

(19)



Евразийское  
патентное  
ведомство

(21) 202392282 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки  
2023.11.30

(51) Int. Cl. *A61K 38/46* (2006.01)  
*A61K 9/00* (2006.01)  
*A61K 47/02* (2006.01)  
*A61P 19/08* (2006.01)

(22) Дата подачи заявки  
2022.02.10

(54) ПОЛИПЕПТИДЫ НА ОСНОВЕ ЩЕЛОЧНОЙ ФОСФАТАЗЫ И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

(31) 63/149,090

(72) Изобретатель:

(32) 2021.02.12

Фегтли Вальтер К., У ЮйХун,

(33) US

Монтелеон Джонатан, Межебовски

(86) PCT/US2022/016031

Татьяна, Фалкоун Эрик, Го Ян (US)

(87) WO 2022/173987 2022.08.18

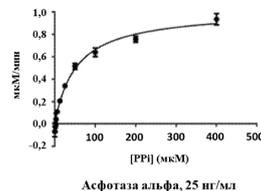
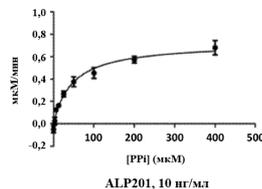
(74) Представитель:

(71) Заявитель:

Медведев В.Н. (RU)

АЛЕКСИОН ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ,  
ИНК. (US)

(57) Раскрыты фармацевтические композиции, которые включают растворимую щелочную фосфатазу для лечения нарушений минерализации костей, таких как гипофосфатазия (HPP), и ее симптомов. Полипептиды включают растворимую щелочную фосфатазу (sALP) или ее фрагмент, который получен из встречающейся в природе щелочной фосфатазы (ALP).



202392282

A1

A1

202392282

## ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-578893EA/019

### ПОЛИПЕПТИДЫ НА ОСНОВЕ ЩЕЛОЧНОЙ ФОСФАТАЗЫ И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

#### ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

Настоящая заявка содержит Перечень последовательностей, который был представлен в электронном виде в формате ASCII и полностью включен в настоящий документ посредством ссылки. Упомянутая копия ASCII, созданная 4 февраля 2022 года, называется 50694-094WO2\_Sequence\_Listing\_2\_4\_22\_ST25 и имеет размер 27 753 байта.

#### УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Гипофосфатазия (HPP) - редкое наследственное заболевание скелета с частотой 1 случай на 100 000 рождений при наиболее тяжелых формах заболевания. Расстройство обычно возникает в результате мутаций с потерей функции в гене, кодирующем тканеспецифическую щелочную фосфатазу (TNSALP). HPP демонстрирует замечательный диапазон симптомов и степени тяжести, от преждевременной потери зубов до почти полного отсутствия минерализации костей в утробе матери. Представление HPP заметно различается среди субъектов, а также заметно различается в зависимости от возраста субъектов. У многих пациентов с HPP наблюдаются изменения скелета, низкий рост, хронические боли, болезненность нижних конечностей, нарушение походки и преждевременная атравматическая потеря зубов.

Альфа-асфотаза (STRENSIQ®, Alexion Pharmaceuticals, Inc.), рекомбинантная ферментная заместительная терапия (ERT, enzyme replacement therapy), которая включает растворимый фрагмент TNSALP, является первой ERT, доступной для пациентов с HPP. Альфа-асфотаза продемонстрировала преобразующее воздействие на наиболее тяжелую форму HPP, о чем свидетельствуют улучшения минерализации и плотности костей, а также дыхательной и двигательной функции, когнитивного развития и мышечной силы (Whyte et al., New Engl. J. Med. 366:904-913, 2012).

#### СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Первый аспект раскрывает фармацевтическую композицию, содержащую полипептид щелочной фосфатазы, последовательность которого на по меньшей мере 80% (например, по меньшей мере на 85%, 90%, 95%, 97%, 99% или 100%) идентична SEQ ID NO: 5, и фармацевтически приемлемый носитель. Полипептид может содержать по меньшей мере одну мутацию, выбранную из E108M, N213Q и N286Q относительно аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1 (например, полипептид может содержать две или все три из этих мутаций). Например, полипептид имеет по меньшей мере 80% (например, по меньшей мере 85%, 90%, 95%, 97%, 99% или 100%) идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 5 и содержит по меньшей мере одну, две или все три мутации, выбранные из E108M, N213Q и N286Q. Фармацевтически приемлемый носитель может включать один или более из фосфатов, пролина и сахарозы. Например, полипептид может содержать или состоять из

аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 5.

В некоторых вариантах осуществления участок полипептида, содержащий щелочную фосфатазу, имеет по меньшей мере 80% (например, по меньшей мере 85%, 90%, 95%, 97%, 99% или 100%) идентичности с последовательностью SEQ ID NO: 3. Этот полипептид может быть дополнительно связан с Fc-областью (например, Fc-областью IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4) и/или полиаспаргатной областью. В некоторых вариантах осуществления полипептид содержит Fc-область IgG2/4, например, имеющую по меньшей мере 80% (например, по меньшей мере 85%, 90%, 95%, 97%, 99% или 100%) идентичности с SEQ ID NO: 4. Полиаспаргат может содержать, например, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 остатков аспартата. В некоторых вариантах осуществления полиаспаргат содержит десять остатков аспартата (D10).

Композиция может быть приготовлена так, чтобы она содержала дозу полипептида щелочной фосфатазы от около 0,1 мг/мл до около 200 мг/мл (например, около 1, 10, 20, 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175 или 200 мг/мл). Композиция может быть приготовлена в объеме от около 0,1 мл до около 50 мл (например, от около 0,1 до около 10 мл, например, около 0,1 мл, 0,2 мл, 0,3 мл, 0,4 мл, 0,5 мл, 0,6 мл, 0,7 мл, 0,8 мл, 0,9 мл или 1,0 мл, например, от около 1 мл до около 10 мл, например, около 2 мл, 3 мл, 4 мл, 5 мл, 6 мл, 7 мл, 8 мл, 9 мл или 10 мл). В некоторых вариантах осуществления композиция составляет в объеме около 1 мл). Например, композиция может содержать 100 мг/мл полипептида щелочной фосфатазы с по меньшей мере 80% (например, по меньшей мере на 85%, 90%, 95%, 97% или 99%) идентичности с последовательностью, или содержать последовательность SEQ ID NO: 5 (например, полипептид содержит по меньшей мере одну, две или все три мутации, выбранные из E108M, N213Q и N286Q SEQ ID NO: 5) и фармацевтически приемлемый носитель.

Композиция может содержать фосфат (например, фосфат натрия), например, в концентрации от около 1 мМ до около 100 мМ или от около 5 мМ до около 20 мМ, например, около 2 мМ, 3 мМ, 4 мМ, 5 мМ, 6 мМ, 7 мМ, 8 мМ, 9 мМ, 10 мМ, 20 мМ, 30 мМ, 40 мМ, 50 мМ, 60 мМ, 70 мМ, 80 мМ, 90 мМ или 100 мМ, например, около 10 мМ. Композиция может дополнительно содержать пролин и/или сахарозу. Композиция может дополнительно содержать пролин. Композиция может дополнительно содержать сахарозу. Например, композиция может содержать от около 1 мМ до около 500 мМ пролина, например, от около 70 мМ до около 280 мМ, например, от около 50 мМ до около 200 мМ, например, около 2 мМ, 3 мМ, 4 мМ, 5 мМ, 6 мМ, 7 мМ, 8 мМ, 9 мМ, 10 мМ, 20 мМ, 30 мМ, 40 мМ, 50 мМ, 60 мМ, 70 мМ, 80 мМ, 90 мМ, 100 мМ, 110 мМ, 120 мМ, 130 мМ, 140 мМ, 150 мМ, 160 мМ, 170 мМ, 180 мМ, 190 мМ, 200 мМ, 300 мМ, 400 мМ, или 500 мМ, например, около 140 мМ пролина и/или от около 1 мМ до около 500 мМ сахарозы, например, от около 70 мМ до около 280 мМ, например, от около 50 мМ до около 200 мМ, например, около 2 мМ, 3 мМ, 4 мМ, 5 мМ, 6 мМ, 7 мМ, 8 мМ, 9 мМ, 10 мМ, 20 мМ, 30 мМ, 40 мМ, 50 мМ, 60 мМ, 70 мМ, 80 мМ, 90 мМ, 100 мМ, 110 мМ, 120 мМ, 130 мМ, 140 мМ, 150 мМ, 160 мМ, 170 мМ, 180 мМ, 190 мМ, 200 мМ, 210 мМ, 220 мМ, 230 мМ, 240

мМ, 250 мМ, 260 мМ, 270 мМ, 280 мМ, 290 мМ, 300 мМ, 350 мМ, 400 мМ, 450 мМ или 500 мМ, например, около 140 мМ сахарозы или около 210 мМ сахарозы. В некоторых вариантах осуществления композиция содержит молярное соотношение пролин:сахароза от около 1:0 до около 1:3, например, около 1:1. В некоторых вариантах осуществления состав содержит от около 1 мМ до около 500 мМ пролина (например, от около 50 мМ до около 200 мМ пролина, например, около 140 мМ пролина) и от около 1 мМ до около 500 мМ сахарозы (например, от около 40 мМ до около 280 мМ, например, от около 50 мМ до около 200 мМ сахарозы, например, около 140 мМ или около 210 мМ сахарозы). В некоторых вариантах осуществления состав содержит около 140 мМ пролина. В некоторых вариантах осуществления состав содержит около 140 мМ сахарозы. В некоторых вариантах осуществления состав содержит около 210 мМ сахарозы. В некоторых вариантах осуществления состав содержит около 210 мМ сахарозы и не содержит пролин. В некоторых вариантах осуществления состав содержит около 140 мМ пролина и около 140 мМ сахарозы. В некоторых вариантах осуществления состав содержит около 140 мМ пролина и около 140 мМ сахарозы и около 10 мМ фосфата (например, фосфата натрия). В некоторых вариантах осуществления состав содержит около 210 мМ сахарозы и около 10 мМ фосфата (например, фосфата натрия). Состав может дополнительно содержать от около 0,01% до около 0,5% полиоксиэтилен(20)сорбитанмоноолеата), например, от около 0,01% до около 0,1% полиоксиэтилен(20)сорбитанмоноолеата, например, около 0,05% полиоксиэтилен(20)сорбитанмоноолеата. Полиоксиэтилен(20)сорбитанмоноолеат может представлять собой, например, полисорбат 80 (PS80). В некоторых вариантах осуществления композиция приготовлена при pH от около pH 7,0 до около pH 7,6 (например, около pH 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5 или 7,6, например, около pH 7,3). В некоторых вариантах осуществления композиция содержит около 10 мМ фосфата, около 140 мМ пролина, около 140 мМ сахарозы и около 0,05% полиоксиэтилен(20)сорбитанмоноолеата (например, PS80) при pH около 7,3.

Композиция может представлять собой фармацевтическую композицию, приготовленную в виде раствора, содержащего полипептид (например, полипептид с SEQ ID NO: 5 и ее вариантами с по меньшей мере около 85% идентичности последовательности с ней (например, полипептид содержит один, две, или все три мутации, выбранные из E108M, N213Q и N286Q SEQ ID NO: 5)). Фармацевтическая композиция может содержать полипептид в количестве, например, от около 0,1 мг/мл до около 200 мг/мл, например, около 100 мг/мл. Фармацевтическая композиция может быть приготовлена для подкожного введения, например, с дозировкой полипептида от около 0,1 мг/мл до около 10 мг/мл. Композиция может быть приготовлена в виде раствора в объеме от около 0,1 мл до около 50 мл (например, от около 0,1 до около 10 мл, например, около 0,1 мл, 0,2 мл, 0,3 мл, 0,4 мл, 0,5 мл, 0,6 мл, 0,7 мл, 0,8 мл, 0,9 мл или 1,0 мл, например, от около 1 мл до около 10 мл, например, около 2 мл, 3 мл, 4 мл, 5 мл, 6 мл, 7 мл, 8 мл, 9 мл, или 10 мл). В некоторых вариантах осуществления композиция может быть

приготовлена в объеме около 1 мл. Раствор может содержать около 10 мМ фосфата, около 140 мМ пролина, около 140 мМ сахарозы и около 0,05% полиоксиэтилен(20)сорбитанмоноолеата (например, PS80) при pH около 7,3.

Также представлен флакон, содержащий описанную в данном документе фармацевтическую композицию. Флакон может содержать раствор (например, около 10 мМ фосфата натрия, около 140 мМ пролина, около 140 мМ сахарозы и около 0,05% моноолеата полиоксиэтилена(20)сорбитана (например, PS80) при pH около 7,3), содержащий полипептид (например, в количестве от около 0,1 мг до около 1,0 г (например, от около 10 мг до около 200 мг)) в объеме, например, от около 0,1 мл до около 10 мл (например, около 1 мл). Флакон может содержать полипептид в количестве, например, от около 0,1 мг/мл до около 500 мг/мл, от около 1 мг/мл до около 200 мг/мл, от около 50 мг/мл до около 150 мг/мл или около 100 мг/мл. Полипептид может иметь аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5 или ее вариант с по меньшей мере 85% идентичности с последовательностью (например, полипептид содержит одну, две или все три мутации, выбранные из E108M, N213Q и N286Q SEQ ID NO: 5).

Второй аспект относится к способу лечения нарушения минерализации костей или заболевания с костными проявлениями (например, заболевания, выбранного из группы, состоящей из гипофосфатазии (ГФП), перелома костей, остеопороза, склеростеоза, хондрокальциноза, гипотонии, мышечной дистрофии Дюшенна, трахеобронхомаляции, судороги, нейрофиброматоз (например, NF-1) и краниосиностоз или одного или более их симптомов у субъекта (например, человека), нуждающегося в этом, путем введения субъекту фармацевтической композиции по первому аспекту. Композицию можно вводить в количестве и в течение продолжительности, достаточных для лечения заболевания или облегчения одного или более его симптомов. Лечение может усиливать образование костей у субъекта. Полипептид можно использовать для лечения мышечной слабости.

Полипептид или фармацевтическую композицию, содержащую его, можно вводить в дозе от около 0,01 мг/кг до около 60 мг/кг (например, от около 0,1 мг/кг до около 50 мг/кг, например, от около 0,1 мг /кг до около 20 мг/кг или, например, от около 0,1 мг/кг до около 10 мг/кг). Полипептид можно вводить один раз в день, неделю, месяц или год (например, один раз в неделю). В некоторых вариантах осуществления полипептид вводят один или более раз каждые 2, 3, 4, 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, 30 или 31 день. Полипептид можно вводить один раз в неделю, один раз в две недели, один раз в три недели, один раз в четыре недели или дольше. Полипептид можно вводить в дозе от около 0,01 мг/кг/неделю до около 50 мг/кг/неделю (например, от около 0,01 мг/кг/неделю до около 40 мг/кг/неделю, например, от около 0,1 мг/кг/неделю до около 20 мг/кг/неделю или, например, от около 0,1 мг/кг/неделю до около 10 мг/кг/неделю). Полипептид можно вводить в течение по меньшей мере одного дня, одной недели, одного месяца, одного года или дольше (например, в течение всей жизни субъекта).

Полипептид или фармацевтическую композицию, содержащую его, можно вводить подкожно, внутривенно, внутримышечно, сублингвально, интратекально или интрадермально. В частности, полипептид или композиция, содержащая полипептид, может быть введена путем подкожного или внутривенного введения.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтическую композицию вводят подкожно (например, в живот или бедро). Например, от около 10 мг до около 100 мг (например, около 10 мг, 15 мг, 20 мг, 25 мг, 30 мг, 35 мг, 40 мг, 45 мг, 50 мг, 55 мг, 60 мг, 65 мг, 70 мг, 75 мг, 80 мг, 85 мг, 90 мг, 95 мг или 100 мг, например, около 15 мг, 45 мг или 90 мг, например, около 15 мг, 45 мг или 90 мг) можно вводить субъекту подкожно, например, один или два раза в неделю, например, в течение по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более недель или дольше (например, всю жизнь субъекта). Композицию можно вводить в объеме, например, около 5 мл или менее (например, 4,0 мл, 3,0 мл, 2,0 мл, 1,0 мл, 0,9 мл, 0,8 мл, 0,7 мл, 0,6 мл, 0,5 мл, 0,4 мл, 0,3 мл, 0,2 мл или 0,1 мл или в объеме в диапазоне от около 5 мл до около 0,1 мл).

В некоторых вариантах осуществления фармацевтическую композицию вводят внутривенно (в/в). Например, от около 10 мг до около 100 мг (например, около 10 мг, 15 мг, 20 мг, 25 мг, 30 мг, 35 мг, 40 мг, 45 мг, 50 мг, 55 мг, 60 мг, 65 мг, 70 мг, 75 мг, 80 мг, 85 мг, 90 мг, 95 мг или 100 мг, например, около 15 мг, 45 мг или 90 мг) можно вводить субъекту внутривенно, например, один раз или два раза в неделю, например, в течение по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более недель (например, в течение 3 недель) или дольше (например, в течение всей жизни субъекта). Например, фармацевтическую композицию вводят внутривенно в объеме около 5 мл или менее (например, 4,0 мл, 3,0 мл, 2,0 мл, 1,0 мл, 0,9 мл, 0,8 мл, 0,7 мл, 0,6 мл, 0,5 мл, 0,4 мл, 0,3 мл, 0,2 мл или 0,1 мл или в объеме в диапазоне от около 5 мл до около 0,1 мл).

В некоторых вариантах осуществления фармацевтическую композицию вводят внутривенно и подкожно (например, в живот или бедро). Например, фармацевтическую композицию вводят по схеме лечения, которая сочетает внутривенное и подкожное (например, в живот или бедро) введение. Например, композиция может быть сначала введена субъекту внутривенно в разовой дозе в количестве от около 10 мг до около 100 мг (например, около 10 мг, 15 мг, 20 мг, 25 мг, 30 мг, 35 мг, 40 мг, 45 мг, 50 мг, 55 мг, 60 мг, 65 мг, 70 мг, 75 мг, 80 мг, 85 мг, 90 мг, 95 мг или 100 мг, например, около 15 мг, 45 мг или 90 мг) с последующим подкожным введением (например, в живот или бедро) субъекту в виде одной или более доз с течением времени. Например, подкожная доза может составлять от около 10 мг до около 100 мг (например, около 10 мг, 15 мг, 20 мг, 25 мг, 30 мг, 35 мг, 40 мг, 45 мг, 50 мг, 55 мг, 60 мг, 65 мг, 70 мг, 75 мг, 80 мг, 85 мг, 90 мг, 95 мг или 100 мг, например, около 15 мг, 45 мг или 90 мг, например, около 15 мг, 45 мг, или 90 мг). Подкожные дозы можно вводить, например, один или два раза в неделю, один раз в две недели, один раз в три недели или один раз в четыре недели, например, в течение по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40 или 50 или более недель или дольше (например, в течение 1-10 лет или в течение жизни субъекта). Внутривенную и

подкожную дозы можно вводить в объеме, например, около 5 мл или менее (например, 4,0 мл, 3,0 мл, 2,0 мл, 1,0 мл, 0,9 мл, 0,8 мл, 0,7 мл, 0,6 мл, 0,5 мл, 0,4 мл, 0,3 мл, 0,2 мл или 0,1 мл или в объеме в диапазоне от около 5 мл до около 0,1 мл).

Субъектом может быть человек, такой как новорожденный, младенец, ребенок, подросток или взрослый.

В некоторых вариантах осуществления TSAC рекомбинантного полипептида щелочной фосфатазы составляет от около 1,0 моль/моль до около 6,0 моль/моль. В некоторых вариантах осуществления TSAC составляет от около 1,2 моль/моль до около 6,0 моль/моль рекомбинантной щелочной фосфатазы. В некоторых вариантах осуществления TSAC составляет от около 1,5 моль/моль до около 6,0 моль/моль рекомбинантной щелочной фосфатазы. В некоторых вариантах осуществления TSAC составляет от около 3,0 моль/моль до около 6,0 моль/моль рекомбинантной щелочной фосфатазы. В некоторых вариантах осуществления TSAC составляет от около 3,2 моль/моль до около 5,9 моль/моль рекомбинантной щелочной фосфатазы. В некоторых вариантах осуществления TSAC составляет около 0,9 моль/моль, около 1,0 моль/моль, около 1,1 моль/моль, около 1,2 моль/моль, около 1,3 моль/моль, около 1,4 моль/моль, около 1,5 моль/моль, около 1,6 моль/моль, около 1,7 моль/моль, около 1,8 моль/моль, около 1,9 моль/моль, около 2,0 моль/моль, около 2,1 моль/моль, около 2,2 моль/моль, около 2,3 моль/моль, около 2,4 моль/моль, около 2,5 моль/моль, около 2,6 моль/моль, около 2,7 моль/моль, около 2,8 моль/моль, около 2,9 моль/моль, около 3,0 моль/моль, около 3,1 моль/моль, около 3,2 моль/моль, около 3,3 моль/моль, около 3,4 моль/моль, около 3,5 моль/моль, около 3,6 моль/моль, около 3,7 моль/моль, около 3,8 моль/моль, около 3,9 моль/моль, около 4,0 моль/моль, около 4,1 моль/моль, около 4,2 моль/моль, около 4,3 моль/моль, около 4,4 моль/моль, около 4,5 моль/моль, около 4,6 моль/моль, около 4,7 моль/моль, около 4,8 моль/моль, около 4,9 моль/моль, около 5,0 моль/моль, около 5,1 моль/моль, около 5,2 моль/моль, около 5,3 моль/моль, около 5,4 моль/моль, около 5,5 моль/моль, около 5,6 моль/моль, около 5,7 моль/моль, около 5,8 моль/моль, около 5,9 моль/моль или около 6,0 моль/моль рекомбинантной щелочной фосфатазы. В некоторых вариантах осуществления TSAC составляет около 3,2 моль/моль рекомбинантной щелочной фосфатазы. В некоторых вариантах осуществления TSAC составляет около 5,0 моль/моль рекомбинантной щелочной фосфатазы. В некоторых вариантах осуществления TSAC составляет около 5,9 моль/моль рекомбинантной щелочной фосфатазы.

В некоторых вариантах осуществления композиция содержит около 10 мМ фосфата, около 140 мМ пролина, около 140 мМ сахарозы, около 0,05% полиоксиэтилен(20)сорбитанмоноолеата (например, PS80) при pH около 7,3 и значении TSAC от около от 3,0 моль/моль до около 6,0 моль/моль.

В некоторых вариантах осуществления способ обеспечивает  $AUC_{0-168ч}$  от около 50 мкг×час/мл до около 4000 мкг×час/мл в крови субъекта. Например, способ может обеспечивать  $AUC_{0-168ч}$  от около 1000 мкг×час/мл до около 3000 мкг×час/мл в крови

субъекта. В некоторых вариантах осуществления способ обеспечивает  $C_{\max}$  от около 0,5 мкг/мл до около 25 мкг/мл в крови субъекта. Например, способ может давать  $C_{\max}$  от около 0,6 мкг/мл до около 20 мкг/мл в крови субъекта.

### **Определения**

Термин «около» означает  $\pm 10\%$  от указанного значения. Подразумевается, что все измерения, представленные в данном документе, изменены термином «около», независимо от того, используется ли этот термин в явном виде, если явно не указано иное.

Термин «фрагмент, нацеливающий на кость» означает аминокислотную последовательность длиной по меньшей мере из 3 аминокислотных остатков, имеющую достаточную аффинность к костному матриксу, так что фрагмент, нацеливающий на кость, взятый отдельно, обладает аффинностью связывания *in vivo* с костным матриксом, то есть по меньшей мере около  $1 \times 10^{-5}$  М или больше, например, около  $10^{-6}$  М, около  $10^{-7}$  М, около  $10^{-8}$  М, около  $10^{-9}$  М или более).

Термин «каталитически компетентный», используемый в данном документе, относится к sALP, которая гидролизует ингибитор минерализации кости неорганический пирофосфат (PPi) с получением неорганического фосфата (Pi), тем самым снижая внеклеточные концентрации PPi. Таким образом, каталитически компетентная sALP улучшает минерализацию скелета, регулируя концентрацию PPi.

Термин «Fc» означает кристаллизующийся фрагмент области иммуноглобулина, например, IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4, включая домены CH2 и CH3 тяжелой цепи иммуноглобулина. Fc может также содержать любую часть шарнирной области, соединяющую области Fab и Fc. Fc может происходить от любого млекопитающего, включая человека, и может быть посттрансляционно модифицирован (например, путем гликозилирования или сиалирования). В неограничивающем примере Fc может представлять собой фрагмент кристаллизующей области человеческого IgG2/4 с SEQ ID NO: 4.

Под «фрагментом» подразумевается часть молекулы полипептида или нуклеиновой кислоты, имеющая, предпочтительно, по меньшей мере 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более от всей длины эталонной молекулы нуклеиновой кислоты или полипептида. Фрагмент может содержать, например, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 310, 320, 330, 340, 350, 360, 370, 380, 390, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1,000, 1100, 1200, 1300, 1400, 1500, 1600, 1700, 1800, 1900, 2000, 2100 или более нуклеотидов, вплоть до всей длины молекулы нуклеиновой кислоты, или 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 400, 500, 600, 700 или более аминокислотных остатков вплоть до всей длины полипептида.

Термины «гипофосфатазия» и «HPP», используемые в данном документе, относятся к редкому наследственному заболеванию скелета, вызванному, например,

одной или более мутациями с потерей функции в гене ALPL (щелочная фосфатаза, печень/кость/почка), которая кодирует тканенеспецифическую щелочную фосфатазу (TNSALP). HPP может быть дополнительно охарактеризован как инфантильный HPP, детский HPP, перинатальный HPP (например, доброкачественный перинатальный HPP или летальный перинатальный HPP), одонто-HPP, подростковый HPP или взрослый HPP. Например, «детский HPP» описывает субъекта с HPP в возрасте от около 5 до около 12 лет, «подростковый HPP» описывает субъекта с HPP в возрасте от около 13 до около 17 лет, а «взрослый» HPP» описывает субъекта с HPP в возрасте около 18 лет и старше. Термин «HPP у взрослых», используемый в данном документе, относится к состоянию или фенотипу, характеризующемуся наличием одного или более из следующих симптомов: повышенный уровень неорганического пирофосфата (PPi) в крови и/или моче, гипоминерализация, гиперкальциурия, один или более деформаций скелета, гипотония, мышечная слабость, ревматоидные осложнения, переваливающаяся походка, трудности с передвижением, боль в костях, боль, перелом костей, отложение кристаллов дигидрата пирофосфата кальция, псевдоподагра, артрит, пирофосфатная артропатия, хондрокальциноз, кальцифицирующий периартрит и псевдоперелом. Используемый в данном документе термин «подростковая HPP» относится к состоянию или фенотипу, характеризующемуся наличием одного или более из следующих симптомов: повышенные уровни PPi, PEA или PLP в крови или моче; остеомалация, одна или более деформаций скелета, гипотония, мышечная слабость, ревматоидные осложнения, артрит, псевдоподагра, переваливающаяся походка, трудности при передвижении, боль в костях, боль, преждевременная потеря зубов, гипоминерализация, гипоплазия легких, дыхательная недостаточность, судороги, гиперкальциурия, низкий рост и задержка роста. Термин «детская HPP», используемый в данном документе, относится к состоянию или фенотипу, характеризующемуся наличием одного или более из следующих симптомов: повышенные уровни PPi, PEA или PLP в крови или моче; рахит, рахит ребер, одна или более деформаций скелета, гипотония, мышечная слабость, ревматоидные осложнения, артрит, псевдоподагра, переваливающаяся походка, трудности при передвижении, боль в костях, боль, преждевременная потеря зубов, гипоминерализация, задержка моторного развития, судороги, гиперкальциурия, невысокий рост, переломы костей, псевдопереломы и задержка роста.

Термин «нуклеиновая кислота» или «молекула нуклеиновой кислоты» означает полимерную молекулу, например, РНК или ДНК, имеющую последовательность из двух или более ковалентно связанных, встречающихся в природе или модифицированных нуклеотидов. Молекула нуклеиновой кислоты может быть, например, одноцепочечной или двухцепочечной и может содержать модифицированные или немодифицированные нуклеотиды или их смеси или комбинации. Также включены различные соли, смешанные соли и свободные кислотные формы молекул нуклеиновых кислот.

Под «лечением», «лечить» и «лечение» подразумевают медицинское ведение субъекта с намерением излечить, улучшить, стабилизировать, уменьшить вероятность или

предотвратить болезненное состояние, такое как НРР (например, детской, подростковой или взрослой НРР), или один или более ее симптомов, и/или ведение субъекта, у которого проявляются или могут быть болезненные состояния, такие как НРР, например, путем введения фармацевтической композиции (например, sALP, как описано в настоящем документе). Лечение (и другие используемые в данном документе формы) включает активное лечение, то есть лечение, направленное конкретно на улучшение или связанное с излечением заболевания, патологического состояния, расстройства или явления, а также включает причинно-следственную терапию, то есть лечение, направленное на устранение причины сопутствующего заболевания, патологического состояния, расстройства или явления. Кроме того, этот термин включает паллиативное лечение, то есть лечение, предназначенное для облегчения или улучшения по меньшей мере одного симптома, а не для излечения болезни, патологического состояния, расстройства или явления; симптоматическое лечение, то есть лечение, направленное на конституциональные симптомы ассоциированного заболевания, патологического состояния, расстройства или события; профилактическое лечение, то есть лечение, направленное на минимизацию или частичное или полное торможение развития ассоциированного заболевания, патологического состояния, расстройства или явления, например, у субъекта, который еще не болен, но подвержен или иным образом находится в стадии риска конкретного заболевания, патологического состояния, расстройства или явления; и поддерживающее лечение, то есть лечение, применяемое в дополнение к другой конкретной терапии, направленной на улучшение ассоциированного заболевания, патологического состояния, расстройства или явления.

Термины «пептид», «полипептид» и «белок» используются взаимозаменяемо и относятся к любой цепи из двух или более природных или не природных аминокислотных остатков, независимо от посттрансляционной модификации (например, гликозилирования, сиакирования или фосфорилирования), составляющий весь или часть встречающегося в природе или не встречающегося в природе полипептида или пептида, как описано в настоящем документе.

Термины «sALP», «растворимая щелочная фосфатаза» и «внеклеточный домен щелочной фосфатазы» используются взаимозаменяемо (если в контексте не указано иное) для обозначения растворимой, немембранно-связанной щелочной фосфатазы или ее биологически активного фрагмента или варианта. sALP включают, например, щелочную фосфатазу, у которой отсутствует С-концевая сигнальная последовательность GPI, и ее дополнительные варианты и аналоги, которые сохраняют активность щелочной фосфатазы, например, способность гидролизовать PPi или другой природный или искусственный субстрат (субстраты). Сюда входят растворимые фрагменты, соответствующие внеклеточным доменам TNSALP, PALP, GLALP и IALP, а также их биологически активные фрагменты или варианты, если не указано иное. Зрелая sALP лишена мембранного якоря GPI и сигнального пептида, который расщепляется во время процессинга.

Термины «ALP» и «щелочная фосфатаза» относятся к природной щелочной фосфатазе, такой как TNSALP, PALP, GLALP и IALP, которая способна гидролизовать PPi или другие природные или искусственные субстраты.

Термин «фармацевтически приемлемый носитель» или «фармацевтически приемлемый эксципиент» означает носитель или эксципиент, который является физиологически приемлемым для субъекта, подвергающегося лечению, при сохранении терапевтических свойств соединения, с которым его вводят. Одним иллюстративным фармацевтически приемлемым носителем является физиологический раствор. Другие физиологически приемлемые носители и их составы известны специалистам в данной области и описаны, например, в Remington's Pharmaceutical Sciences (Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 22nd Ed., Allen, Ed. 2012).

Термин «фармацевтическая композиция» означает композицию, содержащую молекулу полипептида или нуклеиновой кислоты, как описано в настоящем документе, в составе с фармацевтически приемлемым наполнителем, и включает композиции, которые производятся или продаются с одобрения государственного регулирующего органа как часть терапевтического режима лечения или профилактики заболевания или явления у субъекта. Фармацевтические композиции могут быть приготовлены, например, для подкожного введения (например, в живот или бедро), внутривенного введения (например, в виде стерильного раствора, не содержащего эмболов в виде частиц, и в системе растворителей, пригодной для внутривенного введения), для перорального введения (например, таблетка, капсула, каплетта, желатиновая капсула или сироп) или любой другой состав, описанный в настоящем документе, например, в стандартной лекарственной форме.

Термин «субъект» означает млекопитающее, включая, но не ограничиваясь ими, человека или млекопитающего, отличного от человека, такого как крупный рогатый скот, лошадь, собака, овца или кошка.

Термин «терапевтически эффективное количество» означает количество полипептида или молекулы нуклеиновой кислоты, описанных в настоящем документе, достаточное для существенного лечения, предотвращения, отсрочки, подавления или купирования любого симптома заболевания или состояния, описанного в настоящем документе, в частности НРР. Терапевтически эффективное количество композиции, описанной в настоящем документе, может зависеть от тяжести заболевания, которое лечат, а также от состояния, массы и общего состояния субъекта и может быть определено специалистом в данной области с учетом таких факторов. Терапевтически эффективное количество композиции, описанной в настоящем документе, можно вводить субъекту в виде разовой дозы или в виде нескольких доз, вводимых в течение определенного периода времени.

Термины «общее содержание сиаловой кислоты» или «TSAC», используемые в данном документе, относятся к количеству сиаловой кислоты (углевода) на конкретной белковой молекуле. Оно выражается в виде молей сиаловой кислоты, включенной в моль

белка, или «моль/моль». Концентрацию TSAC измеряют в процессе очистки. Например, один из методов количественного определения TSAC заключается в том, что TSAC высвобождается из щелочной фосфатазы с помощью кислотного гидролиза, а высвобожденный TSAC впоследствии обнаруживается с помощью электрохимического обнаружения с использованием высокоэффективной анионообменной хроматографии с методом импульсного амперометрического обнаружения («HPLC-PAD»).

Термин «сиаловая кислота» обычно относится к N- или O-замещенным производным нейраминовой кислоты, моносахарида с девятиуглеродной цепью. Сиаловая кислота может также конкретно относиться к соединению N-ацетилнейраминовой кислоты и иногда обозначается аббревиатурой Neu5Ac или NANA. Присутствие сиаловой кислоты может влиять на абсорбцию, время полужизни в сыворотке и клиренс гликопротеинов из сыворотки, а также на физические, химические и иммуногенные свойства гликопротеина. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения сиаловая кислота, связанная со щелочными фосфатазами, например, ALP201, влияет на экспозицию *in vivo* и период полувыведения молекулы в физиологических условиях. В некоторых вариантах осуществления точный и предсказуемый контроль общего содержания сиаловой кислоты (TSAC) в щелочной фосфатазе служит атрибутом контроля качества.

В данном документе, когда последовательность полипептида или нуклеиновой кислоты упоминается как имеющая «идентичность последовательности по меньшей мере X%» с эталонной последовательностью, это означает, что по меньшей мере X процентов аминокислотных остатков или нуклеотидов в полипептиде или нуклеиновой кислоте идентичны эталонной последовательности, когда последовательности оптимально выровнены. Оптимальное выравнивание последовательностей можно определить различными способами, известными специалистам в данной области, например, алгоритмом выравнивания Смита-Уотермана (Smith et al., J. Mol. Biol. 147:195-7, 1981) и BLAST (Basic Local Alignment Search Tool; Altschul et al., J. Mol. Biol. 215: 403-10, 1990). Эти и другие алгоритмы выравнивания доступны с помощью общедоступного компьютерного программного обеспечения, такого как «Best Fit» (Smith and Waterman, Advances in Applied Mathematics, 482-489, 1981), включенного в GENEMATCHER PLUS™ (Schwarz and Dayhof, Atlas of Protein Sequence and Structure, Dayhoff, M. O., Ed., pp 353-358, 1979), BLAST, BLAST-2, BLAST-P, BLAST-N, BLAST-X, WU-BLAST-2, ALIGN, ALIGN-2, CLUSTAL или Megalign (DNASTAR). Кроме того, специалисты в данной области могут определить соответствующие параметры для измерения выравнивания, включая любые алгоритмы, необходимые для достижения оптимального выравнивания по длине сравниваемых последовательностей.

Слова «предпочтительный» и «предпочтительно» относятся к вариантам осуществления раскрытых соединений, композиций и способов, которые могут давать определенные преимущества при определенных обстоятельствах. Однако другие варианты осуществления также могут быть предпочтительными при тех же или других

обстоятельствах. Кроме того, перечисление одного или более предпочтительных вариантов осуществления не означает, что другие варианты осуществления не являются полезными, и использование этого термина не предназначено для исключения других вариантов осуществления из объема изобретения.

Для любого раскрытого в данном документе способа, который включает в себя отдельные этапы, этапы можно проводить в любом возможном порядке; также, при необходимости, любая комбинация двух или более этапов может быть проведена одновременно.

Приведенное выше краткое описание не предназначено для описания каждого раскрытого варианта осуществления или каждого варианта осуществления раскрытых соединений, композиций и способов. Нижеследующее описание более подробно иллюстрирует иллюстративные варианты осуществления. В нескольких местах заявки могут быть даны рекомендации в виде списков примеров, которые можно использовать в различных комбинациях. В каждом случае приведенный список служит только репрезентативной группой и не должен интерпретироваться как исключительный список.

Все заголовки предназначены для удобства читателя и не должны использоваться для ограничения смысла текста, следующего за заголовком, если только это не указано отдельно.

#### **КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ**

**Фиг. 1** представляет собой набор кривых насыщения, показывающих взаимосвязь повышения уровней PPI со скоростью гидролиза PPI для ALP201 (SEQ ID NO: 5; слева) и асфотазы-альфа (SEQ ID NO: 6; справа).

**Фиг. 2** представляет собой набор кривых насыщения, показывающих взаимосвязь повышения уровня PLP со скоростью гидролиза PLP для ALP201 (слева) и асфотазы альфа (справа).

**Фиг. 3** представляет собой график, показывающий концентрации активного фермента щелочной фосфатазы в плазме мышей Akr2GW (-/-) в конце исследования в зависимости от группы дозирования. Сокращения: q1w=один раз в неделю; q2d=один раз в 2 дня; qd=один раз в день.

**Фиг. 4** представляет собой график, показывающий уровни активности щелочной фосфатазы в ткани бедренной кости мышей на 36/37 день окончания исследования. Сокращения: q2d=один раз в 2 дня; qd=один раз в день.

**Фиг. 5** представляет собой набор репрезентативных кривых выживания для мышей Akr2GW (-/-), получавших ALP201 и асфотазу альфа, в 36-дневных исследованиях эффективности. Сокращения: MED=минимальная эффективная доза; PBS=фосфатно-солевой буфер; q1w=один раз в неделю; q2d=один раз в 2 дня; qd=один раз в день.

**Фиг. 6** представляет собой график, показывающий сравнение результатов моделирования доза-ответ ALP201 и асфотазы альфа. Сокращения: ALP=щелочная фосфатаза; D-R=ответ на дозу; MED=минимальная эффективная доза; ROC=подтверждение концепции.

**Фиг. 7** представляет собой график, показывающий смоделированные профили концентрации человеческого ALP201 в зависимости от времени для каждой когорты первых пациентов (FII). Серая область представляет 90-процентный интервал предсказания, т. е. диапазон от 5 до 95%; черная сплошная линия - медиана смоделированных профилей концентрация-время; LLOQ - горизонтальная пунктирная линия для ФК-анализа; Сокращения: LLOQ=нижний предел количественного определения (0,15 мкг/мл).

**Фиг. 8А и 8В** представляют собой графики, показывающие профили зависимости средней (SD) активной концентрации ALP201 в плазме от времени после внутривенного (Фиг. 8А) и подкожного (Фиг. 8В) введения самцам мышей C57BL/6.

**Фиг. 9А и 9В** представляют собой графики, показывающие среднюю (SD) активную концентрацию ALP201 в плазме в зависимости от времени для ALP201 (партия с TSAC=5,9) после внутривенного введения (Фиг. 9А) и подкожного (Фиг. 9В) введения самцам мышей C57BL/6.

**Фиг. 10А и 10В** представляют собой графики, показывающие среднюю (SD) активную концентрацию ALP201 в плазме в зависимости от времени для ALP201 (партия с TSAC=5,0) после внутривенного введения (Фиг. 10А) и подкожного (Фиг. 10В) введения самцам мышей C57BL/6.

**Фиг. 11А и 11В** представляют собой графики, показывающие среднюю (SD) активную концентрацию ALP201 в плазме в зависимости от времени для ALP201 (партия с TSAC=3,2) после внутривенного введения (Фиг. 11А) и подкожного (Фиг. 11В) введения самцам мышей C57BL/6.

**Фиг. 12** представляет собой график, показывающий зависимость средней (SD) активной концентрации ALP201 в плазме от времени для значений TSAC ALP201 (3,2, 5,0 и 5,9) после внутривенного введения самцам мышей C57BL/6.

**Фиг. 13** представляет собой график, показывающий зависимость средней (SD) активной концентрации ALP201 в плазме от времени для вариантов ALP201 TSAC после подкожного введения самцам мышей C57BL/6.

**Фиг. 14** представляет собой график, показывающий сравнение средней ( $\pm$ SD) концентрации ALP201 и асфотазы альфа в плазме в зависимости от временных профилей после однократного внутривенного и подкожного введения крысам. Сокращения: в/в=внутривенно; п/к=подкожно, SD=стандартное отклонение. Исходные данные асфотазы альфа: объединение по полу, внутривенно и подкожно в дозе 3 мг/кг.

**Фиг. 15** представляет собой график, показывающий сравнение средней ( $\pm$ SD) концентрации ALP201 и асфотазы альфа в плазме в зависимости от временных профилей после однократного внутривенного и подкожного введения обезьянам.

**Фиг. 16** представляет собой график, показывающий сравнение ALP201 и моделирования зависимости от дозы асфотазы альфа (STRENSIQ®). Сокращения: ALP=щелочная фосфатаза; D-R=ответ на дозу; MED=минимальная эффективная доза;

РОС=подтверждение концепции.

### **ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ**

В данном документе раскрыты полипептиды растворимой щелочной фосфатазы (например, те, которые имеют последовательность SEQ ID NO: 5 и ее варианты с идентичностью последовательности до 80% или более, в которых полипептиды содержат одну, две или все три мутации, выбранные из E108M, N213Q и N286Q SEQ ID NO: 5), их фрагменты и их слитые белки, молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие их, и способы применения полипептидов и молекул нуклеиновых кислот для лечения заболевания, такого как нарушение минерализации костей, например, гипофосфатазии (HPP) или одного или более ее симптомов. Полипептиды включают растворимую щелочную фосфатазу (sALP) или ее фрагмент, который получен из встречающейся в природе щелочной фосфатазы (ALP). Щелочные фосфатазы включают различные изоферменты, которые по-разному экспрессируются в разных тканях. Четыре основных изофермента ALP включают тканевую неспецифическую щелочную фосфатазу (TNSALP), плацентарную щелочную фосфатазу (PALP), щелочную фосфатазу зародышевой линии (GLALP) и кишечную щелочную фосфатазу (IALP). Соответственно, представлены белки, полученные из этих изоферментов ALP.

Описанные в данном документе полипептиды входят в состав фармацевтических композиций, содержащих, например, один или более из фосфата, пролина и сахарозы. Эти компоненты придают полипептиду полезные свойства, такие как улучшенная стабильность, пониженная агрегация, уменьшение количества укороченных белковых продуктов и повышенная чистота желаемых белковых продуктов в составе.

HPP - редкое наследственное заболевание скелета с частотой 1 случай на 100 000 рождений при наиболее тяжелых формах заболевания. Расстройство обычно возникает в результате мутаций с потерей функции в гене, кодирующем TNSALP HPP демонстрирует замечательный диапазон симптомов и степени тяжести, от преждевременной потери зубов до почти полного отсутствия минерализации костей в утробе матери. Представление HPP заметно различается среди субъектов, а также заметно различается в зависимости от возраста субъектов. У многих пациентов с HPP наблюдаются изменения скелета, низкий рост, хронические боли, болезненность нижних конечностей, нарушение походки и преждевременная атравматическая потеря зубов. Из-за мутации с потерей функции в эндогенном TNSALP субъекту с HPP требуется функциональная активность полипептидов ALP, описанных в настоящем документе, для восстановления нативной активности ALP и обеспечения нормальной минерализации костного матрикса.

### **Растворимые полипептиды щелочной фосфатазы**

Описанные в данном документе полипептиды включают растворимую щелочную фосфатазу (sALP), такую как мутантная тканеспецифическая щелочная фосфатаза (TNSALP) или ее фрагмент. sALP может быть слит с Fc-областью и полиаспаратом с последовательностью n («Dn», где n равно, например, 3-20) (sALP-Fc-Dn). Полипептид может включать TNSALP человека, такой как растворимый фрагмент TNSALP человека

(например, остатки 1-491 или 1-485 SEQ ID NO: 1). Полипептид может содержать одну, две или все три мутации E108M, N213Q и/или N286Q относительно SEQ ID NO: 1. Например, sALP может иметь по меньшей мере 80% (например, по меньшей мере 85%, 90%, 95%, 97%, 99% или 100%) идентичности с SEQ ID NO: 2 или 3. Fc-область может быть областью Fc IgG2/4. Например, область Fc может иметь по меньшей мере 80% (например, по меньшей мере 85%, 90%, 95%, 97%, 99% или 100%) идентичности с SEQ ID NO: 4. Полиаспартат может содержать, например, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 остатков аспартата. В некоторых вариантах осуществления полиаспартат содержит десять остатков аспартата (D10). В некоторых вариантах осуществления полипептид по меньшей мере на 80% (например, по меньшей мере на 85%, 90%, 95%, 97%, 99% или 100%) идентичен SEQ ID NO: 5. Например, полипептид может содержать или состоять из полипептида SEQ ID NO: 5. Полипептид может состоять из SEQ ID NO: 5.

В некоторых вариантах осуществления участок полипептида, содержащий щелочную фосфатазу, имеет по меньшей мере 80% (например, по меньшей мере 85%, 90%, 95%, 97%, 99% или 100%) идентичности с последовательностью SEQ ID NO: 3. Этот полипептид может быть дополнительно связан с Fc-областью (например, Fc-областью IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4) и/или полиаспартатной областью. В некоторых вариантах осуществления полипептид содержит Fc-область IgG2/4, например, имеющую по меньшей мере 80% (например, по меньшей мере 85%, 90%, 95%, 97%, 99% или 100%) идентичности с SEQ ID NO: 4. Полиаспартат может содержать, например, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 остатков аспартата. В некоторых вариантах осуществления полиаспартат содержит десять остатков аспартата (D10).

SEQ ID NO: 1 - человеческий TNSALP без сигнального пептида (UniProt P05186.4)

LVPEKEKDPKYWRDQAQETLKYALELQKLNTNVAKNVIMFLGDGMGVSTVTA  
ARILKGGLEHNPGEETRLEMDKFPFVALSKTYNTNAQVPDSAGTATAYLCGVKANEGT  
VGVSAATERSRCNTTQGNEVTSILRWAKDAGKSVGIVTTTRVNHATPSAAAYHSADR  
WYSDNEMPPEALSQGCKDIAYQLMHNIRDIDVIMGGGRKYMYPKNKTDVEYESDEKA  
RGTRLDGLDLVDTWKSFKPRYKHSFIWNRTELLTDPHNVDYLLGLFEPGDMQYELN  
RNNVTDPSLSEMVVVAIQILRKNPKGFFLLVEGGRIDHGHHEGKAKQALHEAVEMDRAI  
GQAGSLTSSEDTLTVVTADHSHVFTFGGYTPRGNSIFGLAPMLSDDTKKPFTAILYGNP  
GYKVVGGERENVSMVDYAHNNYQAQSAVPLRHETHGGEDVAVFSKGPMAHLLHGVH  
EQNYVPHVMAYAACIGANLGHCAPASSAGSLAAGPLLLALALYPLSVLF

SEQ ID NO: 2 - TNSALP человека (1-485; E108M, N213Q, N286Q)

LVPEKEKDPKYWRDQAQETLKYALELQKLNTNVAKNVIMFLGDGMGVSTVTA  
ARILKGGLEHNPGEETRLEMDKFPFVALSKTYNTNAQVPDSAGTATAYLCGVKANMGT  
VGVSAATERSRCNTTQGNEVTSILRWAKDAGKSVGIVTTTRVNHATPSAAAYHSADR  
WYSDNEMPPEALSQGCKDIAYQLMHNIRDIDVIMGGGRKYMYPKQKTDVEYESDEKA  
RGTRLDGLDLVDTWKSFKPRYKHSFIWNRTELLTDPHNVDYLLGLFEPGDMQYELN  
RNQVTDPSLSEMVVVAIQILRKNPKGFFLLVEGGRIDHGHHEGKAKQALHEAVEMDRAI  
GQAGSLTSSEDTLTVVTADHSHVFTFGGYTPRGNSIFGLAPMLSDDTKKPFTAILYGNP

GYKVVGGERENVSMVDYAHNNYQAQSAVPLRHETHGGEDVAVFSKGPMHLLHGVH  
EQNYVPHVMAYAACIGANLGHCAPASS

SEQ ID NO: 3 - TNSALP человека (1-491; E108M, N213Q, N286Q)

LVPEKEKDPKYWRDQAQETLKYALELQKLNTNVAKNVIMFLGDGMGVSTVTA  
ARILKGQLHHNPGEETRLEMDKFPFVALSKTYNTNAQVPDSAGTATAYLCGVKANMGT  
VGVSAATERSRCNTTQGNEVTSILRWAKDAGKSVGIVTTTRVNHATPSAAYAHSADR  
WYSDNEMPPEALSQGCKDIAYQLMHNIRDIDVIMGGGRKMYPKQKTDVEYESDEKA  
RGTRLDGLDLVDTWKSFKPRYKHSFIWNRTELLTLDPHNVDYLLGLFEPGDMQYELN  
RNQVTDPSLSEMVVVAIQILRKNPKGFFLLVEGGRIDHGHHEGKAKQALHEAVEMDRAI  
GQAGSLTSSSEDTLTVVTADHSHVFTFGGYTPRGNISIFGLAPMLSDTDKKPFTAILYGNGP  
GYKVVGGERENVSMVDYAHNNYQAQSAVPLRHETHGGEDVAVFSKGPMHLLHGVH  
EQNYVPHVMAYAACIGANLGHCAPASSAGSLAA

SEQ ID NO: 4 - Fc IgG2/4

VECPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYV  
DGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISK  
AKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV  
LDSGDSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHLEALHNHYTQKSLSLGLGK

SEQ ID NO: 5 - ALP201

LVPEKEKDPKYWRDQAQETLKYALELQKLNTNVAKNVIMFLGDGMGVSTVTA  
ARILKGQLHHNPGEETRLEMDKFPFVALSKTYNTNAQVPDSAGTATAYLCGVKANMGT  
VGVSAATERSRCNTTQGNEVTSILRWAKDAGKSVGIVTTTRVNHATPSAAYAHSADR  
WYSDNEMPPEALSQGCKDIAYQLMHNIRDIDVIMGGGRKMYPKQKTDVEYESDEKA  
RGTRLDGLDLVDTWKSFKPRYKHSFIWNRTELLTLDPHNVDYLLGLFEPGDMQYELN  
RNQVTDPSLSEMVVVAIQILRKNPKGFFLLVEGGRIDHGHHEGKAKQALHEAVEMDRAI  
GQAGSLTSSSEDTLTVVTADHSHVFTFGGYTPRGNISIFGLAPMLSDTDKKPFTAILYGNGP  
GYKVVGGERENVSMVDYAHNNYQAQSAVPLRHETHGGEDVAVFSKGPMHLLHGVH  
EQNYVPHVMAYAACIGANLGHCAPASSAGSLAAVECPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDT  
LMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTV  
LHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTC  
LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGDSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCS  
VMHEALHNHYTQKSLSLGLGKDDDDDDDDDD

SEQ ID NO: 6 - асфотаза альфа

LVPEKEKDPKYWRDQAQETLKYALELQKLNTNVAKNVIMFLGDGMGVSTVTA  
ARILKGQLHHNPGEETRLEMDKFPFVALSKTYNTNAQVPDSAGTATAYLCGVKANEGT  
VGVSAATERSRCNTTQGNEVTSILRWAKDAGKSVGIVTTTRVNHATPSAAYAHSADR  
WYSDNEMPPEALSQGCKDIAYQLMHNIRDIDVIMGGGRKMYPKNKTDVEYESDEKA  
RGTRLDGLDLVDTWKSFKPRYKHSFIWNRTELLTLDPHNVDYLLGLFEPGDMQYELN  
RNNVTDPSLSEMVVVAIQILRKNPKGFFLLVEGGRIDHGHHEGKAKQALHEAVEMDRAI  
GQAGSLTSSSEDTLTVVTADHSHVFTFGGYTPRGNISIFGLAPMLSDTDKKPFTAILYGNGP  
GYKVVGGERENVSMVDYAHNNYQAQSAVPLRHETHGGEDVAVFSKGPMHLLHGVH

EQNYVPHVMAYAACIGANLGHС

APASSLKDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKDIDDDDDDDDDDD

### **Общее содержание сиаловой кислоты**

Как описано в настоящем документе, TSAC может влиять на период полувыведения рекомбинантной щелочной фосфатазы в физиологических условиях. Таким образом, уровень TSAC может служить качественным признаком рекомбинантно-производимых щелочных фосфатаз, таких как, например, ALP201. Контроль диапазона TSAC во время производства полипептида может улучшить воспроизводимость от партии к партии и снизить гетерогенность получаемых полипептидов. В некоторых вариантах осуществления TSAC составляет от около 0,8 моль/моль до около 8,0 моль/моль рекомбинантной щелочной фосфатазы. В некоторых вариантах осуществления TSAC составляет от около 0,9 моль/моль до около 7,0 моль/моль рекомбинантной щелочной фосфатазы. В некоторых вариантах осуществления TSAC составляет от около 1,0 моль/моль до около 6,0 моль/моль рекомбинантной щелочной фосфатазы. В некоторых вариантах осуществления TSAC составляет от около 1,2 моль/моль до около 6,0 моль/моль рекомбинантной щелочной фосфатазы. В некоторых вариантах осуществления TSAC составляет от около 1,5 моль/моль до около 6,0 моль/моль рекомбинантной щелочной фосфатазы. В некоторых вариантах осуществления TSAC составляет от около 2,0 моль/моль до около 6,0 моль/моль рекомбинантной щелочной фосфатазы. В некоторых вариантах осуществления TSAC составляет от около 3,2 моль/моль до около 5,9 моль/моль рекомбинантной щелочной фосфатазы. В некоторых вариантах осуществления TSAC составляет около 0,9 моль/моль, около 1,0 моль/моль, около 1,1 моль/моль, около 1,2 моль/моль, около 1,3 моль/моль, около 1,4 моль/моль, около 1,5 моль/моль, около 1,6 моль/моль, около 1,7 моль/моль, около 1,8 моль/моль, около 1,9 моль/моль, около 2,0 моль/моль, около 2,1 моль/моль, около 2,2 моль/моль, около 2,3 моль/моль, около 2,4 моль/моль, около 2,5 моль/моль, около 2,6 моль/моль, около 2,7 моль/моль, около 2,8 моль/моль, около 2,9 моль/моль, около 3,0 моль/моль, около 3,1 моль/моль, около 3,2 моль/моль, около 3,3 моль/моль, около 3,4 моль/моль, около 3,5 моль/моль, около 3,6 моль/моль, около 3,7 моль/моль, около 3,8 моль/моль, около 3,9 моль/моль, около 4,0 моль/моль, около 4,1 моль/моль, около 4,2 моль/моль, около 4,3 моль/моль, около 4,4 моль/моль, около 4,5 моль/моль, около 4,6 моль/моль, около 4,7 моль/моль, около 4,8 моль/моль, около 4,9 моль/моль, около 5,0 моль/моль, около 5,1 моль/моль, около 5,2 моль/моль, около 5,3 моль/моль, около 5,4 моль/моль, около 5,5 моль/моль, около 5,6 моль/моль, около 5,7 моль/моль, около 5,8 моль/моль, около 5,9 моль/моль или около 6,0 моль/моль рекомбинантной щелочной фосфатазы. В некоторых вариантах осуществления TSAC составляет около 3,2 моль/моль рекомбинантной щелочной фосфатазы. В

некоторых вариантах осуществления TSAC составляет около 5,0 моль/моль рекомбинантной щелочной фосфатазы. В некоторых вариантах осуществления TSAC составляет около 5,9 моль/моль рекомбинантной щелочной фосфатазы.

#### **Фармацевтические композиции**

Полипептид, описанный в настоящем документе (например, полипептид, имеющий последовательность SEQ ID NO: 5 или ее вариант с по меньшей мере 85% идентичности последовательности с ней (например, полипептид, который содержит одну или более или все мутации E108M, N213Q и N286Q относительно SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 5)) могут быть составлены в виде фармацевтической композиции различными способами, известными в данной области.

Композиция может содержать одно или более или все из фосфата, пролина и сахарозы. Композиция может содержать, например, фосфат и сахарозу. Например, композиция может содержать фосфат (например, фосфат натрия) в концентрации, например, от около 1 мМ до около 100 мМ или от около 5 мМ до около 20 мМ фосфата, например, около 2 мМ, 3 мМ, 4 мМ, 5 мМ, 6 мМ, 7 мМ, 8 мМ, 9 мМ, 10 мМ, 20 мМ, 30 мМ, 40 мМ, 50 мМ, 60 мМ, 70 мМ, 80 мМ, 90 мМ или 100 мМ, или, например, около 10 мМ. Композиция может дополнительно содержать пролин и/или сахарозу. Композиция может дополнительно содержать пролин. Композиция может дополнительно содержать сахарозу. Например, композиция может содержать от около 1 мМ до около 500 мМ пролина, например, от около 70 мМ до около 280 мМ, например, от около 50 мМ до около 200 мМ, например, около 2 мМ, 3 мМ, 4 мМ, 5 мМ, 6 мМ, 7 мМ, 8 мМ, 9 мМ, 10 мМ, 20 мМ, 30 мМ, 40 мМ, 50 мМ, 60 мМ, 70 мМ, 80 мМ, 90 мМ, 100 мМ, 110 мМ, 120 мМ, 130 мМ, 140 мМ, 150 мМ, 160 мМ, 170 мМ, 180 мМ, 190 мМ, 200 мМ, 300 мМ, 400 мМ, или 500 мМ, например, около 140 мМ пролина и/или от около 1 мМ до около 500 мМ сахарозы, например, от около 70 мМ до около 280 мМ, например, от около 50 мМ до около 200 мМ, например, около 2 мМ, 3 мМ, 4 мМ, 5 мМ, 6 мМ, 7 мМ, 8 мМ, 9 мМ, 10 мМ, 20 мМ, 30 мМ, 40 мМ, 50 мМ, 60 мМ, 70 мМ, 80 мМ, 90 мМ, 100 мМ, 110 мМ, 120 мМ, 130 мМ, 140 мМ, 150 мМ, 160 мМ, 170 мМ, 180 мМ, 190 мМ, 200 мМ, 210 мМ, 220 мМ, 230 мМ, 240 мМ, 250 мМ, 260 мМ, 270 мМ, 280 мМ, 290 мМ, 300 мМ, 350 мМ, 400 мМ, 450 мМ или 500 мМ, например, около 140 мМ сахарозы или около 210 мМ сахарозы. В некоторых вариантах осуществления композиция содержит молярное соотношение пролин:сахароза от около 1:0 до около 1:3, например, около 1:1. В некоторых вариантах осуществления композиция содержит около 140 мМ пролина. В некоторых вариантах осуществления состав содержит около 140 мМ сахарозы. В некоторых вариантах осуществления состав содержит около 210 мМ сахарозы. В некоторых вариантах осуществления состав содержит около 210 мМ сахарозы и не содержит пролин. В некоторых вариантах осуществления композиция содержит около 210 мМ сахарозы и около 10 мМ фосфата (например, фосфата натрия). Состав может дополнительно содержать от около 0,01% до около 0,5%, например, от около 0,01% до около 0,1%, например, около 0,05% полиоксиэтилен(20)сорбитанмоноолеата (например, полисорбат 80

(PS80)). В некоторых вариантах осуществления композиция приготовлена при pH от около pH 7,0 до около pH 7,6 (например, около pH 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5 или 7,6, например, около 7,3). В некоторых вариантах осуществления композиция содержит около 10 mM фосфата, около 140 mM пролина, около 140 mM сахарозы и около 0,05% полиоксиэтилен(20)сорбитанмоноолеата (например, PS80) при pH около 7,3.

Композиция может быть приготовлена в виде раствора, содержащего полипептид в количестве, например, от около 0,1 мг/мл до около 200 мг/мл, например, около 100 мг/мл. Композиция может быть приготовлена для внутривенного или подкожного введения, например, в дозе полипептида от около 0,1 мг/мл до около 10 мг/мл. Композиция может быть приготовлена в виде раствора в объеме от около 0,1 мл до около 50 мл (например, от около 0,1 до около 10 мл, например, около 0,1 мл, 0,2 мл, 0,3 мл, 0,4 мл, 0,5 мл, 0,6 мл, 0,7 мл, 0,8 мл, 0,9 мл или 1,0 мл, например, от около 1 мл до около 10 мл, например, около 2 мл, 3 мл, 4 мл, 5 мл, 6 мл, 7 мл, 8 мл, 9 мл, или 10 мл). В некоторых вариантах осуществления композиция может быть приготовлена в объеме около 1 мл.

В настоящем изобретении также предложен флакон, содержащий фармацевтическую композицию, описанную в настоящем документе. Флакон может содержать раствор в объеме, например, от около 0,1 мл до около 10 мл (например, около 1 мл). Флакон может содержать полипептид в количестве, например, от около 0,1 мг/мл до около 500 мг/мл, например, от около 1 мг/мл до около 200 мг/мл, например, от около 50 мг/мл до около 150 мг/мл, например, около 100 мг/мл полипептида (например, полипептида SEQ ID NO: 5 или варианта, имеющего по меньшей мере 85% идентичности последовательности).

Например, флакон может содержать объем около 0,25 мл, около 0,5 мл, около 0,75 мл или около 1,0 мл раствора, содержащего полипептид SEQ ID NO: 5 в концентрации от около 50 до около 100 мг/мл, в котором раствор содержит около 10 mM фосфата, около 140 mM пролина, около 140 mM сахарозы и около 0,05% полиоксиэтилен(20)сорбитанмоноолеата (например, PS80) при pH около 7,3.

#### *Составы*

Композиции, содержащие sALP и слитые полипептиды sALP (например, полипептид, имеющий последовательность SEQ ID NO: 5, или ее вариант с по меньшей мере 85% идентичностью последовательности (например, полипептид, который содержит одну или более или все мутации E108M, N213Q и N286Q относительно SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 5)) могут быть приготовлены в соответствии со стандартными методами. Например, композиция sALP может быть приготовлена, например, в виде забуференного раствора с подходящей концентрацией и пригодной для хранения при 2-8 °C (например, 4 °C). Композиция sALP также может быть приготовлена для хранения при температуре ниже 0 °C (например, -20 °C или -80 °C). Композицию sALP можно дополнительно приготовить для хранения до 2 лет (например, один месяц, два месяца, три месяца, четыре месяца, пять месяцев, шесть месяцев, семь месяцев, восемь месяцев, девять месяцев, 10 месяцев, 11 месяцев, 1 год, 1,5 года или 2 года) при 2-8 °C (например, 4 °C). Таким

образом, композиции, описанные в настоящем документе, могут быть приготовлены таким образом, чтобы они были стабильными при хранении в течение по меньшей мере 1 года при 2-8 °С (например, 4 °С). Композиция может быть приготовлена в подходящем объеме, например, в объеме от около 0,1 мл до около 10 мл.

Композиции, содержащие sALP и слитые полипептиды sALP (например, полипептид, имеющий последовательность SEQ ID NO: 5, или ее вариант с по меньшей мере 85% идентичностью последовательности (например, полипептид, который содержит одну или более или все мутации E108M, N213Q и N286Q относительно SEQ ID NO: 1 или 5)) может быть в жидкой форме.

Например, композиции, предназначенные для системной или местной доставки, могут быть в форме растворов для инъекций или инфузий. Соответственно, композиция sALP (например, композиция, содержащая полипептид, имеющий последовательность SEQ ID NO: 5, или ее вариант с по меньшей мере 85% идентичностью последовательности (например, полипептид, который содержит одну или более или все мутации E108M, N213Q и N286Q относительно SEQ ID NO: 1 или 5)) могут быть составлены для введения парентеральным способом (например, подкожной, внутривенной, внутривенной или внутримышечной инъекцией). «Парентеральное введение», «вводить парентерально» и другие грамматически эквивалентные фразы, используемые в данном документе, относятся к способам введения, отличным от энтерального и местного введения, как правило, путем инъекции, и включают в себя следующие, но не ограничиваются ими, подкожную интрадермальную, внутривенную, интраназальную, интраокулярную, легочную, внутримышечную, внутриартериальную, интратекальную, интракапсулярную, интраорбитальную, интракардиальную, внутрилегочную, внутривенную, транстрахеальную, субкутикулярную, внутрисуставную, субкапсулярную, субарахноидальную, внутриспинальную, эпидуральную, интрацеребральную, интракраниальную, интракаротидную и интрастернальную инъекции и инфузии. Конкретные способы введения включают внутривенное и подкожное введение.

Композицию можно приготовить в виде лиофилизированной композиции. Композицию можно регидратировать раствором (например, как описано в настоящем документе) перед введением.

#### *Дозировка*

Полипептид sALP (например, полипептид, имеющий последовательность SEQ ID NO: 5 или ее вариант с по меньшей мере 85% идентичностью последовательности с ней (например, полипептид, который содержит одну или более или все мутации E108M, N213Q, и N286Q относительно SEQ ID NO: 1)), описанные в настоящем документе, можно вводить субъекту, имеющему или предрасположенному к нарушению минерализации костей, такому как НРР, в индивидуальных дозах в диапазоне, например, от 0,01 мг/кг до 500 мг/кг (например, от 0,05 мг/кг до 500 мг/кг, от 0,1 мг/кг до 60 мг/кг, от 0,1 мг/кг до 50 мг/кг, от 0,1 мг/кг до 20 мг/кг, от 5 мг/кг до 500 мг/кг, от 0,1 мг/кг до 100 мг/кг, от 10 мг/кг до 100 мг/кг, от 0,1 мг/кг до 50 мг/кг, 0,5 мг/кг до 25 мг/кг, 1,0 мг/кг до 10 мг/кг, 1,5 мг/кг

до 5 мг/кг, или 2,0 мг/кг до 3,0 мг/кг) или от 1 мкг/кг до 1,000 мкг/кг (например, от 5 мкг/кг до 1,000 мкг/кг, от 1 мкг/кг до 750 мкг/кг, от 5 мкг/кг до 750 мкг/кг, от 10 мкг/кг до 750 мкг/кг, от 1 мкг/кг до 500 мкг/кг, от 5 мкг/кг до 500 мкг/кг, от 10 мкг/кг до 500 мкг/кг, от 1 мкг/кг до 100 мкг/кг, от 5 мкг/кг до 100 мкг/кг, от 10 мкг/кг до 100 мкг/кг, от 1 мкг/кг до 50 мкг/кг, от 5 мкг/кг до 50 мкг/кг, или от 10 мкг/кг до 50 мкг/кг).

Примеры доз sALP включают, например, 0,01, 0,05, 0,1, 0,5, 1, 2, 2,5, 5, 10, 20, 25, 50, 100, 125, 150, 200, 250 или 500 мг/кг; или 1, 2, 2,5, 5, 10, 20, 25, 50, 100, 125, 150, 200, 250, 500, 750, 900 или 1000 мкг/кг. Для всех дозировок или диапазонов, указанных в настоящем документе, термин «около» может использоваться для изменения этих дозировок на  $\pm 10\%$  от указанных значений или предельных значений диапазона. В частности, композиции (например, полипептид, имеющий последовательность SEQ ID NO: 5 или ее вариант с по меньшей мере 85% идентичностью последовательности с ней (например, полипептид, который содержит одну или более или все мутации E108M, N213Q и N286Q относительно SEQ ID NO: 1 или 5)) в соответствии с настоящим изобретением можно вводить субъекту в дозах от около 0,001 мг/кг/день до около 500 мг/кг/день, около 0,01 мг/кг/день до около 100 мг/кг/день или от около 0,01 мг/кг/день до около 20 мг/кг/день. Например, композиции sALP (например, полипептид, имеющий последовательность SEQ ID NO: 5, или ее вариант с по меньшей мере 85% идентичностью последовательности (например, полипептид, который содержит одну или более или все мутации E108M, N213Q и N286Q относительно SEQ ID NO: 1 или 5)) можно вводить субъекту в недельной дозе, например, от около 0,5 мг/кг/неделю до около 140 мг/кг/неделю, например, от около 0,8 мг/кг/неделю до около 50 мг/кг/неделю или от около 1 мг/кг/неделю до около 10 мг/кг/неделю (например, около 6 или около 9 мг/кг/неделю). В частности, sALP можно вводить один или более раз в неделю (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или более раз в неделю), один или более раз в две недели или один или более раз в месяц (например, один раз в 14 дней, 15 дней, 16 дней, 17 дней, 18 дней, 19 дней, 20 дней, 21 день, 22 дня, 23 дня, 24 дня, 25 дней, 26 дней, 27 дней, 28 дней, 29 дней или 30 дней). В некоторых вариантах осуществления состав вводят один раз в неделю. В некоторых вариантах осуществления состав вводят один раз каждые две недели.

В частности, sALP (например, полипептид, имеющий последовательность SEQ ID NO: 5 или ее вариант с по меньшей мере 85% идентичности последовательности с ней (например, полипептид, который содержит одну или более или все мутации E108M, N213Q и N286Q относительно SEQ ID NO: 1 или 5)) можно вводить в дозе 2 мг/кг три раза в неделю (общая доза 6 мг/кг/неделю), 1 мг/кг шесть раз в неделю (общая доза 6 мг/кг/неделя), 3 мг/кг три раза в неделю (общая доза 9 мг/кг/неделя), 0,5 мг/кг три раза в неделю (общая доза 1,5 мг/кг/неделю) или 9,3 мг/кг три раза в неделю (общая доза 28 мг/кг/нед). Дозировка может быть адаптирована клиницистом в соответствии с общепринятыми факторами, такими как степень заболевания и различные параметры субъекта, имеющего или предрасположенного к нарушению минерализации костей, такому как НРР. Альтернативно, от около 0,1 мг/кг до около 20 мг/кг (например, от около

0,1 мг/кг до около 9 мг/кг) можно вводить один раз в неделю или один раз каждые две недели. Композицию sALP также можно вводить 1-10 раз (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 и 10) в неделю или две недели в дозе 1-90 мг на дозу (например, в объеме от 0,1 мл до 100 мл). В некоторых вариантах осуществления композицию sALP вводят один раз в неделю. В некоторых вариантах осуществления композицию sALP вводят один раз каждые две недели.

Композиция, содержащая sALP или слитый полипептид sALP (например, полипептид, имеющий последовательность SEQ ID NO: 5, или ее вариант с по меньшей мере 85% идентичностью последовательности (например, полипептид, который содержит одну или более или все мутации E108M, N213Q и N286Q относительно SEQ ID NO: 1 или 5)) можно вводить субъекту либо по схеме однократного дозирования, либо по схеме многократного дозирования. Дозы можно вводить, например, один раз в час, один раз в два часа, один раз в день, два раза в день, два раза в неделю, три раза в неделю, четыре раза в неделю, пять раз в неделю, шесть раз в неделю, один раз в неделю, один раз в две недели, один раз в месяц, один раз в два месяца или один раз в год. В качестве альтернативы можно вводить дозы, например, два, три раза, четыре раза, пять раз, шесть раз, семь раз, восемь раз, девять раз, десять раз, одиннадцать раз или двенадцать раз в день, неделю или месяц. В частности, режим дозирования составляет один, два или три раза в неделю. Продолжительность режима дозирования может составлять, например, 1, 2, 3, 4, 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 дней, недель или месяцев или даже в течение оставшейся жизни субъекта, имеющего или склонного к нарушению минерализации костей, такому как HPP. Количество, частота и продолжительность дозирования могут быть адаптированы клиницистом в соответствии с общепринятыми факторами, такими как степень заболевания и различные параметры субъекта, имеющего или предрасположенного к нарушению минерализации костей, такому как HPP.

Например, дозирование sALP или слитого полипептида sALP (например, полипептида, имеющего последовательность SEQ ID NO: 5, или ее варианта с по меньшей мере 85% идентичностью последовательности (например, полипептид, который содержит одну или более или все мутации E108M, N213Q и N286Q относительно SEQ ID NO: 1 или 5)) могут составлять от около 0,1 мг/кг массы тела до около 10 мг/кг массы тела, вводимых подкожно или внутривенно, один или более (например, 2, 3, 4, 5, 6 или 7) раз в неделю.

В некоторых конкретных вариантах осуществления полипептид (например, полипептид, имеющий последовательность SEQ ID NO: 5, или ее вариант с по меньшей мере 85% идентичностью последовательности (например, полипептид, который содержит одну или более или все мутации E108M, N213Q и N286Q относительно SEQ ID NO: 1 или 5)) или фармацевтическую композицию, содержащую его, можно вводить в дозе от около 0,01 мг/кг до около 60 мг/кг (например, от примерно 0,1 мг/кг до около 50 мг/кг, например, от около 0,1 мг/кг до около 20 мг/кг, например, от около 0,1 мг/кг до около 10

мг/кг). Полипептид можно вводить один раз в день, неделю, месяц или год (например, один раз в неделю). В некоторых вариантах осуществления полипептид вводят один или более раз каждые 2, 3, 4, 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, 30 или 31 день. Полипептид можно вводить в дозе от около 0,01 мг/кг/неделю до около 50 мг/кг/неделю (например, от около 0,01 мг/кг/неделю до около 40 мг/кг/неделю, например, от около 0,1 мг/кг/неделю до около 20 мг/кг/неделю, например, от около 0,1 мг/кг/неделю до около 10 мг/кг/неделю). Полипептид можно вводить в течение по меньшей мере одного дня, одной недели, одного месяца, одного года или дольше (например, в течение 1-5 лет или в течение всей жизни субъекта).

В некоторых вариантах осуществления фармацевтическую композицию вводят подкожно. Например, от около 10 мг до около 100 мг (например, около 10 мг, 15 мг, 20 мг, 25 мг, 30 мг, 35 мг, 40 мг, 45 мг, 50 мг, 55 мг, 60 мг, 65 мг, 70 мг, 75 мг, 80 мг, 85 мг, 90 мг, 95 мг или 100 мг, например, около 15 мг, 45 мг или 90 мг) можно вводить субъекту подкожно, например, один или два раза в неделю, например, в течение по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более недель.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтическую композицию вводят внутривенно. Например, от около 10 мг до около 100 мг (например, около 10 мг, 15 мг, 20 мг, 25 мг, 30 мг, 35 мг, 40 мг, 45 мг, 50 мг, 55 мг, 60 мг, 65 мг, 70 мг, 75 мг, 80 мг, 85 мг, 90 мг, 95 мг или 100 мг, например, около 15 мг, 45 мг или 90 мг) можно вводить субъекту внутривенно, например, один или два раза в неделю, например, в течение по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более недель.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтическую композицию вводят внутривенно и подкожно. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическую композицию вводят внутривенно и подкожно одновременно. В некоторых вариантах осуществления композицию вводят внутривенно, а затем подкожно. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическую композицию вводят подкожно, а затем внутривенно. Например, фармацевтическую композицию можно вводить субъекту внутривенно в одной или более дозах (например, в разовой дозе), например, в виде нагрузочной дозы, а затем вводить субъекту один или более раз подкожно, например, в виде поддерживающей дозы (например, каждую дозу вводят примерно один раз в неделю в течение всего периода терапии).

### **Способы лечения**

В настоящем документе предложены способы лечения или облегчения по меньшей мере одного симптома у субъекта с нарушением минерализации костей, таким как НРР. Другие заболевания или расстройства, такие как перелом костей, остеопороз, склеростеоз, хондрокальциноз, гипотония, мышечная дистрофия Дюшенна, трахеобронхомаляция, судороги, нейрофиброматоз 1 (NF-1) и краниосиностоз, также можно лечить композициями и способами, описанными в настоящем документе. У субъекта может быть мышечная слабость. У субъекта может быть заболевание мышечной слабости, такое как отложение пирофосфата кальция (CPPD) или семейная гипофосфатемия. Такое лечение

может включать введение щелочной фосфатазы (например, фармацевтической композиции, содержащей щелочную фосфатазу) или полипептида, обладающего активностью щелочной фосфатазы, для снижения повышенной концентрации PPI у такого субъекта. Например, растворимая щелочная фосфатаза (sALP, например, полипептид, имеющий последовательность SEQ ID NO: 5, или ее вариант с по меньшей мере 85% идентичностью последовательности (например, полипептид, который содержит одну или более или все мутации E108M, N213Q и N286Q относительно SEQ ID NO: 1 или 5)) можно вводить новорожденным, младенцам, детям, подросткам или взрослым.

У субъектов может быть диагностировано нарушение минерализации костей (например, HPP) до введения щелочной фосфатазы или полипептида, обладающего активностью щелочной фосфатазы (например, sALP, например, полипептида, имеющего последовательность SEQ ID NO: 5, или ее вариант с по меньшей мере 85% идентичностью последовательности (например, полипептид, который содержит одну или более или все мутации E108M, N213Q и N286Q относительно SEQ ID NO: 1 или 5)). Кроме того, субъект, страдающий или предрасположенный к нарушению минерализации костей, такому как HPP, может быть ранее не получавшим лечения sALP (например, полипептидом, имеющим последовательность SEQ ID NO: 5, или ее вариантом с по меньшей мере 85% идентичностью последовательности (например, полипептидом, который содержит одну или более или все мутации E108M, N213Q и N286Q относительно SEQ ID NO: 1 или 5)).

Один или более симптомов заболевания могут впервые проявиться у субъекта в период новорожденности, младенца или ребенка. В других вариантах осуществления один или более симптомов заболевания могут впервые проявиться у субъекта во взрослом возрасте. В некоторых вариантах осуществления у субъекта до достижения им совершеннолетия не развиваются поддающиеся обнаружению симптомы заболевания. В некоторых вариантах осуществления обнаруживаемые симптомы заболевания развиваются у субъекта до достижения им совершеннолетия, но болезненное состояние остается недиагностированным до наступления совершеннолетия.

Способ включает введение щелочной фосфатазы или полипептида, обладающего активностью щелочной фосфатазы (например, sALP, например, полипептида, имеющего последовательность SEQ ID NO: 5, или ее вариантом с по меньшей мере 85% идентичностью последовательности (например, полипептидом, который содержит одну или более или все мутации E108M, N213Q и N286Q относительно SEQ ID NO: 1 или 5)) субъекту, имеющему или склонному к нарушению минерализации костей, такому как HPP, в однократной дозе или в многократных дозах в течение периода времени. В частности, sALP, такая как полипептид, имеющий последовательность SEQ ID NO: 5, можно вводить субъекту, у которого ранее было установлено, что у него повышена концентрация неорганического пирофосфата (PPI) или по меньшей мере один заранее определенный биомаркер/показатель для симптома HPP (например, мышечная слабость), например, средняя оценка силы BOT-2 менее 10, средняя оценка скорости бега и ловкости

ВОТ-2 менее 5, средняя оценка индекса CHAQ более чем около 0,8 и/или средняя оценка PODCI менее чем около 40, средняя 6MWT менее чем около 80% от прогнозируемого значения 6MWT, степени мышечной силы менее 5 и/или среднее значение HND (например, среднее значение HND мышцы или силы хвата), например, менее чем около 80% прогнозируемого значения HND. Например, sALP можно вводить субъекту, у которого предварительно определено, что концентрация PPi в образце (например, образце плазмы) превышает около 5,71 мкМ для младенца или ребенка (например, субъекту в возрасте около 12 лет или меньше); более около 4,78 мкМ для подростка (например, субъекта в возрасте от около 13 до около 18 лет); или более около 5,82 мкМ для взрослого человека (например, субъекта старше около 18 лет). В других вариантах осуществления нарушение минерализации костей, такое как HPP, описанное в настоящем документе, вызвано повышенной концентрацией по меньшей мере одного субстрата щелочной фосфатазы (например, PPi, PLP, PEA и т. д.). Альтернативно, щелочная фосфатаза или полипептид, обладающий активностью щелочной фосфатазы (например, sALP, например, полипептид, имеющий последовательность SEQ ID NO: 5, или ее вариантом с по меньшей мере 85% идентичностью последовательности (например, полипептидом, который содержит одну или более или все мутации E108M, N213Q и N286Q относительно SEQ ID NO: 1 или 5)) можно вводить субъекту, имеющему или предрасположенному к нарушению минерализации костей, такому как HPP, до определения показателя мышечной слабости (например, с использованием оценки силы ВОТ-2, оценки скорости бега и ловкости ВОТ-2, оценки индекса CHAQ, оценки по шкале BSID-III, стандартной оценки PDMS-2, оценки мышечной силы, значения 6MWT и/или значения HND). Лечение ALP в соответствии со способами, описанными в настоящем документе, способствует, например, повышению активности ADL, уменьшению боли и/или улучшению моторного развития.

Кроме того, каждая из описанных оценок (например, оценка силы ВОТ-2, оценка скорости бега и ловкости ВОТ-2, оценка индекса CHAQ, оценка по шкале BSID-III, стандартная оценка PDMS-2, 6MWT, 12- РОМА-G, модифицированная оценка подвижности, ориентированная на производительность (mРОМА-G, например, показанная в Phillips et al. 2015 Bone Abstracts 4:P136), или значение HND) субъекта, имеющего или предрасположенного к расстройству минерализации костей, такому как HPP, описанному в настоящем документе, может быть использовано по отдельности или в любой комбинации для оценки эффективности лечения с использованием sALP (например, полипептида, имеющего последовательность SEQ ID NO: 5 или ее вариант с по меньшей мере 85% идентичностью последовательности с ней (например, полипептид, который содержит одну или более или все мутации E108M, N213Q и N286Q относительно SEQ ID NO: 1 или 5)), в которых улучшения по сравнению с определенной тестовой оценкой демонстрируют, что sALP эффективен для лечения нарушения минерализации костей, такого как HPP.

Например, введение щелочной фосфатазы или полипептида, обладающего

активностью щелочной фосфатазы (например, sALP, например, полипептида, имеющего последовательность SEQ ID NO: 5, или ее варианта с по меньшей мере 85% идентичностью последовательности с ней (например, полипептид, который содержит одну или более или все мутации E108M, N213Q и N286Q относительно SEQ ID NO: 1 или 5)) у субъекта, имеющего или предрасположенного к нарушению минерализации костей, такому как HPP, приводит к среднему увеличению оценки силы BOD-2 до около 10 или выше около 10, при котором субъект ранее имел средний показатель силы BOD-2 менее чем около 10, затем лечение щелочной фосфатазой или полипептидом, обладающим активностью щелочной фосфатазы эффективен при лечении, например, физических нарушений, связанных с нарушением минерализации костей, таких как HPP. В качестве альтернативы, когда введение sALP не приводит к среднему увеличению оценки силы BOD-2 до около 10 или выше около 10, можно изменить дозировку и/или частоту введения щелочной фосфатазы или полипептида, обладающего активностью щелочной фосфатазы (например, повышенный, например, на неопределенный срок или на короткий срок (например, 1-6 месяцев или до одного года или более) для определения эффективного количества щелочной фосфатазы или полипептида, обладающего активностью щелочной фосфатазы, для субъекта. Например, дозировка sALP (например, полипептида, имеющего последовательность SEQ ID NO: 5, или ее варианта с по меньшей мере 85% идентичностью последовательности (например, полипептида, который содержит одну или более или все мутации E108M, N213Q и N286Q относительно SEQ ID NO: 1 или 5)) можно увеличить, например, с от около 0,1-1 мг/кг/неделю до около 1-2 мг/кг/неделю, от около 0,5-3 мг/кг/неделю до около 3-6 мг/кг/неделю или от около 3-6 мг/кг/неделю до около 6-9 мг/кг/неделю. Точно так же можно увеличить частоту дозирования, например, с около одного раза в три недели до около одного раза в две недели или с около одного раза в две недели до около одного раза в неделю. В качестве альтернативы, если достигается улучшение одного из показателей, описанных в настоящем документе, дозировка и/или частота введения могут оставаться прежними или уменьшаться, например, с от около 6-9 мг/кг/неделю до около 3-6 мг/кг/сут неделю, от около 3-6 мг/кг/неделю до около 0,5-3 мг/кг/неделю или от около 0,5-3 мг/кг/неделю до около 0,1-1 мг/кг/неделю. Точно так же частота введения дозы может уменьшаться с около одного раза в неделю до около одного раза в две недели или с около одного раза в две недели до около одного раза в три недели.

Кроме того, при введении щелочная фосфатаза или полипептид, обладающий активностью щелочной фосфатазы (например, sALP, например, полипептид, имеющий последовательность SEQ ID NO: 5, или ее варианта с по меньшей мере 85% идентичностью последовательности (например, полипептида, который содержит одну или более или все мутации E108M, N213Q и N286Q относительно SEQ ID NO: 1 или 5)) субъекту, имеющему или предрасположенному к нарушению минерализации костей, такому как HPP, приводит к улучшению категоризации мышечной силы субъекта по одному или более (например, улучшению до степени мышечной силы 1, 2, 3, 4 или 5 от

предыдущей, более низкой степени мышечной силы), в которой субъект ранее имел среднюю степень мышечной силы менее примерно 5, тогда лечение щелочной фосфатазой или полипептидом, обладающим активностью щелочной фосфатазы, является эффективным при лечении, например, физических нарушений, связанных с нарушением минерализации костей, таким как НРР. В качестве альтернативы, когда введение sALP не приводит к улучшению классификации субъекта по шкале мышечной силы по одной или более из предыдущих, более низких категорий по мышечной силе, дозировка и/или частота введения щелочной фосфатазы или полипептида, имеющего активностью щелочной фосфатазы может быть изменено (например, увеличено) для определения эффективного количества щелочной фосфатазы или полипептида, обладающего активностью щелочной фосфатазы, для субъекта. Например, дозировка sALP (например, полипептида, имеющего последовательность SEQ ID NO: 5, или ее варианта с по меньшей мере 85% идентичностью последовательности (например, полипептида, который содержит одну или более или все мутации E108M, N213Q и N286Q относительно SEQ ID NO: 1 или 5)) можно увеличить, например, с от около 0,1-1 мг/кг/неделю до около 1-2 мг/кг/неделю, от около 0,5-3 мг/кг/неделю до около 3-6 мг/кг/неделю или от около 3-6 мг/кг/неделю до около 6-9 мг/кг/неделю. Точно так же можно увеличить частоту дозирования, например, с около одного раза в три недели до около одного раза в две недели или с около одного раза в две недели до около одного раза в неделю. В качестве альтернативы, если достигается улучшение одного из показателей, описанных в настоящем документе, дозировка и/или частота введения могут оставаться прежними или уменьшаться, например, с от около 6-9 мг/кг/неделю до около 3-6 мг/кг/сут неделю, от около 3-6 мг/кг/неделю до около 0,5-3 мг/кг/неделю или от около 0,5-3 мг/кг/неделю до около 0,1-1 мг/кг/неделю. Точно так же частота введения дозы может уменьшаться с около одного раза в неделю до около одного раза в две недели или с около одного раза в две недели до около одного раза в три недели.

#### **Фармакокинетические (ФК) параметры**

В некоторых вариантах осуществления способ лечения обеспечивает  $AUC_{0-168ч}$  от около 50 мкг×час/мл до около 4000 мкг×час/мл в крови субъекта. Например, способ может обеспечивать  $AUC_{0-168ч}$  от около 1000 мкг×час/мл до около 3000 мкг×час/мл в крови субъекта. В некоторых вариантах осуществления способ лечения обеспечивает  $C_{max}$  от около 0,5 мкг/мл до около 25 мкг/мл в крови субъекта. Например, способ лечения может давать  $C_{max}$  от около 0,6 мкг/мл до около 20 мкг/мл в крови субъекта.

#### **ПРИМЕРЫ**

Данное изобретение иллюстрируется следующими неограничивающими примерами. Следует понимать, что конкретные примеры, материалы, количества и процедуры следует интерпретировать в широком смысле в соответствии с объемом и духом изобретения, как изложено в настоящем документе.

#### **Пример 1**

ALP201 представляет собой человеческий рекомбинантный слитый белок TNSALP-Fc-дека-аспартат. Это растворимый гликопротеин, состоящий из двух

полипептидных цепей из 724 аминокислот, полученных из каталитического домена TNSALP человека (SwissProt, P05186), домена Fc G2/4 иммуноглобулина человека (Ig) (SwissProt, P01859, P01861) (для облегчения очистки и продления периода полувыведения) и пептида дека-аспартата (для нацеливания на кость).

ALP201 представляет собой ERT для устранения основной причины нарушений минерализации костей, такой как HPP, путем замены дефектного фермента щелочной фосфатазы. ALP201 имеет некоторое структурное сходство с асфотазой альфа, а также слитым белком TNSALP-Fc-дека-аспартат ERT, который является единственным одобренным средством для лечения пациентов с HPP у детей (продается под торговым названием STRENSIQ®).

ALP201 представляет собой HPP-терапию следующего поколения с эквивалентной эффективностью и улучшенной активностью по сравнению с асфотазой альфа. ALP201 также обеспечивает повышенную экспозицию благодаря более длительному периоду полувыведения, уменьшенному клиренсу  $\alpha$ -фазы и повышенной биодоступности. Эти улучшенные характеристики поддерживают более низкие дозы и более длительные интервалы дозирования для ALP201 по сравнению с асфотазой альфа. Ожидается, что опыт субъектов улучшится за счет уменьшения объема инъекций и частоты дозирования, что также может привести к уменьшению количества реакций в месте инъекции.

#### ALP201

##### Физические и химические характеристики

ALP201 представляет собой растворимый слитый белок Fc с молекулярной массой около 160 кДа и состоит из двух полипептидных цепей, ковалентно связанных двумя дисульфидными связями. Каждая полипептидная цепь содержит 724 аминокислоты и состоит из трех сегментов:

N-концевая область полипептида, аминокислоты L1-A491, содержит фермент TNSALP, который является растворимой частью фермента неспецифической щелочной фосфатазы тканей человека и выполняет каталитическую функцию. В ферментативную область каждой полипептидной цепи была введена одна точечная мутация (E108M) для повышения активности фермента, а два сайта N-связанного гликозилирования (N213Q и N286Q) были удалены для улучшения процесса.

Вторая часть полипептида, аминокислоты V492-K714, содержит Fc-часть человеческого иммуноглобулина гамма 2/4 (IgG2/4), содержащую шарнирный, CH2- и CH3-домены.

C-концевая область полипептида, аминокислоты D715-D724, содержит десять аспарагиновых кислот. Эта пептидная последовательность способствует связыванию ALP201 с минеральной фазой кости.

Каждая полипептидная цепь ALP201 содержит четыре сайта гликозилирования (N123, N254, N413 и N564) и одиннадцать остатков цистеина (Cys). Cys102 существует в виде свободного цистеина. Каждая полипептидная цепь содержит четыре внутрицепочечные дисульфидные связи между Cys122 и Cys184, Cys472 и Cys480, Cys528

и Cys588 и Cys634-Cys692. Две полипептидные цепи соединены двумя межцепочечными дисульфидными связями между Cys494-Cys494 и Cys497-Cys497. В дополнение к этим ковалентным структурным особенностям щелочные фосфатазы млекопитающих обычно имеют четыре сайта связывания металлов на каждой полипептидной цепи, два сайта для цинка, один сайт для магния и один сайт для кальция.

#### Общие свойства ALP201

В таблице 1 приведены основные свойства ALP201. Теоретическая химическая формула и теоретическая средняя молекулярная масса были рассчитаны в предположении, что все остатки цистеина, кроме двух, связаны дисульфидной связью.

**Таблица 1. Общие свойства ALP201**

Характеристика	Результат
Прогнозируемая формула	C <sub>7058</sub> H <sub>10928</sub> N <sub>1952</sub> O <sub>2198</sub> S <sub>58</sub> (агликозилированный)
Прогнозируемая молекулярная масса	160 154,6 Да (агликозилированный)
Число аминокислот	1448
Биологическая активность	Гидролиз пиррофосфатазы (PPi) и пиридоксаль-5'-фосфата (PLP), связывание гидроксиапатита.

#### Лекарственный препарат

ALP201 100 мг/мл флакон

Лекарственный препарат ALP201 (100 мг/мл) представляет собой стерильный, не содержащий консервантов жидкий раствор ALP201 и вспомогательных веществ, содержащийся в одноразовом флаконе объемом 2 мл. Лекарственный препарат не содержит каких-либо новых вспомогательных веществ или вспомогательных веществ животного или человеческого происхождения. Каждый флакон объемом 2 мл номинально содержит 1,2 мл (переполнение) лекарственного препарата для доставки 100 мг ALP201/флакон. Лекарственный препарат помещают во флакон из прозрачного стекла типа I объемом 2 мл с хлорбутиловой пробкой диаметром 13 мм и алюминиевым уплотнением. Количественный состав лекарственного препарата ALP201 представлен в таблице 2.

Таблица 2: Композиция лекарственного препарата ALP201 для подкожного или внутривенного введения

Ингредиент	Количество на флакон	Функция	Стандарт
ALP201	100 мг/мл	Активный ингредиент	Внутренний стандарт
Натрия фосфат моноосновный моногидрат	0,4 мг/мл	Буферный агент	Мультикомпендиальный

Натрия фосфат двухосновный гептагидрат	1,9 мг/мл	Буферный агент	Мультикомпендиальный
L-пролин	16,1 мг/мл	Стабилизатор	Мультикомпендиальный
Сахароза	47,9 мг/мл	Модификатор/стабилизатор тоничности	Мультикомпендиальный
Полисорбат 80	0,5 мг/мл	Ингибитор адсорбции	Мультикомпендиальный
вода для инъекций	Q.S.	Водная несущая среда	Мультикомпендиальный

Сокращения: QS=достаточное количество.

### Исследование in vivo

ALP201 оценивали с использованием исследований in vivo, чтобы охарактеризовать его фармакологию, фармакокинетику/токсикокинетику (ТК), местную переносимость и потенциальную системную токсичность. Проведенные фармакологические исследования включают исследования повторных доз на мышах НРР (мыши Акp2GW (-/-)), чтобы определить минимальную эффективную дозу ALP201. Чтобы понять фармакокинетические свойства ALP201, были проведены фармакокинетические исследования однократной дозы на мышах, крысах и обезьянах. В токсикологических исследованиях оценивалась системная токсичность подкожного введения ALP201 крысам и обезьянам; эти исследования включали конечные точки фармакологической безопасности (сердечно-сосудистые, респираторные исследования на обезьянах и нейрофункциональные исследования на крысах), оценки ТК и период восстановления для оценки обратимости любых эффектов, связанных с лечением.

Обобщенные данные исследований in vivo, проведенных с ALP201, подтверждающих его использование у людей, представлены в таблице 3.

**Таблица 3: Обзор исследований ALP201 in vivo**

Исследование	Тестовая система/ Количество животных	Способ введения и доза (мг/кг)	Номер исследования	Результаты
<b>Фармакологические исследования</b>				
36-дневное исследование эффективности многократ	Мыши Акp2GW(-/-)	Подкожно: 4,8 мг/кг при интервалах дозирования qd, q2d и q1w Подкожно: 4,8	НРР-РoC-01	ALP201 продемонстрировал эффективность в отношении индекса минерализации костей и конечных

<p>ных доз ALP201 и асфотазы альфа на мышях HPP</p>		<p>мг/кг (дни 1- 24), 1,5 мг/кг (дни 25-35)</p>		<p>точек выживаемости при более низких дозах и более длительных интервалах дозирования, чем те, показатели для эффективной дозы асфотазы альфа.</p>
<p>Титровани е дозы ALP201 для определени я минерализа ции ED85 у мышей Акp2GW - /-</p>	<p>Мыши Акp2GW(-/-)</p>	<p>Подкожно: 0,15, 0,3, 0,8 или 2,0 мг/кг/доза (дозировка каждые 2 дня)</p>	<p>HPP-MED-01</p>	<p>ALP201 продемонстрировал эффективность в отношении индекса минерализации костей, активности костной щелочной фосфатазы, выживаемости и конечных точек уровня плазмы в конце исследования при гораздо более низких дозах, чем те, которые использовались в HPP-PoC-01. Дозозависимая реакция для индекса минерализации кости, наблюдаемого для ALP201 в разных дозах, при этом доза 2,0 мг/кг q2d</p>

				показала себя немного лучше, чем асфотаза альфа при дозе 2,5 мг/кг qd.
Фармакокинетические исследования				
Оценка фармакоки нетики однократно й дозы ALP201 после внутривенн ого и подкожног о введения самцам мышей C57BL/6	Мыши C57BL/6	в/в и п/к: 4 мг/кг	HPP-PK-01	Терминальный период полувыведения после внутривенного введения составляет 48 часов. Абсолютная биодоступность после подкожного введения была высокой и составляла 96%. ФК-параметры, включая системное воздействие ALP201 по AUC, были значительно улучшены по сравнению с асфотазой альфа.
Оценка фармакоки нетики ALP201 после внутривенн ого и подкожног	Крысы линии Спрег-Доули 2М/2Ж на когарту	в/в болюсно: 1, 3, 9 или 27 мг/кг п/к: 2 или 27 мг/кг	20205897	После внутривенного или подкожного введения фармакокинетика ALP201, измеренная по ферментативной

о введения крысам				<p>активности, была немного менее пропорциональной в исследованном диапазоне доз (от 1 до 27 мг/кг). Терминальный период полувыведения в среднем составляет около 2 дней. Абсолютная биодоступность после подкожного введения составила 61% и 54% для доз 2 и 27 мг/кг соответственно. Однократная доза ALP201, введенная внутривенно или подкожно (от 1 до 27 мг/кг), хорошо переносилась самцами и самками крыс.</p>
Оценка фармакоки нетики ALP201 после внутривенн ого и подкожног о введения	Яванские макаки 3 М на когорту	в/в болюсно: 2, 6 или 20 мг/кг п/к: 2 или 20 мг/кг	20205899	После внутривенного или подкожного введения фармакокинетика ALP201, измеренная по ферментативной активности, была

в NHP				<p>близка к пропорциональной дозе в исследованном диапазоне доз (от 2 до 20 мг/кг). Терминальный период полувыведения составляет в среднем около 3 дней. Абсолютная биодоступность после подкожного введения составила 69,6% и 86,9% для доз 2 и 20 мг/кг. Однократная доза ALP201, введенная внутривенно или подкожно (от 2 до 20 мг/кг), хорошо переносилась самцами приматов, отличных от человека.</p>		
<p>Доклинические исследования безопасности (токсикология и фармакология безопасности)</p>						
<p>ALP201: 28-дневное исследование токсичности на крысах с</p>	<p>GLP</p>	<p>Крысы линии Спрег-Доули</p>	<p>Повторная доза подкожно: 0, 2, 10 или 30 мг/кг/дозу (q3d; всего 10 доз)</p>	<p>Charles River Laboratories</p>	<p>1727-227</p>	<p>Ни при одной из доз, оцениваемых в исследовании, не наблюдалось заслуживающей внимания системной</p>

28-дневным периодом восстановления			Однократная доза внутривенно: 0 или 10 мг/кг/доза (для оценки абсолютной п/к биодоступности)			органотоксичности или результатов местной переносимости. Никаких заслуживающих внимания результатов нейротоксичности не наблюдалось ни в одной из доз, оцениваемых в исследовании. Иммуногенность: (положительный ADA) ответы наблюдались при всех дозах, оцениваемых в исследовании. Высокая доза 30 мг/кг/доза, оцененная в исследовании, представляет собой NOAEL.
ALP201: 28-дневное исследование токсичности и при подкожной инъекции у яванских	GLP	Яванские макаки	Повторная доза подкожно: 0, 1, 5 или 20 мг/кг/доза (каждые 3 дня; всего 10 доз)	Charles River Laboratories	1727-228	Ни при одной из доз, оцениваемых в исследовании, не наблюдалось заслуживающей внимания системной органотоксичности или результатов

<p>макаков с 28- дневным периодом восстановл ения</p>					<p>местной переносимости. Ни при одной из доз, оцененных в исследовании, не наблюдалось никаких примечательных сердечно- сосудистых или респираторных нарушений. Иммуногенность: (положительный ADA) ответы наблюдались при всех дозах, оцениваемых в исследовании. Высокая доза 20 мг/кг/доза, оцененная в исследовании, представляет собой NOAEL.</p>
---	--	--	--	--	---

Сокращения: Ж=женщина; GLP=Надлежащая лабораторная практика; в/в=внутривенно; М=мужчина; NOAEL=уровень отсутствия наблюдаемых нежелательных эффектов; qd=один раз в день; q1w=один раз в неделю; q2d=один раз в два дня; п/к=подкожно; TBD=будет определено.

#### *Фармакология in vitro*

Пирофосфат (PPi) является важным естественным субстратом TNSALP, а низкие уровни TNSALP у пациентов с НРР приводят к повышенному уровню циркулирующего PPi в крови. Повышенные уровни пирофосфата препятствуют правильной минерализации костей и приводят к аномальным костным проявлениям, наблюдаемым у субъектов с НРР. Таким образом, PPi рассматривался как природный субстрат для достижения более высоких уровней ферментативной активности в сконструированной молекуле асфотазы

альфа второго поколения.

Кривые насыщения субстрата для гидролиза пирофосфата ALP201 и альфа-асфотазой показаны на фиг. 1. ALP201 сохраняет то же значение  $K_m$  (47 мМ) для пирофосфата, что и асфотаза альфа (53 мМ), но ALP201 работает со значительно более высоким числом оборотов ( $k_{cat}=11\,619\text{ мин}^{-1}$  для ALP201 против  $6714\text{ мин}^{-1}$  для асфотазы альфа). Сходные значения  $K_m$  для ALP201 и каталитического домена TNSALP дикого типа в асфотазе-альфа предполагают, что ALP201 не должна с большей вероятностью, чем асфотаза-альфа, опасно снижать уровни циркулирующего  $PP_i$ , когда присутствует при эквивалентных уровнях активности щелочной фосфатазы в сыворотке.

Пиридоксил-5'-фосфат является вторым природным субстратом TNSALP, имеющим клиническое значение для HPP. TNSALP расщепляет PLP с образованием пиридоксаля, витамина B6, который легче всего усваивается тканями. Когда уровни щелочной фосфатазы в сыворотке очень низкие, системный метаболизм витамина B6 может быть нарушен. При HPP дефицит PLP в головном мозге проявляется в виде судорог, а системный дефицит гидролиза PLP с помощью TNSALP может играть роль в боли, мышечной слабости и гипотонии, испытываемых некоторыми субъектами HPP. Следовательно, ERT для лечения HPP может быть использована для обеспечения достаточной активности гидролиза PLP.

Кривые насыщения субстрата для гидролиза PLP под действием ALP201 и асфотазы-альфа показаны на фиг. 2. ALP201 имеет немного более слабое значение  $K_m$  (2,76 мМ) для PLP по сравнению с асфотазой альфа (1,71 мМ), но ALP201 работает со значительно более высоким числом оборотов ( $k_{cat}=3324\text{ мин}^{-1}$  для ALP201 против  $2623\text{ мин}^{-1}$  для асфотазы альфа), что приводит к очень похожим кривым насыщения активности PLP для двух молекул. Кинетические параметры субстрата приведены в таблице 4.

Таблица 4: Кинетические параметры гидролиза субстрата с помощью ALP201 и асфотазы альфа

Субстрат	Конструкция	$K_m$ (мкМ)	$K_{cat}$ (мин <sup>-1</sup> )
PP <sub>i</sub>	ALP201	46,8 +/- 5,7	11 619 +/- 449
	асфотаза альфа (Strensiq) STRENSIQ®	53,2 +/- 5,5	6 714 +/- 226
PLP	ALP201	2,76 +/- 0,3	3 324 +/- 97
	асфотаза альфа (Strensiq) STRENSIQ®	1,71 +/- 0,2	2 623 +/- 75

Сокращения: PP<sub>i</sub>=пирофосфат; PLP=пиридоксил-5'-фосфат;  $K_m$ =постоянная Михаэлиса-Ментен; мкМ=микромольная;  $K_{cat}$ =каталитическая константа скорости оборота; мин=минута.

#### Фармакология in vivo

Доклинические исследования эффективности ALP201 проводились с использованием мыши Akr2GW (-/-), которая является моделью HPP у человека. Мыши

Akr2GW (-/-) имеют ту же HPP-индуцирующую мутацию TNSALP, что и мыши Akr2 (-/-), которые ранее использовались в доклинической оценке асфотазы альфа. Исследования естественного течения, проведенные в Alexion во время развития мышей Akr2GW (-/-), показали, что гомозиготные мыши с нокаутом активности TNSALP Akr2GW (-/-) демонстрировали почти идентичный фенотип минерализации кости и выживаемости, что и мыши Akr2 (-/-) (Akr2GW-NH-01-02).

В исследованиях эффективности, используемых для оценки эффективности ALP201 с использованием мышинной модели Akr2GW (-/-), дозы испытуемых препаратов вводили подкожно, начиная с 1-го дня после рождения до 35-го дня. Результаты, о которых сообщалось во всех исследованиях, включали общую выживаемость, скорость роста массы тела, минерализацию костей задних лап на 36-й день (или в момент смерти, если до окончания исследования [EOS]) и EOS через уровни активности ферментов плазмы (измеренные в день 36 в группах один раз в день [qd] и один раз в неделю [q1w] и на 37-й день в группах с дозой один раз в 2 дня [q2d]). В некоторых исследованиях определяли длину EOS бедренной и большеберцовой костей и активность щелочной фосфатазы мышинной бедренной кости.

В предыдущих исследованиях с использованием мышей Akr2 (-/-) асфотаза альфа продемонстрировала эффективность как в отношении минерализации костей, так и в отношении конечных точек исследования общей выживаемости в дозе 7-10 мг/кг/день для активных препаратов асфотазы альфа, в зависимости от специфической активности в тестируемом изделии. Предполагаемую минимальную эффективную дозу (MED) асфотазы альфа определяли как дозу, которая приводила к тому, что 85% поддающихся измерению мышей в группе получали нормальную оценку минерализации костей к концу исследования или в момент смерти, если смерть наступила до окончания исследования. Анализ данных об эффективности показал, что это значение составляет около 2,0-2,5 мг/кг/день, в зависимости от специфической активности тестируемого изделия.

Эффективность ALP201 в мышинной модели HPP была протестирована в 2 исследованиях с применением нескольких доз при различных подкожных дозах и интервалах между дозами на мышах Akr2GW (-/-). В этих исследованиях эффективность ALP201 сравнивали с эффективностью, наблюдаемой в группе положительного контроля, получавшей ежедневное подкожное введение асфотазы альфа.

В предыдущем исследовании дозу асфотазы альфа вводили подкожно в ее полностью эффективной дозе 9,8 мг/кг/день по схеме дозирования qd. Эквивалентную дозу активности 4-MUP ALP201 вводили подкожно в PBS с интервалами дозирования qd, q2d и q1w. В группе с одной дозой доза ALP201 была снижена на половину log после отъема мышей на 25-й день. Подкожное введение PBS по схеме qd использовали в качестве отрицательного контроля. Таблицу этих групп дозирования можно найти в Таблице 5.

В исследовании HPP-MED-01 дозу асфотазы альфа вводили подкожно в минимальной эффективной дозе 2,5 мг/кг/день по схеме дозирования qd. ALP201 вводили

подкожно в PBS по схеме дозирования один раз в 2 дня в дозах 2,0, 0,8, 0,3 и 0,15 мг/кг. Подкожное введение PBS по схеме q2d использовали в качестве отрицательного контроля. Таблицу этих групп дозирования можно найти в Таблице 5.

**Таблица 5: Планы исследований с группировкой доз для исследований эффективности Акp2GW (-/-)**

Исследование	Исследуемый препарат	Доза (мг/кг)	Доза (активность U MUP/кг)	Интервал	Генотип мыши
HPP-PoC-01	ALP201	4,8	206	qd	Акp2GW (-/-)
HPP-PoC-01	ALP201	4,8 (дни 1-24) 1,5 (дни 25-35)	206 (дни 1-24) 62 (дни 25-35)	qd	Акp2GW (-/-)
HPP-PoC-01	ALP201	4,8	206	q2d	Акp2GW (-/-)
HPP-PoC-01	ALP201	4,8	206	q1w	Акp2GW (-/-)
HPP-PoC-01	асфотаза альфа	9,8	206	qd	Акp2GW (-/-)
HPP-PoC-01	PBS	Н/П	Н/П	qd	Акp2GW (-/-)
HPP-PoC-01	PBS	Н/П	Н/П	qd	Акp2GW (+/+)
HPP-MED-01	ALP201	2	78	q2d	Акp2GW (-/-)
HPP-MED-01	ALP201	0,8	31	q2d	Акp2GW (-/-)
HPP-MED-01	ALP201	0,3	11,6	q2d	Акp2GW (-/-)
HPP-MED-01	ALP201	0,15	5,8	q2d	Акp2GW (-/-)
HPP-MED-01	асфотаза альфа	2,5	54	qd	Акp2GW (-/-)
HPP-MED-01	PBS	Н/П	Н/П	q2d	Акp2GW (-/-)
HPP-MED-01	PBS	Н/П	Н/П	q2d	Акp2GW (+/+)

Сокращения: PBS=фосфатно-солевой буфер; q1w=один раз в неделю; q2d=один раз в 2 дня; qd=один раз в день; U MUP=единицы активности при гидролизе 4-метилумбеллиферилфосфата; Н/П=не проводили.

#### Результаты минерализации костей

Результаты минерализации костей на 36/37 день определяли с помощью рентгенологического анализа задних лап обработанных мышей Акp2GW (-/-). Рентгеновскую визуализацию минерализации костей задней лапы сравнивали с эталонными рентгеновскими изображениями на 36-й день, иллюстрирующими 4 категории классификации: без изменений, легкий дефицит, умеренный дефицит и

тяжелый дефицит. Подробное описание этих классификаций можно найти в Таблице 6. «Ослепленные» индивидуумы присваивали баллы изображениям для каждой мышцы, и после завершения баллы были составлены в рамках групп с индивидуальными дозами.

**Таблица 6: Классификация для оценки индекса минерализации костей задней лапы на 36-й день**

Оценка	Классификация дефицита минерализации костей	Описание тяжести - Faxitron 2D X-Ray	Описание тяжести - СТ 3D X-Ray
1	Тяжелая	Глубокая дисморфология и полное отсутствие медиальных и дистальных фаланг пальцев и полное отсутствие вторичных центров окостенения	Глубокая дисморфология и полное отсутствие проксимальных и/или медиальных и дистальных фаланг пальцев и полное отсутствие вторичных центров окостенения с переменным образованием плюсневых костей
2	Умеренная	Полностью сформированные пальцы, но еще нет видимых вторичных центров окостенения.	Полностью сформированные пальцы либо без видимых вторичных центров окостенения, либо с переменным формирующимся вторичным центром(ами), переменными сесамовидными костями и переменным образованием плюсневых костей
3	Легкая	Полностью сформированные пальцы с переменными, но неполными вторичными центрами окостенения	Полностью сформированные пальцы либо с отсутствием вторичного центра (центров) окостенения, либо с центром (центрами) с переменным развитием, деформированные

			и отсутствующие сесамовидные кости с вариабельным образованием плюсневых костей
4	Без повреждения	Полностью сформированные пальцы и все вторичные центры окостенения.	Полностью сформированные пальцы со всеми вторичными центрами окостенения, все сесамовидные кости с различной морфологией и полностью сформированными плюсневыми костями.

Распределение наблюдаемых баллов индекса минерализации костей задней лапы EOS для каждой группы дозирования можно найти в таблице 7.

**Таблица 7: Распределение индекса минерализации костей в конце исследования в костях задней лапы в обработанных группах мышей Акp2GW (-/-)**

Дозовая группа	кол-во в группе	кол-во без повреждения (Оценка=4)	кол-во с легким дефицитом (оценка=3)	кол-во с умеренным дефицитом (оценка=2)	кол-во с тяжелым дефицитом (оценка=1)
WT PBS	20	20 (100%)	0	0	0
ALP201 4,8 qd	25	25 (100%)	0	0	0
ALP201 4,8/1,5 qd	17	17 (100%)	0	0	0
ALP201 4,8 q2d	24	24 (100%)	0	0	0
ALP201 2,0 q2d	31	29 (93,5%)	2 (6,5%)	0	0
ALP201 0,8 q2d	29	18 (62,1%)	11 (37,9%)	0	0
ALP201 0,3 q2d	31	18 (58,1%)	10 (32,3%)	1 (3,2%)	2 (6,5%)
ALP201 0,15 q2d	29	14 (48,3%)	9 (31,0%)	6 (20,7%)	0
ALP201 4,8 q1w	19	14 (73,7%)	2 (10,5%)	3 (15,8%)	0
асфотаза альфа 9,8 qd	16	16 (100%)	0	0	0
асфотаза альфа 2,5 qd	26	22 (84,6%)	4 (15,4%)	0	0

НОМ PBS (при смерти)	50	7 (14,0%)	12 (24,0%)	24 (48,0%)	7 (14,0%)
----------------------	----	-----------	------------	------------	-----------

Сокращения: НОМ=гомозиготный нокаут; PBS=фосфатно-солевой буфер; qd=один раз в день; q2d=один раз в 2 дня; q1w=один раз в неделю; WT=дикий тип.

Лечение мышей Akr2GW (-/-) с помощью ALP201 показало реакцию на дозу в виде увеличения процента мышей с незатронутой минерализацией костей задней лапы при увеличении дозы ALP201 в интервале дозирования Q2D. Все группы с дозой ALP201 продемонстрировали статистически значимое улучшение по сравнению с обработанными PBS контролями Akr2GW (-/-) ( $p < 0,001$  по однофакторному анализу ANOVA). Эти данные использовались для обоснования основанных на моделях анализов и прогнозируемых прогнозов дозы для человека.

Результаты минимальной концентрации активного фермента в плазме в конце исследования

Минимальные концентрации активного фермента TNSALP в плазме определяли путем измерения уровней активности TNSALP в образцах плазмы на 36/37 день. Измеренная активность TNSALP соответствовала стандартной кривой известной активности фермента и концентрации для количественного определения уровней активного фермента на единицу объема плазмы. Распределение EOS по концентрации активного фермента в плазме показано на фиг. 3. Табличное представление среднего значения EOS через концентрацию активного фермента в плазме по группам дозирования приведено в Таблице 8.

**Таблица 8: Сгруппированное по дозе среднее значение в конце исследования через концентрацию активного фермента в плазме и уровни активности фермента**

Исследование	Исследуемый препарат	Доза (мг/кг)	Интервал	Количество доз в исследовании	Среднее значение EOS через уровень активности плазмы (Единицы 4-MUP гидролиз/л)	Средняя концентрация фермента EOS (мкг/мл)	День сбора
HPP-POC-01	ALP201	4,8	qd	35	1805,2 ± 321,9	42,0 <sup>a</sup>	36
HPP-POC-01	ALP201	4,8/1,5	qd	35	805,8 ± 235,0	18,7 <sup>a</sup>	36
HPP-POC-01	ALP201	4,8	q2d	18	728,1 ± 162,4	16,9 <sup>a</sup>	37
HPP-MED-01	ALP201	2	q2d	18	235,4 ± 58,7	6,1 <sup>c</sup>	37
HPP-MED-01	ALP201	0,8	q2d	18	134,9 ± 27,6	3,5 <sup>c</sup>	37
HPP-MED-01	ALP201	0,3	q2d	18	54,5 ± 14,9	1,4 <sup>c</sup>	37
HPP-MED-01	ALP201	0,15	q2d	18	22,6 ± 9,4	0,6 <sup>c</sup>	37
HPP-POC-01	ALP201	4,8	qw	5	21,2 ± 13,7	0,5 <sup>a</sup>	36

HPP-POC-01	асфотаза альфа	9,8	qd	35	129,5 ± 81,9	6,2 <sup>b</sup>	36
HPP-MED-01	асфотаза альфа	2,5	qd	35	20,2 ± 13,9	0,9 <sup>d</sup>	36
HPP-MED-01-	PBS - WT	Н/П	Н/П	Н/П	1,7 ± 2,9	Н/П	36

Примечание. Расчет средней концентрации фермента в конце исследования в (мкг/мл)=средний уровень активности EOS в плазме (единицы гидролиза 4-MUP/л) / удельная активность белка (Ед/мг).

а Специфическая активность используемого в исследовании ALP201=43 Ед/мг.

б Специфическая активность использованной в исследовании асфотазы альфа=21 Ед/мг.

с Специфическая активность использованного в исследовании ALP201=38,8 Ед/мг.

д Специфическая активность использованной в исследовании асфотазы альфа=21,5 Ед/мг.

Сокращения: EOS=окончание исследования; 4-MUP=4-метилумбеллиферилфосфат; Н/П=не проводили; PBS=фосфатно-солевой буфер; qw=один раз в неделю; q2d=один раз в 2 дня; qd=один раз в день; WT=дикий тип.

Анализ EOS через активный фермент плазмы и соответствующие уровни ферментативной активности у обработанных мышей Акp2GW (-/-) после многократных доз четко показывает более высокое абсолютное накопление и нормированное дозой накопление ALP201 по сравнению с асфотазой альфа, предположительно благодаря превосходному фармакокинетическому профилю ALP201 после подкожного введения.

Уровни активности костных ферментов в конце исследования в день 36/37 у обработанной мыши Акp2GW (-/-)

Уровни активности щелочной фосфатазы в обработанной ткани бедренной кости мыши Акp2GW (-/-) определяли в анализе *ex vivo* в конце исследования HPP-MED-01 с использованием 4-MUP в качестве субстрата. В этом анализе на активность анализировали только минерализованную часть бедренной кости, чтобы избежать потенциального загрязнения кровью или тканью с высокой перфузией, которые все еще могут содержать высокие уровни ALP201 или асфотазы альфа. Распределение уровней ферментативной активности, прикрепленных к обработанным бедренным костям мышей Акp2GW (-/-), показано на фиг. 4, где данные представлены в микроединицах гидролизной активности 4-MUP/мг минерализованной ткани бедренной кости.

Таблица 9. Средние концентрации активных ферментов в бедренной кости с группировкой доз в конце исследования

Исследование	Исследуемый препарат	Доза (мг/кг)	Интервал	Количество доз в исследовании	Средний уровень активности в бедренной кости в EOS $\pm$ стандартное отклонение (микроединицы гидролиза 4-MUP/мг кости)	День сбора
HPP-MED-01	ALP201	2	q2d	18	26,5 $\pm$ 9,4	37
HPP-MED-01	ALP201	0,8	q2d	18	20,8 $\pm$ 6,6	37
HPP-MED-01	ALP201	0,3	q2d	18	18,6 $\pm$ 6,5	37
HPP-MED-01	ALP201	0,15	q2d	18	13,0 $\pm$ 5,9	37
HPP-MED-01	асфотаза альфа	2,5	qd	35	14,8 $\pm$ 5,3	36
HPP-MED-01	PBS - WT	Н/П	Н/П	Н/П	60,6 $\pm$ 19,6	37

Сокращения: 4- MUP=4-метилумбеллиферилфосфат; PBS=фосфатно-солевой буфер; q1w=один раз в неделю; q2d=один раз каждые 2 дня; qd=один раз каждый день; WT=дикий тип; мг=миллиграмм; SD=стандартное отклонение; Н/П=не проводили

Данные об активности костной ткани показали реакцию на дозу с повышением уровней активности костной ткани в EOS при увеличении дозы ALP201. В конце исследования у мышей в группе, получавшей 0,15 мг/кг ALP201 каждые 2 дня, было восстановлено 22,6% активности щелочной фосфатазы дикого типа по сравнению с 26,9% в группе, получавшей асфотазу альфа 2,5 мг/кг каждые 2 дня. Дозы ALP201 0,3, 0,8 и 2,0 мг/кг каждые 2 дня восстанавливали активность дикого типа на 34,4%, 37,6% и 44,9% соответственно. Различия в уровне костной активности в конце исследования между дозами ALP201, составляющими 0,8 и 2,0 мг/кг каждые 2 дня, были статистически значимыми по сравнению с группой, получавшей асфотазу альфа 2,5 мг/кг q2d, при анализе с помощью однофакторного ANOVA с скорректированными значениями  $p$  0,0048 и  $<0,0001$ , соответственно.

Результаты выживания обработанных мышей Акp2GW (-/-)

Все Акp2GW (-/-), получавшие PBS, умерли на 26-й день исследований или ранее, при этом среднее время выживания составило 20 дней. Обработка ALP201 мышей Акp2GW (-/-) значительно улучшала 36-дневную выживаемость во всех группах доз по сравнению с контрольным носителем PBS (фиг. 5 и таблица 10). Все группы, получавшие ALP201, достигли коэффициента выживаемости EOS по меньшей мере 69%, при этом все группы с интервальным введением дозы qd и q2d, получавшие дозу выше 0,15 мг/кг/день, показали общую выживаемость 88% или выше. Кривые выживаемости для группы 4,8 мг/кг ALP201 q1w и группы асфотазы альфа 9,8 мг/кг qd имеют очень похожие результаты.

**Таблица 10: Обобщенные данные процента выживания групп мышей**

**Акp2GW (-/-), получавших лечение в 36-дневных исследованиях эффективности**

Исследование	Исследуемый препарат	Доза (мг/кг)	Интервал	Выживаемость в конце исследования (%)
HPP-PoC-01	ALP201	4,8	qd	100
HPP-PoC-01	ALP201	4,8/1,5	qd	100
HPP-PoC-01	ALP201	4,8	q2d	96
HPP-MED-01	ALP201	2	q2d	94
HPP-MED-01	ALP201	0,8	q2d	97
HPP-MED-01	ALP201	0,3	q2d	88
HPP-MED-01	ALP201	0,15	q2d	69
HPP-PoC-01	ALP201	4,8	q1w	83
HPP-PoC-01	асфотаза альфа	9,8	qd	81
HPP-MED-01	асфотаза альфа	2,5	qd	96
HPP-PoC-01	PBS	Н/П	Н/П	0
HPP-MED-01	PBS	Н/П	Н/П	0

Сокращения: MED=минимальная эффективная доза; PBS=фосфатно-солевой буфер; PoC=доказательство концепции; qd=один раз в день; q2d=один раз в 2 дня; q1w=один раз в неделю; Н/П=не проводили.

**Результаты относительно массы тела**

Средняя масса тела мышей Акp2GW (-/-), обработанных ALP201 и альфа-асфотазой, во всех группах была постоянно ниже, чем у мышей аналогичного поколения дикого типа, обработанных PBS. Масса тела в конце исследования для всех групп, получавших дозу ALP201, статистически не отличалась от групп, получавших дозу асфотазы альфа.

**Фармакологическая безопасность**

Отдельные фармакологические исследования безопасности для ALP201 не проводились. Тем не менее, конечные точки сердечно-сосудистой системы, дыхания и артериального давления были измерены в рамках базового исследования токсичности на обезьянах, соответствующего GLP, а нейрофункциональные конечные точки были оценены в рамках исследования токсичности GLP на крысах. Лечение ALP201 приводило к увеличению частоты сердечных сокращений (28% по сравнению с контрольной группой) только в группе с низкой дозой, с сопутствующим уменьшением интервалов RR, PR, QT и без каких-либо заметных изменений продолжительности QRS; никаких биологически значимых изменений не наблюдалось в группах со средней и высокой дозой. Таким образом, между небольшим увеличением частоты сердечных сокращений и дозой ALP201 не было зависимости доза-реакция. Поскольку увеличение частоты сердечных сокращений было умеренным по величине, эти результаты не считаются

неблагоприятными. Кроме того, не было обнаружено никаких связанных с ALP201 результатов на ЭКГ, артериальном давлении или параметрах дыхания, оцененных у обезьян после подкожного введения один раз в 3 дня в течение 28 дней вплоть до максимальной дозы, 20 мг/кг, оцененной в исследовании. ALP201 не оказывал влияния на поведенческие показатели или двигательную активность у крыс после подкожного введения один раз в 3 дня в течение 28 дней до максимальной дозы, 30 мг/кг, оцененной в исследовании.

#### Фармакокинетика и метаболизм лекарственного средства у животных

Фармакокинетические исследования однократной дозы проводились на мышах, крысах и обезьянах. Данные этих исследований использовались для оценки распределения (абсорбции, распределения и элиминации) ALP201 у доклинических видов.

#### Абсорбция

ФК ALP201 оценивали у крыс Спраг-Доули и яванских макаков. В настоящем документе представлены обобщенные данные исследований без GLP и GLP после однократного и повторного введения дозы ALP201.

Средняя биодоступность составила 96%, 58% и 78% для мышей, крыс и обезьян соответственно. Время достижения максимальной концентрации ( $t_{max}$ ) варьировало от 17 до 48 часов после введения дозы, что свидетельствует о медленном всасывании ALP201 из места подкожной инъекции.

#### Распределение

После однократного внутривенного введения мышам, крысам и обезьянам объем видимого распределения ALP201 колебался от 0,08 до 0,15 л/кг. Это значение было намного больше ( $> 2$  раза), чем объем плазмы у этих видов, указывая на распределение ALP201 за пределами внутрисосудистого компартмента.

#### Фармакокинетика в исследованиях с однократной дозой

##### ФК однократной дозы у самцов мышей C57BL/6 (исследование HPP-PK-01)

ФК ALP201 оценивали после однократного внутривенного или подкожного введения самцам мышей C57BL/6. Шестнадцать животных получили однократное внутривенное или подкожное введение ALP201 в дозе 4 мг/кг. Для каждого пути введения мышам случайным образом делили на 4 группы выборки по 4 мыши в каждой. Образцы крови собирали с использованием схемы полусерийного отбора проб в течение 20 дней после введения дозы. ФК-параметры ALP201 приведены в таблице 11.

**Таблица 11: ФК-параметры ALP201 после внутривенного и подкожного введения мышам C57BL/6**

Путь введения	Доза (мг/кг)	$C_{max}$ (мкг/мл)	$t_{max}$ (ч)	$t_{1/2}$ (ч)	$AUC_t$ (мкг*ч/мл)	$AUC_{\infty}$ (мкг*ч/мл)	$V_d$ или $V_d/F$ (л/кг)	CL или CL/F (л/ч/кг)	F (%)
в/в	4	93,3	1	48,1	2070,1	2114,3	0,13	0,0019	Н/П
п/к	4	15,2	48	85,2	1828,7	2030,3	0,24	0,0020	96

Сокращения:  $AUC_{\infty}$ =площадь под кривой зависимости концентрации от времени от нуля (дозирование), экстраполированная до бесконечности;  $AUC_t$ =площадь под кривой зависимости концентрации от времени от нуля (дозирование) до последней обнаруживаемой концентрации; CL или CL/F=общий клиренс;  $C_{max}$ =максимальная наблюдаемая концентрация в плазме; F=абсолютная биодоступность; в/в=внутривенно; Н/П=не проводили; п/к=подкожно;  $t_{max}$ =время достижения максимальной наблюдаемой концентрации в плазме;  $t_{1/2}$ = конечный период полувыведения;  $V_d$  или  $V_d/F$ =кажущийся объем распределения

После внутривенного введения профиль концентрация-время снижался мультиэкспоненциальным образом. CL составлял 0,0019 л/ч/кг, а кажущийся терминальный  $t_{1/2}$  составлял 48 часов (таблица 11

**Таблица).**  $V_d$  составлял 0,13 л/кг, что больше, чем объем плазмы у мышей, что указывает на распределение ALP201 за пределами внутрисосудистого пространства. После подкожного введения время достижения максимальной концентрации ( $t_{max}$ ) составляло 48 часов после введения дозы, что предполагает относительно медленное всасывание из места подкожной инъекции. Абсолютная биодоступность после подкожного введения была высокой и составляла 96%.

Однодозовое фармакокинетическое исследование на крысах

ФК ALP201 оценивали после однократного внутривенного или подкожного введения крысам. Четырем животным (по 2 на пол/дозу) вводили однократно внутривенно или подкожно восходящую дозу (внутривенно болюсно в дозе 1, 3, 9 или 27 мг/кг или подкожно в дозе 2 или 27 мг/кг) ALP201. Концентрации ALP201 в плазме поддавались количественному определению в течение 28 дней после введения дозы. Поскольку явных специфических для пола различий в параметрах РК ALP201 не наблюдалось, приводятся объединенные значения для полов. Описательные статистические данные для ФК-параметров ALP201 приведены для объединенных половых групп в Таблице 12. Профили зависимости средней концентрации ALP201 в плазме от времени показаны на фиг. 14; следует обратить внимание, что для сравнения добавлены исторические данные по асфотазе альфа.

**Таблица 12: Средние ( $\pm$ SD) фармакокинетические параметры ALP201 после внутривенного или подкожного введения крысам**

Путь введения	Доза (мг/кг)	N	$t_{1/2}$ (ч)	$t_{max}$ (ч)	$C_{max}$ (мкг/мл)	$AUC_t$ (ч $\times$ мкг/мл)	$AUC_{\infty}$ (ч $\times$ мкг/мл)	$V_d$ или $V_d/F$ (л/кг)	CL или CL/F (л/ч/кг)
в/в	1	4	66,6 $\pm$	0,5 $\pm$	22,4 $\pm$	716,5 $\pm$	802,1 $\pm$	0,12 $\pm$ 0,02	0,0012 $\pm$
			5,6	0,0	0,8	47,3	60,1		0,0001

в/в	3	4	58,7 ± 14,0	0,6 ± 0,3	65,7 ± 1,5	1811,2 ± 142,3	1934,4 ± 196,0 (10,1)	0,13 ± 0,04	0,0015 ± 0,0002
в/в	9	4	63,7 ± 12,6	0,8 ± 0,3	194,1 ± 26,7	5299,7 ± 435,0	5374,1 ± 442,9	0,15 ± 0,03	0,0017 ± 0,0001
в/в	27	4	43,6 ± 12,2	0,5 ± 0,0	559,1 ± 25,4	14089,0 ± 2003,9	14234,3 ± 2053,1	0,12 ± 0,03	0,0019 ± 0,0002
п/к	2	4	55,1 ± 6,7	48,0 ± 0,0	8,1 ± 1,9	869,0 ± 123,4	1007,7 ± 124,6	0,16 ± 0,03	0,0020 ± 0,0002
п/к	27	4	38,3 ± 6,9	30,4 ± 11,7	82,2 ± 19,6	7188,2 ± 1201,9	7674,2 ± 1406,1	0,19 ± 0,03	0,0036 ± 0,0007

Сокращения:  $AUC_{\infty}$ =площадь под кривой зависимости концентрации от времени от нуля (дозирование), экстраполированная до бесконечности;  $AUC_t$ =площадь под кривой зависимости концентрации от времени от нуля (дозирование) до последней обнаруживаемой концентрации; CL или CL/F=общий клиренс;  $C_{max}$ =максимальная наблюдаемая концентрация в плазме; в/в=внутривенно; п/к=подкожно; SD=стандартное отклонение;  $t_{max}$ =время достижения максимальной наблюдаемой концентрации в плазме;  $t_{1/2}$ = конечный период полувыведения;  $V_d$  или  $V_d/F$ = кажущийся объем распределения.

При внутривенном введении фармакокинетическое воздействие ALP201 ( $C_{max}$  и  $AUC_{\infty}$ ) увеличивалось немного меньше, чем пропорционально дозе, в исследуемом диапазоне доз от 1 мг/кг до 27 мг/кг. Средние значения CL и  $V_d$  ALP201 оставались постоянными для разных доз. Средние значения CL варьировались от 0,0012 до 0,0019 л/ч/кг, а средние значения  $V_d$  - от 0,12 до 0,15 л/кг. Точно так же  $t_{1/2}$  ALP201, который оставался относительно одинаковым при внутривенном введении, в среднем составлял около 2 дней. При подкожном введении значения CL/F,  $V_d/F$  и  $t_{1/2}$  были аналогичны значениям, полученным при внутривенном введении, за исключением группы с дозой 27 мг/кг подкожного введения, которая оказалась выпадающей. Среднее значение  $t_{max}$  колебалось от 30 до 48 часов после введения дозы, что предполагает относительно медленное всасывание из места подкожной инъекции. Абсолютная биодоступность после подкожного введения составила 61% и 54% для доз 2 и 27 мг/кг соответственно.

Исследование однократной дозы фармакокинетики на обезьянах

ФК ALP201 оценивали после однократного внутривенного или подкожного введения обезьянам. Трём самцам обезьян вводили однократно внутривенно или подкожно восходящую дозу (внутривенно болюсно в дозе 2, 6 или 20 мг/кг или подкожно в дозе 2 или 20 мг/кг) ALP201. Концентрации ALP201 в плазме поддавались количественному определению в течение 28 дней после введения дозы. Описательная статистика ФК-параметров ALP201 представлена в таблице 13 **Таблица** . Профили зависимости средней концентрации ALP201 в плазме от времени показаны на фиг. 15.

Следует обратить внимание, что для сравнения добавлены исторические данные по асфотазе альфа.

**Таблица 13: Средние ( $\pm$ SD) фармакокинетические параметры ALP201 после однократного внутривенного или подкожного введения обезьянам**

Путь введения	Доза (мг/кг)	N	$T_{max}$ (ч)	$C_{max}$ (мкг/мл)	$t_{1/2}$ (ч)	$AUC_t$ (ч $\times$ мкг/мл)	$AUC_{\infty}$ (ч $\times$ мкг/мл)	$V_d$ или $V_d/F$ (л/кг)	CL или CL/F (л/ч/кг)
в/в	2	3	0,7 $\pm$	48,0 $\pm$	68,3 $\pm$	2298,4 $\pm$	2358,5 $\pm$	0,08 $\pm$	0,0008 $\pm$
			0,3	6,6	5,7	212,5	232,5	0,00	0,0001
в/в	6	3	0,7 $\pm$	146,5 $\pm$	66,8 $\pm$	6394,2 $\pm$	6814,7 $\pm$	0,09 $\pm$	0,0009 $\pm$
			0,3	12,6	8,4	519,0	885,3	0,02	0,0001
в/в	20	3	2,4 $\pm$	416,7 $\pm$	60,4 $\pm$	17838,9	18248,2 $\pm$	0,10 $\pm$	0,0011 $\pm$
			3,2	166,6	20,8	$\pm$ 2737,0	2530,2	0,03	0,0002
п/к	2	3	17,4 $\pm$	13,7 $\pm$	72,7 $\pm$	1593,4 $\pm$	1665,3 $\pm$	0,13 $\pm$	0,0012 $\pm$
			13,3	2,4	5,8	168,5	187,9	0,01	0,0001
п/к	20	3	18,8 $\pm$	149,9 $\pm$	62,0 $\pm$	14064,2	15662,6 $\pm$	0,11 $\pm$	0,0013 $\pm$
			10,9	17,7	13,2	$\pm$ 835,3	189,0	0,02	0,0

Сокращения:  $AUC_{\infty}$ =площадь под кривой зависимости концентрации от времени от нуля (дозирование), экстраполированная до бесконечности;  $AUC_t$ =площадь под кривой зависимости концентрации от времени от нуля (дозирование) до последней обнаруживаемой концентрации; CL или CL/F=общий клиренс;  $C_{max}$ =максимальная наблюдаемая концентрация в плазме; CV=коэффициент вариации; в/в=внутривенно; п/к=подкожно; SD=стандартное отклонение;  $t_{max}$ =время достижения максимальной наблюдаемой концентрации в плазме;  $t_{1/2}$ =конечный период полувыведения;  $V_d$  или  $V_d/F$ =кажущийся объем распределения.

При внутривенном введении увеличение значений  $C_{max}$  и  $AUC_{\infty}$  было близко к пропорциональной дозе в исследованном диапазоне доз от 2 мг/кг до 20 мг/кг. CL и  $V_d$  ALP201 оставались постоянными для разных доз, средние значения CL варьировали от 0,0008 до 0,0011 л/ч/кг, а средние значения  $V_d$  варьировали от 0,08 до 0,10 л/кг.  $t_{1/2}$  ALP201, который также оставался относительно одинаковым для разных доз, в среднем составлял около 3 дней. При подкожном введении средние значения CL/F,  $V_d/F$  и  $t_{1/2}$  соответствовали значениям, полученным после внутривенного введения. Среднее значение  $t_{max}$  колебалось от 17 до 19 часов после введения дозы, что предполагает относительно медленное всасывание из места подкожной инъекции. Абсолютная биодоступность составила 69,6% и 86,9% для доз 2 мг/кг и 20 мг/кг соответственно.

#### **Токсикокинетические исследования повторных доз с ALP201**

Четырехнедельное подкожное введение крысам (1727-227): ALP201 вводили подкожно крысам в дозе 2, 10 или 30 мг/кг/доза один раз каждые 3 дня в течение 4 недель.

Кроме того, крысам внутривенно вводили ALP201 в разовой дозе 10 мг/кг для сравнения биодоступности внутривенного и подкожного введения. Фармакокинетические параметры рассчитывали с использованием некомпартментного анализа концентраций композита ALP201 в плазме после введения дозы в День 0 и День 24 и показаны в Таблице 14.

Системное воздействие ALP201, по-видимому, не зависело от пола после подкожного введения ALP201 в дни 0 и 24 и после однократной внутривенной болюсной инъекции ALP201 в день 0. После подкожного введения ALP201 каждые 3 дня значения  $C_{\max}$  и  $AUC_{0-72 \text{ ч}}$  для ALP201 увеличивались с увеличением дозы чуть менее, чем пропорционально дозе, в дни 0 и 24. Системное воздействие ( $AUC_{0-72 \text{ ч}}$ ) ALP201, по-видимому, снижалось после повторного подкожного введения. Снижение воздействия, по-видимому, зависело от дозы с максимальным снижением до 2 раз после повторного подкожного введения 30 мг/кг ALP201. Подкожная биодоступность ALP201 (на основе значений  $AUC_{0-72 \text{ ч}}$  при 10 мг/кг) составляла приблизительно 44,2%.

Таблица 14. Токсикокинетические параметры после 4-недельного повторного п/к или однократного в/в введения крысам

Путь введения	Доза (мг/кг)	День	$C_{\max}$ (мкг/мл)	$C_{\max}/\text{доза}$ (мкг/мл)/(мг/кг)	$T_{\max}$ (ч)	$AUC_{0-72 \text{ ч}}$ (час×мкг/мл)	$AUC_{0-72 \text{ ч}}/\text{доза}$ (час×мкг/мл)/(мг/кг)	$AUC_{0-168 \text{ ч}}$ (час×мкг/мл)	$R^a$	$F^b$ (%)
п/к	2	0	7,94	3,97	48	429	214	1320	Н/П	Н/П
п/к	2	24	6,13	3,06	24	338	169	841	0,789	Н/П
п/к	10	0	30,4	3,04	24	1630	163	4810	Н/П	44,2
п/к	10	24	22,5	2,25	24	1200	120	2760	0,735	Н/П
п/к	30	0	79,9	2,66	24	4150	138	11600	Н/П	Н/П
п/к	30	24	43,9	1,46	24	2120	70,7	4380	0,512	Н/П
в/в	10	0	195	19,5	2	3690	4720	Н/П	Н/П	Н/П

<sup>a</sup>:  $R=AUC_{0-72 \text{ ч}} \text{ день } 24/AUC_{0-72 \text{ ч}} \text{ день } 0$ .

<sup>b</sup>:  $F=AUC_{0-72 \text{ ч}} \text{ от группы доза } 10 \text{ мг/кг п/к день } 0/AUC_{0-72 \text{ ч}} \text{ группа дозы } 10 \text{ мг/кг в/в день } 0 * 100$

Сокращения:  $AUC_{0-72 \text{ ч}}$ =Площадь под кривой зависимости концентрации в плазме от времени от 0 до 72 часов;  $AUC_{0-168 \text{ ч}}$ =Площадь под кривой зависимости концентрации в плазме от времени от 0 до 168 часов;  $C_{\max}$ =максимальная наблюдаемая концентрация в плазме; в/в=внутривенно; п/к=подкожно; Н/П=не проводили;  $T_{\max}$ =время достижения максимальной наблюдаемой концентрации в плазме.

Четырехнедельное п/к введение обезьянам: ALP201 вводили подкожно обезьянам в дозе 1, 5 или 20 мг/кг/доза один раз каждые 3 дня в течение 4 недель. ФК параметры

рассчитывали с использованием некомпартментного анализа концентраций ALP201 в плазме после введения дозы в День 1 и День 24 и показаны в Таблице 15.

Таблица 15: Токсикокинетические параметры ALP201 после 4-недельного повторного п/к введения обезьянам

Доза (мг/кг)	День	$C_{\max}$ (мкг/мл)	$C_{\max}/\text{доза}$ (мкг/мл)/(мг/кг)	$T_{\max}^a$ (ч)	$AUC_{0-72\text{ ч}}$ (час×мкг/мл)	$AUC_{0-72\text{ ч}}/\text{доза}$ (ч×мкг/мл)/(мг/кг)	$AUC_{0-168\text{ ч}}$ (час×мкг/мл)	$R^b$
1	0	6,73	6,73	48	391	391	1440	Н/П
1	24	10,9	10,9	Н/П	787	787	2200	2,12
5	0	29,2	5,85	48	1720	345	6030	Н/П
5	24	38,1	7,62	24	2870	575	6970	1,83
20	0	125	6,25	48	7310	366	27900	Н/П
20	24	254	12,7	24	15400	772	36800	2,15

a: Медиана (минимум-максимум), медианное значение сообщается только в том случае, если фактический интервал сбора данных

b:  $R = AUC_{0-72\text{ ч}} \text{ Day 24} / AUC_{0-72\text{ ч}} \text{ день 0}$ .

Сокращения:  $AUC_{0-72\text{ ч}}$  = Площадь под кривой зависимости концентрации в плазме от времени от 0 до 72 часов;  $AUC_{0-168\text{ ч}}$  = Площадь под кривой зависимости концентрации в плазме от времени от 0 до 168 часов;  $C_{\max}$  = максимальная наблюдаемая концентрация в плазме; в/в = внутривенно; Н/П = не проводили; п/к = подкожно;  $T_{\max}$  = время достижения максимальной наблюдаемой концентрации в плазме.

Системное воздействие ALP201, по-видимому, не зависело от пола после подкожного введения ALP201 в дни 0 и 24. После подкожного введения ALP201 каждые 3 дня значения  $C_{\max}$  и  $AUC_{0-72\text{ ч}}$  для ALP201 увеличивались с увеличением дозы приблизительно пропорциональным дозе образом в дни 0 и 24. Системное воздействие (значения  $AUC_{0-72\text{ ч}}$ ) ALP201, по-видимому, увеличивалось после повторного подкожного введения ALP201 на 24-й день.

Фармакокинетика, фармакодинамика и иммуногенность в исследованиях повторных доз

28-дневное исследование токсичности на крысах с 28-дневным периодом восстановления

ТК/ADA ALP201 оценивали у самцов и самок крыс после подкожного введения 2, 10 или 30 мг/кг один раз в три дня (10/пол/доза в группе, 5/пол/время) в течение 4 недель (всего 10 доз) и однократная внутривенная доза 10 мг/кг (всего 1 доза). Образцы крови для анализа ТК собирали в течение 72-часового периода у всех животных, в дни 0 и 24. ФК-параметры ALP201 приведены в таблице 16.

**Таблица 16 Средние фармакокинетические параметры ALP201 в день 0 и день 24 после повторного п/к или однократного в/в введения крысам**

Путь введения	Доза (мг/кг)	День	$C_{\max}$ (мкг/мл)	$t_{\max}$ (ч)	$AUC_{72\text{ ч}}$ (час×мкг/мл)	$AUC_{168\text{ ч}}^a$ (час×мкг/мл)	$R^b$	$F^c$ (%)
п/к	2	0	7,94	48	429	1320	Н/П	Н/П
п/к	2	24	6,13	24	338	841	0,789	Н/П
п/к	10	0	30,4	24	1630	4810	Н/П	44,2
п/к	10	24	22,5	24	1200	2760	0,735	Н/П
п/к	30	0	79,9	24	4150	11600	Н/П	Н/П
п/к	30	24	43,9	24	2120	4380	0,512	Н/П
в/в	10	0	195	2	3690	Н/П	Н/П	Н/П

<sup>a</sup>Значения  $AUC_{168\text{ ч}}$  были рассчитаны в день 0 и день 18

<sup>b</sup> $R=AUC_{72\text{ ч}} \text{ день } 24/AUC_{72\text{ ч}} \text{ день } 0$ .

<sup>c</sup> $F=AUC_{72\text{ ч}} \text{ от группы доза } 10 \text{ мг/кг п/к день } 0/AUC_{72\text{ ч}} 10 \text{ мг/кг в/в группа доза день } 0 * 100$

Сокращения:  $AUC_{72\text{ ч}}$ =Площадь под кривой зависимости концентрации в плазме от времени от 0 до 72 часов;  $AUC_{168\text{ ч}}$ =Площадь под кривой зависимости концентрации в плазме от времени от 0 до 168 часов;  $C_{\max}$ =максимальная наблюдаемая концентрация в плазме; F=биодоступность; в/в=внутривенно; п/к=подкожно; Н/П=не проводили;  $t_{\max}$ =время достижения максимальной наблюдаемой концентрации в плазме; R=коэффициент накопления

Системное воздействие ALP201 оказалось независимым от пола после повторного подкожного введения ALP201 и после однократной внутривенной болюсной инъекции ALP201. Поэтому объединенные результаты по полу были включены в Таблицу 16. После подкожного введения ALP201 один раз в 3 дня (q3d) экспозиция ALP201 ( $C_{\max}$  и  $AUC_{72\text{ ч}}$ ) увеличивалась с увеличением дозы чуть менее, чем пропорционально дозе, в дни 0 и 24. Системное воздействие ( $C_{\max}$  и  $AUC_{72\text{ ч}}$ ) на 24-й день, по-видимому, снижалось после повторного подкожного введения. Снижение воздействия оказалось дозозависимым с максимальным снижением до 60% после повторного подкожного введения 30 мг/кг ALP201. Подкожная биодоступность ALP201 составляла приблизительно 44,2%.

Ответ ADA был отрицательным для всех образцов до введения дозы. Уровень заболеваемости ADA составил 58% и 90% для образцов ADA после введения дозы D28 и D56 соответственно. Снижение воздействия на 24-й день (60%) для дозы 30 мг/кг, вероятно, было связано с реакцией иммуногенности.

28-дневное исследование токсичности на обезьянах с 28-дневным периодом восстановления

TK/ADA ALP201 оценивали у самцов и самок обезьян после подкожного введения 1, 5 или 20 мг/кг один раз в три дня (группа 5/пол/доза) в течение 4 недель (всего 10 доз). Образцы крови для анализа ТК собирали на 0-й и 24-й день. Описательная статистика ФК-параметров ALP201 представлена в таблице 17.

**Таблица 17: Средние ( $\pm$ SD) фармакокинетические параметры ALP201 на 0-й и 24-й день после повторного подкожного введения обезьянам**

Доза (мг/кг)	День	Статистические данные	$C_{\max}$ (мкг/мл)	$t_{\max}^a$ (ч)	$AUC_{72\text{ ч}}$ (ч*мкг/мл)	$AUC_{168\text{ ч}}^b$ (ч*мкг/мл)	$R^c$
1	0	N	10	10	10	10	Н/П
		Среднее $\pm$ SD	6,73 $\pm$ 1,44	48 (24-48)	391 $\pm$ 99,9	1440 $\pm$ 298	Н/П
1	24	N	10	10	8	7	8
		Среднее $\pm$ SD	10,9 $\pm$ 7,48	Н/П (8-24)	787 $\pm$ 346	2200 $\pm$ 320	2,12 $\pm$ 1,11
5	0	N	10	10	10	10	Н/П
		Среднее $\pm$ SD	29,2 $\pm$ 4,44	48 (24-48)	1720 $\pm$ 317	6030 $\pm$ 723	Н/П
5	24	N	10	10	8	8	8
		Среднее $\pm$ SD	38,1 $\pm$ 24,2	24 (8-24)	2870 $\pm$ 1140	6970 $\pm$ 2600	1,83 $\pm$ 0,805
20	0	N	10	10	10	10	Н/П
		Среднее $\pm$ SD	125 $\pm$ 29,4	48 (24-48)	7310 $\pm$ 1760	27900 $\pm$ 5130	Н/П
20	24	N	10	10	8	10	8
		Среднее $\pm$ SD	254 $\pm$ 62	24 (8-24)	15400 $\pm$ 4420	36800 $\pm$ 12300	2,15 $\pm$ 0,59

<sup>a</sup>Медиана (минимум-максимум), медианное значение сообщается только в том случае, если фактический интервал сбора данных

<sup>b</sup>Значения  $AUC_{0-168\text{ ч}}$  были рассчитаны в день 0 и день 18

<sup>c</sup> $R = AUC_{72\text{ ч}} \text{ день } 24 / AUC_{72\text{ ч}} \text{ день } 0$ .

Сокращения:  $AUC_{72\text{ ч}}$  = Площадь под кривой зависимости концентрации в плазме от времени от 0 до 72 часов;  $AUC_{168\text{ ч}}$  = Площадь под кривой зависимости концентрации в плазме от времени от 0 до 168 часов;  $C_{\max}$  = максимальная наблюдаемая концентрация в

плазме; Н/П=не проводили;  $t_{\max}$ =время достижения максимальной наблюдаемой концентрации в плазме; R=коэффициент накопления.

Не было никаких различий по полу в системном воздействии ALP201 в дни 0 и 24. Поэтому объединенные результаты по полу были включены в Таблицу 17. После подкожного введения ALP201 один раз каждые 3 дня ALP201 ( $C_{\max}$  и  $AUC_{72 \text{ ч}}$ ) увеличивались с увеличением дозы приблизительно пропорциональным образом в дни 0 и 24. Системное воздействие (значения  $AUC_{72 \text{ ч}}$ ) ALP201, по-видимому, увеличивалось после повторного подкожного введения ALP201 на 24-й день со средними отношениями накопления  $AUC_{72 \text{ ч}}$  2,12, 1,83 и 2,15 при дозах 1, 5 и 20 мг/кг соответственно.

Ответ ADA был отрицательным для образцов до введения дозы. Уровень заболеваемости ADA составил 23% и 92% для образцов ADA после введения дозы D28 и D56 соответственно. Хотя прямую корреляцию между положительными ответами на ADA и профилями зависимости концентрации от времени при системном воздействии установить не удалось, поскольку образцы ADA не отбирали в дни сбора ТК, после многократного введения антитела к ALP201 оказывали влияние на аберрантные профили зависимости концентрации от времени у некоторых животных при дозе  $\leq 5$  мг/кг.

Анализы на основе моделей и прогнозируемые схемы дозирования для человека

Моделирование ALP201

*Модель популяционной фармакокинетики (Поп-ФК)*

Для прогнозирования воздействия ALP201 на людей с учетом результатов зависимости доза-реакция на мышах была разработана модель Поп-ФК с использованием аллометрического масштабирования на основе массы тела и объединения данных о фармакокинетике мышей, крыс и обезьян для прогнозирования оценок фармакокинетических параметров человека. Данные фармакокинетики мышей включали исследование однократной дозы на мышах дикого типа (HPP-PK-01) и однократные измерения  $C_{\text{trough}}$  (D36/D37) из двух многократных исследований эффективности Акp2GW (-/-) на мышах (HPP-PoC-01 и HPP-MED-01). Для крыс и обезьян также были включены однократные дозы, исследования по определению диапазона доз у крыс и яванских макаков, а также многократные 4-недельные токсикологические исследования GLP на крысах и яванских макаках.

Текущая модель Поп-ФК была разработана с использованием программного обеспечения NONMEM версии 7.2 (решения ICON) для одновременного анализа данных ФК в/в и п/к от 3 видов животных с учетом различий в массе тела с использованием аллометрических принципов, где масса тела животного была сосредоточена на 70 кг и аллометрические показатели были зафиксированы на уровне 0,75 для параметров клиренса и 1,0 для параметров объема распределения. Влияние ADA на ФК оценивали по CL на основе 4-недельного ТК, показывающего, что крысы и, в меньшей степени, обезьяны, по-видимому, имеют более низкие концентрации ALP201 для ADA+ животных. В настоящее время лучшей моделью Поп-ФК является двухкомпарментная модель с линейным удалением. Тестирование влияния ADA+ на концентрации ALP201 не дало

результатов. Предполагаемая биодоступность у людей составляла  $\sim 75\%$ , а рассчитанный эффективный период полувыведения для человека составлял от 7 до 9 дней. При моделировании фармакокинетики человека использовалась предполагаемая вариабельность человеческой модели Поп-ФК асфотазы альфа и средняя (и стандартное отклонение) исходная масса тела взрослых субъектов НРР, которые принимали участие в клинических испытаниях, оценивающих асфотазу альфа как средство для лечения НРР.

#### *Модель доза-ответ*

Разработанная модель доза-ответ была выбрана путем тестирования моделей семейства  $E_{\max}$ . Большинство взаимосвязей доза-ответ могут быть описаны с помощью одной из параметризаций модели  $E_{\max}$ . В настоящее время наилучшей характеристикой доза-ответ является использование модели  $E_{\max}+E_0$  (исходный уровень). Конечной точкой эффективности, минерализацией кости, была радиографическая оценка, которая была выбрана, поскольку она имела то же клиническое определение эффективности, что и используемое для неклинической оценки доза-ответ асфотазы альфа. Минерализация костей после лечения асфотазой альфа или ALP201 из 2 исследований эффективности (НРР-РoC-01 и НРР-MED-01) была нанесена на график в зависимости от дозы (фиг. 6). Для сравнения были включены данные асфотазы альфа из предыдущего исследования эффективности. Ось y была выражена как % от нормы, которая была определена как процент мышей в дозовой группе с оценкой минерализации костей 4. Ось x была выражена как доза, нормализованная до мг/кг/день. Доза, вызывающая нормальную минерализацию у 85% пациентов (ED85), была выбрана в качестве целевой эффективной дозы.

Трансляция дозы от мыши к человеку и предлагаемые начальные дозы для человека

Аллометрическое масштабирование применяли к целевой эффективной дозе для мыши (ED85) для определения дозы для человека. Уравнение, используемое для прогнозирования от мышью ED85 до эквивалентной дозы для человека (HED, мг/кг/день), представляло собой  $ED85 \times (0,025 \text{ кг мыши}/70 \text{ кг человека})^{0,25}$ . HED был преобразован в еженедельную фиксированную дозу 45 мг в неделю и будет использоваться в качестве дозы для когорты 2 исследования FII (как в/в, так и п/к). Когорта 3 (в/в и п/к) будет использовать 90 мг/неделю. Группа 1 будет использовать начальную дозу 15 мг в неделю, основанную на NOAEL (как в/в, так и п/к).

Прогнозируемое воздействие на человека и пределы безопасности ФК для ALP201

Модель Поп-ФК использовали для имитации богатых профилей ФК на основе аллометрически масштабированных доз для человека (фиг. 7). Используя смоделированные фармакокинетические данные, были рассчитаны показатели экспозиции  $C_{\max}$  и AUC.

Прогнозируемое воздействие на человека ( $C_{\max}$  и  $AUC_{168 \text{ ч}}$ ) и ожидаемые пределы безопасности ФК для предлагаемых доз FII ALP201 показаны в таблице 18. Пределы безопасности ФК были рассчитаны для предложенных доз FII ALP201 с использованием

прогнозируемого воздействия на человека и наблюдаемого воздействия NOAEL из 4-недельного токсикологического исследования GLP на обезьянах (доза NOAEL при п/к введении 20 мг/кг/Q3D).

Таблица 18: Прогнозируемое воздействие ФК ALP201, запас безопасности и % нормализованной реакции минерализации

Когорта	N	Доза	Прогнози-руемая $AUC_{168\text{ ч}}$ (мкг х час/мл)	Прогнози-руемая $C_{\text{max}}$ (мкг/мл)	Ожидаемый запас безопас-ности для $AUC_{168\text{ ч}}^*$	Ожидаемый запас безопасности для $C_{\text{max}}^*$	% нормальной реакции минерализации в модели НРР на мышах
1	4	15 мг в/в	325	4,3	113	59	Н/П
		15 мг п/к один раз в две недели × 3	441	3,2	83	79	66
2	4	45 мг в/в	1084	13,0	38	20	Н/П
		45 мг п/к один раз в две недели × 3	1318	9,6	28	26	85
3	4	90 мг в/в	1951	26	19	10	Н/П
		90 мг п/к один раз в две недели × 3	2645	19	14	13	91

Сокращения:  $AUC_{168\text{ ч}}$ =площадь под кривой зависимости концентрации от времени от нуля до 168 часов;  $C_{\text{max}}$ =максимальная наблюдаемая концентрация, измеренная после дозирования; НРР=гипофосфатазия; в/в=внутривенно; N=количество субъектов; п/к=подкожно; Н/П=не проводили;

\* NOAEL 20 мг/кг/q3d по результатам 4-недельного токсикологического исследования на обезьянах подкожно.

#### Токсикологические исследования

Доклинические исследования безопасности проводились на крысах и обезьянах для оценки местной переносимости, системной токсичности и фармакологических параметров безопасности после подкожного введения ALP201 в течение 28 дней. Доклиническая оценка безопасности однократного внутривенного введения ALP201 также оценивалась в 28-дневном исследовании токсичности на крысах, чтобы охарактеризовать биодоступность п/к ALP201.

#### Токсикологические исследования однократной дозы

Отдельные исследования переносимости однократного введения ALP201 не проводились. Однако переносимость ALP201 у крыс и обезьян оценивали в рамках исследований фармакокинетики однократной дозы. Переносимость ALP201 оценивали по

клиническим наблюдениям, включая реакции в месте инъекции и данные клинической патологии. Никаких заслуживающих внимания реакций в месте инъекции, связанных с ALP201, клинических наблюдений и наблюдений за клинической патологией в исследованиях однократной дозы фармакокинетики на крысах или обезьянах отмечено не было. Таким образом, однократные дозы ALP201 хорошо переносились при внутривенном или подкожном введении крысам до 27 мг/кг и обезьянам до 20 мг/кг. Дозы для токсикологических исследований с определением повторных доз ALP201 (GLP) были выбраны на основе полученных данных о переносимости и клинической патологии.

#### Токсикологические исследования повторных доз

Окончательные или соответствующие GLP 28-дневные исследования токсичности были проведены на крысах Спраг-Доули и яванских макаках. В 28-дневном исследовании токсичности на крысах введение ALP201 посредством подкожной инъекции один раз каждые 3 дня в течение 28 дней (дни 1, 4, 7, 10, 13, 16, 19, 22, 25 и 28) всего 10 доз для самцов и самок крыс CD<sup>®</sup> хорошо переносился в дозе до 30 мг/кг/дозу, что является самой высокой дозой подкожного введения, оцененной в этом исследовании. Кроме того, введение ALP201 в дозе 10 мг/кг внутривенно также хорошо переносилось после однократной инъекции. Не было никаких изменений, связанных с ALP201, в клинических наблюдениях, массе тела, прибавке массы тела, количественном потреблении пищи, офтальмологии, функциональной батарее наблюдений, гематологии, анализе мочи, общей патологии и массе органов. В конце фазы дозирования наблюдалось дозозависимое повышение активности щелочной фосфатазы (ALP) (ожидаемый фармакологический эффект) при  $\geq 2$  мг/кг/дозу ALP201 SC, которое полностью исчезло после 28-дневного периода восстановления. Неблагоприятные микроскопические изменения были связаны с инъекционными процедурами с сопутствующими реактивными изменениями в дренирующих лимфатических узлах. Не было заметного изменения, связанного с ALP201, в частоте, тяжести или микроскопическом характере изменений в местах инъекций или дренирующих лимфатических узлах. Микроскопические изменения в местах инъекций и дренирующих лимфатических узлах у выздоравливающих животных были аналогичны изменениям, отмеченным у животных с терминальной аутопсией, хотя менее выражены у животных в группе выздоровления. В заключение следует отметить, что уровень дозы 30 мг/кг/доза считается уровнем отсутствия наблюдаемых побочных эффектов (NOAEL) при подкожном введении; это соответствует объединенному значению  $C_{max}$  у мужчин и женщин на 24-й день, равному 43,9 мкг/мл, и значению  $AUC_{0-72 ч}$ , равному 2120 ч\*мкг/мл.

После однократного внутривенного болюсного введения 10 мг/кг ALP2-1 крысам показатель  $AUC_{0-72 ч}$  составил 3690 ч\*мкг/мл. Подкожная биодоступность ALP201 (на основе значений п/к  $AUC_{0-72 ч}$  при 10 мг/кг/доза) у крыс составляла приблизительно 44,2%.

В 28-дневном исследовании токсичности на обезьянах введение ALP201 посредством подкожной инъекции один раз каждые 3 дня в течение 28 дней (всего 10 дней в дни 1, 4, 7, 10, 13, 16, 19, 22, 25 и 28), в дозах 1 мг/кг, 5 мг/кг или 20 мг/кг у самцов и самок яванских макаков хорошо переносились до 20 мг/кг/дозы, самой высокой дозы,

оцененной в этом исследовании. Не было никаких связанных с ALP201 изменений в реакциях в месте инъекции (кожная оценка), массе тела, прибавке массы тела, качественном потреблении пищи, офтальмологии, частоте мануального дыхания, непрямом артериальном давлении, качественной электрокардиографии, гематологии, анализе мочи, общей патологии и массе органов. В конце фазы дозирования наблюдалось дозозависимое повышение активности щелочной фосфатазы (ожидаемый фармакологический эффект), которое полностью (1 мг/кг/доза) или в основном ( $\geq 5$  мг/кг/доза) устранялось после 28-дневного восстановительного периода. Неблагоприятные микроскопические изменения, связанные с ALP201, ограничивались местами инъекций и включали дегенерацию/некроз от минимальной до легкой степени, минерализацию и смешанное клеточное воспаление/инфильтрацию. Частичное восстановление дегенерации/некроза и смешанное клеточное воспаление/инфильтрация места (мест) инъекции наблюдалось в группах восстановления, в то время как минимальная или легкая минерализация сохранялась у выздоравливающих мужчин при  $\geq 1$  мг/кг/доза и у женщин при 20 мг/кг/доза. Увеличение частоты сердечных сокращений наблюдалось у всех животных при 1 мг/кг/доза и у некоторых животных при  $\geq 5$  мг/кг/доза. Это увеличение частоты сердечных сокращений не считалось неблагоприятным, потому что, помимо несоответствия данных о системном воздействии, частота сердечных сокращений и значения ЭКГ оставались в пределах нормального диапазона биологических вариаций для обезьян этого возраста. В заключение, уровень дозы 20 мг/кг/доза считается уровнем отсутствия наблюдаемых побочных эффектов (NOAEL), что соответствует комбинированному среднему значению  $C_{\max}$  у мужчин и женщин на 24-й день 254 мкг/мл и среднее значение  $AUC_{0-72 \text{ ч}}$  составляет 15400 ч\*мкг/мл соответственно.

#### Местный переносимость

Отдельные доклинические исследования для оценки местной переносимости не проводились. Тем не менее, оценка мест инъекций проводилась в SC ALP201 в исследованиях общей токсикологии на крысах и обезьянах и в/в ALP201 в исследованиях общей токсикологии на крысах. Подкожное и в/в введение ALP201 локально хорошо переносилось обезьянами, при этом в местах инъекции не наблюдалось побочных явлений.

Обобщенные данные доклинических наблюдений, относящихся к клиническим исследованиям ALP201

#### Оценки безопасности

Не было никаких изменений, связанных с ALP201, в клинических наблюдениях, массе тела, прибавке массы тела, количественном потреблении пищи, офтальмологии, функциональной наблюдательной батарее (ЦНС), сердечно-сосудистых конечных точках, респираторных конечных точках, гематологии, анализе мочи, общей патологии и массе органов в 28-дневных токсикологических исследованиях. В конце фазы дозирования наблюдалось значительное дозозависимое повышение активности щелочной фосфатазы

(ALP), ожидаемый фармакологический эффект у крыс или обезьян. У крыс или обезьян не наблюдалось заслуживающей внимания системной органной токсичности ни при одной из доз, оцененных в соответствующих исследованиях.

ALP201 хорошо переносился локально после подкожного введения крысам и обезьянам. Не-неблагоприятные микроскопические изменения, связанные с ALP201, в исследовании на обезьянах были ограничены местами инъекций и включали дегенерацию/некроз от минимальной до легкой степени у самцов и самок. Дегенерация/некроз и смешанное клеточное воспаление/инфильтрация места (мест) инъекции встречались реже и имели меньшую степень тяжести или имели признаки хронизации (минерализации) в группе выздоровления, что указывает на частичное выздоровление. Не-неблагоприятные микроскопические изменения в исследовании на крысах были ограничены инъекционными процедурами с сопутствующими реактивными изменениями в дренирующих лимфатических узлах. Не было заметного изменения, связанного с ALP201, в частоте, тяжести или микроскопическом характере изменений в местах инъекций или дренирующих лимфатических узлах. Микроскопические изменения в местах инъекций и дренирующих лимфатических узлах у выздоравливающих животных были аналогичны изменениям, отмеченным у животных с терминальной аутопсией, хотя менее выражены у животных в группе выздоровления.

Наблюдаемое воздействие NOAEL при дозе 20 мг/кг/дозу, полученное в рамках исследования токсичности GLP п/к для обезьян, приблизительно в 113 раз (для в/в) и в 83 раза (для п/к) выше, чем прогнозируемое воздействие AUC предлагаемой начальной однократной дозы для человека 15 мг в/в или 15 мг qw x 3 п/к (таблица 18). Учитывая предел безопасности и отсутствие данных о системной токсичности или местной переносимости в 28-дневных токсикологических исследованиях ALP201 на крысах и обезьянах, риск безопасности для людей при начальной дозе 15 мг очень низок.

#### Иммуногенность

Иммуногенный потенциал ALP201 оценивали путем измерения антилекарственных антител (ADA) ALP201 в сыворотке, полученной в ходе 28-дневных токсикологических исследований GLP на крысах и обезьянах.

В исследовании токсичности на крысах ответы ADA были положительными при подкожном введении у 9 из 20 (6 самцов; 3 самки) животных контрольной группы, у 10 из 19 (6 самцов; 4 самки) животных в дозе 2 мг/кг/доза, 12 из 20 животных (7 самцов; 5 самок) при дозе 10 мг/кг/доза и 12 из 20 животных (6 самцов; 6 самок) при дозе 30 мг/кг/доза на 28-й день ПК. Кроме того, ответы ADA были положительными при внутривенном введении однократной дозы ALP201 у 14 из 20 животных (8 самцов; 6 самок) в дозе 10 мг/кг на 28-й день ПК. Положительный ответ на ADA, по-видимому, не всегда влиял на комбинированные профили зависимости концентрации в плазме от времени в группах, принимавших 2 и 10 мг/кг/дозу подкожно, на 24-й день, хотя ADA могла способствовать очевидному снижению системного воздействия при дозе 30 мг/кг/доза на 24-й день. Положительные ответы ADA у контрольных животных вряд ли

связаны с неправильным дозированием ALP201 на основании проведенного исследования. Дозозависимое увеличение ALP, ожидаемый фармакологический эффект ALP201, наблюдалось в группах с дозой  $\geq 2$  мг/кг подкожно перед окончательной аутопсией, которые разрешились при восстановительной аутопсии. Результаты ALP у животных в контрольных группах были одинаковыми как до терминальной, так и перед восстановительной аутопсией. Кроме того, не было никаких связанных с ALP201 результатов в жизни во время фазы дозирования и восстановления. Таким образом, взятые вместе, положительные ответы ADA, наблюдаемые у контрольных животных на 28-й и 56-й дни ПК (даты исследования 29-й и 57-й день), скорее всего, были связаны с контаминацией пробы крови и не считались влияющими на исследование.

В исследовании токсичности на обезьянах ответы антител к ALP201 были отрицательными для всех образцов до введения дозы в день 0. Ответы ADA была положительными у 4 из 10 животных при 1 мг/кг/доза, у 6 из 10 животных при 5 мг/кг/доза и у 5 из 10 животных при 20 мг/кг/доза на 28-й день. Хотя прямую корреляцию между положительными ответами на ADA и профилями зависимости концентрации от времени при системном воздействии установить не удалось, поскольку образцы ADA не отбирали в дни сбора ТК, после многократного введения антитела к ALP201 оказывали влияние на профили зависимости концентрации от времени у некоторых животных при дозе  $\leq 5$  мг/кг. Животные, подвергшиеся воздействию антител к ALP201, включали 3 животных (2 самца и 1 самку) при 1 мг/кг/доза и 3 животных при 5 мг/кг/доза (3 самки) с днями воздействия на профили концентрация-время в диапазоне от 18-го до 24-го дня для этих животных.

### **Пример 2**

Фармакокинетический профиль асфотазы альфа у нескольких видов предполагает, что сочетание сниженной абсолютной биодоступности и периода полувыведения требует частого дозирования. Каталитический домен TNSALP человека представляет собой сильно гликозилированную молекулу. Присутствие асиалилированных гликанов приводит к клиренсу через асиалогликопротеиновый рецептор (ASGPR) в печени.

ALP201 был разработан как ERT щелочной фосфатазы нового поколения с учетом этих соображений. ALP201 сохраняет архитектуру TNSALP-IgG Fc-D10, используемую в асфотазе альфа, и включает удаление двух несущественных N-связанных гликанов, изменение изотипа Fc человека на IgG2/4 и многочисленные усовершенствования процесса экспрессии молекулы, что приводит к более высокому включению TSAC. В этом отчете мы представляем фармакокинетические параметры для ALP201, определенные в исследованиях однократной дозы самцов мышей C57BL/6 при внутривенном и подкожном введении. Мы также сообщаем о фармакокинетических параметрах нескольких партий ALP201, экспрессированных и очищенных с различными уровнями включения TSAC, чтобы помочь определить, на какие фармакокинетические параметры наиболее сильно влияет клиренс асиалилированного гликана.

Материалы и методы

## Штамм животных

Чтобы обеспечить согласованность между этими исследованиями и предыдущими фармакокинетическими исследованиями асфотазы альфа, это исследование было проведено с использованием самцов мышей C57BL/6 в возрасте приблизительно 11-12 недель на момент введения дозы. Информация для протестированных молекул показана в таблице 19.

Таблица 19: Исследуемые препараты

Молекула	Партия №	Специфическая* активность	Общее содержание сиаловой кислоты (моль/мономер)	Концентрация (мг/мл)	Состав
ALP201	1	36,9	5,9	8,35	PBS
ALP201	2	32,8	5,9	9,15	PBS
ALP201	3	40,3	5,0	3,09	PBS
ALP201	4	39,1	3,2	6,54	PBS

\* Специфическая активность указана в Ед/мг гидролиза 4-MUP, где 1 Ед.=фермент, необходимый для гидролиза 1 микромоля 4-MUP за 1 минуту в условиях буфера для анализа при 37°C.

## Дозирование животным и забор крови

Животных в возрасте 11-12 недель рандомизировали по массе тела и разделили на 4 группы. Дозу ALP201 4 мг/кг вводили 16 мышам/группе в день 0 внутривенно (в/в) (Группа 1) или подкожно (п/к) (Группа 2). Эквивалентный объем PBS с поправкой на массу вводили в день 0 мышам/группе 4 в/в (группа 3) или п/к (группа 4). Внутривенное введение дозы выполняли в хвостовую вену. Подкожно болюсную дозу вводили в лопаточную область над плечами.

Был использован полупоследовательный дизайн выборки с 4 когортами на группу и n=4/на когорту+1 дополнительная мышь на группу. В ходе исследования в Alexion у каждой мыши брали кровь 3 раза, включая конечный забор. Временные точки (часы после введения дозы) показаны в Таблице 20 ниже для каждой когорты.

Для нетерминальных заборов крови 100 мл цельной крови собирали путем подчелюстного сбора в предварительно покрытые литий-гепаринизированными пробирки для сбора не менее 50 мкл плазмы в момент времени для каждого животного. При терминальном заборе крови максимально возможное количество крови собирали путем пункции сердца в пробирки с литий-гепаринизированным гепарином. Кровь хранили при 4°C и обрабатывали для получения плазмы центрифугированием как можно скорее после сбора. Каждый образец плазмы был разделен на 2 равные по объему аликвоты перед быстрой заморозкой в смеси CO<sub>2</sub>/этанол и хранением при -80°C.

Таблица 20: Экспериментальные группы лечения, доза, способ введения и график забора крови для исследования в домашних условиях

Группа	Кол-во мышей	Исследуемый препарат	Путь введения	Доза (мг/кг)	Конц. дозы (мг/мл)	Доза (мл/кг)	Носитель
1	16+1 <sup>a</sup>	ALP201	в/в болюс	4	1	4	PBS без Ca/Mg
2	16+1 <sup>a</sup>	ALP201	п/к-болюс	4	1	4	PBS без Ca/Mg
3	4	PBS	в/в болюс	-	-	-	-
4	4	PBS	п/к-болюс	-	-	-	-

<sup>a</sup>N=16 на группу+1 дополнительное животное, которое используется в качестве запасного животного в случае гибели животного или неправильной дозы.

Таблица 21: График отбора проб крови для внутреннего исследования, когорты групп 1 и 2

Когорта	0,25 ч	1 ч	6 ч	24 ч (D1)	48 ч (D2)	72 ч (D3)	96 ч (D4)	120 ч (D5)	192 ч (D8)	264 ч (D11)	336 ч (D14)	480 ч (D21)
1	X				X				X			
2		X				X				X		
3			X				X				X	
4				X				X				X

Таблица 22: График отбора крови для внутреннего исследования, группы 3 и 4

Группа	0,25 ч	1 ч	6 ч	24 ч (D1)	48 ч (D2)	72 ч (D3)	96 ч (D4)	120 ч (D5)	192 ч (D8)	264 ч (D11)	336 ч (D14)	480 ч (D21)
3	X								X			
4	X								X			

Для партий 2, 3 и 4 группы по 32 мыши собирали для каждого пути введения в 8 когорт по 4 животных на временную точку. В группах с в/в введением у каждой когорты брали кровь дважды (первая временная точка для сбора данных о выживании, а вторая - терминально) через приблизительно 0,5, 1, 3, 8, 12, 21, 26, 32, 45, 49, 72, через 96, 120, 192, 264 и 336 часов после введения дозы. В группах с п/к введением у каждой когорты брали кровь дважды (первая - для сбора данных о выживании, а вторая - терминально) приблизительно через 1, 3, 6, 8, 12, 21, 26, 32, 45, 49, 72, через 96, 120, 192, 264 и 336 часов после введения дозы.

### Определение концентрации активного ALP201 в плазме

Образцы плазмы анализировали на активность щелочной фосфатазы с использованием 4-метилумбеллиферилфосфата (4-MUP) в качестве искусственного субстрата. Гидролиз фосфоэфирной связи в 4-MUP высвобождает флуоресцентное соединение 4-метилумбеллиферон (4-MU), которое легко обнаруживается флуориметром. Количественную оценку активности проводили с помощью стандартной кривой ферментативной активности.

### Анализ проб для внутреннего фармакокинетического исследования

Количественную оценку активности проводили с помощью стандартной кривой ферментативной активности, построенной с использованием серийных разведений эталонного стандарта белка асфотазы альфа с известной активностью в анализе 4-MUP на том же планшете. Образцы размороженной плазмы разводили от 100 до 2000 раз в буфере для анализа (50 мМ HEPES, 150 мМ NaCl, 1 мМ MgCl<sub>2</sub>, pH 7,4 и 1 мг/мл BSA) и анализировали для определения концентрации активного фермента ALP201. Окончательный диапазон стандартов белка на каждом планшете составлял от 4 до 80 нг/мл.

Разведенные образцы количественно определяли следующим образом: все разведенные образцы перед началом анализа доводили до 37°C путем добавления 4-MUP к образцу белка, в результате чего конечная концентрация 4-MUP составляла 10 мМ. Производство 4-MU измеряли при длине волны возбуждения 360 нм и длине волны испускания 465 нм. Данные были собраны в планшет-ридере при 37°C, при этом планшет считывался каждые 40 секунд в общей сложности 20 минут. Скорости реакции для плазмы и стандартных образцов рассчитывали путем линейной регрессии наклона реакции с использованием Microsoft Excel в единицах относительных единиц флуоресценции (RFU) в минуту. Скорости реакции для стандартных образцов использовали для построения линейной стандартной кривой в единицах RFU/мин/Ед. Сравнение измеренных скоростей реакции в образцах плазмы сравнивали со стандартной кривой для определения активности ALP201 в плазме в Ед/мл. Активность образца в Единицах/мл переводили в единицы массы мг/л путем деления активности образца на удельную активность тестируемого образца белка (в ед/мг). Образцы дважды прогоняли в двух повторностях для сбора данных для каждой независимой точки отбора проб.

### Анализ образцов для фармакокинетических исследований

Был проведен такой же анализ гидролиза 4-MUP. В день проведения анализа стандарты, контроли качества (КК), контроли разведения (КР) и холостые образцы разводили в 250-кратном буфере для анализа. Стандарты, QC, DC и холостые пробы дополнительно разводили в 2 раза субстратом, 4-метилумбеллиферилфосфатом (4-MUP), до общего 500-кратного минимально необходимого разведения (MRD). Перед выполнением MRD DC разводили в 200 раз плазмой мыши. Количественно ALP201 определяли на основе флуоресцентного продукта метилумбеллиферона, который образуется в результате гидролиза субстрата 4-MUP, используемого в анализе. Планшет

помещали в ридер планшетов и считывали каждые 60 секунд с настройками кинетической флуоресценции при 360 нм (возбуждение), 455 нм (отсечка) и 465 нм (испускание) в течение 25 минут при 37 °С. Активность фермента прямо пропорциональна скорости реакции субстрата.  $V_{max}$  (скорость в интенсивности флуоресценции/мин) определяли по линии наилучшего соответствия данным. Холостой образец не был включен в аппроксимацию кривой. Результаты сообщались в мг/л. Значения были скорректированы с учетом различий в удельной активности между тестируемым продуктом и стандартом активности белка.

#### Фармакокинетический анализ

ФК-анализ проводили с помощью Phoenix WinNonlin v8.0 (Certara). Фармакокинетические параметры рассчитывали с помощью некомпартментного анализа.

Были рассчитаны следующие некомпартментальные фармакокинетические параметры: площадь под кривой «концентрация-время» от нулевого момента времени (дозирование) до последней определяемой концентрации ( $AUC_t$ ), нормализованная по дозе площадь под кривой «концентрация-время» от нулевого времени (дозировка) до последней определяемой концентрации. концентрация ( $AUC_t/\text{доза}$ ), площадь под кривой концентрация-время от нулевого момента времени (дозировка), экстраполированная до бесконечности ( $AUC_{inf}$ ), нормированная по дозе площадь под кривой концентрация-время от нулевого момента (дозировка), экстраполированная до бесконечности ( $AUC_{inf}/\text{доза}$ ), максимальная наблюдаемая концентрация в плазме ( $C_{max}$ ), нормализованная по дозе максимальная наблюдаемая концентрация в плазме ( $C_{max}/\text{доза}$ ), время достижения максимальной наблюдаемой концентрации в плазме ( $T_{max}$ ), конечный период полувыведения ( $t_{1/2}$ ), общий клиренс (CL), кажущийся объем распределения ( $V_d$ ) и биодоступности (F). Фактическое время сбора образцов использовали для расчета ФК-параметров. Фактические дозы использовали для расчета нормированных по дозе фармакокинетических параметров.

#### Результаты и обсуждение

Фармакокинетические параметры ALP201 после внутривенного и подкожного введения мышам

ФК ALP201 оценивали после однократного внутривенного или подкожного введения самцам мышей C57BL/6. В каждой группе вводили дозу 16 мышам, и собирали кровь у разделенных когорт из 4 мышей в каждой группе в следующие моменты времени после введения: 0,25, 1, 6, 24, 48, 72, 96, 120, 192, 264, 336 и 480 часов.

Концентрации ALP201 в плазме измеряли с использованием анализа ферментативной активности, который измерял каталитическую активность ALP201 щелочной фосфатазы. Затем ферментативную активность ALP201 переводили в единицы массы (мг/л) для отчетности.

Профили зависимости средней концентрации активного ALP201 в плазме от времени после внутривенного и подкожного введения представлены в полулогарифмическом масштабе на фиг. 8А и 8В. ФК-параметры ALP201 приведены в

таблицах 7 и 11 выше.

Индивидуальные профили активности в плазме у некоторых мышей в группе внутривенного введения, по-видимому, позволяют предположить, что часть дозы могла быть доставлена подкожно, что может быть причиной относительно высокой вариабельности, наблюдаемой в ранние моменты времени профиля дозирования внутривенного введения. Если это произошло, расчетное значение  $C_{\max}$  для группы, получавшей внутривенно, также может быть искусственно занижено. После внутривенного введения профиль концентрация-время снижался мультиэкспоненциальным образом (фиг 8А и 8В). CL составлял 0,0019 л/ч/кг, а кажущийся терминальный  $t_{1/2}$  составлял 48 часов. После подкожного введения время достижения максимальной концентрации ( $t_{\max}$ ) составляло 48 часов после введения дозы, что предполагает относительно медленное всасывание из места подкожной инъекции. Абсолютная биодоступность после подкожного введения была высокой и составляла 96%.

Фармакокинетические параметры партий ALP201 с различными значениями общего содержания сиаловой кислоты у мышей

Три отдельные партии ALP201, очищенные с измеренными значениями TSAC 5,9, 5,0 и 3,2 моль сиаловой кислоты/моль белкового мономера, вводили путем внутривенного и подкожного введения 32 мышам. Кровь собирали у разделенных когорт из 4 мышей в каждой группе введения в следующие моменты времени после введения: 0,5, 1, 3, 8, 12, 21, 26, 32, 45, 49, 72, 96, 120, 192, 264 и 336 часов после введения дозы для в/в введения; и 1, 3, 6, 8, 12, 21, 26, 32, 45, 49, 72, 96, 120, 192, 264 и 336 часов после введения дозы для п/к введения, при этом у каждой мыши дважды отбирали кровь.

Концентрации ALP201 в плазме измеряли с использованием анализа, который измерял каталитическую активность ALP201 щелочной фосфатазы. Ферментативная активность ALP201 была выражена в единицах массы (мг/л) Charles River.

Профили зависимости средней концентрации активного ALP201 в плазме от времени после внутривенного и подкожного введения для каждой партии белка представлены в полулогарифмической шкале на фиг. 9А и 9В, 10А и 10В, и 11А и 11В. Набор профилей концентрации в плазме в зависимости от времени для внутривенного введения вариантов значения TSAC представлен на фиг. 12. Набор профилей зависимости концентрации в плазме от времени для подкожного введения представлен на фиг. 13. Сводные таблицы средних ФК параметров и нормированных по средней дозе ФК параметров после внутривенного и подкожного введения можно найти в таблицах 21 и 22 соответственно.

Таблица 23. Обобщенные данные фармакокинетических параметров ALP201 для вариантов значений TSAC после подкожного введения самцам мышей C57BL/6

TSAC (МОЛЬ/МОЛЬ)	Путь введения	Доза (МГ/КГ)	$C_{max}$ (МГ/МЛ)	$t_{max}$ (Ч)	$t_{1/2}$ (Ч)	$AUC_t$ (МГ*Ч/Л)	$AUC_{\infty}$ (МГ*Ч/Л)	$V_d$ или $V_d/F$ (Л/КГ)	CL или CL/F (Л/Ч/КГ)	F (%)
5,9	в/в	4	105,3	0,5	29,9	2060,5	2063,8	0,08	0,0019	Н/П
5,9	п/к	4	23,3	21	33,4	1480,3	1487,6	0,13	0,0027	72,1
5,0	в/в	4	57,3	0,5	31,4	1319,6	1322,4	0,14	0,0030	Н/П
5,0	п/к	4	22,4	12	34,9	1316,5	1351,4	0,15	0,0030	102,2
3,2	в/в	4	61,4	0,5	32,8	1308,1	1330,4	0,14	0,0030	Н/П
3,2	п/к	4	19,7	12	35,6	1058,7	1081,5	0,19	0,0037	81,3

Сокращения:  $AUC_{\infty}$ =площадь под кривой зависимости концентрации от времени от нуля (дозирование), экстраполированная до бесконечности;  $AUC_t$ =площадь под кривой зависимости концентрации от времени от нуля (дозирование) до последней обнаруживаемой концентрации; CL или CL/F=общий клиренс;  $C_{max}$ =максимальная наблюдаемая концентрация в плазме; F=абсолютная биодоступность; в/в=внутривенно; Н/П=не проводили; п/к=подкожно; TSAC=общее содержание сиаловой кислоты;  $t_{max}$ =время достижения максимальной наблюдаемой концентрации в плазме;  $t_{1/2}$ = конечный период полувыведения;  $V_d$  или  $V_d/F$ =кажущийся объем распределения.

Таблица 24: Обобщенные данные нормированных по дозе фармакокинетических параметров ALP201 для вариантов значений TSAC после подкожного введения самцам мышей C57BL/6

TSAC (МОЛЬ/МОЛЬ)	Путь введения	$C_{max}/\text{доза}$ [(МГ/Л)/(МГ/КГ)]	$AUC_t/\text{доза}$ [(МГ*Ч/Л)/(МГ/КГ)]	$AUC_{\infty}/\text{доза}$ [(МГ*Ч/Л)/(МГ/КГ)]
5,9	в/в	26,3	515,1	516,0
5,9	п/к	5,8	371,1	371,9
5,0	в/в	14,3	329,9	330,6
5,0	п/к	5,6	329,1	337,9
3,2	в/в	15,4	327,0	332,6
3,2	п/к	4,9	264,7	270,4

Сокращения:  $AUC_{inf}/\text{доза}$ =нормированная по дозе площадь под кривой зависимости концентрации от времени от нулевого момента (дозирование), экстраполированная до бесконечности;  $AUC_t/\text{доза}$ =нормализованная по дозе площадь под кривой зависимости концентрации от времени от нуля (введение дозы) до последней обнаруживаемой концентрации;  $C_{max}/\text{доза}$ =нормализованная по дозе максимальная наблюдаемая концентрация в плазме; в/в=внутривенно; п/к=подкожно; TSAC=общее содержание сиаловой кислоты

Партии белка ALP201 со значениями TSAC 5,9, 5,0 и 3,2 моль/моль соответствуют 1,48, 1,25 и 0,80 моль сиаловой кислоты на консенсусный сайт N-связанного гликана, а фармакокинетические профили всех партий (как для в/в введения, так и для п/к введения) были похожи по форме, с аналогичными значениями  $T_{max}$  и  $t_{1/2}$ .

С увеличением значения TSAC клиренс несколько снижался,  $C_{max}$  и AUC как при внутривенном, так и при подкожном введении увеличивались, а объем распределения уменьшался. Все эти изменения согласуются с идеей о том, что более низкие значения TSAC приводят к более высоким уровням незрелых N-связанных гликанов, которые могут быть быстро очищены клеточными рецепторами, такими как ASGPR, и вызывают более высокий клиренс, более низкую  $C_{max}$  и более низкую AUC для образца белка. Изменения этих параметров относительно невелики и максимально различаются не более чем в 2 раза.

Сравнение параметров ПК ALP201 у мышей с параметрами ПК асфотазы альфа у мышей

В качестве ERT щелочной фосфатазы второго поколения ALP201 был разработан для улучшения фармакокинетических параметров асфотазы альфа, которые ранее тестировались в исследованиях фармакокинетики мышей с использованием самцов мышей C57BL/6. Обобщенные данные фармакокинетических параметров асфотазы альфа представлены в таблице 25.

Таблица 25: Ранее определенные фармакокинетические параметры асфотазы альфа у мышей C57BL/6 после однократного внутривенного или подкожного введения в дозе 2 мг/кг

Путь введения	$C_{max}$ (мг/мл)	$C_{max}/\text{доза}$ [(мг/л)/(мг/кг)]	$t_{1/2}$ (ч)	$AUC_{t(0-49)}$ (мг*ч/л)	$AUC_{\infty}$ (мг*ч/л)	$AUC_{\infty}/\text{доза}$ [(мг*ч/л)/(мг/кг)]	CL (л/ч/кг)	F (%)
в/в	26,4	13,2	15,6	258	286	143	0,007	Н/П
п/к	3,07	1,54	31,1	100	161	81	Н/П	38,8

Сокращения:  $AUC_{\infty}$  = площадь под кривой зависимости концентрации от времени от нуля (дозирование), экстраполированная до бесконечности;  $AUC_t$  = площадь под кривой зависимости концентрации от времени от нуля (дозирование) до последней обнаруживаемой концентрации; CL = общий клиренс;  $C_{max}$  = максимальная наблюдаемая концентрация в плазме; F = абсолютная биодоступность; в/в = внутривенно; SC = подкожно;  $t_{1/2}$  = конечный период полувыведения

Во всех наборах фармакокинетических данных, собранных для ALP201 у самцов мышей C57BL/6, ALP201 демонстрирует превосходный период полувыведения *in vivo* (измеряемый по  $t_{1/2}$ ), экспозицию *in vivo* (измеряемую по  $C_{max}$  и AUC) и биодоступность. Для всех протестированных образцов ALP201 также демонстрирует значительно более низкий клиренс у мышей, чем асфотаза альфа.

Поскольку спецификации высвобождения асфотазы альфа ограничивают молекулу

значениями TSAC 1,2-3,0 моль/моль, а молекула имеет 6 N-связанных сайтов гликозилирования на мономер, включение сиаловой кислоты для асфотазы альфа составляет всего 0,20-0,50 моль сиаловой кислоты/гликан. Это указывает на то, что многие гликаны на асфотазе альфа не содержат частей сиаловой кислоты и могут быть эффективными субстратами для клиренса ASPGR. Это может объяснить более высокий клиренс и более низкие нормированные дозы  $C_{max}$  и AUC, наблюдаемые для асфотазы альфа по сравнению с ALP201.

Все эти образцы ALP201 имеют гораздо более высокую биодоступность, чем асфотаза альфа, при этом образец с наименьшей биодоступностью ALP201 имеет примерно вдвое большую наблюдаемую биодоступность асфотазы альфа (72,1% против 38,8%). Различия в изоформе домена Fc IgG человека между двумя конструкциями могут быть причиной этого наблюдения. Мы показали, что Fc-домен IgG2/4 ALP201 не связывается с рядом распространенных рецепторов Fcg, но Fc-домен IgG1 асфотазы альфа прочно связывается по меньшей мере с двумя из них (Источник: Research Technical Report 036). Если эти рецепторы Fcg присутствуют в подкожном пространстве, альфа-асфотаза может быть очищена еще до того, как она попадет в системный кровоток, что снижает биодоступность и экспозицию.

### **Заключение**

Результаты этих исследований показывают, что ALP201 имеет значительно улучшенный фармакокинетический профиль с поправкой на дозу у мышей по сравнению с асфотазой альфа после внутривенного или подкожного введения, с более высокой биодоступностью, нормализованной по дозе  $C_{max}$  и экспозицией, нормализованной по дозе. Дополнительные фармакокинетические исследования с использованием образцов ALP201 с различными уровнями включения TSAC показали небольшое увеличение  $C_{max}$  и экспозицию *in vivo* при повышенных уровнях TSAC. Период полувыведения,  $T_{max}$  и биодоступность практически не зависели от изменений значений TSAC.

### **Пример 3**

Обзор фармакокинетических исследований однократной дозы с ALP201

Два исследования фармакокинетики с однократной дозой были проведены как часть программы неклинической разработки асфотазы альфа на крысах Спрег-Дули и яванских макаках, соответственно (таблица 26). Эти исследования подтверждают исследования однократной дозы ALP201.

Таблица 26: Исследования фармакокинетики однократной дозы, проведенные с асфотазой альфа

Название исследования	Длительность	Вид	Путь введения	Состав
ФК разовой дозы	3 дня	Крыса	в/в, п/к	25 мМ фосфата натрия рН 7,4, 150 мМ хлорида натрия

ФК разовой дозы	3 дня	Обезьяна	в/в, п/к	25 мМ фосфата натрия рН 7,4, 150 мМ хлорида натрия
-----------------	-------	----------	----------	---

Примечание: если не указано иное, параметры ФК/ТК были охарактеризованы методом некомпартментного анализа (NCA).

Сокращения: в/в=внутривенно; ФК=фармакокинетика; п/к=подкожно; ТК=токсикокинетика.

После внутривенного введения однократной дозы системный клиренс (CL) асфотазы альфа составлял от 0,0193 до 0,0492 л/ч/кг с кажущимся периодом полувыведения от 27 до 34 часов. Объем распределения в равновесном состоянии ( $V_{ss}$ ) колебался в пределах 0,432-1,39 л/кг. После однократного подкожного введения крысам и обезьянам время достижения максимальной концентрации ( $T_{max}$ ) варьировалось от 10 до 32 часов после введения дозы, что свидетельствует о медленном всасывании асфотазы альфа из места подкожной инъекции. Предполагаемая биодоступность при п/к пути введения у крыс и обезьян варьировала от 26% до 35%.

Заключение из исследований фармакокинетики однократной дозы

ALP201 был разработан для улучшения характеристик одобренного продукта, асфотазы альфа, с улучшенной эффективностью/активностью, системным воздействием, абсолютной биодоступностью и периодом полувыведения. Изотип домена Fc Ig в ALP201 представляет собой G2/4 вместо домена Fc IgG1, присутствующего в асфотазе альфа. Это изменение предназначено для улучшения фармакокинетических свойств ALP201, включая системное фармакокинетическое воздействие, период полувыведения и биодоступность.

Доклинические данные по 3 видам животных (мыши, крысы и обезьяны) подтверждают, что эти цели были достигнуты. По сравнению с асфотазой альфа, ALP201 продемонстрировал значительное улучшение воздействия ФК (более чем в 10 раз), абсолютной биодоступности (в 2 раза) и периода полувыведения (в 2 раза) после внутривенного или подкожного введения у 3 видов животных. Доклиническое фармакокинетическое моделирование популяции также прогнозирует, что улучшенные фармакокинетические свойства ALP201, как ожидается, будут экстраполированы на человека, что облегчит лечение пациентов с уменьшенным объемом инъекций, менее частым введением и меньшим годовым объемом, тем самым снизив бремя лечения для пациентов.

Доклинические исследования безопасности

Резюме токсикологических исследований в поддержку первого исследования на людях

Отдельные исследования токсикологичности/переносимости однократного введения ALP201 не проводились. Дозы ALP201 для токсикологических исследований с определением повторных доз (GLP) были выбраны на основе данных, полученных в исследованиях фармакокинетики однократной дозы ALP201 внутривенно и подкожно на крысах и обезьянах. Переносимость ALP201 оценивали в исследованиях фармакокинетики однократной дозы внутривенно и подкожно на крысах и обезьянах по

клиническим наблюдениям, включая реакции в месте инъекции и данные клинической патологии. Таким образом, ALP201 хорошо переносился при однократном введении внутривенно или подкожно крысам в дозе до 27 мг/кг и обезьянам в дозе до 20 мг/кг.

Продолжаются окончательные исследования токсичности ALP201 в течение 28 дней, соответствующие требованиям GLP, на яванских макаках и крысах Спрег-Доули. Прижизненная часть исследований на крысах и обезьянах, включая этапы восстановления, завершена, и в настоящее время готовятся отчеты. Хотя проверенные проекты отчетов об этих исследованиях еще не доступны, все данные обоих исследований, кроме данных ADA, доступны, и результаты приведены в таблице 27. Таким образом, результаты 28-дневных исследований токсичности ALP201 на крысах и обезьянах показывают, что лечение ALP201 не приводило к каким-либо заслуживающим внимания/биологически значимым связанным с лечением побочным эффектам ни по одной из конечных точек токсичности, оцененных в обоих исследованиях, включая конечные точки фармакологической безопасности.

Таблица 27: Сравнение результатов 28-дневных исследований токсичности GLP ALP201 на крысах и обезьянах

	<b>Исследование токсичности GLP ALP201 для обезьян<sup>a</sup></b>	<b>Исследование токсичности GLP ALP201 для крыс<sup>a</sup></b>
<b>Возраст животных</b>	Приблизительно 2-3 года	Приблизительно 7-8 недель
<b>Продолжительность исследования</b>	28 дней	28 дней
<b>Период восстановления</b>	28 дней	28 дней
<b>Путь введения</b>	Подкожная инъекция	Подкожная инъекция <sup>b</sup>
<b>Частота введения</b>	Один раз в 3 дня (Q3D)	Один раз в 3 дня (Q3D)
<b>Общее количество введенных доз</b>	10 доз	10 доз
<b>Введенная доза</b>	0, 1, 5 или 20 мг/кг/доза	0, 2, 10 или 30 мг/кг/доза
<b>NOAEL</b>	20 мг/кг/доза	30 мг/кг/доза
<b>AUC<sub>0-t</sub><sup>c</sup> при NOAEL</b>	День 1: 27, 900 мкг·ч/мл День 24: 36, 800 мкг·ч/мл	Сутки 1: 11, 600 мкг·ч/мл День 24: 4, 380 мкг·ч/мл
<b>C<sub>max</sub> при NOAEL<sup>c</sup></b>	День 1: 125 мкг/мл День 24: 254 мкг/мл	День 1: 79,9 мкг/мл День 24: 43,9 мкг/мл
<b>Смертность</b>	Нет смертности	Нет смертности

<b>Клинические наблюдения</b>	Отсутствие клинических наблюдений, связанных с лечением	Отсутствие клинических наблюдений, связанных с лечением
<b>Масса тела</b>	Нет результатов, связанных с лечением	Нет результатов, связанных с лечением
<b>Потребление пищи</b>	Нет результатов, связанных с лечением	Нет результатов, связанных с лечением
<b>Офтальмология</b>	Нет результатов, связанных с лечением	Нет результатов, связанных с лечением
<b>Кожные наблюдения</b>	Отсутствие связанных с лечением изменений в месте инъекций	Отсутствие связанных с лечением изменений в месте инъекций
<b>ЭКГ</b>	Отсутствие связанных с лечением данных, основанных на количественных параметрах (частота сердечных сокращений, интервал RR, интервал PR, продолжительность QRS, интервал QT и интервал QTc) и качественном обзоре ЭКГ	Н/П
<b>Артериальное давление</b>	Нет результатов, связанных с лечением	Н/П
<b>Легочная</b>	Нет результатов, связанных с лечением	Нет результатов, связанных с лечением
<b>ЦНС</b>	Н/П	Нет результатов, связанных с лечением
<b>Параметры клинической патологии</b>		
<b>Гематология</b>	Нет результатов, связанных с лечением	Нет результатов, связанных с лечением

<b>Коагуляция</b>	Нет результатов, связанных с лечением	Нет результатов, связанных с лечением
<b>Клиническая химия</b>	Нет результатов, связанных с лечением, за исключением дозозависимого повышения уровня ALP, ожидаемого фармакологического эффекта.	Нет результатов, связанных с лечением, за исключением дозозависимого повышения уровня ALP, ожидаемого фармакологического эффекта.
<b>Анализ мочи</b>	Нет результатов, связанных с лечением	Нет результатов, связанных с лечением
<b>Масса органов</b>	Нет результатов, связанных с лечением	Нет результатов, связанных с лечением
<b>Макроскопические данные</b>	Нет результатов, связанных с лечением	Нет результатов, связанных с лечением
<b>Анатомическая патология</b>	Наблюдалась незначительная дегенерация/некроз и минерализация мест инъекций; но были сделаны выводы, что они не являются неблагоприятными. Эти результаты были частично восстановлены в конце восстановления. Никаких других микро- или макроскопических наблюдений в исследовании отмечено не было.	Спорадические изменения в месте инъекции с сопутствующими реактивными изменениями в дренирующих лимфатических узлах; эти результаты не зависели от дозы и были признаны не неблагоприятными; эти результаты были частично обращены вспять в конце выздоровления. Никаких других микро- или макроскопических наблюдений в исследовании отмечено не было.
<b>Иммуногенность</b>	Данные пока недоступны	Данные пока недоступны

<sup>a</sup>28-дневные исследования токсичности на крысах и обезьянах находятся в стадии отчетности.

<sup>b</sup> В исследовании на крысах однократную дозу ALP201 вводили в количестве 10

мг/кг внутривенно животным группы 5 для определения абсолютной биодоступности ALP201 после подкожного введения.

<sup>c</sup> Сообщается о средних значениях системного воздействия в разбивке по полу. Значения AUC для внутривенных и подкожных исследований представлены как AUC<sub>0-24,5</sub> и AUC<sub>0-168</sub> соответственно.

Сокращения: ALP=щелочная фосфатаза; AUC=площадь под кривой зависимости концентрации от времени; C<sub>max</sub>=максимальная наблюдаемая концентрация в плазме; ЦНС=центральная нервная система; ЭКГ=электрокардиограмма; GLP=хорошая лабораторная практика; в/в=внутривенно; NOAEL=уровень отсутствия наблюдаемых нежелательных эффектов; Q3D=каждые 3 дня п/к=подкожно.

Стратегия доклинической безопасности для ALP201 на поздней стадии клинической разработки

ALP201 - это улучшенная ERT по сравнению с продаваемым Alexion продуктом ERT асфотазы альфа (STRENSIQ<sup>®</sup>). Каталитический домен TNSALP человека в ALP201 включает рационально сконструированные изменения в 3 положениях для придания более высокой ферментативной активности. Fc-часть ALP201 представляет собой человеческий иммуноглобулин гамма 2/4 (IgG2/4), тогда как Fc-часть асфотазы альфа представляет собой человеческий иммуноглобулин IgG1. С-концевые области ALP201 и асфотазы альфа, нацеленные на кость, идентичны.

Доступные результаты исследований ALP201 и отдельных исследований асфотазы альфа следующие:

1. Результаты токсикологических исследований ALP201 GLP в течение 28 дней на крысах и обезьянах очень схожи (таблица 31).

2. Результаты токсикологических исследований ALP201 и асфотазы альфа аналогичной продолжительности (4 недели/28 дней) на обезьянах и крысах очень схожи (таблица 32 и таблица 33 соответственно).

3. Выводы о токсичности полного доклинического пакета безопасности асфотазы альфа в значительной степени ограничиваются преходящими результатами местной переносимости у крыс, без каких-либо других заслуживающих внимания неблагоприятных результатов, связанных с лечением асфотазой альфа.

Хроническая/6-месячная стратегия исследований общей токсикологии ALP201

Стратегия изучения хронической токсикологии одного вида подтверждается следующими наблюдениями:

4. В ходе 28-дневных токсикологических исследований GLP на крысах и обезьянах не наблюдалось заметной системной токсичности и/или данных о местной переносимости после 10 повторных введений п/к ALP201 один раз в 3 дня (Q3D), хотя системное воздействие ALP201 было значительно выше по сравнению с асфотазой альфа. Системные воздействия приведены в таблицах 31 и 32.

5. Результаты 28-дневных токсикологических исследований GLP ALP201 на крысах и обезьянах были очень схожими. Результаты этих исследований приведены в

Таблице 28.

6. Если токсикологические результаты краткосрочных общих токсикологических исследований аналогичны, то обычно считают достаточными долгосрочные исследования общей токсичности на 1 виде.

7. Крысы являются предпочтительным видом для изучения хронической токсичности с помощью ALP201. Кроме того, крысы являются предпочтительным видом, когда только один вид используется для проведения долгосрочных исследований общей токсичности.

Таблица 28: Сравнение результатов исследований токсичности GLP асфотазы альфа и ALP201 на обезьянах

	<b>Исследование токсичности GLP асфотазы альфа на обезьянах</b>	<b>Исследование токсичности GLP асфотазы альфа на обезьянах</b>	<b>Исследование токсичности GLP ALP201 на обезьянах</b>
<b>Возраст животных</b>	Приблизительно 1 год (молодые обезьяны)	Приблизительно 1 год (молодые обезьяны)	Приблизительно 2-3 года
<b>Продолжительность исследования</b>	4 недели	6 месяцев (26 недель)	4 недели
<b>Период восстановления</b>	28 дней	28 дней	28 дней
<b>Путь введения</b>	Внутривенная инъекция	Подкожная инъекция	Подкожная инъекция
<b>Частота введения</b>	Один раз в неделю	Один раз в день	Один раз в 3 дня (Q3D)
<b>Общее количество введенных доз</b>	4 дозы (дни 1, 8, 15 и 22)	182 доз	10 доз
<b>Введенная доза</b>	0, 5, 15 или 45 мг/кг/доза	0, 0,43, 2,14 или 10 мг/кг/день	0, 1, 5 или 20 мг/кг/доза
<b>NOAEL</b>	45 мг/кг/доза	10 мг/кг/день	20 мг/кг/доза
<b>AUC<sub>0-168 ч</sub> при NOAEL</b>	День 1: 3,190 мкг·ч/мл День 22: 2,670 мкг·ч/мл	День 1: 50 мкг·ч/мл <sup>a</sup> Неделя 26: 124 мкг·ч/мл <sup>a</sup>	День 1: 27,900 мкг·ч/мл День 24: 36,800 мкг·ч/мл
<b>C<sub>max</sub> при NOAEL</b>	Сутки 1: 726 мкг/мл	Сутки 1: 2,66	День 1: 125

	День 22: 691 мкг/мл	мкг/мл Неделя 26: 6,68 мкг/мл	мкг/мл День 24: 254 мкг/мл
<b>Смертность</b>	Нет смертности	Нет смертности	Нет смертности
<b>Клинические наблюдения</b>	Отсутствие клинических наблюдений, связанных с лечением	Отсутствие клинических наблюдений, связанных с лечением	Отсутствие клинических наблюдений, связанных с лечением
<b>Масса тела</b>	Нет результатов, связанных с лечением	Нет результатов, связанных с лечением	Нет результатов, связанных с лечением
<b>Потребление пищи</b>	Нет результатов, связанных с лечением	Нет результатов, связанных с лечением	Нет результатов, связанных с лечением
<b>Офтальмология</b>	Нет результатов, связанных с лечением	Нет результатов, связанных с лечением	Нет результатов, связанных с лечением
<b>Кожные наблюдения</b>	Нет результатов, связанных с лечением	Реакции в месте инъекции при всех дозах включают кожные струпья, сухость и/или покраснение кожи.	Отсутствие связанных с лечением изменений в месте инъекций
<b>ЭКГ</b>	Отсутствие связанных с лечением данных, основанных на количественных параметрах (частота сердечных сокращений, интервал RR, интервал PR,	Отсутствие связанных с лечением данных, основанных на количественных параметрах (частота сердечных	Отсутствие связанных с лечением данных, основанных на количественных параметрах (частота сердечных

	продолжительность QRS, интервал QT и интервал QTc) и качественном обзоре ЭКГ	сокращений, интервал RR, интервал PR, продолжительность QRS, интервал QT и интервал QTc) и качественном обзоре ЭКГ	сокращений, интервал RR, интервал PR, продолжительность QRS, интервал QT и интервал QTc) и качественном обзоре ЭКГ
<b>Артериальное давление</b>	Нет результатов, связанных с лечением	Нет результатов, связанных с лечением	Нет результатов, связанных с лечением
<b>Клиническая патология</b>			
<b>Гематология</b>	Нет результатов, связанных с лечением	Нет результатов, связанных с лечением	Нет результатов, связанных с лечением
<b>Коагуляция</b>	Нет результатов, связанных с лечением	Нет результатов, связанных с лечением	Нет результатов, связанных с лечением
<b>Клиническая химия</b>	Нет результатов, связанных с лечением, за исключением дозозависимого повышения уровня ALP, фармакологический эффект.	Нет результатов, связанных с лечением, за исключением дозозависимого повышения уровня ALP, фармакологический эффект.	Нет результатов, связанных с лечением, за исключением дозозависимого повышения уровня ALP, фармакологический эффект.
<b>Анализ мочи</b>	Нет результатов, связанных с лечением	Нет результатов, связанных с лечением	Нет результатов, связанных с лечением
<b>Масса органов</b>	Нет результатов, связанных с лечением	Нет результатов, связанных с лечением	Нет результатов, связанных с лечением

<b>Макроскопические данные</b>	Нет результатов, связанных с лечением	Нет результатов, связанных с лечением	Нет результатов, связанных с лечением
<b>Анатомическая патология</b>	Нет результатов, связанных с лечением	В местах инъекций наблюдалось очаговое гранулематозное воспаление и мононуклеарная инфильтрация при дозах $\geq 0,43$ мг/кг/доза, которые частично или полностью восстанавливались к концу периода восстановления; Незначительная дегенерация или некроз мышц под местом инъекции у одного самца обезьяны в дозе 2,14 мг/кг/доза	Наблюдалась незначительная дегенерация/некроз и минерализация мест инъекций; но были сделаны выводы, что они не являются неблагоприятным и. Эти результаты были частично восстановлены в конце восстановления. Никаких других микро- или макроскопических наблюдений в исследовании отмечено не было.

<sup>a</sup> значения AUC для исследования 670338 представлены как AUC<sub>0-24 ч</sub>

Сокращения: ALP=щелочная фосфатаза; AUC=площадь под кривой концентрация-время; ADA=антилекарственное антитело; C<sub>max</sub>=максимальная наблюдаемая концентрация в плазме; ЭКГ=электрокардиограмма; GLP=хорошая лабораторная практика; NOAEL=уровень отсутствия наблюдаемых нежелательных эффектов; Q3D=один раз каждые 3 дня.

Таблица 29. Сравнение результатов исследований токсичности GLP асфотазы альфа и ALP201 на крысах

	<b>Исследование токсичности GLP асфотазы альфа на</b>	<b>Исследование токсичности GLP асфотазы альфа на</b>	<b>Исследование токсичности GLP ALP201 на крысах</b>

	крысах	крысах	
<b>Возраст животных</b>	Приблизительно 21-24 дня (молодые крысы)	Приблизительно 21 день (молодые крысы)	Приблизительно 7-8 недель
<b>Продолжительность исследования</b>	4 недели	6 месяцев	4 недели
<b>Период восстановления</b>	28 дней	28 дней	28 дней
<b>Путь введения</b>	Внутривенная инъекция	Внутривенная инъекция	Подкожная инъекция
<b>Частота введения</b>	Один раз в неделю	Один раз в день	Один раз в 3 дня (q3d)
<b>Общее количество введенных доз</b>	4 дозы (дни 1, 8, 15 и 22)	182 доз	10 доз
<b>Введенная доза</b>	0, 3, 30 или 90 мг/кг/доза (номинальные дозы) 0, 2,6, 26 или 77 мг/кг/доза (фактические измеренные дозы)	0, 1, 3 или 13 мг/кг/день	0, 2, 10 или 30 мг/кг/доза
<b>NOAEL</b>	26 мг/кг/доза	13 мг/кг/день	30 мг/кг/доза
<b>AUC<sub>0-168</sub><sup>a</sup> при NOAEL</b>	День 23: н/п	Неделя 1: 364 мкг·ч/мл Неделя 26: 379 мкг·ч/мл	Сутки 1: 11, 600 мкг·ч/мл День 24: 4, 380 мкг·ч/мл
<b>C<sub>max</sub> при NOAEL</b>	День 23: 3,79 мкг/мл	Неделя 1: 115 мкг/мл Неделя 26: 281 мкг/мл	День 1: 79,9 мкг/мл День 24: 43,9 мкг/мл
<b>Смертность</b>	1 крыса (заключено, что не связано с лечением)	9 крыс (все 9 смертей были признаны не связанными с	Нет смертности

		лечением)	
<b>Клинические наблюдения</b>	Острые/преходящие реакции на инъекции (до 60 минут после введения) при всех дозах; никаких реакций на инъекции не наблюдалось в период восстановления во всех группах или в контрольной группе с носителем в период лечения	Острый дозозависимый отек конечностей (передних и задних лап и морды); эти отеки исчезли в течение < 24 часов после введения дозы	Отсутствие клинических наблюдений, связанных с лечением
<b>Масса тела</b>	Дозозависимое незначительное снижение (7,4-12,1%) средней прибавки массы тела у самцов в период выздоровления.	Нет результатов, связанных с лечением	Нет результатов, связанных с лечением
<b>Потребление пищи</b>	Небольшое дозозависимое снижение потребления пищи у самцов, коррелирующее со снижением прироста массы тела.	Нет результатов, связанных с лечением	Нет результатов, связанных с лечением
<b>Офтальмология</b>	Нет результатов, связанных с лечением	Нет результатов, связанных с лечением	Нет результатов, связанных с лечением
<b>Кожные наблюдения</b>	Нет результатов, связанных с лечением	Реакции в месте инъекции при всех дозах включают кожные струпья, сухость и/или	Отсутствие связанных с лечением изменений в месте инъекций

		покраснение кожи.	
<b>ЦНС</b>	Нет результатов, связанных с лечением	Нет результатов, связанных с лечением	Нет результатов, связанных с лечением
<b>Эстральный цикл</b>	Нет результатов, связанных с лечением	Нет результатов, связанных с лечением	Нет результатов, связанных с лечением
<b>Клиническая патология</b>			
<b>Гематология</b>	При высоких дозах незначительно снижается количество нейтрофилов, моноцитов и эозинофилов; наблюдалось незначительное увеличение лимфоцитов, тромбоцитов и ретикулоцитов по сравнению с контрольной группой	Нет результатов, связанных с лечением	Нет результатов, связанных с лечением
<b>Коагуляция</b>	Нет результатов, связанных с лечением	Нет результатов, связанных с лечением	Нет результатов, связанных с лечением
<b>Клиническая химия</b>	Никаких результатов, связанных с лечением, за исключением дозозависимого повышения уровня ALP, желаемый фармакологический эффект.	Никаких результатов, связанных с лечением, за исключением дозозависимого повышения уровня ALP, желаемый фармакологический эффект.	Никаких результатов, связанных с лечением, за исключением дозозависимого повышения уровня ALP, желаемый фармакологический эффект.

			эффект.
<b>Анализ мочи</b>	Нет результатов, связанных с лечением	Нет результатов, связанных с лечением	Нет результатов, связанных с лечением
<b>Масса органов</b>	Нет результатов, связанных с лечением	Нет результатов, связанных с лечением	Нет результатов, связанных с лечением
<b>Макроскопические данные</b>	Нет результатов, связанных с лечением	Нет результатов, связанных с лечением	Нет результатов, связанных с лечением
<b>Анатомическая патология</b>	Нет результатов, связанных с лечением	Нет результатов, связанных с лечением	Спорадические изменения в месте инъекции с сопутствующими реактивными изменениями в дренирующих лимфатических узлах; эти результаты не зависели от дозы и были признаны не неблагоприятными; эти результаты были частично обращены вспять в конце выздоровления. Никаких других микро- или макроскопических наблюдений в исследовании отмечено не было.
<b>Иммуногенн</b>	Скрининговый анализ	Заслуживающий	Данные пока

<b>ость</b>	ADA продемонстрировал ADA во всех дозовых группах, включая носитель (день 1 67% и день 28 100%) и группы лечения (день 1 от 56 до 89% и день 28 100%); подтверждающий анализ ADA не проводился из-за наличия небольшого объема образца.	внимания ответ ADA не наблюдался	недоступны
-------------	--	----------------------------------	------------

<sup>a</sup>Сообщается о средних значениях системного воздействия в разбивке по полу. Значения AUC представлены как  $AUC_{0-168}$

Сокращения: ALP=щелочная фосфатаза; AUC=площадь под кривой концентрация-время; ADA=антилекарственное антитело;  $C_{max}$ =максимальная наблюдаемая концентрация в плазме; ЦНС=центральная нервная система; GLP=хорошая лабораторная практика; в/в=внутривенно; MTD=максимально переносимая доза; NOAEL=уровень отсутствия наблюдаемых нежелательных эффектов; Q3D=один раз каждые 3 дня; п/к=подкожно.

Анализы на основе моделей и прогнозируемые схемы дозирования для человека

Моделирование ALP201

#### Данные, используемые в текущих моделях

Чтобы выполнить экстраполяцию дозы от мыши (виды модели болезни) к человеку, требуется достаточный анализ фармакокинетики, чтобы смоделировать воздействие на человека доз в аллометрическом масштабе. Имелись ограниченные данные о фармакокинетике мышей; исследование однократной дозы на мышах дикого типа (HPP-PK-01) и однократные измерения  $C_{trough}$  (D36/D37) из 2 исследований эффективности многократных доз Акp2GW-/- на мышах (HPP-PoC-01 и HPP-MED-01). Для создания надежной фармакокинетической характеристики ALP201 данные по мышам были дополнены данными ФК из исследований по определению диапазона доз у крыс и яванских макаков. В таблице 30 показаны данные (47 животных и 387 концентраций ФК), проанализированные на сегодняшний день с использованием подхода к моделированию популяционной фармакокинетики (Поп-Фк). Для моделирования доза-реакция использовались данные эффективности (минерализации костей) из 2 исследований эффективности Акp2GW -/- на мышах (HPP-PoC-01 и HPP-MED-01).

Таблица 30: данные фармакокинетики однократной дозы ALP201, используемые

для разработки модели Поп-ФК

		Разовая доза ALP201, мг/кг; N (измерения)								
Вид	Путь введения	1	2	3	4	6	9	20	27	Всего
Мышь	в/в	.	.	.	4 (30)	.	.	.	.	.
	п/к	.	.	.	4 (37)	.	.	.	.	.
Крыса	в/в	4 (33)	.	4 (33)	.	.	4 (36)	.	4 (35)	.
	п/к	.	4 (24)	.	.	.	.	.	4 (35)	.
Обезьяна	в/в	.	3 (27)	.	.	3 (26)	.	3 (24)	.	.
	п/к	.	3 (24)	.	.	.	.	3 (24)	.	.
Всего		.	.	.	.	.	.	.	.	47 (387)

Сокращения: в/в=внутривенно; N=количество животных; ФК=фармакокинетика; Поп-ФК=популяция-фармакокинетика; п/к=подкожно.

#### Текущая модель Поп-ФК

Текущая модель Поп-ФК была разработана с использованием программного обеспечения NONMEM версии 7.2 (решения ICON) для одновременного анализа данных ФК от 3 видов животных с учетом видовых различий в распределении ФК с использованием аллометрических принципов, основанных на массе тела, где масса тела животного была сосредоточена на 70 кг, а аллометрические показатели были зафиксированы на уровне 0,75 для параметров клиренса и 1,0 для параметров объема распределения. Данные внутривенного и подкожного введения также одновременно соответствовали оценке внесосудистых параметров, например, абсолютной биодоступности после подкожной инъекции. Текущая модель представляет собой двухкомпонентную модель с линейным исключением, а оценки параметров модели приведены в таблице 31.

Таблица 31: Оценки параметров для промежуточной модели Поп-ФК

Параметр, единицы измерения	Типичное значение	RSE (%)	BSV (%)	RSE (%)	Уменьшение (%)
Клиренс, CL, л/ч/70 кг	0,025	5	27	24	10
Центральный объем, V <sub>2</sub> , л/70 кг	3,48	5	.	.	.
Периферический объем, V <sub>3</sub> , л/70 кг	2,71	13	.	.	.
Периферический CL, Q, л/ч/70 кг	0,027	36	.	.	.
Скорость поглощения, K <sub>a</sub> , 1/ч	0,031	25	86	41	40
Биодоступность, F, %	74,6	11	76	76	59

Пропорциональная остаточная ошибка; КРЫСА, %	24,6	38	.	.	7
Аддитивная остаточная ошибка; КРЫСА, мкг/мл	0,707	29	.	.	7
Пропорциональная остаточная ошибка; МАКАК, %	30,4	36	.	.	7
Пропорциональная остаточная ошибка; МЫШЬ, %	47	31	.	.	5

Сокращения: BSV=межсубъектная вариабельность; RSE=относительная стандартная ошибка (точность параметра на шаге \$COV)

Типичные значения или оценки средних параметров для ФК-параметров были достаточно оценены. Вариабельность (BSV) для CL была приемлемой и хорошо оцененной; однако вариабельность для Ka и F была большой (86% и 76% соответственно) и не была хорошо оценена. Уменьшение представляет собой оценку того, как данные повлияли на оценку ФК-параметров, при этом значение <30% является хорошим. Учитывая высокие значения уменьшение для Ka и F (40% и 59% соответственно), дополнительные данные 4-недельных токсикологических исследований GLP должны улучшить оценку параметров Ka и F. В целом, текущая модель Поп-ФК должна обеспечивать разумное моделирование дозы с учетом хороших оценок средних параметров; хотя область изменчивости может быть слишком широкой.

#### **Текущая модель доза-ответ**

Разработанная модель доза-ответ была выбрана путем тестирования моделей семейства  $E_{max}$ . Большинство взаимосвязей доза-ответ могут быть описаны с помощью одной из параметризаций модели  $E_{max}$ . В настоящее время наилучшей характеристикой доза-ответ является использование модели  $E_{max}+E_0$  (исходный уровень). Конечной точкой эффективности, минерализацией кости, была радиографическая оценка, которая была выбрана, поскольку она имела то же клиническое определение эффективности, что и используемое для неклинической оценки доза-ответ асфотазы альфа. Минерализация костей после лечения асфотазой альфа или ALP201 из 2 исследований эффективности (NPP-PoC-01 и NPP-MED-01) была нанесена на график в зависимости от дозы (фиг. 16). Для сравнения были включены данные по асфотазе альфа из предыдущего исследования эффективности ALP-PT-12. Ось y была выражена как % от нормы, которая была определена как процент мышей в дозовой группе с оценкой минерализации костей 4. Ось x была выражена как доза, нормализованная до мг/кг/день. Доза, вызывающая нормальную минерализацию у 85% пациентов (ED85), была выбрана в качестве целевой эффективной дозы.

Трансляция дозы от мыши к человеку и предлагаемые начальные дозы для человека

Аллометрическое масштабирование применяли к целевой эффективной дозе для

мышы (ED85) для определения дозы для человека. Уравнение для прогнозирования от мышины ED85 до эквивалентной дозы для человека (HED, мг/кг/день), представляло собой  $ED85 \times (0,025 \text{ кг мышы}/70 \text{ кг человека})^{0,25}$ . HED была переведена в еженедельную фиксированную дозу 45 мг в неделю и использовалась в качестве начальной дозы для группы MAD исследования FII. Максимальная рекомендуемая начальная доза (MRSD) для группы SAD была выбрана после рассмотрения результатов методов NOAEL и MABEL. Было решено, что изучаемая доза, вызывающая минимальный целевой фармакологический ответ, будет выбрана и переведена в фиксированную дозу для человека (5 мг).

### **Другие варианты осуществления**

Предшествующее подробное описание и примеры даны только для ясности понимания. Из этого не следует предполагать никаких ненужных ограничений. Описание не ограничивается показанными и описанными точными деталями, поскольку вариации, очевидные специалисту в данной области техники, будут включены в объем, определяемый формулой изобретения.

Если не указано иное, все числа, выражающие количества компонентов, молекулярные массы и т.д., используемые в описании и формуле изобретения, следует понимать как измененные во всех случаях термином «около». Соответственно, если не указано иное, численные параметры, указанные в описании и формуле изобретения, являются приближенными значениями, которые могут изменяться в зависимости от желаемых свойств, которые необходимо получить. Как минимум, что не стоит трактовать как попытку ограничить применение доктрины эквивалентов объемом формулы изобретения, каждый числовой параметр необходимо, по меньшей мере, толковать с учетом числа приведенных значимых цифр и путем применения обычных методов округления.

Несмотря на то, что численные диапазоны и параметры, изложенные в широком объеме данного описания, являются приблизительными, изложенные в конкретных примерах численные значения указаны настолько точно, насколько это возможно. Все числовое значение, однако, по своей сути содержит диапазон, неизбежно возникающий в результате стандартного отклонения, обнаруженного при соответствующих экспериментальных измерениях.

Полное раскрытие всех патентов, патентных заявок, включая предварительные патентные заявки, публикаций, включая патентные публикации и непатентные публикации, а также материалов, доступных в электронном виде (включая, например, представленные последовательности нуклеотидов, например, в GenBank и RefSeq, и представленные последовательности аминокислот в, например, SwissProt, PIR, PRF, PDB и переводы из аннотированных кодирующих областей в GenBank и RefSeq), цитируемые в данном документе, включены в качестве ссылки. Предшествующее подробное описание и примеры даны только для ясности понимания. Из этого не следует предполагать никаких ненужных ограничений. Описание не ограничивается показанными и описанными

точными деталями, поскольку вариации, очевидные специалисту в данной области техники, будут включены в варианты осуществления, определяемые формулой изобретения.

**ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ**

1. Фармацевтическая композиция, содержащая полипептид, имеющий по меньшей мере 80% идентичности с последовательностью SEQ ID NO: 5 и по меньшей мере одну мутацию, выбранную из E108M, N213Q и N286Q относительно SEQ ID NO: 1, и фармацевтически приемлемый носитель, содержащий один или более из фосфата, пролина и сахарозы.
2. Фармацевтическая композиция по п. 1, где полипептид имеет по меньшей мере 85%, 90%, 95%, 97% или 99% идентичности с последовательностью SEQ ID NO: 5.
3. Фармацевтическая композиция по п. 2, где полипептид содержит или состоит из последовательности SEQ ID NO: 5.
4. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 1-3, где полипептид содержит две или три мутации E108M, N213Q и N286Q относительно SEQ ID NO: 1.
5. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 1-4, где композиция содержит от около 1 мМ до около 100 мМ фосфата.
6. Фармацевтическая композиция по п. 5, где композиция содержит от около 5 мМ до около 20 мМ фосфата.
7. Фармацевтическая композиция по п. 6, где композиция содержит около 10 мМ фосфата.
8. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 1-7, где фосфат представляет собой фосфат натрия.
9. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 1-8, где композиция содержит от около 1 мМ до около 500 мМ пролина.
10. Фармацевтическая композиция по п. 9, где композиция содержит от около 50 мМ до около 200 мМ пролина.
11. Фармацевтическая композиция по п. 10, где композиция содержит около 140 мМ пролина.
12. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 1-11, где композиция содержит от около 1 мМ до около 500 мМ сахарозы.
13. Фармацевтическая композиция по п. 12, где композиция содержит от около 50 мМ до около 200 мМ сахарозы.
14. Фармацевтическая композиция по п. 13, где композиция содержит около 140 мМ сахарозы.
15. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 6-14, где композиция содержит около 10 мМ фосфата, около 140 мМ пролина и около 140 мМ сахарозы.
16. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 1-15, где композиция содержит от около 0,01% до около 0,5% полиоксиэтилен(20)сорбитанмоноолеата.
17. Фармацевтическая композиция по п. 16, где композиция содержит от около 0,01% до около 0,1% полиоксиэтилен(20)сорбитанмоноолеата.
18. Фармацевтическая композиция по п. 17, где композиция содержит около 0,05% полиоксиэтилен(20)сорбитанмоноолеата.

19. Фармацевтическая композиция по п. 18, где композиция содержит около 140 мМ пролина, около 140 мМ сахарозы и около 0,05% полиоксиэтилен(20)сорбитанмоноолеата.

20. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 1-19, где полипептид имеет общее содержание сиаловой кислоты (TSAC) от около 1,0 моль/моль до около 6,0 моль/моль.

21. Фармацевтическая композиция по п. 20, где TSAC составляет от около 3,0 моль/моль до около 6,0 моль/моль.

22. Фармацевтическая композиция по п. 21, где TSAC составляет около 3,2 моль/моль, 5,0 моль/моль или около 5,9 моль/моль.

23. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 1-22, где композиция имеет рН около 7,3.

24. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 1-23, где композиция составлена в концентрации от около 0,1 мг/мл до около 200 мг/мл.

25. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 1-24, где композиция составлена в объеме от около 0,1 мл до около 50 мл.

26. Фармацевтическая композиция по п. 24 или 25, где композиция составлена в концентрации около 100 мг/мл в объеме около 1 мл.

27. Флакон, содержащий фармацевтическую композицию по любому из пп. 1-23.

28. Флакон по п. 27, где композиция составлена в объеме от около 0,1 мл до около 50 мл.

29. Флакон по п. 28, где композиция составлена в объеме около 10 мл.

30. Флакон по любому из пп. 27-29, где композиция составлена в концентрации от около 0,1 мг/мл до около 200 мг/мл.

31. Флакон по п. 30, где композиция составлена в концентрации около 100 мг/мл.

32. Флакон по любому из пп. 27-31, где композиция составлена в концентрации около 100 мг/мл в объеме около 1 мл.

33. Способ лечения нарушения минерализации костей у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение субъекту дозы фармацевтической композиции по любому из пп. 1-26.

34. Способ по п. 33, где нарушение минерализации костей выбрано из гипофосфатазии (НРР), перелома костей, остеопороза, склеростеоза, хондрокальциноза, гипотонии, мышечной дистрофии Дюшенна, трахеобронхомаляции, судорожного припадка, нейрофиброматоза и краниосиностоза.

35. Способ по п. 33 или п. 34, где полипептид вводят в количестве и в течение периода времени, достаточных для лечения нарушения минерализации костей.

36. Способ по любому из пп. 33-35, где лечение улучшению формирования костной ткани у субъекта.

37. Способ по любому из пп. 33-36, где полипептид вводят в дозе от около 0,01 мг/кг до около 20 мг/кг.

38. Способ по п. 37, где полипептид вводят в дозе от около 0,1 мг/кг до около 10 мг/кг.

39. Способ по любому из пп. 33-38, где полипептид вводят один раз в день, неделю, месяц или год.

40. Способ по любому из пп. 33-39, где в неделю вводят от около 10 до около 100 мг полипептида.

41. Способ по п. 40, где в неделю вводят от около 15 до около 90 мг полипептида.

42. Способ по п. 41, где в неделю вводят около 15 мг, около 30 мг, около 45 мг или около 90 мг полипептида.

43. Способ по любому из пп. 33-42, где полипептид вводят в течение по меньшей мере одного дня, одной недели, одного месяца, одного года или дольше.

44. Способ по любому из пп. 33-43, где композицию вводят подкожно, внутривенно, внутримышечно, сублингвально, интратекально или интрадермально.

45. Способ по п. 44, где композицию вводят подкожно или внутривенно.

46. Способ по любому из пп. 33-45, где субъектом является человек.

47. Способ по п. 46, где человек является новорожденным, ребенком, подростком или взрослым.

48. Способ по любому из пп. 33-47, где способ позволяет достичь  $AUC_{0-168ч}$  от около 50 мкг×час/мл до около 4000 мкг×час/мл в крови субъекта.

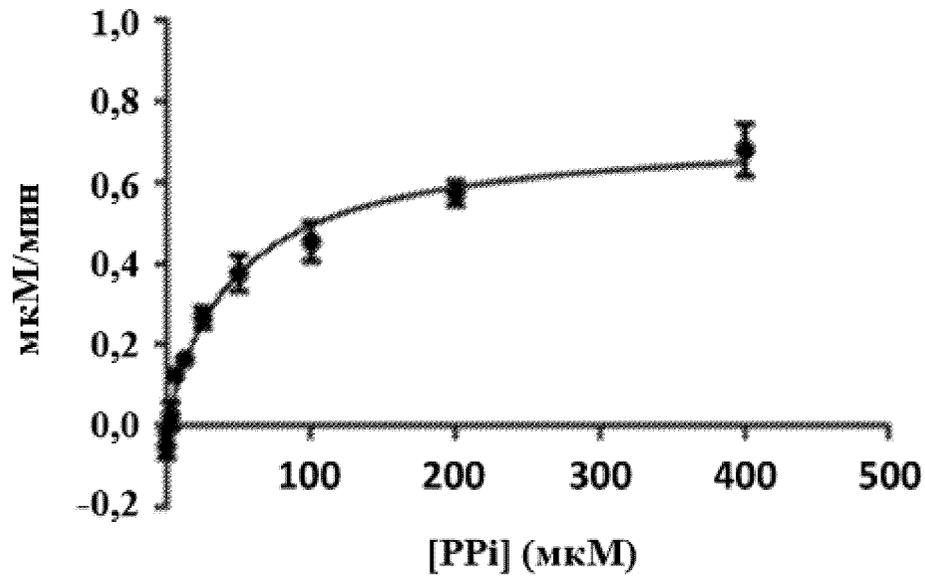
49. Способ по п. 48, где способ позволяет достичь  $AUC_{0-168ч}$  от около 1000 мкг×час/мл до около 3000 мкг×час/мл в крови субъекта.

50. Способ по любому из пп. 33-48, где способ позволяет достичь  $C_{max}$  от около 0,5 мкг/мл до около 25 мкг/мл в крови субъекта.

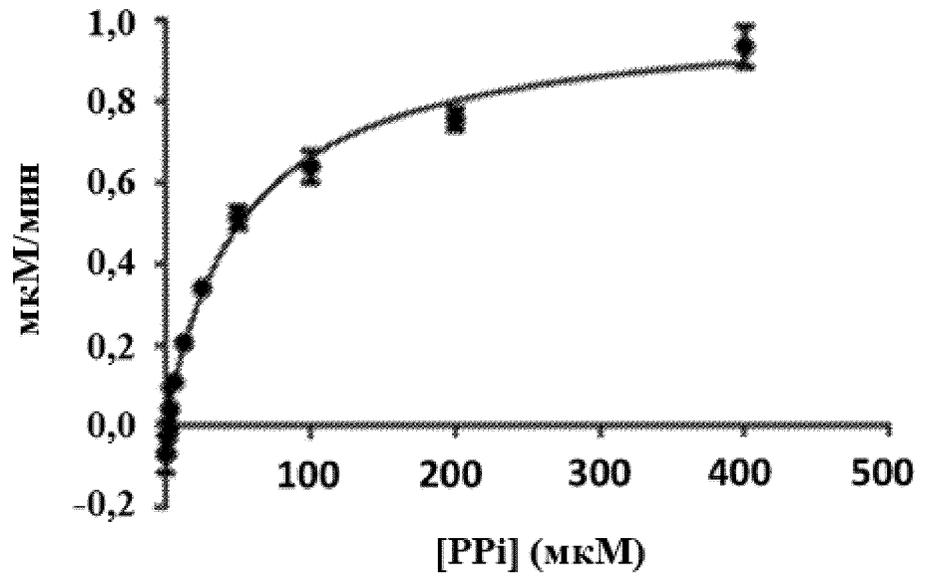
51. Способ по п. 49, где способ позволяет достичь  $C_{max}$  от около 0,6 мкг/мл до около 20 мкг/мл в крови субъекта.

По доверенности

ФИГ. 1

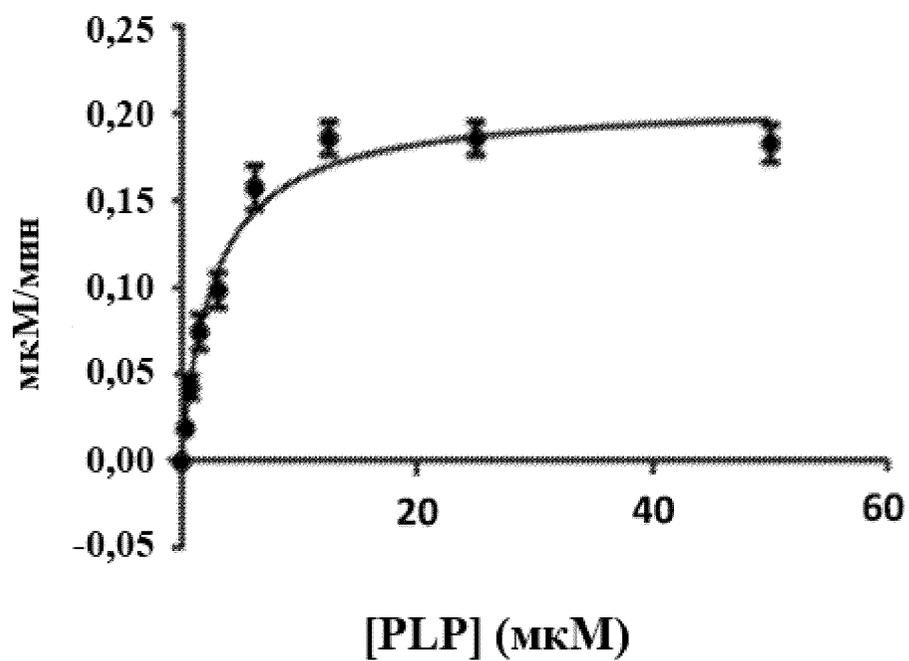


ALP201, 10 нг/мл

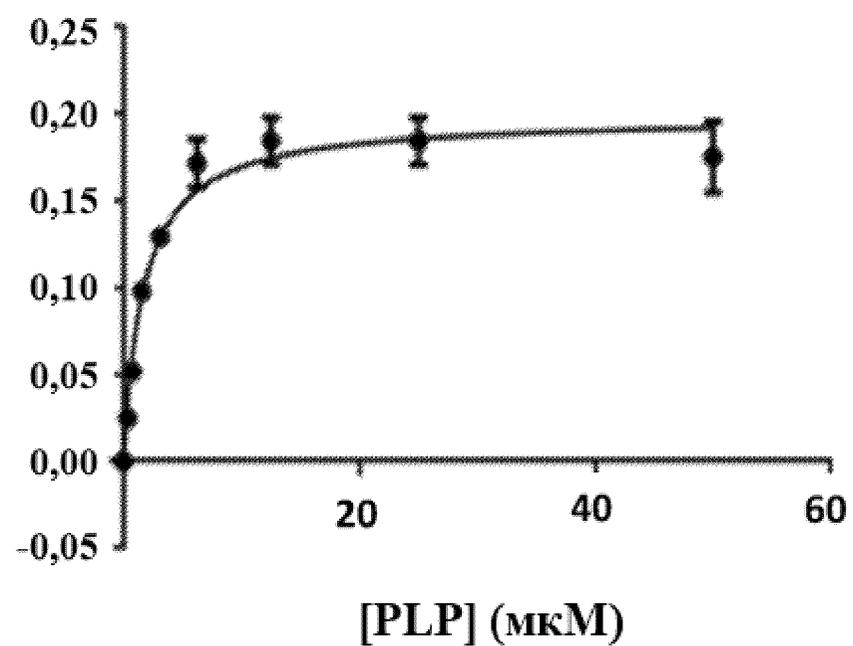


Асфотаза альфа, 25 нг/мл

ФИГ. 2

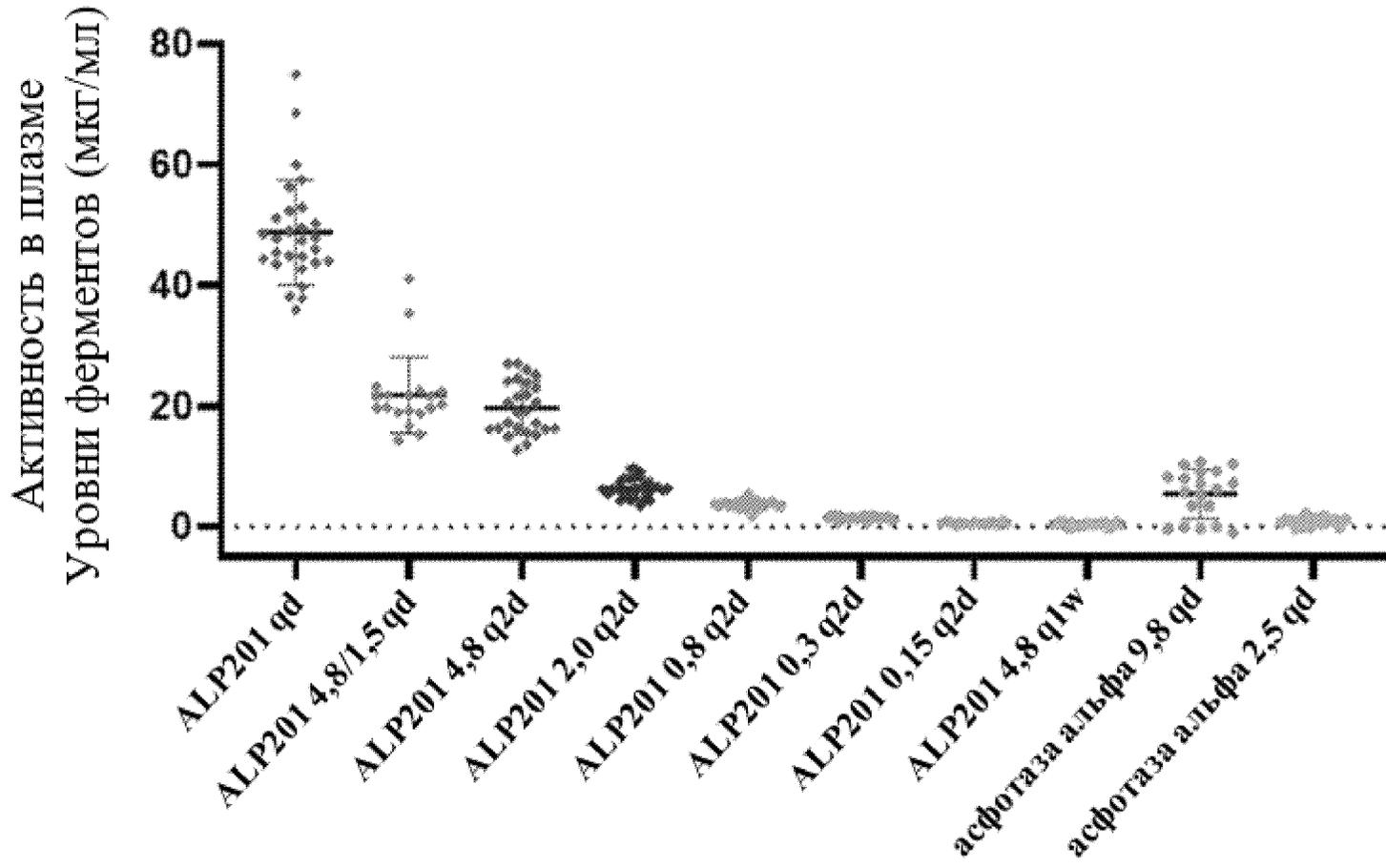


ALP201, 10 нг/мл



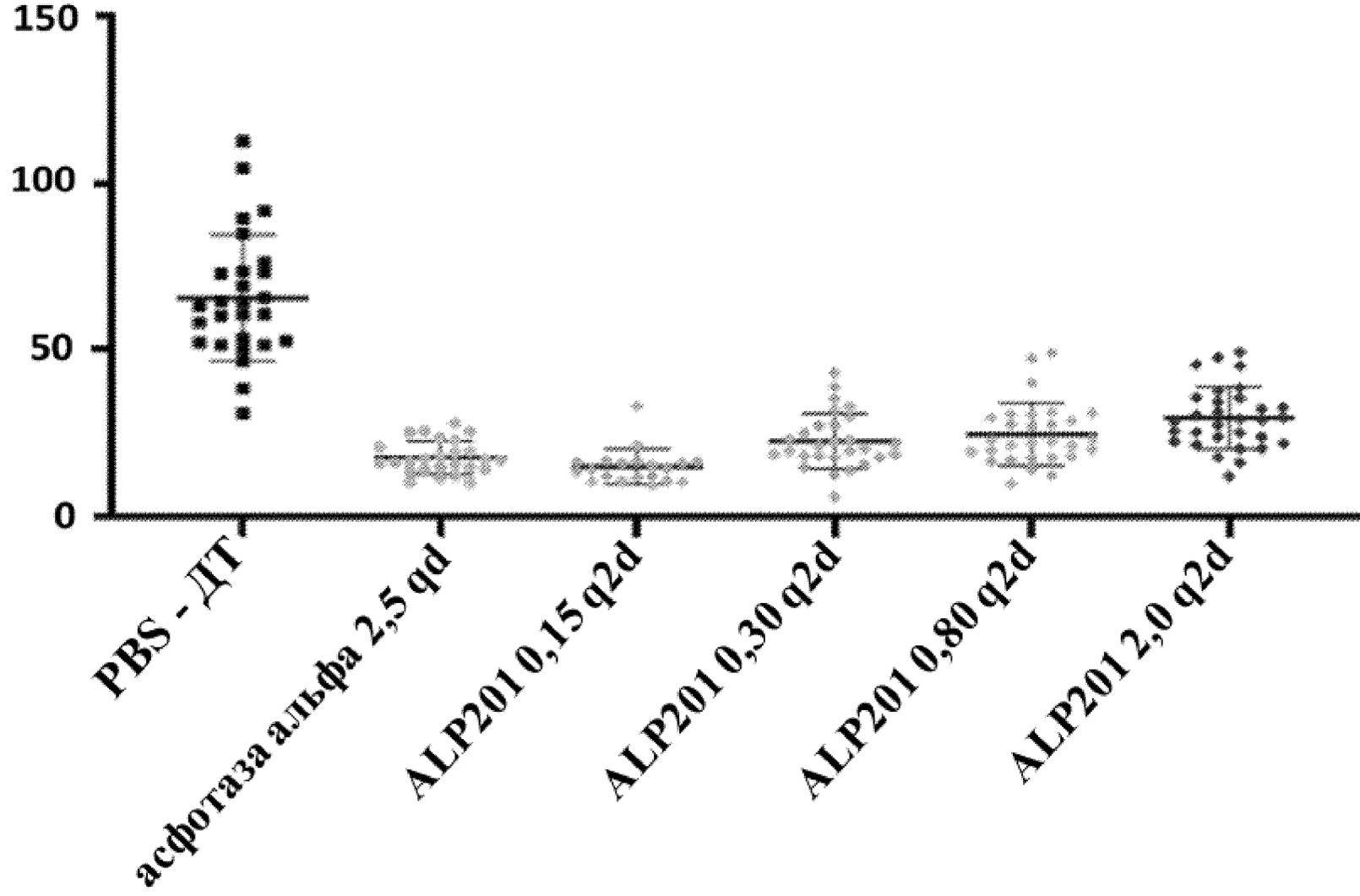
Асфотаза альфа, 12,5 нг/мл

ФИГ. 3

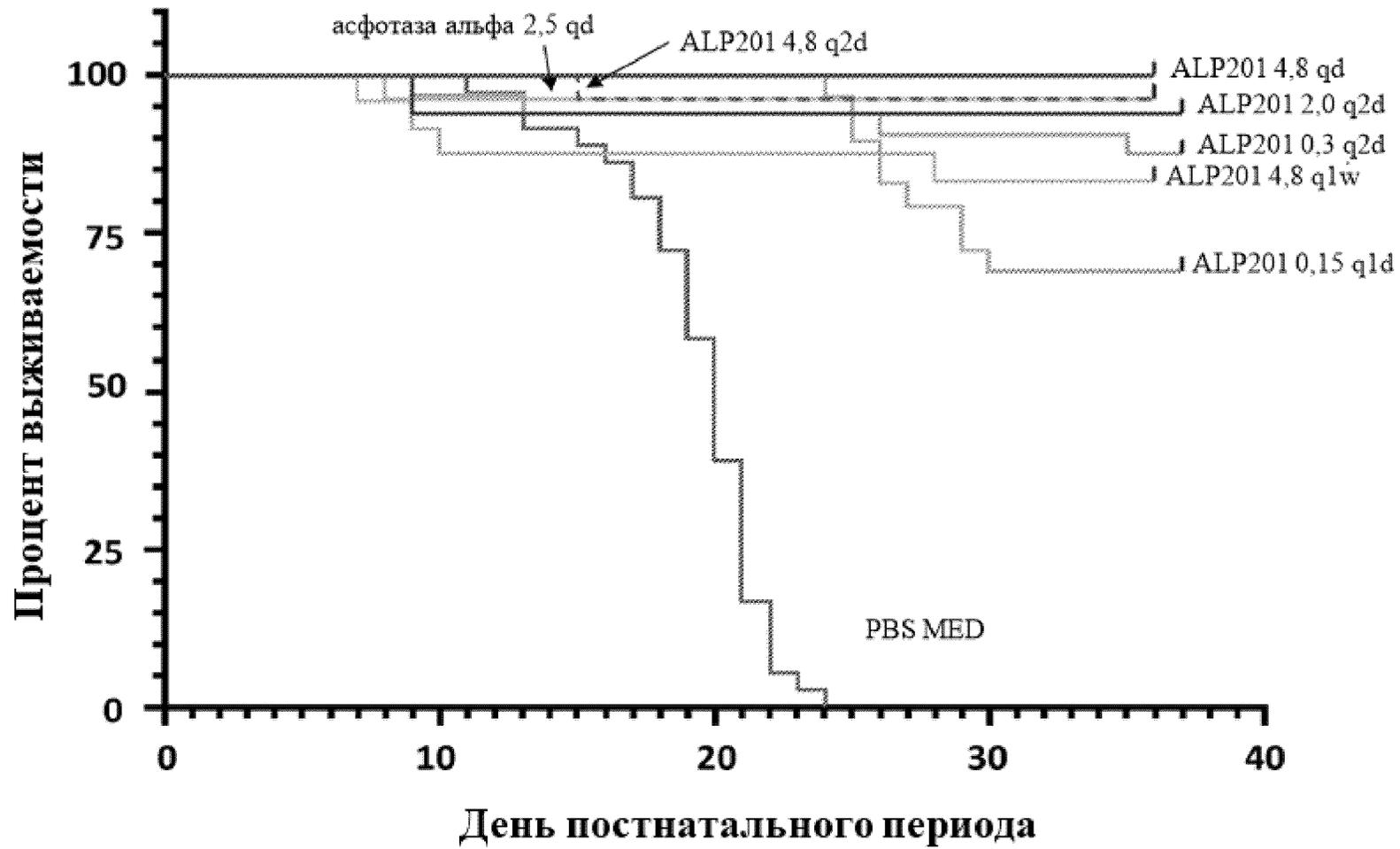


ФИГ. 4

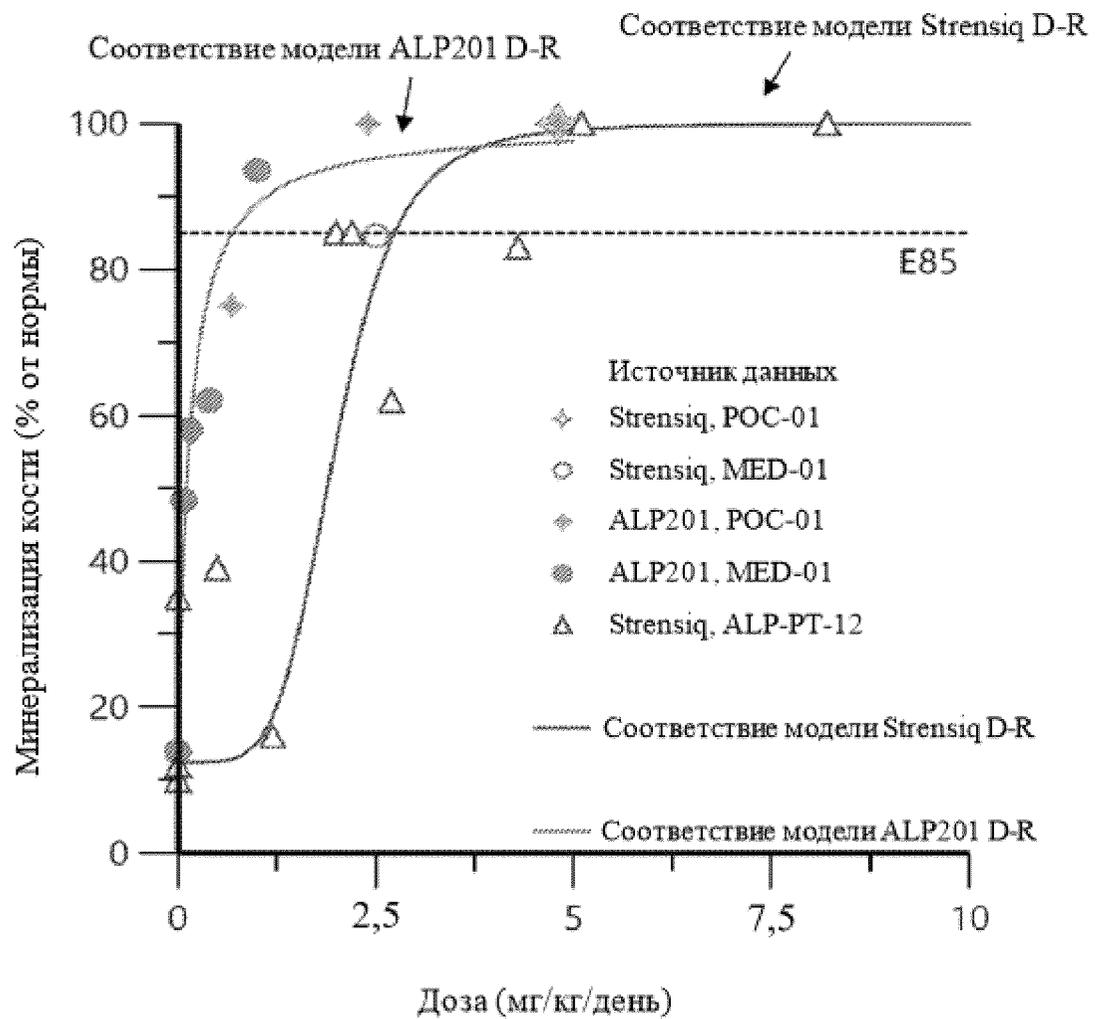
Активность щелочной фосфатазы  
(микроЕдиниц/мг кости)



ФИГ. 5

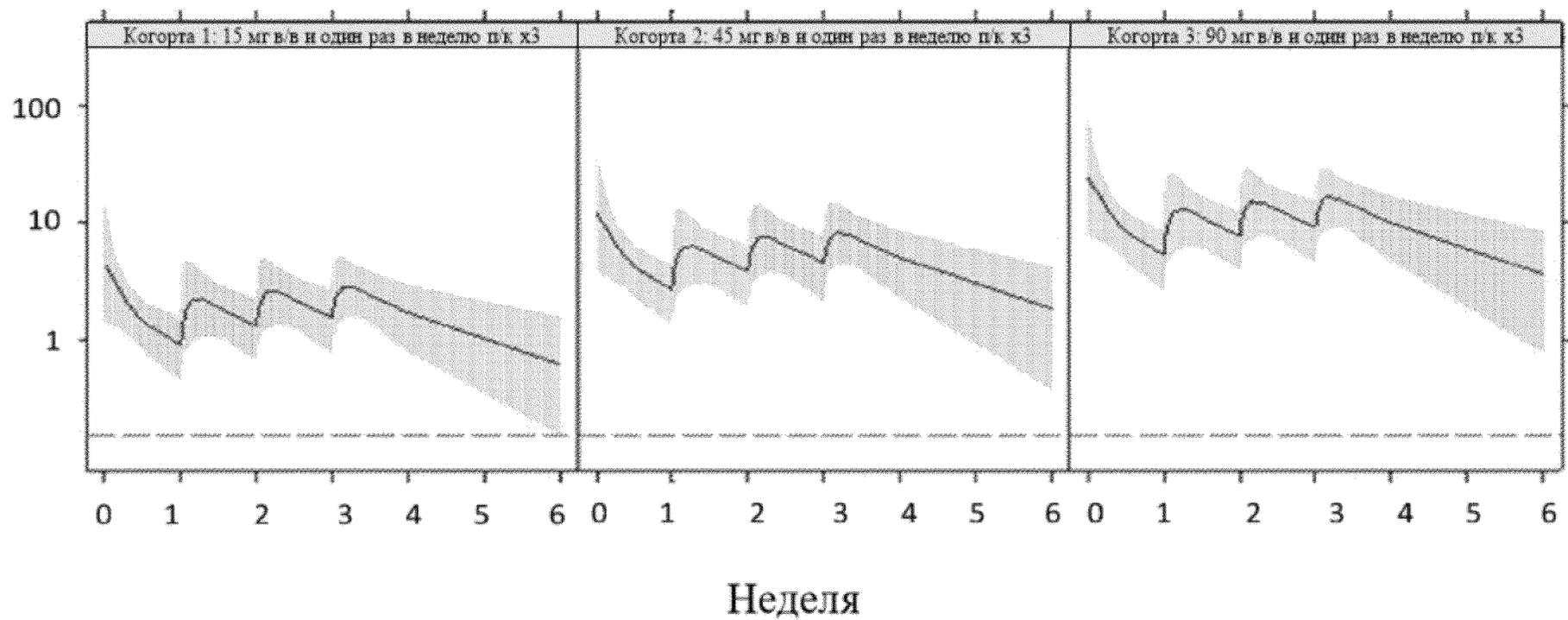


ФИГ. 6



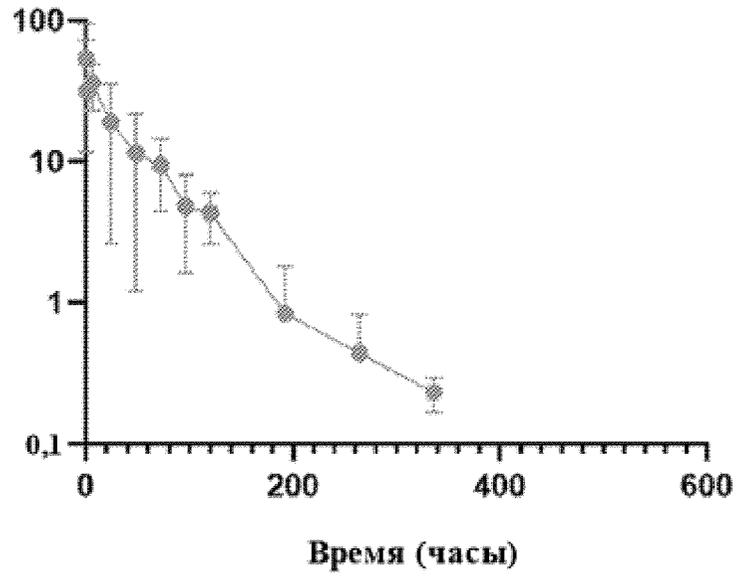
ФИГ. 7

Медианная концентрация ALP201 (мкг/мл)

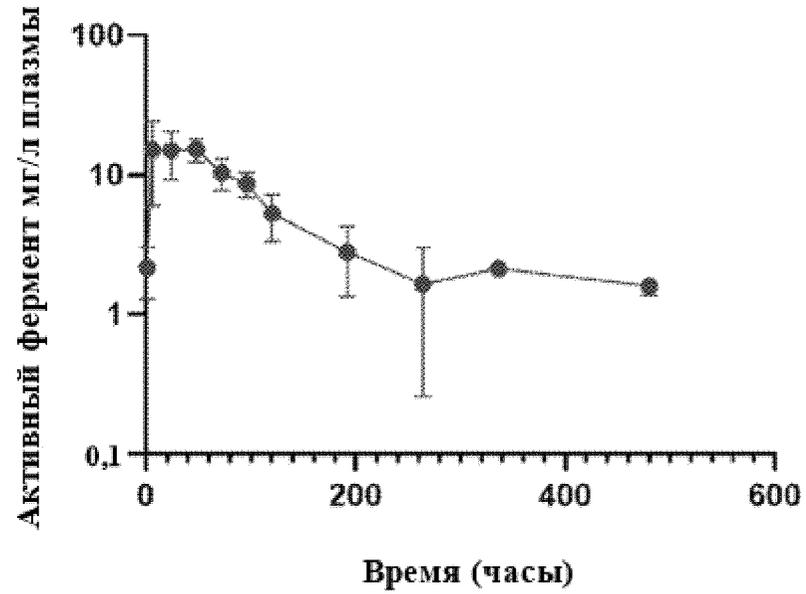


Активный фермент мкг/л плазмы

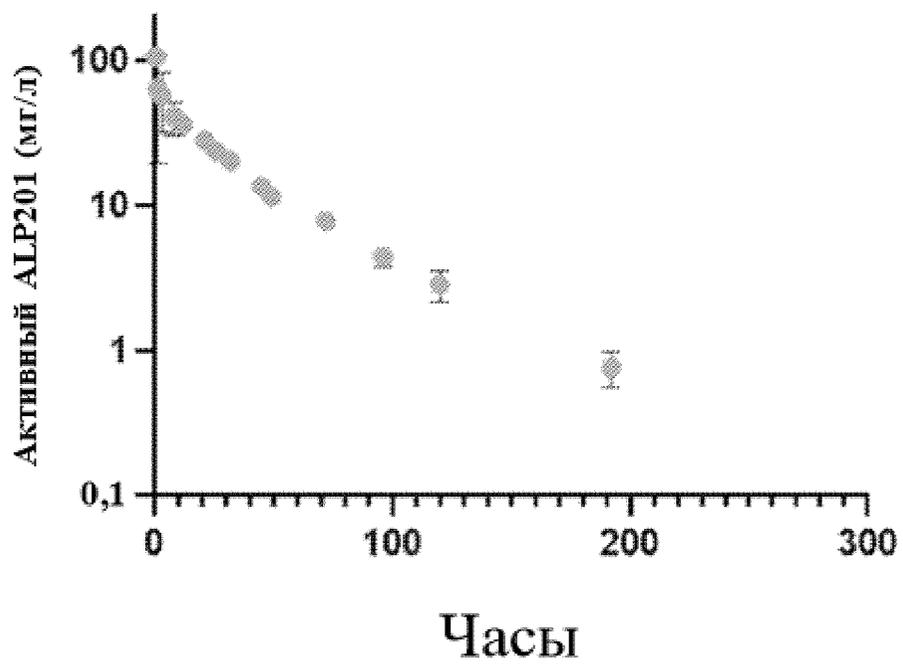
ФИГ. 8А



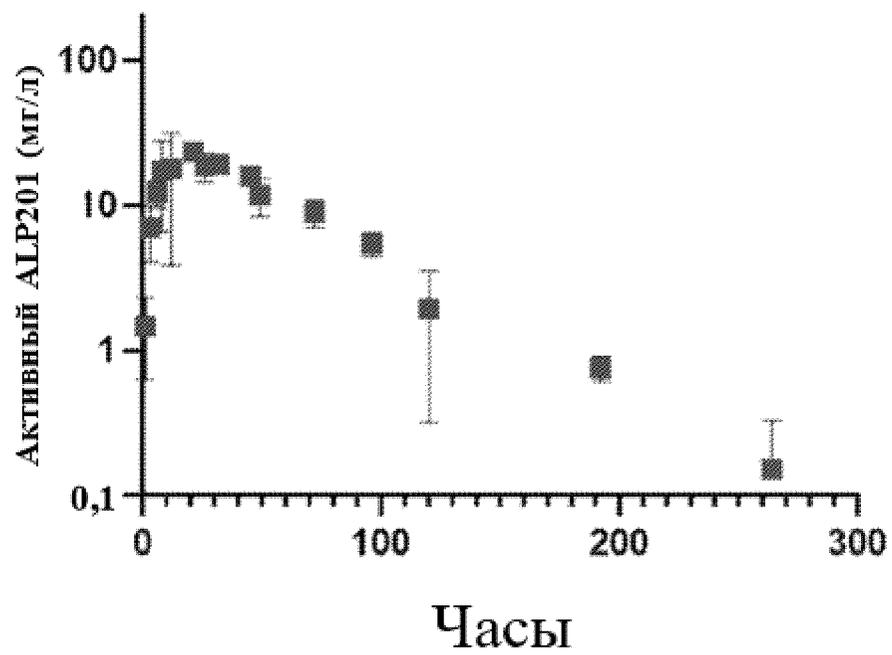
ФИГ. 8В



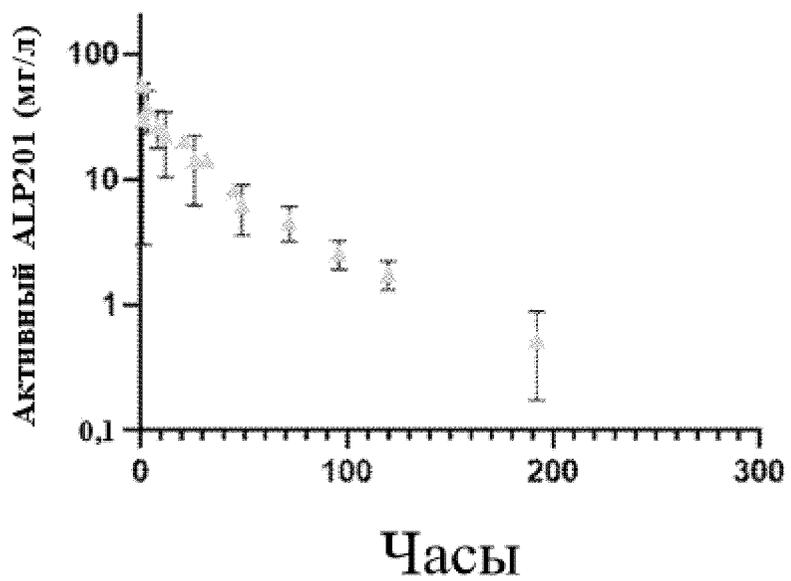
ФИГ. 9А



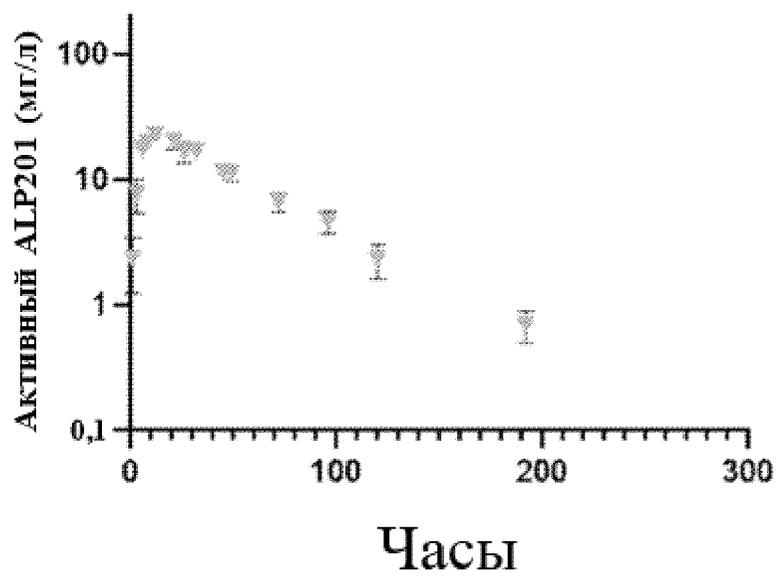
ФИГ. 9В



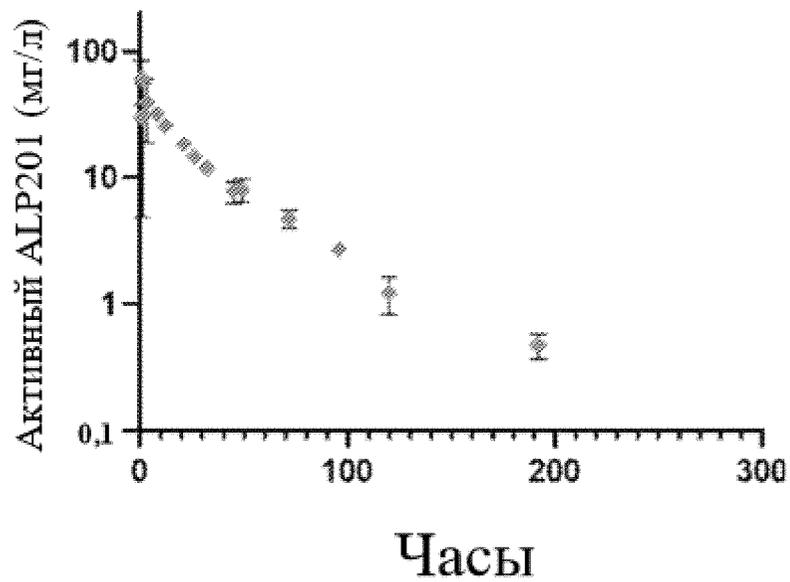
ФИГ. 10А



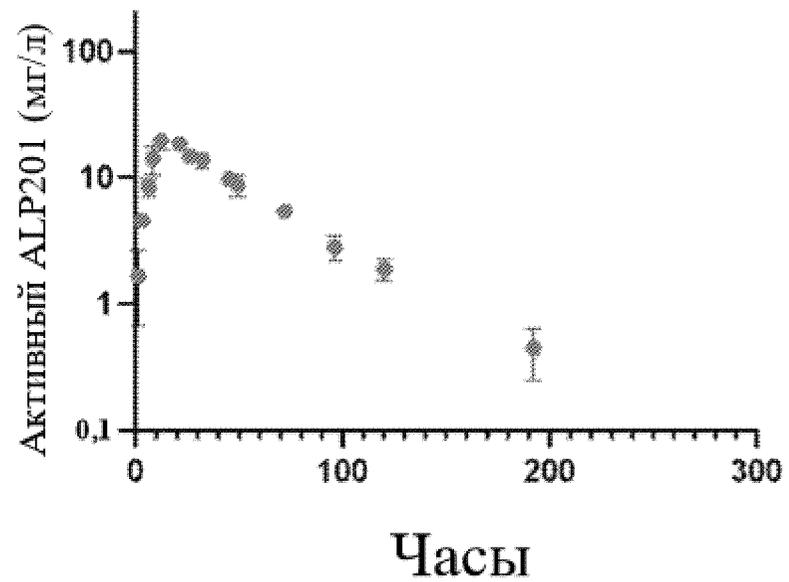
ФИГ. 10В



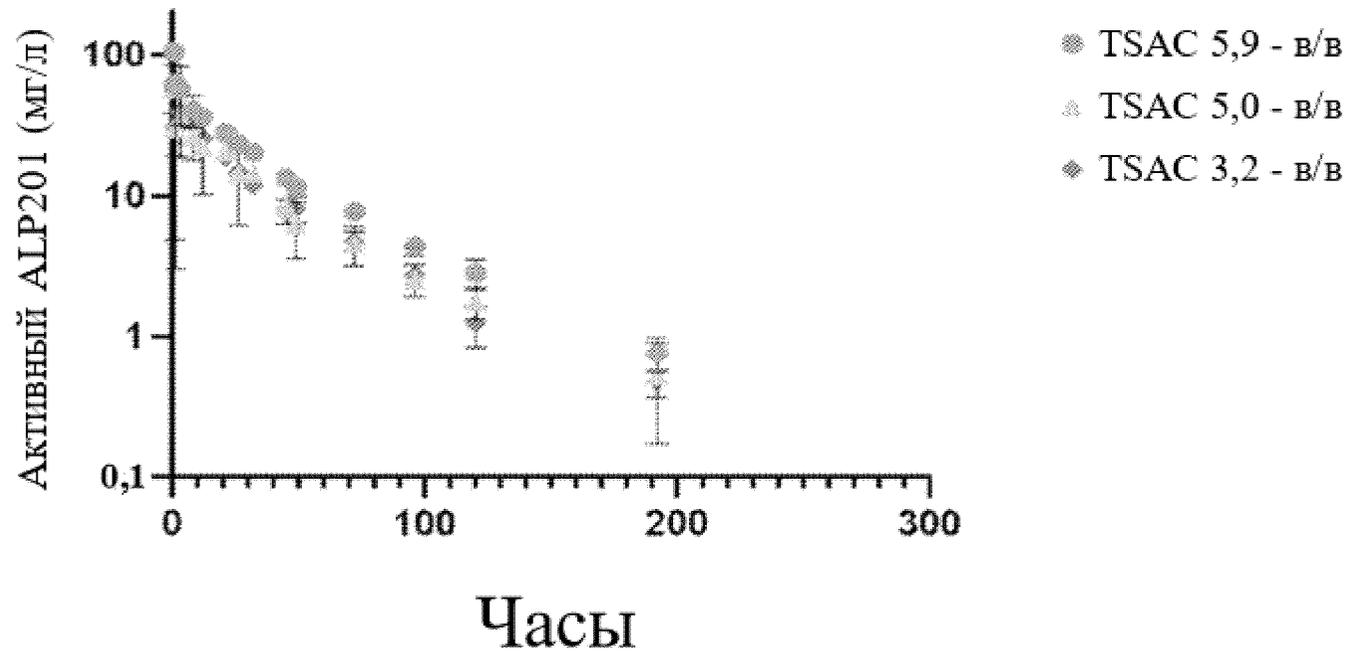
ФИГ. 11А



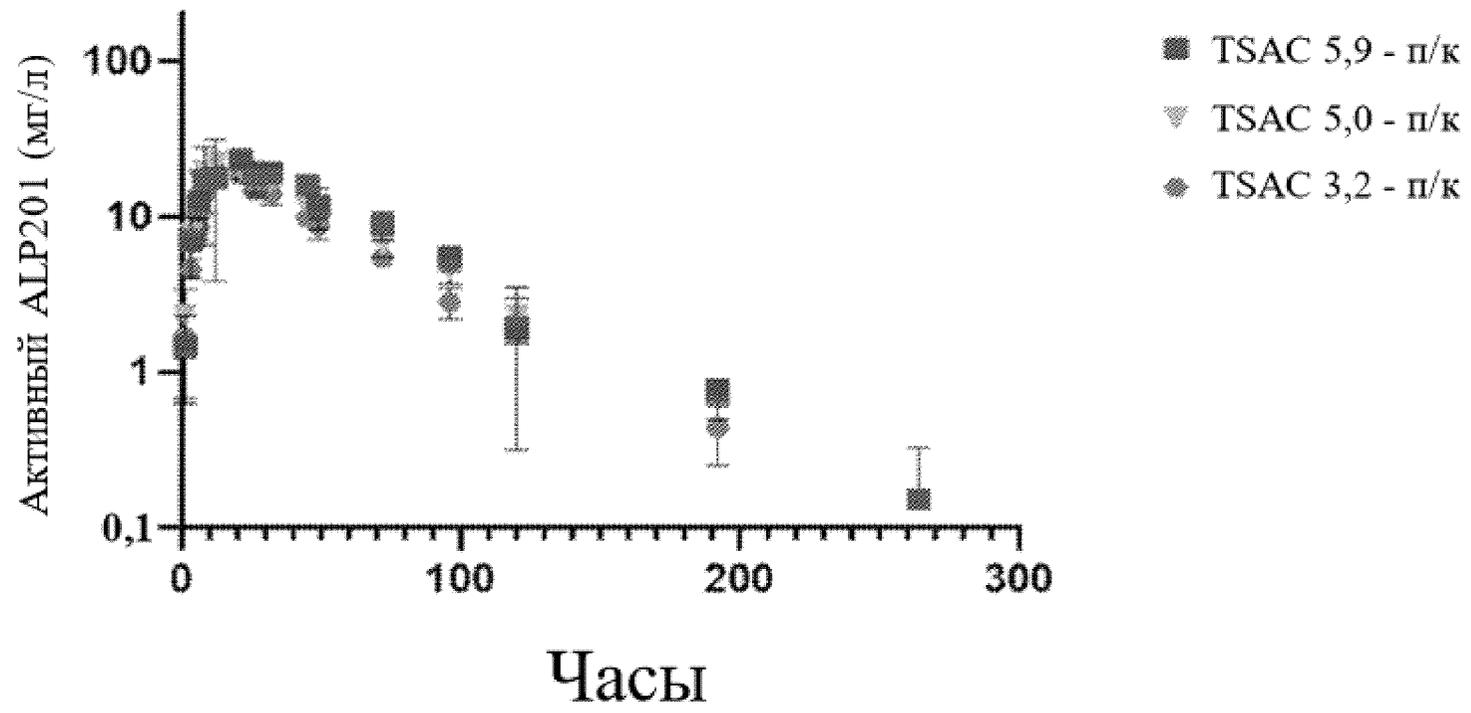
ФИГ. 11В



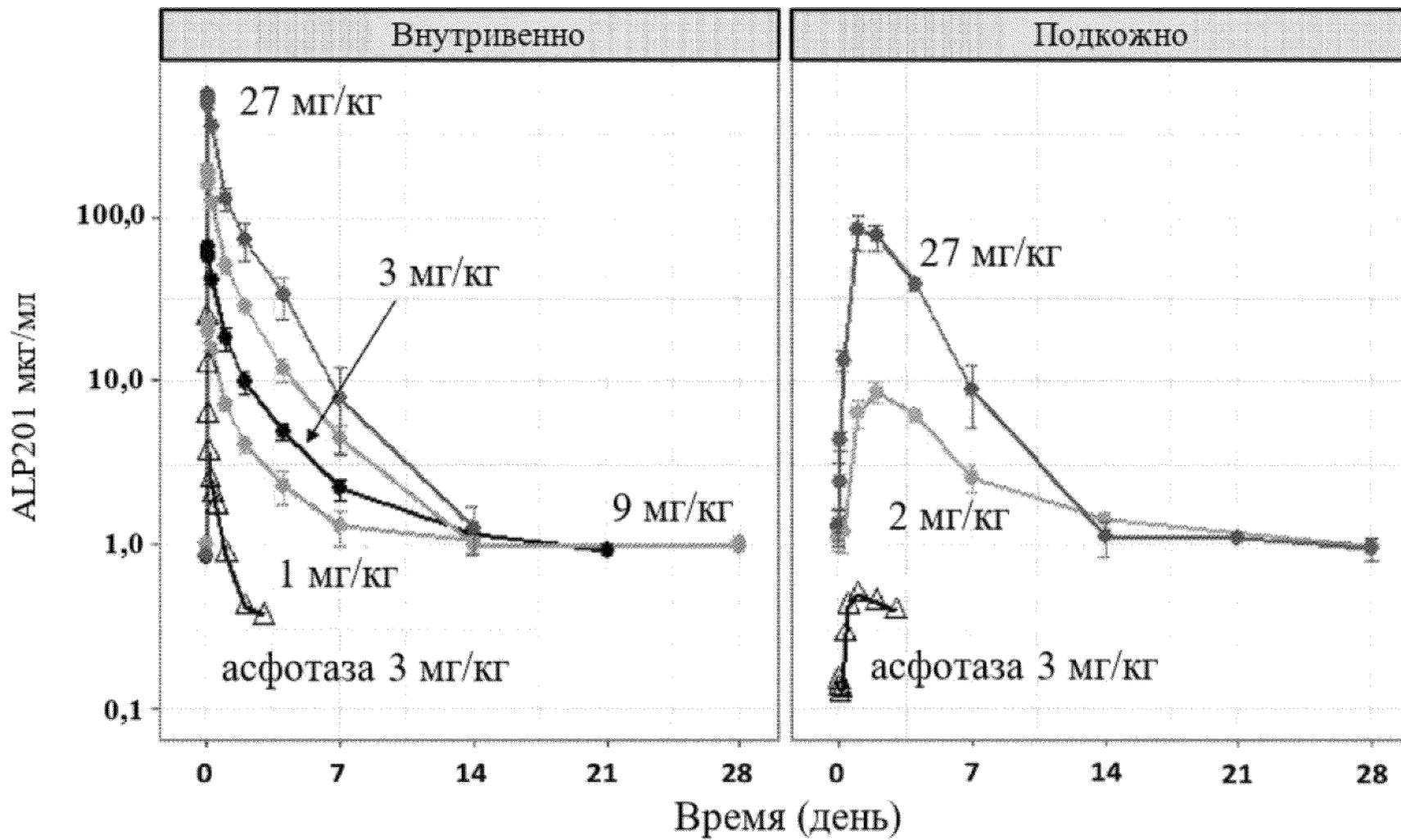
ФИГ. 12



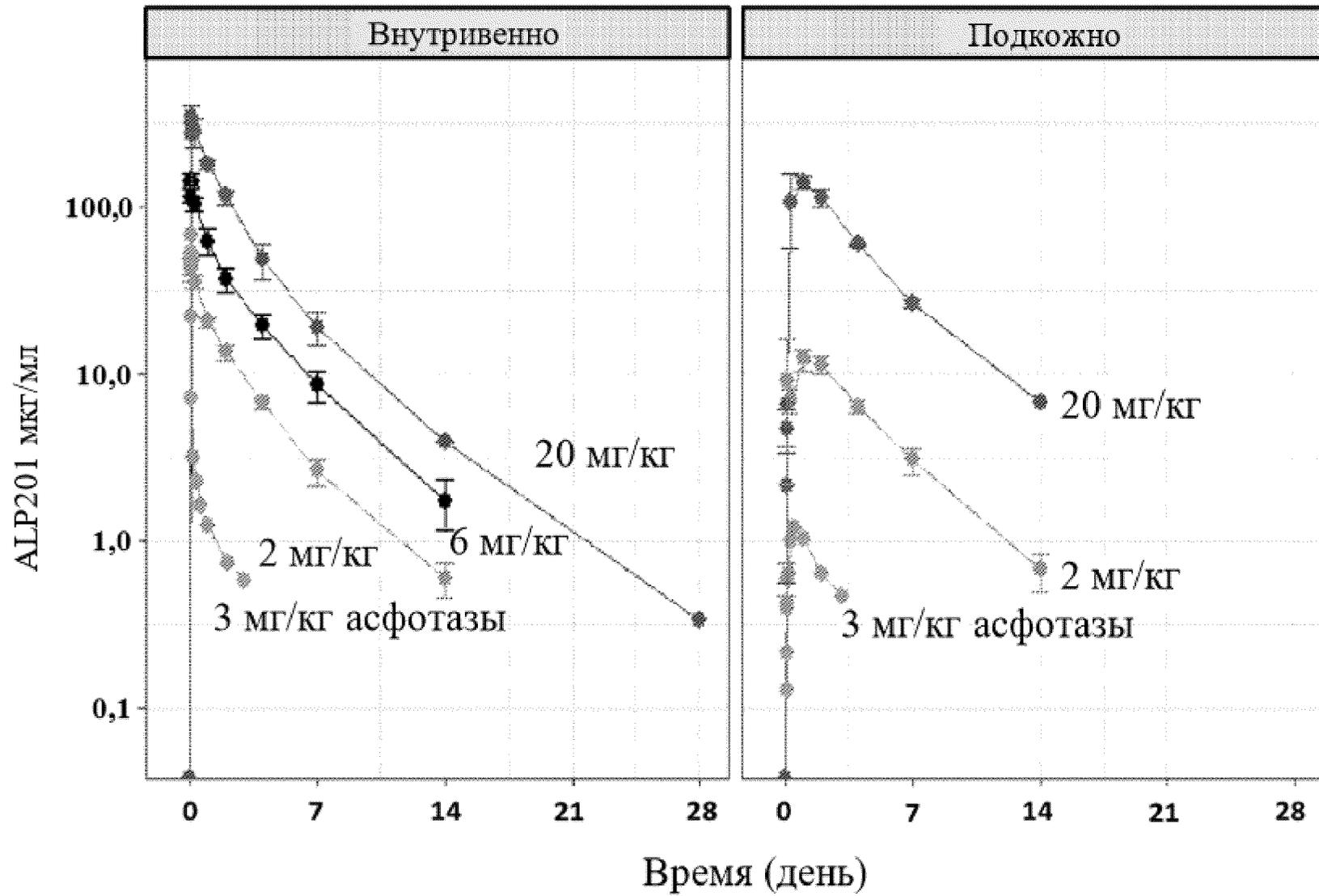
ФИГ. 13



ФИГ. 14



ФИГ. 15



ФИГ. 16

