



(12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ

(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN)
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ

(11)



1-0032921

(51)⁷ C12N 5/07; C12N 5/10

(13) B

(21) 1-2017-01119

(22) 30/09/2015

(86) PCT/US2015/053252 30/09/2015

(87) WO2016/054231 07/04/2016

(30) 62/057,842 30/09/2014 US; 62/057,847 30/09/2014 US; 62/112,463 05/02/2015 US;
62/135,345 19/03/2015 US

(45) 25/08/2022 413

(43) 25/08/2017 353A

(73) AMICUS THERAPEUTICS, INC. (US)

1 Cedar Brook Drive, Cranbury, NJ 08512, US

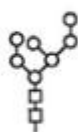
(72) GOTSCHALL, Russell (US); DO, Hung (US).

(74) Công ty TNHH INVESTPRO và cộng sự (INVESTPRO & ASSOCIATES)

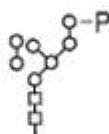
(54) HỢP PHẦN CHỨA AXIT ALPHA-GLUCOSIDAZA Ở NGƯỜI TÁI TỔ HỢP (RHGAA)

(57) Sáng chế đề cập đến hợp phần alpha glucosidaza ở người tái tổ hợp (rhGAA) có nguồn gốc từ tế bào CHO mà có chứa hợp phần glycan được tối ưu hóa hơn chứa lượng rhGAA chứa N-glycan mang mannoza-6-phosphat (M6P) hoặc bis-M6P cao hơn so với rhGAA thông thường, cùng với hàm lượng thấp của glycan có hàm lượng mannoza cao không được phosphoryl hóa, và hàm lượng thấp của galactosa đầu tận cùng trên các oligosacarit phức. Sáng chế cũng đề cập đến phương pháp tạo ra hợp phần chứa rhGAA.

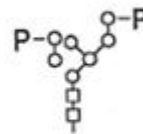
Cấu trúc và ái lực thụ thể đối với các oligosacarit mannoza cao và được phosphoryl hóa



N-glycan mannoza cao, không được phosphoryl hóa;



N-glycan Mono-M6P;
Ái lực thấp hơn đối với CI-MPR
($K_d \sim 7000$ nM)



N-glycan Bis-M6P;
Ái lực cao đối với CI-MPR
($K_d = 2$ nM)

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến lĩnh vực y học, di truyền và hóa sinh glycoprotein tái tổ hợp, và, cụ thể là, đề cập đến hợp phần alpha glucosidaza ở người tái tổ hợp (rhGAA) mà có tổng hàm lượng của glycan mang 6-phosphat mannoza cao hơn mà hướng đích một cách hiệu quả vào CIMPR trên tế bào cơ và sau đó chuyển rhGAA vào lysosom mà ở đó nó có thể phá vỡ hàm lượng cao bất thường của glycogen tích lũy. rhGAA theo sáng chế thể hiện sự hướng đích vào tế bào cơ và tiếp đó chuyển vào lysosom tốt hơn so với các sản phẩm rhGAA thông thường và thể hiện các tính chất dược động học khác mà làm cho nó đặc biệt hữu hiệu đối với liệu pháp thay thế enzym của đối tượng mắc bệnh Pompe.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Các liệu pháp thay thế enzym hiện nay đối với bệnh Pompe sử dụng sản phẩm rhGAA thông thường mà có tổng hàm lượng của glycan mang M6P và glycan mang bis-M6P thấp. Các sản phẩm thông thường được biết với tên gọi Lumizyme®, Myozyme® và Alglucosidase alfa. “Lumizyme” và “Myozyme” là các dạng thông thường của rhGAA được sản xuất hoặc được bán trên thị trường dưới dạng sinh vật bởi Genzyme và được phê chuẩn bởi Cơ quan Quản lý Thực phẩm và Thuốc Hoa Kỳ và được mô tả có tham chiếu đến tài liệu *Physician's Desk Reference* (2014) (mà được kết hợp ở đây bằng cách tham chiếu) hoặc bởi các sản phẩm có tên là “Lumizyme®” hoặc “Myozyme®” được phê chuẩn để sử dụng ở Hoa Kỳ bởi FDA vào ngày 1 tháng 10 năm 2014. Alglucosidase Alfa được xác định với tên hóa học [199-arginin,223-histidin]prepro- α -glucosidaza (ở người); công thức phân tử, $C_{4758}H_{7262}N_{1274}O_{1369}S_{35}$; CAS số 420794-05-0. Các sản phẩm này được dùng cho đối tượng mắc bệnh Pompe, còn gọi là bệnh dự trữ glycogen typ II (GSD-II) hoặc bệnh thiếu hụt axit maltaza. Liệu pháp thay thế enzym nhằm điều trị bệnh Pompe bằng cách thay thế GAA bị mất ở lysosom bằng cách dùng rhGAA do đó làm phục hồi khả năng phá vỡ glycogen ở lysosom của tế bào.

Bệnh Pompe là bệnh dự trữ lysosom di truyền bắt nguồn từ sự thiếu hụt hoạt tính axit α -glucosidaza (GAA). Người mắc bệnh Pompe thiếu hoặc có hàm lượng axit alpha-glucosidaza (GAA) giảm, enzym mà phá vỡ glycogen, và chất mà cơ thể dùng làm nguồn năng lượng. Sự thiếu hụt enzym này gây ra sự tích lũy glycogen dư thừa trong lysosom, mà là cơ quan tử nội bào có chứa enzym mà nhìn chung phá vỡ glycogen và mảnh vụn tế bào hoặc sản phẩm đào thải khác. Sự tích lũy glycogen trong các mô nhất định của đối tượng mắc bệnh Pompe, đặc biệt là cơ, làm suy yếu khả năng hoạt động bình thường của tế bào. Trong bệnh Pompe, glycogen không được chuyển hóa một cách thích hợp và tích lũy dần trong lysosom, đặc biệt là trong tế bào cơ xương và, ở dạng khởi phát ở tuổi sơ sinh của bệnh, trong tế bào cơ tim. Sự tích lũy của glycogen làm hư hỏng tế bào cơ và thần kinh cũng như là các tế bào ở các mô bị ảnh hưởng khác.

Theo cách cũ, tùy thuộc vào tuổi khởi phát, bệnh Pompe được nhận dạng lâm sàng là dạng khởi phát ở trẻ em sớm hoặc là dạng khởi phát muộn. Tuổi khởi phát có khuynh hướng tương đương với độ nghiêm trọng của đột biến di truyền gây ra bệnh Pompe. Các đột biến di truyền nghiêm trọng nhất gây ra sự mất hoàn toàn hoạt tính GAA biểu lộ dưới dạng bệnh khởi phát sớm ở tuổi sơ sinh. Các đột biến di truyền mà làm giảm bớt hoạt tính GAA nhưng không triệt tiêu hoàn toàn nó có liên quan đến các dạng bệnh Pompe có sự khởi phát và tiến triển muộn. Bệnh Pompe khởi phát ở tuổi sơ sinh biểu hiện ngay sau khi sinh và đặc trưng bởi sự yếu cơ, thiếu năng hô hấp và suy tim. Khi không được điều trị, bệnh nhân thường chết trong vòng hai năm. Bệnh Pompe khởi phát ở tuổi thiếu niên và trưởng thành biểu hiện muộn hơn trong đời và thường tiến triển chậm hơn so với bệnh khởi phát ở tuổi sơ sinh. Dạng này của bệnh, mặc dù thường không ảnh hưởng đến tim, cũng có thể dẫn đến tử vong, do cơ xương và các cơ quan tham gia vào sự hô hấp bị yếu.

Phương pháp điều trị không giảm nhẹ tạm thời hiện nay của bệnh Pompe gồm có liệu pháp thay thế enzym (ERT) bằng cách sử dụng GAA ở người tái tổ hợp (rhGAA) chẳng hạn như Lumizyme® hoặc Myozyme®. rhGAA được dùng với nỗ lực để thay thế hoặc bổ sung cho GAA bị mất hoặc khiếm khuyết ở đối tượng mắc bệnh Pompe. Tuy nhiên, vì hầu hết rhGAA trong sản phẩm rhGAA thường không hướng đích vào mô cơ nên nó bị triệt tiêu không hữu ích sau khi sử dụng.

Điều này xảy ra bởi vì rhGAA thông thường thiếu tổng hàm lượng cao của glycan mang M6P và bis-M6P mà hướng đích phân tử rhGAA vào CIMPR trên tế bào cơ đích mà sau đó nó được vận chuyển vào lysosom của tế bào. Sự hấp thụ tế bào của rhGAA đối với liệu pháp thay thế enzym được làm cho thuận tiện bằng carbohydrat chuyên hóa, mannoza-6-phosphat (M6P), mà liên kết với thụ thể mannoza 6-phosphat không phụ thuộc cation (CIMPR) trình diện trên bề mặt tế bào để sau đó chuyển enzym ngoại sinh vào lysosom.

Có bảy vị trí glycosyl hóa liên kết N tiềm năng trên rhGAA. Vì mỗi vị trí glycosyl hóa là khác loại trong loại oligosacarit liên kết N (N-glycan) có mặt, rhGAA bao gồm hỗn hợp phức của các protein có N-glycan có ái lực liên kết khác nhau đối với thụ thể M6P và các thụ thể carbohydrat khác. rhGAA mà có chứa mannoza N-glycan cao có một nhóm M6P (mono-M6P) liên kết với CIMPR với ái lực thấp (~6.000 nM) trong khi rhGAA mà có chứa hai nhóm M6P trên cùng N-glycan (bis-M6P) liên kết với ái lực cao (~2 nM). Các cấu trúc đại diện đối với glycan mono-M6P, và bis-M6P không được phosphoryl hóa được thể hiện trên Hình 1A. Nhóm mannoza-6-P được thể hiện trên Hình 1B. Ngay bên trong lysosom, rhGAA có thể làm thoái hóa glycogen tích lũy bằng enzym. Tuy nhiên, rhGAA thông thường có tổng hàm lượng thấp của glycan mang M6P và bis-M6P và, do đó, hướng đích vào tế bào cơ kém dẫn đến việc chuyển rhGAA vào lysosom kém. Phần lớn phân tử rhGAA trong các sản phẩm thông thường này không có N-glycan đã phosphoryl hóa, do đó thiếu ái lực đối với CIMPR. Glycan mannoza cao không được phosphoryl hóa cũng có thể được thanh thải bằng thụ thể mannoza mà dẫn đến sự thanh thải không hữu ích của ERT (Hình 2).

Các loại khác của N-glycan, carbohydrat phức hợp, mà có chứa, galactoza và axit sialic cũng có mặt trên rhGAA. Vì N-glycan phức hợp không được phosphoryl hóa nên chúng không có ái lực đối với CIMPR. Tuy nhiên, N-glycan kiểu phức hợp với các gốc galactoza được bộc lộ có ái lực từ trung bình đến cao đối với thụ thể asialoglycoprotein trên tế bào gan mà dẫn đến sự thanh thải không hữu ích nhanh của rhGAA (Hình 2).

Sự glycosyl hóa GAA hoặc rhGAA có thể được cải biến bằng enzym *in vitro* bằng phosphotransferaza và các enzym làm lộ được mô tả bởi Canfield và cộng sự, Bằng sáng chế Mỹ số 6,534,300, để tạo ra nhóm M6P. Sự glycosyl hóa bằng enzym

không thể được kiểm soát một cách thích hợp và tạo ra rhGAA có các tính chất miễn dịch và dược lý không mong muốn. rhGAA được cải biến bằng enzym có thể có chứa chỉ một N-glycan mannoza cao mà đều có khả năng được phosphoryl hóa bằng enzym *in vitro* bằng phosphotransferaza/enzym làm lộ và có thể có chứa trung bình là 5-6 nhóm M6P trong mỗi GAA. Các mô hình glycosyl hóa được sản xuất bằng cách xử lý enzym *in vitro* của GAA có vấn đề bởi vì các gốc mannoza ở đầu tận cùng bổ sung, cụ thể là các gốc mannoza ở đầu tận cùng không được phosphoryl hóa, ảnh hưởng bất lợi đến dược động học của rhGAA được cải biến. Khi sản phẩm được cải biến bằng enzym này được dùng *in vivo*, các nhóm mannoza này làm tăng sự thanh thải không hữu ích của GAA, làm tăng sự hấp thụ của GAA được cải biến bằng enzym bởi tế bào miễn dịch, và làm giảm hiệu quả trị liệu rhGAA do ít GAA tới được mô đích, chẳng hạn như tế bào cơ tim hoặc tế bào cơ xương. Ví dụ, các gốc mannoza không được phosphoryl hóa ở đầu tận cùng là các phối tử đã biết đối với thụ thể mannoza ở gan và lách mà dẫn đến sự thanh thải nhanh của rhGAA được cải biến bằng enzym và sự hướng đích giảm của rhGAA đến mô đích. Ngoài ra, mô hình glycosyl hóa của GAA được cải biến bằng enzym có N-glycan mannoza cao có các gốc mannoza không được phosphoryl hóa ở đầu tận cùng tương tự với các gốc trên glycoprotein được sản xuất ở nấm men, nấm mốc và hoạt động làm tăng nguy cơ kích hoạt đáp ứng miễn dịch hoặc dị ứng, chẳng hạn như phản ứng dị ứng nghiêm trọng đe dọa tính mạng (phản vệ) hoặc phản ứng quá mẫn, đối với rhGAA được cải biến bằng enzym.

Như giải thích ở trên, sản phẩm rhGAA thông thường như Lumizyme® có hàm lượng thấp của glycan đã phosphoryl hóa một lần và thậm chí là thấp hơn glycan đã bis-phosphoryl hóa. Để liệu pháp điều trị bệnh Pompe có hiệu quả rhGAA phải được chuyển vào lysosom trong tế bào cơ. Tổng hàm lượng thấp của các nhóm hướng đích mono-M6P và bis-M6P trên rhGAA thông thường làm hạn chế sự hấp thụ tế bào thông qua việc chuyển CIMPR và lysosom, do đó làm cho liệu pháp thay thế enzym thông thường không hiệu quả. Ví dụ, trong khi sản phẩm rhGAA thông thường ở liều lượng 20 mg/kg hoặc cao hơn cải thiện một số khía cạnh của bệnh Pompe, chúng không thể làm giảm một cách thích hợp glycogen tích lũy ở nhiều mô đích, cụ thể là cơ xương để đảo ngược sự tiến triển bệnh.

Do việc chuyển vào lysosom không hiệu quả của liệu pháp thay thế enzym thông thường, các liệu pháp này thường có liên quan đến các vấn đề khác, bao gồm sự gây ra đáp ứng miễn dịch đối với GAA. Phần lớn GAA trong rhGAA thông thường không chứa glycan mang mono-M6P hoặc bis-M6P, mà hướng đích rhGAA vào tế bào cơ. Hệ miễn dịch của đối tượng được bộc lộ với GAA không được phosphoryl hóa dư thừa này và có thể tạo ra đáp ứng miễn dịch có hại mà nhận diện GAA. Việc gây ra đáp ứng miễn dịch đối với GAA không được phosphoryl hóa mà không đi vào mô đích và chuyển vào lysosom làm tăng nguy cơ điều trị thất bại do sự bất hoạt miễn dịch của rhGAA được đưa vào và làm tăng nguy cơ bệnh nhân phải trải qua các phản ứng tự miễn hoặc dị ứng có hại đối với việc điều trị rhGAA. rhGAA theo sáng chế có chứa lượng ít hơn đáng kể của rhGAA không được phosphoryl hóa, không được hướng đích này, do đó làm giảm sự bộc lộ của hệ miễn dịch của bệnh nhân với nó.

Về mặt hậu cần, liều lượng lớn hơn tạo ra gánh nặng bổ sung cho đối tượng cũng như là chuyên viên y tế điều trị cho đối tượng, chẳng hạn như kéo dài thời gian truyền cần để cấp rhGAA trong tĩnh mạch. Điều này là do rhGAA thông thường có chứa hàm lượng cao hơn của rhGAA không được phosphoryl hóa mà thường không hướng đích vào CIMPR trên tế bào cơ. rhGAA mà không liên kết với CIMPR trên tế bào cơ và sau đó đi vào lysosom không làm thoái hóa glycogen ở đó bằng enzym. Khi liều lượng tương đương của rhGAA thông thường và rhGAA theo sáng chế được dùng, nhiều rhGAA hơn trong hợp phần theo sáng chế liên kết CIMPR trên tế bào cơ và sau đó chuyển vào lysosom. rhGAA theo sáng chế cung cấp cho bác sĩ lựa chọn để dùng lượng thấp hơn của rhGAA trong khi chuyển cùng một lượng rhGAA hoặc nhiều rhGAA hơn vào lysosom.

Các quy trình sản xuất hiện nay được dùng để tạo ra rhGAA thông thường, chẳng hạn như Myozyme®, Lumizyme® hoặc Alglucosidase Alfa, không làm tăng đáng kể hàm lượng của M6P hoặc bis-M6P bởi vì việc xử lý carbohydrat tế bào vốn phức tạp và cực khó thao tác. Xem xét các thiếu sót này của sản phẩm rhGAA thông thường, các tác giả sáng chế đã nhận nại tìm kiếm và xác định được cách để hướng đích một cách hiệu quả rhGAA vào tế bào cơ và chuyển nó vào lysosom, làm giảm thiểu sự thanh thải không hữu ích của rhGAA khi được dùng, và do đó hướng đích một cách hữu ích hơn rhGAA vào mô cơ.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Để giải quyết các vấn đề liên quan đến việc hướng đích và dùng các dạng rhGAA thông thường và các khó khăn liên quan đến việc sản xuất các dạng rhGAA hướng đích tốt này, các tác giả sáng chế đã nghiên cứu và phát triển quy trình tạo ra rhGAA mà hướng đích CIMPR hiệu quả hơn và chuyển nó vào lysosom trong mô cơ bởi vì nó có hàm lượng của glycan M6P và bis-M6P cao hơn so với hợp phần rhGAA thông thường. Ngoài ra, rhGAA theo sáng chế xử lý tốt N-glycan kiểu phức mà làm giảm thiểu sự thanh thải không hữu ích của rhGAA bởi mô không phải là mô đích.

Có tính đến các vấn đề liên quan đến các phương pháp điều trị thay thế enzym bằng cách sử dụng sản phẩm rhGAA thông thường chẳng hạn như Lumizyme®, thông qua các nghiên cứu và khảo sát kỹ lưỡng các tác giả sáng chế đã phát triển phương pháp sản xuất rhGAA ở tế bào CHO có tổng hàm lượng của glycan mono-M6P và bis-M6P cao hơn đáng kể mà hướng đích CIMPR trên tế bào cơ và sau đó chuyển rhGAA vào lysosom.

rhGAA được sản xuất bằng phương pháp này cũng có các tính chất dược động học có lợi do mô hình glycosyl hóa toàn phần của nó mà làm tăng sự hấp thụ mô đích và làm giảm sự thanh thải không hữu ích sau khi dùng cho đối tượng mắc bệnh Pompe. Các tác giả sáng chế chứng minh rằng rhGAA theo sáng chế, ví dụ như rhGAA được gọi là ATB-200, có hiệu lực hơn và hiệu quả hơn trong việc hướng đích mô cơ xương so với rhGAA thông thường chẳng hạn như Lumizyme®. rhGAA theo sáng chế có khả năng tốt hơn để hướng đích một cách hữu ích mô cơ ở bệnh nhân mắc bệnh Pompe và làm giảm sự thanh thải không hữu ích của rhGAA như được minh họa trên Hình 2.

rhGAA tốt hơn theo sáng chế có thể được hoàn thiện thêm hoặc được kết hợp với chaperon hoặc được liên hợp với các nhóm khác mà hướng đích CIMPR trong mô cơ, chẳng hạn như các phần của IGF2 mà liên kết với thụ thể này. Các ví dụ dưới đây cho thấy rằng rhGAA theo sáng chế, ví dụ như rhGAA ATB-200, vượt quá tiêu chuẩn hiện hành được quan tâm đối với liệu pháp thay thế enzym bằng cách tạo ra sự thanh thải glycogen tốt hơn đáng kể ở cơ xương khi so với chế độ hiện tại bằng cách sử dụng sản phẩm rhGAA thông thường Lumizyme®.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Hình 1: Hình 1A thể hiện glycan mannoza cao không được phosphoryl hóa, glycan mono-M6P, và glycan bis-M6P. Hình 1B thể hiện cấu trúc hóa học của nhóm M6P.

Hình 2: Hình 2A mô tả sự hướng đích hữu ích của rhGAA thông qua glycan mang M6P đến mô đích (ví dụ, mô cơ của đối tượng mắc bệnh Pompe). Hình 2B mô tả sự thanh thải thuốc không hữu ích đến mô không phải là đích (ví dụ, gan và lách) hoặc bằng cách liên kết glycan không có M6P đến mô không phải là đích.

Hình 3: Hình 3A minh họa bằng đồ thị thụ thể CIMPR (còn gọi là thụ thể IGF2) và các miền của thụ thể này. Hình 3B là bảng thể hiện ái lực liên kết (nMol) của glycan mang bis- và mono-M6P đối với CIMPR, ái lực liên kết của glycan kiểu mannoza cao với thụ thể mannoza, và ái lực liên kết của glycan phức được khử sialyl hóa đối với thụ thể asialyoglycoprotein. RhGAA mà có glycan mang M6P và bis-M6P có thể liên kết hữu ích với CIMPR trên tế bào đích cơ. RhGAA mà có glycan mannoza cao và glycan được khử sialyl hóa có thể liên kết không hữu ích với tế bào không phải là đích mang thụ thể tương ứng.

Hình 4: Các hình 4A và 4B lần lượt thể hiện kết quả của sắc ký ái lực CIMPR của Lumizyme® và Myozyme®. Các đường nét đứt dùng để chỉ gradien rửa giải M6P. Việc rửa giải bằng M6P hoán đổi phân tử GAA được liên kết qua glycan có chứa M6P thành CIMPR. Như thể hiện trên Hình 4A, 78% hoạt tính GAA trong Lumizyme® được rửa giải trước khi bổ sung M6P. Hình 4B thể hiện rằng 73% hoạt tính GAA Myozyme® được rửa giải trước khi bổ sung M6P. Chỉ 22% hoặc 27% rhGAA lần lượt trong Lumizyme® hoặc Myozyme được rửa giải bằng M6P. Các hình vẽ này cho thấy rằng hầu hết rhGAA trong hai sản phẩm rhGAA thông thường thiếu glycan có M6P cần để hướng đích CIMPR ở mô cơ đích.

Hình 5: Cấu trúc ADN để biến nạp tế bào CHO bằng ADN mã hóa cho rhGAA. Các tế bào CHO được biến nạp bằng cấu trúc ADN mã hóa cho rhGAA (SEQ ID NO: 4).

Hình 6: Các hình 6A và 6B thể hiện kết quả của sắc ký ái lực CIMPR của Myozyme và rhGAA ATB-200. Như thấy rõ ràng trên Hình 6B, khoảng 70% rhGAA trong rhGAA ATB-200 có chứa M6P.

Hình 7: Tinh chế rhGAA ATB-200, Phương án 1 & 2.

Hình 8: Biên dạng rửa giải Polywax của Lumizyme® và rhGAA ATB-200.

Hình 9: Tóm tắt các cấu trúc N-glycan của Lumizyme® so với ba hợp phần khác nhau của rhGAA ATB200, được ký hiệu là BP-rhGAA, ATB200-1 và ATB200-2.

Hình 10: Hình 10A so sánh ái lực liên kết CIMPR của rhGAA ATB-200 (đường bên trái) với ái lực liên kết CIMPR của Lumizyme® (đường bên phải). Hình 10B mô tả hàm lượng Bis-M6P của Lumizyme® và rhGAA ATB-200.

Hình 11: Hình 11A so sánh hoạt tính rhGAA ATB-200 (đường bên trái) với hoạt tính rhGAA Lumizyme® (đường bên phải) bên trong nguyên bào sợi bình thường ở các nồng độ GAA khác nhau. Hình 11B so sánh hoạt tính rhGAA ATB-200 (đường bên trái) với hoạt tính rhGAA Lumizyme® (đường bên phải) bên trong nguyên bào sợi từ đối tượng mắc bệnh Pompe ở các nồng độ GAA khác nhau. Hình 11C so sánh ($K_{\text{hấp thụ}}$) của nguyên bào sợi từ đối tượng bình thường và đối tượng mắc bệnh Pompe.

Hình 12: Hình 12A thể hiện hàm lượng của glycogen tương ứng với protein ở cơ tim sau khi tiếp xúc với tá dược lỏng (đối chứng âm), với 20 mg/ml Alglucosidase Alfa, hoặc với 5, 10 hoặc 20 mg/kg rhGAA ATB-200. Hình 12B thể hiện hàm lượng của glycogen tương ứng với protein trong cơ bốn đầu sau khi tiếp xúc với tá dược lỏng (đối chứng âm), với 20 mg/ml Lumizyme®, hoặc với 5, 10 hoặc 20 mg/kg rhGAA ATB-200. Hình 12C thể hiện hàm lượng của glycogen tương ứng với protein ở cơ ba đầu sau khi tiếp xúc với tá dược lỏng (đối chứng âm), với 20 mg/ml Lumizyme®, hoặc với 5, 10 hoặc 20 mg/kg rhGAA ATB-200. rhGAA ATB-200 tạo ra sự giảm glycogen đáng kể ở cơ bốn đầu và ba đầu so với đối chứng âm và so với Lumizyme®.

Hình 13: Độ ổn định rhGAA ATB-200 được cải thiện trong sự có mặt của chaperon AT2221. Đường thứ nhất bên trái trên Hình 13A thể hiện tỉ lệ phần trăm của protein rhGAA ATB-200 không cuộn gập ở các nhiệt độ khác nhau ở độ pH 7,4 (độ pH của máu). Đường cuối cùng bên phải thể hiện tỉ lệ phần trăm của protein rhGAA

ATB-200 không cuộn gập ở các nhiệt độ khác nhau ở độ pH 5,2 (độ pH của lysosom). Ba đường ở giữa thể hiện hiệu quả của 10 µg, 30µg, hoặc 100 µg chaperon AT2221 lên sự cuộn gập protein. Dữ liệu này cho thấy AT2221 ngăn ngừa sự mở cuộn gập của rhGAA ATB-200 ở độ pH của máu so với mẫu đối chứng. Sự cải thiện của Tm ở độ pH trung tính bằng AT2221 được tổng kết trên Hình 13B.

Hình 14: Bảng này cho thấy rằng sự kết hợp của rhGAA ATB-200 và chaperon AT2221 tạo ra sự thanh thải glycogen tốt hơn đáng kể ở chuột bị bất hoạt GAA so với điều trị bằng Lumizyme® và AT2221 hoặc đối chứng rhGAA Lumizyme® hoặc rhGAA ATB200 không có chaperon AT2221.

Hình 15: Glycogen dư trong cơ bốn đầu sau khi điều trị bằng Lumizyme, rhGAA ATB-200, hoặc rhGAA ATB-200 và các nồng độ khác nhau của chaperon AT2221.

Hình 16: Sự cải thiện của Bệnh lý Cơ Xương ở Chuột được điều trị bằng ATB200 + Miglustat (AT2221) so với các con Chuột chỉ được điều trị bằng ERT. Nhuộm màu glycogen PAS (Hình 16A) và EM (Hình 16 B) của mô cơ từ con chuột GAA KO được điều trị bằng rhGAA thông thường hoặc rhGAA ATB-200 và miglustat (AT-2221). Hình 16C; Đánh giá sự tăng sinh lysosom bằng chỉ thị LAMP-1. Hình 16D Xác định sợi cơ typ I và typ II.

Hình 17: Sự cải thiện của Bệnh lý Cơ Xương ở Chuột được điều trị bằng ATB-200 + Miglustat (AT2221) so với các con chuột chỉ được điều trị bằng ERT. Nhuộm màu glycogen PAS (Hình 17A) của mô cơ từ con chuột GAA KO được điều trị bằng rhGAA thông thường hoặc rhGAA ATB-200 và miglustat (AT-2221). Hình 17B; Đánh giá sự tăng sinh lysosom bằng chỉ thị LAMP-1.

Mô tả chi tiết sáng chế

Định nghĩa: Các thuật ngữ dùng trong bản mô tả này thường có nghĩa thông thường trong lĩnh vực, trong ngữ cảnh của sáng chế này và trong ngữ cảnh cụ thể sử dụng mỗi thuật ngữ này. Các thuật ngữ nhất định được thảo luận dưới đây, hoặc ở nơi nào đó trong bản mô tả, để cung cấp chỉ dẫn bổ sung cho người thực hành trong việc mô tả hợp phần và phương pháp theo sáng chế và làm thế nào để tạo ra và sử dụng chúng.

Thuật ngữ "GAA" dùng để chỉ axit α -glucosidaza ở người (GAA) enzym mà xúc tác cho sự thủy phân của các liên kết α -1,4- và α -1,6-glycosidic của glycogen ở lysosom cũng như là dùng để chỉ các biến thể cài xen, có liên quan hoặc thể của trình tự axit amin GAA và các mảnh của trình tự GAA dài hơn mà tạo ra hoạt tính enzym. Thuật ngữ "rhGAA" được dùng để phân biệt GAA nội sinh với GAA được sản xuất bằng cách tổng hợp hoặc tái tổ hợp, chẳng hạn như GAA được sản xuất bằng cách biến nạp tế bào CHO bằng ADN mã hóa cho GAA. Trình tự ADN ví dụ mã hóa cho GAA là NP_000143.2 (SEQ ID NO: 4) mà được kết hợp ở đây để tham khảo. GAA và rhGAA có thể có mặt trong hợp phần có chứa hỗn hợp của phân tử GAA có các mô hình glycosyl hóa khác nhau, chẳng hạn như hỗn hợp của phân tử rhGAA mang các nhóm mono-M6P hoặc bis-M6P trên glycan của chúng và phân tử GAA mà không mang M6P hoặc bis-M6P. GAA và rhGAA cũng có thể được hoàn thiện bằng các hợp chất khác, chẳng hạn như chaperon, hoặc có thể được liên kết với các gốc khác trong thể liên hợp GAA hoặc rhGAA, chẳng hạn như được liên kết với gốc IGF2 mà hướng đích thể liên hợp vào CIMPR và sau đó chuyển nó vào lysosom.

"Đối tượng" hoặc "bệnh nhân" tốt hơn là người, mặc dù các động vật có vú và động vật không phải là người khác mắc rối loạn bao gồm sự tích lũy của glycogen cũng có thể được điều trị. Đối tượng có thể là thai nhi, trẻ sơ sinh, trẻ em, thiếu niên hoặc người trưởng thành mắc bệnh Pompe hoặc các rối loạn dự trữ hoặc tích lũy glycogen khác. Một ví dụ về cá thể được điều trị là cá thể (thai nhi người, trẻ sơ sinh, trẻ em, thiếu niên, thanh niên, hoặc người trưởng thành) mắc GSD-II (ví dụ, GSD-II ở tuổi sơ sinh, GSD-II ở tuổi thiếu niên, hoặc GSD-II khởi phát ở tuổi trưởng thành). Cá thể có thể có hoạt tính GAA dư, hoặc không có hoạt tính có thể đo được. Ví dụ, cá thể mắc GSD-II có thể có hoạt tính GAA mà nhỏ hơn khoảng 1% hoạt tính GAA bình thường (GSD-II ở tuổi sơ sinh), hoạt tính GAA mà bằng khoảng 1-10% hoạt tính GAA bình thường (GSD-II ở tuổi thiếu niên), hoặc hoạt tính GAA mà bằng khoảng 10-40% hoạt tính GAA bình thường (GSD-II ở tuổi trưởng thành).

Các thuật ngữ, "điều trị" và "việc điều trị," như được dùng trong bản mô tả này, dùng để chỉ sự cải thiện một hoặc nhiều triệu chứng có liên quan đến bệnh, ngăn ngừa hoặc làm chậm sự khởi phát của một hoặc nhiều triệu chứng của bệnh, và/hoặc làm giảm độ nghiêm trọng hoặc tần suất của một hoặc nhiều triệu chứng của bệnh. Ví dụ,

việc điều trị có thể dùng để chỉ sự cải thiện tình trạng tim (ví dụ, sự tăng thể tích cuối tâm trương và/hoặc thể tích cuối tâm thu, hoặc sự giảm, cải thiện hoặc ngăn ngừa bệnh cơ tim tiến triển mà thường được tìm thấy ở GSD-II) hoặc chức năng phổi (ví dụ, sự tăng dung tích sống khi khóc so với dung tích cơ sở, và/hoặc sự bình thường hóa của sự giảm độ bão hòa oxy trong quá trình khóc); sự cải thiện kỹ năng phát triển thần kinh và/hoặc vận động (ví dụ, sự tăng điểm AIMS); sự giảm hàm lượng glycogen ở mô của cá thể bị mắc bệnh; hoặc dạng kết hợp bất kỳ của các tác dụng này. Theo một phương án ưu tiên, việc điều trị gây ra sự cải thiện tình trạng tim, cụ thể là sự giảm hoặc ngăn ngừa bệnh cơ tim có liên quan đến GSD-II.

Các thuật ngữ, "cải thiện," "làm tăng" hoặc "làm giảm," như được dùng trong bản mô tả này, dùng để chỉ các giá trị tương ứng với phép đo cơ sở, chẳng hạn như phép đo ở cùng cá thể trước khi bắt đầu việc điều trị được mô tả trong bản mô tả này, hoặc phép đo ở cá thể đối chứng (hoặc nhiều cá thể đối chứng) khi không có việc điều trị được mô tả trong bản mô tả này. Cá thể đối chứng là cá thể bị mắc cùng một dạng GSD-II (khởi phát ở tuổi sơ sinh, thiếu niên hoặc trưởng thành) như cá thể được điều trị, mà có cùng tuổi như cá thể được điều trị (để đảm bảo rằng các giai đoạn của bệnh ở cá thể được điều trị và (các) cá thể đối chứng có thể so sánh được).

Thuật ngữ "được tinh chế" như được dùng trong bản mô tả này dùng để chỉ nguyên liệu mà được phân lập trong điều kiện làm giảm hoặc loại bỏ sự có mặt của các nguyên liệu không liên quan, tức là, chất ô nhiễm, bao gồm nguyên liệu tự nhiên mà từ đó thu được nguyên liệu này. Ví dụ, protein được tinh chế tốt hơn là về cơ bản không chứa các protein hoặc axit nucleic khác mà kết hợp với nó trong tế bào; phân tử axit nucleic được tinh chế tốt hơn là về cơ bản không chứa các protein hoặc các phân tử axit nucleic không liên quan khác mà có thể được tìm thấy cùng nó ở trong tế bào. Như được dùng trong bản mô tả này, thuật ngữ "về cơ bản không chứa" được dùng tùy theo hoạt động, trong ngữ cảnh thử nghiệm phân tích của nguyên liệu. Tốt hơn là, nguyên liệu được tinh chế về cơ bản không chứa chất ô nhiễm có độ tinh khiết ít nhất là 95%; tốt hơn là, độ tinh khiết ít nhất là 97%, và tốt hơn nữa là độ tinh khiết ít nhất là 99%. Độ tinh khiết có thể được đánh giá bằng sắc ký, điện di trên gel, thử nghiệm miễn dịch, phân tích hợp phần, thử nghiệm sinh học, thử nghiệm enzym và các phương pháp khác đã biết trong lĩnh vực. Theo phương án cụ thể, được tinh chế có nghĩa là hàm

lượng của chất ô nhiễm thấp hơn hàm lượng chấp nhận được bởi các cơ quan quản lý để sử dụng an toàn cho người hoặc động vật không phải là người. Các protein tái tổ hợp có thể được phân lập hoặc được tinh chế từ tế bào CHO bằng cách sử dụng phương pháp đã biết trong lĩnh vực bao gồm tách kích thước sắc ký, sắc ký ái lực hoặc sắc ký trao đổi anion.

Thuật ngữ "được cải biến di truyền" hoặc "tái tổ hợp" dùng để chỉ tế bào, chẳng hạn như tế bào CHO, mà biểu hiện sản phẩm gen cụ thể, chẳng hạn như rhGAA hoặc rhGAA ATB-200, sau khi đưa axit nucleic có chứa trình tự mã hóa mà mã hóa cho sản phẩm gen, cùng với các yếu tố điều hòa mà kiểm soát sự biểu hiện của trình tự mã hóa. Việc đưa axit nucleic vào có thể được thực hiện bằng phương pháp bất kỳ đã biết trong lĩnh vực bao gồm hướng đích gen và tái tổ hợp tương đồng. Như được dùng trong bản mô tả này, thuật ngữ này cũng bao gồm tế bào mà đã được thiết kế để biểu hiện hoặc biểu hiện quá mức gen nội sinh hoặc sản phẩm gen không thường được biểu hiện bởi tế bào này, ví dụ, bằng công nghệ hoạt hóa gen.

"Bệnh Pompe" dùng để chỉ LSD lặn nhiễm sắc thể thường đặc trưng bởi thiếu hụt hoạt tính axit alpha glucosidaza (GAA) mà làm suy yếu sự chuyển hóa glycogen ở lysosom. Sự thiếu hụt enzym dẫn đến sự tích lũy glycogen ở lysosom và dẫn đến sự yếu cơ xương tiến triển, chức năng tim giảm, thiếu năng hô hấp, và/hoặc sự suy yếu CNS ở giai đoạn muộn của bệnh. Các đột biến di truyền ở gen GAA dẫn đến sự biểu hiện ít hơn hoặc tạo ra các dạng enzym đột biến có độ ổn định bị thay đổi, và/hoặc hoạt tính sinh học cuối cùng dẫn đến bệnh. (nhìn chung xem tài liệu Hirschhorn R, 1995, Glycogen Storage Disease Type II: Acid α -Glucosidase (Acid Maltase) Deficiency, The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease, Scriver et al., eds., McGraw-Hill, New York, 7th ed., pages 2443-2464). Ba dạng bệnh Pompe được nhận diện lâm sàng (ở tuổi sơ sinh, thiếu niên và trưởng thành) tương đương với mức độ của hoạt tính α -glucosidaza dư (Reuser A J et al., 1995, Glycogenosis Type II (Acid Maltase Deficiency), Muscle & Nerve Supplement 3, S61-S69). Bệnh Pompe ở tuổi sơ sinh (typ I hoặc A) phổ biến nhất và nghiêm trọng nhất, đặc trưng bởi sự kém phát triển, nhược trương phổ quát, phì đại tim, và suy tim phổi trong năm thứ hai của tuổi đời. Bệnh Pompe ở tuổi thiếu niên (typ II hoặc B) có độ nghiêm trọng trung bình và đặc trưng bởi sự chiếm ưu thế của triệu chứng cơ bắp nhưng không có tim to. Cá thể

mắc bệnh Pompe ở tuổi thiếu niên thường chết trước khi tới 20 tuổi do suy phổi. Bệnh Pompe ở tuổi trưởng thành (typ III hoặc C) thường thể hiện dưới dạng bệnh cơ tiến triển chậm trong những năm thiếu niên hoặc muộn vào thập kỷ thứ sáu (Felicia K J et al., 1995, Clinical Variability in Adult-Onset Acid Maltase Deficiency: Report of Affected Sibs and Review of the Literature, Medicine 74, 131-135). Ở bệnh Pompe, đã biết rằng α -glucosidaza được cải biến rộng rãi sau dịch mã bằng cách glycosyl hóa, phosphoryl hóa, và xử lý phân giải protein. Sự chuyển hóa của 110 kilo Dalton (kid) tiền chất thành các dạng trưởng thành 76 và 70 kid bằng cách phân giải protein trong lysosom là điều cần thiết đối với sự xúc tác glycogen tối ưu. Như được dùng trong bản mô tả này, thuật ngữ "bệnh Pompe" dùng để chỉ tất cả các typ của bệnh Pompe. Hợp phần và chế độ dùng liều lượng bộc lộ trong đơn này có thể được dùng để điều trị, ví dụ, bệnh Pompe typ I, typ II hoặc typ III.

Các phương án không làm giới hạn sáng chế

Hợp phần rhGAA bắt nguồn từ tế bào CHO mà có chứa lượng rhGAA có chứa N-glycan mang mono-mannoza-6-phosphat (M6P) hoặc bis-M6P cao hơn so với rhGAA thông thường ví dụ như Lumizyme® (Alglucosidase Alfa; CAS 420794-05-0). Hợp phần rhGAA ví dụ theo sáng chế là ATB-200 (đôi khi ký hiệu là ATB-200, ATB-200 hoặc CBP-rhGAA) mà được mô tả trong Ví dụ. rhGAA theo sáng chế (ATB-200) đã được thể hiện là liên kết CIMPR với ái lực cao ($K_D \sim 2-4$ nM) và được tiếp thu một cách hiệu quả bởi nguyên bào sợi và nguyên bào cơ xương Pompe ($K_{hấp thu} \sim 7-14$ nM). ATB-200 được xác định đặc điểm *in vivo* và được thể hiện là có thời gian bán hủy huyết tương biểu kiến ngắn hơn ($t_{1/2} \sim 45$ phút) so với rhGAA ERT hiện tại ($t_{1/2} \sim 60$ phút).

Trình tự axit amin của rhGAA có thể có độ tương đồng ít nhất là 70%, 75%, 80%, 85%, 95% hoặc 99%, hoặc có chứa 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 hoặc nhiều hơn sự mất, sự thế hoặc sự thêm vào trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 1, 3 hoặc 4. Theo một số phương án của GAA hoặc rhGAA theo sáng chế, chẳng hạn như trong rhGAA ATB-200, GAA hoặc rhGAA sẽ có chứa trình tự axit amin GAA kiểu đại chẳng hạn như trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 1 hoặc 3. Theo các phương án không làm giới hạn sáng chế khác, rhGAA có chứa tập hợp con của các gốc axit amin có mặt trong GAA kiểu đại, trong đó tập hợp con này bao gồm các gốc axit amin của

GAA kiểu đại mà tạo thành vị trí hoạt tính để liên kết chất nền và/hoặc sự khử chất nền. Theo một phương án, rhGAA là glucosidaza alfa, mà là enzym ở người axit α -glucosidaza (GAA), được mã hóa bằng phần lớn trong chín kiểu đơn bội quan sát được của gen này. rhGAA theo sáng chế, bao gồm rhGAA ATB-200, có thể có chứa trình tự axit amin mà có độ tương đồng bằng 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% so với trình tự axit amin của alpha glucosidaza ở người, chẳng hạn như trình tự axit amin có số truy cập AHE24104.1 (GI:568760974)(SEQ ID NO: 1) và Bằng sáng chế Mỹ số 8,592,362 hoặc trình tự axit amin của NP_000143.2 (SEQ ID NO: 4) mà được kết hợp ở đây để tham khảo. Trình tự nucleotit và trình tự axit amin đối với GAA cũng lần lượt được nêu trong các SEQ ID NO: 2 và 3. Các biến thể của trình tự axit amin này cũng bao gồm các trình tự có 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 hoặc nhiều hơn axit amin sự mất, sự cài xen hoặc sự thế vào trình tự axit amin GAA dưới đây. Các trình tự polynucleotit mã hóa cho GAA và biến thể ở người GAA cũng được dự định và có thể được dùng để biểu hiện tái tổ hợp rhGAA theo sáng chế.

Các thuật toán và/hoặc các chương trình sắp xếp thẳng hàng khác nhau có thể được dùng để tính độ tương đồng giữa hai trình tự, bao gồm FASTA, hoặc BLAST mà có sẵn dưới dạng một phần của gói phân tích trình tự GCG (University of Wisconsin, Madison, Wis.), và có thể được dùng với, ví dụ, cài đặt mặc định. Ví dụ, các polypeptit có độ tương đồng ít nhất là 70%, 85%, 90%, 95%, 98% hoặc 99% đối với các polypeptit cụ thể được mô tả trong bản mô tả này và tốt hơn là thể hiện về cơ bản là cùng chức năng, cũng như là polynucleotit mã hóa cho các polypeptit này, được dự tính. Trừ khi có chỉ dẫn khác điểm độ tương tự dựa trên việc sử dụng BLOSUM62. Khi sử dụng BLASTP, độ tương tự theo tỉ lệ phần trăm được dựa trên điểm dương BLASTP và độ tương đồng trình tự theo tỉ lệ phần trăm được dựa trên điểm độ tương tự BLASTP. “Độ tương đồng” BLASTP thể hiện số và phân đoạn của tổng số gốc trong các cặp trình tự điểm cao mà là tương đồng; và “Dương” BLASTP thể hiện số và phân đoạn của các gốc mà điểm sắp thẳng hàng có giá trị dương và mà là tương tự với nhau. Trình tự axit amin có các mức độ của độ tương đồng hoặc độ tương tự này hoặc mức độ trung gian bất kỳ của độ tương đồng hoặc độ tương tự với các trình tự axit amin được bộc lộ trong bản mô tả này được dự tính và được bao hàm bởi sáng chế này. Các trình tự polynucleotit của các polypeptit tương tự được suy ra bằng cách sử

dụng mã di truyền và có thể thu được bằng các phương pháp thông thường, cụ thể là bằng cách dịch mã ngược trình tự axit amin của nó bằng cách sử dụng mã di truyền.

Tốt hơn là, không lớn hơn 70, 65, 60, 55, 45, 40, 35, 30, 25, 20, 15, 10, hoặc 5% tổng số rhGAA trong hợp phần theo sáng chế thiếu N-glycan mang M6P hoặc bis-M6P hoặc thiếu khả năng liên kết với thụ thể mannoza-6-phosphat phụ thuộc cation (CIMPR). Theo cách khác, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 99%, <100% hoặc nhiều hơn của rhGAA trong hợp phần có chứa ít nhất là một N-glycan mang M6P và/hoặc bis-M6P hoặc có khả năng liên kết với CIMPR.

Phân tử rhGAA trong hợp phần rhGAA theo sáng chế có thể có 1, 2, 3 hoặc 4 nhóm M6P trên glycan của chúng. Ví dụ, chỉ một N-glycan trên phân tử rhGAA có thể mang M6P (được mono-phosphoryl hóa), N-glycan đơn lẻ có thể mang hai nhóm M6P (được bis-phosphoryl hóa), hoặc hai N-glycan khác nhau trên cùng phân tử rhGAA có thể mang nhóm M6P đơn lẻ. Phân tử rhGAA trong hợp phần rhGAA cũng có thể có N-glycan không mang nhóm M6P. Theo phương án khác, trung bình N-glycan có chứa lớn hơn 3 mol/mol M6P và lớn hơn 4 mol/mol axit sialic. Trung bình ít nhất là khoảng 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, hoặc 10% tổng số glycan trên rhGAA có thể ở dạng glycan mono-M6P, ví dụ, khoảng 6,25% tổng số glycan có thể mang nhóm M6P đơn lẻ và trung bình là, ít nhất là khoảng 0,5, 1, 1,5, 2,0, 2,5, 3,0% tổng số glycan trên rhGAA ở dạng glycan bis-M6P và trung bình là ít hơn 25% tổng số rhGAA theo sáng chế không chứa glycan đã phosphoryl hóa liên kết với CIMPR.

Hợp phần rhGAA theo sáng chế có thể có hàm lượng trung bình của N-glycan mang M6P nằm trong khoảng từ 0,5 đến 7,0 mol/mol rhGAA hoặc giá trị trung gian bất kỳ của khoảng giá trị con bao gồm 0,5, 1,0, 1,5, 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, hoặc 7,0 mol/mol rhGAA. Như thể hiện trong các Ví dụ, rhGAA theo sáng chế có thể được cắt phân đoạn để tạo ra hợp phần rhGAA có số lượng trung bình khác nhau của glycan mang M6P hoặc mang bis-M6P trên rhGAA do đó cho phép tùy biến thêm nữa rhGAA hướng đích vào lysosom trong mô đích bằng cách chọn lọc phân đoạn cụ thể hoặc bằng cách kết hợp có chọn lọc các phân đoạn khác nhau.

Lên đến 60% N-glycan trên rhGAA có thể được sialy hóa đầy đủ, ví dụ, lên đến 10%, 20%, 30%, 40%, 50% hoặc 60% N-glycan có thể được sialy hóa đầy đủ. Theo

một số phương án từ 4 đến 20% tổng số N-glycan trong hợp phần rhGAA được sialyl hóa đầy đủ.

Theo phương án khác không lớn hơn 5%, 10%, 20% hoặc 30% của N-glycan trên rhGAA mang axit sialic và Gal ở đầu tận cùng. Khoảng giá trị này bao gồm tất cả các giá trị trung gian và các khoảng giá trị con, ví dụ, từ 7 đến 30% tổng số N-glycan trên rhGAA trong hợp phần có thể mang axit sialic và Gal ở đầu tận cùng.

Theo phương án khác nữa, không lớn hơn 5, 10, 15, 16, 17, 18, 19 hoặc 20% N-glycan trên rhGAA chỉ có Gal ở đầu tận cùng và không chứa axit sialic. Khoảng giá trị này bao gồm tất cả các giá trị trung gian và các khoảng giá trị con, ví dụ, từ 8 đến 19% tổng số N-glycan trên rhGAA trong hợp phần có thể chỉ có Gal ở đầu tận cùng và không chứa axit sialic.

Theo phương án khác theo sáng chế từ 40, 45, 50, 55 đến 60% tổng số N-glycan trên rhGAA trong hợp phần là N-glycan kiểu phức; hoặc không lớn hơn 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7% tổng số N-glycan rhGAA trong hợp phần là N-glycan kiểu lai; không lớn hơn 5, 10, hoặc 15% N-glycan kiểu mannoza cao trên rhGAA trong hợp phần không được phosphoryl hóa; ít nhất là 5% hoặc 10% N-glycan kiểu mannoza cao trên rhGAA trong hợp phần được mono-M6P phosphoryl hóa; và/hoặc ít nhất là 1 hoặc 2% N-glycan kiểu mannoza cao trên rhGAA trong hợp phần được bis-M6P phosphoryl hóa. Các giá trị này bao gồm tất cả các giá trị trung gian và các khoảng giá trị con. Hợp phần rhGAA theo sáng chế có thể thuộc một hoặc nhiều của khoảng giá trị hàm lượng nêu trên.

Theo một số phương án, hợp phần rhGAA theo sáng chế mang, trung bình là, từ 2,0 đến 8,0 gốc axit sialic trong mỗi mol của rhGAA. Khoảng giá trị này bao gồm tất cả các giá trị trung gian và các khoảng giá trị con bao gồm 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5 và 8,0 gốc/mol rhGAA. Gốc axit sialic có thể ngăn ngừa sự thanh thải không hữu ích bởi thụ thể asialoglycoprotein.

Hợp phần rhGAA theo sáng chế tốt hơn là được sản xuất bằng tế bào CHO, chẳng hạn như dòng tế bào CHO GA-ATB-200, hoặc bằng môi trường nuôi cấy cấp hai hoặc dẫn xuất của môi trường nuôi cấy tế bào CHO này. Cấu trúc ADN, mà biểu hiện các biến thể alen của GAA hoặc trình tự axit amin GAA biến thể khác chẳng hạn

như các trình tự có độ tương đồng ít nhất là 90%, 95% hoặc 99% so với SEQ ID NO: 1, có thể được tạo cấu trúc và được biểu hiện ở tế bào CHO. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực có thể chọn lọc các vật truyền thay thế thích hợp để biến nạp tế bào CHO để sản xuất cấu trúc ADN này.

Các tác giả sáng chế đã phát hiện ra rằng rhGAA có khả năng vượt trội để hướng đích CIMPR và lysosom tế bào cũng như là mô hình glycosyl hóa mà làm giảm sự thanh thải không hữu ích *in vivo* của nó có thể được sản xuất bằng cách sử dụng tế bào trứng chuột đồng Trung Quốc (CHO). Các tế bào này có thể được làm cho biểu hiện rhGAA với hàm lượng cao hơn đáng kể của tổng số M6P và bis-M6P so với sản phẩm rhGAA thông thường. GAA tái tổ hợp ở người được sản xuất bởi các tế bào này, ví dụ, như được lấy ví dụ bằng rhGAA ATB-200 đã được mô tả trong các Ví dụ, có các nhóm M6P và bis-M6P hướng đích tế bào cơ nhiều hơn đáng kể so với GAA thông thường, chẳng hạn như Lumizyme® và được thể hiện là liên kết có hiệu quả với CIMPR và được hấp thụ hiệu quả bởi cơ xương và cơ tim. Nó cũng được chứng tỏ là có mô hình glycosyl hóa mà tạo ra biên dạng được động học phù hợp và làm giảm sự thanh thải không hữu ích *in vivo*.

rhGAA theo sáng chế có thể được tạo hợp phần dưới dạng dược phẩm hoặc được dùng để sản xuất thuốc để điều trị bệnh Pompe hoặc các tình trạng bệnh khác có liên quan đến sự thiếu hụt GAA. Hợp phần có thể được tạo hợp phần với chất mang hoặc tá dược chấp nhận được về mặt dược lý. Chất mang và hợp phần có thể là tiệt trùng và mặt khác phù hợp với phương thức sử dụng.

Chất mang được dụng thích hợp bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở nước, dung dịch muối (ví dụ, NaCl), nước muối, nước muối đã đệm, rượu, glyxerol, etanol, gôm arabic, dầu thực vật, rượu benzyl, polyetylen glycol, gelatin, carbohydrat chẳng hạn như lactoza, amyloza hoặc tinh bột, đường chẳng hạn như mannitol, sucroza, hoặc các chất khác, dextroza, magie stearat, đá talc, axit silicic, este của axit béo, hydroxymetylxenluloza, polyvinyl pyrrolidon, v.v., cũng như là dạng kết hợp của chúng. Các hợp phần dược, nếu muốn, có thể được trộn với chất phụ trợ, ví dụ, chất hoạt động bề mặt, chẳng hạn như polysorbat như polysorbat 80, chất làm trơn, chất bảo quản, chất làm ổn định, chất làm ẩm, chất nhũ tương hóa, muối để làm ảnh hưởng đến áp suất thẩm thấu, chất đệm, chất tạo màu, chất tạo vị và/hoặc chất tạo hương và

chất tương tự mà không phản ứng theo cách có hại với hoạt chất. Theo phương án ưu tiên, chất mang tan trong nước thích hợp để dùng trong tĩnh mạch được sử dụng.

Hợp phần hoặc thuốc, nếu muốn, cũng có thể có chứa lượng nhỏ của chất làm ẩm hoặc nhũ tương hóa, hoặc chất đệm pH. Hợp phần có thể là dung dịch lỏng, huyền phù, nhũ tương, viên nén, viên tròn, viên nang, hợp phần giải phóng kéo dài, hoặc bột. Hợp phần cũng có thể được tạo hợp phần dưới dạng thuốc đạn, với chất liên kết và chất mang truyền thống chẳng hạn như triglyxerit. Hợp phần dùng qua đường miệng có thể bao gồm các chất mang tiêu chuẩn chẳng hạn như các loại dùng cho dược phẩm của mannitol, lactoza, tinh bột, magie stearat, polyvinyl pyrolidon, natri sacarin, xenluloza, magie carbonat, v.v. Theo phương án ưu tiên rhGAA được dùng bằng cách truyền trong tĩnh mạch.

Hợp phần hoặc thuốc có thể được tạo hợp phần theo các quy trình thông thường dưới dạng dược phẩm được làm cho phù hợp để dùng cho người. Ví dụ, theo phương án ưu tiên, hợp phần để dùng trong tĩnh mạch là dung dịch trong chất đệm trong nước đẳng trương tiết trùng. Khi cần, hợp phần cũng có thể bao gồm chất làm hòa tan và chất gây tê cục bộ để làm giảm đau ở vị trí tiêm. Nhìn chung, các thành phần được cung cấp riêng rẽ hoặc được trộn cùng nhau trong hệ liều đơn vị, ví dụ, dưới dạng bột được làm đông lạnh khô hoặc chất cô không chứa nước trong vật chứa kín khí chẳng hạn như ampun hoặc túi xác định lượng hoạt chất. Khi hợp phần được dùng bằng cách truyền, nó có thể được làm phân tán bằng chai truyền có chứa nước, nước muối hoặc dextroza/nước loại dùng cho dược phẩm tiết trùng. Khi hợp phần được dùng bằng cách tiêm, ampun của nước tiết trùng để tiêm hoặc nước muối có thể được cung cấp sao cho các thành phần có thể được trộn trước khi sử dụng.

rhGAA có thể được tạo hợp phần dưới dạng dạng trung tính hoặc dạng muối. Muối được dùng bao gồm muối được tạo thành chứa nhóm amino tự do chẳng hạn như muối có nguồn gốc từ axit hydrocloric, axit phosphoric, axit axetic, axit oxalic, axit tartaric, v.v., và muối được tạo thành với các nhóm carboxyl tự do chẳng hạn như muối có nguồn gốc từ natri, kali, amoni, canxi, sắt hydroxit, isopropylamin, trietylamin, 2-etylamin ethanol, histidin, procain, v.v.

rhGAA (hoặc hợp phần hoặc thuốc có chứa GAA) được dùng theo đường dùng thích hợp. Theo một phương án, GAA được dùng trong tĩnh mạch. Theo phương án

khác, GAA được dùng bằng cách dùng trực tiếp cho mô đích, chẳng hạn như cho tim hoặc cơ xương (ví dụ, trong cơ), hoặc hệ thần kinh (ví dụ, tiêm trực tiếp vào não; trong não thất; nội tủy mạc). Có thể sử dụng hơn một đường dùng một cách đồng thời, nếu muốn.

rhGAA (hoặc hợp phần hoặc thuốc có chứa GAA) được dùng với lượng hữu hiệu để điều trị (ví dụ, liều lượng mà, khi dùng ở các khoảng thời gian đều đặn, đủ để điều trị bệnh, chẳng hạn như bằng cách cải thiện triệu chứng có liên quan đến bệnh, ngăn ngừa hoặc làm chậm sự khởi phát của bệnh, và/hoặc cũng như là làm yếu đi mức độ nghiêm trọng hoặc tần suất của triệu chứng của bệnh, như đã mô tả ở trên). Hàm lượng mà sẽ hữu hiệu để điều trị trong việc điều trị của bệnh sẽ phụ thuộc vào bản chất và phạm vi ảnh hưởng của bệnh, và có thể được xác định bằng các kỹ thuật lâm sàng tiêu chuẩn. Ngoài ra, các thử nghiệm *in vitro* hoặc *in vivo* có thể tùy ý được dùng để giúp xác định giới hạn liều lượng tối ưu. Liều lượng chính xác để sử dụng còn phụ thuộc vào đường dùng, và độ nghiêm trọng của bệnh, và phải được quyết định theo đánh giá của người thực hành và trường hợp của mỗi bệnh nhân. Liều hữu hiệu có thể được ngoại suy từ đường cong đáp ứng liều lượng có nguồn gốc từ hệ thử nghiệm *in vitro* hoặc hệ thử nghiệm mẫu động vật. Theo phương án ưu tiên, lượng hữu hiệu để điều trị bằng hoặc nhỏ hơn 20 mg enzym/kg khối lượng cơ thể của cá thể, tốt hơn là nằm trong khoảng từ khoảng 1 đến 10 mg enzym/kg khối lượng cơ thể, và tốt hơn nữa là khoảng 10 mg enzym/kg khối lượng cơ thể hoặc khoảng 5 mg enzym/kg khối lượng cơ thể. Liều hữu hiệu đối với cá thể cụ thể có thể được thay đổi (ví dụ, tăng hoặc giảm) theo thời gian, tùy thuộc vào nhu cầu của cá thể. Ví dụ, vào thời gian bị bệnh tụt về thể chất hoặc căng thẳng, hoặc nếu kháng thể kháng GAA có mặt hoặc tăng lên, hoặc nếu triệu chứng bệnh xấu đi, hàm lượng có thể được tăng lên.

Lượng hữu hiệu để điều trị của GAA (hoặc hợp phần hoặc thuốc có chứa GAA) được dùng vào các khoảng thời gian đều đặn, tùy thuộc vào bản chất và phạm vi ảnh hưởng của bệnh, và trên cơ sở xảy ra. Việc dùng ở "khoảng thời gian đều đặn," như được dùng trong bản mô tả này, dùng để chỉ việc lượng hữu hiệu để điều trị được dùng định kỳ (phân biệt với liều lượng dùng một lần). Khoảng thời gian có thể được xác định bằng các kỹ thuật lâm sàng tiêu chuẩn. Theo phương án ưu tiên, GAA được dùng hàng tháng, hai tháng một lần; hàng tuần; hai lần một tuần; hoặc hàng ngày. Khoảng

thời gian dùng đối với cá thể cụ thể không cần phải là khoảng thời gian cố định, mà có thể thay đổi theo thời gian, tùy thuộc vào nhu cầu của cá thể. Ví dụ, vào thời gian bệnh tật về thể chất hoặc căng thẳng, nếu kháng thể kháng GAA có mặt hoặc tăng lên, hoặc nếu triệu chứng bệnh xấu đi, khoảng thời gian giữa các liều lượng có thể được giảm đi. Theo một số phương án, lượng hữu hiệu để điều trị bằng 5, 10, 20, 50, 100, hoặc 200 mg enzym/kg khối lượng có thể được dùng hai lần một tuần, hàng tuần hoặc cách một tuần dùng một lần với hoặc không với chaperon.

GAA hoặc rhGAA theo sáng chế có thể được điều chế để sử dụng muôn, chẳng hạn như trong lọ hoặc ống tiêm liều đơn vị, hoặc trong chai hoặc túi để dùng trong tĩnh mạch. Bộ kit có chứa GAA hoặc rhGAA, cũng như là tá dược tùy chọn hoặc các thành phần hoạt tính khác, chẳng hạn như chaperon hoặc thuốc khác, có thể được bọc trong nguyên liệu bao gói và được thực hiện theo hướng dẫn để hoàn nguyên, pha loãng hoặc định liều để điều trị cho đối tượng cần điều trị, chẳng hạn như bệnh nhân mắc bệnh Pompe.

GAA (hoặc hợp phần hoặc thuốc có chứa GAA) có thể được dùng một mình, hoặc kết hợp với các chất khác, chẳng hạn như chaperon. rhGAA với mức độ glycosyl hóa khác nhau bằng mono-M6P hoặc bis-M6P có thể được dùng hoặc dạng kết hợp của các rhGAA với mức độ glycosylat hóa bằng M6P hoặc bisM6P khác nhau được sử dụng.

Theo một số phương án hợp phần rhGAA theo sáng chế được tạo phức hợp hoặc được phối trộn với chaperon, chẳng hạn như AT-2220 hoặc AT-2221. Chaperon, đôi khi được gọi là “chaperon được lý,” là hợp chất là khi được tạo phức hợp hoặc được đồng sử dụng với rhGAA làm cải biến được động học của nó và các tính chất được lý khác. Các chaperon đại diện được lấy ví dụ ở đây bao gồm AT2221 (miglustat, N-butyl-đeoxyojirimycin) và AT2220 (đuvoglustat HCl, 1-đeoxyojirimycin). Việc tạo phức hợp hoặc phối trộn này có thể diễn ra bên ngoài cơ thể hoặc bên trong cơ thể, ví dụ, ở nơi mà các liều riêng lẻ của rhGAA và chaperon được dùng. Ví dụ, việc hướng đích của rhGAA, các phân đoạn, hoặc dẫn xuất của nó theo sáng chế vào CIMPR và sau đó là vào lysosom tế bào có thể được cải thiện bằng cách kết hợp nó với đuvoglustat-HCl (AT2220, deoxyojirimycin, AT2220) hoặc miglustat (AT2221, N-butyl-đeoxyojirimycin). Các Ví dụ dưới đây cho thấy sự giảm

chất nền glycogen đáng kể trong các cơ xương then chốt của con chuột bất hoạt GAA tiếp nhận rhGAA được hướng đích tốt theo sáng chế kết hợp với chaperon.

Khía cạnh khác của sáng chế đề cập đến tế bào CHO hoặc dẫn xuất của chúng hoặc các dạng tương đương khác mà tạo ra rhGAA theo sáng chế. Một ví dụ về dòng tế bào CHO này là GA-ATB-200 hoặc môi trường nuôi cấy cấp hai của chúng mà tạo ra hợp phần rhGAA như được mô tả trong bản mô tả này. Các dòng tế bào CHO này có thể có chứa nhiều bản sao của gen, chẳng hạn như 5, 10, 15, hoặc 20 hoặc nhiều hơn bản sao, của polynucleotit mã hóa cho GAA.

rhGAA M6P và bis-M6P cao theo sáng chế, chẳng hạn như rhGAA ATB-200, có thể được sản xuất bằng cách biến nạp tế bào CHO (trứng chuột đồng Trung Quốc tế bào) bằng cấu trúc ADN mà mã hóa cho GAA. Trong khi tế bào CHO đã được sử dụng để tạo ra rhGAA, rõ ràng rằng tế bào CHO đã được chuyển nạp có thể được nuôi cấy và được chọn lọc theo cách sẽ tạo ra rhGAA có hàm lượng cao của glycan M6P và bis-M6P mà hướng đích CIMPR.

Đáng ngạc nhiên là, các tác giả sáng chế phát hiện ra rằng có thể biến nạp dòng tế bào CHO, chọn lọc thể biến nạp mà tạo ra rhGAA có chứa hàm lượng cao của glycan mang M6P hoặc bis-M6P mà hướng đích CIMPR, và biểu hiện ổn định rhGAA M6P cao này. Do đó, khía cạnh liên quan của sáng chế đề cập đến phương pháp tạo ra các dòng tế bào CHO này. Phương pháp này bao gồm bước biến nạp tế bào CHO bằng ADN mã hóa cho GAA hoặc biến thể GAA, chọn lọc tế bào CHO mà kết hợp ổn định ADN mã hóa cho GAA vào (các) nhiễm sắc thể của nó và biểu hiện ổn định GAA, và chọn lọc tế bào CHO mà biểu hiện GAA có hàm lượng cao của glycan mang M6P hoặc bis-M6P, và, tùy ý, chọn lọc tế bào CHO có N-glycan có hàm lượng axit sialic cao và/hoặc có N-glycan có hàm lượng mannoza cao không được phosphoryl hóa thấp. Các dòng tế bào CHO này có thể được dùng để tạo ra rhGAA và hợp phần rhGAA theo sáng chế bằng cách nuôi cấy dòng tế bào CHO và thu hồi hợp phần này từ môi trường nuôi cấy tế bào CHO.

Hợp phần rhGAA theo sáng chế hoặc các phân đoạn hoặc dẫn xuất của nó được dùng theo cách có lợi để điều trị cho đối tượng mắc tình trạng bệnh, rối loạn hoặc bệnh có liên quan đến GAA lysosom không đủ bằng cách dùng hợp phần rhGAA. Đối tượng cần điều trị bao gồm đối tượng mắc bệnh dự trữ glycogen typ II (bệnh Pompe)

cũng như là các tình trạng bệnh, rối loạn hoặc bệnh khác mà sẽ hưởng lợi từ việc dùng rhGAA.

Các Ví dụ dưới đây cho thấy rằng rhGAA theo sáng chế (ATB-200) được hấp thụ bởi tế bào cơ xương, liên kết với CIMPR và loại bỏ một cách hiệu quả glycogen khỏi tế bào cơ xương khi được dùng ở liều lượng thấp hơn đáng kể so với các sản phẩm rhGAA thông thường. Sự giảm đi lên đến 75% của glycogen trong nguyên bào cơ xương đạt được ở con chuột bất hoạt GAA bằng cách dùng trong tĩnh mạch ATB-200 theo chế độ hai tuần một lần. Sự giảm đi này vượt quá sự giảm đi tạo ra bởi cùng lượng Lumizyme® cho thấy rằng rhGAA theo sáng chế, mà có hàm lượng tăng lên của N-glycan mang M6P và bis-M6P, mang lại sự giảm tốt hơn của chất nền glycogen. Do sự hướng đích được cải thiện, dược lực học và dược động học của hợp phần rhGAA theo sáng chế có thể được dùng ở liều lượng thấp hơn so với các sản phẩm rhGAA thông thường chẳng hạn như Lumizyme® hoặc Myozyme®.

Nó có thể được sử dụng để phân hủy, làm giảm hoặc loại bỏ glycogen khỏi cơ tim, cơ trơn, hoặc cơ vân. Ví dụ về cơ xương hoặc cơ vân cần được điều trị bao gồm ít nhất một cơ được chọn từ nhóm gồm có cơ giạng ngón chân út (chân), cơ giạng ngón tay út (tay), cơ giạng ngón chân cái, cơ giạng ngắn ngón tay cái, cơ giạng dài ngón tay cái, cơ khép ngắn, cơ khép ngón chân cái, cơ khép dài, cơ khép lớn, cơ khép ngón tay cái, cơ khuỷu tay, cơ khớp xương trụ, cơ khớp gối, cơ phễu-nấp thanh quản, cơ aryjordanicus, cơ tai, cơ hai đầu cánh tay, cơ hai đầu đùi, cơ cánh tay, cơ cánh tay quay, cơ mút, cơ hành xấp, cơ khít hầu dưới, cơ khít hầu giữa, cơ khít hầu trên, cơ qua cánh tay, cơ nhãn lông mày, cơ bùi, cơ sụn nhãn-giáp, cơ trơn bùi, cơ ngang sâu đáy chậu, cơ delta, cơ hạ góc miệng, cơ hạ môi dưới, cơ hoành, cơ hai thân, cơ hai thân (nhìn từ phía trước), cơ dựng cột sống, cơ dựng cột sống-xương chậu-sườn, cơ dựng cột sống-lưng dài, cơ duỗi cổ tay quay ngắn, cơ duỗi cổ tay quay dài, cơ duỗi cổ tay trụ, cơ duỗi ngón tay út (tay), cơ duỗi các ngón tay (tay), cơ duỗi ngắn các ngón chân (chân), cơ duỗi dài các ngón chân (chân), cơ duỗi dài ngón chân cái, cơ duỗi ngón trở, cơ duỗi ngắn ngón tay cái, cơ duỗi dài ngón tay cái, cơ bụng chéo ngoài, cơ gấp cổ tay quay, cơ gấp cổ tay trụ, cơ gấp ngắn ngón chân út (chân), cơ gấp ngắn ngón tay út (tay), cơ gấp ngắn các ngón chân, cơ gấp dài các ngón chân (chân), cơ gấp sâu các ngón, cơ gấp nông các ngón, cơ gấp ngắn ngón chân cái, cơ gấp dài ngón chân cái, cơ

gấp ngắn ngón tay cái, cơ gấp dài ngón tay cái, cơ trán, cơ sinh đôi căng chân, cơ sinh đôi dưới, cơ sinh đôi trên, cơ cằm-lưỡi, cơ cằm xương móng, cơ mông lớn, cơ mông nhỏ, cơ mông nhỏ, cơ khép móng, cơ móng lưỡi, cơ chậu, cơ chéo dưới, cơ thẳng dưới, cơ dưới gai, cơ gian sườn ngoài, cơ gian sườn trong cùng, cơ gian sườn trong, cơ bụng chéo trong, cơ gian cốt mu bàn tay, cơ gian cốt mu bàn chân, cơ gian cốt gan bàn tay, cơ gian cốt gan bàn chân, cơ gian gai, cơ gian mỏm ngang, cơ nội tại của lưỡi, cơ ngồi-hang, cơ nhãn-sụn phễu bên, cơ chân bướm ngoài, cơ thẳng bên, cơ lưng rộng, cơ nâng góc miệng, cơ nâng hậu môn-xương cụt, cơ nâng hậu môn-xương chậu-cụt, cơ nâng hậu môn-mu cụt, cơ nâng hậu môn-mu trực tràng, cơ nâng hậu môn-mu âm đạo, cơ nâng môi trên, cơ nâng môi trên, cơ cánh mũi, cơ nâng mí mắt trên, cơ nâng xương vai, cơ nâng màn hầu khẩu cái, cơ nâng sườn, cơ dài đầu, cơ dài cổ, cơ giãn chân (4), cơ giãn bàn tay, cơ cắn, cơ chân bướm trong, cơ thẳng giữa, cơ cằm, cơ lưỡi gà, cơ hàm móng, cơ mũi, cơ sụn phễu chéo, cơ chéo đầu dưới, cơ chéo đầu trên, cơ bịt ngoài, cơ bịt trong (A), cơ bịt trong (B), cơ vai-móng, cơ đối ngón tay út (tay), cơ đối ngón tay cái, cơ vòng mi, cơ vòng môi, cơ vòm-miệng-lưỡi, cơ vòm miệng-hầu, cơ gan bàn tay bé, cơ gan bàn tay dài, cơ lược, cơ ngực lớn, cơ ngực nhỏ, cơ mác ngắn, cơ mác dài, cơ mác ba, cơ hình lê (A), cơ hình lê (B), cơ gan bàn chân, cơ da cổ, cơ kheo, cơ nhãn-sụn phễu sau, cơ tháp mũi, cơ sắp vuông, cơ sắp tròn, cơ thắt lưng lớn, cơ thắt lưng bé, cơ tháp, cơ vuông đùi, cơ vuông thắt lưng, cơ vuông gan chân, cơ thẳng bụng, cơ thẳng đầu trước, cơ thẳng đầu ngoài, cơ thẳng đầu sau to, cơ thẳng đầu sau bé, cơ thẳng đùi, cơ trám lớn, cơ trám bé, cơ cười, cơ vòm nhĩ-họng, cơ may, cơ bậc thang trước, cơ bậc thang giữa, cơ bậc thang bé, cơ bậc thang sau, cơ bán mạc, cơ bán gân, cơ răng cửa trước, cơ răng cửa bé sau dưới, cơ răng cửa bé sau trên, cơ dép, cơ thắt hậu môn, cơ thắt niệu đạo, cơ gối đầu, cơ gối cổ, cơ bàn đạp, cơ ức đòn-chũm, cơ ức móng, cơ ức-giáp, cơ trâm-lưỡi, cơ trâm-móng, cơ trâm-móng (nhìn từ phía trước), cơ trâm-hầu, cơ dưới đòn, cơ hạ sườn, cơ dưới xương bả vai, cơ ngang nông, cơ đáy chậu, cơ chéo trên, cơ thẳng trên, cơ ngựa ngắn, cơ trên mỏm gai, cơ thái dương, cơ thái dương đỉnh, cơ căng cân đùi, cơ căng màng nhĩ, cơ căng màn hầu khẩu cái, cơ tròn to, cơ tròn nhỏ, cơ tuyến giáp-sụn nhãn & thanh âm, cơ tuyến giáp-nấp thanh quản, cơ giáp-xương móng, cơ chày trước, cơ chày sau, cơ liên phễu, cơ ngang gai sống xẻ nhiều nhánh, cơ ngang gai sống xoay, cơ ngang gai sống bán gai, cơ bụng

ngang, cơ ngang ngực, cơ hình thang, cơ ba đầu, cơ trung gian rộng, cơ bên rộng, cơ giữa rộng, cơ gò má lớn, và cơ gò má nhỏ.

Hợp phần GAA theo sáng chế cũng có thể được dùng, hoặc được sử dụng để điều trị sợi cơ loại 1 (co rút chậm) hoặc sợi cơ loại 2 (co rút nhanh) hoặc các đối tượng tích trữ glycogen trong các sợi cơ như vậy. Cơ loại I, co rút chậm, hoặc "đỏ" dày đặc mao quản và giàu ty thể và myoglobin, làm cho mô cơ đặc trưng bởi màu đỏ. Nó có thể mang nhiều oxy hơn và duy trì hoạt động ưa khí sử dụng chất béo hoặc carbohydrat làm nhiên liệu. Sợi cơ rút chậm co trong khoảng thời gian dài nhưng với lực nhỏ. Cơ loại II, co rút nhanh, có ba loại phụ chính (IIa, IIx, và IIb) khác nhau cả về tốc độ co và lực được tạo ra. Sợi cơ rút nhanh co nhanh và mạnh nhưng mỏi rất nhanh, chỉ duy trì được sự gắng sức hoạt động ngắn, kỵ khí trước khi sự co cơ trở nên đau. Chúng hầu như góp phần vào độ bền cơ và có khả năng tăng khối lượng lớn hơn. Loại IIb là cơ kỵ khí, thủy phân glycogen, "trắng" ít ty thể và myoglobin nhất. Ở các động vật nhỏ bé (ví dụ, động vật gặm nhấm) đây là loại cơ nhanh chính, điều này lý giải tại sao thịt của chúng lại có màu nhợt nhạt.

Hợp phần rhGAA theo sáng chế, phần hoặc dẫn xuất của nó có thể được sử dụng toàn thân, ví dụ, bằng cách truyền trong tĩnh mạch (IV), hoặc được sử dụng trực tiếp ở vị trí mong muốn, như trong cơ tim hoặc cơ xương, như cơ bốn đầu, cơ ba đầu, hoặc cơ hoành. Nó có thể được sử dụng cho tế bào cơ, mô cơ, cơ, hoặc nhóm cơ cụ thể. Ví dụ, việc điều trị như vậy có thể sử dụng trong cơ hợp phần rhGAA trực tiếp vào cơ bốn đầu hoặc cơ ba đầu hoặc cơ hoành của đối tượng.

Như được đề cập trên đây, hợp phần rhGAA theo sáng chế, phần hoặc dẫn xuất của nó có thể được tạo phức hoặc được trộn với chaperon, như AT-2220 (Duvoglustat HCl, 1-Deoxynojirimyxin) hoặc AT-2221 (Miglustat, N-butyl-đeoxyojirimyxin) hoặc muối của chúng để cải thiện động học của việc sử dụng rhGAA. rhGAA và chaperon có thể được sử dụng cùng nhau hoặc riêng rẽ. Khi được sử dụng đồng thời, GAA trong hợp phần có thể được nạp trước với chaperon. Theo cách khác, GAA và chaperon có thể được sử dụng riêng rẽ đồng thời hoặc tại các thời điểm khác nhau.

Các liều lượng AT2221 tiêu biểu nằm trong khoảng từ 0,25 đến 400 mg/kg, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 0,5-200 mg/kg, và tốt nhất là nằm trong khoảng từ 2 đến 50 mg/kg. Các liều lượng AT2221 cụ thể bao gồm 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35,

40, 45 và 50 mg/kg. Các liều lượng này có thể được kết hợp với rhGAA, như rhGAA ATB-200, ở tỷ lệ mol của AT2221 so với rhGAA nằm trong khoảng từ 15: 1 đến 150: 1. Các tỷ lệ cụ thể bao gồm 15:1, 20:1, 25:1, 50:1, 60: 1, 65:1, 70:1, 75:1, 80:1, 85:1, 90: 1, 100:1, 125:1, and 150:1. rhGAA và AT2221 có thể được đồng sử dụng với các lượng hoặc tỷ lệ mol này đồng thời, lần lượt hoặc riêng rẽ. Các khoảng nêu trên bao gồm tất cả các khoảng phụ và giá trị ở giữa, như tất cả các giá trị số nguyên nằm giữa các điểm đầu nút của khoảng.

Các khoảng AT2220 tiêu biểu nằm trong khoảng từ 0,1 đến 120 mg/kg, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 0,25 đến 60, và tốt nhất là nằm trong khoảng từ 0,6 đến 15 mg/kg. Liều lượng AT2220 cụ thể bao gồm 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 và 30 mg/kg. Các liều lượng này có thể được kết hợp với rhGAA, như rhGAA ATB-200, ở tỷ lệ mol của AT2220 so với rhGAA nằm trong khoảng từ 15 : 1 đến 150: 1. Các tỷ lệ cụ thể bao gồm 15:1, 20: 125:1, 50:1, 60: 1, 65:1, 70:1, 75:1, 80:1, 85:1, 90: 1, 100:1, 125:1, và 150:1. rhGAA và AT2220 có thể được đồng sử dụng với với các lượng hoặc tỷ lệ mol này đồng thời, lần lượt hoặc riêng rẽ. Các khoảng nêu trên bao gồm tất cả các khoảng phụ và giá trị ở giữa, như tất cả các giá trị số nguyên nằm giữa các điểm đầu nút của khoảng.

Hợp phần rhGAA theo sáng chế, phần hoặc dẫn xuất của nó cũng có thể được sử dụng để chuyển hóa, phân hủy, loại bỏ hoặc theo cách khác làm giảm glycogen trong mô, cơ, sợi cơ, tế bào cơ, lysosom, cơ quan tế bào, ngăn tế bào, hoặc bào chất. Bằng cách sử dụng hợp phần rhGAA cho đối tượng, tùy ý cùng với chaperon hoặc thuốc làm giảm đáp ứng miễn dịch đối với rhGAA.

Theo phương án khác của phương pháp sử dụng nó, rhGAA theo sáng chế có thể được sử dụng để điều biến sự tăng sinh lysosom, sự tự tiêu, hoặc sự xuất bào, trong tế bào bằng cách sử dụng nó, các phần hoặc các dẫn xuất của nó cho tế bào, mô, hoặc đối tượng cần sự điều biến này, tùy ý kết hợp với chaperon hoặc tùy ý dưới dạng thể liên hợp với gốc hướng đích khác. Sự tự tiêu là cơ chế dị hóa cho phép tế bào phân hủy glycogen hoặc các thành phần tế bào loạn chức năng hoặc không cần thiết khác thông qua tác động của lysosom của nó. Phương pháp này cũng có thể bao gồm việc sử dụng toàn thân hoặc cục bộ hợp phần GAA cho đối tượng cần điều trị.

rhGAA theo sáng chế, được làm giàu mono-M6P và bis-M6P, so với Lumizyme® và Myozyme, và có các tính chất động học có lợi do kiểu glycosyl hóa của nó đem lại cũng có thể được sử dụng để điều trị các tình trạng bệnh lý khác đòi hỏi sự phá vỡ các carbohydrate phức tạp, như các rối loạn khác trong đó glycogen hoặc các carbohydrate khác được phân hủy bởi rhGAA tích lũy trong lysosom hoặc các phần khác của tế bào, như trong bào chất có thể tiếp cận với rhGAA, như bệnh tích trữ glycogen III. Nó cũng có thể được sử dụng cho mục đích không nhằm chữa bệnh, như để sản xuất thực phẩm, đồ uống, hóa chất và sản phẩm được đòi hỏi phá vỡ các carbohydrate phức tạp như tinh bột và glycogen thành các monome của nó.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Các ví dụ không làm giới hạn sáng chế sau đây nhằm minh họa các khía cạnh của sáng chế.

Phần I: rhGAA ATB-200 và các tính chất của nó

Các hạn chế của sản phẩm Myozyme® và Lumizyme® rhGAA hiện có

Để đánh giá khả năng của rhGAA trong Myozyme® và Lumizyme®, các phương pháp điều trị duy nhất được phê chuẩn hiện nay cho bệnh Pompe, các hợp phần rhGAA này được truyền vào cột CIMPR (mà liên kết với rhGAA có nhóm M6P) và sau đó rửa giải bằng gradien M6 tự do. Thu gom các phân đoạn trong đĩa có 96 giếng và thử nghiệm hoạt tính GAA bằng cơ chất 4MU- α -glucoza. Xác định các lượng tương đối của rhGAA đã được liên kết và chưa được liên kết dựa trên hoạt tính GAA và báo cáo dưới dạng phần của enzym tổng.

Hình 5 mô tả các vấn đề có liên quan đến các ERT thông thường (Myozyme® và Lumizyme®): 73% rhGAA trong Myozyme® (Hình 5B) và 78% rhGAA trong Lumizyme® (Hình 5A) không liên kết với CIMPR, xem các đỉnh ngoài cùng bên trái trên mỗi hình vẽ. Chỉ có 27% rhGAA trong Myozyme® và 22% rhGAA trong Lumizyme® chứa M6P mà có thể hướng đích hiệu quả nó đến CIMPR trên tế bào cơ, xem Hình 2 mô tả sự hướng đích thuốc hiệu quả và sự thanh thải thuốc không hiệu quả.

Liều hiệu quả của Myozyme® và Lumizyme® tương ứng với lượng rhGAA chứa M6P mà hướng đích CIMPR trên tế bào cơ. Tuy nhiên, hầu hết rhGAA trong hai sản phẩm thông thường này không hướng đích thụ thể CIMPR trên tế bào cơ đích. Việc sử dụng rhGAA thông thường, trong đó hầu hết rhGAA không được hướng đích đến tế bào cơ, làm tăng nguy cơ phản ứng dị ứng hoặc sự kích thích tính miễn dịch đối với rhGAA không được hướng đích.

Chuẩn bị tế bào CHO sản xuất rhGAA ATB-200 có hàm lượng N-glycan mangmono- hoặc bis-M6P cao.

Chuyển nạp các tế bào CHO bằng ADN biểu hiện rh-GAA sau đó chọn lọc các thể biến nạp sản xuất rhGAA. Cấu trúc ADN để biến nạp tế bào CHO với ADN mã hóa rh-GAA được thể hiện trên Hình 5. Chuyển nạp các tế bào CHO bằng ADN biểu hiện rh-GAA sau đó chọn lọc các thể biến nạp sản xuất rhGAA.

Sau khi chuyển nạp, các tế bào DG44 CHO (DHFR-) có chứa gen GAA được tích hợp ổn định được chọn lọc bằng môi trường thiếu hụt hypoxanthin/thymidin (-HT). Khuếch đại sự biểu hiện GAA trong các tế bào này bằng cách xử lý bằng methotrexat (MTX, 500 nM). Nhận diện nhóm tế bào biểu hiện lượng lớn GAA bằng thử nghiệm hoạt tính enzym GAA và sử dụng chúng để thiết lập các dòng vô tính riêng rẽ sản xuất rhGAA. Tạo ra các dòng vô tính riêng rẽ trên đĩa môi trường bán rắn, lựa chọn bằng hệ ClonePix, và chuyển đến đĩa có 24 giếng sâu. Thử nghiệm các dòng vô tính riêng rẽ về hoạt tính enzym GAA để nhận diện các dòng vô tính biểu hiện mức cao GAA. Các môi trường có điều kiện để xác định hoạt tính GAA sử dụng cơ chất 4-MU- α -Glucosidaza. Các dòng vô tính sản xuất mức GAA cao hơn như được xác định bởi thử nghiệm enzym GAA được đánh giá tiếp về khả năng sống sót, khả năng sinh trưởng, hiệu suất GAA, cấu trúc N-glycan và sự biểu hiện ổn định protein. Phân lập các dòng tế bào CHO bao gồm dòng tế bào CHO GA-ATB-200, biểu hiện rhGAA với N-glycan được tăng cường mono-M6P hoặc bis-M6P bằng cách sử dụng quy trình này.

Tinh chế rhGAA rhGAA ATB-200

Sản xuất nhiều mẻ rhGAA theo sáng chế trong bình lắc và trong thiết bị phản ứng sinh học truyền dịch sử dụng dòng tế bào CHO GA-ATB-200 và xác định sự liên kết CIMPR. Thụ thể CIMPR tương tự liên kết (~70%) với nó được thể hiện trên Hình 6B và Hình 7 được quan sát về rhGAA ATB-200 đã được tinh chế từ các mẻ sản xuất

khác nhau, cho thấy rằng rhGAA ATB-200 có thể được sản xuất một cách đồng đều. Như thể hiện trên các Hình 6A và 6B, rhGAA Myozyme® và rhGAA Lumizyme® thể hiện sự liên kết CIMPR ít hơn một cách đáng kể so với rhGAA ATB-200.

So sánh phân tích ATB-200 so với Lumizyme

Sử dụng sắc ký lỏng trao đổi ion yếu ("WAX") để phân đoạn rhGAA ATB-200 theo phosphat đầu tận cùng. Tạo ra biên dạng rửa giải bằng cách rửa giải ERT bằng lượng muối tăng dần. Theo dõi biên dạng này bằng UV (A280nm). rhGAA ATB-200 thu được từ tế bào CHO và được tinh chế. Lumizyme® thu được từ nguồn thương mại. Lumizyme® thể hiện đỉnh cao ở bên trái biên dạng rửa giải của nó. rhGAA ATB-200 thể hiện bốn đỉnh nổi bật rửa giải ở bên phải của Lumizyme® (Hình 8). Điều này xác nhận rằng rhGAA ATB-200 được phosphoryl hóa đến mức độ lớn hơn so với Lumizyme® vì sự đánh giá này là bằng điện tích đầu tận hơn là ái lực CIMPR.

Xác định đặc điểm oligosacarit của rhGAA ATB-200

Đánh giá glycan rhGAA ATB-200 đã được tinh chế và glycan Lumizyme® bằng MALDI-TOF để xác định các cấu trúc glycan riêng rẽ được tìm thấy trên mỗi ERT (Hình 9). Các mẫu ATB-200 được phát hiện thấy là chứa lượng N-glycan có hàm lượng mannoza cao không được phosphoryl hóa thấp hơn không đáng kể so với Lumizyme®. Hàm lượng của M6P glycan trong ATB-200 cao hơn trong Lumizyme, hướng đích rhGAA ATB-200 vào tế bào cơ hiệu quả hơn. Tỷ lệ phần trăm cao của cấu trúc mono-phosphoryl hóa và bis-phosphoryl hóa được xác định bởi MALDI là phù hợp với biên dạng CIMPR, biên dạng này minh họa sự liên kết cao hơn một cách đáng kể của ATB-200 với thụ thể CIMPR. Phân tích N-glycan thông qua phép đo khối phổ MALDI-TOF xác nhận rằng trung bình mỗi phân tử ATB200 chứa ít nhất một cấu trúc bis-M6P N-glycan tự nhiên. Hàm lượng bis-M6P N-glycan trên rhGAA ATB-200 cao hơn này có liên quan trực tiếp với sự liên kết ái lực cao với CIMPR trong thử nghiệm liên kết đĩa thụ thể M6P (K_D khoảng 2-4 nM) Hình 10A.

Xác định đặc điểm ái lực CIMPR của ATB-200

Ngoài việc có tỷ lệ phần trăm rhGAA có thể liên kết với CIMPR cao hơn, điều quan trọng là phải hiểu được đặc tính của tương tác đó. Tiến hành xác định sự liên kết thụ thể Lumizyme® và ATB200 rhGAA bằng cách sử dụng thử nghiệm liên kết đĩa

CIMPR. Nói một cách ngắn gọn, sử dụng các đĩa được phủ CIMPR để bắt giữ GAA. Áp dụng các nồng độ khác nhau của rhGAA cho thụ thể đã được cố định và rửa rhGAA không được liên kết. Xác định lượng rhGAA còn lại bằng hoạt tính GAA. Như được thể hiện trên Hình 10A, rhGAA ATB-200 liên kết với CIMPR tốt hơn một cách đáng kể so với Lumizyme.

Hình 10B thể hiện hàm lượng tương đối của bis-M6P glycan trong Lumizyme, rhGAA thông thường, và ATB-200 theo sáng chế. Đối với Lumizyme®, trung bình chỉ có 10% phân tử có glycan được bis-phosphoryl hóa. Điều này trái với ATB-200, trong đó trung bình mỗi phân tử rhGAA có ít nhất một glycan được bis-phosphoryl hóa.

rhGAA ATB-200 được hấp thụ bởi nguyên bào sợi một cách hiệu quả hơn so với Lumizyme.

So sánh sự hấp thụ tế bào tương đối của ATB-200 và Lumizyme® rhGAA bằng cách sử dụng dòng tế bào nguyên bào sợi bình thường và dòng tế bào nguyên bào sợi Pompe. Các so sánh bao gồm 5-100 nM rhGAA ATB-200 theo sáng chế với 10-500 nM rhGAA Lumizyme® thông thường. Sau khi ủ trong 16 giờ, làm bất hoạt rhGAA ngoài bằng bazơ TRIS và rửa các tế bào 3 lần bằng PBS trước khi thu hoạch. Xác định GAA đã được hấp thụ bằng sự thủy phân 4MU- α -Glucosid và vẽ đồ thị so với protein tổng cộng trong tế bào và các kết quả được thể hiện trên Hình 11.

rhGAA ATB-200 cũng được phát hiện thấy là được hấp thụ một cách hiệu quả vào tế bào (Hình 11A và Hình 11B), một cách tương ứng, cho thấy rằng rhGAA ATB-200 được hấp thụ vào cả tế bào nguyên bào sợi bình thường và tế bào nguyên bào sợi Pompe và nó được hấp thụ ở mức độ lớn hơn so với rhGAA Lumizyme® thông thường. rhGAA ATB-200 làm bão hòa thụ thể tế bào ở nồng độ khoảng 20 nM, trong khi cần khoảng 250 nM Lumizyme®. Hằng số hiệu quả hấp thụ ($K_{\text{hấp thụ}}$) được ngoại suy từ các kết quả này là 2-3 nM đối với ATB-200 và 56 nM đối với Lumizyme® như được thể hiện trên Hình 11C. Các kết quả này gợi ý rằng rhGAA ATB-200 là biện pháp điều trị được hướng đích tốt đối với bệnh Pompe.

Phần II: Các nghiên cứu tiền lâm sàng

rhGAA ATB-200 với sự glycosyl hóa tốt hơn thể hiện sự thanh thải glycogen trong cơ xương của chuột KO GAA tốt hơn một cách đáng kể so với tiêu chuẩn chăm sóc ERT.

Như được giải thích trên đây, liệu pháp thay thế enzym (ERT) sử dụng GAA tái tổ hợp của người (rhGAA) là phương pháp điều trị duy nhất được phê chuẩn sẵn có hiện nay đối với bệnh Pompe. ERT này đòi hỏi hydro cacbon chuyên dụng mannoza 6-phosphat (M6P) cho sự hấp thụ tế bào và sự phân phối tiếp theo đến lysosom thông qua thụ thể M6P không phụ thuộc cation bề mặt tế bào (CIMPR). Tuy nhiên, ERT rhGAA hiện nay chứa lượng M6P thấp, điều này hạn chế sự hướng đích và công hiệu của thuốc trong các mô liên quan đến bệnh. Các tác giả sáng chế đã phát triển dòng tế bào sản xuất và quy trình sản xuất tạo ra rhGAA (được ký hiệu là rhGAA ATB-200) với sự glycosyl hóa tốt hơn và hàm lượng M6P cao hơn so với rhGAA thông thường, cụ thể là cấu trúc bis-M6P N-glycan ái lực cao, để cải thiện sự hướng đích của thuốc. rhGAA ATB-200 liên kết với CI-MPR với ái lực cao ($KD \sim 2-4$ nM) và được hấp thụ một cách hiệu quả bởi nguyên bào sợi Pompe và nguyên bào cơ của cơ xương ($K_{\text{hấp thụ}} \sim 7-14$ nM).

rhGAA ATB-200 thanh thải glycogen tốt hơn một cách đáng kể so với Lumizyme® trong cơ xương. Tiến hành đánh giá hiệu quả của việc sử dụng Lumizyme® và rhGAA ATB-200 đối với sự thanh thải glycogen ở các con chuột KO GAA. Cho các con vật dùng hai lần tiêm liều lớn IV (cách tuần); thu hoạch mô hai tuần sau liều cuối cùng và phân tích hoạt tính GAA và hàm lượng glycogen (Hình 12). rhGAA ATB-200 và Lumizyme® rhGAA có hiệu quả thanh thải glycogen trong tim bằng nhau (Hình 12A). Như được thể hiện trên Hình 12B và Hình 12C, rhGAA ATB-200 ở nồng độ 5 mg/kg làm giảm glycogen trong cơ xương tương đương với rhGAA Lumizyme® ở nồng độ 20 mg/kg; ATB-200 được định liều ở nồng độ 10 và 20 mg/kg làm thanh thải glycogen trong cơ xương tốt hơn một cách đáng kể so với Lumizyme®;

Cơ sở hợp lý của việc đồng sử dụng rhGAA ATB-200 với AT2221 (Kỹ thuật CHART)

Chaperon liên kết với và làm ổn định rhGAA ERT, làm tăng sự hấp thụ enzym hoạt tính vào mô, cải thiện tính dung nạp và có khả năng làm giảm tính sinh miễn dịch. Như được thể hiện trên đây, độ ổn định protein của ERT trong các điều kiện không

thuận lợi được cải thiện đáng kể bằng cách sử dụng CHART™. CHART: CHART: liệu pháp thay thế tiên tiến-chaperon, xem http://_www.amicusrx.com/chaperone.aspx (truy cập cuối cùng ngày 22 tháng 9 năm 2015), trang web này được đưa vào bản mô tả này để tham khảo. Như thể hiện trên Hình 13A và Hình 13B, độ ổn định của ATB-200 được cải thiện một cách đáng kể bởi AT2221 (Miglustat, N-butyl-deoxynojirimycin). Sự cuộn gập của protein rhGAA được theo dõi ở nhiệt độ 37°C bằng sự biến tính bằng nhiệt trong chất đệm trung hòa (độ pH 7,4 - môi trường huyết tương) hoặc chất đệm axit (độ pH 5,2 - môi trường lysosom). AT2220 làm ổn định protein rhGAA trong chất đệm có độ pH trung hòa trong 24 giờ.

Việc đồng sử dụng Myozyme® với AT2221 (Miglustat) so với việc đồng sử dụng rhGAA ATB-200 với Miglustat

Xử lý các con chuột KO GAA mười hai tuần tuổi bằng Lumizyme® hoặc ATB200, 4 lần tiêm IV 20 mg/kg cách tuần; Miglustat được đồng sử dụng ở nồng độ 10 mg/kg PO, 30 phút trước rhGAA như đã được biểu thị. Thu gom mô 14 ngày sau liệu enzyme cuối cùng để xác định glycogen. Hình 14 thể hiện sự giảm tương đối của glycogen trong cơ xương bốn đầu và cơ xương ba đầu.

Sự giảm glycogen trong mô bằng rhGAA ATB-200 được đồng sử dụng với chaperon được lý AT2221 (Miglustat).

Hỗn hợp của chaperon được lý và rhGAA ATB-200 được thấy là tăng cường sự thanh thải glycogen *in vivo*. Cho các con chuột KO GAA dùng hai lần tiêm liều lớn IV rhGAA ở liều lượng bằng 20 mg/kg cách tuần. Chaperon được lý AT2221 được sử dụng qua đường miệng 30 phút trước rhGAA ở liều lượng bằng 0, 1, 2 và 10 mg/kg. Thu hoạch mô hai tuần sau liều cuối cùng của ERT và phân tích hoạt tính GAA, hàm lượng glycogen, sự tăng sinh lysosom và glycogen đặc hiệu tế bào.

Như được thể hiện trên Hình 15, các con vật nhận được ATB200+ chaperon AT2221 thể hiện sự thanh thải glycogen khỏi cơ bốn đầu được tăng cường. rhGAA ATB-200 (20 mg/kg) làm giảm glycogen nhiều hơn so với liều Lumizyme® giống như vậy và khi rhGAA ATB-200 được kết hợp với 10 mg/kg AT2220, mức glycogen trong cơ đạt được gần mức bình thường.

Như thể hiện trên Hình 16A và Hình 16B, không giống như rhGAA thông thể hiện sự giảm glycogen hạn chế (được biểu thị bởi tín hiệu PAS đậm dư), một mình rhGAA ATB-200 cho thấy sự giảm đáng kể tín hiệu PAS. Việc đồng sử dụng với 10 mg/kg miglustat dẫn đến sự giảm thêm đáng kể cơ chất. TEM cho thấy rằng phần lớn glycogen trong lysosom là ở dạng nguyên liệu được liên kết màng, dày đặc electron, điều này tương ứng với tín hiệu PAS đậm. Việc đồng sử dụng rhGAA ATB-200 với miglustat, làm giảm số lượng, kích thước và mật độ của lysosom chứa cơ chất, điều này gợi ý sự phân phối được hướng đích của rhGAA ATB-200 đến tế bào cơ và sự phân phối tiếp theo đến lysosom.

Từ nghiên cứu (2 lần tiêm liều lớn IV cách tuần) được thể hiện trên đây, mô được xử lý về sự tăng sinh lysosom bằng cách sử dụng gen đánh dấu LAMP 1, việc điều hòa tăng là dấu hiệu phân biệt khác của bệnh Pompe. LAMP: protein màng có liên quan đến lysosom. Từ nghiên cứu (2 lần tiêm liều lớn IV EOW) được thể hiện trên đây, mô cơ dếp được xử lý để nhuộm màu LAMP 1 trong các phần liên kề và kháng thể đặc hiệu sợi loại I (NOQ7.5.4D) trong các phần liên kề Hình (16C và 16D) rhGAA ATB-200 dẫn đến sự giảm LAMP1 nhiều hơn một cách đáng kể so với rhGAA thông thường, với sự giảm dẫn đến mức được thấy ở các con vật WT (Hình 16C).

Ngoài ra, không giống như rhGAA, trong đó hiệu quả hầu hết bị giới hạn ở sợi loại I (co rút chậm, được đánh dấu bằng dấu hoa thị), rhGAA ATB-200 cũng dẫn đến sự giảm đáng kể tín hiệu LAMP1 trong phần sợi loại II (co rút nhanh) (đầu mũi tên đỏ) (Hình 16D). Điều quan trọng là, việc đồng sử dụng với miglustat còn cải thiện sự giảm tăng sinh LAMP1 trong phần lớn sợi loại II được điều tiết bởi ATB-200 (Hình 16C và Hình 16D). Kết quả là, không có sự khác biệt đáng kể mức tín hiệu LAMP1 đặc hiệu loại sợi. Các kết luận tương tự được đưa ra đối với cơ bốn đầu và cơ hoành (số liệu không được thể hiện).

Trong nghiên cứu được thiết kế tương tự và riêng rẽ, tiến hành kiểm tra hiệu quả của ATB-200 ± AT2221 trong thời gian dài hơn với bốn lần tiêm liều lớn IV hai tuần một lần. Trong tim, sự tích trữ glycogen chủ yếu trong tế bào cơ tim được thanh thải dễ dàng bằng việc sử dụng lặp lại rhGAA hoặc ATB-200 đến mức được quan sát thấy ở các con vật kiểu dại (WT) (Hình 17A). Tuy nhiên, cơ chất trong tế bào cơ tron

của tim dường như được thanh thải tốt hơn là bởi rhGAA ATB-200, gợi ý sự phân phối sinh học có khả năng rộng hơn của ATB-200 so với rhGAA (dấu hoa thị đánh dấu khoang của mạch máu tim). Điều quan trọng là, việc đồng sử dụng với miglustat còn cải thiện sự giảm tăng sinh LAMP1 được điều tiết bởi ATB-200.

Các kết quả này cho thấy rằng rhGAA ATB-200, mà có mức M6P và bis-M6P cao hơn trên N-glycan của nó, hướng đích một cách hiệu quả CIMPR trong cơ xương. rhGAA ATB-200 cũng có N-glycan kiểu phức được xử lý tốt mà làm giảm thiểu sự thanh thải không hiệu quả *in vivo*, có các tính chất dược động học tốt để sử dụng nó *in vivo* và thể hiện sự hướng đích tốt đến các mô cơ quan trọng *in vivo*. Các kết quả này cũng cho thấy rằng rhGAA ATB-200 làm giảm glycogen trong mô cơ tốt hơn so với tiêu chuẩn chăm sóc thông thường, Lumizyme, và hỗn hợp của rhGAA ATB-200 và chaperon AT2221 còn cải thiện thêm việc loại bỏ glycogen khỏi mô đích và cải thiện bệnh lý cơ.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Hợp phần chứa axit alpha- glucosidaza ở người tái tổ hợp (rhGAA) được sản xuất từ tế bào trứng chuột đồng Trung Quốc (CHO), trong đó 40%-60% N-glycan trên rhGAA là N-glycan kiểu phức; và trong đó rhGAA chứa 3,0-5,0 mol nhóm mannoza-6-phosphat (M6P) cho mỗi mol rhGAA.
2. Hợp phần theo điểm 1, trong đó rhGAA chứa từ 3,0 đến 4,0 mol M6P cho mỗi mol rhGAA.
3. Hợp phần theo điểm 1, trong đó rhGAA chứa từ 4,0 đến 5,0 mol M6P cho mỗi mol rhGAA.
4. Hợp phần theo điểm 1, trong đó rhGAA chứa thêm ít nhất 4 mol axit sialic cho mỗi mol rhGAA.
5. Hợp phần theo điểm 1, trong đó rhGAA chứa thêm từ 2,0 đến 8,0 mol gốc axit sialic cho mỗi mol rhGAA.
6. Hợp phần theo điểm 1, trong đó hợp phần này còn chứa thêm chaperon được lý.
7. Hợp phần theo điểm 1, trong đó rhGAA bao gồm ít nhất một N-glycan được bis-phosphoryl hóa cho mỗi rhGAA.
8. Hợp phần theo điểm 1, trong đó khoảng 45%-55% N-glycan trên rhGAA là N-glycan kiểu phức.
9. Hợp phần theo điểm 1, trong đó khoảng 50% N-glycan trên rhGAA là N-glycan kiểu phức.
10. Hợp phần theo điểm 1, trong đó rhGAA chứa 4 mol M6P cho mỗi mol rhGAA, 4,5 mol axit sialic cho mỗi mol rhGAA, và ít nhất một N-glycan được bis-phosphoryl hóa cho mỗi rhGAA.
11. Hợp phần theo điểm 10, trong đó hợp phần này còn bao gồm chaperon N-butyl-deoxynojirimycin được lý hoặc muối được dụng của chúng.

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> AMICUS THERAPEUTICS
 GOTSCHALL, Russell
 DO, Hung

<120> HỢP PHẦN CHỨA AXIT ALPHA GLUCOSIDAZA Ở NGƯỜI TÁI TỔ HỢP (rhGAA)

<130> 442420WO

<150> US 62/135,345
 <151> 2015-03-19

<150> US 62/112,643
 <151> 2015-02-05

<150> US 62/057,847
 <151> 2014-09-30

<150> US 62/057,842
 <151> 2014-09-30

<160> 4

<170> PatentIn phiên bản 3.5

<210> 1
 <211> 952
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> ĐẶC ĐIỂM HỖN TẠP
 <222> (1)..(952)
 <223> Trình tự 4 từ bằng sáng chế US 8592362GenBank: AHE24104.1

<400> 1

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

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

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

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

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

Gln Cys Asp Val Pro Pro Asn Ser Arg Phe Asp Cys Ala Pro Asp Lys

85

90

95

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Val Leu Gln Pro Ser Pro Ala Leu Ser Trp Arg Ser Thr Gly Gly Ile

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

				565						570						575			
Leu	Thr	Glu	Ala	Ile	Ala	Ser	His	Arg	Ala	Leu	Val	Lys	Ala	Arg	Gly				
			580					585					590						
Thr	Arg	Pro	Phe	Val	Ile	Ser	Arg	Ser	Thr	Phe	Ala	Gly	His	Gly	Arg				
		595					600					605							
Tyr	Ala	Gly	His	Trp	Thr	Gly	Asp	Val	Trp	Ser	Ser	Trp	Glu	Gln	Leu				
	610					615					620								
Ala	Ser	Ser	Val	Pro	Glu	Ile	Leu	Gln	Phe	Asn	Leu	Leu	Gly	Val	Pro				
625					630					635					640				
Leu	Val	Gly	Ala	Asp	Val	Cys	Gly	Phe	Leu	Gly	Asn	Thr	Ser	Glu	Glu				
				645					650					655					
Leu	Cys	Val	Arg	Trp	Thr	Gln	Leu	Gly	Ala	Phe	Tyr	Pro	Phe	Met	Arg				
			660					665					670						
Asn	His	Asn	Ser	Leu	Leu	Ser	Leu	Pro	Gln	Glu	Pro	Tyr	Ser	Phe	Ser				
		675					680					685							
Glu	Pro	Ala	Gln	Gln	Ala	Met	Arg	Lys	Ala	Leu	Thr	Leu	Arg	Tyr	Ala				
	690					695					700								
Leu	Leu	Pro	His	Leu	Tyr	Thr	Leu	Phe	His	Gln	Ala	His	Val	Ala	Gly				
705					710					715					720				
Glu	Thr	Val	Ala	Arg	Pro	Leu	Phe	Leu	Glu	Phe	Pro	Lys	Asp	Ser	Ser				
				725					730					735					
Thr	Trp	Thr	Val	Asp	His	Gln	Leu	Leu	Trp	Gly	Glu	Ala	Leu	Leu	Ile				
			740					745					750						
Thr	Pro	Val	Leu	Gln	Ala	Gly	Lys	Ala	Glu	Val	Thr	Gly	Tyr	Phe	Pro				
		755					760					765							
Leu	Gly	Thr	Trp	Tyr	Asp	Leu	Gln	Thr	Val	Pro	Ile	Glu	Ala	Leu	Gly				
	770					775					780								
Ser	Leu	Pro	Pro	Pro	Pro	Ala	Ala	Pro	Arg	Glu	Pro	Ala	Ile	His	Ser				
785					790					795					800				
Glu	Gly	Gln	Trp	Val	Thr	Leu	Pro	Ala	Pro	Leu	Asp	Thr	Ile	Asn	Val				

805 810 815
 His Leu Arg Ala Gly Tyr Ile Ile Pro Leu Gln Gly Pro Gly Leu Thr
 820 825 830
 Thr Thr Glu Ser Arg Gln Gln Pro Met Ala Leu Ala Val Ala Leu Thr
 835 840 845
 Lys Gly Gly Glu Ala Arg Gly Glu Leu Phe Trp Asp Asp Gly Glu Ser
 850 855 860
 Leu Glu Val Leu Glu Arg Gly Ala Tyr Thr Gln Val Ile Phe Leu Ala
 865 870 875 880
 Arg Asn Asn Thr Ile Val Asn Glu Leu Val Arg Val Thr Ser Glu Gly
 885 890 895
 Ala Gly Leu Gln Leu Gln Lys Val Thr Val Leu Gly Val Ala Thr Ala
 900 905 910
 Pro Gln Gln Val Leu Ser Asn Gly Val Pro Val Ser Asn Phe Thr Tyr
 915 920 925
 Ser Pro Asp Thr Lys Val Leu Asp Ile Cys Val Ser Leu Leu Met Gly
 930 935 940
 Glu Gln Phe Leu Val Ser Trp Cys
 945 950
 <210> 2
 <211> 3624
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <221> CDS
 <222> (220)..(3078)
 <223> mARN GAA H.sapiens đối với alpha-glucosidaza lysosom (axit
 maltaza); GenBank: Y00839.1
 <400> 2
 cagttgggaa agctgaggtt gtcgccgggg ccgcgggttg aggtcgggga tgaggcagca 60
 ggtaggacag tgacctcggg gacgcgaagg acccgggcca cctctaggtt ctctcgtcc 120
 gcccgttggt cagcgaggga ggctctgggc ctgccgcagc tgacggggaa actgaggcac 180
 ggagcggggc tgtaggagct gtccaggcca tctccaacc atg gga gtg agg cac 234
 Met Gly Val Arg His

															1	5	
ccg	ccc	tgc	tcc	cac	cgg	ctc	ctg	gcc	gtc	tgc	gcc	ctc	gtg	tcc	ttg		282
Pro	Pro	Cys	Ser	His	Arg	Leu	Leu	Ala	Val	Cys	Ala	Leu	Val	Ser	Leu		
				10					15					20			
gca	acc	gct	gca	ctc	ctg	ggg	cac	atc	cta	ctc	cat	gat	ttc	ctg	ctg		330
Ala	Thr	Ala	Ala	Leu	Leu	Gly	His	Ile	Leu	Leu	His	Asp	Phe	Leu	Leu		
				25					30					35			
gtt	ccc	cga	gag	ctg	agt	ggc	tcc	tcc	cca	gtc	ctg	gag	gag	act	cac		378
Val	Pro	Arg	Glu	Leu	Ser	Gly	Ser	Ser	Pro	Val	Leu	Glu	Glu	Thr	His		
				40					45					50			
cca	gct	cac	cag	cag	gga	gcc	agc	aga	cca	ggg	ccc	cgg	gat	gcc	cag		426
Pro	Ala	His	Gln	Gln	Gly	Ala	Ser	Arg	Pro	Gly	Pro	Arg	Asp	Ala	Gln		
				55					60					65			
gca	cac	ccc	ggc	cgt	ccc	aga	gca	gtg	ccc	aca	cag	tgc	gac	gtc	ccc		474
Ala	His	Pro	Gly	Arg	Pro	Arg	Ala	Val	Pro	Thr	Gln	Cys	Asp	Val	Pro		
				70					75					80			
ccc	aac	agc	cgc	ttc	gat	tgc	gcc	cct	gac	aag	gcc	atc	acc	cag	gaa		522
Pro	Asn	Ser	Arg	Phe	Asp	Cys	Ala	Pro	Asp	Lys	Ala	Ile	Thr	Gln	Glu		
				90					95					100			
cag	tgc	gag	gcc	cgc	ggc	tgc	tgc	tac	atc	cct	gca	aag	cag	ggg	ctg		570
Gln	Cys	Glu	Ala	Arg	Gly	Cys	Cys	Tyr	Ile	Pro	Ala	Lys	Gln	Gly	Leu		
				105					110					115			
cag	gga	gcc	cag	atg	ggg	cag	ccc	tgg	tgc	ttc	ttc	cca	ccc	agc	tac		618
Gln	Gly	Ala	Gln	Met	Gly	Gln	Pro	Trp	Cys	Phe	Phe	Pro	Pro	Ser	Tyr		
				120					125					130			
ccc	agc	tac	aag	ctg	gag	aac	ctg	agc	tcc	tct	gaa	atg	ggc	tac	acg		666
Pro	Ser	Tyr	Lys	Leu	Glu	Asn	Leu	Ser	Ser	Ser	Glu	Met	Gly	Tyr	Thr		
				135					140					145			
gcc	acc	ctg	acc	cgt	acc	acc	ccc	acc	ttc	ttc	ccc	aag	gac	atc	ctg		714
Ala	Thr	Leu	Thr	Arg	Thr	Thr	Pro	Thr	Phe	Phe	Pro	Lys	Asp	Ile	Leu		
				150					155					160			
acc	ctg	cgg	ctg	gac	gtg	atg	atg	gag	act	gag	aac	cgc	ctc	cac	ttc		762
Thr	Leu	Arg	Leu	Asp	Val	Met	Met	Glu	Thr	Glu	Asn	Arg	Leu	His	Phe		
				170					175					180			
acg	atc	aaa	gat	cca	gct	aac	agg	cgc	tac	gag	gtg	ccc	ttg	gag	acc		810
Thr	Ile	Lys	Asp	Pro	Ala	Asn	Arg	Arg	Tyr	Glu	Val	Pro	Leu	Glu	Thr		
				185					190					195			
ccg	cgt	gtc	cac	agc	cgg	gca	ccg	tcc	cca	ctc	tac	agc	gtg	gag	ttc		858
Pro	Arg	Val	His	Ser	Arg	Ala	Pro	Ser	Pro	Leu	Tyr	Ser	Val	Glu	Phe		
				200					205					210			
tcc	gag	gag	ccc	ttc	ggg	gtg	atc	gtg	cac	cgg	cag	ctg	gac	ggc	cgc		906
Ser	Glu	Glu	Pro	Phe	Gly	Val	Ile	Val	His	Arg	Gln	Leu	Asp	Gly	Arg		
				215					220					225			
gtg	ctg	ctg	aac	acg	acg	gtg	gcg	ccc	ctg	ttc	ttt	gcg	gac	cag	ttc		954
Val	Leu	Leu	Asn	Thr	Thr	Val	Ala	Pro	Leu	Phe	Phe	Ala	Asp	Gln	Phe		

230	235	240	245	
ctt cag ctg tcc acc tcg ctg ccc tcg cag tat atc aca ggc ctc gcc				1002
Leu Gln Leu Ser Thr Ser Leu Pro Ser Gln Tyr Ile Thr Gly Leu Ala				
	250	255	260	
gag cac ctc agt ccc ctg atg ctc agc acc agc tgg acc agg atc acc				1050
Glu His Leu Ser Pro Leu Met Leu Ser Thr Ser Trp Thr Arg Ile Thr				
	265	270	275	
ctg tgg aac cgg gac ctt gcg ccc acg ccc ggt gcg aac ctc tac ggg				1098
Leu Trp Asn Arg Asp Leu Ala Pro Thr Pro Gly Ala Asn Leu Tyr Gly				
	280	285	290	
tct cac cct ttc tac ctg gcg ctg gag gac ggc ggg tcg gca cac ggg				1146
Ser His Pro Phe Tyr Leu Ala Leu Glu Asp Gly Gly Ser Ala His Gly				
	295	300	305	
gtg ttc ctg cta aac agc aat gcc atg gat gtg gtc ctg cag ccg agc				1194
Val Phe Leu Leu Asn Ser Asn Ala Met Asp Val Val Leu Gln Pro Ser				
	310	315	320	325
cct gcc ctt agc tgg agg tcg aca ggt ggg atc ctg gat gtc tac atc				1242
Pro Ala Leu Ser Trp Arg Ser Thr Gly Gly Ile Leu Asp Val Tyr Ile				
	330	335	340	
ttc ctg ggc cca gag ccc aag agc gtg gtg cag cag tac ctg gac gtt				1290
Phe Leu Gly Pro Glu Pro Lys Ser Val Val Gln Gln Tyr Leu Asp Val				
	345	350	355	
gtg gga tac ccg ttc atg ccg cca tac tgg ggc ctg ggc ttc cac ctg				1338
Val Gly Tyr Pro Phe Met Pro Pro Tyr Trp Gly Leu Gly Phe His Leu				
	360	365	370	
tgc cgc tgg ggc tac tcc tcc acc gct atc acc cgc cag gtg gtg gag				1386
Cys Arg Trp Gly Tyr Ser Ser Thr Ala Ile Thr Arg Gln Val Val Glu				
	375	380	385	
aac atg acc agg gcc cac ttc ccc ctg gac gtc caa tgg aac gac ctg				1434
Asn Met Thr Arg Ala His Phe Pro Leu Asp Val Gln Trp Asn Asp Leu				
	390	395	400	405
gac tac atg gac tcc cgg agg gac ttc acg ttc aac aag gat ggc ttc				1482
Asp Tyr Met Asp Ser Arg Arg Asp Phe Thr Phe Asn Lys Asp Gly Phe				
	410	415	420	
cgg gac ttc ccg gcc atg gtg cag gag ctg cac cag ggc ggc cgg cgc				1530
Arg Asp Phe Pro Ala Met Val Gln Glu Leu His Gln Gly Gly Arg Arg				
	425	430	435	
tac atg atg atc gtg gat cct gcc atc agc agc tcg ggc cct gcc ggg				1578
Tyr Met Met Ile Val Asp Pro Ala Ile Ser Ser Ser Gly Pro Ala Gly				
	440	445	450	
agc tac agg ccc tac gac gag ggt ctg cgg agg ggg gtt ttc atc acc				1626
Ser Tyr Arg Pro Tyr Asp Glu Gly Leu Arg Arg Gly Val Phe Ile Thr				
	455	460	465	
aac gag acc ggc cag ccg ctg att ggg aag gta tgg ccc ggg tcc act				1674
Asn Glu Thr Gly Gln Pro Leu Ile Gly Lys Val Trp Pro Gly Ser Thr				

470	475	480	485	
gcc ttc ccc gac ttc acc aac ccc aca gcc ctg gcc tgg tgg gag gac Ala Phe Pro Asp Phe Thr Asn Pro Thr Ala Leu Ala Trp Trp Glu Asp 490 495 500				1722
atg gtg gct gag ttc cat gac cag gtg ccc ttc gac ggc atg tgg att Met Val Ala Glu Phe His Asp Gln Val Pro Phe Asp Gly Met Trp Ile 505 510 515				1770
gac atg aac gag cct tcc aac ttc atc aga ggc tct gag gac ggc tgc Asp Met Asn Glu Pro Ser Asn Phe Ile Arg Gly Ser Glu Asp Gly Cys 520 525 530				1818
ccc aac aat gag ctg gag aac cca ccc tac gtg cct ggg gtg gtt ggg Pro Asn Asn Glu Leu Glu Asn Pro Pro Tyr Val Pro Gly Val Val Gly 535 540 545				1866
ggg acc ctc cag gcg gcc acc atc tgt gcc tcc agc cac cag ttt ctc Gly Thr Leu Gln Ala Ala Thr Ile Cys Ala Ser Ser His Gln Phe Leu 550 555 560 565				1914
tcc aca cac tac aac ctg cac aac ctc tac ggc ctg acc gaa gcc atc Ser Thr His Tyr Asn Leu His Asn Leu Tyr Gly Leu Thr Glu Ala Ile 570 575 580				1962
gcc tcc cac agg gcg ctg gtg aag gct cgg ggg aca cgc cca ttt gtg Ala Ser His Arg Ala Leu Val Lys Ala Arg Gly Thr Arg Pro Phe Val 585 590 595				2010
atc tcc cgc tcg acc ttt gct ggc cac ggc cga tac gcc ggc cac tgg Ile Ser Arg Ser Thr Phe Ala Gly His Gly Arg Tyr Ala Gly His Trp 600 605 610				2058
acg ggg gac gtg tgg agc tcc tgg gag cag ctc gcc tcc tcc gtg cca Thr Gly Asp Val Trp Ser Ser Trp Glu Gln Leu Ala Ser Ser Val Pro 615 620 625				2106
gaa atc ctg cag ttt aac ctg ctg ggg gtg cct ctg gtc ggg gcc gac Glu Ile Leu Gln Phe Asn Leu Leu Gly Val Pro Leu Val Gly Ala Asp 630 635 640 645				2154
gtc tgc ggc ttc ctg ggc aac acc tca gag gag ctg tgt gtg cgc tgg Val Cys Gly Phe Leu Gly Asn Thr Ser Glu Glu Leu Cys Val Arg Trp 650 655 660				2202
acc cag ctg ggg gcc ttc tac ccc ttc atg cgg aac cac aac agc ctg Thr Gln Leu Gly Ala Phe Tyr Pro Phe Met Arg Asn His Asn Ser Leu 665 670 675				2250
ctc agt ctg ccc cag gag ccg tac agc ttc agc gag ccg gcc cag cag Leu Ser Leu Pro Gln Glu Pro Tyr Ser Phe Ser Glu Pro Ala Gln Gln 680 685 690				2298
gcc atg agg aag gcc ctc acc ctg cgc tac gca ctc ctc ccc cac ctc Ala Met Arg Lys Ala Leu Thr Leu Arg Tyr Ala Leu Leu Pro His Leu 695 700 705				2346
tac aca ctg ttc cac cag gcc cac gtc gcg ggg gag acc gtg gcc cgg Tyr Thr Leu Phe His Gln Ala His Val Ala Gly Glu Thr Val Ala Arg 710 715 720				2394

710	715	720	725	
ccc ctc ttc ctg gag ttc ccc aag gac tct agc acc tgg act gtg gac Pro Leu Phe Leu Glu Phe Pro Lys Asp Ser Ser Thr Trp Thr Val Asp 730 735 740				2442
cac cag ctc ctg tgg ggg gag gcc ctg ctc atc acc cca gtg ctc cag His Gln Leu Leu Trp Gly Glu Ala Leu Leu Ile Thr Pro Val Leu Gln 745 750 755				2490
gcc ggg aag gcc gaa gtg act ggc tac ttc ccc ttg ggc aca tgg tac Ala Gly Lys Ala Glu Val Thr Gly Tyr Phe Pro Leu Gly Thr Trp Tyr 760 765 770				2538
gac ctg cag acg gtg cca ata gag gcc ctt ggc agc ctc cca ccc cca Asp Leu Gln Thr Val Pro Ile Glu Ala Leu Gly Ser Leu Pro Pro Pro 775 780 785				2586
cct gca gct ccc cgt gag cca gcc atc cac agc gag ggg cag tgg gtg Pro Ala Ala Pro Arg Glu Pro Ala Ile His Ser Glu Gly Gln Trp Val 790 795 800				2634
acg ctg ccg gcc ccc ctg gac acc atc aac gtc cac ctc cgg gct ggg Thr Leu Pro Ala Pro Leu Asp Thr Ile Asn Val His Leu Arg Ala Gly 810 815 820				2682
tac atc atc ccc ctg cag ggc cct ggc ctc aca acc aca gag tcc cgc Tyr Ile Ile Pro Leu Gln Gly Pro Gly Leu Thr Thr Thr Glu Ser Arg 825 830 835				2730
cag cag ccc atg gcc ctg gct gtg gcc ctg acc aag ggt gga gag gcc Gln Gln Pro Met Ala Leu Ala Val Ala Leu Thr Lys Gly Gly Glu Ala 840 845 850				2778
cga ggg gag ctg ttc tgg gac gat gga gag agc ctg gaa gtg ctg gag Arg Gly Glu Leu Phe Trp Asp Asp Gly Glu Ser Leu Glu Val Leu Glu 855 860 865				2826
cga ggg gcc tac aca cag gtc atc ttc ctg gcc agg aat aac acg atc Arg Gly Ala Tyr Thr Gln Val Ile Phe Leu Ala Arg Asn Asn Thr Ile 870 875 880 885				2874
gtg aat gag ctg gta cgt gtg acc agt gag gga gct ggc ctg cag ctg Val Asn Glu Leu Val Arg Val Thr Ser Glu Gly Ala Gly Leu Gln Leu 890 895 900				2922
cag aag gtg act gtc ctg ggc gtg gcc acg gcg ccc cag cag gtc ctc Gln Lys Val Thr Val Leu Gly Val Ala Thr Ala Pro Gln Gln Val Leu 905 910 915				2970
tcc aac ggt gtc cct gtc tcc aac ttc acc tac agc ccc gac acc aag Ser Asn Gly Val Pro Val Ser Asn Phe Thr Tyr Ser Pro Asp Thr Lys 920 925 930				3018
gtc ctg gac atc tgt gtc tcg ctg ttg atg gga gag cag ttt ctc gtc Val Leu Asp Ile Cys Val Ser Leu Leu Met Gly Glu Gln Phe Leu Val 935 940 945				3066
agc tgg tgt tag ccgggcggag tgtgttagtc tctccagagg gaggctggtt Ser Trp Cys				3118

950

```

ccccagggaa gcagagcctg tgtgcgggca gcagctgtgt gcgggcctgg gggttgcatg      3178
tgtcacctgg agctgggcac taaccattcc aagccgccgc atcgcttggt tccacctcct      3238
gggccggggc tctggcccc aacgtgtcta ggagagcttt ctccctagat cgcactgtgg      3298
gccggggcct ggagggctgc tctgtgttaa taagattgta aggtttgccc tcctcacctg      3358
ttgccggcat gcgggtagta ttagccaccc ccctccatct gttcccagca ccggagaagg      3418
gggtgctcag gtggaggtgt ggggtatgca cctgagctcc tgcttcgcgc ctgctgctct      3478
gccccaacgc gaccgttcc cggtgccca gagggctgga tgcttgccgg tccccgagca      3538
agcctgggaa ctcaggaaaa ttcacaggac ttgggagatt ctaaacttta agtgcaatta      3598
ttttaataaaa aggggcattt ggaatc                                          3624

```

<210> 3
 <211> 952
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 3

```

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

```

```

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

```

```

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

```

```

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

```

```

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

```

```

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

```

```

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

```

```

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

```

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Glu Gln Phe Leu Val Ser Trp Cys
945 950

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

<220>
<221> ĐẶC ĐIỂM HỖN TẠP
<222> (1)..(952)
<223> Tiền chất của proprotein alpha-glucosidaza lysosom [Homo sapiens];
Trình tự tham chiếu NCBI: NP_000143.2

<400> 4

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

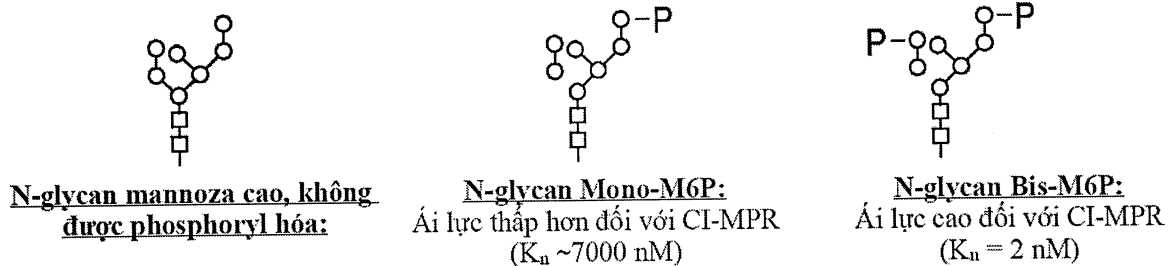
Pro Gln Gln Val Leu Ser Asn Gly Val Pro Val Ser Asn Phe Thr Tyr
915 920 925

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

Glu Gln Phe Leu Val Ser Trp Cys
945 950

Hình 1A

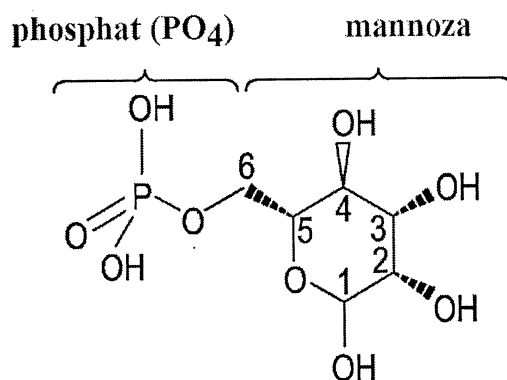
Cấu trúc và ái lực thụ thể đối với các oligosacarit mannoza cao và được phosphoryl hóa



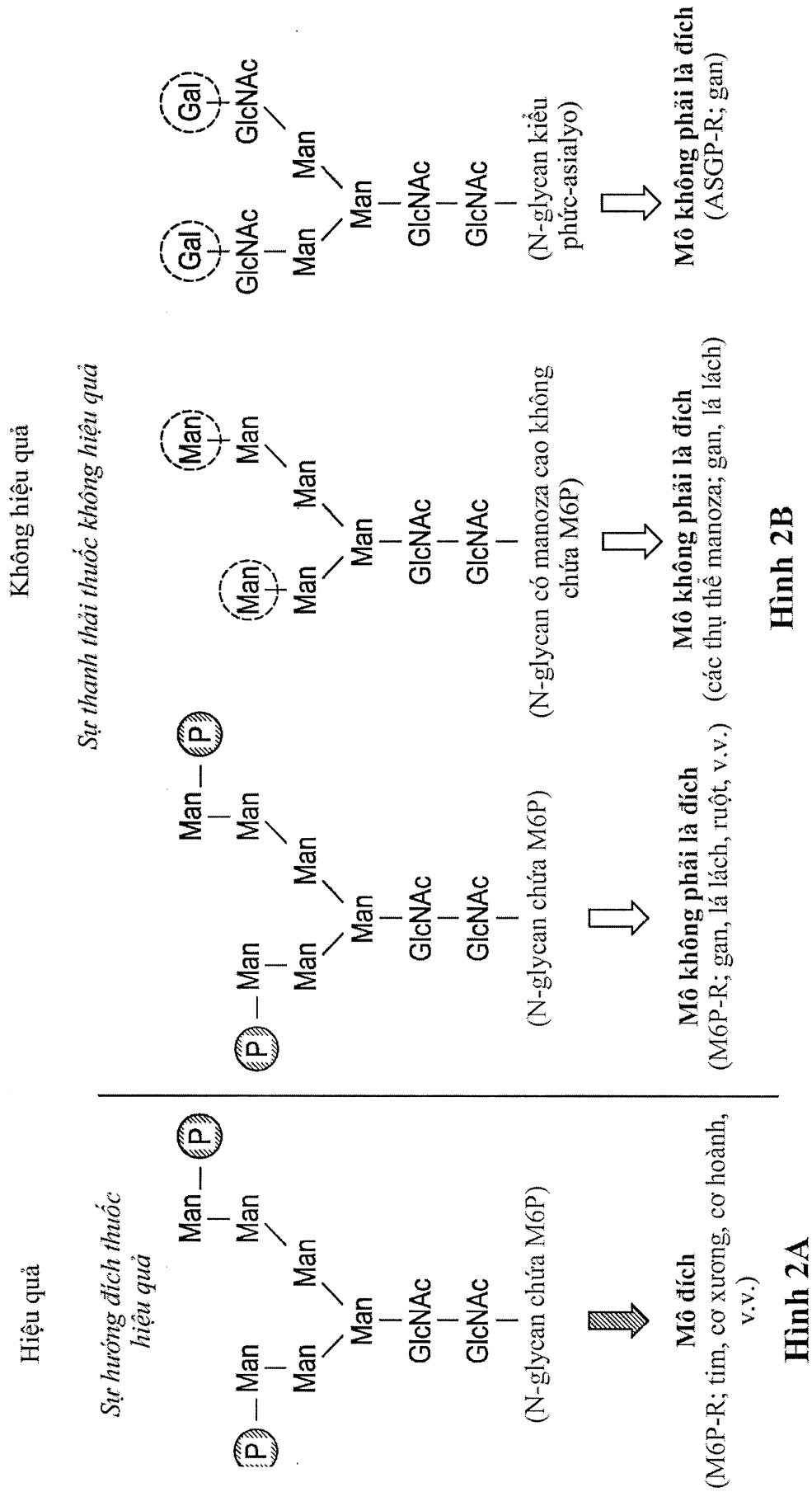
Hình 1B

Cấu trúc hóa học của Mannoza 6-Phosphat

Mannoza 6-Phosphat (M6P)



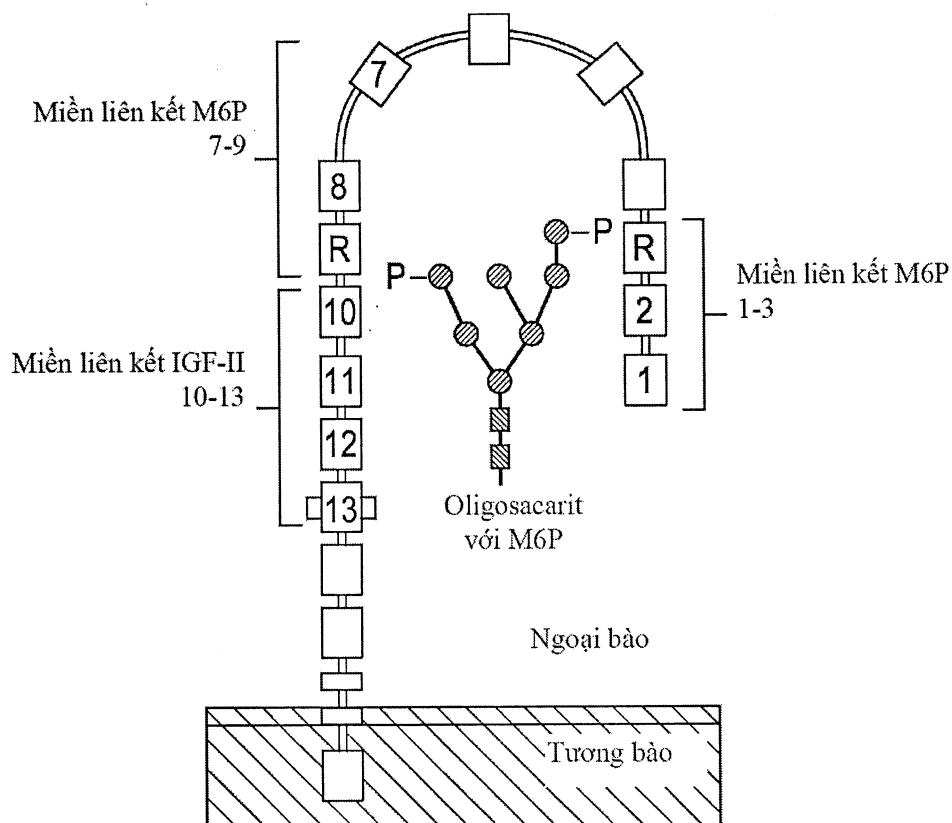
So sánh sự hướng đích các thụ thể đặc hiệu glycan hiệu quả và không hiệu quả



Hình 2A

Hình 2B

Cấu trúc và miền liên kết của CIMPR



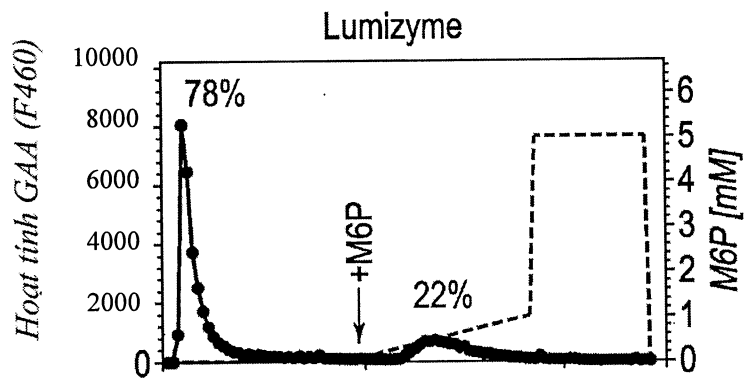
Hình 3A

Phối tử; Ái lực và vị trí in vivo của ba thụ thể glycoprotein

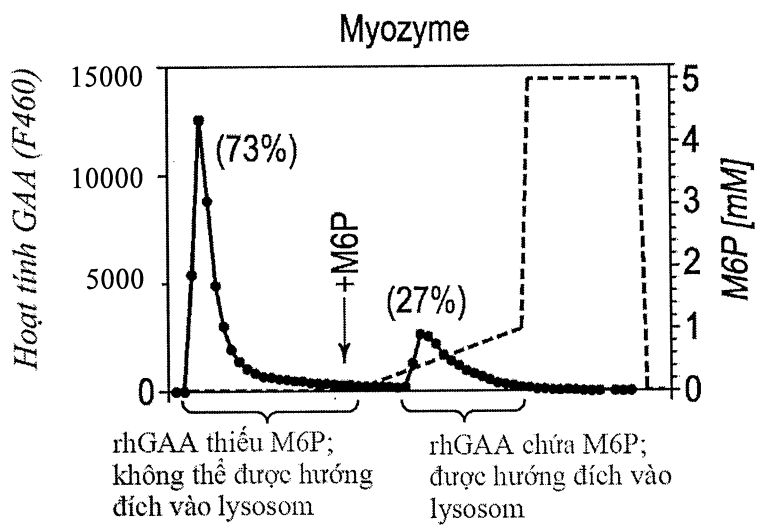
Phối tử	Thụ thể	Ái lực (nmol)	Vị trí
Glycan được bis-phosphoryl hóa	CIMPR	2	Tất cả các tế bào
Glycan được mono-phosphoryl hóa		7000	
Glycan mannoza cao	Thụ thể mannoza	20 ^b	Đại thực bào Tế bào tua
Glycan phức được khử sialyl hóa	Thụ thể asialoglycoprotein	7 ^c	Tế bào gan

Tài liệu tham khảo: ^aTong *et al* 1989; ^bTaylor *et al* 1992; ^cSchwartz *et al* 1981

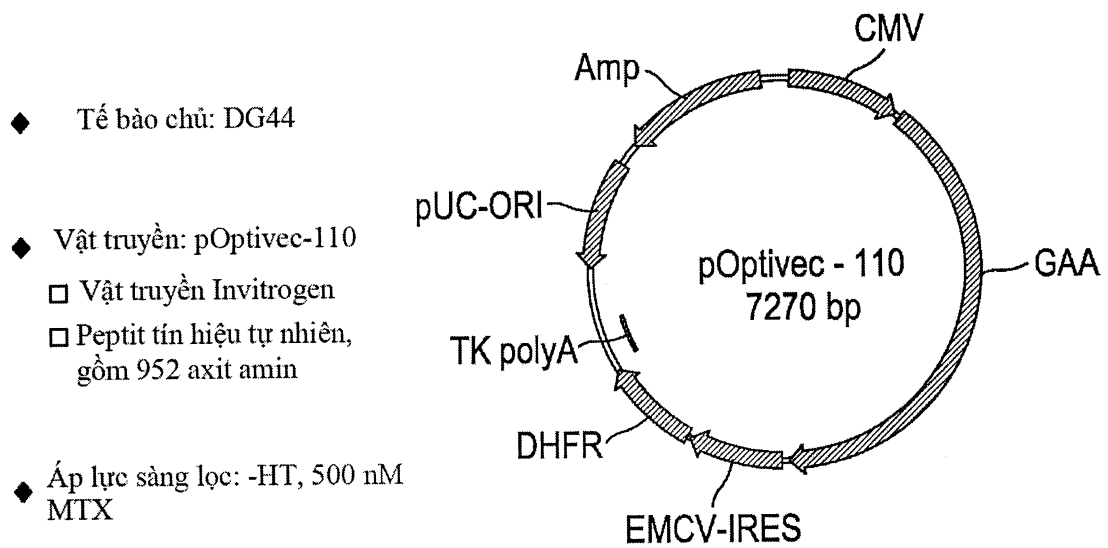
Hình 3B



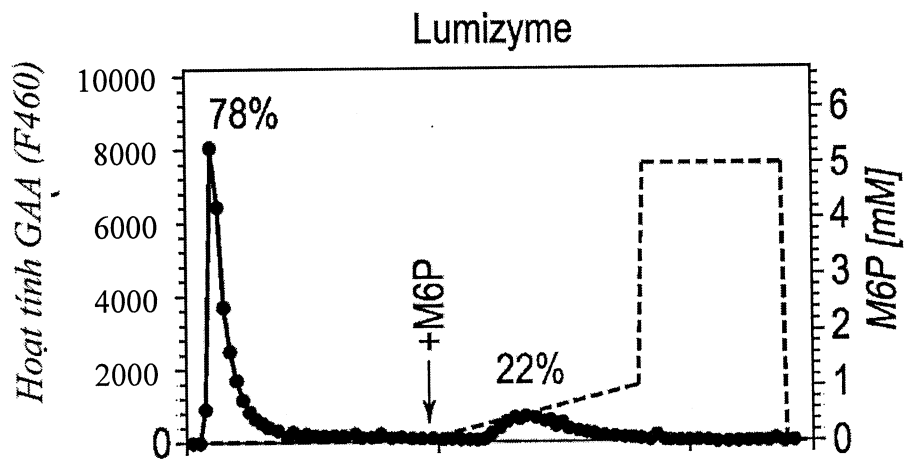
Hình 4A



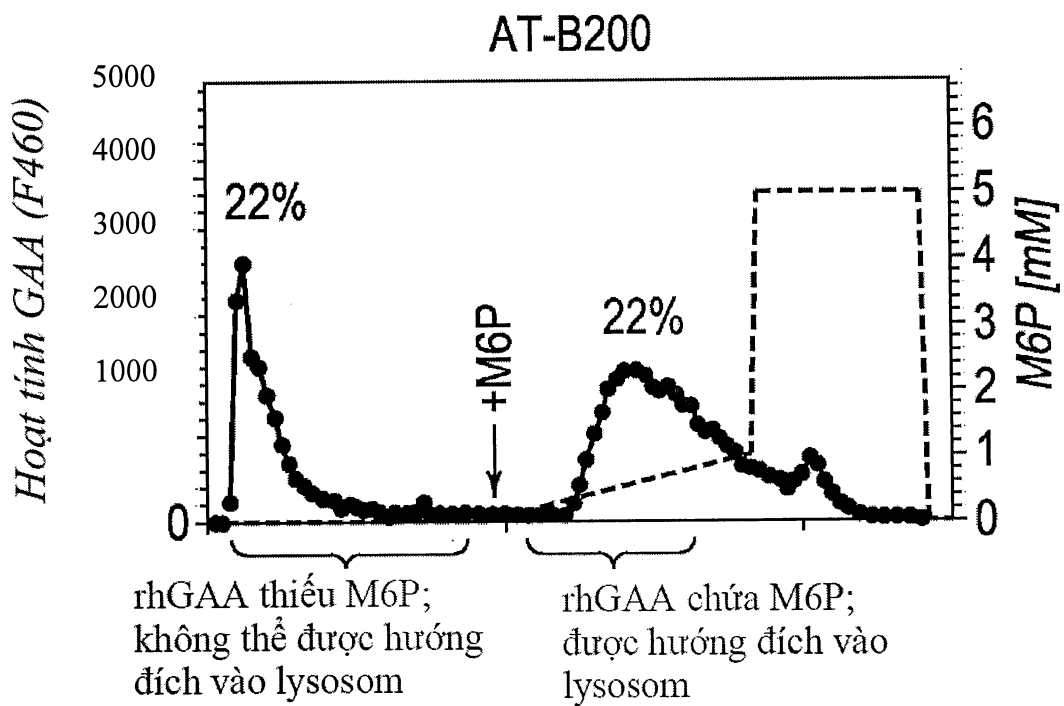
Cấu trúc vật truyền ATB200

**Hình 5**

Biên dạng liên kết CIMPR của Lumizyme so với biên dạng liên kết CIMPR của rhGAA ATB-200

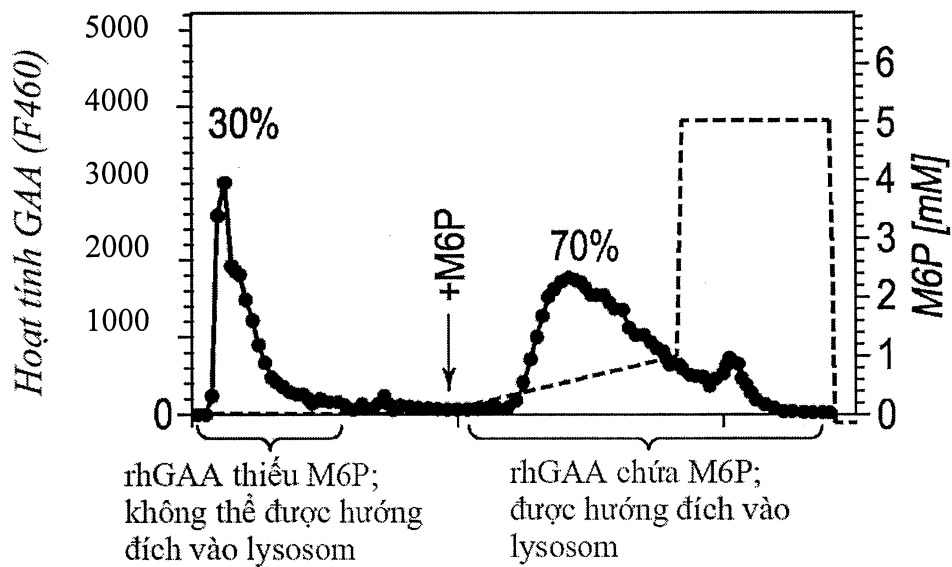


Hình 6A



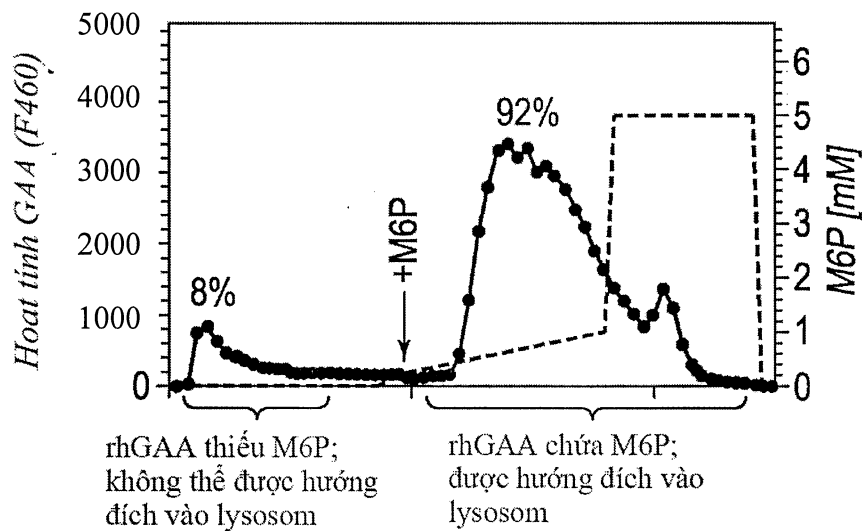
Hình 6B

Sự tối ưu hóa sản xuất đối với ATB200
Phương án 1



Hình 7A

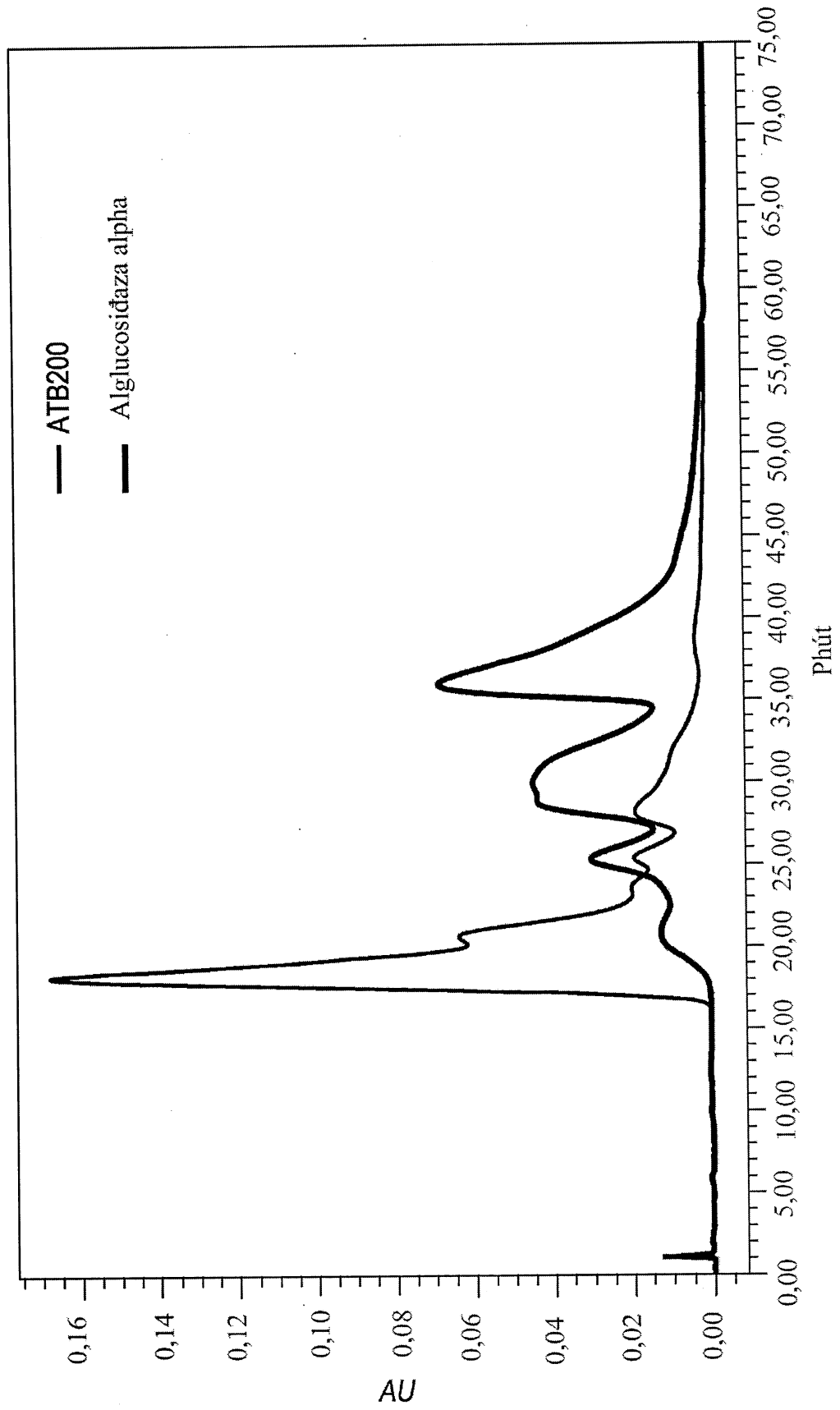
Phương án 2



Hình 7B

Hình 8

Profin rửa giải polywax của Alglucosidaza và ATB200 rhGAA

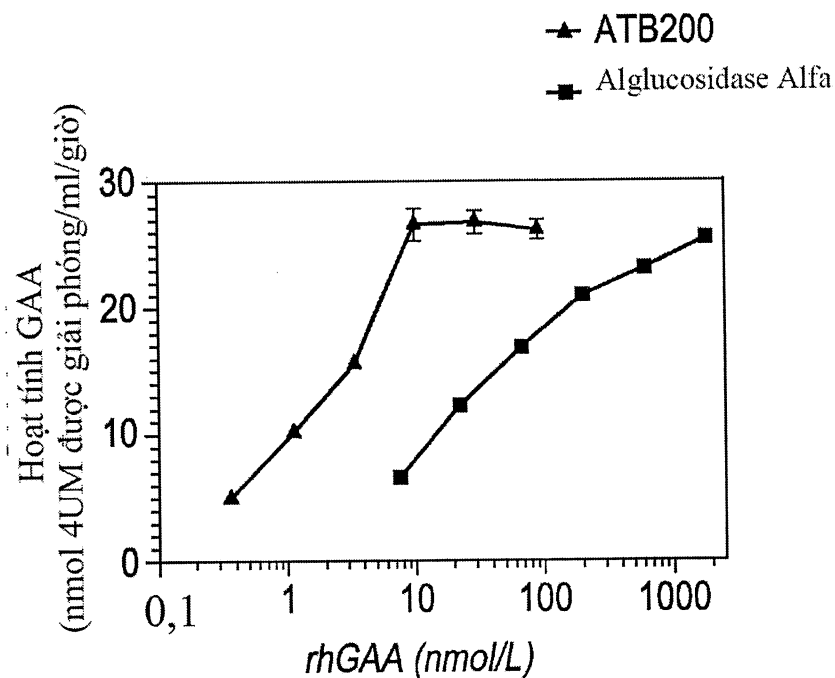


Sự phân bố của N-glycan trên các chế phẩm rhGAA

	Lumizyme	BP-rhGAA*	ATB200	
			1	2
N-glycan loại phức tạp	70,7%	48,9%	51,0%	47,5%
N-glycan loại thể lai	6,7%	9,7%	4,4%	3,7%
N-glycan loại mannoza cao:				
Không được phosphoryl hóa	15,8%	23,7%	14,0%	9,9%
<i>Mono-M6P</i>	5,2%	10,4%	13,4%	14,2%
<i>Bis-M6P</i>	1,6%	6,8%	17,2%	24,7%

Hình 9

Xác định ái lực liên kết CIMPR



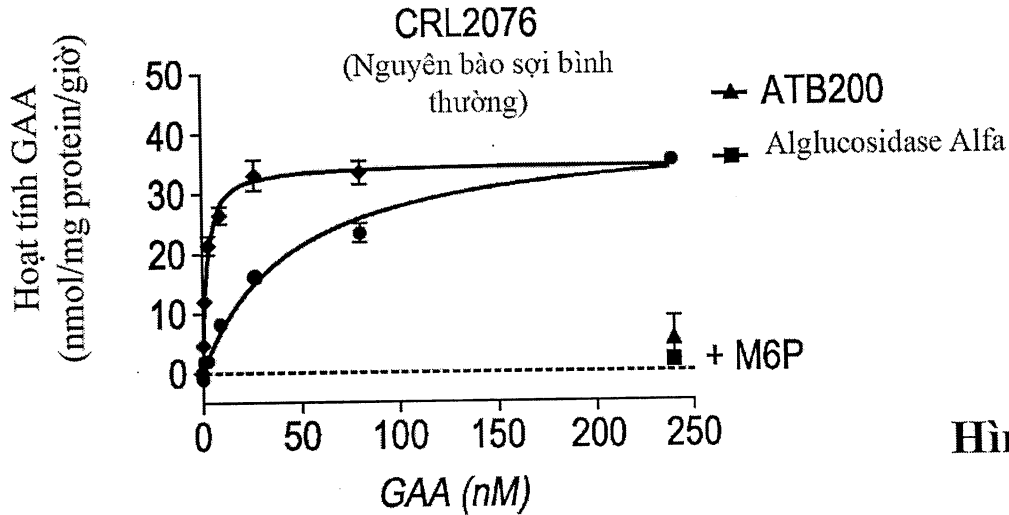
Hình 10A

So sánh các oligosacarit được bis-phosphoryl hóa

Glycan	Alglucosidase Alfa (mol bis-glycan/ mol protein)	ATB200 (mol bis-glycan/ mol protein)
Bis-M6P	0,1	1,3

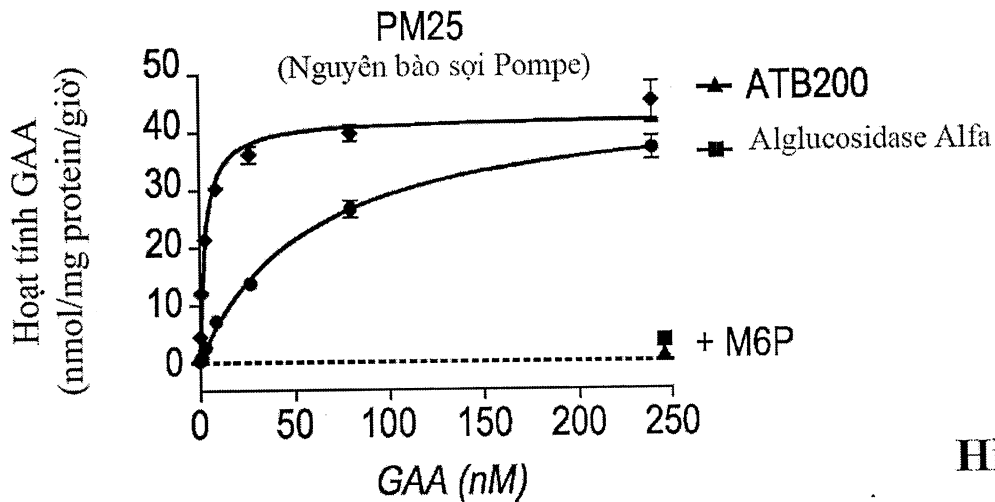
Hình 10B

Sự hấp thu CIMPR ở nguyên bào sợi bình thường



Hình 11A

Sự hấp thu CIMPR trong nguyên bào sợi Pompe



Hình 11B

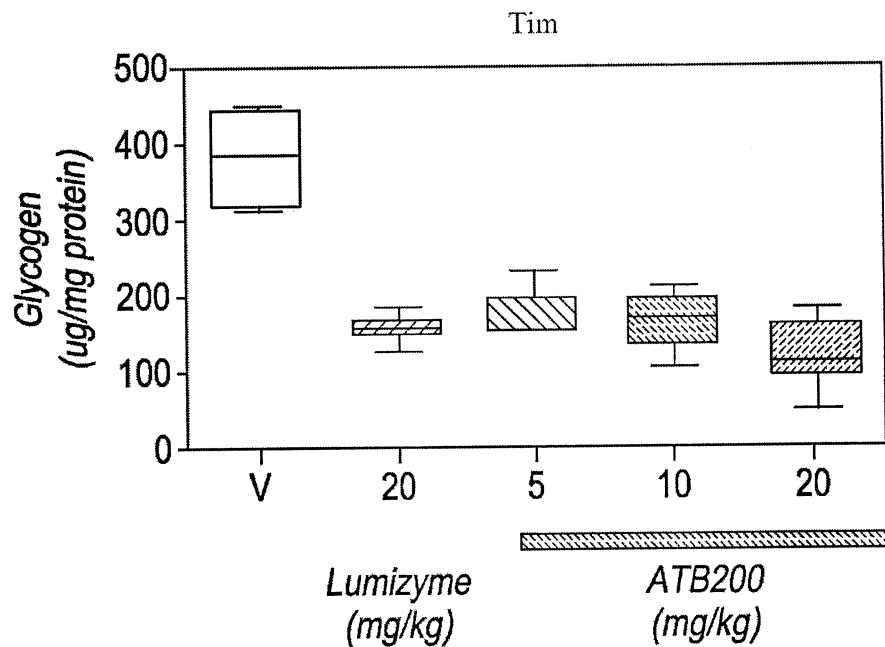
So sánh $K_{\text{hấp thu}}$ ở nguyên bào sợi bình thường và nguyên bào sợi Pompe

Dòng tế bào	$K_{\text{hấp thu}}$ (nM)	
	AT200	Lumizyme
Bình thường	2	56
Pompe	3	57

Hình 11C

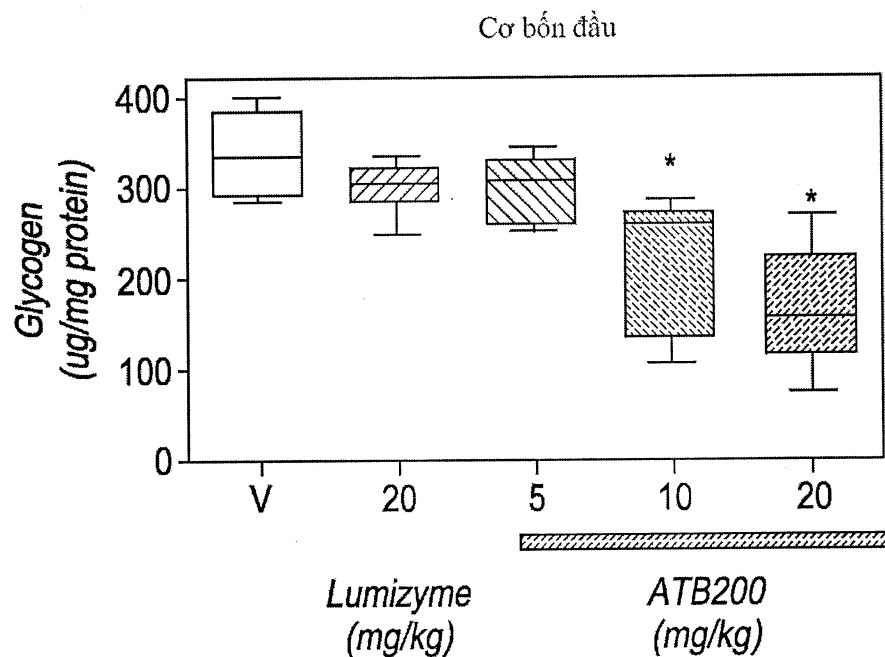
So sánh sự thanh thải glycogen bởi rhGAA ATB-200 và rhAGG Lumizyme trong cơ tim, cơ b đầu và cơ ba đầu

Sự giảm glycogen ở tim



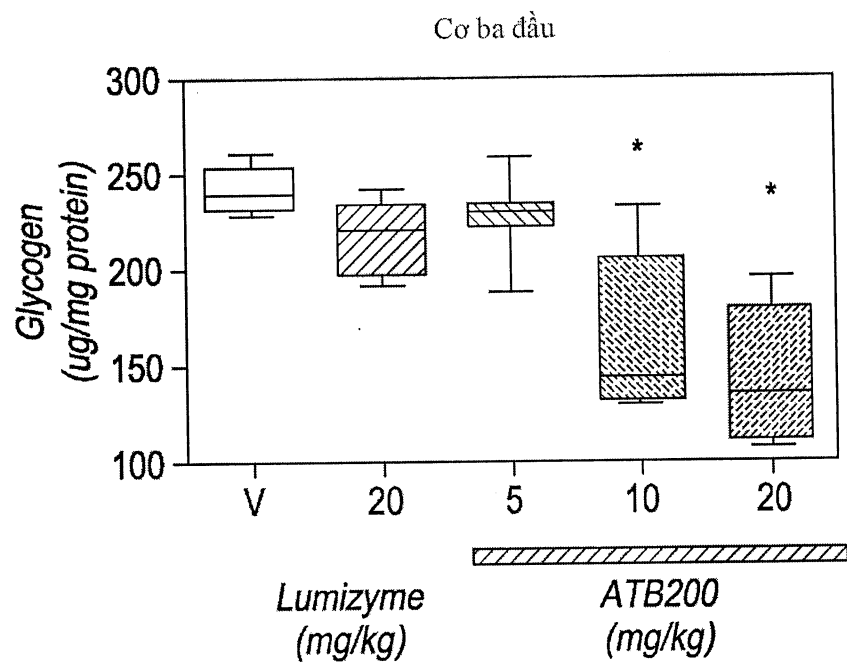
Hình 12A

Sự giảm glycogen trong cơ bốn đầu



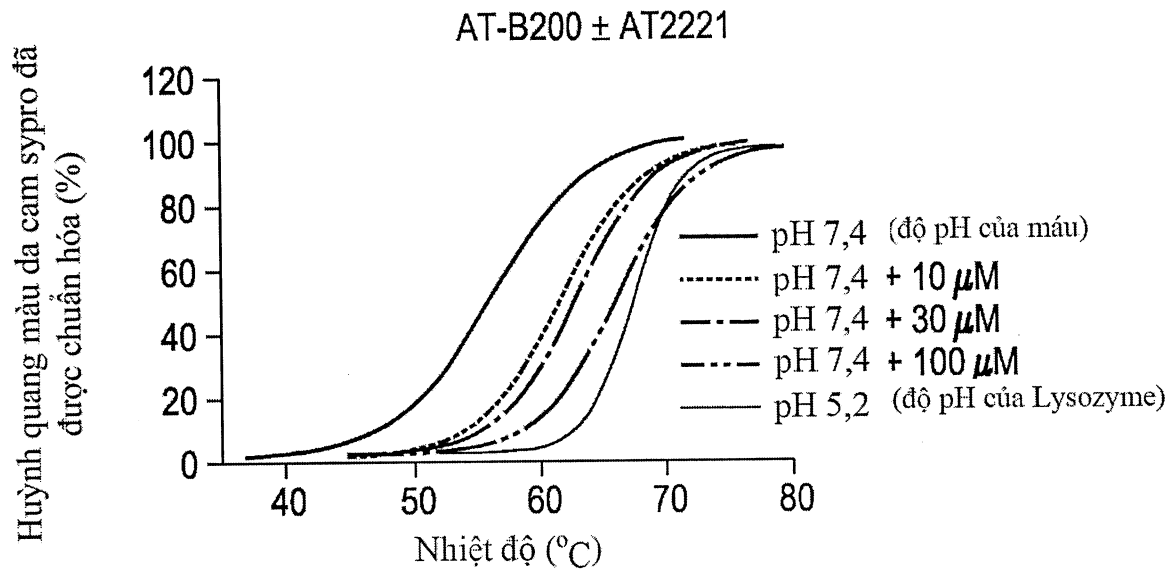
Hình 12B

Sự giảm glycogen trong cơ bốn đầu



Hình 12C

Ảnh hưởng của nhiệt độ đến sự cuộn gập của rhGAA
ATB-200 trong sự có mặt của chất đi kèm AT2221



Tóm tắt nhiệt độ nóng chảy của ATB200 với lượng AT2221 tăng dần

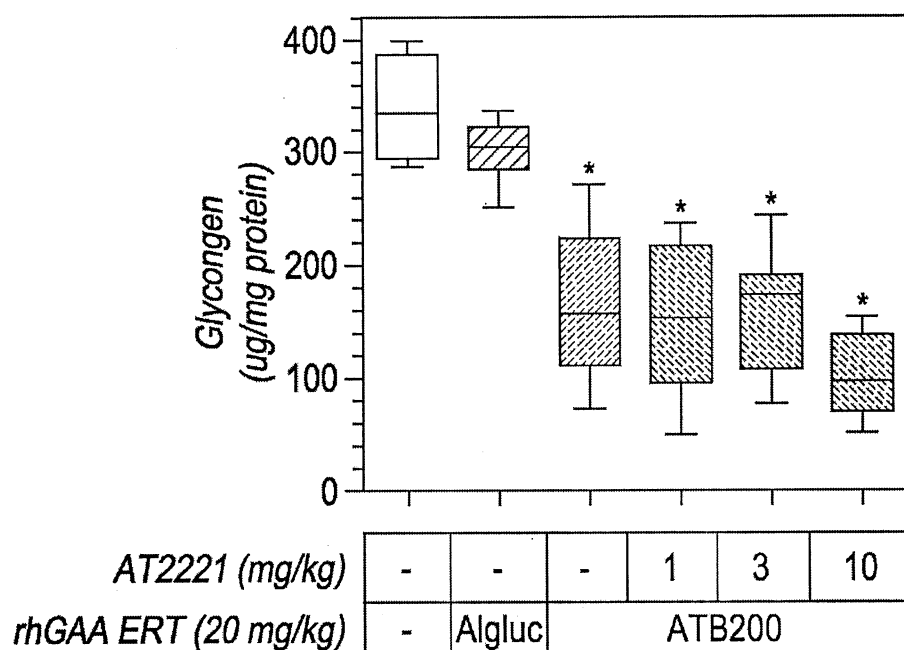
Chất đệm	$T_m(^{\circ}\text{C})$ của ATB200
pH 7,4	56,2
pH 7,4 + 10 mM AT2221	61,6
pH 7,4 + 30 mM AT2221	62,9
pH 7,4 + 100 mM AT2221	66,0
pH 5,2	67,3

Hình 13B

So sánh % giảm glycogen ở các con chuột KO Gaa sau khi dùng Lumizyme hoặc ATB200 (có hoặc không có miglusat)		
Enzym ± Chất đi kèm	Cơ bốn đầu	Cơ ba đầu
Chỉ có Lumizyme (20 mg/Kg)	14	14
Chỉ có ATB200 (20 mg/kg)	74	62
ATB200 + Miglustat (AT2221) (20 mg/kg) + (10 mg/kg)	94	73

Hình 14

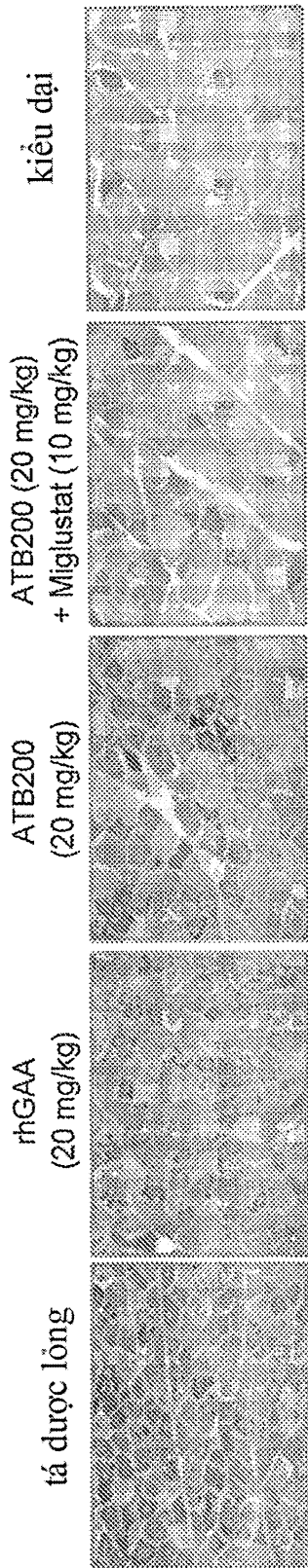
Sự thanh thải glycogen ở cơ bốn đầu bởi rhGAA ATB-200 và chất đi kèm AT-2221



Hình 15

Sự nhuộm màu PAS của glycogen và EM của mô cơ xương từ các con chuột KO GAA được điều trị bằng rhGAA thông thường hoặc rhGAA ATB-200 và AT2221

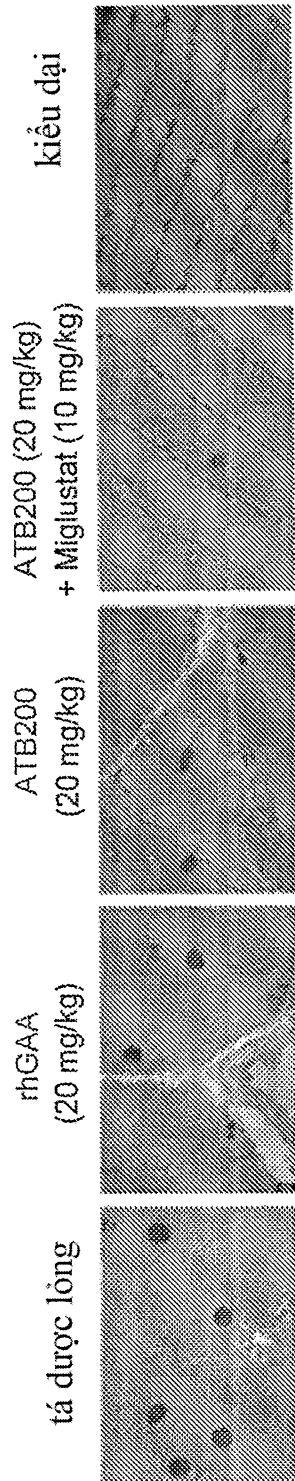
Sự nhuộm màu PAS của glycogen



Sự nhuộm màu AS-glycogen

Hình 16A

EM của mô cơ

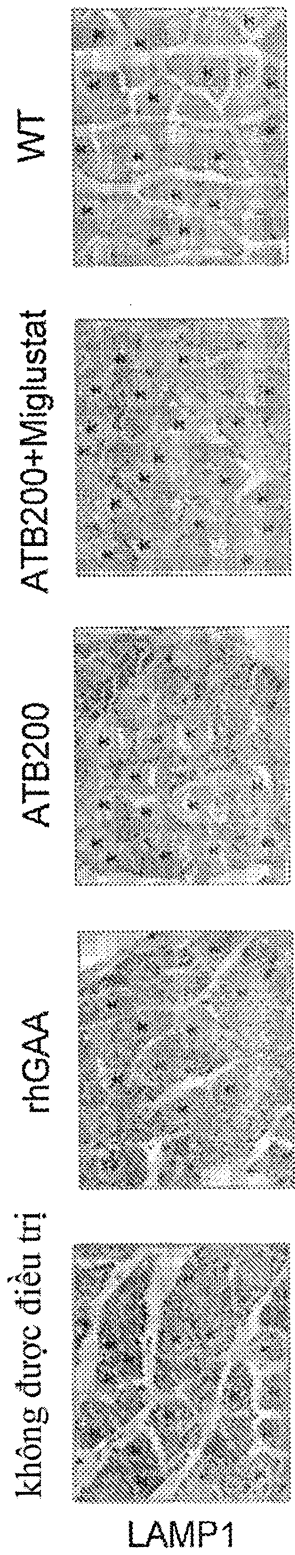


Hiện vi điện từ

Hình 16B

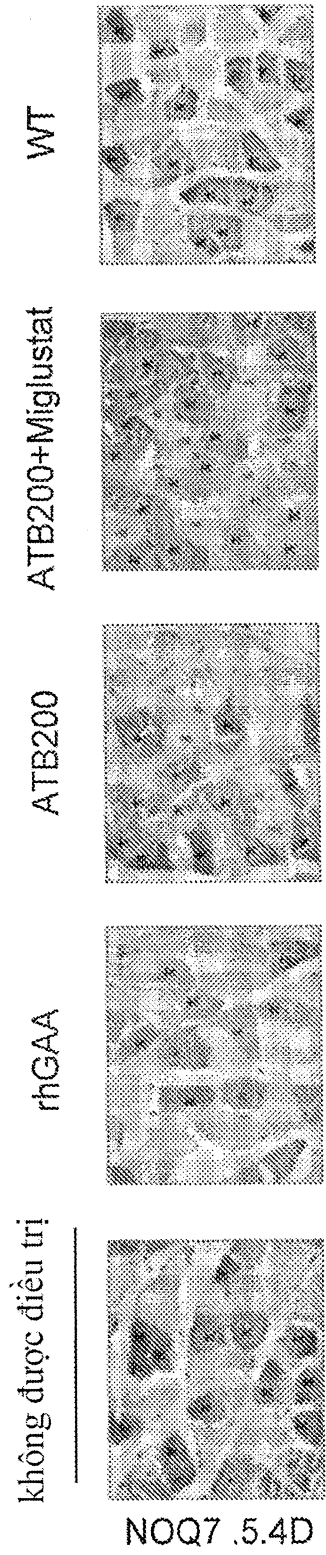
Sự nhuộm màu glycogen và EM của mô cơ xương từ các con chuột KO GAA được điều trị bằng rhGAA thông thường hoặc ATB-200 và AT2221

Đánh giá sự tăng sinh lysosom bởi chất chỉ thị LAMP-1



Hình 16C

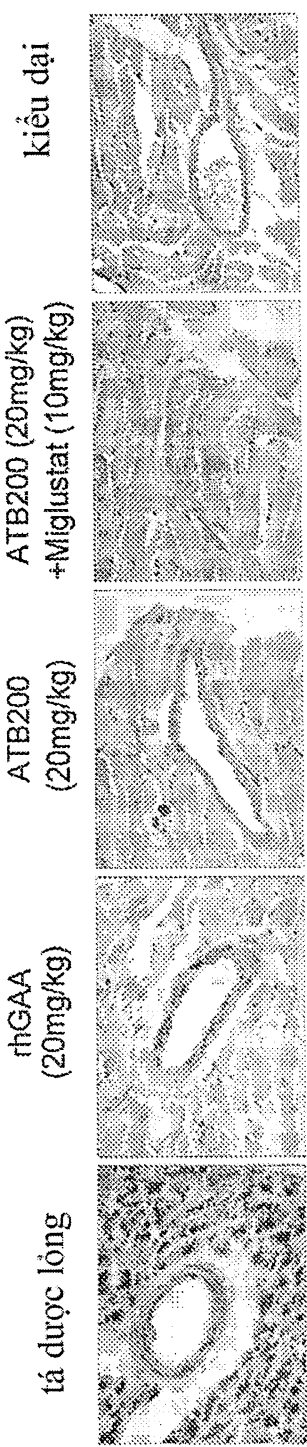
Nhận diện các sợi cơ Loại I và Loại II



Hình 16D

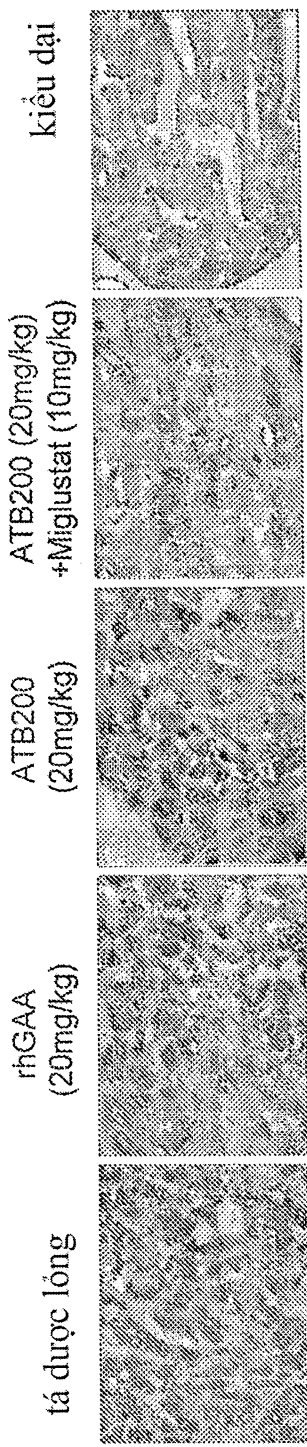
Sự nhuộm màu PAS của glycogen và EM của mô cơ tìm từ các con chuột KO GAA được điều trị bằng rhGAA thông thường hoặc rhGAA ATB-200 và Miglustat (AT-2221)

Sự nhuộm màu PAS của glycogen



Hình 17A

Đánh giá sự tăng sinh lysosom bởi chất chỉ thị LAMP-1



Hình 17B