



(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)



1-0052101

(51)⁸ C12N 9/26

(13) B

(21) 1-2018-04832

(22) 30/03/2017

(86) PCT/US2017/024981 30/03/2017

(87) WO2017/173059 A1 05/10/2017

(30) 62/315, 400 30/03/2016 US; 62/457, 584 10/02/2017 US; 15/473, 994 30/03/2017 US

(45) 25/09/2025 450

(43) 25/02/2019 371A

(73) Amicus Therapeutics, Inc. (US)

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

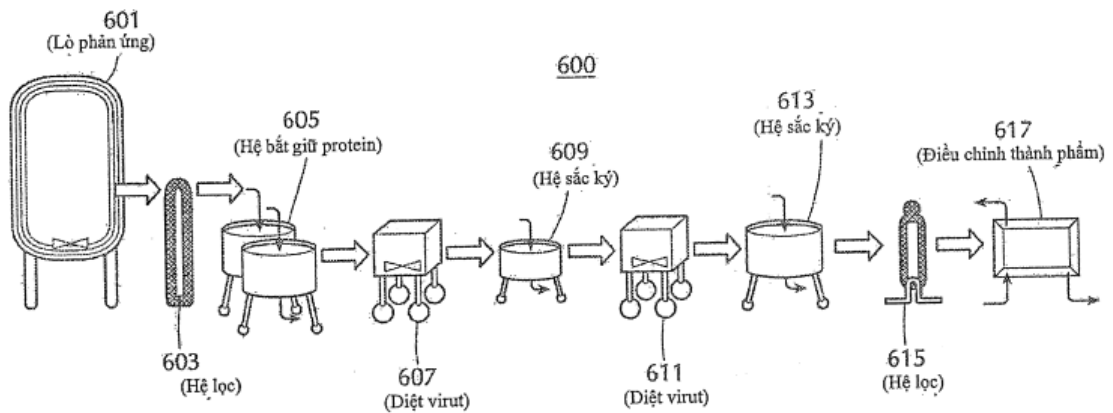
(72) DO, Hung V. (US); GOTSCHALL, Russell (US).

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

(54) PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT AXIT A-GLUCOSIDAZA TÁI TỔ HỢP Ở NGƯỜI

(21) 1-2018-04832

(57) Sáng chế đề xuất phương pháp axit α -glucosidaza tái tổ hợp ở người (rhGAA). Protein lysosom tái tổ hợp của người có thể có hàm lượng cao của gốc manozơ-6-phosphat. Còn được mô tả là được phẩm chứa protein lysosom tái tổ hợp của người này.



HÌNH 6

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Nguyên tắc và phương án của sáng chế nói chung liên quan đến việc sản xuất protein tái tổ hợp, cụ thể là enzym lysosom mà có hàm lượng mannoza-6-phosphat cao.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

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 mucopolysaccharit 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. Ví dụ, bệnh Pompe, còn gọi là bệnh thiếu hụt axit maltaza hoặc bệnh dự trữ glycogen loại II, là một trong một vài rối loạn dự trữ lysosom. Các ví dụ khác về rối loạn lysosom bao gồm bệnh Gaucher, bệnh GM1-gangliosidosis, bệnh fucosidosis, bệnh 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, polysaccharit 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 phồng rộp 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 nhiều 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

2

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 lòi 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®, từ 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.

3

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 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 mannoza-6-phosphat (M6P). Các gốc này liên kết các thụ thể mannoza-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.

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

Các loại khác của N-glycan, carbohydrat phức hợp, mà có chứa galactosa và axit sialic, cũng có mặt trên rhGAA. Vì N-glycan phức hợp không được phosphoryl hóa nên

4

chúng không có ái lực đối với CIMPR. Tuy nhiên, N-glycan kiểu phức hợp với các gốc galactosa được bộc lộ có ái lực từ trung bình đến cao đối với thụ thể asialoglycoprotein trên tế bào gan mà dẫn đến sự thanh thải không hữu ích nhanh của rhGAA (Hình 2B).

Các quy trình sản xuất hiện nay được dùng để tạo ra rhGAA thông thường, như Myozyme®, Lumizyme® hoặc alglucosidaza alfa, không làm tăng đáng kể hàm lượng của M6P hoặc bis-M6P bởi vì việc xử lý carbohydrate tế bào vốn phức tạp và cực khó thao tác. Theo đó, vẫn có nhu cầu đối với việc cải tiến hơn nữa cho liệu pháp chữa bệnh thay thế enzym để điều trị bệnh Pompe, như các quy trình sản xuất, bắt giữ và tinh chế đối với rhGAA.

Tương tự, các protein tái tổ hợp khác mà nhắm đích lysosom, như các enzym lysosom khác, cũng liên kết CIMPR. Tuy nhiên, các quy trình sản xuất hiện nay thường tạo ra các protein tái tổ hợp thông thường khác mà nhắm đích lysosom không tạo ra protein tái tổ hợp với hàm lượng M6P hoặc bis-M6P cao. Theo đó, cũng vẫn có nhu cầu đối với các cải tiến nữa trong các quy trình sản xuất, bắt giữ và tinh chế đối với các protein tái tổ hợp khác.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Một khía cạnh của sáng chế đề cập đến phương pháp sản xuất protein lysosom tái tổ hợp của người. Theo nhiều phương án khác nhau của khía cạnh này, phương pháp bao gồm nuôi cấy tế bào chủ trong lò phản ứng sinh học mà tiết ra protein lysosom tái tổ hợp của người, loại bỏ môi trường khỏi lò phản ứng, lọc môi trường để tạo ra phần lọc, nạp phần lọc lên cột sắc ký trao đổi anion (AEX) để bắt giữ protein lysosom và rửa giải sản phẩm protein thứ nhất từ cột AEX.

Theo một hoặc nhiều phương án, protein lysosom tái tổ hợp của người là α -glucosidaza tái tổ hợp của người (rhGAA). Theo một hoặc nhiều phương án, rhGAA chứa trình tự axit amin có ít nhất là 95% tương đồng với SEQ ID NO: 2.

Theo một hoặc nhiều phương án, phương pháp còn bao gồm việc nạp sản phẩm protein thứ nhất lên cột sắc ký, và rửa giải sản phẩm protein thứ hai từ cột. Theo một số phương án, cột là cột sắc ký ái lực cố định ion kim loại (IMAC)

5

Theo một hoặc nhiều phương án, phương pháp còn bao gồm việc nạp sản phẩm protein thứ hai lên cột sắc ký, và rửa giải sản phẩm protein thứ ba từ cột sắc ký. Theo một số phương án, cột sắc ký thứ ba được chọn từ cột sắc ký trao đổi cation (CEX) và cột sắc ký loại kích thước (SEC).

Theo một hoặc nhiều phương án, việc lọc môi trường được chọn từ lọc dòng chảy tiếp tuyến xoay chiều (ATF) và lọc dòng chảy tiếp tuyến (TFF).

Theo một hoặc nhiều phương án, phương pháp còn bao gồm làm bất hoạt virus trong một hoặc nhiều trong số sản phẩm protein thứ nhất, sản phẩm protein thứ hai và sản phẩm protein thứ ba.

Theo một hoặc nhiều phương án, phương pháp còn bao gồm việc lọc sản phẩm protein thứ hai hoặc sản phẩm protein thứ ba để tạo ra sản phẩm lọc và nạp đầy lọ với sản phẩm đã lọc. Theo một hoặc nhiều phương án, phương pháp còn bao gồm việc đông khô sản phẩm đã lọc.

Theo một hoặc nhiều phương án, tế bào chủ bao gồm tế bào trứng chuột đồng Trung Quốc (CHO). Theo một số phương án, tế bào chủ bao gồm dòng tế bào CHO GA-ATB-200 hoặc ATB-200-X5-14 hoặc dòng tế bào cấy chuyển của chúng.

Theo một hoặc nhiều phương án, (i) ít nhất 90% của sản phẩm protein thứ nhất hoặc sản phẩm protein thứ hai hoặc sản phẩm protein thứ ba liên kết với thụ thể mannoza-6-phosphat không phụ thuộc cation (CIMPR) hoặc (ii) ít nhất 90% của sản phẩm protein thứ nhất hoặc sản phẩm protein thứ hai hoặc sản phẩm protein thứ ba chứa N-glycan mang mono-mannoza-6-phosphat (mono-M6P) hoặc bis-mannoza-6-phosphat (bis-M6P).

Theo một hoặc nhiều phương án, protein lysosom tái tổ hợp của người là rhGAA chứa bảy vị trí N-glycosyl hóa tiềm năng, ít nhất 50% phân tử của rhGAA chứa đơn vị N-glycan mang hai gốc mannoza-6-phosphat tại vị trí thứ nhất, ít nhất 30% phân tử của rhGAA chứa đơn vị N-glycan mang một gốc mannoza-6-phosphat tại vị trí thứ hai, ít nhất 30% phân tử của rhGAA chứa đơn vị N-glycan mang hai gốc mannoza-6-phosphat tại vị trí thứ tư, và ít nhất 20% phân tử của rhGAA chứa đơn vị N-glycan mang một gốc mannoza-6-phosphat tại vị trí thứ tư.

Khía cạnh khác của sáng chế đề cập đến sản phẩm protein tái tổ hợp được sản xuất bằng bất kỳ trong số các phương pháp được mô tả ở đây.

6

Khía cạnh khác của sáng chế đề cập đến dược phẩm chứa sản phẩm protein tái tổ hợp và chất mang dược dụng.

Khía cạnh khác nữa của sáng chế đề cập đến phương pháp để điều trị rối loạn dự trữ lysosom, phương pháp bao gồm việc dùng dược phẩm cho bệnh nhân cần chúng.

Theo một hoặc nhiều phương án, rối loạn dự trữ lysosom là bệnh Pompe và protein tái tổ hợp là rhGAA. Theo một hoặc nhiều phương án, bệnh nhân được dùng đồng thời chất đi kèm dược lý đối với α -glucosidaza trong vòng 4 giờ dùng dược phẩm chứa sản phẩm rhGAA. Theo một số phương án, chất đi kèm dược lý được chọn từ 1-deoxynojirimyxin và N-butyl-deoxynojirimyxin. Theo một số phương án, chất đi kèm dược lý được điều chế đồng thời với sản phẩm rhGAA.

[Các phương án khác nhau được nêu dưới đây. Cần hiểu rằng các phương án được liệt kê dưới đây có thể được kết hợp không chỉ như nêu dưới đây, mà còn theo các kết hợp thích hợp bất kỳ khác theo phạm vi của sáng chế.

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 1A thể hiện glycan manosa cao không được phosphoryl hóa, glycan mono-M6P, và glycan bis-M6P.

Hình 1B thể hiện cấu trúc hóa học của nhóm M6P.

Hình 2A mô tả sự hướng đích hữu ích của rhGAA thông qua glycan mang M6P đến mô đích (ví dụ mô cơ của đối tượng mắc bệnh Pompe).

Hình 2B mô tả sự thanh thải thuốc không hữu ích đến mô không phải là đích (ví dụ gan và lách) hoặc bằng cách liên kết glycan không có M6P với mô không phải là đích.

Hình 3A minh họa bằng đồ thị thụ thể CIMPR (còn gọi là thụ thể IGF2) và các miền của thụ thể này.

Hình 3B là bảng thể hiện ái lực liên kết (nmolar) của glycan mang bis- và mono-M6P đối với CIMPR, ái lực liên kết của glycan kiểu manosa cao với thụ thể manosa, và ái lực liên kết của glycan phức được khử sialyl hóa đối với thụ thể asialyoglycoprotein. RhGAA có glycan mang M6P và bis-M6P có thể liên kết hữu ích với CIMPR trên cơ.

7

Các Hình 4A và 4B, tương ứng, là các biểu đồ 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 thiếu glycan có M6P cần để hướng đích CIMPR ở mô cơ đích.

Hình 5 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 6 là sơ đồ đại cương của quy trình ví dụ để sản xuất, bắt giữ và tinh chế protein lysosom tái tổ hợp.

Các Hình 7A và 7B, tương ứng, là các biểu đồ thể hiện các kết quả của sắc ký ái lực CIMPR của Myozyme® và rhGAA ATB200. Như thấy rõ ràng từ Hình 7B, khoảng 70% rhGAA trong rhGAA ATB200 có chứa M6P.

Hình 8 là biểu đồ 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 9 là biểu đồ thể hiện các biên dạng rửa giải Polywax của Lumizyme® và rhGAA ATB200.

Hình 10 là bảng 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 11A-11H thể hiện kết quả của phân tích sự N-glycosyl hóa đặc hiệu vị trí của rhGAA ATB200.

Hình 12A là biểu đồ 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 12B là bảng so sánh hàm lượng Bis-M6P của Lumizyme® và rhGAA ATB200.

Hình 13A là biểu đồ 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.

8

Hình 13B là bảng 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 13C là bảng so sánh $K_{\text{hấp thu}}$ của nguyên bào sợi từ đối tượng bình thường và đối tượng mắc Bệnh Pompe.

Hình 14A là biểu đồ thể hiện lượng glycogen so với liều lượng axit α -glucosidaza tái tổ hợp trong cơ tim chuột sau khi tiếp xúc với chất dẫn thuốc (đối chứng âm), với 20 mg/ml alglucosidaza alfa (Lumizyme®), hoặc với 5, 10 hoặc 20 mg/kg ATB200.

Hình 14B là biểu đồ thể hiện lượng glycogen so với liều lượng axit α -glucosidaza tái tổ hợp trong cơ tứ đầu đùi chuột sau khi tiếp xúc với chất dẫn thuốc (đối chứng âm), với 20 mg/ml alglucosidaza alfa (Lumizyme®), hoặc với 5, 10 hoặc 20 mg/kg ATB200.

Hình 14C là biểu đồ thể hiện lượng glycogen so với liều lượng axit α -glucosidaza tái tổ hợp trong cơ tam đầu đùi ở chuột sau khi tiếp xúc với chất dẫn thuốc (đối chứng âm), với 20 mg/ml alglucosidaza alfa (Lumizyme®), hoặc với 5, 10 hoặc 20 mg/kg ATB200.

Hình 15 là bảng thể hiện rằng sự kết hợp của rhGAA ATB200 và chất đi kèm miglustat tạo ra sự thanh thải glycogen tốt hơn đáng kể ở chuột bị bất hoạt GAA so với điều trị bằng Lumizyme® hoặc rhGAA ATB200 không có chất đi kèm miglustat.

Hình 16 là dãy ảnh chụp hiển vi của cơ tim, cơ hoành và cơ đùi từ chuột kiểu đại và chuột đã bị làm bất hoạt Gaa được điều trị bằng chất dẫn thuốc, alglucosidaza alfa và ATB200 với sự có mặt và không có mặt của miglustat, thể hiện hàm lượng của protein màng liên kết lysosom (LAMP-1).

Hình 17 là dãy ảnh chụp hiển vi của cơ tim và cơ đùi từ chuột kiểu đại và chuột đã bị làm bất hoạt Gaa được điều trị bằng chất dẫn thuốc, alglucosidaza alfa và ATB200 với 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 18 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 chất dẫn thuốc, alglucosidaza alfa và ATB200 với sự có mặt và không có mặt của miglustat, được nhuộm màu bằng xanh metylen để thể hiện không bào (được chỉ bằng mũi tên).

9

Hình 19 là dãy ảnh chụp hiển vi (40x) của cơ tứ đầu đùi từ chuột kiểu đại và chuột đã bị làm bất hoạt *Gaa* được điều trị bằng chất dẫn thuốc, *alglucosidaza* alfa và ATB200 với 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 20A và 20B, tương ứng, là các biểu đồ thể hiện kết quả của sắc ký ái lực CIMPR của enzym α -galactosidaza A tái tổ hợp (α -Gal A) trước và sau khi bắt giữ và tinh chế trên cột trao đổi anion (AEX).

Các Hình 21A và 21B 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 chất dẫn thuốc, *alglucosidaza* alfa và ATB200 với sự có mặt của *miglustat*.

Các Hình 22A-22G là các biểu đồ thể hiện các mức 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 chất dẫn thuốc, *alglucosidaza* alfa và ATB200 với sự có mặt và không có mặt của *miglustat*.

Hình 23 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.

Hình 24 thể hiện mô hình nghiên cứu của nghiên cứu nhãn mở, trình tự cố định, liều tăng dần, lần đầu tiên ở người, pha 1/2 để đánh giá tính an toàn, khả năng chịu thuốc, PK, PD, và hiệu quả của việc truyền trong tĩnh mạch ATB200 được dùng đồng thời với *miglustat* dùng qua đường miệng ở người lớn mắc bệnh Pompe.

Các Hình 25A-25B 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 25C là biểu đồ thể hiện AUC của tổng số protein GAA trong huyết tương ở các đối tượng là người 20 mg/kg ATB200, 20 mg/kg ATB200 và 130 mg *miglustat*, hoặc 20 mg/kg ATB200 và 260 mg *miglustat*.

10

Hình 25D là biểu đồ thể hiện các biên dạng nồng độ-thời gian của tổng số protein GAA trong huyết tương ở hai đối tượng là người sau khi dùng liều lượng 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 of miglustat.

Các Hình 27A-27D là các biểu đồ thể hiện thay đổi về mức alanin aminotransferaza (ALT), aspartat aminotransferaza (AST), creatin phosphokinaza (CPK) và hexoza tetrasacarit (Hex4) ở các bệnh nhân là người sau khi dùng liều lượng tăng dần của ATB200 (5, 10 và 20 mg/kg) sau đó dùng phối hợp ATB200 (20 mg/kg) và miglustat (130 và 260 mg).

Mô tả chi tiết sáng chế

Trước khi mô tả một vài phương án ví dụ của sáng chế, cần hiểu rằng sáng chế không bị giới hạn ở các chi tiết của cấu trúc hoặc các bước của quy trình được đề cập trong phần mô tả sau đây. Sáng chế có khả năng là các phương án khác và được thực hành hoặc thực hiện theo nhiều cách khác nhau.

Mặc dù viện dẫn cụ thể đến GAA, chuyên gia trong lĩnh vực sẽ hiểu rằng các phương pháp được mô tả ở đây có thể được sử dụng để sản xuất, bắt giữ và tinh chế các protein tái tổ hợp khác mà nhắm đích lysosom, bao gồm nhưng không giới hạn ở enzym lysosom α -galactosidaza A.

Các khía cạnh khác nhau của sáng chế đề cập đến phương pháp mới để sản xuất, bắt giữ và tinh chế protein lysosom tái tổ hợp của người, như axit α -glucosidaza tái tổ hợp của người (rhGAA). Các khía cạnh khác của sáng chế đề cập đến protein tái tổ hợp được tạo ra bởi các quy trình được mô tả ở đây, cũng như được phẩm, phương pháp điều trị, và sử dụng protein tái tổ hợp này.

Định nghĩa

Các thuật ngữ dùng trong bản mô tả này thường có nghĩa thông thường trong lĩnh vực, trong ngữ cảnh của sáng chế này và trong ngữ cảnh cụ thể sử dụng mỗi thuật ngữ này. Các thuật ngữ nhất định được thảo luận dưới đây, hoặc ở nơi nào đó trong bản mô tả,

11

để cung cấp chỉ dẫn bổ sung cho người thực hành trong việc mô tả hợp phần và phương pháp theo sáng chế và làm thế nào để tạo ra và sử dụng chúng.

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 ở đây, thuật ngữ "protein lysosom" đề cập đến protein bất kỳ mà nhắm đích lysosom, như enzym lysosom. Các ví dụ của enzym lysosom và bệnh liên quan được đề xuất trong Bảng 1 dưới đây:

Bảng 1

Enzym lysosom	Bệnh
Axit α -glucosidaza	Bệnh Pompe
α -galactosidaza A	Bệnh Fabry
Axit β -glucosidaza	Bệnh Gaucher
α -L-iduronidaza	Bệnh Hurler-Scheie
Iduronat sulfataza	Bệnh Hunter
β -galactosidaza	Bệnh GM1-gangliosidosis; Bệnh Morquio B
β -glucuronidaza	Bệnh Sly (MPS VI)
α -fucosidaza	Bệnh Fucosidosis
Axit sphingomyelinaza	Bệnh Niemann-Pick A và B
β -hexosaminidaza A	Bệnh Tay Sachs
β -hexosaminidaza B	Bệnh Sandhoff
β -galactocerebrosidaza	Bệnh Krabbe
Axit ceramidaza	Bệnh Farber
Heparan-N-sulfataza	Bệnh Sanfilippo A (MPS IIIa)
α -N-acetyl-glucosaminidaza	Bệnh Sanfilippo B (MPS IIIb)
α -glucosaminid N-acetyltransferaza	Bệnh Sanfilippo C (MPS IIIc)
N-acetylglucosamin-6-sulfat sulfataza	Bệnh Sanfilippo D (MPS IIId)

12

N-acetylgalactosamin-6-sulfat sulfataza	Bệnh Morquio A (MPS Ivb)
Arylsulfataza A	Loạn dưỡng chất trắng nhược sắc
Arylsulfataza B	Bệnh Maroteaux-Lamy (MPS VI)
Axit lipaza	Bệnh sói điên
axit α -mannosidaza	Bệnh α -mannosidosis
axit β -mannosidaza	Bệnh β -mannosidosis
α -N-acetyl-neuraminidaza	Bệnh Sialidosis
α -N-acetylgalactosaminidaza	Bệnh Schindler-Kanzaki
N-aspartyl- β -glucosaminidaza	Bệnh Aspartylglucosaminuria

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "bệnh Pompe," còn được gọi là bệnh thiếu hụt axit maltaza, bệnh dự trữ glycogen loại II (GSDII), và glycogenosis loại II, để chỉ rối loạn dự trữ lysosom di truyền đặc trưng bởi sự đột biến ở gen GAA, mà 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.

13

Như được sử dụng ở đây, 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 phải của người, bao gồm nhưng không giới hạn ở gen ở chuột hoặc chuột nhắt, và chữ viết tắt "Gaa" nhằm để chỉ enzym axit α -glucosidaza không phải của 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 tháng một năm 2016, dưới dạng các sản phẩm Lumizyme® và Myozyme®.

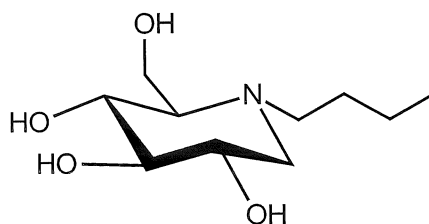
Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "ATB200" nhằm để chỉ axit α -glucosidaza tái tổ hợp ở người được mô tả trong đơn sáng chế đồng tồn tại PCT/US2015/053252, phần bộc lộ của chúng được viện dẫn trong bản mô tả này để tham khảo.

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-axetylglucosamin, mannoza, 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 manozơ cao" nhằm để chỉ N-glycan có từ một đến sáu đơn vị manozơ hoặc nhiều hơn. Theo ít nhất một phương án, đơn vị N-glycan manozơ cao có thể có chứa chuỗi bis(N-axetylglucosamin) liên kết với gốc asparagin và còn liên kết với chuỗi polymanozơ phân nhánh. Như được sử dụng thay thế lẫn nhau trong bản mô tả này, thuật ngữ "M6P" hoặc "manozơ-6-phosphat" nhằm để chỉ đơn vị manozơ 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 manozơ của một hoặc nhiều đơn vị N-glycan được phosphoryl hóa tại vị trí 6 để tạo ra đơn vị manozơ-6-phosphat. Theo ít nhất một phương án, thuật ngữ "M6P" hoặc "manozơ-6-phosphat" đề cập đến cả manozơ phosphodiester có N-axetylglucosamin (GlcNAc) làm "mũ" trên nhóm phosphat, cũng như là đơn vị manozơ 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 galactozơ và/hoặc đơn vị axit sialic. Theo ít nhất một phương án, N-glycan phức hợp có thể là N-glycan manozơ cao trong đó một hoặc nhiều đơn vị manozơ còn liên kết với một hoặc nhiều đơn vị monosacarit mà mỗi đơn vị monosacarit được chọn độc lập từ N-axetylglucosamin, galactozơ và axit sialic. Như được sử dụng ở đây, hợp chất miglustat, còn gọi là N-butyl-1-deoxynojirimycin 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:

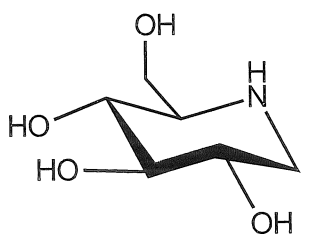


Một chế phẩm của miglustat được tiếp thị trên thị trường với tên thương mại là Zavesca® dưới dạng đơn trị liệu đối với bệnh Gaucher loại 1.

15

Như được thảo luận dưới đây, cũng có thể sử dụng các muối được dùng 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 ở đây, hợp chất divoglustat, còn gọi là 1-deoxynojirimycin hoặc DNJ hoặc (2*R*,3*R*,4*R*,5*S*)-2-(hydroxymethyl)piperidin-3,4,5-triol, là hợp chất có công thức hóa học sau đây:



Khi sử dụng muối của divoglustat được sử dụng, liều lượng muối sẽ được điều chỉnh sao cho liều lượng divoglustat được bệnh nhân tiếp nhận tương đương với lượng mà đã được tiếp nhận có bazơ không chứa divoglustat được sử dụng.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "chất đi kèm dược lý" hoặc đôi khi đơn giản là thuật ngữ "chất đi kèm" nhằm để chỉ phân tử mà liên kết đặc hiệu với protein lysosom 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 di chuyển đúng 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 protein.

Do đó, chất đi kèm có dược 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

16

(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.

Như được sử dụng ở đây, the "lượng có hiệu quả chữa bệnh" và "lượng có hiệu quả" nhằm đề cập đến lượng của protein lysosom tái tổ hợp của người (ví dụ rhGAA) và/hoặc của chất đi kèm và/hoặc của 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; tật 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 chất đi kèm (ví dụ miglustat) mà có tác dụng ức chế lên axit α -

glucosidaza có thể cấu thành "lượng có hiệu quả" 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 chất đi kèm khi dung trong cơ thể.

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 trong ống nghiệm, 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

18

bang hoặc tiểu bang phê chuẩn hoặc được liệt kê trong Dược Điển Hoa Kỳ hoặc được 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 thể 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 xytokin 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

19

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

20

aspartic, axit benzensulfonic, axit benzoic, axit butyric, axit camphoric, axit camphorsulfonic, axit xinamic, axit xitric, axit digluconic, 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 dùng" 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 dùng bao gồm nhưng không giới hạn ở các muối của amin bậc một, bậc hai, và 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, như metylamin, dimetylamin, trimetylamin, etylamin, dietylamin, trietylamin, isopropylamin, tripropylamin, tributylamin, etanolamin, dietanolamin, 2-dimethylaminoetanol, 2-diethylaminoetanol, dicyclohexylamin, lysin, arginin, histidin, cafein, hydrabamin, cholin, betain, etylendiamin, glucosamin, methylglucamin, theobromin, purin, piperazin, piperidin, N-etylpiperidin, hợp chất tetrametylamoni, hợp chất tetraetylamoni, pyridin, N,N-dimetylanilin, N-metylpiperidin, N-metylmorpholin, dicyclohexylamin, dibenzylamin, N,N-dibenzylphenetylamin, 1-phenamin, N,N'-dibenzyletylendiamin, nhựa polyamin và tương tự.

rhGAA ATB200

Theo ít nhất một phương án, protein lysosom tái tổ hợp của người (ví dụ rhGAA) được biểu hiện ở tế bào trứng chuột đồng Trung Quốc (CHO) và chứa hàm lượng tăng của

21

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 protein lysosom tái tổ hợp thông thường của người như 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 ($K_{hấp thu} \sim 7-14$ nM). ATB200 được xác định đặc điểm *trong cơ thể* 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 hoặc SEQ ID NO: 2.

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

22

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

23

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

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

24

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

25

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 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 -

26

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: 2, 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 thiếu và/hoặc sự chèn so với trình tự axit amin được mô tả trong SEQ ID NO: 1 hoặc SEQ ID NO: 2. 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 đồng phân 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 hoặc SEQ ID NO: 2, 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 cho GAA và biến thể ở người GAA cũng được dự định và có thể được dùng để biểu hiện tái tổ hợp rhGAA theo sáng chế.

Tốt hơn là, không nhiều hơn 70, 65, 60, 55, 45, 40, 35, 30, 25, 20, 15, 10, hoặc 5% tổng số phân tử protein lysosom tái tổ hợp của người (ví dụ rhGAA) thiếu đơn vị N-glycan mang một hoặc nhiều gốc manosa-6-phosphat hoặc thiếu khả năng liên kết với thụ thể manosa-6-phosphat không phụ thuộc cation (CIMPR). Tùy ý, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 99%, <100% hoặc nhiều hơn của các phân tử protein lysosom tái tổ hợp của người (ví dụ rhGAA) chứa ít nhất một đơn vị N-glycan mang một hoặc nhiều gốc manosa-6-phosphat hoặc có khả năng liên kết với CIMPR.

27

Phân tử protein lysosom tái tổ hợp của người (ví dụ rhGAA) có thể có 1, 2, 3 hoặc 4 nhóm manosa-6-phosphat (M6P) trên glycan của chúng. Ví dụ, chỉ một N-glycan trên phân tử protein lysosom tái tổ hợp của 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 protein lysosom tái tổ hợp của người có thể mang nhóm M6P đơn lẻ. Phân tử protein lysosom tái tổ hợp của người cũng có thể có các N-glycan không mang nhóm M6P. Theo phương án khác, trung bình N-glycan chứa nhiều hơn 3 mol/mol M6P và nhiều hơn 4 mol/mol axit sialic, such that protein lysosom tái tổ hợp của người chứa trung bình ít nhất 3 mol gốc manosa-6-phosphat trong mỗi mol protein lysosom tái tổ hợp của người và ít nhất 4 mol sialic axit trong mỗi mol protein lysosom tái tổ hợp của người. Trung bình ít nhất khoảng 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, hoặc 10% tổng số glycan trên protein lysosom tái tổ hợp của 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 khoảng 0,5, 1, 1,5, 2,0, 2,5, 3,0% tổng số glycan trên protein lysosom tái tổ hợp của người là ở dạng bis-M6P glycan và trung bình ít hơn 25% tổng số protein lysosom tái tổ hợp của người không có chứa glycan đã phosphoryl hóa liên kết với CIMPR.

Protein lysosom tái tổ hợp của người (ví dụ rhGAA) có thể có hàm lượng trung bình của N-glycan mang M6P nằm trong khoảng từ 0,5 đến 7,0 mol/mol protein lysosom 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 protein lysosom. Protein lysosom có thể được phân đoạn để tạo các chế phẩm protein lysosom với số lượng trung bình khác nhau của glycan có mang M6P hoặc bis-M6P do đó cho phép tùy chỉnh thêm protein lysosom 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.

Theo một số phương án, protein lysosom tái tổ hợp của người (ví dụ rhGAA) mang, trung bình là, từ 2,0 đến 8,0 mol M6P trong mỗi mol protein lysosom tái tổ hợp của người (ví dụ rhGAA). Khoảng giá trị này bao gồm tất cả các giá trị trung gian và các khoảng giá trị con bao gồm 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5 và 8,0 mol M6P/mol protein lysosom tái tổ hợp của người (ví dụ rhGAA).

28

Lên đến 60% N-glycan trên protein lysosom tái tổ hợp của người (ví dụ rhGAA) 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 không nhiều hơn 5%, 10%, 20% hoặc 30% N-glycan trên protein lysosom tái tổ hợp của người (ví dụ rhGAA) mang sialic axit 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 protein lysosom tái tổ hợp của người có thể mang sialic axit 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 protein lysosom tái tổ hợp của 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% of tổng số N-glycan trên protein lysosom tái tổ hợp của người trong chế phẩm có thể chỉ có galactosa ở đầu tận cùng và không có chứa axit sialic.

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

Theo một số phương án, protein lysosom tái tổ hợp của người (ví dụ rhGAA) mang, trung bình là, từ 2,0 đến 8,0 mol gốc axit sialic trong mỗi mol protein lysosom tái tổ hợp của người (ví dụ rhGAA). Khoảng giá trị này bao gồm tất cả các giá trị trung gian và các khoảng giá trị con bao gồm 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5 và 8,0 mol gốc/mol protein lysosom tái tổ hợp của người (ví dụ rhGAA). 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 protein lysosom tái tổ hợp của người (ví dụ rhGAA) bởi thụ thể asialoglycoprotein.

Theo một hoặc nhiều phương án, protein lysosom tái tổ hợp của người (ví dụ rhGAA) có đơn vị M6P và/hoặc sialic axit tại các vị trí N-glycosyl hóa nhất định của protein lysosom tái tổ hợp của người. Ví dụ, như đề cập ở trên, 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: 2: 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: 2 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: 2 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-

30

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: 2 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: 2 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: 2 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.

31

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: 2 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: 2 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.

Theo các phương án khác nhau, rhGAA có hàm lượng fucoza trung bình bằng 0-5 mol mỗi mol rhGAA, hàm lượng GlcNAc bằng 10-30 mol mỗi mol rhGAA, hàm lượng galactoza bằng 5-20 mol mỗi mol rhGAA, hàm lượng manozơ bằng 10-40 mol mỗi mol rhGAA, hàm lượng M6P bằng 2-8 mol mỗi mol rhGAA và hàm lượng axit sialic bằng 2-8 mol mỗi mol rhGAA. Theo các phương án khác nhau, rhGAA có hàm lượng fucoza trung bình bằng 2-3 mol mỗi mol rhGAA, hàm lượng GlcNAc bằng 20-25 mol mỗi mol rhGAA, hàm lượng galactoza bằng 8-12 mol mỗi mol rhGAA, hàm lượng manozơ bằng 22-27 mol mỗi mol rhGAA, hàm lượng M6P bằng 3-5 mol mỗi mol rhGAA và hàm lượng axit sialic bằng 4-7 mol rhGAA.

Protein lysosom tái tổ hợp của người (ví dụ rhGAA) là được sản xuất bởi tế bào trứng chuột đồng Trung Quốc (CHO), như dòng tế bào CHO GA-ATB-200 hoặc ATB-200-001-X5-14, hoặc bởi dòng tế bào cấy chuyển 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

32

hoặc các trình tự axit amin của axit α -glucosidaza biến thể khác như các trình tự mà có ít nhất 90%, 95%, 98% hoặc 99% tương đồng với SEQ ID NO: 1 hoặc SEQ ID NO: 2, có thể được tạo cấu trúc và được biểu hiện ở 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 chèn so với SEQ ID NO: 1 hoặc SEQ ID NO: 2, như có 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 hoặc sự làm khuyết, sự thế và/hoặc sự chèn so với trình tự axit amin được mô tả bởi SEQ ID NO: 1 hoặc SEQ ID NO: 2. 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 axit α -glucosidaza tái tổ hợp của người có khả năng cao để nhắm đích thụ thể manosa-6-phosphat không phụ thuộc cation (CIMPR) và lysosom tế bào cũng như các kiểu glycosyl hóa mà làm giảm sự thanh

33

thải không hữu ích trong cơ thể có thể được sản xuất bằng cách sử dụng 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 mannoza-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 N-glycan mannoza-6-phosphat (M6P) và bis-mannoza-6-phosphat hướng đích tế bào cơ hơn đáng kể so với axit α -glucosidaza thông thường, 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 thể hiện 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 dược động học thuận lợi và làm giảm sự thanh thải không hữu ích trong cơ thể.

Cũng dự tính rằng sự glycosyl hóa rộng của ATB200 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 khả năng gây miễn dịch của protein bằng cách tối thiểu hóa sự kết tụ protein cũng như bằng cách che các epitop protein gây miễn dịch khỏi hệ miễn dịch (Guidance for Industry – Immunogenicity Assessment for Therapeutic Protein Products, US Department of Health và Human Services, Food và Drug Administration, Center for Drug Evaluation và Research, Center for Biologics Evaluation và Research, tháng tám năm 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.

34

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 này là GA-ATB-200 hoặc ATB-200-001-X5-14, hoặc dòng tế bào cấy chuyển của chúng mà sản xuất chế phẩm 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 manosa cao không được phosphoryl hóa thấp.

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.

Sản xuất, Bất giữ và Tình chế Protein lysosom tái tổ hợp của người

Các phương án khác nhau của sáng chế đề cập đến phương pháp để sản xuất và/hoặc bất giữ và/hoặc tình chế protein lysosom tái tổ hợp của người (ví dụ rhGAA). Quy

35

trình ví dụ 600 để sản xuất, bắt giữ và tinh chế protein lysosom tái tổ hợp của người được thể hiện trên Hình 6.

Trên Hình 6, mũi tên chỉ hướng di chuyển đối với các pha lỏng khác nhau có chứa protein lysosom tái tổ hợp của người. Lò phản ứng 601 có chứa môi trường nuôi cấy tế bào, như tế bào CHO, mà biểu hiện và tiết protein lysosom tái tổ hợp của người (ví dụ rhGAA) vào môi trường nuôi cấy lỏng bao quanh. Lò phản ứng 601 có thể là lò phản ứng thích hợp bất kỳ để nuôi cấy tế bào, như lò phản ứng ngập, mẻ hoặc nạp theo mẻ. Theo các phương án khác nhau, lò phản ứng có thể tích nằm trong khoảng từ khoảng 1 L đến khoảng 20,000 L. Thể tích lò phản ứng ví dụ bao gồm khoảng 1 L, khoảng 10 L, khoảng 20 L, khoảng 30 L, khoảng 40 L, khoảng 50 L, khoảng 60 L, khoảng 70 L, khoảng 80 L, khoảng 90 L, khoảng 100 L, khoảng 150 L, khoảng 200 L, khoảng 250 L, khoảng 300 L, khoảng 350 L, khoảng 400 L, khoảng 500 L, khoảng 600 L, khoảng 700 L, khoảng 800 L, khoảng 900 L, khoảng 1,000 L, khoảng 1,500 L, khoảng 2,000 L, khoảng 2,500 L, khoảng 3,000 L, khoảng 3,500 L, khoảng 4,000 L, khoảng 5,000 L, khoảng 6,000 L, khoảng 7,000 L, khoảng 8,000 L, khoảng 9,000 L, khoảng 10,000 L, khoảng 15,000 L và khoảng 20,000 L.

Như được thể hiện trên Hình 6, môi trường nuôi cấy có thể được loại khỏi lò phản ứng. Việc loại môi trường này có thể tiếp tục đối với lò phản ứng ngập hoặc có thể từng mẻ đối với lò phản ứng mẻ hoặc nạp theo mẻ. Môi trường nuôi cấy được lọc bằng hệ lọc 603 để loại tế bào. Theo một số phương án, tế bào được loại từ môi trường nuôi cấy được đưa lại vào lò phản ứng và môi trường nuôi cấy bao gồm protein lysosom tái tổ hợp của người được tiết ra có thể được xử lý thêm. Hệ lọc 603 có thể là hệ lọc thích hợp bất kỳ, bao gồm hệ lọc dòng chảy tiếp tuyến xoay chiều (ATF), hệ lọc dòng chảy tiếp tuyến (TFF), hệ lọc ly tâm, v.v. Theo các phương án khác nhau, hệ lọc sử dụng máy lọc có kích thước lỗ nằm trong khoảng từ khoảng 10 nanomet đến khoảng 2 micromet. Kích thước lỗ lọc ví dụ bao gồm khoảng 10 nm, khoảng 20 nm, khoảng 30 nm, khoảng 40 nm, khoảng 50 nm, khoảng 60 nm, khoảng 70 nm, khoảng 80 nm, khoảng 90 nm, khoảng 100 nm, khoảng 150 nm, khoảng 200 nm, khoảng 250 nm, khoảng 300 nm, khoảng 350 nm, khoảng 400 nm, khoảng 500 nm, khoảng 600 nm, khoảng 700 nm, khoảng 800 nm, khoảng 900 nm, khoảng 1 μm , khoảng 1,5 μm và khoảng 2 μm .

36

Theo các phương án khác nhau, tốc độ loại môi trường nuôi cấy là nằm trong khoảng từ khoảng 1 L/ngày đến khoảng 20,000 L/ngày. Tốc độ loại môi trường nuôi cấy ví dụ bao gồm khoảng 1 L/ngày, khoảng 10 L/ngày, khoảng 20 L/ngày, khoảng 30 L/ngày, khoảng 40 L/ngày, khoảng 50 L/ngày, khoảng 60 L/ngày, khoảng 70 L/ngày, khoảng 80 L/ngày, khoảng 90 L/ngày, khoảng 100 L/ngày, khoảng 150 L/ngày, khoảng 200 L/ngày, khoảng 250 L/ngày, khoảng 300 L/ngày, khoảng 350 L/ngày, khoảng 400 L/ngày, khoảng 500 L/ngày, khoảng 600 L/ngày, khoảng 700 L/ngày, khoảng 800 L/ngày, khoảng 900 L/ngày, khoảng 1,000 L/ngày, khoảng 1,500 L/ngày, khoảng 2,000 L/ngày, khoảng 2,500 L/ngày, khoảng 3,000 L/ngày, khoảng 3,500 L/ngày, khoảng 4,000 L/ngày, khoảng 5,000 L/ngày, khoảng 6,000 L/ngày, khoảng 7,000 L/ngày, khoảng 8,000 L/ngày, khoảng 9,000 L/ngày, khoảng 10,000 L/ngày, khoảng 15,000 L/ngày và khoảng 20,000 L/ngày. Tùy ý, tốc độ loại môi trường nuôi cấy có thể được thể hiện là hàm của thể tích lò phản ứng, như thể tích lò phản ứng từ khoảng 0,1 đến khoảng 3 mỗi ngày. Tốc độ loại môi trường nuôi cấy ví dụ bao gồm khoảng 0,1, khoảng 0,2, khoảng 0,3, khoảng 0,4, khoảng 0,5, khoảng 0,6, khoảng 0,7, khoảng 0,8, khoảng 0,9, khoảng 1, khoảng 1,1, khoảng 1,2, khoảng 1,3, khoảng 1,4, khoảng 1,5, khoảng 2, khoảng 2,5 và khoảng 3 thể tích lò phản ứng mỗi ngày.

Đối với quy trình liên tục hoặc nạp theo mẻ, tốc độ mà tại đó môi trường nuôi cấy mới được cấp cho lò phản ứng có thể nằm trong khoảng từ khoảng 1 L/ngày đến khoảng 20,000 L/ngày. Tốc độ đưa môi trường nuôi cấy vào ví dụ bao gồm khoảng 1 L/ngày, khoảng 10 L/ngày, khoảng 20 L/ngày, khoảng 30 L/ngày, khoảng 40 L/ngày, khoảng 50 L/ngày, khoảng 60 L/ngày, khoảng 70 L/ngày, khoảng 80 L/ngày, khoảng 90 L/ngày, khoảng 100 L/ngày, khoảng 150 L/ngày, khoảng 200 L/ngày, khoảng 250 L/ngày, khoảng 300 L/ngày, khoảng 350 L/ngày, khoảng 400 L/ngày, khoảng 500 L/ngày, khoảng 600 L/ngày, khoảng 700 L/ngày, khoảng 800 L/ngày, khoảng 900 L/ngày, khoảng 1.000 L/ngày, khoảng 1,500 L/ngày, khoảng 2.000 L/ngày, khoảng 2,500 L/ngày, khoảng 3.000 L/ngày, khoảng 3,500 L/ngày, khoảng 4.000 L/ngày, khoảng 5.000 L/ngày, khoảng 6.000 L/ngày, khoảng 7.000 L/ngày, khoảng 8.000 L/ngày, khoảng 9.000 L/ngày, khoảng 10.000 L/ngày, khoảng 15.000 L/ngày và khoảng 20.000 L/ngày. Tùy ý, tốc độ đưa môi trường nuôi cấy vào có thể được thể hiện là hàm của thể tích lò phản ứng, như từ khoảng 0,1 đến khoảng 3 thể tích lò phản

37

ứng mỗi ngày. Tốc độ đưa môi trường nuôi cấy vào ví dụ bao gồm khoảng 0,1, khoảng 0,2, khoảng 0,3, khoảng 0,4, khoảng 0,5, khoảng 0,6, khoảng 0,7, khoảng 0,8, khoảng 0,9, khoảng 1, khoảng 1,1, khoảng 1,2, khoảng 1,3, khoảng 1,4, khoảng 1,5, khoảng 2, khoảng 2,5 và khoảng 3 thể tích lò phản ứng mỗi ngày.

Sau khi lọc, phân lọc được nạp lên hệ bắt giữ protein 605. Hệ bắt giữ protein 605 có thể bao gồm một hoặc nhiều cột sắc ký. Nếu nhiều hơn một cột sắc ký được sử dụng, thì các cột có thể được đặt thành caesc dãy sao cho cột tiếp theo có thể bắt đầu nạp khi cột thứ nhất đã nạp. Tùy ý, quy trình loại môi trường nuôi cấy có thể dừng trong khoảng thời gian mà các cột được chuyển đổi.

Theo các phương án khác nhau, hệ bắt giữ protein 605 bao gồm một hoặc nhiều cột trao đổi anion (AEX) để bắt giữ sản phẩm trực tiếp của protein lysosom tái tổ hợp của người, cụ thể là protein lysosom có hàm lượng M6P cao. Trong khi không mong muốn bị ràng buộc bởi bất kỳ lý thuyết cụ thể, tin rằng sử dụng sắc ký AEX để bắt giữ protein lysosom tái tổ hợp của người từ môi trường nuôi cấy được lọc đảm bảo rằng sản phẩm protein tái tổ hợp bị bắt giữ có hàm lượng M6P cao hơn, do nhiều điện tích âm của protein tái tổ hợp có một hoặc nhiều nhóm M6P. Kết quả là, protein tái tổ hợp không được phosphoryl hóa và tạp chất tế bào chủ không liên kết nền cột cũng như protein tái tổ hợp được phosphoryl hóa cao, và protein tái tổ hợp không được phosphoryl hóa và tạp chất tế bào chủ đi qua cột. Theo đó, sắc ký AEX có thể được sử dụng để làm giàu hàm lượng M6P của sản phẩm protein (tức là lựa chọn protein có nhiều M6P hơn) do ái lực cao của protein có chứa M6P đối với nền AEX.

Hơn nữa, trong khi không mong muốn bị ràng buộc bởi bất kỳ lý thuyết cụ thể, còn tin rằng việc có sự bắt giữ sản phẩm trực tiếp của protein tái tổ hợp sử dụng sắc ký AEX đảm bảo rằng protein tái tổ hợp có hàm lượng M6P cao được loại khỏi môi trường nuôi cấy có chứa proteaza và các enzym khác mà có thể làm thoái biến protein và/hoặc khử phosphoryl hóa protein. Kết quả là, sản phẩm chất lượng cao được bảo quản.

Các cột sắc ký AEX thích hợp có các nhóm hóa học chức năng mà liên kết các protein tích điện âm. Các nhóm chức năng ví dụ bao gồm, nhưng không giới hạn ở, các nhóm amin hoặc amoni bậc nhất, bậc hai, bậc ba, và bậc bốn. Các nhóm chức năng này có thể gắn vào màng (ví dụ màng xenluloza) hoặc nền sắc ký thông thường. Môi trường

38

nuôi cấy cột ví dụ bao gồm môi trường nuôi cấy dòng chảy nhanh SP, CM, Q và DEAE Sepharose® từ GE Healthcare Lifesciences.

Thể tích của cột sắc ký AEX có thể là thể tích thích hợp bất kỳ, như nằm trong khoảng từ 1 L đến 1.000 L. Thể tích cột ví dụ bao gồm khoảng 1 L, khoảng 2 L, khoảng 3 L, khoảng 4 L, khoảng 5 L, khoảng 6 L, khoảng 7 L, khoảng 8 L, khoảng 9 L, khoảng 10 L, khoảng 20 L, khoảng 30 L, khoảng 40 L, khoảng 50 L, khoảng 60 L, khoảng 70 L, khoảng 80 L, khoảng 90 L, khoảng 100 L, khoảng 150 L, khoảng 200 L, khoảng 250 L, khoảng 300 L, khoảng 350 L, khoảng 400 L và khoảng 500 L, khoảng 600 L, khoảng 700 L, khoảng 800 L, khoảng 900 L và khoảng 1.000 L.

Các điều kiện ví dụ cho cột trao đổi anion được đề xuất trong Bảng 2 dưới đây:

Bảng 2

Quy trình	Chất đệm	Tốc độ dòng chảy (cm/h)	Thể tích (CV)	Nhiệt độ (°C)
Sát trùng trước khi sử dụng	0.1-10 M NaOH	≤ 25-2500	≥ 1-3 (≥ 10-120 phút)	15 – 25
Cân bằng trước	Chất đệm phosphat 20-2000 mM (PB), pH 6,9-7,3	≤ 25-2500	≥ 1-5	15 – 25
Cân bằng	PB 4-400 mM, pH 6,9-7,3	≤ 25-2500	≥ 1-5	2 – 15
Nạp	Không có	≤ 10-1000	Không có	2 – 15
Wash1	PB 4-400 mM, pH 6,9-7,3	≤ 25-2500	≥ 2-10	2 – 15
Wash2	PB 4-400 mM, pH 6,9-7,3	≤ 25-2500	≥ 2-10	15 – 25

39

Rửa giải	PB 4-400 mM, 20-2000 mM NaCl, pH 6,1-6,5	≤ 25 -2500	Không có	15 – 25
Dùng	PB 4-400 mM, NaCl 0,1-10 M, pH 6,1-6,5	≤ 25 -2500	≥ 1 -5	15 – 25
Sát trùng sau khi sử dụng	0.1-10 M NaOH	≤ 25 -2500	≥ 1 -3 (≥ 10 -120 phút)	15 – 25
Lưu trữ	0.01-1.0 M NaOH	≤ 25 -2500	≥ 1 -5	15 – 25

Sau khi protein lysosom tái tổ hợp của người được nạp lên hệ bắt giữ protein 605, protein lysosom tái tổ hợp của người được rửa giải từ (các) cột bằng cách thay đổi độ pH và/hoặc hàm lượng muối trong cột.

Protein lysosom tái tổ hợp của người đã rửa giải có thể được đưa vào các bước tinh chế thêm và/hoặc các bước đảm bảo chất lượng. Ví dụ, như được thể hiện trên Hình 6, protein lysosom tái tổ hợp của người đã rửa giải có thể được đưa vào bước diệt virus 607. Việc diệt virus 607 này có thể bao gồm một hoặc nhiều việc diệt bằng độ pH thấp, diệt bằng chất tẩy rửa, hoặc kỹ thuật khác đã biết trong lĩnh vực.

Sản phẩm protein tái tổ hợp từ bước diệt virus 607 có thể được đưa vào hệ sắc ký thứ hai 609 để tinh chế thêm sản phẩm protein tái tổ hợp. Tùy ý, protein tái tổ hợp được rửa giải từ hệ bắt giữ protein 605 có thể được nạp trực tiếp vào hệ sắc ký thứ hai 609. Theo các phương án khác nhau, hệ sắc ký thứ hai 609 bao gồm một hoặc nhiều cột sắc ký ái lực kim loại được làm bất động (IMAC) để loại thêm tạp chất. Ion kim loại ví dụ bao gồm coban, niken, đồng, sắt, kẽm hoặc gali.

Thể tích của cột sắc ký thứ hai (ví dụ cột IMAC) có thể là thể tích thích hợp bất kỳ, như nằm trong khoảng từ 0,1 L đến 100 L. Thể tích cột ví dụ bao gồm khoảng 0,1 L, khoảng 0,2 L, khoảng 0,3 L, khoảng 0,4 L, khoảng 0,5 L, khoảng 0,6 L, khoảng 0,7 L, khoảng 0,8 L, khoảng 0,9 L, khoảng 1 L, khoảng 1,5 L, khoảng 2 L, khoảng 2,5 L, khoảng 3 L, khoảng 3,5 L, khoảng 4 L, khoảng 4,5 L, khoảng 5 L, khoảng 6 L, khoảng 7 L, khoảng 8 L, khoảng 9 L, khoảng 10 L, khoảng 15 L, khoảng 20 L, khoảng 25 L,

40

khoảng 30 L, khoảng 35 L, khoảng 40 L và khoảng 50 L, khoảng 60 L, khoảng 70 L, khoảng 80 L, khoảng 90 L và khoảng 100 L.

Các điều kiện ví dụ đối với cột IMAC được đề xuất trong Bảng 3 dưới đây:

Bảng 3

Quy trình	Chất đệm	Tốc độ dòng chảy (cm/h)	Thể tích (CV)
Xả	PB 4-400 mM, pH 6,3-6,7	$\leq 25-2500$	$\geq 1-5$
Sát trùng trước khi sử dụng	0.01-1.0 M NaOH	$\leq 25-2500$	$\geq 1-3$ (10 – 30 phút)
Cân bằng	PB 4-400 mM, pH 6,5	$\leq 25-2500$	$\geq 1-5$
Rửa với WFI	Nước để tiêm (WFI)	$\leq 25-2500$	$\geq 1-3$
Chelat hóa	Đồng Axetat 0,01-1,0 M	$\leq 25-2500$	$\geq 1-5$
Rửa với WFI	WFI	$\leq 25-2500$	$\geq 2-10$
Rửa với chất đệm axit	Natri Axetat 2-200 mM, NaCl 0,05-5 M, pH 3,5-4,5	$\leq 25-2500$	$\geq 2-10$
Cân bằng	PB 4-400 mM, pH 6,3-6,7	$\leq 25-2500$	$\geq 1-5$
Chạy không với chất đệm rửa giải	PB 4-400 mM, Glyxin 15-1500 mM, pH 6,1-6,5	$\leq 25-2500$	$\geq 2-20$
Cân bằng	PB 4-400 mM, pH 6,3-6,7	$\leq 25-2500$	$\geq 1-5$
Nạp	Không có	$\leq 25-2500$	$\geq 1-5$
Wash1	PB 4-400 mM, pH 6,3-6,7	$\leq 25-2500$	$\geq 2-10$
Wash2	PB 4-400 mM, NaCl 0,1-10 M, propylen glycol 5-30%, pH 6,3-6,7	$\leq 25-2500$	$\geq 2-10$
Wash3	PB 4-400 mM, pH 6,3-6,7	$\leq 25-2500$	$\geq 2-10$
Rửa giải	PB 4-400 mM, Glyxin 15-1500 mM, pH 6,1-6,5	$\leq 25-2500$	Không có

41

Dùng	PB 4-400 mM, imidazol 50-5000 mM, pH 6,3-6,7	$\leq 25-2500$	$\geq 1-5$
Sát trùng sau khi sử dụng	0.01-1M NaOH	$\leq 25-2500$	$\geq 1-3$ (10 – 30 phút)
Xả	PB 4-400 mM, pH 6,3-6,7	$\leq 25-2500$	$\geq 1-5$
Lưu trữ	5-30% etanol	$\leq 25-2500$	$\geq 1-5$

Sau khi protein tái tổ hợp được nạp lên hệ sắc ký thứ hai 609, protein tái tổ hợp được rửa giải từ (các) cột. Như được thể hiện trên Hình 6, protein tái tổ hợp đã rửa giải có thể qua bước diệt virus 611. Như với việc diệt virus 607, việc diệt virus 611 có thể bao gồm một hoặc nhiều việc diệt virus bằng độ pH thấp, diệt virus bằng chất tẩy rửa, hoặc kỹ thuật khác đã biết trong lĩnh vực. Theo một số phương án, chỉ một trong số bước diệt virus 607 hoặc 611 được sử dụng, hoặc các bước diệt virus được thực hiện ở cùng giai đoạn trong quá trình tinh chế.

Như được thể hiện trên Hình 6, sản phẩm protein tái tổ hợp từ bước diệt virus 611 có thể được đưa vào hệ sắc ký thứ ba 613 để tinh chế thêm sản phẩm protein tái tổ hợp. Tùy ý, protein tái tổ hợp đã rửa giải từ hệ sắc ký thứ hai 609 có thể được nạp trực tiếp vào hệ sắc ký thứ ba 613. Theo các phương án khác nhau, hệ sắc ký thứ ba 613 bao gồm một hoặc nhiều cột sắc ký trao đổi cation (CEX) và/hoặc cột sắc ký loại kích cỡ (SEC) để loại thêm tạp chất. Sản phẩm protein tái tổ hợp sau đó được rửa giải từ hệ sắc ký thứ ba 613.

Thế tích cột sắc ký thứ ba (ví dụ cột CEX hoặc SEC) có thể là thế tích thích hợp bất kỳ, như nằm trong khoảng từ 0,1 L đến 200 L. Thế tích cột ví dụ bao gồm khoảng 0,1 L, khoảng 0,2 L, khoảng 0,3 L, khoảng 0,4 L, khoảng 0,5 L, khoảng 0,6 L, khoảng 0,7 L, khoảng 0,8 L, khoảng 0,9 L, khoảng 1 L, khoảng 1,5 L, khoảng 2 L, khoảng 2,5L, khoảng 3 L, khoảng 3,5 L, khoảng 4 L, khoảng 4,5 L, khoảng 5 L, khoảng 6 L, khoảng 7 L, khoảng 8 L, khoảng 9 L, khoảng 10 L, khoảng 15 L, khoảng 20 L, khoảng 25 L, khoảng 30 L, khoảng 35 L, khoảng 40 L và khoảng 50 L, khoảng 60 L, khoảng 70 L, khoảng 80 L, khoảng 90 L, khoảng 100 L, khoảng 150 L và khoảng 200 L.

Các điều kiện ví dụ đối với cột CEX được đề xuất trong Bảng 4 dưới đây:

42

Bảng 4

Quy trình	Chất đệm	Tốc độ dòng chảy (cm/h)	Thể tích (CV)
Sát trùng trước khi sử dụng	NaOH 0,1-10 M	$\leq 25-2500$	$\geq 1-3$ ($\geq 10-120$ phút)
Cân bằng	Natri xitrat 2-200 mM, pH 4,0-5,0	$\leq 30-3000$	$\geq 2-10$
Nạp	Không có	$\leq 30-3000$	Không có
Rửa	Natri xitrat 2-200 mM, pH 4,0-5,0	$\leq 30-3000$	$\geq 2-10$
Rửa giải	Natri xitrat 2-200 mM, NaCl 15-1500 mM, pH 4,0-5,0	$\leq 30-3000$	$\geq 2-10$
Dừng	Natri xitrat 2-200 mM, NaCl 0,1-10 M, pH 4,0-5,0	$\leq 30-3000$	$\geq 1-5$
Sát trùng sau khi sử dụng	0.1-10 M NaOH	$\leq 25-2500$	$\geq 1-3$ ($\geq 10-120$ phút)
Lưu trữ	0.01-1.0 M NaOH	$\leq 30-3000$	$\geq 1-5$

Sản phẩm protein tái tổ hợp còn có thể được xử lý thêm. Ví dụ, hệ lọc khác 615 có thể được sử dụng để loại virus. Theo một số phương án, việc lọc này có thể sử dụng thiết bị lọc với kích thước lỗ nằm trong khoảng từ 5 đến 50 μm . Việc xử lý sản phẩm khác có thể bao gồm bước điều chỉnh sản phẩm 617, trong đó sản phẩm protein tái tổ hợp có thể được vô trùng, được lọc, được cô, được lưu trữ và/hoặc có các thành phần bổ sung để được bổ sung vào chế phẩm thành phẩm. Ví dụ, sản phẩm protein tái tổ hợp có thể được cô bởi hệ số bằng 2-10 lần, như từ nồng độ protein ban đầu bằng khoảng 2 đến khoảng 20 mg/ml đến nồng độ protein cuối bằng khoảng 4 đến khoảng 200 mg/ml.

43

Sản phẩm cuối cùng có thể được sử dụng để nạp đầy lọ và có thể được đông khô để sử dụng tiếp.

Dùng Protein tái tổ hợp

Protein lysosom tái tổ hợp của người (ví dụ rhGAA), hoặc muối được dùng của chúng, có thể được phối chế theo các quy trình thông thường dưới dạng dược 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 dược 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.

Protein lysosom tái tổ hợp của người (ví dụ rhGAA) (hoặc chế phẩm hoặc thuốc chứa protein lysosom tái tổ hợp của người) được dùng theo đường dung thích hợp. Theo một phương án, protein lysosom tái tổ hợp của người được dùng trong tĩnh mạch. Theo các phương án khác, protein lysosom tái tổ hợp của người (ví dụ rhGAA) được dùng bằng cách dùng trực tiếp cho mô đích, như cho cơ tim hoặc cơ xương (ví dụ trong cơ), hoặc 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.

Protein lysosom tái tổ hợp của người (ví dụ rhGAA) (hoặc chế phẩm hoặc thuốc có chứa protein lysosom tái tổ hợp của người) được dùng với lượng có hiệu quả chữa bệnh (ví dụ lượng liều dùng mà, khi được dùng ở các khoảng thời gian đều đặn, đủ để điều trị bệnh, 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

44

thể được xác định bằng các kỹ thuật lâm sàng tiêu chuẩn. Ngoài ra, các thử nghiệm trong ống nghiệm hoặc trong cơ thể 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 có nguồn gốc từ hệ thử nghiệm trong ống nghiệm 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 bằng khoảng 1 mg/kg đến khoảng 100 mg/kg, như khoảng 5 mg/kg đến khoảng 30 mg/kg, typically 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, khoảng 20 mg/kg, khoảng 25 mg/kg, khoảng 30 mg/kg, khoảng 35 mg/kg, khoảng 40 mg/kg, khoảng 50 mg/kg, khoảng 50 mg/kg, khoảng 60 mg/kg, khoảng 70 mg/kg, khoảng 80 mg/kg, khoảng 90 mg/kg hoặc khoảng 100 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 -

45

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.

Protein lysosom tái tổ hợp của người (ví dụ rhGAA) có thể được điều chế để sử dụng sau, 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 containing protein lysosom tái tổ hợp của người (ví dụ rhGAA), cũng như các tá dược tùy ý hoặc các thành phần có hoạt tính khác, 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, như bệnh nhân mắc bệnh Pompe.

Liệu pháp điều trị kết hợp của rhGAA và Chất đi kèm dược lý

Theo các phương án khác nhau, rhGAA (ví dụ ATB200) được sản xuất bởi quy trình được mô tả ở đây có thể được sử dụng trong liệu pháp điều trị kết hợp với chất đi kèm dược lý như miglustat hoặc duvoglustat.

Theo ít nhất một phương án, chất đi kèm dược lý (ví dụ 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 400 mg, hoặc ở liều lượng qua đường miệng bằng khoảng 200 mg, khoảng 250 mg, khoảng 300 mg, khoảng 350 mg hoặc khoảng 400 mg. Theo ít nhất một phương án, miglustat được dùng ở liều lượng qua đường miệng bằng 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 là 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 400 mg hoặc khoảng nhỏ hơn bất kỳ nằm trong đó có thể thích hợp cho bệnh nhân trưởng thành có khối

46

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 tròn, 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 dụng 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 dụng, 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 dụng 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, 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

48

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 bao gồm dạng liều lượng được đựng chứa miglustat, dạng liều lượng được đựng chứa axit α -glucosidaza tái tổ hợp của người như được xác định ở đây, và hướng dẫn sử dụng dạng liều lượng được đựng chứa miglustat và dạng liều lượng được đựng chứa axit α -glucosidaza tái tổ hợp cho bệnh nhân cần chúng. Theo ít nhất một phương án, dạng liều lượng được đựng chứa miglustat là dạng liều lượng dùng qua đường miệng như được mô tả trong bản mô tả này, bao gồm nhưng không

49

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 của người là dung dịch vô trùng thích hợp để tiêm như được mô tả ở đây. Theo ít nhất một phương án, hướng dẫn sử dụng dạng liều lượng bao gồm hướng dẫn để dùng dạng liều lượng được dụng chứa miglustat qua đường miệng trước khi dụng dạng liều lượng được dụng chứa axit α -glucosidaza tái tổ hợp của người bằng cách truyền trong tĩnh mạch, như được mô tả ở đây.

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. Ví dụ, 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 sống sót trong các 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 được lý, ví dụ miglustat; và vị trí hoạt tính mà nó đặc hiệu với;
- liều lượng, đường dùng của chất đi kèm được lý (ví dụ miglustat) và loại dược phẩm bao gồm bản chất của chất mang và việc sử dụng các chế phẩm 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, thích hợp là protein lysosom tái tổ hợp của người (ví dụ rhGAA), ví dụ axit α -glucosidaza tái tổ hợp của người được biểu hiện trong tế bào trứng chuột đồng Trung

50

Quốc (CHO) và chứa hàm lượng tăng của đơn vị N-glycan mang một hoặc nhiều gốc manosa-6-phosphat khi so với hàm lượng của đơn vị N-glycan mang một hoặc nhiều gốc manosa-6-phosphat của alglucosidaza alfa; và thích hợp là có trình tự axit amin như được nêu trong SEQ ID NO: 1 hoặc SEQ ID NO: 2;

- số lượng và loại đơn vị N-glycan trên protein lysosom tái tổ hợp của người (ví dụ rhGAA), như N-acetylglucosamin, galactosa, axit sialic hoặc N-glycan phức hợp được tạo thành từ kết hợp của chúng, được gắn vào protein lysosom tái tổ hợp của người;
- mức độ phosphoryl hóa của đơn vị manosa trên protein lysosom tái tổ hợp của người (ví dụ rhGAA) để tạo thành manosa-6-phosphat và/hoặc bis-manoza-6-phosphat;
- liều lượng và đường dùng (ví dụ dùng trong tĩnh mạch, đặc biệt là truyền trong tĩnh mạch, hoặc dùng trực tiếp cho mô đích) của enzym thay thế (ví dụ axit α -glucosidaza tái tổ hợp của người) và loại chế phẩm bao gồm chất mang và lượng có hiệu quả chữa bệnh;
- khoảng thời gian cách nhau của chất đi kèm được lý (miglustat) và axit α -glucosidaza tái tổ hợp của người;
- bản chất của đáp ứng trị liệu và kết quả của liệu pháp kết hợp (ví dụ kết quả được tăng cường khi so với tác dụng của mỗi liệu pháp tiến hành một cách riêng lẻ);
- thời gian sử dụng trị liệu pháp kết hợp, ví dụ dùng đồng thời miglustat và axit α -glucosidaza tái tổ hợp của người hoặc dùng tuần tự, ví dụ trong đó miglustat được dùng trước axit α -glucosidaza tái tổ hợp của người hoặc sau axit α -glucosidaza tái tổ hợp của người hoặc trong khoảng thời gian nhất định trước hoặc sau khi dùng axit α -glucosidaza tái tổ hợp của người; và
- bản chất của bệnh nhân được điều trị (ví dụ động vật có vú như con người) và tình trạng bệnh mà cá thể mắc (ví dụ sự thiếu hụt enzym).

Bất kỳ trong số các phương án trong danh sách trên có thể được kết hợp với một hoặc nhiều trong số các 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 4A-B mô tả các vấn đề có liên quan đến ERT thông thường (Myozyme® và Lumizyme®): 73% rhGAA trong Myozyme® (Hình 4B) và 78% rhGAA trong Lumizyme® (Hình 4A) 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 mang mono- 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 5. Chuyển nạp các tế bào CHO bằng ADN biểu hiện rhGAA sau đó chọn lọc các thể biến nạp sản xuất rhGAA.

52

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 4-MU- α -Glucosidaza. Các dòng vô tính sản xuất mức GAA cao hơn như được xác định bởi thử nghiệm enzym GAA được đánh giá tiếp về khả năng sống sót, khả năng sinh trưởng, hiệu suất GAA, cấu trúc N-glycan và sự biểu hiện ổn định protein. Phân lập các dòng tế bào CHO bao gồm dòng tế bào CHO GA-ATB-200, biểu hiện rhGAA với N-glycan được tăng cường mono-M6P hoặc bis-M6P bằng cách sử dụng quy trình này.

Ví dụ 3: Bất 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 thụ thể thể hiện trên Hình 7B và Hình 8 được quan sát về rhGAA ATB200 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 4A, Hình 4B, Hình 7A và Hình 7B, 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

53

thể hiện bốn đỉnh chiếm ưu thế rửa giải ở bên phải của Lumizyme® (Hình 9). 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 tặn 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 10). Phát hiện thấy các mẫu ATB200 có chứa lượng N-glycan loại manosa cao không được phosphoryl hóa thấp hơn so với Lumizyme®. Hàm lượng cao của glycan M6P trong ATB200 so với Lumizyme®, nhắm đích rhGAA ATB200 đến tế bào cơ 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 12A.

rhGAA ATB200 cũng được phân tích về các biên 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 µg mẫu protein, 5 µl tris-HCl 1 mol/l (nồng độ cuối cùng 50mM), 75 µl guanidin HCl 8 mol/l (nồng độ cuối cùng 6 M), 1 µl EDTA 0,5 mol/l (nồng độ cuối cùng 5 mM), 2 µl 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 µl. 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 µL 1 mol/L iodoacetamid (IAM, nồng độ cuối 50 mM), sau đó ủ ở 10-30°C trong tối trong 30 phút. Sau khi alkyl hóa, bổ sung 400 µl 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 5 phút ở 13000 rpm ở 4°C và loại bỏ dịch nổi. Bổ sung 400 µL of axeton đã làm lạnh

54

trước vào các viên, mà sau đó được ly tâm trong 5 phút ở 13000 rpm ở 4°C và loại bỏ dịch nổi. 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 bằng 100 μ l, và bổ sung 5 μ l trypsin 0,5 mg/ml (tỷ lệ protein so với enzym bằng 20/1 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 ProTM.

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 iodoaxetic (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 TribidTM.

Các kết quả của phân tích thứ nhất và thứ hai được thể hiện trên các Hình 11A-11H. Trên các Hình 11A-11H, các 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 11B-11G, 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).

Như có thể thấy trên các Hình 8A-8I, hai phân tích 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 vện 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 11A thể hiện độ chiếm giữ vị trí N-glycosyl hóa của ATB200. Như có thể thấy trên Hình 11A, các vị trí N-glycosyl hóa thứ nhất, thứ hai, thứ ba, thứ tư, thứ năm và thứ

55

sáu hầu hết bị chiếm giữ, với cả hai phân tích phát hiện trên 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 11B thể hiện biên dạng N-glycosyl hóa tại vị trí thứ nhất, N84. Như có thể thấy trên Hình 11B, 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 11C thể hiện biên dạng N-glycosyl hóa tại vị trí thứ hai, N177. Như có thể thấy trên Hình 11C, 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 11D thể hiện biên dạng N-glycosyl hóa tại vị trí thứ ba, N334. Như có thể thấy trên Hình 11D, 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 11E thể hiện biên dạng N-glycosyl hóa tại vị trí thứ tư, N414. Như có thể thấy trên Hình 11E, các loại glycan chính là glycan bis-M6P và mono-MGP. 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 11F thể hiện biên dạng N-glycosyl hóa tại vị trí thứ năm, N596. Như có thể thấy trên Hình 11F, 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 11G thể hiện biên dạng N-glycosyl hóa tại vị trí thứ sáu, N826. Như có thể thấy trên Hình 11G, 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.

Phân tích của sự glycosyl hóa ở vị trí thứ bảy, N869, thể hiện xấp xỉ 40% glycosyl hóa, với glycan phổ biến nhất là A4S3S3GF (12%), A5S3G2F (10%), A4S2G2F (8%) và A6S3G3F (8%).

56

Hình 11H thể hiện tóm tắt của sự phosphoryl hóa tại mỗi vị trí trong bảy vị trí N-glycosyl hóa tiềm năng. Như có thể thấy trên Hình 11H, 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.

Phân tích glycan khác của ATB200 được thực hiện theo phương pháp sắc ký lỏng tương tác thân nước-phát hiện huỳnh quang-quang phổ khối (HILIC-FLD-MS).

Kết quả của phân tích HILIC-FLD-MS được đề xuất trong Bảng 5 dưới đây: Trong Bảng 5, số thứ nhất trong số có ba chữ số chỉ số nhánh trong glycan, số thứ hai chỉ số đơn vị fucoza lõi và số thứ ba chỉ số đơn vị axit sialic ở đầu tận cùng. Sử dụng danh pháp này, "303" thể hiện glycan ba râu (3 đầu tiên) với 0 fucoza lõi (0 thứ hai) và 3 axit sialic ở đầu tận cùng (3 cuối cùng), "212" thể hiện glycan hai râu với 1 fucoza lõi và 2 axit sialic ở đầu tận cùng, "404" thể hiện glycan bốn râu với 0 fucoza lõi và 4 axit sialic ở đầu tận cùng, v.v.

Bảng 5

Số đỉnh FLD	Số đỉnh MS	RT (phút)	Cấu trúc Glycan	% Diện tích đỉnh
1	1		BisP_Man 8	2.83%
2	2	13.41	BisP_Man 7	17.58%
	3	14.30	BisP_Man 6	1.02%
3	4	20.89	MonoP_Man 6	2.34%
4	5	21.65	MonoP_Man 5	1.16%
5	6	23.51	MonoP_Man 8	1.28%
6	7	24.33	MonoP_Man 7	4.35%
7	8	25.61	MonoP_Man 7_(+)GlcNAc	0.50%
8	9	28.76	MonoP_hMan6_101	0.48%
9	10	30.54	MonoP_Man 6_(+)GlcNAc	0.68%
10	11	33.50	Man 6	3.97%

	12	33.65	57 303	0.74%
11	13	34.97	Man 7	0.20%
12	14	35.64	403	0.39%
13	15	36.61	302	0.36%
14	16	38.07	302	0.61%
15	17	38.53	Man 5	1.85%
16	18	39.57	302	0.48%
	19	39.78	hMan 5_101	0.42%
	20	40.05	hMan 5_100_(-)Gal	0.30%
17	21	40.77	301_(-)Gal	0.52%
	22	40.58	301	0.50%
18	23	41.47	300_(-)Gal	0.80%
19	24	42.17	301_(-)Gal	0.11%
	25	42.13	301	0.58%
20	26	42.89	301_(-)Gal	0.07%
	27	42.79	301	0.80%
21	28	43.41	300	0.85%
	29	43.28	101	0.39%
22	30	43.94	202	0.63%
23	31	44.45	401	0.39%
24	32	45.04	MonoP_hMan6_111	0.36%
25	33	45.69	MonoP_hMan6_111	1.45%
	34	45.90	100	0.23%
	35	45.90	400	0.19%
26	36	46.87	201	0.49%
	37	47.15	202	0.34%
27	38	48.19	414	0.37%
28	39	48.94	202	1.97%
29	40	50.79	MonoP_Man 6_110_(-)Gal	1.31%

	41	51.37	58 414	0.62%
30	42	52.22	313	0.74%
	43	52.42	201_(-)Gal	0.46%
	44	52.42	201	1.18%
	45	53.11	hMan6_111	0.20%
31	46	53.83	200_(-)Gal	0.80%
	47	54.23	201	1.27%
	48	54.75	413	0.30%
32	49	55.47	200	1.30%
33	50	57.45,58.34	414_(+)GlcNAcGal	0.14%
	51	56.62,56.91,57.99	413	0.94%
	52	56.11,57.26,57.99	312	0.98%
34	53	60.19	413	0.33%
	54	59.39	413_(+)GlcNAcGal	0.42%
	55	59.80	312	0.52%
	56	59.49	412	0.18%
35	57	60.75	413	0.78%
	58	60.89	413_(+)GlcNAcGal	0.07%
36	59	61.79	413	0.20%
	60	61.75	312	0.16%
	61	62.12	412	0.64%
37	62	63.87	311	0.73%
	63	63.18,64.32	412	0.29%
	64	63.84	413_(+)GlcNAcGal	0.45%
	65	63.5, 64.36	311_(-)Gal	0.42%
38	66	65.73, 66.20	311	0.68%
	67	65.85, 66.49	412	0.72%
	68	65.91	310_(-)Gal	0.28%
39	69	67.37	212	1.42%

	70	67.57	59 310	0.34%
40	71	68.67	412_(+)GlcNAcGal	0.24%
	72	68.36	412	0.53%
41	73	68.36	412_(+)GlcNAcGal	0.17%
	74	69.03	412	0.35%
	75	69.30	413_(+)2(GlcNAcGal)	0.16%
42	76	70.66	412_(+)GlcNAcGal	0.73%
43	77	71.74	211	1.09%
	78	71.23	211_(-)Gal	0.19%
44	79	72.46	212	3.66%
45	80	74.82	221_(-)Gal(+)GalNAc	0.38%
	81	74.43,74.96	411_(+)GlcNAcGal	0.66%
46	82	75.92	410	0.42%
47	83	76.73,77.87	211_(-)Gal	1.24%
	84	77.23	211	3.64%
48	85	79.05	211	1.52%
	86	79.38	210_(-)2Gal	0.45%
49	87	80.11	210_(-)Gal	1.58%
50	88	81.15	210	2.41%
51	89	84.22-87.15	311	1.26%
52	90	95.35	Mono_Axetyl_NANA_212	0.99%
53	91	96.23	Mono_Axetyl_NANA_211	0.76%
54	92	97.37	Bis_Axetyl_NANA_212	0.42%

Dựa trên phân tích HILIC-FLD-MS này, ATB200 được thử được kỳ vọng là có hàm lượng fucoza trung bình bằng 2-3 mol mỗi mol ATB200, hàm lượng GlcNAc bằng 20-25 mol mỗi mol ATB200, hàm lượng galactosa bằng 8-12 mol mỗi mol ATB200, hàm lượng manozơ bằng 22-27 mol mỗi mol ATB200, hàm lượng M6P bằng 3-5 mol mỗi mol ATB200 và hàm lượng axit sialic bằng 4-7 mol của ATB200.

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 12A, rhGAA ATB200 liên kết với CIMPR tốt hơn đáng kể so với Lumizyme®.

Hình 12B thể hiện hàm lượng tương đối của glycan bis-M6P 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 hấp thụ bởi nguyên bào sợi một cách hiệu quả hơn 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 biểu đồ so với tổng protein tế bào và các kết quả thể hiện trên các Hình 13A-B.

rhGAA ATB200 cũng thể hiện là được hấp thụ một cách hữu hiệu vào tế bào (Hình 13A và 13B), tương ứng, thể hiện rằng rhGAA ATB200 được hấp thụ vào cả tế bào nguyên bào sợi bình thường và Pompe và nó được hấp thụ ở mức độ lớn hơn so với rhGAA Lumizyme® thông thường. RhGAA ATB200 saturates cellular receptors at khoảng 20 nM, while khoảng 250 nM of Lumizyme® is needed. Hằng số hiệu quả hấp thụ ($K_{\text{hấp thụ}}$) được ngoại suy từ các kết quả này là 2-3 nM đối với ATB200 và 56 nM đối với Lumizyme® như được thể hiện trên Hình 13C. 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: Giảm glycogen ở chuột bị làm bất hoạt *Gaa*

Các Hình 14A đến 14C thể hiện ảnh hưởng của việc dùng alglucosidaza alfa (Lumizyme®) và ATB200 lên sự thanh thải glycogen ở chuột đã bị làm bất hoạt *Gaa*. Các con vật được cung cấp hai lần dùng dạng IV bolus (cách tuần); 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 các Hình 14A đến 14C, ATB200 được phát hiện là 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 thấy trên các Hình 14A đến 14C, ATB200 được dùng ở liều 5 mg/kg thể hiện giảm tương tự glycogen ở cơ tim và cơ xương chuột (cơ tứ đầu đùi và cơ tam đầu đùi) so với Lumizyme® được dùng ở liều 20 mg/kg, trong khi ATB200 được dùng ở liều 10 và 20 mg/kg thể hiện giảm tốt hơn đáng kể mức glycogen trong cơ xương so với Lumizyme®.

Hình 15 thể hiện tác dụng của việc dùng alglucosidaza alfa (Lumizyme®) và ATB200 lên sự thanh thải glycogen ở chuột bị làm bất hoạt *Gaa*, cũng như tác dụng của việc dùng đồng thời ATB200 và miglustat lên sự thanh thải glycogen. Chuột KO GAA mười hai tuần tuổi được điều trị với Lumizyme® hoặc ATB200, 4 lần tiêm IV 20 mg/kg cách tuần; miglustat được dùng đồng thời ở 10 mg/kg PO, 30 phút trước rhGAA như đã được chỉ định. Các mô được gom 14 ngày sau liều enzym cuối cùng để đo glycogen. Hình 15 thể hiện giảm tương đối của glycogen trong cơ xương cơ tứ đầu đùi và cơ tam đầu đùi, với ATB200 tạo ra sự giảm lớn hơn của glycogen so với Lumizyme®, và ATB200/miglustat tạo ra sự giảm glycogen thậm chí lớn hơn.

Ví dụ 9: 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 dạng IV bolus của axit α -glucosidaza tái tổ hợp (alglucosidaza alfa hoặc ATB200) at 20 mg/kg cách tuần. Miglustat được dùng qua đường miệng ở liều lượng bằng 10 mg/kg to cho tập hợp con của các con vật được điều trị bằng ATB200 30 phút trước khi dùng ATB200. Chuột

62

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

Như có thể thấy trên Hình 16, 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 dép) 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 17, việc dùng ATB200 cho thấy sự giảm đi của hàm lượng glycogen đốm ở mô cơ tim và mô cơ xương (cơ dép) 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.

63

Cũng như vậy, như có thể thấy trên Hình 18, việc dùng đồng thời 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 α -glucosidaza alfa. Như có thể thấy trên Hình 19, các mức của cả LC3 II và p62 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 đồng thời ATB200 và miglustat. Ngoài ra, các mức 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 10: 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 dần dần sức mạnh cơ chức năng ở chuột *Gaa* KO từ đường cơ sở như được đo bởi cả thử nghiệm lực nắm giữ và thử nghiệm bàn tay nắm dây (Các Hình 21A-21B). Chuột được điều trị bằng α -glucosidaza 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 21A-21B). Như với nghiên cứu ngắn hạn, ATB200/miglustat có sự thanh thải glycogen tốt hơn đáng kể sau 3 tháng (các Hình 22A-22C) và 6 tháng (các Hình 22D-22G) của việc điều trị so với α -glucosidaza 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 23) so với α -glucosidaza alfa. Trên Hình 21A, * 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 22A-22G, * 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).

64

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 so 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 23 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 11: Bắt giữ α -Gal A

Biên dạng liên kết CIMPR của α -galactosidaza A tái tổ hợp của người (α -Gal A) trong môi trường nuôi cấy tế bào thải ra được đo trước khi bắt giữ sản phẩm sử dụng sắc ký AEX (Hình 20A) và sau khi bắt giữ sản phẩm sử dụng sắc ký AEX (Hình 20B). Các đường nét đứt trong cả hai đồ thị đề cập đến gradien rửa giải M6P. Trước khi bắt giữ sản phẩm AEX, 80% α -Gal A có khả năng liên kết với CIMPR. Sau khi bắt giữ sản phẩm AEX, tổng giới hạn α -Gal A tăng để 96%.

Ví dụ 12: Ví dụ: dữ liệu dược động học và tính an toàn trên axit α -glucosidaza tái tổ hợp ATB200 được dùng đồng thời với miglustat ở bệnh nhân mắc bệnh Pompe đã dùng ERT và chưa dùng ERT

Thử nghiệm này được thiết kế để đánh giá sơ bộ tính an toàn, khả năng chịu thuốc, và dược động học (PK) of ATB200 được dùng đồng thời với miglustat. Mô hình chuyển nạp PK/dược lực học (PD) từ chuột bị làm bất hoạt *Gaa* dự báo rằng kết hợp của ATB200 20 mg/kg với liều cao (ví dụ 260 mg) của miglustat ở người có thể tạo ra sự giảm glycogen tiềm năng.

Trong mô tả dưới đây, "liều cao" của miglustat đề cập đến liều bằng khoảng 260 mg và "liều thấp" của miglustat đề cập đến liều bằng khoảng 130 mg.

65

Mục tiêu là để đánh giá dữ liệu tổng protein GAA, ATB200 và PK của miglustat sơ bộ, và các đánh dấu an toàn từ 10 bệnh nhân trong nghiên cứu pha 1/2 này.

Đây là nghiên cứu nhãn mở, trình tự cố định, liều tăng dần, lần đầu tiên ở người, pha 1/2 để đánh giá tính an toàn, khả năng chịu thuốc, PK, PD, và hiệu quả của việc truyền trong tĩnh mạch ATB200 được dùng đồng thời với miglustat dùng qua đường miệng ở người lớn mắc bệnh Pompe (Hình 24). Tổng protein GAA trung bình và các kết quả PK của miglustat từ 8b bệnh nhân Nhóm 1 thứ nhất qua Lần khám 9 và 2 bệnh nhân Nhóm 3 thứ nhất được đánh giá.

^aDữ liệu tính an toàn từ 2 bệnh nhân cạnh từ Nhóm 1 được kiểm tra ở mỗi mức liều trước khi dùng trong Nhóm 2 và 3.

^bTrong các giai đoạn 2 và 3, miglustat được dùng qua đường miệng trước khi bắt đầu truyền trong tĩnh mạch ATB200. Đối với tất cả các liều, ATB200 truyền trong tĩnh mạch trong thời gian 4-giờ.

^c2 bệnh nhân thứ nhất trong các Nhóm 2 và 3 dùng làm bệnh nhân cạnh cho các nhóm tương ứng.

Yêu cầu bao gồm chính:

- Đàn ông và phụ nữ độ tuổi 18-65 tuổi được chẩn đoán mắc bệnh Pompe dựa trên thiếu hụt hoạt tính enzym GAA được ghi nhận trong tài liệu hoặc bằng cách tạo kiểu di truyền GAA
 - Nhận ERT với alglucosidaza alfa trong 2-6 năm (hoặc ≥ 2 năm đối với Nhóm 2) trước khi bắt đầu thử (Nhóm 1)
 - Hiện nhận alglucosidaza alfa ở tần suất cách tuần và hoàn thành 2 lần truyền cuối không có tác dụng phụ liên quan đến thuốc gây gián đoạn liều (Nhóm 1 và 2)
 - Phải có khả năng chạy giữa đồng hồ 200 và 500 trên thử nghiệm chạy 6 phút (Nhóm 1 và 3)
 - Dung tích sống gắng sức khi đứng thẳng phải nằm trong khoảng 30%-80% của giá trị bình thường ở người (Nhóm 1 và 3)
 - Phải gắn với xe lăn và không thể đi bộ khi không được hỗ trợ (Nhóm 2)

Phân tích PK:

66

- Mẫu máu đối với tổng protein GAA trong huyết tương và nồng độ hoạt tính được gom
- Giai đoạn 1: trước khi bắt đầu truyền ATB200 và 1, 2, 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 6, 8, 10, 12, và 24 giờ sau khi bắt đầu truyền
- Giai đoạn 2 và 3: 1, 2, 3, 4, 4,5, 5, 6, 7, 9, 11, 13, và 25 giờ sau khi dùng qua đường miệng miglustat
- Mẫu máu đối với nồng độ miglustat trong huyết tương được lấy ngay trước khi dùng qua đường miệng miglustat (thời gian 0) và 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 4, 5, 6, 9, 11, và 25 giờ sau khi dùng qua đường miệng miglustat. Miglustat trong huyết tương được xác định bằng thử nghiệm LC-MS/MS có hiệu lực
- Tổng nồng độ protein GAA trong huyết tương đối với ATB200 5, 10, và 20 mg/kg được xác định bằng định lượng LC-MS/MS có hiệu lực của (các) peptit "ký" đặc hiệu rhGAA

[00209] Phân tích sơ bộ được hoàn thành ở 8 bệnh nhân trong Nhóm 1 đã hoàn thành Giai đoạn 1 và 2 và 2 bệnh nhân trong Nhóm 3 bắt đầu Giai đoạn 3

- Bệnh nhân chuyển ERT ban đầu đại diện cho quần thể bệnh Pompe, với trung bình 5,02 năm trên ERT (Bảng 6)

Bảng 6: Các đặc điểm đường cơ sở

Đặc điểm đường cơ sở (N=12*)	Lưu động được điều trị ERT (n=10)	Chưa được điều trị (n=2)
Thời gian trên ERT (Lumizyme®/ Myozyme®), năm, trung bình (STDV)	5,02 (1,2)	N/A
Tuổi, năm, trung bình (khoảng)	47,7 (8,19)	33,0 (12,73)
Giới tính, Nam/Nữ, %	80 (20)	0 (100)
6MWT, số đo, trung bình (STDV)	398,4 (95,92)	432,1 (67,81)
FVC khi đứng thẳng, % trung bình dự báo (STDV)	51,9 (13,84)	51,0 (26,87)

6MWT=thử nghiệm chạy 6 phút; FVC=dung tích sống gắng sức; N/A=không có;

STDV=sai số chuẩn

^an=10 từ Nhóm 1 (chuyển đổi ERT lưu động) qua phân tích dữ liệu chuyển tiếp; n=2 từ Nhóm 3 (tự nhiên).

Tổng Protein GAA

Khi được cho một mình, ATB200 tăng theo cách tỷ lệ với liều cao hơn ít (Bảng 7 và Các Hình 25A-25D). Tính biến động thể hiện tăng với liều miglustat (Hình 25C). Sử dụng đồng thời ATB200 20 mg/kg với the liều cao của miglustat (260 mg) làm tăng phơi lộ tổng protein GAA (AUC) thêm xấp xỉ 25% so với ATB200 một mình ở 20 mg/kg. Thời gian bán rã phân bố (pha α) tăng thêm 45%, đề xuất rằng liều cao của miglustat làm ổn định ATB200 trong huyết tương. Sự tăng về thời gian bán rã phân bố đi kèm với tăng về AUC từ thời gian đến nồng độ huyết tương tối đa đến xấp xỉ 12 giờ sau khi dùng liều. Tăng về AUC và bán rã có thể quan sát được trên thước log, trong pha loại trừ đầu cuối (Hình 25B). ATB200 chứng minh thể tích phân bố tương đối cao. Sự sắp xếp của tổng protein GAA trong huyết tương thể hiện tương tự giữa bệnh nhân chưa điều trị ERT (Nhóm 3) và bệnh nhân được điều trị ERT (Nhóm 1) (Các Hình 25A và 25D).

Bảng 7: Tổng Protein GAA

Nhóm	Điều trị	C _{lớn nhất} (ng/mL) ^a	t _{lớn nhất} (hr) ^b	AUC _{0-t} (ng*hr/ mL) ^a	AUC _{0-∞} ^c (ng*hr/m L) ^a	β _{t1/2} (hr) ^c	α _{t1/2} (hr) ^c	CL _T (L/hr) ^c	V _{ss} (L) ^c
1	5 mg/kg một mình ^d	61 (18,1)	38 3,0- 4,0).	215 (16,7)	218 (16,4)	1,9 (16, 7)	1,1 (10, 2)	2,1 (16,9)	4,62 (12, 7)
1	10 mg/kg một mình ^d	144 (16,6)	4,0 (3,5- 4,0).	578 (20,3)	584 (20,4)	1,6 (46, 1)	1,3 (10, 5)	1,59 (25,4)	3,87 (16, 5)

68

1	20 mg/kg một mình ^d	345 (10,1)	4,0 3,5- 4,0).	1508 (14,5)	1512 (14,4)	2,1 (29, 7)	1,5 (6,5)	1,22 (21,7)	3,52 (12, 4)
1	ATB20 0 20 mg/kg + mimglu stat SD ^d thấp	334 (16,2)	4,0 3,5- 4,0).	1694 (17,7)	1701 (17,5)	2,4 (16, 6)	1,8 (10, 2)	1,09 (22,9)	3,76 (13, 3)
1	ATB20 0 20 mg/kg + mimglu stat MD ^d thấp	353 (13,7)	4,0 3,5- 5,0).	1804 (15,7)	1808 (15,8)	2,5 (8,1)	1,9 (21, 8)	1,02 (21,4)	3,73 (12, 3)
1	ATB20 0 20 mg/kg + mimglu stat SD ^d cao	349 (13,9)	4,0 3,5- 4,0).	1878 (17,5)	1886 (17,5)	2,7 (13, 1)	2,3 (18, 9)	0,98 (26,5)	3,74 (12, 3)
1	ATB20 0 20 mg/kg + mimglu stat MD ^d cao	356 (20,2)	4,0 3,5- 4,0).	1886 (21,3)	1901 (21,7)	2,5 (20, 5)	2,1 (16, 1)	0,98 (27,3)	3,6 (18, 7)

69

3	ATB20 0 20 mg/kg + mimglu stat MD' cao	291 (21,6)	4,3 4,0- 4,5).	1597 (34,8)	1600 (34,9)	2,4 (5,4)	2 (14, 5)	0,69 (28,9 5)	2,61 (17, 3)
3	ATB20 0 20 mg/kg + mimglu stat MD' cao	330 (27,5)	4,0 4,0- 4,0).	1672 (32,7)	1676 (32,6)	2,6 (8,7)	1,9 (9,0)	0,66 (26,6)	2,33 (23, 2)

AUC=diện tích dưới đường cong; CL_T =tổng thanh thải cơ thể; C_{max} =nồng độ thuốc tối đa; CV=hệ số biến đổi; MD=đa liều; SD=đơn liều; $t_{1/2}$ =thời gian bán thải; t_{max} =thời gian đến nồng độ thuốc tối đa; V_{ss} =thể tích rõ ràng của phân phối ở trạng thái bền.

^aTrung bình hình học (CV%). ^bỞ giữa (tối thiểu-tối đa). ^cTrung bình số học (CV%).

^dn=8. ^en=7. ^fn=2.

Miglustat PK

Miglustat chứng minh động lực tỷ lệ liều lượng (Bảng 8 và Hình 26). Miglustat huyết tương thể hiện tương tự giữa liều đơn và đa.

Bảng 8: Tóm tắt Miglustat PK

Điều trị	C_{max} (ng/mL) ^a	$t_{1/2}$ nhất ^b	AUC_{0-t} (ng*hr/mL) ^a	$AUC_{0-\infty}$ (ng*h/mL) ^a	$t_{1/2}$ (h) ^c	CL/F (L/h) ^c	V_z/F (L) ^c
SD thấp	1486 (29,9)	3,5 (1,5- 3,5)	11,807 (25,6)	12,565 (26,8)	5,6 (11,7)	10,6 (23)	85,8 (23,4)
MD thấp	1518 (27,6)	3,0 (1,5- 3,5)	12,254 (26,4)	13,094 (28,3)	5,9 (32,1)	10,2 (23,9)	86,7 (43,9)

70

SD	3059	3,5	23,999	25,859	5,7	10,6	86,3
cao	(36,1)	(1,5-5)	(35)	(34,4)	(29,9)	(33)	(45,7)
MD	3569	3,0	24,970	25,972	5,3	10,3	81
cao	(25,5)	(1,0-4,0)	(24,1)	(23)	(15,6)	(26,4)	(41,8)

V_z =thể tích rõ ràng của phân phối ở trạng thái tận cùng. ^aTrung bình hình học (CV%).

^bỞ giữa (tối thiểu-tối đa). ^cTrung bình số học (CV%).

Dược lực học

Ở lần thăm khám thứ 11 ở bệnh nhân được điều trị ERT từ Nhóm 1 (Các Hình 27A và 27B):

- Alanin aminotransferaza (ALT) giảm ở 5 trong số 8 bệnh nhân; 4/4 bệnh nhân với mức đường cơ sở tăng được chuẩn hóa
- Aspartat aminotransferaza (AST) giảm ở 6 trong 8 bệnh nhân; 3/4 bệnh nhân với mức đường cơ sở tăng được chuẩn hóa
- Creatin phosphokinaza (CPK) giảm ở 6 trong 8 bệnh nhân; 2/6 bệnh nhân với mức đường cơ sở tăng được chuẩn hóa
- Mức glucoza tetrasacarit trong nước tiểu (HEX4) giảm ở 8 trong 8 bệnh nhân

Từ tuần 4, tất cả 4 các mức đánh dấu sinh học giảm ở 2 bệnh nhân trong nhóm chưa được điều trị (Nhóm 3) (Các Hình 27C và 27D).

Trên Các Hình 27A-27D, dữ liệu thể hiện là trung bình $\pm$ sai số chuẩn.

Tính an toàn

- Không có tác dụng phụ nghiêm trọng (AE) hoặc phản ứng liên quan đến việc truyền được báo cáo sau 155+ tổng tiêm ở tất cả các bệnh nhân
- AE xuất hiện khi điều trị, được báo cáo ở 11/13 (84%) bệnh nhân, thường nhẹ và ngắn.
- AE liên quan đến điều trị được báo cáo ở 7/13 (53%) bệnh nhân: buồn nôn (n=1), mệt mỏi (n=1), đau đầu (n=1), run (n=2), nổi mụn (n=1), tim đập nhanh (n=1), và giảm huyết áp (n=1).

Kết luận

71

- ATB200 một mình và kết hợp với miglustat là an toàn và dung chịu tốt, không có phản ứng liên quan đến việc truyền cho đến nay.
- ATB200 một mình thể hiện tăng tỷ lệ với liều nhiều hơn trong phơi lộ, mà còn được tăng cường với miglustat, đề xuất tác dụng làm ổn định của chất đi kèm lên ATB200.
- Sau khi chuyển đổi từ chăm sóc tiêu chuẩn sang ATB200/miglustat, bệnh nhân nói chung thể hiện cải thiện đánh dấu sinh học của hư hỏng cơ, với nhiều bệnh nhân chứng minh sự chuẩn hóa bằng tuần 18.
- 2 bệnh nhân nhân chưa được điều trị ban đầu được điều trị bằng ATB200/miglustat chứng minh giảm mạnh ở tất cả các đánh dấu sinh học của việc hư hỏng cơ

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.

72

Yêu cầu bảo hộ

1. Phương pháp sản xuất axit α -glucosidaza tái tổ hợp ở người (rhGAA) tinh chế bao gồm:

trong lò phản ứng sinh học, nuôi cấy tế bào chủ tiết ra rhGAA;

loại môi trường khỏi lò phản ứng;

lọc môi trường để tạo ra phần lọc;

nap phần lọc lên cột sắc ký trao đổi anion (AEX) để bắt giữ rhGAA

rửa giải rhGAA từ cột AEX.

nap rhGAA rửa giữa từ cột AEX lên cột sắc ký ái lực cố định ion kim loại (IMAC); và

rửa giải rhGAA từ cột IMAC,

trong đó rhGAA tinh chế bao gồm một trình tự axit amin mà có ít nhất 98% tương đồng với SEQ ID NO: 2.

2. Phương pháp theo điểm 1, trong đó rhGAA tinh chế chứa một vị trí N-glycosyl hóa tiềm năng thứ nhất, một vị trí N-glycosyl hóa tiềm năng thứ hai, một vị trí N-glycosyl hóa tiềm năng thứ ba, một vị trí N-glycosyl hóa tiềm năng thứ tư, một vị trí N-glycosyl hóa tiềm năng thứ năm, một vị trí N-glycosyl hóa tiềm năng thứ sáu, và một vị trí N-glycosyl hóa tiềm năng thứ bảy.

3. Phương pháp theo điểm 1 hoặc điểm 2, trong đó phương pháp này còn bao gồm:

nap rhGAA rửa giải từ cột IMAC lên cột sắc ký thứ ba; và

rửa giải rhGAA từ cột sắc ký thứ ba.

4. Phương pháp theo điểm 3, trong đó cột sắc ký thứ ba được chọn từ cột sắc ký trao đổi cation (CEX) và cột sắc ký loại kích thước (SEC).

5. Phương pháp theo bất kỳ trong số các điểm 1-4, trong đó lọc môi trường được chọn từ lọc dòng chảy tiếp tuyến xoay chiều (ATF) và lọc dòng chảy tiếp tuyến (TFF).

6. Phương pháp theo bất kỳ trong số các điểm 1-5, trong đó phương pháp này còn bao gồm bước làm bất hoạt virus trong một hoặc nhiều trong số rhGAA rửa giải từ cột AEX, rhGAA rửa giải từ cột IMAC và rhGAA rửa giải từ cột sắc ký thứ ba.

7. Phương pháp theo điểm 3, trong đó phương pháp này còn bao gồm bước lọc rhGAA rửa giải từ cột IMAC hoặc rhGAA rửa giải từ cột sắc ký thứ ba để tạo ra sản phẩm lọc.

73

8. Phương pháp theo điểm 7, trong đó phương pháp này còn bao gồm bước đông khô sản phẩm đã lọc.
9. Phương pháp theo bất kỳ trong số các điểm 1-8, trong đó tế bào chủ bao gồm tế bào trứng chuột đồng Trung Quốc (CHO).
10. Phương pháp theo bất kỳ trong số các điểm 1-9, trong đó:
 - (i) ít nhất 90% của rhGAA tinh chế liên kết với thụ thể manosa-6-phosphat không phụ thuộc cation (CIMPR) hoặc
 - (ii) ít nhất 90% của rhGAA tinh chế chứa N-glycan mang mono-manoza-6-phosphat (mono-M6P) hoặc bis-manoza-6-phosphat (bis-M6P).

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Amicus Therapeutics, Inc.

<120> PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT PROTEIN LYSOSOM TÁI TỔ HỢP CỦA NGƯỜI VÀ SẢN PHẨM PROTEIN LYSOSOM TÁI TỔ HỢP THU ĐƯỢC TỪ PHƯƠNG PHÁP NÀY

<130> AT-P8600-US

<160> 2

<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> 896
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 2

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

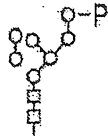
Ile Cys Val Ser Leu Leu Met Gly Glu Gln Phe Leu Val Ser Trp Cys
885 890 895

1/42

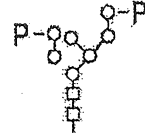
Cấu trúc và ái lực thụ thể đối với manozơ cao và oligosacarit được phosphoryl hóa



N-glycan Manozơ cao
không được phosphoryl hóa:



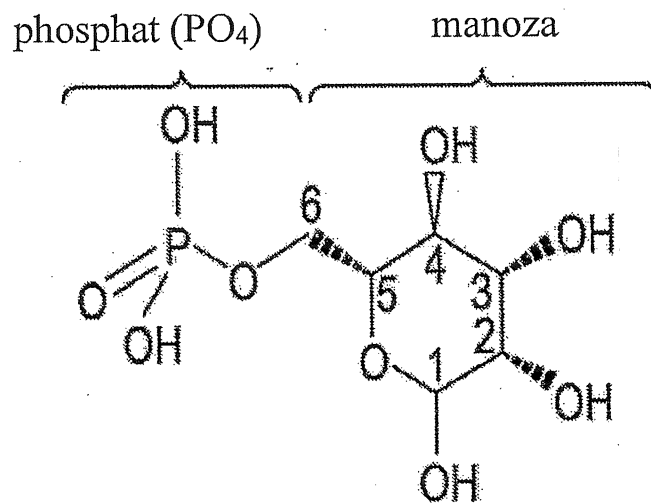
N-glycan Mono-M6P:
Ái lực thấp đối với CI-MPR
($K_n \sim 7000 \text{ nM}$)



N-glycan Bis-M6P:
Ái lực thấp đối với CI-MPR
($K_n = 2 \text{ nM}$)

HÌNH 1A

Manozơ 6-phosphat (M6P)



HÌNH 1B

TRANG THAY THẾ (ĐIỀU 26)

3/42

Cấu trúc và vùng liên kết của CIMPR

Vùng liên kết M6P 7-9

Vùng liên kết IGF-II 10-13

Vùng liên kết M6P 1-3

Oligosacarit với M6P

Ngoại bào

Thuộc dịch bào tương

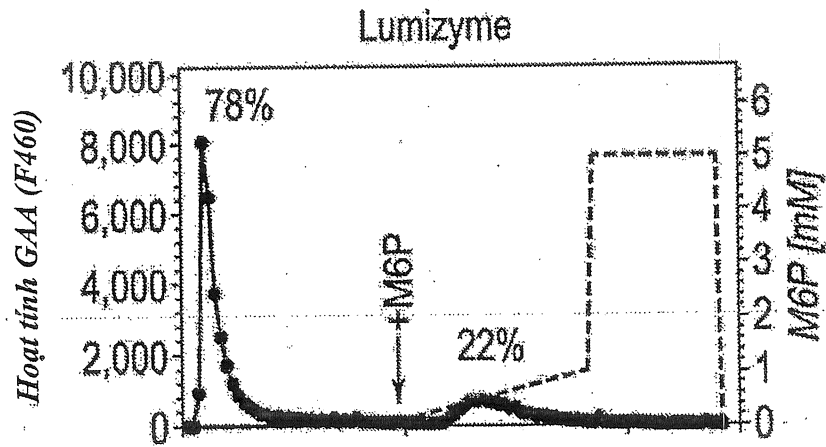
Phôi tử; Ái lực và Vị trí trong cơ thể của ba thụ thể Glycoprotein

Phối tử	Thụ thể	Ái lực (nmol)	Vị trí
Glycan bis-phosphoryl hóa	CIMPR	2	Toàn bộ tế bào
Glycan mono-phosphoryl hóa		7.000	
Glycan mannoza cao	Thụ thể mannoza	20 ^b	Tế bào tua của đại thực bào
Glycan phức được khử sialyl hóa	Thụ thể Asialoglycoprotein	7 ^c	Tế bào gan

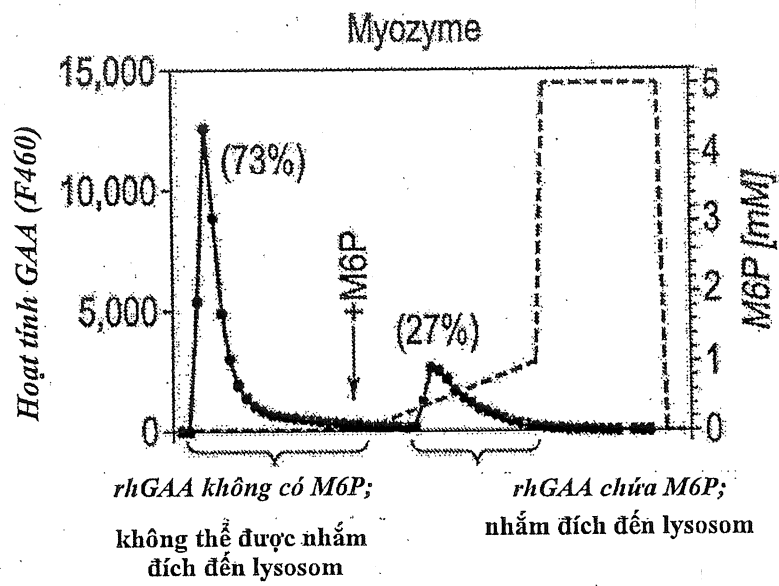
Tham khảo: ^aTong *et al* 1989; ^bTaylor *et al* 1992; ^cSchwartz *et al* 1981

HÌNH 3B

4/42



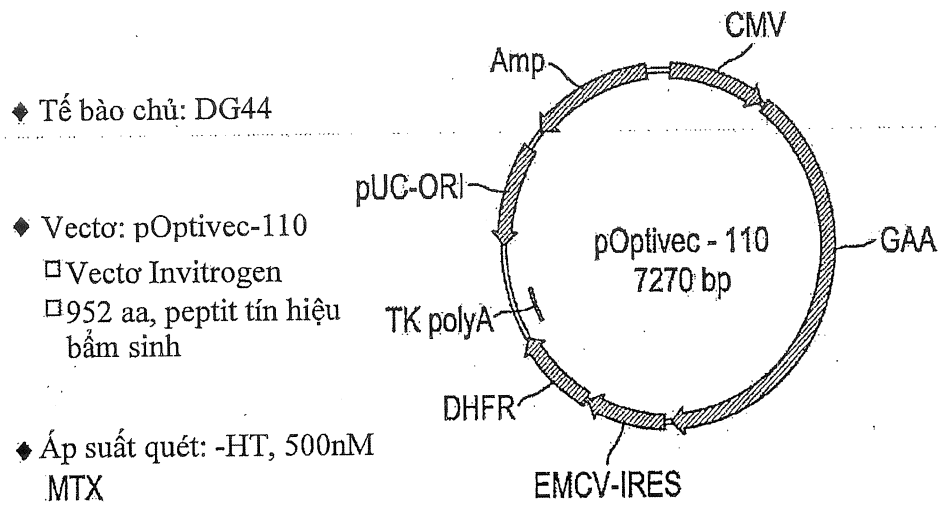
HÌNH 4A



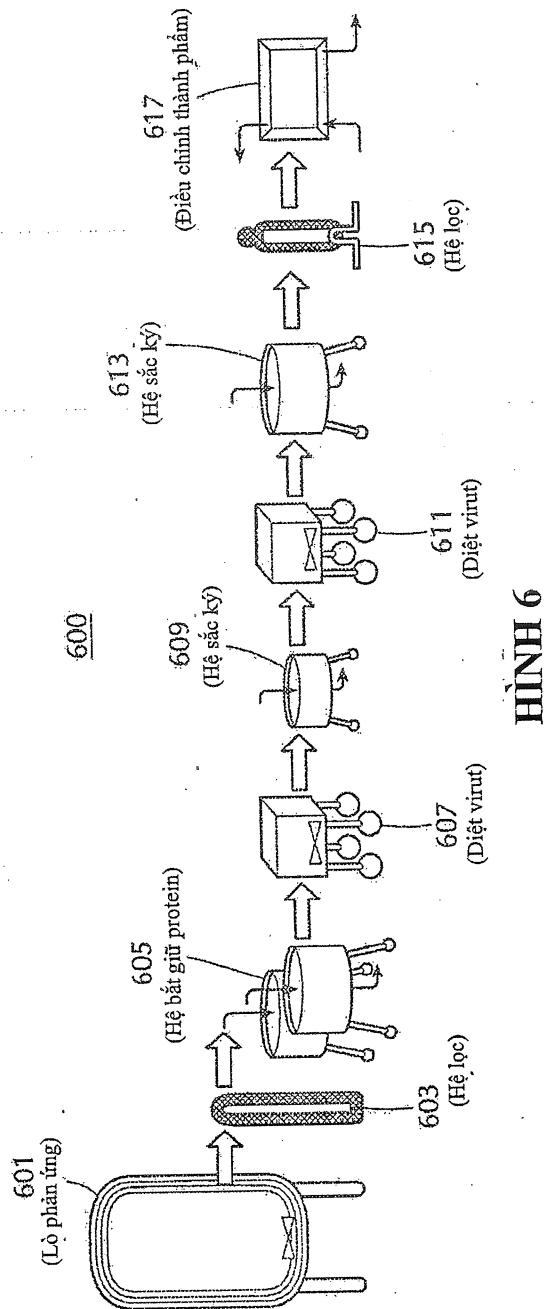
HÌNH 4B

5/42

Cấu trúc vector ATB200

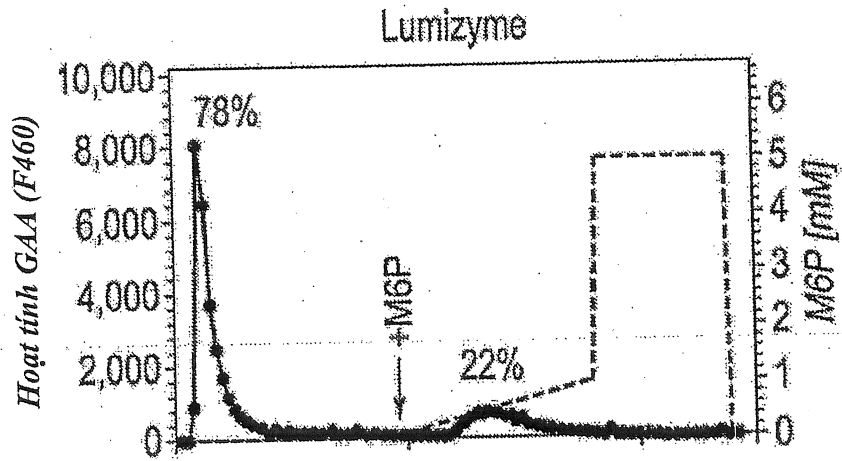
**HÌNH 5**

6/42

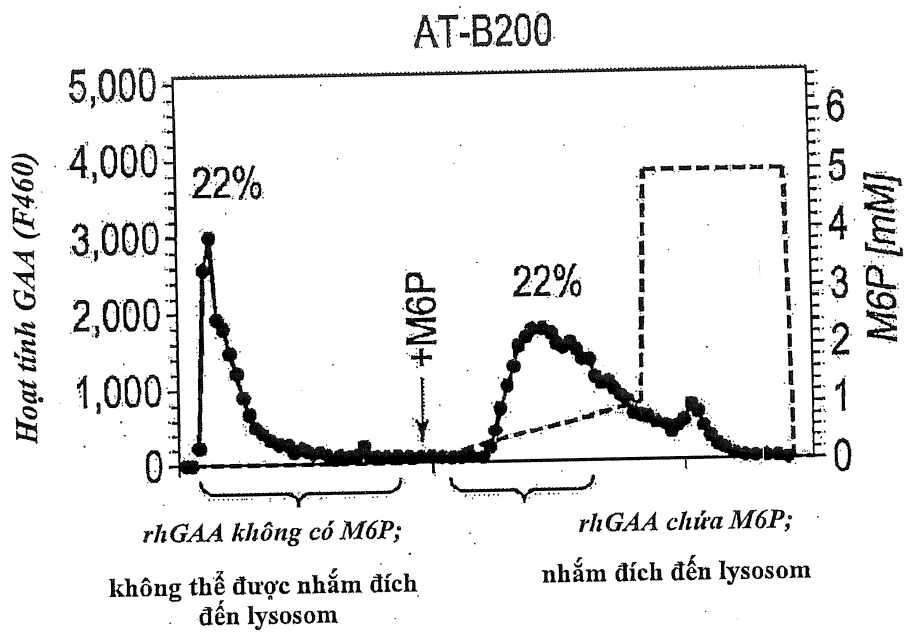


TRANG THAY THỂ (ĐIỀU 26)

7/42



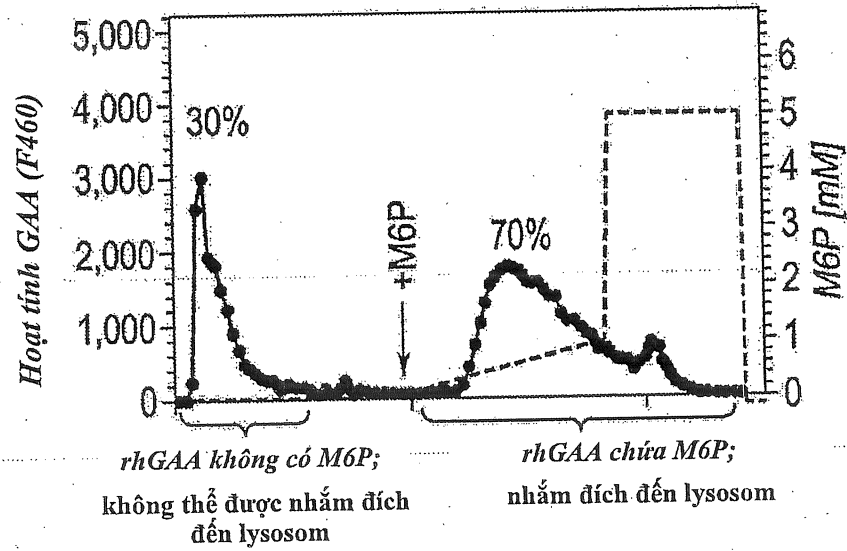
HÌNH 7A



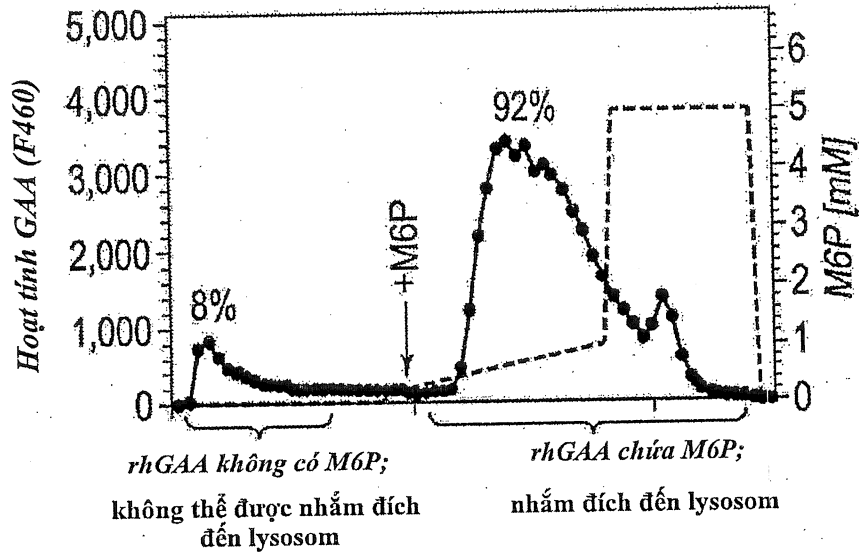
HÌNH 7B

8/42

Phương án 1



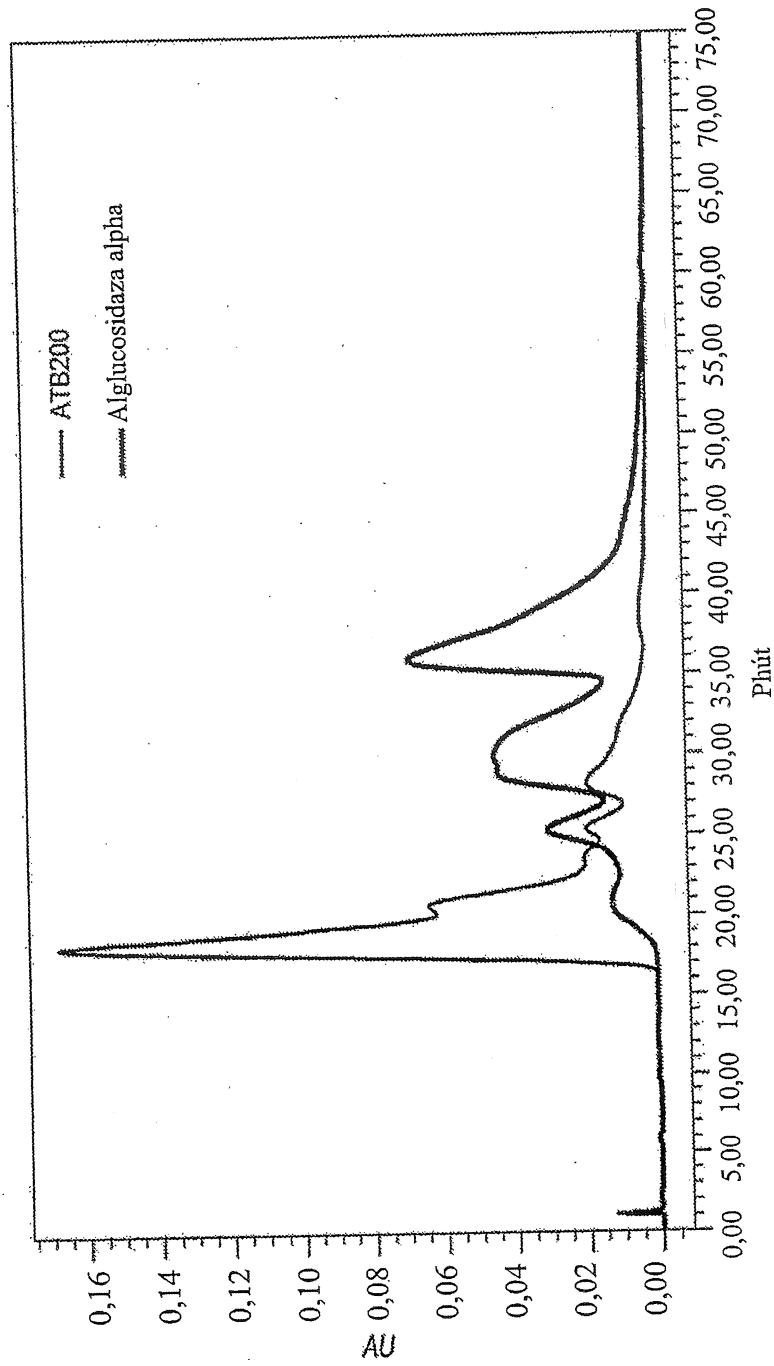
Phương án 2



HÌNH 8

TRANG THAY THẾ (ĐIỀU 26)

9/42



HÌNH 9

TRANG THAY THẾ (ĐIỀU 26)

10/42

Phân bố N-Glycan trên các chế phẩm rhGAA

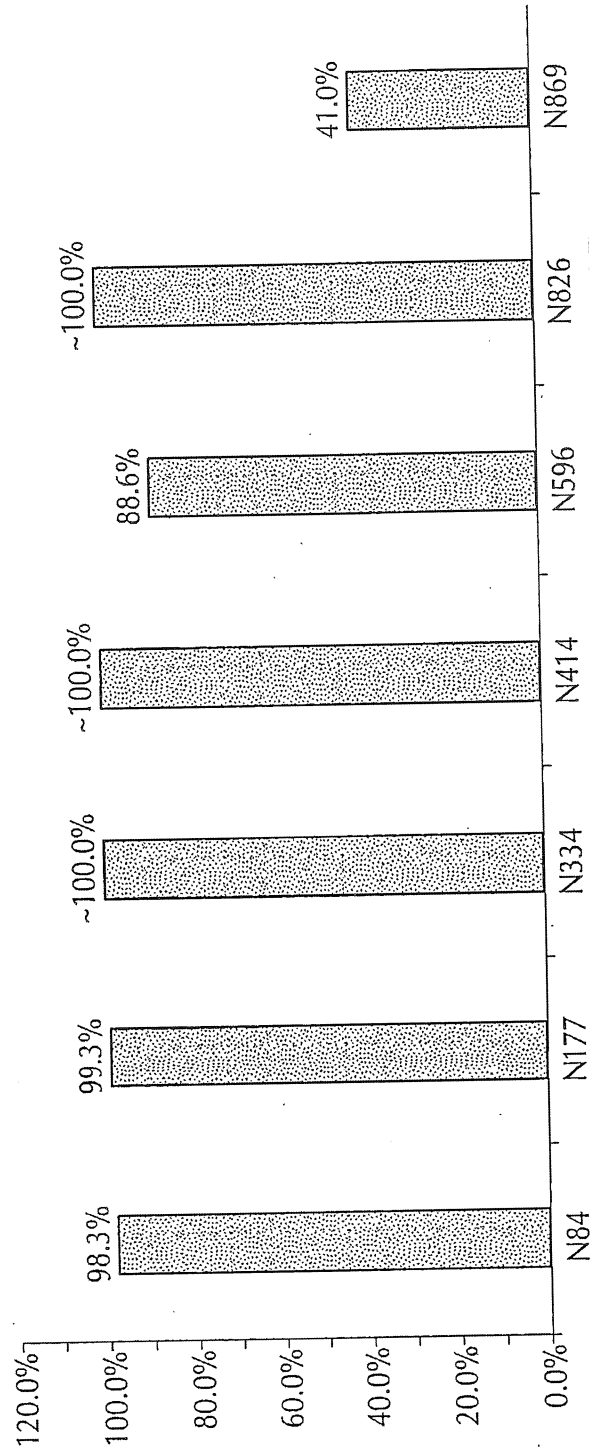
	Lumizyme	BP-rhGAA*	ATB200	
			1	2
N-glycan kiểu phức	70,7%	48,9%	51,0%	47,5%
N-glycan kiểu lai	6,7%	9,7%	4,4%	3,7%
N-glycan kiểu Manosa cao:				
Không phosphoryl hóa	15,8%	23,7%	14,0%	9,9%
Mono-M6P	5,2%	10,4%	13,4%	14,2%
Bis-M6P	1,6%	6,8%	17,2%	24,7%

HÌNH 10

TRANG THAY THẾ

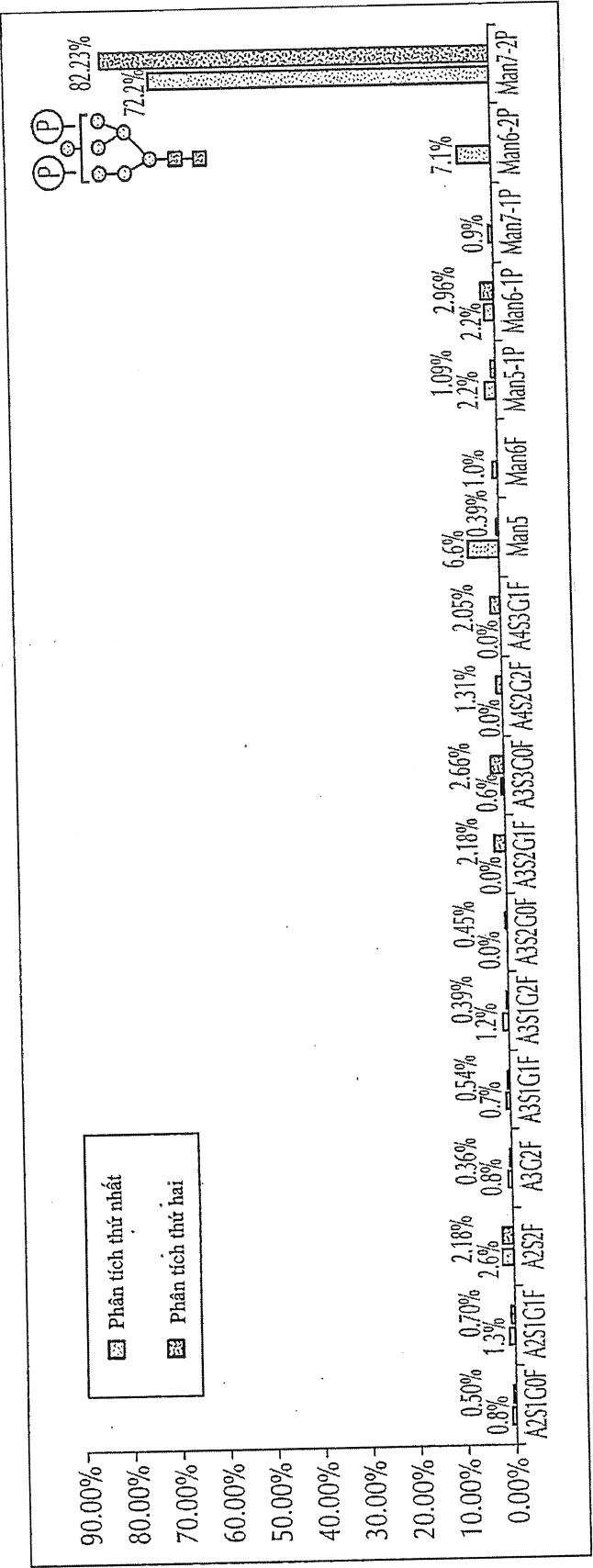
11/42

Độ chiếm giữ vị trí N-glycosyl hóa của ATB200



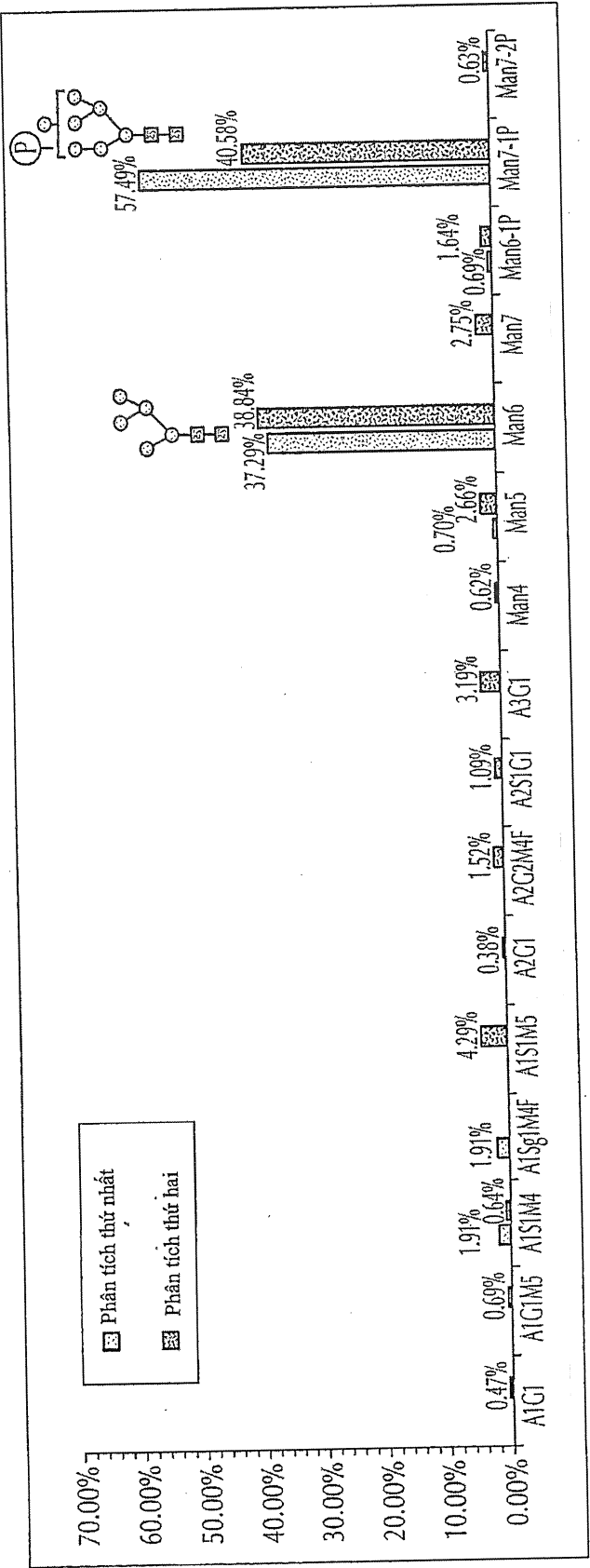
HÌNH 11A

Biên dạng N-glycosyl hóa của N84

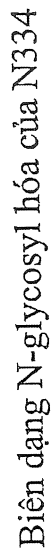


HÌNH 11B

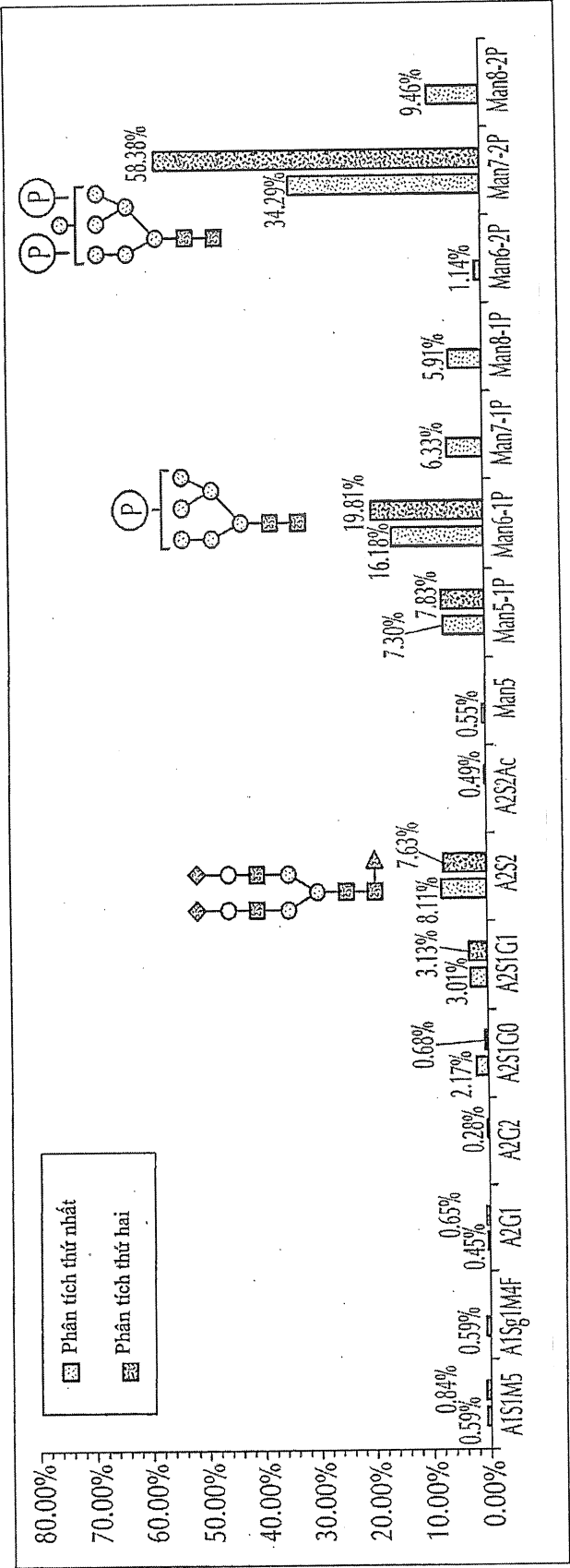
Biên dạng N-glycosyl hóa của N177



HÌNH 11C

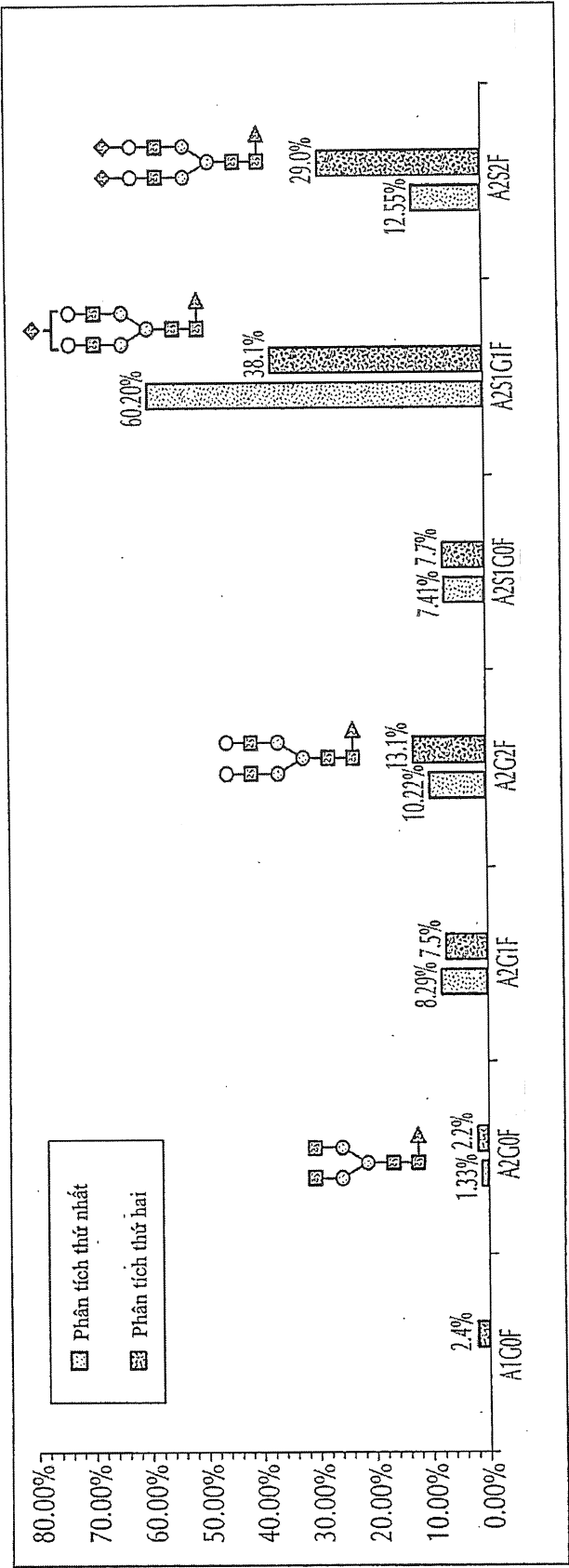


Biên dạng N-glycosyl hóa của N414



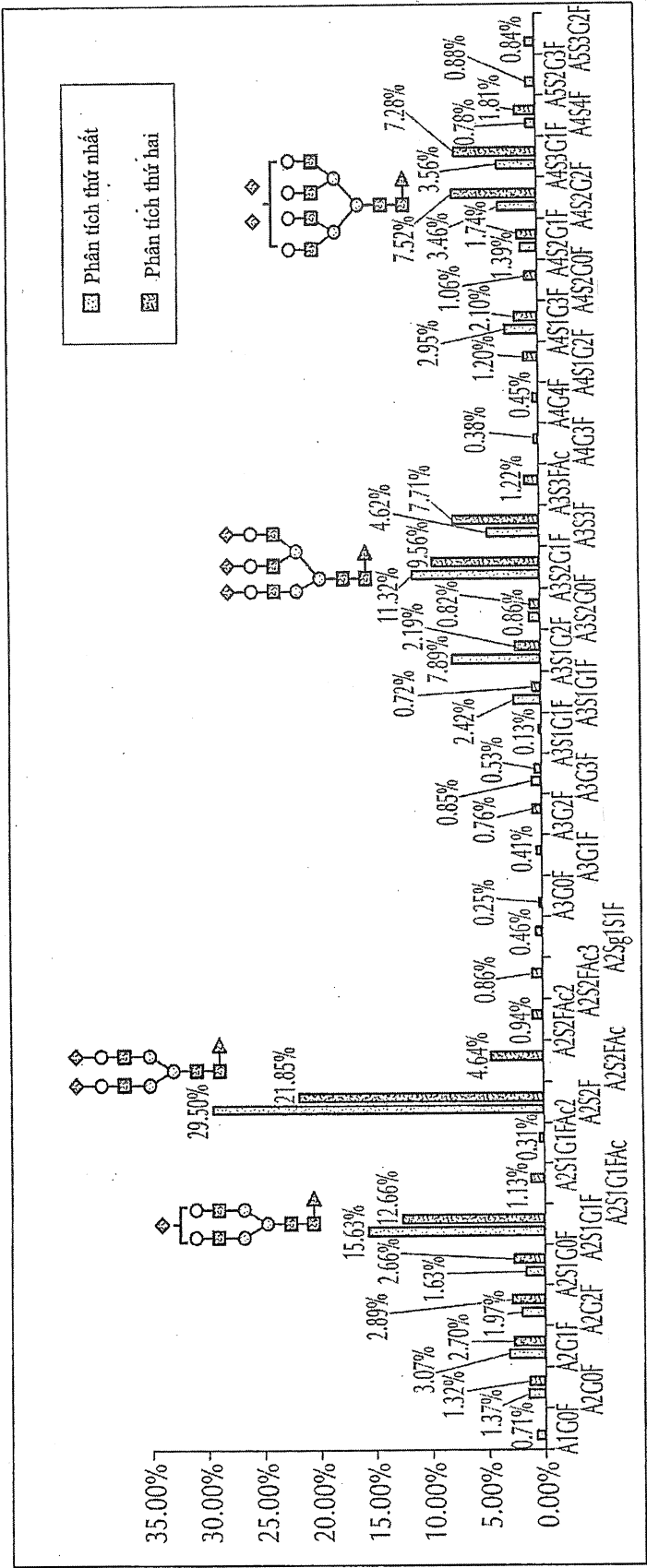
HÌNH 11E

Biên dạng N-glycosyl hóa của N596



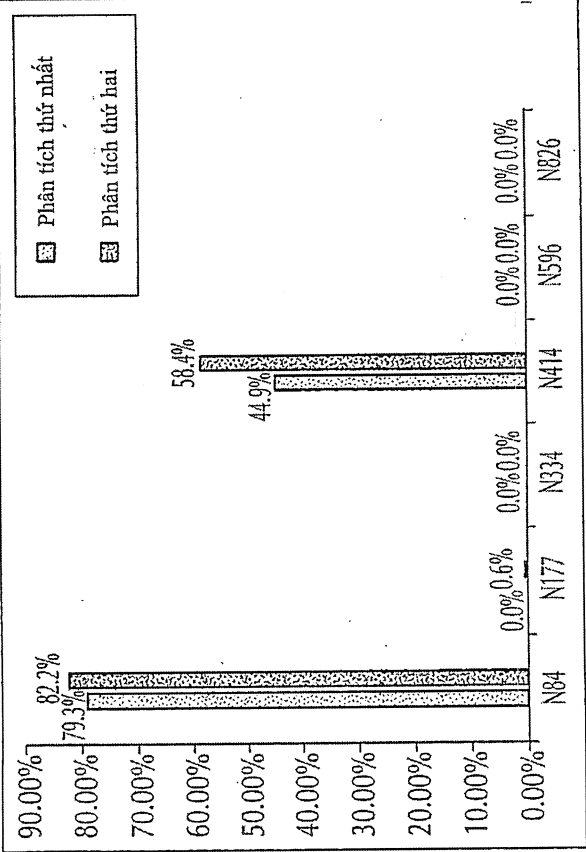
HÌNH 11F

Biên dạng N-glycosyl hóa của N826

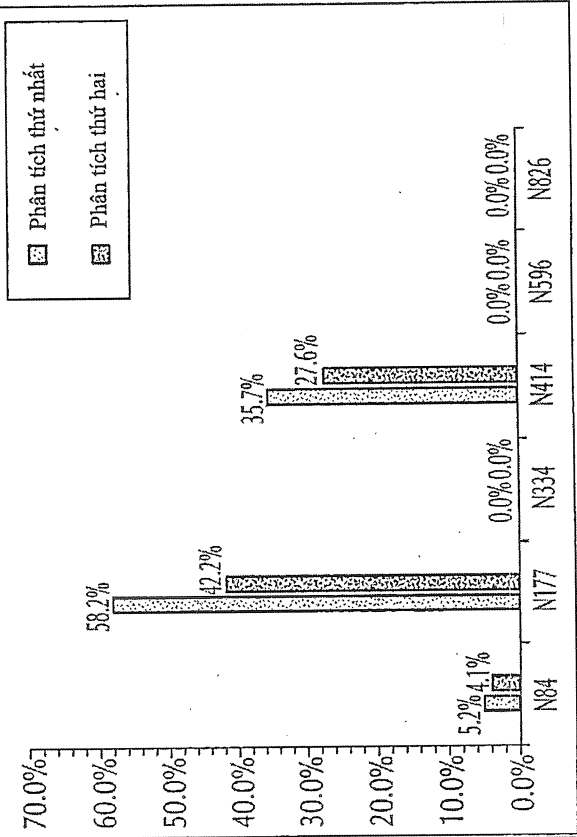


Phân trăm tương đối bis-M6P và mono-M6P ở mỗi vị trí N-glycosyl hóa

Phân trăm các loài Bis-M6P ở mỗi vị trí N-glycosyl hóa

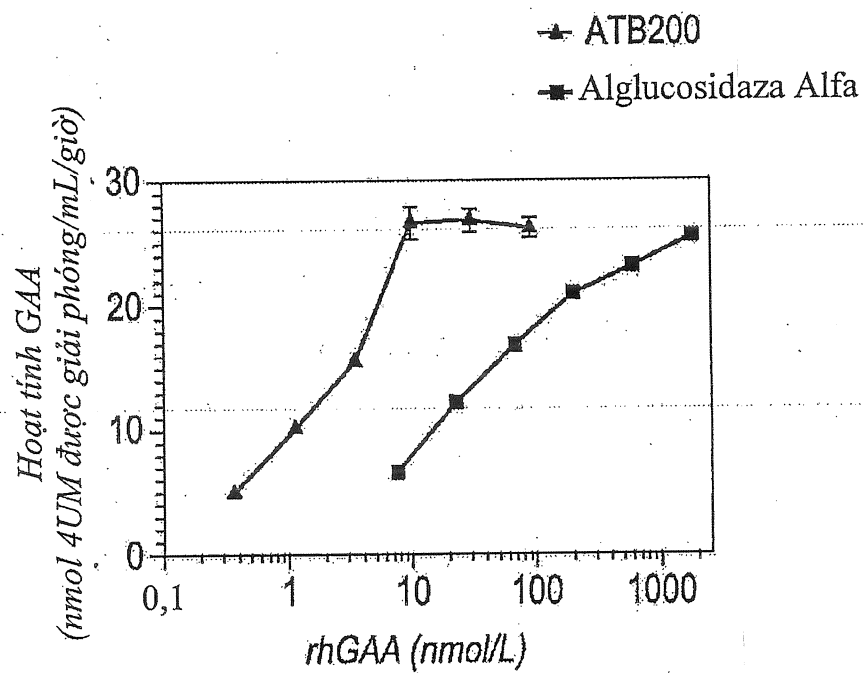


Phân trăm các loài Mono-M6P ở mỗi vị trí N-glycosyl hóa



HÌNH 11H

19/42

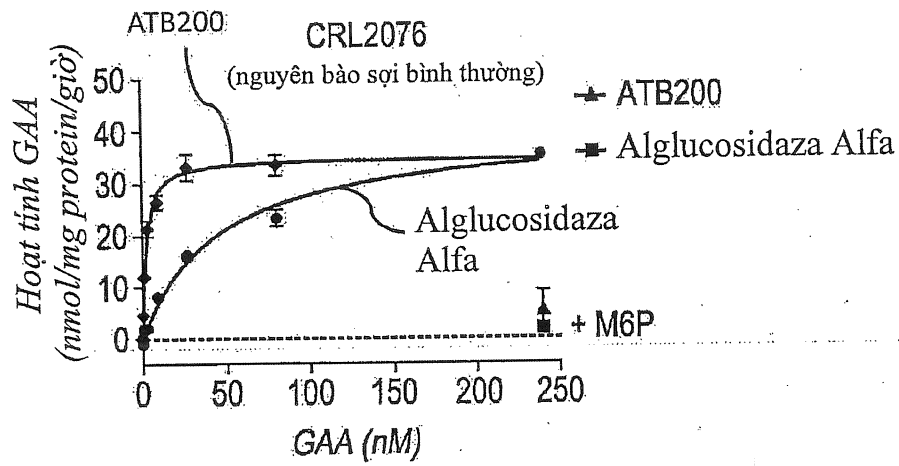


HÌNH 12A

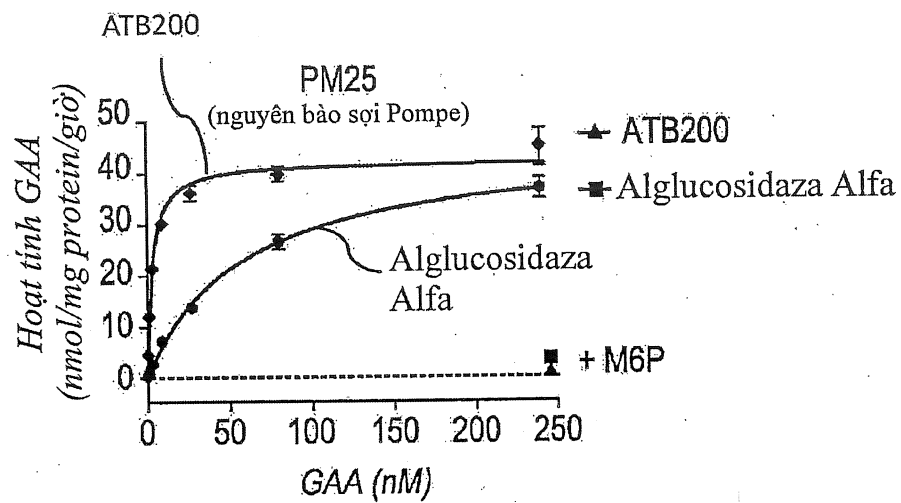
Glycan	Alglucosidaza Alfa (mol bis-glycan/ mol protein)	ATB200 (mol bis-glycan/ mol protein)
Bis-M6P	0,1	1,3

HÌNH 12B

20/42



HÌNH 13A

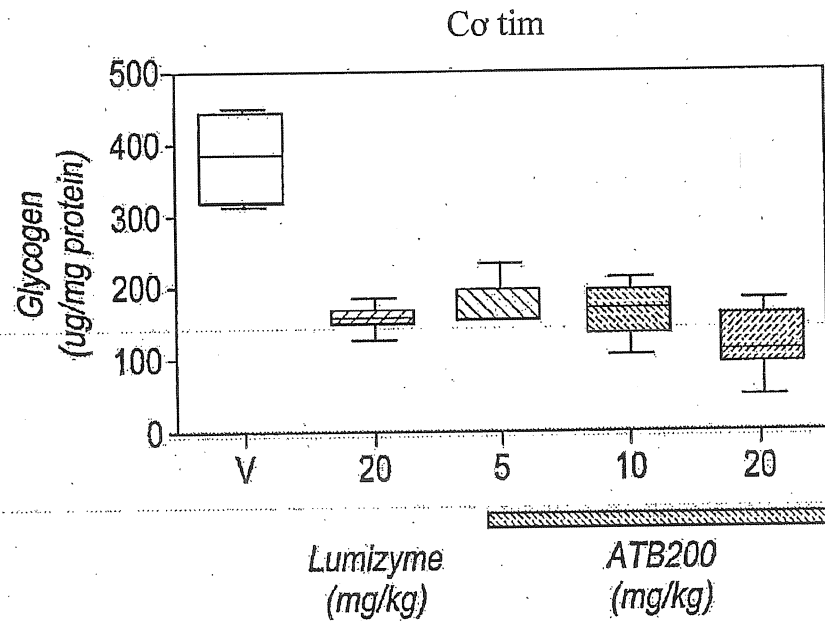


HÌNH 13B

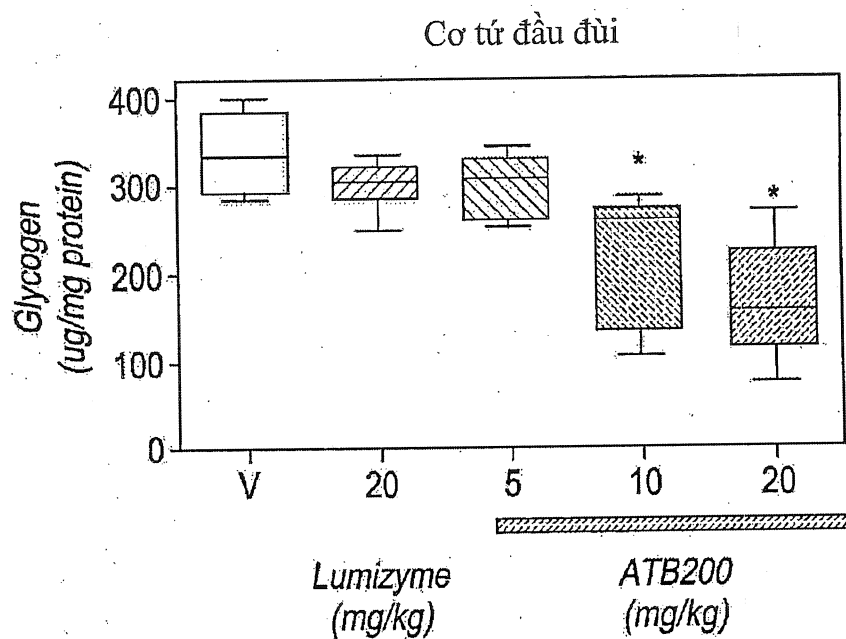
Dòng tế bào	$K_{hấp thu}$ (nM)	
	AT200	Lumizyme
bình thường	2	56
Pompe	3	57

HÌNH 13C

21/42



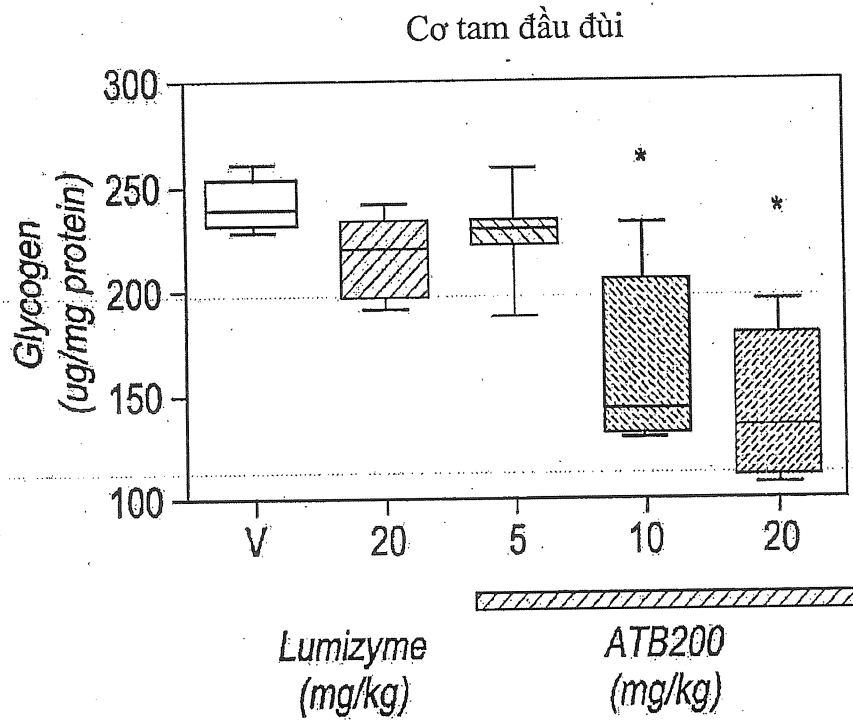
HÌNH 14A



HÌNH 14B

TRANG THAY THẾ (ĐIỀU 26)

22/42



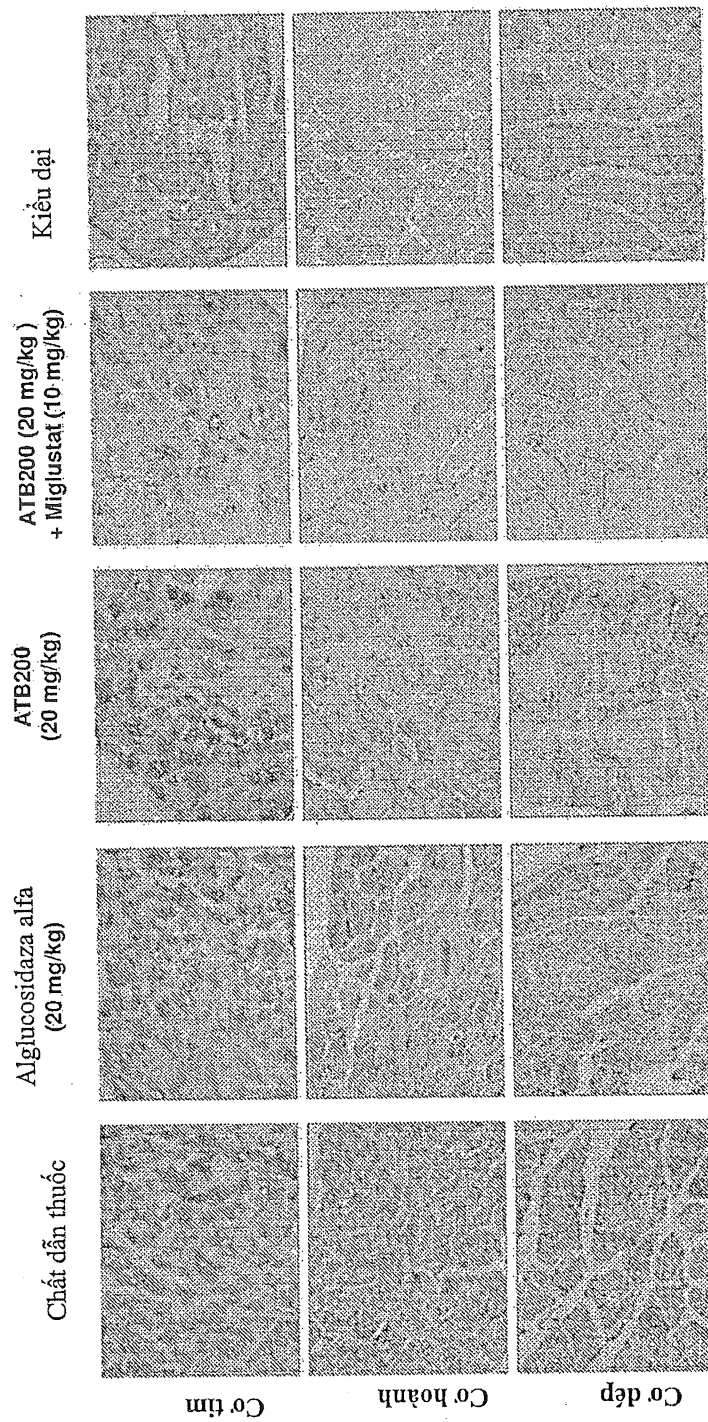
HÌNH 14C

So sánh % giảm glycogen ở chuột *Gaa* KO sau khi dùng Lumizyme hoặc ATB200 (có hoặc không có miglustat)

Enzyme ± Chất đi kèm	Cơ tứ đầu đuôi	Cơ tam đầu đuôi
Lumizyme một mình (20 mg/kg)	14	14
ATB200 một mình (20 mg/kg)	74	62
ATB200 + Miglustat (20 mg/kg) + (10 mg/kg)	94	73

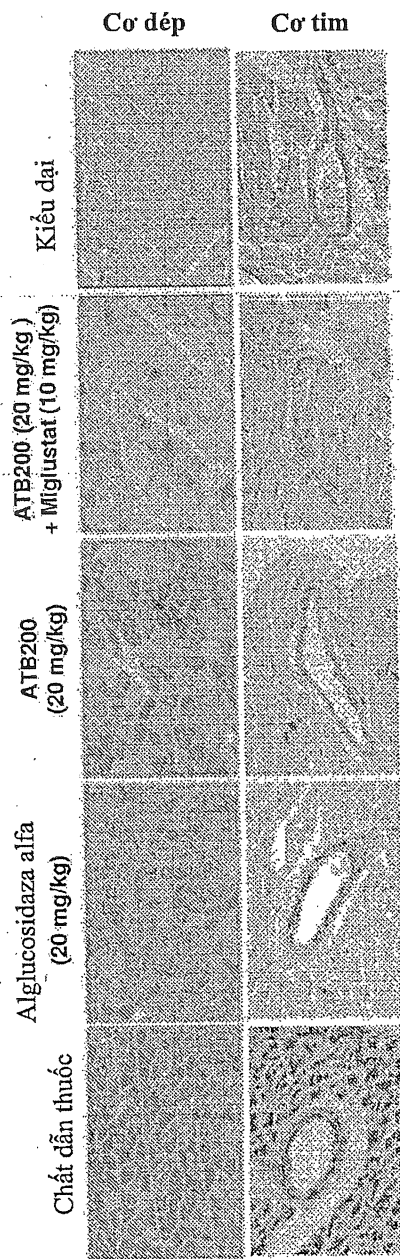
HÌNH 15

23/42

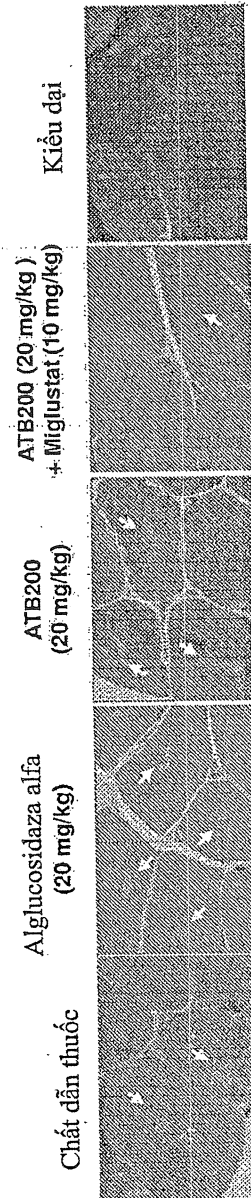


HÌNH 16

24/42

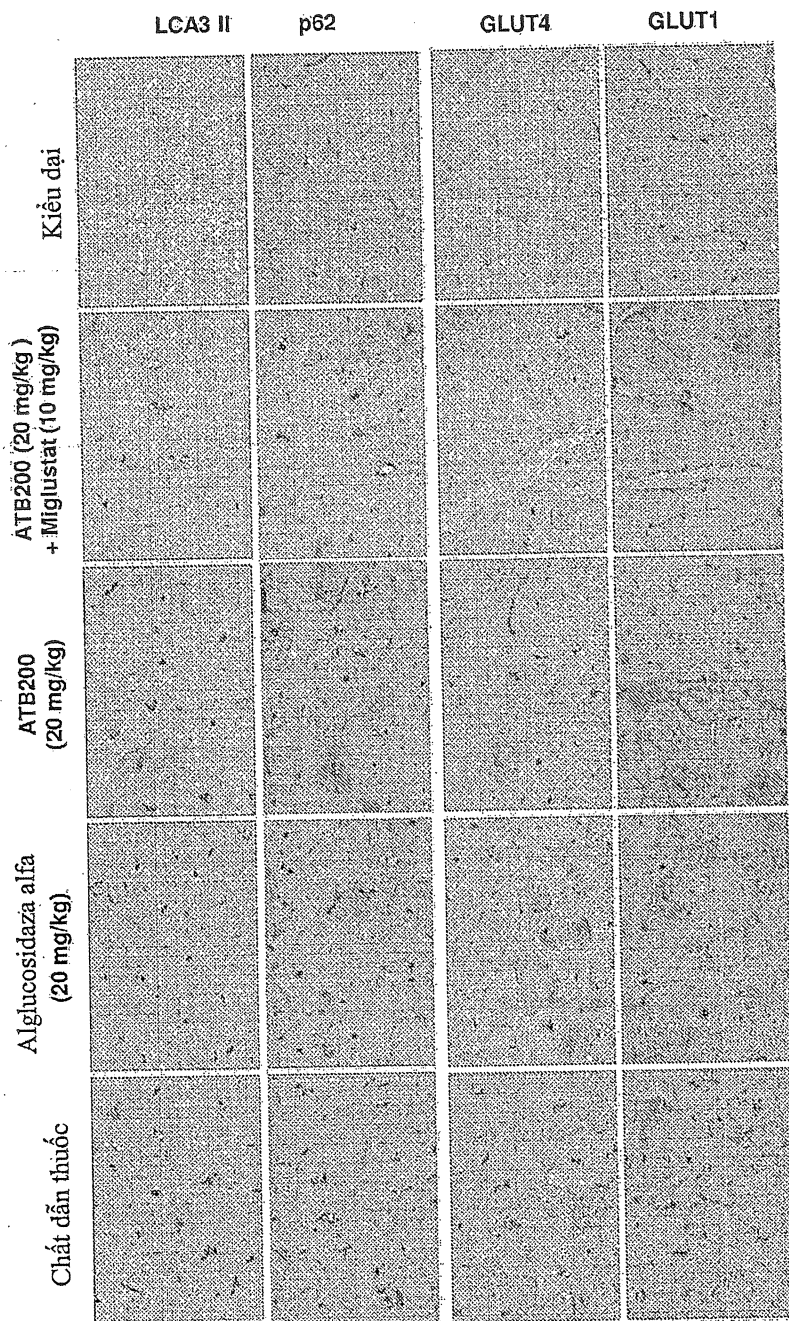


HÌNH 17



HÌNH 18

25/42

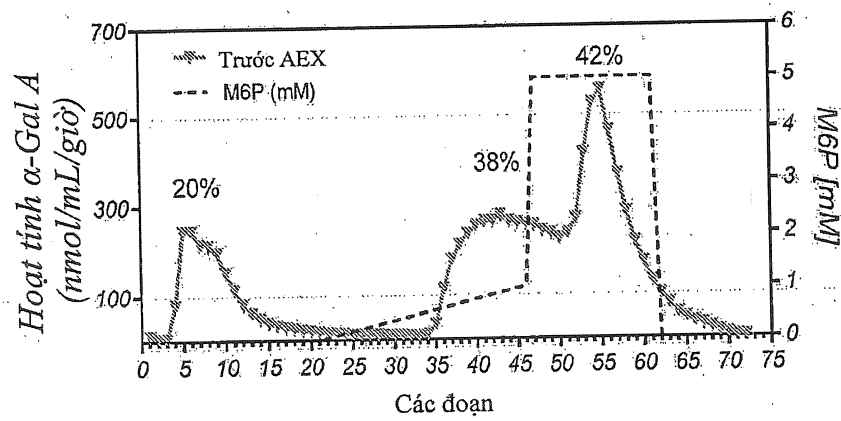


HÌNH 19

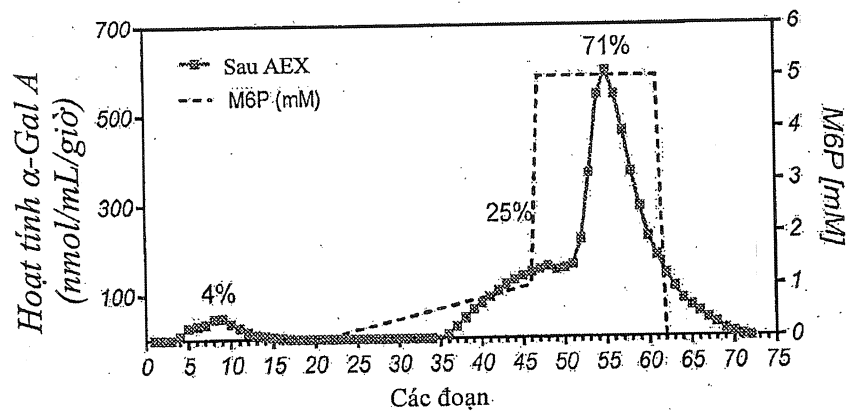
TRANG THAY THỂ (ĐIỀU 26)

26/42

A



B

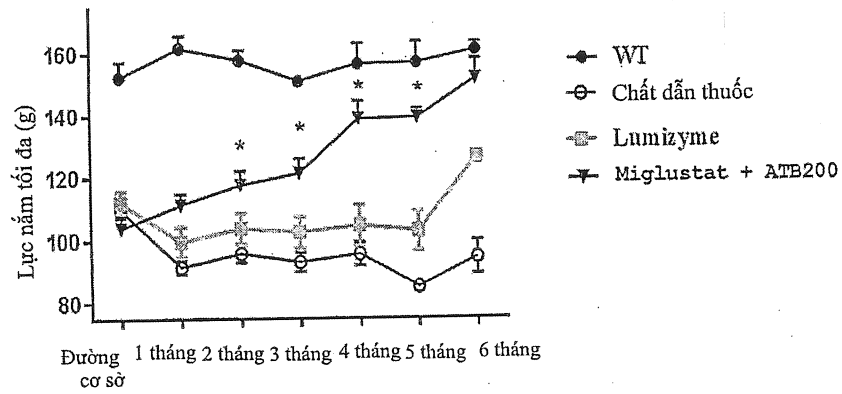


HÌNH 20

TRANG THAY THẾ

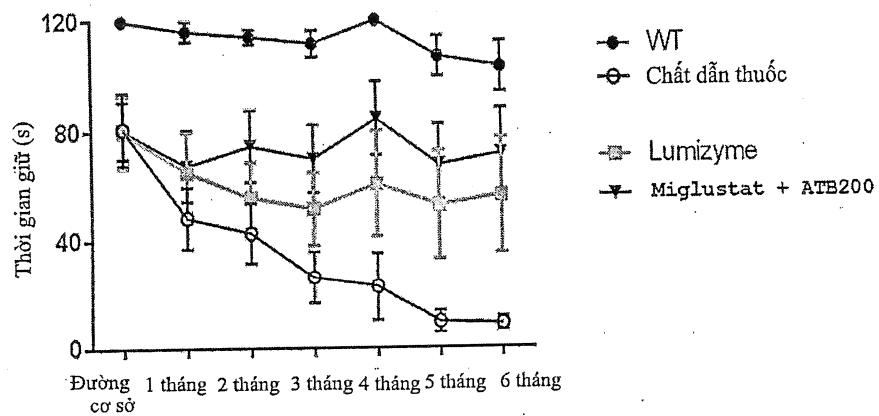
27/42

Nghiên cứu lực nắm giữ



HÌNH 21A

Nghiên cứu bàn tay nắm dây

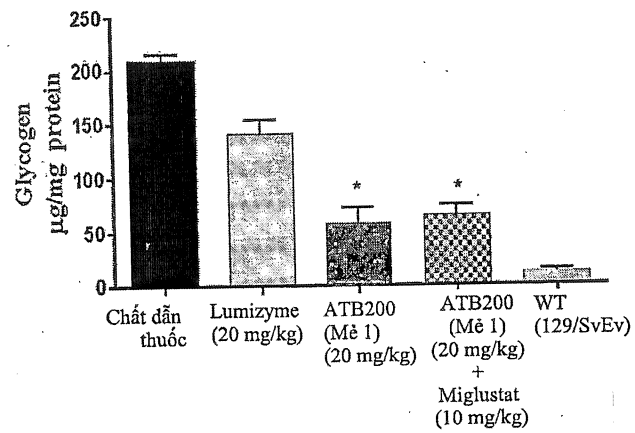


HÌNH 21B

TRANG THAY THỂ

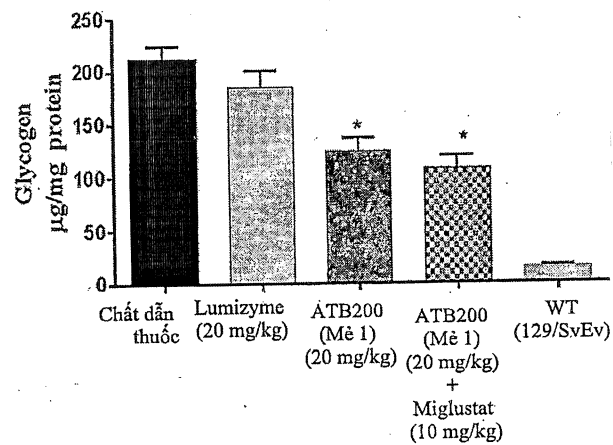
28/42

Cơ tứ đầu đùi



HÌNH 22A

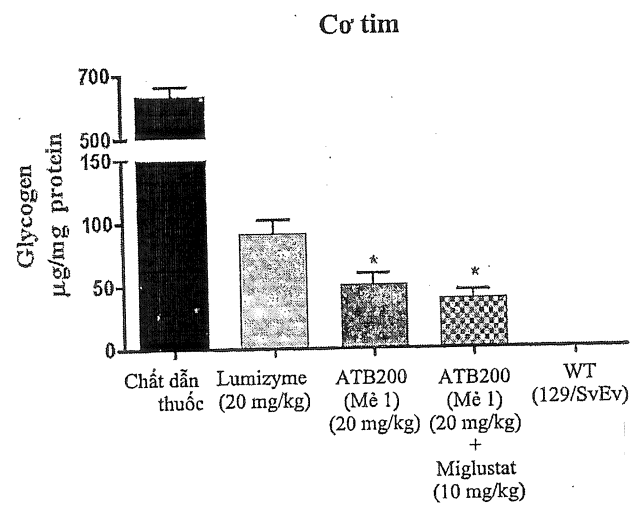
Cơ tim đầu đùi



HÌNH 22B

TRANG THAY THỂ

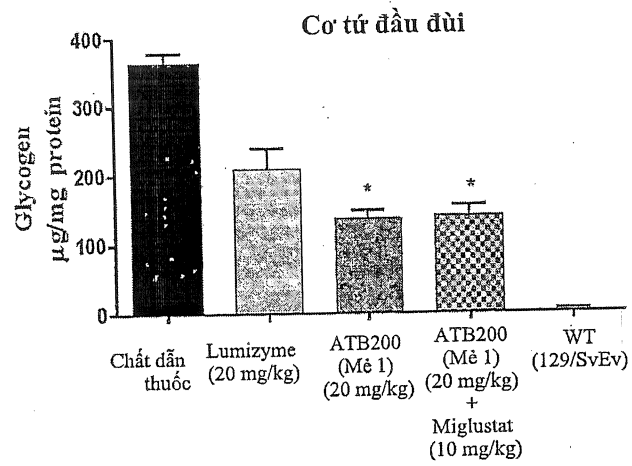
29/42



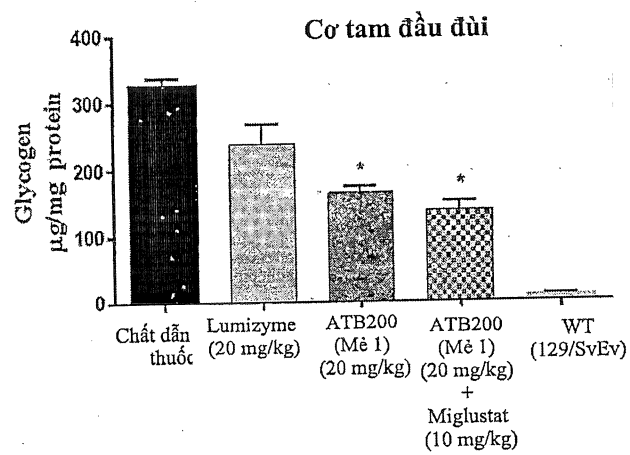
HÌNH 22C

TRANG THAY THỂ

30/42



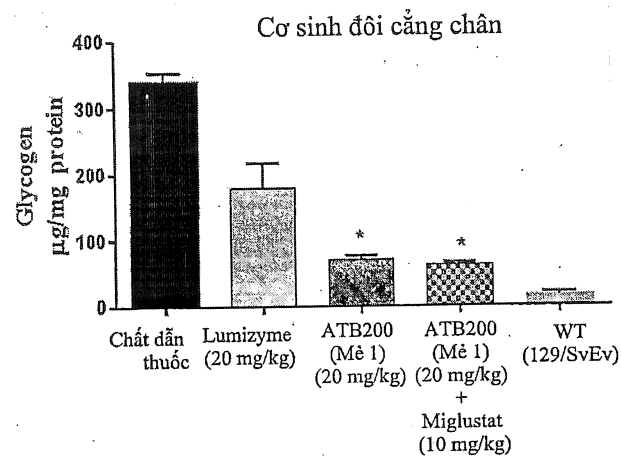
HÌNH 22D



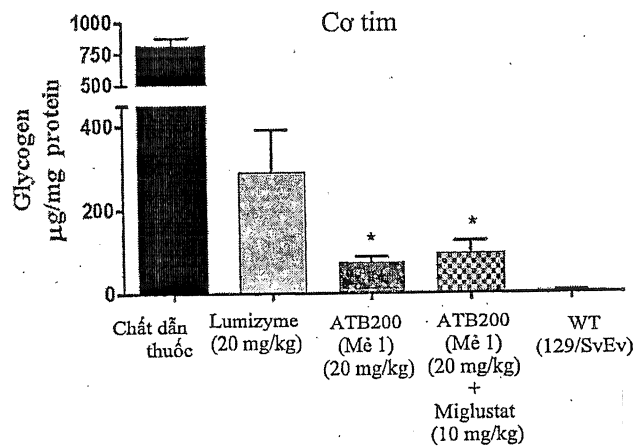
HÌNH 22E

TRANG THAY THẾ

31/42

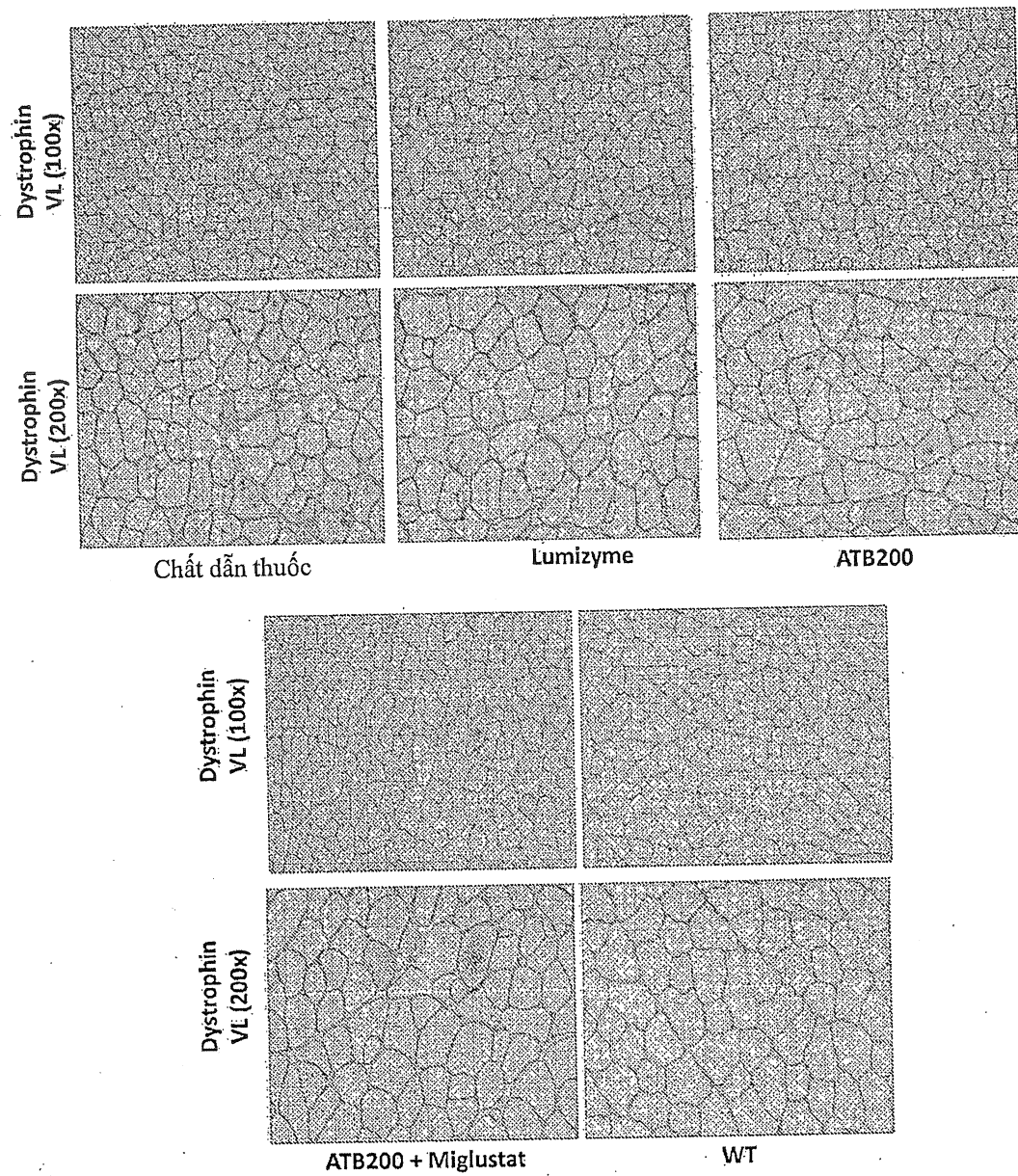


HÌNH 22F



HÌNH 22G

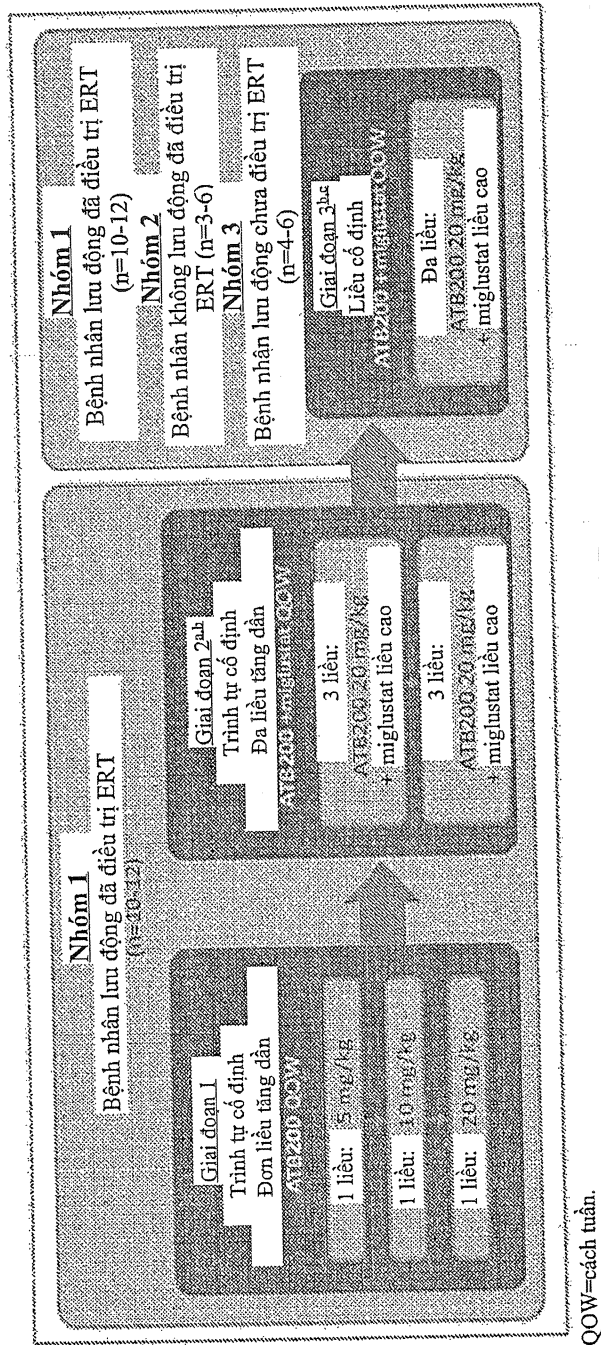
32/42



HÌNH 23

TRANG THAY THẾ (ĐIỀU 26)

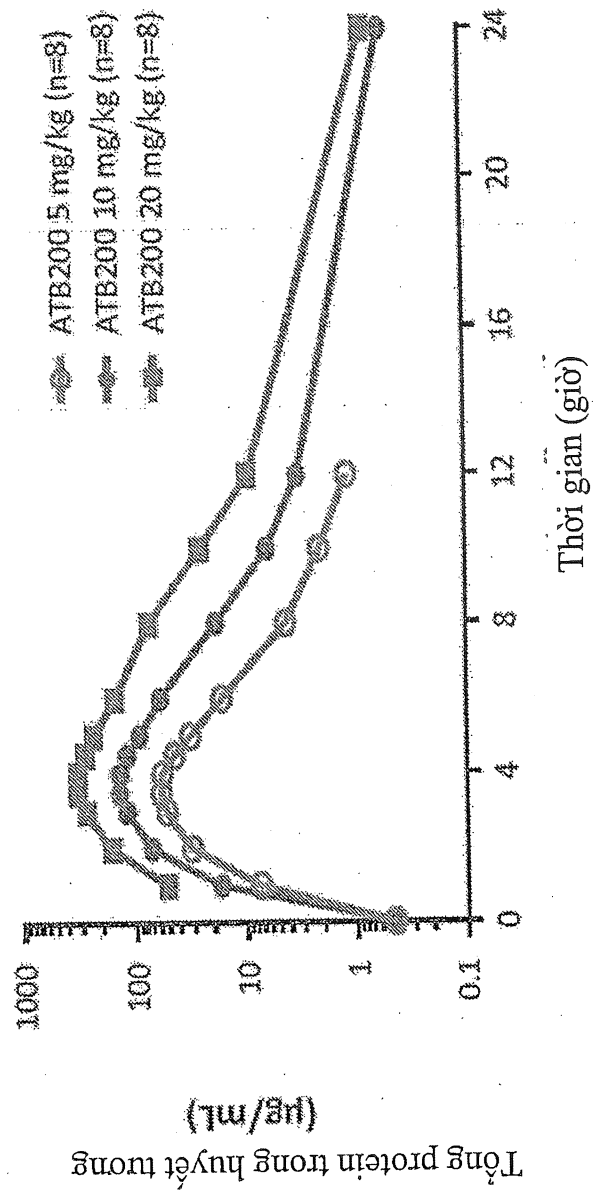
33/42



HÌNH 24

TRANG THAY THẾ (ĐIỀU 26)

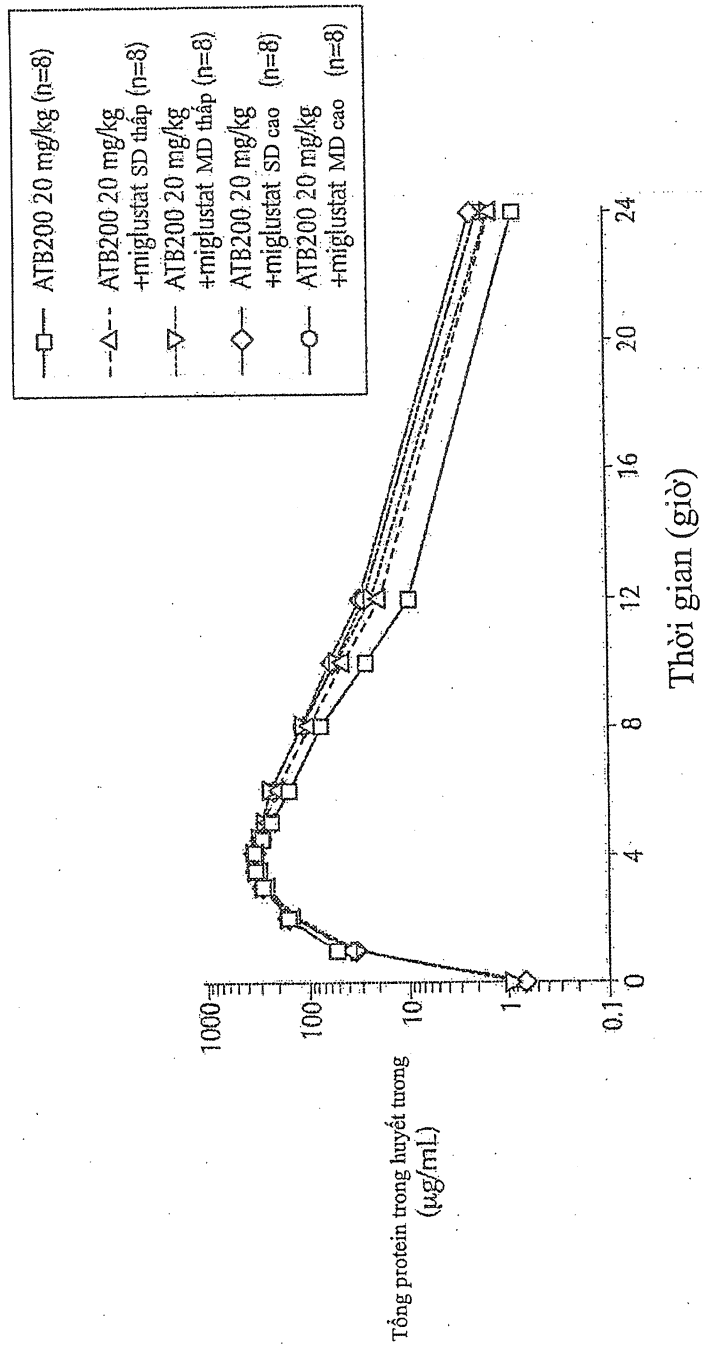
34/42



HÌNH 25A

TRANG THAY THẾ (ĐIỀU 26)

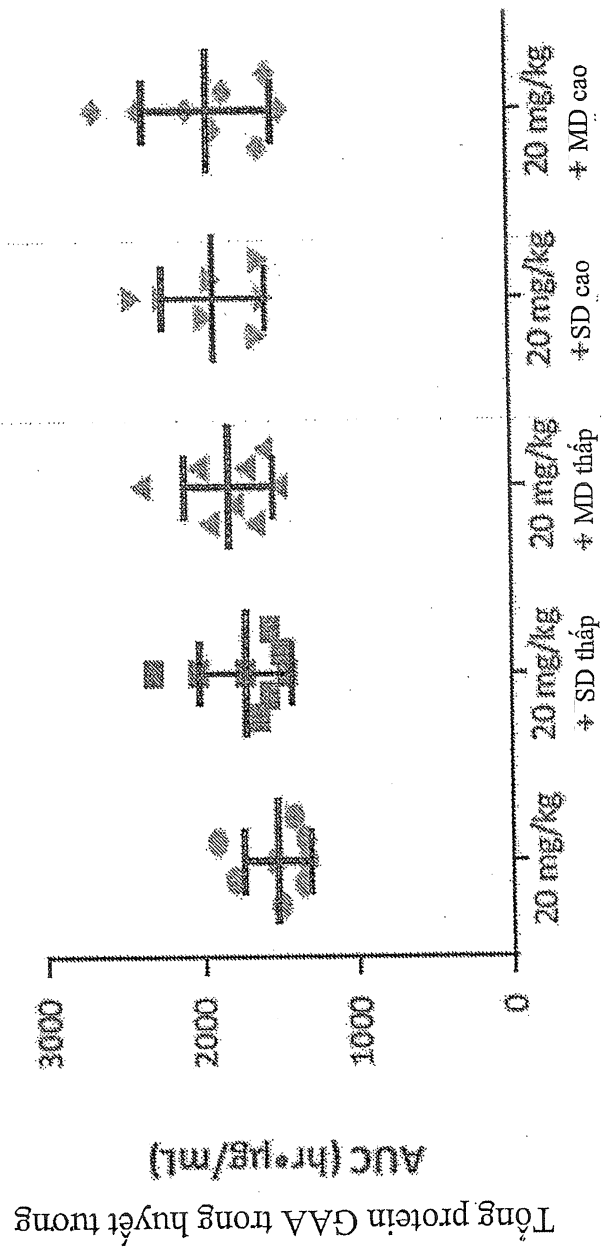
35/42



HÌNH 25B

TRANG THAY THỂ (ĐIỀU 26)

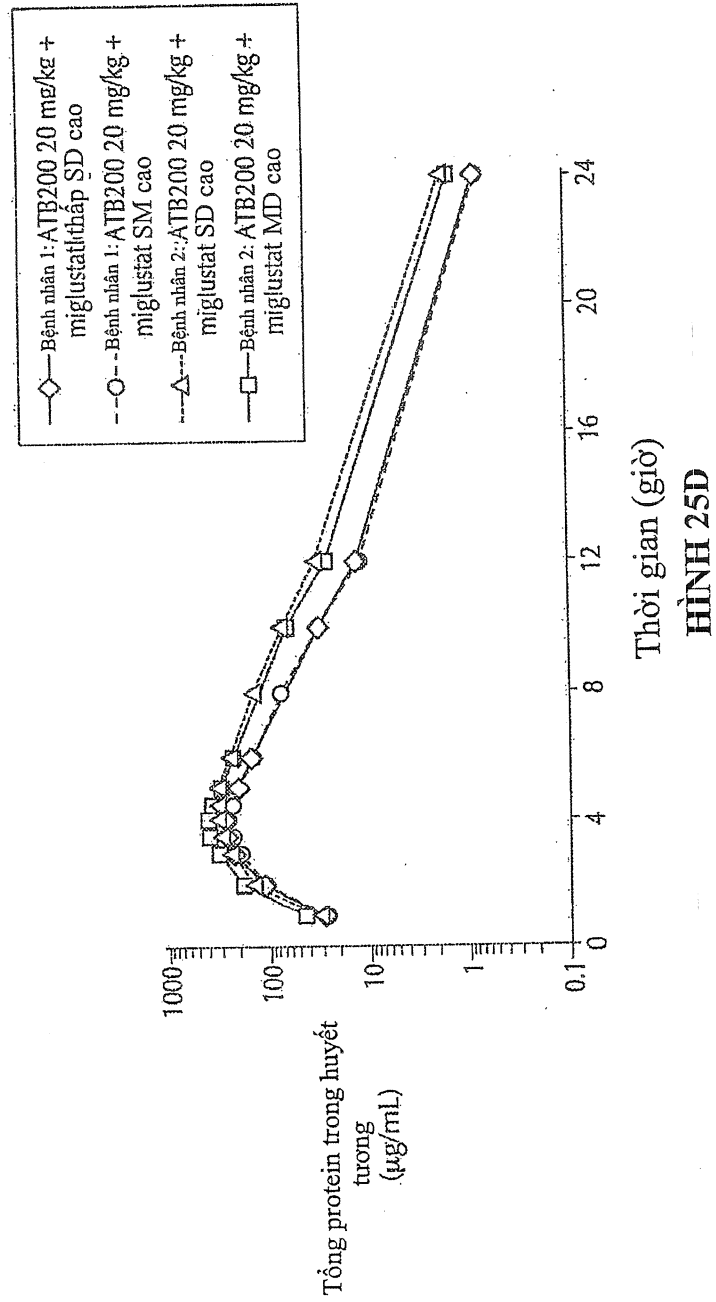
36/42



HÌNH 25C

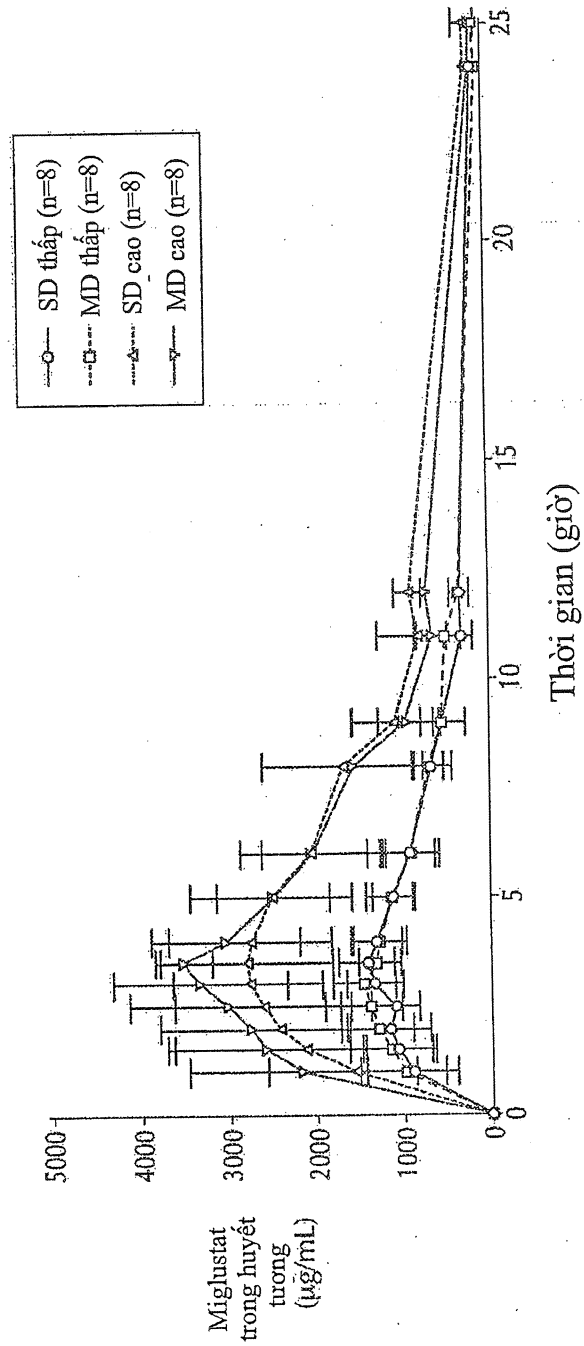
TRANG THAY THẾ (ĐIỀU 26)

37/42



TRANG THAY THỂ (ĐIỀU 26)

38/42

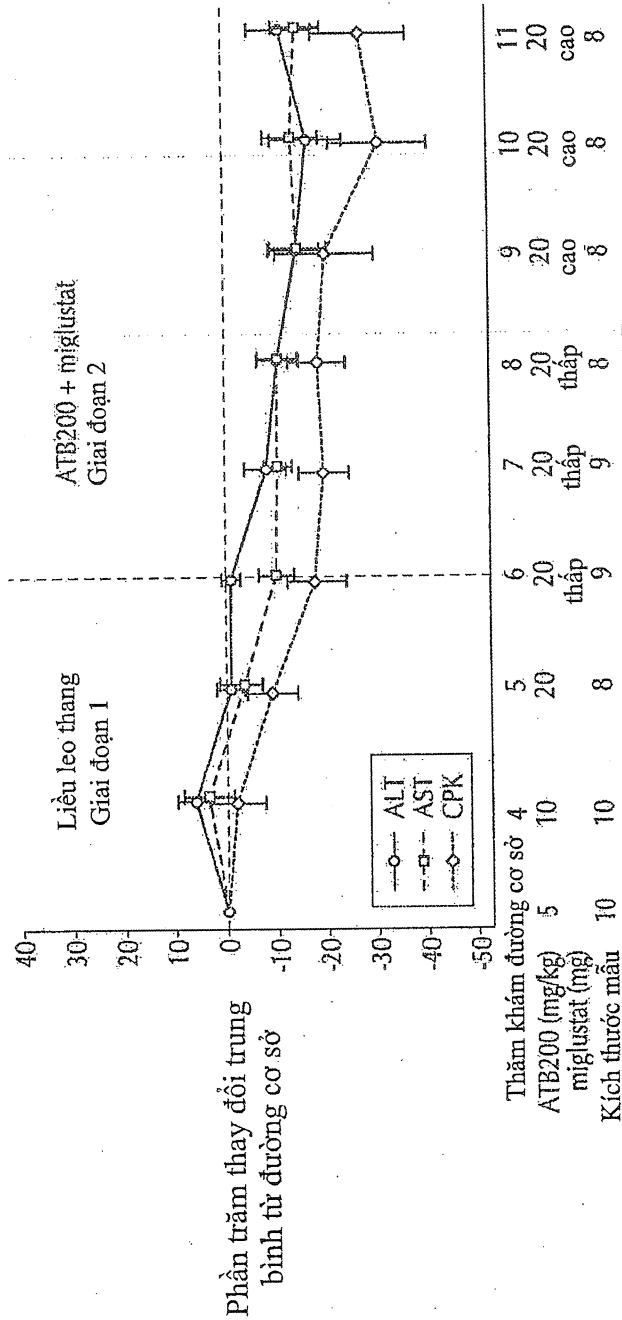


HÌNH 26

TRANG THAY THẾ (ĐIỀU 26)

39/42

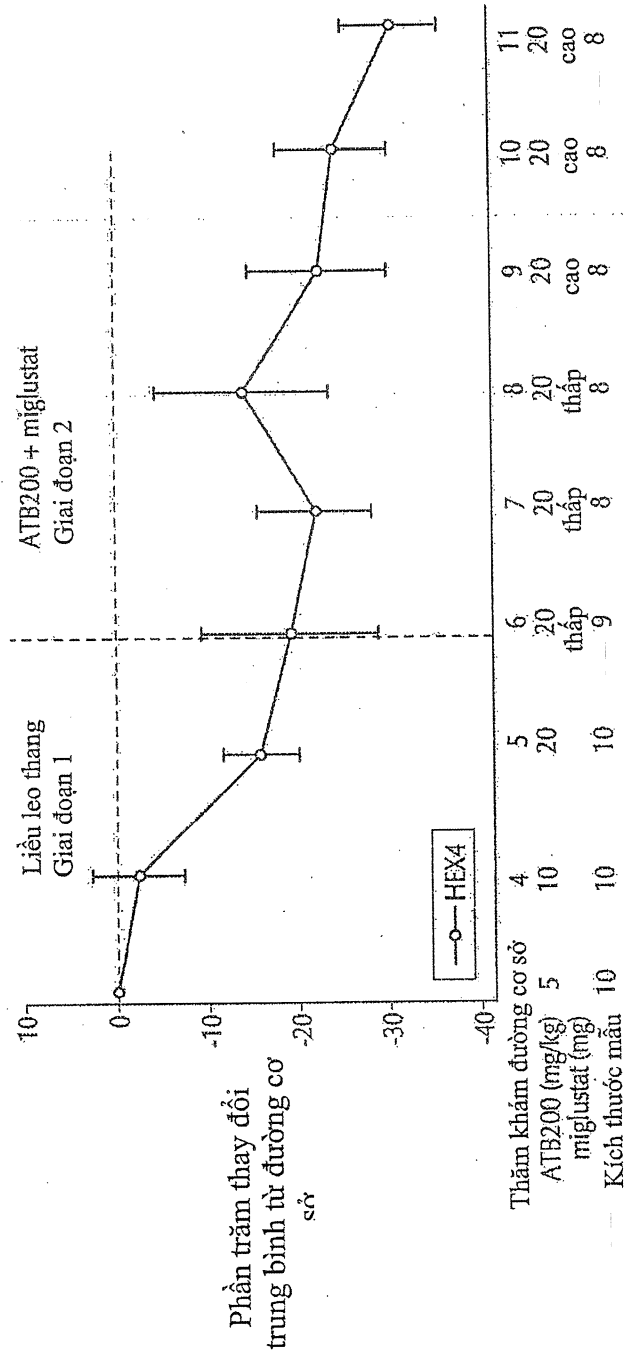
Nhóm 1: Phần trăm thay đổi từ đường cơ sở đối với ALT, AST, và CPK



HÌNH 27A

40/42

Nhóm 1: Phần trăm thay đổi từ đường cơ sở đối với HEX4

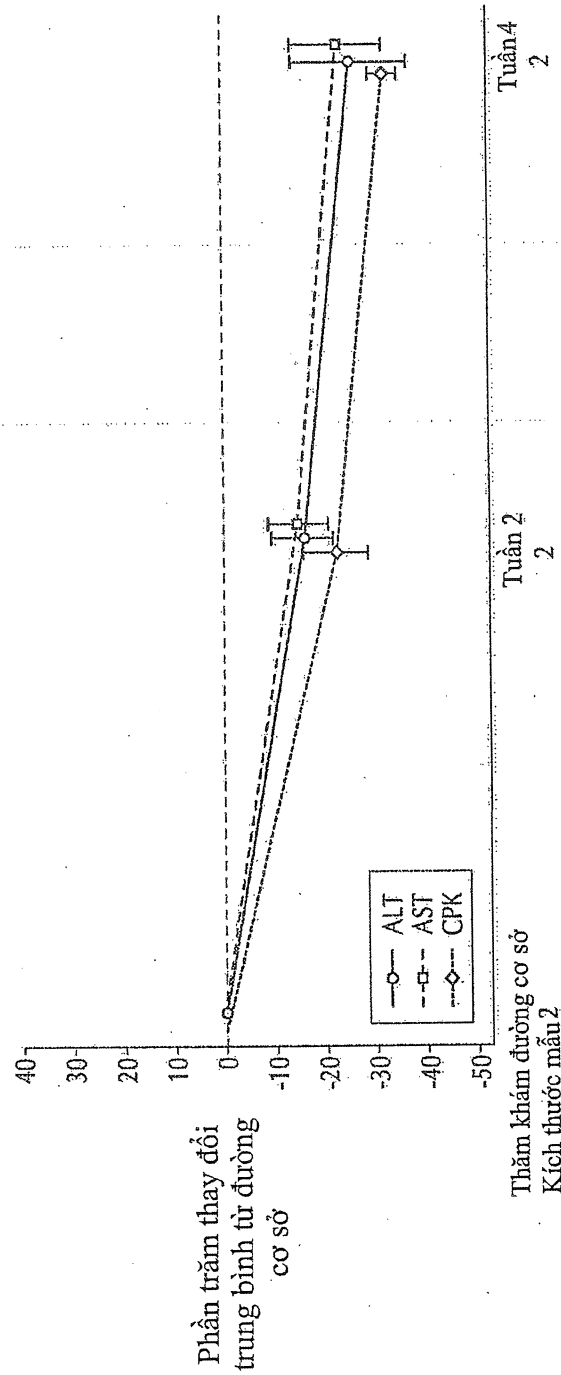


HÌNH 27B

TRANG THAY THỂ (ĐIỀU 26)

41/42

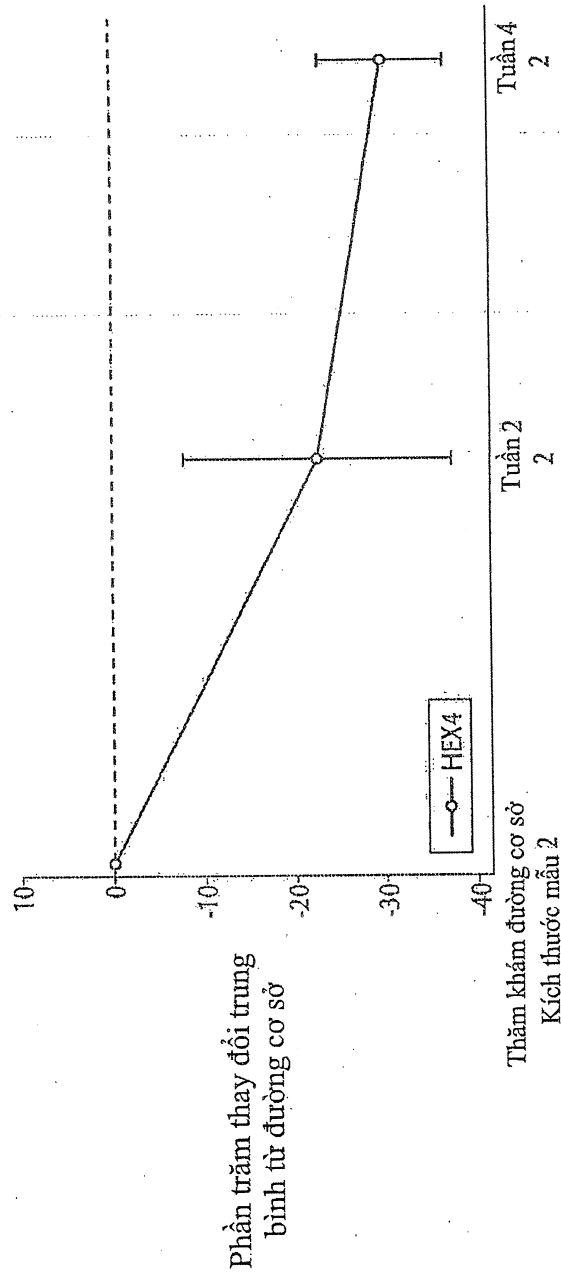
Nhóm 3: Phần trăm thay đổi từ đường cơ sở đối với ALT, AST, và CPK



HÌNH 27C

42/42

Nhóm 3: Phần trăm thay đổi từ đường cơ sở đối với HEX4



HÌNH 27D