



(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)



1-0048895

(51)⁸ A61K 38/47; A61K 31/445

(13) B

(21) 1-2018-03239

(22) 29/12/2016

(86) PCT/US2016/069243 29/12/2016

(87) WO2017/117407 A1 06/07/2017

(30) 62/272,890 30/12/2015 US; 62/300,479 26/02/2016 US; 62/315,412 30/03/2016 US;
62/402,454 30/09/2016 US; 62/428,867 01/12/2016 US; 62/431,791 08/12/2016 US;
15/394,135 29/12/2016 US

(45) 25/07/2025 448

(43) 25/10/2018 367A

(73) Amicus Therapeutics, Inc. (US)

1 Cedar Brook Drive, Cranbury, New Jersey 08512, US

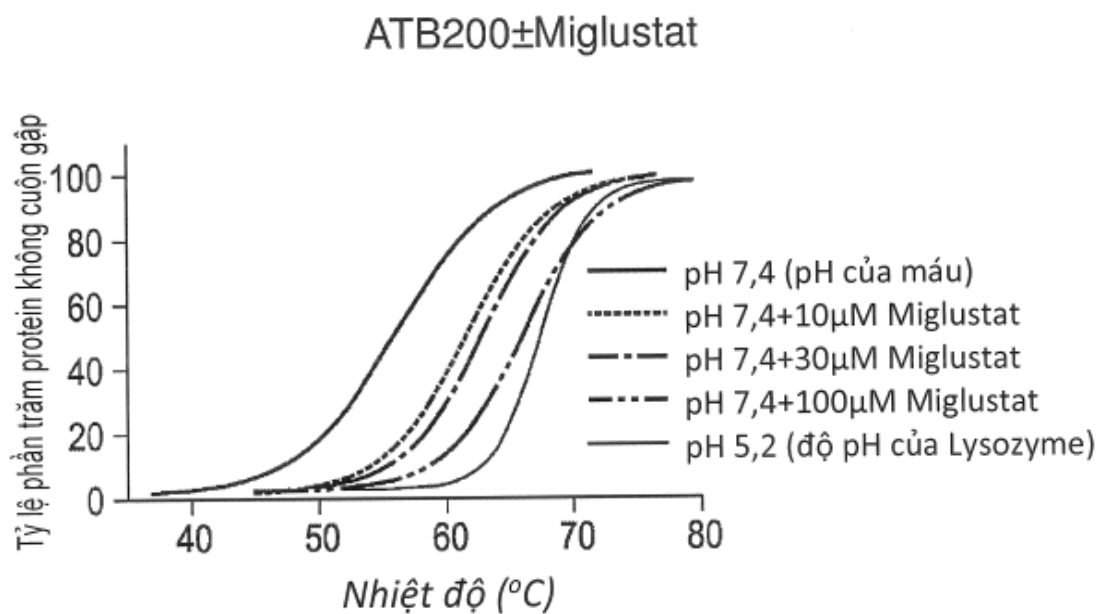
(72) DO, Hung V. (US); KHANNA, Richie (US); GOTSCHALL, Russell (US).

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

(54) KIT CHỨA AXIT ALPHA-GLUCOSIDAZA ĐỂ ĐIỀU TRỊ BỆNH POMPE

(21) 1-2018-03239

(57) Sáng chế đề cập đến axit α -glucosidaza tái tổ hợp dùng để điều trị bệnh Pompe. Ngoài ra, sáng chế còn đề cập đến kit dùng để điều trị bệnh Pompe chứa axit α -glucosidaza này.



HÌNH 1

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề xuất phương pháp điều trị bệnh Pompe bao gồm bước dùng cho cá thể hợp phần kết hợp của axit α -glucosidaza và chất đi kèm có được tính của chúng. Cụ thể hơn, sáng chế đề xuất phương pháp điều trị bệnh Pompe bao gồm bước dùng cho cá thể hợp phần kết hợp của axit α -glucosidaza tái tổ hợp ở người và miglustat.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Bệnh Pompe, còn được gọi là bệnh thiếu hụt axit maltaza hoặc bệnh dự trữ glycogen loại II, là một trong một vài rối loạn dự trữ lysosom. Rối loạn dự trữ lysosom là nhóm các bệnh di truyền lặn nhiễm sắc thể thường đặc trưng bởi sự tích lũy của các glycosphingolipit tế bào, glycogen, hoặc mucopolysacarit trong các khoang nội bào được gọi là lysosom. Các cá thể mắc bệnh này mang các gen đột biến mã hóa cho các enzym mà có khiếm khuyết trong việc xúc tác cho sự thủy phân của một hoặc nhiều chất trong số các chất này, mà sau đó tích lũy trong lysosom. Các ví dụ khác về rối loạn lysosom bao gồm bệnh Gaucher, G_{M1}-gangliosidosis, fucosidosis, mucopolysaccharidosis, bệnh Hurler-Scheie, bệnh Niemann-Pick A và B, và bệnh Fabry. Bệnh Pompe cũng được phân loại là bệnh thần kinh-cơ hoặc bệnh cơ chuyển hóa.

Ước tính bệnh Pompe xảy ra ở khoảng 1 trong 40.000 trẻ em được sinh ra, và gây ra bởi sự đột biến ở gen *GAA*, mà mã hóa cho enzym α -glucosidaza lysosom (EC:3.2.1.20), cũng thường được gọi là axit α -glucosidaza. Axit α -glucosidaza tham gia vào sự chuyển hóa glycogen, polysacarit mạch nhánh mà là dạng dự trữ chính của glucoza ở động vật, bằng cách xúc tác cho sự thủy phân glycogen thành glucoza trong lysosom. Vì các cá thể mắc bệnh Pompe tạo ra axit α -glucosidaza khiếm khuyết, đột biến mà bị bất hoạt hoặc có hoạt tính giảm, sự phân hủy glycogen xảy ra chậm hoặc không xảy ra, và glycogen tích lũy ở lysosom của các mô khác nhau, cụ thể là ở cơ vân, dẫn đến phổ rộng của các biểu hiện lâm sàng, bao gồm sự suy yếu cơ tiến triển và sự suy hô hấp. Các mô chẳng hạn như cơ tim và cơ xương đặc biệt bị ảnh hưởng.

Bệnh Pompe có thể khác nhau ở mức độ thiếu hụt enzym, độ nghiêm trọng và độ tuổi khởi phát, và hơn 500 đột biến khác nhau ở gen *GAA* đã được xác định, nhiều đột biến

trong số đó gây ra các triệu chứng bệnh có độ nghiêm trọng khác nhau. Bệnh này được phân loại thành các loại rộng: khởi phát sớm hoặc khởi phát lúc sơ sinh và khởi phát muộn. Sự khởi phát bệnh càng sớm và hoạt tính enzym càng thấp thường có liên quan đến diễn biến lâm sàng càng nghiêm trọng hơn. Bệnh Pompe sơ sinh là nghiêm trọng nhất, do sự thiếu hụt axit α -glucosidaza hoàn toàn hoặc gần hoàn toàn, và xuất hiện các triệu chứng bao gồm thiếu trương lực cơ nghiêm trọng, sự suy yếu, gan và tim phình to, và bệnh cơ tim. Lưỡi có thể trở nên phình to và lồi ra, và việc nuốt có thể trở nên khó khăn. Phần lớn trẻ em mắc bệnh tử vong vì các biến chứng hô hấp hoặc biến chứng tim trước hai tuổi. Bệnh Pompe khởi phát muộn có thể xuất hiện ở độ tuổi bất kỳ trên 12 tháng và đặc trưng bởi thiếu sự tham gia của tim và sự tiên lượng ngắn hạn tốt hơn. Các triệu chứng có liên quan đến rối loạn chức năng cơ xương tiến triển, và bao gồm sự suy yếu cơ tổng quát và sự hao kiệt của các cơ hô hấp ở thân, chi dưới vùng gần thân, và cơ hoành. Một số bệnh nhân trưởng thành không có các triệu chứng hoặc hạn chế vận động chính. Sự tiên lượng thường phụ thuộc vào phạm vi tham gia của cơ hô hấp. Hầu hết các đối tượng mắc bệnh Pompe cuối cùng tiến triển thành suy nhược thể chất cần phải sử dụng xe lăn và bộ thông khí hỗ trợ, thường bị tử vong sớm do suy hô hấp.

Các lựa chọn điều trị gần đây đối với bệnh Pompe bao gồm trị liệu thay thế enzym (ERT) với axit α -glucosidaza tái tổ hợp ở người (rhGAA). Sản phẩm rhGAA thông thường được biết với các tên gọi là alglucosidaza alfa, Myozyme® hoặc Lumizyme®; Genzyme, Inc. ERT là sự điều trị mãn tính cần thiết suốt đời của bệnh nhân, và bao gồm việc dùng enzym thay thế bằng cách truyền trong tĩnh mạch. Sau đó enzym thay thế được vận chuyển trong hệ tuần hoàn và đi vào lysosom ở trong tế bào, nơi mà nó tác động làm phá vỡ glycogen tích lũy, bù đắp cho hoạt tính bị thiếu hụt của enzym đột biến khiếm khuyết nội sinh, và do đó làm thuyên giảm các triệu chứng bệnh. Ở đối tượng mắc bệnh Pompe khởi phát lúc sơ sinh, việc điều trị bằng alglucosidaza alfa đã được chứng minh là làm cải thiện đáng kể khả năng sống so với các đối chứng trong lịch sử, và ở bệnh Pompe khởi phát muộn, alglucosidaza alfa đã được chứng minh là có tác dụng có ý nghĩa về mặt thống kê, nếu vừa phải, lên Thử Nghiệm Đi Bộ 6 Phút (6MWT) và dung tích sống gắng sức (FVC) so với giả dược.

Tuy nhiên, đa số các đối tượng vẫn ổn định hoặc tiếp tục trở nên xấu đi trong khi trải qua việc điều trị bằng alglucosidaza alfa. Lý do cho tác dụng dưới mức tối ưu biểu kiến của ERT với alglucosidaza alfa là không rõ ràng, nhưng có thể một phần là do bản chất tiến triển của bệnh lý cơ tiềm tàng, hoặc việc hướng đích vào mô kém của ERT hiện hành. Ví dụ, enzym được truyền vào không ổn định ở độ pH trung tính, bao gồm ở độ pH của huyết tương (độ pH bằng khoảng 7,4), và có thể bị bất hoạt không thể phục hồi trong hệ tuần hoàn. Ngoài ra, alglucosidaza alfa được truyền vào thể hiện sự hấp thụ không đủ ở các cơ chính có liên quan đến bệnh, có thể là do sự glycosyl hóa không thỏa đáng bằng các gốc manosa-6-phosphat (M6P). Các gốc này liên kết các thụ thể manosa-6-phosphat không phụ thuộc cation (CIMPR) ở bề mặt tế bào, cho phép enzym đi vào tế bào và lysosom bên trong. Do đó, có thể cần liều lượng enzym cao để điều trị hữu hiệu sao cho lượng đủ của enzym có hoạt tính có thể đến được lysosom, làm cho việc trị liệu tốn tiền và tốn thời gian.

Ngoài ra, sự phát triển kháng thể trung hòa kháng axit α -glucosidaza tái tổ hợp ở người thường phát triển ở các bệnh nhân mắc bệnh Pompe, do tiếp xúc lặp lại với việc điều trị. Các đáp ứng miễn dịch này có thể làm giảm nghiêm trọng sự dung chịu của bệnh nhân đối với việc điều trị. Nhãn hiệu sản phẩm Mỹ đối với alglucosidaza alfa bao gồm cảnh báo hộp màu đen với thông tin về nguy cơ tiềm tàng về phản ứng quá mẫn. Các phản ứng phản vệ đe dọa tính mạng, bao gồm sốc phản vệ, được quan sát thấy ở các đối tượng được điều trị bằng alglucosidaza alfa.

ERT thế hệ tiếp theo đang được phát triển để khắc phục các nhược điểm này. Theo một chiến lược, có thể dùng phối hợp các enzym tái tổ hợp với chất đi kèm có được tính mà có thể gây cảm ứng hoặc làm ổn định cấu hình phù hợp của enzym, để ngăn chặn hoặc làm giảm sự thoái hóa của enzym và/hoặc sự mở cuộn gấp của nó thành dạng bất hoạt, *in vitro* (ví dụ, khi dự trữ trước khi dùng) hoặc *in vivo*. Chiến lược này được mô tả trong các Công Bố Đơn Sáng Chế Quốc Tế Số WO 2004/069190, WO 2006/125141, WO 2013/166249 và WO 2014/014938.

Các kết quả thử nghiệm lâm sàng của việc dùng phối hợp alglucosidaza alfa với miglustat cho bệnh nhân mắc bệnh Pompe đã được mô tả. Trong thử nghiệm lâm sàng được tiến hành ở 13 đối tượng mắc bệnh Pompe (3 đối tượng khởi phát sớm (lúc sơ sinh) và 10 đối tượng khởi phát muộn) tại 4 trung tâm điều trị ở Ý, từ 20 đến 40 mg/kg alglucosidaza

alfa được dùng một mình và sau đó dùng phối hợp với 4 liều 80 mg miglustat. Các kết quả của nghiên cứu này cho thấy sự bộc lộ hoạt tính axit α -glucosidaza tăng trung bình 6,8 lần (được đo theo tham số dược động học AUC (diện tích dưới đường cong nồng độ so với thời gian)) đối với việc dùng phối hợp so với dùng alglucosidaza alfa một mình (Parenti, G., G. Andria, et al. (2015). "Lysosomal Storage Diseases: From Pathophysiology to Therapy." Annu. Rev. Med. **66**(1): 471-486). Ngoài ra, nghiên cứu được tiến hành tại Đại học Florida đánh giá dược động học (PK) của miglustat trong huyết tương khi dùng phối hợp với việc truyền alglucosidaza alfa trong tĩnh mạch cho các đối tượng mắc bệnh Pompe (Doerfler, P. A., J. S. Kelley, et al. (2014). "Pharmacological chaperones prevent the precipitation of rhGAA by anti-GAA antibodies during enzyme replacement therapy." Mol. Genet. Metab. **111**(2): S38).

Tuy nhiên, vẫn cần có sự cải thiện thêm đối với việc trị liệu thay thế enzym để điều trị bệnh Pompe. Ví dụ, điều mong muốn là có các enzym axit α -glucosidaza tái tổ hợp ở người mới mà có thể có một hoặc nhiều ưu điểm so với các enzym được sử dụng hiện nay, bao gồm nhưng không giới hạn ở sự hấp thụ mô được cải thiện, hoạt tính enzym được cải thiện, độ ổn định được cải thiện hoặc khả năng gây miễn dịch giảm.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề xuất phương pháp điều trị bệnh Pompe ở bệnh nhân cần chúng, phương pháp này bao gồm bước dùng miglustat cho bệnh nhân kết hợp với axit α -glucosidaza tái tổ hợp ở người (rhGAA), trong đó axit α -glucosidaza tái tổ hợp ở người được biểu hiện ở tế bào trứng chuột đồng Trung Quốc (CHO) và có chứa hàm lượng tăng của đơn vị N-glycan mang một hoặc hai gốc manoz-6-phosphat khi so với hàm lượng của đơn vị N-glycan mang một hoặc hai gốc manoz-6-phosphat của alglucosidaza alfa. Theo ít nhất một phương án, axit α -glucosidaza tái tổ hợp ở người được dùng trong tĩnh mạch ở liều lượng bằng khoảng 20 mg/kg và miglustat được dùng qua đường miệng ở liều lượng bằng khoảng 260 mg.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất hợp phần kết hợp của miglustat và axit α -glucosidaza tái tổ hợp ở người như được xác định trong bản mô tả này để điều trị bệnh Pompe ở bệnh nhân cần chúng.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất việc sử dụng hợp phần kết hợp của miglustat và axit α -glucosidaza tái tổ hợp ở người như được xác định trong bản mô tả này trong việc điều chế chất để điều trị bệnh Pompe ở bệnh nhân cần chúng.

Khía cạnh khác của sáng chế đề xuất bộ kit để trị liệu kết hợp đối với bệnh Pompe ở bệnh nhân cần chúng, bộ kit này bao gồm dạng liều lượng được dụng chứa miglustat, dạng liều lượng được dụng chứa axit α -glucosidaza tái tổ hợp ở người như được xác định trong bản mô tả này, và hướng dẫn sử dụng dạng liều lượng được dụng chứa miglustat và dạng liều lượng được dụng chứa axit α -glucosidaza tái tổ hợp cho bệnh nhân cần chúng.

Mô Tả Vắn Tắt Các Hình Vẽ

Các dấu hiệu khác của sáng chế trở nên rõ ràng từ phần mô tả bằng văn bản viết dưới đây và các hình kèm theo, trong đó:

Hình 1 là biểu đồ thể hiện tỷ lệ phần trăm của protein ATB200 không cuộn gập ở các giá trị độ pH khác nhau và trong sự có mặt và không có mặt của miglustat theo nhiệt độ;

Hình 2A và Hình 2B, lần lượt, thể hiện các 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 thông qua glycan có chứa M6P thành CIMPR. Như được thể hiện trên Hình 2A, 78% hoạt tính GAA trong Lumizyme® được rửa giải trước khi bổ sung M6P. Hình 2B cho thấy 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 này thiếu glycan có M6P cần cho sự hấp thụ trong tế bào và hướng đích lysosom.

Hình 3 thể hiện cấu trúc ADN để biến nạp vào các tế bào CHO có ADN mã hóa cho rhGAA. Các tế bào CHO được biến nạp bằng cấu trúc ADN mã hóa cho rhGAA.

Hình 4A và Hình 4B lần lượt thể hiện các kết quả của sắc ký ái lực CIMPR của rhGAA Myozyme® và rhGAA ATB200. Như thấy rõ ràng từ Hình 4B, khoảng 70% rhGAA trong rhGAA ATB200 có chứa M6P.

Hình 5A và Hình 5B thể hiện các kết quả của sắc ký ái lực CIMPR của rhGAA ATB200 bị bắt giữ và không bị bắt giữ trên cột trao đổi anion (AEX).

Hình 6 thể hiện các biên dạng rửa giải Polywax của rhGAA Lumizyme® và rhGAA ATB200.

Hình 7 thể hiện tóm tắt các cấu trúc N-glycan của Lumizyme® so với ba chế phẩm khác nhau của rhGAA ATB200, được ký hiệu là BP-rhGAA, ATB200-1 và ATB200-2.

Các hình vẽ từ Hình 8A đến Hình 8H thể hiện kết quả của phân tích sự N-glycosyl hóa đặc hiệu vị trí của rhGAA ATB200.

Hình 9A so sánh ái lực liên kết CIMPR của rhGAA ATB200 (đường bên trái) với ái lực liên kết CIMPR của Lumizyme® (đường bên phải).

Hình 9B so sánh hàm lượng Bis-M6P của Lumizyme® và rhGAA ATB200.

Hình 10A so sánh hoạt tính rhGAA ATB200 (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 10B so sánh hoạt tính rhGAA ATB200 (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 10C so sánh ($K_{\text{hấp thụ}}$) của nguyên bào sợi từ đối tượng bình thường và đối tượng mắc Bệnh Pompe.

Hình 11 là biểu đồ thể hiện độ phù hợp của mô hình dược động học (PK) quần thể đối với ATB200;

Hình 12 là biểu đồ thể hiện biên dạng nồng độ trong huyết tương đã chuẩn hóa liều lượng theo thời gian của miglustat và duvoglustat;

Hình 13A là biểu đồ thể hiện độ phù hợp của mô hình PK quần thể đối với duvoglustat trong huyết tương;

Hình 13B là biểu đồ thể hiện độ phù hợp của mô hình PK quần thể đối với duvoglustat trong mô cơ;

Hình 14 là biểu đồ thể hiện độ phù hợp của mô hình PK quần thể đối với miglustat;

Hình 15 là biểu đồ thể hiện biên dạng nồng độ-thời gian được dự đoán thu được từ việc truyền liều lượng trong tĩnh mạch 20 mg/kg đơn lẻ của ATB200 ở người trong thời gian 4 giờ;

Hình 16A là biểu đồ thể hiện lượng glycogen tương quan với liều lượng axit α -glucosidaza tái tổ hợp ở người trong cơ tim chuột sau khi tiếp xúc với tá dược lỏng (đối chứng âm), với 20 mg/kg alglucosidaza alfa (Lumizyme®), hoặc với 5, 10 hoặc 20 mg/kg ATB200;

Hình 16B là biểu đồ thể hiện lượng glycogen tương quan với liều lượng axit α -glucosidaza tái tổ hợp ở người trong cơ tứ đầu đuôi chuột sau khi tiếp xúc với tá dược lỏng (đối chứng âm), với 20 mg/kg alglucosidaza alfa (Lumizyme®), hoặc với 5, 10 hoặc 20 mg/kg ATB200;

Hình 16C là biểu đồ thể hiện lượng glycogen tương quan với liều lượng axit α -glucosidaza tái tổ hợp ở người trong cơ tam đầu đuôi ở chuột sau khi tiếp xúc với tá dược lỏng (đối chứng âm), với 20 mg/kg alglucosidaza alfa (Lumizyme®), hoặc với 5, 10 hoặc 20 mg/kg ATB200;

Hình 17 là biểu đồ thể hiện đồ thị tỷ lệ của hàm lượng glycogen ở chuột được điều trị bằng các liều lượng miglustat khác nhau trong sự có mặt của ATB200 với hàm lượng glycogen ở chuột được điều trị bằng một mình ATB200 so với tỷ lệ của giá trị AUC của miglustat với giá trị AUC của ATB200;

Hình 18 là biểu đồ thể hiện biên dạng nồng độ-thời gian được dự đoán của miglustat trong huyết tương sau khi dùng liều lượng lặp lại của các liều lượng bằng 466 mg, 270 mg và 233 mg của miglustat;

Hình 19 là biểu đồ thể hiện biên dạng nồng độ-thời gian được dự đoán của miglustat trong huyết tương sau khi dùng liều lượng lặp lại của các liều lượng bằng 466 mg, 270 mg và 233 mg của miglustat;

Hình 20 là dãy ảnh chụp hiển vi của cơ tim, cơ hoành và cơ dóp từ chuột kiểu đại và chuột đã bị làm bất hoạt *Gaa* được điều trị bằng tá dược lỏng, alglucosidaza alfa và

ATB200 trong sự có mặt và không có mặt của miglustat, thể hiện hàm lượng của protein màng liên kết lysosom (LAMP1);

Hình 21 là dãy ảnh chụp hiển vi của cơ tim và cơ dế từ chuột kiểu đại và chuột đã bị làm bất hoạt *Gaa* được điều trị bằng tá dược lỏng, alglucosidaza alfa và ATB200 trong sự có mặt và không có mặt của miglustat, thể hiện hàm lượng glycogen bằng cách nhuộm màu bằng axit periodic – chất phản ứng Schiff (PAS);

Hình 22 là dãy ảnh chụp hiển vi (1000x) của cơ tứ đầu đùi từ chuột kiểu đại và chuột đã bị làm bất hoạt *Gaa* được điều trị bằng tá dược lỏng, alglucosidaza alfa và ATB200 trong sự có mặt và không có mặt của miglustat, được nhuộm màu bằng xanh metylen để thể hiện không bào (được chỉ ra bằng mũi tên);

Hình 23 là dãy ảnh chụp hiển vi (400x) của cơ tứ đầu đùi từ chuột kiểu đại và chuột đã bị làm bất hoạt *Gaa* được điều trị bằng tá dược lỏng, alglucosidaza alfa và ATB200 trong sự có mặt và không có mặt của miglustat, thể hiện hàm lượng của các chỉ thị tự tiêu thể liên hợp protein liên kết vi ống 1A/1B-chuỗi nhẹ 3 phosphatidyletanolamin (LC3A II) và p62, chất vận chuyển glucoza phụ thuộc insulin GLUT4 và chất vận chuyển glucoza không phụ thuộc insulin GLUT1;

Các hình vẽ từ Hình 24A đến Hình 24D là các biểu đồ thể hiện các biên dạng nồng độ-thời gian của hoạt tính GAA trong huyết tương ở các đối tượng là người sau khi dùng liều lượng 5, 10 hoặc 20 mg/kg ATB200, hoặc 20 mg/kg ATB200 và 130 hoặc 260 mg miglustat;

Các hình vẽ từ Hình 25A đến Hình 25D là các biểu đồ thể hiện các biên dạng nồng độ-thời gian của tổng số protein GAA trong huyết tương ở các đối tượng là người sau khi dùng liều lượng 5, 10 hoặc 20 mg/kg ATB200, 20 mg/kg ATB200 và 130 mg miglustat, hoặc 20 mg/kg ATB200 và 260 mg miglustat;

Hình 26 là biểu đồ thể hiện các biên dạng nồng độ-thời gian của miglustat trong huyết tương ở các đối tượng là người sau khi dùng liều lượng 130 mg hoặc 260 mg miglustat;

Hình 27 là dãy ảnh hiển vi miễn dịch huỳnh quang của hàm lượng GAA và LAMP1 trong nguyên bào sợi kiểu đại và nguyên bào sợi Pompe;

Hình 28 là dãy ảnh chụp hiển vi của sợi cơ từ chuột kiểu đại và chuột đã bị làm bất hoạt *Gaa* thể hiện hàm lượng của dystrophin, α - và β -dystroglycan, và dysferlin;

Hình 29A và Hình 29B là dãy ảnh chụp hiển vi (200x) của các sợi cơ của cơ thẳng đùi (RF) và cơ rộng ngoài/cơ rộng trong (VL/VM) từ chuột kiểu đại và chuột đã bị làm bất hoạt *Gaa* được điều trị bằng tá dược lỏng, alglucosidaza alfa và ATB200 trong sự có mặt và không có mặt của miglustat, thể hiện tín hiệu IHC LAMP1;

Hình 30A và Hình 30B là dãy ảnh chụp hiển vi (200x) của các sợi cơ của RF và VL/VM từ chuột kiểu đại và chuột đã bị làm bất hoạt *Gaa* được điều trị bằng tá dược lỏng, alglucosidaza alfa và ATB200 trong sự có mặt và không có mặt của miglustat, thể hiện tín hiệu IHC LC3 II;

Hình 31A và Hình 31B là dãy ảnh chụp hiển vi (200x) của các sợi cơ của RF và VL/VM từ chuột kiểu đại và chuột đã bị làm bất hoạt *Gaa* được điều trị bằng tá dược lỏng, alglucosidaza alfa và ATB200 trong sự có mặt và không có mặt của miglustat, thể hiện tín hiệu IHC dysferlin;

Các hình vẽ từ Hình 32A đến Hình 32D là các biểu đồ thể hiện hàm lượng glycogen ở tế bào của cơ tứ đầu đùi, cơ tam đầu đùi, cơ sinh đôi cẳng chân và tim từ chuột kiểu đại và chuột đã bị làm bất hoạt *Gaa* được điều trị bằng tá dược lỏng, alglucosidaza alfa và ATB200 trong sự có mặt và không có mặt của miglustat;

Hình 33A và Hình 33B là các biểu đồ thể hiện dữ liệu cơ bàn tay dây và lực nắm giữ đối với chuột kiểu đại và chuột đã bị làm bất hoạt *Gaa* được điều trị bằng tá dược lỏng, alglucosidaza alfa và ATB200 trong sự có mặt của miglustat;

Các hình vẽ từ Hình 34A đến Hình 34G là các biểu đồ thể hiện hàm lượng glycogen trong cơ tứ đầu đùi, cơ tam đầu đùi và tế bào tim từ chuột kiểu đại và chuột đã bị làm bất hoạt *Gaa* được điều trị bằng tá dược lỏng, alglucosidaza alfa và ATB200 trong sự có mặt và không có mặt của miglustat;

Hình 35 là dãy ảnh chụp hiển vi của các sợi cơ của VL/VM từ chuột kiểu đại và chuột đã bị làm bất hoạt *Gaa* được điều trị bằng tá dược lỏng, alglucosidaza alffa và ATB200 trong sự có mặt và không có mặt của miglustat, thể hiện tín hiệu IHC LAMP1, LC3 và dysferlin;

Hình 36 là biểu đồ thể hiện các biên dạng nồng độ-thời gian của hoạt tính GAA trong huyết tương ở chuột đã bị làm bất hoạt *Gaa* sau khi dùng hai mẻ ATB200 có hàm lượng axit sialic khác nhau;

Các hình vẽ từ Hình 37A đến Hình 37D là các biểu đồ thể hiện hàm lượng glycogen ở tế bào của cơ tứ đầu đùi, cơ tam đầu đùi, cơ sinh đôi cẳng chân và tim từ chuột kiểu đại và chuột đã bị làm bất hoạt *Gaa* được điều trị bằng tá dược lỏng, alglucosidaza alfa và ATB200;

Hình 38 là biểu đồ thể hiện hàm lượng của alanin aminotransferaza (ALT) ở người bệnh sau khi dùng liều lượng ATB200 tăng dần (5, 10 và 20 mg/kg) sau đó dùng phối hợp ATB200 (20 mg/kg) và miglustat (130 và 260 mg);

Hình 39 là biểu đồ thể hiện hàm lượng của aspartat aminotransferaza (AST) ở người bệnh sau khi dùng liều lượng ATB200 tăng dần (5, 10 và 20 mg/kg) sau đó dùng phối hợp ATB200 (20 mg/kg) và miglustat (130 và 260 mg);

Hình 40 là biểu đồ thể hiện hàm lượng của creatin phosphokinaza (CPK) ở người bệnh sau khi dùng liều lượng ATB200 tăng dần (5, 10 và 20 mg/kg) sau đó dùng phối hợp ATB200 (20 mg/kg) và miglustat (130 và 260 mg);

Hình 41 là biểu đồ thể hiện hàm lượng của ALT, AST và CPK trung bình ở người bệnh sau khi dùng liều lượng ATB200 tăng dần (5, 10 và 20 mg/kg) sau đó dùng phối hợp ATB200 (20 mg/kg) và miglustat (130 và 260 mg); và

Hình 42 là dãy ảnh chụp hiển vi (100x và 200x) của các sợi cơ của cơ rộng ngoài (VL) từ chuột kiểu đại và chuột đã bị làm bất hoạt *Gaa* được điều trị bằng tá dược lỏng, alglucosidaza alfa và ATB200 trong sự có mặt và không có mặt của miglustat, thể hiện tín hiệu dystrophin.

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 nơi khác trong bản mô tả này, để cung cấp hướng dẫn bổ sung cho người thực hành.

Trong bản mô tả sáng chế này, trừ khi ngữ cảnh yêu cầu nghĩa khác do ngôn ngữ diễn đạt hoặc ngụ ý cần thiết, từ "có chứa", hoặc các dạng cải biến chẳng hạn như "chứa" hoặc "đang chứa" được sử dụng theo nghĩa bao hàm tức là để chỉ rõ sự có mặt các dấu hiệu được nêu nhưng không loại trừ sự có mặt hoặc sự bổ sung của các dấu hiệu khác trong các phương án khác nhau của sáng chế.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "bệnh Pompe," còn được gọi là bệnh thiếu hụt axit maltaza, bệnh dự trữ glycogen loại II (GSDII), và bệnh glycogenosis loại II, được dự định là để chỉ rối loạn dự trữ lysosom di truyền đặc trưng bởi sự đột biến ở gen *GAA*, mã hóa cho enzym axit α -glucosidaza ở người. Thuật ngữ này bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở các dạng khởi phát sớm và khởi phát muộn, bao gồm nhưng không giới hạn ở bệnh Pompe khởi phát lúc sơ sinh, lúc thiếu niên và lúc trưởng thành.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "axit α -glucosidaza" nhằm để chỉ enzym lysosom mà thủy phân liên kết α -1,4 giữa các đơn vị D-glucosa của glycogen, maltoza, và isomaltoza. Các tên thay thế bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở α -glucosidaza (EC:3.2.1.20); glucoamylaza; 1,4- α -D-glucan glucohydrolaza; amyloglucosidaza; gamma-amylaza và exo-1,4- α -glucosidaza ở lysosom. Axit α -glucosidaza người được mã hóa bởi gen *GAA* (Trung Tâm Thông Tin Công Nghệ Sinh Học Quốc Gia (National Centre for Biotechnology Information - NCBI) ID Gen 2548), mà đã được lập bản đồ vào nhánh dài của nhiễm sắc thể 17 (vị trí 17q25.2-q25.3). Hiện nay đã xác định được hơn 500 đột biến ở gen *GAA* người, nhiều đột biến trong số đó có liên quan đến bệnh Pompe. Các đột biến dẫn đến sự cuộn gập sai hoặc xử lý nhầm của enzym axit α -glucosidaza bao gồm T1064C (Leu355Pro) và C2104T (Arg702Cys). Ngoài ra, đột biến *GAA* mà ảnh hưởng đến sự trưởng thành và sự xử lý của enzym bao gồm Leu405Pro và Met519Thr. Hexapeptit được bảo toàn WIDMNE ở các gốc axit amin từ 516 đến 521 cần thiết cho hoạt tính của protein axit α -glucosidaza. Như được sử dụng trong bản mô tả này, chữ viết tắt "GAA" nhằm để chỉ enzym axit α -glucosidaza, trong khi chữ viết tắt in nghiêng "*GAA*" nhằm để chỉ gen ở người mã hóa cho enzym axit α -glucosidaza ở người. Chữ viết tắt in nghiêng "*Gaa*" nhằm để chỉ gen không ở người mã hóa cho enzym axit α -glucosidaza không ở người, bao gồm nhưng không giới hạn ở gen ở chuột hoặc gen ở chuột nhắt, và chữ viết tắt "Gaa" nhằm để chỉ

enzym axit α -glucosidaza không ở người. Do đó, chữ viết tắt "rhGAA" nhằm để chỉ enzym axit α -glucosidaza tái tổ hợp ở người.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "alglucosidaza alfa" nhằm để chỉ axit α -glucosidaza tái tổ hợp ở người được ký hiệu là [199-arginin,223-histidin]prepro- α -glucosidaza (ở người); Số Đăng Ký Tóm Tắt Hóa Chất 420794-05-0. Alglucosidaza alfa được chấp thuận để đưa ra thị trường ở Hoa Kỳ bởi Genzyme, kể từ ngày 1 tháng 10 năm 2014, dưới dạng các sản phẩm Lumizyme® và Myozyme®.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "ATB200" nhằm để chỉ axit α -glucosidaza tái tổ hợp ở người được mô tả trong đơn sáng chế đồng tồn tại PCT/US2015/053252, phần bộc lộ của chúng được viện dẫn trong bản mô tả này để tham khảo.

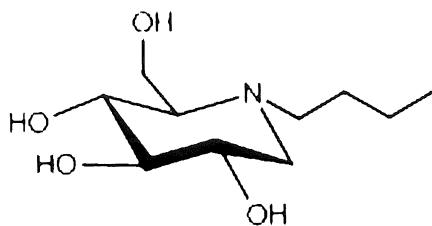
Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "glycan" nhằm để chỉ chuỗi polysacarit liên kết cộng hóa trị với gốc axit amin trên protein hoặc polypeptit. Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "N-glycan" hoặc "glycan được liên kết N" nhằm để chỉ chuỗi polysacarit gắn vào gốc axit amin trên protein hoặc polypeptit thông qua liên kết cộng hóa trị với nguyên tử nitơ của gốc axit amin này. Ví dụ, N-glycan có thể được liên kết cộng hóa trị với nguyên tử nitơ chuỗi bên của gốc asparagin. Glycan có thể có chứa một hoặc một vài đơn vị monosacarit, và các đơn vị monosacarit có thể được liên kết cộng hóa trị để tạo chuỗi mạch thẳng hoặc chuỗi mạch nhánh. Theo ít nhất một phương án, các đơn vị N-glycan gắn vào ATB200 có thể chứa một hoặc nhiều đơn vị monosacarit mà mỗi đơn vị monosacarit này được chọn độc lập từ N-acetylglucosamin, manosa, galactosa hoặc axit sialic. Có thể xác định các đơn vị N-glycan trên protein bằng kỹ thuật phân tích thích hợp bất kỳ, chẳng hạn như đo phổ khối. Theo một số phương án, các đơn vị N-glycan có thể được xác định bằng đo phổ khối nối tiếp sắc ký lỏng ghép (LC-MS/MS) bằng cách sử dụng thiết bị chẳng hạn như Khối Phổ Kế Thermo Scientific Orbitrap Velos Pro™, Khối Phổ Kế Thermo Scientific Orbitrap Fusion Lumos Tribid™ hoặc Khối Phổ Kế Waters Xevo® G2-XS QToF.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "N-glycan manosa cao" nhằm để chỉ N-glycan có từ một đến sáu đơn vị manosa hoặc nhiều hơn. Theo ít nhất một phương án,

đơn vị N-glycan mannoza cao có thể có chứa chuỗi bis(N-acetylglucosamin) liên kết với gốc asparagin và còn liên kết với chuỗi polymannoza phân nhánh. Như được sử dụng thay thế lẫn nhau trong bản mô tả này, thuật ngữ "M6P" hoặc "mannoza-6-phosphat" nhằm để chỉ đơn vị mannoza được phosphoryl hóa tại vị trí 6; tức là có nhóm phosphat liên kết với nhóm hydroxyl tại vị trí 6. Theo ít nhất một phương án, một hoặc nhiều đơn vị mannoza của một hoặc nhiều đơn vị N-glycan được phosphoryl hóa tại vị trí 6 để tạo ra đơn vị mannoza-6-phosphat. Theo ít nhất một phương án, thuật ngữ "M6P" hoặc "mannoza-6-phosphat" dùng để chỉ cả mannoza phosphodiester có N-acetylglucosamin (GlcNAc) làm "mũ" trên nhóm phosphat, cũng như là đơn vị mannoza có nhóm phosphat lộ ra mà thiếu mũ GlcNAc. Theo ít nhất một phương án, các N-glycan của protein có thể có nhiều nhóm M6P, với ít nhất một nhóm M6P có mũ GlcNAc và ít nhất một nhóm M6P khác thiếu mũ GlcNAc.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "N-glycan phức hợp" nhằm để chỉ N-glycan có chứa một hoặc nhiều đơn vị galactoza và/hoặc đơn vị axit sialic. Theo ít nhất một phương án, N-glycan phức hợp có thể là N-glycan mannoza cao trong đó một hoặc nhiều đơn vị mannoza còn liên kết với một hoặc nhiều đơn vị monosacarit mà mỗi đơn vị monosacarit được chọn độc lập từ N-acetylglucosamin, galactoza và axit sialic.

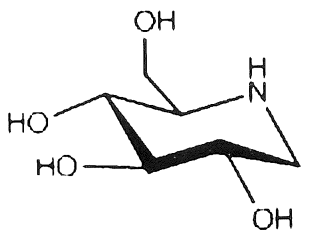
Như được sử dụng trong bản mô tả này, hợp chất miglustat, còn được gọi là N-butyl-1-đeoxynojirimyxin hoặc NB-DNJ hoặc (2R,3R,4R,5S)-1-butyl-2-(hydroxymetyl)piperidin-3,4,5-triol, là hợp chất có công thức hóa học sau đây:



Một chế phẩm của miglustat được tiếp thị trên thị trường với tên thương mại là Zavesca® dưới dạng đơn trị liệu đối với bệnh Gaucher loại 1.

Như được thảo luận dưới đây, cũng có thể sử dụng các muối được dụng của miglustat trong sáng chế này. Khi sử dụng muối của miglustat, liều lượng muối sẽ được điều chỉnh sao cho liều lượng miglustat được bệnh nhân tiếp nhận tương đương với lượng mà đã được tiếp nhận có bazơ không chứa miglustat được sử dụng.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, hợp chất duvoglustat, còn được gọi là 1-đeoxynojirimyxin hoặc DNJ hoặc (2*R*,3*R*,4*R*,5*S*)- 2-(hydroxymetyl)piperidin-3,4,5-triol, là hợp chất có công thức hóa học sau đây:



Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "chất đi kèm có được tính" hoặc đôi khi đơn giản là thuật ngữ "chất đi kèm" nhằm để chỉ phân tử mà liên kết đặc hiệu với axit α -glucosidaza và có một hoặc nhiều tác dụng trong số các tác dụng sau đây:

- tăng cường sự tạo thành cấu hình phân tử ổn định của protein;
- tăng cường sự vận chuyển phù hợp của protein từ mạng lưới

nội chất đến vị trí khác trong tế bào, tốt hơn là vị trí tế bào tự nhiên, để ngăn ngừa sự phân hủy protein kết hợp trên mạng lưới nội chất;

- ngăn ngừa sự kết tụ của protein không ổn định về mặt cấu hình hoặc protein bị cuộn gập sai;
- khôi phục và/hoặc tăng cường ít nhất một phần chức năng kiểu đại, độ ổn định, và/hoặc hoạt tính của protein; và/hoặc
- cải thiện kiểu hình hoặc chức năng của tế bào chứa axit α -glucosidaza.

Do đó, chất đi kèm có được tính đối với axit α -glucosidaza là phân tử mà liên kết với axit α -glucosidaza, dẫn đến việc cuộn gập, việc vận chuyển, sự không kết tụ, và hoạt tính phù hợp của axit α -glucosidaza. Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ này bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở chất đi kèm đặc hiệu vị trí có hoạt tính (ASSC) mà liên kết ở vị trí hoạt tính của enzym, chất ức chế hoặc chất đối kháng, và chất chủ vận. Theo ít nhất một phương án, chất đi kèm có được tính có thể là chất ức chế hoặc chất đối kháng của axit α -glucosidaza. Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "chất đối kháng" nhằm để chỉ phân tử bất kỳ mà liên kết với axit α -glucosidaza và phong bế, ức chế, làm giảm, hoặc trung hòa một phần hoặc hoàn toàn hoạt tính của axit α -glucosidaza. Theo ít nhất một

phương án, chất đi kèm có được tính là miglustat. Ví dụ khác không làm giới hạn sáng chế về chất đi kèm có được tính đối với axit α -glucosidaza là duvoglustat.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "vị trí hoạt tính" nhằm để chỉ vùng của protein mà có liên quan đến và cần thiết cho hoạt tính sinh học đặc hiệu của protein. Theo ít nhất một phương án, vị trí hoạt tính có thể là vị trí mà liên kết cơ chất hoặc đối tác liên kết khác và đóng góp các gốc axit amin mà tham gia trực tiếp vào việc tạo ra và phá vỡ các liên kết hóa học. Vị trí hoạt tính theo sáng chế này có thể bao hàm vị trí xúc tác của enzyme, vị trí liên kết kháng nguyên của kháng thể, miền liên kết phối tử của thụ thể, miền liên kết của chất điều hòa, hoặc miền liên kết thụ thể của protein được tiết ra. Vị trí hoạt tính cũng có thể bao hàm sự hoạt hóa chéo, sự tương tác protein-protein, hoặc miền liên kết ADN của các yếu tố phiên mã và các chất điều hòa.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "AUC" nhằm để chỉ phép tính toán học để đánh giá toàn bộ sự phơi nhiễm của cơ thể theo thời gian đối với thuốc được dùng. Trong biểu đồ lập đồ thị về nồng độ trong máu của thuốc được dùng cho đối tượng thay đổi theo thời gian như thế nào sau khi dùng liều lượng, biến số nồng độ thuốc nằm trên trục y và thời gian nằm trên trục x. Diện tích giữa đường cong nồng độ thuốc và trục x trong khoảng thời gian xác định là AUC ("area under the curve" - "diện tích dưới đường cong"). AUC được sử dụng làm chỉ dẫn cho các chế độ liều lượng và để so sánh sinh khả dụng của độ khả dụng của các thuốc khác nhau trong cơ thể.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ " $C_{\text{lớn nhất}}$ " nhằm để chỉ nồng độ thuốc trong huyết tương lớn nhất đạt được sau khi dùng cho đối tượng.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "thể tích phân bố" hoặc "V" nhằm để chỉ thể tích lý thuyết cần thiết để chứa tổng lượng thuốc đã dùng ở cùng nồng độ mà nó được quan sát thấy trong huyết tương, và thể hiện mức độ mà thuốc được phân phối trong mô cơ thể thay vì huyết tương. Giá trị V càng cao biểu thị mức độ phân phối ở mô càng lớn. "Thể tích phân bố trung tâm" hoặc " V_c " nhằm để chỉ thể tích phân bố trong máu và các mô được tràn ngập ở mức độ cao bởi máu. "Thể tích phân bố ngoại vi" hoặc " V_2 " nhằm để chỉ thể tích phân bố trong mô ngoại vi.

Như được sử dụng thay thế lẫn nhau trong bản mô tả này, các thuật ngữ "độ thanh thải", "độ thanh thải toàn thân" hoặc "CL" nhằm để chỉ thể tích huyết tương mà được thanh thải hoàn toàn khỏi thuốc đã dùng trong một đơn vị thời gian. "Độ thanh thải ngoại vi" nhằm để chỉ thể tích mô ngoại vi mà được thanh thải khỏi thuốc đã dùng trong một đơn vị thời gian.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, "liều lượng hữu hiệu để điều trị" và "lượng hữu hiệu" nhằm để chỉ lượng của axit α -glucosidaza và/hoặc miglustat và/hoặc hợp phần kết hợp của chúng, mà đủ để tạo nên đáp ứng trị liệu ở đối tượng. Đáp ứng trị liệu có thể là đáp ứng bất kỳ mà người sử dụng (ví dụ, chuyên viên lâm sàng) công nhận là đáp ứng hữu hiệu đối với trị liệu, bao gồm chỉ thị lâm sàng đại diện bất kỳ hoặc các triệu chứng được mô tả trong bản mô tả này và đã biết trong lĩnh vực. Do đó, theo ít nhất một phương án, đáp ứng trị liệu có thể là sự cải thiện hoặc sự ức chế của một hoặc nhiều triệu chứng hoặc chỉ thị của bệnh Pompe chẳng hạn như các triệu chứng hoặc chỉ thị đã biết trong lĩnh vực. Các triệu chứng hoặc chỉ thị của bệnh Pompe bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở hoạt tính mô axit α -glucosidaza giảm; bệnh cơ tim; bệnh tim to; sự suy yếu cơ tiến triển, đặc biệt là ở thân hoặc chi dưới; giảm trương lực cơ sâu; bệnh phổi đại lồi (và trong một số trường hợp, sự lồi ra của lồi); khó nuốt, bú, và/hoặc cho ăn; suy hô hấp; chứng gan to (mức trung bình); chứng yếu cơ mặt; chứng mất phản xạ; không chịu được luyện tập; chứng khó thở khi gắng sức; chứng khó thở khi nằm; ngưng thở khi ngủ; đau đầu buổi sáng; tình trạng mơ màng; tụt ưỡn cột sống và/hoặc vẹo cột sống; phản xạ gân sâu giảm; chứng đau lưng dưới; và không đáp ứng được các cột mốc vận động phát triển. Cần lưu ý rằng nồng độ miglustat mà có tác dụng ức chế lên axit α -glucosidaza có thể cấu thành "lượng hữu hiệu" để đạt được mục đích của sáng chế bởi vì độ pha loãng (và sự dịch chuyển tiếp theo trong liên kết do sự thay đổi trạng thái cân bằng), độ sinh khả dụng và sự chuyển hóa của miglustat khi dùng *in vivo*.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "trị liệu thay thế enzym" hoặc "ERT" nhằm để chỉ việc đưa enzym không tự nhiên, đã tinh chế vào cá thể bị thiếu hụt enzym này. Có thể thu được protein được dùng này từ các nguồn tự nhiên hoặc bằng cách biểu hiện tái tổ hợp. Thuật ngữ này cũng dùng để chỉ việc đưa enzym đã tinh chế vào cá thể mà đòi hỏi hoặc hưởng lợi theo cách khác từ việc dùng enzym đã tinh chế. Theo ít nhất một phương án, cá thể này bị thiếu hụt enzym. Enzym được đưa vào có thể là enzym tái tổ hợp,

đã tinh chế được sản xuất *in vitro*, hoặc protein được tinh chế từ mô hoặc dịch lỏng được phân lập, chẳng hạn như, ví dụ, nhau thai hoặc sữa động vật, hoặc từ thực vật.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "trị liệu kết hợp" nhằm để chỉ trị liệu bất kỳ mà trong đó dùng đồng thời hoặc dùng liên tiếp hai hoặc nhiều trị liệu riêng lẻ. Theo ít nhất một phương án, các kết quả của trị liệu kết hợp được tăng cường so với tác dụng của mỗi trị liệu khi tiến hành nó một cách riêng lẻ. Sự tăng cường có thể bao gồm sự cải thiện bất kỳ về tác dụng của các trị liệu khác nhau mà có thể mang lại kết quả có lợi so với các kết quả đạt bằng trị liệu khi được tiến hành một mình. Tác dụng hoặc kết quả được tăng cường có thể bao gồm sự tăng cường hiệp đồng, trong đó tác dụng được tăng cường này cao hơn tác dụng cộng gộp của mỗi trị liệu khi được tiến hành một mình; sự tăng cường cộng gộp, trong đó tác dụng được tăng cường về cơ bản bằng với tác dụng cộng gộp của mỗi trị liệu khi được tiến hành một mình; hoặc nhỏ hơn tác dụng hiệp đồng, trong đó tác dụng được tăng cường thấp hơn tác dụng cộng gộp của mỗi trị liệu khi được tiến hành một mình, nhưng vẫn tốt hơn tác dụng của mỗi trị liệu khi được tiến hành một mình. Có thể đo tác dụng được tăng cường bằng các phương thức đã biết bất kỳ trong lĩnh vực theo cách mà có thể đo hiệu quả điều trị hoặc kết quả điều trị.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "dược dụng" nhằm để chỉ các thực thể phân tử và hợp phần mà có khả năng dung chịu về mặt sinh lý và thường không tạo ra phản ứng rủi ro khi dùng cho người. Tốt hơn là, như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "dược dụng" có nghĩa là được cơ quan quản lý của chính quyền liên bang hoặc tiểu bang phê chuẩn hoặc được liệt kê trong Dược Điển Hoa Kỳ hoặc dược điển được công nhận chung khác để sử dụng ở động vật, và cụ thể hơn là ở người.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "chất mang" nhằm để chỉ chất pha loãng, chất hỗ trợ, tá dược, hoặc tá dược lỏng mà được dùng cùng với hợp chất. Các chất mang có được tính thích hợp đã biết trong lĩnh vực và, theo ít nhất một phương án, đã được mô tả trong tài liệu "Remington's Pharmaceutical Sciences" của E. W. Martin, Xuất bản lần thứ 18, hoặc các lần xuất bản khác.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, các thuật ngữ "đối tượng" hoặc "bệnh nhân" nhằm để chỉ con người hoặc động vật không phải con người. Theo ít nhất một phương án, đối tượng là động vật có vú. Theo ít nhất một phương án, đối tượng là con người.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "kháng thể kháng thuốc" nhằm để chỉ kháng thể liên kết đặc hiệu với thuốc được dùng cho đối tượng và được tạo ra bởi đối tượng khi có ít nhất một phản đáp ứng miễn dịch đối với việc dùng thuốc cho đối tượng. Theo ít nhất một phương án thuốc là sản phẩm thuốc protein trị liệu. Sự có mặt của kháng thể kháng thuốc ở đối tượng có thể gây ra các đáp ứng miễn dịch nằm trong khoảng từ nhẹ đến nghiêm trọng, bao gồm nhưng không giới hạn ở các đáp ứng miễn dịch đe dọa tính mạng bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở chứng phản vệ, hội chứng giải phóng cytokin và sự trung hòa phản ứng chéo của các protein nội sinh làm trung gian cho các chức năng thiết yếu. Ngoài ra hoặc theo cách khác, sự có mặt của kháng thể kháng thuốc ở đối tượng có thể làm giảm hiệu quả của thuốc.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "kháng thể trung hòa" nhằm để chỉ kháng thể kháng thuốc tác động để làm trung hòa chức năng của thuốc. Theo ít nhất một phương án, sản phẩm thuốc protein trị liệu là đối tác của protein nội sinh mà sự biểu hiện của nó được làm giảm hoặc không có ở đối tượng. Theo ít nhất một phương án, kháng thể trung hòa có thể tác động để làm trung hòa chức năng của protein nội sinh.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, các thuật ngữ "khoảng" và "xấp xỉ" nhằm để chỉ mức độ sai số có thể chấp nhận được đối với đại lượng được đo theo bản chất hoặc độ chính xác của các phép đo. Ví dụ, có thể biểu thị mức độ sai số bằng một số lượng của các chữ số có nghĩa được cung cấp cho phép đo, như được hiểu theo lĩnh vực, và bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở mức biến thiên bằng ± 1 ở chữ số có nghĩa chính xác nhất được báo cáo cho phép đo. Mức độ sai số làm ví dụ thông thường là ở trong khoảng 20 phần trăm (%), tốt hơn là trong khoảng 10%, và tốt hơn nữa là trong khoảng 5% giá trị hoặc khoảng giá trị được nêu. Theo cách khác, và cụ thể là trong hệ thống sinh học, các thuật ngữ "khoảng" và "xấp xỉ" có thể có nghĩa là các giá trị mà nằm trong thứ tự về độ lớn, tốt hơn là trong khoảng gấp 5 lần và tốt hơn nữa là trong khoảng gấp 2 lần giá trị được nêu. Các đại lượng bằng số được nêu trong bản mô tả này là đại lượng xấp xỉ trừ khi có chỉ dẫn khác, có nghĩa là thuật ngữ "khoảng" hoặc "xấp xỉ" có thể được suy ra khi không được chỉ ra rõ ràng.

Thuật ngữ "đồng thời" như được sử dụng trong bản mô tả này được dự định có nghĩa là cùng lúc với hoặc ở trong khoảng thời gian ngắn vừa phải trước hoặc sau đó, như được hiểu bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực. Ví dụ, nếu dùng hai điều trị được dùng đồng thời với nhau, một điều trị có thể dùng trước hoặc sau điều trị kia, cho phép có thời gian cần thiết để chuẩn bị cho sự điều trị sau trong số hai điều trị. Do đó "việc dùng đồng thời" của hai điều trị bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở một điều trị này sau điều trị kia 20 phút hoặc ít hơn, khoảng 20 phút, khoảng 15 phút, khoảng 10 phút, khoảng 5 phút, khoảng 2 phút, khoảng 1 phút hoặc ít hơn 1 phút.

Thuật ngữ "muối được dụng" như được sử dụng trong bản mô tả này dự định có nghĩa là muối mà, trong phạm vi đánh giá y tế có căn cứ, thích hợp để sử dụng để tiếp xúc với mô của người và động vật bậc thấp mà không có độc tính, kích ứng, đáp ứng dị ứng, và dạng tương tự quá mức, tương xứng với tỷ lệ có lợi/rủi ro hợp lý, thường là hòa tan được hoặc phân tán được trong nước hoặc dầu, và hữu hiệu cho việc sử dụng dự kiến của chúng. Thuật ngữ này bao gồm muối cộng axit được dụng và muối cộng bazơ được dụng. Danh sách các muối thích hợp được tìm thấy trong tài liệu, ví dụ, S. M. Birge et al., J. Pharm. Sci., 1977, 66, pp. 1-19, được viện dẫn trong bản mô tả này để tham khảo.

Thuật ngữ "muối cộng axit được dụng" như được sử dụng trong bản mô tả này dự định có nghĩa là các muối mà giữ lại độ hữu hiệu và thuộc tính sinh học của bazơ tự do và không có điều không mong muốn về mặt sinh học và về mặt khác, được tạo ra với axit vô cơ bao gồm nhưng không giới hạn ở axit clohydric, axit bromhydric, axit sulfuric, axit sulfamic, axit nitric, axit phosphoric và axit tương tự, và axit hữu cơ bao gồm nhưng không giới hạn ở axit axetic, axit trifloaxetic, axit adipic, axit ascorbic, axit aspartic, axit benzensulfonic, axit benzoic, axit butyric, axit camphoric, axit camphorsulfonic, axit xinamic, axit xitric, axit đigluconic, axit etansulfonic, axit glutamic, axit glycolic, axit glyxerophosphoric, axit hemisulfic, axit hexanoic, axit formic, axit fumaric, axit 2-hydroxyetansulfonic (axit isethionic), axit lactic, axit hydroxymaleic, axit malic, axit malonic, axit mandelic, axit mesitylenesulfonic, axit metansulfonic, axit naphtalensulfonic, axit nicotinic, axit 2-naphtalensulfonic, axit oxalic, axit pamoic, axit pectinic, axit phenylaxetic, axit 3-phenylpropionic, axit pivalic, axit propionic, axit pyruvic, axit salixylic,

axit stearic, axit succinic, axit sulfanilic, axit tartaric, axit p-toluensulfonic, axit undecanoic và axit tương tự.

Thuật ngữ "muối cộng bazơ được dụng" như được sử dụng trong bản mô tả này dự định có nghĩa là các muối mà giữ lại độ hữu hiệu và thuộc tính sinh học của axit tự do và không có điều không mong muốn về mặt sinh học và về mặt khác, được tạo ra với bazơ vô cơ bao gồm nhưng không giới hạn ở amoniac hoặc amoni hydroxit, amoni cacbonat, hoặc amoni bicacbonat hoặc cation kim loại chẳng hạn như natri, kali, lithium, canxi, magie, sắt, kẽm, đồng, mangan, nhôm và dạng tương tự. Các muối được tạo dẫn xuất từ các bazơ không độc hữu cơ được dụng bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở các muối của amin bậc một, amin bậc hai, amin bậc ba, các hợp chất amin bậc bốn, các amin được thể bao gồm các amin được thể có trong tự nhiên, các amin vòng và nhựa trao đổi ion bazơ, chẳng hạn như metylamin, dimetylamin, trimetylamin, etylamin, dietylamin, trietylamin, isopropylamin, tripropylamin, tributylamin, etanolamin, dietanolami, 2-dimetylaminioetanol, 2-dietylaminioetanol, đixyclohexylamin, lysin, arginin, histidin, cafein, hydrabamin, cholin, betain, etylendiamin, glucosamin, methylglucamin, theobromin, purin, piperazin, piperidin, N-etylpiperidin, các hợp chất tetraetylamoni, các hợp chất tetraetylamoni, pyridin, N,N-dimetylanilin, N-metylpiperidin, N-metylmorpholin, đixyclohexylamin, dibenzylamin, N,N-dibenzylphenetylamin, 1-ephenamin, N,N'-dibenzyletylendiamin, nhựa polyamin và dạng tương tự.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế đề xuất phương pháp điều trị bệnh Pompe ở bệnh nhân cần chúng, phương pháp này bao gồm bước dùng miglustat, hoặc muối được dụng của chúng, cho bệnh nhân kết hợp với axit α -glucosidaza tái tổ hợp ở người, trong đó axit α -glucosidaza tái tổ hợp ở người được biểu hiện ở tế bào trứng chuột đồng Trung Quốc (CHO) và chứa hàm lượng tăng của đơn vị N-glycan mang một hoặc hai gốc mannoza-6-phosphat khi so với hàm lượng của đơn vị N-glycan mang một hoặc hai gốc mannoza-6-phosphat của α -glucosidaza. Theo ít nhất một phương án, axit α -glucosidaza tái tổ hợp ở người có mức độ thấp của glycan phức hợp với galactosa ở đầu tận cùng. Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất việc sử dụng miglustat và axit α -glucosidaza tái tổ hợp ở người trong hợp phần kết hợp để điều trị bệnh Pompe ở bệnh nhân cần chúng.

Theo ít nhất một phương án, miglustat được dùng qua đường miệng. Theo ít nhất một phương án, miglustat được dùng ở liều lượng qua đường miệng nằm trong khoảng từ khoảng 200 mg đến khoảng 600 mg, hoặc ở liều lượng qua đường miệng bằng khoảng 200 mg, khoảng 250 mg, khoảng 300 mg, khoảng 350 mg, khoảng 400 mg, khoảng 450 mg, khoảng 500 mg, khoảng 550 mg hoặc khoảng 600 mg. Theo ít nhất một phương án, miglustat được dùng ở liều lượng qua đường miệng nằm trong khoảng từ khoảng 233 mg đến khoảng 400 mg. Theo ít nhất một phương án, miglustat được dùng ở liều lượng qua đường miệng nằm trong khoảng từ khoảng 250 đến khoảng 270 mg, hoặc ở liều lượng qua đường miệng bằng khoảng 250 mg, khoảng 255 mg, khoảng 260 mg, khoảng 265 mg hoặc khoảng 270 mg. Theo ít nhất một phương án, miglustat được dùng dưới dạng liều lượng qua đường miệng bằng khoảng 260 mg.

Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực cần hiểu rằng liều lượng qua đường miệng của miglustat nằm trong khoảng từ khoảng 200 mg đến 600 mg hoặc khoảng nhỏ hơn bất kỳ nằm trong đó có thể thích hợp cho bệnh nhân trưởng thành có khối lượng cơ thể trung bình bằng khoảng 70 kg. Đối với các bệnh nhân mà có khối lượng cơ thể thấp hơn đáng kể so với khoảng 70 kg, bao gồm nhưng không giới hạn ở trẻ sơ sinh, trẻ em hoặc người trưởng thành nhẹ cân, liều lượng nhỏ hơn có thể được bác sĩ coi là thích hợp. Do đó, theo ít nhất một phương án, miglustat được dùng dưới dạng liều lượng qua đường miệng nằm trong khoảng từ khoảng 50 mg đến khoảng 200 mg, hoặc dưới dạng liều lượng qua đường miệng bằng khoảng 50 mg, khoảng 75 mg, khoảng 100 mg, 125 mg, khoảng 150 mg, khoảng 175 mg hoặc khoảng 200 mg. Theo ít nhất một phương án, miglustat được dùng dưới dạng liều lượng qua đường miệng nằm trong khoảng từ khoảng 65 mg đến khoảng 195 mg, hoặc dưới dạng liều lượng qua đường miệng bằng khoảng 65 mg, khoảng 130 mg hoặc khoảng 195 mg.

Theo ít nhất một phương án, miglustat được dùng dưới dạng liều lượng được dùng thích hợp để dùng qua đường miệng, và bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở viên nén, viên nang, viên hình trứng, viên ngọt, dung dịch hoặc huyền phù, gel, sirô, nước súc miệng, hoặc bột khô để hoàn nguyên bằng nước hoặc tá dược lỏng thích hợp khác trước khi sử dụng, tùy ý với các chất tạo hương vị và chất tạo màu để dùng theo cách giải phóng ngay lập tức, giải phóng chậm, giải phóng biến đổi, giải phóng duy trì, giải phóng theo xung hoặc giải phóng

có kiểm soát. Cũng có thể sử dụng các hợp phần dạng rắn chẳng hạn như viên nén, viên nang, viên hình thoi, viên ngậm, viên tròn, viên dạng bolus, bột, bột nhão, hạt nhỏ, viên hình đạn, viên bao hoặc các chế phẩm hỗn hợp sơ chế. Theo ít nhất một phương án, miglustat được dùng dưới dạng viên nén. Theo ít nhất một phương án, miglustat được dùng dưới dạng viên nang. Theo ít nhất một phương án, dạng liều lượng có chứa từ khoảng 50 mg đến khoảng 300 mg miglustat. Theo ít nhất một phương án, dạng liều lượng có chứa khoảng 65 mg miglustat. Theo ít nhất một phương án, dạng liều lượng có chứa khoảng 130 mg miglustat. Theo ít nhất một phương án, dạng liều lượng có chứa khoảng 260 mg miglustat. Dự tính rằng khi dạng liều lượng có chứa khoảng 65 mg miglustat, miglustat có thể được dùng dưới dạng liều lượng có bốn dạng liều lượng, hoặc tổng liều lượng bằng 260 mg miglustat. Tuy nhiên, đối với các bệnh nhân mà có khối lượng thấp hơn đáng kể so với khối lượng người trưởng thành trung bình bằng 70 kg, bao gồm nhưng không giới hạn ở trẻ sơ sinh, trẻ em hoặc người trưởng thành nhẹ cân, miglustat có thể được dùng dưới dạng liều lượng có một dạng liều lượng (tổng liều lượng bằng 65 mg miglustat), hai dạng liều lượng (tổng liều lượng bằng 130 mg miglustat), hoặc ba dạng liều lượng (tổng liều lượng bằng 195 mg miglustat).

Có thể điều chế các hợp phần dạng rắn và dạng lỏng để sử dụng qua đường miệng theo các phương pháp đã biết rõ trong lĩnh vực. Các hợp phần này cũng có thể có chứa một hoặc nhiều chất mang và tá dược được dùng mà có thể là ở dạng rắn hoặc dạng lỏng. Có thể điều chế viên nén hoặc viên nang bằng các phương thức thông thường với tá dược được dùng, bao gồm nhưng không giới hạn ở chất kết dính, chất độn, chất làm trơn, chất làm tan rã hoặc chất làm ẩm. Tá dược được dùng thích hợp đã biết trong lĩnh vực và bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở tinh bột được gelatin hóa sơ bộ, polyvinylpyrrolidon, povidon, hydroxypropyl metylxenluloza (HPMC), hydroxypropyl etylxenluloza (HPEC), hydroxypropyl xenluloza (HPC), sucroza, gelatin, acacia, lactoza, xenluloza vi tinh thể, canxi hydro phosphat, magie stearat, axit stearic, glyxeryl behenat, đá talc, silic đioxit, tinh bột ngô, tinh bột khoai tây hoặc tinh bột sắn, tinh bột natri glycolat, natri lauryl sulfat, natri xitrat, canxi cacbonat, canxi phosphat đibazơ, glyxin croscarmelloza natri và silicat phức hợp. Viên nén có thể được phủ bằng các phương pháp đã biết rõ trong lĩnh vực. Theo ít nhất

một phương án, miglustat được dùng dưới dạng chế phẩm có sẵn trên thị trường như Zavesca® (Actelion Pharmaceuticals).

Theo ít nhất một phương án, axit α -glucosidaza tái tổ hợp ở người được biểu hiện ở tế bào trứng chuột đồng Trung Quốc (CHO) và chứa hàm lượng tăng của đơn vị N-glycan mang một hoặc nhiều gốc manozơ-6-phosphat khi so với hàm lượng của đơn vị N-glycan mang một hoặc nhiều gốc manozơ-6-phosphat của alglucosidaza alfa. Theo ít nhất một phương án, axit α -glucosidaza là axit α -glucosidaza tái tổ hợp ở người được đề cập đến trong bản mô tả này dưới dạng ATB200, như được mô tả trong đơn sáng chế quốc tế đồng tồn tại PCT/US2015/053252. Đã thấy rằng ATB200 liên kết với các thụ thể manozơ-6-phosphat không phụ thuộc cation (CIMPR) với ái lực cao ($K_D \sim 2-4$ nM) và được nội tại hóa một cách hiệu quả bởi nguyên bào sợi Pompe và nguyên bào cơ xương Pompe ($K_{hấp thụ} \sim 7-14$ nM). ATB200 được xác định đặc điểm *in vivo* và cho thấy có thời gian bán thải trong huyết tương biểu kiến ngắn hơn ($t_{1/2} \sim 45$ phút) so với alglucosidaza alfa ($t_{1/2} \sim 60$ phút).

Theo ít nhất một phương án, axit α -glucosidaza tái tổ hợp ở người là enzym có trình tự axit amin như được nêu trong SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 (hoặc như được mã hóa bởi SEQ ID NO: 2), SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 hoặc SEQ ID NO: 5.

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

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

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

SEQ cagttgggaaagctgaggtgtcgcggggccgcgggtggaggtcgggatgaggcagca
 ID ggtaggacagtgaacctcgggtgacgcgaaggacccccggccacctctaggttctcctcgtcc
 NO: gcccgttgttcagcgagggaggctctgggcctgccgcagctgacgggaaactgaggcac
 2 ggagcgggcctgtaggagctgtccaggccatctccaacctgggagtgaggcacccgccc
 tgctcccaccggctcctggccgtctgcgcctcgtgtccttggcaaccgctgcactcctg
 gggcacatcctactccatgatttctgctggttccccgagagctgagtggctcctcccca
 gtcttgaggagactcaccagctcaccagcagggagccagcagaccagggccccgggat
 gccaggcacacccccggcgtcccagagcagtgccacacagtgcgacgtccccccaac
 agccgcttcgattgcgccctgacaaggccatcaccaggaacagtgcgaggccccgcggc
 tgtgtctacatccctgcaaagcaggggctgcaggagagccagatggggcagccctggtgc
 ttctcccaccagctacccagctacaagctggagaacctgagctcctctgaaatgggc
 tacacggccaccctgacctgaccacccccaccttcttccccaaggacatcctgacctg
 cggctggacgtgatgatggagactgagaaccgcctccacttcacgatcaaagatccagct
 aacaggcgctacgaggtgcccttggagacccccgcgtgtccacagccgggcaccgtcccca
 ctctacagcgtggagttctccgaggagcccttcggggtgatcgtgcaccggcagctggac
 ggccgcgtgctgctgaacacgacgggtggcgccccctgttcttgcggaccagttccttcag

ctgtccacctcgctgccctcgcagtatatcacaggcctcgccgagcacctcagtccccctg
atgtcagcaccagctggaccaggatcacctgtggaaccgggaccttgccccacgccc
ggtgcgaacctctacgggtctcaccctttctacctggcgctggaggacggcgggtcggca
cacggggtgttctgctaaacagcaatgccatggatgtggtcctgcagccgagccctgcc
cttagctggaggctgcacaggtgggatcctggatgtctacatcttctgggcccagagccc
aagagcgtggtgcagcagctacctggacgttgtgggataccggtcatgccgccatactgg
ggcctgggctccacctgtgccgctggggctactcctccaccgctatcacccgccaggtg
gtggagaacatgaccagggcccacttccccctggacgtccaatggaacgacctggactac
atggactcccggagggacttcacgttcaacaaggatggcttccgggacttccggccatg
gtgcaggagctgcaccagggcgccggcgctacatgatgatcgtggatcctgccatcagc
agctcgggccctgccgggagctacaggccctacgacgagggtctgcggaggggggttttc
atcaccaacgagaccggccagccgctgattgggaaggatggcccgggtccactgccttc
cccgacttcaccaaccccacagccctggcctgggtgggaggacatggtggctgagttccat
gaccaggtgcccttcgacggcatgtggattgacatgaacgagcctccaacttcacaga
ggctctgaggacggctgccccaaacaatgagctggagaaccaccctacgtgcctgggggtg
gttggggggaccctccaggcgccaccatctgtgcctccagccaccagtttctctccaca
cactacaacctgcacaacctctacggcctgaccgaagccatgcctcccacagggcgctg
gtgaaggctcgggggacacgcccatttgtgatctcccgctcgacctttgctggccacggc
cgatacgccggccactggacgggggacgtgtggagctcctgggagcagctcgctcctcc
gtgccagaaatcctgcagtttaacctgctgggggtgcctctggtcggggccgacgtctgc
ggcttctgggcaacacctcagaggagctgtgtgtgcgctggaccagctgggggccttc
tacccttcatgcggaaccacaacagcctgctcagctgccccaggagccgtacagcttc
agcgagccggcccagcaggccatgaggaaggccctcacctgcgctacgcactcctcccc
cacctctacacactgttccaccaggcccacgtcgcgggggagaccgtggcccggccccctc

ttcctggagttccccaaggactctagcacctggactgtggaccaccagctcctgtggggg
gaggccctgctcatcaccacagtgctccaggccgggaaggccgaagtgactggctacttc
cccttgggcacatggtacgacctgcagacgggtgccaatagaggcccttggcagcctcca
ccccacctgcagctccccgtgagccagccatccacagcgaggggcagtggggtgacgctg
ccggccccctggacaccatcaacgtccacctccgggtgggtacatcatccccctgcag
ggccctggcctcacaaccacagagtcccgccagcagcccatggccctggctgtggccctg
accaaggggtggagaggcccgaggggagctgttctgggacgatggagagagcctggaagtg
ctggagcgaggggcctacacacaggtcatcttctggccaggaataacacgacgtgaat
gagctgggtacgtgtgaccagtgagggagctggcctgcagctgcagaaggtgactgtcctg
ggcgtggccacggcgccccagcaggtcctctccaacgggtgtccctgtctccaactcacc
tacagccccgacaccaaggtcctggacatctgtgtctcgctgttgatgggagagcagttt
ctcgtcagctgggtgttagccgggaggagtggttagtctctccagaggaggctgggtcc
ccagggaagcagagcctgtgtgcgggcagcagctgtgtgcgggcctgggggttgcattgt
tcacctggagctgggcactaaccattccaagccgccgcatcgcttgttccacctcctgg
gccggggctctggcccccaacgtgtctaggagagctttctccctagatcgactgtgggc
cggggcctggagggtgctctgtgttaataagattgaaggtttgcctcctcacctgtt
gccggcatgcgggtagtattagccacccccctccatctgttccagcaccggagaagggg
gtgctcaggtggaggtgtggggtatgcacctgagctcctgcttcgcgcctgctgctctgc
cccaacgcgaccgcttcccggctgccagagggtggatgcctgccggtccccgagcaag
cctgggaactcaggaaaattcacaggacttgggagattctaaatcttaagtgaattatt
ttaataaaaggggcatttggaatc

SEQ Met Gly Val Arg His Pro Pro Cys Ser His Arg Leu Leu Ala Val Cys Ala Leu
ID Val Ser Leu Ala Thr Ala Ala Leu Leu Gly His Ile Leu Leu His Asp Phe Leu Leu

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

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

SEQ
ID
NO:
4

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

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

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

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

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

Glu Gln Phe Leu Val Ser Trp Cys

Theo ít nhất một phương án, axit α -glucosidaza tái tổ hợp ở người có trình tự axit amin GAA kiểu đại như được nêu trong SEQ ID NO: 1, như được mô tả trong Bằng Sáng Chế Mỹ Số 8.592.362 và có mã số truy cập GenBank AHE24104.1 (GI:568760974). Theo ít nhất một phương án, axit α -glucosidaza tái tổ hợp ở người có trình tự axit amin GAA kiểu đại như được mã hóa trong SEQ ID NO: 2, trình tự mRNA có mã số truy cập GenBank Y00839.1. Theo ít nhất một phương án, axit α -glucosidaza tái tổ hợp ở người có trình tự axit amin GAA kiểu đại như được nêu trong SEQ ID NO: 3. Theo ít nhất một phương án, axit α -glucosidaza tái tổ hợp ở người có trình tự axit amin GAA như được nêu trong SEQ ID NO: 4, và có mã số truy cập Trung Tâm Thông Tin Công Nghệ Sinh Học Quốc Gia (NCBI) NP_000143.2. Theo ít nhất một phương án, axit α -glucosidaza tái tổ hợp ở người là glucosidaza alfa, enzym axit α -glucosidaza ở người được mã hóa bởi kiểu gen đơn bội chiếm ưu thế nhất trong số chín kiểu gen đơn bội được quan sát thấy của gen *GAA*.

Theo ít nhất một phương án, axit α -glucosidaza tái tổ hợp ở người được biểu hiện ban đầu dưới dạng có trình tự chiều dài đầy đủ gồm 952 axit amin của GAA kiểu đại như được nêu trong SEQ ID NO: 1, và axit α -glucosidaza tái tổ hợp ở người trải qua sự xử lý nội bào mà loại bỏ một phần axit amin, ví dụ 56 axit amin đầu tiên. Theo đó, axit α -glucosidaza tái tổ hợp ở người mà được tế bào chủ tiết ra có thể có trình tự axit amin ngắn hơn so với axit α -glucosidaza tái tổ hợp ở người mà được biểu hiện ban đầu trong tế bào. Theo ít nhất một phương án, protein ngắn hơn có thể có trình tự axit amin được nêu trong SEQ ID NO: 5, chỉ khác với SEQ ID NO: 1 ở chỗ 56 axit amin đầu tiên chứa peptit tín hiệu và peptit tiền thân đã bị loại bỏ, do đó tạo nên protein có 896 axit amin. Các biến đổi khác về số lượng axit amin cũng có thể là, chẳng hạn như có 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 hoặc nhiều hơn sự làm khuyết, sự thế và/hoặc sự cài xen tương quan với trình tự axit amin được mô tả trong SEQ ID NO: 1 hoặc SEQ ID NO: 5. Theo một số phương án, sản phẩm rhGAA bao gồm hỗn hợp của các phân tử axit α -glucosidaza tái tổ hợp ở người có các chiều dài axit amin khác nhau.

Theo ít nhất một phương án, axit α -glucosidaza tái tổ hợp ở người trải qua các cải biến sau dịch mã và/hoặc cải biến hóa học tại một hoặc nhiều gốc axit amin trong protein. Ví dụ, các gốc methionin và tryptophan có thể trải qua sự oxy hóa. Ví dụ khác là, glutamin ở đầu tận cùng N có thể tạo ra pyro-glutamat. Ví dụ khác là, các gốc asparagin có thể trải qua sự khử amit thành axit aspartic. Ví dụ khác nữa là, các gốc axit aspartic có thể trải qua sự isome hóa thành axit iso-aspartic. Ví dụ khác nữa là, các gốc xystein chưa bắt cặp trong protein có thể tạo thành liên kết disulfua với glutathion tự do và/hoặc xystein tự do. Theo đó, theo một số phương án enzym được biểu hiện ban đầu dưới dạng có trình tự axit amin như được nêu trong SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 (hoặc như được mã hóa bởi SEQ ID NO: 2), SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 hoặc SEQ ID NO: 5, và enzym này trải qua một hoặc nhiều cải biến trong số các cải biến sau dịch mã và/hoặc cải biến hóa học. Các cải biến này cũng nằm trong phạm vi của sáng chế.

Các trình tự polynucleotit mã hóa GAA và các GAA ở người biến thể này cũng được dự kiến và có thể được sử dụng để biểu hiện tái tổ hợp rhGAA theo sáng chế.

Tốt hơn là, không lớn hơn 70, 65, 60, 55, 45, 40, 35, 30, 25, 20, 15, 10, hoặc 5% tổng số phân tử axit α -glucosidaza tái tổ hợp ở người thiếu đơn vị N-glycan có mang một hoặc nhiều gốc manozơ-6-phosphat hoặc thiếu khả năng liên kết với thụ thể manozơ-6-phosphat không 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 các phân tử axit α -glucosidaza tái tổ hợp ở người chứa ít nhất là một đơn vị N-glycan có mang một hoặc nhiều gốc manozơ-6-phosphat hoặc có khả năng liên kết với CIMPR.

Phân tử axit α -glucosidaza tái tổ hợp ở người có thể có 1, 2, 3 hoặc 4 nhóm manozơ-6-phosphat (M6P) trên glycan của chúng. Ví dụ, chỉ một N-glycan trên phân tử axit α -glucosidaza tái tổ hợp ở người có thể mang M6P (được mono-phosphoryl hóa), một N-glycan đơn lẻ có thể mang hai nhóm M6P (được bis-phosphoryl hóa), hoặc mỗi trong hai N-glycan khác nhau trên cùng một phân tử axit α -glucosidaza tái tổ hợp ở người có thể mang nhóm M6P đơn lẻ. Phân tử axit α -glucosidaza tái tổ hợp ở người cũng có thể có các N-glycan không mang nhóm M6P. Theo phương án khác, trung bình N-glycan có chứa lớn hơn 2,5 mol/mol M6P và lớn hơn 4 mol/mol axit sialic, sao cho axit α -glucosidaza tái tổ hợp ở người chứa trung bình ít nhất là 2,5 mol gốc manozơ-6-phosphat trong mỗi mol axit

α -glucosidaza tái tổ hợp ở người và ít nhất là 4 mol axit sialic trong mỗi mol axit α -glucosidaza tái tổ hợp ở người. Trung bình ít nhất là khoảng 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, hoặc 10% tổng số glycan trên axit α -glucosidaza tái tổ hợp ở người có thể là ở dạng mono-M6P glycan, ví dụ, khoảng 6,25% tổng số glycan có thể mang một nhóm M6P đơn lẻ và trung bình, ít nhất là khoảng 0,5, 1, 1,5, 2,0, 2,5, 3,0% tổng số glycan trên axit α -glucosidaza tái tổ hợp ở người là ở dạng bis-M6P glycan và trung bình ít hơn 25% tổng số axit α -glucosidaza tái tổ hợp ở người không có chứa glycan đã phosphoryl hóa liên kết với CIMPR.

Axit α -glucosidaza tái tổ hợp ở người có thể có hàm lượng trung bình của N-glycan có mang M6P nằm trong khoảng từ 0,5 đến 7,0 mol/mol axit α -glucosidaza tái tổ hợp ở người 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 axit α -glucosidaza tái tổ hợp ở người. Axit α -glucosidaza tái tổ hợp ở người có thể được phân đoạn để tạo các chế phẩm axit α -glucosidaza tái tổ hợp ở người với số lượng trung bình khác nhau của glycan có mang M6P hoặc bis-M6P do đó cho phép tùy chỉnh thêm axit α -glucosidaza tái tổ hợp ở người thêm nhắm đích vào lysosom ở 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 axit α -glucosidaza tái tổ hợp ở người có thể được sialyl hóa đầy đủ, ví dụ, lên đến 10%, 20%, 30%, 40%, 50% hoặc 60% N-glycan có thể được sialyl hóa đầy đủ. Theo một số phương án từ 4 đến 20% tổng số N-glycan được sialyl hóa đầy đủ. Theo các phương án khác có không lớn hơn 5%, 10%, 20% hoặc 30% N-glycan trên axit α -glucosidaza tái tổ hợp ở người mang axit sialic và gốc galactosa ở đầu tận cùng (Gal). 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 axit α -glucosidaza tái tổ hợp ở người có thể mang axit sialic và galactosa ở đầu tận cùng. Theo các phương án khác nữa, không nhiều hơn 5, 10, 15, 16, 17, 18, 19 hoặc 20% N-glycan trên axit α -glucosidaza tái tổ hợp ở người chỉ có galactosa ở đầu tận cùng và không có 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 axit α -glucosidaza tái tổ hợp ở người trong hợp phần có thể chỉ có galactosa ở đầu tận cùng và không có chứa axit sialic.

Theo các phương án khác của sáng chế, từ 40, 45, 50, 55 đến 60% tổng số N-glycan trên axit α -glucosidaza tái tổ hợp ở người là các N-glycan loại phức hợp; hoặc không nhiều hơn 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7% tổng số N-glycan trên axit α -glucosidaza tái tổ hợp ở người là N-glycan loại lai; không nhiều hơn 5, 10, hoặc 15% N-glycan loại mannoza cao trên axit α -glucosidaza tái tổ hợp ở người không được phosphoryl hóa; ít nhất là 5% hoặc 10% N-glycan loại mannoza cao trên axit α -glucosidaza tái tổ hợp ở người được mono-M6P phosphoryl hóa; và/hoặc ít nhất là 1 hoặc 2% N-glycan loại mannoza cao trên axit α -glucosidaza tái tổ hợp ở người được bis-M6P phosphoryl hóa. Các giá trị này bao gồm tất cả các giá trị trung gian và các khoảng giá trị con. Axit α -glucosidaza tái tổ hợp ở người có thể đáp ứng một hoặc nhiều khoảng giá trị trong số các khoảng giá trị hàm lượng được mô tả ở trên.

Theo một số phương án, axit α -glucosidaza tái tổ hợp ở người mang, trung bình là, từ 2,0 đến 8,0 mol gốc axit sialic trong mỗi mol axit α -glucosidaza tái tổ hợp ở người. 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 mol gốc/mol axit α -glucosidaza tái tổ hợp ở người. Không bị ràng buộc bởi lý thuyết, tin rằng sự có mặt các đơn vị N-glycan có mang gốc axit sialic có thể ngăn chặn sự thanh thải không hữu ích của axit α -glucosidaza tái tổ hợp ở người bởi thụ thể asialoglycoprotein.

Theo một hoặc nhiều phương án, rhGAA có đơn vị M6P và/hoặc đơn vị axit sialic tại vị trí N-glycosyl hóa nhất định của protein ở lysosom tái tổ hợp ở người. Ví dụ, có bảy vị trí glycosyl hóa được liên kết N tiềm năng trên rhGAA. Các vị trí glycosyl hóa tiềm năng này nằm ở các vị trí sau đây của SEQ ID NO: 5: N84, N177, N334, N414, N596, N826 và N869. Tương tự, đối với trình tự axit amin chiều dài đầy đủ của SEQ ID NO: 1, các vị trí glycosyl hóa tiềm năng nằm ở các vị trí sau đây: N140, N233, N390, N470, N652, N882 và N925. Các biến thể khác của rhGAA có thể có vị trí glycosyl hóa tương tự, tùy thuộc vào vị trí của các gốc asparagin. Thông thường, các trình tự ASN-X-SER hoặc ASN-X-THR trong trình tự axit amin protein biểu thị vị trí glycosyl hóa tiềm năng, ngoại trừ trường hợp là X không thể là HIS hoặc PRO.

Theo các phương án khác nhau, rhGAA có biên dạng N-glycosyl hóa nhất định. Theo một hoặc nhiều phương án, ít nhất là 20% rhGAA được phosphoryl hóa tại vị trí N-

glycosyl hóa thứ nhất (ví dụ N84 đối với SEQ ID NO: 5 và N140 đối với SEQ ID NO: 1). Ví dụ, ít nhất là 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% hoặc 95% rhGAA có thể được phosphoryl hóa tại vị trí N-glycosyl hóa thứ nhất. Sự phosphoryl hóa này có thể là kết quả của các đơn vị mono-M6P và/hoặc bis-M6P. Theo một số phương án, ít nhất là 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% hoặc 95% rhGAA mang đơn vị mono-M6P tại vị trí N-glycosyl hóa thứ nhất. Theo một số phương án, ít nhất là 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% hoặc 95% rhGAA mang đơn vị bis-M6P tại vị trí N-glycosyl hóa thứ nhất.

Theo một hoặc nhiều phương án, ít nhất là 20% rhGAA được phosphoryl hóa tại vị trí N-glycosyl hóa thứ hai (ví dụ N177 đối với SEQ ID NO: 5 và N223 đối với SEQ ID NO: 1). Ví dụ, ít nhất là 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% hoặc 95% rhGAA có thể được phosphoryl hóa tại vị trí N-glycosyl hóa thứ hai. Sự phosphoryl hóa này có thể là kết quả của các đơn vị mono-M6P và/hoặc bis-M6P. Theo một số phương án, ít nhất là 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% hoặc 95% rhGAA mang đơn vị mono-M6P tại vị trí N-glycosyl hóa thứ hai. Theo một số phương án, ít nhất là 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% hoặc 95% rhGAA mang đơn vị bis-M6P tại vị trí N-glycosyl hóa thứ hai. Theo một hoặc nhiều phương án, ít nhất là 5% rhGAA được phosphoryl hóa tại vị trí N-glycosyl hóa thứ ba (ví dụ N334 đối với SEQ ID NO: 5 và N390 đối với SEQ ID NO: 1). Theo các phương án khác, ít hơn 5%, 10%, 15%, 20% hoặc 25% rhGAA được phosphoryl hóa tại vị trí N-glycosyl hóa thứ ba. Ví dụ, vị trí N-glycosyl hóa thứ ba có thể có hỗn hợp của các glycan manosa cao không được phosphoryl hóa, glycan phức hợp có hai nhánh, ba nhánh, và bốn nhánh, và các glycan lai làm các loại chính. Theo một số phương án, ít nhất là 3%, 5%, 8%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45% hoặc 50% rhGAA được sialyl hóa tại vị trí N-glycosyl hóa thứ ba.

Theo một hoặc nhiều phương án, ít nhất là 20% rhGAA được phosphoryl hóa tại vị trí N-glycosyl hóa thứ tư (ví dụ N414 đối với SEQ ID NO: 5 và N470 đối với SEQ ID NO: 1). Ví dụ, ít nhất là 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% hoặc 95% rhGAA có thể được phosphoryl hóa tại vị trí N-glycosyl hóa thứ

tư. Sự phosphoryl hóa này có thể là kết quả của các đơn vị mono-M6P và/hoặc bis-M6P. Theo một số phương án, ít nhất là 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% hoặc 95% rhGAA mang đơn vị mono-M6P tại vị trí N-glycosyl hóa thứ tư. Theo một số phương án, ít nhất là 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% hoặc 95% rhGAA mang đơn vị bis-M6P tại vị trí N-glycosyl hóa thứ tư. Theo một số phương án, ít nhất là 3%, 5%, 8%, 10%, 15%, 20% hoặc 25% rhGAA được sialyl hóa tại vị trí N-glycosyl hóa thứ tư.

Theo một hoặc nhiều phương án, ít nhất là 5% rhGAA được phosphoryl hóa tại vị trí N-glycosyl hóa thứ năm (ví dụ N596 đối với SEQ ID NO: 5 và N692 đối với SEQ ID NO: 1). Theo các phương án khác, có ít hơn 5%, 10%, 15%, 20% hoặc 25% rhGAA được phosphoryl hóa tại vị trí N-glycosyl hóa thứ năm. Ví dụ, vị trí N-glycosyl hóa thứ năm có thể có glycan phức hợp có hai nhánh được fucosyl hóa làm các loại chính. Theo một số phương án, ít nhất là 3%, 5%, 8%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% hoặc 95% rhGAA được sialyl hóa tại vị trí N-glycosyl hóa thứ năm.

Theo một hoặc nhiều phương án, ít nhất là 5% rhGAA được phosphoryl hóa tại vị trí N-glycosyl hóa thứ sáu (ví dụ N826 đối với SEQ ID NO: 5 và N882 đối với SEQ ID NO: 1). Theo các phương án khác, có ít hơn 5%, 10%, 15%, 20% hoặc 25% rhGAA được phosphoryl hóa tại vị trí N-glycosyl hóa thứ sáu. Ví dụ, vị trí N-glycosyl hóa thứ sáu có thể có hỗn hợp của glycan phức hợp có hai nhánh, ba nhánh, và bốn nhánh làm các loại chính. Theo một số phương án, ít nhất là 3%, 5%, 8%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% hoặc 95% rhGAA được sialyl hóa tại vị trí N-glycosyl hóa thứ sáu.

Theo một hoặc nhiều phương án, ít nhất là 5% rhGAA được phosphoryl hóa tại vị trí N-glycosyl hóa thứ bảy (ví dụ N869 đối với SEQ ID NO: 5 và N925 đối với SEQ ID NO: 1). Theo các phương án khác, có ít hơn 5%, 10%, 15%, 20% hoặc 25% rhGAA được phosphoryl hóa tại vị trí N-glycosyl hóa thứ bảy. Theo một số phương án, có ít hơn 40%, 45%, 50%, 55%, 60% hoặc 65% rhGAA có glycan bất kỳ tại vị trí N-glycosyl hóa thứ bảy. Theo một số phương án, ít nhất là 30%, 35% hoặc 40% rhGAA có glycan tại vị trí N-glycosyl hóa thứ bảy.

Axit α -glucosidaza tái tổ hợp ở người tốt hơn là được sản xuất bởi các tế bào trứng chuột đồng Trung Quốc (CHO), chẳng hạn như dòng tế bào CHO GA-ATB-200 hoặc ATB-200-001-X5-14, hoặc bởi 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 axit α -glucosidaza hoặc các trình tự axit amin axit α -glucosidaza biến thể khác chẳng hạn như các trình tự mà có độ tương đồng ít nhất là 90%, 95%, 98% hoặc 99% so với SEQ ID NO: 1 hoặc SEQ ID NO: 5, có thể được tạo cấu trúc và được biểu hiện ở các tế bào CHO. Các trình tự axit amin axit α -glucosidaza biến thể này có thể có chứa sự làm khuyết, sự thế và/hoặc sự cài xen tương quan với SEQ ID NO: 1 hoặc SEQ ID NO: 5, chẳng hạn như có 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 hoặc nhiều hơn sự làm khuyết, sự thế và/hoặc sự cài xen tương quan với trình tự axit amin được mô tả trong SEQ ID NO: 1 hoặc SEQ ID NO: 5. 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.

Có thể sử dụng các thuật toán và/hoặc các chương trình sắp xếp thẳng hàng khác nhau để tính độ tương đồng giữa hai trình tự, bao gồm FASTA, hoặc BLAST có sẵn dưới dạng một phần của gói phân tích trình tự GCG (Đại học Wisconsin, Madison, Wis.), và có thể sử dụng với, ví dụ, thiết lập mặc định. Ví dụ, polypeptit mà có độ tương đồng ít nhất là 90%, 95%, 98% hoặc 99% so với các polypeptit cụ thể được mô tả trong bản mô tả này và tốt hơn là thể hiện về cơ bản là cùng các chức năng, cũng như là polynucleotit mã hóa cho các polypeptit này, được dự kiến. 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.

Các tác giả sáng chế đã phát hiện ra rằng có thể sản xuất axit α -glucosidaza tái tổ hợp ở người mà có khả năng tốt hơn để hướng đích các thụ thể manosa-6-phosphat không phụ thuộc cation (CIMPR) và các lysosom tế bào cũng như là các kiểu glycosyl hóa mà làm giảm sự thanh thải *in vivo* không hữu ích của nó bằng cách sử dụng các tế bào trứng chuột đồng Trung Quốc (CHO). Có thể làm các tế bào này biểu hiện axit α -glucosidaza tái tổ hợp ở người có hàm lượng cao hơn đáng kể của đơn vị N-glycan có mang một hoặc nhiều gốc manosa-6-phosphat so với các sản phẩm axit α -glucosidaza tái tổ hợp ở người thông thường chẳng hạn như alglucosidaza alfa. Axit α -glucosidaza tái tổ hợp ở người được sản xuất bởi các tế bào này, ví dụ, như được lấy ví dụ bởi ATB200, có nhiều gốc manosa-6-phosphat (mono-M6P) và bis-manosa-6-phosphat (bis-M6P) N-glycan hướng đích tế bào cơ hơn đáng kể so với axit α -glucosidaza thông thường, chẳng hạn như Lumizyme®. Không bị ràng buộc bởi lý thuyết, tin rằng sự glycosyl hóa rộng này cho phép enzym ATB200 được hấp thụ một cách hữu hiệu hơn vào tế bào đích, và do đó được thanh thải khỏi hệ tuần hoàn một cách hiệu quả hơn so với các axit α -glucosidaza tái tổ hợp ở người khác, chẳng hạn như ví dụ, alglucosidaza alfa, mà có hàm lượng M6P và Bis-M6P thấp hơn nhiều. ATB200 đã được chứng minh là liên kết hiệu quả với CIMPR và được hấp thụ hiệu quả bởi cơ xương và cơ tim và có kiểu glycosyl hóa mà tạo ra biên dạng được động học thuận lợi và làm giảm sự thanh thải không hữu ích *in vivo*.

Cũng dự tính rằng sự glycosyl hóa ATB200 đơn nhất có thể góp phần làm giảm khả năng gây miễn dịch của ATB200 so với, ví dụ, alglucosidaza alfa. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực hiểu rõ rằng, sự glycosyl hóa của protein bằng các đường được bảo toàn ở động vật có vú thường tăng cường độ hòa tan sản phẩm và giảm bớt sự kết tụ và khả năng gây miễn dịch của sản phẩm. Sự glycosyl hóa làm thay đổi gián tiếp protein có khả năng gây miễn dịch bằng cách tối thiểu hóa sự kết tụ protein cũng như là bằng cách che chắn các epitop protein gây miễn dịch khỏi hệ miễn dịch (*Guidance for Industry – Immunogenicity Assessment for Therapeutic Protein Products*, US Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research, Center for Biologics Evaluation and Research, August 2014). Do đó, theo ít nhất một phương án,

việc dùng axit α -glucosidaza tái tổ hợp ở người không gây cảm ứng ra các kháng thể kháng thuốc. Theo ít nhất một phương án, việc dùng axit α -glucosidaza tái tổ hợp ở người gây cảm ứng phạm vi ảnh hưởng thấp hơn của kháng thể kháng thuốc ở đối tượng so với hàm lượng kháng thể kháng thuốc do việc dùng alglucosidaza alfa gây ra.

Như được mô tả trong đơn sáng chế quốc tế đồng tồn tại PCT/US2015/053252, các tế bào chẳng hạn như các tế bào CHO có thể được sử dụng để sản xuất rhGAA như được mô tả trong bản mô tả này, và rhGAA này có thể được sử dụng trong sáng chế. Các ví dụ về dòng tế bào CHO là GA-ATB-200 hoặc ATB-200-001-X5-14, hoặc môi trường nuôi cấy cấp hai của chúng mà sản xuất 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, chẳng hạn như rhGAA ATB200, có thể được sản xuất bằng cách biến nạp các tế bào CHO bằng cấu trúc ADN mã hóa cho GAA. Trong khi tế bào CHO đã được sử dụng để sản xuất 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, đã 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, các phương pháp để tạo ra dòng tế bào CHO cũng được mô tả trong đơn sáng chế quốc tế đồng tồn tại PCT/US2015/053252. Phương pháp này bao gồm bước biến nạp tế bào CHO bằng ADN mã hóa cho cho GAA hoặc biến thể GAA, chọn lọc tế bào CHO mà kết hợp ổn định ADN mã hóa cho 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. Theo ít nhất một phương án, GAA có hàm lượng thấp của glycan phức hợp có galactosa ở đầu tận cùng.

Có thể sử dụng các dòng tế bào CHO này để sản xuất rhGAA và hợp phần rhGAA bằng cách nuôi cấy dòng tế bào CHO và thu hồi hợp phần này từ môi trường nuôi cấy tế bào CHO.

Axit α -glucosidaza tái tổ hợp ở người, hoặc muối được dụng của chúng, có thể được tạo chế phẩm theo các quy trình thông thường dưới dạng được phẩm thích 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 tiệt 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 ở dạng liều đơn vị, ví dụ, dưới dạng bột được làm đông lạnh khô hoặc chất cô không chứa nước trong vật chứa kín khít 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 được phẩm tiệt trùng. Khi hợp phần được dùng bằng cách tiêm, ampun của nước tiệt trùng để tiêm hoặc nước muối có thể được cung cấp sao cho các thành phần có thể được trộn trước khi sử dụng.

Axit α -glucosidaza tái tổ hợp ở người (hoặc hợp phần hoặc thuốc có chứa axit α -glucosidaza tái tổ hợp ở người) được dùng theo đường dùng thích hợp. Theo một phương án, axit α -glucosidaza tái tổ hợp ở người được dùng trong tĩnh mạch. Theo các phương án khác, axit α -glucosidaza tái tổ hợp ở người được dùng bằng dùng trực tiếp cho mô đích, chẳng hạn như cho cơ 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.

Axit α -glucosidaza tái tổ hợp ở người (hoặc hợp phần hoặc thuốc có chứa axit α -glucosidaza tái tổ hợp ở người) được dùng ở lượng hữu hiệu để điều trị (ví dụ, lượng liều dùng mà, khi được dùng ở các khoảng thời gian đều đặn, đủ để điều trị bệnh, chẳng hạn như bằng cách làm cải thiện các triệu chứng có liên quan đến bệnh, ngăn ngừa hoặc làm chậm sự khởi phát bệnh, và/hoặc làm giảm bớt mức độ nghiêm trọng hoặc tần suất của các triệu chứng bệnh). 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 ít nhất một phương án, axit α -glucosidaza tái tổ hợp ở người được dùng bằng cách truyền trong tĩnh mạch ở liều lượng nằm trong khoảng từ khoảng 5 mg/kg đến khoảng 30 mg/kg, thường là trong khoảng từ khoảng 5 mg/kg đến khoảng 20 mg/kg. Theo ít nhất một phương án, axit α -glucosidaza tái tổ hợp ở người được dùng bằng cách truyền trong tĩnh mạch ở liều lượng bằng khoảng 5 mg/kg, khoảng 10 mg/kg, khoảng 15 mg/kg hoặc khoảng 20 mg/kg. Theo ít nhất một phương án, axit α -glucosidaza tái tổ hợp ở người được dùng bằng cách truyền trong tĩnh mạch ở liều lượng bằng khoảng 20 mg/kg. 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, trong thời gian mắc bệnh hoặc căng thẳng về thể chất, hoặc nếu kháng thể kháng axit α -glucosidaza bắt đầu có mặt hoặc tăng lên, hoặc nếu các triệu chứng bệnh trở nên xấu hơn, có thể làm tăng hàm lượng.

Lượng hữu hiệu để điều trị của axit α -glucosidaza tái tổ hợp ở người (hoặc hợp phần hoặc thuốc có chứa axit α -glucosidaza tái tổ hợp ở người) được dùng ở các khoảng thời gian đều đặn, tùy thuộc vào bản chất và phạm vi tác dụng của bệnh, và tùy thuộc vào cơ sở thực hiện. 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 được ưu tiên, axit α -glucosidaza tái tổ hợp ở người được dùng hàng tháng, hai tháng một lần; hàng tuần; hai lần mỗi tuần; hoặc hằng 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, trong thời gian mắc bệnh hoặc căng thẳng về thể chất, nếu kháng thể kháng axit α -glucosidaza tái tổ hợp ở người bắt đầu có mặt hoặc tăng lên, hoặc nếu các triệu chứng bệnh trở nên xấu hơn, có thể giảm khoảng thời gian giữa các liều lượng. 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 chất đi kèm.

Có thể điều chế axit α -glucosidaza tái tổ hợp ở người theo sáng chế để sử dụng lần sau, chẳng hạn như trong lọ hoặc ống tiêm liều lượng đơn vị, hoặc trong chai hoặc túi để dùng trong tĩnh mạch. Các bộ kit có chứa axit α -glucosidaza tái tổ hợp ở người, cũng như là các tá dược tùy ý hoặc các thành phần có hoạt tính khác, chẳng hạn như chất đi kèm hoặc các thuốc khác, có thể được bao bọc trong nguyên liệu đóng gói và kèm theo hướng dẫn để hoàn nguyên, pha loãng hoặc dùng liều lượng để điều trị cho đối tượng cần điều trị, chẳng hạn như bệnh nhân mắc bệnh Pompe.

Theo ít nhất một phương án, miglustat và axit α -glucosidaza tái tổ hợp ở người được dùng đồng thời. Theo ít nhất một phương án, miglustat và axit α -glucosidaza tái tổ hợp ở người được dùng tuần tự. Theo ít nhất một phương án, dùng miglustat trước khi dùng axit α -glucosidaza tái tổ hợp ở người. Theo ít nhất một phương án, miglustat được dùng ít hơn ba giờ trước khi dùng axit α -glucosidaza tái tổ hợp ở người. Theo ít nhất một phương án, miglustat được dùng khoảng hai giờ trước khi dùng axit α -glucosidaza tái tổ hợp ở người. Theo ít nhất một phương án, miglustat được dùng ít hơn hai giờ trước khi dùng axit α -glucosidaza tái tổ hợp ở người. Theo ít nhất một phương án, miglustat được dùng khoảng 1,5 giờ trước khi dùng axit α -glucosidaza tái tổ hợp ở người. Theo ít nhất một phương án, miglustat được dùng khoảng một giờ trước khi dùng axit α -glucosidaza tái tổ hợp ở người. Theo ít nhất một phương án, miglustat được dùng trong khoảng từ khoảng 50 phút đến khoảng 70 phút trước khi dùng axit α -glucosidaza tái tổ hợp ở người. Theo ít nhất một phương án, miglustat được dùng trong khoảng từ khoảng 55 phút đến khoảng 65 phút trước khi dùng axit α -glucosidaza tái tổ hợp ở người. Theo ít nhất một phương án, miglustat được dùng khoảng 30 phút trước khi dùng axit α -glucosidaza tái tổ hợp ở người. Theo ít nhất một phương án, miglustat được dùng trong khoảng từ khoảng 25 phút đến khoảng 35 phút trước khi dùng axit α -glucosidaza tái tổ hợp ở người. Theo ít nhất một phương án, miglustat được dùng trong khoảng từ khoảng 27 phút đến khoảng 33 phút trước khi dùng axit α -glucosidaza tái tổ hợp ở người.

Theo ít nhất một phương án, miglustat được dùng đồng thời với việc dùng axit α -glucosidaza tái tổ hợp ở người. Theo ít nhất một phương án, miglustat được dùng trong khoảng 20 phút trước hoặc sau khi dùng axit α -glucosidaza tái tổ hợp ở người. Theo ít nhất một phương án, miglustat được dùng trong khoảng 15 phút trước hoặc sau khi dùng axit α -

glucosidaza tái tổ hợp ở người. Theo ít nhất một phương án, miglustat được dùng trong khoảng 10 phút trước hoặc sau khi dùng axit α -glucosidaza tái tổ hợp ở người. Theo ít nhất một phương án, miglustat được dùng trong khoảng 5 phút trước hoặc sau khi dùng axit α -glucosidaza tái tổ hợp ở người.

Theo ít nhất một phương án, miglustat được dùng sau khi dùng axit α -glucosidaza tái tổ hợp ở người. Theo ít nhất một phương án, miglustat được dùng lên đến 2 giờ sau khi dùng axit α -glucosidaza tái tổ hợp ở người. Theo ít nhất một phương án, miglustat được dùng khoảng 30 phút sau khi dùng axit α -glucosidaza tái tổ hợp ở người. Theo ít nhất một phương án, miglustat được dùng khoảng một giờ sau khi dùng axit α -glucosidaza tái tổ hợp ở người. Theo ít nhất một phương án, miglustat được dùng khoảng 1,5 giờ sau khi dùng axit α -glucosidaza tái tổ hợp ở người. Theo ít nhất một phương án, miglustat được dùng khoảng 2 giờ sau khi dùng axit α -glucosidaza tái tổ hợp ở người.

Khía cạnh khác của sáng chế đề xuất bộ kit để trị liệu kết hợp bệnh Pompe ở bệnh nhân cần chúng. Bộ kit này bao gồm dạng liều lượng được dụng chứa miglustat, dạng liều lượng được dụng chứa axit α -glucosidaza tái tổ hợp ở người như được xác định trong bản mô tả này, và hướng dẫn sử dụng dạng liều lượng được dụng chứa miglustat và dạng liều lượng được dụng chứa axit α -glucosidaza tái tổ hợp cho bệnh nhân cần chúng. Theo ít nhất một phương án, dạng liều lượng được dụng chứa miglustat là dạng liều lượng dùng qua đường miệng như được mô tả trong bản mô tả này, bao gồm nhưng không giới hạn ở viên nén hoặc viên nang. Theo ít nhất một phương án, dạng liều lượng được dụng chứa axit α -glucosidaza tái tổ hợp ở người là dung dịch vô trùng thích hợp để tiêm như được mô tả trong bản mô tả này. Theo ít nhất một phương án, hướng dẫn sử dụng dạng liều lượng bao gồm hướng dẫn sử dụng qua đường miệng dạng liều lượng được dụng chứa miglustat trước khi dùng dạng liều lượng được dụng chứa axit α -glucosidaza tái tổ hợp ở người bằng cách truyền trong tĩnh mạch, như được mô tả trong bản mô tả này.

Không bị ràng buộc bởi lý thuyết, tin rằng miglustat có vai trò làm chất đi kèm có được tính đối với axit α -glucosidaza tái tổ hợp ở người ATB200 và liên kết với vị trí hoạt tính của nó. Do đó, như có thể thấy trên Hình 1, đã phát hiện ra rằng miglustat làm giảm tỷ lệ phần trăm của protein ATB200 không cuộn gập và làm ổn định cấu hình hoạt tính của ATB200, ngăn ngừa sự biến tính và sự bất hoạt không thể phục hồi ở độ pH trung tính của

huyết tương và cho phép nó có điều kiện trong hệ tuần hoàn đủ lâu để đến và được hấp thụ bởi các mô. Tuy nhiên, sự liên kết của miglustat với vị trí hoạt tính của ATB200 cũng có thể dẫn đến sự ức chế hoạt tính enzym của ATB200 bằng cách ngăn chặn cơ chất tự nhiên, glycogen, tiếp cận đến vị trí hoạt tính. Tin rằng khi dùng miglustat và axit α -glucosidaza tái tổ hợp ở người cho bệnh nhân trong điều kiện được mô tả trong bản mô tả này, nồng độ của miglustat và ATB200 trong huyết tương và mô là nồng độ sao cho ATB200 được làm ổn định đến khi nó được hấp thụ vào mô và được hướng đích đến lysosom, nhưng, vì sự thanh thải miglustat nhanh, sự thủy phân glycogen bằng ATB200 trong các lysosom không bị ức chế quá mức bởi sự có mặt của miglustat, và enzym vẫn giữ được hoạt tính đủ để hữu dụng về mặt điều trị.

Có thể kết hợp tất cả các phương án được mô tả ở trên. Điều này bao gồm trong các phương án cụ thể liên quan đến:

bản chất của chất đi kèm có được tính, ví dụ miglustat; và vị trí hoạt tính mà nó đặc hiệu với;

liều lượng, đường dùng của chất đi kèm có được tính (miglustat) và loại dược phẩm bao gồm bản chất của chất mang và việc sử dụng các hợp phần có trên thị trường;

bản chất của thuốc, ví dụ sản phẩm thuốc protein trị liệu, mà có thể là đối tác của protein nội sinh mà sự biểu hiện của chúng được làm giảm hoặc không có ở đối tượng, axit α -glucosidaza tái tổ hợp ở người thích hợp, ví dụ axit α -glucosidaza tái tổ hợp ở người được biểu hiện ở tế bào trứng chuột đồng Trung Quốc (CHO) và chứa hàm lượng tăng của đơn vị N-glycan mang một hoặc nhiều gốc mannoza-6-phosphat khi so với hàm lượng của đơn vị N-glycan mang một hoặc nhiều gốc mannoza-6-phosphat của α -glucosidaza alfa; và thích hợp là có trình tự axit amin như được nêu trong SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 (hoặc như được mã hóa bởi SEQ ID NO: 2), SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 hoặc SEQ ID NO: 5;

số lượng và loại đơn vị N-glycan trên axit α -glucosidaza tái tổ hợp ở người, ví dụ N-acetylglucosamin, galactosa, axit sialic hoặc N-glycan phức hợp được tạo thành từ sự kết hợp của chúng) được gắn vào axit α -glucosidaza tái tổ hợp ở người;

mức độ phosphoryl hóa của đơn vị mannoza trên axit α -glucosidaza tái tổ hợp ở người để tạo thành mannoza-6-phosphat và/hoặc bis-mannoza-6-phosphat;

liều lượng và đường dùng (ví dụ dùng trong tĩnh mạch, đặc biệt là truyền trong tĩnh mạch, hoặc dùng trực tiếp đến mô đích) của enzym thay thế (axit α -glucosidaza tái tổ hợp ở người) và loại chế phẩm bao gồm chất mang và lượng hữu hiệu để điều trị;

khoảng thời gian cách nhau của liều lượng của chất đi kèm có được tính (miglustat) và axit α -glucosidaza tái tổ hợp ở người;

bản chất của đáp ứng trị liệu và kết quả của trị liệu kết hợp (ví dụ kết quả được tăng cường khi so với tác dụng của mỗi trị liệu tiến hành một cách riêng lẻ);

thời gian sử dụng trị liệu kết hợp, ví dụ dùng đồng thời miglustat và axit α -glucosidaza tái tổ hợp ở người hoặc dùng tuần tự, ví dụ trong đó miglustat được dùng trước axit α -glucosidaza tái tổ hợp ở người hoặc sau axit α -glucosidaza tái tổ hợp ở người hoặc trong khoảng thời gian nhất định trước hoặc sau khi dùng axit α -glucosidaza tái tổ hợp ở người; và

bản chất của bệnh nhân được điều trị (ví dụ động vật có vú chẳng hạn như người) và tình trạng bệnh mà cá thể mắc (ví dụ sự thiếu hụt enzym).

Có thể kết hợp phương án bất kỳ trong số các phương án trong danh sách ở trên với một hoặc nhiều phương án khác trong danh sách.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Các dấu hiệu khác của sáng chế trở nên rõ ràng từ các ví dụ không làm giới hạn sáng chế sau đây mà minh họa, bằng cách lấy ví dụ, các nguyên tắc của sáng chế.

Ví dụ 1: Các hạn chế của sản phẩm rhGAA Myozyme® và rhGAA Lumizyme® 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 lấy các phân đoạn trong đĩa 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.

Các Hình 2A-B mô tả các vấn đề có liên quan đến ERT thông thường (Myozyme® và Lumizyme®): 73% rhGAA trong Myozyme® (Hình 2B) và 78% rhGAA trong

Lumizyme® (Hình 2A) không liên kết với CIMPR, xem các đỉnh ngoài cùng bên trái ở mỗi hình vẽ. Chỉ có 27% rhGAA trong Myozyme® và 22% rhGAA trong Lumizyme® có chứa M6P có thể có ích để hướng nó đến đích CIMPR trên các tế bào cơ.

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.

Ví dụ 2: Điều chế tế bào CHO sản xuất rhGAA ATB200 có hàm lượng cao của N-glycan có mang mono-M6P hoặc bis-M6P.

Chuyển nạp các tế bào CHO bằng ADN biểu hiện rhGAA sau đó chọn lọc các thể biến nạp sản xuất rhGAA. Cấu trúc ADN để biến nạp tế bào CHO với ADN mã hóa cho rhGAA được thể hiện trên Hình 3. Chuyển nạp các tế bào CHO bằng ADN biểu hiện rhGAA 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). Tập hợp tế bào mà biểu hiện lượng GAA cao được nhận dạng bằng thử nghiệm hoạt tính enzym GAA và được sử dụng để thiết lập các dòng 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 α -glucosidaza 4-MU- α -glucopyranosit. 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 có các mono-M6P N-glycan hoặc bis-M6P N-

glycan được tăng cường bằng cách sử dụng quy trình này.

Ví dụ 3: Bắt giữ và Tinh chế rhGAA ATB200

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 4B và Hình 5A được quan sát về rhGAA ATB200 được tinh chế từ các mẻ sản xuất khác nhau cho thấy rằng rhGAA ATB200 có thể được sản xuất một cách nhất quán. Như được thể hiện trên Hình 2A, Hình 2B, Hình 4A và Hình 4B, rhGAA Myozyme® và rhGAA Lumizyme® thể hiện liên kết CIMPR ít đáng kể hơn so với rhGAA ATB200.

Ví dụ 4: So Sánh Phân Tích ATB200 với Lumizyme®

Sử dụng sắc ký lỏng trao đổi anion yếu ("WAX") để phân đoạn rhGAA ATB200 theo phosphat ở 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 ATB200 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 ATB200 thể hiện bốn đỉnh chiếm ưu thế rửa giải ở bên phải của Lumizyme® (Hình 6). Điều này xác nhận rằng rhGAA ATB200 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.

Ví dụ 5: Xác định đặc điểm oligosacarit của rhGAA ATB200

Đánh giá glycan rhGAA ATB200 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 7). Phát hiện thấy các mẫu ATB200 có chứa lượng N-glycan loại mannoza cao không được phosphoryl hóa thấp hơn so với Lumizyme®. Hàm lượng M6P glycan trong ATB200 cao hơn so với trong Lumizyme®, hướng đích rhGAA ATB200 đến các tế bào cơ một cách hữu hiệu 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 ATB200 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 cao

hơn trên rhGAA ATB200 tương quan trực tiếp với việc liên kết ái lực cao với CIMPR trong thử nghiệm liên kết đĩa thụ thể M6P (KD khoảng 2-4 nM) Hình 9A.

rhGAA ATB200 cũng được phân tích về các biến dạng N-glycan đặc hiệu vị trí bằng cách sử dụng hai kỹ thuật phân tích LC-MS/MS khác nhau. Trong phân tích thứ nhất, protein bị biến tính, bị khử, alkyl hóa và phân giải trước khi phân tích LC-MS/MS. Trong quá trình biến tính và khử protein, 200 μ g mẫu protein, 5 μ l tris-HCl 1 mol/l (nồng độ cuối cùng 50mM), 75 μ l guanidin HCl 8 mol/l (nồng độ cuối cùng 6 M), 1 μ l EDTA 0,5 mol/l (nồng độ cuối cùng 5 mM), 2 μ l DTT 1 mol/l (nồng độ cuối cùng 20 mM) và nước Milli-Q® được bổ sung vào ống 1,5 ml để tạo nên tổng thể tích bằng 100 μ l. Trộn mẫu và ủ ở nhiệt độ 56°C trong thời gian 30 phút trong bể khô. Trong quá trình alkyl hóa, trộn mẫu protein đã bị biến tính và đã khử với 5 μ l iodoacetamid 1 mol/l (IAM, nồng độ cuối cùng 50 mM), sau đó ủ ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 10 đến 30°C trong tối trong thời gian 30 phút. Sau khi alkyl hóa, bổ sung 400 μ l axeton đã làm lạnh trước vào mẫu và làm đông lạnh hỗn hợp ở nhiệt độ làm lạnh -80°C trong thời gian 4 giờ. Sau đó ly tâm mẫu trong thời gian 5 phút ở tốc độ 13000 vòng/phút ở nhiệt độ 4°C và loại bỏ dịch nổi bề mặt. Bổ sung 400 μ l axeton đã làm lạnh trước vào các viên, mà sau đó được ly tâm trong thời gian 5 phút ở tốc độ 13000 vòng/phút ở nhiệt độ 4°C và loại bỏ dịch nổi bề mặt. Sau đó mẫu được làm khô trong không khí trên nước đá trong tối để loại bỏ phần axeton còn lại. Bổ sung 40 μ l urê 8M và 160 μ l NH_4HCO_3 100 mM vào mẫu để hòa tan protein. Trong quá trình phân giải bằng trypsin, sau đó bổ sung 50 μ g protein vào đệm phân giải trypsin đến thể tích cuối cùng bằng 100 μ l, và bổ sung 5 μ l trypsin 0,5 mg/ml (tỷ lệ protein so với enzym bằng 20/1 theo khối lượng/khối lượng). Trộn kỹ dung dịch này và ủ qua đêm (16 ± 2 giờ) ở nhiệt độ 37°C. Bổ sung 2,5 μ l TFA 20% (nồng độ cuối cùng 0,5%) để làm dừng phản ứng. Sau đó phân tích mẫu bằng cách sử dụng Khối Phổ Kế Thermo Scientific Orbitrap Velos Pro™.

Trong phân tích LC-MS/MS thứ hai, mẫu ATB200 được điều chế theo quy trình biến tính, khử, alkyl hóa và phân giải tương tự, ngoại trừ việc sử dụng axit iodoacetic (IAA) làm chất phản ứng alkyl hóa thay cho IAM, và sau đó được phân tích bằng cách sử dụng Khối Phổ Kế Thermo Scientific Orbitrap Fusion Lumos Tribid™.

Trong phân tích LC-MS/MS thứ ba, mẫu ATB200 được điều chế theo quy trình biến tính, khử, alkyl hóa và phân giải bằng cách sử dụng iodoacetamid (IAM) làm chất phản ứng

alkyl hóa tương tự, và sau đó được phân tích bằng cách sử dụng Khối Phổ Kế Thermo Scientific Orbitrap Fusion.

Các kết quả của phân tích thứ nhất và thứ hai được thể hiện trên các hình vẽ từ Hình 8B đến Hình 8H và kết quả của phân tích thứ ba được thể hiện trên Hình 8A. Trên các hình vẽ từ Hình 8B đến Hình 8H, kết quả của phân tích thứ nhất được thể hiện bằng cột bên trái (màu xám đậm) và kết quả của phân tích thứ hai được thể hiện bằng cột bên phải (màu xám nhạt). Trên các hình vẽ từ Hình 8B đến Hình 8H, danh pháp ký hiệu để thể hiện glycan là theo tài liệu Varki, A., Cummings, R.D., Esko J.D., et al., *Essentials of Glycobiology*, tái bản lần thứ 2 (2009). Trên các hình vẽ từ Hình 8A đến Hình 8H, vị trí glycosyl hóa được nêu tương quan với SEQ ID NO: 5: N84, N177, N334, N414, N596, N826 và N869. Đối với trình tự axit amin chiều dài đầy đủ của SEQ ID NO: 1, các vị trí glycosyl hóa tiềm năng nằm ở các vị trí sau đây: N140, N233, N390, N470, N652, N882 và N925.

Như có thể thấy trên các hình vẽ từ Hình 8B đến Hình 8H, hai phân tích thứ nhất cung cấp kết quả tương tự, mặc dù có một số biến đổi giữa các kết quả. Sự biến đổi này có thể là do một số yếu tố, bao gồm thiết bị được sử dụng và tính chất trộn vụn của phân tích N-glycan. Ví dụ, nếu một số loại glycan được phosphoryl hóa không được nhận dạng và/hoặc không được định lượng, thì tổng số glycan được phosphoryl hóa có thể được thể hiện dưới mức, và tỷ lệ phần trăm của rhGAA có mang glycan được phosphoryl hóa tại vị trí đó có thể được thể hiện dưới mức. Ví dụ khác là, nếu một số loại glycan không được phosphoryl hóa không được nhận dạng và/hoặc không được định lượng, thì tổng số glycan không được phosphoryl hóa có thể được thể hiện dưới mức, và tỷ lệ phần trăm của rhGAA có mang glycan được phosphoryl hóa tại vị trí đó có thể được thể hiện quá mức.

Hình 8A thể hiện độ chiếm giữ vị trí N-glycosyl hóa của ATB200. Như có thể thấy trên Hình 8A, các vị trí N-glycosyl hóa thứ nhất, thứ hai, thứ ba, thứ tư, thứ năm và thứ sáu hầu hết bị chiếm giữ, với xấp xỉ 90% và lên đến khoảng 100% enzym ATB200 có glycan được phát hiện tại mỗi vị trí tiềm năng. Tuy nhiên, vị trí N-glycosyl hóa tiềm năng thứ bảy được glycosyl hóa khoảng một nửa thời gian.

Hình 8B thể hiện biên dạng N-glycosyl hóa tại vị trí thứ nhất, N84. Như có thể thấy trên Hình 8B, loại glycan chính là bis-M6P glycan. Cả phân tích thứ nhất và phân tích thứ

hai đều phát hiện trên 75% ATB200 có bis-M6P glycan tại vị trí thứ nhất.

Hình 8C thể hiện biên dạng N-glycosyl hóa tại vị trí thứ hai, N177. Như có thể thấy trên Hình 8C, loại glycan chính là mono-M6P glycan và glycan manosa cao không được phosphoryl hóa. Cả phân tích thứ nhất và phân tích thứ hai đều phát hiện trên 40% ATB200 có mono-M6P glycan tại vị trí thứ hai.

Hình 8D thể hiện biên dạng N-glycosyl hóa tại vị trí thứ ba, N334. Như có thể thấy trên Hình 8D, loại glycan chính là glycan manosa cao không được phosphoryl hóa, glycan phức hợp có hai nhánh, ba nhánh, và bốn nhánh, và glycan lai. Cả phân tích thứ nhất và phân tích thứ hai đều phát hiện trên 20% ATB200 có gốc axit sialic tại vị trí thứ ba.

Hình 8E thể hiện biên dạng N-glycosyl hóa tại vị trí thứ tư, N414. Như có thể thấy trên Hình 8E, loại glycan chính là bis-M6P và mono-M6P glycan. Cả phân tích thứ nhất và phân tích thứ hai đều phát hiện trên 40% ATB200 có bis-M6P glycan tại vị trí thứ tư. Cả phân tích thứ nhất và phân tích thứ hai còn phát hiện trên 25% ATB200 có mono-M6P glycan tại vị trí thứ tư.

Hình 8F thể hiện biên dạng N-glycosyl hóa tại vị trí thứ năm, N596. Như có thể thấy trên Hình 8F, loại glycan chính là glycan phức hợp có hai nhánh được fucosyl hóa. Cả phân tích thứ nhất và phân tích thứ hai đều phát hiện trên 70% ATB200 có gốc axit sialic tại vị trí thứ năm.

Hình 8G thể hiện biên dạng N-glycosyl hóa tại vị trí thứ sáu, N826. Như có thể thấy trên Hình 8G, loại glycan chính là glycan phức hợp có hai nhánh, ba nhánh, và bốn nhánh. Cả phân tích thứ nhất và phân tích thứ hai đều phát hiện trên 80% ATB200 có gốc axit sialic tại vị trí thứ sáu.

Hình 8H thể hiện tóm tắt của sự phosphoryl hóa tại mỗi vị trí trong sáu vị trí N-glycosyl hóa tiềm năng đầu tiên. Như có thể thấy trên Hình 8H, cả phân tích thứ nhất và phân tích thứ hai đều phát hiện mức độ phosphoryl hóa cao tại các vị trí thứ nhất, thứ hai và thứ tư. Cả hai phân tích phát hiện trên 80% ATB200 được mono- hoặc di-phosphoryl hóa tại vị trí thứ nhất, trên 40% ATB200 được mono-phosphoryl hóa tại vị trí thứ hai, và trên 80% ATB200 được mono- hoặc di-phosphoryl hóa tại vị trí thứ tư.

Ví dụ 6: Xác định đặc điểm ái lực CIMPR của ATB200

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 rhGAA ATB200 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 9A, rhGAA ATB200 liên kết với CIMPR tốt hơn đáng kể so với Lumizyme®.

Hình 9B thể hiện hàm lượng tương đối của bis-M6P glycan trong Lumizyme®, rhGAA thông thường, và ATB200 theo sáng chế. Đối với Lumizyme®, trung bình chỉ có 10% phân tử có glycan được bis-phosphoryl hóa. Điều này trái với ATB200, trong đó trung bình mỗi phân tử rhGAA có ít nhất một glycan được bis-phosphoryl hóa.

Ví dụ 7: rhGAA ATB200 được nội tại hóa hiệu quả hơn bởi nguyên bào sợi so với Lumizyme®

So sánh sự hấp thụ tế bào tương đối của rhGAA ATB200 và Lumizyme® 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 ATB200 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. Đo GAA được nội tại hóa bằng cách thủy phân 4MU- α -Glucosid và được minh họa bằng đồ thị tương quan với tổng protein tế bào và các kết quả thể hiện trên các Hình 10A-B.

Cũng phát hiện thấy là rhGAA ATB200 được hấp thụ một cách hiệu quả vào tế bào (Hình 10A và Hình 10B), một cách tương ứng, cho thấy rằng rhGAA ATB200 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 ATB200 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 (Khả thụ) được ngoại suy từ các kết quả này là trong khoảng từ 2 đến 3 nM đối với ATB200 và 56 nM đối với Lumizyme® như được thể hiện trên Hình 10C. Các kết quả này gợi ý rằng rhGAA ATB200 là biện pháp điều trị được hướng đích tốt đối

với bệnh Pompe.

Ví dụ 8: Mô hình hóa dược động học (PK) quần thể đối với ATB200 và miglustat

Dữ liệu dược động học đối với axit α -glucosidaza (ATB200), bao gồm thời gian lấy mẫu, lịch sử dùng liều lượng và nồng độ axit α -glucosidaza trong huyết tương, được thu nhận từ chuột cống, chuột nhắt và khỉ dùng ATB200 bằng cách tiêm trong tĩnh mạch. Dữ liệu dược động học đối với miglustat và duvoglustat trong huyết tương và mô được thu lấy từ người hoặc từ chuột nhắt.

Mô hình hóa và mô phỏng được thực hiện bằng cách sử dụng Phoenix® NLME™ v1.3. Xây dựng các mô hình PK phân ngăn để đánh giá PK của ATB200 trong huyết tương. Các mô hình bao gồm:

- Mô tả mối quan hệ giữa nồng độ huyết tương và thời gian;
- Xác định đặc điểm thành phần biến thiên giữa các động vật và trong cùng động vật ở các tham số mô hình; và
- Mô tả thành phần bất định trong tình trạng hiểu biết về các thành phần mô hình thiết yếu.

Mô hình ảnh hưởng hỗn hợp phi tuyến tính (NLME) có dạng:

$$C_{pij} = C \cdot D_i \cdot f(\theta_i) + \varepsilon_{ij}$$

$$\theta_i = \theta_1, \dots, \theta_m$$

trong đó C_{pij} là nồng độ tại thời điểm thu gom thứ j (t_j) đối với động vật i , D_i thể hiện lịch sử dùng liều lượng đối với động vật i , θ_i là vector của tham số PK đối với động vật i , và ε_{ij} là sai số ngẫu nhiên có liên quan đến nồng độ thứ j đối với động vật i .

Sự biến thiên giữa các đối tượng (BSV) ở các tham số được mô hình hóa dưới dạng phân bố log-chuẩn:

$$\theta_{in} = \theta_{TVn} \text{ mũ } (\eta_{in})$$

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

trong đó θ_{TVn} là giá trị tiêu biểu quần thể cho tham số PK thứ n (ví dụ độ thanh thải) và η_{in} là ảnh hưởng giữa các động vật ngẫu nhiên lên tham số thứ n đối với động vật i . Các

ảnh hưởng ngẫu nhiên ($\eta_1, \dots, \eta_m$) thường được phân bố với trung bình 0 và phương sai ước tính ω^2 được bao gồm trong ma trận OMEGA (Ω).

PK được giả định là không phụ thuộc loại và được chia tỷ lệ theo phương pháp Dedrick tổng quát hóa mà chia tỷ lệ bố trí theo độ lớn của khối lượng cơ thể động vật:

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

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

trong đó CL = độ thanh thải toàn thân, V = thể tích phân bố, BW = khối lượng cơ thể, p = ngoại vi, b và d = số mũ tương quan sinh trưởng, và a và c = các giá trị tiêu biểu cho BW = 1. Trong trường hợp này, có thể so sánh số mũ b và d với các giá trị tổng quát hơn được chấp nhận trong tài liệu (b=0,75 và d=1,0). Sử dụng BW danh nghĩa (0,025, 0,25 và 2,5 kg) trong các phân tích.

Nồng độ axit α -glucosidaza cơ sở được mô hình hóa dưới dạng $C_{\text{cơ sở}} = \text{Tốc độ tổng hợp axit } \alpha\text{-glucosidaza} / \text{CL}$ và có thể được ngoại suy đối với người, vì $C_{\text{cơ sở}}$ là đặc trưng loại, không phụ thuộc vào nồng độ ATB200 và đã biết ở người mắc bệnh Pompe. Xác định mô hình cơ sở bằng cách sử dụng Phoenix® FOCE-ELS, để đánh giá liệu mô hình phân 1 hoặc 2 ngăn có phải là tốt nhất để khớp dữ liệu. Các nguồn biến thiên trong PK của axit α -glucosidaza cũng được khảo sát bằng mắt và bằng cách tìm kiếm tác dụng của các tác dụng liên quan đến kiểu đại / kiểu loài / liều lượng khác nhau lên PK.

Đối với ATB200, mô hình hai ngăn với sự loại trừ tuyến tính biểu thị đặc điểm tương xứng các biên dạng nồng độ-thời gian của hoạt tính axit α -glucosidaza đối với tất cả các mức liều lượng qua các loài động vật. Mô hình này bao gồm thành phần tương quan sinh trưởng theo lý thuyết giải thích cho sự khác biệt về khối lượng cơ thể giữa các loài động vật trên độ thanh thải (CL) và thể tích phân bố (Vc). Độ phù hợp của mô hình của mô hình PK quần thể đối với ATB200 được thể hiện trên Hình 11. Các tham số PK quần thể của ATB200 trong các nghiên cứu không lâm sàng được thể hiện trong Bảng 1.

Bảng 1:

Tham Số PK	Giá Trị Tiêu Biểu (Sai số chuẩn tương đối (%))	Độ biến thiên giữa các đối tượng (%)
Độ thanh thải toàn thân (CL; l/giờ)	$0,00957 \times (BW/0,25)^{0,78}$ (5,1) (3,2)	21,0
Thể tích trung tâm của sự phân bố (V_c ; l)	$0,0101 \times (BW/0,25)^{0,83}$ (4,3) (1,7)	5,3
Độ thanh thải ngoại vi (CL_d ; l/giờ)	$0,000290 \times (BW/0,25)^{0,78}$ (43,2)	Không có
Thể tích ngoại vi của sự phân bố (V_2 ; L)	$0,000653 \times (BW/0,25)^{0,83}$ (35,6)	Không có
Tốc độ tổng hợp axit α - glucosidaza nội sinh (SYNT; mg/giờ)	Chuột nhắt: 0,00401 (8,1) Chuột cống: 0,0203 (13,3) Khỉ: 0,00518 (16,9)	Không có

BW: khối lượng cơ thể

Biên dạng nồng độ-thời gian của miglustat (200 mg) ở bệnh nhân mắc bệnh Pompe được so sánh với biên dạng nồng độ-thời gian thu được sau khi dùng duvoglustat ở các tình nguyện viên khỏe mạnh bình thường (khoảng liều lượng: 50, 100, 250, 600, và 1000 mg). Biên dạng nồng độ trong huyết tương đã chuẩn hóa liều lượng theo thời gian của miglustat và duvoglustat được thể hiện trên Hình 12. Vì biên dạng nồng độ-thời gian của miglustat ở các bệnh nhân mắc bệnh Pompe tương tự với các biên dạng nồng độ-thời gian được quan sát thấy sau khi dùng liều lượng duvoglustat ở các đối tượng khỏe mạnh hơn 24 giờ, sử dụng dữ liệu PK thu gom được đối với duvoglustat ở các mô ngoại vi làm đại diện để mô hình hóa sự tiếp xúc với miglustat. Sử dụng mô hình hai ngăn có sự loại trừ tuyến tính để xác định đặc điểm biên dạng nồng độ-thời gian của duvoglustat ở mô.

Độ phù hợp của sự khớp của mô hình PK của duvoglustat được thể hiện trên Hình 13A và Hình 13B. Các tham số PK mô hình cuối cùng của duvoglustat trong huyết tương và mô được thể hiện trong Bảng 2.

Bảng 2:

Tham Số PK	Giá Trị Tiêu Biểu (CV%)
Thể tích phân bố (V; l)	44,5 (7,41)
Độ thanh thải toàn thân (CL; l/giờ)	9,44 (6,99)
Hằng số tốc độ hấp thụ (K_a ; 1/giờ)	1,10 (14,0)
Thể tích phân bố ngoại vi (V ₂ ; l)	8,68 (19,39)
Độ thanh thải ngăn trung tâm (CL ₂ ; l/giờ)	0,205 (23,7)
Thể tích phân bố giữa các ngăn (VQ; l)	61,8 (21,2)
Hằng số tốc độ loại trừ (Keo)	0,378 (11,1)
Thể tích phân bố giữa các ngăn trong ngăn trung tâm (VQ ₂ ; l)	3390
Độ thanh thải ngăn ngoại vi (CL ₃ ; l/giờ)	88,0 (7,72)
Độ thanh thải giữa các ngăn biểu kiến (CLQ; l/giờ)	40,6 (10,6)
Thời gian trễ (giờ)	0,176 (30,7)
Sai số chuẩn tương đối của ngăn trung tâm	0,477 (6,56)
Sai số chuẩn tương đối của ngăn ngoại vi	0,368 (8,19)

CV: hệ số biến thiên

Xây dựng mô hình PK quần thể của miglustat dựa trên liều lượng dùng qua đường miệng ở chuột đã bị làm bất hoạt (KO) *Gaa*. Các tham số PK quần thể của miglustat ở chuột KO *Gaa* được thể hiện trong Bảng 3. Độ phù hợp của mô hình được thể hiện trên Hình 14. Mô hình này có sai số cộng gộp thẳng dư bằng 0,475 ng/ml.

Bảng 3:

Tham Số PK	Giá Trị Tiêu Biểu (BSV%)
Hằng số tốc độ hấp thụ (K_a ; h^{-1})	2,09 (4,56)
Độ thanh thải toàn thân (CL ; ml/giờ)	43,3 (9,61)
Thể tích phân bố trung tâm (V_c ; ml)	4,55 (45,1)
Độ thanh thải ngoại vi (CL_d ; ml/giờ)	4,57 (32,1)
Thể tích phân bố ngoại vi (V_2 ; ml)	19,6 (23,3)

BSV: độ biến thiên giữa các đối tượng

Ví dụ 9: Mô hình hóa các tham số dược động học (PK) axit α -glucosidaza tái tổ hợp (ATB200) ở người

Sử dụng các mô hình dược động học (Ví dụ 8) để tiến hành các mô phỏng và dự đoán các biên dạng nồng độ-thời gian của axit α -glucosidaza ở người mắc bệnh Pompe giai đoạn muộn sau khi dùng liều lượng ATB200. Hàm số tương quan sinh trưởng cho phép kết nối khối lượng cơ thể với độ thanh thải và thể tích phân bố, và do đó cho phép dự đoán các tham số PK ở các đối tượng là người tiêu biểu có khối lượng cơ thể bằng 70 kg. Tùy chỉnh mô hình này bằng cách bao gồm tốc độ tổng hợp axit α -glucosidaza nội sinh ở người (Umapathysivam K, Hopwood JJ, Meikle PJ. Determination of acid alpha-glucosidase activity in blood spots as a diagnostic test for Pompe disease. *Clin Chem.* (2001) Aug; 47(8): 1378-83).

Liều lượng IV bằng 20 mg/kg đơn lẻ của ATB200 ở người sau khi truyền trong 4 giờ được dự đoán là dẫn đến biên dạng nồng độ-thời gian được thể hiện trên Hình 15. Các tham số PK ở người có khối lượng 70 kg tiêu biểu và các tham số tiếp xúc thu được sau khi truyền IV 20 mg/kg ATB200 trong 4 giờ được thể hiện trong Bảng 4.

Bảng 4:

Tham số dược động học	Giá trị dự đoán
Độ thanh thải toàn thân (CL; l/giờ)	0,768
Thể tích phân bố trung tâm (V_c ; l)	1,09
Diện tích dưới đường cong, được ngoại suy đến vô cùng (AUC_0 đến vô cùng; mg·giờ/l)	1822
Nồng độ lớn nhất ($C_{\text{lớn nhất}}$; mg/l)	423
Thời gian mà đạt được nồng độ lớn nhất ($T_{\text{lớn nhất}}$; giờ)	4
Thời gian bán thải ($T_{1/2}$; giờ)	2,17

Độ thanh thải toàn thân (CL) và thể tích phân bố (V) của ATB200 ở bệnh nhân có khối lượng 70 kg tiêu biểu được dự đoán lần lượt là 0,768 l/giờ và 2,41 l.

Theo nhãn sản phẩm đối với Lumizyme® (α-glucosidaza alfa), độ thanh thải toàn thân của axit α-glucosidaza ở Tuần 52 sau khi dùng liều lượng Lumizyme® lặp lại ở bệnh nhân mắc bệnh Pompe giai đoạn muộn là 601 ml/giờ (0,601 l/giờ) và thời gian bán thải của Lumizyme® là 2,4 giờ. Dựa trên mô hình ở trên, độ thanh thải toàn thân của ATB200 ở các đối tượng trưởng thành mắc bệnh Pompe được mong đợi là nhanh hơn xấp xỉ 28% so với độ thanh thải được báo cáo đối với Lumizyme®. Ngoài ra, AUC được dự đoán ở người sau khi dùng liều lượng 20 mg/kg của ATB200 được mong đợi là thấp hơn khoảng 25% (AUC_0 đến vô cùng: 1822 mg·giờ/l) so với AUC được báo cáo sau khi dùng liều lượng 20 mg/kg Lumizyme® (~2700 μg·giờ/ml).

Ví dụ 10: Mô hình tiếp xúc-đáp ứng đối với sự giảm glycogen

Chuột nhất đã bị làm bất hoạt *Gaa* được dùng axit α-glucosidaza (ATB200) trong tĩnh mạch ở các liều lượng bằng 5, 10 và 20 mg/kg, liều lượng qua đường miệng tăng dần của miglustat (1, 3 và 10 mg/kg) đồng thời với liều lượng trong tĩnh mạch bằng 5 hoặc 10

mg/kg của ATB200 hoặc liều lượng qua đường miệng tăng dần của miglustat (1, 3, 5, 10, 20, và 30 mg/kg) đồng thời với liều lượng trong tĩnh mạch bằng 20 mg/kg của ATB200. Đo hàm lượng glycogen như được mô tả trước đây (Khanna, R, Flanagan, JJ, Feng, J, Soska, R, Frascella, M, Pellegrino, LJ et al. (2012). "The pharmacological chaperone AT2220 increases recombinant human acid α -glucosidase uptake and glycogen reduction in a mouse model of Pompe disease. PLoS One 7(7): e40776). Tính tỷ lệ của hàm lượng glycogen được quan sát thấy sau mỗi điều trị trị liệu kết hợp với hàm lượng glycogen được quan sát thấy sau khi đơn trị liệu (tỷ lệ glycogen). Kết quả được nêu trong Bảng 5.

Bảng 5:

Điều Trị		Glycogen (µg/mg protein)				Tỉ Lệ (Trị liệu kết hợp / Đơn trị liệu)
ATB200 (mg/kg)	Miglustat (mg/kg)	Đơn trị liệu	Trị liệu Kết hợp		Trung vị (N)	
		Nghiên cứu #1 Trung vị (N)	Nghiên cứu #2 Trung vị (N)	Nghiên cứu #3 Trung vị (N)		
5	Không có	307 (N=7)	Không có	Không có	307 (N=7)	Không có
10	Không có	259 (N=7)	Không có	Không có	259 (N=7)	Không có
20	Không có	157 (N=7)	Không có	195 (N=14)	181 (N=21)	Không có
5	1	Không có	323 (N=7)	Không có	323 (N=7)	1,05
	3	Không có	359 (N=6)	Không có	359 (N=6)	1,17

Điều Trị		Glycogen (µg/mg protein)				Tỉ Lệ (Trị liệu kết hợp / Đơn trị liệu)
ATB200 (mg/kg)	Miglustat (mg/kg)	Đơn trị liệu	Trị liệu Kết hợp		Trung vị (N)	
		Nghiên cứu #1 Trung vị (N)	Nghiên cứu #2 Trung vị (N)	Nghiên cứu #3 Trung vị (N)		
	10	Không có	352 (N=7)	Không có	352 (N=7)	1,15
10	1	Không có	273 (N=7)	Không có	273 (N=7)	1,05
	3	Không có	252 (N=7)	Không có	252 (N=7)	0.973
	10	Không có	278 (N=7)	Không có	278 (N=7)	1,07

Điều Trị		Glycogen (µg/mg protein)				Tỉ Lệ (Trị liệu kết hợp / Đơn trị liệu)
ATB200 (mg/kg)	Miglustat (mg/kg)	Đơn trị liệu	Trị liệu Kết hợp		Trung vị (N)	
		Nghiên cứu #1 Trung vị (N)	Nghiên cứu #2 Trung vị (N)	Nghiên cứu #3 Trung vị (N)		
20	1	Không có	154 (N=7)	Không có	154 (N=7)	0,851
	3	Không có	175 (N=7)	Không có	175 (N=7)	0,967
	5	Không có	NA	163 (N=14)	163 (N=14)	0,900
	10	Không có	97 (N=6)	145 (N=13)	118 (N=19)	0,652
	20	Không có	NA	122 (N=13)	122 (N=13)	0,674
	30	Không có	167 (N=6)	175 (N=14)	170 (N=20)	0,939

Ngoài ra, các hình vẽ từ Hình 15A đến Hình 15C thể hiện ảnh hưởng của việc dùng alglucosidaza alfa (Lumizyme®) và ATB200 lên độ thanh thải glycogen ở chuột đã bị làm bất hoạt *Gaa*. Các con vật được cung cấp hai lần dùng IV dạng bolus (hai tuần một lần); thu hoạch mô hai tuần sau khi dùng liều lần cuối và phân tích hoạt tính axit α -glucosidaza và hàm lượng glycogen.

Như có thể thấy từ kết quả trong Bảng 5, phát hiện rằng ATB200 làm suy kiệt glycogen mô ở chuột đã bị làm bất hoạt axit α -glucosidaza (*Gaa*) theo cách phụ thuộc liều lượng. Liều lượng bằng 20 mg/kg của ATB200 loại bỏ nhất quán tỷ lệ lớn hơn của glycogen dự trữ ở chuột đã bị làm bất hoạt *Gaa* so với mức độ liều lượng bằng 5 và 10 mg/kg. Tuy nhiên, như có thể thấy trên các hình vẽ từ Hình 15A đến Hình 15C, ATB200 được dùng ở liều lượng 5 mg/kg cho thấy sự giảm tương tự của glycogen ở cơ tim và cơ xương chuột (cơ tứ đầu đùi và cơ tam đầu đùi) so với Lumizyme® được dùng ở liều lượng 20 mg/kg, mặc dù ATB200 được dùng ở liều lượng 10 và 20 mg/kg đã cho thấy sự giảm tốt hơn đáng kể của hàm lượng glycogen ở cơ xương so với Lumizyme®.

Ngoài ra, các liều lượng bằng 10 và 20 mg/kg của miglustat được dùng phối hợp với ATB200 ở lượng 20 mg/kg dẫn đến sự giảm hàm lượng glycogen ở chuột đã bị làm bất hoạt *Gaa* lần lượt xuống 118 và 122 $\mu\text{g}/\text{mg}$ protein. Việc dùng liều lượng miglustat ở mức 30 mg/kg gây ra sự giảm glycogen ít hơn. Không bị ràng buộc bởi lý thuyết, tin rằng tại các nồng độ miglustat cao hơn, sự ức chế axit α -glucosidaza ở các lysosom có thể vượt quá tác dụng chất đi kèm có lợi, do đó làm giảm sự phân hủy của glycogen ở lysosom.

Sử dụng các mô hình được động học (Ví dụ 8) để dự đoán sự tiếp xúc với axit α -glucosidaza và miglustat, được khớp theo thời gian với các giá trị đối với hàm lượng glycogen lysosom ở mô trong Bảng 5. Tỷ lệ tiếp xúc trạng thái ổn định (tiếp xúc trung bình trong thời gian 24 giờ) của miglustat/ATB200 bắt nguồn từ mỗi trị liệu kết hợp được thử nghiệm, lập đồ thị dựa trên tỷ lệ glycogen tương ứng (Bảng 5) và khớp với hàm số toán học. Đường cong tiếp xúc-đáp ứng được thể hiện trên Hình 17.

Như có thể thấy từ các kết quả trên Hình 17, dùng phối hợp các liều lượng 10 và 20 mg/kg của miglustat với liều lượng 20 mg/kg của ATB200 mang lại độ ổn định tốt của hoạt tính axit α -glucosidaza trong huyết tương, trong khi tối đa hóa sự giảm glycogen. Các liều lượng miglustat thấp hơn (1, 3, và 5 mg/kg) được cho là dẫn đến sự ổn định hoạt tính axit α -glucosidaza dưới mức tối ưu, trong khi đó liều lượng miglustat cao nhất (30 mg/kg) được cho là dẫn đến sự ức chế quá mức của hoạt tính α -glucosidaza trong lysosom.

Dựa trên các mô hình được động học (Ví dụ 8), tỷ lệ AUC miglustat/ATB200 được quan sát thấy bằng 0,01159 (dùng phối hợp 10 mg/kg miglustat với 20 mg/kg ATB200)

được mong đợi là tương ứng với liều lượng miglustat bằng khoảng 270 mg được dùng phối hợp với 20 mg/kg ATB200 ở người có khối lượng 70 kg tiêu biểu. Các tỷ lệ AUC bằng 0,01 và 0,02 lần lượt tương ứng với liều lượng miglustat bằng 233 và 466 mg, được dùng phối hợp với 20 mg/kg ATB200, ở đối tượng có khối lượng 70 kg tiêu biểu.

Ví dụ 11: Mô hình hóa các nồng độ miglustat/duvoglustat ở người

Sử dụng các mô hình dược động học (Ví dụ 8) để dự đoán khoảng thời gian mà nồng độ duvoglustat ở huyết tương hoặc mô (đại diện cho miglustat) vẫn ở trên IC_{50} (nồng độ mang lại 50% sự ức chế lớn nhất của hoạt tính axit α -glucosidaza) của miglustat trong huyết tương và lysosom. Xác định sự ức chế hoạt tính axit α -glucosidaza bằng các phương pháp được mô tả trước đây (Flanagan JJ, Rossi B, Tang K, Wu X, Mascioli K, et al. (2009) "The pharmacological chaperone 1-deoxynojirimycin increases the activity and lysosomal trafficking of multiple mutant forms of acid alpha-glucosidase." Hum Mutat 30: 1683-1692). Giá trị IC_{50} của miglustat ở độ pH của huyết tương (độ pH 7,0) được xác định bằng 170 $\mu\text{g/l}$, trong khi giá trị IC_{50} ở độ pH của ngăn lysosom (độ pH 5,2) được xác định bằng 377 $\mu\text{g/l}$.

Kết quả của dự đoán mô hình được thể hiện trong Bảng 6. Biên dạng nồng độ-thời gian được dự đoán của miglustat trong huyết tương và trong lysosom sau khi dùng liều lượng lặp lại lần lượt được thể hiện trên Hình 17 và Hình 18.

Bảng 6:

Liều Lượng Miglustat (mg)	Thời gian > IC_{50} (giờ)	
	Huyết tương (độ pH 7,0)	Lysosom (độ pH 5,2)
100	13,1	0
150	15,0	0
200	16,4	1,19
233	17,2	2,96
250	17,5	3,58

Liều Lượng Miglustat (mg)	Thời gian > IC ₅₀ (giờ)	
	Huyết tương (độ pH 7,0)	Lysosom (độ pH 5,2)
270	17,9	4,15
300	18,4	4,92
466	20,7	8,04
600	22,0	9,96
699	22,8	11,2

Dựa trên các kết quả được thể hiện trong Bảng 6 và Hình 17 và Hình 18, liều lượng 260 mg của miglustat được mong đợi là liên kết với và làm ổn định ATB200 trong huyết tương lên đến 18 giờ trong khi đó sự ức chế hoạt tính axit α -glucosidaza ở lysosom được mong đợi là chỉ kéo dài 4 giờ.

Ví dụ 12: Sinh lý và hình thái cơ ở chuột đã bị làm bất hoạt *Gaa*

Chuột đã bị làm bất hoạt *Gaa* được cho dùng hai lần dùng IV dạng bolus của axit α -glucosidaza tái tổ hợp ở người (alglucosidaza alfa hoặc ATB200) ở liều lượng 20 mg/kg hai tuần một lần. Miglustat được dùng qua đường miệng ở liều lượng bằng 10 mg/kg cho tập hợp con của các con vật được điều trị bằng ATB200 trong thời gian 30 phút trước khi dùng ATB200. Chuột đối chứng được điều trị bằng một mình tá được lỏng. Mô cơ dép, mô cơ tứ đầu đùi và mô cơ hoành được thu lấy trong thời gian hai tuần sau khi dùng liều lượng axit α -glucosidaza tái tổ hợp ở người lần cuối. Phân tích mô cơ dép và mô cơ hoành về hàm lượng glycogen, bằng cách nhuộm màu bằng axit periodíc – chất phản ứng Schiff (PAS), và về sự tăng sinh lysosom, bằng cách đo hàm lượng của chỉ thị protein màng liên kết lysosom (LAMP1), mà được điều hòa tăng ở bệnh Pompe. Các lát cắt bán mỏng của cơ tứ đầu đùi nhúng trong nhựa epoxy (Epon) được nhuộm màu bằng xanh metylen và quan sát bằng kính hiển vi điện tử (1000x) để xác định phạm vi có mặt của không bào. Các mẫu cơ tứ đầu đùi được phân tích hóa mô miễn dịch để xác định hàm lượng của chỉ thị tự tiêu thể liên hợp

protein liên kết vi ống 1A/1B-chuỗi nhẹ 3 phosphatidyletanolamin (LC3A II) và p62, chất vận chuyển glucoza phụ thuộc insulin GLUT4 và chất vận chuyển glucoza không phụ thuộc insulin GLUT1.

Trong nghiên cứu tương tự, con chuột đã bị làm bất hoạt *Gaa* được cho dùng bốn lần dùng IV dạng bolus của axit α -glucosidaza tái tổ hợp ở người (alglucosidaza alfa hoặc ATB200) ở liều lượng 20 mg/kg hai tuần một lần. Miglustat được dùng qua đường miệng ở liều lượng bằng 10 mg/kg cho tập hợp con của các con vật được điều trị bằng ATB200 trong thời gian 30 phút trước khi dùng ATB200. Chuột đối chứng được điều trị bằng một mình tá được lỏng. Mô cơ tim được thu lấy trong thời gian hai tuần sau khi dùng liều lượng axit α -glucosidaza tái tổ hợp ở người lần cuối và được phân tích về các hàm lượng glycogen, bằng cách nhuộm màu bằng axit periodic – chất phản ứng Schiff (PAS), và về sự tăng sinh lysosom, bằng cách đo hàm lượng LAMP1.

Như có thể thấy trên Hình 20, việc dùng ATB200 cho thấy sự giảm đi của sự tăng sinh lysosom ở mô cơ tim, mô cơ hoành và mô cơ xương (cơ đùi) so với việc điều trị thông thường bằng alglucosidaza alfa, và việc dùng phối hợp miglustat với ATB200 cho thấy sự giảm thêm đáng kể của sự tăng sinh lysosom, đạt đến hàm lượng đã thấy ở chuột kiểu dại (WT). Ngoài ra, như có thể thấy trên Hình 21, việc dùng ATB200 cho thấy sự giảm đi của hàm lượng glycogen đốm ở mô cơ tim và mô cơ xương (cơ đùi) so với việc điều trị thông thường bằng alglucosidaza alfa, và việc dùng phối hợp miglustat với ATB200 cho thấy sự giảm thêm đáng kể, đạt đến mức độ đã thấy ở chuột kiểu dại (WT) lần nữa.

Cũng như vậy, như có thể thấy trên Hình 22, việc dùng phối hợp miglustat với ATB200 làm giảm đáng kể số lượng không bào ở sợi cơ trong cơ tứ đầu đùi của chuột đã bị làm bất hoạt *Gaa* so với chuột không được điều trị và chuột điều trị bằng alglucosidaza alfa. Như có thể thấy trên Hình 23, hàm lượng của cả LC3 II và p62 được tăng lên ở chuột đã bị làm bất hoạt *Gaa* so với chuột kiểu dại, nhưng bị giảm đáng kể khi điều trị bằng ATB200 và miglustat, cho thấy rằng sự tăng lên của sự tự tiêu có liên quan đến sự thiếu hụt axit α -glucosidaza bị giảm đi khi dùng phối hợp ATB200 và miglustat. Ngoài ra, hàm lượng chất vận chuyển glucoza phụ thuộc insulin GLUT4 và chất vận chuyển glucoza không phụ thuộc insulin GLUT1 được tăng lên ở chuột đã bị làm bất hoạt *Gaa* so với chuột kiểu dại, nhưng lại, bị giảm đáng kể khi điều trị bằng ATB200 và miglustat. Hàm lượng GLUT4 và GLUT1

tăng có liên quan đến sự thiếu hụt axit α -glucosidaza có thể góp phần làm tăng sự hấp thụ glucoza vào các sợi cơ và làm tăng sự tổng hợp glycogen cả ở mức cơ sở và sau khi dung nạp thức ăn. Do đó, đã phát hiện rằng việc điều trị kết hợp bằng ATB200 và miglustat làm cải thiện hình thái và sinh lý cơ xương ở mô hình chuột mắc bệnh Pompe.

Ví dụ 13: Độ độc của ATB200 được dùng phối hợp với miglustat ở khỉ cynomolgus

Khỉ cynomolgus nguyên bản có nguồn gốc từ Campuchia được phân vào các nhóm liều lượng như đã nêu trong Bảng 7. Để các con vật thích nghi với phòng nghiên cứu trong khoảng thời gian từ 18 ngày (con cái) đến 19 ngày (con đực). Vào ngày cuối cùng của việc thích nghi, các con vật nặng từ 2,243 kg đến 5,413 kg và từ 2 năm tuổi đến 3 năm tuổi.

Bảng 7:

Nhóm	Vật Phẩm Thử Nghiệm	Đường Dùng	Mức Độ Liều Lượng (mg/kg)	Nồng Độ Liều Lượng (mg/ml)	Số Lượng Con Vật (Đực/Cái)	Mổ Tử Thi Ngày 99 (Đực/Cái)
1	Đối Chứng (Bơ Chế Phẩm)	Truyền IV	0	0	4/4	4/4
2	Miglustat	NG	25	2,5	4/4	4/4
	ATB200	Truyền IV	50	5		
3	Miglustat	NG	175	17,5	4/4	4/4
	ATB200	Truyền IV	100	10		
4	Miglustat	NG	175	17,5	4/4	4/4
5	ATB200	Truyền IV	100	10	4/4	4/4

NG: đường mũi đến dạ dày

Chọn lọc mức độ liều lượng thử nghiệm, dựa trên các nghiên cứu trước đây ở động vật linh trưởng không phải người, để cung cấp sự tiếp xúc (AUC) có thể so sánh được với

hoặc cao hơn một chút (đối với nhóm 25 mg/kg miglustat và 50 mg/kg ATB200) hoặc cao hơn xấp xỉ 10 lần và 3 lần (đối với các nhóm 175 mg/kg miglustat và/hoặc 100 mg/kg ATB200) so với các AUC lâm sàng được dự đoán ở người được dùng liều lượng bằng 260 mg miglustat và 20 mg/kg ATB200 như được dự đoán từ các mô hình dược động học của Ví dụ 8 (lần lượt là xấp xỉ 20,9 giờ·µg/ml và xấp xỉ 1822 giờ·µg/ml). Trong các nghiên cứu trước đây ở động vật linh trưởng không phải người, đã thấy rằng liều lượng IV bằng 100 mg/kg ATB200 dẫn đến AUC bằng 5330 giờ·µg/ml, và liều lượng dùng qua đường miệng bằng 175 mg/kg miglustat được ngoại suy để dẫn đến AUC bằng 196 giờ·µg/ml.

ATB200 được tạo chế phẩm trong đệm natri phosphat 25 mM, độ pH 6 có chứa 2,92 mg/ml natri clorua, 20 mg/ml mannitol, và 0,5 mg/ml polysorbat 80 (bơ chế phẩm). Vật phẩm thử nghiệm (ATB200 hoặc miglustat) và vật phẩm đối chứng/tá dược lỏng (bơ chế phẩm) được dùng hai tuần một lần trong thời gian 13 tuần, bắt đầu vào Ngày 1 và kết thúc vào Ngày 85. ATB200 và vật phẩm đối chứng/tá dược lỏng được dùng bằng cách truyền trong tĩnh mạch (IV) trong thời gian 2 giờ (± 10 phút) ở liều lượng 0 mg/kg (Nhóm 1, vật phẩm đối chứng), 50 mg/kg (Nhóm 2), hoặc 100 mg/kg (Nhóm 3 và Nhóm 5). Dùng miglustat thông qua đường mũi đến dạ dày trong nước cất để tiêm, USP, ở liều lượng 25 mg/kg (Nhóm 2) hoặc 175 mg/kg (Nhóm 3 và Nhóm 4), trong thời gian 30 phút (± 2 phút) trước khi bắt đầu truyền ATB200, khi dùng kết hợp. Thể tích liều lượng cho tất cả các nhóm là 10 ml/kg.

Các tham số được đánh giá trong giai đoạn diễn ra của nghiên cứu bao gồm khối lượng cơ thể, sự tiêu thụ thức ăn, quan trắc lâm sàng, quan trắc lâm sàng chi tiết, kiểm tra sức khỏe, điện tâm đồ, đánh giá về mắt, bệnh lý học lâm sàng (huyết học, sự đông tụ, hóa học huyết thanh), đánh giá kháng thể kháng thuốc (ADA), đánh giá ADA trung hòa, thử nghiệm nước tiểu, và động học độc tố huyết tương (TK) đối với hoạt tính miglustat và hoạt tính ATB200 và protein tổng số. Mô tử thi động vật giai đoạn cuối được tiến hành vào Ngày 99 (14 ngày sau khi dùng liều lượng lần cuối). Lúc mô tử thi, các quan sát tổng quan và các khối lượng cơ quan được ghi lại, và các mô được thu lấy để xét nghiệm dưới kính hiển vi.

Tất cả các động vật sống đến khi bị giết chết êm ái theo lịch trình và không có sự thay đổi nào có thể quy cho việc dùng ATB200, miglustat hoặc quy cho việc dùng phối hợp ATB200 và miglustat trong quá trình kiểm tra sức khỏe hoặc trong quá trình đánh giá sự

tiêu thụ thức ăn, quan trắc lâm sàng, quan trắc lâm sàng chi tiết, khối lượng cơ thể, nhãn khoa, hoặc các tham số ECG. Ngoài ra, không có sự thay đổi nào liên quan đến ATB200, miglustat, hoặc ATB200/miglustat trong các tham số thử nghiệm nước tiểu, hóa học huyết thanh, huyết học, hoặc đông tụ, hoặc trong quá trình đánh giá quan sát tổng quan, khối lượng cơ quan, hoặc mô bệnh học.

Tổng số kháng thể kháng thuốc (ADA) và kháng thể trung hòa (NAb)

Tổng hàm lượng kháng thể kháng thuốc (ADA) và kháng thể trung hòa (NAb) được đo trong huyết tương. Thu lấy mẫu máu (xấp xỉ 1,6 ml) trong các ống K₂EDTA từ tất cả con vật một lần trong quá trình thích nghi, trước khi dùng liều lượng (trước khi dùng miglustat) và vào Ngày 1, 85 và 99. Các mẫu được duy trì trên nước đá ẩm cho đến khi được xử lý. Thu lấy huyết tương bằng cách ly tâm ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 2°C đến 8°C và các phần phân ước (xấp xỉ 0,2 ml) được chuyển vào các lọ polypropylen, và được lưu trữ đông lạnh ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ -60°C đến -86°C trong một giờ từ khi thu lấy máu. Phân tích mẫu về ADA được tiến hành trên các mẫu được thu lấy từ các con vật trong các Nhóm 1, 2, 3, và 5 (không phân tích các mẫu chỉ có miglustat). Phân tích về kháng thể trung hòa được tiến hành bằng cách sử dụng thử nghiệm enzym với cơ chất phát huỳnh quang 4-methylumbelliferyl- α -D-glucopyranosit (4MU-Glc).

Tất cả các con vật trong các nhóm liều lượng ATB200 (Nhóm 2, 3, và 5) dương tính đối với kháng thể kháng thuốc (ADA) vào Ngày 85 và 99 (tỷ lệ mắc phải 100%). Độ chuẩn nằm trong khoảng từ 25600 đến 409600 vào Ngày 85 và nằm trong khoảng từ 51200 đến 819200 vào Ngày 99. Không có xu hướng rõ ràng nào cho thấy độ chuẩn càng tăng thì mức độ liều lượng ATB200 càng tăng. Năm trong số 8 con vật dương tính đối với kháng thể trung hòa (NAb) trong Nhóm 2 (50 mg/kg ATB200 kết hợp với 25 mg/kg miglustat) vào các Ngày 85 và 99. Hai con trong số 8 con vật dương tính đối với NAb vào Ngày 85 trong Nhóm 3 (100 mg/kg ATB200 kết hợp với 175 mg/kg miglustat) và 4 con trong số 8 con vật dương tính vào Ngày 99. Hai trong số 8 con vật dương tính đối với NAb vào Ngày 85 trong Nhóm 5 (đơn trị liệu 100 mg/kg ATB200) và 3 trong số 8 con vật dương tính vào Ngày 99. Không có sự ảnh hưởng rõ ràng của ADA lên sự tiếp xúc ATB200 hoặc các tham số TK khác.

Động học độc tố ATB200

Đo động học độc tố ATB200 ở các mẫu máu được thu lấy trong các ống K₂EDTA từ các con vật vào các Ngày 1 và 85 tại các thời điểm sau đây:

Đối với các Nhóm 1, 2, 3, và 5: Trước khi dùng liều lượng (trước khi dùng miglustat); 1 giờ từ khi bắt đầu truyền; 2 giờ từ khi bắt đầu truyền; 2,5 giờ từ khi bắt đầu truyền; 3 giờ từ khi bắt đầu truyền; 4 giờ từ khi bắt đầu truyền; 6 giờ từ khi bắt đầu truyền; 12 giờ từ khi bắt đầu truyền; 26 giờ từ khi bắt đầu truyền; 168 giờ từ khi bắt đầu truyền; và 336 giờ từ khi bắt đầu truyền (được thu lấy trước khi dùng liều lượng vào Ngày 15); và

Đối với Nhóm 4: Trước khi dùng liều lượng (trước khi dùng miglustat); 1,5 giờ sau khi dùng miglustat; 2,5 giờ sau khi dùng miglustat; 3,5 giờ sau khi dùng miglustat; 4,5 giờ sau khi dùng miglustat; 6,5 giờ sau khi dùng miglustat; 12,5 giờ sau khi dùng miglustat; 26,5 giờ sau khi dùng miglustat; 168,5 giờ sau khi dùng miglustat; và 336,5 giờ sau khi dùng miglustat (được thu lấy trước khi dùng liều lượng vào Ngày 15).

Thu lấy huyết tương bằng cách ly tâm ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 2°C đến 8°C và các phần phân ước (xấp xỉ 0,1 ml) được chuyển vào các lọ polypropylen, và được lưu trữ đông lạnh ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ -60°C đến -86°C. Phân tích hoạt tính axit α -glucosidaza ATB200 và protein tổng số ATB200 được tiến hành trên các mẫu sau khi dùng liều lượng hai giờ từ các con vật thuộc Nhóm 1 và từ tất cả các mẫu được thu lấy từ các con vật trong các Nhóm 2, 3, và 5. Tổng số protein ATB200 được đo bằng sắc ký lỏng ghép với đo khối phổ nối tiếp (LC-MS/MS). Sử dụng hai peptit chữ ký (TTPTFFPK và VTSEGAGLQLQK) làm thước đo ATB200. Kết quả từ hai peptit này là nhất quán, cho thấy ATB200 nguyên vẹn có mặt trong các mẫu huyết tương được phân tích. Hoạt tính axit α -glucosidaza được thử nghiệm bằng cách sử dụng cơ chất phát huỳnh quang 4-methylumbelliferyl- α -D-glucopyranosit (4MU-Glc).

Phân tích dữ liệu động học độc tố (TK) được tiến hành trên các bộ dữ liệu đã được kiểm tra/xác minh (nồng độ và thời gian) từ các con vật trong các Nhóm 2, 3, và 5 bằng cách sử dụng phần mềm WinNonlin Phoenix, phiên bản 6.1 (Pharsight Corporation). Phân tích không phân ngăn của dữ liệu nồng độ huyết tương ở đối tượng cụ thể được sử dụng để ước tính các tham số TK đối với hoạt tính axit α -glucosidaza và protein tổng số ATB200

(dựa trên hai peptit chữ ký TTPTFFPK và VTSEGAGLQLQK) sau khi truyền IV. Mức độ liều lượng được đưa vào dưới dạng liều lượng ATB200 thực theo mg, được tính dựa trên thể tích liều lượng, khối lượng cơ thể, và nồng độ liều lượng trung bình của mỗi con vật cụ thể. Thời điểm bắt đầu của mỗi lần dùng liều lượng (bắt đầu truyền ATB200) được đặt bằng không cho tất cả các biên dạng trong chế độ liều lượng. Các thời điểm thu gom mẫu danh nghĩa được sử dụng cho tất cả các phân tích. Diện tích dưới đường cong nồng độ trong huyết tương-thời gian (AUC_{0-t}) được tạo ra cho ATB200 (các bộ dữ liệu protein tổng số và thử nghiệm hoạt tính) được ước tính theo quy tắc hình thang tuyến tính logarit. Phép hồi quy dùng để ước tính λ_z được dựa trên dữ liệu nồng độ có trọng số đều.

Các tham số sau đây được tính cho mỗi bộ dữ liệu ATB200 (được tạo ra từ hai peptit chữ ký trong thử nghiệm ATB200 tổng số và từ thử nghiệm hoạt tính ATB200):

- R^2 – bình phương của hệ số tương quan đối với hồi quy tuyến tính được sử dụng để ước tính $\lambda_{z\alpha}$. Được sử dụng khi số lượng đã thiết lập của các điểm được dùng để xác định khoảng thời gian cuối (hoặc khoảng thời gian cụ thể) của biên dạng nồng độ so với thời gian;
- R^2_{adj} – bình phương của hệ số tương quan đối với hồi quy tuyến tính được sử dụng để ước tính λ_z , được điều chỉnh đối với một số điểm được sử dụng trong ước tính $\lambda_{z\beta}$. Được sử dụng khi số lượng điểm được dùng để xác định khoảng thời gian cuối của biên dạng nồng độ so với thời gian có thể biến đổi;
- Số lượng điểm λ_z – số lượng điểm cho phân tích hồi quy tuyến tính được sử dụng để ước tính λ_z ;
 - $\lambda_{z\alpha}$ – hằng số tốc độ loại trừ đối với ba thời điểm đầu tiên sau $t_{l\text{ớn nhất}}$;
 - $\lambda_{z\beta}$ – hằng số tốc độ loại trừ cuối;
 - $t_{1/2\alpha}$ – thời gian bán thải dựa trên ba thời điểm đầu tiên sau $t_{l\text{ớn nhất}}$;
 - $t_{1/2\beta}$ – thời gian bán thải loại trừ cuối dựa trên λ_z ($0,693/\lambda_z$);
 - $t_{l\text{ớn nhất}}$ – thời điểm có nồng độ chất phân tích lớn nhất trong huyết tương;
 - $C_{l\text{ớn nhất}}$ – nồng độ chất phân tích được quan sát thấy lớn nhất trong huyết tương;

- AUC_{0-t} – Diện tích dưới đường cong nồng độ trong huyết tương-thời gian (AUC) được đo từ thời điểm 0 (trước khi dùng liều lượng) đến thời điểm có nồng độ có thể đo được lần cuối;
- $AUC_{0-\infty}$ – AUC được ngoại suy đến thời điểm vô cùng;
- AUC_{ext} – phần AUC được ngoại suy đến thời điểm vô cùng được thể hiện dưới dạng % tổng $AUC_{0-\infty}$;
- CL_T – tổng độ thanh thải (dựa trên $\lambda_{z\beta}$); dựa trên tổng liều lượng theo mg từ khối lượng cơ thể thực;
- CL_T/F – tổng độ thanh thải (dựa trên $\lambda_{z\beta}$); dựa trên phân số giữa tổng liều lượng theo mg từ khối lượng cơ thể thực chia cho độ sinh khả dụng;
- V_{ss} – thể tích phân bố biểu kiến ở trạng thái cân bằng;
- V_z – thể tích phân bố dựa trên khoảng thời gian cuối (dựa trên $\lambda_{z\beta}$); dựa trên tổng liều lượng theo mg từ khối lượng cơ thể thực;
- V_z/F – thể tích phân bố dựa trên khoảng thời gian cuối (dựa trên $\lambda_{z\beta}$); dựa trên phân số giữa tổng liều lượng theo mg từ khối lượng cơ thể thực chia cho độ sinh khả dụng; và
- Tỷ lệ tích lũy – $AR_C \text{ lớn nhất} = \text{tỷ lệ của } C_{\text{lớn nhất}} \text{ vào Ngày 85 với Ngày 1}$; $AR_{AUC} = \text{tỷ lệ của } AUC_{0-t} \text{ vào Ngày 85 so với Ngày 1}$

Nồng độ ATB200 và các tham số TK là tương tự nhau giữa con đực và con cái. Các nồng độ trong huyết tương sau khi truyền 50 mg/kg ATB200 IV 2 giờ kết hợp với 25 mg/kg miglustat có thể đo được trong khoảng thời gian từ 12 đến 26 giờ sau khi dùng liều lượng. Ở mức độ liều lượng 100 mg/kg (có hoặc không có 175 mg/kg miglustat), nồng độ ATB200 có thể đo được trong khoảng thời gian từ 26 đến 168 giờ sau khi dùng liều lượng. Các tham số động học độc tố đối với đơn liều (Ngày 1) được thể hiện trong Bảng 8.

Bảng 8:

Nhóm	Điều Trị	Tham Số	Đơn Vị	Thử Nghiệm Protein Tổng Số		Thử Nghiệm Hoạt Tính
				TTPTFFPKVTSEGAGLQLQK	ATB200	
2	50 mg/kg ATB200 + 25 mg/kg miglustat	$t_{\text{lớn nhất}}$	giờ	2,00	2,00	2,06
		$C_{\text{lớn nhất}}$	µg/ml	890	900	495
		AUC_{0-t}	giờ·µg/ml	3060	3080	1700
		$t_{1/2\alpha}$	giờ	1,69	1,69	2,01
		$t_{1/2\beta}$	giờ	1,70	1,71	1,92
		CL_T	l/giờ	0,058	0,058	0,106
		V_{ss}	l	0,145	0,144	0,266
		V_z	l	0,144	0,143	0,296
3	100 mg/kg ATB200 + 175 mg/kg miglustat	$t_{\text{lớn nhất}}$	giờ	2,00	2,00	2,25
		$C_{\text{lớn nhất}}$	µg/ml	1960	1980	1150
		AUC_{0-t}	giờ·µg/ml	10400	10400	6130
		$t_{1/2\alpha}$	giờ	2,77	2,77	3,07
		$t_{1/2\beta}$	giờ	2,72	2,70	2,54
		CL_T	l/giờ	0,034	0,034	0,057
		V_{ss}	l	0,140	0,140	0,231
		V_z	l	0,133	0,133	0,210

Nhóm	Điều Trị	Tham Số	Đơn Vị	Thử Nghiệm Protein Tổng Số		Thử Nghiệm Hoạt Tính
				TTPTFPPKVTSEGAGLQLQK	ATB200	
5	Đơn trị liệu 100 mg/kg ATB200	$t_{\text{lớn nhất}}$	giờ	1,88	1,88	1,94
		$C_{\text{lớn nhất}}$	µg/ml	1690	1670	1270
		AUC_{0-t}	giờ·µg/ml	5490	5410	3230
		$t_{1/2\alpha}$	giờ	1,56	1,55	1,28
		$t_{1/2\beta}$	giờ	11,1	6,29	1,71
		CL_T	l/giờ	0,105	0,105	0,140
		V_{ss}	l	0,171	0,149	0,168
		V_z	l	0,729	0,401	0,383

Các tham số động học độc tố đối với liều lượng lặp lại (Ngày 85) được thể hiện trong Bảng 9.

Bảng 9:

Nhóm	Điều trị	Tham số	Đơn Vị	Thử Nghiệm Protein Tổng Số		Thử Nghiệm Hoạt Tính
				TTPTFFPK	VTSEGAGLQLQK	ATB200
2	50 mg/kg ATB200 + 25 mg/kg miglustat	$t_{\text{lớn nhất}}$	giờ	2,00	2,00	2,13
		$C_{\text{lớn nhất}}$	$\mu\text{g/ml}$	927	921	586
		AUC_{0-t}	giờ· $\mu\text{g/ml}$	3700	3700	2390
		$t_{1/2\alpha}$	giờ	1,98	1,95	2,35
		$t_{1/2\beta}$	giờ	2,38	2,40	2,31
		CL_T	l/giờ	0,049	0,049	0,076
		V_{ss}	l	0,147	0,147	0,223
		V_z	l	0,168	0,168	0,254

Nhóm	Điều trị	Tham số	Đơn Vị	Thử Nghiệm Protein Tổng Số		Thử Nghiệm Hoạt Tính
				TTPTFFPK	VTSEGAGLQLQK	ATB200
3	100 mg/kg ATB200 + 175 mg/kg miglustat	$t_{\text{lớn nhất}}$	giờ	2,13	2,19	2,06
		$C_{\text{lớn nhất}}$	µg/ml	2270	2270	1600
		AUC_{0-t}	giờ·µg/ml	13900	13800	9240
		$t_{1/2\alpha}$	giờ	3,62	3,72	3,34
		$t_{1/2\beta}$	giờ	4,83	4,83	2,90
		CL_T	l/giờ	0,027	0,027	0,040
		V_{ss}	L	0,140	0,140	0,186
		V_z	L	0,174	0,174	0,165
5	Đơn trị liệu 100 mg/kg ATB200	$t_{\text{lớn nhất}}$	giờ	2,13	2,13	2,00
		$C_{\text{lớn nhất}}$	µg/ml	2020	2010	1510
		AUC_{0-t}	giờ·µg/ml	7830	7790	4890
		$t_{1/2\alpha}$	giờ	1,93	1,88	1,44
		$t_{1/2\beta}$	giờ	6,62	2,63	2,03
		CL_T	l/giờ	0,045	0,045	0,070
		V_{ss}	l	0,143	0,127	0,159
		V_z	l	0,396	0,170	0,205

Thời gian đến nồng độ ATB200 trong huyết tương lớn nhất ($t_{\text{lớn nhất}}$) là xấp xỉ 2 giờ sau khi dùng liều lượng ở cả ba nhóm liều lượng. Các nồng độ ATB200 huyết tương và các tham số TK Ngày 1 và Ngày 85, như được đo bằng thử nghiệm protein ATB200 tổng số, là nhất quán giữa hai peptit chữ ký được đánh giá, TTPTFFPK và VTSEGAGLQLQK. Sự tiếp xúc, như được đo bởi $C_{\text{lớn nhất}}$ và AUC_{0-t} , là tương đối thấp hơn khi được đo bằng thử nghiệm hoạt tính axit α -glucosidaza. Điều này được dự đoán, vì thử nghiệm protein tổng số đo nồng độ của cả enzyme có hoạt tính và enzyme bất hoạt trong khi thử nghiệm hoạt tính axit α -glucosidaza chỉ đo nồng độ enzyme có hoạt tính. Sự tiếp xúc ATB200 tăng lên với liều lượng nằm trong khoảng mức độ liều lượng từ 50 đến 100 mg/kg. $t_{1/2\alpha}$ ban đầu Ngày 1 trung bình (con đực và con cái kết hợp) dựa trên ba thời điểm đầu tiên qua $t_{\text{lớn nhất}}$ nằm trong khoảng từ 1,28 đến 3,07 giờ. Thời gian bán thải cuối Ngày 1 trung bình ($t_{1/2\beta}$) nằm trong khoảng từ 1,70 đến 11,1 giờ (các giá trị $t_{1/2\beta}$ lâu hơn bị ảnh hưởng bởi các con vật mà có các nồng độ có thể đo được đến lúc 168 giờ sau khi dùng liều lượng). Các khoảng giá trị tương tự được quan sát thấy sau liều lượng Ngày 85. Quan sát thấy từ ít đến không có sự tích lũy khi dùng lặp lại, cách một tuần một lần. Sự bổ sung 175 mg/kg miglustat vào liều lượng 100 mg/kg ATB200 dường như là đã làm giảm độ thanh thải ATB200 và làm tăng sự tiếp xúc huyết tương xấp xỉ 2 lần, tương quan với đơn trị liệu 100 mg/kg ATB200.

Vì không có sự thay đổi liên quan đến vật phẩm thử nghiệm bất lợi nào được xác định, Mức Ảnh Hưởng Bất Lợi Không Quan Sát Thấy (NOAEL) đối với ATB200 ở khi cynomolgus khi cho dùng cách một tuần một lần trong thời gian 13 tuần bằng cách truyền 2 giờ, có dùng hoặc không dùng với miglustat, là truyền 100 mg/kg/lần, liều lượng cao nhất được thử nghiệm. Ở mức độ liều lượng này, AUC_{0-t} trung bình-theo giới tính trung bình và $C_{\text{lớn nhất}}$ (protein tổng số) vào Ngày 85 lần lượt là 7830 (TTPTFFPK) và 7790 (VTSEGAGLQLQK) giờ· μ g/ml và 2020 (TTPTFFPK) hoặc 2010 (VTSEGAGLQLQK) μ g/ml, đối với một mình ATB200 và lần lượt là 13900 (TTPTFFPK) hoặc 13800 (VTSEGAGLQLQK) giờ· μ g/ml và 2270 (cả hai peptit) μ g/ml, kết hợp với 175 mg/kg Miglustat.

Động học độc tố miglustat

Đo động học độc tố miglustat ở mẫu máu được thu lấy trong các ống K_2EDTA từ các con vật vào các Ngày 1 và 85 tại các thời điểm sau đây:

Đối với các Nhóm 1, 2, 3, và 5: Trước khi dùng liều lượng (trước khi dùng miglustat); 15 phút sau khi dùng miglustat; 0 giờ (trước khi bắt đầu truyền); 0,5 giờ từ khi bắt đầu truyền; 1 giờ từ khi bắt đầu truyền; 2 giờ từ khi bắt đầu truyền; 4 giờ từ khi bắt đầu truyền; 6 giờ từ khi bắt đầu truyền; 12 giờ từ khi bắt đầu truyền; 26 giờ từ khi bắt đầu truyền; 50 giờ từ khi bắt đầu truyền; và 74 giờ từ khi bắt đầu truyền; và

Đối với Nhóm 4: Trước khi dùng liều lượng (trước khi dùng miglustat); 15 phút sau khi dùng miglustat; 30 phút sau khi dùng miglustat; 1 giờ sau khi dùng miglustat; 1,5 giờ sau khi dùng miglustat; 2,5 giờ sau khi dùng miglustat; 4,5 giờ sau khi dùng miglustat; 6,5 giờ sau khi dùng miglustat; 12,5 giờ sau khi dùng miglustat; 26,5 giờ sau khi dùng miglustat; 50,5 giờ sau khi dùng miglustat; và 74,5 giờ sau khi dùng miglustat.

Thu lấy huyết tương bằng cách ly tâm ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 2°C đến 8°C và các phần phân ước (xấp xỉ 0,2 ml) được chuyển vào các lọ polypropylen, và được lưu trữ đông lạnh ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ -60°C đến -86°C. Phân tích nồng độ miglustat được tiến hành bằng cách sử dụng phương pháp LC-MS/MS tương tự với phương pháp được mô tả để phân tích nồng độ duvoglusta bởi Richie Khanna, Allan C. Powe Jr., Yi Lun, Rebecca Soska, Jessie Feng, Rohini Dhulipala, Michelle Frascella, Anadina Garcia, Lee J. Pellegrino, Su Xu, Nasty Brignol, Matthew J. Toth, Hung V. Do, David J. Lockhart, Brandon A. Wustman, Kenneth J. Valenzano. "The Pharmacological Chaperone AT2220 Increases the Specific Activity and Lysosomal Delivery of Mutant Acid Alpha-Glucosidase, and Promotes Glycogen Reduction in Transgenic Mouse Model of Pompe Disease." PLOS ONE (1 July 2014) 9(7): e102092.

Phân tích dữ liệu động học độc tố (TK) đối với miglustat được tiến hành trên các bộ dữ liệu đã được kiểm tra/xác minh (nồng độ và thời gian) từ các con vật trong các Nhóm 2, 3, và 4 bằng cách sử dụng phần mềm WinNonlin Phoenix®, phiên bản 6.1 (Pharsight Corporation). Phân tích không phân ngăn của dữ liệu nồng độ huyết tương riêng rẽ được sử dụng để ước tính các tham số TK. Các tham số TK miglustat được ước tính bằng quy tắc hình thang tuyến tính logarit. Phép hồi quy dùng để ước tính λ_z được dựa trên dữ liệu nồng độ có trọng số đều. Các tham số sau đây được tính:

- R^2_{adj} – bình phương của hệ số tương quan đối với hồi quy tuyến tính được sử dụng để ước tính λ_z , được điều chỉnh đối với một số điểm được sử dụng trong ước tính λ_z . Được sử dụng khi số lượng điểm được dùng để xác định khoảng thời gian cuối của biên dạng nồng độ so với thời gian có thể biến đổi;
- Số lượng điểm λ_z – số lượng điểm cho phân tích hồi quy tuyến tính được sử dụng để ước tính λ_z ;
- λ_z – hằng số tốc độ loại trừ cuối;
- $t_{1/2}$ – thời gian bán thải loại trừ cuối dựa trên λ_z ($0,693/\lambda_z$);
- $t_{\text{lớn nhất}}$ – thời điểm có nồng độ chất phân tích lớn nhất trong huyết tương;
- $C_{\text{lớn nhất}}$ – nồng độ chất phân tích được quan sát thấy lớn nhất trong huyết tương;
- AUC_{0-t} – Diện tích dưới đường cong nồng độ trong huyết tương-thời gian (AUC) được đo từ thời điểm 0 (trước khi dùng liều lượng) đến thời điểm có nồng độ có thể đo được lần cuối;
- $AUC_{0-\infty}$ – AUC được ngoại suy đến thời điểm vô cùng;
- AUC_{ext} – phần AUC được ngoại suy đến thời điểm vô cùng được thể hiện dưới dạng % tổng $AUC_{0-\infty}$;
- CL_T/F – phân số của tổng độ thanh thải chia cho độ sinh khả dụng dựa trên tổng liều lượng theo mg từ khối lượng cơ thể thực;
- V_z/F – phân số giữa thể tích phân bố dựa trên khoảng thời gian cuối chia cho độ sinh khả dụng dựa trên tổng liều lượng theo mg từ khối lượng cơ thể thực;
- Tỷ lệ tích lũy – $AR_{C \text{ lớn nhất}}$ = tỷ lệ của $C \text{ lớn nhất}$ vào Ngày 85 so với Ngày 1; và AR_{AUC} = tỷ lệ của AUC_{0-t} vào Ngày 85 so với Ngày 1.

Không có sự ảnh hưởng nhất quán của giới tính lên các tham số TK miglustat. Nồng độ miglustat trong huyết tương sau khi dùng liều lượng 25 mg/kg thông qua đường mũi đến dạ dày (NG) kết hợp với 50 mg/kg ATB200, hoặc dùng liều lượng 175 mg/kg NG (có hoặc không có 100 mg/kg ATB200), có thể đo được đến 74,5 giờ (thời điểm được đo lần cuối).

Các tham số động học độc tố đối với đơn liều (Ngày 1) và đối với liều lượng lặp lại (Ngày 85) được thể hiện trong Bảng 10.

Bảng 10:

Nhóm	Điều Trị	Tham Số	Đơn Vị	Thử Nghiệm Miglustat	
				Ngày 1	Ngày 85
2	50 mg/kg ATB200 + 25 mg/kg miglustat	$t_{\text{lớn nhất}}$	giờ	2,06	2,88
		$C_{\text{lớn nhất}}$	ng/ml	7430	7510
		AUC_{0-t}	giờ·ng/ml	47300	49100
		$t_{1/2}$	giờ	7,44	8,23
		CL_T/F	l/giờ	1,92	1,99
		V_z/F	l	20,5	23,3
3	100 mg/kg ATB200 + 175 mg/kg miglustat	$t_{\text{lớn nhất}}$	giờ	2,69	3,56
		$C_{\text{lớn nhất}}$	ng/ml	20400	22000
		AUC_{0-t}	giờ·ng/ml	182000	216000
		$t_{1/2}$	giờ	6,85	7,86
		CL_T/F	l/giờ	3,22	3,62
		V_z/F	l	32,3	39,1
4	Đơn trị liệu 175 mg/kg Miglustat	$t_{\text{lớn nhất}}$	giờ	3,00	4,13
		$C_{\text{lớn nhất}}$	ng/ml	16400	14700
		AUC_{0-t}	giờ·ng/ml	173000	204000
		$t_{1/2}$	giờ	6,86	6,66

Nhóm	Điều Trị	Tham Số	Đơn Vị	Thử Nghiệm Miglustat	
				Ngày 1	Ngày 85
		CL_T/F	l/giờ	3,67	3,49
		V_z/F	1	35,9	33,8

$t_{lớn nhất}$ nằm trong khoảng từ xấp xỉ 2 đến 4 giờ sau khi dùng liều lượng. Sự tiếp xúc Miglustat tăng lên với liều lượng trong khoảng mức độ liều lượng từ 25 đến 175 mg/kg. $t_{1/2}$ trung bình (con đực và con cái kết hợp) nhất quán vào Ngày 1 và Ngày 85 và nằm trong khoảng từ 6,66 đến 8,23 giờ. Quan sát thấy từ ít đến không có sự tích lũy khi dùng NG lặp lại cách một tuần một lần. Không có ảnh hưởng có thể quan sát được của việc dùng phối hợp ATB200 lên toàn bộ sự tiếp xúc mglustat (tức là, AUC_{0-t}) hoặc các tham số TK.

Vì không có sự thay đổi liên quan đến vật phẩm thử nghiệm bất lợi được xác định, Mức Ảnh Hưởng Bất Lợi Không Quan Sát Thấy (NOAEL) đối với miglustat ở khi cynomolgus khi cho dùng cách một tuần một lần trong thời gian 13 tuần thông qua đường mũi đến dạ dày, có dùng hoặc không dùng với ATB200, là 175 mg/kg/liều lượng, liều lượng cao nhất được thử nghiệm. Ở mức độ liều lượng này, AUC_{0-t} trung bình-theo giới tính trung bình và $C_{lớn nhất}$ vào Ngày 85 lần lượt là 204000 giờ·ng/ml và 14700 ng/ml, đối với miglustat một mình và lần lượt là 216000 giờ·ng/ml và 22000 ng/ml, kết hợp với 100 mg/kg ATB200.

Ví dụ 14: Quy trình nghiên cứu lâm sàng của axit α -glucosidaza tái tổ hợp (ATB200) được dùng một mình và được dùng phối hợp với miglustat

Thiết Kế Nghiên Cứu:

Đây là nghiên cứu kiểu nhãn mở, trình tự cố định, liều lượng tăng dần, lần đầu tiên ở người để đánh giá độ an toàn, khả năng dung chịu, và dược động học (PK) của việc dùng axit α -glucosidaza tái tổ hợp trong tĩnh mạch (IV) (ATB200, bột được làm khô lạnh hoàn nguyên bằng nước cất để tiêm và pha loãng bằng natri clorua 0,9% để tiêm) một mình và khi được dùng phối hợp với miglustat qua đường miệng (viên nang gelatin cứng, 65 mg). Nghiên cứu sẽ được tiến hành theo 2 giai đoạn. Ở Giai đoạn 1, độ an toàn, khả năng dung

chịu, và PK được đánh giá sau khi dùng các liều lượng ATB200 đơn lẻ tăng dần tuần tự, được dùng 2 tuần 1 lần dưới dạng truyền trong tĩnh mạch xấp xỉ 4 giờ, trong 3 khoảng thời gian dùng liều lượng ở 5, 10, và 20 mg/kg. Ở Giai đoạn 2, độ an toàn, khả năng dung chịu, và PK được đánh giá sau khi kết hợp dùng liều lượng đơn tăng dần và đa liều lượng tăng dần: 20 mg/kg ATB200 được dùng phối hợp 2 tuần 1 lần với 130 mg miglustat (hai viên nang 65 mg), dùng qua đường miệng trong thời gian 1 giờ trước khi truyền trong tĩnh mạch ATB200 xấp xỉ 4 giờ, đối với 3 liều lượng sau đó dùng phối hợp 20 mg/kg ATB200 với 260 mg miglustat (bốn viên nang 65 mg), dùng qua đường miệng trong thời gian 1 giờ trước khi truyền trong tĩnh mạch ATB200 xấp xỉ 4 giờ, đối với 3 liều lượng.

Mười hai đối tượng mắc bệnh Pompe đã trải qua trị liệu thay thế enzyme (ERT) (xấp xỉ 6 đối tượng đi lại được và 6 đối tượng không đi lại được) tham gia vào Giai đoạn 1. Cùng các đối tượng đó tiếp tục nghiên cứu ở Giai đoạn 2. Ít nhất là 4 đối tượng đi lại được được tham gia và được cho dùng liều lượng trước khi các đối tượng không đi lại được tham gia. Các đối tượng (đi lại được) đã trải qua ERT được xác định là các đối tượng mà đã ERT trong khoảng thời gian từ 2 đến 6 năm trước khi tham gia, mà có thể đi bộ ít nhất là 200 mét trong thử nghiệm đi bộ sáu phút (6MWT), và có FVC bằng từ 30 đến 80% giá trị chuẩn được dự đoán. Các đối tượng (không đi lại được) đã trải qua ERT được xác định là các đối tượng mà gắn với xe lăn hoàn toàn, không thể đi bộ khi không được hỗ trợ, và đã ERT trong thời gian ≥ 2 năm trước khi tham gia. Sự phân bố điều trị được thể hiện trong Bảng 11.

Bảng 11:

Số Lượng Đối Tượng	Quần Thể: Đã trải qua ERT	Giai đoạn 1			Giai đoạn 2	
		Thời Kỳ 1 Liều Lượng Đơn	Thời Kỳ 2 Liều Lượng Đơn	Thời Kỳ 3 Liều Lượng Đơn	Giai Đoạn 4 Dùng Phối Hợp Đa Liều Lượng	Giai Đoạn 5 Dùng Phối Hợp Đa Liều Lượng
12	~6 đối tượng đi lại được, ~6 đối tượng không đi lại được	5 mg/kg ATB200	10 mg/kg ATB200	20 mg/kg ATB200	20 mg/kg ATB200 + 130 mg miglustat	20 mg/kg ATB200 + 260 mg miglustat

ERT=trị liệu thay thế enzym.

Yêu cầu các đối tượng nhịn ăn ít nhất là 2 giờ trước và 2 giờ sau khi dùng miglustat qua đường miệng. Việc truyền IV của ATB200 bắt đầu 1 giờ sau khi dùng miglustat qua đường miệng.

Quy Trình Nghiên Cứu

Nghiên cứu bao gồm Sàng lọc, cơ sở, Giai đoạn 1 (3 thời kỳ, trình tự cố định, đơn liều lượng tăng dần của một mình ATB200), và Giai đoạn 2 (2 thời kỳ, trình tự cố định, đa liều lượng của 20 mg/kg ATB200 được dùng phối hợp với đa liều lượng tăng dần của miglustat).

Sàng lọc:

Tất cả các đối tượng cung cấp thư chấp thuận đã được thông báo và trải qua sự xem xét về tiêu chuẩn đủ điều kiện. Sự đánh giá đối với tất cả các đối tượng bao gồm tiền sử y tế bao gồm các phản ứng có liên quan đến việc truyền trước đó (IAR) và tiền sử ngã; xem xét việc dùng thuốc trước đó và đồng thời và các trị liệu không dùng thuốc; các dấu hiệu sự sống (nhịp tim [HR], tần số hô hấp [RR], huyết áp [BP], và nhiệt độ); chiều cao; khối lượng; kiểm tra sức khỏe toàn diện (PE); điện tâm đồ 12 cần (ECG); các đánh giá thí nghiệm độ an toàn lâm sàng (hóa học huyết thanh, huyết học, và thử nghiệm nước tiểu); thử thai bằng nước tiểu; mẫu nước tiểu đối với hexoza tetrasacarit (Hex4); và xác định kiểu gen *GAA* (đối

với các đối tượng không thể cung cấp báo cáo xác định kiểu gen *GAA* lúc sàng lọc). Mẫu máu cũng được thu lấy để đánh giá thăm dò khả năng gây miễn dịch (toàn bộ kháng thể và các kháng thể trung hòa, xytokin thăm dò/chỉ thị sinh học khác của sự kích hoạt hệ miễn dịch, khả năng phản ứng chéo với alglucosidaza alfa, và globulin miễn dịch E [IgE]) nếu cần. Đối tượng đáp ứng tất cả các tiêu chuẩn bao hàm và không có tiêu chuẩn loại trừ nào sẽ được chỉ định vào Giai đoạn 1 như được mô tả trong Bảng 11.

Cơ sở:

Các đánh giá độ an toàn đối với tất cả các đối tượng bao gồm xét duyệt tiêu chuẩn đủ điều kiện; tiền sử y tế bao gồm các phản ứng có liên quan đến việc truyền (IAR) và tiền sử ngã, thăm tra biến cố bất lợi (AE) và AE nghiêm trọng (SAE), xem xét việc dùng thuốc trước đó và đồng thời và các trị liệu không dùng thuốc; các dấu hiệu sự sống (HR, RR, BP, và nhiệt độ); khối lượng; PE vẫn tắt; ECG; thang đo hoạt tính đặc trưng-Pompe được Rasch xây dựng (R-PAct); Thang Đo Độ Tàn Tật Rotterdam; và Thang Đo Mức Độ Nghiêm Trọng Của Tình Trạng Mệt Mỏi; các đánh giá thí nghiệm độ an toàn lâm sàng (hóa học huyết thanh, huyết học, và thử nghiệm nước tiểu); thử thai bằng nước tiểu; các đánh giá dược lực học (PD) (Hex4 và creatinin phosphokinaza [CPK]); các đánh giá khả năng gây miễn dịch (toàn bộ kháng thể và các kháng thể trung hòa, phản ứng chéo kháng thể với alglucosidaza alfa, xytokin thăm dò và chỉ thị sinh học khác của sự kích hoạt hệ miễn dịch, khả năng phản ứng chéo với alglucosidaza alfa, và IgE nếu cần); các thử nghiệm chức năng phổi (PFT); các thử nghiệm chức năng vận động; và các thử nghiệm sức mạnh cơ đối với tất cả các đối tượng.

Giai đoạn 1, các Thời kỳ 1, 2, và 3:

Giai đoạn này bao gồm:

- Độ an toàn: xem xét các AE, bao gồm các biến cố bất lợi nghiêm trọng (SAE) và IAR; xem xét việc dùng thuốc đi kèm và các trị liệu không dùng thuốc; các dấu hiệu sự sống (HR, RR, BP, và nhiệt độ); PE vẫn tắt; ECG; các đánh giá thí nghiệm độ an toàn lâm sàng (hóa học huyết thanh, huyết học, và thử nghiệm nước tiểu); và thử thai bằng nước tiểu
- PD: Hex4 trong nước tiểu và CPK trong huyết thanh

- Miễn dịch: mẫu máu cho độ chuẩn kháng thể kháng axit α -glucosidaza tái tổ hợp (độ chuẩn toàn bộ kháng thể kháng axit α -glucosidaza tái tổ hợp và kháng thể trung hòa và phản ứng chéo kháng thể với α -glucosidaza alfa) và mẫu máu cho phép đo xytokin tiền viêm và chỉ thị sinh học khác của sự kích hoạt hệ miễn dịch. Nếu cần, cũng sẽ tiến hành đo IgE.

- Dược động học 24 giờ liên tiếp (PK): Trong suốt Thời kỳ 1 (Lần khám 3, Ngày 1), Thời kỳ 2 (Lần khám 4, Ngày 15), và Thời kỳ 3 (Lần khám 5, Ngày 29), thực hiện việc lấy mẫu máu để mức độ hoạt tính axit α -glucosidaza huyết tương và nồng độ protein axit α -glucosidaza tổng số được tính đối với tất cả các đối tượng.

Giai đoạn 2, các Thời kỳ 4 và 5:

- Độ an toàn: xem xét các AE, bao gồm SAE và IAR; xem xét việc dùng thuốc đi kèm và các trị liệu không dùng thuốc; các dấu hiệu sự sống (HR, RR, BP, và nhiệt độ); khối lượng; PE; ECG; các đánh giá thí nghiệm độ an toàn lâm sàng (hóa học huyết thanh, huyết học, và thử nghiệm nước tiểu); và thử thai bằng nước tiểu

- PD: Hex4 trong nước tiểu và CPK trong huyết thanh

- Miễn dịch: mẫu máu cho độ chuẩn kháng thể kháng axit α -glucosidaza tái tổ hợp (độ chuẩn toàn bộ kháng thể kháng axit α -glucosidaza tái tổ hợp và kháng thể trung hòa và phản ứng chéo kháng thể với α -glucosidaza alfa) và mẫu máu cho phép đo xytokin tiền viêm và chỉ thị sinh học khác của sự kích hoạt hệ miễn dịch. Nếu cần, cũng sẽ tiến hành đo IgE.

- PK 24 giờ liên tục: Trong suốt Thời kỳ 4 (Lần khám 6, Ngày 43 và Lần khám 8, Ngày 71) và Thời kỳ 5 (Lần khám 9, Ngày 85 và Lần khám 11, Ngày 113), thực hiện lấy mẫu máu để mức độ hoạt tính α -glucosidaza trong huyết tương, nồng độ protein axit α -glucosidaza tổng số, và nồng độ miglustat được tính đối với tất cả các đối tượng.

Kết thúc Giai đoạn Dược động học:

- Độ an toàn: xem xét các AE, bao gồm SAE và IAR; xem xét việc dùng thuốc đi kèm và các trị liệu không dùng thuốc; các dấu hiệu sự sống (HR, RR, BP, và nhiệt độ);

khối lượng; PE; ECG; các đánh giá thí nghiệm độ an toàn lâm sàng (hóa học huyết thanh, huyết học, và thử nghiệm nước tiểu); và thử thai bằng nước tiểu

- PD: Hex4 trong nước tiểu và CPK trong huyết thanh
- Miễn dịch: mẫu máu cho độ chuẩn kháng thể kháng axit α -glucosidaza tái tổ hợp (độ chuẩn toàn bộ kháng thể kháng axit α -glucosidaza tái tổ hợp và kháng thể trung hòa và phản ứng chéo kháng thể với α -glucosidaza alfa) và mẫu máu cho phép đo xytokin tiền viêm và chỉ thị sinh học khác của sự kích hoạt hệ miễn dịch. Nếu cần, cũng sẽ tiến hành đo IgE.

Các đối tượng mà rút lui sớm khỏi nghiên cứu sẽ tham gia lần khám Châm Dứt Sớm và sẽ trải qua tất cả các đánh giá mà cần được tiến hành ở lần khám Kết thúc PK. Không có thuốc nghiên cứu nào được dùng. Nếu đối tượng bất kỳ trong số các đối tượng dự phòng rút lui sớm khỏi nghiên cứu, đối tượng đó sẽ bị thay thế bởi đối tượng đi lại được tiếp theo tham gia trong nghiên cứu (ví dụ, nếu đối tượng 1 rút lui, đối tượng 3 [đối tượng đi lại được] sẽ thay thế đối tượng đó làm đối tượng dự phòng).

Các đối tượng hoàn thành nghiên cứu này và/hoặc các đối tượng khác đủ tiêu chuẩn sẽ được cấp cơ hội tham gia vào nghiên cứu mở rộng dài hạn và tiếp tục được đánh giá về độ an toàn và khả năng dung chịu ATB200 được dùng phối hợp với miglustat. Ngoài ra, các đánh giá về chức năng liên quan với bệnh Pompe được tiến hành trong nghiên cứu mở rộng ở các khoảng thời gian đều đặn.

Theo Dõi Độ An Toàn

Độ an toàn được theo dõi bởi Thiết Bị Giám Sát Y Tế và các thẩm tra viên trên cơ sở liên tục, và trên cơ sở thường xuyên bởi Ban Chỉ Đạo Tính An Toàn (SSC).

Dùng Liều Lượng Dự Phòng

2 đối tượng đi lại được đầu tiên trong nghiên cứu này sẽ là các đối tượng dự phòng cho nghiên cứu và sẽ là 2 đối tượng đầu tiên được dùng liều lượng trong mỗi thời kỳ của nghiên cứu (các Thời kỳ từ 1 đến 5). Trong trường hợp mà đối tượng dự phòng rút lui sớm khỏi nghiên cứu, đối tượng này sẽ được thay thế bởi đối tượng đi lại được khác. Lưu ý: Ít

nhất là 4 đối tượng đi lại được dùng liều lượng 5 mg/kg ATB200 trước khi đối tượng không đi lại được bất kỳ có thể được dùng liều lượng.

Ở Giai đoạn 1 (các Thời kỳ 1, 2, và 3), các đối tượng sẽ được dùng liều lượng với đơn liều lượng tăng dần của ATB200 (5 mg/kg [Thời kỳ 1], 10 mg/kg [Thời kỳ 2], và 20 mg/kg [Thời kỳ 3]).

Sau việc dùng liều lượng của 2 đối tượng dự phòng đối với từng thời kỳ nghiên cứu trong Giai đoạn 1, tiến hành các đánh giá dữ liệu độ an toàn sẵn có (PE, các dấu hiệu sự sống, AE, các phản ứng truyền, ECG, và các thử nghiệm thí nghiệm thích hợp được tiến hành cục bộ) trong thời gian từ 24 đến 48 giờ bởi Thiết Bị Giám Sát Y Tế và các thẩm tra viên. SSC sẽ triệu tập để xem xét độ an toàn chính thức khi dữ liệu thí nghiệm độ an toàn trung tâm có sẵn cho cả hai đối tượng dự phòng ở mỗi mức độ liều lượng. Nếu SSC xác định rằng không có mối lo ngại nào về độ an toàn mà loại bỏ việc dùng liều ở liều lượng được chỉ định cho thời kỳ đó, 10 đối tượng nữa sẽ được tham gia và được dùng liều lượng. SSC cũng sẽ triệu tập để xem xét độ an toàn khi dữ liệu độ an toàn (bao gồm dữ liệu thí nghiệm độ an toàn trung tâm) cho tất cả các đối tượng ở cả 3 mức độ liều lượng Giai đoạn 1 mức độ có sẵn.

Ở Giai đoạn 2 (các Thời kỳ 4 và 5), 2 đối tượng dự phòng sẽ được dùng liều lượng, và độ an toàn được đánh giá sau liều lượng đầu tiên đối với từng thời kỳ trong Giai đoạn 1. Nếu SSC xác định rằng không có mối lo ngại độ an toàn nào mà loại bỏ việc dùng liều bổ sung ở liều lượng 20 mg/kg ATB200 phối hợp với 130 mg miglustat (Thời kỳ 4) hoặc liều lượng 20 mg/kg ATB200 phối hợp với 260 mg miglustat (Thời kỳ 5), 10 đối tượng bổ sung sẽ nhận 3 liều lượng hai tuần một lần ở liều lượng được chỉ định cho thời kỳ đó. SSC sẽ triệu tập lại khi tất cả dữ liệu độ an toàn (bao gồm dữ liệu thí nghiệm độ an toàn trung tâm) có sẵn đối với tất cả các đối tượng ở cuối Giai đoạn 2. SSC cũng sẽ triệu tập đặc biệt trong trường hợp SAE hoặc quan ngại về độ an toàn được nhận ra.

SSC có thể khuyến nghị xem xét bất kỳ trong số các xem xét sau đây:

- Tiếp tục nghiên cứu mà không cải biến
- Tiếp tục nghiên cứu có cải biến (sửa đổi)
- Tạm thời ngưng dùng liều lượng

- Ngừng dùng liều lượng vĩnh viễn

Nếu theo ý kiến của SSC không có AES hoặc quan ngại về độ an toàn ở các đối tượng dự phòng mà có thể loại bỏ việc dùng liều nghiên cứu tiếp tục, việc dùng liều lượng sẽ tiếp tục đối với tất cả các đối tượng còn lại ở mức độ liều lượng đó. Độ an toàn của đối tượng sẽ tiếp tục được theo dõi kỹ lưỡng bằng Thiết Bị Giám Sát Y Tế và các thăm tra viên nghiên cứu trên cơ sở liên tục, và ở các khoảng cách đều đặn bởi SSC.

Số lượng đối tượng (theo kế hoạch):

Mười hai đối tượng trưởng thành mắc bệnh Pompe đã trải qua ERT (xấp xỉ 6 đối tượng đi lại được và 6 đối tượng không đi lại được) sẽ tham gia vào Giai đoạn 1. Cùng các đối tượng đó tiếp tục nghiên cứu ở Giai đoạn 2.

Chẩn đoán và tiêu chuẩn đủ điều kiện:

Tại Lần Khám Sàng Lọc, các đối tượng trưởng thành mắc bệnh Pompe đã trải qua ERT sẽ được đánh giá bằng cách sử dụng tiêu chuẩn đủ điều kiện được phác họa dưới đây. Mỗi đối tượng phải đáp ứng tất cả các tiêu chuẩn bao hàm và không có tiêu chuẩn loại trừ nào. Không chấp nhận sự khước từ về tiêu chuẩn bao hàm/loại trừ.

Tiêu Chuẩn Bao Hàm

Các đối tượng đã trải qua ERT (**đi lại được**)

1. Các đối tượng nam và nữ từ 18 đến 65 tuổi, bao hàm;
2. Đối tượng phải đưa ra thư chấp thuận đã được thông báo đã ký trước các quy trình liên quan đến nghiên cứu bất kỳ;
3. Đối tượng có khả năng sinh đẻ phải đồng ý sử dụng các phương pháp ngừa thai được chấp nhận về mặt y học trong quá trình nghiên cứu và trong thời gian 30 ngày sau khi dùng phối hợp ATB200 + miglustat lần cuối;
4. Đối tượng có chẩn đoán mắc bệnh Pompe dựa trên sự thiếu hụt hoạt tính enzym axit α -glucosidaza được ghi chép lại hoặc bằng cách xác định kiểu gen *GAA*;
5. Đối tượng đã tiếp nhận ERT bằng alglucosidaza alfa trong khoảng thời gian từ 2 đến 6 năm trước;

6. Đối tượng hiện đang tiếp nhận alglucosidaza alfa theo tần suất là hai tuần một lần;
7. Đối tượng đã tiếp nhận và hoàn thành hai đợt truyền cuối mà không có biến cố bất lợi liên quan đến thuốc dẫn đến gián đoạn liều lượng;
8. Đối tượng phải có khả năng đi bộ từ 200 đến 500 mét theo 6MWT; và
9. Dung tích sống gắng sức (FVC) khi đứng thẳng phải nằm trong khoảng từ 30% đến 80% giá trị chuẩn được dự đoán.

Các đối tượng đã trải qua ERT (không đi lại được)

10. Các đối tượng nam và nữ từ 18 đến 65 tuổi, bao hàm;
11. Đối tượng phải đưa ra thư chấp thuận đã được thông báo đã ký trước các quy trình liên quan đến nghiên cứu bất kỳ;
12. Đối tượng có khả năng sinh đẻ phải đồng ý sử dụng các phương pháp ngừa thai được chấp nhận về mặt y học trong quá trình nghiên cứu và trong thời gian 30 ngày sau khi dùng phối hợp ATB200 + miglustat lần cuối;
13. Đối tượng có chẩn đoán mắc bệnh Pompe dựa trên sự thiếu hụt hoạt tính enzym axit α -glucosidaza được ghi chép lại hoặc bằng cách xác định kiểu gen *GAA*;
14. Đối tượng đã tiếp nhận ERT bằng alglucosidaza alfa trong thời gian ≥ 2 năm;
15. Đối tượng hiện đang tiếp nhận alglucosidaza alfa theo tần suất là hai tuần một lần;
16. Đối tượng đã tiếp nhận và hoàn thành hai đợt truyền cuối mà không có biến cố bất lợi liên quan đến thuốc dẫn đến gián đoạn liều lượng; và
17. Đối tượng phải gắn với xe lăn hoàn toàn và không thể đi bộ khi không được hỗ trợ.

Tiêu Chuẩn Loại TrừCác đối tượng đã trải qua ERT (đi lại được)

1. Đối tượng đã tiếp nhận trị liệu nghiên cứu bệnh Pompe bất kỳ, ngoài alglucosidaza alfa trong vòng 30 ngày trước Lần Khám Cơ Sở, hoặc tiên liệu làm như vậy trong quá trình nghiên cứu;
2. Đối tượng đã tiếp nhận điều trị bằng các thuốc ngăn chặn (miglitol (ví dụ, Glyset®); miglustat (ví dụ, Zavesca®); acarbose (ví dụ, Precose®, Glucobay®); voglibose (ví dụ, Volix®, Vocarb®, và Volibo®); albuterol và clenbuterol; hoặc thuốc nghiên cứu/thí nghiệm bất kỳ) trong vòng 30 ngày của Lần Khám Cơ Sở;
3. Đối tượng, nếu là nữ, có thai hoặc đang cho con bú lúc sàng lọc;
4. Đối tượng, dù là nam hay nữ, đang có kế hoạch mang thai trong quá trình nghiên cứu;
5. Đối tượng đòi hỏi phải hỗ trợ thông khí xâm lấn;
6. Đối tượng sử dụng hỗ trợ thông khí không xâm lấn ≥ 6 giờ mỗi ngày khi tỉnh;
7. Đối tượng có tình trạng hoặc trường hợp y tế hoặc suy nhược khác bất kỳ mà có thể, theo ý kiến thăm tra viên, đặt ra nguy cơ về an toàn quá mức cho đối tượng hoặc làm tổn thương khả năng của đối tượng để tuân theo các yêu cầu của quy trình;
8. Đối tượng có tiền sử về chứng phản vệ với alglucosidaza alfa;
9. Đối tượng có tiền sử về độ chuẩn kháng thể kháng axit α -glucosidaza tái tổ hợp duy trì cao;
10. Đối tượng có tiền sử về dị ứng hoặc mẫn cảm với miglustat hoặc các đường dạng imino khác;
11. Đối tượng có tiền sử về bệnh tự miễn đã biết bao gồm bệnh luput ban đỏ, viêm tuyến giáp tự miễn, bệnh xơ cứng da, hoặc viêm khớp dạng thấp; và
12. Đối tượng có tiền sử đã biết về bệnh hen phế quản.

Các đối tượng đã trải qua ERT (**không đi lại được**)

13. Đối tượng đã tiếp nhận trị liệu nghiên cứu bệnh Pompe bất kỳ, ngoài alglucosidaza alfa trong vòng 30 ngày trước Lần Khám Cơ Sở, hoặc tiên liệu làm như vậy trong quá trình nghiên cứu;

14. Đối tượng đã tiếp nhận điều trị bằng các thuốc ngăn chặn (miglitol (ví dụ, Glyset[®]); miglustat (ví dụ, Zavesca[®]); acarbose (ví dụ, Precose[®], Glucobay[®]); voglibose (ví dụ, Volix[®], Vocarb[®], và Volibo[®]); albuterol và clenbuterol; hoặc thuốc nghiên cứu/thí nghiệm bất kỳ) trong vòng 30 ngày của Lần Khám Cơ Sở;

15. Đối tượng, nếu là nữ, có thai hoặc đang cho con bú lúc sàng lọc;

16. Đối tượng, dù là nam hay nữ, đang có kế hoạch mang thai trong quá trình nghiên cứu;

17. Đối tượng có tình trạng hoặc trường hợp y tế hoặc suy nhược khác bất kỳ mà có thể, theo ý kiến thăm tra viên, đặt ra nguy cơ về an toàn quá mức cho đối tượng hoặc làm tổn thương khả năng của đối tượng để tuân theo các yêu cầu của quy trình;

18. Đối tượng có tiền sử về chứng phản vệ với alglucosidaza alfa;

19. Đối tượng có tiền sử về độ chuẩn kháng thể kháng axit α -glucosidaza tái tổ hợp duy trì cao;

20. Đối tượng có tiền sử về dị ứng hoặc mẫn cảm với miglustat hoặc các đường dạng imino khác;

21. Đối tượng có tiền sử về bệnh tự miễn đã biết bao gồm bệnh luput ban đỏ, viêm tuyến giáp tự miễn, bệnh xơ cứng da, hoặc viêm khớp dạng thấp; và

22. Đối tượng có tiền sử đã biết về bệnh hen phế quản.

Sản phẩm, liều lượng, và phương thức sử dụng được khảo sát:

Giai đoạn 1 (bao gồm 3 thời kỳ dùng liều lượng cách nhau 2 tuần)

- Thời kỳ 1: truyền IV đơn liều lượng của 5 mg/kg ATB200;
- Thời kỳ 2: truyền IV đơn liều lượng của 10 mg/kg ATB200 cho tất cả các đối tượng đã hoàn thành Thời kỳ 1; và

- Thời kỳ 3: truyền IV đơn liều lượng của 20 mg/kg ATB200 cho tất cả các đối tượng đã hoàn thành Thời kỳ 2.

Giai đoạn 2 (bao gồm 2 thời kỳ dùng liều lượng, mỗi thời kỳ chứa 3 liều lượng thuốc nghiên cứu, cách nhau 2 tuần)

- Thời kỳ 4: 130 mg miglustat được dùng qua đường miệng trong thời gian 1 giờ trước khi truyền IV đơn liều lượng của 20 mg/kg ATB200 cho tất cả các đối tượng đã hoàn thành Thời kỳ 3 (lặp lại 2 tuần 1 trong tổng cộng 3 lần dùng); và

- Thời kỳ 5: 260 mg miglustat được dùng qua đường miệng trong thời gian 1 giờ trước khi truyền IV đơn liều lượng của 20 mg/kg ATB200 cho tất cả các đối tượng đã trải qua ERT đã hoàn thành Thời kỳ 4 (lặp lại 2 tuần 1 lần cho tổng cộng 3 lần dùng).

Lưu ý: Yêu cầu các đối tượng nhịn ăn ít nhất là 2 giờ trước và 2 giờ sau khi dùng miglustat qua đường miệng.

Toàn Bộ Thời Gian Nghiên Cứu: Lên đến 22 tuần (thời gian sàng lọc lên đến 4 tuần sau đó xấp xỉ 18 tuần cho điều trị nghiên cứu [các Giai đoạn 1 và 2])

Khoảng thời gian quan trắc PK đơn liều (Giai đoạn 1, các Thời kỳ 1, 2, và 3): 6 tuần

Khoảng thời gian quan trắc PK đa liều (Giai đoạn 2, các Thời kỳ 4 và 5): 12 tuần

Khoảng thời gian quan trắc độ an toàn, khả năng dung chịu, và khả năng gây miễn dịch (các Thời kỳ 1, 2, 3, 4, và 5): 18 tuần

Tiêu chuẩn để đánh giá:

Cơ bản:

Các đánh giá độ an toàn:

- PE
- Các dấu hiệu sự sống, bao gồm nhiệt độ cơ thể, RR, HR, và BP
- AE, bao gồm IAR
- ECG 12-Cần

- Các đánh giá thí nghiệm độ an toàn lâm sàng: hóa học huyết thanh, huyết học, và thử nghiệm nước tiểu

PK của ATB200 và miglustat trong huyết tương:

- Mức độ hoạt tính axit α -glucosidaza huyết tương và các tham số PK nồng độ protein axit α -glucosidaza tổng số: nồng độ trong huyết tương được quan sát thấy lớn nhất ($C_{\text{lớn nhất}}$), thời gian để đạt được nồng độ trong huyết tương được quan sát thấy lớn nhất ($t_{\text{lớn nhất}}$), diện tích dưới đường cong thời gian nồng độ thuốc-huyết tương từ Thời điểm 0 đến thời điểm có nồng độ có thể đo được lần cuối (AUC_{0-t}), diện tích dưới đường cong thời gian nồng độ thuốc-huyết tương từ Thời điểm 0 ngoại suy đến vô cùng ($AUC_{0-\infty}$), thời gian bán thải ($t_{1/2}$), và tổng độ thanh thải sau khi dùng IV (CL_T)
- Các tỷ lệ của hoạt tính axit α -glucosidaza huyết tương và protein axit α -glucosidaza tổng số $C_{\text{lớn nhất}}$ và $AUC_{0-\infty}$ đối với tất cả các chế độ liều lượng
- Các tham số PK miglustat trong huyết tương: $C_{\text{lớn nhất}}$, $t_{\text{lớn nhất}}$, AUC_{0-t} , $AUC_{0-\infty}$, và $t_{1/2}$, độ thanh thải thuốc tổng số biểu kiến sau khi dùng qua đường miệng (CL_T/F), và thể tích phân bố ở khoảng thời gian cuối sau khi dùng qua đường miệng (V_z/F) đối với mỗi mức độ liều lượng
- Các tỷ lệ của miglustat trong huyết tương $C_{\text{lớn nhất}}$ và $AUC_{0-\infty}$ đối với mỗi mức độ liều lượng

Các đánh giá về chức năng (được tiến hành ở Cơ sở)

Đối với đối tượng đi lại được

- Các Thử Nghiệm Chức Năng Vận Động
- Thử Nghiệm Đi Bộ Sáu Phút (6MWT)
- Thử Nghiệm Đi Bộ 10 Mét
- Điểm Dáng Đi, Bậc Thang, Gower, và Ngồi Ghế
- Tính Thời Gian Đứng Lên và Đi (TUG)
- Thử Nghiệm Sức Mạnh Cơ (tiêu chuẩn nghiên cứu về y học [MRC] và động lực kế cầm tay) đối với cả chi trên và chi dưới

- Các PFT (FVC, MIP, MEP, và SNIP)

Đối với đối tượng không đi lại được

- Thử Nghiệm Sức Mạnh Cơ - Chỉ Chỉ Trên
- MRC và động lực kế cầm tay được tiến hành chỉ đối với chi trên
- Các thử nghiệm chức năng phổi (PFT) (dung tích sống gắng sức [FVC], áp suất hít vào lớn nhất [MIP], áp suất thở ra lớn nhất [MEP], và áp suất hít vào qua mũi [SNIP])

Các Kết Quả Được Báo Cáo Ở Bệnh Nhân (được tiến hành ở Cơ sở)

- Thang Đo Mức Độ Nghiêm Trọng Của Tình Trạng Một Mỏi
- Thang Đo Độ Tàn Tật Rotterdam
- Hoạt động đặc trưng-Pompe do Rasch xây dựng (R-PAct)

Khảo sát

- Độ chuẩn kháng thể kháng ATB200 (toàn bộ và trung hòa)
- Phản ứng chéo của kháng thể kháng axit α -glucosidaza tái tổ hợp với α -glucosidaza alfa
- Các cytokin tiền viêm và chỉ thị sinh học khác của sự kích hoạt hệ miễn dịch
- Chỉ thị PD (Hex4 và CPK)

Các Phương Pháp Phân Tích:

Phương pháp thống kê:

Thống kê mô tả về các tham số PK được cung cấp. Thống kê tổng hợp được cung cấp đối với tất cả các biến số mà không phải là các tham số PK. Đánh giá tỷ lệ với liều lượng lên hoạt tính axit α -glucosidaza và sự tiếp xúc protein axit α -glucosidaza tổng số ($C_{lớn nhất}$, các tỷ lệ AUC_{0-t} , và $AUC_{0-\infty}$) của 5, 10, và một mình 20 mg/kg ATB200. Phân tích biến thiên (ANOVA) trên hoạt tính axit α -glucosidaza và sự tiếp xúc protein axit α -glucosidaza tổng số ($C_{lớn nhất}$, các tỷ lệ AUC_{0-t} , và $AUC_{0-\infty}$) của một mình 20 mg/kg ATB200 so với 20 mg/kg ATB200 + 130 mg miglustat, và so với 20 mg/kg ATB200 + 260 mg miglustat trong

mỗi quần thể và toàn bộ. ANOVA trên hoạt tính axit α -glucosidaza và sự tiếp xúc protein axit α -glucosidaza tổng số ($C_{\text{lớn nhất}}$, các tỷ lệ AUC_{0-t} , và $AUC_{0-\infty}$) của đối tượng đi lại được và đối tượng không đi lại được đối với 20 mg/kg ATB200 + 130 mg miglustat và 20 mg/kg ATB200 + 260 mg miglustat. Đánh giá liều lượng theo tỷ lệ đối với các tỷ lệ tiếp xúc ($C_{\text{lớn nhất}}$, AUC_{0-t} , và $AUC_{0-\infty}$) giữa 130 mg và 260 mg miglustat trong mỗi quần thể đối tượng và toàn bộ. Đánh giá ảnh hưởng của các kết quả gây miễn dịch lên PK, PD, và độ an toàn.

Phân Tích Chuyển Tiếp:

Phân tích chuyển tiếp được tiến hành khi có ít nhất là 50% (n=6) đối tượng đã hoàn thành Giai đoạn 2 của nghiên cứu. Có thể tiến hành lên đến 2 phân tích chuyển tiếp bổ sung trong nghiên cứu.

Các Kết Quả PK Ban Đầu:

Bản tóm tắt PK của hoạt tính GAA và tổng số protein GAA đối với các đối tượng lần lượt được thể hiện trong Bảng 12 và Bảng 13.

Trong các bảng từ Bảng 12 đến Bảng 15 và các hình vẽ từ Hình 24 đến Hình 26, các phép đo liều lượng đơn (SD) được thực hiện sau khi dùng miglustat và ATB200 đơn lẻ, và các phép đo đa liều lượng (MD) được thực hiện sau dùng miglustat và ATB200 hai tuần một lần lần thứ ba.

Bảng 12:

Liều lượng	$\alpha t_{1/2}^a$	$\beta t_{1/2}^a$	$t_{\text{lớn nhất}}^b$	$C_{\text{lớn nhất}}^c$	AUC_{0-t}^c	$AUC_{0-\infty}^c$	$AUC_{0-\infty}/D^c$	CL_T^a	V_{ss}^a
mg/kg ATB200 + mg miglustat	(giờ)	(giờ)	(giờ)	(ug/ml)	(giờ*ug/ml)	(giờ*ug/ml)	(giờ*ug/ml/mg)	(l/giờ)	(l)
5	1,06 (9,7)	3,15 (5,3)	3,5 (3,5 - 4,0)	53,7 (20,4)	193 (22,5)	193 (22,5)	0,444 (15,4)	2,27 (15,9)	5,61 (21,2)
10	1,26	2,73	3,75	115	447 (30,7)	448 (30,6)	0,523 (17,5)	1,93	5,3

	(22,2)	(18,2)	(3,5)	(28,3)				(15,0)	9
		)	-					)	(21
			4,5)						,2)
20	1,36	2,16	4,0	256	1020	1021	0,596 (30,1)	1,76	5,0
	(25,7)	(10,2)	(3,5)	(30,4)	(37,4)	(37,4)		(37,5)	1
		)	-					)	(28
			4,0)						,0)
20 + 130 Liều	1,84	2,49	4,5	234	1209	1211	0,707 (23,7)	1,45	5,3
Lượng Đơn	(16,0)	(9,9)	(4,0)	(36,0)	(29,9)	(29,9)		(25,8)	2
			-					)	(24
			5,0)						,8)
20 + 130 Đa Liều		2,53	4,0						5,5
Lượng	1,90 (7,5)	(11,9)	(3,5)	230	1180	1183	0,690 (15,1)	1,46	5
		)	-	(20,2)	(19,1)	(19,0)		(14,4)	(14
			5,0)					)	,2)
20 + 260 Liều	2,39	2,70	4,0						5,7
Lượng Đơn	(11,5)	(10,8)	(4,0)	228	1251	1256	0,733 (15,8)	1,38	1
		)	-	(26,0)	(17,4)	(17,2)		(17,3)	(20
			4,5)					)	,2)

^aTrung bình cộng số học (CV%)

^bTrung vị (nhỏ nhất-lớn nhất)

^cTrung bình nhân (CV%)

Bảng 13:

Liều lượng	$\alpha t_{1/2}^a$	$\beta t_{1/2}^a$	$t_{l\text{ớn nhất}}^b$	$C_{l\text{ớn nhất}}^c$	AUC_{0-t}^c	$AUC_{0-\infty}^c$	$AUC_{0-\infty}/D^c$	CL_T^a	V_{ss}^a
mg/kg ATB200 + mg miglustat	(giờ)	(giờ)	(giờ)	(ug/ml))	(giờ*ug/ g/ml)	(giờ*ug/ g/ml)	(giờ*ug/ ml/mg)	(l/giờ)	(l)

5	1,02 (3,0)	1,83 (13,8)	4,0 (3,5 - 4,0)	61,1 (20,0)	215 (17,1)	218 (17,0)	0,511 (7,3)	1,97 (7,7)	4,57 (6,8)
10	1,36 (5,3)	1,99 (56,9)	4,0	143 (19,5)	589 (16,6)	594 (16,6)	0,694 (12,3)	1,45 (13,4)	3,90 (14,5)
20	1,65 (12,3)	2,62 (18,5)	4,0	338 (11,1)	1547 (12,1)	1549 (12,1)	0,904 (12,8)	1,11 (14,4)	3,49 (11,6)
20 + 130 Liều Lượng Đơn	1,79 (10,7)	2,63 (6,6)	4,0	322 (18,2)	1676 (14,9)	1680 (14,8)	0,980 (15,0)	1,03 (17,6)	3,78 (12,2)
20 + 130 Đa Liều Lượng	1,99 (10,2)	2,47 (4,2)	4,0 (3,5 - 5,0)	355 (16,5)	1800 (12,7)	1804 (12,7)	1,05 (12,9)	0,96 (13,7)	3,70 (10,8)
20 + 260 Liều Lượng Đơn	2,35 (13,9)	2,73 (10,4)	4,0	350 (14,2)	1945 (15,1)	1953 (15,0)	1,14 (15,8)	0,89 (15,7)	3,63 (16,3)

^aTrung bình cộng số học (CV%)

^bTrung vị (nhỏ nhất-lớn nhất)

^cTrung bình nhân (CV%)

Hình 24A thể hiện các biên dạng nồng độ-thời gian của hoạt tính GAA trong huyết tương trung bình sau khi dùng liều lượng 5 mg/kg, 10 mg/kg và 20 mg/kg ATB200. Hình 24B cũng đưa ra các biên dạng nồng độ-thời gian của hoạt tính GAA trong huyết tương trung bình sau khi dùng liều lượng 5 mg/kg, 10 mg/kg và 20 mg/kg ATB200, nhưng hoạt tính GAA trong huyết tương được thể hiện theo thang lôgarit. Như có thể thấy trên các hình vẽ từ Hình 24A đến Hình 24B và Bảng 12, ATB200 chứng tỏ lớn hơn một chút so với sự tiếp xúc tỷ lệ với liều lượng đối với hoạt tính GAA trong huyết tương.

Hình 24C thể hiện các biên dạng nồng độ-thời gian của hoạt tính GAA trong huyết tương trung bình sau khi dùng liều lượng một mình 20 mg/kg ATB200, cũng như là 20 mg/kg ATB200 và 130 hoặc 260 mg miglustat. Hình 24D cũng đưa ra hoạt tính GAA trong huyết tương trung bình sau khi dùng liều lượng một mình 20 mg/kg ATB200, với 130 mg

miglustat hoặc 260 mg miglustat, nhưng hoạt tính GAA trong huyết tương được thể hiện theo thang lôgarit.

Hình 25A thể hiện các biên dạng nồng độ-thời gian của protein GAA tổng số trong huyết tương trung bình sau khi dùng liều lượng 5 mg/kg, 10 mg/kg và 20 mg/kg ATB200. Hình 25B cũng đưa ra các biên dạng nồng độ-thời gian của protein GAA tổng số trong huyết tương trung bình sau khi dùng liều lượng 5 mg/kg, 10 mg/kg và 20 mg/kg ATB200, nhưng protein GAA tổng số trong huyết tương được thể hiện theo thang lôgarit. Như có thể thấy trên các hình vẽ từ Hình 25A đến Hình 25B và Bảng 13, ATB200 chứng tỏ lớn hơn một chút so với sự tiếp xúc tỷ lệ với liều lượng đối với protein GAA tổng số trong huyết tương.

Hình 25C thể hiện các biên dạng nồng độ-thời gian của protein GAA tổng số trong huyết tương trung bình sau khi dùng liều lượng một mình 20 mg/kg ATB200, 20 mg/kg ATB200 và 130 mg miglustat, và 20 mg/kg ATB200 và 260 mg miglustat. Hình 25D cũng đưa ra protein GAA tổng số trong huyết tương trung bình sau khi dùng liều lượng một mình 20 mg/kg ATB200, with 130 mg miglustat hoặc 260 mg miglustat, nhưng protein GAA tổng số trong huyết tương được thể hiện theo thang lôgarit.

Như được thể hiện trong Bảng 13, việc dùng phối hợp miglustat làm tăng thời gian bán thải trong huyết tương của protein GAA tổng số lên xấp xỉ 30% tương quan với ATB200 được dùng một mình. Thể tích phân bố nằm trong khoảng từ 3,5 đến 5,7 l đối với tất cả các điều trị, gợi ý rằng sự glycosyl hóa ATB200 cho phép phân phối ATB200 hiệu quả đến các mô.

Bản tóm tắt PK đối với miglustat được thể hiện trong Bảng 14.

Bảng 14

Liều lượng	$\beta t_{1/2}^a$	$t_{\text{lớn nhất}}^b$	$C_{\text{lớn nhất}}^c$	$C_{\text{lớn nhất}}^c/BW^c$	AUC_{0-t}^c	$AUC_{0-\infty}^c$	$AUC_{0-\infty}^c/BW^c$	V_z/F^a	CL/F^a	
mg	(giờ)	(giờ)	(ug/ml)	(ng/ml/kg)	(giờ*ug/ml)	(giờ*ug/ml)	(giờ*ng/ml/kg)	(l)	(l/giờ)	
130	Đơn	4,5	2,75 (1,5)	1647	19,2	12620	13157	154 (29,7)	65,4	9,93

Liều	(37,0)	- 3,5)	(22,1)	(23,9)	(13,1)	(13,1)		(41,9)	(13,7)
130 Đa Liều	5,6	3,0 (1,5 -	1393	16,3	11477	12181	142 (26,9)	88,1	10,8
Lượng	(12,5)	3,5)	(36,8)	(36,4)	(18,0)	(16,4)		(26,1)	(16,2)
260 Đơn	5,5	2,75 (1,0	3552	41,5	26631	28050	325 (30,8)	79,2	9,51
Liều	(25,9)	- 5,0)	(30,2)	(33,8)	(25,1)	(22,9)		(55,3)	(27,6)

^aTrung bình cộng số học (CV%)

^bTrung vị (nhỏ nhất-lớn nhất)

^cTrung bình nhân (CV%)

Hình 26 thể hiện biên dạng nồng độ-thời gian của miglustat trong huyết tương ở các đối tượng là người sau khi dùng liều lượng 130 mg hoặc 260 mg miglustat.

Như có thể thấy trong Bảng 14 và Hình 26, miglustat trong huyết tương, được dùng qua đường miệng trong thời gian 1 giờ trước khi truyền ATB200, đạt đến nồng độ đỉnh trong thời gian 2 giờ sau khi truyền và chứng tỏ động học tỷ lệ với liều lượng.

Tiến hành phân tích trên các phần khác nhau của đường cong nồng độ huyết tương đối với hoạt tính GAA và protein tổng số để xác định AUC từng phần. Bảng 15 đưa ra bản tóm tắt của AUC từng phần từ 0-t_{lớn nhất}, t_{lớn nhất}-6 giờ, t_{lớn nhất}-10 giờ, t_{lớn nhất}-12 giờ và t_{lớn nhất}-24 giờ đối với hoạt tính GAA và protein tổng số.

Bảng 15:

		Trung Bình Cộng Số Học pAUC (ng*giờ/ml) ở Thời Điểm Sau Khi Dùng Liều Lượng (N=4)				
Chất Phân Tích	Điều Trị	0-t _{lớn nhất}	t _{lớn nhất} -6giờ	t _{lớn nhất} -10giờ	t _{lớn nhất} -12giờ	t _{lớn nhất} -24giờ
Hoạt tính GAA	20 mg/kg	428	382	606	630	654
Hoạt tính GAA	20 mg/kg + 130 mg Đơn	456	415	722	770	832

	Liều					
Hoạt tính GAA	20 mg/kg + 130 mg Đa Liều Lượng	423	392	689	737	796
Hoạt tính GAA	20 mg/kg + 260 mg Đơn Liều	423	536	924	996	1094
Protein Tổng Số	20 mg/kg	621	603	943	981	1040
Protein Tổng Số	20 mg/kg + 130 mg Đơn Liều	565	614	1041	1106	1189
Protein Tổng Số	Đa Liều Lượng 20 mg/kg + 130 mg	630	612	1079	1154	1244
Protein Tổng Số	20 mg/kg + 260 mg Đơn Liều	679	824	1411	1518	1665

Như có thể thấy trong Bảng 15, sự gia tăng trung bình tỷ lệ phần trăm hoạt tính GAA của $pAUC_{t_{lớn nhất-24 giờ}}$ đối với 20 mg/kg cộng miglustat tương quan với một mình 20 mg/kg ATB200 là 21,4%, 17,8%, 40,2%, lần lượt đối với 130 mg SD, 130 mg MD, và 260 mg SD.

Tương tự, sự gia tăng trung bình tỷ lệ phần trăm protein GAA tổng số của $pAUC_{t_{lớn nhất-24 giờ}}$ đối với 20 mg/kg cộng miglustat tương quan với một mình 20 mg/kg ATB200 là 12,5%, 16,4%, 37,5%, lần lượt đối với 130 mg SD, 130 mg MD, và 260 mg SD.

Do đó, phân tích AUC một phần chứng minh rằng việc dùng phối hợp miglustat làm tăng đáng kể AUC từng phần khoảng thời gian cuối ($t_{lớn nhất-24 giờ}$) của ATB200 bằng xấp xỉ

15% đối với liều lượng 130 mg miglustat và bằng xấp xỉ 40% đối với liều lượng 260 mg miglustat.

Các Kết Quả Chỉ Thị Sinh Học Ban Đầu

Hàm lượng của alanin aminotransferaza (ALT), aspartat aminotransferaza (AST) và creatin phosphokinaza (CPK) được theo dõi ở người bệnh mà chuyển đổi từ Lumizyme® sang ATB200. Các bệnh nhân tiếp nhận liều lượng ATB200 tăng dần (5, 10 và 20 mg/kg) sau đó dùng phối hợp ATB200 (20 mg/kg) và miglustat (130 và 260 mg). Hàm lượng cao của enzym CPK có thể biểu thị tổn thương hoặc áp lực căng thẳng lên mô cơ, tim, hoặc não. ALT và AST tăng cao lần lượt là các chỉ thị của tổn thương gan và cơ do bệnh Pompe. Phân tích ban đầu về hàm lượng của ALT, AST và CPK được thể hiện trên các hình vẽ từ Hình 38 đến Hình 41.

Như có thể thấy trên các hình vẽ từ Hình 38 đến Hình 41, có hai bệnh nhân thể hiện hướng sớm về phía sự cải thiện ở cả ba chỉ thị sinh học và có hai bệnh nhân vẫn ổn định. Có một bệnh nhân có sự giảm 44%, 28% và 34% lần lượt ở CPK, AST và ALT. Bệnh nhân kia có sự giảm 31%, 22% và 11% lần lượt ở CPK, AST và ALT.

Cho đến lúc này, không có biến cố bất lợi nghiêm trọng (SAE) nào. AE thường là nhẹ và nhất thời. Cho đến lúc này không có các phản ứng liên quan đến việc truyền sau 100+ lần truyền ở tất cả các bệnh nhân tham gia. Tất cả các bệnh nhân có các kháng thể kháng rhGAA vào lúc cơ sở mà thường vẫn ổn định. Xytokin vẫn thấp và ổn định trong quá trình truyền.

Ví dụ 15: Hàm lượng của GAA và LAMP1 trong nguyên bào sợi kiểu đại và nguyên bào sợi Pompe

Sử dụng kính hiển vi huỳnh quang miễn dịch để phát hiện hàm lượng của GAA và LAMP1 trong nguyên bào sợi kiểu đại và nguyên bào sợi Pompe với đột biến ghép nối thông thường. Như được thể hiện trên Hình 27, GAA ở các ngăn lysosom riêng biệt trong nguyên bào sợi kiểu đại. Hình 27 còn thể hiện tín hiệu GAA dồi dào trong nguyên bào sợi Pompe, và cho thấy rằng cả tín hiệu GAA và tín hiệu LAMP1 trong nguyên bào sợi Pompe dường như tập trung cục bộ ở ER và thể Golgi, chứ không phải là các lysosom ngoại biên. Đây là bằng chứng của việc vận chuyển protein GAA đã bị thay đổi trong nguyên bào sợi

Pompe.

Ví dụ 16: Sự cải thiện của rối loạn chức năng tế bào và chức năng cơ ở chuột đã bị làm bất hoạt *Gaa*

Đã thấy rằng sự suy yếu của sự dị hóa glycogen lysosom do thiếu hụt GAA gây ra rối loạn chức năng tế bào cơ bản như đã được chứng minh là bởi tự tiêu liên tục, rõ ràng và sự tăng sinh và sự tích lũy của các khoang nội bào liên kết màng đã được lấp đầy bằng glycogen tích lũy (N. Raben et al.). Dữ liệu mô miễn dịch của chúng tôi chỉ ra rằng việc vận chuyển protein được thay đổi đáng kể đối với nhiều protein bao gồm một vài protein chính mà cực kỳ quan trọng đối với độ ổn định màng cơ chẳng hạn như dystrophin, α - và β -dystroglycan, các sarcoglycan khác nhau và các protein khác mà chứa phức hợp dystrophin glycoprotein cũng như là các protein tham gia vào việc sửa chữa cơ chẳng hạn như dysferlin. Các protein cơ chính này yêu cầu việc vận chuyển protein thích hợp đến màng tế bào cơ nơi chúng thực hiện chức năng. Như được thể hiện trên Hình 28, dữ liệu mô miễn dịch của chúng tôi chỉ ra rằng phân đoạn đáng kể của các protein cơ chính này có sự định vị nội bào trong cơ của mô hình chuột đã bị làm bất hoạt (KO) *Gaa* mắc bệnh Pompe. Các dữ liệu này chỉ ra rằng việc vận chuyển sai của các protein cơ chính này có thể gây ra bệnh loạn dưỡng cơ-giả mà cuối cùng dẫn đến sự suy yếu và hư hỏng cơ.

Alglucosidaza alfa (Myozyme®) và ATB200 có và không có 10 mg/kg miglustat được đánh giá ở chuột KO *Gaa* ở liều lượng ERT tương đương (20 mg/kg) thông qua lịch trình dùng liều lượng hai tuần một lần. Sau 2 lần dùng, alglucosidaza alfa làm giảm vừa phải glycogen lysosom tích lũy trong cơ xương (các hình vẽ từ Hình 32A đến Hình 32C) và có các tác dụng không đáng kể theo hướng làm giảm tự tiêu (Hình 30A - Hình 30B) hoặc sự tăng sinh lysosom (Hình 29A - Hình 29B) khi so với chuột được điều trị bằng tá dược lỏng. Ngược lại, quan sát thấy rằng độ thanh thải glycogen lysosom tốt hơn đáng kể với ATB200/miglustat trong các điều kiện giống hệt nhau (các hình vẽ từ Hình 32A đến Hình 32D). ATB200/miglustat cũng dường như là cải thiện sinh lý cơ nói chung như đã được chứng minh bằng hàm lượng của LC3 II giảm đi (Hình 30A - Hình 30B), chỉ thị sinh học tự tiêu đã xác minh rõ ràng và bằng sự thanh thải các túi nội bào tích lũy được nhuộm màu bằng LAMP1 (Hình 29A - Hình 29B), protein màng và dysferlin nguyên khối lysosom thường trú đã biết (Hình 31A - Hình 31B), protein bề mặt tế bào đã biết tham gia vào việc

sửa chữa cơ. Ngoài ra, ATB200/miglustat cải thiện đáng kể kiến trúc cơ mà giống với các sợi cơ của chuột kiểu đại.

Và, các hình vẽ từ Hình 29 đến Hình 32 thể hiện hai mẽ ATB200 khác nhau (quá trình sản xuất thế hệ trước và sau) tạo ra các kết quả có thể so sánh được. Trên các hình vẽ từ Hình 32A đến Hình 32D, * dùng để chỉ có ý nghĩa về mặt thống kê so với một mình Myozyme®.

Ví dụ 17: Chức năng cơ ở chuột đã bị làm bất hoạt *Gaa*

Trong các nghiên cứu dài hạn của 12 lần dùng hai tuần một lần, 20 mg/kg ATB200 cộng 10 mg/kg miglustat làm tăng sức mạnh cơ chức năng ở chuột KO *Gaa* từ cơ sở như được đo bởi cả thử nghiệm lực nắm giữ và thử nghiệm bàn tay nắm dây (Hình 33A - Hình 33B). Chuột được điều trị bằng alglucosidaza alfa (Lumizyme®) tiếp nhận cùng liều lượng ERT (20 mg/kg) được quan sát thấy là suy giảm trong các điều kiện giống hệt nhau trong hầu hết nghiên cứu (Hình 33A - Hình 33B). Như với nghiên cứu ngắn hạn, ATB200/miglustat có độ thanh thải glycogen tốt hơn đáng kể sau 3 tháng (các hình vẽ từ Hình 34A đến Hình 34C) và 6 tháng (các hình vẽ từ Hình 34D đến Hình 34G) của việc điều trị so với alglucosidaza alfa. ATB200/miglustat cũng làm giảm sự tự tiêu và sự tích lũy nội bào của LAMP1 và dysferlin sau 3 tháng điều trị (Hình 35) so với alglucosidaza alfa. Trên Hình 33A, * dùng để chỉ có ý nghĩa về mặt thống kê so với một mình Lumizyme® ($p < 0,05$, t-test 2 phía). Trên các hình vẽ từ Hình 34A đến Hình 34G, * dùng để chỉ có ý nghĩa về mặt thống kê so với một mình Lumizyme® ($p < 0,05$, dạng so sánh đa nhóm bằng cách sử dụng phương pháp Dunnett trong phân tích ANOVA một chiều).

Xem xét cùng nhau, các dữ liệu này chỉ ra rằng ATB200/miglustat hướng đích một cách hiệu quả đến các cơ để làm đảo ngược rối loạn chức năng tế bào và cải thiện chức năng cơ. Điều quan trọng là, sự cải thiện rõ rệt ở kiến trúc cơ và sự tự tiêu và sự tích lũy nội bào giảm đi của LAMP1 và dysferlin có thể là dấu hiệu đại diện tốt về sinh lý cơ được cải thiện mà tương quan với các cải thiện về sức mạnh cơ chức năng. Kết quả này cho thấy rằng việc theo dõi sự tự tiêu và các protein cơ chính có thể là phương pháp thiết thực, hợp lý để đánh giá các điều trị trị liệu hữu hiệu đối với bệnh Pompe ở chuột KO *Gaa* mà có thể chứng tỏ là các chỉ thị sinh học hữu dụng từ mẫu sinh thiết cơ trong các nghiên cứu lâm sàng.

Hình 40 cho thấy rằng 6 tháng dùng ATB200 mà có hoặc không có miglustat làm hạ thấp sự tích lũy nội bào của dystrophin ở chuột KO *Gaa*. Có sự giảm lớn hơn của sự tích lũy dystrophin bằng ATB200 ± miglustat so với Lumizyme®.

Ví dụ 18: Ảnh hưởng của hàm lượng axit sialic lên ATB200 ở chuột đã bị làm bất hoạt *Gaa*

Hai mẹ có ATB200 với các hàm lượng axit sialic khác nhau được đánh giá về được động học và tính hiệu quả ở chuột KO *Gaa*. Bảng 16 thể hiện tóm tắt đặc tính đối với hai mẹ.

Bảng 16:

Đặc Tính	Mê A	Mê B
Axit Sialic	4,0 mol/mol protein	5,4 mol/mol protein
Hàm Lượng M6P	3,3 mol/mol protein	2,9 mol/mol protein
Hoạt tính đặc hiệu	115831 (nmol 4mu/mg protein/giờ)	120929 (nmol 4mu/mg protein/giờ)
Liên kết CIMPR	$K_d=2,7$ nM	$K_d=2,9$ nM

Như có thể thấy trong Bảng 16, Mê B có hàm lượng axit sialic cao hơn so với Mê A, nhưng có hàm lượng M6P thấp hơn một chút so với Mê A.

Hình 36 thể hiện các biên dạng nồng độ-thời gian của hoạt tính GAA trong huyết tương ở chuột KO *Gaa* sau khi dùng liều IV dạng bolus đơn lẻ của ATB200. Thời gian bán thải của Mê A và Mê B được nêu trong Bảng 17 dưới đây.

Bảng 17:

Thời Gian Bán Thải (giờ)	Giá Trị Trung Bình ± SEM
--------------------------	--------------------------

Mẻ A	$0,50 \pm 0,02$
Mẻ B	$0,60 \pm 0,03$

Như có thể thấy trong Bảng 17, Mẻ B có thời gian bán thải thấp hơn so với Mẻ A. Mặc dù độ giảm thời gian bán thải này là vừa phải, độ giảm trong thời gian bán thải này có ý nghĩa về mặt thống kê ($p < 0,05$ trong t-test 2 phía).

Trong nghiên cứu liên quan, việc tiêm vào tĩnh mạch đuôi IV dạng bolus của ATB200 (Mẻ A và Mẻ B) và Lumizyme® được dùng cho chuột KO *Gaa* hai tuần một lần với tổng số là 2 mũi tiêm. Đo hàm lượng glycogen trong các mô 14 ngày sau khi dùng lần cuối. Như được thể hiện trên các hình vẽ từ Hình 37A đến Hình 37D, Mẻ B thường hiệu quả hơn trong việc làm giảm glycogen so với Mẻ A ở liều lượng tương tự. Cả Mẻ A và Mẻ B đều vượt trội hơn so với Lumizyme® trong việc làm giảm glycogen. Trên các hình vẽ từ Hình 37A đến Hình 37D, * dùng để chỉ có ý nghĩa về mặt thống kê so với Lumizyme® ($p < 0,05$, t-test) và ^ dùng để chỉ sự so sánh có ý nghĩa về mặt thống kê của Mẻ A và Mẻ B ở cùng liều lượng ($p < 0,05$, t-test).

Các phương án được mô tả trong bản mô tả này được dự định để minh họa cho các hợp phần và phương pháp theo sáng chế và không được dự định là làm giới hạn phạm vi của sáng chế. Nhiều cải biến và thay đổi khác nhau thống nhất với bản mô tả sáng chế nói chung và người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực dễ dàng hiểu được rằng chúng được dự định là được bao hàm trong sáng chế. Các yêu cầu bảo hộ kèm theo không bị giới hạn bởi các phương án cụ thể được nêu trong các ví dụ, mà cần được hiểu theo nghĩa rộng nhất thống nhất với bản mô tả sáng chế nói chung.

Các sáng chế, bằng sáng chế, tài liệu công bố, bản mô tả sản phẩm, Mã Số Truy Cập GenBank, và quy trình được viện dẫn trong toàn bộ bản mô tả sáng chế này, nội dung bộc lộ của chúng được kết hợp ở đây chỉ với mục đích tham khảo.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Một bộ kit bao gồm:

dạng liều lượng được đựng chứa miglustat được định hình để dùng qua đường miệng với liều khoảng 260 mg hoặc khoảng 130 mg,

dạng liều lượng được đựng bao gồm các phân tử axit α -glucosidaza tái tổ hợp ở người (rhGAA) được định hình để dùng trong tĩnh mạch với liều từ khoảng 5 mg/kg đến khoảng 20 mg/kg, và

hướng dẫn sử dụng dạng liều lượng được đựng bao gồm miglustat và dạng liều lượng được đựng chứa các phân tử rhGAA cho bệnh nhân có nhu cầu sử dụng,

trong đó

các phân tử rhGAA được tạo ra trong tế bào trứng chuột đồng Trung Quốc (CHO),

các phân tử rhGAA bao gồm các vị trí N-glycosyl hóa tiềm năng thứ nhất, thứ hai, thứ ba, thứ tư, thứ năm, thứ sáu và thứ bảy ở các vị trí axit amin ứng với N84, N177, N334, N414, N596, N826 và N869 của SEQ ID NO: 5 tương ứng,

40% -60% N-glycan trong các phân tử rhGAA là N-glycans loại phức hợp, và

ít nhất 50% phân tử rhGAA mang đơn vị bis- mannoza-6-phosphat (bis-M6P) tại vị trí N-glycosyl hóa tiềm năng thứ nhất.

2. Một bộ kit bao gồm:

dạng liều lượng được đựng bao gồm các phân tử axit α -glucosidaza tái tổ hợp ở người (rhGAA) được định hình để dùng trong tĩnh mạch với liều từ khoảng 5 mg/kg đến khoảng 20 mg/kg, và

hướng dẫn sử dụng cho bệnh nhân cần đến dạng liều lượng được đựng bao gồm các phân tử rhGAA kết hợp với dạng liều lượng được đựng bao gồm miglustat,

trong đó

các phân tử rhGAA được tạo ra trong tế bào trứng chuột đồng Trung Quốc (CHO),

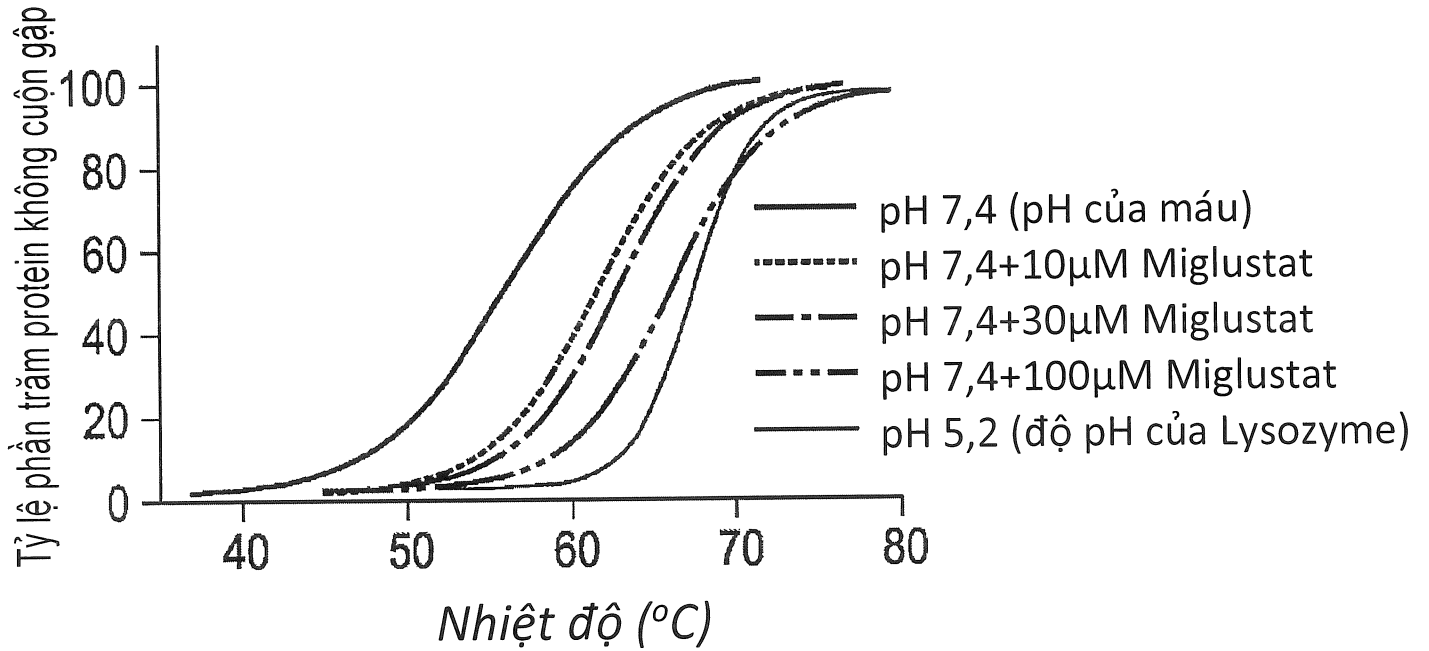
các phân tử rhGAA bao gồm các vị trí N-glycosyl hóa tiềm năng thứ nhất, thứ hai, thứ ba, thứ tư, thứ năm, thứ sáu và thứ bảy ở các vị trí axit amin ứng với N84, N177, N334, N414, N596, N826 và N869 của SEQ ID NO: 5 tương ứng,

40% -60% N-glycan trong các phân tử rhGAA là N-glycans loại phức hợp, và

ít nhất 50% phân tử rhGAA mang đơn vị bis- mannoza-6-phosphat (bis-M6P) tại vị trí N-glycosyl hóa tiềm năng thứ nhất.

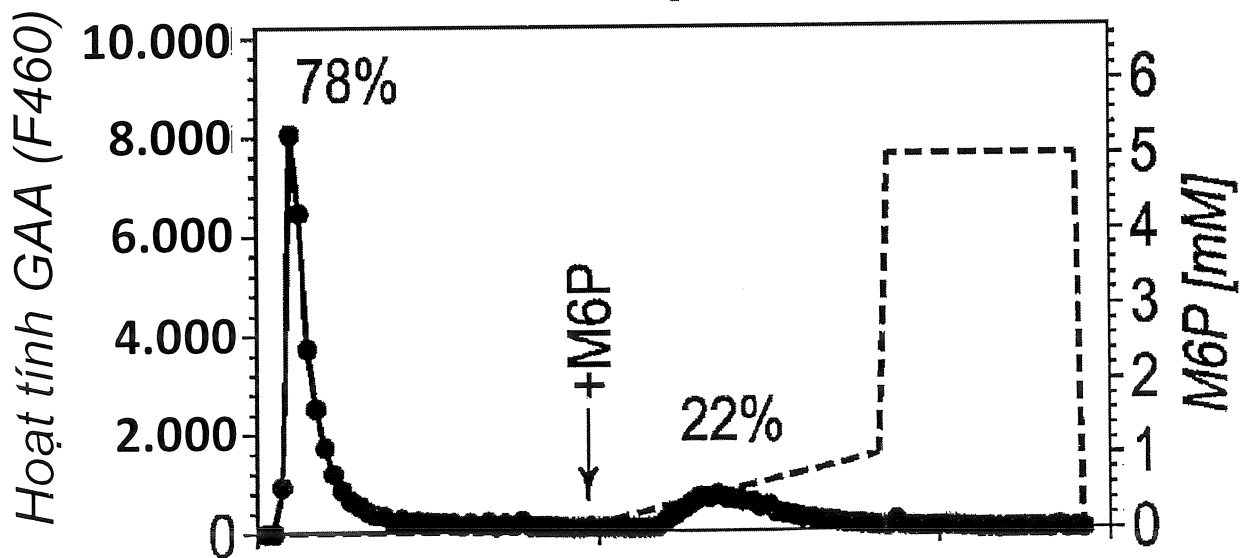
1/51

ATB200±Miglustat



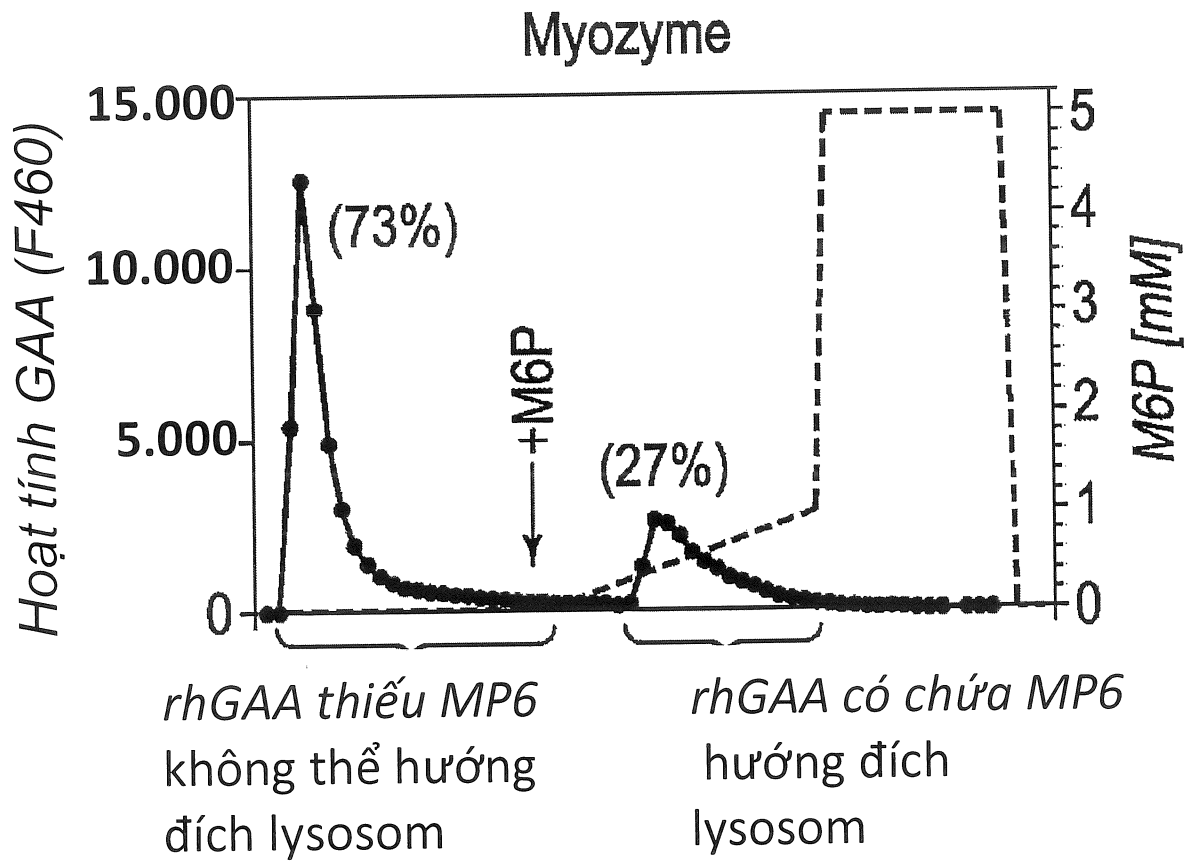
HÌNH 1

Lumizyme



HÌNH 2A

2/51

**HÌNH 2B****Cấu trúc vectơ ATB200**

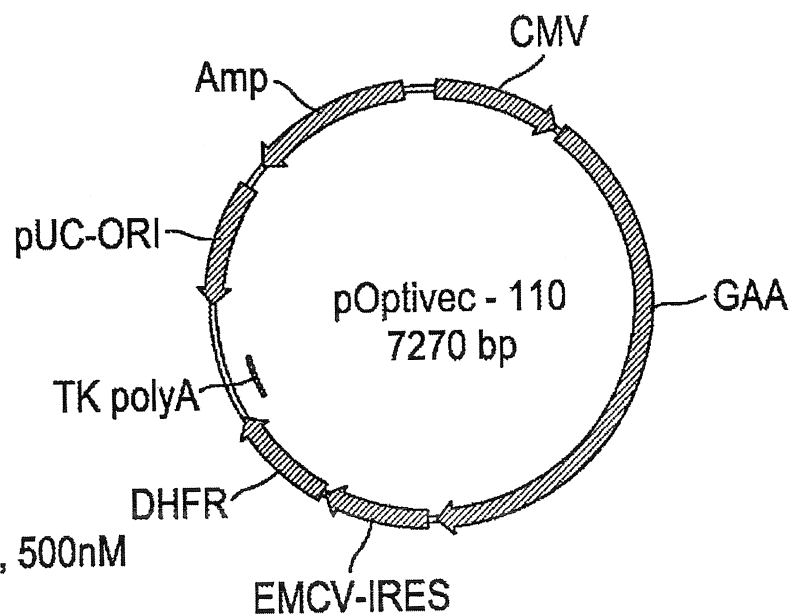
◆ Tế bào chủ: DG44

◆ Vectơ: pOpvec-110

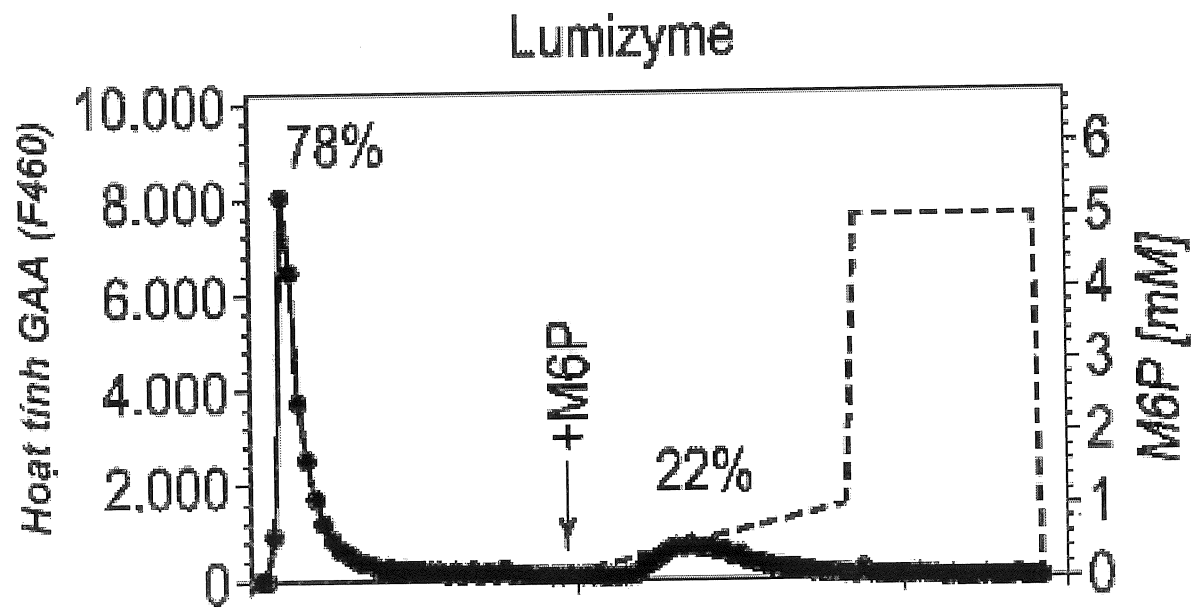
□ Vector Invitrogen

□ Peptit tín hiệu tự
nhiên, 952 aa

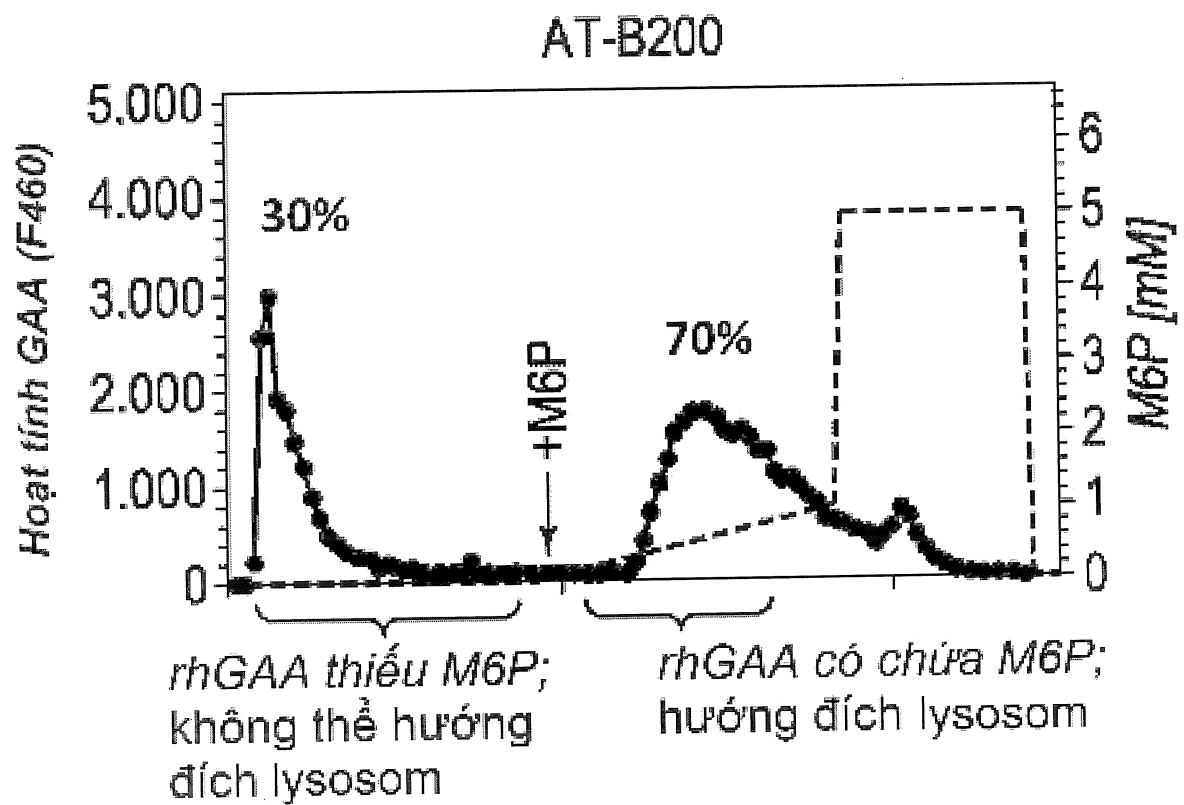
◆ Áp suất sàng lọc: -HT, 500nM
MTX

**HÌNH 3**

3/51



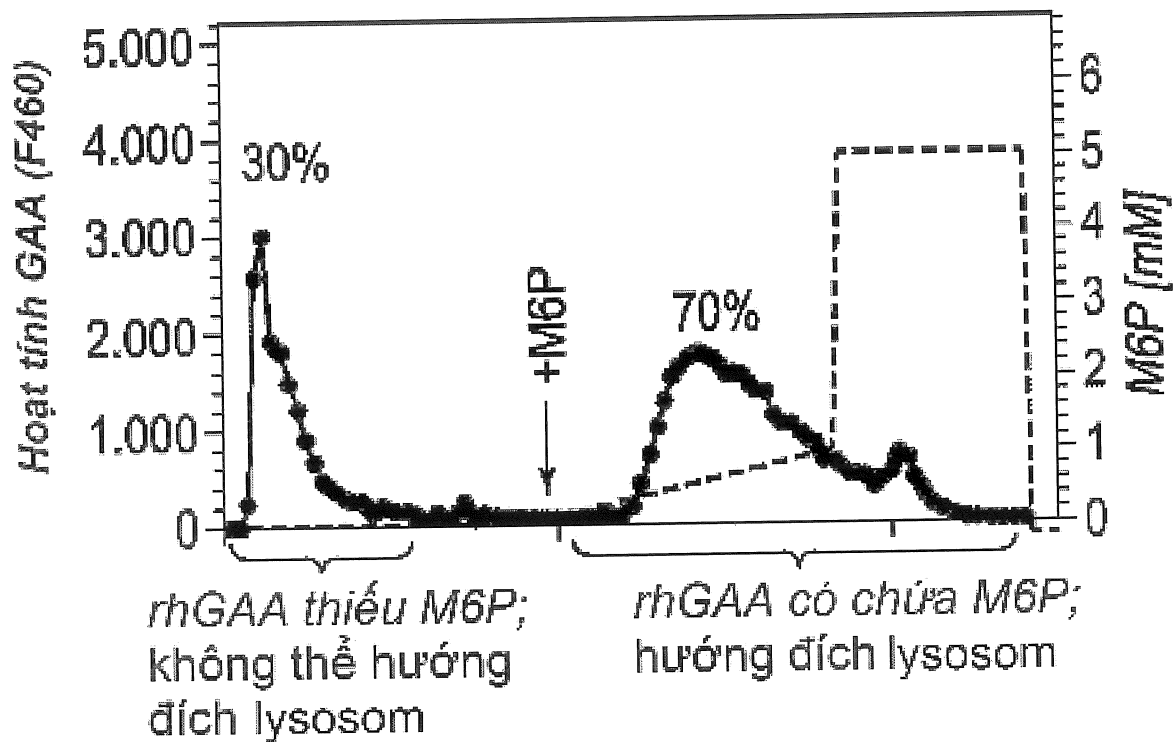
HÌNH 4A



HÌNH 4B

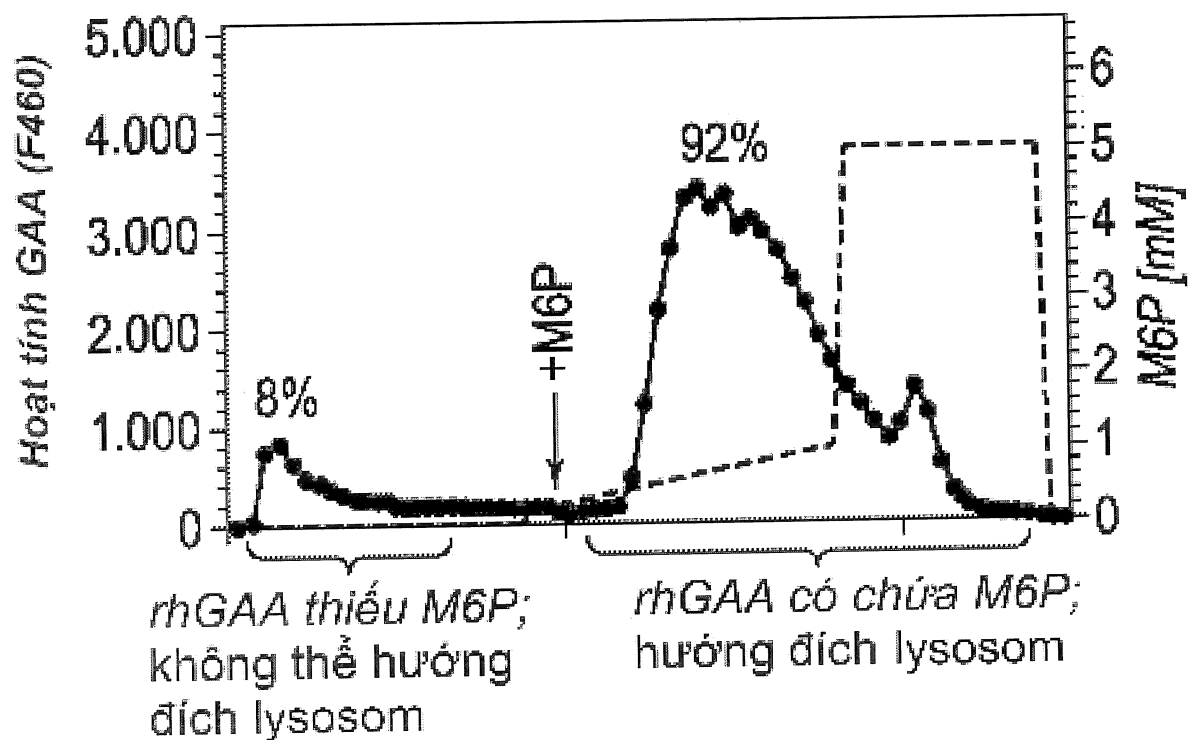
4/51

Phương Án 1



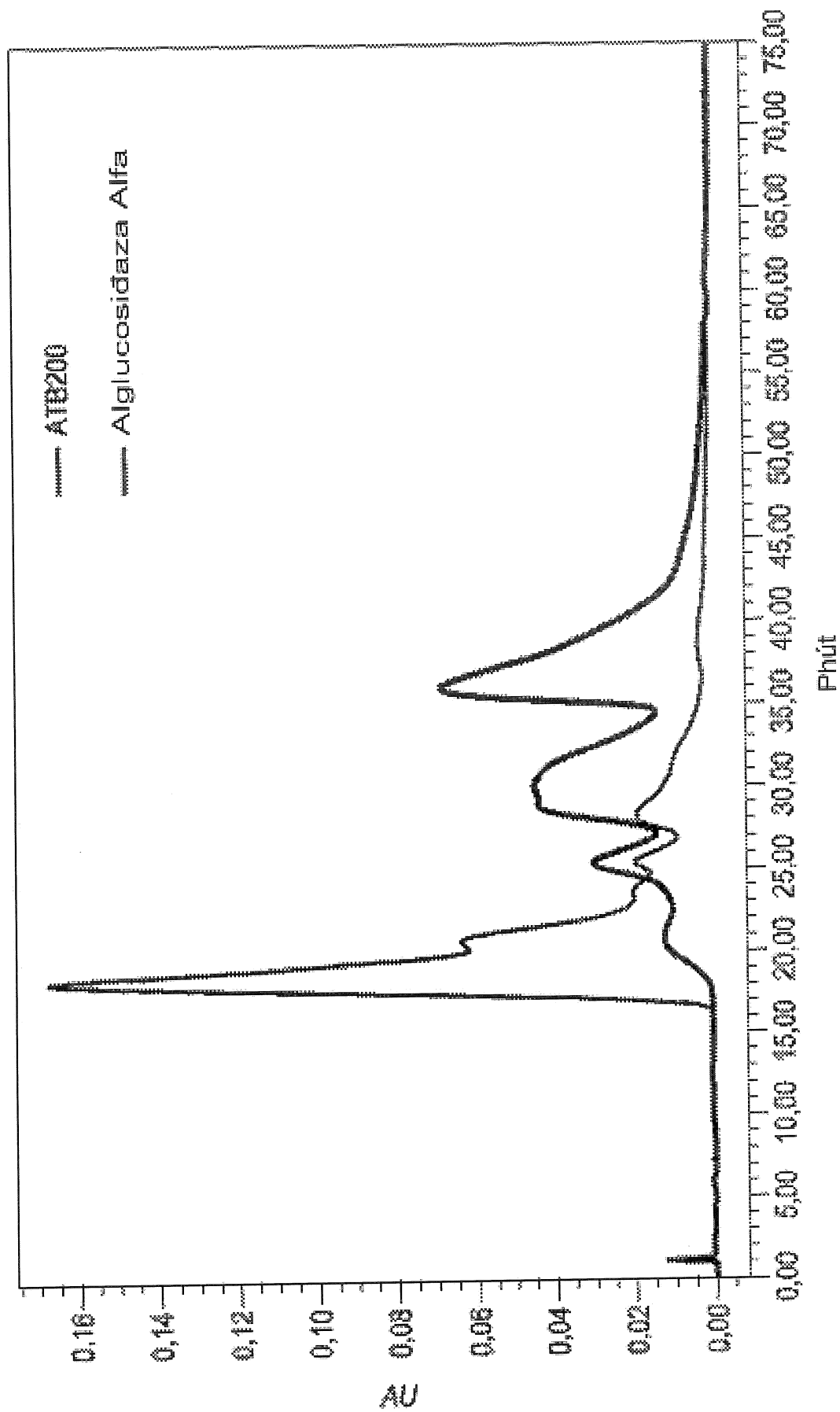
HÌNH 5A

Phương Án 2



HÌNH 5B

5/51



HÌNH 6

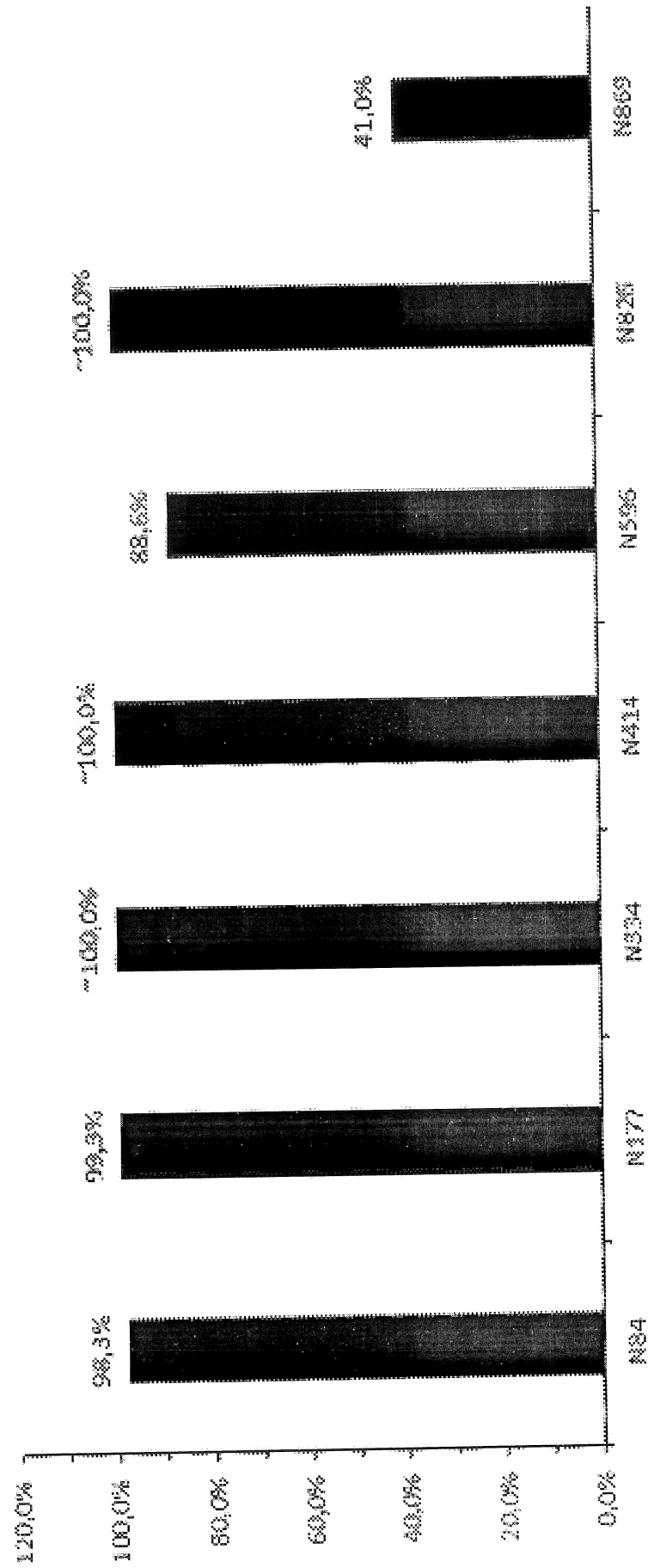
6/21

Sự phân bố của N-glycan trên chế phẩm rhGAA

	Lumizyme	BP-rhGAA*	ATB200	
			1	2
N-Glycan Phức Hợp	70,7%	48,9%	51,0%	47,5%
N-Glycan Kiểu Lai	6,7%	9,7%	4,4%	3,7%
N-Glycan Kiểu Manosa Cao				
Không được Phosphoryl hóa	15,8%	23,7%	14,0%	9,9%
Mono-M6P	5,2%	10,4%	13,4%	14,2%
Bis-M6P	1,6%	6,8%	17,2%	24,7%

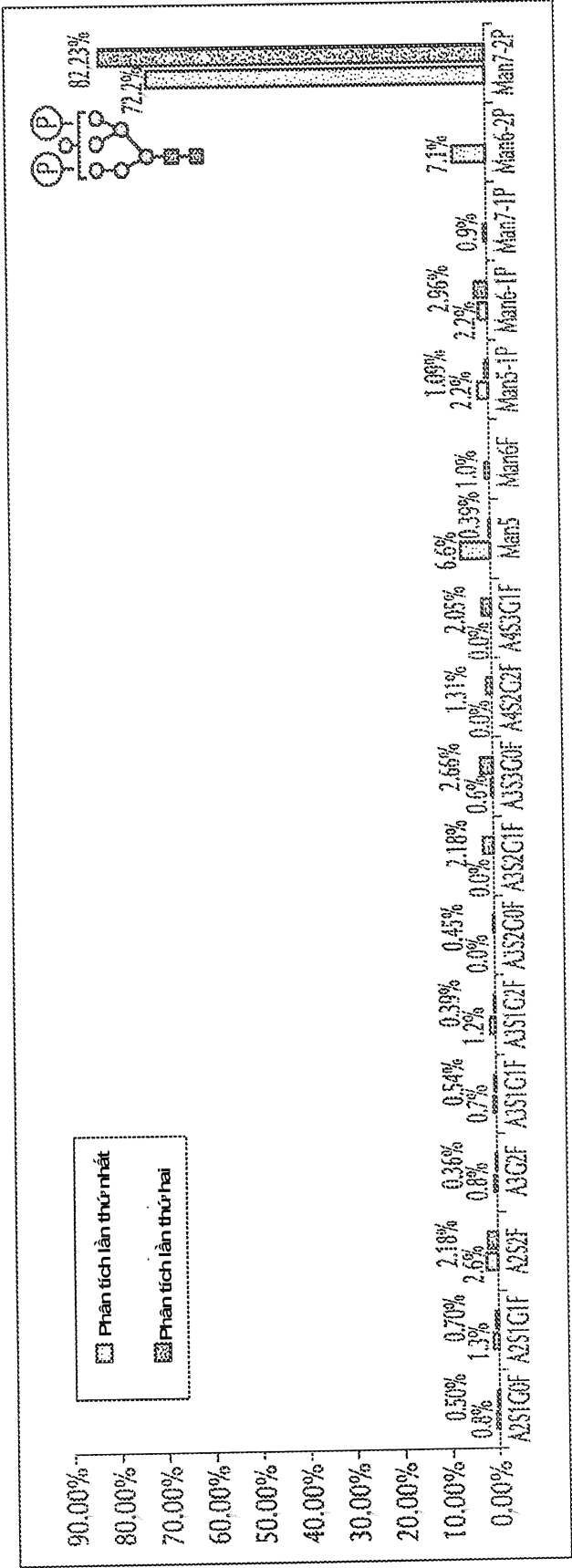
HÌNH 7

Độ Chiếm Giữ Vị Trí N-Glycosyl Hóa của ATB200



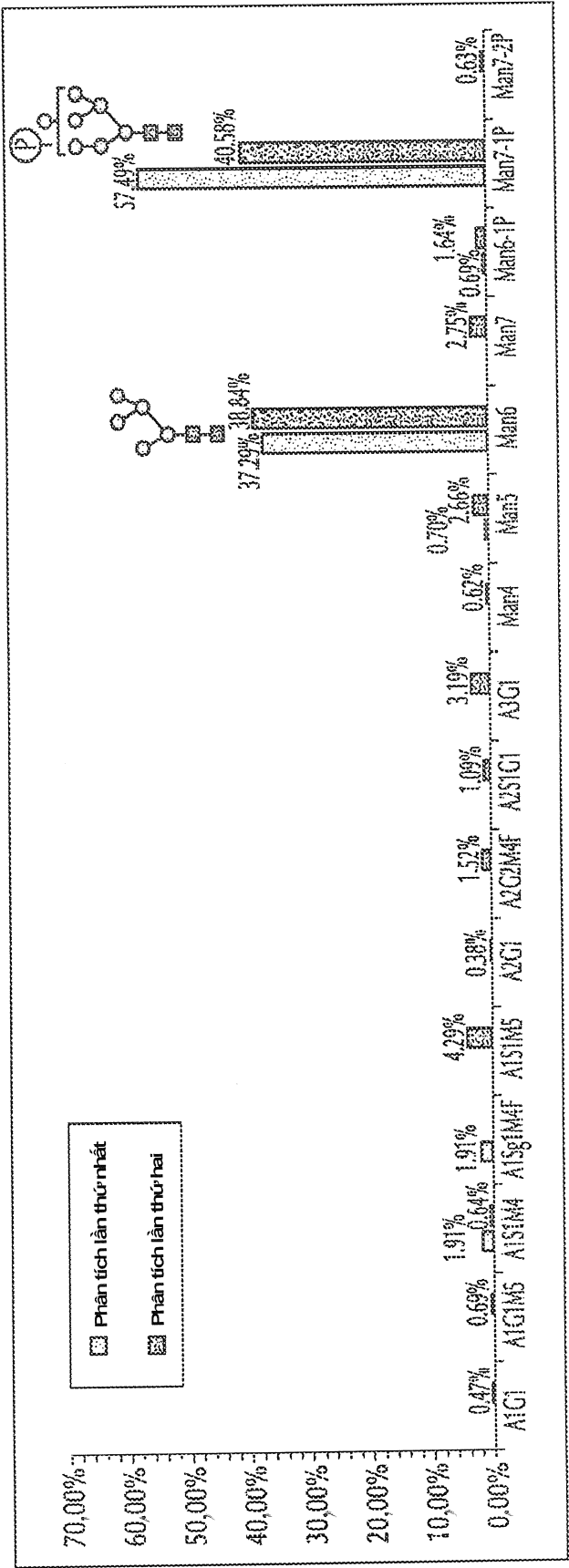
HÌNH 8A

Biên dạng N-Glycosyl hóa của N84



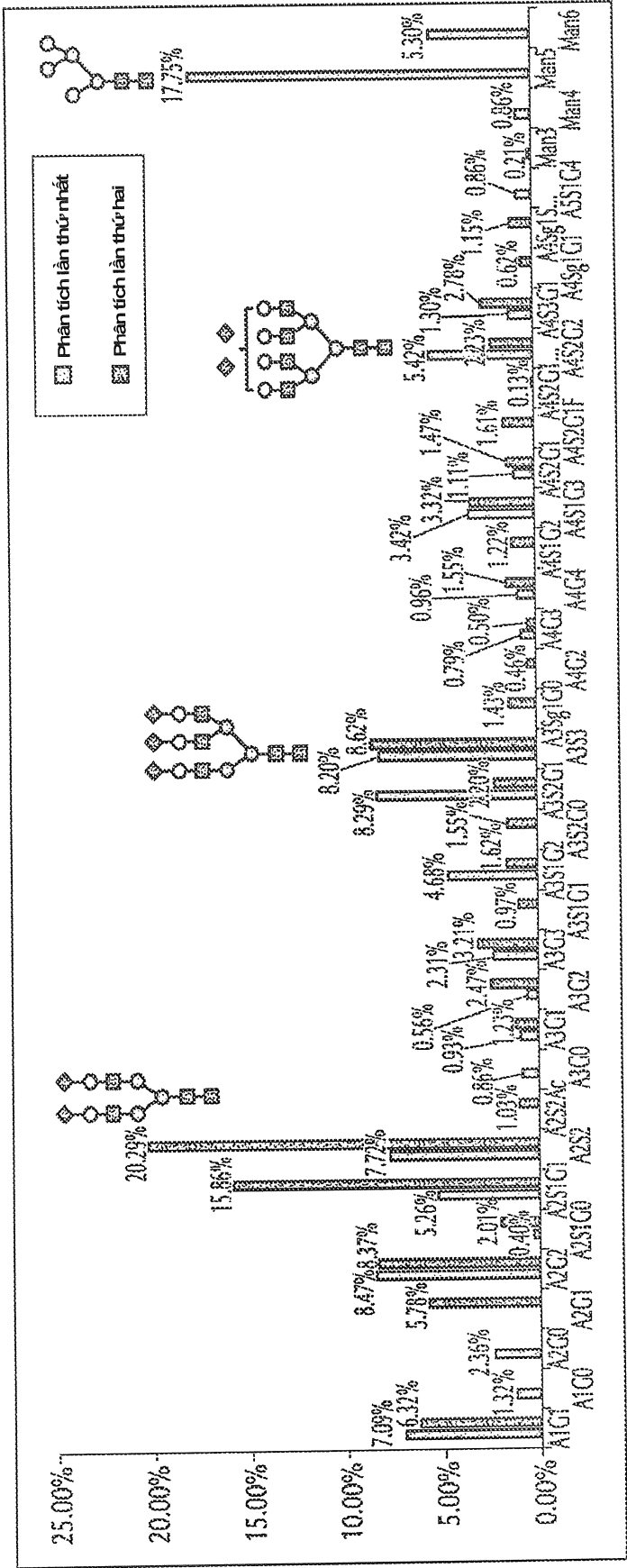
HÌNH 8B

Biên dạng N-Glycosyl hóa của N177

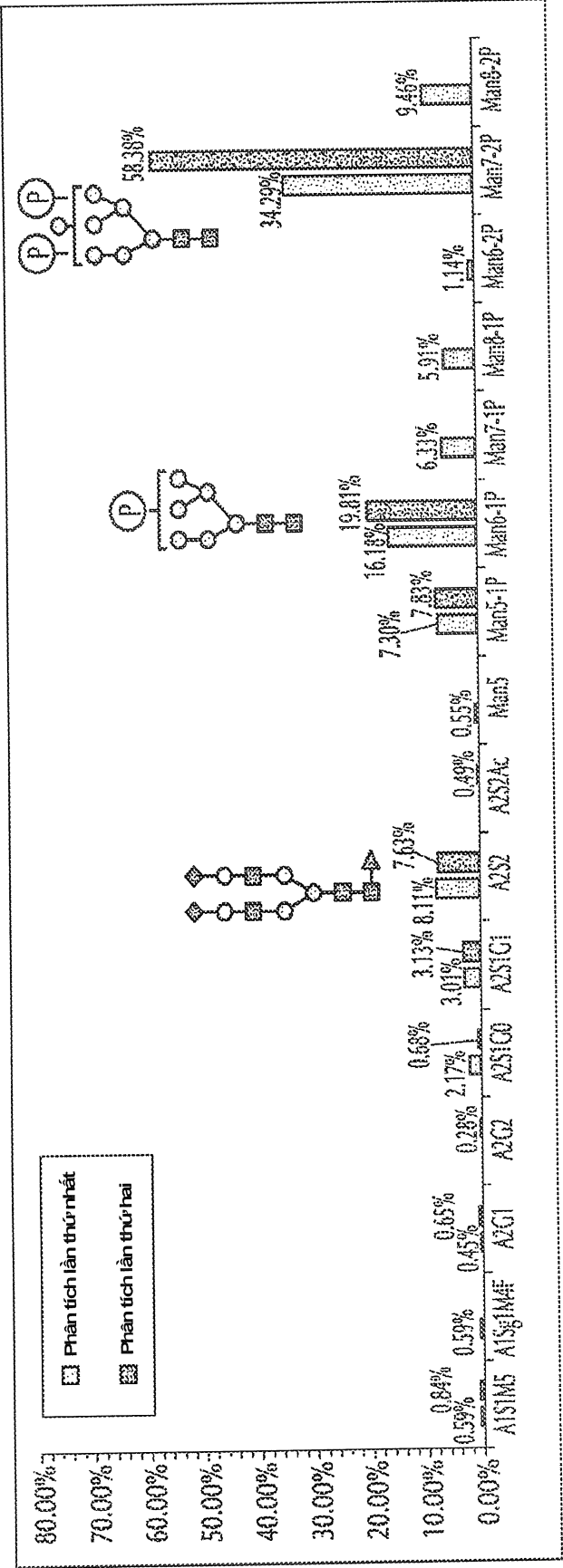


HÌNH 8C

Biên dạng N-Glycosyl hóa của N334

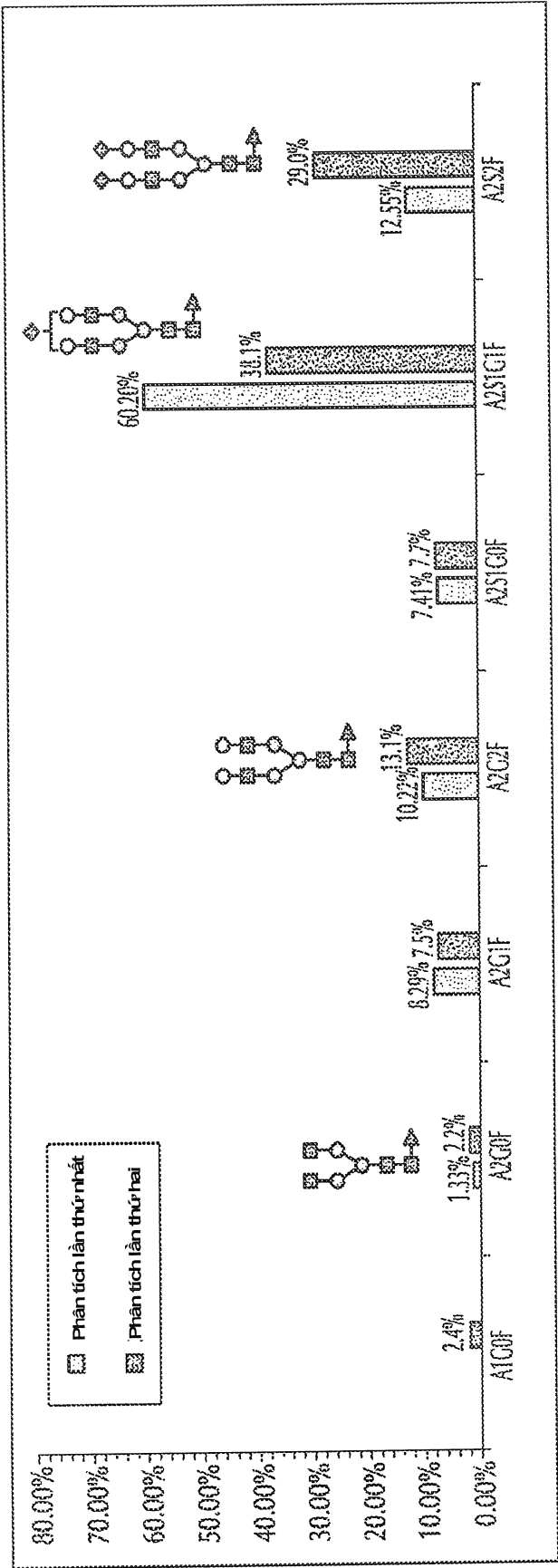


Biên dạng N-Glycosyl hóa của N414



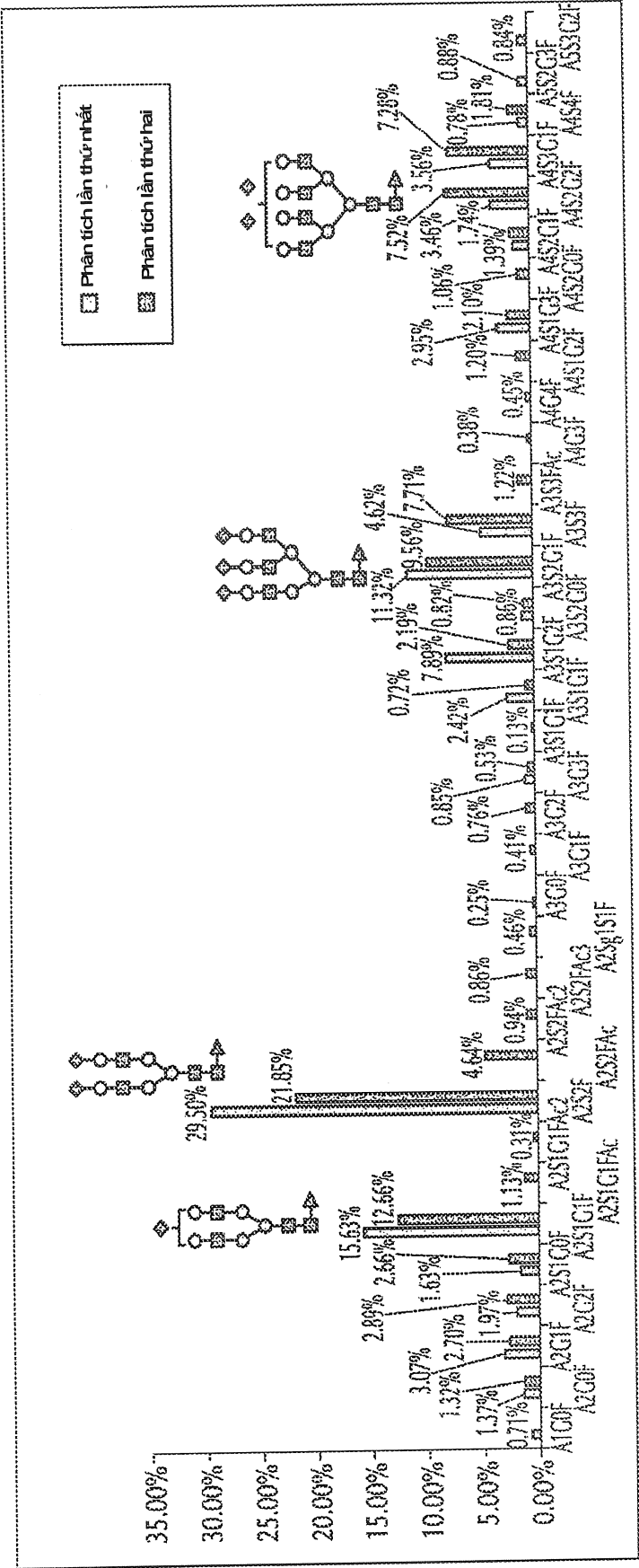
HÌNH 8E

Biên dạng N-Glycosyl hóa của N596



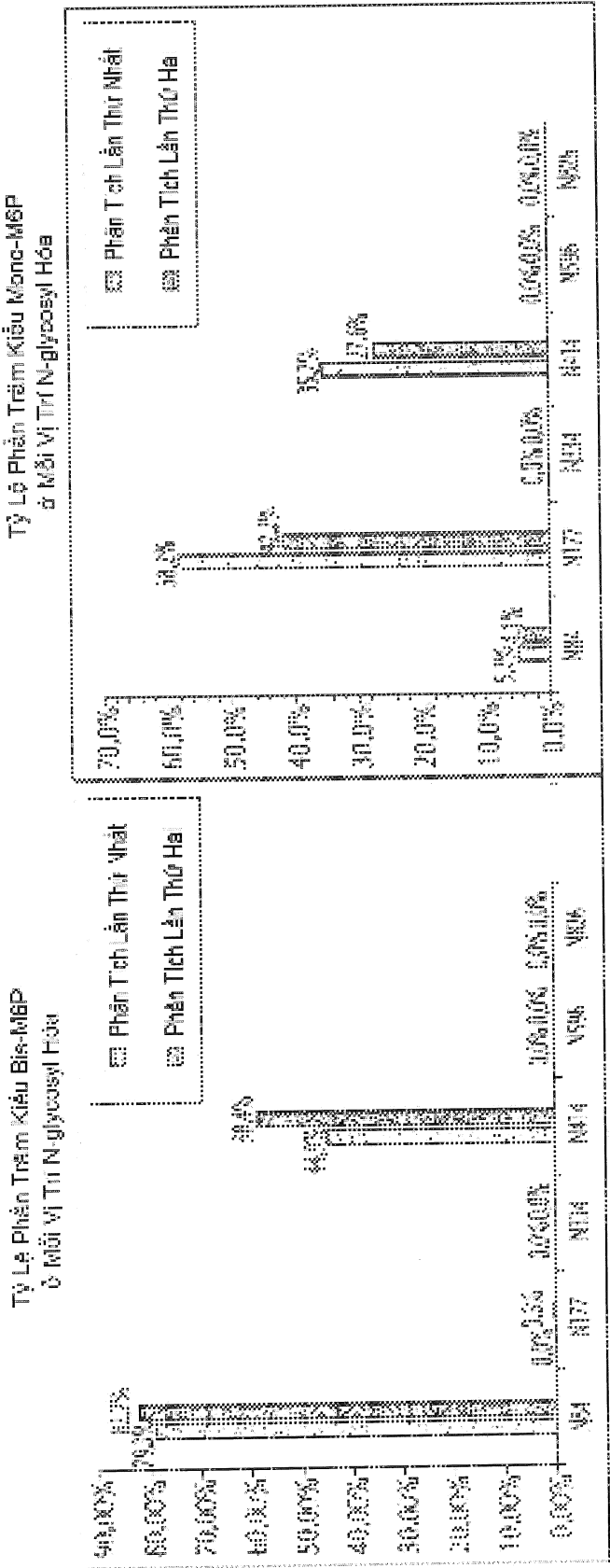
HÌNH 8F

Biên dạng N-Glycosyl hóa của N826



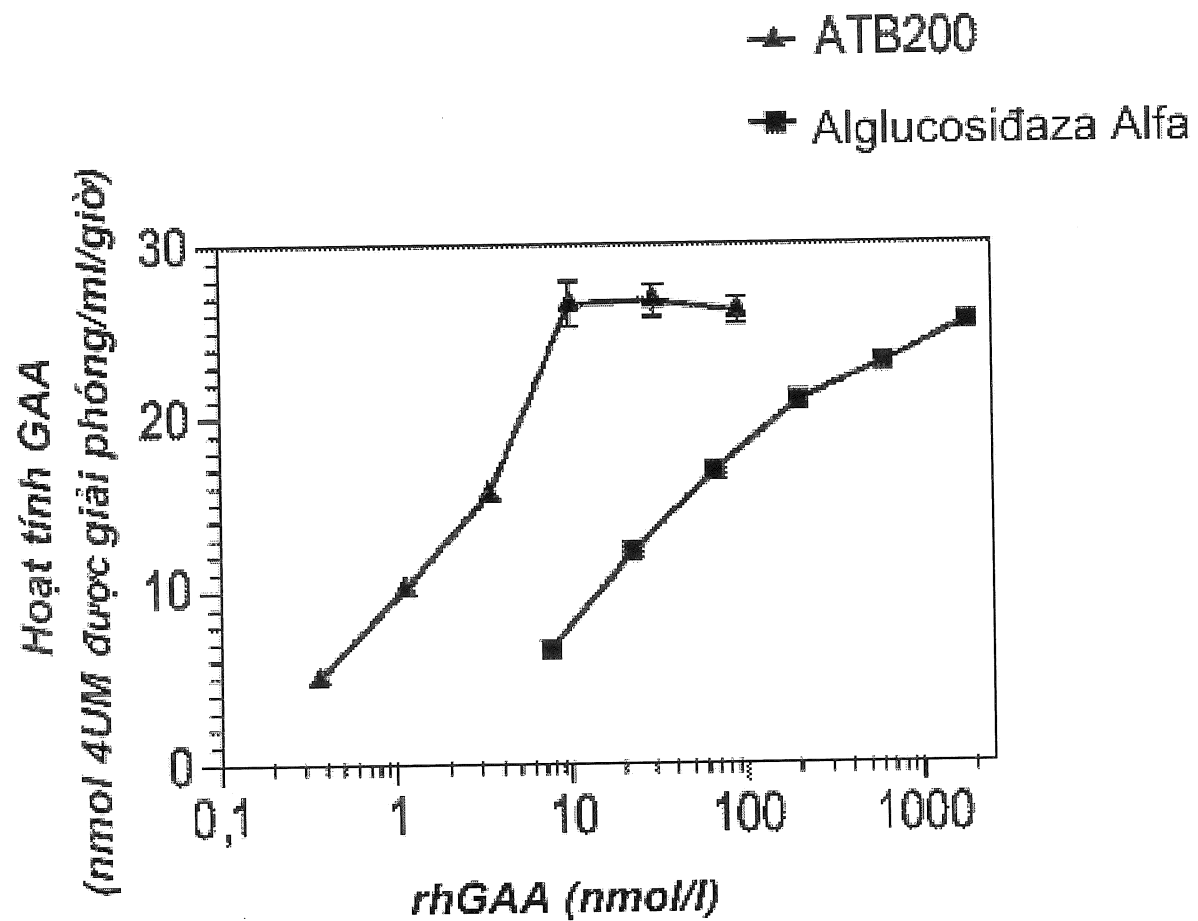
HÌNH 8G

Tỷ Lệ Phần Trăm Bis-M6P và Mono-M6P Tương Ứng ở Mỗi Vị Trí N-glycosyl Hóa



HÌNH 8H

13/51

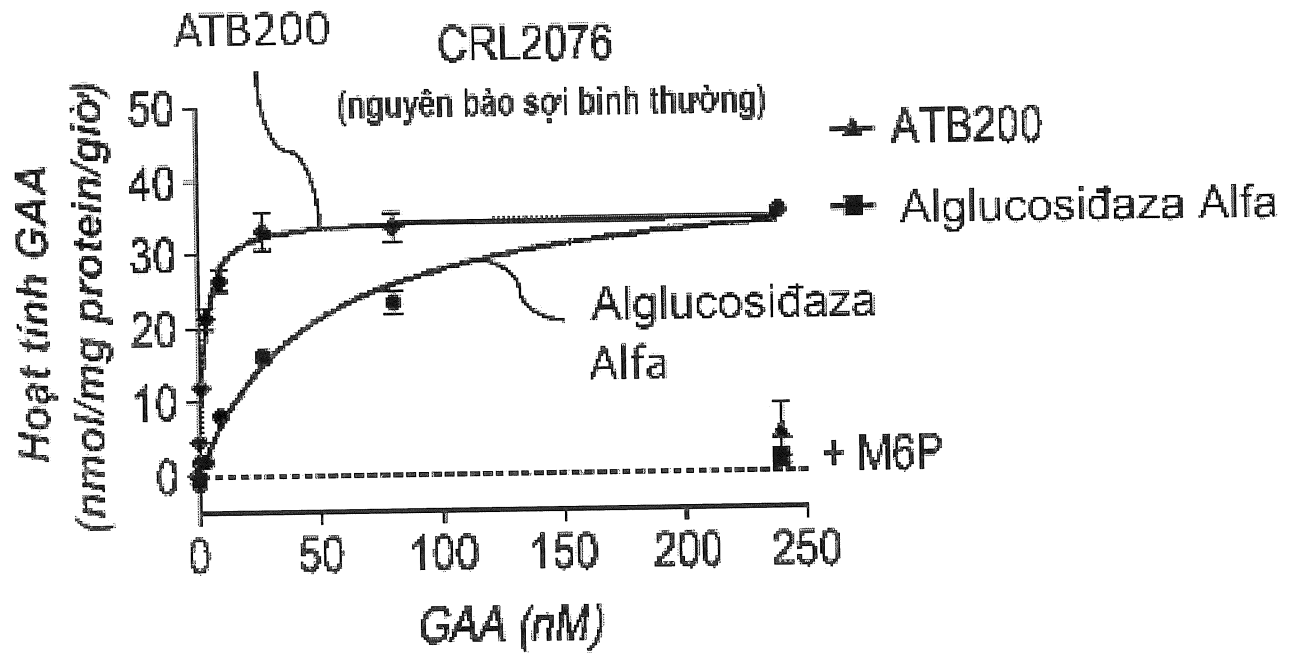


HÌNH 9A

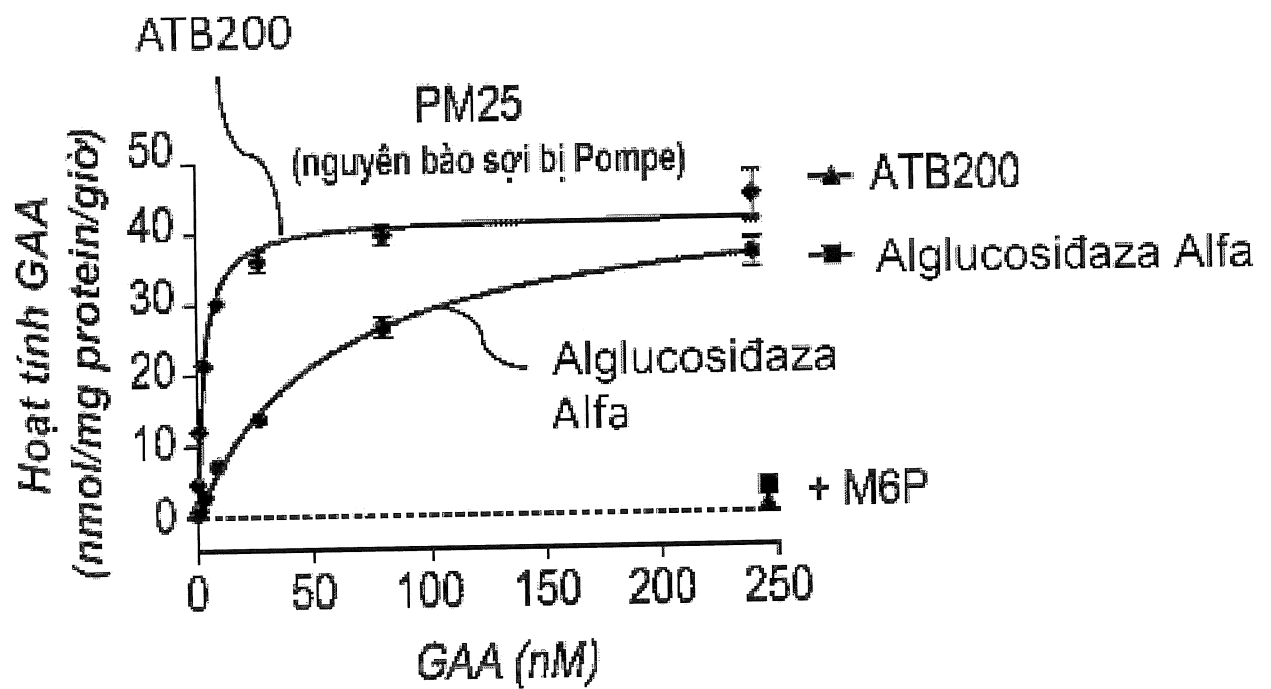
Glycan	Alglucosidaza Alfa (mol bis-glycan/ mol protein)	ATB200 (mol bis-glycan/ mol protein)
Bis-M6P	0,1	1,3

HÌNH 9B

16/51



HÌNH 10A

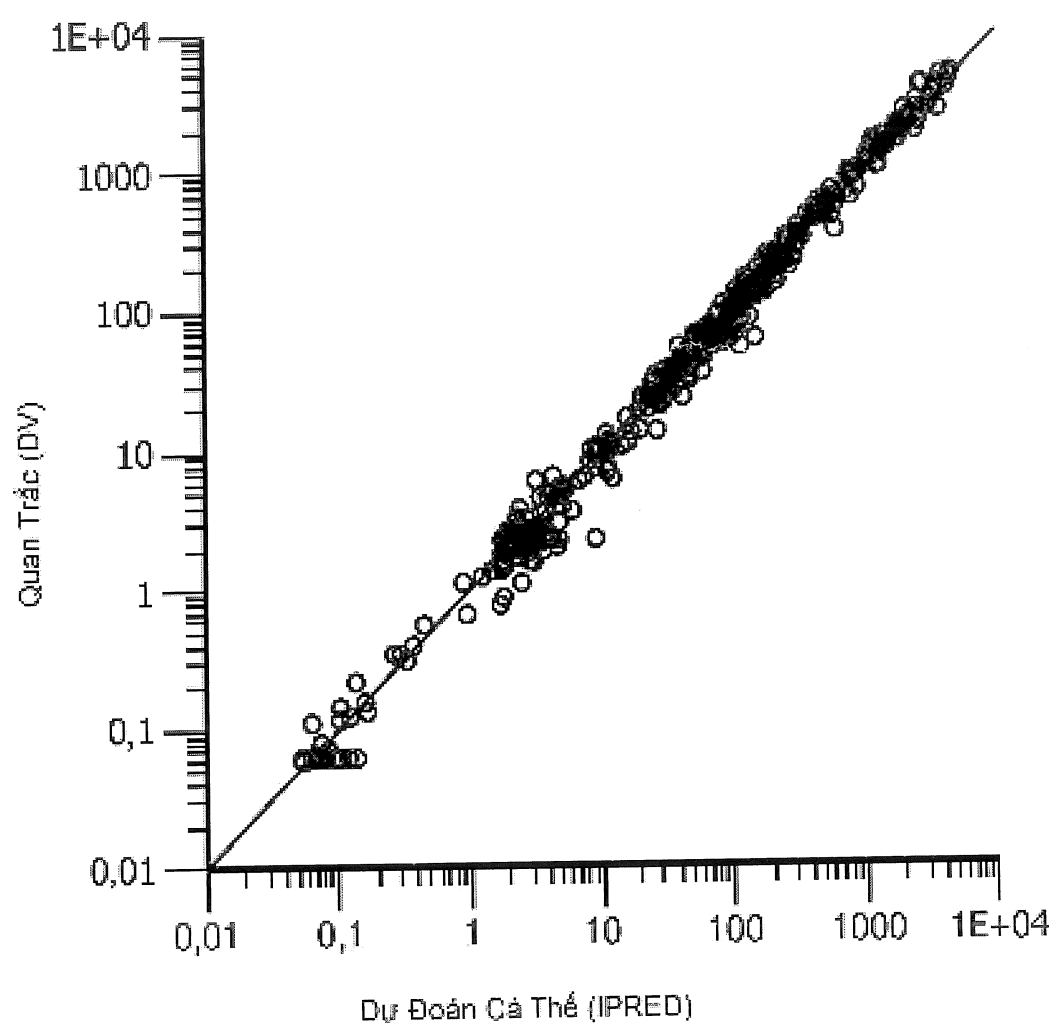


HÌNH 10B

17/51

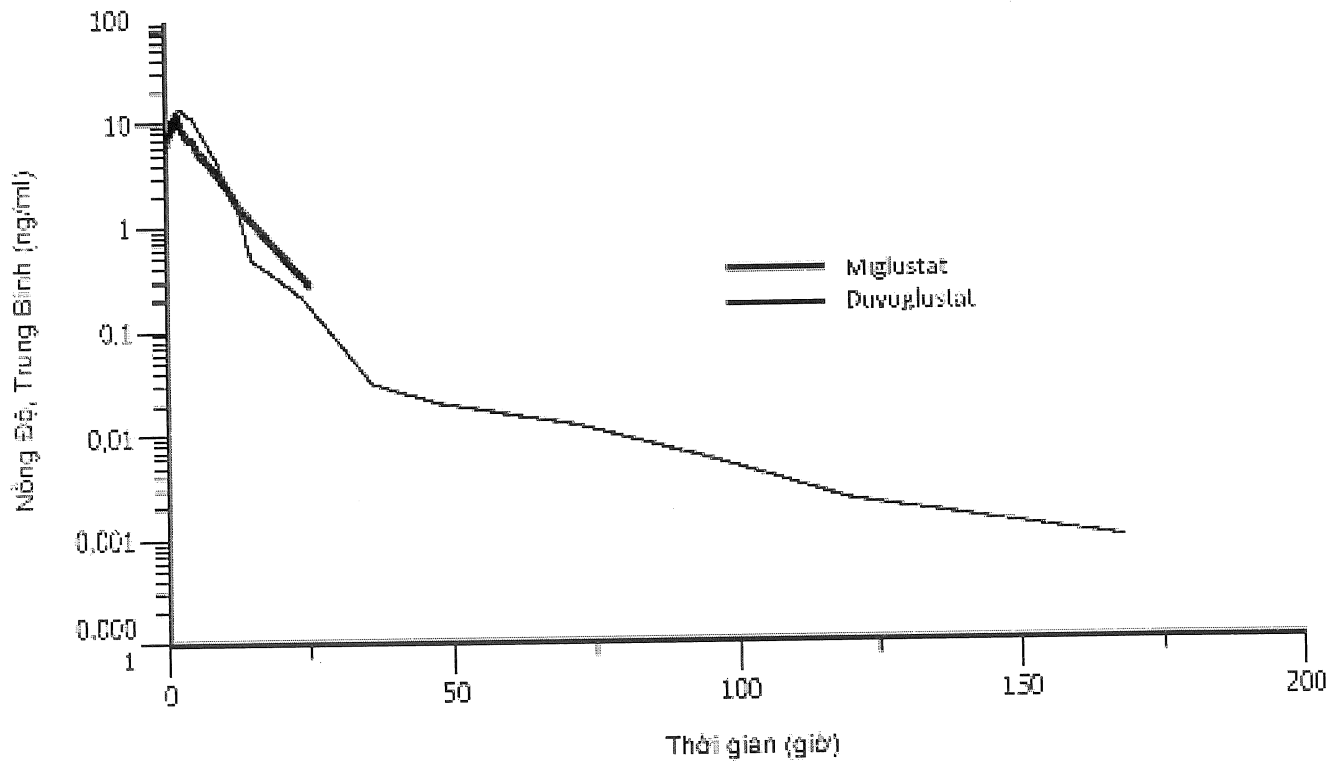
Dòng Tế Bào	$K_{hấp thu}$ (nM)	
	AT200	Lumizyme
bình thường	2	56
bị Pompe	3	57

HÌNH 10C

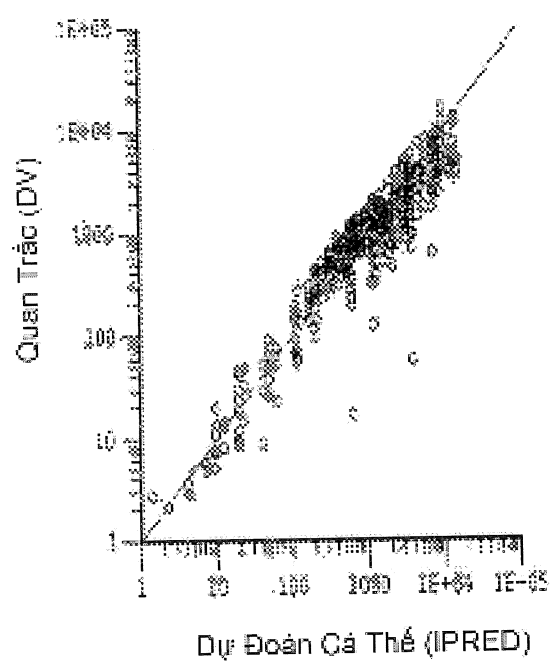


HÌNH 11

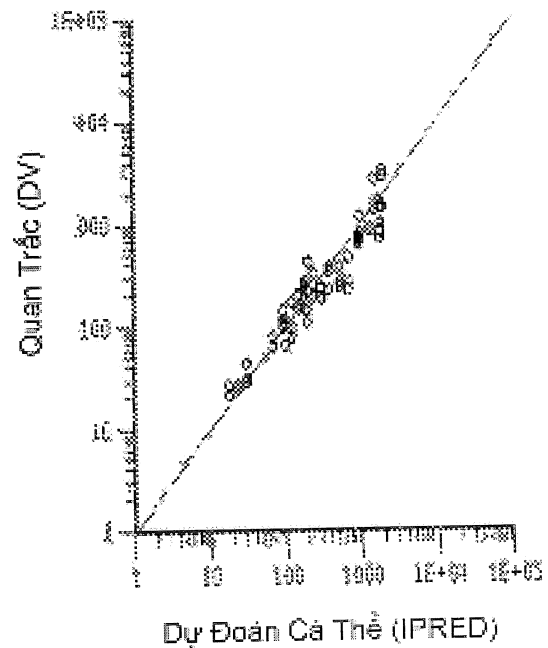
18/51



HÌNH 12



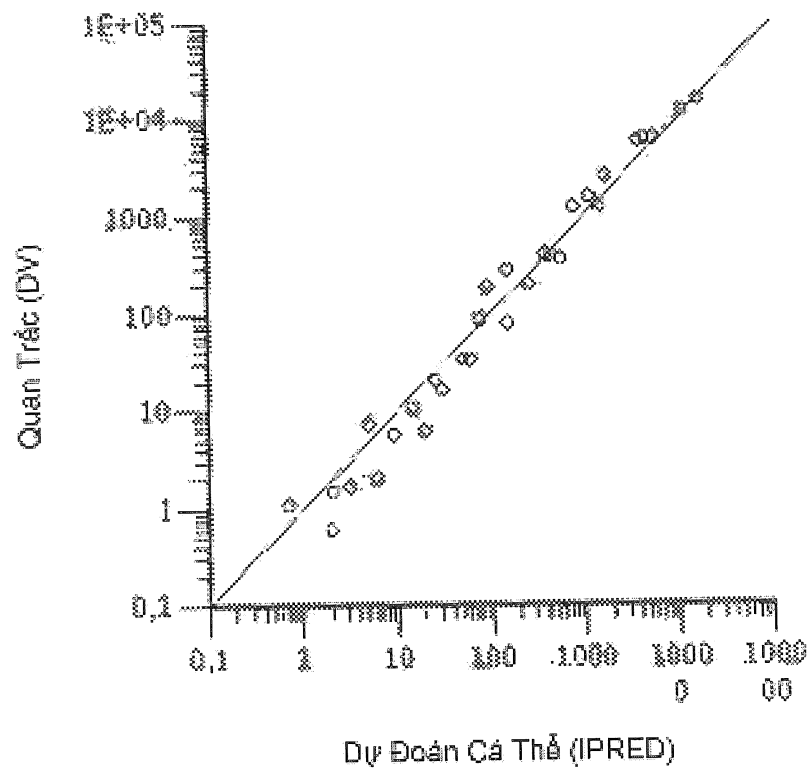
HÌNH 13A



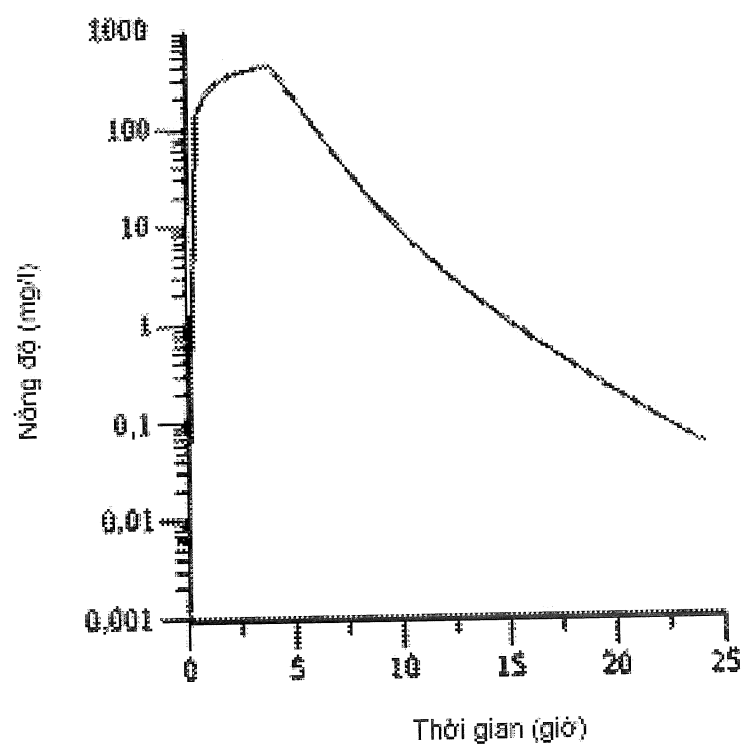
HÌNH 13B

19/51

CObs (ng/ml)

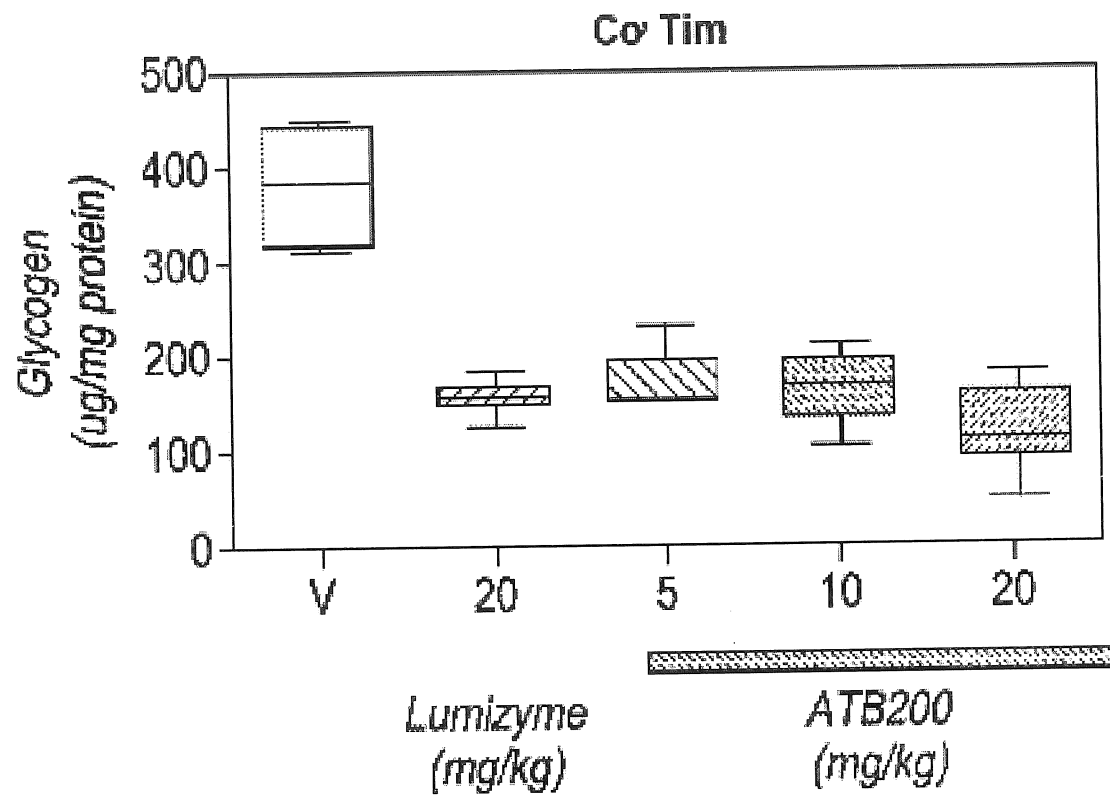


HÌNH 14

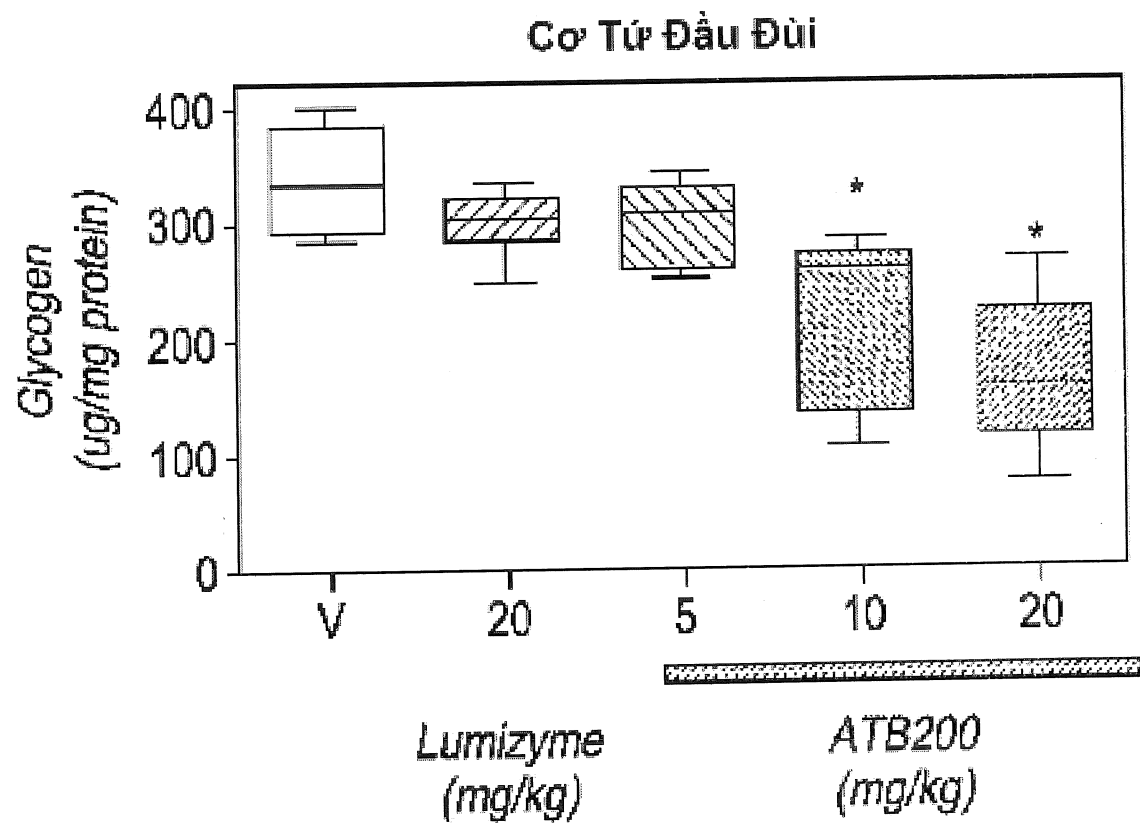


HÌNH 15

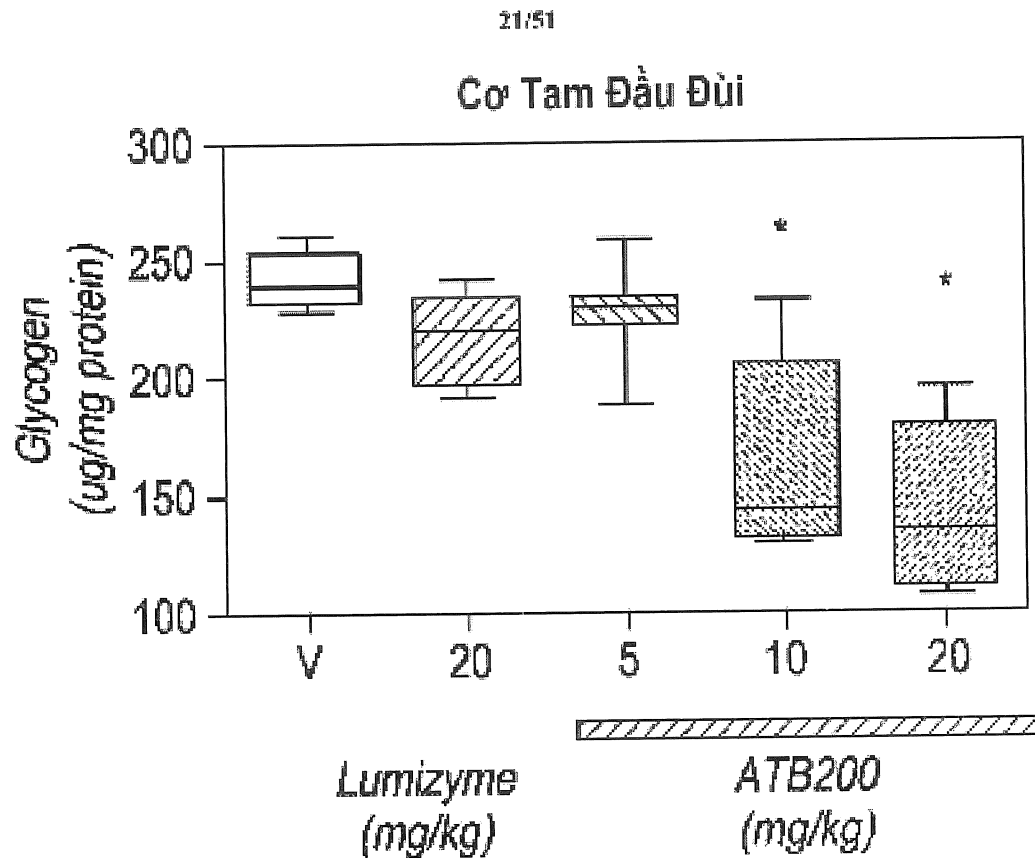
20/51



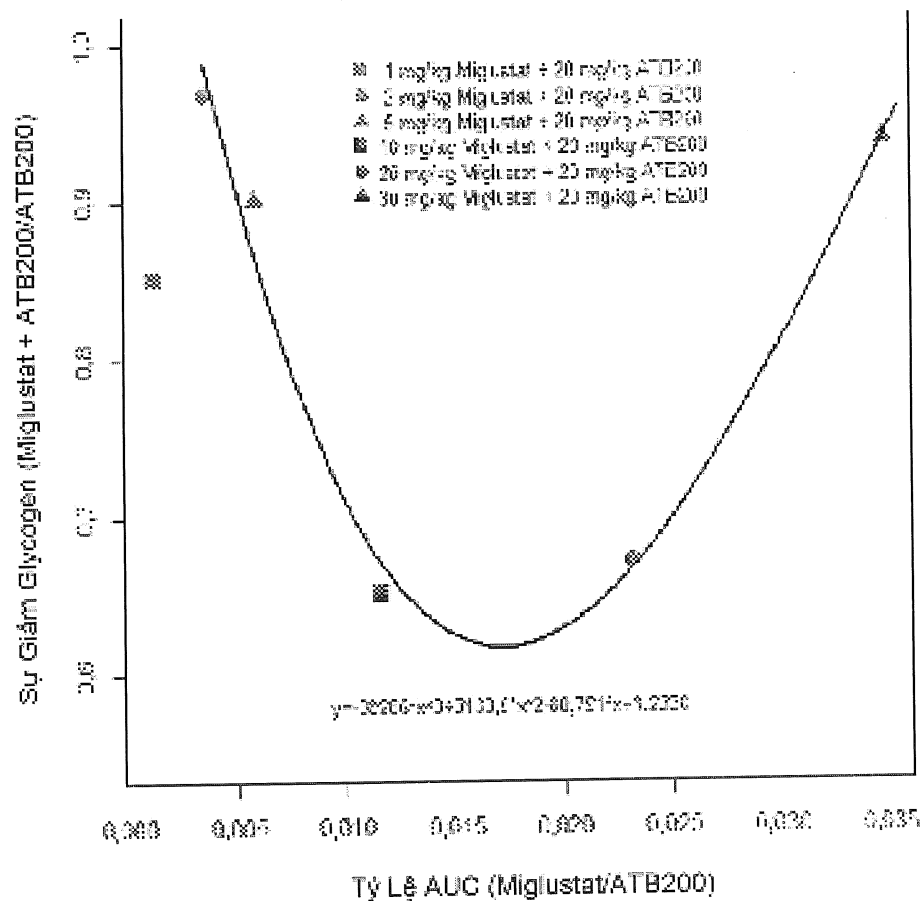
HÌNH 16A



HÌNH 16B

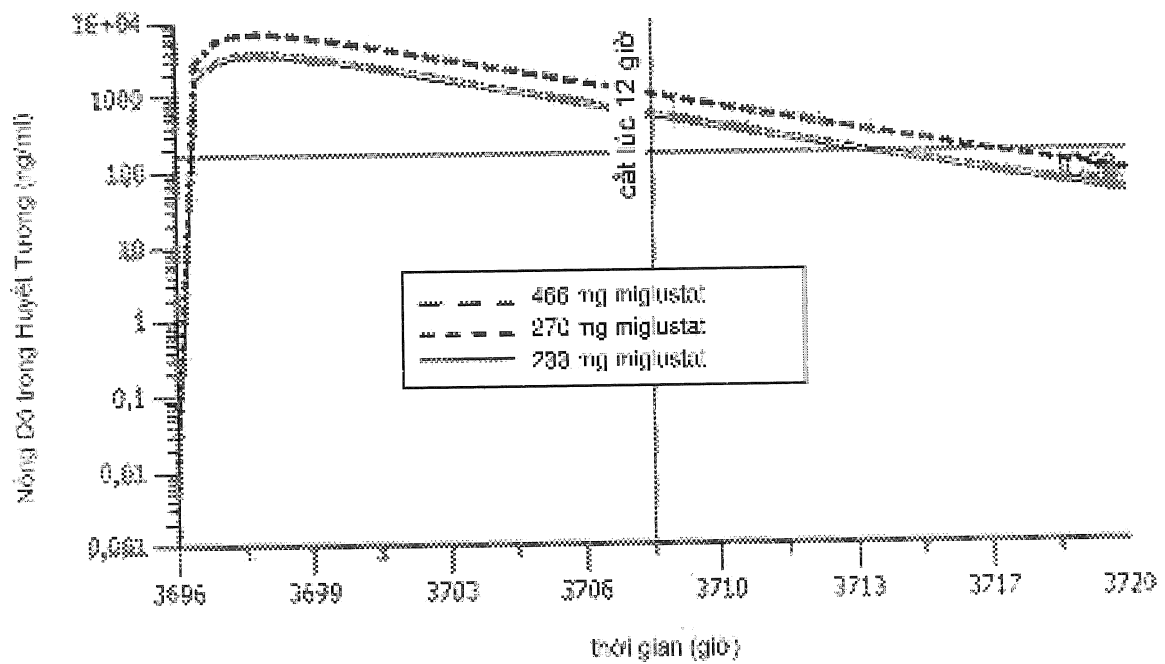


HÌNH 16C

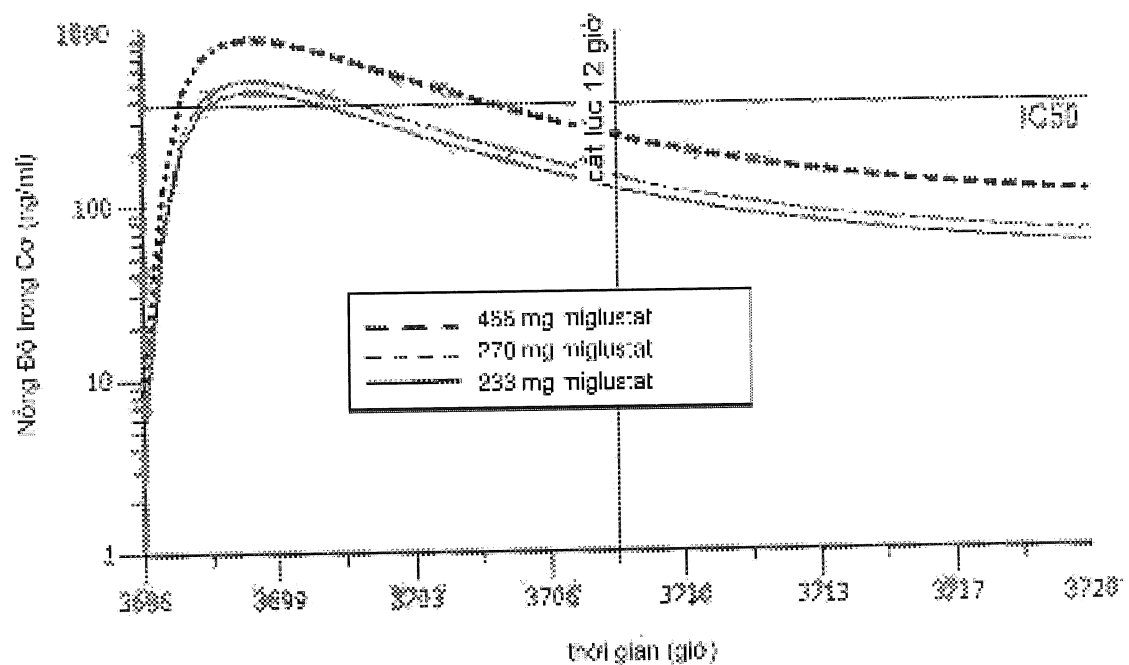


HÌNH 17

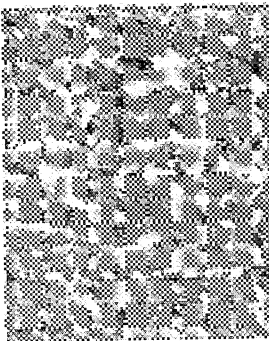
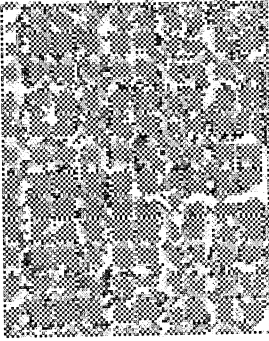
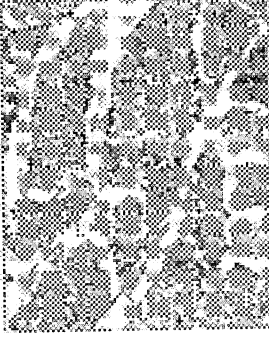
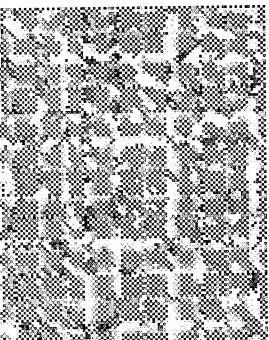
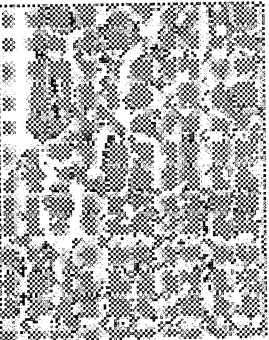
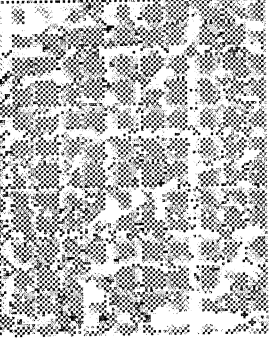
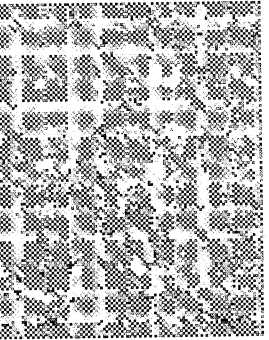
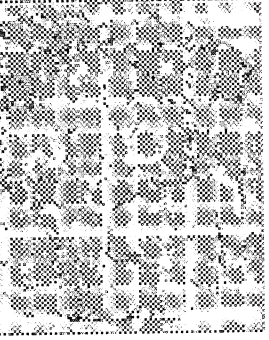
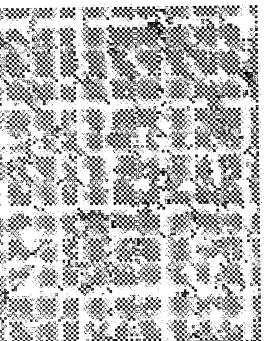
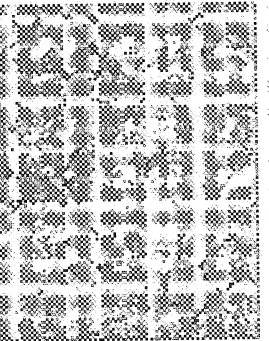
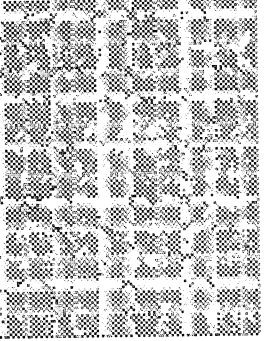
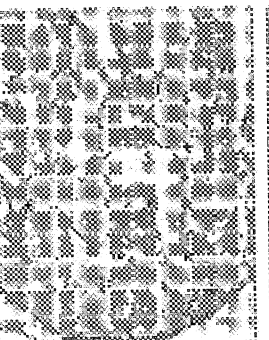
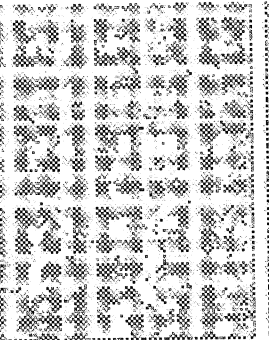
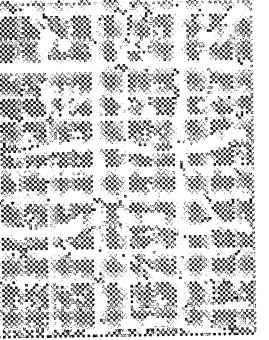
12/51



HÌNH 18

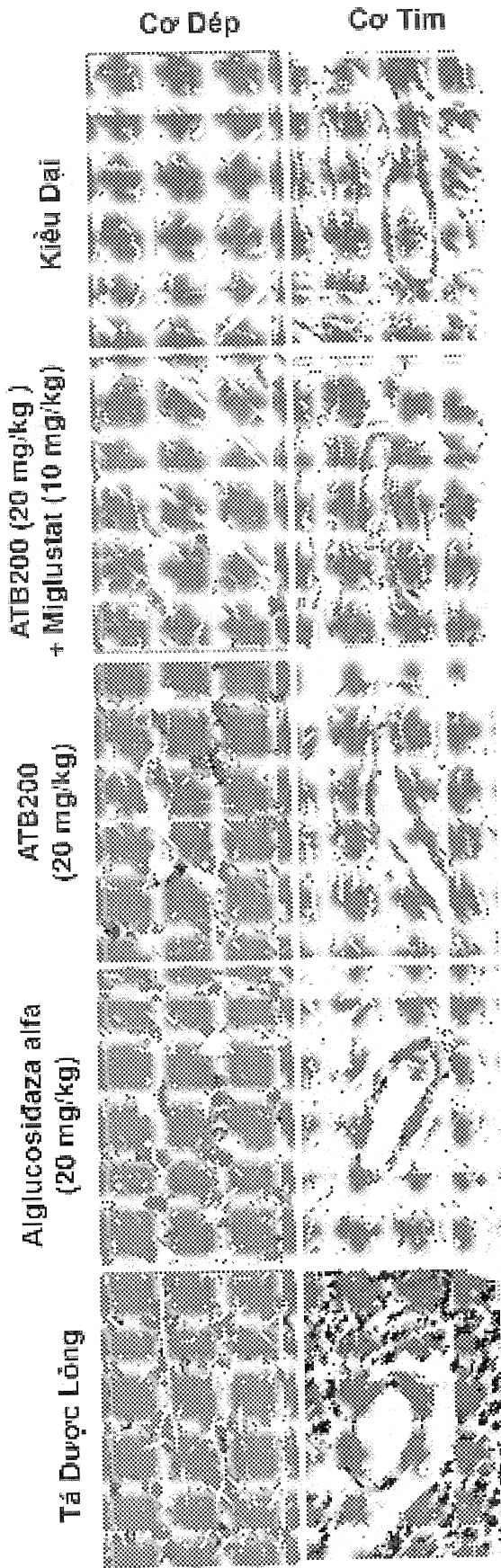


HÌNH 19

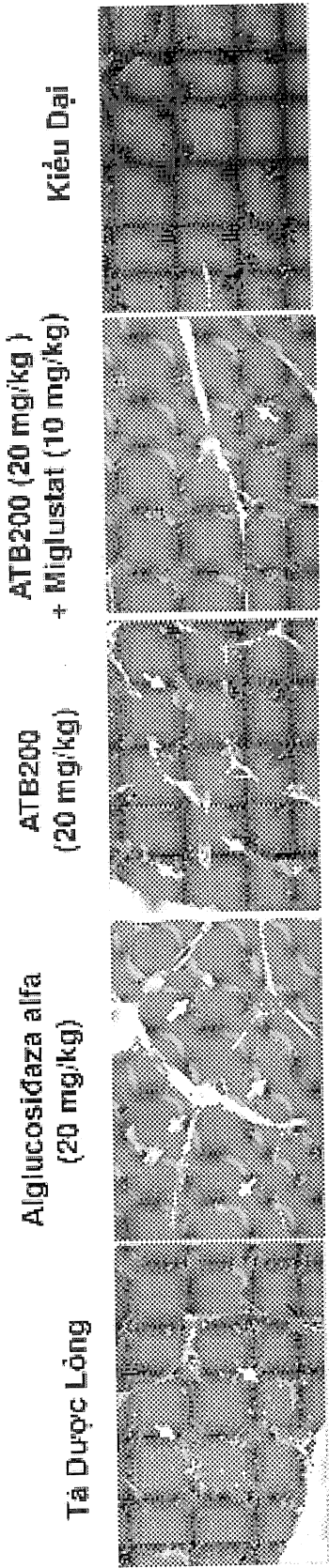
23/51					
Cơ Tim	Tá Dược Lòng	Alglucosidaza alfa (20 mg/kg)	ATB200 (20 mg/kg)	ATB200 (20 mg/kg) + Miglustat (10 mg/kg)	Kiểu Đại
					
					
					

HÌNH 20

24/51

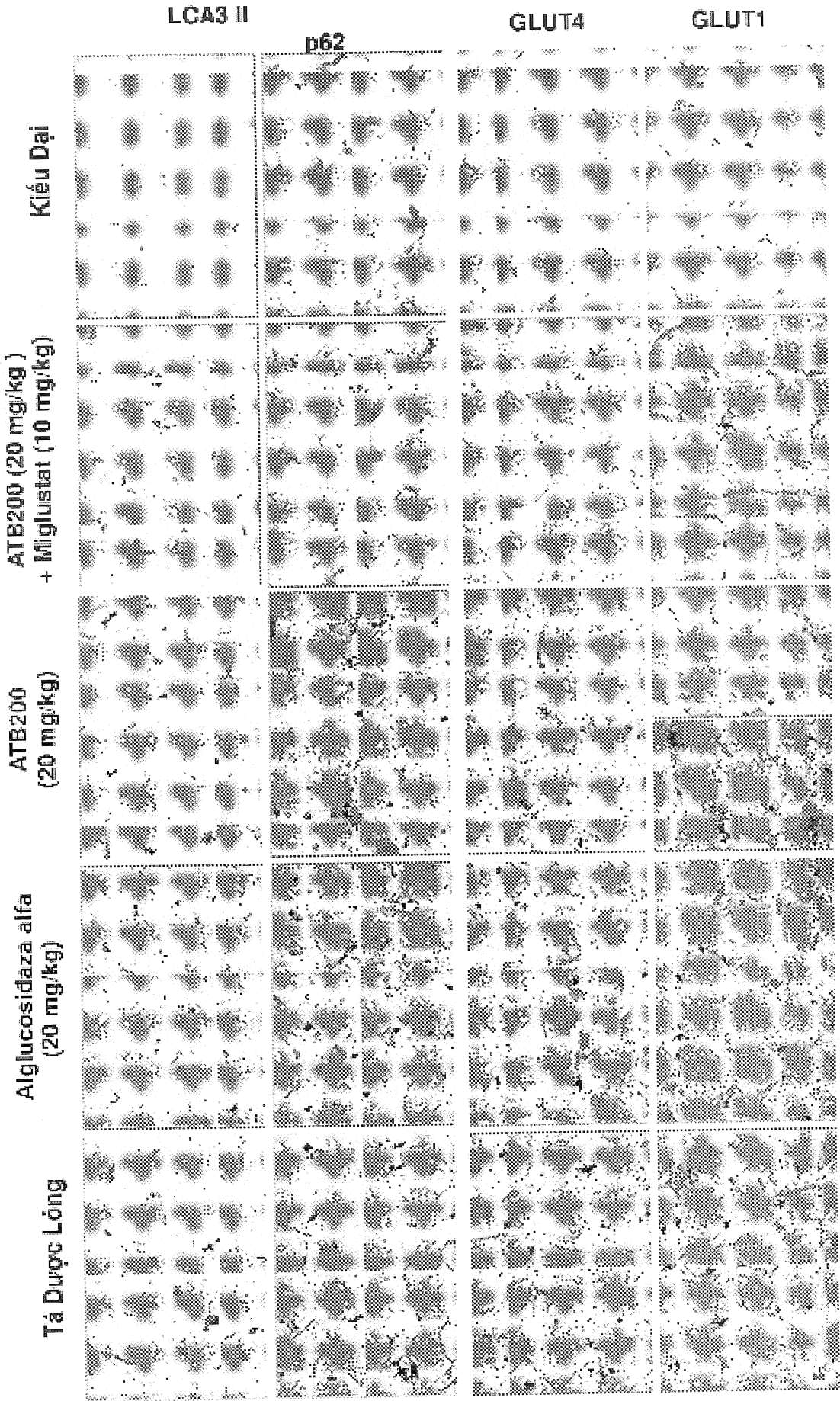


HÌNH 21



HÌNH 22

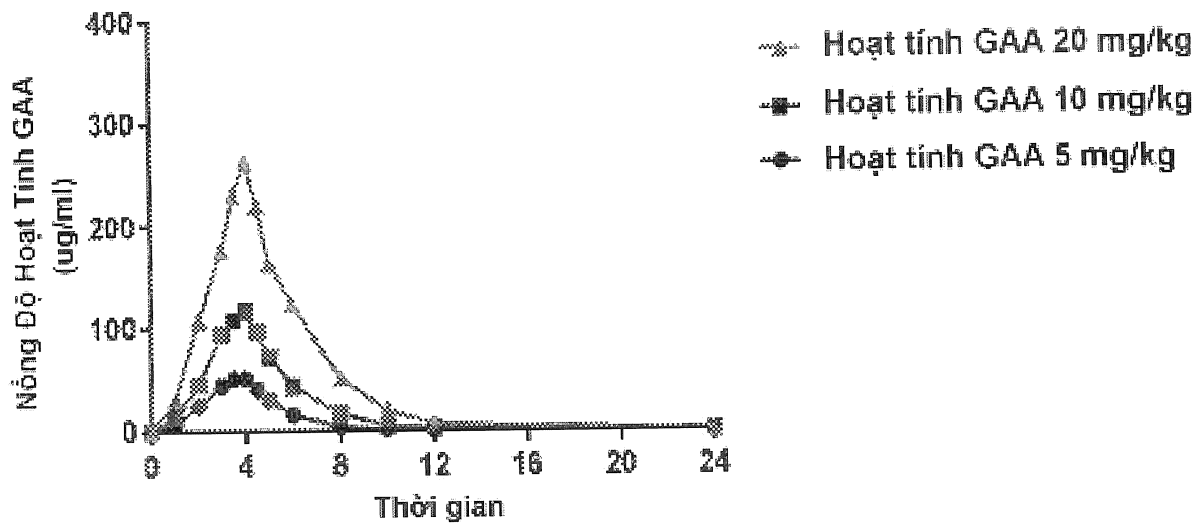
25/51



HÌNH 23

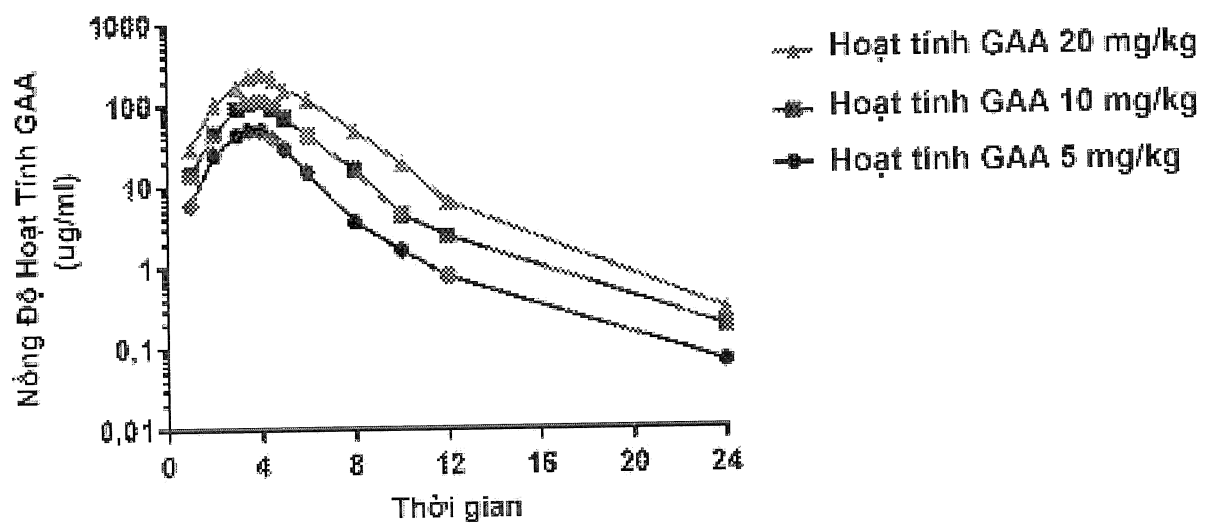
26/51

**Hoạt Tính GAA Trung Bình
Giai Đoạn 1 (N=4)**



HÌNH 24A

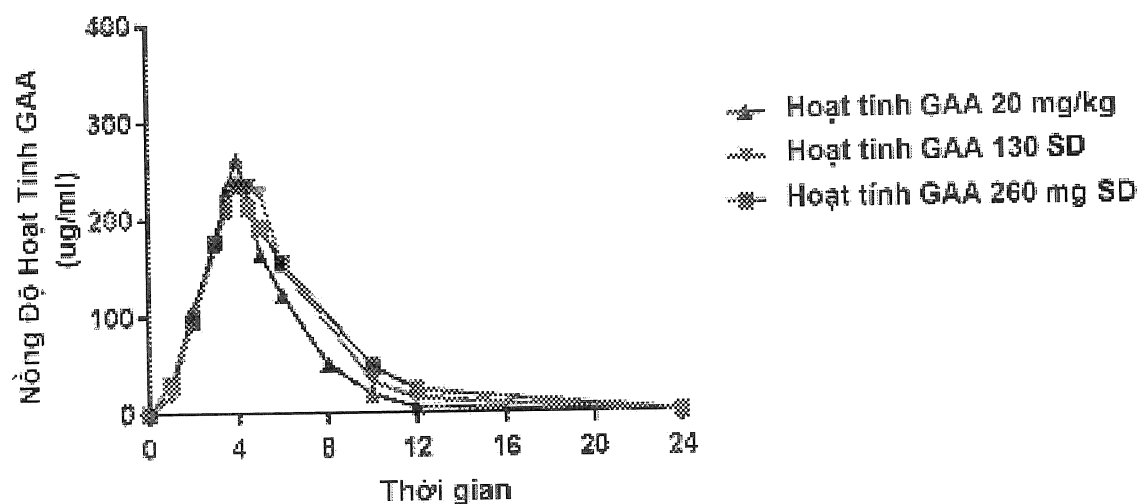
**Hoạt Tính GAA Trung Bình
Giai Đoạn 1 (N=4)**



HÌNH 24B

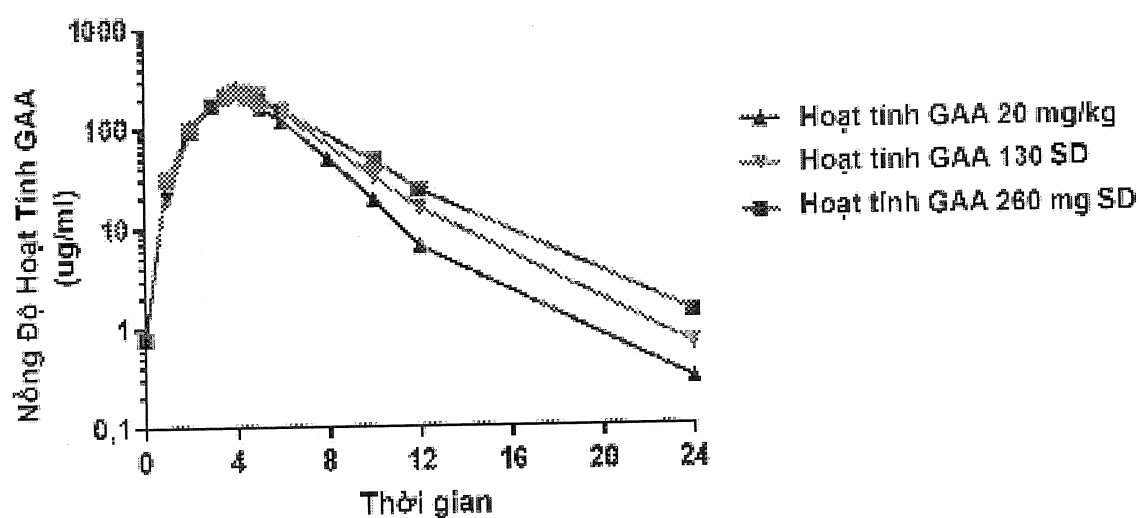
27/51

Hoạt Tính GAA (SD) Trung Bình đối với 20 mg/kg Một Mình
so với 20 mg/kg +130 mg hoặc 260 mg Miglustat



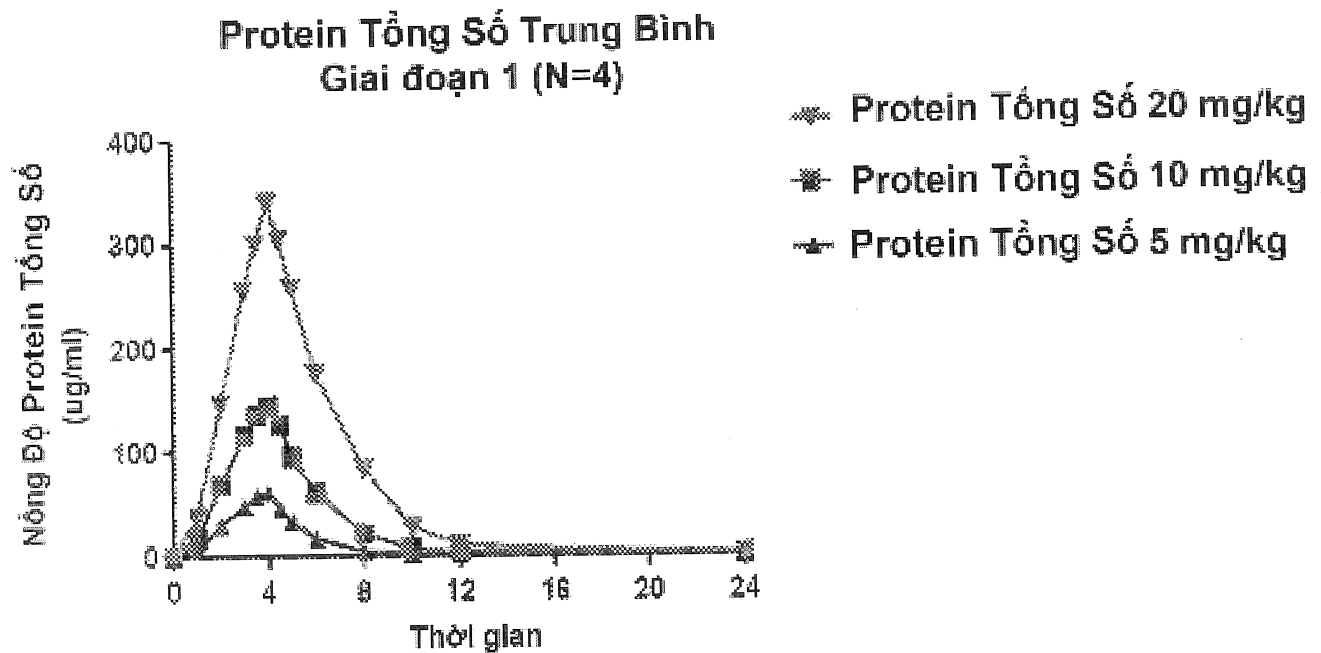
HÌNH 24C

Hoạt Tính GAA (SD) Trung Bình đối với 20 mg/kg Một Mình
so với 20 mg/kg +130 mg hoặc 260 mg Miglustat

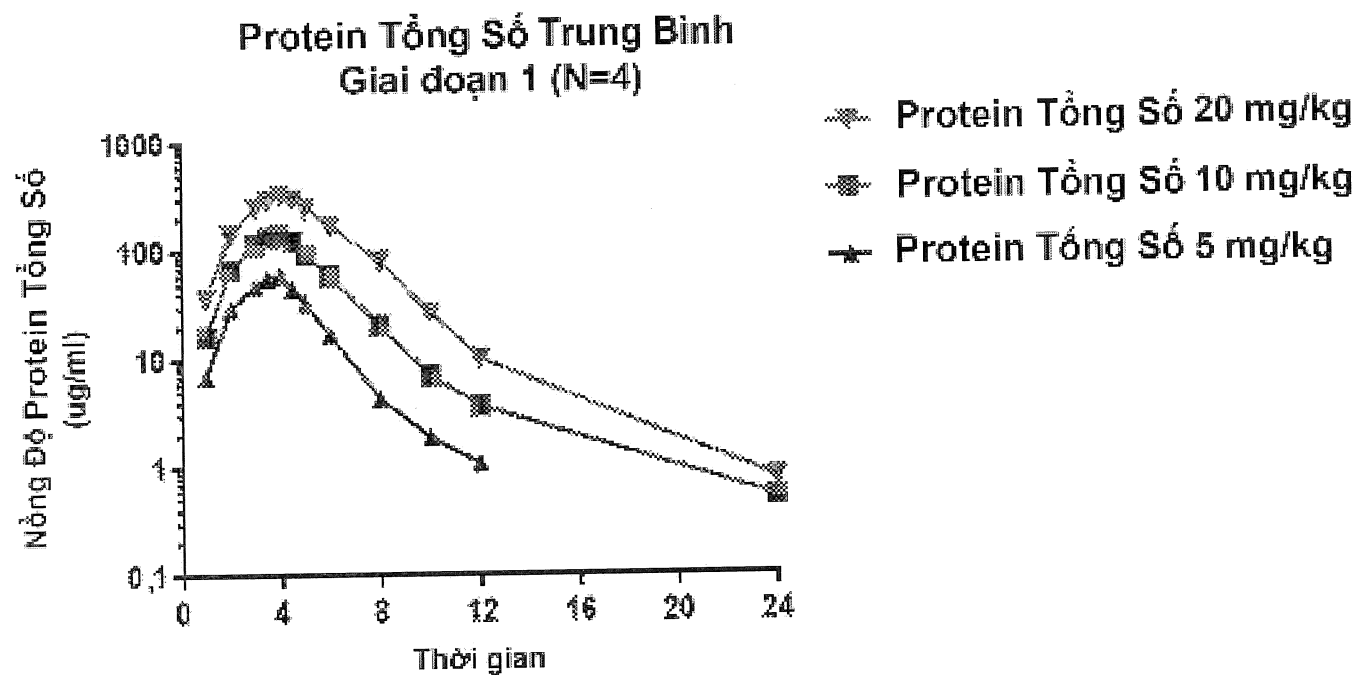


HÌNH 24D

28/51



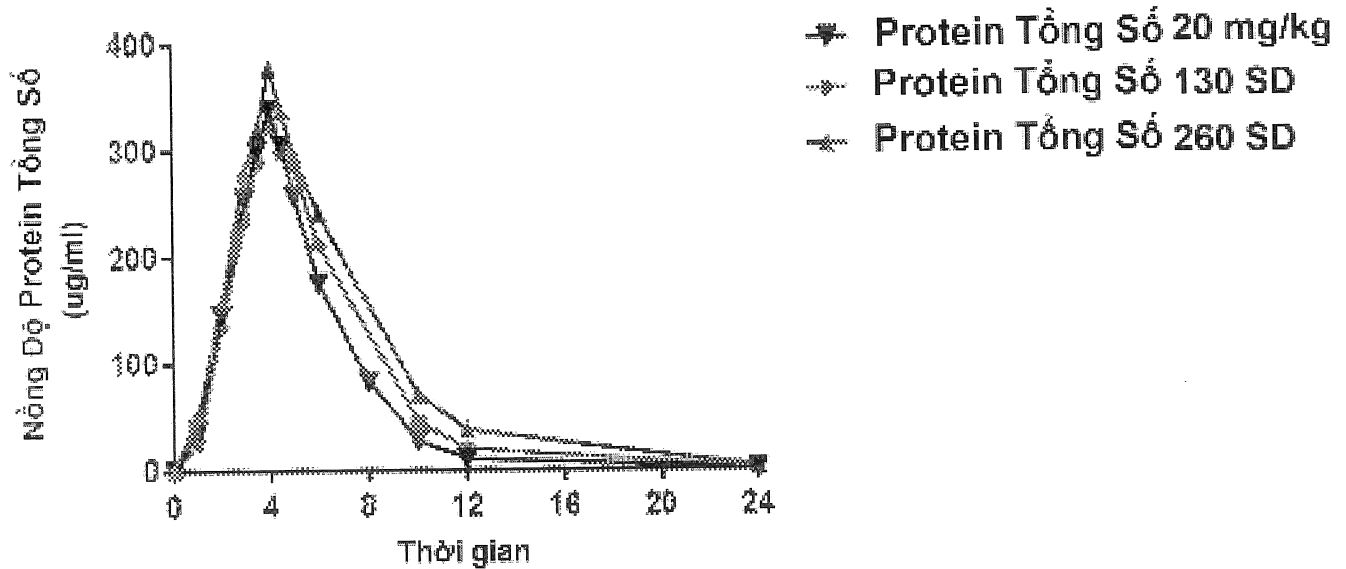
HÌNH 25A



HÌNH 25B

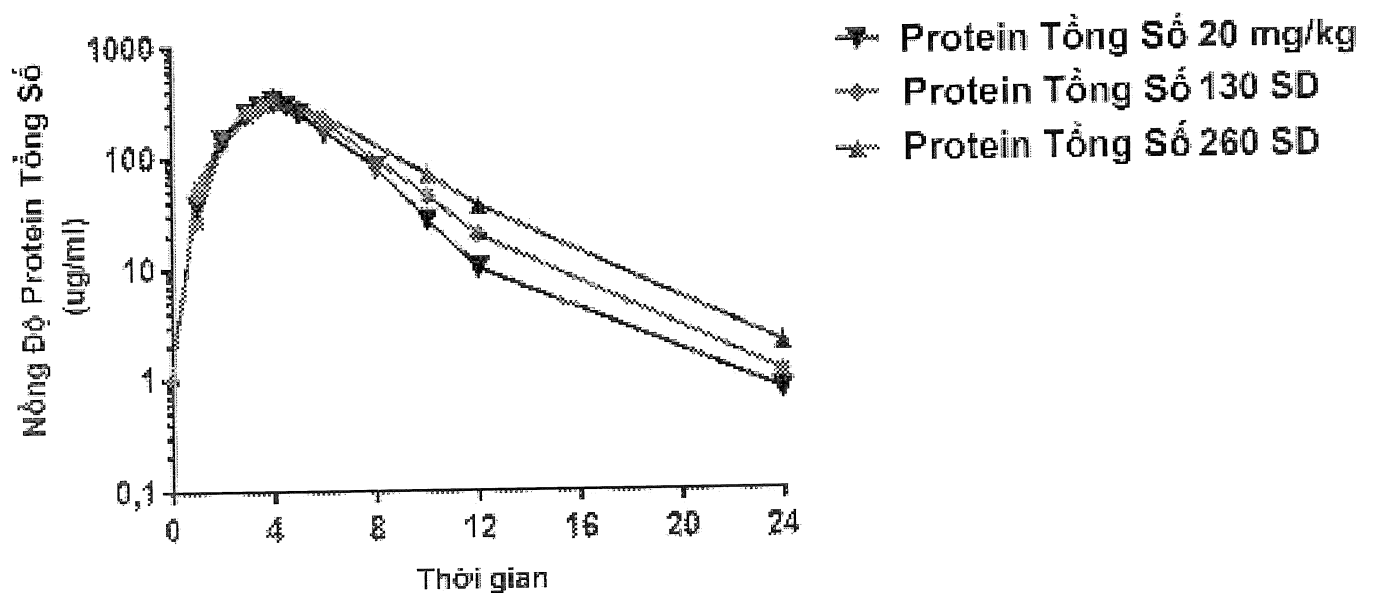
29/51

**Protein Tổng Số Trung Bình đối với 20 mg/kg Một Mình
so với 20 mg/kg + 130 mg hoặc 260 mg Miglustat**



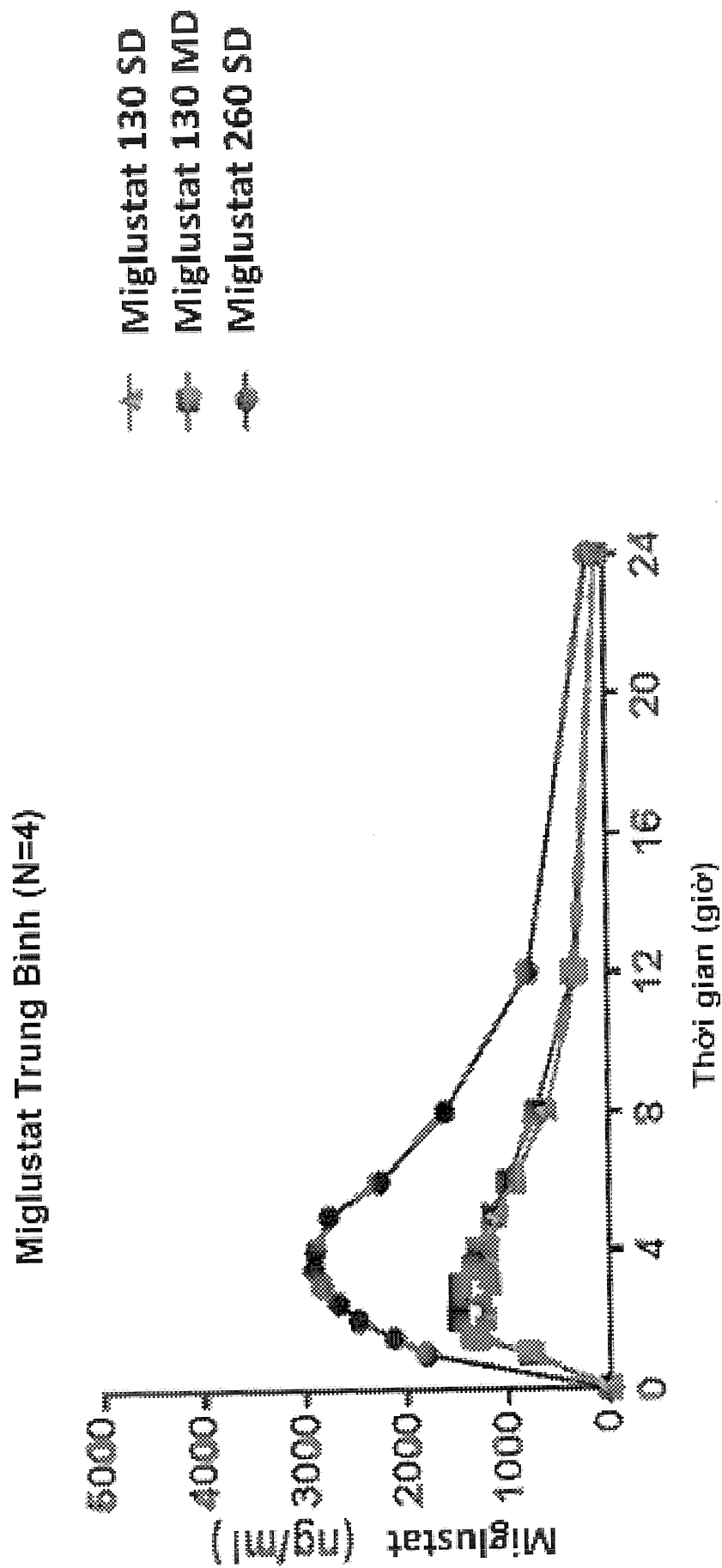
HÌNH 25C

**Protein Tổng Số Trung Bình đối với 20 mg/kg Một Mình
so với 20 mg/kg + 130 mg hoặc 260 mg Miglustat**



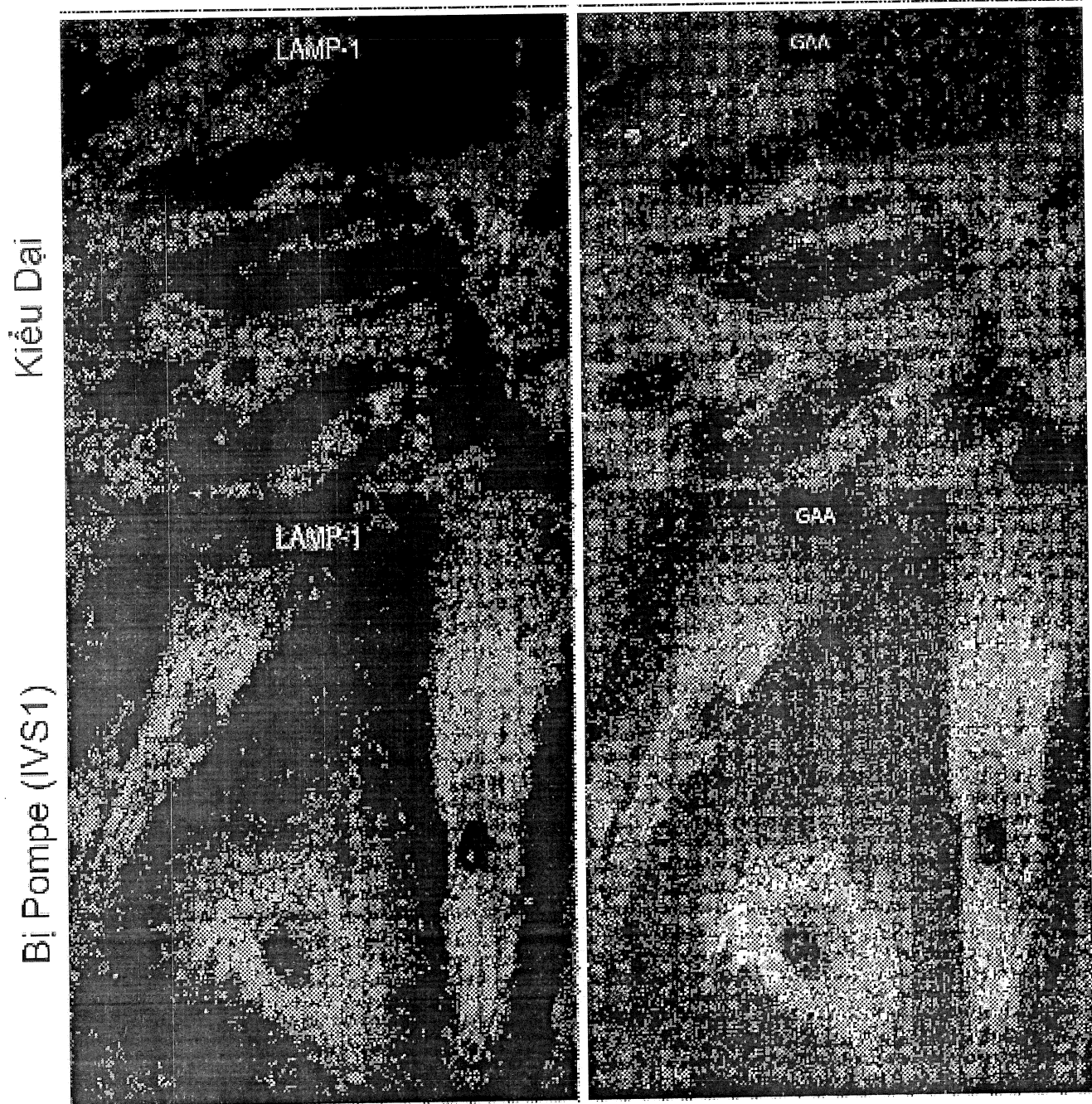
HÌNH 25D

30/51



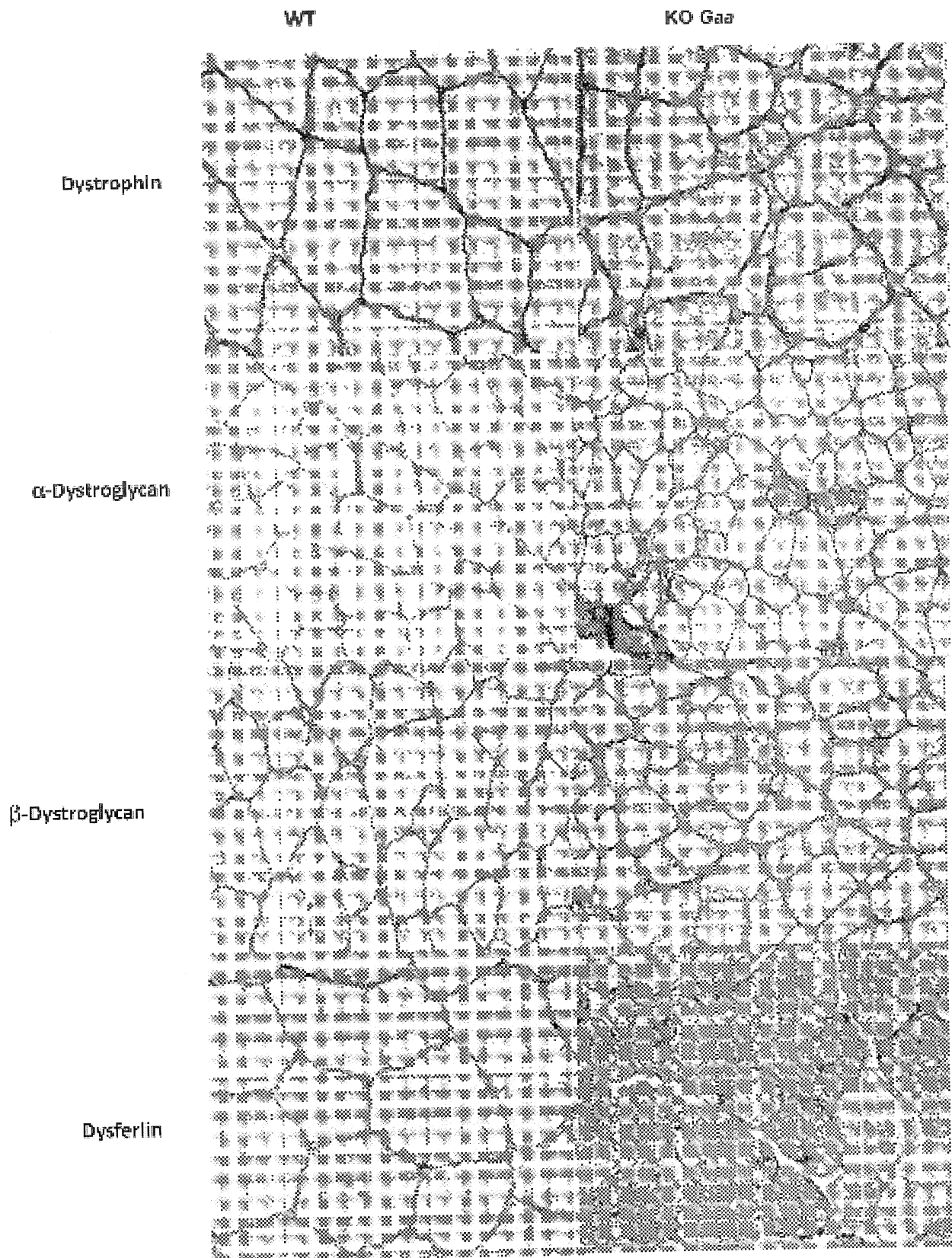
HÌNH 26

31/51



HÌNH 27

32/51

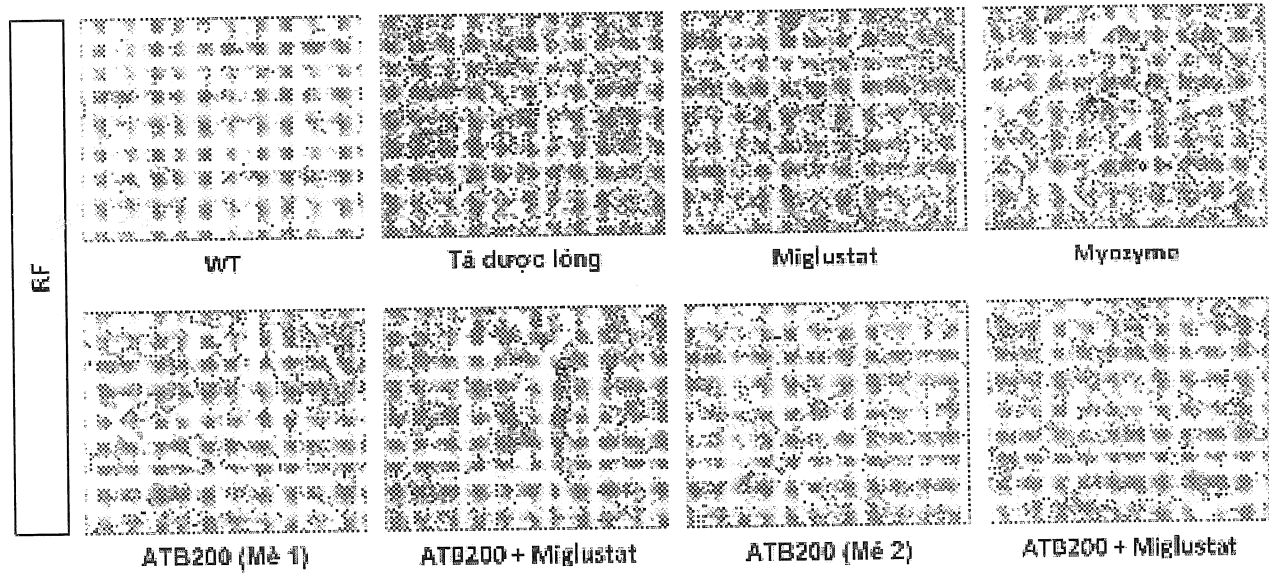


HÌNH 28

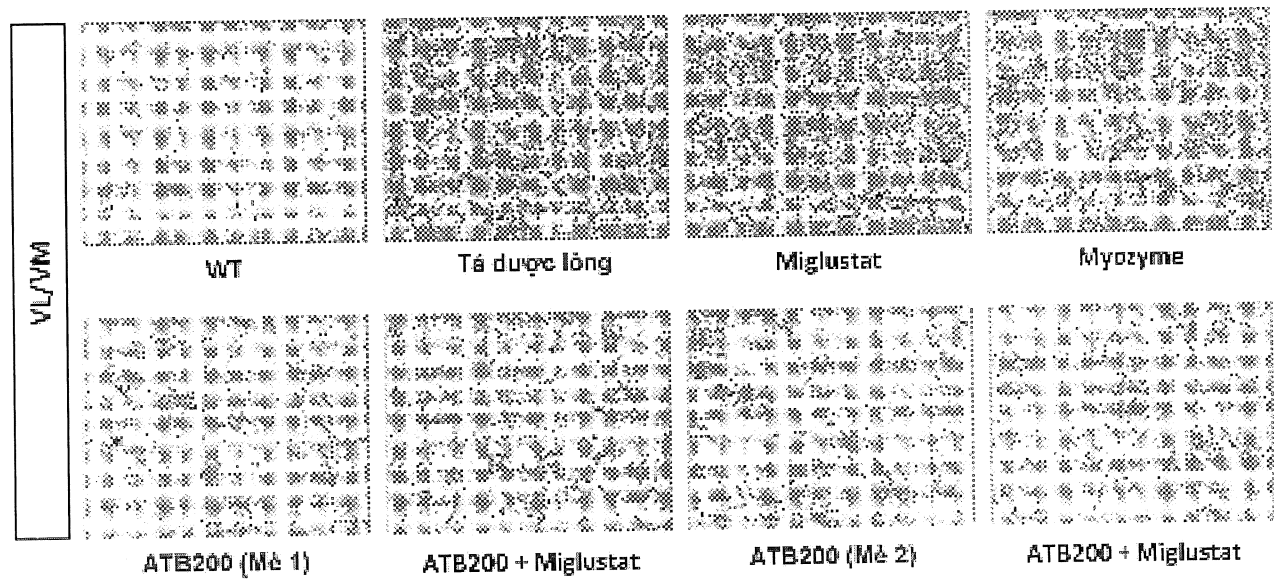
33/51

LAMP1 IHC

Độ phóng đại = 200x



HÌNH 29A

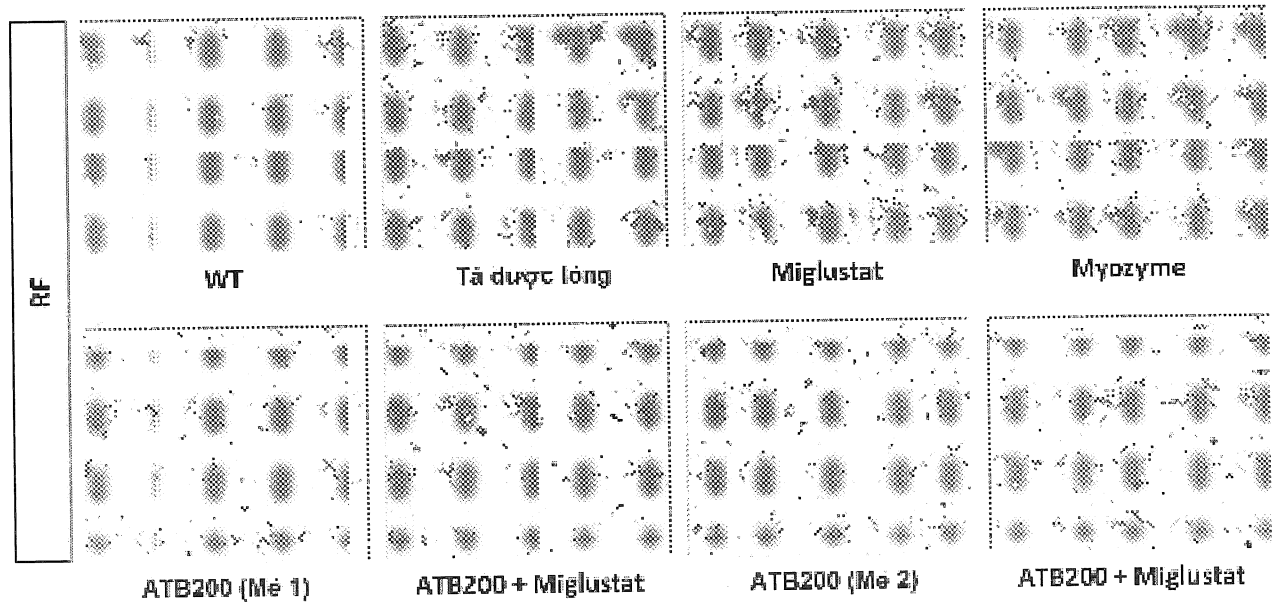


HÌNH 29B

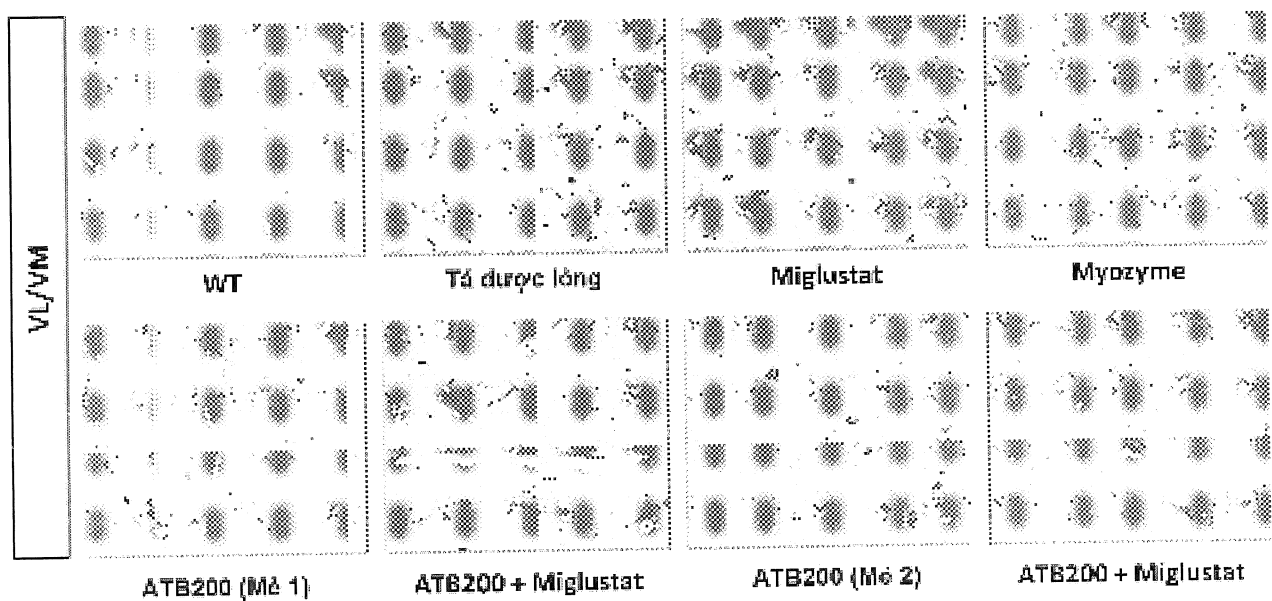
34/51

LC3 II IHC

Độ phóng đại = 200x



HÌNH 30A

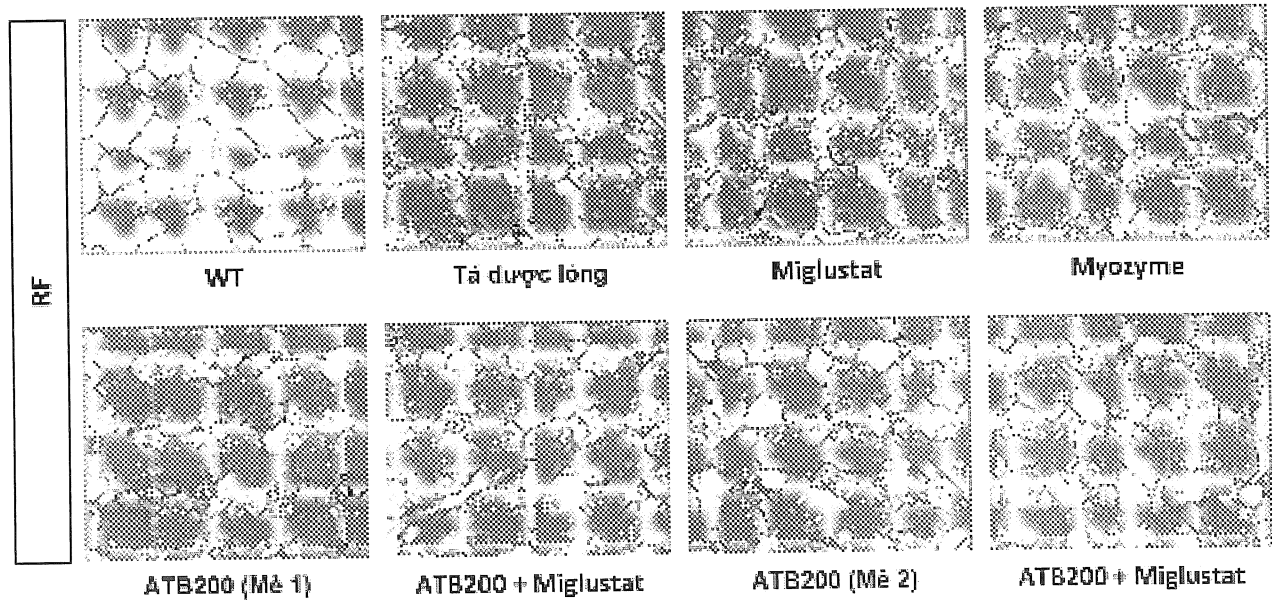


HÌNH 30B

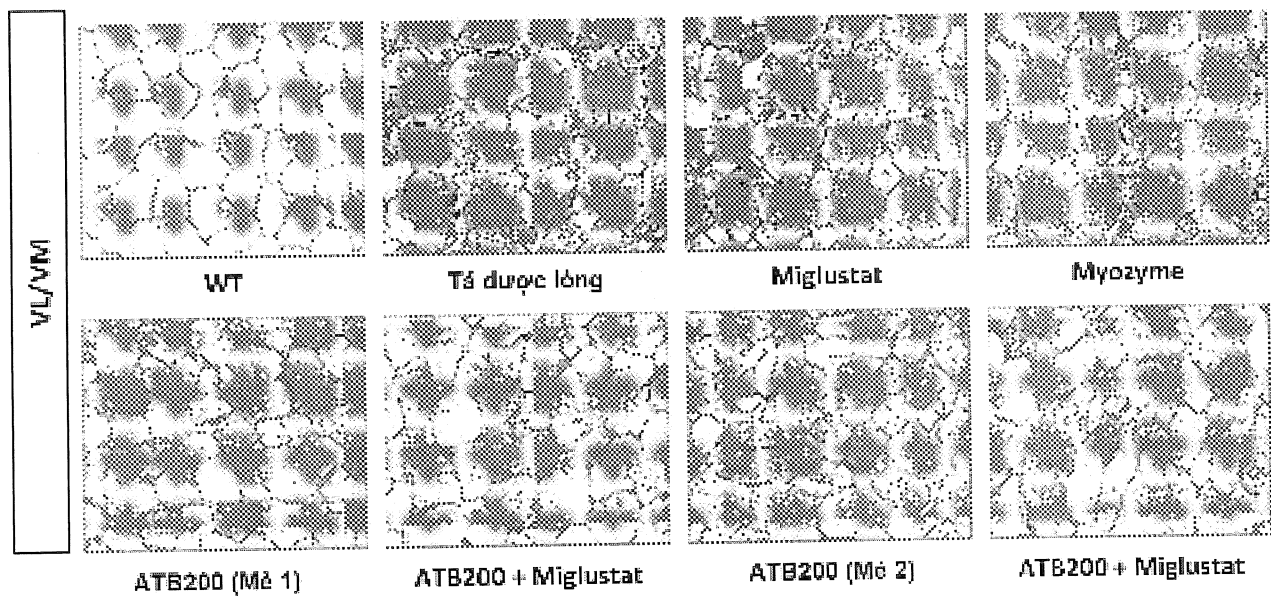
35/51

Dysferlin IHC

Độ phóng đại - 200x

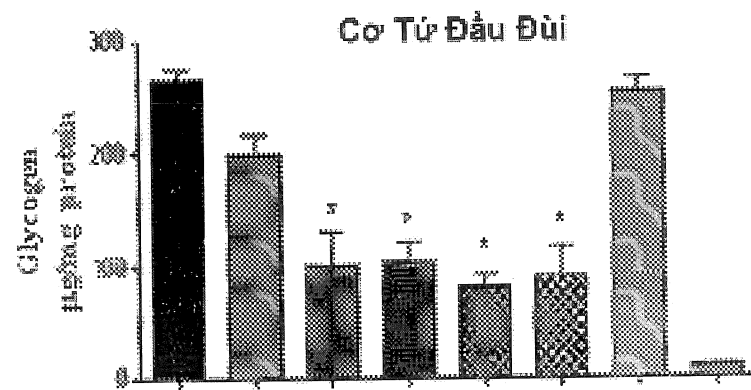


HÌNH 31A

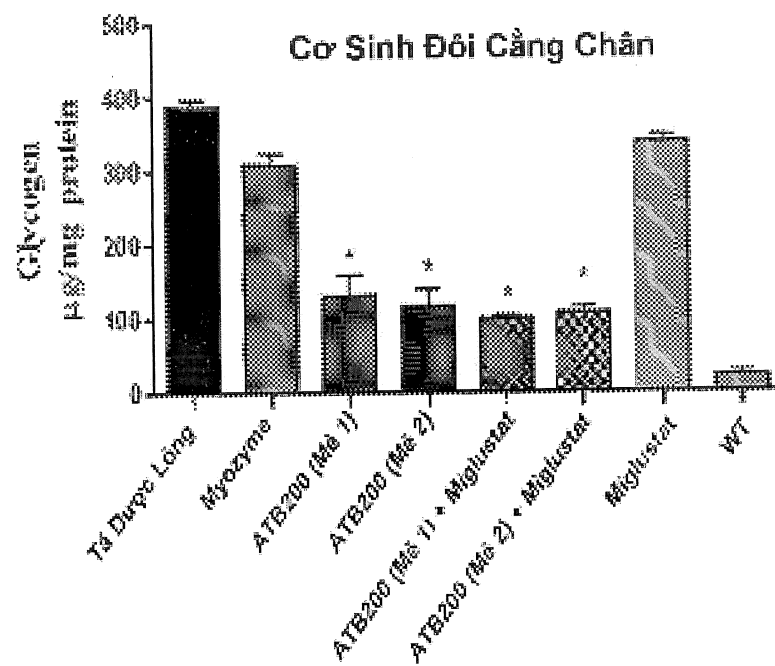


HÌNH 31B

36/51

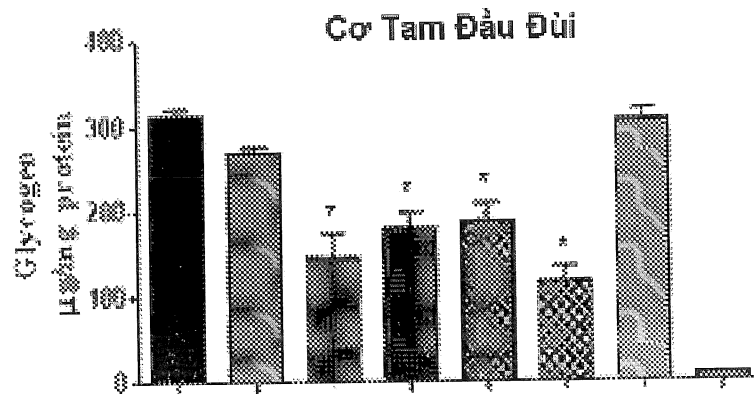


HÌNH 32A

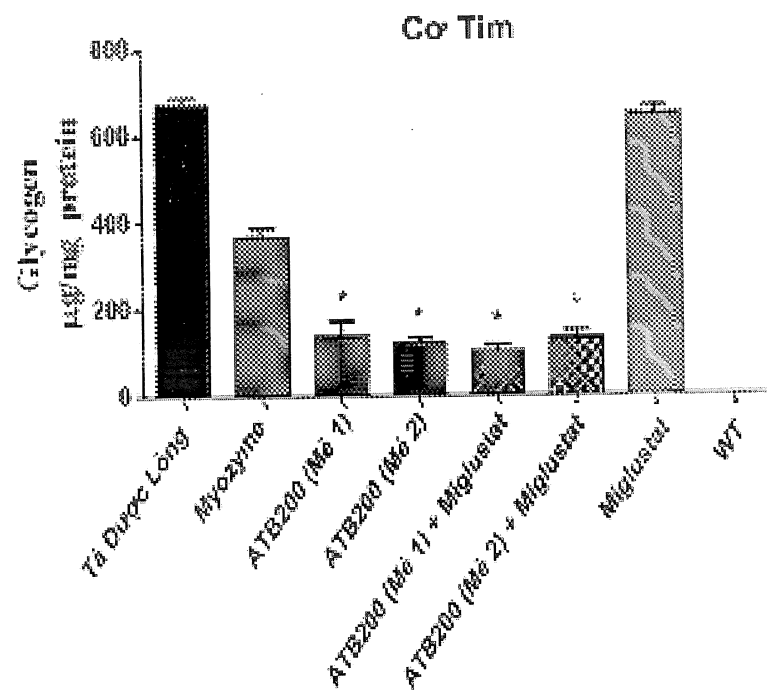


HÌNH 32B

37/51

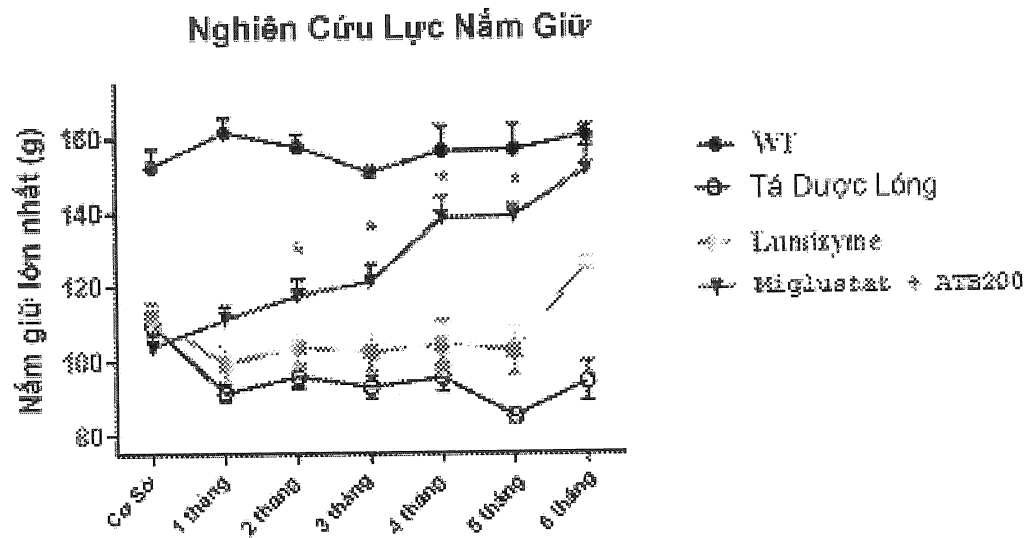


HÌNH 32C

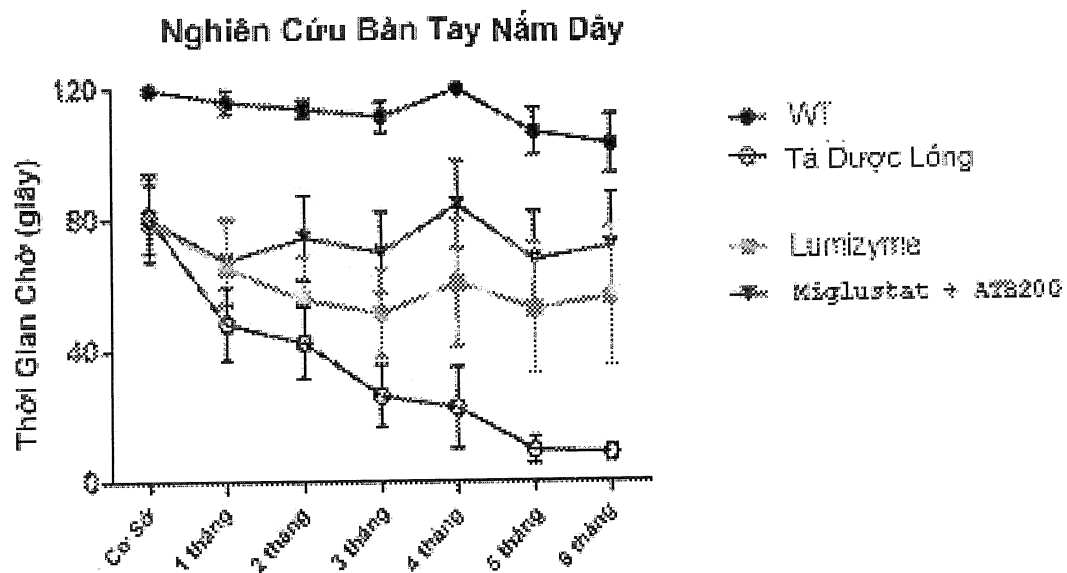


HÌNH 32D

38/51



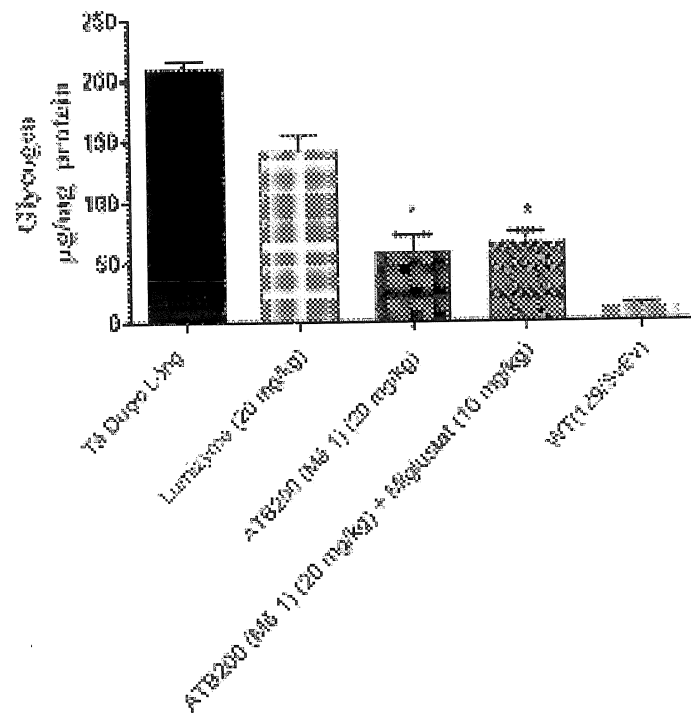
HÌNH 33A



HÌNH 33B

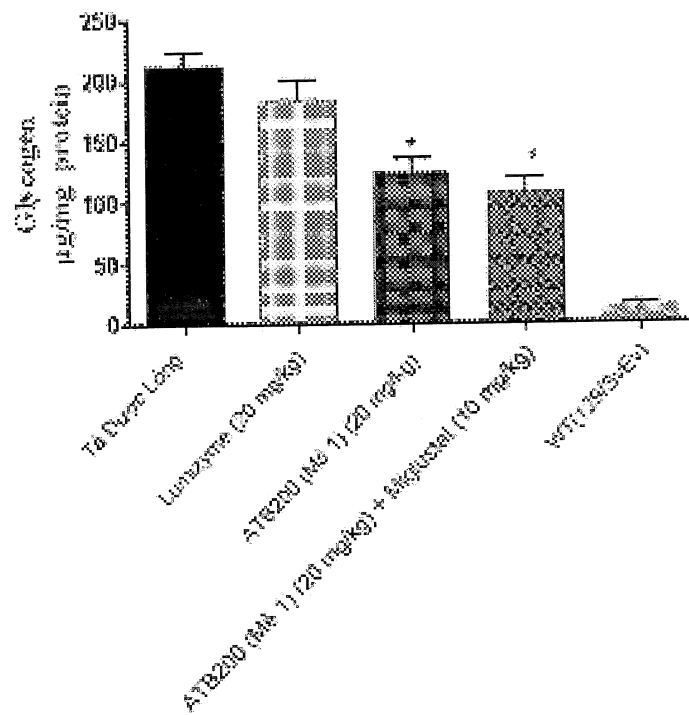
39/51

Cơ Tử Đầu Dài



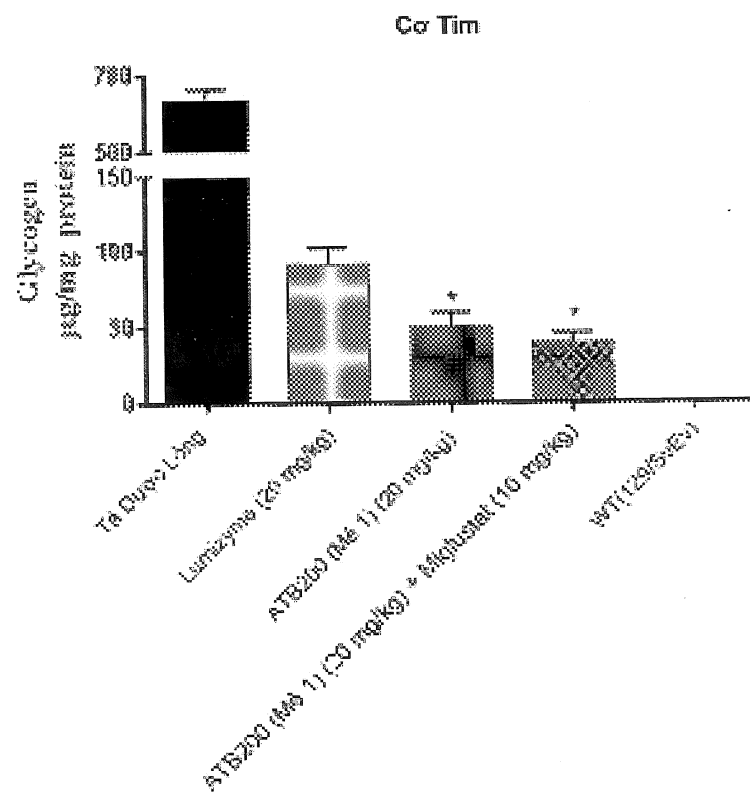
HÌNH 34A

Cơ Tam Đầu ĐÔI



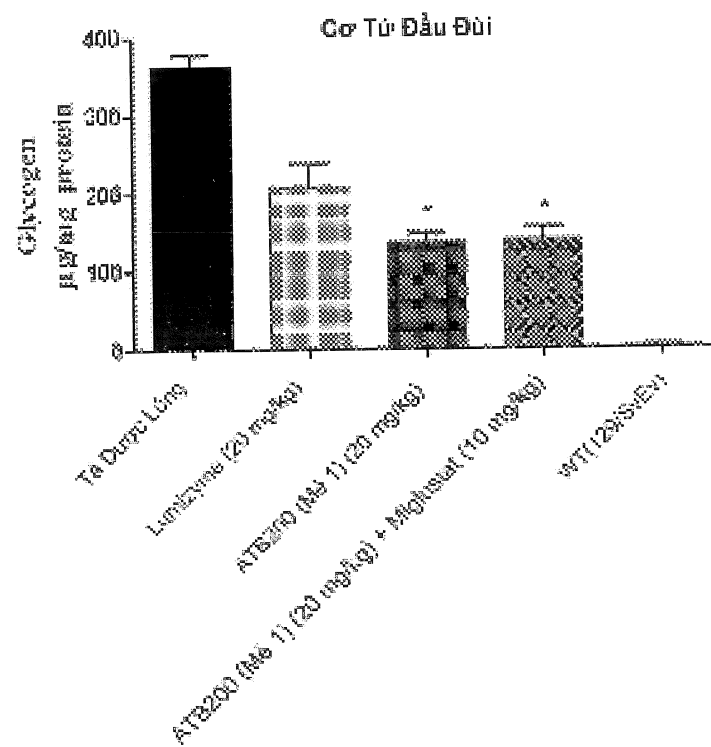
HÌNH 34B

40/51

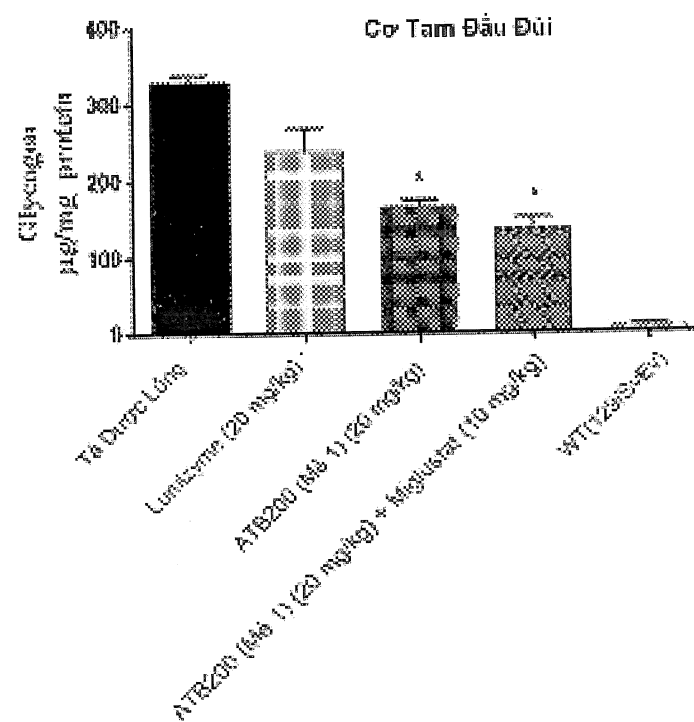


HÌNH 34C

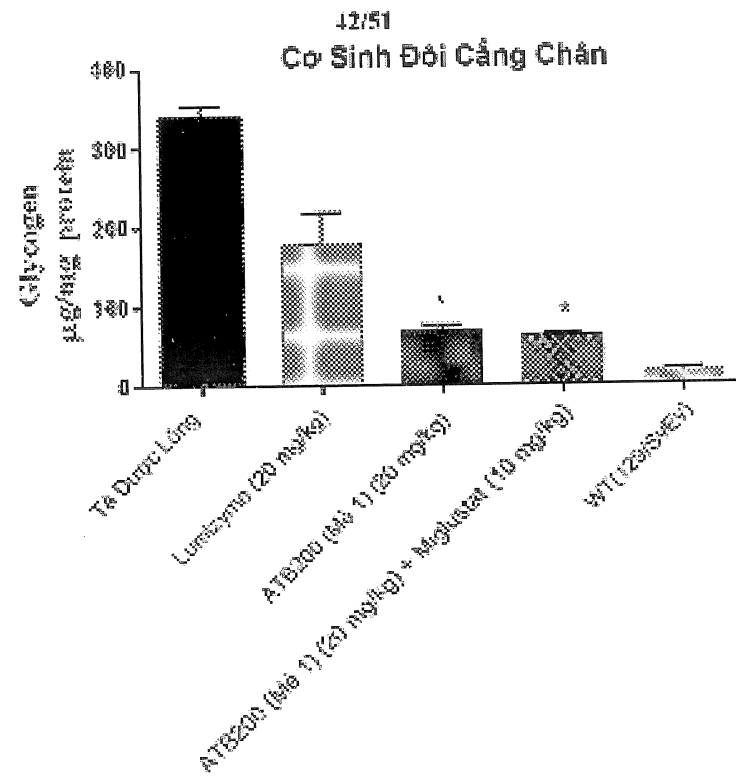
41/51



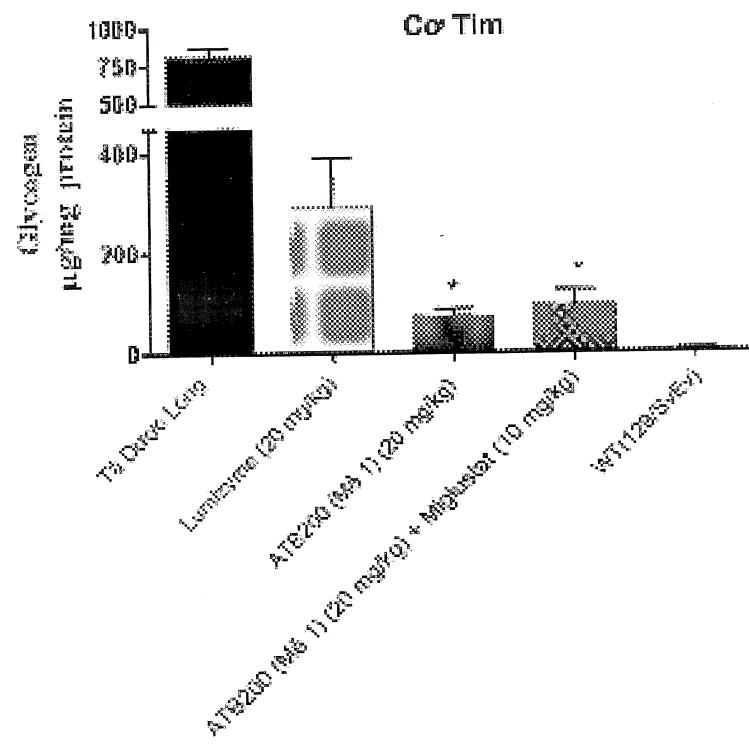
HÌNH 34D



HÌNH 34E

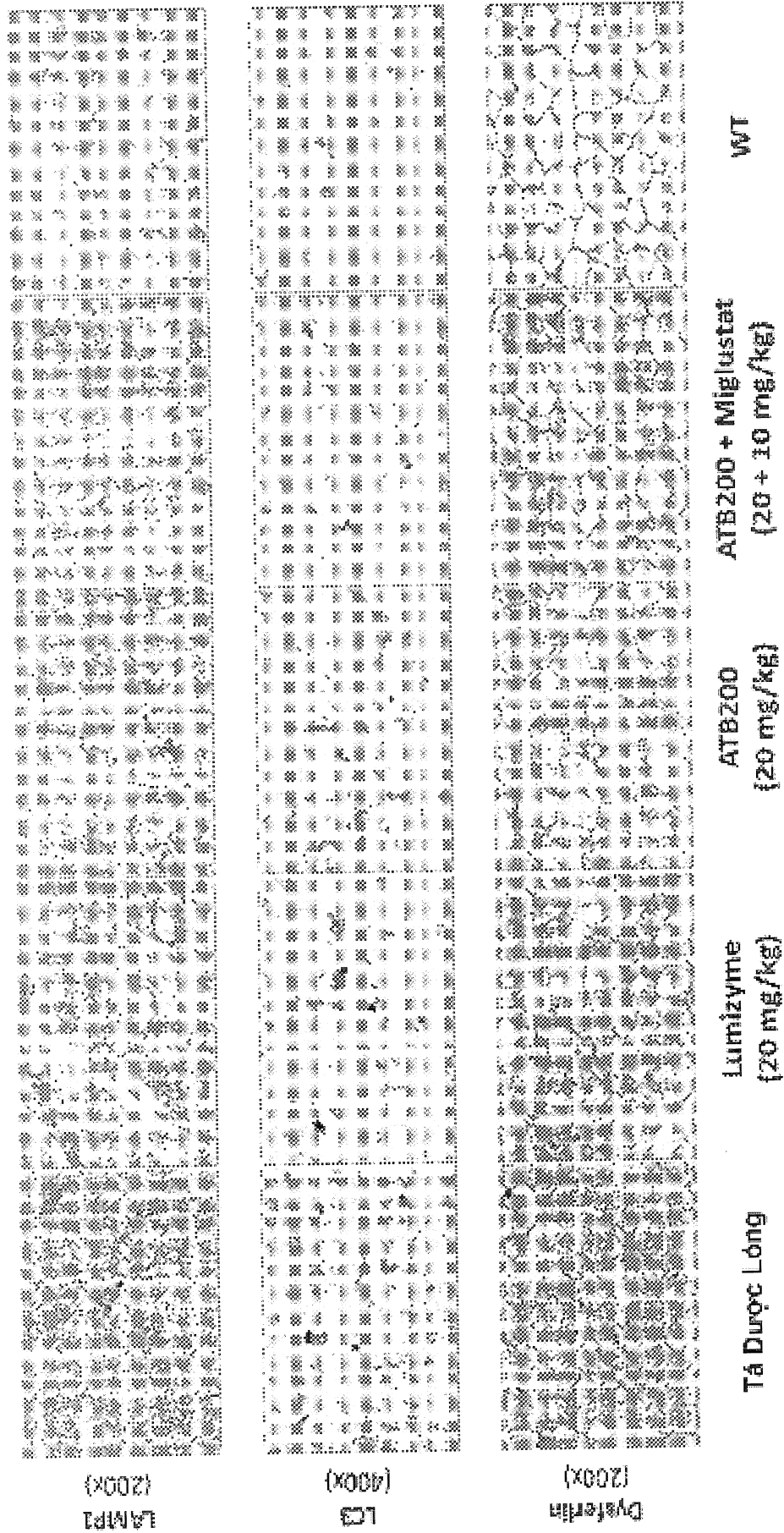


HÌNH 34F



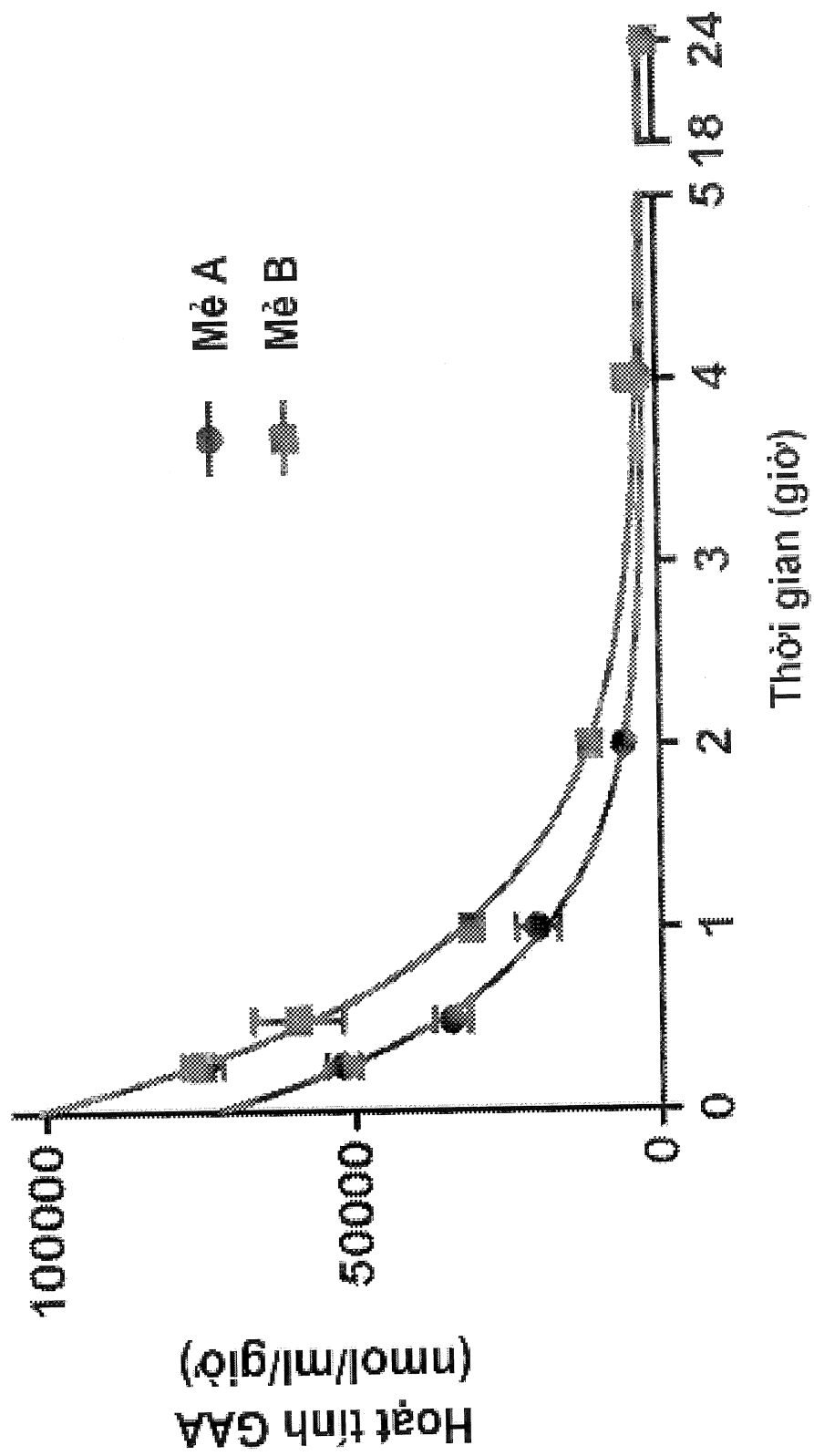
HÌNH 34G

13/51



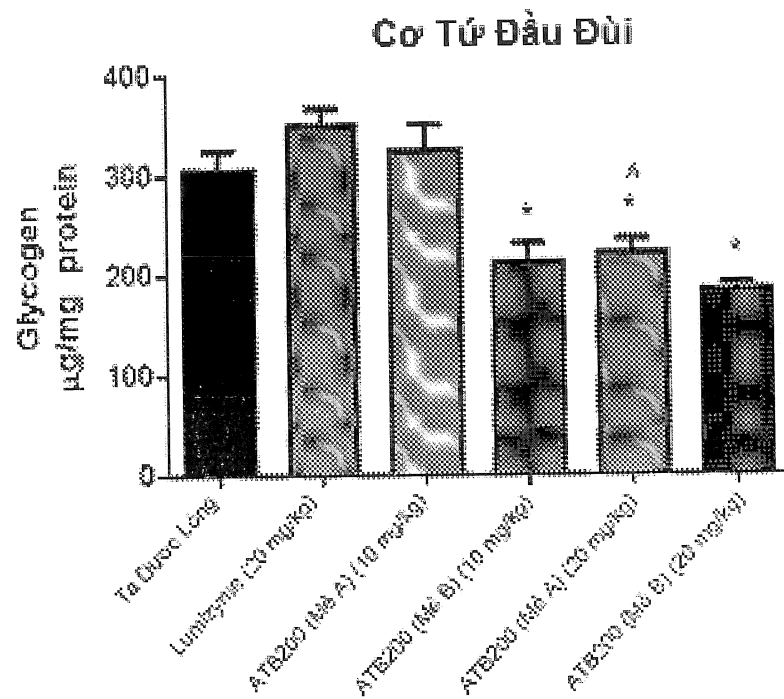
HÌNH 35

15/7/1

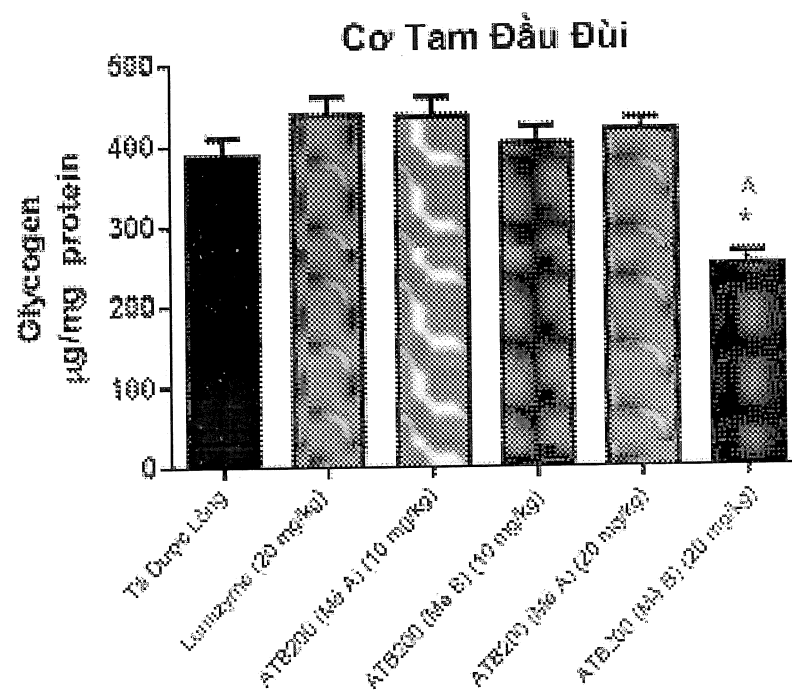


HÌNH 36

45/51

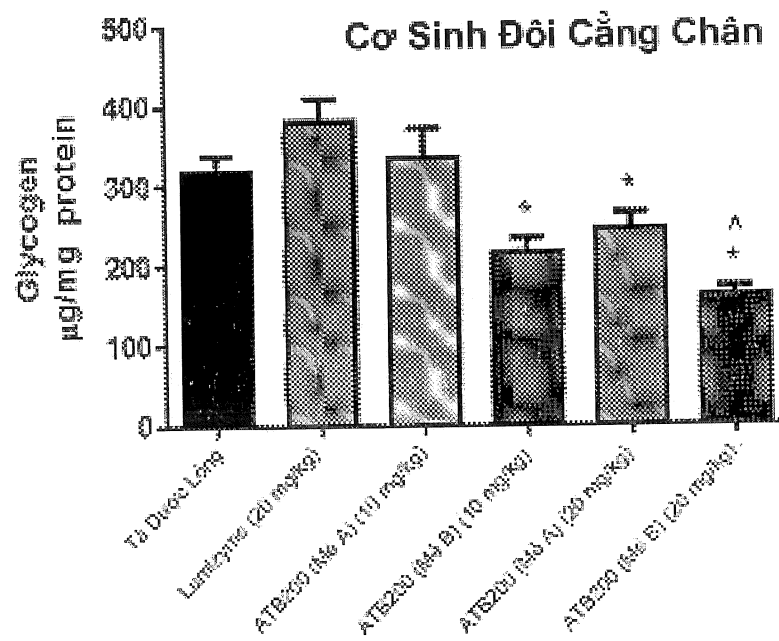


HÌNH 37A

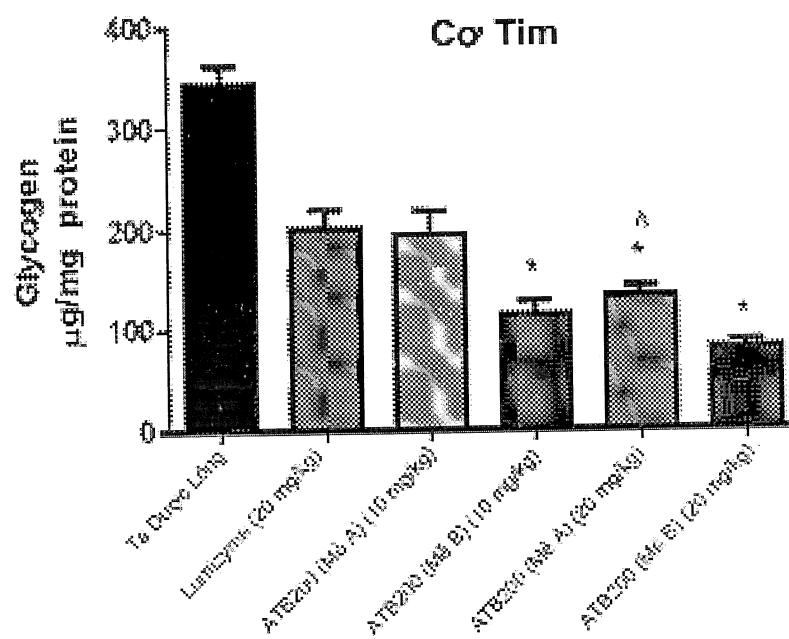


HÌNH 37B

46/51



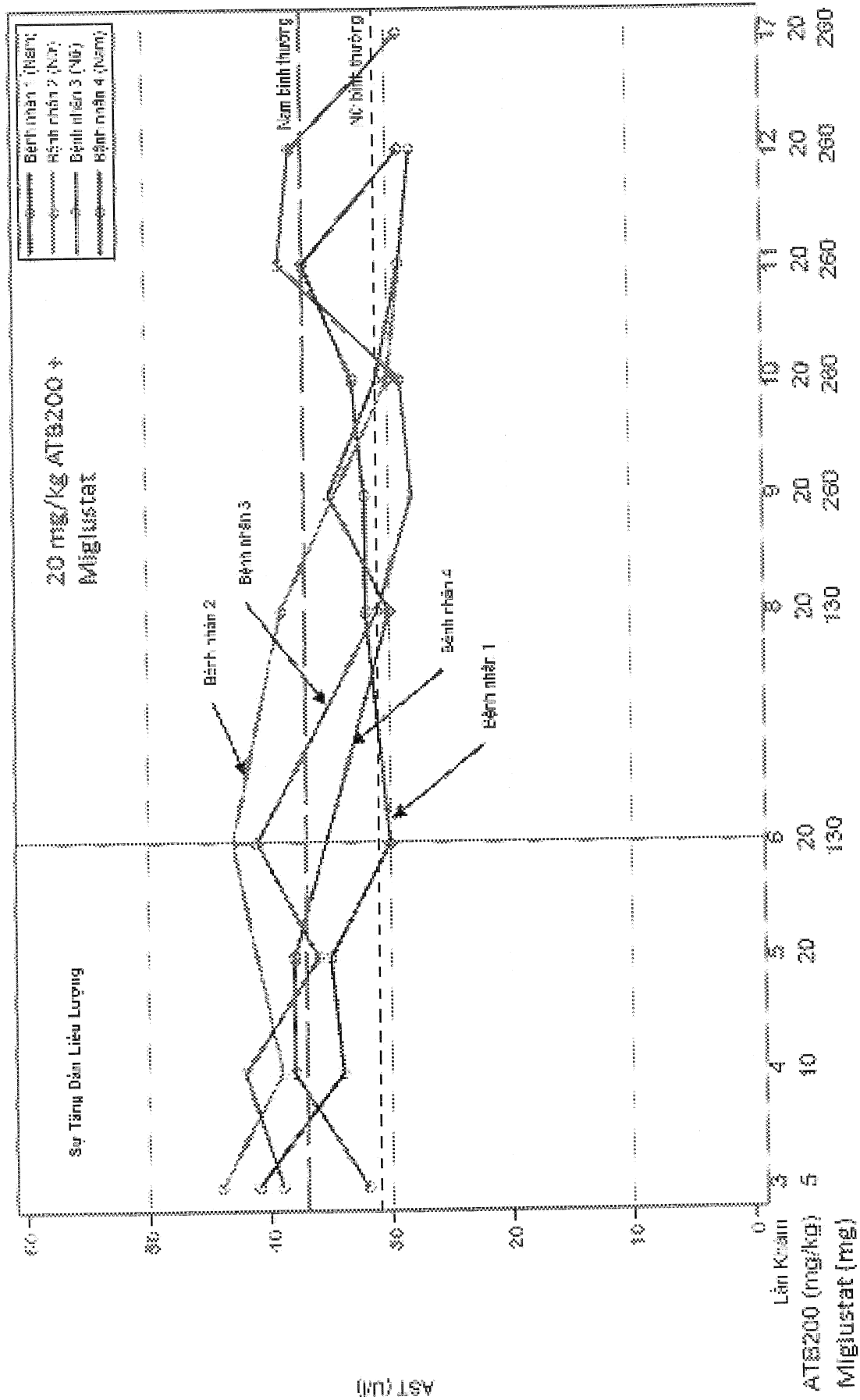
HÌNH 37C



HÌNH 37D

47/51

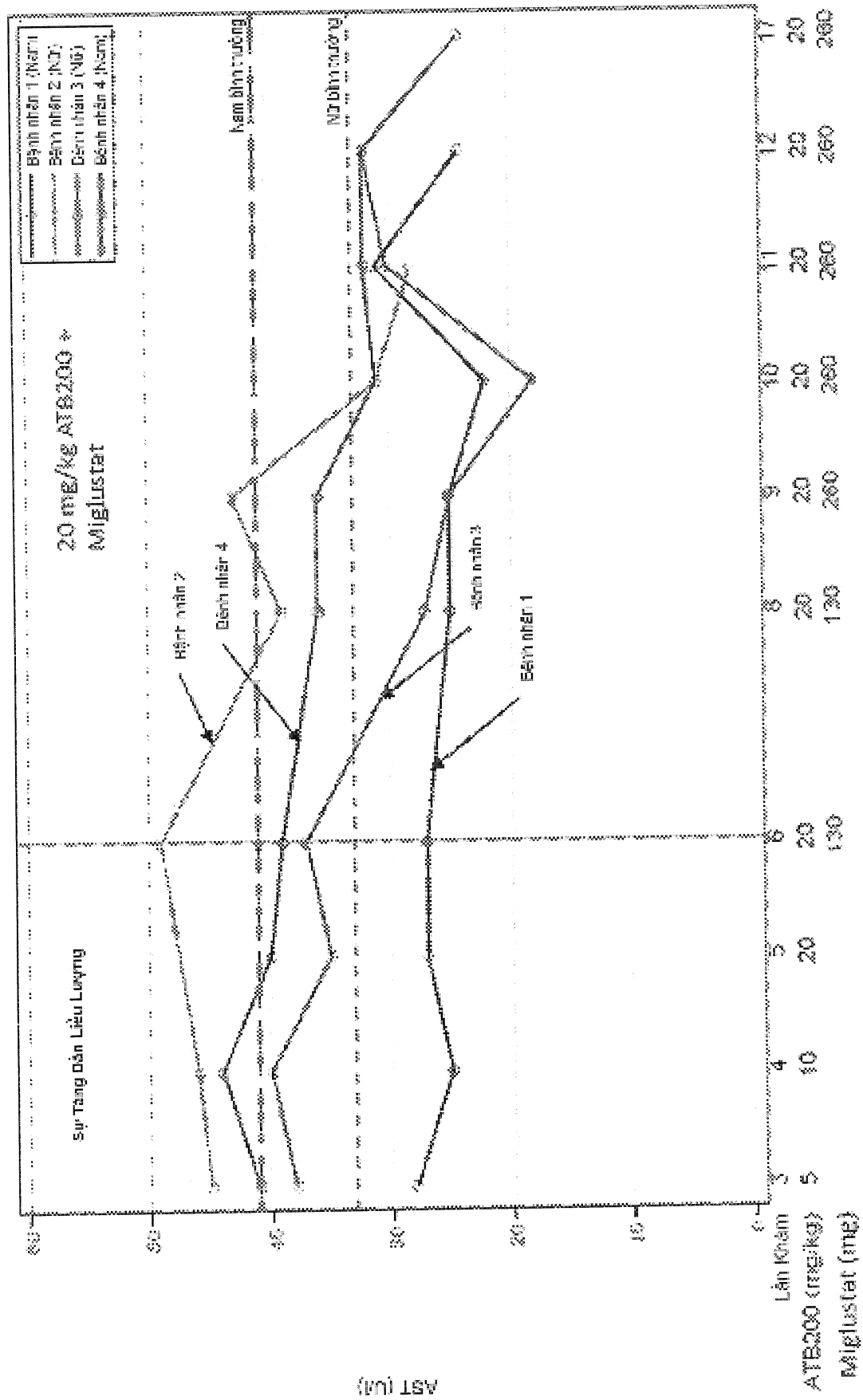
Chỉ Thị Cơ Sở Số Bộ: AST



HÌNH 38

48/51

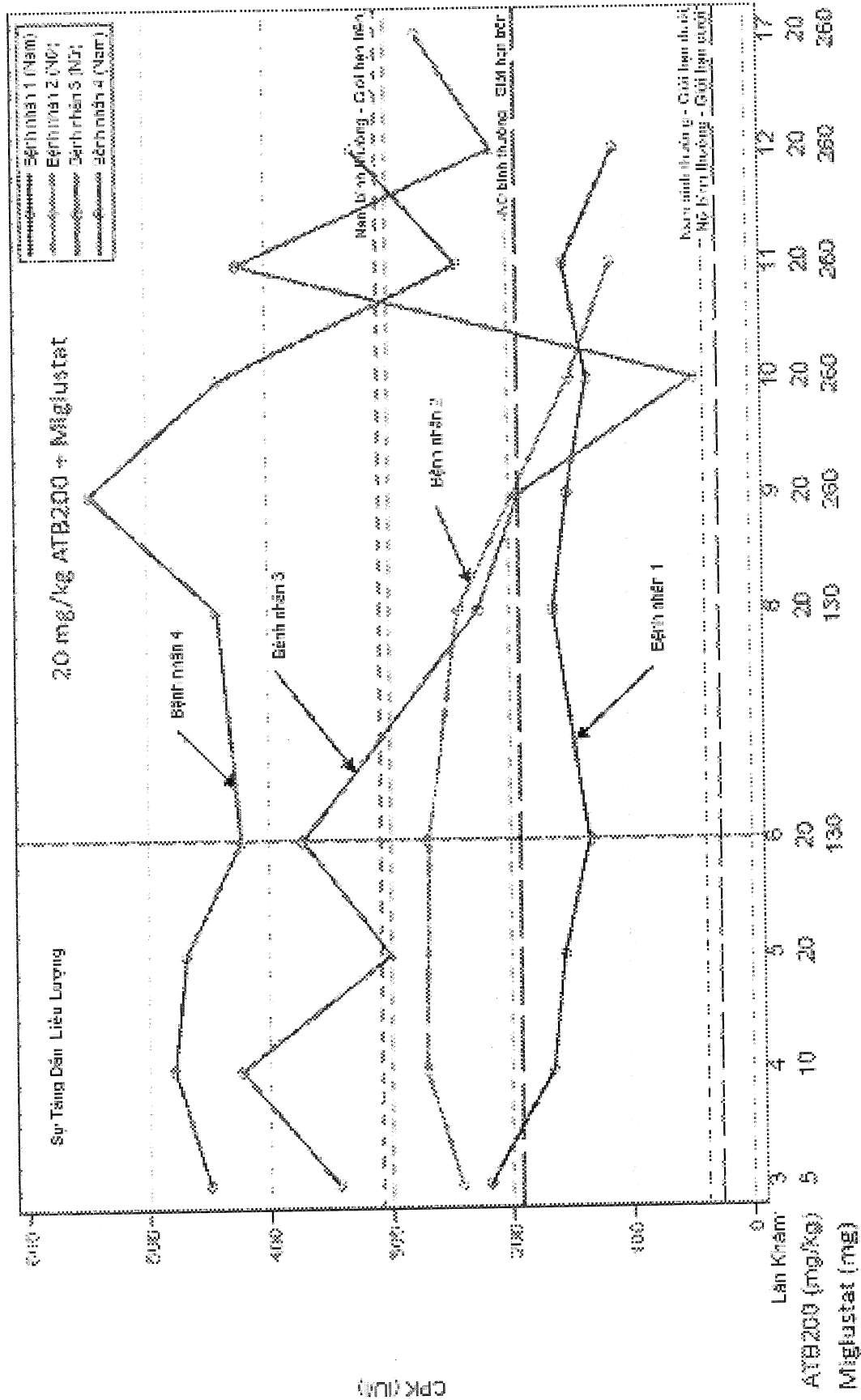
Chỉ Thị Cơ Sở Bộ: AST



HÌNH 39

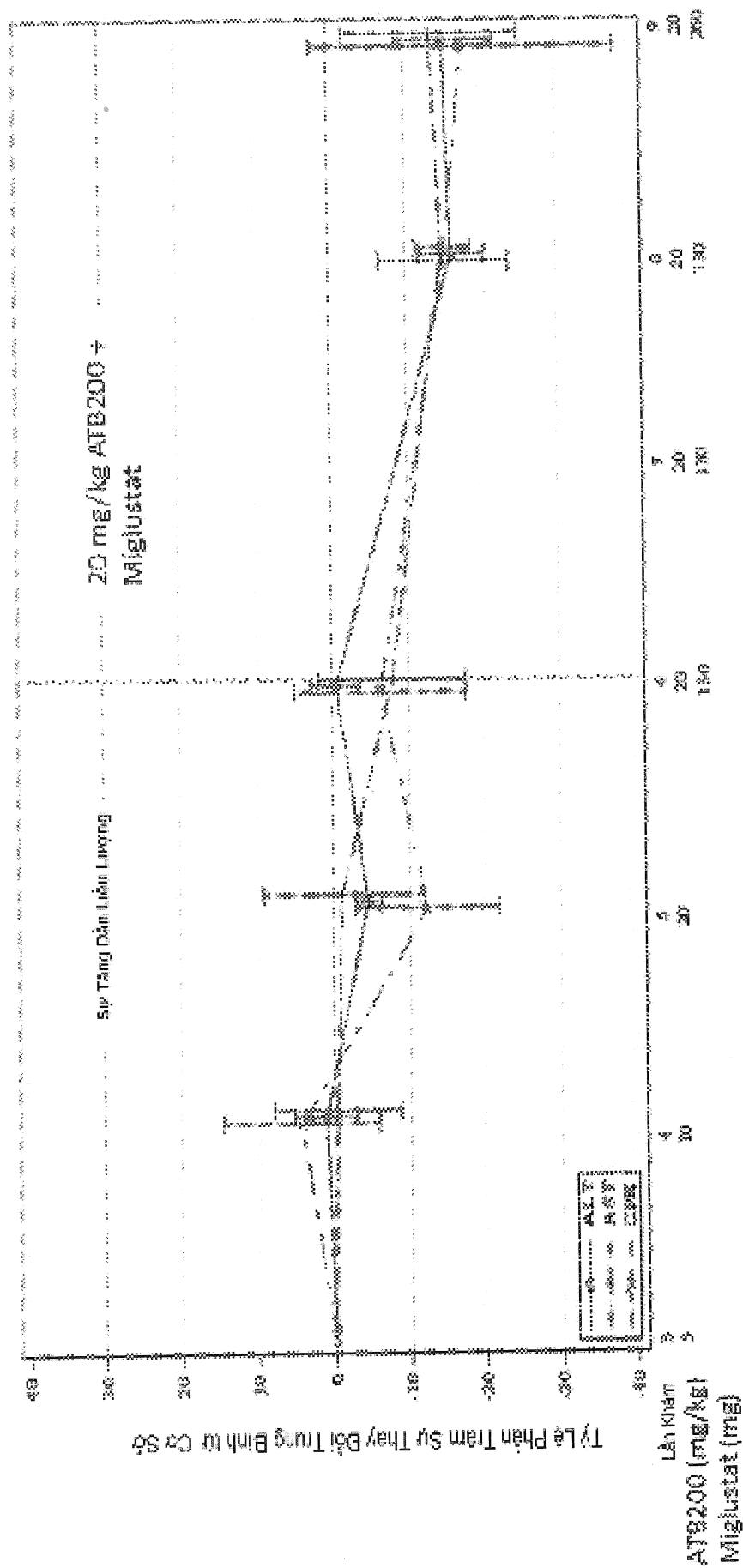
19/51

Chỉ Thị Cơ Sở Bộ: CPK



HÌNH 40

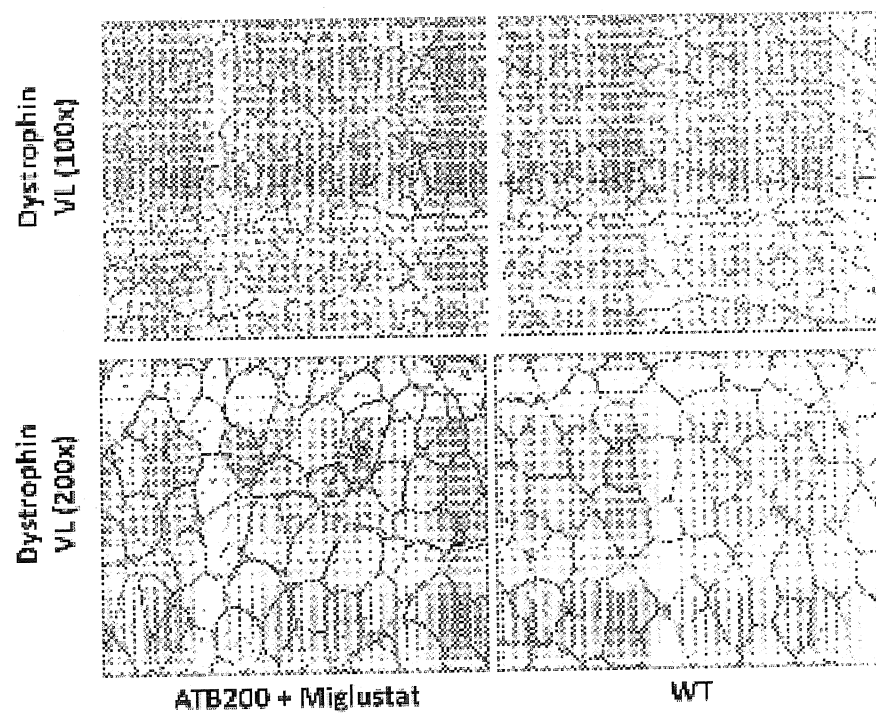
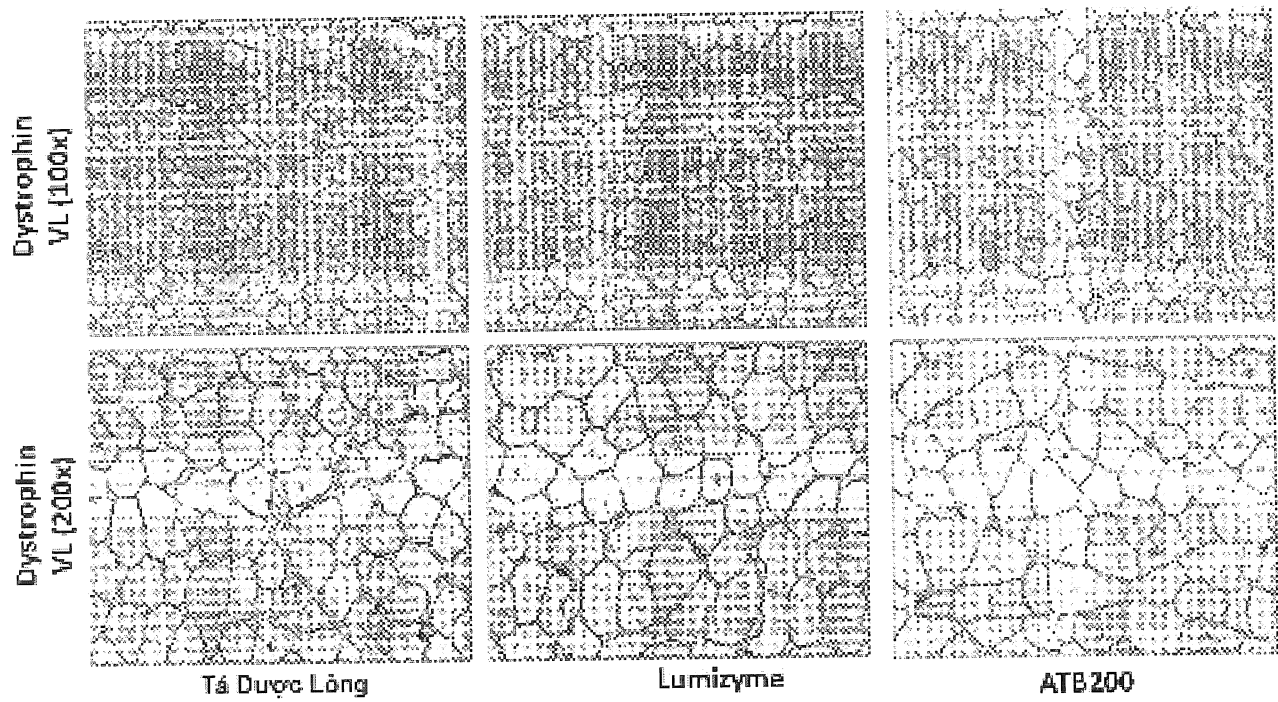
50/51



HÌNH 41

51/51

51:51



HÌNH 42

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Amicus Therapeutics, Inc.

<120> Kit chứa axit alpha-glucosidaza để điều trị bệnh Pompe
DISEASE

<130> AT-P8500-PCT

<160> 6

<170> PatentIn phiên bản 3.5

<210> 1

<211> 952

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Phe Ala Asp Gln Phe Leu Gln Leu Ser Thr Ser Leu Pro Ser Gln Tyr
 245 250 255
 Ile Thr Gly Leu Ala Glu His Leu Ser Pro Leu Met Leu Ser Thr Ser
 260 265 270
 Trp Thr Arg Ile Thr Leu Trp Asn Arg Asp Leu Ala Pro Thr Pro Gly
 275 280 285
 Ala Asn Leu Tyr Gly Ser His Pro Phe Tyr Leu Ala Leu Glu Asp Gly
 290 295 300
 Gly Ser Ala His Gly Val Phe Leu Leu Asn Ser Asn Ala Met Asp Val
 305 310 315 320
 Val Leu Gln Pro Ser Pro Ala Leu Ser Trp Arg Ser Thr Gly Gly Ile
 325 330 335
 Leu Asp Val Tyr Ile Phe Leu Gly Pro Glu Pro Lys Ser Val Val Gln
 340 345 350
 Gln Tyr Leu Asp Val Val Gly Tyr Pro Phe Met Pro Pro Tyr Trp Gly
 355 360 365
 Leu Gly Phe His Leu Cys Arg Trp Gly Tyr Ser Ser Thr Ala Ile Thr
 370 375 380
 Arg Gln Val Val Glu Asn Met Thr Arg Ala His Phe Pro Leu Asp Val
 385 390 395 400
 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)			
 <220>			
<221> mARN			
<222> (221)..(3075)			
 <400> 2			
cagttgggaa agctgaggtt gtcgccgggg ccgcgggttg aggtcgggga tgaggcagca			60
ggtaggacag tgacctcggg gacgcgaagg accccggcca cctctaggtt ctcctcgtcc			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			
Pro Pro Cys Ser His Arg Leu Leu Ala Val Cys Ala Leu Val Ser Leu			282
	10 15 20		
 gca acc gct gca ctc ctg ggg cac atc cta ctc cat gat ttc ctg ctg			
Ala Thr Ala Ala Leu Leu Gly His Ile Leu Leu His Asp Phe Leu Leu			330
	25 30 35		
 gtt ccc cga gag ctg agt ggc tcc tcc cca gtc ctg gag gag act cac			
Val Pro Arg Glu Leu Ser Gly Ser Ser Pro Val Leu Glu Glu Thr His			378
	40 45 50		
 cca gct cac cag cag gga gcc agc aga cca ggg ccc cgg gat gcc cag			
Pro Ala His Gln Gln Gly Ala Ser Arg Pro Gly Pro Arg Asp Ala Gln			426
	55 60 65		
 gca cac ccc ggc cgt ccc aga gca gtg ccc aca cag tgc gac gtc ccc			
Ala His Pro Gly Arg Pro Arg Ala Val Pro Thr Gln Cys Asp Val Pro			474
	70 75 80 85		
 ccc aac agc cgc ttc gat tgc gcc cct gac aag gcc atc acc cag gaa			
Pro Asn Ser Arg Phe Asp Cys Ala Pro Asp Lys Ala Ile Thr Gln Glu			522
	90 95 100		
 cag tgc gag gcc cgc ggc tgc tgc tac atc cct gca aag cag ggg ctg			
Gln Cys Glu Ala Arg Gly Cys Cys Tyr Ile Pro Ala Lys Gln Gly Leu			570
	105 110 115		
 cag gga gcc cag atg ggg cag ccc tgg tgc ttc ttc cca ccc agc tac			
Gln Gly Ala Gln Met Gly Gln Pro Trp Cys Phe Phe Pro Pro Ser Tyr			618
	120 125 130		
 ccc agc tac aag ctg gag aac ctg agc tcc tct gaa atg ggc tac acg			
			666

Pro	Ser	Tyr	Lys	Leu	Glu	Asn	Leu	Ser	Ser	Ser	Glu	Met	Gly	Tyr	Thr		
135						140					145						
gcc	acc	ctg	acc	cgt	acc	acc	ccc	acc	ttc	ttc	ccc	aag	gac	atc	ctg	714	
Ala	Thr	Leu	Thr	Arg	Thr	Thr	Pro	Thr	Phe	Phe	Pro	Lys	Asp	Ile	Leu		
150					155				160						165		
acc	ctg	cgg	ctg	gac	gtg	atg	atg	gag	act	gag	aac	cgc	ctc	cac	ttc	762	
Thr	Leu	Arg	Leu	Asp	Val	Met	Met	Glu	Thr	Glu	Asn	Arg	Leu	His	Phe		
				170				175					180				
acg	atc	aaa	gat	cca	gct	aac	agg	cgc	tac	gag	gtg	ccc	ttg	gag	acc	810	
Thr	Ile	Lys	Asp	Pro	Ala	Asn	Arg	Arg	Tyr	Glu	Val	Pro	Leu	Glu	Thr		
			185				190					195					
ccg	cgt	gtc	cac	agc	cgg	gca	ccg	tcc	cca	ctc	tac	agc	gtg	gag	ttc	858	
Pro	Arg	Val	His	Ser	Arg	Ala	Pro	Ser	Pro	Leu	Tyr	Ser	Val	Glu	Phe		
		200					205					210					
tcc	gag	gag	ccc	ttc	ggg	gtg	atc	gtg	cac	cgg	cag	ctg	gac	ggc	cgc	906	
Ser	Glu	Glu	Pro	Phe	Gly	Val	Ile	Val	His	Arg	Gln	Leu	Asp	Gly	Arg		
	215				220						225						
gtg	ctg	ctg	aac	acg	acg	gtg	gcg	ccc	ctg	ttc	ttt	gcg	gac	cag	ttc	954	
Val	Leu	Leu	Asn	Thr	Thr	Val	Ala	Pro	Leu	Phe	Phe	Ala	Asp	Gln	Phe		
230					235					240					245		
ctt	cag	ctg	tcc	acc	tcg	ctg	ccc	tcg	cag	tat	atc	aca	ggc	ctc	gcc	1002	
Leu	Gln	Leu	Ser	Thr	Ser	Leu	Pro	Ser	Gln	Tyr	Ile	Thr	Gly	Leu	Ala		
				250					255					260			
gag	cac	ctc	agt	ccc	ctg	atg	ctc	agc	acc	agc	tgg	acc	agg	atc	acc	1050	
Glu	His	Leu	Ser	Pro	Leu	Met	Leu	Ser	Thr	Ser	Trp	Thr	Arg	Ile	Thr		
			265					270					275				
ctg	tgg	aac	cgg	gac	ctt	gcg	ccc	acg	ccc	ggt	gcg	aac	ctc	tac	ggg	1098	
Leu	Trp	Asn	Arg	Asp	Leu	Ala	Pro	Thr	Pro	Gly	Ala	Asn	Leu	Tyr	Gly		
		280					285					290					
tct	cac	cct	ttc	tac	ctg	gcg	ctg	gag	gac	ggc	ggg	tcg	gca	cac	ggg	1146	
Ser	His	Pro	Phe	Tyr	Leu	Ala	Leu	Glu	Asp	Gly	Gly	Ser	Ala	His	Gly		
	295				300						305						
gtg	ttc	ctg	cta	aac	agc	aat	gcc	atg	gat	gtg	gtc	ctg	cag	ccg	agc	1194	
Val	Phe	Leu	Leu	Asn	Ser	Asn	Ala	Met	Asp	Val	Val	Leu	Gln	Pro	Ser		
310					315					320					325		
cct	gcc	ctt	agc	tgg	agg	tcg	aca	ggt	ggg	atc	ctg	gat	gtc	tac	atc	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	1722
Ala Phe Pro Asp Phe Thr Asn Pro Thr Ala Leu Ala Trp Trp Glu Asp	
490 495 500	
atg gtg gct gag ttc cat gac cag gtg ccc ttc gac ggc atg tgg att	1770
Met Val Ala Glu Phe His Asp Gln Val Pro Phe Asp Gly Met Trp Ile	
505 510 515	
gac atg aac gag cct tcc aac ttc atc aga ggc tct gag gac ggc tgc	1818
Asp Met Asn Glu Pro Ser Asn Phe Ile Arg Gly Ser Glu Asp Gly Cys	
520 525 530	
ccc aac aat gag ctg gag aac cca ccc tac gtg cct ggg gtg gtt ggg	1866
Pro Asn Asn Glu Leu Glu Asn Pro Pro Tyr Val Pro Gly Val Val Gly	
535 540 545	
ggg acc ctc cag gcg gcc acc atc tgt gcc tcc agc cac cag ttt ctc	1914
Gly Thr Leu Gln Ala Ala Thr Ile Cys Ala Ser Ser His Gln Phe Leu	
550 555 560 565	
tcc aca cac tac aac ctg cac aac ctc tac ggc ctg acc gaa gcc atc	1962
Ser Thr His Tyr Asn Leu His Asn Leu Tyr Gly Leu Thr Glu Ala Ile	
570 575 580	
gcc tcc cac agg gcg ctg gtg aag gct cgg ggg aca cgc cca ttt gtg	2010
Ala Ser His Arg Ala Leu Val Lys Ala Arg Gly Thr Arg Pro Phe Val	
585 590 595	
atc tcc cgc tcg acc ttt gct ggc cac ggc cga tac gcc ggc cac tgg	2058
Ile Ser Arg Ser Thr Phe Ala Gly His Gly Arg Tyr Ala Gly His Trp	
600 605 610	
acg ggg gac gtg tgg agc tcc tgg gag cag ctc gcc tcc tcc gtg cca	2106
Thr Gly Asp Val Trp Ser Ser Trp Glu Gln Leu Ala Ser Ser Val Pro	
615 620 625	
gaa atc ctg cag ttt aac ctg ctg ggg gtg cct ctg gtc ggg gcc gac	2154
Glu Ile Leu Gln Phe Asn Leu Leu Gly Val Pro Leu Val Gly Ala Asp	
630 635 640 645	
gtc tgc ggc ttc ctg ggc aac acc tca gag gag ctg tgt gtg cgc tgg	2202

Val Cys Gly Phe Leu Gly Asn Thr Ser Glu Glu Leu Cys Val Arg Trp	
650 655 660	
acc cag ctg ggg gcc ttc tac ccc ttc atg cgg aac cac aac agc ctg	2250
Thr Gln Leu Gly Ala Phe Tyr Pro Phe Met Arg Asn His Asn Ser Leu	
665 670 675	
ctc agt ctg ccc cag gag ccg tac agc ttc agc gag ccg gcc cag cag	2298
Leu Ser Leu Pro Gln Glu Pro Tyr Ser Phe Ser Glu Pro Ala Gln Gln	
680 685 690	
gcc atg agg aag gcc ctc acc ctg cgc tac gca ctc ctc ccc cac ctc	2346
Ala Met Arg Lys Ala Leu Thr Leu Arg Tyr Ala Leu Leu Pro His Leu	
695 700 705	
tac aca ctg ttc cac cag gcc cac gtc gcg ggg gag acc gtg gcc cgg	2394
Tyr Thr Leu Phe His Gln Ala His Val Ala Gly Glu Thr Val Ala Arg	
710 715 720 725	
ccc ctc ttc ctg gag ttc ccc aag gac tct agc acc tgg act gtg gac	2442
Pro Leu Phe Leu Glu Phe Pro Lys Asp Ser Ser Thr Trp Thr Val Asp	
730 735 740	
cac cag ctc ctg tgg ggg gag gcc ctg ctc atc acc cca gtg ctc cag	2490
His Gln Leu Leu Trp Gly Glu Ala Leu Leu Ile Thr Pro Val Leu Gln	
745 750 755	
gcc ggg aag gcc gaa gtg act ggc tac ttc ccc ttg ggc aca tgg tac	2538
Ala Gly Lys Ala Glu Val Thr Gly Tyr Phe Pro Leu Gly Thr Trp Tyr	
760 765 770	
gac ctg cag acg gtg cca ata gag gcc ctt ggc agc ctc cca ccc cca	2586
Asp Leu Gln Thr Val Pro Ile Glu Ala Leu Gly Ser Leu Pro Pro Pro	
775 780 785	
cct gca gct ccc cgt gag cca gcc atc cac agc gag ggg cag tgg gtg	2634
Pro Ala Ala Pro Arg Glu Pro Ala Ile His Ser Glu Gly Gln Trp Val	
790 795 800 805	
acg ctg ccg gcc ccc ctg gac acc atc aac gtc cac ctc cgg gct ggg	2682
Thr Leu Pro Ala Pro Leu Asp Thr Ile Asn Val His Leu Arg Ala Gly	
810 815 820	
tac atc atc ccc ctg cag ggc cct ggc ctc aca acc aca gag tcc cgc	2730
Tyr Ile Ile Pro Leu Gln Gly Pro Gly Leu Thr Thr Thr Glu Ser Arg	
825 830 835	
cag cag ccc atg gcc ctg gct gtg gcc ctg acc aag ggt gga gag gcc	2778
Gln Gln Pro Met Ala Leu Ala Val Ala Leu Thr Lys Gly Gly Glu Ala	
840 845 850	
cga ggg gag ctg ttc tgg gac gat gga gag agc ctg gaa gtg ctg gag	2826
Arg Gly Glu Leu Phe Trp Asp Asp Gly Glu Ser Leu Glu Val Leu Glu	
855 860 865	
cga ggg gcc tac aca cag gtc atc ttc ctg gcc agg aat aac acg atc	2874
Arg Gly Ala Tyr Thr Gln Val Ile Phe Leu Ala Arg Asn Asn Thr Ile	
870 875 880 885	
gtg aat gag ctg gta cgt gtg acc agt gag gga gct ggc ctg cag ctg	2922
Val Asn Glu Leu Val Arg Val Thr Ser Glu Gly Ala Gly Leu Gln Leu	
890 895 900	
cag aag gtg act gtc ctg ggc gtg gcc acg gcg ccc cag cag gtc ctc	2970

Gln Lys Val Thr Val Leu Gly Val Ala Thr Ala Pro Gln Gln Val Leu
905 910 915

tcc aac ggt gtc cct gtc tcc aac ttc acc tac agc ccc gac acc aag 3018
Ser Asn Gly Val Pro Val Ser Asn Phe Thr Tyr Ser Pro Asp Thr Lys
920 925 930

gtc ctg gac atc tgt gtc tcg ctg ttg atg gga gag cag ttt ctc gtc 3066
Val Leu Asp Ile Cys Val Ser Leu Leu Met Gly Glu Gln Phe Leu Val
935 940 945

agc tgg tgt tag ccgggaggag tgtgttagtc tctccagagg gaggttggtt 3118
Ser Trp Cys
950

ccccagggaa gcagagcctg tgtgcgggca gcagctgtgt gcgggcctgg gggttgcatg 3178
tgtcacctgg agctgggcac taaccattcc aagccgcgc atcgtttgtt tccacctcct 3238
gggcccgggc tctggccccc aacgtgtcta ggagagcttt ctccctagat cgcactgtgg 3298
gccggggcct ggagggctgc tctgtgttaa taagattgta aggtttgccc tctcacctg 3358
ttgccggcat gcgggtagta ttagccaccc cctccatct gttcccagca ccggagaagg 3418
gggtgtctcag gtggaggtgt ggggtatgca cctgagctcc tgcttcgcgc ctgctgtctt 3478
gccccaacgc gaccgcttcc cggctgccc gagggctgga tgcttgccgg tccccgagca 3538
agcctgggaa ctcaggaaaa ttcacaggac ttgggagatt ctaaattctta agtgcaatta 3598
ttttaataaa 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
 <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 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>  5
<211>  952
<212>  PRT
<213>  Homo sapiens

<400>  5

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
 <210> 6
 <211> 896
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 6
 Gln Gln Gly Ala Ser Arg Pro Gly Pro Arg Asp Ala Gln Ala His Pro
 1 5 10 15
 Gly Arg Pro Arg Ala Val Pro Thr Gln Cys Asp Val Pro Pro Asn Ser
 20 25 30
 Arg Phe Asp Cys Ala Pro Asp Lys Ala Ile Thr Gln Glu Gln Cys Glu
 35 40 45
 Ala Arg Gly Cys Cys Tyr Ile Pro Ala Lys Gln Gly Leu Gln Gly Ala
 50 55 60
 Gln Met Gly Gln Pro Trp Cys Phe Phe Pro Pro Ser Tyr Pro Ser Tyr
 65 70 75 80
 Lys Leu Glu Asn Leu Ser Ser Ser Glu Met Gly Tyr Thr Ala Thr Leu
 85 90 95
 Thr Arg Thr Thr Pro Thr Phe Phe Pro Lys Asp Ile Leu Thr Leu Arg
 100 105 110
 Leu Asp Val Met Met Glu Thr Glu Asn Arg Leu His Phe Thr Ile Lys
 115 120 125
 Asp Pro Ala Asn Arg Arg Tyr Glu Val Pro Leu Glu Thr Pro Arg Val
 130 135 140
 His Ser Arg Ala Pro Ser Pro Leu Tyr Ser Val Glu Phe Ser Glu Glu
 145 150 155 160
 Pro Phe Gly Val Ile Val His Arg Gln Leu Asp Gly Arg Val Leu Leu
 165 170 175
 Asn Thr Thr Val Ala Pro Leu Phe Phe Ala Asp Gln Phe Leu Gln Leu
 180 185 190
 Ser Thr Ser Leu Pro Ser Gln Tyr Ile Thr Gly Leu Ala Glu His Leu
 195 200 205
 Ser Pro Leu Met Leu Ser Thr Ser Trp Thr Arg Ile Thr Leu Trp Asn

210	215	220
Arg Asp Leu Ala Pro Thr Pro Gly Ala Asn Leu Tyr Gly Ser His Pro		
225	230	235 240
Phe Tyr Leu Ala Leu Glu Asp Gly Gly Ser Ala His Gly Val Phe Leu		
	245	250 255
Leu Asn Ser Asn Ala Met Asp Val Val Leu Gln Pro Ser Pro Ala Leu		
	260	265 270
Ser Trp Arg Ser Thr Gly Gly Ile Leu Asp Val Tyr Ile Phe Leu Gly		
	275	280 285
Pro Glu Pro Lys Ser Val Val Gln Gln Tyr Leu Asp Val Val Gly Tyr		
	290	295 300
Pro Phe Met Pro Pro Tyr Trp Gly Leu Gly Phe His Leu Cys Arg Trp		
	305	310 315 320
Gly Tyr Ser Ser Thr Ala Ile Thr Arg Gln Val Val Glu Asn Met Thr		
	325	330 335
Arg Ala His Phe Pro Leu Asp Val Gln Trp Asn Asp Leu Asp Tyr Met		
	340	345 350
Asp Ser Arg Arg Asp Phe Thr Phe Asn Lys Asp Gly Phe Arg Asp Phe		
	355	360 365
Pro Ala Met Val Gln Glu Leu His Gln Gly Gly Arg Arg Tyr Met Met		
	370	375 380
Ile Val Asp Pro Ala Ile Ser Ser Ser Gly Pro Ala Gly Ser Tyr Arg		
	385	390 395 400
Pro Tyr Asp Glu Gly Leu Arg Arg Gly Val Phe Ile Thr Asn Glu Thr		
	405	410 415
Gly Gln Pro Leu Ile Gly Lys Val Trp Pro Gly Ser Thr Ala Phe Pro		
	420	425 430
Asp Phe Thr Asn Pro Thr Ala Leu Ala Trp Trp Glu Asp Met Val Ala		
	435	440 445
Glu Phe His Asp Gln Val Pro Phe Asp Gly Met Trp Ile Asp Met Asn		
	450	455 460
Glu Pro Ser Asn Phe Ile Arg Gly Ser Glu Asp Gly Cys Pro Asn Asn		
	465	470 475 480
Glu Leu Glu Asn Pro Pro Tyr Val Pro Gly Val Val Gly Gly Thr Leu		
	485	490 495
Gln Ala Ala Thr Ile Cys Ala Ser Ser His Gln Phe Leu Ser Thr His		
	500	505 510
Tyr Asn Leu His Asn Leu Tyr Gly Leu Thr Glu Ala Ile Ala Ser His		
	515	520 525
Arg Ala Leu Val Lys Ala Arg Gly Thr Arg Pro Phe Val Ile Ser Arg		
	530	535 540
Ser Thr Phe Ala Gly His Gly Arg Tyr Ala Gly His Trp Thr Gly Asp		
	545	550 555 560

Val Trp Ser Ser Trp Glu Gln Leu Ala Ser Ser Val Pro Glu Ile Leu
 565 570 575
 Gln Phe Asn Leu Leu Gly Val Pro Leu Val Gly Ala Asp Val Cys Gly
 580 585 590
 Phe Leu Gly Asn Thr Ser Glu Glu Leu Cys Val Arg Trp Thr Gln Leu
 595 600 605
 Gly Ala Phe Tyr Pro Phe Met Arg Asn His Asn Ser Leu Leu Ser Leu
 610 615 620
 Pro Gln Glu Pro Tyr Ser Phe Ser Glu Pro Ala Gln Gln Ala Met Arg
 625 630 635 640
 Lys Ala Leu Thr Leu Arg Tyr Ala Leu Leu Pro His Leu Tyr Thr Leu
 645 650 655
 Phe His Gln Ala His Val Ala Gly Glu Thr Val Ala Arg Pro Leu Phe
 660 665 670
 Leu Glu Phe Pro Lys Asp Ser Ser Thr Trp Thr Val Asp His Gln Leu
 675 680 685
 Leu Trp Gly Glu Ala Leu Leu Ile Thr Pro Val Leu Gln Ala Gly Lys
 690 695 700
 Ala Glu Val Thr Gly Tyr Phe Pro Leu Gly Thr Trp Tyr Asp Leu Gln
 705 710 715 720
 Thr Val Pro Ile Glu Ala Leu Gly Ser Leu Pro Pro Pro Pro Ala Ala
 725 730 735
 Pro Arg Glu Pro Ala Ile His Ser Glu Gly Gln Trp Val Thr Leu Pro
 740 745 750
 Ala Pro Leu Asp Thr Ile Asn Val His Leu Arg Ala Gly Tyr Ile Ile
 755 760 765
 Pro Leu Gln Gly Pro Gly Leu Thr Thr Thr Glu Ser Arg Gln Gln Pro
 770 775 780
 Met Ala Leu Ala Val Ala Leu Thr Lys Gly Gly Glu Ala Arg Gly Glu
 785 790 795 800
 Leu Phe Trp Asp Asp Gly Glu Ser Leu Glu Val Leu Glu Arg Gly Ala
 805 810 815
 Tyr Thr Gln Val Ile Phe Leu Ala Arg Asn Asn Thr Ile Val Asn Glu
 820 825 830
 Leu Val Arg Val Thr Ser Glu Gly Ala Gly Leu Gln Leu Gln Lys Val
 835 840 845
 Thr Val Leu Gly Val Ala Thr Ala Pro Gln Gln Val Leu Ser Asn Gly
 850 855 860
 Val Pro Val Ser Asn Phe Thr Tyr Ser Pro Asp Thr Lys Val Leu Asp
 865 870 875 880
 Ile Cys Val Ser Leu Leu Met Gly Glu Gln Phe Leu Val Ser Trp Cys
 885 890 895