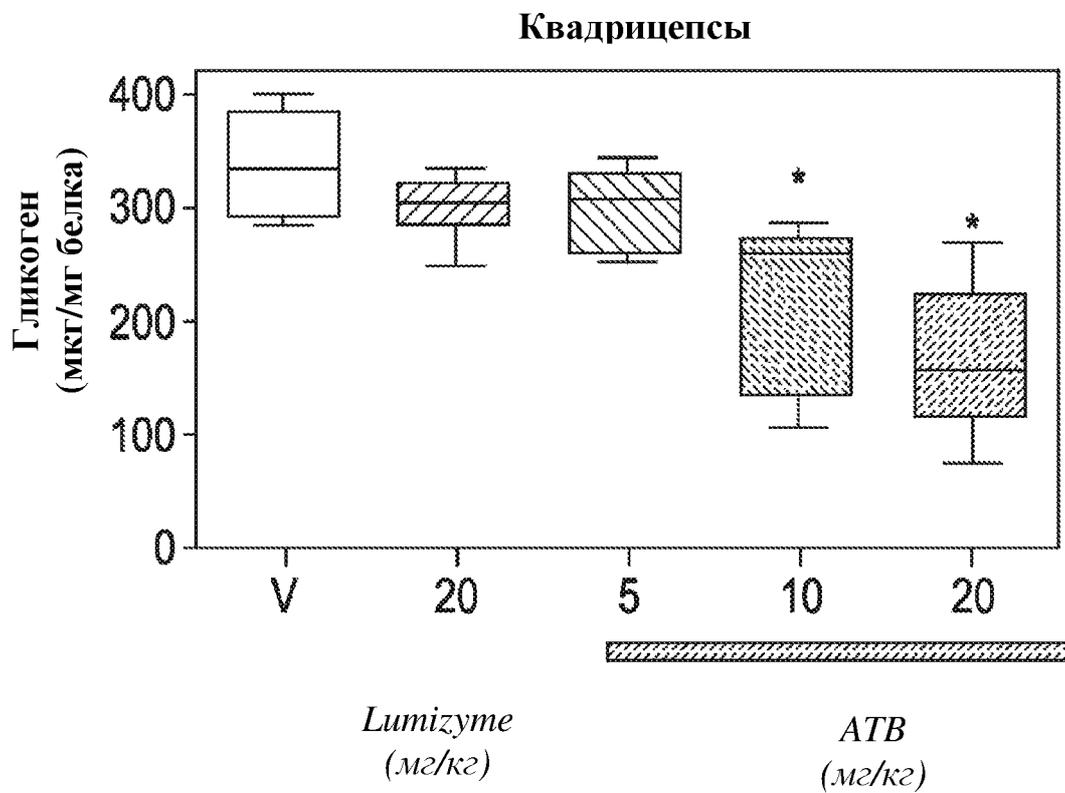
Фиг. 11В

Клеточная линия	K <sub>поглощения</sub> (нМ)	
	AT200	Lumizyme
Нормальная	2	56
Помпе	3	57

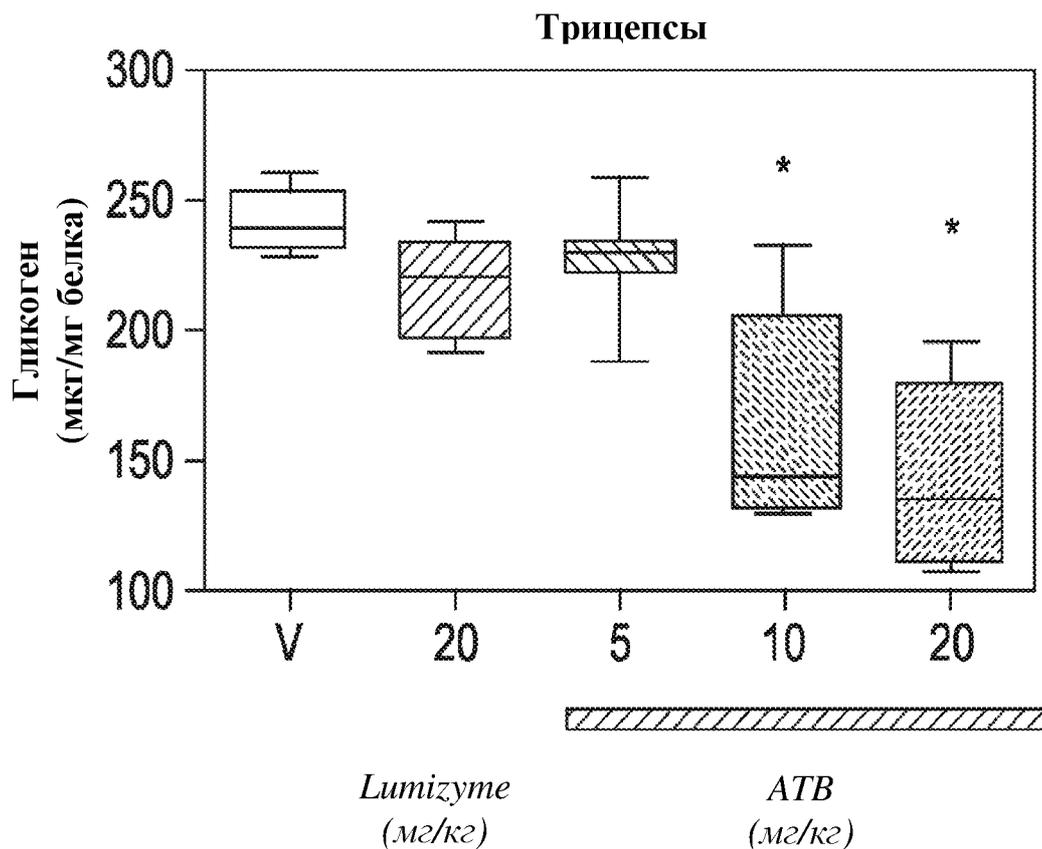
Фиг. 11С



Фиг. 12А



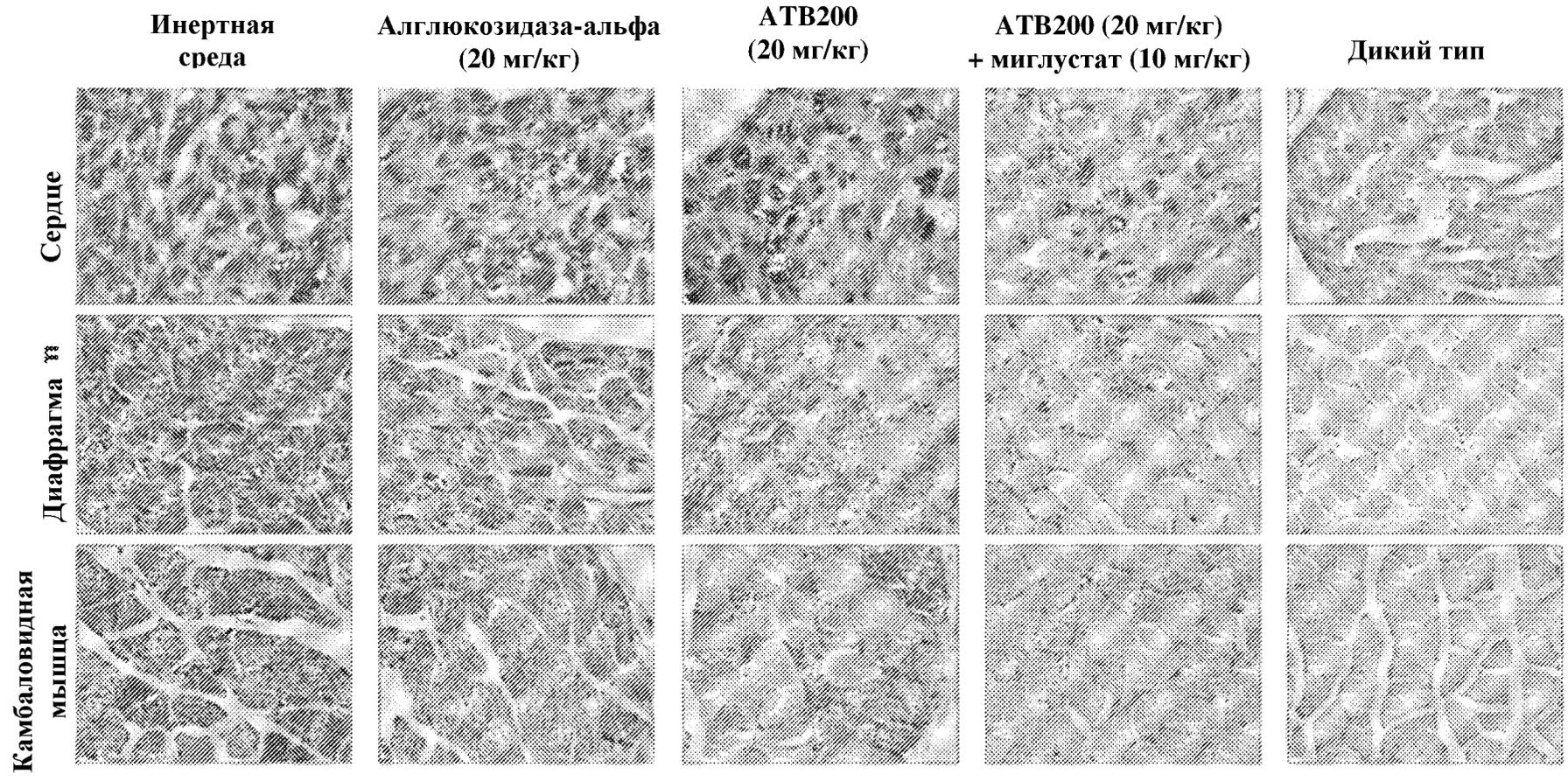
Фиг. 12В



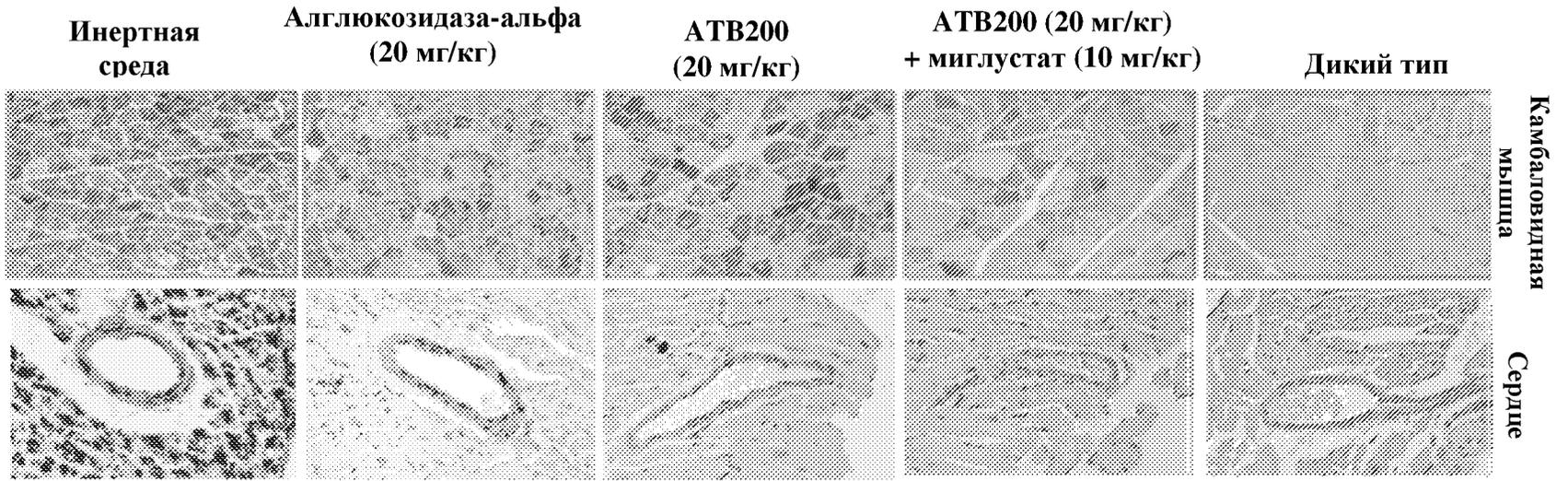
Фиг. 12С

Сравнение % снижения уровня гликогена у мышей с нокаут по Gaa после введения Lumizyme или ATB200 (с миглустатом или без него)		
Фермент ± шаперон	Квадрицепс	Трицепс
Отдельно Lumizyme (20 мг/кг)	14	14
Отдельно ATB200 (20 мг/кг)	74	62
ATB200 + миглустат (20 мг/кг) + (10 мг/кг)	94	73

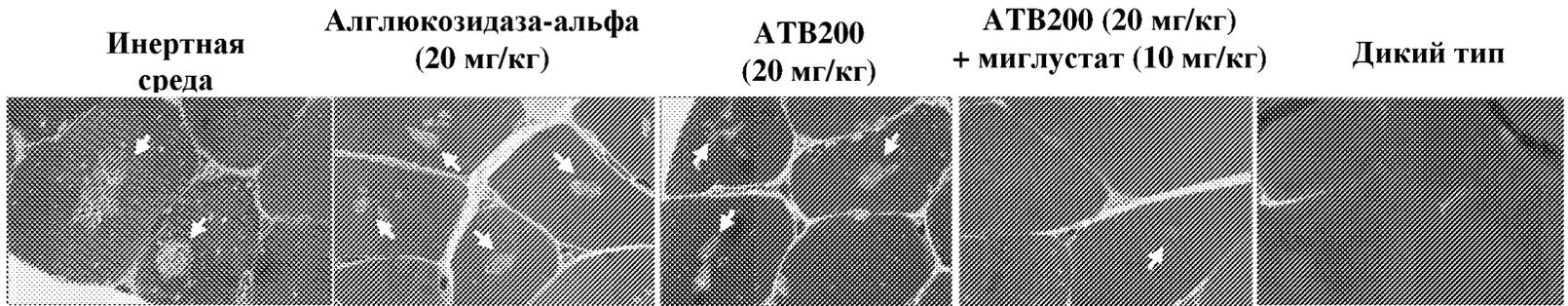
Фиг. 13



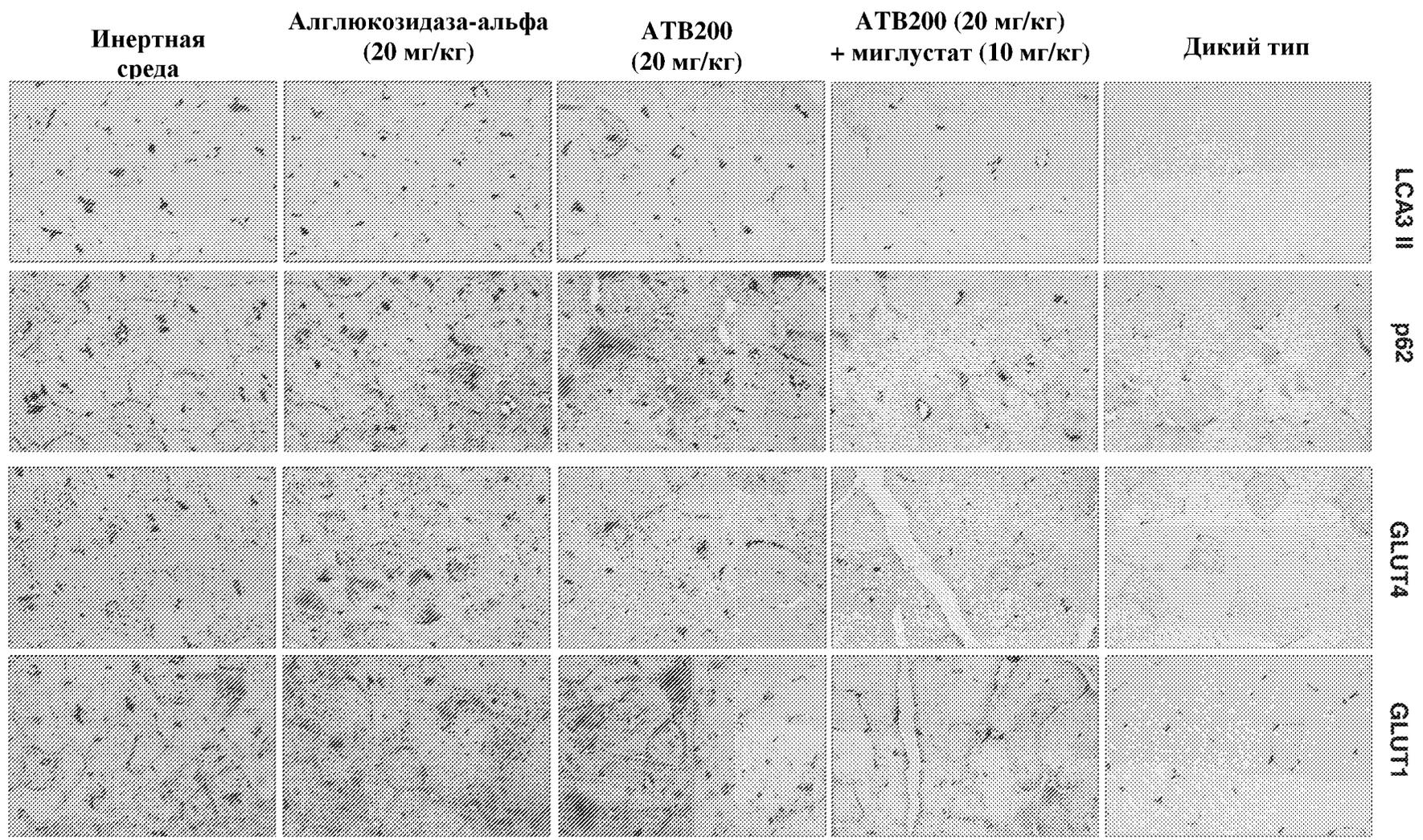
Фиг. 14



Фиг. 15

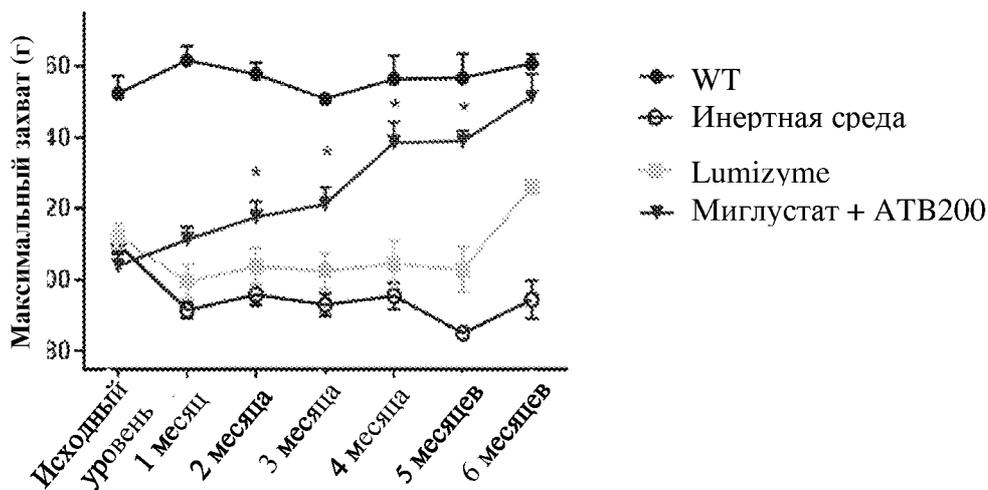


Фиг. 16



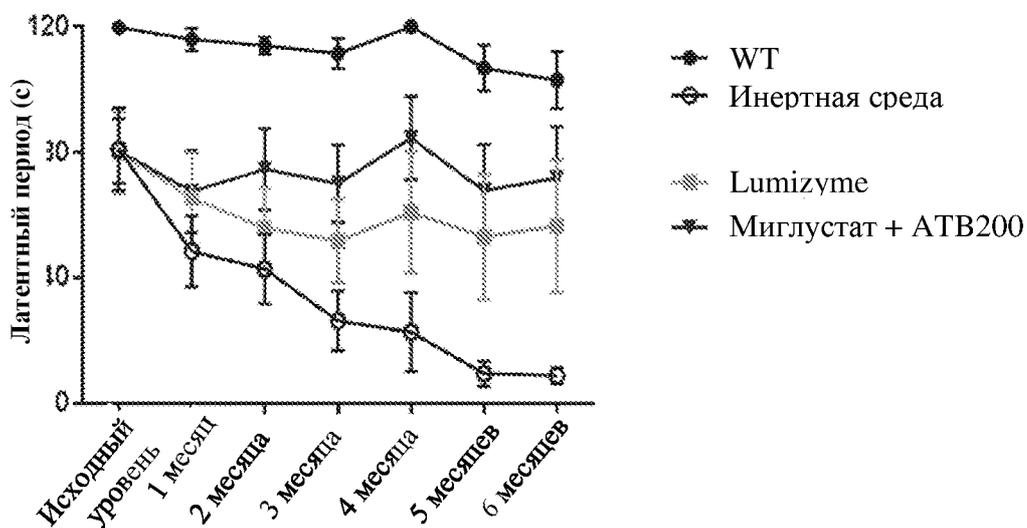
Фиг. 17

**Исследование силы захвата**

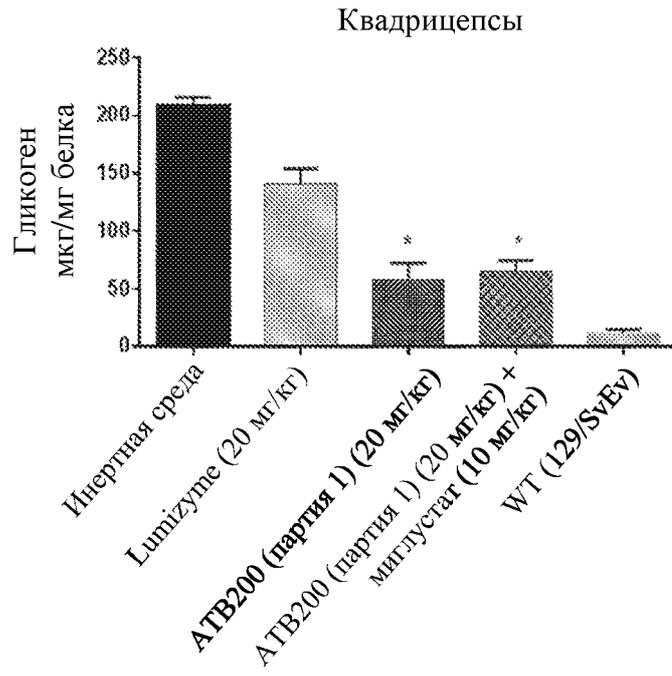


**Фиг. 18А**

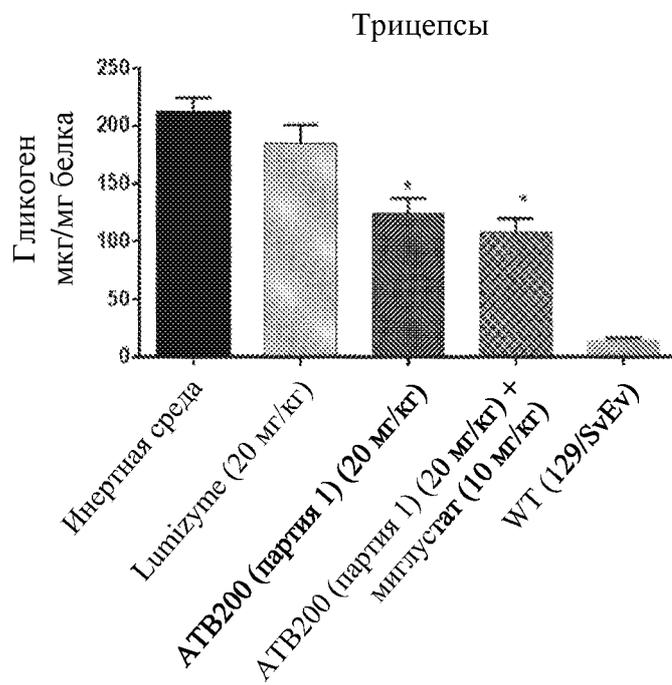
**Исследование "вис на проволоке"**



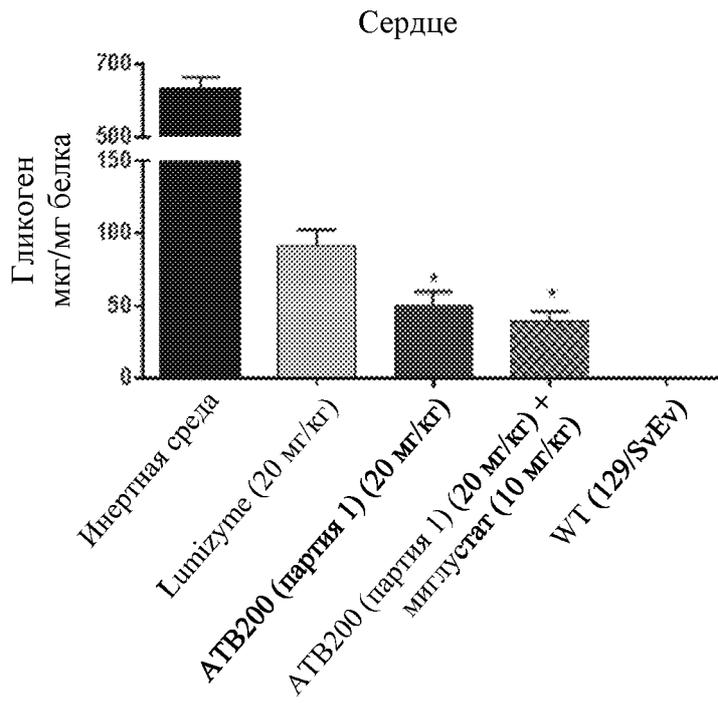
**Фиг. 18В**



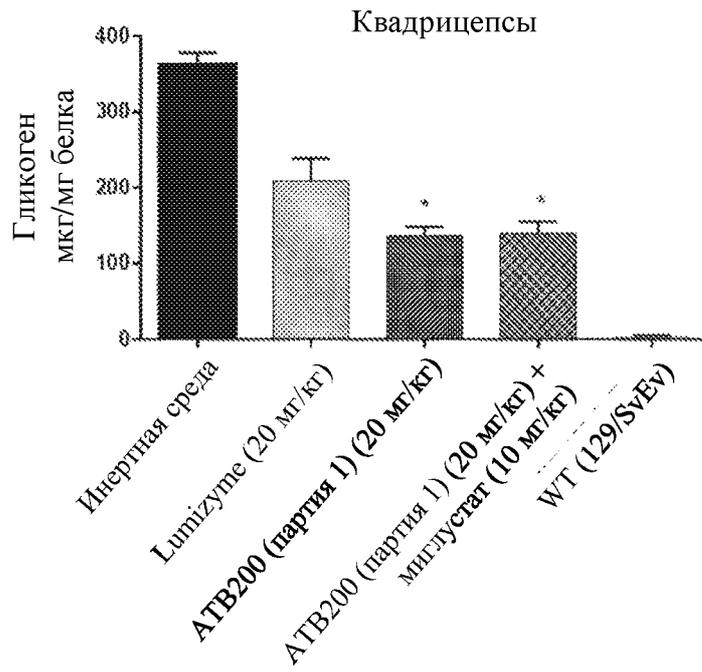
Фиг. 19А



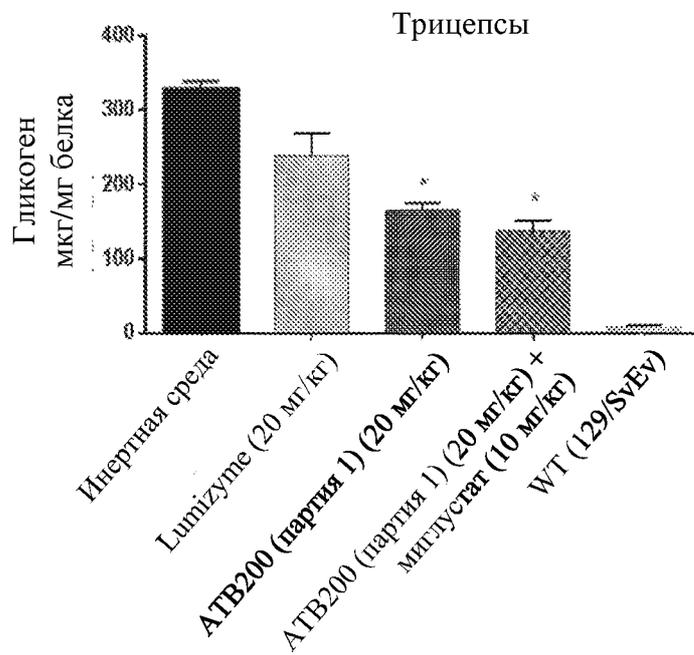
Фиг. 19В



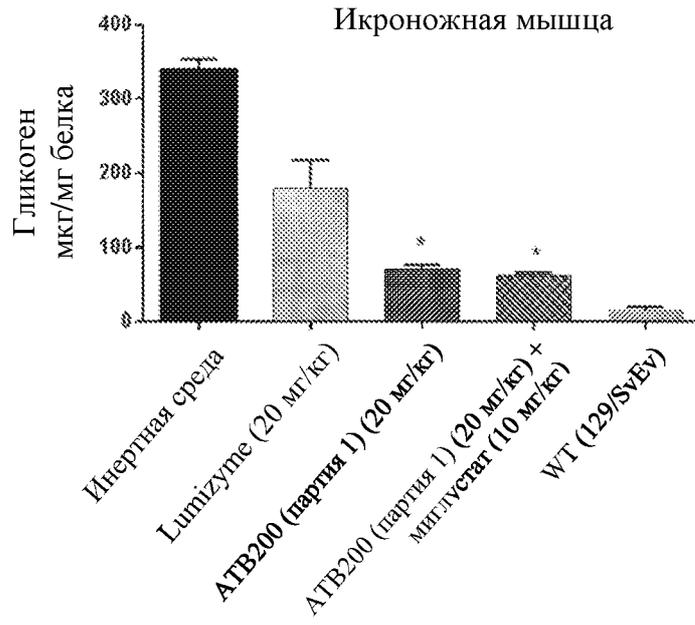
Фиг. 19С



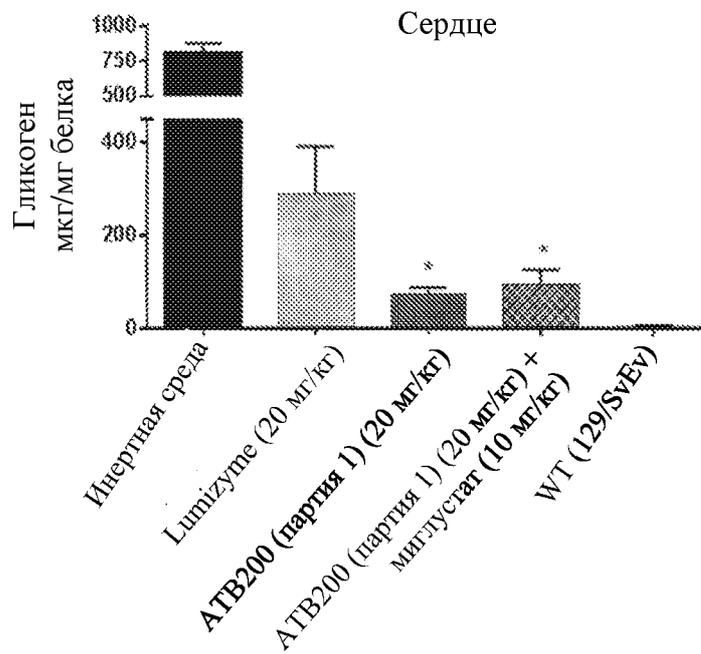
**Фиг. 19D**



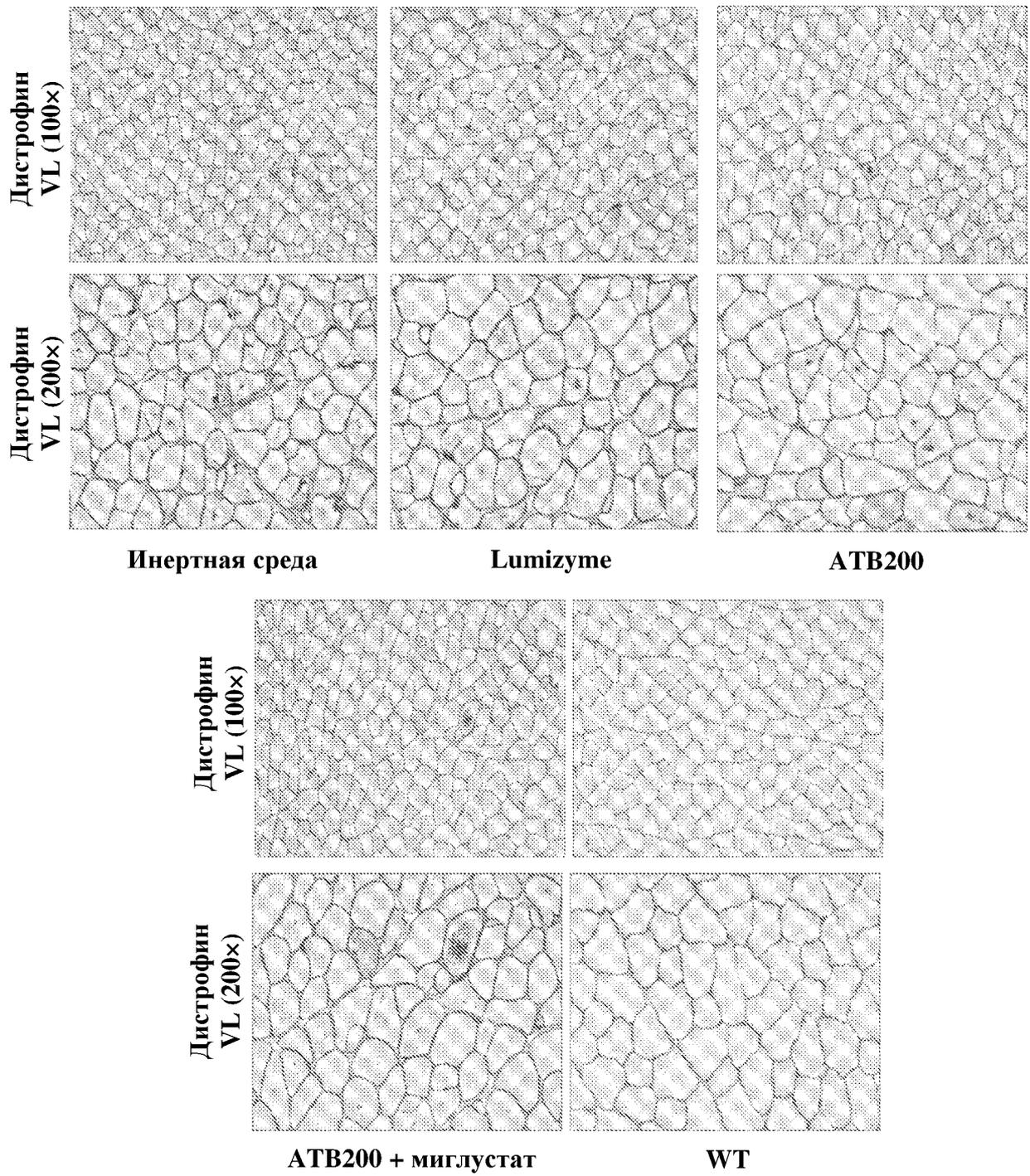
**Фиг. 19E**



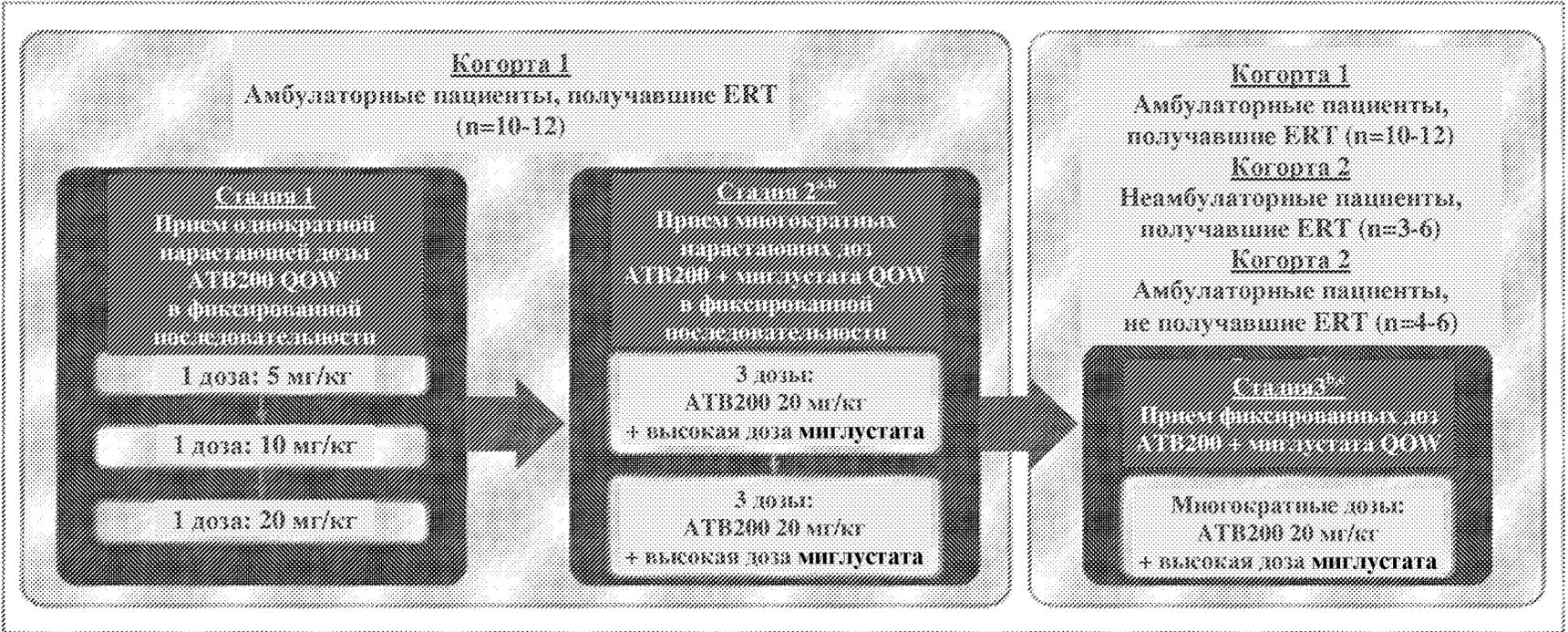
**Фиг. 19F**



**Фиг. 19G**

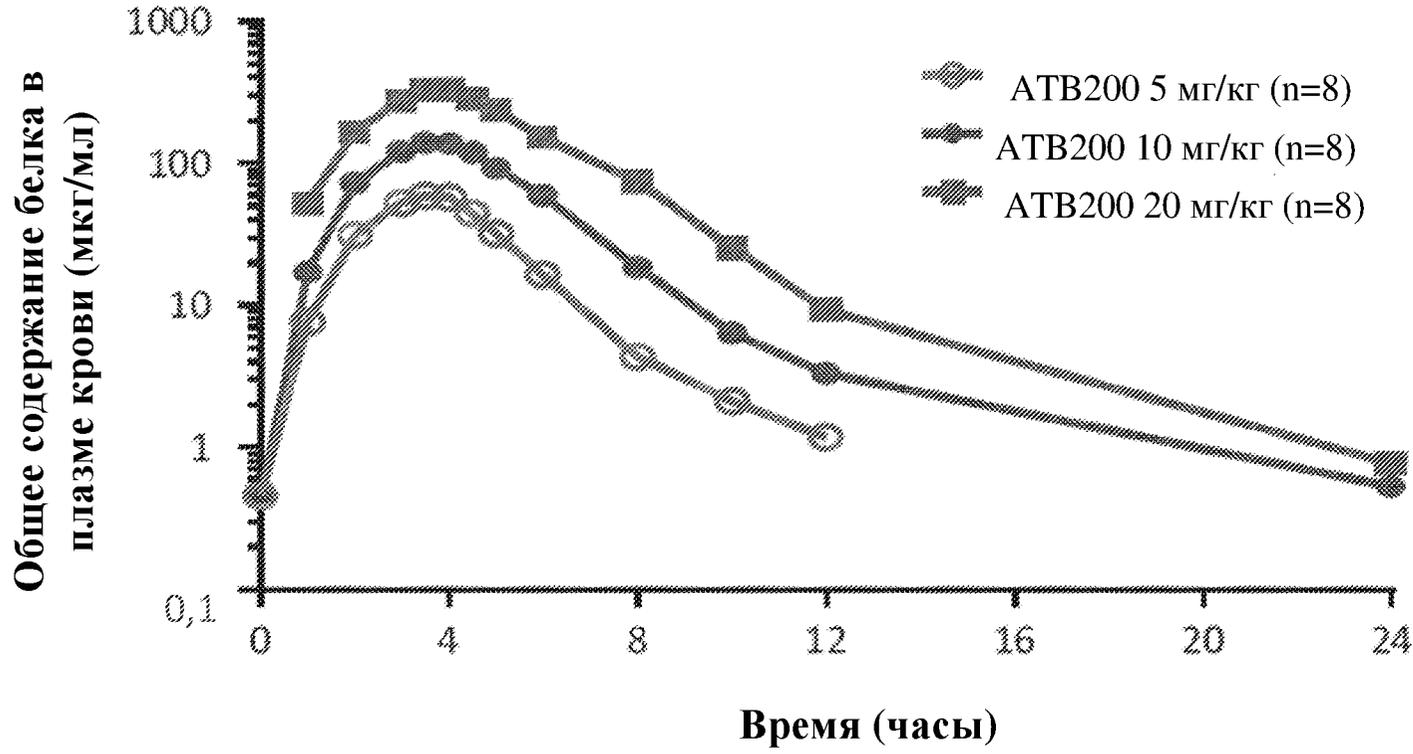


Фиг. 20

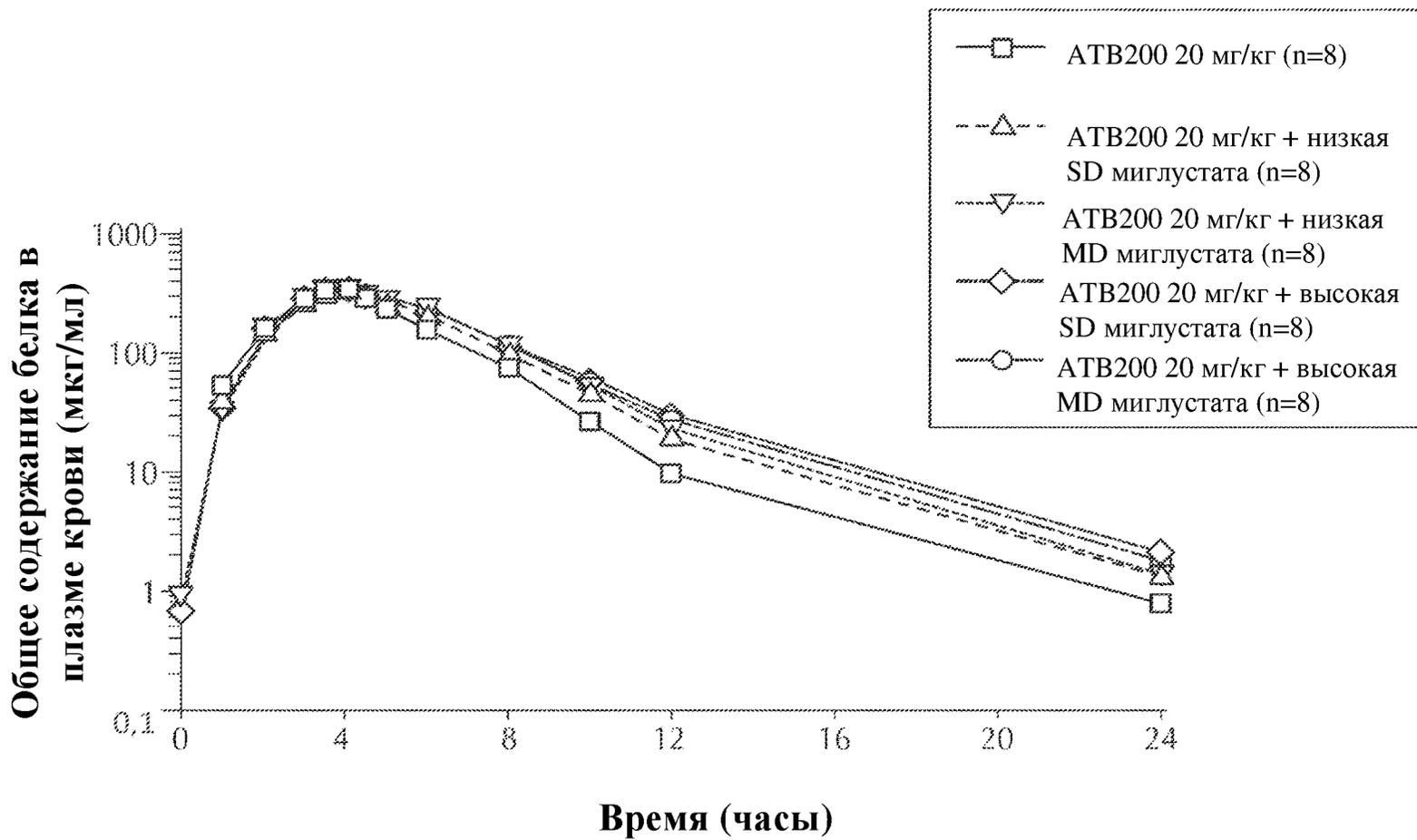


QOW = один раз в две недели

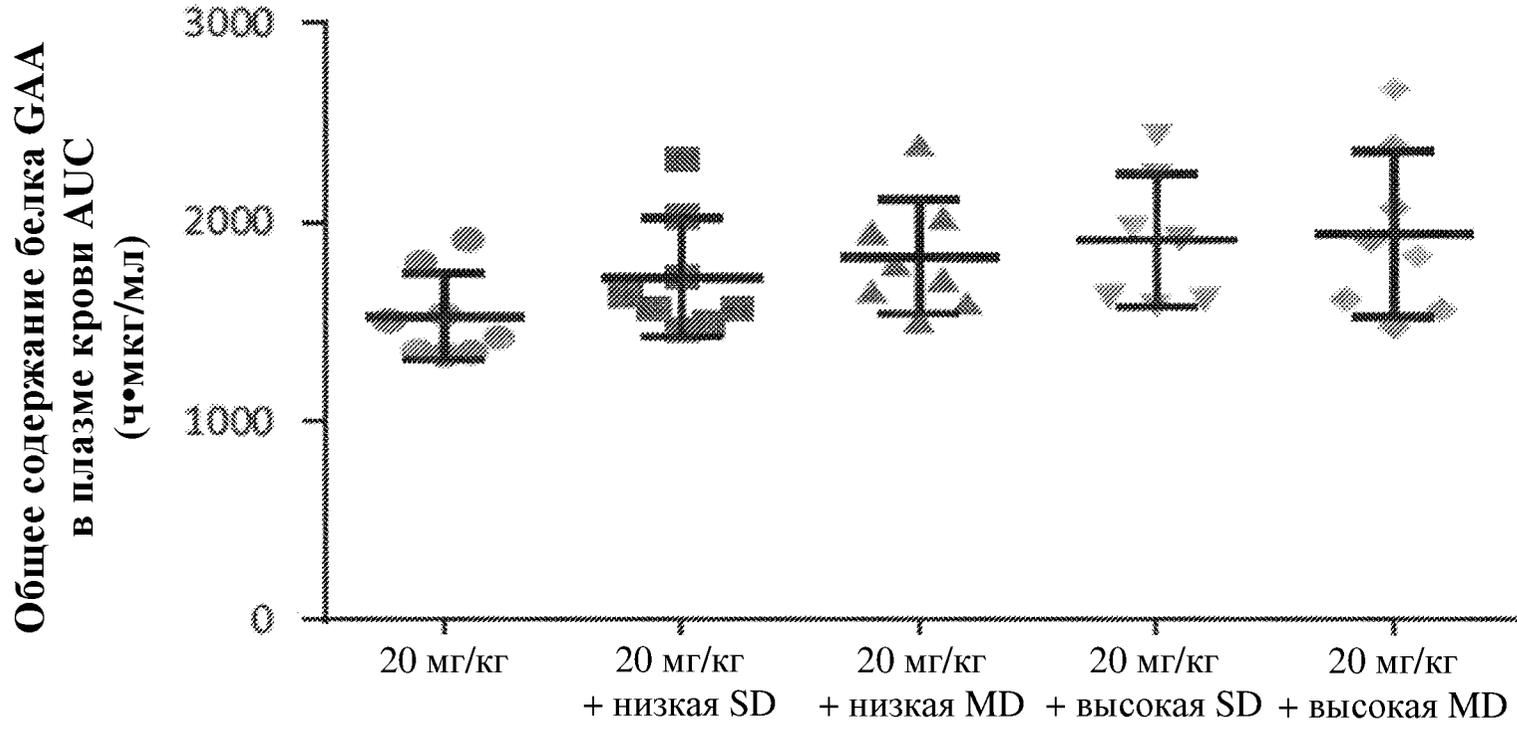
Фиг. 21



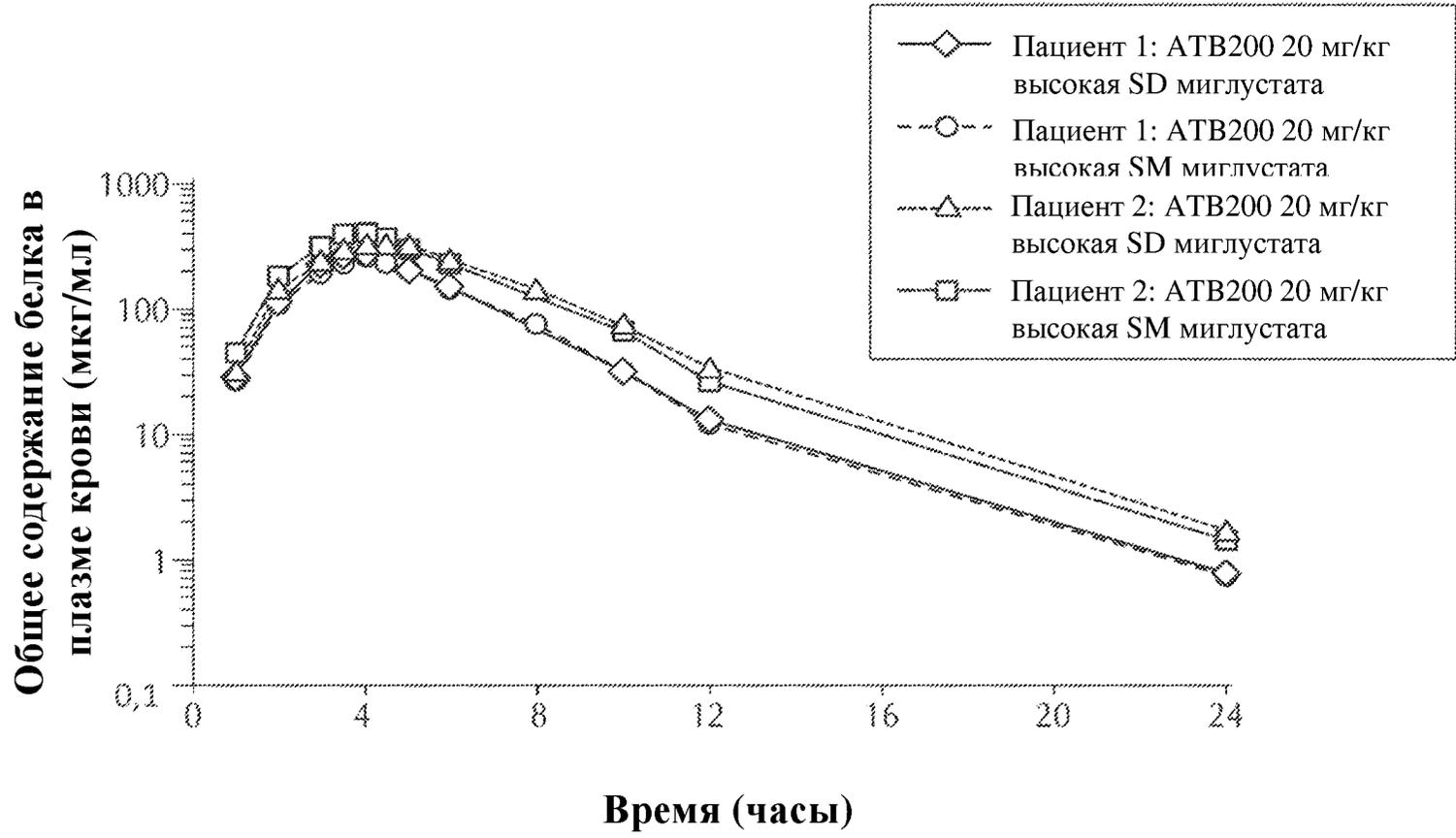
Фиг. 22А



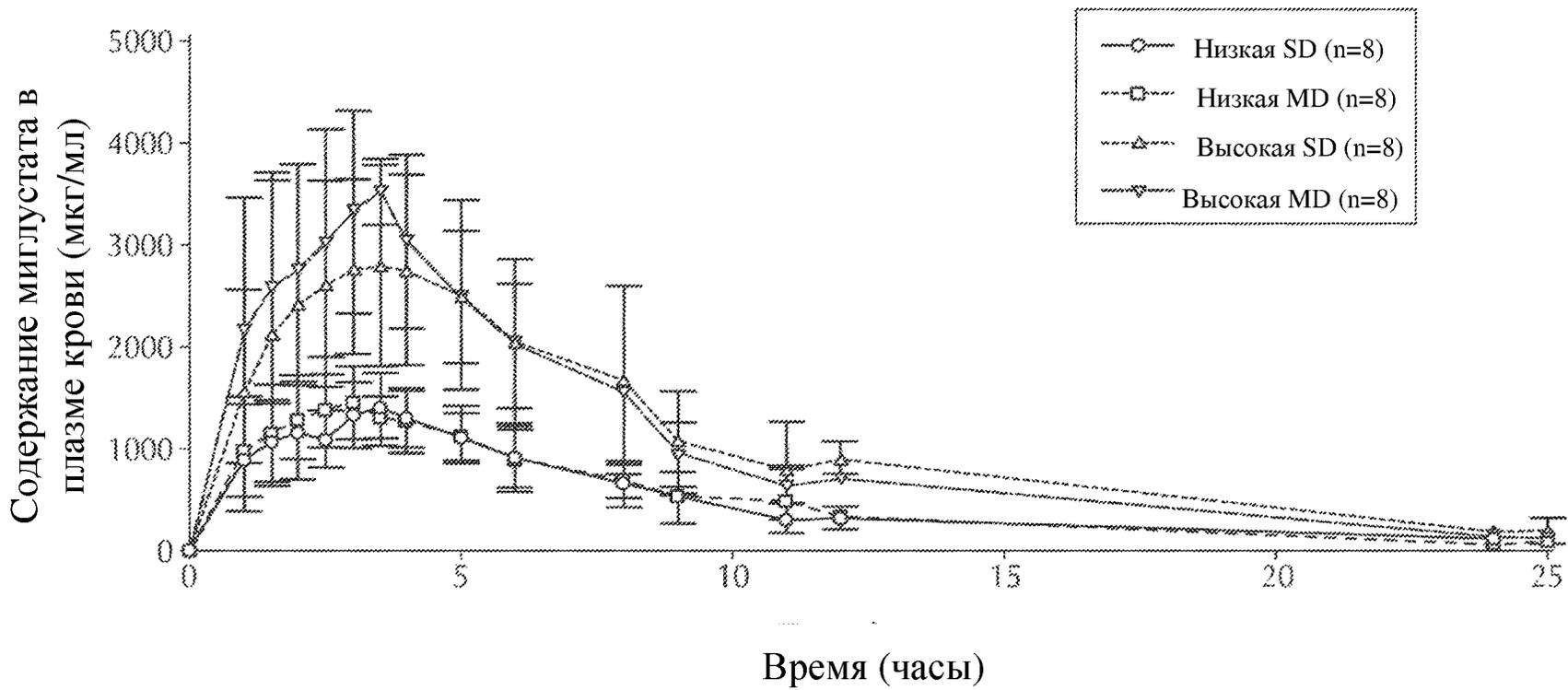
Фиг. 22В



Фиг. 22С

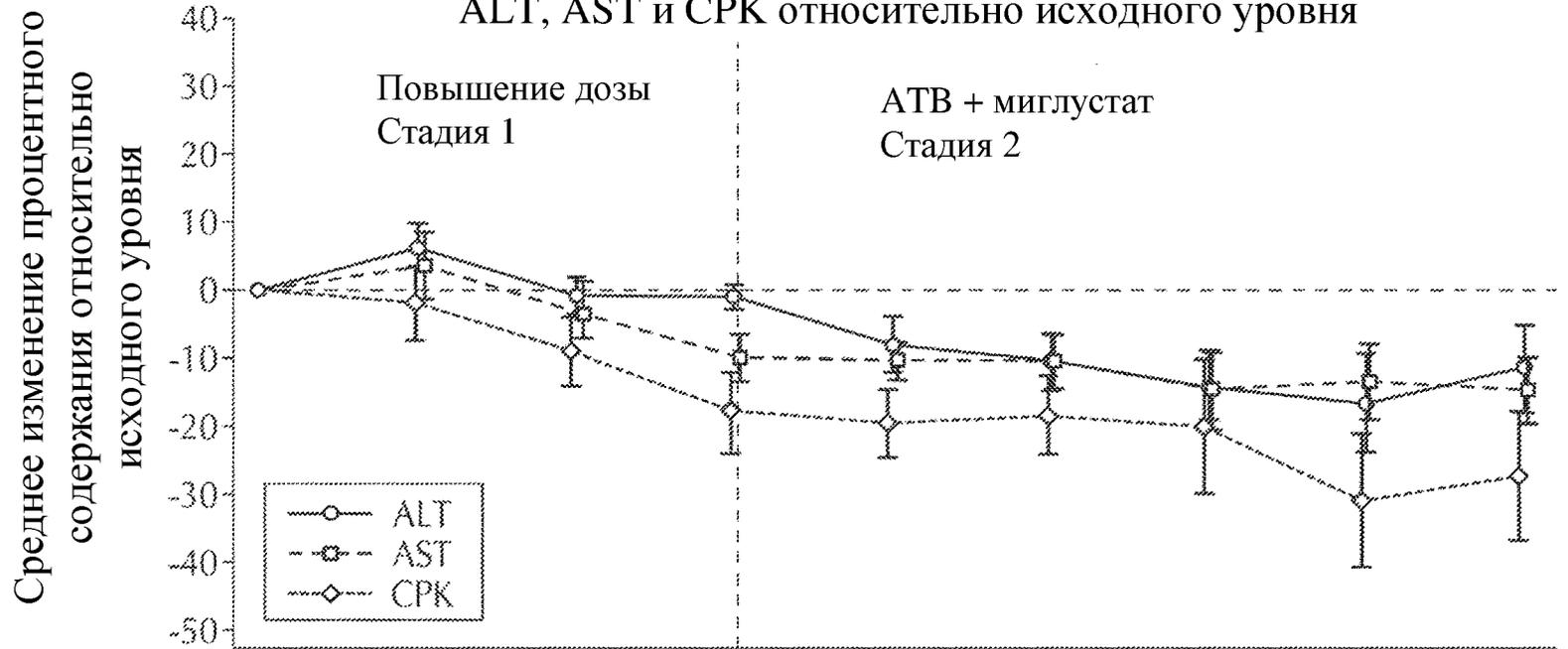


Фиг. 22D



Фиг. 23

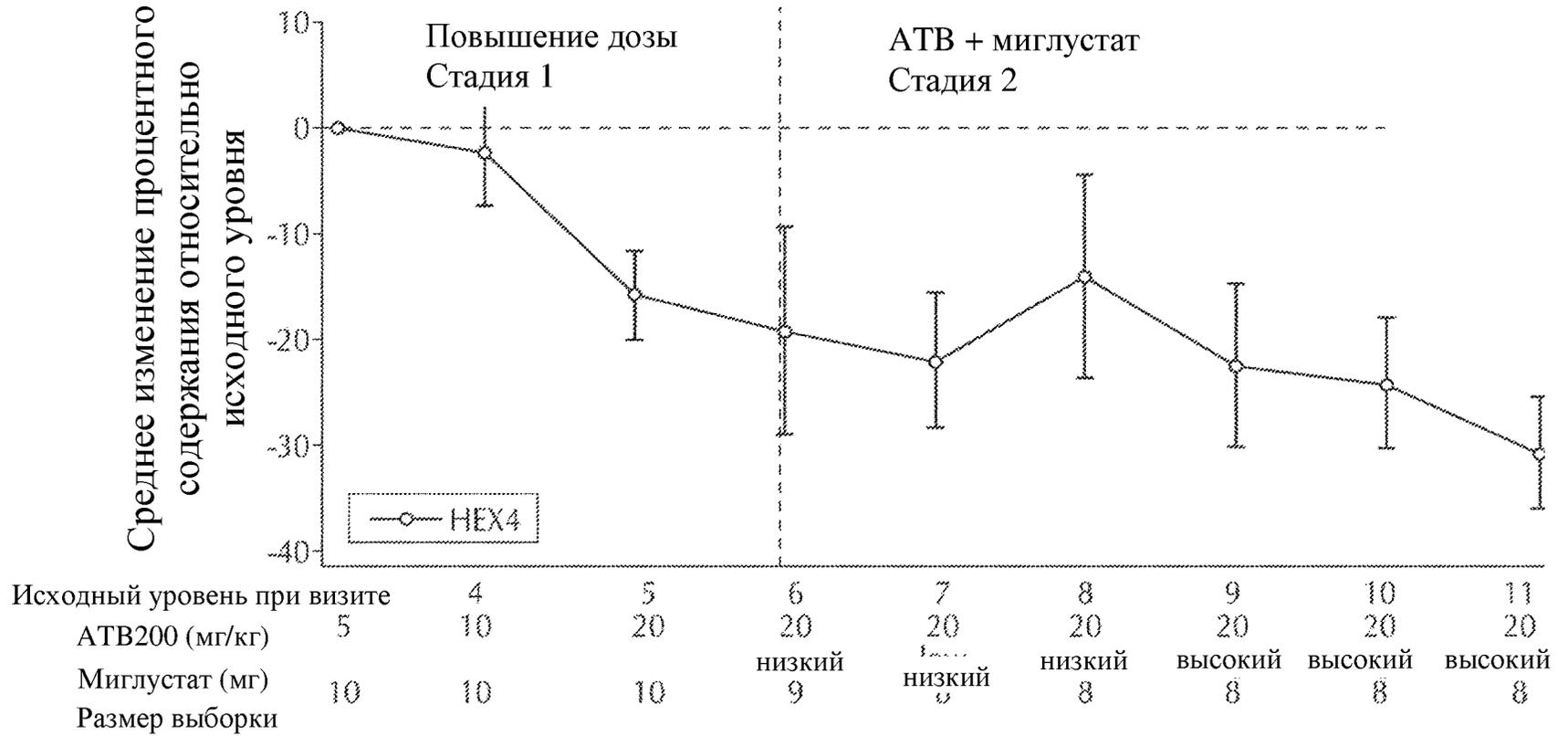
Когорта 1: изменение процентного содержания ALT, AST и СРК относительно исходного уровня



Исходный уровень при визите	4	5	6	7	8	9	10	11	
АТВ200 (мг/кг)	5	10	20	20	20	20	20	20	
Миглустат (мг)		10	8	низкий	низкий	низкий	высокий	высокий	высокий
Размер выборки	10	10	8	9	9	8	8	8	8

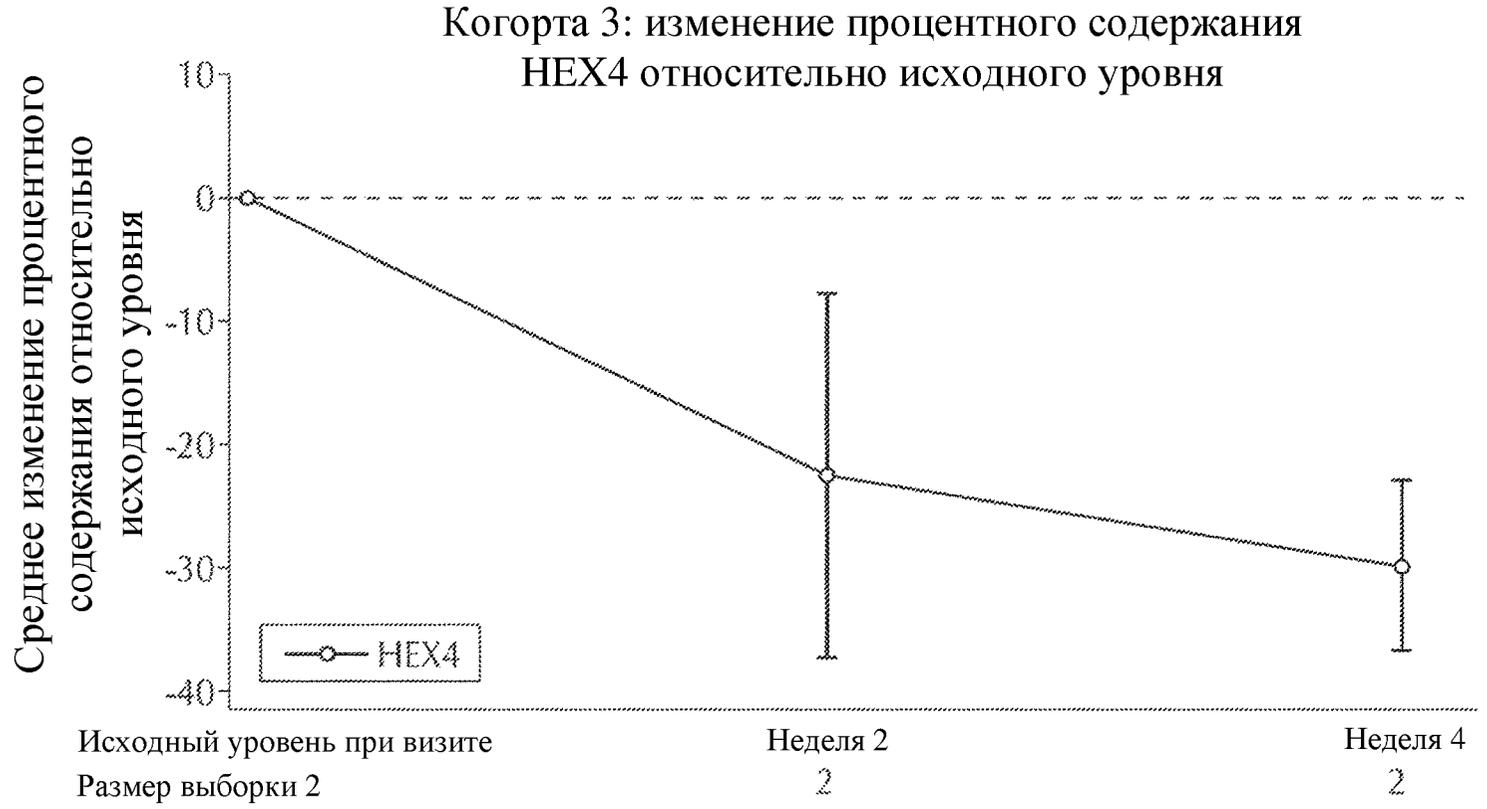
Фиг. 24А

Когорта 1: изменение процентного содержания  
HEX4 относительно исходного уровня



Фиг. 24В





**Фиг. 24D**

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference AT-P8700-PCT	<b>FOR FURTHER ACTION</b> <small>see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, item 5 below.</small>	
International application No. PCT/US2017/024982	International filing date ( <i>day/month/year</i> ) 30 March 2017 (30-03-2017)	(Earliest) Priority Date ( <i>day/month/year</i> ) 30 March 2016 (30-03-2016)
Applicant  AMICUS THERAPEUTICS, INC		

This international search report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau.

This international search report consists of a total of 5 sheets.

It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.

1. **Basis of the report**

a. With regard to the **language**, the international search was carried out on the basis of:

- the international application in the language in which it was filed
- a translation of the international application into \_\_\_\_\_, which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1(b))

b.  This international search report has been established taking into account the **rectification of an obvious mistake** authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 43.6*bis*(a)).

c.  With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, see Box No. I.

2.  **Certain claims were found unsearchable** (See Box No. II)

3.  **Unity of invention is lacking** (see Box No III)

4. With regard to the **title**,

- the text is approved as submitted by the applicant
- the text has been established by this Authority to read as follows:

5. With regard to the **abstract**,

- the text is approved as submitted by the applicant
- the text has been established, according to Rule 38.2, by this Authority as it appears in Box No. IV. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority

6. With regard to the **drawings**,

a. the figure of the **drawings** to be published with the abstract is Figure No. 6

- as suggested by the applicant
- as selected by this Authority, because the applicant failed to suggest a figure
- as selected by this Authority, because this figure better characterizes the invention

b.  none of the figures is to be published with the abstract

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2017/024982

## Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
  - a.  forming part of the international application as filed:
    - in the form of an Annex C/ST.25 text file.
    - on paper or in the form of an image file.
  - b.  furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
  - c.  furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
    - in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).
    - on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2.  In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No  
PCT/US2017/024982

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**  
 INV. A61K38/47 C12N9/26 A61P3/00  
 ADD.  
 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**  
 Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
 A61K C12N  
 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
 EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, FSTA, WPI Data

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 2002/073438 A1 (REUSER ARNOLD J [NL] ET AL) 13 June 2002 (2002-06-13) paragraphs [0028] - [0030], [0236] - [0238], [0253]; claims 1-39 -----	1-30
Y	WO 2010/148253 A2 (ZYSTOR THERAPEUTICS INC [US]; LEBOWITZ JONATHAN H [US]; CHANG BYEONG []) 23 December 2010 (2010-12-23) paragraph [0013]; claims 1-30 ----- -/--	1-30

Further documents are listed in the continuation of Box C.       See patent family annex.

\* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search  11 July 2017	Date of mailing of the international search report  25/07/2017
---	--

Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer  Habadanck, Robert
--	---

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2017/024982

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>MCVIE-WYLIE A J ET AL: "Biochemical and pharmacological characterization of different recombinant acid alpha-glucosidase preparations evaluated for the treatment of Pompe disease", MOLECULAR GENETICS AND METABOLISM, ACADEMIC PRESS, AMSTERDAM, NL, vol. 94, no. 4, 1 August 2008 (2008-08-01), pages 448-455, XP022833455, ISSN: 1096-7192, DOI: 10.1016/J.YMGME.2008.04.009 [retrieved on 2008-06-05] abstract; table 1</p>	1-30
Y	<p>-----</p> <p>KHANNA RICHIE ET AL: "Co-administration of the pharmacological chaperone AT2221 with a proprietary recombinant human acid alfa-glucosidase leads to greater plasma exposure and substrate reduction compared to alglucosidase alfa", MOLECULAR GENETICS AND METABOLISM, vol. 117, no. 2, 3 March 2016 (2016-03-03), XP029416454, ISSN: 1096-7192, DOI: 10.1016/J.YMGME.2015.12.318 abstract; compound ATB200</p>	1-30
Y	<p>-----</p> <p>R Khanna ET AL: "Co-Administration of the Pharmacological Chaperone AT2221 with a Proprietary Recombinant Human Acid-alpha-Glucosidase Leads to Greater Plasma Exposure and Substrate Reduction Compared to Alglucosidase Alfa", 1 March 2016 (2016-03-01), XP055385407, Retrieved from the Internet: URL:http://files.shareholder.com/downloads/AMTX/4713261270x0x878433/B2B74EE8-4C34-4E27-ADBA-CC2EC1E246E1/Co-Administration_of_the_Pharmacological_Chaperone_AT2221_with_a_Proprietary_Recombinant_Human_Acid_Alpha-Glucosidase.pdf [retrieved on 2017-06-27] abstract, summary</p> <p>-----</p>	1-30

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2017/024982

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2002073438	A1	13-06-2002	NONE
-----			
WO 2010148253	A2	23-12-2010	EP 2475376 A2 18-07-2012
			EP 3075386 A1 05-10-2016
			ES 2569514 T3 11-05-2016
			US 2012148556 A1 14-06-2012
			WO 2010148253 A2 23-12-2010
-----			