(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2025년04월01일
(11) 등록번호 10-2787774
(24) 등록일자 2025년03월24일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 38/47 (2006.01) *A61P 21/00* (2006.01)
A61P 25/00 (2006.01) *A61P 43/00* (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 38/47 (2013.01)
A61P 21/00 (2018.01)
(21) 출원번호 10-2019-7036907
(22) 출원일자(국제) 2018년05월15일
심사청구일자 2021년05월13일
(85) 번역문제출일자 2019년12월13일
(65) 공개번호 10-2020-0004414
(43) 공개일자 2020년01월13일
(86) 국제출원번호 PCT/US2018/032815
(87) 국제공개번호 WO 2018/213340
국제공개일자 2018년11월22일
(30) 우선권주장
62/506,561 2017년05월15일 미국(US)
(뒷면에 계속)
(56) 선행기술조사문헌
WO2016054231 A1*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
아미쿠스 세라퓨틱스, 인코포레이티드
미국 펜실베니아 19104 필라델피아 마켓 스트리트 3675
(72) 발명자
두, 헝
미국 08512 뉴저지주 크랜버리 세다 브룩 드라이브 1
갓샬, 러셀
미국 08512 뉴저지주 크랜버리 세다 브룩 드라이브 1
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
양영준, 김영

전체 청구항 수 : 총 9 항 심사관 : 정혜진

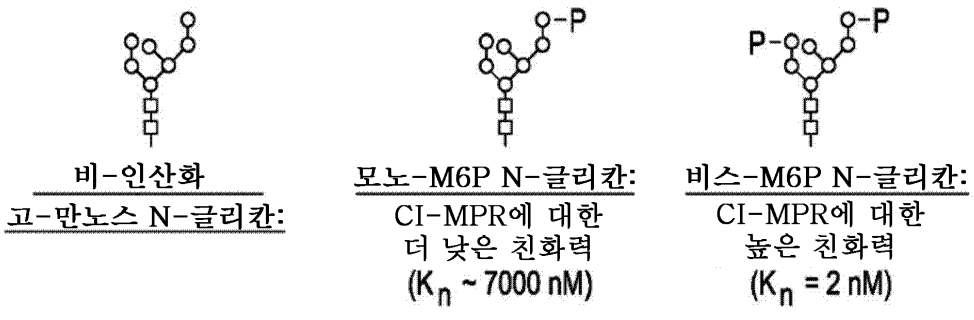
(54) 발명의 명칭 **재조합 인간 산 알파-글루코시다제**

(57) 요 약

차이니즈 햄스터 난소 (CHO) 세포에서 발현되고, 알글루코시다제 알파의 1개 또는 2개의 만노스-6-포스페이트 잔기를 보유하는 N-글리칸 단위의 함량에 비교했을 때 증가된 함량의 1개 또는 2개의 만노스-6-포스페이트 잔기를 보유하는 N-글리칸 단위를 포함하는 재조합 산 α-글루코시다제, 및 재조합 산 α-글루코시다제를 포함하는 제약 조성물이 제공된다. 대상체에게 투여하기 위한 재조합 산 α-글루코시다제 또는 제약 조성물의 생산, 정제 및 제형화 방법, 및 재조합 산 α-글루코시다제 또는 제약 조성물을 사용하여 폼페병과 같은 질환 또는 장애를 치료하는 방법이 본원에서 또한 제공된다.

대 표 도 - 도1a

고-만노스 및 인산화 올리고당류의 구조 및 수용체 친화력



(52) CPC특허분류
A61P 25/00 (2018.01)
A61P 43/00 (2018.01)
C12Y 302/0102 (2013.01)

(72) 발명자
칸나, 리치
미국 08512 뉴저지주 크랜버리 세다 브룩 드라이브 1
룬, 이
미국 08512 뉴저지주 크랜버리 세다 브룩 드라이브 1
차르, 힝
미국 08512 뉴저지주 크랜버리 세다 브룩 드라이브 1
데슬러, 세르게이
미국 08512 뉴저지주 크랜버리 세다 브룩 드라이브 1
선덜랜드, 웬디
미국 08512 뉴저지주 크랜버리 세다 브룩 드라이브 1
딜론, 엔리크
미국 08512 뉴저지주 크랜버리 세다 브룩 드라이브 1

(30) 우선권주장
62/506,574 2017년05월15일 미국(US)
62/506,569 2017년05월15일 미국(US)
62/529,300 2017년07월06일 미국(US)
62/564,083 2017년09월27일 미국(US)
62/567,334 2017년10월03일 미국(US)
62/618,021 2018년01월16일 미국(US)
62/624,638 2018년01월31일 미국(US)
62/660,758 2018년04월20일 미국(US)

명 세 서

청구범위

청구항 1

폼페병 치료를 필요로 하는 대상체에서 폼페병의 치료에 사용하기 위한, 재조합 인간 산 α-글루코시다제 (rhGAA) 분자 집단을 포함하는 조성물이며, 여기서 rhGAA 분자는 차이니즈 햄스터 난소 (CHO) 세포로부터 생산되고;

rhGAA 분자는 7개의 잠재적 N-글리코실화 부위를 포함하고;

rhGAA 분자는 평균적으로 3-4개의 만노스-6-포스페이트 (M6P) 잔기를 포함하고;

rhGAA 분자는 액체 크로마토그래피-탠덤 질량 분광법 (LC-MS/MS)을 사용하여 결정 시 제1 잠재적 N-글리코실화 부위에 평균적으로 rhGAA mol 당 적어도 0.5 mol의 비스-만노스-6-포스페이트 (비스-M6P)를 포함하고;

rhGAA 분자 집단은 약리적 샤페론과 공동으로 또는 순차적으로 투여되고, 여기서 약리적 샤페론은 미글루스타트 또는 이의 제약상 허용되는 염이고;

rhGAA 분자 집단은 20 mg/kg의 용량으로 정맥내 투여되고, 미글루스타트 또는 이의 제약상 허용되는 염은 260 mg의 용량으로 경구 투여되고; 여기서

(i) 대상체가 ERT-스위치 환자이고, 기준선에 비교하여, 직립 강제 폐활량 (FVC) 검사로 측정한 치료 6개월 후의 대상체의 폐 기능은 안정적이거나 개선되고/거나;

(ii) 대상체가 보행가능 ERT-스위치 환자이고, 기준선에 비교하여, 치료 6개월 후 대상체의 크레아틴 키나제 수준이 적어도 15% 감소되고/거나;

(iii) 대상체가 보행불능 ERT-스위치 환자이고, 기준선에 비교하여, 치료 6개월 후 대상체의 크레아틴 키나제 수준이 적어도 20% 감소되고/거나;

(iv) 대상체가 ERT-스위치 환자이고, 기준선에 비교하여, 치료 6개월 후 대상체의 소변 육탄당 사당류 수준이 적어도 35% 감소되는 것인 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 미글루스타트 또는 이의 제약상 허용되는 염이 rhGAA의 투여 전에 투여되는 것인 조성물.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, rhGAA 분자가 서열식별번호(SEQ ID NO): 1 또는 서열식별번호: 5와 적어도 95% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 것인 조성물.

청구항 4

제1항 또는 제2항에 있어서, LC-MS/MS를 사용하여 결정 시, rhGAA 분자가 평균적으로 rhGAA mol 당 0.5 mol 내지 7.0 mol의 모노-M6P 또는 비스-M6P를 포함하는 것인 조성물.

청구항 5

제1항 또는 제2항에 있어서, LC-MS/MS를 사용하여 결정 시, rhGAA 분자가 평균적으로 rhGAA mol 당 2.5 mol 내지 3.5 mol의 M6P 및 rhGAA mol 당 4 mol 내지 5.4 mol의 시알산을 포함하는 것인 조성물.

청구항 6

제1항 또는 제2항 중 어느 한 항에 있어서, rhGAA mol 당, rhGAA 분자가 평균적으로

(a) 제2 잠재적 N-글리코실화 부위에 0.4 내지 0.6 mol의 모노-M6P;

(b) 제4 잠재적 N-글리코실화 부위에 0.4 내지 0.6 mol의 비스-M6P; 및

(c) 제4 잠재적 N-글리코실화 부위에 0.3 내지 0.4 mol의 모노-M6P

를 포함하고, (a)-(c)가 LC-MS/MS를 사용하여 결정되는 것인 조성물.

청구항 7

제1항 또는 제2항에 있어서, rhGAA mol 당, rhGAA 분자가 4 mol 내지 7.3 mol의 시알산을 추가로 포함하고,

여기서 rhGAA mol 당, rhGAA 분자가 평균적으로

(a) 제3 잠재적 N-글리코실화 부위에 0.9 내지 1.2 mol의 시알산;

(b) 제5 잠재적 N-글리코실화 부위에 0.8 내지 0.9 mol의 시알산; 및

(c) 제6 잠재적 N-글리코실화 부위에 1.5 내지 4.2 mol의 시알산

을 포함하고, (a)-(c)가 LC-MS/MS를 사용하여 결정되는 것인 조성물.

청구항 8

제1항 또는 제2항에 있어서, rhGAA 분자 집단이 제약 조성물로 제형화되고, 제약 조성물이 시트레이트, 포스페이트 및 이의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 하나의 완충제, 및 만니톨, 폴리소르베이트 80 및 이의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 하나의 부형제를 추가로 포함하고, 제약 조성물의 pH가 5.0 내지 7.0인 조성물.

청구항 9

제1항 또는 제2항에 있어서, 제약 조성물에서, rhGAA 분자 집단이 5-50 mg/mL의 농도로 존재하고, 적어도 하나의 완충제가 10-100 mM의 농도로 존재하는 시트르산나트륨 완충제이고, 적어도 하나의 부형제가 10-50 mg/mL의 농도로 존재하는 만니톨 및 0.1-1 mg/mL의 농도로 존재하는 폴리소르베이트 80이고, 제약 조성물이 추가로 물을 포함하고, 제약 조성물의 pH가 6.0인 조성물.

청구항 10

삭제

청구항 11

삭제

청구항 12

삭제

청구항 13

삭제

청구항 14

삭제

청구항 15

삭제

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

청구항 41

삭제

청구항 42

삭제

청구항 43

삭제

청구항 44

삭제

청구항 45

삭제

청구항 46

삭제

청구항 47

삭제

청구항 48

삭제

청구항 49

삭제

청구항 50

삭제

청구항 51

삭제

청구항 52

삭제

청구항 53

삭제

청구항 54

삭제

청구항 55

삭제

청구항 56

삭제

청구항 57

삭제

청구항 58

삭제

청구항 59

삭제

청구항 60

삭제

청구항 61

삭제

청구항 62

삭제

청구항 63

삭제

청구항 64

삭제

청구항 65

삭제

청구항 66

삭제

청구항 67

삭제

청구항 68

삭제

청구항 69

삭제

청구항 70

삭제

청구항 71

삭제

청구항 72

삭제

청구항 73

삭제

청구항 74

삭제

청구항 75

삭제

청구항 76

삭제

청구항 77

삭제

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] ***관련 출원에 대한 상호 참조***

[0002] 본 출원은 미국 가출원 일련 번호 62/506,561 (2017년 5월 15일 출원), 미국 가출원 일련 번호 62/506,569 (2017년 5월 15일 출원), 미국 가출원 일련 번호 62/506,574 (2017년 5월 15일 출원), 미국 가출원 일련 번호 62/564,083 (2017년 9월 27일 출원), 미국 가출원 일련 번호 62/567,334 (2017년 10월 3일 출원), 미국 가출원 일련 번호 62/618,021 (2018년 1월 16일 출원), 미국 가출원 일련 번호 62/624,638 (2018년 1월 31일 출원), 및 미국 가출원 일련 번호 62/660,758 (2018년 4월 20일 출원)의 혜택을 주장하고, 이들 각각에 대해 우선권이 주장되며, 이들 각각은 전문이 참고로 포함된다.

[0003] ***발명의 분야***

[0004] 본 발명은 의학, 유전학 및 재조합 당단백질 생화학 분야를 수반하고, 구체적으로, 효율적으로 세포 상의 CIMPR을 표적화하고, 이어서 재조합 인간 α-글루코시다제 (rhGAA)가 비정상적으로 높은 수준의 축적된 글리코겐을 분해할 수 있는 라이소솜으로 rhGAA를 전달하는 만노스-6-포스페이트-보유 N-글리칸의 총 함량이 더 높은 rhGAA 조성물에 관한 것이다. 본 발명의 rhGAA는 통상적인 rhGAA 제품에 비교하여 우수한 근육 세포 내로의 흡수 및 이어지는 라이소솜 내로의 전달을 나타내고, 이를 폼페병에 걸린 대상체의 효소 대체 요법에 특히 효과적이게 만드는 다른 약동학 성질을 나타낸다.

[0005] 본 발명은 개체에게 rhGAA 및 약리적 샤페론의 조합물을 투여하는 것을 포함하는 폼페병을 치료하는 방법을 또한 제공한다. 예를 들어, 일부 실시양태에서, 본 발명은 개체에게 rhGAA 및 미글루스타트의 조합물을 투여하는 것을 포함하는 폼페병을 치료하는 방법을 제공한다. 본 발명의 rhGAA는 폼페병을 앓고 있는 대상체에서 질환 진행을 치료하고 역전시키는 것에서 놀라운 효능을 나타낸다.

배 경 기 술

[0006] ***배경***

[0007] 폼페병은 산 α-글루코시다제 (GAA) 활성의 결핍으로부터 초래되는 유전적인 라이소솜 저장 질환이다. 폼페병에 걸린 사람은 글리코겐을 근육의 주요 에너지원인 글루코스로 분해하는 효소인 산 α-글루코시다제 (GAA)가 결여되거나 또는 이의 수준이 감소되어 있다. 이러한 효소 결핍은 일반적으로는 글리코겐 및 다른 세포 잔해물 또는 폐기물을 분해하는 효소를 함유하는 세포내 소기관인 라이소솜에 글리코겐이 과도하게 축적되는 것을 야기한다. 폼페병에 걸린 대상체의 특정 조직, 특히 근육 내의 글리코겐 축적은 세포가 정상적으로 기능하는 능력을 손상시킨다. 폼페병에서, 글리코겐은 적절하게 대사되지 않고, 점진적으로 라이소솜 내에 축적되며, 특히 골격근 세포에서, 그리고 영아 발병 형태의 질환의 경우에는 심근 세포에서 그러하다. 글리코겐 축적은 근육 및 신경 세포, 뿐만 아니라 다른 영향을 받은 조직 내의 것들을 손상시킨다.

[0008] 전통적으로, 발병 나이에 따라, 폼페병은 임상적으로 조기 영아 형태 형태 또는 후기 발병 형태로 인식된다. 발병 나이는 폼페병을 야기하는 유전자 돌연변이의 중증도와 부합하는 경향이 있다. 가장 중증인 유전자 돌연변이는 GAA 활성의 상실을 야기하고, 영아기 동안 조기 발병 질환으로서 나타난다. GAA 활성을 감소시키지만 이를 완전히 제거하지는 않는 유전자 돌연변이는 발병 및 진행이 지연된 형태의 폼페병과 연관된다. 영아 발병 폼페병은 출생 직후에 나타나고, 근육 약화, 호흡 기능부전 및 심부전을 특징으로 한다. 치료되지 않으면, 이는 일반적으로 2년 이내에 치명적이다. 소아 및 성인 발병 폼페병은 생애 중 더 나중에 나타나고, 일반적으로 영아 발병 질환보다 더 느리게 진행된다. 일반적으로 심장에 영향을 미치지는 않지만, 골격근 및 호흡에 수반되는 것의 약화로 인해 이러한 형태의 질환 또한 사망을 초래할 수 있다.

[0009] 폼페병의 현재의 비-완화 치료는 루미자임(Lumizyme)®, 마이오자임(Myozyme)® 또는 알글루코시다제 알파로 공지된 재조합 인간 GAA (rhGAA)를 사용하는 효소 대체 요법 (ERT)을 수반한다. 이러한 통상적인 효소 대체 요법은 rhGAA를 투여함으로써 라이소솜 내의 결손 GAA를 교체하고, 따라서 세포가 라이소솜 글리코겐을 분해하는 능력을 복원하는 것에 의해 폼페병을 치료하려 한다. "루미자임®" 및 "마이오자임®"은 젠자임(Genzyme)이 생물제제로서 생산 또는 판매하고 미국 식품의약청이 승인한 통상적인 형태의 rhGAA이고, 문헌 [*Physician's Desk Reference* (2014)] (이에 의해 참고로 포함됨)을 참고로 기술된다. 알글루코시다제 알파는 화학명 [199-아르기닌, 223-히스티딘]프리프로-α-글루코시다제 (인간); 분자식 $C_{4758}H_{7262}N_{1274}O_{1369}S_{35}$; CAS 번호 420794-05-0으로 확인된다. 이러한 제품들은 폼페병, 일명 II형 글리코겐 저장 질환 (GSD-II) 또는 산 말타제 결핍 질환에 걸린 대상체에게 투여된다.

[0010] rhGAA 분자의 세포 흡수는 표적 세포 예컨대 근육 세포 상에 존재하는 양이온-비의존적 만노스-6-포스페이트 수용체 (CIMPR)에 결합하는, 특수 탄수화물인 만노스-6-포스페이트 (M6P)에 의해 촉진된다. 결합 시, rhGAA 분자가 표적 세포에 의해 흡수되고, 이어서 세포 내의 라이소솜 내로 운반된다. 그러나, 대부분의 통상적인 rhGAA 제품은 모노-M6P- 및 비스-M6P-보유 N-글리칸 (즉, 각각 1개의 M6P 잔기를 보유하는 N-글리칸 또는 2개의 M6P 잔기를 보유하는 N-글리칸)의 높은 총 함량이 결여되고, 이는 CIMPR을 통한 세포 흡수 및 라이소솜 전달을 제한하고, 따라서 통상적인 효소 대체 요법을 불충분하게 효과적이게 만든다. 예를 들어, 20 mg/kg 이상의 용량의 통상적인 rhGAA 제품은 폼페병의 일부 측면을 호전시키지만, 특히, 충분하게 (i) 근원적인 세포 기능 장애를 치료하거나, (ii) 근육 구조를 복원시키거나, 또는 (iii) 다수의 표적 조직, 예컨대 골격근 내의 축적된 글리코겐을 감소시켜 질환 진행을 역전시킬 수 없다. 추가로, 더 높은 용량은 대상체, 뿐만 아니라 대상체를 치료하는

의료 전문가에게 추가적인 부담, 예컨대 rhGAA를 정맥내 투여하는데 필요한 주입 시간을 연장하는 것을 부과할 수 있다. 폼페병 치료를 위한 효소 대체 요법에 대한 추가 개선, 예컨대 조직 흡수가 개선되거나, 효소 활성이 개선되거나, 안정성이 개선되거나, 또는 면역원성이 개선된 rhGAA가 여전히 요구된다.

[0011] M6P 기가 생성되도록 캔필드(Canfield) 등의 미국 특허 번호 6,534,300에 기술된 포스포트랜스퍼라제 및 노출(uncovering) 효소에 의해 시험관 내에서 GAA 또는 rhGAA의 글리코실화가 효소적으로 변형될 수 있다. 효소적 글리코실화는 충분하게 제어될 수 없고, 바람직하지 않은 면역학적 및 약리학적 성질을 갖는 rhGAA를 생산할 수 있다. 효소적으로 변형된 rhGAA는 잠재적으로 모두 포스포트랜스퍼라제 또는 노출 효소로 시험관 내에서 효소적으로 인산화될 수 있는 고-만노스 올리고당만 함유할 수 있고, GAA 당 평균적으로 5-6개의 M6P 기를 함유할 수 있다. GAA의 시험관내 효소 처리에 의해 생산된 글리코실화 패턴은 추가적인 말단 만노스 잔기, 특히 비-인산화 말단 만노스 잔기가 변형된 rhGAA의 약동학에 부정적으로 영향을 미치기 때문에 문제가 있다. 이같은 효소적으로 변형된 제품이 생체 내에서 투여되는 경우, 이러한 만노스 기가 GAA의 비-생산적 클리어런스를 증가시키고, 면역 세포에 의한 효소적으로 변형된 GAA의 흡수를 증가시키며, 더 적은 GAA가 표적화된 조직, 예컨대 골격근 근육세포에 도달하는 것으로 인해 rhGAA 치료 효능을 감소시킨다. 예를 들어, 말단의 비-인산화 만노스 잔기는 간 및 지라 내의 만노스 수용체에 대한 공지된 리간드이고, 이는 효소적으로 변형된 rhGAA의 급속한 클리어런스 및 표적 조직으로의 rhGAA 표적화 감소에 이른다. 또한, 말단의 비-인산화 만노스 잔기가 있는 고-만노스 N-글리칸을 갖는 효소적으로 변형된 GAA의 글리코실화 패턴은 효모 및 곰팡이에서 생산된 당단백질의 것과 유사하고, 효소적으로 변형된 rhGAA에 대한 면역 또는 알레르기 반응, 예컨대 생명을 위협하는 중증 알레르기 (아나필락시스) 반응 또는 과민증 반응을 촉발할 위험을 증가시킨다.

[0012] 통상적인 rhGAA 제품 및 rhGAA를 인산화시키는 시험관내 방법의 이러한 결핍을 고려하여, 본 발명가들은 강화된 생체분포 및 라이소솜 흡수를 위한 최적화된 N-글리칸 프로파일을 갖는 rhGAA를 생산하고, 이에 의해 투여되었을 때 rhGAA의 비-생산적 클리어런스를 최소화하는 방법을 열심히 모색하고 확인하였다. 본 발명은 안정적이거나 쇠퇴성인 폼페 환자에게 세포 수준에서 질환 진행을 역전시키는 효과적인 요법을 제공한다. 본 발명가들은 본 발명의 rhGAA가 질환 진행을 역전시킨다는 것 (라이소솜 글리코겐을 현재의 표준 치료보다 더욱 효율적으로 클리어런스하는 것을 포함함)과 임상 연구로부터의 다양한 효능 결과 (예를 들어, 실시예 10 및 11)에서 실연된 바와 같이, 본 발명의 rhGAA로 치료된 환자가 근력, 운동 기능 및/또는 폐 기능의 개선을 포함하고/하거나 질환 진행의 역전을 포함하는 놀랍고 현저한 건강 개선을 나타낸다는 것을 또한 보고한다.

발명의 내용

[0013] ***개요***

[0014] 본 발명은 일군의 재조합 인간 산 α-글루코시다제 (rhGAA) 분자를 투여하는 것을 포함하는, 대상체에서 질환 또는 장애 예컨대 폼페병을 치료하는 방법에 관한 것이다.

[0015] 본원에 기술된 rhGAA 분자는 차이니즈 햄스터 난소 (CHO) 세포에서 발현될 수 있고, 7개의 잠재적 N-글리코실화 부위를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 본원에 기술된 바와 같은 일군의 rhGAA 분자의 N-글리코실화 프로파일은 액체 크로마토그래피-탠덤 질량 분광법 (LC-MS/MS)을 사용하여 결정된다. 일부 실시양태에서, rhGAA 분자는 평균적으로 3-4개의 만노스-6-포스페이트 (M6P) 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, rhGAA 분자는 제1 잠재적 N-글리코실화 부위에 평균적으로 rhGAA mol 당 적어도 약 0.5 mol의 비스-인산화 N-글리칸 기 (비스-M6P)를 포함한다. 일부 실시양태에서, rhGAA는 서열식별번호(SEQ ID NO): 1 또는 서열식별번호: 5와 적어도 95% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, rhGAA는 서열식별번호: 1 또는 서열식별번호: 5와 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, rhGAA 분자 중 적어도 30%의 분자가 1개 또는 2개의 M6P 잔기를 보유하는 N-글리칸 단위를 1개 이상 포함한다. 일부 실시양태에서, rhGAA 분자는 평균적으로 rhGAA mol 당 약 0.5 mol 내지 약 7.0 mol의 1개 또는 2개의 M6P 잔기를 보유하는 N-글리칸 단위를 포함한다. 일부 실시양태에서, rhGAA 분자는 평균적으로 rhGAA mol 당 적어도 2.5 몰의 M6P 및 rhGAA mol 당 적어도 4 mol의 시알산을 포함한다. 일부 실시양태에서, 분자 당 평균 3-4개의 M6P 잔기 및 제1 잠재적 N-글리코실화 부위에 평균적으로 rhGAA mol 당 적어도 0.5 mol의 비스-M6P를 포함하는 rhGAA 분자는 평균적으로 제2 잠재적 N-글리코실화 부위에 rhGAA mol 당 약 0.4 내지 약 0.6 mol의 모노-인산화 N-글리칸 (모노-M6P), 제4 잠재적 N-글리코실화 부위에 rhGAA mol 당 약 0.4 내지 약 0.6 mol의 비스-M6P, 및 제4 잠재적 N-글리코실화 부위에 rhGAA mol 당 약 0.3 내지 약 0.4 mol의 모노-M6P를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, rhGAA 분자는 평균적으로 제3 잠재적 N-글리코실화 부위에 rhGAA mol 당 약 4 mol 내지 약 7.3 mol의 시알산 잔기 (rhGAA mol 당 약 0.9 내지 약 1.2 mol의 시알산을 포함함), 제5 잠재적 N-글리코실화 부위에 rhGAA mol 당 약 0.8 내지 약 0.9 mol의

시알산, 제6 잠재적 N-글리코실화 부위에 rhGAA mol 당 약 1.5 내지 약 4.2 mol의 시알산을 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 일군의 rhGAA 분자는 제약 조성물로 제형화된다. 일부 실시양태에서, 일군의 rhGAA 분자를 포함하는 제약 조성물은 시트레이트, 포스페이트 및 이의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 하나의 완충제, 및 만니톨, 폴리소르베이트 80 및 이의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 하나의 부형제를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 제약 조성물의 pH는 약 5.0 내지 약 7.0, 약 5.0 내지 약 6.0, 또는 약 6.0이다. 일부 실시양태에서, 제약 조성물은 물, 산성화제, 알칼리화제, 또는 이의 조합을 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 제약 조성물은 pH가 6.0이고, 약 5-50 mg/mL의 일군의 rhGAA 분자, 약 10-100 mM의 시트르산나트륨 완충제, 약 10-50 mg/mL 만니톨, 약 0.1-1 mg/mL 폴리소르베이트 80, 및 물을 포함하며, 임의적으로 산성화제 및/또는 알칼리화제를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제약 조성물은 pH가 6.0이고, 약 15 mg/mL의 일군의 rhGAA 분자, 약 25 mM의 시트르산나트륨 완충제, 약 20 mg/mL 만니톨, 약 0.5 mg/mL 폴리소르베이트 80, 및 물을 포함하고, 임의적으로 산성화제 및/또는 알칼리화제를 포함한다.

[0016] 일부 실시양태에서, 일군의 rhGAA 분자는 약 1 mg/kg 내지 약 100 mg/kg의 용량으로 투여된다. 일부 실시양태에서, 일군의 rhGAA 분자는 약 20 mg/kg의 용량으로 투여된다. 일부 실시양태에서, 일군의 rhGAA 분자는 격월, 매월, 격주, 매주, 주 2회, 또는 매일 투여된다. 일부 실시양태에서, 일군의 rhGAA 분자는 정맥내 투여된다.

[0017] 일부 실시양태에서, 일군의 rhGAA 분자는 약리적 샤페론 예컨대 미글루스타트 (AT2221으로도 지칭됨) 또는 이의 제약상 허용되는 염과 공동으로 또는 순차적으로 투여된다. 일부 실시양태에서, 미글루스타트 또는 이의 제약상 허용되는 염은, 예를 들어 약 200 mg 내지 약 600 mg, 임의적으로는 약 260 mg의 용량으로, 경구 투여된다. 일부 실시양태에서, 일군의 rhGAA 분자는 약 5 mg/kg 내지 약 20 mg/kg의 용량으로 정맥내 투여되고, 미글루스타트 또는 이의 제약상 허용되는 염은 약 233 mg 내지 약 500 mg의 용량으로 경구 투여된다. 일부 실시양태에서, 일군의 rhGAA 분자는 약 5 mg/kg 내지 약 20 mg/kg의 용량으로 정맥내 투여되고, 미글루스타트 또는 이의 제약상 허용되는 염은 약 50 mg 내지 약 200 mg의 용량으로 경구 투여된다. 한 실시양태에서, 일군의 rhGAA 분자는 약 20 mg/kg의 용량으로 정맥내 투여되고, 미글루스타트 또는 이의 제약상 허용되는 염은 약 260 mg의 용량으로 경구 투여된다. 일부 실시양태에서, 미글루스타트 또는 이의 제약상 허용되는 염은 일군의 rhGAA 분자 전에 (예를 들어, 이를 투여하기 약 1시간 전에) 투여된다. 적어도 하나의 실시양태에서, 대상체는 미글루스타트 또는 이의 제약상 허용되는 염의 투여로부터 적어도 2시간 전 및 적어도 2시간 후 동안 단식한다.

[0018] 본 발명의 실시양태는 폼페병에 걸린 대상체를 치료하고 이러한 대상체에서 질환 진행을 역전시키기 위한 본원에 기술된 rhGAA의 효능을 실연한다.

[0019] 일부 실시양태에서, 일군의 rhGAA 분자는 대상체에서 질환 진행을 역전시킬 수 있는 투여량으로 투여된다. 예를 들어, 치료 후, 대상체 내의 근육 또는 근육 섬유가 라이소솜 크기 감소 및/또는 자가포식 증강의 해소를 나타낸다. 일부 실시양태에서, 치료 후, 대상체에서 분석된 근육 섬유의 65% 미만이 자가포식 증강이 있다. 일부 실시양태에서, 치료 후, 대상체에서 분석된 근육 섬유의 적어도 36%가 정상적이거나 또는 정상에 가까운 외관을 갖는다. 일부 실시양태에서, 치료 후 질환 진행에서의 역전을 경험하는 대상체는 ERT-스위치 환자, 예를 들어 이전에 적어도 2년 동안 알글루코시다제 알파로 치료된 ERT-스위치 환자이다.

[0020] 일부 실시양태에서, 일군의 rhGAA 분자는 대상체의 근육 내의 글리코겐 함량을 동일한 투여량의 알글루코시다제 알파보다 더 신속하게 감소시킬 수 있는 투여량으로 투여된다. rhGAA는 글리코겐 함량을 동일한 투여량의 알글루코시다제 알파보다 적어도 약 1.25, 1.5, 1.75, 2.0, 또는 3.0배 더 신속하게 감소시킬 수 있다. 일부 실시양태에서, 일군의 rhGAA 분자는 1, 2, 3, 4, 5 또는 6회의 투여 후에 평가되었을 때, 추가로 대상체의 근육 내의 글리코겐 함량을 동일한 투여량으로 투여된 알글루코시다제 알파보다 더 효과적으로 감소시킬 수 있는 투여량으로 투여된다. 일부 실시양태에서, 일군의 rhGAA 분자는 동일한 투여량으로 투여된 알글루코시다제 알파보다 적어도 약 10%, 20%, 30%, 50%, 75%, 또는 90% 더 효과적으로 글리코겐 함량을 감소시킨다. 일부 실시양태에서, 치료 후, 대상체는 더 낮은 수준의 글리코겐 축적 바이오마커인 소변 육탄당 사당류 (Hex4)를 나타낸다. 적어도 하나의 실시양태에서, 치료 6개월 후에 대상체에서의 Hex4 수준이 기준선에 비교하여 적어도 30% 감소된다. 예를 들어, 이전에 효소 대체 요법으로 치료된 보행가능 또는 보행불능 대상체 (ERT-스위치 환자)가 치료 6개월 후에 기준선에 비교하여 적어도 35%의 Hex4 수준 감소를 나타낼 수 있다. 또 다른 예에서, 이전에 효소 대체 요법을 받지 않은 보행가능 대상체 (ERT-나이브 환자)가 치료 6개월 후에 기준선에 비교하여 적어도 45%의 Hex4 수준 감소를 나타낼 수 있다.

[0021] 일부 실시양태에서, 일군의 rhGAA 분자는 대상체에서 운동 기능을 개선시킬 수 있는 투여량으로 투여된다. 운동 기능 검사 예컨대 6분 보행 검사 (6MWT), 일어나 걸어가기 검사, 4-계단 오르기 검사, 10미터 보행 검사, 가

워스 검사, 보행-계단-가워스-의자 (GSGC) 검사, 또는 이의 조합에 의해 운동 기능의 개선을 측정할 수 있다. 일부 실시양태에서, 대상체는 치료 6개월 후에 (기준선에 비교했을 때) 적어도 20 미터의 6MWT 거리 증가, 적어도 1초의 일어나 걸어가기 검사 시간 감소, 적어도 0.6초의 4-계단 오르기 검사 시간 감소, 적어도 0.7초의 10 미터 보행 검사시간 감소, 적어도 1초의 가워스 검사 시간 감소, 및/또는 적어도 1점의 GSGC 점수 감소를 나타낸다. 예를 들어, 보행가능 ERT-스위치 환자가, 치료 6개월 후에 (기준선에 비교하여), 적어도 20 미터의 6MWT 증가, 적어도 1.5초의 일어나 걸어가기 검사 시간 감소, 적어도 0.6초의 4-계단 오르기 검사 시간 감소, 및/또는 적어도 1초의 가워스 검사 시간 감소를 나타낼 수 있다. 또 다른 예에서, 보행가능 ERT-나이브 환자가, 치료 6개월 후에 (기준선에 비교하여), 적어도 40 미터의 6MWT 거리 증가, 적어도 1초의 일어나 걸어가기 검사 시간 감소, 적어도 0.6초의 4-계단 오르기 검사 시간 감소, 적어도 0.7초의 10미터 보행 검사시간 감소, 및/또는 적어도 1점의 GSGC 점수 감소를 나타낼 수 있다. 일부 실시양태에서, ERT-스위치 환자는 이전의 알글루코시다제 알파로의 ERT 후의 환자의 운동 기능 검사 결과에 비교하여 치료 후에 적어도 하나의 운동 기능 검사에서 개선을 나타낸다.

[0022] 일부 실시양태에서, 일군의 rhGAA 분자는 대상체에서 상체 힘을 개선시킬 수 있는 투여량으로 투여된다. 일부 실시양태에서, 일군의 rhGAA 분자는 보행가능 대상체에게 투여되고, 추가로 대상체에서 하체 힘 및/또는 전신 힘을 개선시킬 수 있다.

[0023] 일부 실시양태에서, 상체 힘 개선은 도수 근력 점수를 사용하여 측정된다. 대상체의 도수 근력 점수가 치료 6개월 후에 기준선에 비교하여 적어도 1점 (보행가능 ERT-스위치 환자의 경우) 또는 적어도 5.5점 (보행불능 ERT-스위치 환자의 경우)만큼 개선될 수 있다. 일부 실시양태에서, ERT-스위치 환자는 이전의 알글루코시다제 알파로의 ERT 후의 환자의 상체 힘에 비교하여 치료 후 상체 힘의 개선을 나타낸다.

[0024] 일부 실시양태에서, 일군의 rhGAA 분자는 어깨 내전, 어깨 외전, 팔꿈치 굽힘, 및/또는 팔꿈치 폄의 정량적 근육 검사 또는 도수 근육 검사에 의해 측정 시 상지 힘을 개선시킬 수 있는 투여량으로 투여된다. 예를 들어, 기준선에 비교하여 치료 6개월 후에, 보행불능 ERT-스위치 환자가 적어도 8 파운드의 힘의 어깨 내전 개선, 적어도 1 파운드의 힘의 어깨 외전 개선, 적어도 2 파운드의 힘의 팔꿈치 굽힘 개선, 및/또는 적어도 5 파운드의 힘의 팔꿈치 폄 개선을 나타낼 수 있다.

[0025] 일부 실시양태에서, 일군의 rhGAA 분자는 대상체에서 폐 기능을 개선시킬 수 있는 투여량으로 투여된다. 폐 기능 검사 예컨대 직립 (좌위) 강제 폐활량 검사, 최대 호기압 (MEP) 검사, 최대 흡기압(MIP) 검사, 또는 이의 조합에 의해 운동 기능의 개선을 측정할 수 있다. 일부 실시양태에서, 대상체는 치료 6개월 후에 (기준선에 비교했을 때) 적어도 4%의 FVC 개선, 적어도 16 cmH_2O의 MEP 개선, 및/또는 적어도 0.3 cmH_2O의 MIP 개선을 나타낸다. 예를 들어, 보행가능 ERT-스위치 환자가, 치료 6개월 후에 (기준선에 비교하여), 적어도 16 cmH_2O의 MEP 개선을 나타낼 수 있다. 또 다른 예에서, 보행가능 ERT-나이브 환자가, 치료 6개월 후에 (기준선에 비교하여), 적어도 4%의 FVC 개선 및/또는 적어도 11 cmH_2O의 MIP 개선을 나타낼 수 있다. 일부 실시양태에서, ERT-스위치 환자는 이전의 알글루코시다제 알파로의 ERT 후의 환자의 폐 기능 검사 결과에 비교하여 치료 후에 적어도 하나의 폐 기능 검사에서 개선을 나타낸다.

[0026] 일부 실시양태에서, 일군의 rhGAA 분자는 피로 중증도 척도 (FSS) 점수에 따라 측정 시 대상체에서 피로를 감소시킬 수 있는 투여량으로 투여된다. 예를 들어, 대상체는 보행불능 ERT-스위치 환자일 수 있고, 기준선에 비교하여 치료 6개월 후에 적어도 3.5점의 FSS 점수 감소를 나타낼 수 있다. 또 다른 예에서, 대상체는 보행가능 ERT-스위치 환자일 수 있고, 기준선에 비교하여 치료 6개월 후에 적어도 8점의 FSS 점수 감소를 나타낼 수 있다. 또 다른 예에서, 대상체는 보행가능 ERT-나이브 환자일 수 있고, 기준선에 비교하여 치료 6개월 후에 적어도 5점의 FSS 점수 감소를 나타낼 수 있다. 일부 실시양태에서, ERT-스위치 환자는 이전의 알글루코시다제 알파로의 ERT 후의 환자의 FSS 점수에 비교하여 치료 후에 더 낮은 FSS 점수를 나타낸다.

[0027] 일부 실시양태에서, 일군의 rhGAA 분자는 적어도 하나의 근육 손상 바이오마커, 예를 들어 크레아틴 키나제 (CK), 알라닌 아미노트랜스퍼라제 (ALT), 아스파르테이트 아미노트랜스퍼라제 (AST), 또는 이의 조합의 수준을 감소시킬 수 있는 투여량으로 투여된다. 일부 실시양태에서, 치료 6개월 후의 대상체의 CK 수준이 기준선에 비교하여 적어도 15% 감소되고/되거나, 치료 6개월 후의 대상체의 ALT 수준이 기준선에 비교하여 적어도 5% 감소되고/되거나, 및/또는 치료 6개월 후의 대상체의 AST 수준이 기준선에 비교하여 적어도 5% 감소된다. 예를 들어, 대상체는 보행가능 ERT-스위치 환자일 수 있고, 치료 6개월 후에 기준선에 비교하여 적어도 15%의 CK 수준 감소, 적어도 15%의 ALT 수준 감소, 및/또는 적어도 10%의 AST 수준 감소를 나타낼 수 있다. 또 다른 예에서,

대상체는 보행불능 ERT-스위치 환자일 수 있고, 치료 6개월 후에 기준선에 비교하여 적어도 20%의 CK 수준 감소, 적어도 5%의 ALT 수준 감소, 및/또는 적어도 5%의 AST 수준 감소를 나타낼 수 있다. 또 다른 예에서, 대상체는 보행가능 ERT-나이브 환자일 수 있고, 치료 6개월 후에 기준선에 비교하여 적어도 35%의 CK 수준 감소, 적어도 35%의 ALT 수준 감소, 및/또는 적어도 30%의 AST 수준 감소를 나타낼 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0028] ***도면의 간단한 설명***

도 1a는 비-인산화 고-만노스 N-글리칸, 모노-M6P N-글리칸, 및 비스-M6P N-글리칸을 나타낸다. 도 1b는 M6P기의 화학 구조를 나타낸다. 각각의 사각형은 N-아세틸글루코스아민 (GlcNAc)을 나타내고, 각각의 원은 만노스를 나타내며, 각각의 P는 포스페이트를 나타낸다.

도 2a는 M6P를 보유하는 N-글리칸을 통한 rhGAA의 표적 조직 (예를 들어, 폼페병에 걸린 대상체의 근육 조직)으로의 생산적 표적화를 기술한다. 도 2b는 비-표적 조직 (예를 들어, 간 및 지라)으로의 또는 비-M6P N-글리칸이 비-표적 조직에 결합하는 것에 의한 비-생산적 약물 클리어런스를 기술한다.

도 3은 재조합 라이소솜 단백질의 제작, 포착 및 정제를 위한 예시적인 공정의 개략도이다.

도 4는 CHO 세포를 rhGAA를 코딩하는 DNA로 형질전환시키기 위한 DNA 구축물을 나타낸다.

도 5는 음이온 교환 (AEX) 칼럼의 존재 (실시양태 2) 및 부재 (실시양태 1) 하의 ATB200 rhGAA의 CIMPR 친화력 크로마토그래피의 결과를 나타내는 그래프이다.

도 6a-6h는 2개의 상이한 LC-MS/MS 분석 기술을 사용하는, ATB200 rhGAA의 부위-특이적 N-글리코실화 분석의 결과를 나타낸다. 도 6a는 ATB200에 대한 7개의 잠재적 N-글리코실화 부위의 부위 점유율을 나타낸다. 도 6b는 ATB200에 대한 제1 잠재적 N-글리코실화 부위의 N-글리코실화 프로파일의 2개의 분석을 나타낸다. 도 6c는 ATB200에 대한 제2 잠재적 N-글리코실화 부위의 N-글리코실화 프로파일의 2개의 분석을 나타낸다. 도 6d는 ATB200에 대한 제3 잠재적 N-글리코실화 부위의 N-글리코실화 프로파일의 2개의 분석을 나타낸다. 도 6e는 ATB200에 대한 제4 잠재적 N-글리코실화 부위의 N-글리코실화 프로파일의 2개의 분석을 나타낸다. 도 6f는 ATB200에 대한 제5 잠재적 N-글리코실화 부위의 N-글리코실화 프로파일의 2개의 분석을 나타낸다. 도 6g는 ATB200에 대한 제6 잠재적 N-글리코실화 부위의 N-글리코실화 프로파일의 2개의 분석을 나타낸다. 도 6h는 제1, 제2, 제3, 제4, 제5 및 제6 잠재적 N-글리코실화 부위에 대한 모노-인산화 및 비스-인산화 종의 상대적 퍼센트를 요약한다.

도 7은 루미자임® (알글루코시다제 알파, 가는선, 왼쪽으로 용출됨) 및 ATB200 (굵은선, 오른쪽으로 용출됨)의 폴리왁스(Polywax) 용출 프로파일을 나타내는 그래프이다.

도 8은 BP-rhGAA, ATB200-1 및 ATB200-2로 확인되는, ATB200 rhGAA의 3가지 상이한 제제에 비교된 루미자임®의 N-글리칸 구조의 요약을 나타내는 표이다.

도 9a 및 9b는 각각 루미자임® 및 마이오자임®의 CIMPR 친화력 크로마토그래피의 결과를 나타내는 그래프이다.

도 10a는 ATB200 rhGAA의 CIMPR 결합 친화력 (왼쪽 트레이스)을 루미자임®의 것 (오른쪽 트레이스)과 비교하는 그래프이다. 도 10b는 루미자임® 및 ATB200 rhGAA의 비스-M6P 함량을 비교하는 표이다.

도 11a는 다양한 GAA 농도에서의 정상 섬유모세포 내부의 ATB200 rhGAA 활성 (왼쪽 트레이스)과 루미자임® rhGAA 활성 (오른쪽 트레이스)을 비교하는 그래프이다. 도 11b는 다양한 GAA 농도에서의 폼페병에 걸린 대상체로부터의 섬유모세포 내부의 ATB200 rhGAA 활성 (왼쪽 트레이스)과 루미자임® rhGAA 활성 (오른쪽 트레이스)을 비교하는 표이다. 도 11c는 정상 대상체 및 폼페병에 걸린 대상체로부터의 섬유모세포의 $K_{흡수}$를 비교하는 표이다.

도 12는 단백질이 변성될 때 염료의 형광이 증가함에 따른, 사이프로 오렌지(SYPRO Orange)를 사용하는 열안정성 검정법에서 평가된 산성 또는 중성 pH 완충제에서의 ATB200의 안정성을 도시한다.

도 13은 아밀로글루코시다제 소화를 사용하여 결정된, 비히클, 알글루코시다제 알파, 또는 ATB200/AT2221로 처리된 WT 마우스 또는 *Gaa* KO 마우스의 조직 글리코겐 함량을 나타낸다. 막대는 7마리의 마우스/군의 평균 ± SEM을 나타낸다. * $p<0.05$: 일원 ANOVA 분석 하에 던넷 방법을 사용하여 다중 비교에서 알글루코시다제 알파에

비교됨.

도 14는 비히클, 알글루코시다제 알파, 또는 ATB200/AT2221로 처리된 *Gaa* KO 마우스 또는 WT 마우스의 근육 섬유 내의 LAMP1-양성 소포를 도시한다. 영상은 가쪽넓은근에서 찍혔고, 군 당 7마리의 마우스를 대표한다. 배율 = 200× (삽입도에서는 1,000×).

도 15a는 비히클, 알글루코시다제 알파, 또는 ATB200/AT2221로 처리된 *Gaa* KO 마우스 또는 WT 마우스의 근육 섬유 내의 LC3-양성 응집체를 나타낸다. 영상은 가쪽넓은근에서 찍혔고, 군 당 7마리의 마우스를 대표한다. 배율 = 400×. 도 15b는 LC3 II 단백질의 웨스턴 블롯 분석을 나타낸다. 총 30 mg의 단백질이 각각의 레인에 로딩되었다.

도 16는 비히클, 알글루코시다제 알파, 또는 ATB200/AT2221로 처리된 *Gaa* KO 마우스 또는 WT 마우스의 근육 섬유에서의 디스펄린(Dysferlin) 발현을 나타낸다. 영상은 가쪽넓은근에서 찍혔고, 군 당 7마리의 마우스를 대표한다. 배율 = 200×.

도 17은 비히클, 알글루코시다제 알파, 또는 ATB200로 처리된 *Gaa* KO 마우스의 백색 비복근으로부터 단리된 단일 섬유 섬유에서의 LAMP1 (녹색) (예를 들어, "B" 참조) 및 LC3 (적색) (예를 들어, "A" 참조)의 공동-면역형광 염색을 도시한다. "C"는 자가포식 잔해물의 클리어런스 및 확대된 라이소솜의 부재를 도시한다. 각각의 동물로부터 최소 30개의 섬유가 검사되었다.

도 18은 ATB200 단독에 비교된, 각각 17 μM AT2221 및 170 μM AT2221에 의한 ATB200의 안정화를 도시한다.

도 19a 및 19b는 ATB200-02 연구 디자인을 나타낸다. 저용량 = 130 mg. 고용량 = 260 mg. 도 19a에서, "6MWT" = 6분 보행 검사; "FVC" = 강제 폐활량; "QOW" = 격주. "a" = 코호트 1로부터의 2명의 감시 환자로부터의 안전성 데이터를 각각의 용량 수준에서 검토한 후에 코호트 2 및 3에서 투약하였다; "b" = 2기 및 3기 동안, ATB200 정맥내 주입을 시작하기 전에 AT2221을 경구 투여하였다. 모든 용량에 대해, ATB200을 4시간 기간 동안 정맥내 주입하였다. "c" = 코호트 2 및 3의 처음 2명의 환자가 이들의 각각의 코호트에 대한 감시 환자로서의 역할을 하였다. 도 19c는 코호트 1, 2, 및 3에 걸쳐 등록된 환자의 기준선 특성을 요약한다. "NA" = 적용가능하지 않음. "SD" = 표준 편차. "a" = 코호트 1 환자는 기준선에서 2-6년 동안 알글루코시다제 알파 중인 것이 요구되었다. LOPD = 후기 발병 폼페병.

도 20은 AT2221의 약동학 데이터를 도시한다. "AUC"= 곡선하 면적; "CL/F" = AT2221 경구 생체이용률에 대해 조정된 혈장 클리어런스; "C_{max}" = 최대 약물 농도; "CV" = 변동 계수; "$t_{1/2}$" = 반감기; "t_{max}" = 최대 약물 농도까지의 시간; "V_Z/F" = AT2221 경구 생체이용률에 대해 조정된 겉보기 말기 분포 용적. "a" = 기하 평균 (CV%); "b" = 중앙값 (최소-최대); "c" = 산술 평균 (CV%).

도 21은 코호트 1 및 3에 대한 시그너처 펩티드 T09에 의한 총 GAA 단백질을 도시한다. "AUC" = 곡선하 면적; "CL_T" = 총 신체 클리어런스; "C_{max}" = 최대 약물 농도; "CV" = 변동 계수; "MD" = 다중 용량; "$t_{1/2}$" = 반감기; "t_{max}" = 최대 약물 농도까지의 시간; "F_{rel}" = 20 mg/kg ATB 200 단독 및 10 mg/kg ATB200 단독 대 5 mg/kg ATB200 단독, 및 20 mg/kg ATB200 + 저용량 또는 고용량 AT2221 대 20 mg/kg ATB200 단독의 AUC 비. "a" = 기하 평균 (CV%); "b" = 중앙값 (최소-최대); "c" = 산술 평균 (CV%); "d" = n=11; "e" = n=5. 저용량 = 130 mg. 고용량 = 260 mg.

도 22a, 22b, 22c, 22d, 22e, 및 22f는 코호트에 의해 총 GAA 단백질을 도시한다. 저용량 = 130 mg. 고용량 = 260 mg. 도 22a는 코호트 1 (단일 용량)에 대한 평균 총 GAA 단백질 농도-시간 프로파일을 나타낸다. 도 22b는 코호트 1 (다중 용량)에 대한 평균 총 GAA 단백질 농도-시간 프로파일을 나타낸다. 도 22c는 코호트 1 대 코호트 3 (단일 용량)에 대한 평균 총 GAA 단백질 농도-시간 프로파일을 나타낸다. 도 22d는 코호트 1 대 코호트 3 (다중 용량)에 대한 평균 총 GAA 단백질 농도-시간 프로파일을 나타낸다. 도 22e는 투약 12시간 후의 20 mg/kg ATB200에 대한 총 GAA 단백질 비교를 나타낸다; * = $p<0.05$; ** = $p<0.01$; *** $p<0.001$. 도 22f는 투약 24시간 후의 20 mg/kg ATB200에 대한 총 GAA 단백질 비교를 나타낸다; * = $p<0.05$; ** = $p<0.01$; "ns"= 유의하지 않음.

도 23은 시그너처 펩티드 T09에 의한 총 GAA 단백질에 대한 분산 분석 (ANOVA)을 나타낸다. 곡선하 면적 (AUC)이 μg·h/mL로 제공된다; "CI"= 신뢰 구간.

도 24a는 코호트 1 및 코호트 3의 환자에 대한 6개월, 9개월 및 12개월의 기준선으로부터의 변화 ("CFBL")를 나

타내는, 6분 보행 검사 ("6MWT")로부터의 분석 및 입수가능한 중간 데이터의 요약을 도시한다.

도 24b는 개별적인 코호트 1 및 코호트 3 환자에 대한 6MWT 데이터를 도시한다.

도 24c는 코호트 1 및 코호트 3의 환자에 대한 6개월, 9개월 및 12개월의 기준선으로부터의 변화 ("CFBL")를 나타내는, 다른 운동 기능 검사로부터의 분석 및 입수가능한 중간 데이터의 요약을 도시한다: 일어나 걸어가기 운동 기능 검사; 4-계단 오르기 검사; 10미터 (10M) 보행 검사; 가워스; 및 보행-계단-가워스-의자 ("GSGC") 운동 기능 검사. GSGC는 4가지 운동 기능 평가의 관찰자-등급화 조합 점수이다: 보행 (10미터 보행), 4-계단 오르기, 가워스 (바닥에서 일어서기), 및 의자에서 일어나기. 각각의 테스트가 1점 (정상)에서 7점 (수행할 수 없음; 의자에서 일어나기 검사의 경우 최대 6점)까지 채점된다. 총점은 4점 내지 27점 범위이다. "a" = n=9, 환자가 검사 수행을 거부하는 것으로 인해 누락값이 수득되지 않음; "b" = 기준선으로부터의 중앙값 변화가 -1.5였고, 7/9명의 환자가 감소가 있었다; "c" = 기준선으로부터의 중앙값 변화가 -0.8이었고, 4/5명의 환자가 감소가 있었다.

도 25는 코호트 2의 환자에 대한 6개월 및 9개월의 기준선으로부터의 변화 ("CFBL")를 나타내는, 근력 검사 (QMT)로부터의 분석 및 입수가능한 중간 데이터의 요약을 도시한다. QMT = 정량화 근육 검사. 제시된 값은 조합된 오른쪽 및 왼쪽에 대한 파운드의 힘을 나타낸다. "a" = 1명의 대상체에 대해 어깨 내전이 입수가능하지 않음; "b" = 채점: (1) 가시적인 근육 운동이 있지만, 관절에서의 운동이 없음; (2) 관절에서의 운동이 있지만, 중력에 대항하지 않음; (3) 중력에 대항하여 운동하지만, 부가된 저항에 대항하지 않음; (4) 저항에 대항하여 운동하지만, 정상보다 적음; (5) 정상적인 힘.

도 26a는 코호트 1 환자에서의 도수 근육 검사 (MMT) 점수로부터의 분석 및 입수가능한 중간 데이터의 요약을 도시한다. 상체 (최대 점수: 40), 하체 (최대 점수: 40), 및 전신 (최대 점수: 80)에 대해 MMT 점수가 계산되었다. 도수 근력의 증가가 6개월, 9개월 및 12개월에 코호트 1 환자에서 관찰되었다. "SD" = 표준 편차.

도 26b는 코호트 2 환자에서의 도수 근육 검사 (MMT) 점수로부터의 분석 및 입수가능한 중간 데이터의 요약을 도시한다. 상체 (최대 점수: 40)에 대해 MMT 점수가 계산되었다. 도수 근력의 증가가 6개월 및 9개월에 코호트 2 환자에서 관찰되었다. "SD" = 표준 편차. MMT 결과가 일반적으로 QMT 결과 (도 28에서 제시됨)와 일관되었다.

도 26c는 코호트 3 환자에서의 도수 근육 검사 (MMT) 점수로부터의 분석 및 입수가능한 중간 데이터의 요약을 도시한다. 상체 (최대 점수: 40), 하체 (최대 점수: 40), 및 전신 (최대 점수: 80)에 대해 MMT 점수가 계산되었다. 도수 근력의 증가가 6개월, 9개월 및 12개월 각각에 코호트 3 환자에서 관찰되었다. "SD" = 표준 편차.

도 27은 코호트 1 및 코호트 3의 환자에 대한 6개월, 9개월 및 12개월의 기준선으로부터의 변화 ("CFBL")를 나타내는, 좌위 강제 폐활량 ("FVC"), 최대 흡기압 ("MIP"), 및 최대 호기압 ("MEP")으로부터의 분석 및 입수가능한 중간 데이터의 요약을 도시한다. "a" = 1명의 대상체에 대해 FVC가 입수가능하지 않음. MEP 및 MIP는 cmH_2O로 측정되었다.

도 28은 각각 1 내지 7점의 척도로 채점되는 9개의 질문으로 이루어지는 자가 평가 질문지인 피로 중증도 척도 ("FSS")로부터의 분석 및 입수가능한 중간 데이터의 요약을 도시한다. 총점은 9 내지 63점 범위이고, 값이 높을수록 질환 상태로 인한 더 높은 수준의 피로를 나타낸다. 건강한 집단에서의 표준치는 ~21이다. 도 28은 코호트 1, 코호트 2, 및 코호트 3의 환자에 대한 6개월, 9개월 및 12개월의 기준선으로부터의 변화 ("CFBL")를 나타낸다.

도 29a-29c는 모든 환자 코호트에서의 근육 손상의 마커 (알라닌 아미노트랜스퍼라제, 아스파르테이트 아미노트랜스퍼라제, 및 크레아틴 키나제)의 기준선으로부터의 평균 백분율 변화를 도시한다. 도 29a는 58주에 걸친 코호트 1 환자로부터의 데이터를 도시하고, 도 29b는 24주에 걸친 코호트 2 환자로부터의 데이터를 도시하며, 도 29c는 36주에 걸친 코호트 3 환자로부터의 데이터를 도시한다. 도 29d는 코호트 1, 코호트 2, 및 코호트 3의 환자에 대한 12개월까지에 대한 근육 손상 마커 (CK = 크레아틴 키나제) 및 질환 기질 마커 (Hex4 = 소변 육탄당 사당류)의 기준선으로부터의 평균 백분율 변화를 도시한다. "BL" = 기준선. "SE" = 표준 오차. "WK" = 주. "M" = 개월.

도 30은 ATB200-02 연구로부터의 안전성 데이터를 요약한다. "AE" = 유해 사례. "IAR" = 주입-연관 반응; "a" = 중간 데이터 분석을 통해 보고됨 (최대 20+개월); "b" = 상복부 및 하복부 통증을 포함함.

도 31은 ATB200-02 연구로부터의 입수가능한 효능 및 안전성 데이터를 요약한다.

도 32a-32h는 프로테아제-소화 ATB200의 LC-MS/MS 분석을 사용한, 제7 잠재적 N-글리코실화 부위에 대한 N-글리코실화 프로파일을 포함하는 ATB200 rhGAA의 부위-특이적 N-글리코실화 분석의 결과를 나타낸다. 도 32a-32h는 상이한 규모로 생산된 10개의 ATB200 롯트에 대한 평균 데이터를 제공한다.

도 32a는 ATB200에 대한 7개의 잠재적 N-글리코실화 부위의 평균 부위 점유율을 나타낸다. N-글리코실화 부위는 서열식별번호: 1에 따라 제공된다. CV = 변동 계수.

도 32b-32h는 ATB200에 대한 7개 모두의 잠재적 N-글리코실화 부위의 부위-특이적 N-글리코실화 분석을 나타내고, 부위 번호는 서열식별번호: 5에 따라 제공된다. 막대는 분석된 10개의 ATB200 롯트에 대한 특정 N-글리칸 기로서 확인된 N-글리칸 종의 최대 및 최소 백분율을 나타낸다. 도 32b는 ATB200에 대한 제1 잠재적 N-글리코실화 부위의 N-글리코실화 프로파일을 나타낸다. 도 32c는 ATB200에 대한 제2 잠재적 N-글리코실화 부위의 N-글리코실화 프로파일을 나타낸다. 도 32d는 ATB200에 대한 제3 잠재적 N-글리코실화 부위의 N-글리코실화 프로파일을 나타낸다. 도 32e는 ATB200에 대한 제4 잠재적 N-글리코실화 부위의 N-글리코실화 프로파일을 나타낸다. 도 32f는 ATB200에 대한 제5 잠재적 N-글리코실화 부위의 N-글리코실화 프로파일을 나타낸다. 도 32g는 ATB200에 대한 제6 잠재적 N-글리코실화 부위의 N-글리코실화 프로파일을 나타낸다. 도 32h는 ATB200에 대한 제7 잠재적 N-글리코실화 부위의 N-글리코실화 프로파일을 나타낸다.

도 33a-33b는 도 32a-32h에 또한 나타난 바와 같은 ATB200의 N-글리코실화 프로파일을 추가로 특성화하고 요약한다. 도 33a는 ATB200의 2-안트라닐산 (2-AA) 글리칸 맵핑 및 LC/MS-MS 분석을 나타내고, 총 형광의 백분율로서 ATB200에서 확인된 N-글리칸 종을 요약한다. 2-AA 글리칸 맵핑 및 LC-MS/MS 분석으로부터의 데이터가 표 5에서 또한 도시된다. 도 33b는 ATB200에 대한 7개 모두의 잠재적 N-글리코실화 부위에 대한 평균 부위 점유율 및 평균 N-글리칸 프로파일 (총 인산화, 모노-인산화, 비스-인산화 및 시알릴화를 포함함)을 요약한다. ND = 검출되지 않음.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0029] ***상세한 설명***

[0030] 본 발명의 몇몇 예시적 실시양태를 기술하기 전에, 본 발명이 하기 설명에 기재된 구성 또는 공정 단계의 상세사항에 제한되지 않는다는 것을 이해하여야 한다. 본 발명은 다른 실시양태가 가능하고, 다양한 방식으로 실행 또는 수행될 수 있다.

[0031] **I. 정의**

[0032] 본 명세서에서 사용된 용어는, 본 발명의 문맥에서, 그리고 각각의 용어가 사용된 구체적인 문맥에서, 일반적으로 관련 분야에서의 통상적인 의미를 갖는다. 본 발명의 조성물 및 방법, 및 어떻게 이를 제조하고 사용하는지를 기술하는 것에서 실행자에게 추가적인 지침을 제공하기 위해 특정 용어가 하기에서 또는 명세서의 다른 곳에서 논의된다. 단수는 1개 또는 1개 초과 (즉, 적어도 1개)의 관사의 문법적 대상을 지칭한다. 용어 "또는"은, 문맥적으로 명백하게 달리 지시되지 않는 한, 용어 "및/또는"을 의미하고, 이와 상호교환가능하게 사용된다. 본 출원에서, 단수의 사용은 구체적으로 달리 언급되지 않는 한 복수를 포함한다. 추가로, 용어 "포함하는", 뿐만 아니라 다른 형태, 예컨대 "포함하다" 및 "포함되는"의 사용은 제한적이지 않다. 본원에 기술된 임의 범위는 종점 및 종점 사이의 모든 값을 포함하는 것으로 이해될 것이다. 본 명세서에서, 표현 언어 또는 필요한 함축으로 인해 문맥적으로 달리 요구되는 경우를 제외하고, "포함하다(comprise)", 또는 변형 예컨대 "포함하는(comprising)"은 포괄적인 의미로, 즉 언급된 특색의 존재를 명시하지만, 본 발명의 다양한 실시양태에서 추가 특색의 존재 또는 부가를 배제하지 않는 것으로 사용된다.

[0033] 용어 "GAA"는 라이소솜 글리코겐의 α-1,4- 및 α-1,6-글리코시드 연결의 가수분해를 촉매하는 인간 산 α-글루코시다제 (GAA) 효소, 뿐만 아니라 효소 활성을 발휘하는, GAA 아미노산 서열의 삽입, 관련 또는 치환 변이체 및 더 긴 GAA 서열의 단편을 지칭한다. 인간 산 α-글루코시다제는 GAA 유전자 (국립 생물공학 정보 센터 (National Centre for Biotechnology Information) (NCBI) 유전자 ID 2548)에 의해 코딩되고, 이는 17번 염색체의 긴팔에 맵핑되었다 (위치 17q25.2-q25.3). GAA를 코딩하는 예시적인 DNA 서열이 NP 000143.2이고, 이는 참조로 포함된다. 현재 500개를 초과하는 돌연변이가 인간 GAA 유전자에서 확인되었고, 이들 중 다수가 폼페병과 연관된다. 산 α-글루코시다제 효소의 미스폴딩 또는 미스프로세싱을 초래하는 돌연변이는 T1064C (Leu355Pro) 및 C2104T (Arg702Cys)를 포함한다. 추가적으로, 효소의 성숙 및 프로세싱에 영향을 미치는 GAA 돌연변이는 Leu405Pro 및 Met519Thr을 포함한다. 아미노산 잔기 516-521의 보존된 헥사펩티드 WIDMNE가 산 α-글루코시다제 단백질의 활성에 요구된다. 본원에서 사용된 바와 같이, 약어 "GAA"는 인간 산 α-글루코시다제

효소를 지칭하도록 의도되는 한편, 이탤릭체 약어 "*GAA*"는 인간 산 α-글루코시다제 효소를 코딩하는 인간 유전자를 지칭하도록 의도된다. 이탤릭체 약어 "*Gaa*"는 래트 또는 마우스 유전자를 포함하지만 이에 제한되지 않는, 비-인간 산 α-글루코시다제 효소를 코딩하는 비-인간 유전자를 지칭하도록 의도되고, 약어 "Gaa"는 비-인간 산 α-글루코시다제 효소를 지칭한다.

[0034] 용어 "rhGAA"는 재조합 인간 산 α-글루코시다제 효소를 지칭하도록 의도되고, 내인성 GAA를 합성 또는 재조합-생산 GAA (예를 들어, GAA를 코딩하는 DNA로 형질전환된 CHO 세포로부터 생산된 GAA)와 구별하기 위해 사용된다. 용어 "rhGAA"는 일군의 개별적인 rhGAA 분자들을 포함한다. 일군의 rhGAA 분자의 특징이 본원에서 제공된다. 용어 "통상적인 rhGAA 제품"은 알글루코시다제 알파를 함유하는 제품, 예컨대 루미자임® 또는 마이오자임®을 지칭하도록 의도된다.

[0035] 용어 "유전적으로 변형된" 또는 "재조합"은 코딩 서열의 발현을 제어하는 조절 요소와 함께 유전자 생성물을 코딩하는 코딩 서열을 포함하는 핵산의 도입 후에 특정 유전자 생성물, 예컨대 rhGAA를 발현하는 세포, 예컨대 CHO 세포를 지칭한다. 핵산 도입은 유전자 표적화 및 상동 재조합을 포함하는 관련 분야에 공지된 임의의 방법에 의해 달성될 수 있다. 본원에서 사용된 바와 같이, 이러한 용어는, 예를 들어, 유전자 활성화 기술에 의해, 정상적으로는 이같은 세포에서 발현되지 않는 내인성 유전자 또는 유전자 생성물을 발현 또는 과발현하도록 조작된 세포를 또한 포함한다.

[0036] 본원에서 사용된 바와 같은 용어 "정제된"은 물질이 이로부터 수득되는 천연 물질을 포함하여, 관련되지 않은 물질, 즉, 오염물의 존재를 감소시키거나 제거하는 조건 하에 단리된 물질을 지칭한다. 예를 들어, 정제된 단백질은 바람직하게는 자신과 세포에서 회합되는 다른 단백질 또는 핵산이 실질적으로 없고, 정제된 핵산 분자는 바람직하게는 세포 내에서 함께 발견될 수 있는 단백질 또는 다른 관련되지 않은 핵산 분자가 실질적으로 없다. 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "실질적으로 없음"은 물질의 분석 검사의 맥락에서 조작적으로 사용된다. 바람직하게는, 오염물이 실질적으로 없는 정제된 물질은 적어도 95% 순수하고, 더욱 바람직하게는 적어도 97% 순수하며, 더욱 더 바람직하게는 적어도 99% 순수하다. 순도는 크로마토그래피, 겔 전기영동, 면역검정법, 조성 분석, 생물학적 검정법, 효소 검정법 및 관련 분야에 공지된 기타 방법에 의해 평가될 수 있다. 특정 실시양태에서, 정제된은 오염물의 수준이 인간 또는 비-인간 동물에게 안전하게 투여하는 것에 대해 규제 당국에게 허용 가능한 수준 미만이라는 것을 의미한다. 재조합 단백질, 예컨대 rhGAA는 크로마토그래피 크기 분리, 친화력 크로마토그래피, 또는 음이온 교환 크로마토그래피에 의한 것을 포함하여 관련 분야에 공지된 방법을 사용하여 CHO 세포로부터 단리 또는 정제될 수 있다. 일부 실시양태에서, rhGAA는 음이온 교환 크로마토그래피에 고정된 금속 친화력 크로마토그래피가 이어지고, 임의적으로 제3 크로마토그래피 칼럼을 사용하는 정제가 이어지는 것을 포함하는 방법에 의해 정제된다.

[0037] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "알글루코시다제 알파"는 [199-아르기닌,223-히스티딘]프리프로-α-글루코시다제 (인간); 화학물질 등록 번호(Chemical Abstracts Registry Number) 420794-05-0로 확인되는 재조합 인간 산 α-글루코시다제를 지칭하도록 의도된다. 알글루코시다제 알파는 루미자임® 및 마이오자임® 제품으로 젠자임에 의해 미국에서의 판매에 대해 승인되었다.

[0038] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "ATB200"은 국제 출원 PCT/US2015/053252 (이의 개시내용은 본원에 참조로 포함됨)에 기술된 재조합 인간 산 α-글루코시다제를 지칭한다.

[0039] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "글리칸"은 단백질 또는 폴리펩티드 상의 아미노산 잔기에 공유결합으로 결합된 다당류 사슬을 지칭하도록 의도된다. 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "N-글리칸" 또는 "N-연결 글리칸"은 아미노산 잔기의 질소 원자에 공유결합으로 결합하는 것을 통해 단백질 또는 폴리펩티드 상의 아미노산 잔기에 부착된 다당류 사슬을 지칭하도록 의도된다. 예를 들어, N-글리칸은 아스파라긴 잔기의 측쇄 질소 원자에 공유결합으로 결합될 수 있다. 글리칸은 1개 또는 여러개의 단당류 단위를 함유할 수 있고, 단당류 단위들은 공유결합으로 연결되어 직쇄 또는 분지쇄를 형성할 수 있다. 적어도 하나의 실시양태에서, rhGAA에 부착된 N-글리칸 단위는 N-아세틸글루코스아민, 만노스, 갈락토스, 푸코스, 만노스-6-포스페이트, 또는 시알산으로부터 각각 독립적으로 선택된 1개 이상의 단당류 단위를 포함할 수 있다. 단백질 상의 N-글리칸 단위는 임의의 적합한 분석 기술, 예컨대 질량 분광법에 의해 결정될 수 있다. 일부 실시양태에서, 써모 사이언티픽™ 오비트랩 벨로스 프로™(Thermo Scientific™ Orbitrap Velos Pro)™ 질량 분광계, 써모 사이언티픽™ 오비트랩 퓨전™ 루모스 트리비드™(Thermo Scientific™ Orbitrap Fusion™ Lumos Tribid™) 질량 분광계, 또는 워터스 엑세보® (Waters Xevo®)G2-XS QTof 질량 분광계와 같은 기기를 이용하여 액체 크로마토그래피-탠덤 질량 분광법 (LC-MS/MS)에 의해 rhGAA에 부착된 N-글리칸 단위가 결정된다.

[0040] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "고-만노스 N-글리칸"은 1개 내지 6개 이상의 만노스 단위가 있는 N-글리칸을 지칭하도록 의도된다. 일부 실시양태에서, 고-만노스 N-글리칸 단위는 아스파라긴 잔기에 결합되고 추가로 분지형 폴리만노스 사슬에 결합된 비스(N-아세틸글루코스아민) 사슬을 함유할 수 있다. 본원에서 상호교환가능하게 사용된 바와 같이, 용어 "M6P" 또는 "만노스-6-포스페이트"는 6번 위치에서 인산화된, 즉 6번 위치의 히드록실 기에 포스페이트 기가 결합된 만노스 단위를 지칭하도록 의도된다. 일부 실시양태에서, 1개 이상의 N-글리칸 단위의 1개 이상의 만노스 단위가 6번 위치에서 인산화되어 만노스-6-포스페이트 단위를 형성한다. 일부 실시양태에서, 용어 "M6P" 또는 "만노스-6-포스페이트"는 포스페이트 기 상에 "캡"으로서 N-아세틸글루코스아민(GlcNAc)이 있는 만노스 포스포디에스테르, 뿐만 아니라 GlcNAc 캡이 결여된 노출된 포스페이트 기가 있는 만노스 단위 양쪽 모두를 지칭한다. 적어도 하나의 실시양태에서, 단백질의 N-글리칸은 다중 M6P 기를 가질 수 있고, 이때 적어도 1개의 M6P 기에 GlcNAc 캡이 있고, 적어도 1개의 다른 M6P 기는 GlcNAc 캡이 결여된다.

[0041] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "복합 N-글리칸"은 GlcNac 및 만노스 이외의 유형의 당류, 예를 들어, 하나 이상의 갈락토스 및/또는 시알산 단위를 포함하는 N-글리칸을 지칭하도록 의도된다. 적어도 하나의 실시양태에서, 복합 N-글리칸은 하나 이상의 만노스 단위가 N-아세틸글루코스아민, 갈락토스, 및 시알산으로부터 각각 독립적으로 선택된 하나 이상의 단당류 단위에 추가로 결합된 고-만노스 N-글리칸일 수 있다. 본원에서 사용된 바와 같이, "하이브리드 N-글리칸"은 적어도 1개의 고-만노스 분지 및 적어도 1개의 복합 분지를 포함하는 N-글리칸을 지칭한다. 비-인산화, 모노-M6P, 및 비스-M6P N-글리칸에 대한 대표적인 구조가 도 1a에서 제시된다. 만노스-6-포스페이트 기가 도 1b에서 제시된다.

[0042] 본원에서 사용된 바와 같이, 근육 내의 라이소솜의 "정상화"는 이환 근육을 이의 축적된 글리코겐의 크기 및 개수를 감소시키는 것에 의해 야생형 근육의 라이소솜 형태로 복원시켜서, 이환 근육이 실질적으로 정상 라이소솜 형태와 유사하고, 궁극적으로는 질환 진행을 역전시키는 것에 이를 프로세스를 지칭한다

[0043] 본원에서 사용된 바와 같이, "질환 진행의 역전"은, 특히, 적합하게 (i) 글리코겐 축적을 감소시키거나 제거하는 것, (ii) 라이소솜 팽창 및/또는 기능장애를 감소시키거나 제거하는 것, 및 (iii) 자가포식 잔해물의 증강을 감소시키거나 제거하는 것을 의미한다. 보행가능 ERT-경험 폼페병 환자에서 질환 진행의 역전은 하기의 "임상 개선" 중 2개 이상으로서 나타날 수 있다: (a) 적어도 20미터의 6분 보행 검사 거리의 평균 증가, (b) 적어도 16 cmH_2O의 최대 호기압의 평균 개선, 및 (c) 적어도 7점의 피로 중증도 척도 점수의 평균 감소. 보행불능 ERT-경험 폼페병 환자에서 질환 진행의 역전은 하기의 "임상 개선" 중 2개 이상으로서 나타날 수 있다: (a) 적어도 8 파운드의 힘의 어깨 내전의 평균 개선, (b) 적어도 5 파운드의 힘의 팔꿈치 폄의 평균 개선, 및 (c) 적어도 3.5점의 피로 중증도 척도 점수의 평균 감소. ERT-나이브 폼페병 환자에서 질환 진행의 역전은 하기의 "임상 개선" 중 2개 이상으로서 나타날 수 있다: (a) 적어도 40 미터의 6분 보행 검사 거리의 평균 증가, (b) 적어도 4%의 직립 (좌위) 강제 폐활량의 평균 개선, (c) 적어도 11 cmH_2O의 최대 흡기압의 평균 개선, 및 (d) 적어도 5점의 피로 중증도 척도 점수의 평균 감소.

[0044] 알글루코시다제 알파의 투여에 비교된 본원에 개시된 치료 방법의 장점은 본원의 방법으로 치료된 폼페 환자가 장기간의 임상 개선을 나타낸다는 것이다. 예를 들어, 1차 치료의 투여로부터 2 내지 3년 또는 그 이상, 예를 들어, 1차 치료의 투여로부터 4, 5 또는 6년의 시점에 개선이 관찰될 수 있다. 대조적으로, 표준 치료 (예를 들어, 알글루코시다제 알파)로의 2년의 효소 대체 요법 후에, 폼페병 환자는 (i) 치료 전의 기준선으로부터의 이익을 유지하지만, 2 또는 3년 마크를 넘어서는 식별할 수 있는 개선을 나타내지 않거나, 또는 (ii) 점진적인 하락을 경험하고, 표준 관리로의 치료 후 2 또는 3년 동안 달성된 임의의 이익을 상실한다. 문헌 [Kuperus et al. 2017. Long-term benefit of enzyme replacement therapy in Pompe disease: A 5-year prospective study. Neurology. 89:2365-2373]. 대조적으로, 본원에 기술된 rhGAA는 표준 치료보다 더 효율적으로 라이소솜 글리코겐을 클리어런스하고, 적어도 2년 동안 효소 대체 요법을 복용한 후 개선될 것으로 예상되지 않은 환자 (예를 들어, 연구 ATB200-02의 "보행가능 ERT-스위치" 코호트 1)에서 개선을 유발한 것으로 나타났다. 본원에 기술된 rhGAA 또는 제약 조성물을 사용한 현재까지의 임상 데이터는 치료 2년 후 이후에도 환자 결과에서 지속적인 개선을 전달할 것으로 예상된다. 따라서, 일부 실시양태에서, 본원에 기술된 rhGAA 또는 제약 조성물로 치료된 환자는 치료 후 2년 초과 동안 하나 이상의 임상 개선에서의 진행을 계속 나타낸다 (예를 들어, 2년 마크까지 또는 2년 마크에 달성된 이익을 넘어서는 추가 이익을 경험한다).

[0045] 본원에서 사용된 바와 같이, "라이소솜 병리의 역전"은 최적의 GAA 활성의 결여로 인해 세포에 축적된 글리코겐의 부분적 클리어런스 또는 완전한 클리어런스를 의미한다.

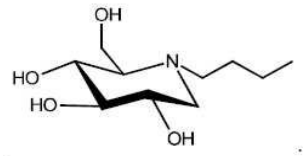
[0046] 본원에서 사용된 바와 같이, 강제 폐활량 또는 "FVC"는 대상체가 가능한 가장 깊은 숨을 들이마신 후에 대상체

의 폐로부터 강제로 내쉬어질 수 있는 공기의 양이다.

[0047] 본원에서 사용된 바와 같이, "6분 보행 검사" (6MWT)는 개체가 딱딱하고 평평한 표면에서 총 6분에 걸쳐 보행할 수 있는 거리를 측정하는 검사이다. 검사는 6분 안에 가능한 한 멀리 걷게 함으로써 수행된다.

[0048] 본원에서 사용된 바와 같이, "10미터 보행 검사" (10MWT)는 보행화를 신은 개체가 평평한 표면에서 10미터를 보행하는데 걸리는 시간을 측정하는 검사이다.

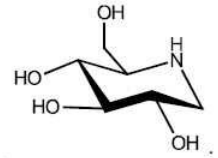
[0049] 본원에서 사용된 바와 같이, 화합물 미글루스타트, 일명 N-부틸-1-데옥시노지리마이신 또는 NB-DNJ 또는 (2R,3R,4R,5S)-1-부틸-2-(히드록시메틸)피페리딘-3,4,5-트리올은 하기 화학식의 화합물이다:

[0050] 

[0051] 한 미글루스타트 제형이 1형 고셔병에 대한 단독요법으로서 상표명 자베스카(Zavesca)®로서 시판된다. 일부 실시양태에서, 미글루스타트는 AT2221로 지칭된다.

[0052] 하기 논의된 바와 같이, 미글루스타트의 제약상 허용되는 염 또한 본 발명에서 사용될 수 있다. 미글루스타트의 염이 사용될 때, 환자가 받는 미글루스타트의 용량이 미글루스타트 유리 염기가 사용되는 경우에 환자가 받았을 양과 등가이도록 염의 투여량이 조정될 것이다.

[0053] 본원에서 사용된 바와 같이, 화합물 두보글루스타트, 일명 1-데옥시노지리마이신 또는 DNJ 또는 (2R,3R,4R,5S)-2-(히드록시메틸)피페리딘-3,4,5-트리올은 하기 화학식의 화합물이다:

[0054] 

[0055] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "약리적 샤페론" 또는 때때로 간단히 용어 "샤페론"은 산 α-글루코시다제에 특이적으로 결합하고 하기 효과 중 하나 이상을 갖는 분자를 지칭하도록 의도된다:

[0056] • 단백질의 안정적인 분자 형상의 형상을 강화하고/하거나;

[0057] • 단백질이 소포체로부터 또 다른 세포 위치, 바람직하게는 천연 세포 위치로 올바르게 트래피킹되는 것을 강화하여, 단백질의 소포체-연관 분해를 방지하고/하거나;

[0058] • 형상적으로 불안정하거나 또는 미스폴딩된 단백질의 응집을 방지하고/하거나;

[0059] • 단백질의 적어도 부분적인 야생형 기능, 안정성, 및/또는 활성을 복원 및/또는 강화하고/하거나;

[0060] • 산 α-글루코시다제를 보유하는 세포의 표현형 또는 기능을 개선함.

[0061] 따라서, 산 α-글루코시다제에 대한 약리적 샤페론은 산 α-글루코시다제에 결합하여, 산 α-글루코시다제의 올바른 폴딩, 트래피킹, 비-응집 및 활성을 초래하는 분자이다. 본원에서 사용된 바와 같이, 이러한 용어는 효소의 활성 부위에 결합하는 활성 부위-특이적 샤페론 (ASSC), 억제제 또는 길항제, 및 효능제를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 적어도 하나의 실시양태에서, 약리적 샤페론은 산 α-글루코시다제의 억제제 또는 억제제 또는 길항제일 수 있다. 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "길항제"는 산 α-글루코시다제에 결합하고, 산 α-글루코시다제의 활성을 부분적으로 또는 완전히 차단하거나, 억제하거나, 감소시키거나 또는 중화하는 분자를 지칭하도록 의도된다. 적어도 하나의 실시양태에서, 약리적 샤페론은 미글루스타트이다. 산 α-글루코시다제에 대한 약리적 샤페론의 또 다른 비제한적 예는 두보글루스타트이다.

[0062] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "활성 부위"는 단백질의 특이적인 생물학적 활성과 연관되고 이에 필요한 단백질의 영역을 지칭하는 것으로 의도된다. 적어도 하나의 실시양태에서, 활성 부위는 기질 또는 다른 결합 파

트너에 결합하고, 화학적 결합의 제조 및 파괴에 직접적으로 참여하는 아미노산 잔기에 기여하는 부위일 수 있다. 본 발명에서의 활성 부위는 효소의 촉매 부위, 항체의 항원 결합 부위, 수용체의 리간드 결합 도메인, 조절제의 결합 도메인, 또는 분비 단백질의 수용체 결합 도메인을 포함할 수 있다. 활성 부위는 전사 인자 및 조절제의 트랜스활성화, 단백질-단백질 상호작용, 또는 DNA 결합 도메인을 또한 포함할 수 있다.

[0063] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "AUC" 또는 "곡선하 면적"은 소정의 약물에 대한 경시적인 신체의 총 노출을 평가하기 위한 수학적 계산을 지칭하도록 의도된다. 대상체에게 투여된 약물의 혈액 내 농도가 투약 후에 어떻게 변화되는지를 플롯팅하는 그래프에서, 약물 농도 변수는 y축에 놓이고, 시간은 x축에 놓인다. 지정된 시간 간격에 대한 약물 농도 곡선과 x축 사이의 면적이 AUC이다. AUC는 투약 일정에 대한 지침으로서, 그리고 신체 내에서의 상이한 약물들의 이용률에 대한 생체이용률을 비교하기 위해 사용된다.

[0064] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "Cmax"는 대상체에게 투여된 후에 달성된 약물의 최대 혈장 농도를 지칭하도록 의도된다.

[0065] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "분포 용적" 또는 "V"는 혈장에서 관찰되는 것과 동일한 농도의 투여 약물의 총량을 함유하는데 필요할 이론적 부피를 지칭하도록 의도되고, 혈장보다는 신체 조직에서 약물이 분포되는 정도를 나타낸다. V 값이 높을수록 조직 분포 정도가 더 크다는 것을 가리킨다. "중심 분포 용적" 또는 "Vc"는 혈액 및 혈액이 고도로 관류하는 조직 내의 분포 용적을 지칭하도록 의도된다. "말초 분포 용적" 또는 "V2"는 말초 조직 내의 분포 용적을 지칭하도록 의도된다.

[0066] 본원에서 상호교환가능하게 사용된 바와 같이, 용어 "클리어런스", "전신 클리어런스" 또는 "CL"은 단위 시간 당 투여 약물이 완전히 클리어런스된 혈장의 부피를 지칭하도록 의도된다. "말초 클리어런스"는 단위 시간 당 투여 약물이 클리어런스된 말초 조직의 부피를 지칭하도록 의도된다.

[0067] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "제약상 허용되는"은 생리적으로 허용가능하고, 전형적으로 인간에게 투여되었을 때 부적절한 반응을 일으키지 않는 분자 엔티티 및 조성물을 지칭하도록 의도된다. 바람직하게는, 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "제약상 허용되는"은 동물, 더욱 특히 인간에서 사용하는 것에 대해 연방 또는 주 정부의 규제 기관에 의해 승인되었거나 또는 미국 약전 또는 다른 일반적으로 인정되는 약전에 열거되어 있음을 의미한다. 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "담체"는 화합물이 이와 함께 투여되는 희석제, 아주반트, 부형제, 또는 비히클을 지칭하도록 의도된다. 적절한 제약 담체는 관련 분야에 공지되어 있고, 적어도 한 실시양태에서, 문헌 "Remington's Pharmaceutical Sciences", E. W. Martin, 18th Edition], 또는 다른 판에 기술되어 있다.

[0068] 본원에서 사용된 바와 같은 용어 "제약상 허용되는 염"은 건전한 의학적 판단의 범주 내에서, 과도한 독성, 자극, 알레르기 반응 등 없이 인간 및 하등 동물의 조직과 접촉하여 사용하기에 적절하고, 합리적인 이익/위험 비에 부합하고, 일반적으로 물 또는 오일에 가용성 또는 분산성이고, 이의 의도되는 용도에 효과적인 염을 의미하도록 의도된다. 이러한 용어는 제약상 허용되는 산 부가 염 및 제약상 허용되는 염기 부가 염을 포함한다. 적절한 염의 목록이, 예를 들어, 본원에 참조로 포함된 문헌 [S. M. Berge et al., J. Pharm. Sci., 1977, 66, pp. 1-19]에 기술되어 있다. 본원에서 사용된 바와 같은 용어 "제약상 허용되는 산 부가 염"은 무기 산으로 형성된, 유리 염기의 생물학적 유효성 및 성질을 유지하고 생물학적으로 또는 다른 방식으로 바람직하지 않지 않은 염을 의미하도록 의도된다. 본원에서 사용된 바와 같은 용어 "제약상 허용되는 염기 부가 염"은 무기 염기로 형성된, 유리 산의 생물학적 유효성 및 성질을 유지하고 생물학적으로 또는 다른 방식으로 바람직하지 않지 않은 염을 의미하도록 의도된다.

[0069] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "완충제"는 pH 변화를 방지하는 것을 돕는 약산 및 이의 짝염기를 함유하는 용액을 지칭한다.

[0070] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "치료적 유효 용량" 및 "유효량"은 대상체에서 치료 반응을 초래하는데 충분한, 산 α-글루코시다제 및/또는 미글루스타트 및/또는 이의 조합물의 양을 지칭하도록 의도된다. 치료 반응은 본원에 기술되고 관련 분야에 공지되어 있는 임의의 대리 임상 마커 또는 증상을 포함하여, 사용자 (예를 들어, 임상의)가 요법에 대한 효과적인 반응으로 인식할 임의의 반응일 수 있다. 따라서, 적어도 하나의 실시양태에서, 치료 반응은 폼페병의 하나 이상의 증상 또는 마커 예컨대 관련 분야에 공지된 것의 호전 또는 억제일 수 있다. 폼페병의 증상 또는 마커는 산 α-글루코시다제 조직 활성 감소; 심근병증; 심장비대; 진행성 근육 약화, 특히 몸통 및 하지에서의 것; 중증 긴장저하; 대설증 (및 일부 경우에는 혀의 돌출); 삼키기, 빨기 및/또는 먹기 곤란; 호흡 기능부전; 간비대 (중등도); 안면 근육 이완; 무반사; 운동 불내성; 운동성 호흡곤란; 좌위

호흡; 수면 무호흡; 아침 두통; 졸림; 척추전만증 및/또는 척추측만증; 심건 반사 감소; 허리 통증; 및 운동 발달 이정표를 충족시키지 못함을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 산 α-글루코시다제에 대한 억제 효과가 있는 미글루스타트의 농도가 생체내 투여 시의 미글루스타트의 희석 (및 평형 및 pH의 변화로 인한 결과적인 결합 이동), 생체이용률 및 대사로 인해 본 발명의 목적을 위해 "유효량"을 구성할 수 있다는 것을 주지하여야 한다.

[0071] 치료 반응은 분자적 반응 예컨대 글리코겐 축적, 라이소솜 증식, 및 자가포식 구역의 형성을 또한 포함할 수 있다. 본원에 기술된 rhGAA로의 치료 전 및 후의 근육 생검체의 생리적 및 분자적 반응을 비교함으로써 치료 반응을 평가할 수 있다. 예를 들어, 생검 샘플 내에 존재하는 글리코겐의 양이 치료 반응을 결정하기 위한 마커로서 사용될 수 있다. 또 다른 예는 바이오마커 예컨대 LAMP-1, LC3, 및 디스펠린을 포함하고, 이는 라이소솜 저장 기능장애의 지표로서 사용될 수 있다. 예를 들어, 본원에 기술된 rhGAA로의 치료 전 및 후에 수집된 근육 생검체가 바이오마커 중 하나를 인식하는 항체로 염색될 수 있다.

[0072] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "효소 대체 요법" 또는 "ERT"은 정제된 비-천연 효소를 이같은 효소가 결핍된 개체 내로 도입하는 것을 지칭하도록 의도된다. 투여된 단백질은 천연 공급원으로부터 또는 재조합 발현에 의해 수득될 수 있다. 이러한 용어는 정제된 효소의 투여를 필요로 하거나 또는 이의 투여가 이로운 개체에서 정제된 효소를 도입하는 것을 또한 지칭한다. 적어도 하나의 실시양태에서, 이같은 개체는 효소 기능부전을 앓는다. 도입된 효소는 시험관 내에서 생산된 정제된 재조합 효소, 또는 단리된 조직 또는 체액, 예를 들어, 태반 또는 동물 유액으로부터 또는 식물로부터 정제된 단백질일 수 있다.

[0073] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "조합 요법"은 2개 이상의 개별적인 요법이 공동으로 또는 순차적으로 투여되는 임의의 요법을 지칭하도록 의도된다. 일부 실시양태에서, 각각의 요법이 개별적으로 수행되었을 때의 각각의 요법의 효과에 비교하여 조합 요법의 결과가 강화된다. 강화는 단독으로 수행될 때 요법에 의해 달성되는 결과에 비교하여 유리한 결과를 초래할 수 있는 다양한 요법의 효과의 임의의 개선을 포함할 수 있다. 강화된 효과 또는 결과는 강화된 효과가 단독으로 수행되었을 때의 각각의 요법의 부가적인 효과보다 더 큰 상승적 강화; 강화된 효과가 단독으로 수행되었을 때의 각각의 요법의 부가적인 효과와 실질적으로 같은 부가적 강화; 또는 강화된 효과가 단독으로 수행되었을 때의 각각의 요법의 부가적인 효과보다 낮지만, 여전히 단독으로 수행되었을 때의 각각의 요법의 효과보다 우수한 부가 미만의 효과를 포함할 수 있다. 강화된 효과는 치료 효능 또는 결과가 측정될 수 있는 관련 업계에 공지된 임의의 수단에 의해 측정될 수 있다.

[0074] 본원에서 사용된 바와 같은 용어 "공동으로"는, 관련 분야의 기술자가 이해할 바와 같이, 동시에 또는 전 또는 후의 합리적으로 짧은 기간 이내에를 의미하도록 의도된다. 예를 들어, 2개의 치료가 서로 공동으로 투여되면, 하나의 치료가 다른 치료 전 또는 후에 투여되어, 2개의 치료 중 후자를 제조하는데 필요한 시간을 허용할 수 있다. 따라서, 2개의 치료의 "공동 투여"는 약 30분 이하, 약 30분, 20분 이하, 약 20분, 약 15분, 약 10분, 약 9분, 약 8분, 약 7분, 약 6분 약 5분, 약 4분, 약 3분, 약 2분, 약 1분, 또는 1분 미만까지 하나의 치료가 다른 치료에 이어지는 것을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.

[0075] "폼페병"은 라이소솜 글리코겐 대사를 손상시키는 결핍성 산 알파 글루코시다제 (GAA) 활성을 특징으로 하는 보통염색체 열성 LSD를 지칭한다. 효소 결핍은 라이소솜 글리코겐 축적에 이르고, 진행성 골격근 약화, 심장 기능 감소, 호흡 기능부전, 및/또는 질환 말기의 CNS 손상을 초래한다. GAA 유전자에서의 유전자 돌연변이는 더 낮은 발현을 초래하거나, 또는 안정성 및/또는 생물학적 활성이 변경된 돌연변이체 형태의 효소를 생산하여 궁극적으로 질환에 이른다 (일반적으로, 문헌 [Hirschhorn R, 1995, Glycogen Storage Disease Type II: Acid a-Glucosidase (Acid Maltase) Deficiency, The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease, Scriver et al., eds., McGraw-Hill, New York, 7th ed., pages 2443-2464]을 참조한다). 폼페병의 3가지 인정된 임상 형태 (영아, 소아 및 성인)는 잔류 α-글루코시다제 활성의 수준과 상호관련된다 (Reuser A J et al., 1995, Glycogenosis Type II (Acid Maltase Deficiency), Muscle & Nerve Supplement 3, S61-S69). 영아 폼페병 (I형 또는 A형)은 가장 통상적이고 가장 중증이며, 생후 2년 이내의 발육 실패, 전신성 긴장저하, 심장 비대, 및 심장호흡 부전을 특징으로 한다. 소아 폼페병 (II형 또는 B형)은 중증도 면에서 중간이고, 심장비대 없이 근육 증상의 우세를 특징으로 한다. 소아 폼페 개체는 일반적으로 호흡 부전으로 인해 20세에 도달하기 전에 사망한다. 성인 폼페병 (III형 또는 C형)은 10대 또는 느리게는 60대에 천천히 진행성인 근육병으로서 종종 존재한다 (Felicia K J et al., 1995, Clinical Variability in Adult-Onset Acid Maltase Deficiency: Report of Affected Sibs and Review of the Literature, Medicine 74, 131-135). 폼페에서, α-글루코시다제가 번역 후에 글리코실화, 인산화 및 단백질분해성 프로세싱에 의해 광범위하게 변형되는 것으로 나타났다. 라이소솜에서 단백질분해에 의해 110 킬로돌턴 (kDa) 전구체가 76 및 70 KDa의 성숙 형태로 전환되는 것이 최적의 글리코겐

촉매작용에 요구된다. 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "폼페병"은 모든 유형의 폼페병을 지칭한다. 본 출원에 개시된 제형 및 투약 체계는, 예를 들어, I형, II형 또는 III형 폼페병을 치료하는데 사용될 수 있다.

[0076] "대상체" 또는 "환자"는 바람직하게는 인간이지만, 글리코겐 축적을 수반하는 장애에 걸린 다른 포유동물 및 비-인간 동물 또한 치료될 수 있다. 대상체는 폼페병 또는 다른 글리코겐 저장 또는 축적 장애에 걸린 태아, 신생아, 아동, 소아 또는 성인일 수 있다. 치료되는 개체의 한 예는 GSD-II (예를 들어, 영아 GSD-II, 소아 GSD-II, 또는 성인-발병 GSD-II)에 걸린 개체 (태아, 신생아, 아동, 소아, 청소년, 또는 성인 인간)이다. 개체는 잔여 GAA 활성이 있을 수 있거나, 또는 측정가능한 활성이 없을 수 있다. 예를 들어, GSD-II에 걸린 개체는 정상 GAA 활성의 약 1% 미만인 GAA 활성 (영아 GSD-II), 정상 GAA 활성의 약 1-10%인 GAA 활성 (소아 GSD-II), 또는 정상 GAA 활성의 약 10-40%인 GAA 활성 (성인 GSD-II)을 가질 수 있다. 일부 실시양태에서, 대상체 또는 환자는 이전에 효소 대체 요법을 받은 폼페병 환자를 지칭하는 "ERT-경험" 또는 "ERT-스위치" 환자이다. 일부 실시양태에서, 대상체 또는 환자는 이전에 효소 대체 요법을 받지 않은 폼페병 환자를 지칭하는 "ERT-나이브" 환자이다. 특정 실시양태에서, 대상체 또는 환자는 보행가능하다 (예를 들어, 보행가능 ERT-스위치 환자 또는 보행가능 ERT-나이브 환자). 특정 실시양태에서, 대상체 또는 환자는 보행가능하지 않다 (예를 들어, 보행불능 ERT-스위치 환자). 보행가능 또는 보행불능 상태는 6분 보행 검사 (6MWT)에 의해 결정될 수 있다. 일부 실시양태에서, 보행가능 환자는 6MWT에서 적어도 200 미터를 보행할 수 있는 폼페병 환자이다. 일부 실시양태에서, 보행불능 환자는 보조 없이 보행할 수 없거나 또는 휠체어에 구속된 폼페병 환자이다.

[0077] 본원에서 사용된 바와 같은 용어 "치료하다" 및 "치료"는 질환과 연관된 하나 이상의 증상의 호전, 질환의 하나 이상의 증상의 발병의 예방 또는 지연, 및/또는 질환의 하나 이상의 증상의 중증도 또는 빈도의 감소를 지칭한다. 예를 들어, 치료는 심장 상태의 개선 (예를 들어, 확장 말기 및/또는 수축 말기 용적의 증가, 또는 GSD-II에서 전형적으로 발견되는 진행성 심근병증의 감소, 호전 또는 예방) 또는 폐 기능의 개선 (예를 들어, 기준선 폐활량에 비교하여 울음 폐활량의 증가, 및/또는 우는 동안의 산소 불포화도의 정상화); 신경발달 및/또는 운동 능력의 개선 (예를 들어, AIMS 점수 증가); 질환에 걸린 개체의 조직 내의 글리코겐 수준의 감소; 또는 이러한 효과의 임의의 조합을 지칭할 수 있다. 한 바람직한 실시양태에서, 치료는 심장 상태의 개선, 특히 GSD-II-연관 심근병증의 감소 또는 예방에 있어서 개선을 포함한다.

[0078] 본원에서 사용된 바와 같은 용어 "개선하다", "증가시키다" 및 "감소시키다"는 기준선 측정치, 예컨대 본원에 기술된 치료를 시작하기 전의 동일한 개체에서의 측정치, 또는 본원에 기술된 치료의 부재 하의 대조군 개체 (또는 다수의 대조군 개체)에서의 측정치에 대해 상대적인 값을 가리킨다. 대조군 개체는 (치료된 개체 및 대조군 개체(들)에서의 질환 단계가 필적하다는 것을 확실히 하기 위해) 치료 중인 개체와 대략적으로 같은 나이인, 치료 중인 개체와 동일한 형태의 GSD-II (영아, 소아 또는 성인-발병)에 걸린 개체이다.

[0079] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "약" 및 "대략적으로"는 측정치의 성질 또는 정확도를 고려하여 측정된 양에 대한 허용가능한 정도의 오차를 지칭하도록 의도된다. 예를 들어, 오차의 정도는, 관련 분야에서 이해되는 바와 같이, 측정을 위해 제공된 유효 숫자의 개수에 의해 지시될 수 있고, 측정치에 대해 보고된 가장 정확한 유효 숫자에서의 ±1의 변동을 포함하지만, 이에 제한되지는 않는다. 전형적인 예시적인 오차 정도는 소정의 값 또는 값 범위의 20 퍼센트 (%) 이내, 바람직하게는 10% 이내, 더욱 바람직하게는 5% 이내이다. 본원에서 제공되는 수치는 달리 언급되지 않는 한 근사치이고, 이는 명백하게 언급되지 않은 경우에 용어 "약" 또는 "대략적으로"가 추론될 수 있다는 것을 의미한다.

[0080] **II. 재조합 인간 산 α-글루코시다제 (rhGAA)**

[0081] 일부 실시양태에서, 재조합 인간 산 α-글루코시다제 (rhGAA)는 서열식별번호: 1, 서열식별번호: 3, 서열식별번호: 4, 또는 서열식별번호: 5에 기재된 아미노산 서열을 갖는 효소이다. 일부 실시양태에서, rhGAA는 서열식별번호: 2에 기재된 뉴클레오티드 서열에 의해 코딩된다.

[0082] <표 1>

[0083] 뉴클레오티드 서열 및 단백질 서열

서열 식별 번호	서열
1	MGVRHPPCSHRLLAVCALVSLATAALLGHILLHDFLLVPRELSGSSPVLEETHPAHQQGA SRPGPRDAQAHPGRPRAVPTQCDVPPNSRFDCAPDKAITQEQCEARGCCYIPAKQGLQGA QMGQPWCFFPPSYPSYKLENLSSSEMGYTATLTRTTPTFFPKDILTLRLDVMMETENRLH FTIKDPANRRYEVPLETPRVHSRAPSPLYSVEFSEEPFGVIVHRQLDGRVLLNTTVAPLF FADQFLQLSTSLPSQYITGLAEHLSPLMLSTSWTRITLWNRDLAPTPGANLYGSHPFYLA LEDGGSAHGVFLLNSNAMDVVLQPSPALSWRSTGGILDVYIFLGPEPKSVVQQYLDVVGY PFMPPYWGLGFHLCRWGYSSTAITRQVVENMTRAHFPLDVQWNDLDYMDSRRDFTFNKDG FRDFPAMVQELHQGGRRYMMIVDPAISSSGPAGSYRPYDEGLRRGVFITNETGQPLIGKV WPGSTAFPDFTNPTALAWWEDMVAEFHDQVPFDGMWIDMNEPSNFIRGSEDGCPNNELEN PPYVPGVVGGTLQAATICASSHQFLSTHYNLHNLYGLTEAIASHRALVKARGTRPFVISR STFAGHGRYAGHWTGDVWSSWEQLASSVPEILQFNLLGVPLVGADVCGFLGNTSEELCVR WTQLGAFYPFMRNHNSLLSLPQEPYSFSEPAQQAMRKALTLRYALLPHLYTLFHQAHVAG ETVARPLFLEFPKDSSTWTVDHQLLWGEALLITPVLQAGKAEVTGYFPLGTWYDLQTVPI EALGSLPPPPAAPREPAIHSEGQWVTLPAPLDTINVHLRAGYIIPLQGPGLTTTESRQQP MALAVALTKGGEARGELFWDDGESLEVLERGAYTQVIFLARNNTIVNELVRVTSEGAGLQ LQKVTVLGVATAPQQVLSNGVPVSNFTYSPDTKVLDICVSLLMGEQFLVSWC
2	cagttgggaaagctgaggttgtcgccggggccgcgggtggaggtcggggatgaggcagcaggtaggacagtgacctcggtgacgcgaaggac cccggccacctctaggttctcctcgtccgcccgttgttcagcgaggaggctctgggcctgccgcagctgacggggaaactgaggcacggagcg ggcctgtaggagctgtccaggccatctccaaccatgggagtgaggcacccgccctgctcccaccggctcctggccgtctgcgccctcgtgtccttg gcaaccgctgcactcctggggcacatcctactccatgatttcctgctggttcccgagagctgagtggctcctccccagtcctggaggagactcacc cagctcaccagcagggagccagcagaccagggccccgggatgcccaggcacaccccggccgtcccagagcagtgcccacacagtgcgacgt ccccccaacagccgcttcgattgcgccccgacaaggccatcacccaggaacagtgcgaggcccgcggctgctgctacatccctgcaaagcag gggctgcagggagcccagatggggcagccctggtgcttcttcccacccagctaccccagctacaagctggagaacctgagctcctctgaaatggg ctacacggccacccctgacccgtaccaccccccacctttcttcccccaaggacatcctgaccctgcggctggacgtgatgatggagactgagaaccgcct ccacttcacgatcaaagatccagctaacaggcgctacgaggtgccctggagacccccgcgtgtccacagccgggcaccgtccccactctacagcg tggagttctccgaggagcccttcggggtgatcgtgcaccggcagctggacggccgcgtgctgctgaacacgacggtggcgccccctgttctttgcg gaccagttccttcagctgtccacctcgctgccctcgcagtatatcacaggcctcgccgagcacctcagtccccctgatgctcagcaccagctggacca ggatcaccctgtggaaccgggaccttgcgcccacgcccggtgcgaacctctacgggtctcacccttctacctggcgctggaggacggcgggtcg gcacacggggtgttcctgctaaacagcaatgccatggatgtggtcctgcagccgagccctgcccttagctggaggtcgacaggtgggatcctggat gtctacatcttcctgggcccagagcccaagagcgtggtgcagcagtacctggacgttgtgggatacccgttcatgccgccatactgggcctgggct tccacctgtgccgctggggctactcctccaccgctatcacccgccaggtggtggagaacatgaccagggcccacttcccctggacgtccaatgga acgacctggactacatggactcccggagggacttcacgttcaacaaggatggcttccgggacttcccggccatggtgcaggagctgcaccagggc ggccggcgctacatgatgatcgtggatcctgccatcagcagctcgggccctgccgggagctacaggccctacgacgagggtctgcggaggggg gttttcatcaccaacgagaccggccagccgctgattgggaaggtatggcccgggtccactgccttcccgacttcaccaaccccacagccctggcc tggtgggaggacatggtggctgagttccatgaccaggtgcccttcgacggcatgtggattgacatgaacgagccttccaacttcatcagaggctctg aggacggctgccccaacaatgagctggagaacccaccctacgtgcctggggtggttgggggacctccaggcggccaccatctgtgcctccag ccaccagtttctctccacacactacaacctgcacaacctctacggcctgaccgaagccatcgcctcccacagggcgctggtgaaggctcgggggа cacgcccatttgtgatctcccgctcgaccttgctggccacggccgatacgccggccactggacgggggacgtgtggagctcctgggagcagctc gcctcctccgtgccagaaatcctgcagtttaacctgctgggggtgcctctggtcgggggccgacgtctgcggcttcctgggcaacacctcagaggag ctgtgtgtgcgctggacccagctgggggccttctacccctcatgcggaaccacaacagcctgctcagtctgccccaggagccgtacagcttcagc gagccggcccagcaggccatgaggaaggccctcaccctgcgctacgcactcctccccccacctctacacactgttccaccaggcccacgtcgcgg gggagaccgtggcccggccccctcttcctggagttccccaaggactctagcacctggactgtggaccaccagctcctgtgggggaggccctgctc atcaccccagtgctccaggccgggaaggccgaagtgactggctacttcccctttgggcacatggtacgacctgcagacggtgccaatagaggccct tggcagcctcccaccccccacctgcagctcccgtgagccagccatccacagcgaggggcagtgggtgacgctgccggccccccctggacaccat caacgtccacctccgggctgggtacatcatcccccctgcagggcccctggcctcacaaccacagagtcccgccagcagcccatggccctggctgtgg ccctgaccaaggtggagaggcccgaggggagctgttctgggacgatggagagagcctggaagtgctggagcgaggggcctacacacaggtc atcttcctggccaggaataacacgatcgtgaatgagctggtacgtgtgaccagtgagggagctggcctgcagctgcagaaggtgactgtcctgggc gtggccacggcgccccagcaggtcctctccaacggtgtccctgtctccaacttcacctacagccccgacaccaaggtcctggacatctgtgtctcgc tgttgatgggagagcagtttctcgtcagctggtgttagccgggcggagtgtgttagtctctccagagggaggctggttccccagggaagcagagcct gtgtgcgggcagcagctgtgtgcgggcctgggggttgcatgtgtcacctggagctgggcactaaccattccaagccgccgcatcgcttgtttccacc tcctgggccgggctctggccccccaacgtgtctaggagagctttctccctagatcgcactgtgggccgggggcctggagggctgctctgtgttaataa gattgtaaggtttgccctcctcacctgttgccggcatgcgggtagtattagccaccccctccatctgttcccagcaccggagaagggggtgctcagg tggaggtgtgggtatgcacctgagctcctgcttcgcgcctgctgctctgccccaacgcgaccgcttcccggctgcccagagggctggatgcctgc cggtccccgagcaagcctgggaactcaggaaaattcacaggacttgggagattctaaatcttaagtgcaattattttaataaaaggggcatttggaatc

[0084]

3	MGVRHPPCSHRLLAVCALVSLATAALLGHILLHDFLLVPRELSGSSPVLEETHPAHQQGA SRPGPRDAQAHPGRPRAVPTQCDVPPNSRFDCAPDKAITQEQCEARGCCYIPAKQGLQGA QMGQPWCFFPPSYPSYKLENLSSSEMGYTATLTRTTPTFFPKDILTLRLDVMMETENRLH FTIKDPANRRYEVPLETPRVHSRAPSPLYSVEFSEEPFGVIVHRQLDGRVLLNTTVAPLF FADQFLQLSTSLPSQYITGLAEHLSPLMLSTSWTRITLWNRDLAPTPGANLYGSHPFYLA LEDGGSAHGVFLLNSNAMDVVLQPSPALSWRSTGGILDVYIFLGPEPKSVVQQYLDVVGY PFMPPYWGLGFHLCRWGYSSTAITRQVVENMTRAHFPLDVQWNDLDYMDSRRDFTFNKDG FRDFPAMVQELHQGGRRYMMIVDPAISSSGPAGSYRPYDEGLRRGVFITNETGQPLIGKV WPGSTAFPDFTNPTALAWWEDMVAEFHDQVPFDGMWIDMNEPSNFIRGSEDGCPNNELEN PPYVPGVVGGTLQAATICASSHQFLSTHYNLHNLYGLTEAIASHRALVKARGTRPFVISR STFAGHGRYAGHWTGDVWSSWEQLASSVPEILQFNLLGVPLVGADVCGFLGNTSEELCVR WTQLGAFYPFMRNHNSLLSLPQEPYSFSEPAQQAMRKALTLRYALLPHLYTLFHQAHVAG ETVARPLFLEFPKDSSTWTVDHQLLWGEALLITPVLQAGKAEVTGYFPLGTWYDLQTVPI EALGSLPPPPAAPREPAIHSEGQWVTLPAPLDTINVHLRAGYIIPLQGPGLTTTESRQQP MALAVALTKGGEARGELFWDDGESLEVLERGAYTQVIFLARNNTIVNELVRVTSEGAGLQ LQKVTVLGVATAPQQVLSNGVPVSNFTYSPDTKVLDICVSLLMGEQFLVSWC
4	MGVRHPPCSHRLLAVCALVSLATAALLGHILLHDFLLVPRELSGSSPVLEETHPAHQQGA SRPGPRDAQAHPGRPRAVPTQCDVPPNSRFDCAPDKAITQEQCEARGCCYIPAKQGLQGA QMGQPWCFFPPSYPSYKLENLSSSEMGYTATLTRTTPTFFPKDILTLRLDVMMETENRLH FTIKDPANRRYEVPLETPHVHSRAPSPLYSVEFSEEPFGVIVRRQLDGRVLLNTTVAPLF FADQFLQLSTSLPSQYITGLAEHLSPLMLSTSWTRITLWNRDLAPTPGANLYGSHPFYLA LEDGGSAHGVFLLNSNAMDVVLQPSPALSWRSTGGILDVYIFLGPEPKSVVQQYLDVVGY PFMPPYWGLGFHLCRWGYSSTAITRQVVENMTRAHFPLDVQWNDLDYMDSRRDFTFNKDG FRDFPAMVQELHQGGRRYMMIVDPAISSSGPAGSYRPYDEGLRRGVFITNETGQPLIGKV WPGSTAFPDFTNPTALAWWEDMVAEFHDQVPFDGMWIDMNEPSNFIRGSEDGCPNNELEN PPYVPGVVGGTLQAATICASSHQFLSTHYNLHNLYGLTEAIASHRALVKARGTRPFVISR STFAGHGRYAGHWTGDVWSSWEQLASSVPEILQFNLLGVPLVGADVCGFLGNTSEELCVR WTQLGAFYPFMRNHNSLLSLPQEPYSFSEPAQQAMRKALTLRYALLPHLYTLFHQAHVAG ETVARPLFLEFPKDSSTWTVDHQLLWGEALLITPVLQAGKAEVTGYFPLGTWYDLQTVPV EALGSLPPPPAAPREPAIHSEGQWVTLPAPLDTINVHLRAGYIIPLQGPGLTTTESRQQP MALAVALTKGGEARGELFWDDGESLEVLERGAYTQVIFLARNNTIVNELVRVTSEGAGLQ LQKVTVLGVATAPQQVLSNGVPVSNFTYSPDTKVLDICVSLLMGEQFLVSWC
5	QQGASRPGPRDAQAHPGRPRAVPTQCDVPPNSRFDCAPDKAITQEQCEARGCCYIPAKQG LQGAQMGQPWCFFPPSYPSYKLENLSSSEMGYTATLTRTTPTFFPKDILTLRLDVMMETE NRLHFTIKDPANRRYEVPLETPRVHSRAPSPLYSVEFSEEPFGVIVHRQLDGRVLLNTTV APLFFADQFLQLSTSLPSQYITGLAEHLSPLMLSTSWTRITLWNRDLAPTPGANLYGSHP FYLALEDGGSAHGVFLLNSNAMDVVLQPSPALSWRSTGGILDVYIFLGPEPKSVVQQYLD VVGYPFMPPYWGLGFHLCRWGYSSTAITRQVVENMTRAHFPLDVQWNDLDYMDSRRDFTF NKDGFRDFPAMVQELHQGGRRYMMIVDPAISSSGPAGSYRPYDEGLRRGVFITNETGQPL IGKVWPGSTAFPDFTNPTALAWWEDMVAEFHDQVPFDGMWIDMNEPSNFIRGSEDGCPNN ELENPPYVPGVVGGTLQAATICASSHQFLSTHYNLHNLYGLTEAIASHRALVKARGTRPF VISRSTFAGHGRYAGHWTGDVWSSWEQLASSVPEILQFNLLGVPLVGADVCGFLGNTSEE LCVRWTQLGAFYPFMRNHNSLLSLPQEPYSFSEPAQQAMRKALTLRYALLPHLYTLFHQA HVAGETVARPLFLEFPKDSSTWTVDHQLLWGEALLITPVLQAGKAEVTGYFPLGTWYDLQ TVPIEALGSLPPPPAAPREPAIHSEGQWVTLPAPLDTINVHLRAGYIIPLQGPGLTTTES RQQPMALAVALTKGGEARGELFWDDGESLEVLERGAYTQVIFLARNNTIVNELVRVTSEG AGLQLQKVTVLGVATAPQQVLSNGVPVSNFTYSPDTKVLDICVSLLMGEQFLVSWC

[0085]

[0086] 일부 실시양태에서, rhGAA는 미국 특허 번호 8,592,362에 기술된 바와 같이 서열식별번호: 1에 기재된 야생형 GAA 아미노산 서열을 갖고, 진뱅크(GenBank) 수탁 번호가 AHE24104.1 (GI:568760974)이다. 일부 실시양태에서, rhGAA는 진뱅크 수탁 번호 Y00839.1의 mRNA인 서열식별번호: 2에서 코딩된 바와 같은 야생형 GAA 아미노산 서열을 갖는다. 일부 실시양태에서, rhGAA는 서열식별번호: 3에 기재된 바와 같은 야생형 GAA 아미노산 서열을 갖는다. 일부 실시양태에서, rhGAA는 서열식별번호: 4에 기재된 바와 같은 야생형 GAA 아미노산 서열을 갖고, 국립 생물공학 정보 센터 (NCBI) 수탁 번호가 NP_000143.2이다. 일부 실시양태에서, rhGAA는 *GAA* 유전자의 9개의 관찰된 일배체형 중 가장 우세한 것에 의해 코딩되는 인간 산 α-글루코시다제 효소인 알글루코시다제 알파이다.

[0087] 일부 실시양태에서, rhGAA는 처음에는 서열식별번호: 1에 기재된 바와 같은 야생형 GAA의 아미노산 952개의 전장 서열을 갖는 것으로서 발현되고, 아미노산의 일부분, 예를 들어, 처음 56개의 아미노산을 제거하는 세포내 프로세싱이 rhGAA에 진행된다. 따라서, 숙주 세포가 분비하는 rhGAA는 처음에 세포에서 발현된 rhGAA보다 더 짧은 아미노산 서열을 가질 수 있다. 한 실시양태에서, 더 짧은 단백질은 서열식별번호: 5에 기재된 아미노산 서열을 갖고, 이는 신호 펩티드 및 전구체 펩티드를 포함하는 처음 56개의 아미노산이 제거되어, 896개의 아미노산을 갖는 단백질이 초래되었다는 점에서만 서열식별번호: 1과 상이하다. 아미노산 개수의 다른 변이, 예컨대 서열식별번호: 1 또는 서열식별번호: 5에 기재된 아미노산 서열에 비교하여 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15개 이상의 결실, 치환, 및/또는 삽입이 있는 것이 또한 가능하다. 일부 실시양태에서, rhGAA 제품은 아미노산 길이가 상이한 재조합 인간 산 α-글루코시다제 분자들의 혼합물을 포함한다.

[0088] 일부 실시양태에서, rhGAA는 서열식별번호: 1 또는 서열식별번호: 5와 적어도 90%, 95%, 98% 또는 99% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. GCG 서열 분석 패키지 (유니버시티 오브 위스컨신(University of Wisconsin), 위스컨신주 매디슨)의 일부로서 입수가능하고, 예를 들어, 디폴트 설정으로 사용될 수 있는 BLAST 또는 FASTA를 포함하여, 다양한 정렬 알고리즘 및/또는 프로그램을 사용하여 2개의 서열 사이의 동일성을 계산할 수 있다. 예를 들어, 본원에 기술된 특정 폴리펩티드에 대한 동일성이 적어도 90%, 95%, 98% 또는 99%이고, 바람직하게는

실질적으로 동일한 기능을 나타내는 폴리펩티드, 뿐만 아니라 이같은 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드가 구상된다. 달리 지시되지 않는 한, 유사성 점수는 BLOSUM62를 사용하는 것을 기초로 할 것이다. BLASTP가 사용되는 경우, 퍼센트 유사성은 BLASTP 양성 점수를 기초로 하고, 퍼센트 서열 동일성은 BLASTP 동일성 점수를 기초로 한다. BLASTP "동일성"은 동일한 고득점 서열 쌍 내의 총 잔기의 개수 및 분율을 나타내고, BLASTP "양성"은 정렬 점수가 양의 값이고 서로 유사한 잔기의 개수 및 분율을 나타낸다. 본원에 개시된 서열에 대한 이러한 정도의 동일성 또는 유사성 또는 임의의 중간 정도의 동일성 또는 유사성을 갖는 아미노산 서열이 본 개시내용에 의해 구상되고 포함된다. 유사한 폴리펩티드들의 폴리뉴클레오티드 서열이 유전자 코드를 사용하여 추론되고, 통상적인 수단에 의해, 특히 유전자 코드를 사용하여 이의 아미노산 서열을 역번역함으로써 수득될 수 있다.

[0089] 일부 실시양태에서, 단백질 내의 하나 이상의 아미노산 잔기에서 rhGAA에 번역후 및/또는 화학적 변형이 진행된다. 예를 들어, 메티오닌 및 트립토판 잔기에 산화가 진행될 수 있다. 또 다른 예로서, N-말단 글루타민이 피로-글루타메이트를 형성할 수 있다. 또 다른 예로서, 아스파라긴 잔기에 아스파르트산으로의 탈아미드화가 진행될 수 있다. 또 다른 예로서, 아스파르트산 잔기에 이소-아스파르트산으로의 이성질체화가 진행될 수 있다. 또 다른 예로서, 단백질 내의 쌍을 이루지 않은 시스테인 잔기가 유리 글루타티온 및/또는 시스테인과 디술피드 결합을 형성할 수 있다. 따라서, 일부 실시양태에서, 효소는 처음에는 서열식별번호: 1, 서열식별번호: 3, 서열식별번호: 4 또는 서열식별번호: 5에 기재된 바와 같은 아미노산 서열, 또는 서열식별번호: 2에 의해 코딩되는 아미노산 서열을 갖는 것으로서 발현되고, 효소에 하나 이상의 이러한 번역후 및/또는 화학적 변형이 진행된다. 이같은 변형 또한 본 개시내용의 범주 내에 속한다.

[0090] **III. rhGAA의 N-연결 글리코실화**

[0091] 단일 rhGAA 분자 상에 7개의 잠재적 N-연결 글리코실화 부위가 있다. 이러한 잠재적 글리코실화 부위는 서열식별번호: 5의 하기의 위치에 있다: N84, N177, N334, N414, N596, N826, 및 N869. 유사하게, 서열식별번호: 1의 전장 아미노산 서열의 경우, 이러한 잠재적 글리코실화 부위는 하기의 위치에 있다: N140, N233, N390, N470, N652, N882, 및 N925. 아스파라긴 잔기의 위치에 따라, rhGAA의 다른 변이체가 유사한 글리코실화 부위를 가질 수 있다. 일반적으로, X가 His 또는 Pro일 수 없다는 것을 제외하고, 단백질 아미노산 서열 내의 Asn-X-Ser 또는 Asn-X-Thr의 서열이 잠재적 글리코실화 부위를 가리킨다

[0092] 본원에 기술된 rhGAA 분자는 이의 N-글리칸 상에, 평균적으로, 1, 2, 3, 또는 4개의 만노스-6-포스페이트(M6P) 기를 가질 수 있다. 예를 들어, rhGAA 분자 상의 오직 1개의 N-글리칸이 M6P (모노-인산화 또는 모노-M6P)를 보유할 수 있거나, 단일 N-글리칸이 2개의 M6P 기 (비스-인산화 또는 비스-M6P)를 보유할 수 있거나, 또는 동일한 rhGAA 분자 상의 2개의 상이한 N-글리칸이 단일한 M6P 기를 각각 보유할 수 있다. 일부 실시양태에서, 본원에 기술된 rhGAA 분자는 이의 N-글리칸 상에 평균적으로 3-4개의 M6P 기를 갖는다. 재조합 인간 산 α-글루코시다제 분자는 M6P 기를 보유하지 않는 N-글리칸이 있을 수도 있다. 또 다른 실시양태에서, 평균적으로 rhGAA는 rhGAA mol 당 2.5 mol 초과의 M6P, 및 rhGAA mol 당 4 mol 초과의 시알산을 포함한다. 일부 실시양태에서, 평균적으로 rhGAA는 rhGAA mol 당 약 3-3.5 mol의 M6P를 포함한다. 일부 실시양태에서, 평균적으로 rhGAA는 rhGAA mol 당 약 4-5.4 mol의 시알산을 포함한다. 평균적으로, rhGAA 상의 총 N-글리칸의 적어도 약 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10%, 또는 20%가 모노-M6P N-글리칸의 형태일 수 있고, 예를 들어, 총 N-글리칸의 약 6.25%가 단일 M6P 기를 보유할 수 있고, 평균적으로, rhGAA 상의 총 N-글리칸의 적어도 약 0.5, 1, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0%가 비스-M6P N-글리칸의 형태이며, 평균적으로 총 rhGAA의 25% 미만이 CIMPR에 대한 인산화 N-글리칸 결합을 함유하지 않는다. 일부 실시양태에서, 평균적으로 rhGAA 상의 총 N-글리칸의 약 10% 내지 약 14%가 모노-인산화된다. 일부 실시양태에서, 평균적으로 rhGAA 상의 총 N-글리칸의 약 7% 내지 약 25%가 비스-인산화된다. 일부 실시양태에서, 평균적으로 rhGAA는 rhGAA mol 당 약 1.3 mol의 비스-M6P를 포함한다.

[0093] 본원에 기술된 rhGAA는 M6P를 보유하는 N-글리칸의 평균 함량이 rhGAA mol 당 0.5 내지 7.0 mol의 M6P, 또는 이의 임의의 중간 값 또는 하위 범위 (rhGAA mol 당 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, 또는 7.0 mol의 M6P을 포함함)일 수 있다. rhGAA는 모노-M6P-보유 또는 비스-M6P-보유 N-글리칸의 평균 개수가 상이한 rhGAA 제제를 제공하도록 분획화될 수 있고, 따라서 특정 분획을 선택함으로써 또는 상이한 분획들을 선택적으로 조합함으로써 표적 조직 내의 라이소솜을 표적화하는 rhGAA의 맞춤제작을 추가로 허용한다.

[0094] 일부 실시양태에서, rhGAA 상의 N-글리칸의 60% 이하가 완전히 시알릴화될 수 있고, 예를 들어, N-글리칸의 10%, 20%, 30%, 40%, 50% 또는 60% 이하가 완전히 시알릴화될 수 있다. 일부 실시양태에서, rhGAA 상의 N-글

리칸의 50% 이하가 완전히 시알릴화된다. 일부 실시양태에서, 총 N-글리칸의 4% 내지 20%가 완전히 시알릴화된다. 다른 실시양태에서, rhGAA 상의 N-글리칸의 5%, 10%, 20% 또는 30% 이하가 시알산 및 말단 갈락토스 잔기(Gal)를 보유한다. 이러한 범위는 모든 중간 값 및 하위범위를 포함하고, 예를 들어, rhGAA 상의 총 N-글리칸의 7% 내지 30%가 시알산 및 말단 갈락토스를 보유할 수 있다. 또 다른 실시양태에서, rhGAA 상의 N-글리칸의 5%, 10%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 또는 20% 이하가 말단 갈락토스만 있고, 시알산을 함유하지 않는다. 이러한 범위는 모든 중간 값 및 하위범위를 포함하고, 예를 들어, 조성물 내의 rhGAA 상의 총 N-글리칸의 8% 내지 19%가 말단 갈락토스만 있을 수 있고, 시알산은 함유하지 않는다.

[0095] 일부 실시양태에서, rhGAA 상의 총 N-글리칸의 40%, 45%, 50%, 또는 55% 내지 60%가 복합형 N-글리칸이거나; 또는 rhGAA 상의 총 N-글리칸의 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6,%, 또는 7% 이하가 하이브리드형 N-글리칸이고; rhGAA 상의 고-만노스형 N-글리칸의 5%, 10%, 15%, 20%, 또는 25% 이하가 비-인산화되고/되거나; rhGAA 상의 고-만노스형 N-글리칸의 적어도 5% 또는 10%가 모노-인산화되고/되거나; rhGAA 상의 고-만노스형 N-글리칸의 적어도 1% 또는 2%가 비스-인산화된다. 이러한 값은 모든 중간 값 및 하위범위를 포함한다. rhGAA는 상기 기술된 함량 범위 중 하나 이상을 충족시킬 수 있다.

[0096] 일부 실시양태에서, rhGAA는, 평균적으로, rhGAA 몰 당 2.0 내지 8.0 몰의 시알산 잔기를 보유할 수 있다. 이러한 범위는 rhGAA mol 당 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 및 8.0 mol의 시알산 잔기를 포함하여, 이의 모든 중간 값 및 하위범위를 포함한다. 이론에 의해 제한되지 않으면서, 시알산 잔기를 보유하는 N-글리칸 단위의 존재가 아시알로당단백질 수용체에 의한 rhGAA의 비-생산적 클리어런스를 방지할 수 있는 것으로 여겨진다.

[0097] 하나 이상의 실시양태에서, rhGAA는 특정한 잠재적 N-글리코실화 부위에 특정한 N-글리코실화 프로파일을 갖는다. 일부 실시양태에서, rhGAA는 7개의 잠재적 N-글리코실화 부위가 있다. 일부 실시양태에서, rhGAA의 적어도 20%가 제1 잠재적 N-글리코실화 부위 (예를 들어, 서열식별번호: 5의 경우 N84 및 서열식별번호: 1의 경우 N140)에서 인산화된다. 예를 들어, rhGAA의 적어도 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 또는 95%가 제1 잠재적 N-글리코실화 부위에서 인산화될 수 있다. 이러한 인산화는 모노-M6P 및/또는 비스-M6P 단위의 결과일 수 있다. 일부 실시양태에서, rhGAA의 적어도 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 또는 95%가 제1 잠재적 N-글리코실화 부위에 모노-M6P 단위를 보유한다. 일부 실시양태에서, rhGAA의 적어도 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 또는 95%가 제1 잠재적 N-글리코실화 부위에 비스-M6P 단위를 보유한다. 일부 실시양태에서, rhGAA는 제1 잠재적 N-글리코실화 부위에 평균적으로 rhGAA mol 당 약 1.4 mol의 M6P (모노-M6P 및 비스-M6P)를 포함한다. 일부 실시양태에서, rhGAA는 제1 잠재적 N-글리코실화 부위에 평균적으로 rhGAA mol 당 적어도 약 0.5 mol의 비스-M6P를 포함한다. 일부 실시양태에서, rhGAA는 제1 잠재적 N-글리코실화 부위에 평균적으로 rhGAA mol 당 약 0.25 mol의 모노-M6P를 포함한다. 일부 실시양태에서, rhGAA는 제1 잠재적 N-글리코실화 부위에 평균적으로 rhGAA mol 당 약 0.2 mol 내지 약 0.3 mol의 시알산을 포함한다. 적어도 하나의 실시양태에서, rhGAA는 도 6a에 도시된 바와 같은 제1 잠재적 N-글리코실화 부위 점유율 및 도 6b에 도시된 바와 같은 N-글리코실화 프로파일을 포함한다. 적어도 하나의 실시양태에서, rhGAA는 도 32a에 도시된 바와 같은 제1 잠재적 N-글리코실화 부위 점유율 및 도 32b 또는 도 33b에 도시된 바와 같은 N-글리코실화 프로파일을 포함한다.

[0098] 일부 실시양태에서, rhGAA의 적어도 20%가 제2 잠재적 N-글리코실화 부위 (예를 들어, 서열식별번호: 5의 경우 N177 및 서열식별번호: 1의 경우 N223)에서 인산화된다. 예를 들어, rhGAA의 적어도 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 또는 95%가 제2 N-글리코실화 부위에서 인산화될 수 있다. 이러한 인산화는 모노-M6P 및/또는 비스-M6P 단위의 결과일 수 있다. 일부 실시양태에서, rhGAA의 적어도 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 또는 95%가 제2 N-글리코실화 부위에 모노-M6P 단위를 보유한다. 일부 실시양태에서, rhGAA의 적어도 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 또는 95%가 제2 N-글리코실화 부위에 비스-M6P 단위를 보유한다. 일부 실시양태에서, rhGAA는 제2 잠재적 N-글리코실화 부위에 평균적으로 rhGAA mol 당 약 0.5 mol의 M6P (모노-M6P 및 비스-M6P)를 포함한다. 일부 실시양태에서, rhGAA는 제2 잠재적 N-글리코실화 부위에 평균적으로 rhGAA mol 당 약 0.4 내지 약 0.6 mol의 모노-M6P를 포함한다. 적어도 하나의 실시양태에서, rhGAA는 도 6a에 도시된 바와 같은 제2 잠재적 N-글리코실화 부위 점유율 및 도 6c에 도시된 바와 같은 N-글리코실화 프로파일을 포함한다. 적어도 하나의 실시양태에서, rhGAA는 도 32a에 도시된 바와 같은 제2 잠재적 N-글리코실화 부위 점유율 및 도 32c 또는 도 33b에 도시된 바와 같은 N-글리코실화 프로파일을 포함한다.

[0099] 하나 이상의 실시양태에서, rhGAA의 적어도 5%가 제3 잠재적 N-글리코실화 부위 (예를 들어, 서열식별번호: 5의 경우 N334 및 서열식별번호: 1의 경우 N390)에서 인산화된다. 다른 실시양태에서, rhGAA의 5%, 10%, 15%, 20%, 또는 25% 미만이 제3 잠재적 N-글리코실화 부위에서 인산화된다. 예를 들어, 제3 잠재적 N-글리코실화 부위는 주요 종으로서 비-인산화 고-만노스 N-글리칸, 디-, 트리- 및 테트라-안테나 복합 N-글리칸, 및 하이브리드 N-글리칸의 혼합물이 있을 수 있다. 일부 실시양태에서, rhGAA의 적어도 3%, 5%, 8%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 또는 50%가 제3 잠재적 N-글리코실화 부위에서 시알릴화된다. 일부 실시양태에서, rhGAA는 제3 잠재적 N-글리코실화 부위에 평균적으로 rhGAA mol 당 약 0.9 내지 약 1.2 mol의 시알산을 포함한다. 적어도 하나의 실시양태에서, rhGAA는 도 6a에 도시된 바와 같은 제3 잠재적 N-글리코실화 부위 점유율 및 도 6d에 도시된 바와 같은 N-글리코실화 프로파일을 포함한다. 적어도 하나의 실시양태에서, rhGAA는 도 32a에 도시된 바와 같은 제3 잠재적 N-글리코실화 부위 점유율 및 도 32d 또는 도 33b에 도시된 바와 같은 N-글리코실화 프로파일을 포함한다.

[0100] 일부 실시양태에서, rhGAA의 적어도 20%가 제4 잠재적 N-글리코실화 부위 (예를 들어, 서열식별번호: 5의 경우 N414 및 서열식별번호: 1의 경우 N470)에서 인산화된다. 예를 들어, rhGAA의 적어도 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 또는 95%가 제4 잠재적 N-글리코실화 부위에서 인산화될 수 있다. 이러한 인산화는 모노-M6P 및/또는 비스-M6P 단위의 결과일 수 있다. 일부 실시양태에서, rhGAA의 적어도 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 또는 95%가 제4 잠재적 N-글리코실화 부위에 모노-M6P 단위를 보유한다. 일부 실시양태에서, rhGAA의 적어도 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 또는 95%가 제4 잠재적 N-글리코실화 부위에 비스-M6P 단위를 보유한다. 일부 실시양태에서, rhGAA의 적어도 3%, 5%, 8%, 10%, 15%, 20%, 또는 25%가 제4 잠재적 N-글리코실화 부위에서 시알릴화된다. 일부 실시양태에서, rhGAA는 제4 잠재적 N-글리코실화 부위에 평균적으로 rhGAA mol 당 약 1.4 mol의 M6P (모노-M6P 및 비스-M6P)를 포함한다. 일부 실시양태에서, rhGAA는 제4 잠재적 N-글리코실화 부위에 평균적으로 rhGAA mol 당 약 0.4 내지 약 0.6 mol의 비스-M6P를 포함한다. 일부 실시양태에서, rhGAA는 제4 잠재적 N-글리코실화 부위에 평균적으로 rhGAA mol 당 약 0.3 내지 약 0.4 mol의 모노-M6P를 포함한다. 적어도 하나의 실시양태에서, rhGAA는 도 6a에 도시된 바와 같은 제4 잠재적 N-글리코실화 부위 점유율 및 도 6e에 도시된 바와 같은 N-글리코실화 프로파일을 포함한다. 적어도 하나의 실시양태에서, rhGAA는 도 32a에 도시된 바와 같은 제4 잠재적 N-글리코실화 부위 점유율 및 도 32e 또는 도 33b에 도시된 바와 같은 N-글리코실화 프로파일을 포함한다.

[0101] 일부 실시양태에서, rhGAA의 적어도 5%가 제5 잠재적 N-글리코실화 부위 (예를 들어, 서열식별번호: 5의 경우 N596 및 서열식별번호: 1의 경우 N692)에서 인산화된다. 다른 실시양태에서, rhGAA의 5%, 10%, 15%, 20%, 또는 25% 미만이 제5 잠재적 N-글리코실화 부위에서 인산화된다. 예를 들어, 제5 잠재적 N-글리코실화 부위는 주요 종으로서 푸코실화 디-안테나 복합 N-글리칸이 있을 수 있다. 일부 실시양태에서, rhGAA의 적어도 3%, 5%, 8%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 또는 95%가 제5 잠재적 N-글리코실화 부위에서 시알릴화된다. 일부 실시양태에서, rhGAA는 제5 잠재적 N-글리코실화 부위에 평균적으로 rhGAA mol 당 약 0.8 내지 약 0.9 mol의 시알산을 포함한다. 적어도 하나의 실시양태에서, rhGAA는 도 6a에 도시된 바와 같은 제5 잠재적 N-글리코실화 부위 점유율 및 도 6f에 도시된 바와 같은 N-글리코실화 프로파일을 포함한다. 적어도 하나의 실시양태에서, rhGAA는 도 32a에 도시된 바와 같은 제5 잠재적 N-글리코실화 부위 점유율 및 도 32f 또는 도 33b에 도시된 바와 같은 N-글리코실화 프로파일을 포함한다.

[0102] 일부 실시양태에서, rhGAA의 적어도 5%가 제6 N-글리코실화 부위 (예를 들어, 서열식별번호: 5의 경우 N826 및 서열식별번호: 1의 경우 N882)에서 인산화된다. 다른 실시양태에서, rhGAA의 5%, 10%, 15%, 20% 또는 25% 미만이 제6 N-글리코실화 부위에서 인산화된다. 예를 들어, 제6 N-글리코실화 부위는 주요 종으로서 디-, 트리- 및 테트라-안테나 복합 N-글리칸의 혼합물이 있을 수 있다. 일부 실시양태에서, rhGAA의 적어도 3%, 5%, 8%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% 또는 95%가 제6 N-글리코실화 부위에서 시알릴화된다. 일부 실시양태에서, rhGAA는 제6 잠재적 N-글리코실화 부위에 평균적으로 rhGAA mol 당 약 1.5 내지 약 4.2 mol의 시알산을 포함한다. 일부 실시양태에서, rhGAA는 제6 잠재적 N-글리코실화 부위에 평균적으로 rhGAA mol 당 약 0.9 mol의 아세틸화 시알산을 포함한다. 적어도 하나의 실시양태에서, rhGAA는 도 6a에 도시된 바와 같은 제6 잠재적 N-글리코실화 부위 점유율 및 도 6g에 도시된 바와 같은 N-글리코실화 프로파일을 포함한다. 적어도 하나의 실시양태에서, rhGAA는 도 32a에 도시된 바와 같은 제6 잠재적 N-글리코실화 부위 점유율 및 도 32g 또는 도 33b에 도시된 바와 같은 N-글리코실화 프로파일을 포함한다.

[0103] 일부 실시양태에서, rhGAA의 적어도 5%가 제7 잠재적 N-글리코실화 부위 (예를 들어, 서열식별번호: 5의 경우 N869 및 서열식별번호: 1의 경우 N925)에서 인산화된다. 다른 실시양태에서, rhGAA의 5%, 10%, 15%, 20%, 또는 25% 미만이 제7 잠재적 N-글리코실화 부위에서 인산화된다. 일부 실시양태에서, rhGAA의 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 또는 65% 미만이 제7 잠재적 N-글리코실화 부위에 임의의 N-글리칸이 있다. 일부 실시양태에서, rhGAA의 적어도 30%, 35%, 또는 40%가 제7 잠재적 N-글리코실화 부위에 N-글리칸이 있다. 일부 실시양태에서, rhGAA는 제7 잠재적 N-글리코실화 부위에 평균적으로 rhGAA mol 당 약 0.86 mol의 시알산을 포함한다. 적어도 하나의 실시양태에서, 제7 잠재적 N-글리코실화 부위에서 확인된 모든 N-글리칸은 복합 N-글리칸이다. 적어도 하나의 실시양태에서, rhGAA는 도 6a에 도시된 바와 같은 또는 도 32a에 도시된 바와 같은 제7 잠재적 N-글리코실화 부위 점유율 및 도 32h 또는 도 33b에 도시된 바와 같은 N-글리코실화 프로파일을 포함한다.

[0104] 일부 실시양태에서, rhGAA는 평균적으로 rhGAA 분자 당 3-4개의 M6P 잔기 및 rhGAA mol 당 약 4 내지 약 7.3 mol의 시알산을 포함한다. 일부 실시양태에서, rhGAA는 평균적으로 제1 잠재적 N-글리코실화 부위에 rhGAA mol 당 적어도 약 0.5 mol의 비스-M6P, 제2 잠재적 N-글리코실화 부위에 rhGAA mol 당 약 0.4 내지 약 0.6 mol의 모노-M6P, 제3 잠재적 N-글리코실화 부위에 rhGAA mol 당 약 0.9 내지 약 1.2 mol의 시알산, 제4 잠재적 N-글리코실화 부위에 rhGAA mol 당 약 0.4 내지 약 0.6 mol의 비스-M6P, 제4 잠재적 N-글리코실화 부위에 rhGAA mol 당 약 0.3 내지 약 0.4 mol의 모노-M6P, 제5 잠재적 N-글리코실화 부위에 rhGAA mol 당 약 0.8 내지 약 0.9 mol의 시알산, 및 제6 잠재적 N-글리코실화 부위에 rhGAA mol 당 약 1.5 내지 약 4.2 mol의 시알산을 추가로 포함한다. 적어도 하나의 실시양태에서, rhGAA는 평균적으로 제7 잠재적 N-글리코실화 부위에 rhGAA mol 당 약 0.86 mol의 시알산을 추가로 포함한다. 적어도 하나의 실시양태에서, rhGAA는 도 6a-6h에 도시된 바와 같은 점유율 및 N-글리코실화 프로파일의 7개의 잠재적 N-글리코실화 부위를 포함한다. 적어도 하나의 실시양태에서, rhGAA는 도 32a-32h 및 도 33a-33b에 도시된 바와 같은 점유율 및 N-글리코실화 프로파일의 7개의 잠재적 N-글리코실화 부위를 포함한다.

[0105] rhGAA의 제조 방법이 2014년 9월 30일에 출원된 미국 특허 가출원 번호 62/057,842에 개시되어 있고, 이의 전체 내용은 본원에 참조로 포함된다.

[0106] 일단 라이소솜 내부에 들어가면, rhGAA는 축적된 글리코겐을 효소적으로 분해할 수 있다. 그러나, 통상적인 rhGAA 제품은 모노-M6P- 및 비스-M6P 보유 N-글리칸의 총 수준이 낮고, 따라서, 근육 세포를 불량하게 표적화하여, rhGAA를 라이소솜으로 열악하게 전달하는 것을 초래한다. 이러한 통상적인 제품 내의 대부분의 rhGAA 분자는 인산화된 N-글리칸이 없고, 이에 의해 CIMPR에 대한 친화력이 결여된다. 비-인산화 고-만노스 N-글리칸은 또한 만노스 수용체에 의해 클리어런스될 수 있고, 이는 ERT의 비-생산적 클리어런스를 초래한다 (도 2b). 대조적으로, 도 2a에 나타난 바와 같이, 본원에 기술된 rhGAA는 더 높은 양의 모노-M6P- 및 비스-M6P 보유 N-글리칸을 함유할 수 있어, 특정 조직 예컨대 근육 내로의 rhGAA의 생산적 흡수에 이른다.

[0107] **IV. N-연결 글리코실화 rhGAA의 생산 및 정제**

[0108] 전문이 본원에 참조로 포함된 국제 출원 PCT/US2015/053252에 기술된 바와 같이, 차이니즈 햄스터 난소 (CHO) 세포와 같은 세포가 본원에 기술된 rhGAA를 생산하는데 사용될 수 있다. CHO 세포에서 고-M6P rhGAA를 발현시키는 것이 적어도 부분적으로 번역 후에 rhGAA의 글리칸 프로파일을 변형시키는 것에 비해 유리한데, 전자만 글리칸 분해에 의해 글리코겐 가수분해가 최적인 rhGAA 형태로 전환되어 치료 효능을 강화할 수 있기 때문이다.

[0109] 일부 실시양태에서, 바람직하게는 rhGAA는 본원에 기술된 rhGAA를 코딩하는 DNA 구축물로 형질전환된 하나 이상의 CHO 세포주에 의해 생산된다. 이같은 CHO 세포주는 유전자의 다수의 카피, 예컨대 GAA를 코딩하는 폴리뉴클레오티드의 5, 10, 15, 또는 20개 이상의 카피를 함유할 수 있다. 산 α-글루코시다제의 대립유전자 변이체 또는 다른 변이체 산 α-글루코시다제 아미노산 서열 예컨대 서열식별번호: 1 또는 서열식별번호: 5에 적어도 90%, 95%, 98%, 또는 99% 동일한 것을 발현하는 DNA 구축물이 구축되어 CHO 세포에서 발현될 수 있다. 관련 분야의 기술자는 이같은 DNA 구축물의 생산을 위해 CHO 세포를 형질전환시키는데 적절한 대안적인 벡터를 선택할 수 있다.

[0110] 이같은 CHO 세포주를 제조하는 방법이 전문이 본원에 참조로 포함된 국제 출원 PCT/US2015/053252에 기술되어 있다. 간략하게, 이러한 방법은 CHO 세포를 GAA 또는 GAA 변이체를 코딩하는 DNA로 형질전환시키고, GAA를 코딩하는 DNA가 이의 염색체(들) 내로 안정적으로 통합되고 GAA를 안정적으로 발현하는 CHO 세포를 선택하고, 모노-M6P 또는 비스-M6P를 보유하는 N-글리칸이 높은 함량으로 있는 GAA를 발현하는 CHO 세포를 선택하고, 임의적으로, 시알산 함량이 높은 N-글리칸이 있고/있거나 비-인산화 고-만노스 함량이 낮은 N-글리칸이 있는 CHO 세포를 선택하는 것을 수반한다. CHO 세포주를 배양하고, CHO 세포의 배양물로부터 rhGAA 조성물을 회수하는 것에

의해, 선택된 CHO 세포주는 rhGAA 및 rhGAA 조성물을 생산하는데 사용될 수 있다. 일부 실시양태에서, 선택된 CHO 세포주로부터 생산된 rhGAA는 CIMPR을 표적화하는 모노-M6P 또는 비스-M6P를 보유하는 N-글리칸을 높은 함량으로 함유한다. 일부 실시양태에서, 본원에 기술된 바와 같이 생산된 rhGAA는 말단 갈락토스가 있는 복합 N-글리칸의 수준이 낮다. 일부 실시양태에서, 선택된 CHO 세포주는 GA-ATB200 또는 ATB200-X5-14로 지칭된다. 일부 실시양태에서, 선택된 CHO 세포주는 이같은 CHO 세포 배양물의 하위배양물 또는 유도체를 포함한다. 일부 실시양태에서, 선택된 CHO 세포주로부터 생산된 rhGAA는 ATB200으로 지칭된다.

[0111] 본원에 기술된 바와 같이 생산된 rhGAA는 국제 출원 PCT/US2017/024981 및 미국 가출원 번호 62/506,569 (양쪽 모두 전문이 본원에 참조로 포함됨)에 기술된 방법을 따름으로써 정제될 수 있다. CHO 세포주로부터 생산된 rhGAA의 생산, 포착 및 정제를 위한 예시적인 공정이 도 3에서 제시된다.

[0112] 간략하게, 생물반응기 (601)는 rhGAA를 발현하여 주위의 액체 배양 배지 내로 분비하는 세포, 예컨대 CHO 세포의 배양물을 함유한다. 생물반응기 (601)는 세포 배양을 위한 임의의 적합한 생물반응기, 예컨대 관류, 뱃치 또는 페드-뱃치 생물반응기일 수 있다. 세포가 rhGAA를 생산하기에 충분한 시간 후에 생물반응기로부터 배양 배지를 제거한다. 이같은 배지 제거는 관류 생물반응기의 경우 연속적일 수 있거나 또는 뱃치 또는 페드-뱃치 반응기의 경우 뱃치 방식일 수 있다. 여과 시스템 (603)에 의해 배지를 여과하여 세포를 제거할 수 있다. 여과 시스템 (603)은 교번 접선 유동 여과 (ATF) 시스템, 접선 유동 여과 (TFF) 시스템, 및/또는 원심분리 여과 시스템을 포함하는 임의의 적절한 여과 시스템일 수 있다. 다양한 실시양태에서, 여과 시스템은 세공 크기가 약 10 나노미터 내지 약 2 마이크로미터인 필터를 이용한다.

[0113] 여과 후, 여과액을 단백질 포착 시스템 (605) 상에 로딩한다. 단백질 포착 시스템 (605)는 하나 이상의 크로마토그래피 칼럼을 포함할 수 있다. 1개를 초과하는 크로마토그래피 칼럼이 사용되는 경우, 제1 칼럼이 로딩되면 다음 칼럼이 로딩을 시작할 수 있도록 칼럼들이 연속적으로 배치될 수 있다. 대안적으로, 칼럼이 전환되는 시간 동안 배지 제거 공정이 정지될 수 있다.

[0114] 다양한 실시양태에서, 단백질 포착 시스템 (605)은 rhGAA, 특히 M6P 함량이 높은 rhGAA의 직접적인 생성물 포착을 위해 하나 이상의 음이온 교환 (AEX) 칼럼을 포함한다. 단백질 포착 시스템 (605)에 의해 포착된 rhGAA는 칼럼 내의 pH 및/또는 염 함량을 변화시키는 것에 의해 칼럼(들)으로부터 용출된다. AEX 칼럼의 예시적인 조건이 표 2에서 제공된다.

[0115] <표 2>

[0116] AEX 칼럼의 예시적인 조건

절차	완충제	유속 (cm/h)	부피 (CV)	온도 (℃)
사용전 위생처리	0.1-10 M NaOH	≤ 25-2500	≥ 1-3 (≥ 10-120 분)	15 - 25
예비-평형화	20-2000 mM 포스페이트 완충제 (PB), pH 6.9-7.3	≤ 25-2500	≥ 1-5	15 - 25
평형화	4-400 mM PB, pH 6.9-7.3	≤ 25-2500	≥ 1-5	2 - 15
로딩	NA	≤ 10-1000	NA	2 - 15
세정1	4-400 mM PB, pH 6.9-7.3	≤ 25-2500	≥ 2-10	2 - 15
세정2	4-400 mM PB, pH 6.9-7.3	≤ 25-2500	≥ 2-10	15 - 25
용출	4-400 mM PB, 20-2000 mM NaCl, pH 6.1-6.5	≤ 25-2500	NA	15 - 25
스트리핑	4-400 mM PB, 0.1-10 M NaCl, pH 6.1-6.5	≤ 25-2500	≥ 1-5	15 - 25
사용후 위생처리	0.1-10 M NaOH	≤ 25-2500	≥ 1-3 (≥ 10-120 분)	15 - 25
보관	0.01-1.0 M NaOH	≤ 25-2500	≥ 1-5	15 - 25

[0117]

[0118] 용출된 rhGAA를 추가 정제 단계 및/또는 품질 보증 단계에 적용할 수 있다. 예를 들어, 용출된 rhGAA를 바이러스 사멸 단계 (607)에 적용할 수 있다. 이같은 바이러스 사멸 (607)은 저-pH 사멸, 세제 사멸, 또는 관련 분야에 공지된 기타 기술 중 하나 이상을 포함할 수 있다. 바이러스 사멸 단계 (607)로부터의 rhGAA를 제2 크로마

토그래피 시스템 (609)에 도입하여 rhGAA 생성물을 추가로 정제할 수 있다. 대안적으로, 단백질 포착 시스템 (605)으로부터의 용출된 rhGAA를 제2 크로마토그래피 시스템 (609)에 직접적으로 공급할 수 있다. 다양한 실시양태에서, 제2 크로마토그래피 시스템 (609)는 불순물의 추가 제거를 위한 하나 이상의 고정된 금속 친화력 크로마토그래피 (IMAC) 칼럼을 포함한다. IMAC 칼럼의 예시적인 조건이 하기 표 3에서 제공된다.

[0119] <표 3>

[0120] IMAC 칼럼의 예시적인 조건

절차	완충제	유속 (cm/h)	부피 (CV)
행구기	4-400 mM PB, pH 6.3-6.7	≤ 25-2500	≥ 1-5
사용전 위생처리	0.01-1.0 M NaOH	≤ 25-2500	≥ 1-3 (10 - 30 분)
평형화	4-400 mM PB, pH 6.5	≤ 25-2500	≥ 1-5
WFI 세정	주사용수 (WFI)	≤ 25-2500	≥ 1-3
킬레이팅	0.01-1.0 M 아세트산구리	≤ 25-2500	≥ 1-5
WFI 세정	WFI	≤ 25-2500	≥ 2-10
산성 완충제 세정	2-200 mM 아세트산나트륨, 0.05-5 M NaCl, pH 3.5-4.5	≤ 25-2500	≥ 2-10
평형화	4-400 mM PB, pH 6.3-6.7	≤ 25-2500	≥ 1-5
용출 완충제로의 블랭크 실행	4-400 mM PB, 15-1500 mM 글리신, pH 6.1-6.5	≤ 25-2500	≥ 2-20
평형화	4-400 mM PB, pH 6.3-6.7	≤ 25-2500	≥ 1-5
로딩	NA	≤ 25-2500	≥ 1-5
세정1	4-400 mM PB, pH 6.3-6.7	≤ 25-2500	≥ 2-10
세정2	4-400 mM PB, 0.1-10 M NaCl, 5-30% 프로필렌 글리콜, pH 6.3-6.7	≤ 25-2500	≥ 2-10
세정3	4-400 mM PB, pH 6.3-6.7	≤ 25-2500	≥ 2-10
용출	4-400 mM PB, 15-1500 mM 글리신, pH 6.1-6.5	≤ 25-2500	NA
스트리핑	4-400 mM PB, 50-5000 mM 이미다졸, pH 6.3-6.7	≤ 25-2500	≥ 1-5
사용후 위생처리	0.01-1M NaOH	≤ 25-2500	≥ 1-3 (10 - 30 분)
행구기	4-400 mM PB, pH 6.3-6.7	≤ 25-2500	≥ 1-5
저장	5-30% 에탄올	≤ 25-2500	≥ 1-5

[0121]

[0122] rhGAA가 제2 크로마토그래피 시스템 (609)에 로딩된 후, 재조합 단백질이 칼럼(들)으로부터 용출된다. 용출된 rhGAA를 바이러스 사멸 단계 (611)에 적용할 수 있다. 바이러스 사멸 (607)과 같이, 바이러스 사멸 (611)은 저-pH 사멸, 세제 사멸, 또는 관련 분야에 공지된 기타 기술 중 하나 이상을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 바이러스 사멸 (607 또는 611) 중 오직 하나만 사용되거나, 또는 바이러스 사멸이 정제 공정에서 동일한 단계에 수행된다.

[0123] 바이러스 사멸 단계 (611)로부터의 rhGAA를 제3 크로마토그래피 시스템 (613)에 적용하여 재조합 단백질 생성물을 추가로 정제할 수 있다. 대안적으로, 제2 크로마토그래피 시스템 (609)으로부터의 용출된 재조합 단백질을 제3 크로마토그래피 시스템 (613)에 직접적으로 공급할 수 있다. 다양한 실시양태에서, 제3 크로마토그래피 시스템 (613)은 불순물의 추가 제거를 위한 하나 이상의 양이온 교환 크로마토그래피 (CEX) 칼럼 및/또는 크기 배제 크로마토그래피 (SEC) 칼럼을 포함한다. 그 후, rhGAA 생성물이 제3 크로마토그래피 시스템 (613)으로부터 용출된다. CEX 칼럼의 예시적인 조건이 하기 표 4에서 제공된다.

[0124] <표 4>

[0125] CEX 칼럼의 예시적인 조건

절차	완충제	유속 (cm/h)	부피 (CV)
사용전 위생처리	0.1-10 M NaOH	≤ 25-2500	≥ 1-3 (≥ 10-120 분)
평형화	2-200 mM 시트르산나트륨, pH 4.0-5.0	≤ 30-3000	≥ 2-10
로딩	NA	≤ 30-3000	NA
세정	2-200 mM 시트르산나트륨, pH 4.0-5.0	≤ 30-3000	≥ 2-10
용출	2-200 mM 시트르산나트륨, 15-1500 mM NaCl, pH 4.0-5.0	≤ 30-3000	≥ 2-10
스트리핑	2-200 mM 시트르산나트륨, 0.1-10 M NaCl, pH 4.0-5.0	≤ 30-3000	≥ 1-5
사용후 위생처리	0.1-10 M NaOH	≤ 25-2500	≥ 1-3 (≥ 10-120 분)
보관	0.01-1.0 M NaOH	≤ 30-3000	≥ 1-5

[0126]

[0127] rhGAA 생성물을 추가 프로세싱에 적용할 수도 있다. 예를 들어, 또 다른 여과 시스템 (615)을 사용하여 바이러스를 제거할 수 있다. 일부 실시양태에서, 이같은 여과는 세공 크기가 5 내지 50 ㎛인 필터를 이용할 수 있다. 기타 생성물 프로세싱은 재조합 단백질 생성물이 멸균되고/되거나, 여과되고/되거나, 농축되고/되거나, 저장되고/되거나, 최종 생성물 제형을 위해 추가적인 성분이 부가되는 생성물 조정 단계 (617)를 포함할 수 있다.

[0128] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "ATB200"은 GA-ATB200 세포주로부터 생산되고 본원에 기술된 방법을 사용하여 정제된, 모노-M6P 및 비스-M6P를 보유하는 N-글리칸의 함량이 높은 rhGAA를 지칭한다.

[0129] **V. 제약 조성물**

[0130] 다양한 실시양태에서, 본원에 기술된 rhGAA를 단독으로 또는 다른 치료제 및/또는 제약상 허용되는 담체와 조합하여 포함하는 제약 조성물이 제공된다.

[0131] 하나 이상의 실시양태에서, 본원에 기술된 제약 조성물은 제약상 허용되는 염을 포함한다.

[0132] 일부 실시양태에서, 본원에서 사용된 제약상 허용되는 염은 제약상 허용되는 산 부가 염을 포함한다. 제약상 허용되는 산 부가 염은 염산, 브롬화수소산, 황산, 술팜산, 질산, 인산 등, 및 아세트산, 트리플루오로아세트산, 아디프산, 아스코르브산, 아스파르트산, 벤젠술폰산, 벤조산, 부티르산, 캄포르산, 캄포술폰산, 신남산, 시트르산, 디글루콘산, 에탄술폰산, 글루탐산, 글리콜산, 글리세로인산, 헤미술프산, 헥산산, 포름산, 푸마르산, 2-히드록시에탄술폰산(이세티온산), 젖산, 히드록시말레산, 말산, 말론산, 만델산, 메시틸렌술폰산, 메탄술폰산, 나프탈렌술폰산, 니코틴산, 2-나프탈렌술폰산, 옥살산, 파모산, 펙틴산, 페닐아세트산, 3-페닐프로피온산, 피발산, 프로피온산, 피루브산, 살리실산, 스테아르산, 숙신산, 술파닐산, 타르타르산, p-톨루엔술폰산, 운데칸산 등을 포함하지만 이에 제한되지 않는 유기산을 포함할 수 있지만, 이에 제한되지 않는다.

[0133] 일부 실시양태에서, 본원에서 사용되는 제약상 허용되는 염은 제약상 허용되는 염기 부가 염이다. 제약상 허용되는 염기 부가 염은 암모니아, 또는 나트륨, 칼륨, 리튬, 칼슘, 마그네슘, 철, 아연, 구리, 망간, 알루미늄 등과 같은 금속 양이온 또는 암모늄의 수산화물, 탄산염 또는 중탄산염을 폼할 수 있지만, 이에 제한되지 않는다. 제약상 허용되는 비독성 유기 염기로부터 유래되는 염은 1차, 2차 및 3차 아민, 4차 아민 화합물, 천연 발생 치환 아민, 고리형 아민 및 염기성 이온-교환 수지를 포함하는 치환 아민, 예컨대 메틸아민, 디메틸아민, 트리메틸아민, 에틸아민, 디에틸아민, 트리에틸아민, 이소프로필아민, 트리프로필아민, 트리부틸아민, 에탄올아민, 디에탄올아민, 2-디메틸아미노에탄올, 2-디에틸아미노에탄올, 디시클로헥실아민, 리신, 아르기닌, 히스티딘, 카페인, 히드라바민, 콜린, 베타인, 에틸렌디아민, 글루코사민, 메틸글루카마인, 테오브로민, 퓨린, 피페라진, 피페리딘, N-에틸피페리딘, 테트라메틸암모늄 화합물, 테트라에틸암모늄 화합물, 피리딘, N,N-디메틸아닐린, N-메틸피페리딘, N-메틸모르폴린, 디시클로헥실아민, 디벤질아민, N,N-디벤질펜에틸아민, 1-에펜아민, N,N'-디벤질에틸렌디아민, 폴리아민 수지 등의 염을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.

[0134] 일부 실시양태에서, rhGAA 또는 이의 제약상 허용되는 염은 정맥내 투여용으로 적합한 제약 조성물로 제형화된다. 일부 실시양태에서, 제약 조성물은 멸균 등장성 수성 완충제 내의 용액이다. 필요한 경우, 조성물은 주사 부위에서의 통증을 완화하기 위한 국소 마취제 및 가용화제를 또한 포함할 수 있다. 제약 조성물의 성분들은

따로따로 공급될 수 있거나, 또는 단위 투여량 형태로, 예를 들어, 활성 작용제의 양을 지시하는 앰플 또는 사세와 같은 밀폐된 밀봉 용기 내의 건식 동결건조 분말 또는 무수 농축물로서 함께 혼합될 수 있다. 조성물이 주입에 의해 투여되어야 하는 경우, 이는 멸균 제약 등급 물, 염수 또는 덱스트로스/물을 함유하는 주입 병으로 분배될 수 있다. 일부 실시양태에서, 주입은 병원 또는 진료소에서 일어날 수 있다. 일부 실시양태에서, 주입은 병원 또는 진료소 환경 외부에서, 예를 들어, 대상체의 거주지에서 일어날 수 있다. 조성물이 주사에 의해 투여되는 경우, 성분들이 투여 전에 혼합될 수 있도록 주사용 멸균수 또는 염수의 앰플이 제공될 수 있다.

[0135] 일부 실시양태에서, rhGAA 또는 이의 제약상 허용되는 염은 경구 투여용으로 제형화될 수 있다. 경구 투여될 수 있는 조성물은 즉각-, 지연-, 변형-, 지속-, 펄스- 또는 제어-방출 용도를 위해, 임의적으로 착향 및 착색제와 함께, 정제, 캡슐, 오블, 엘릭서, 용액 또는 현탁액, 겔, 시럽, 구강 세정제, 또는 사용 전에 물 또는 다른 적절한 비히클로 재구성시키기 위한 건식 분말의 형태로 제형화될 수 있다. 고체 조성물 예컨대 정제, 캡슐, 로젠지, 향정, 알약, 볼루스, 분말, 페이스트, 과립, 불릿, 당의정 또는 프리믹스 제제 또한 사용될 수 있다. 경구 용도의 고체 및 액체 조성물은 관련 분야에 널리 공지되어 있는 방법에 따라 제조될 수 있다. 이같은 조성물은 고체 또는 액체 형태일 수 있는 하나 이상의 제약상 허용되는 담체 및 부형제를 또한 함유할 수 있다. 정제 또는 캡슐은 결합제, 충전제, 윤활제, 붕해제, 또는 습윤화제를 포함하지만 이에 제한되지 않는 제약상 허용되는 부형제와 함께 통상적인 수단에 의해 제조될 수 있다. 적절한 제약상 허용되는 부형제가 관련 분야에 공지되어 있고, 예비젤라틴화 전분, 폴리비닐피롤리돈, 포비돈, 히드록시프로필 메틸셀룰로스(HPMC), 히드록시프로필 에틸셀룰로스(HPEC), 히드록시프로필 셀룰로스(HPC), 수크로스, 젤라틴, 아카시아, 락토스, 미세결정질 셀룰로스, 인산수소칼슘, 스테아르산마그네슘, 스테아르산, 글리세릴 베헤네이트, 탈크, 실리카, 옥수수, 감자 또는 타피오카 전분, 전분 글리콜산나트륨, 라우릴황산나트륨, 시트르산나트륨, 탄산칼슘, 이염기성 인산칼슘, 글리신 크로스카르멜로스 소듐, 및 복합 실리케이트를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 정제는 관련 분야에 널리 공지되어 있는 방법에 의해 코팅될 수 있다.

[0136] 일부 실시양태에서, 본원에 기술된 제약 조성물은 국제 출원 PCT/US2017/024982 및 미국 가출원 번호 62/506,574 (양쪽 모두 전문이 본원에 참조로 포함됨)에 따라 제형화될 수 있다. 예를 들어, 일부 실시양태에서, 본원에 기술된 제약 조성물의 pH는 약 5.0 내지 약 7.0 또는 약 5.0 내지 약 6.0이다. 일부 실시양태에서, pH는 약 5.5 내지 약 6.0의 범위이다. 일부 실시양태에서, 제약 조성물의 pH는 6.0이다. 일부 실시양태에서, pH 조정제 (예를 들어, 알칼리화제 및 산성화제) 예컨대 수산화나트륨 및/또는 염산을 사용함으로써 pH를 표적 pH로 조정할 수 있다.

[0137] 본원에 기술된 제약 조성물은 완충제 시스템 예컨대 시트레이트 시스템, 포스페이트 시스템 및 이의 조합을 포함할 수 있다. 시트레이트 및/또는 포스페이트는 시트르산나트륨 또는 인산나트륨일 수 있다. 다른 염은 칼륨 및 암모늄 염을 포함한다. 하나 이상의 실시양태에서, 완충제는 시트레이트를 포함한다. 추가 실시양태에서, 완충제는 시트르산나트륨을 포함한다 (예를 들어, 시트르산나트륨 탈수화물 및 시트르산 1수화물의 혼합물). 하나 이상의 실시양태에서, 시트레이트를 포함하는 완충제 용액은 시트르산나트륨 및 시트르산을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 시트레이트 및 포스페이트 완충제 양쪽 모두가 존재한다.

[0138] 일부 실시양태에서, 본원에 기술된 제약 조성물은 적어도 하나의 부형제를 포함한다. 부형제는 강장제, 벌크화제, 및/또는 안정화제로서 기능할 수 있다. 강장제는 제형의 삼투압이 인간 혈액과 유사하거나 동일한 것을 확실하게 하도록 돕는 성분이다. 벌크화제는 제형 (예를 들어, 동결건조됨)에 질량을 부가하고 케이크에 적합한 구조를 제공하는 성분이다. 안정화제는 소수성 공기-물 계면 표면에서 응집체 형성을 방지 또는 최소화할 수 있는 화합물이다. 하나의 부형제가 강장제 및 벌크화제로서 동시에 기능할 수 있다. 예를 들어, 만니톨은 강장제로서 기능할 수 있고, 또한 벌크화제로서의 이익을 제공할 수 있다.

[0139] 강장제의 예는 염화나트륨, 만니톨, 수크로스 및 트레할로스를 포함한다. 일부 실시양태에서, 강장제는 만니톨을 포함한다. 일부 실시양태에서, 강장제(들)의 총량은 약 10 mg/mL 내지 약 50 mg/mL의 양의 범위이다. 추가 실시양태에서, 강장제(들)의 총량은 약 10, 11, 12, 13, 14, 또는 15 mg/mL 내지 약 16, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 또는 50 mg/mL의 양의 범위이다.

[0140] 일부 실시양태에서, 부형제는 안정화제를 포함한다. 일부 실시양태에서, 안정화제는 계면활성제이다. 일부 실시양태에서, 안정화제는 폴리소르베이트 80이다. 하나 이상의 실시양태에서, 안정화제의 총량은 약 0.1 mg/mL 내지 약 1.0 mg/mL의 범위이다. 추가 실시양태에서, 안정화제의 총량은 약 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 또는 0.5 mg/mL 내지 약 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 또는 1.0 mg/mL의 범위이다. 추가 실시양태에서, 안정화제의 총량은 약 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 또는 1.0 mg/mL이다.

[0141] 일부 실시양태에서, 제약 조성물은 (a) rhGAA (예컨대 ATB200), (b) 시트레이트, 포스페이트 및 이의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 하나의 완충제, 및 (c) 만니톨, 폴리소르베이트 80 및 이의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 하나의 부형제를 포함하고, pH가 (i) 약 5.0 내지 약 6.0, 또는 (ii) 약 5.0 내지 약 7.0이다. 일부 실시양태에서, 조성물은 물을 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 조성물은 산성화제 및/또는 알칼리화제를 추가로 포함할 수 있다.

[0142] 일부 실시양태에서, 제약 조성물은 (a) 약 5-50 mg/mL, 약 5-30 mg/mL, 또는 약 15 mg/mL의 농도의 rhGAA (예컨대 ATB200), (b) 약 10-100 mM 또는 약 25 mM의 농도의 시트르산나트륨 완충제, (c) 약 10-50 mg/mL, 또는 약 20 mg/mL의 농도의 만니톨, (d) 약 0.1-1 mg/mL, 약 0.2-0.5 mg/mL, 또는 약 0.5 mg/mL의 농도로 존재하는 폴리소르베이트 80, 및 (e) 물을 포함하고, pH가 약 6.0이다. 적어도 하나의 실시양태에서, 제약 조성물은 (a) 15 mg/mL rhGAA (예컨대 ATB200) (b) 25 mM 시트르산나트륨 완충제, (c) 20 mg/mL 만니톨 (d) 0.5 mg/mL 폴리소르베이트 80, 및 (e) 물을 포함하고, pH가 약 6.0이다. 일부 실시양태에서, 조성물은 산성화제 및/또는 알칼리화제를 추가로 포함할 수 있다.

[0143] 일부 실시양태에서, rhGAA를 포함하는 제약 조성물은 이를 필요로 하는 대상체에게 투여하기 전에 희석된다.

[0144] 일부 실시양태에서, 본원에 기술된 제약 조성물은 샤페론을 포함한다. 일부 실시양태에서, 샤페론은 미글루스타트 또는 이의 제약상 허용되는 염이다. 또 다른 실시양태에서, 샤페론은 두보글루스타트 또는 이의 제약상 허용되는 염이다.

[0145] 일부 실시양태에서, 본원에 기술된 rhGAA가 하나의 제약 조성물로 제형화되는 한편, 샤페론 예컨대 미글루스타트가 또 다른 제약 조성물로 제형화된다. 일부 실시양태에서, 미글루스타트를 포함하는 제약 조성물은 자베스카® (악텔리온 파마슈티컬즈(Actelion Pharmaceuticals))로 시판되는 제형을 기초로 한다.

[0146] 일부 실시양태에서, 케이크 또는 분말을 제공하도록 본원에 기술된 제약 조성물에 동결건조 (냉동-건조) 공정이 진행될 수 있다. 따라서, 본 발명의 또 다른 측면은 동결건조 후의 제약 조성물에 관한 것이다. 동결건조 혼합물은 본원에 기술된 rhGAA (예를 들어, ATB200), 시트레이트, 포스페이트 및 이의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 완충제, 및 트레할로스, 만니톨, 폴리소르베이트 80 및 이의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 하나의 부형제를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 다른 성분 (예를 들어, 다른 부형제)이 동결건조 혼합물에 첨가될 수 있다. 동결건조 제형을 포함하는 제약 조성물은 바이알로 제공될 수 있고, 그 후 이를 보관하고/하거나, 운송하고/하거나, 재구성하고/하거나, 환자에게 투여할 수 있다.

[0147] **VI. 치료 방법**

[0148] **A. 질환 치료**

[0149] 본 발명의 또 다른 측면은 본원에 기술된 rhGAA 또는 제약 조성물을 투여하는 것에 의한 글리코겐 저장 조절곤란에 관련된 질환 또는 장애의 치료 방법에 관한 것이다. 일부 실시양태에서, 질환은 폼페병 (일명 산 말타제 결핍 (AMD) 및 II형 글리코겐 저장 질환 (GSD II))이다. 일부 실시양태에서, rhGAA는 ATB200이다. 일부 실시양태에서, 제약 조성물은 ATB200을 포함한다.

[0150] 본원에 기술된 rhGAA 또는 제약 조성물은 적합한 경로에 의해 투여된다. 한 실시양태에서, rhGAA 또는 제약 조성물은 정맥내 투여된다. 다른 실시양태에서, rhGAA 또는 제약 조성물은 표적 조직, 예컨대 심장 또는 골격근 (예를 들어, 근육내), 또는 신경계 (예를 들어, 뇌 내로의 직접 주사; 뇌실내; 수막강내)로의 직접적인 투여에 의해 투여된다. 일부 실시양태에서, rhGAA 또는 제약 조성물은 경구 투여된다. 원한다면, 1가지를 초과하는 경로가 공동으로 사용될 수 있다.

[0151] 일부 실시양태에서, 본원에 기술된 rhGAA 또는 제약 조성물의 치료 효과를 하기 기준 중 하나 이상을 기초로 평가할 수 있다: (1) 심장 상태 (예를 들어, 확장 말기 및/또는 수축 말기 용적의 증가, 또는 GSD-II에서 전형적으로 발견되는 진행성 심근병증의 감소, 호전 또는 예방), (2) 폐 기능 (예를 들어, 기준선 폐활량에 비교하여 울음 폐활량의 증가, 및/또는 우는 동안의 산소 불포화도의 정상화, (3) 신경발달 및/또는 운동 능력 (예를 들어, AIMS 점수 증가), 및 (4) 질환에 걸린 개체의 조직 내의 글리코겐 수준의 감소.

[0152] 일부 실시양태에서, 비히클로 치료된 대상체의 것 또는 치료 전의 대상체의 것에 비교하여, 본원에 기술된 rhGAA 또는 제약 조성물의 1회 이상의 투여량의 투여 후에 대상체의 심장 상태가 10%, 20%, 30%, 40%, 또는 50% (또는 중간의 임의의 백분율)만큼 개선된다. 확장 말기 및/또는 수축 말기 용적을 측정함으로써 및/또는 심근병증을 임상적으로 평가함으로써 대상체의 심장 상태를 평가할 수 있다. 일부 실시양태에서, 비히클로 치료된

대상체의 것 또는 치료 전의 대상체의 것에 비교하여, ATB200 또는 ATB200을 포함하는 제약 조성물의 1회 이상의 투여량의 투여 후에 대상체의 폐 기능이 10%, 20%, 30%, 40%, 또는 50% (또는 중간의 임의의 백분율)만큼 개선된다. 특정 실시양태에서, 투여로부터 1주, 2주, 3주, 1개월, 2개월 또는 그 이상 (또는 중간의 임의의 기간) 후에 개선이 달성된다. 특정 실시양태에서, ATB200 또는 ATB200를 포함하는 제약 조성물은 투여로부터 1주, 2주, 3주, 1개월, 2개월 또는 그 이상 (또는 중간의 임의의 기간) 후에 대상체의 폐 기능을 개선한다.

[0153] 일부 실시양태에서, 비히클로 치료된 대상체의 것 또는 치료 전의 대상체의 것에 비교하여, 본원에 기술된 rhGAA 또는 제약 조성물의 1회 이상의 투여량의 투여 후에 대상체의 폐 기능이 10%, 20%, 30%, 40%, 또는 50% (또는 중간의 임의의 백분율)만큼 개선된다. 기준선 폐활량에 비교된 울음 폐활량, 및/또는 우는 동안의 산소 불포화도의 정상화에 의해 대상체의 폐 기능을 평가할 수 있다. 일부 실시양태에서, 비히클로 치료된 대상체의 것 또는 치료 전의 대상체의 것에 비교하여, ATB200 또는 ATB200을 포함하는 제약 조성물의 1회 이상의 투여량의 투여 후에 대상체의 폐 기능이 10%, 20%, 30%, 40%, 또는 50% (또는 중간의 임의의 백분율)만큼 개선된다. 특정 실시양태에서, 투여로부터 1주, 2주, 3주, 1개월, 2개월 또는 그 이상 (또는 중간의 임의의 기간) 후에 개선이 달성된다. 특정 실시양태에서, ATB200 또는 ATB200를 포함하는 제약 조성물은 투여로부터 1주, 2주, 3주, 1개월, 2개월 또는 그 이상 (또는 중간의 임의의 기간) 후에 대상체의 폐 기능을 개선한다.

[0154] 일부 실시양태에서, 비히클로 치료된 대상체의 것 또는 치료 전의 대상체의 것에 비교하여, 본원에 기술된 rhGAA 또는 제약 조성물의 1회 이상의 투여량의 투여 후에 대상체의 신경발달 및/또는 운동 능력이 10%, 20%, 30%, 40%, 또는 50% (또는 중간의 임의의 백분율)만큼 개선된다. AIMS 점수를 결정함으로써 대상체의 신경발달 및/또는 운동 능력을 평가할 수 있다. AIMS은 임상의가 관리 및 채점하는 12개 항목의 앵커링 척도(anchored scale)이다 (문헌 [Rush JA Jr., Handbook of Psychiatric Measures, American Psychiatric Association, 2000, 166-168]을 참조한다). 항목 1-10은 5점 앵커링 척도로 등급화된다. 항목 1-4는 구강안면 운동을 평가한다. 항목 5-7는 팔다리 및 몸통 운동이상을 다룬다. 항목 8-10은 검사자가 판단한 바와 같은 전반적인 중증도, 및 환자가 운동 및 이와 연관된 곤란을 자각하는 것을 다룬다. 항목 11-12는 치아 및/또는 의치의 문제 (이같은 문제는 운동이상을 잘못 진단하는 것으로 이어질 수 있다)에 관련된 예/아니오 질문이다. 일부 실시양태에서, 비히클로 치료된 대상체의 것 또는 치료 전의 대상체의 것에 비교하여, ATB200 또는 ATB200을 포함하는 제약 조성물의 1회 이상의 투여량의 투여 후에 대상체의 신경발달 및/또는 운동 능력이 10%, 20%, 30%, 40%, 또는 50% (또는 중간의 임의의 백분율)만큼 개선된다. 특정 실시양태에서, 투여로부터 1주, 2주, 3주, 1개월, 2개월 또는 그 이상 (또는 중간의 임의의 기간) 후에 개선이 달성된다. 특정 실시양태에서, ATB200 또는 ATB200를 포함하는 제약 조성물은 투여로부터 1주, 2주, 3주, 1개월, 2개월 또는 그 이상 (또는 중간의 임의의 기간) 후에 대상체의 신경발달 및/또는 운동 능력을 개선한다.

[0155] 일부 실시양태에서, 비히클로 치료된 대상체의 것 또는 치료 전의 대상체의 것에 비교하여, 본원에 기술된 rhGAA 또는 제약 조성물의 1회 이상의 투여량의 투여 후에 대상체의 특정 조직의 글리코겐 수준이 10%, 20%, 30%, 40%, 또는 50% (또는 중간의 임의의 백분율)만큼 감소된다. 일부 실시양태에서, 조직은 근육 예컨대 사두근, 삼두근, 및 비복근이다. 관련 분야에 공지된 방법을 사용하여 조직의 글리코겐 수준을 분석할 수 있다. 글리코겐 수준의 결정은 아밀로글루코시다제 소화를 기초로 널리 공지되어 있고, 문헌 [Amalfitano et al. (1999), "Systemic correction of the muscle disorder glycogen storage disease type ii after hepatic targeting of a modified adenovirus vector encoding human acid-alphaglucosidase", Proc Natl Acad Sci USA, 96:8861-8866]과 같은 간행물에 기술되어 있다. 일부 실시양태에서, 비히클로 치료된 대상체의 것 또는 치료 전의 대상체의 것에 비교하여, ATB200 또는 ATB200을 포함하는 제약 조성물의 1회 이상의 투여량의 투여 후에 대상체의 근육 내의 글리코겐 수준이 10%, 20%, 30%, 40%, 또는 50% (또는 중간의 임의의 백분율)만큼 감소된다. 특정 실시양태에서, 투여로부터 1주, 2주, 3주, 1개월, 2개월 또는 그 이상 (또는 중간의 임의의 기간) 후에 감소가 달성된다. 특정 실시양태에서, ATB200 또는 ATB200를 포함하는 제약 조성물은 투여로부터 1주, 2주, 3주, 1개월, 2개월 또는 그 이상 (또는 중간의 임의의 기간) 후에 대상체의 근육 내의 글리코겐 수준을 감소시킨다.

[0156] **B. 바이오마커**

[0157] 대상체의 근육 섬유 내의 글리코겐 축적의 바이오마커, 예컨대 소변 육탄당 사당류 (Hex4)를 사용하여, 폼페병에 걸린 대상체에서 효소 대체 요법의 치료 효과를 평가 및 비교할 수 있다. 일부 실시양태에서, 대상체 내의 Hex4의 수준을 측정함으로써 글리코겐 축적에 대한 rhGAA 또는 rhGAA를 포함하는 제약 조성물의 치료 효과가 평가된다.

[0158] 근육 상해 또는 손상의 바이오마커 예컨대 크레아틴 키나제 (CK), 알라닌 아미노트랜스퍼라제 (ALT), 및 아스파르테이트 아미노트랜스퍼라제 (AST)를 사용하여, 폼페병에 걸린 대상체에서 효소 대체 요법의 치료 효과를 평가 및 비교할 수 있다. 일부 실시양태에서, 대상체에서 CK, ALT, 및/또는 AST의 수준을 측정함으로써 근육 손상에 대한 rhGAA 또는 rhGAA를 포함하는 제약 조성물의 치료 효과가 평가된다. 적어도 하나의 실시양태에서, 대상체에서 CK의 수준을 측정함으로써 근육 손상에 대한 rhGAA 또는 rhGAA를 포함하는 제약 조성물의 치료 효과가 평가된다.

[0159] LAMP-1, LC3, 및 디스펄린과 같은 바이오마커를 또한 사용하여, 본원에 기술된 rhGAA 또는 제약 조성물의 치료 효과를 평가 및 비교할 수 있다. 폼페병에서, GAA가 라이소솜 글리코겐을 가수분해하지 못하는 것은 일부 조직에서 글리코겐으로 채워진 대형 라이소솜이 비정상적으로 축적되는 것에 이른다. (Raben et al., JBC 273: 19086-19092, 1998.) 폼페병의 마우스 모델에서의 연구는 골격근 내의 확대된 라이소솜이 기계적 수행의 감소를 적합하게 설명할 수 없다는 것과 분해된 근섬유를 함유하는 대형 봉입체의 존재 (즉, 자가포식 증강)가 근육 기능의 손상에 기여한다는 것을 나타냈다. (Raben et al., Human Mol Genet 17: 3897-3908, 2008.) 손상된 자가포식 플럭스가 폼페 환자에서의 불량한 치료 결과와 연관된다는 것이 보고서에서 또한 제안되었다. (Nascimbeni et al., Neuropathology and Applied Neurobiology doi: 10.1111/nan.12214, 2015; Fukuda et al., Mol Ther 14: 831-839, 2006.) 추가적으로, 다양한 중증도의 30가지를 초과하는 유전적으로 정의된 아유형이 있는 일군의 유전적으로 이질적인 신경근육 질환인 미분류 지대형 근육 디스트로피 (LGMD)에서 후기-발병 폼페병이 우세하다 (Preisler et al., Mol Genet Metab 110: 287-289, 2013). IHC 검사에서, *Gaa* KO 마우스의 골격근 섬유 내의 디스펄린의 실질적으로 상승된 근형질 존재가 밝혀졌다.

[0160] 다양한 공지된 방법을 사용하여 이같은 바이오마커의 유전자 발현 수준 및/또는 단백질 수준을 측정할 수 있다. 예를 들어, 본원에 기술된 rhGAA 또는 제약 조성물로 치료된 대상체로부터의 샘플, 예컨대 조직, 특히 근육의 생검체를 수득할 수 있다. 일부 실시양태에서, 샘플은 대상체 내의 근육의 생검체이다. 일부 실시양태에서, 근육은 사두근, 삼두근 및 비복근으로부터 선택된다. 대상체로부터 수득된 샘플을 이같은 바이오마커를 검출하는 하나 이상의 항체 또는 다른 검출제로 염색할 수 있거나, 또는 질량 분광법에 의해 확인 및 정량할 수 있다. 또한 또는 대안적으로, 예를 들어, RT-qPCR 방법을 통해, 바이오마커를 코딩하는 핵산, 예컨대 mRNA의 존재를 검출하기 위해 샘플을 프로세싱할 수 있다.

[0161] 일부 실시양태에서, 하나 이상의 바이오마커의 유전자 발현 수준 및/또는 단백질 수준이 본원에 기술된 rhGAA 또는 제약 조성물로의 치료 전 및 후에 개체로부터 수득된 근육 생검체에서 측정된다. 일부 실시양태에서, 하나 이상의 바이오마커의 유전자 발현 수준 및/또는 단백질 수준이 비히클로 치료된 개체로부터 수득된 근육 생검체에서 측정된다. 일부 실시양태에서, 비히클로 치료된 대상체의 것 또는 치료 전의 대상체의 것에 비교하여, 본원에 기술된 rhGAA 또는 제약 조성물의 1회 이상의 투여량의 투여 후에 하나 이상의 바이오마커의 유전자 발현 수준 및/또는 단백질 수준이 10%, 20%, 30%, 40%, 또는 50% (또는 중간의 임의의 백분율)만큼 감소된다. 일부 실시양태에서, 비히클로 치료된 대상체의 것 또는 치료 전의 대상체의 것에 비교하여, ATB200 또는 ATB200를 포함하는 제약 조성물의 1회 이상의 투여량의 투여 후에 하나 이상의 바이오마커의 유전자 발현 수준 및/또는 단백질 수준이 10%, 20%, 30%, 40%, 또는 50% (또는 중간의 임의의 백분율)만큼 감소된다. 특정 실시양태에서, 투여로부터 1주, 2주, 3주, 1개월, 2개월 또는 그 이상 (또는 중간의 임의의 기간) 후에 감소가 달성된다. 특정 실시양태에서, ATB200 또는 ATB200를 포함하는 제약 조성물은 투여로부터 1주, 2주, 3주, 1개월, 2개월 또는 그 이상 (또는 중간의 임의의 기간) 후에 하나 이상의 바이오마커의 유전자 발현 수준 및/또는 단백질 수준을 감소시킨다.

[0162] **C. rhGAA의 투여량**

[0163] 제약 제형 또는 재구성된 조성물이 치료적 유효량 (예를 들어, 규칙적인 간격으로 투여되었을 때, 예컨대 질환과 연관된 증상을 호전시킴으로써, 질환의 발병을 방지하거나 지연시킴으로써, 및/또는 질환의 증상의 중증도 또는 빈도를 감소시킴으로써, 질환을 치료하는데 충분한 투여량)으로 투여된다. 질환 치료에서 치료적으로 효과적인 양은 질환 효과의 성질 및 정도에 좌우될 수 있고, 표준 임상 기술에 의해 결정될 수 있다. 추가적으로, 시험관내 또는 생체내 검정법을 임의적으로 사용하여 최적의 투여량 범위를 확인하는 것을 도울 수 있다. 적어도 하나의 실시양태에서, 본원에 기술된 rhGAA 또는 이러한 rhGAA를 포함하는 제약 조성물은 약 1 mg/kg 내지 약 100 mg/kg, 예컨대 약 5 mg/kg 내지 약 30 mg/kg, typically 약 5 mg/kg 내지 약 20 mg/kg의 용량으로 투여된다. 적어도 하나의 실시양태에서, 본원에 기술된 rhGAA 또는 제약 조성물은 약 5 mg/kg, 약 10 mg/kg, 약 15 mg/kg, 약 20 mg/kg, 약 25 mg/kg, 약 30 mg/kg, 약 35 mg/kg, 약 40 mg/kg, 약 50 mg/kg, 약 50 mg/kg, 약 60 mg/kg, 약 70 mg/kg, 약 80 mg/kg, 약 90 mg/kg, 또는 약 100 mg/kg의 용량으로 투여된다.

일부 실시양태에서, rhGAA는 5 mg/kg, 10 mg/kg, 20 mg/kg, 50 mg/kg, 75 mg/kg, 또는 100 mg/kg의 용량으로 투여된다. 적어도 하나의 실시양태에서, rhGAA 또는 제약 조성물은 약 20 mg/kg의 용량으로 투여된다. 일부 실시양태에서, rhGAA 또는 제약 조성물은 약리적 샤페론과 공동으로 또는 순차적으로 투여된다. 일부 실시양태에서, 약리적 샤페론은 미글루스타트이다. 적어도 하나의 실시양태에서, 미글루스타트는 약 260 mg의 경구 용량으로서 투여된다. 개체의 요구에 따라, 특정 개체에 대한 유효 용량이 경시적으로 변할 수 있다 (예를 들어, 증가 또는 감소될 수 있다). 예를 들어, 신체 질병 또는 스트레스가 있는 시기에, 또는 항-산 α-글루코시다제 항체가 존재하게 되거나 증가되는 경우, 또는 질환 증상이 악화되는 경우, 양이 증가될 수 있다.

[0164] 일부 실시양태에서, 본원에 기술된 rhGAA 또는 제약 조성물의 치료적 유효 용량은 통상적인 rhGAA 제품의 것보다 더 낮다. 예를 들어, 통상적인 rhGAA 제품의 치료적 유효 용량이 20 mg/kg이면, 통상적인 rhGAA 제품과 동일하거나 또는 이보다 더 양호한 치료 효과를 일으키는데 요구되는 본원에 기술된 rhGAA 또는 제약 조성물의 용량은 20 mg/kg보다 낮을 수 있다. 상기 논의된 하나 이상의 기준 (예를 들어, 심장 상태, 글리코겐 수준, 또는 바이오마커 발현)을 기초로 치료 효과를 평가할 수 있다. 일부 실시양태에서, 본원에 기술된 rhGAA 또는 제약 조성물의 치료적 유효 용량은 통상적인 rhGAA 제품의 것보다 적어도 약 5%, 10%, 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 이상 더 낮다.

[0165] 일부 실시양태에서, 본원에 기술된 rhGAA 또는 제약 조성물의 치료 효과는 운동 기능 개선, 근력 (상체, 하체 또는 전신) 개선, 폐 기능 개선, 피로 감소, 적어도 하나의 근육 손상 바이오마커의 수준 감소, 적어도 하나의 글리코겐 축적 바이오마커의 수준 감소, 또는 이의 조합을 포함한다. 일부 실시양태에서, 본원에 기술된 rhGAA 또는 제약 조성물의 치료 효과는 근육 섬유 내의 라이소솜 병리의 역전, 근육 섬유 내의 글리코겐 함량의 더 신속하고/신속하거나 더 효과적인 감소, 6분 보행 검사 거리의 증가, 일어나 걸어가기 검사 시간의 감소, 4-계단 오르기 검사 시간의 감소, 10미터 보행 검사 시간의 감소, 보행-계단-가워스-의자 점수의 감소, 상지 힘의 증가, 어깨 내전의 개선, 어깨 외전의 개선, 팔꿈치 굽힘의 개선, 팔꿈치 폄의 개선, 상체 힘의 개선, 하체 힘의 개선, 전신 힘의 개선, 직립 (좌위) 강제 폐활량의 개선, 최대 호기압의 개선, 최대 흡기압의 개선, 피로 중증도 척도 점수의 감소, 소변 육탄당 사당류 수준의 감소, 크레아틴 키나제 수준의 감소, 알라닌 아미노트랜스퍼라제 수준의 감소, 아스파르테이트 아미노트랜스퍼라제 수준의 감소, 또는 이의 임의의 조합을 포함한다.

[0166] 일부 실시양태에서, 본원에 기술된 rhGAA 또는 제약 조성물은 동일한 용량으로 투여되었을 때 통상적인 rhGAA 제품보다 더 신속하게 원하는 치료 효과를 달성한다. 상기 논의된 하나 이상의 기준 (예를 들어, 심장 상태, 글리코겐 수준, 또는 바이오마커 발현)을 기초로 치료 효과를 평가할 수 있다. 예를 들어, 단일 용량의 통상적인 rhGAA 제품이 치료된 개체의 조직 내의 글리코겐 수준을 1주일에 10%만큼 감소시키면, 동일한 용량의 본원에 기술된 rhGAA 또는 제약 조성물이 투여되었을 때 1주일 미만 내에 동일한 정도의 감소가 달성될 수 있다. 일부 실시양태에서, 동일한 용량으로 투여되었을 때, 본원에 기술된 rhGAA 또는 제약 조성물은 통상적인 rhGAA 제품보다 적어도 약 1.25, 1.5, 1.75, 2.0, 3.0 이상 더 신속하게 원하는 치료 효과를 달성할 수 있다.

[0167] 일부 실시양태에서, 치료적 유효량의 rhGAA (또는 rhGAA를 포함하는 조성물 또는 약제)이 1회 초과 투여된다. 일부 실시양태에서, 본원에 기술된 rhGAA 또는 제약 조성물은 질환 효과의 성질 및 정도에 따라, 그리고 지속적으로 규칙적인 간격으로 투여된다. 본원에서 사용된 바와 같이, "규칙적인 간격"의 투여는 치료적 유효량이 (1회 용량과 구별되는 바와 같이) 주기적으로 투여된다는 것을 가리킨다. 간격은 표준 임상 기술에 의해 결정될 수 있다. 특정 실시양태에서, rhGAA는 격월, 매월, 격주, 매주, 주 2회, 또는 매일 투여된다. 일부 실시양태에서, rhGAA는 주 2회, 매주, 또는 격주로 정맥내 투여된다. 단일 개체에 대한 투여 간격은 고정된 간격일 필요는 없고, 개체의 요구에 따라 경시적으로 변할 수 있다. 예를 들어, 신체 질병 또는 스트레스가 있는 시기에, 또는 항-rhGAA 항체가 존재하게 되거나 증가되는 경우, 또는 질환 증상이 악화되는 경우, 용량 사이의 간격이 감소될 수 있다.

[0168] 일부 실시양태에서, 동일한 용량으로 사용되는 경우, 본원에 기술된 바와 같은 rhGAA 또는 제약 조성물은 통상적인 rhGAA 제품보다 덜 빈번하게 투여될 수 있지만, 통상적인 rhGAA 제품과 동일하거나 또는 이보다 더 양호한 치료 효과를 일으킬 수 있다. 예를 들어, 통상적인 rhGAA 제품이 매주 20 mg/kg으로 투여되면, 본원에 기술된 바와 같은 rhGAA 또는 제약 조성물은, rhGAA 또는 제약 조성물이 덜 빈번하게, 예를 들어, 격주 또는 매월 투여되더라도, 20 mg/kg으로 투여될 때 통상적인 rhGAA 제품과 동일하거나 또는 이보다 더 양호한 치료 효과를 일으킬 수 있다. 상기 논의된 하나 이상의 기준 (예를 들어, 심장 상태, 글리코겐 수준, 또는 바이오마커 발현)을 기초로 치료 효과를 평가할 수 있다. 일부 실시양태에서, 본원에 기술된 rhGAA 또는 제약 조성물의 2회 용량 사이의 간격은 통상적인 rhGAA 제품의 것보다 더 길다. 일부 실시양태에서, rhGAA 또는 제약 조성물의 2회 용

량 사이의 간격은 통상적인 rhGAA 제품의 것보다 적어도 약 1.25, 1.5, 1.75, 2.0, 3.0 이상 더 길다.

[0169] 일부 실시양태에서, 동일한 치료 조건 (예를 들어, 동일한 간격으로 투여된 동일한 용량) 하에, 본원에 기술된 rhGAA 또는 제약 조성물은 통상적인 rhGAA 제품이 제공하는 것보다 더 우수한 정도로 치료 효과를 제공한다. 상기 논의된 하나 이상의 기준 (예를 들어, 심장 상태, 글리코겐 수준, 또는 바이오마커 발현)을 기초로 치료 효과를 평가할 수 있다. 예를 들어, 매주 20 mg/kg으로 투여된 통상적인 rhGAA 제품에 비교했을 때, 매주 20 mg/kg으로 투여된 rhGAA 또는 제약 조성물은 치료된 개체의 조직 내의 글리코겐 수준을 더 높은 정도로 감소시킬 수 있다. 일부 실시양태에서, 동일한 치료 조건 하에 투여되었을 때, 본원에 기술된 rhGAA 또는 제약 조성물은 통상적인 rhGAA 제품의 것보다 적어도 약 1.25, 1.5, 1.75, 2.0, 3.0 이상 더 큰 치료 효과를 제공한다.

[0170] **D. 조합 요법**

[0171] 하나 이상의 실시양태에서, 본원에 기술된 rhGAA 또는 rhGAA를 포함하는 제약 조성물은 약리적 샤페론과 공동으로 또는 순차적으로 투여된다. 일부 실시양태에서, rhGAA 또는 제약 조성물은 약리적 샤페론에 비교하여 상이한 경로로 투여된다. 예를 들어, 약리적 샤페론은 경구 투여될 수 있는 한편, rhGAA 또는 제약 조성물은 정맥내 투여된다.

[0172] 다양한 실시양태에서, 약리적 샤페론은 미글루스타트이다. 일부 실시양태에서, 미글루스타트는 약 50 mg 내지 약 600 mg의 경구 용량으로 투여된다. 적어도 하나의 실시양태에서, 미글루스타트는 약 200 mg 내지 약 600 mg의 경구 용량, 또는 약 200 mg, 약 250 mg, 약 300 mg, 약 350 mg, 약 400 mg, 약 450 mg, 약 500 mg, 약 550 mg, 또는 약 600 mg의 경구 용량으로 투여된다. 적어도 하나의 실시양태에서, 미글루스타트는 약 233 mg 내지 약 500 mg의 경구 용량으로 투여된다. 적어도 하나의 실시양태에서, 미글루스타트는 약 250 내지 약 270 mg의 경구 용량, 또는 약 250 mg, 약 255 mg, 약 260 mg, 약 265 mg 또는 약 270 mg의 경구 용량으로 투여된다. 적어도 하나의 실시양태에서, 미글루스타트는 약 260 mg의 경구 용량으로 투여된다.

[0173] 관련 분야의 기술자는 성인 환자에게 환자의 체중에 따라 약 200 mg 내지 600 mg의 범위 또는 이에 따른 임의의 더 작은 범위의 미글루스타트의 경구 용량이 적절할 수 있다는 것을 이해할 것이다. 예를 들어, 영아, 아동, 또는 저체중 성인을 포함하지만 이에 제한되지 않는, 체중이 유의하게 약 70 kg 미만인 환자의 경우, 의사는 더 작은 용량을 적절한 것으로 간주할 수 있다. 따라서, 적어도 하나의 실시양태에서, 미글루스타트는 약 50 mg 내지 약 200 mg의 경구 용량, 또는 약 50 mg, 약 75 mg, 약 100 mg, 125 mg, 약 150 mg, 약 175 mg, 또는 약 200 mg의 경구 용량으로 투여된다. 적어도 하나의 실시양태에서, 미글루스타트는 약 65 mg 내지 약 195 mg의 경구 용량, 또는 약 65 mg, 약 130 mg, 또는 약 195 mg의 경구 용량으로 투여된다.

[0174] 일부 실시양태에서, rhGAA는 약 5 mg/kg 내지 약 20 mg/kg의 용량으로 정맥내 투여되고, 미글루스타트는 약 50 mg 내지 약 600 mg의 용량으로 경구 투여된다. 일부 실시양태에서, rhGAA는 약 5 mg/kg 내지 약 20 mg/kg의 용량으로 정맥내 투여되고, 미글루스타트는 약 50 mg 내지 약 200 mg의 용량으로 경구 투여된다. 일부 실시양태에서, rhGAA는 약 5 mg/kg 내지 약 20 mg/kg의 용량으로 정맥내 투여되고, 미글루스타트는 약 200 mg 내지 약 600 mg의 용량으로 경구 투여된다. 일부 실시양태에서, rhGAA는 약 5 mg/kg 내지 약 20 mg/kg의 용량으로 정맥내 투여되고, 미글루스타트는 약 233 mg 내지 약 500 mg의 용량으로 경구 투여된다. 한 실시양태에서, rhGAA는 약 20 mg/kg의 용량으로 정맥내 투여되고, 미글루스타트는 약 260 mg의 용량으로 경구 투여된다.

[0175] 일부 실시양태에서, 미글루스타트 및 rhGAA는 공동으로 투여된다. 예를 들어, 미글루스타트는 rhGAA의 투여 전 또는 후로부터 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 또는 1분 이내에 투여될 수 있다. 일부 실시양태에서, 미글루스타트는 rhGAA의 투여 전 또는 후로부터 5, 4, 3, 2, 또는 1분 이내에 투여된다.

[0176] 일부 실시양태에서, 미글루스타트 및 rhGAA는 순차적으로 투여된다. 적어도 하나의 실시양태에서, 미글루스타트는 rhGAA의 투여 전에 투여된다. 적어도 하나의 실시양태에서, 미글루스타트는 rhGAA의 투여로부터 3시간 미만 전에 투여된다. 적어도 하나의 실시양태에서, 미글루스타트는 rhGAA의 투여로부터 약 2시간 전에 투여된다. 예를 들어, 미글루스타트는 rhGAA의 투여로부터 약 1.5시간, 약 1시간, 약 50분, 약 30분, 또는 약 20분 전에 투여될 수 있다. 적어도 하나의 실시양태에서, 미글루스타트는 rhGAA의 투여로부터 약 1시간 전에 투여된다.

[0177] 일부 실시양태에서, 미글루스타트는 rhGAA의 투여 후에 투여된다. 적어도 하나의 실시양태에서, 미글루스타트는 rhGAA의 투여 후 3시간 이내에 투여된다. 적어도 하나의 실시양태에서, 미글루스타트는 rhGAA의 투여 후 2시간 이내에 투여된다. 예를 들어, 미글루스타트는 rhGAA의 투여 후 약 1.5시간, 약 1시간, 약 50분, 약 30분, 또는 약 20분 이내에 투여될 수 있다.

[0178] 일부 실시양태에서, 대상체는 미글루스타트의 투여로부터 적어도 2시간 전 및 적어도 2시간 후 동안 단식한다.

[0179] **E. 키트**

[0180] 본 발명의 또 다른 측면은 본원에 기술된 rhGAA 또는 제약 조성물을 포함하는 키트에 관한 것이다. 하나 이상의 실시양태에서, 키트는 rhGAA 또는 제약 조성물 (동결건조 전 또는 후)을 포함하는 용기, 및 재구성, 희석 및 투여에 관한 설명서를 포함한다.

[0181] ***실시예***

[0182] **실시예 1: 모노- 또는 비스-M6P-보유 N-글리칸의 함량이 높은 rhGAA를 생산하는 CHO 세포의 제조.**

[0183] DG44 CHO (DHFR-) 세포를 rhGAA를 발현하는 DNA 구축물로 형질감염시켰다. DNA 구축물이 도 4에서 제시된다. 형질감염 후, 안정적으로 통합된 GAA 유전자를 함유하는 CHO 세포를 하이포크산틴/티미딘 결핍 (-HT) 배지를 사용하여 선별하였다. 메토트렉세이트 처리 (MTX, 500 nM)에 의해 이러한 세포에서의 GAA 발현을 유도하였다.

[0184] 다량의 GAA를 발현한 세포 풀을 GAA 효소 활성 검정법에 의해 확인하고, rhGAA를 생산하는 개별적인 클론을 확립하는데 사용하였다. 개별적인 클론을 반고체 배지 플레이트 상에서 생성시키고, 클론픽스(ClonePix) 시스템에 의해 피킹하고, 깊은 24웰 플레이트로 옮겼다. 개별적인 클론을 GAA 효소 활성에 대해 검정하여, 높은 수준의 GAA를 발현하는 클론을 확인하였다. GAA 활성을 결정하기 위한 컨디셔닝 배지는 4-MU-α 글루코시다제 기질을 사용하였다. GAA 효소 검정법에 의해 측정 시 더 높은 수준의 GAA를 생산하는 클론을 생존율, 성장 능력, GAA 생산성, N-글리칸 구조 및 안정적인 단백질 발현에 대해 추가로 평가하였다. 모노-M6P 또는 비스-M6P N-글리칸이 강화된 rhGAA를 발현하는, CHO 세포주 GA-ATB200를 포함하는 CHO 세포주가 이러한 절차를 사용하여 단리되었다.

[0185] **실시예 2: rhGAA의 정제**

[0186] 본 발명에 따른 rhGAA의 다중 뱃치를 진탕 플라스크 및 관류 생물반응기에서 CHO 세포주 GA-ATB200을 사용하여 생산하였고, 이의 생성물이 "ATB200"으로 지칭된다. 약한 음이온 교환 ("WAX") 액체 크로마토그래피를 사용하여 말단 포스페이트 및 시알산에 따라 ATB200 rhGAA를 분획화하였다. 염의 양을 증가시키면서 ERT를 용출시킴으로써 용출 프로파일이 생성되었다. 프로파일을 UV (A280 nm)에 의해 모니터링하였다. 유사한 CIMPR 수용체 결합 (적어도 ~70%) 프로파일이 상이한 생산 뱃치들로부터의 정제된 ATB200 rhGAA에 대해 관찰되고 (도 5), 이는 ATB200 rhGAA가 일관되게 생산될 수 있다는 것을 가리킨다.

[0187] **실시예 3: ATB200 rhGAA의 올리고당류 특성화**

[0188] ATB200 rhGAA를 상이한 LC-MS/MS 분석 기술들을 사용하여 부위-특이적 N-글리칸 프로파일에 대해 분석하였다. 처음 2개의 LC-MS/MS 방법의 결과가 도 6a-6h에서 제시된다. 제3 LC-MS/MS 방법 + 2-AA 글리칸 맵핑의 결과가 도 32a-32h, 도 33a-33b, 및 표 5에서 제시된다.

[0189] 제1 LC-MS/MS 분석에서, LC-MS/MS 분석 전에 단백질이 변성, 환원, 알킬화 및 소화되었다. 단백질 변성 및 환원 동안, 200 ㎍의 단백질 샘플, 5 ㎕의 1 mol/L 트리스-HCl (최종 농도 50 mM), 75 ㎕의 8 mol/L 구아니딘 HCl (최종 농도 6 M), 1 ㎕의 0.5 mol/L EDTA (최종 농도 5 mM), 2 ㎕의 1 mol/L DTT (최종 농도 20 mM), 및 Milli-Q® 물을 1.5 mL 튜브에 첨가하여 총 100 ㎕의 부피를 제공하였다. 샘플을 혼합하고 56℃에서 30분 동안 건조 욕조에서 인큐베이션하였다. 알킬화 동안, 변성 및 환원된 단백질 샘플을 5 ㎕의 1 mol/L 아이오도아세트아미드 (IAM, 최종 농도 50 mM)와 혼합한 후, 암실에서 30분 동안 10-30℃에서 인큐베이션하였다. 알킬화 후, 400 ㎕의 사전냉각 아세톤을 샘플에 첨가하고, 혼합물을 4시간 동안 -80℃ 냉동으로 동결시켰다. 그 후, 샘플을 4℃에서 5분 동안 13000 rpm으로 원심분리하고, 상청액을 제거하였다. 400 ㎕의 사전냉각 아세톤을 펠릿에 첨가한 후, 이를 4℃에서 5분 동안 13000 rpm으로 원심분리하고, 상청액을 제거하였다. 그 후, 샘플을 암실에서 얼음 상에서 공기 건조시켜 아세톤 잔류물을 제거하였다. 40 마이크로리터의 8 M 요소 및 160 ㎕의 100 mM NH_4HCO_3를 샘플에 첨가하여 단백질을 용해시켰다. 그 후, 트립신 소화 동안, 50 ㎍의 단백질에 트립신 소화 완충제를 100 ㎕의 최종 부피로 첨가하고, 5 ㎕의 0.5 mg/mL 트립신 (20/1 w/w의 단백질 대 효소 비)을 첨가하였다. 용액을 잘 혼합하고, 37℃에서 철야로 인큐베이션하였다 (16±2시간). 2.5 마이크로리터의 20% TFA (최종 농도 0.5%)를 첨가하여 반응을 켄칭시켰다. 그 후, 샘플을 써모 사이언티픽™ 오비트랩 벨로스 프로™ 질량 분광계를 사용하여 분석하였다.

[0190] 제2 LC-MS/MS 분석에서, 아이오도아세트산 (IAA)이 IAM 대신 알킬화 시약으로 사용된 것을 제외하고는 유사한

변성, 환원, 알킬화 및 소화 절차를 사용하여 ATB200 샘플을 제조한 후, 써모 사이언티픽™ 오비트랩 퓨전™ 루모스 트리비드™ 질량 분광계를 사용하여 분석하였다.

[0191] 제1 및 제2 분석의 결과가 도 6a-6h에서 제공된다. 도 6a-6h에서, 제1 분석의 결과는 왼쪽 막대 (진회색)에 의해 표시되고, 제2 분석으로부터의 결과는 오른쪽 막대 (연회색)에 의해 표시된다. 글리칸 표시의 기호 명명법은 문헌 [Varki, A., Cummings, R.D., Esko J.D., et al., Essentials of Glycobiology, 2nd edition (2009)]에 따른다.

[0192] 도 6a-6h에서 볼 수 있듯이, 2개의 분석이 유사한 결과를 제공하였지만, 결과 사이에 약간의 변동이 있었다. 이러한 변동은 사용된 기구 및 N-글리칸 분석의 완전성을 포함하는 다수의 요인에 기인할 수 있다. 예를 들어, 인산화 N-글리칸의 일부 종이 확인되지 않았고/않았거나 정량되지 않은 경우, 인산화 N-글리칸의 총 개수가 과소표시될 수 있고, 이러한 부위에 인산화 N-글리칸을 보유하는 rhGAA의 백분율이 과소표시될 수 있다. 또 다른 예로서, 비-인산화 N-글리칸의 일부 종이 확인되지 않았고/않았거나 정량되지 않은 경우, 비-인산화 N-글리칸의 총 개수가 과소표시될 수 있고, 그 부위에서 인산화 N-글리칸을 보유하는 rhGAA의 백분율이 과다표시될 수 있다.

[0193] 도 6a는 ATB200의 N-글리코실화 부위 점유율을 나타낸다. 도 6a에서 볼 수 있듯이, 제1, 제2, 제3, 제4, 제5 및 제6 N-글리코실화 부위는 대부분 점유되어 있고, 이때 양쪽 분석에서 ATB200 효소의 약 90% 이상 및 최대 약 100%에 각각의 잠재적 N-글리코실화 부위에서 검출된 N-글리칸이 있는 것이 검출되었다. 그러나, 제7 잠재적 N-글리코실화 부위는 약 절반의 경우에 N-글리코실화된다.

[0194] 도 6b는 제1 잠재적 N-글리코실화 부위인 N84의 N-글리코실화 프로파일을 나타낸다. 도 6b에서 볼 수 있듯이, 주요 N-글리칸 종은 비스-M6P N-글리칸이다. 제1 및 제2 분석 양쪽 모두에서 ATB200의 75% 초과가 제1 부위에 비스-M6P가 있다는 것이 검출되었고, 이는 제1 부위에서 ATB200 mol 당 약 0.8 mol 비스-M6P의 평균에 상응한다.

[0195] 도 6c는 제2 잠재적 N-글리코실화 부위인 N177의 N-글리코실화 프로파일을 나타낸다. 도 6c에서 볼 수 있듯이, 주요 N-글리칸 종은 모노-M6P N-글리칸 및 비-인산화 고-만노스 N-글리칸이다. 제1 및 제2 분석 양쪽 모두에서 ATB200의 40% 초과가 제2 부위에 모노-M6P이 있는 것이 검출되었고, 이는 제2 부위에서 ATB200 mol 당 약 0.4 내지 약 0.6 mol 모노-M6P의 평균에 상응한다.

[0196] 도 6d는 제3 잠재적 N-글리코실화 부위인 N334의 N-글리코실화 프로파일을 나타낸다. 도 6d에서 볼 수 있듯이, 주요 N-글리칸 종은 비-인산화 고-만노스 N-글리칸, 디-, 트리-, 및 테트라-안테나 복합 N-글리칸, 및 하이브리드 N-글리칸이다. 제1 및 제2 분석 양쪽 모두에서 ATB200의 20% 초과가 제3 부위에 시알산 잔기가 있는 것이 검출되었고, 이는 제3 부위에서 ATB200 mol 당 약 0.9 내지 약 1.2 mol 시알산의 평균에 상응한다.

[0197] 도 6e는 제4 잠재적 N-글리코실화 부위인 N414의 N-글리코실화 프로파일을 나타낸다. 도 6e에서 볼 수 있듯이, 주요 N-글리칸 종은 비스-M6P 및 모노-M6P N-글리칸이다. 제1 및 제2 분석 양쪽 모두에서 ATB200의 40% 초과가 제4 부위에 비스-M6P가 있는 것이 검출되었고, 이는 제4 부위에서 ATB200 mol 당 약 0.4 내지 약 0.6 mol 비스-M6P의 평균에 상응한다. 제1 및 제2 분석 양쪽 모두에서 ATB200의 25% 초과가 제4 부위에 모노-M6P가 있는 것이 또한 검출되었고, 이는 제4 부위에서 ATB200 mol 당 약 0.3 내지 약 0.4 mol 모노-M6P의 평균에 상응한다.

[0198] 도 6f는 제5 잠재적 N-글리코실화 부위인 N596의 N-글리코실화 프로파일을 나타낸다. 도 6f에서 볼 수 있듯이, 주요 N-글리칸 종은 푸코실화 디-안테나 복합 N-글리칸이다. 제1 및 제2 분석 양쪽 모두에서 ATB200의 70% 초과가 제5 부위에 시알산 잔기가 있는 것이 검출되었고, 이는 제5 부위에서 ATB200 mol 당 약 0.8 내지 약 0.9 mol 시알산의 평균에 상응한다.

[0199] 도 6g는 제6 잠재적 N-글리코실화 부위인 N826의 N-글리코실화 프로파일을 나타낸다. 도 6g에서 볼 수 있듯이, 주요 N-글리칸 종은 디-, 트리- 및 테트라-안테나 복합 N-글리칸이다. 제1 및 제2 분석 양쪽 모두에서 ATB200의 80% 초과가 제6부위에 시알산 잔기가 있는 것이 검출되었고, 이는 제6 부위에서 ATB200 mol 당 약 1.5 내지 약 1.8 mol 시알산의 평균에 상응한다.

[0200] 제7 부위인 N869에서의 N-글리코실화의 분석은 약 40% N-글리코실화를 나타냈고, 이때 가장 통상적인 N-글리칸은 A4S3S3GF (12%), A5S3G2F (10%), A4S2G2F (8%) 및 A6S3G3F (8%)였다.

[0201] 도 6h는 7개의 잠재적 N-글리코실화 부위 각각에서의 인산화의 요약을 나타낸다. 도 6h에서 볼 수 있듯이, 제1 및 제2 분석 양쪽 모두에서 제1, 제2 및 제4 잠재적 N-글리코실화 부위에서 높은 인산화 수준이 검출되었다.

양쪽 모두의 분석에서 ATB200의 80% 초과가 제1 부위에서 모노- 또는 비스-인산화되었고, ATB200의 40% 초과가 제2 부위에서 모노-인산화되었으며, ATB200의 80% 초과가 제4 부위에서 모노- 또는 비스-인산화되었음이 검출되었다.

[0202] ATB200의 또 다른 N-글리코실화 분석이 하기 기술된 바와 같은 LC-MS/MS 방법에 따라 수행되었다. 이러한 분석에서 10개의 ATB200 롯트에 걸친 평균 N-글리코실화 프로파일이 산출되었다 (도 32a-32h, 도 33a-33b).

[0203] ATB200으로부터의 N-연결 글리칸을 PNGase-F로 효소적으로 방출시키고, 2-안트라닐산 (2-AA)로 표지하였다. 2-AA 표지 N-글리칸을 고체상 추출 (SPE)에 의해 추가로 프로세싱하여 과량의 염 및 기타 오염물을 제거하였다. 정제된 2-AA N-글리칸을 아세토니트릴/물 (20/80; v/v)에 용해시키고, 10 마이크로그램을 고성능 액체 크로마토그래피 + 형광 검출 (HPLC-FLD) 및 고분해능 질량 분광법 (HRMS) 분석을 위해 아미노-폴리머 분석 칼럼 (apHera™, 수펠코(Supelco)) 상에 로딩하였다.

[0204] 이동상 A (아세토니트릴 내의 2% 아세트산) 및 이동상 B (5% 아세트산; 수산화암모늄으로 pH 4.3으로 조정된 물 내의 20 밀리몰 아세트산암모늄)의 구배 용출 모드로 순상 조건 하에 액체 크로마토그래피 (LC) 분리를 수행하였다. 초기 이동상 조성은 70% A/30% B였다. 형광 검출을 위해, 검출기 (RF-20Axs, 시마즈(Shimadzu))의 파라미터는 여기 (Ex):320 nm; 방출 (Em):420 nm였다. 독립적 데이터 획득 (IDA) 모드로 작동되는 사중극자 비행시간 질량 분광계 (Sciex X500B QTOF)를 사용하여 HRMS 분석을 수행하였다. 획득된 데이터파일을 프로테오위자드(ProteoWizard)로부터의 MSConvert를 사용하여 mzML 파일로 변환한 후, GRITS 툴박스 1.2 모닝 블렌드(GRITS Toolbox 1.2 Morning Blend) 소프트웨어 (UGA)를 이용하여, 글리칸 데이터베이스를 검색하고, 이어서 확인된 N-글리칸에 주석을 달았다. 전구체 단일동위원소 질량 (m/z) 및 생성물 이온 m/z 양쪽 모두를 사용하여 N-글리칸을 확인하였다. 글리코워크벤치(GlycoWorkbench) 2 어플리케이션을 사용하여 실험 생성물 이온 및 단편화 패턴을 인-실리코로 확인하였다.

[0205] ATB200으로부터의 N-연결 글리칸의 상대적 정량을 결정하기 위해, HPLC-FLD-QTOF MS/MS 실험으로부터 획득된 데이터를 하기와 같이 프로세싱하였다. FLD 크로마토그램 내의 모든 N-글리칸 피크를 통합하고, 각각의 피크에 FLD 크로마토그램 내의 모든 피크의 총 면적의 백분율을 할당하였다. 피크 면적으로 표현된 형광 신호는 샘플 내의 각각의 N-글리칸의 양의 정량적 척도이다 (도 33a). 그러나, 대부분의 경우에, 다중 N-글리칸 종이 동일한 FLD 피크 내에 함유되었다. 따라서, 각각의 N-글리칸 종의 상대적 정량 (표 5)을 수득하기 위해 질량 분광계 데이터가 또한 요구되었다. 각각의 N-글리칸에 대한 이온 강도 신호를 데이터로부터 "추출"하여, 추출 이온 크로마토그램 (XIC)으로 칭해지는 크로마토그래프 피크가 생성되었다. XIC가 FLD 크로마토그래프 피크와 정렬되었고, 오직 1개의 N-글리칸 종에 대해 특이적이었다. 그 후, 이온 강도 신호로부터 생성된 XIC 피크를 통합하였고, 이러한 피크 면적은 존재하는 글리칸의 양의 상대적 정량 척도이다. FLD 피크 면적 및 질량 분광계 XIC 피크 면적 양쪽 모두가 본원에서 보고된 ATB200의 모든 N-연결 글리칸 종의 상대적 정량을 가능하는데 사용되었다.

[0206] 이러한 LC-MS/MS 분석의 결과가 하기 표 5에서 제공된다. 글리칸 표시를 위한 기호 명명법은 문헌 [Wopereis W, et al. 2006. Abnormal glycosylation with hypersialylated O-glycans in patients with Sialuria. Biochimica et Biophysica Acta. 1762:598-607]; [Gornik O, et al. 2007. Changes of serum glycans during sepsis and acute pancreatitis. Glycobiology. 17:1321-1332] (https://doi.org/10.1093/glycob/cwm106); [Kattla JJ, et al. 2011. Biologic protein glycosylation. In: Murray Moo-Young (ed.), Comprehensive Biotechnology, Second Edition, 3:467-486]; [Tharmalingam-Jaikaran T, et al. N-glycan profiling of bovine follicular fluid at key dominant follicle developmental stages. 2014. Reproduction. 148:569-580]; [Clerc F, et al. Human plasma protein N-glycosylation. 2015. Glycoconj J. DOI 10.1007/s10719-015-9626-2]; 및 [Blackler RJ, et al. 2016. Single-chain antibody-fragment M6P-1 possesses a mannose 6-phosphate monosaccharide-specific binding pocket that distinguishes N-glycan phosphorylation in a branch-specific manner. Glycobiology. 26-2:181-192]을 따른다.

[0207] <표 5>

[0208] 2-AA 글리칸 맵핑 및 LC-MS/MS 확인을 기초로 ATB200에서 확인된 올리고당류의 유형 및 보급률

고-만노스 N-글리칸	전체의 %	복합 N-글리칸	전체의 %	복합 N-글리칸	전체의 %	복합 N-글리칸	전체의 %
2P-M7	11.39	FA2G2S1	3.89	A3G3S1+1Ac	0.65	FA2G2S1+1Ac	0.29
P-M7	7.97	FA2G2S2	3.42	A3G2S2+1Ac	0.64	A4G3	0.29
M6	6.89	A2G2S2	3.32	A1G1S1	0.63	A4G4+3KDN	0.29
P-M6	3.42	FA2G2	2.77	A4G3S1	0.61	A4G4S3	0.28
M5	2.06	FA4G4S3	2.26	FA3G3	0.61	FA5G4	0.24
P-M5	1.67	A2G2S1	2.25	A1G1	0.6	A4G3S2	0.21
2P-M8	1.27	FA3G3S1	2.12	FA2G2S2+1Ac	0.57	FA1	0.21
P-M8	1.17	A3G3S2	1.8	A3G2S1	0.57	FA4G4	0.21
BP-M6	0.9	FA2G1	1.66	A3G2S1	0.56	A3G1	0.21
M7	0.81	A2G2	1.46	A2G2S2+1Ac	0.5	FA4G3S2	0.21
BP-M7	0.69	FA3G3S1	1.42	FA3G2	0.45	FA3G2S2	0.21
M4	0.14	A4G4S1	1.28	A3G3+3KDN	0.45	A1	0.2
BP2-M5	0.04	FA3G3S2	1.25	A4G3S1	0.45	A4G2	0.19
BP2-M6	0.01	FA4G4(1LN)S3	1.1	A2G1S1	0.41	FA4G3	0.19
하이브리드 N-글리칸	전체의 %	FA4G4S1	1.08	A3G2	0.4	FA3	0.18
FA1P-M6	2.16	A3G3	1.08	FA4G4S1+LN	0.4	A1G1S1	0.18
M5A1G1S1	1.56	FA4G4S4	1.07	FA3G2S1	0.39	A4G1S1	0.16
FP-M6A1G1S1	0.42	FA3G3S3	1.04	FA2	0.38	FA1G1	0.15
A1M5	0.36	FA4G4S2	0.94	FA4G4S2+LN	0.38	FA3G1	0.14
A1G1M5	0.32	A2G1	0.94	A3G2S2	0.37	FA5G4S2	0.12
P-M6A1G1S1	0.17	FA2G1S1	0.94	A2	0.34	A3G1S1	0.11
요약	총합	A4G4	0.91	FA4G4(2LN)S3	0.33	A3	0.11
고-만노스 N-글리칸	38%	FA1G1S1	0.91	FA2G2Sg1	0.32	FA3G3S3+1Ac	0.1
하이브리드 N-글리칸	5%	FA2G2S2+2Ac	0.76	FA4G4(1LN)S4	0.31	A2G2S1+1Ac	0.09
복합 N-글리칸	57%	A4G4S2	0.69	A3G3S3	0.29	FA3G1S1	0.06

[0209]

[0210] 이러한 2-AA 및 LC-MS/MS 분석을 기초로, 그리고 도 33a에 추가로 요약된 바와 같이, 테스트된 ATB200는 평균 M6P 함량이 ATB200 mol 당 3-5 mol이고 (모노-M6P 및 비스-M6P 양쪽 모두에 대해 계산됨), 시알산 함량이 ATB200 mol 당 4-7 mol이다.

[0211] 도 32a-32h에 나타나고 도 33b에 요약된 바와 같이, ATB200의 제1 잠재적 N-글리코실화 부위는 평균 M6P 함량이 약 1.4 mol M6P/mol ATB200이고, 약 0.25 mol 모노-M6P/mol ATB200의 평균 모노-M6P 함량 및 약 0.56 mol 비스-M6P/mol ATB200의 평균 비스-M6P 함량을 차지하고; ATB200의 제2 잠재적 N-글리코실화 부위는 평균 M6P 함량이 약 0.5 mol M6P/mol ATB200이고, 주요 인산화 N-글리칸 종이 모노-M6P N-글리칸이고; ATB200의 제3 잠재적 N-글리코실화 부위는 평균 시알산 함량이 약 1 mol 시알산/mol ATB200이고; ATB200의 제4 잠재적 N-글리코실화 부위는 평균 M6P 함량이 약 1.4 mol M6P/mol ATB200이고, 약 0.35 mol 모노-M6P/mol ATB200의 평균 모노-M6P 함량 및 약 0.52 mol 비스-M6P/mol ATB200의 평균 비스-M6P 함량을 차지하고; ATB200의 제5 잠재적 N-글리코실화 부위는 평균 시알산 함량이 약 0.86 mol 시알산/mol ATB200이고; ATB200의 제6 잠재적 N-글리코실화 부위는 평균 시알산 함량이 약 4.2 mol 시알산/mol ATB200이며; ATB200의 제7 잠재적 N-글리코실화 부위는 평균 시알산 함량이 약 0.86 mol 시알산/pol ATB200이다.

[0212] 또한 이러한 2-AA 및 LC-MS/MS 분석 기술에 따르면, 평균적으로 ATB200의 제1 잠재적 N-글리코실화 부위의 N-글리칸의 약 65%가 고-만노스 N-글리칸이고, ATB200의 제2 잠재적 N-글리코실화 부위의 N-글리칸의 약 89%가 고-만노스 N-글리칸이고, ATB200의 제3 잠재적 N-글리코실화 부위의 N-글리칸의 절반 초과가 시알릴화되고 (거의 20%가 완전히 시알릴화됨), ATB200의 제3 잠재적 N-글리코실화 부위의 N-글리칸의 약 85%가 복합 N-글리칸이고, ATB200의 제4 잠재적 N-글리코실화 부위의 N-글리칸의 약 84%가 고-만노스 N-글리칸이고, ATB200의 제5 잠재적 N-글리코실화 부위의 N-글리칸의 약 70%가 시알릴화되고 (약 26%가 완전히 시알릴화됨), ATB200의 제5 잠재적 N-글리코실화 부위의 N-글리칸의 약 100%가 복합 N-글리칸이고, ATB200의 제6 잠재적 N-글리코실화 부위의 N-글리칸의 약 85%가 시알릴화되고 (거의 27%가 완전히 시알릴화됨), ATB200의 제6 잠재적 N-글리코실화 부위의 N-글리칸의 약 98%가 복합 N-글리칸이며, ATB200의 제7 잠재적 N-글리코실화 부위의 N-글리칸의 약 87%가 시알릴화되고 (거의 8%가 완전히 시알릴화됨), ATB200의 제7 잠재적 N-글리코실화 부위의 N-글리칸의 약 100%가 복합

N-글리칸이다.

[0213] **실시예 4: ATB200 및 마이오자임®/루미자임®의 분석적 비교**

[0214] 정제된 ATB200 및 루미자임® N-글리칸을 MALDI-TOF에 의해 평가하여, 각각의 ERT 상에서 발견되는 개별적인 N-글리칸 구조를 결정하였다. 루미자임®은 시판원으로부터 수득되었다. 도 7에 나타난 바와 같이, ATB200은 루미자임®의 오른쪽에서 용출되는 4개의 우세한 피크를 나타냈다. 이는 ATB200이 루미자임®보다 더 큰 정도로 인산화되었음을 입증하는데, 이러한 평가가 CIMPR 친화력보다는 말단 전하에 의한 것이기 때문이다. 도 8에 요약된 바와 같이, ATB200 샘플은 루미자임®보다 더 작은 양의 비-인산화 고-만노스형 N-글리칸을 함유하는 것으로 밝혀졌다.

[0215] 마이오자임® 및 루미자임®에서의 통상적인 rhGAA가 CIMPR과 상호작용하는 능력을 평가하기 위해, 2개의 통상적인 rhGAA 제제를 CIMPR 친화력 칼럼 (M6P 기가 있는 rhGAA에 결합함) 상에 주입하고, 관류물을 수집하였다. 결합된 물질을 유리 M6 구배로 용출시켰다. 분획을 96웰 플레이트에 수집하고, 4MU-α-글루코시다제 기질에 의해 GAA 활성을 검정하였다. 미결합 (관류) 및 결합 (M6P 용출) rhGAA의 상대적인 양을 GAA 활성을 기초로 결정하고, 총 효소의 분율로서 보고하였다. 도 9a 및 9b는 마이오자임® 및 루미자임® 내의 rhGAA의 결합 프로파일을 나타낸다: 마이오자임® 내의 rhGAA의 73% (도 9b) 및 루미자임® 내의 rhGAA의 78% (도 9a)가 CIMPR에 결합하지 않았다. 실제로, 마이오자임® 내의 rhGAA의 27% 및 루미자임® 내의 rhGAA의 22%만 이를 근육 세포 상의 CIMPR에 표적화하도록 생산적일 수 있는 M6P를 함유하였다. 대조적으로, 도 5에 나타난 바와 같이, 동일한 조건 하에, ATB200 내의 rhGAA의 70% 초과가 CIMPR에 결합하는 것으로 밝혀졌다.

[0216] CIMPR에 결합할 수 있는 rhGAA의 백분율이 더 큰 것에 더하여, 이러한 상호작용의 특질을 이해하는 것이 중요하다. 루미자임® 및 ATB200 수용체 결합을 CIMPR 플레이트 결합 검정법을 사용하여 결정하였다. 간략하게, CIMPR-코팅 플레이트를 사용하여 GAA를 포착하였다. 다양한 농도의 rhGAA를 고정된 수용체에 적용하였고, 미결합 rhGAA를 세정하여 제거하였다. 남아 있는 rhGAA의 양을 GAA 활성에 의해 결정하였다. 도 10a에 나타난 바와 같이, ATB200이 루미자임®보다 유의하게 더 양호하게 CIMPR에 결합하였다. 도 10b는 루미자임® (통상적인 rhGAA 제품) 및 본 발명에 따른 ATB200 내의 비스-M6P N-글리칸의 상대적인 함량을 나타낸다. 루미자임®의 경우, 평균적으로 분자의 10%만 비스-인산화 N-글리칸이 있었다. 대조적으로, 평균적으로 ATB200 내의 모든 rhGAA 분자에 적어도 하나의 비스-인산화 N-글리칸이 있다.

[0217] 전반적으로, 루미자임®보다 더 높은 ATB200 내의 M6P N-글리칸 함량은 ATB200 내의 더 높은 비율의 rhGAA 분자가 근육 세포를 표적화할 수 있다는 것을 가리킨다. 상기에서 제시된 바와 같이, MALDI에 의해 결정된 모노-인산화 및 비스-인산화 구조의 높은 백분율은 ATB200가 CIMPR 수용체에 유의하게 더 크게 결합하는 것을 도해한 CIMPR 프로파일과 일치한다. MALDI-TOF 질량 분광법을 통한 N-글리칸 분석에서, 평균적으로 각각의 ATB200 분자가 적어도 1개의 천연 비스-M6P N-글리칸 구조를 함유한다는 것이 확인되었다. ATB200 상에서의 이러한 더 높은 비스-M6P N-글리칸 함량은 M6P 수용체 플레이트 결합 검정법에서 CIMPR에 고-친화력으로 결합하는 것 (K_D 약 2-4 nM)과 직접적으로 상호관련되었다.

[0218] ATB200 및 루미자임® rhGAA의 상대적 세포 흡수를 정상 및 폼페 섬유모세포 세포주를 사용하여 비교하였다. 비교는 5-100 nM의 본 발명에 따른 ATB200과 10-500 nM의 통상적인 rhGAA 제품인 루미자임®을 수반하였다. 16시간 인큐베이션 후, 외부 rhGAA를 TRIS 염기로 불활성화시키고, 세포를 PBS로 3회 세정한 후 수확하였다. 내재화된 GAA를 4MU-α-글루코시드 가수분해에 의해 측정하고, 총 세포 단백질에 대해 상대적으로 그래프화하였으며, 결과가 도 11a-11c에서 나타난다.

[0219] ATB200은 세포 내로 효율적으로 내재화되는 것으로 또한 나타났다. 도 11a-11b에 도시된 바와 같이, ATB200은 정상 및 폼페 섬유모세포 세포 양쪽 모두 내로 내재화되고, 통상적인 rhGAA 제품인 루미자임®보다 더 큰 정도로 내재화된다. ATB200은 약 20 nM에서 세포 수용체를 포화시키는 한편, 약 250 nM의 루미자임®이 세포 수용체를 포화시키는데 필요하다. 도 11c에 나타난 바와 같이, 이러한 결과로부터 외삽된 흡수 효율 상수 ($K_{흡수}$)는 ATB200의 경우 2-3 nm, 루미자임®의 경우 56 nM이다. 이러한 결과는 ATB200이 폼페병에 대한 잘 표적화된 치료라는 것을 시사한다.

[0220] **실시예 5: ATB200 및 약리적 샤페론**

[0221] 단백질이 변성될 때 염료의 형광이 증가함에 따라, 산성 또는 중성 pH 완충제에서의 ATB200의 안정성을 사이프로 오렌지를 사용하여 열안정성 검정법에서 평가하였다. 도 12에 나타난 바와 같이, AT2221 첨가가, 라이소솜

의 산성 환경을 모방하는 조건인 pH 5.2에서의 ATB200의 안정성에 유사하게, pH 7.4에서 농도-의존적 방식으로 ATB200을 안정화시켰다. 표 6에 요약된 바와 같이, AT2221 첨가가 ATB200의 용융 온도 (T_m)를 거의 10℃만큼 증가시켰다.

[0222] <표 6>

[0223] AT2221과 조합된 ATB200의 안정성

테스트 조건	Tm (°C)
pH 7.4	56.2
pH 7.4 + 10 μM AT2221	61.6
pH 7.4 + 30 μM AT2221	62.9
pH 7.4 + 100 μM AT2221	66.0
pH 5.2	67.3

[0224]

[0225] **실시예 6: *Gaa* KO 마우스에서의 ATB200 및 AT2221의 공동-투여**

[0226] *Gaa* KO 마우스에서 ATB200 및 AT2221의 치료 효과를 평가하고, 알글루코시다제 알파의 것에 대해 비교하였다. 연구를 위해, 수컷 *Gaa* KO 마우스 (3 내지 4개월령) 및 나이가 매칭되는 야생형 (WT) 마우스를 사용하였다. 알글루코시다제 알파를 볼루스 꼬리 정맥 정맥내 (IV) 주사를 통해 투여하였다. 공동-투여 체계에서, ATB200의 IV 주사 30분 전에 AT2221을 경구 위관영양 (PO)을 통해 투여하였다. 격주로 처리를 제공하였다. 처리된 마우스를 최종 투여 14일 후에 희생시키고, 추가 분석을 위해 다양한 조직을 수집하였다. 표 7은 연구 디자인을 요약한다:

[0227] <표 7>

[0228] 공동-투여 연구 디자인

유전자형	처리	투여 당 약물 투여량 (격주)	투여 횟수
Gaa KO	비히클	N/A	6
Gaa KO	알글루코시다제 알파	20 mg/kg	6
Gaa KO	ATB200/AT2221	20 mg/kg (ATB200) 10 mg/kg (AT2221)	6
WT (Sve 129)	처리하지 않음	N/A	N/A

[0229]

[0230] 조직 샘플 내의 조직 글리코겐 함량을 상기 논의된 바와 같이 아밀로글루코시다제 소화를 사용하여 결정하였다. 도 13에 나타난 바와 같이, 20 mg/kg ATB200 및 10 mg/kg AT2221의 조합이 동일한 투여량의 알글루코시다제 알파에 비교하여 4가지 상이한 조직 (사두근, 삼두근, 비복근 및 심장)에서 글리코겐 함량을 유의하게 감소시켰다.

[0231] 조직 샘플을 문헌 [Khanna R, et al. (2012), "The pharmacological chaperone AT2220 increases recombinant human acid α-glucosidase uptake and glycogen reduction in a mouse model of Pompe disease", Plos One 7(7): e40776]; 및 [Khanna, R et al. (2014), "The Pharmacological Chaperone AT2220 Increases the Specific Activity and Lysosomal Delivery of Mutant Acid α-Glucosidase, and Promotes Glycogen Reduction in a Transgenic Mouse Model of Pompe Disease", PLoS ONE 9(7): e102092]에 기술된 방법에 따라 바이오마커 변화에 대해서 또한 분석하였다. 도 14에 나타난 바와 같이, LAMP1-양성 소포의 지대한 증가 및 확대가 WT에 비교하여 *Gaa* KO 동물의 근육 섬유에서 나타났고, 이는 라이소솜 증식을 가리킨다. ATB200 / AT2221의 공동-투여는 LAMP1 수준이 정상화된 섬유가 더 많은 것에 이른 한편, 나머지 LAMP1-양성 소포는 크기 면에서 또한 감소되었다 (삽입도).

[0232] 유사하게, 미처리 *Gaa* KO 마우스의 근육 섬유에서의 강한 LC3-양성 응집체는 자가포식 구역 및 자가포식 증강의 존재를 의미한다. LC3-양성 응집체 (적색)가 알글루코시다제 알파로 처리된 마우스에 비교하여 ATB200 / AT2221 공동-투여로 처리된 마우스에서 우선적으로 감소되었다 (도 15a). LC3의 발현을 웨스턴 블롯을 사용하여 평가했을 때 유사한 관찰이 이루어졌다. 도 15b에 나타난 바와 같이, ATB200 / AT2221로 처리된 동물의 대다수가 자가포식소체와 연관된 지질화 형태인 LC3 II의 수준의 유의한 감소를 나타냈고, 이는 개선된 자가포식 플럭스를 시사한다. 이와 비교하여, 자가포식에 대한 알글루코시다제 알파의 효과는 근소하였다.

[0233] 막 복구에서 수반되고 이의 결핍/미스트래피킹이 다수의 근육 디스트로피와 연관되는 단백질인 디스펄린을 또한 평가하였다. 도 16에 나타난 바와 같이, 디스펄린 (갈색)이 *Gaa* KO 마우스의 근형질에 다량으로 축적되었다. 알글루코시다제 알파에 비교하여, ATB200 / AT2221은 더 많은 개수의 근육 섬유에서 디스펄린을 근형질막으로 복원할 수 있었다.

[0234] 이러한 데이터들은 폼페병의 효과적인 치료뿐만 아니라 질환 진행의 역전에 이른 ATB200 및 미글루스타트로 치료된 인간 폼페병 환자에서 실연된 세포 수준에서의 개선 (예를 들어, 환자가 글리코겐 축적 및 근육 손상 바이오마커의 수준 감소를 나타냄)과 일관된다. 인간 폼페병 환자에서의 임상 데이터가 하기 실시예 8-13에서 요약된다.

[0235] **실시예 7: 단일 섬유 분석**

[0236] 도 17에 나타난 바와 같이, 대다수의 비히클-처리 마우스는 총체적으로 확대된 라이소솜 (녹색) (예를 들어 "B" 참조) 및 과도한 자가포식 증강의 존재 (적색) (예를 들어 "A" 참조)를 나타냈다. 마이오자임®-처리 마우스는 비히클-처리 마우스에 비교하여 어떠한 유의한 차이도 나타내지 않았다. 대조적으로, ATB200로 처리된 마우스로부터 단리된 대부분의 섬유는 극적으로 감소된 라이소솜 크기를 나타냈다 (예를 들어, "C" 참조). 또한, 자가포식 증강이 있는 면적 또한 다양한 정도로 감소되었다 (예를 들어, "C" 참조). 결과적으로, ATB200-처리 마우스로부터의 분석된 근육 섬유의 유의한 일부분 (36-60%)이 정상이거나 또는 거의 정상인 것으로 나타났다. 하기 표 8은 도 17에서 나타난 단일 섬유 분석을 요약한다.

[0237] <표 8>

[0238] 단일 섬유 분석

처리	분석된 동물	분석된 섬유의 총 개수 (n)	라이소솜 확대	자가포식 증강이 있는 섬유	외관이 정상이거나 거의 정상인 섬유
WT	2	65	-	-	100%
비히클	2	65	+	>90%	<10%
알글루코시다제 알파	4	150	+	>90%	<10%
ATB200	5	188	대부분의 섬유에서의 극적인 크기 감소	40-64%*	36-60%

* 이는 자가포식 증강이 다양한 정도로 감소된 섬유를 포함하였다. 전반적으로, 증강의 정도가 비히클- 또는 알글루코시다제 알파-처리 군에 비교하여 ATB200-처리 군에서 더 작았다.

[0239]

[0240] 전반적으로, 데이터는 M6P 함량이 더 높은 ATB200가, 단독으로 및 혈액의 중성 pH에서 약리적 샤페론 AT2221에 의해 추가로 안정된 것 양쪽 모두에서, *Gaa* KO 마우스에 투여되었을 때 알글루코시다제 알파에 비교하여 조직 표적화 및 라이소솜 트래피킹에서 더욱 효율적이라는 것을 가리키고, 이는 도 18에 도시된 바와 같은 AT2221에 의한 ATB200의 안정화와 일관된다. 결과적으로, ATB200 투여 및 ATB200/AT2221의 공동-투여가 질환-관련 병리 중 일부, 예컨대 글리코겐 축적, 라이소솜 증식, 및 자가포식 구역의 형성을 수정하는 것에서 알글루코시다제 알파보다 더욱 효과적이었다. 이러한 양성 치료 효과로 인해, ATB200 투여 및 ATB200/AT2221의 공동-투여가 근육 섬유를 손상으로부터 회복할 기회를 개선하고, 심지어 최적 GAA 활성의 결여로 인해 세포 내에 축적된 글리코겐을 클리어런스함으로써 손상을 역전시키는 것으로 나타났다. 실시예 6과 같이, 이러한 데이터는 ATB200 및 미글루스타트의 투여 후 폼페병의 효과적인 치료 및 질환 진행의 역전 양쪽 모두에 이른 인간 폼페병 환자에서 실연된 세포 수준에서의 개선과 또한 일관된다. 인간 폼페병 환자에서의 임상 데이터가 하기 실시예 8-13에서 요약된다.

[0241] **실시예 8: ATB200-02 시험: 폼페병 환자에서의 ATB200/AT2221의 인간 대상 연구**

[0242] 다양한 ATB200 효소 대체 요법 (ERT) 및 AT2221 샤페론 용량에서 약동학 (PK) 및 글리코겐 감소 효율을 평가하기 위해 *Gaa* 녹아웃 마우스에서 임상전 연구를 수행하였다. 이러한 데이터를 사용하여 인간에서의 필적하는 AT2221 샤페론 용량을 추정하였다. 그 후, 폼페병 환자에서 AT2221과 공동-투여된 ATB200의 안정성, 허용성, PK, 약역학 (PD), 및 효능을 평가하기 위한 표지 공개, 순서 고정, 용량 상승, 최초의 인간 대상 1/2상 연구로서 연구 ATB200-02 (NCT02675465)를 디자인하였다. 도 19a-19b는 ATB200-02 연구 디자인을 나타낸다. 이전에

알글루코시다제 알파로의 효소 대체 요법을 받은 보행가능 환자를 보행가능 ERT-스위치 (또는 ERT-스위치 보행가능) 환자 또는 코호트 1 환자로 지칭한다. 이전에 알글루코시다제 알파로의 효소 대체 요법을 받은 보행불능 환자를 보행불능 ERT-스위치 (또는 ERT-스위치 보행불능) 환자 또는 코호트 2 환자로 지칭한다. 이전에 알글루코시다제 알파로의 효소 대체 요법을 받지 않은 보행가능 환자를 ERT-나이브 (또는 ERT-나이브 보행가능) 환자 또는 코호트 3 환자로 지칭한다.

[0243] 5개국 내의 16개의 임상 장소가 ATB200-02 연구에 참여하였다. 연구는 하기의 주요 포함 기준을 사용하였다: GAA 효소 활성의 문서화된 결핍을 기초로 또는 GAA 표현형 결정에 의해 폼페병으로 진단되었고, 시험을 시작하기 전에 2-6년 (또는 코호트 2의 경우 ≥2년) 동안 알글루코시다제 알파로의 효소 대체 요법을 받은 18-65세의 남성 및 여성 (코호트 1). 적격한 대상체는 현재 격주 간격으로 알글루코시다제 알파를 받고 있고, 용량 중단을 초래하는 약물-관련 유해 사례 (AE) 없이 마지막 2회의 주입을 완료한 대상체였다 (코호트 1 및 2). 대상체는 6분 보행 검사 (6MWT)에서 200 내지 500 미터를 보행할 수 있어야 했거나 (코호트 1 및 3), 직립 강제 폐활량 (FVC)이 예상되는 정상 값의 30-80%이어야 했거나 (코호트 1 및 3), 또는 휠체어에 구속되고, 보조 없이 보행할 수 없어야 했다 (코호트 2). 6MWT 및 FVC 검사에 대한 프로토콜을, 예를 들어, 문헌 [Lachman and Schoser, *Journal of Rare Diseases*, 2013, 8:160], 및 [Bittner and Singh, The 6 Minute Walk Test, *Cardiology Advisor*, 2013]에서 확인할 수 있다. 도 19c는 20명의 대상체에 대한 기준선 특성을 제공한다. 안전성, 허용성, 및 바이오마커를 코호트 1, 2 및 3에 대해 평가하였다. 하기의 기능 평가를 코호트 1 및 3에 대해 평가하였다: 6MWT, 기타 운동 기능 검사 (시간 검사 및 보행-계단-가워스-의자 (GSGC)), 도수 근육 검사, 및 폐 기능 (FVC, 최대 흡기압(MIP)/ 최대 호기압 (MEP)). 시간 검사 및 GSGC 검사에 대한 프로토콜을, 예를 들어, 문헌 [Lachman and Schoser, *Journal of Rare Diseases*, 2013, 8:160]에서 확인할 수 있다. 코호트 2에 대해, 기능 평가는 근력 검사를 포함하였다.

[0244] **실시예 9: ATB200-02 시험으로부터의 중간 PK 결과**

[0245] AT2221에 대한 약동학 데이터의 요약이 도 20에서 제공된다. 1기 및 2기를 완료한 11명의 코호트 1 환자, 뿐만 아니라 3기의 PK 연구를 완료한 5명의 코호트 2 환자에 대해 rhGAA-특이적 "시그너처" 펩티드(들)인 T09 (1차) 및 T50 (확인용)의 검증된 LC-MS/MS 정량에 의해 5 mg/kg, 10 mg/kg 및 20 mg/kg의 ATB200에 대한 혈장 내의 총 GAA 단백질 농도를 결정하였다. 1기의 경우, 혈장 총 GAA 단백질 농도를 위한 혈액 샘플을 ATB200 주입을 시작하기 전, 및 주입을 시작하고 나서 1, 2, 3, 3.5, 4, 4.5, 5, 6, 8, 10, 12 및 24시간 후에 수집하였다. 2기 및 3기의 경우, 혈장 총 GAA 단백질 농도를 위한 혈액 샘플을 주입을 시작하기 전, 및 주입을 시작하고 나서 1, 2, 3, 3.5, 4, 4.5, 5, 6, 8, 10, 12 및 24시간 후에 수집하였다.

[0246] 1기 및 2기를 완료한 11명의 코호트 1 환자, 뿐만 아니라 3기의 PK 연구를 완료한 5명의 코호트 2 환자에 대해 AT2221 PK 분석을 또한 수행하였다. 혈장 AT2221 농도를 위한 혈액 샘플을 AT2221 경구 투여 직전 (0시), 및 AT2221를 경구 투여하고 나서 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 4, 5, 6, 9, 11, 및 25시간 후에 채혈하였다. 검증된 LC-MS/MS 검정법에 의해 혈장 AT2221을 결정하였다.

[0247] 도 21에 나타난 바와 같이, 단독으로 투여되었을 때 ATB200 수준이 용량보다 약간 더 크게 비례하는 방식으로 증가하였다. 20 mg/kg의 ATB200와 단일한 고용량 (260 mg)의 AT2221의 공동-투여는 단독으로 투여된 20 mg/kg의 ATB200에 비교하여 약 17%만큼 총 GAA 단백질 노출 곡선하 면적 (AUC)을 증가시켰다 (도 21, 도 22c). 20 mg/kg의 ATB200와 다중 고용량 (260 mg)의 AT2221의 공동-투여는 단독으로 투여된 20 mg/kg의 ATB200에 비교하여 대략 29%만큼 총 GAA 단백질 노출 곡선하 면적 (AUC)을 증가시켰다 (도 21, 도 22d). 최종 제거기 동안, 분포 반감기 및 부분적 AUC-24h의 증가가 로그 스케일에서 관찰되었다 (도 21, 도 22a, 도 22b). 도 21에 나타난 바와 같이, 분포 반감기 (α기)가 40%만큼 증가하였고, 이는 혈장에서의 ATB200에 대한 고-용량 AT2221의 안정화 효과와 일관된다. 42.2%만큼의 최대 혈장 농도까지의 시간부터 투약 후 24시간까지의 부분적 AUC의 증가가 분포 반감기의 증가에 동반되었다 (도 21, 도 22b). AT2221에 의한 ATB200 안정화의 추가 증거가 저용량 및 고용량 AT2221 대 ATB200 단독의 투약 12시간 후 및 24시간 후 비교에서 관찰되었다 (도 22e 및 22f). ERT-나이브 (코호트 3)와 ERT-스위치 환자 (코호트 1) 사이에 혈장 총 GAA 단백질 노출에서 통계적으로 유의한 차이가 없었다 (도 23). 시그너처 펩티드 T50의 PK 성향이 시그너처 펩티드 T09의 것과 상이하지 않았다 (AUC 비: 1.00).

[0248] **실시예 10: ATB200-02 시험으로부터의 중간 효능 결과**

[0249] 도 24a 및 24b에 나타난 바와 같이, 보행가능 ERT-스위치 환자 및 ERT-나이브 환자에 대해 6개월에 6MWT가 개선되었고, 12개월까지 지속적인 이익이 관찰되었다. 6개월, 9개월 및 12개월에 각각 7/10, 8/10, 및 8/8명의

ERT-스위치 환자에서 6MWT가 증가하였다. 6개월, 9개월 및 12개월에 각각 5/5, 5/5, 및 2/2명의 ERT-나이브 환자에서 6MWT가 증가하였다.

[0250] 도 24c, 도 26a, 및 도 26c에 나타난 바와 같이, 6MWT와 함께, 운동 기능 검사 및 도수 근력의 개선이 12개월에 걸쳐 ERT-스위치 및 ERT-나이브 환자 양쪽 모두에 대해 근육 기능의 전반적인 개선과 일관되었다.

[0251] 도 25, 및 도 26b에 나타난 바와 같이, 6개월 및 9개월에 모든 보행불능 ERT-스위치 환자에서 일관되고 실질적인 증가가 상지 힘에서 관찰되었다.

[0252] 도 27에 나타난 바와 같이, 6개월, 9개월 및 12개월에 각각 5/9, 6/9, 및 3/7명의 ERT-스위치 환자에서 FVC가 안정적이거나 증가되었고, 6개월, 9개월 및 12개월에 각각 5/5, 5/5, 및 2/2명의 ERT-나이브 환자에서 FVC가 안정적이거나 증가되었다. 또한 도 27에 나타난 바와 같이, ERT-스위치 보행가능 환자에서 최대 흡기압 (MIP)이 안정적이고 최대 호기압 (MEP)이 증가된 한편, ERT-나이브 환자에서 MIP가 증가되고 MEP가 안정적이었다.

[0253] 피로 중증도 척도 ("FSS")는 각각 1 내지 7점의 척도로 채점되는 9개의 질문으로 이루어지는 자가-평가 질문지이다. 총점은 9 내지 63점 범위이고, 값이 높을수록 질환 상태로 인한 더 높은 수준의 피로를 나타낸다. 건강한 집단에서의 표준치는 약 21이다 (Grace J et al. Parkinsonism Relat Disord. 2007;13:443-445). 도 28에 나타난 바와 같이, 모든 코호트가 기준선에서 피로에 유의하게 영향을 받았고, ATB200/AT2221을 받은 후에 모든 코호트가 이들의 FSS의 개선을 실연하였다.

[0254] **실시예 11: ATB200-02 시험으로부터의 중간 결과: 근육 손상 마커**

[0255] 하기의 근육 손상 마커를 평가하였다: 크레아틴 키나제 (CK) 효소, 알라닌 아미노트랜스퍼라제 (ALT), 및 아스파르테이트 아미노트랜스퍼라제 (AST). 9개월의 임상 시험 후에 입수가능한 결과가 도 29a-29c에서 보고된다 (코호트 1, 2 및 3에 대해 각각 최대 58주, 24주 및 36주로부터의 데이터; 아래의 n 값은 일부 데이터가 분석될 수 없었거나 또는 아직 분석되지 않았음을 반영한다). 이러한 각각의 시점에 관찰된 기준선으로부터의 평균 감소는 대략적으로 보행가능 ERT-스위치 환자 (n=9)의 경우 30-35%, 보행불능 ERT-스위치 환자 (n=4)의 경우 5-20%, ERT-나이브 환자 (n=5)의 경우 40-55%였다. 12개월의 임상 시험 후에 입수가능한 CK 효소에 대한 결과가 도 29d에서 보고된다 (코호트 1, 2 및 3에 대해 최대 12개월로부터의 데이터; 아래의 n 값은 일부 데이터가 분석될 수 없었거나 또는 아직 분석되지 않았음을 반영한다).

[0256] 소변 육탄당 사당류 (Hex4)를 글리코겐 축적의 마커로서 평가하였다. 12개월의 임상 시험 후에 입수가능한 Hex4에 대한 결과가 도 29d에서 보고된다 (코호트 1, 2 및 3에 대해 최대 12개월로부터의 데이터; 아래의 n 값은 일부 데이터가 분석될 수 없었거나 또는 아직 분석되지 않았음을 반영한다).

[0257] **실시예 12: ATB200-02 시험으로부터의 중간 안전성 결과**

[0258] 최장 치료 기간은 20개월을 초과하였다. 3개의 코호트 모두에 걸쳐 400회를 초과하는 총 주입 후에 주입-연관 반응의 비율이 매우 낮으면서 (1% 미만), 유해 사례 (AE)가 일반적으로 경미하고 일시적이었다. 표준 예비투약에 의해 이러한 발병률을 제어하였다.

[0259] 최대 72주에 치료에 관련된 것으로 보고된 가장 통상적인 AE는 구역 (3/20), 떨림 (3/20), 두통 (3/20), 피로 (3/20), 설사 (2/20), 근육 연축 (2/20), 및 관절 종창 (2/20)이었다.

[0260] 최대 20+개월에 치료에 관련된 것으로 보고된 가장 통상적인 AE는 복통 (상복부 통증 및 하복부 통증을 포함함) (8/20), 설사 (8/20), 코인두염 (6/20), 구역 (5/20), 두통 (5/20), 및 상부 기도 감염 (5/20)이었다 (도 30). 한 심각한 AE가 보고되었고, 이는 연구 약물과 관련되지 않았다 (하부 기도 감염으로 입원함). AE로 인해 연구를 중단한 환자가 없었다.

[0261] 550+회의 주입에서 3회의 주입-연관 반응 (IAR) 사건이 있었고, 표준 예비투약에 의해 이를 제어하였다. 1회의 IAR 사례 (피부 변색)가 보행불능 ERT-스위치 환자 (코호트 2)에서 발생하였다. 2회의 IAR 사례 (국소적인 가려움, 홍반 및 작열감)이 ERT-나이브 환자 (코호트 3)에서 발생하였다 (도 30).

[0262] **실시예 13: ATB200-02 시험으로부터의 중간 결과의 요약 및 결론**

[0263] 도 31에 요약된 바와 같이, 상이한 코호트들에 걸쳐 근육 손상 및 기질 축적의 마커, 근육 기능 검사 (시간 검사 및 지구력), 도수 근력에서의 현저하고 뜻밖인 병행 개선, 및 호흡 기능 검사에서의 안정화 및/또는 개선을 나타내어, ATB200-02 시험으로부터의 중간 데이터가 조화를 이루었다. 근육 기능이 6개월 및 9개월에 각각 16/18 및 10/10명의 환자에서 개선되었다. 12개월까지 ERT-스위치 보행가능 및 ERT-나이브 환자에서 6MWT 거리

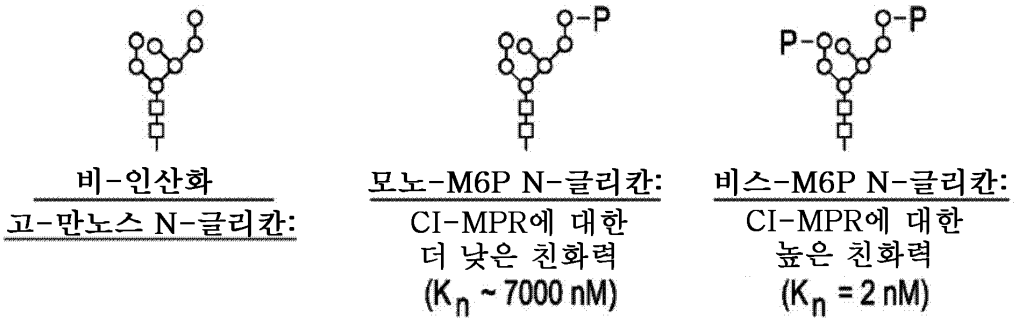
의 증가가 일관적 및 지속적이었고, ERT-스위치 보행가능 및 ERT-나이브 환자에서 다른 운동 기능 검사에서의 개선도 그러하였다. 정성적 및 정량적 측정에서, 6개월 및 9개월에 보행불능 ERT-스위치 환자에서 상지 힘의 증가가 나타났다. FVC, MIP, 및 MEP가 ERT-스위치 환자에서 일반적으로 안정적이었고, ERT-나이브 환자에서 증가하였다. 모든 코호트에서 피로 점수의 개선이 관찰되었다. 바이오마커 수준 (예를 들어, CK 및 Hex4 수준)이 모든 코호트에서 감소되었고, ATB200/AT2221이 일반적으로 잘 허용되었다.

[0264] 따라서, 요법의 다차원 효과는 ATB200/AT2221의 조합 체계가 폼페병 환자에 대한 중요한 치료 선택권일 잠재력이 있다는 것을 시사한다. 이러한 임상 결과는 치료가 근육 섬유로부터 병리를 클리어런스하는데 효과적이라는 것을 실연하는 실시예 7에 기술된 단일 섬유 분석으로부터의 결과를 지지한다. 임상 시험에 대한 추가 연구가 진행 중이다.

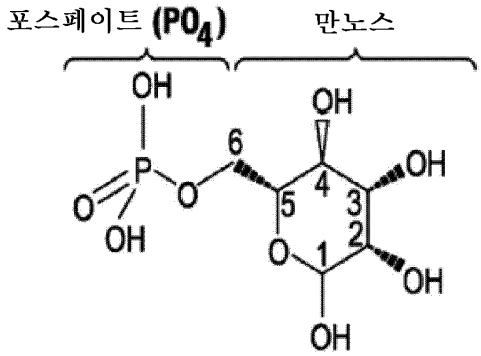
도면

도면1a

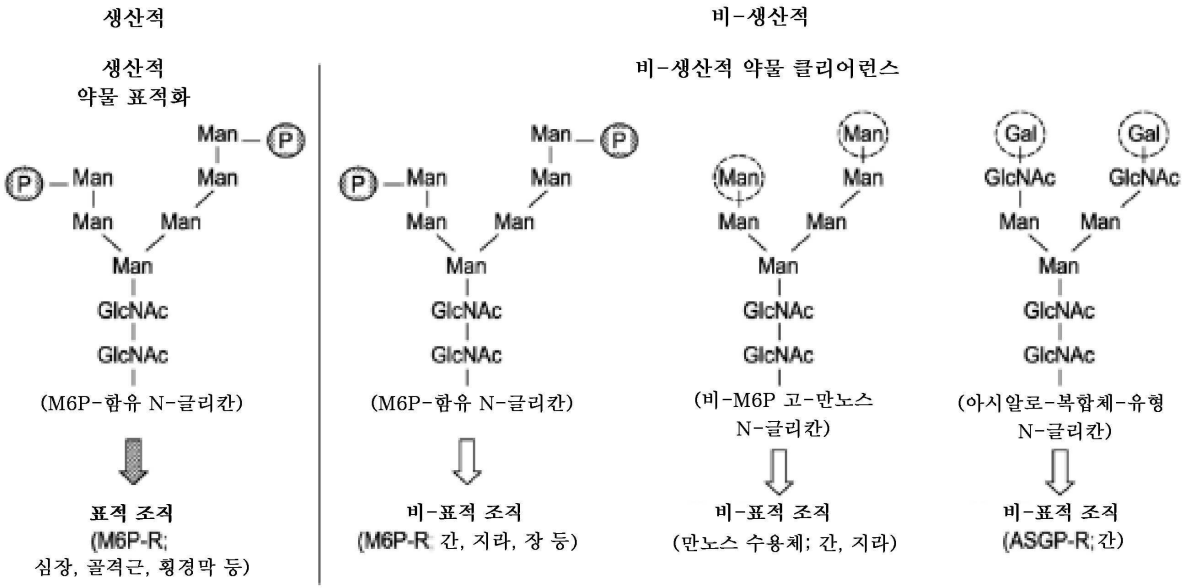
고-만노스 및 인산화 올리고당류의 구조 및 수용체 친화력



도면1b



글리칸 특이적 수용체를 통한 생산적 및 비-생산적 표적화의 비교

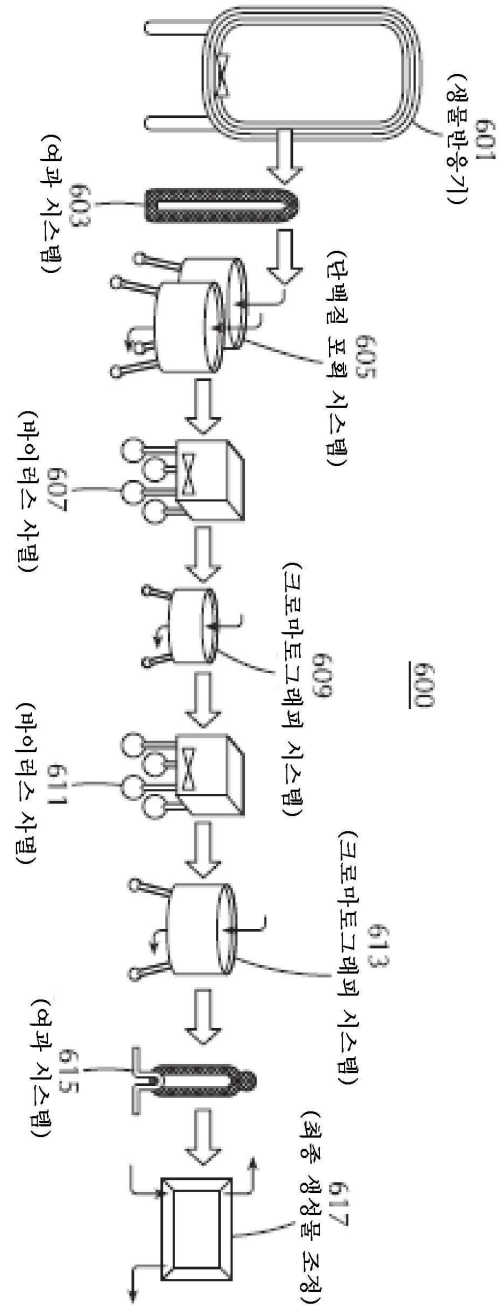


도 2a

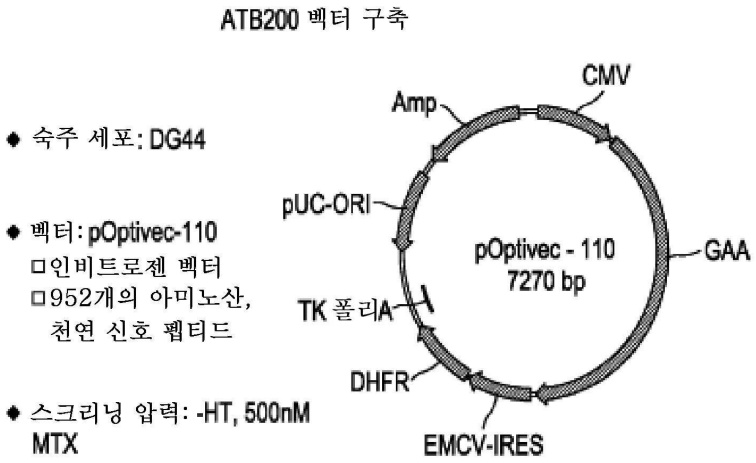
도 2b

도면2

도면3

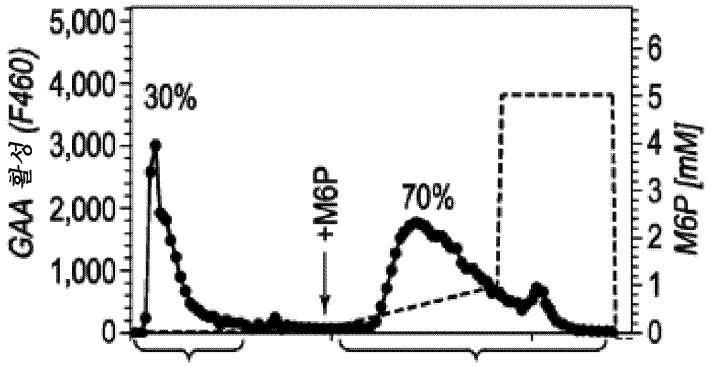

601
(생물반응기)
603
(여과 시스템)
605
(단백질 포획 시스템)
607
(바이러스 사멸)
609
(크로마토그래피 시스템)
611
(바이러스 사멸)
613
(크로마토그래피 시스템)
615
(여과 시스템)
617
(최종 생성물 조정)
600

도면4



도면5

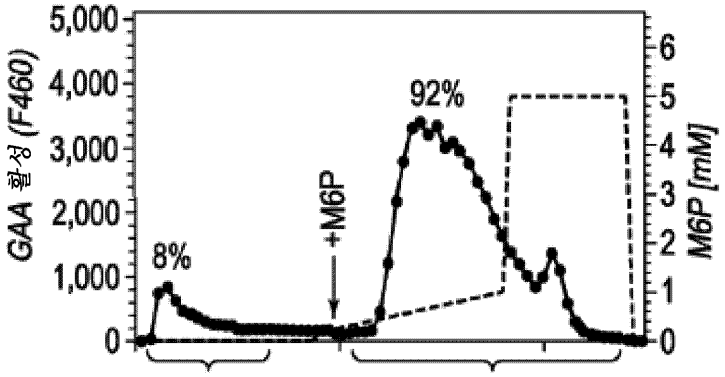
실시양태 1



rhGAA에 M6P가 결여된다; 라이소솜으로 표적화될 수 없음

rhGAA가 M6P를 함유한다; 라이소솜으로 표적화됨

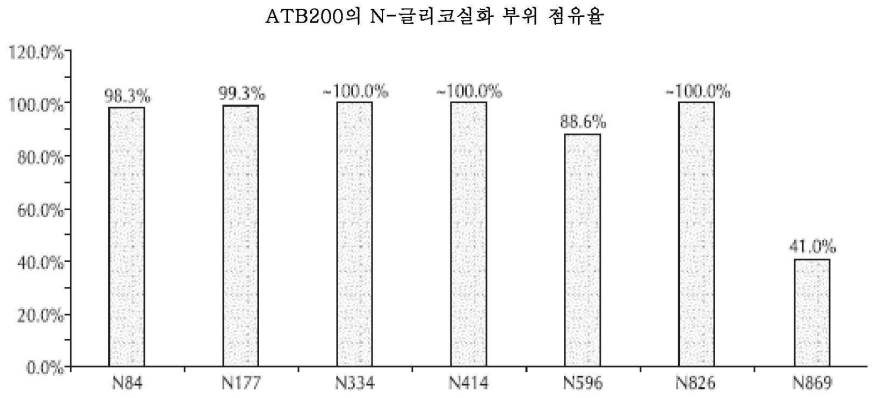
실시양태 2



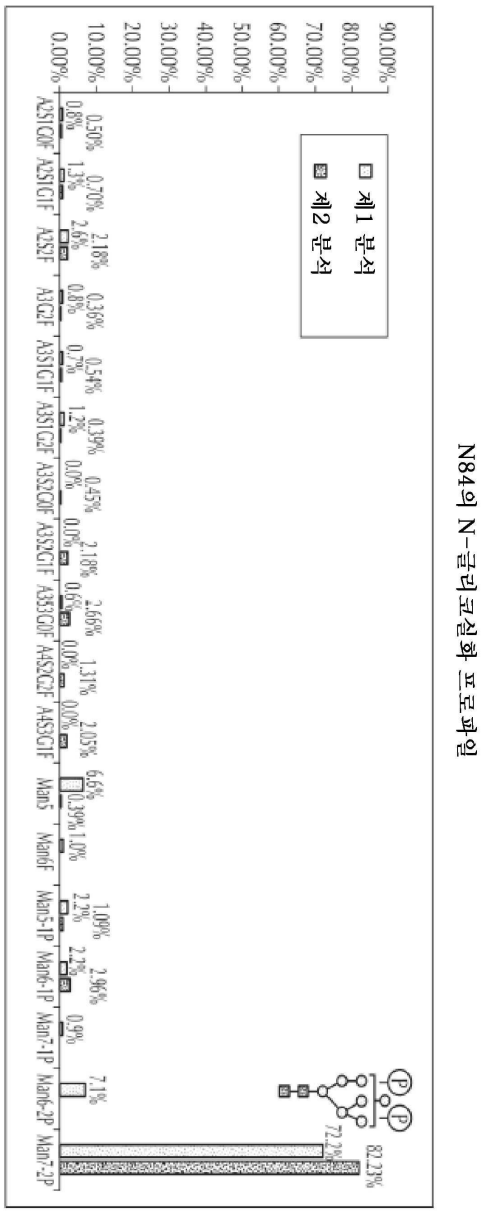
rhGAA에 M6P가 결여된다; 라이소솜으로 표적화될 수 없음

rhGAA가 M6P를 함유한다; 라이소솜으로 표적화됨

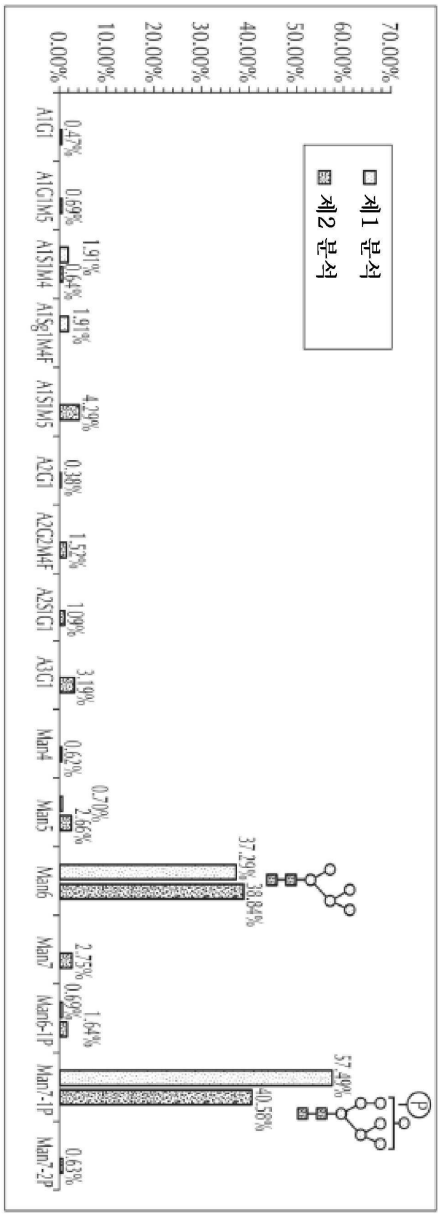
도면6a


ATB200의 N-글리코실화 부위 점유율
120.0%
100.0%
80.0%
60.0%
40.0%
20.0%
0.0%
98.3%
99.3%
~100.0%
~100.0%
88.6%
~100.0%
41.0%
N84
N177
N334
N414
N596
N826
N869

도면6b

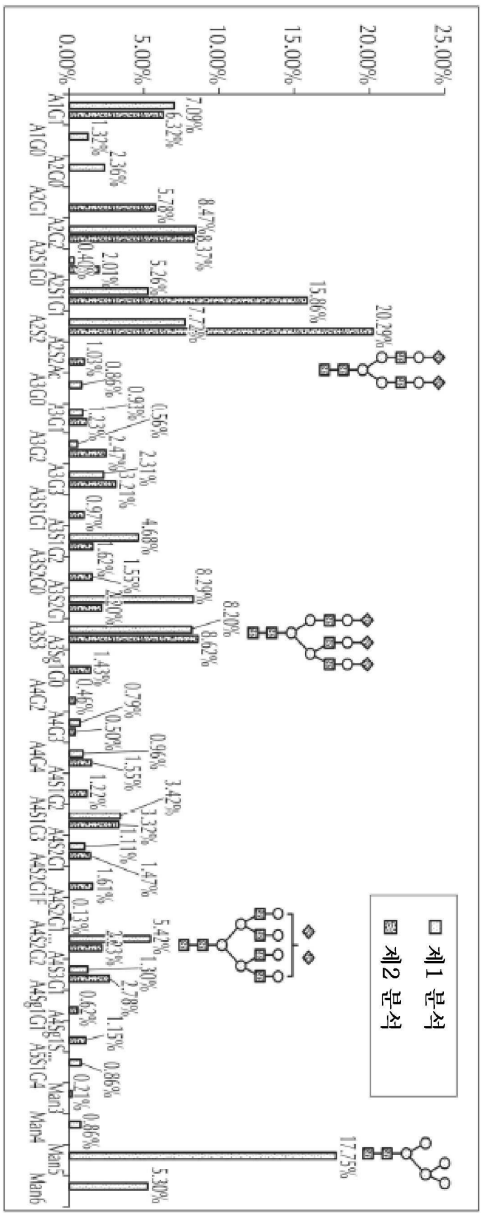

N84의 N-글리코실화 프로파일
제1 분석
제2 분석
A2S1G0F
A2S1G1F
A2S2F
A3G2F
A3S1G1F
A3S1G2F
A3S2G0F
A3S2G1F
A3S3G0F
A4S2G2F
A4S3G1F
Man5
Man6F
Man5-1P
Man6-1P
Man7-1P
Man6-2P
Man7-2P
72.2%
82.23%

도면6c



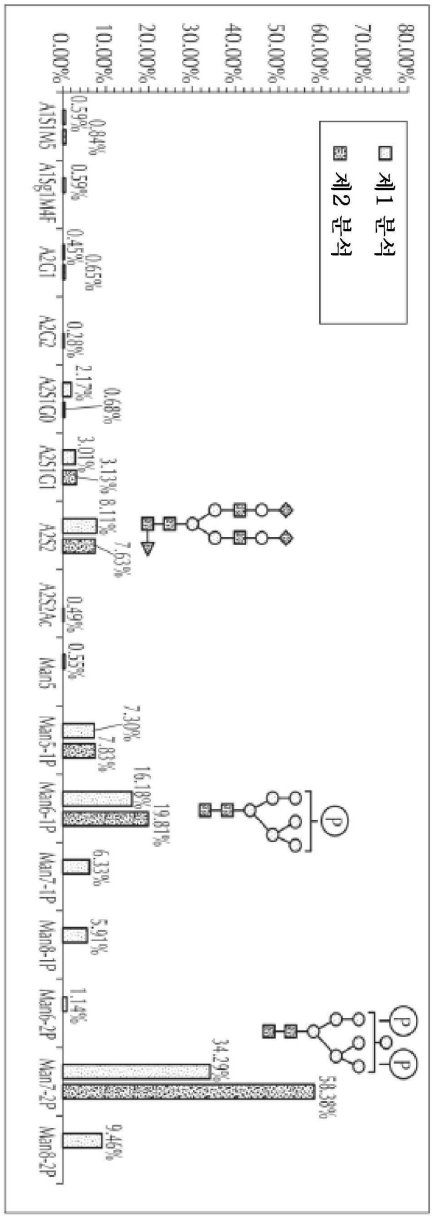
N177의 N-글리코실화 프로파일

도면6d



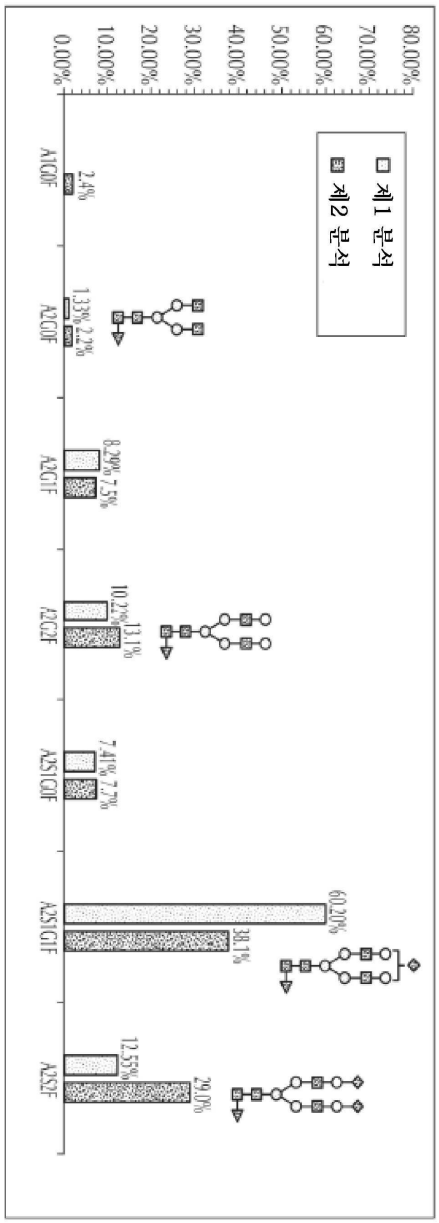
N334의 N-글리코실화 프로파일

도면6e



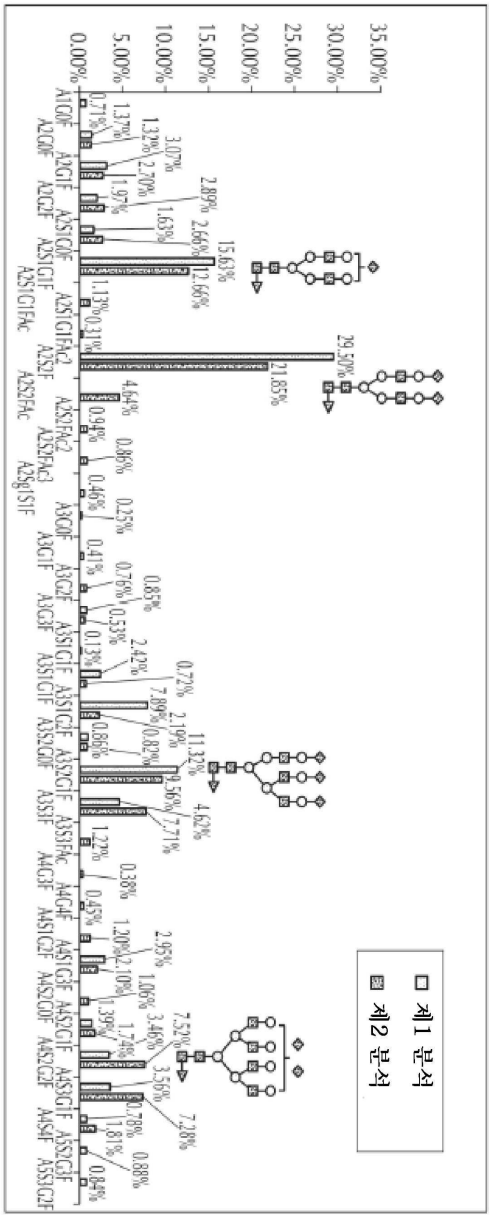
N414의 N-글리코실화 프로파일

도면6f



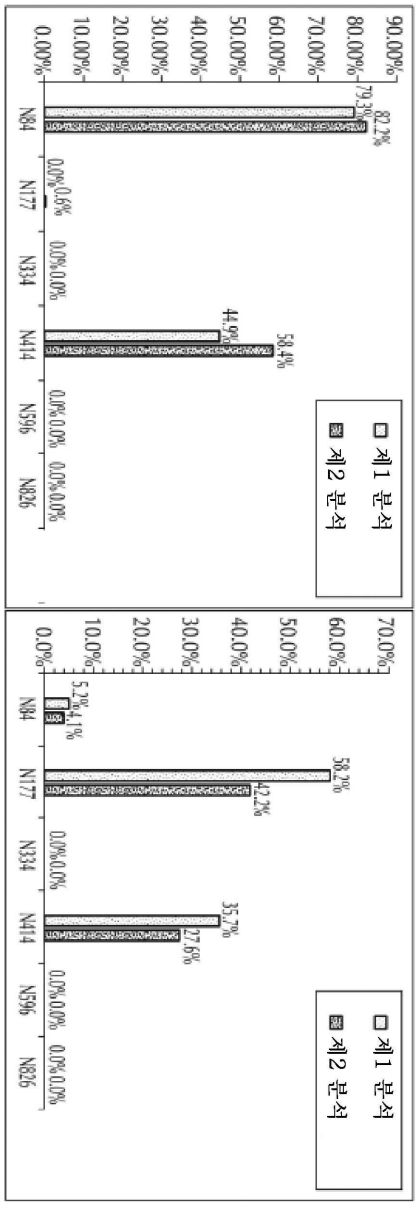
N596의 N-글리코실화 프로파일

도면6g

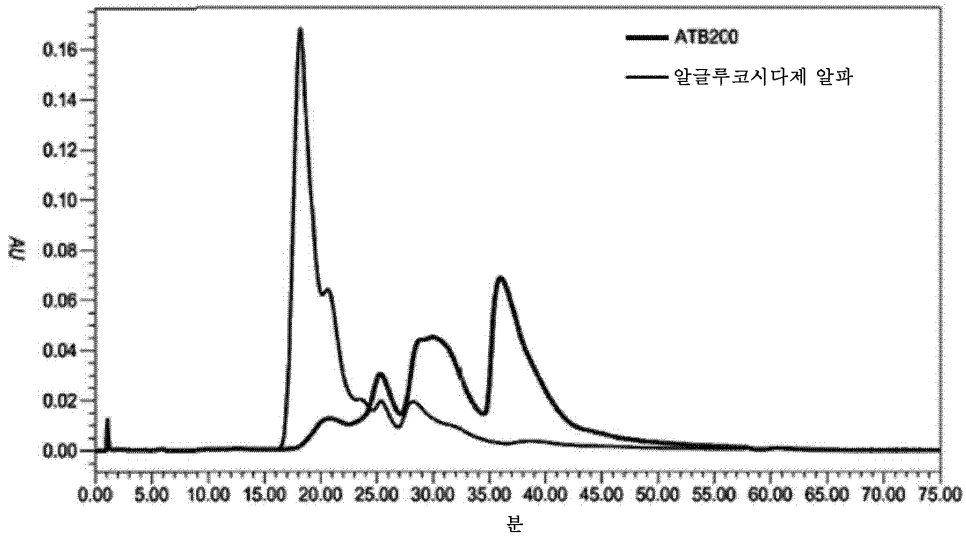


N826의 N-글리코실화 프로파일

도면6h


각각의 N-글리코실화 부위의 비스-M6P 및 모노-M6P의 상대적 퍼센트
각각의 N-글리코실화 부위의 비스-M6P 총 퍼센트
□ 제1 분석
▨ 제2 분석
N84
N177
N334
N414
N596
N826
82.2%
79.3%
0.6%
0.0%
0.0%
58.4%
44.9%
0.0%
0.0%
0.0%
0.0%
각각의 N-글리코실화 부위의 모노-M6P 총 퍼센트
5.2%
4.1%
58.2%
42.2%
0.0%
0.0%
35.7%
27.6%
0.0%
0.0%
0.0%
0.0%

도면7

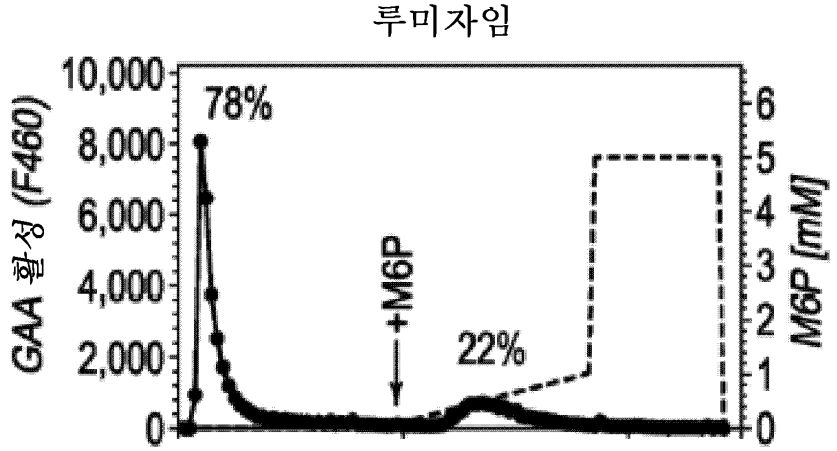

ATB2C0
알글루코시다제 알파
AU
0.16
0.14
0.12
0.10
0.08
0.06
0.04
0.02
0.00
0.00 5.00 10.00 15.00 20.00 25.00 30.00 35.00 40.00 45.00 50.00 55.00 60.00 65.00 70.00 75.00
분

도면8

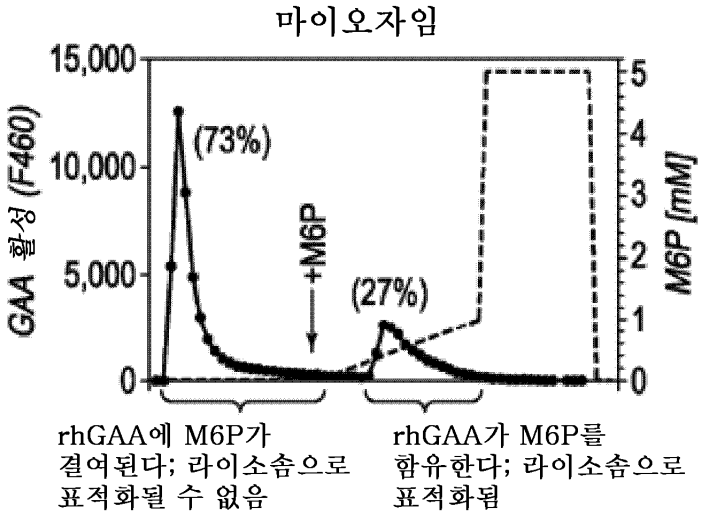
rhGAA 제제 상의 N-글리칸의 분포

	루미자임	BP-rhGAA*	ATB200	
			1	2
복합형 N-글리칸	70.7%	48.9%	51.0%	47.5%
하이브리드형 N-글리칸	6.7%	9.7%	4.4%	3.7%
고-만노스형 N-글리칸:				
비-인산화	15.8%	23.7%	14.0%	9.9%
모노-M6P	5.2%	10.4%	13.4%	14.2%
비스-M6P	**1.6%**	6.8%	**17.2%**	**24.7%**

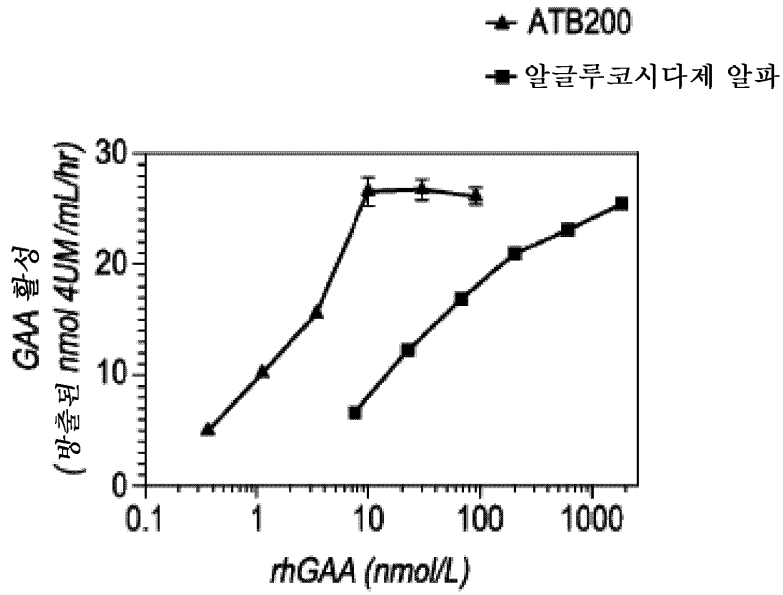
도면9a



도면9b



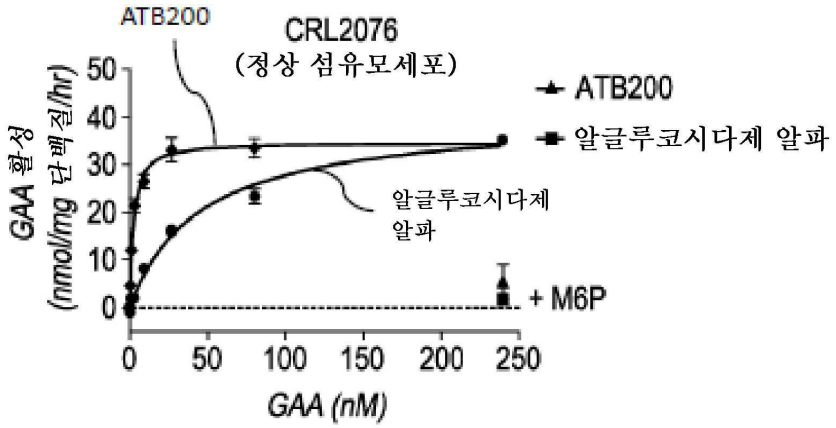
도면10a



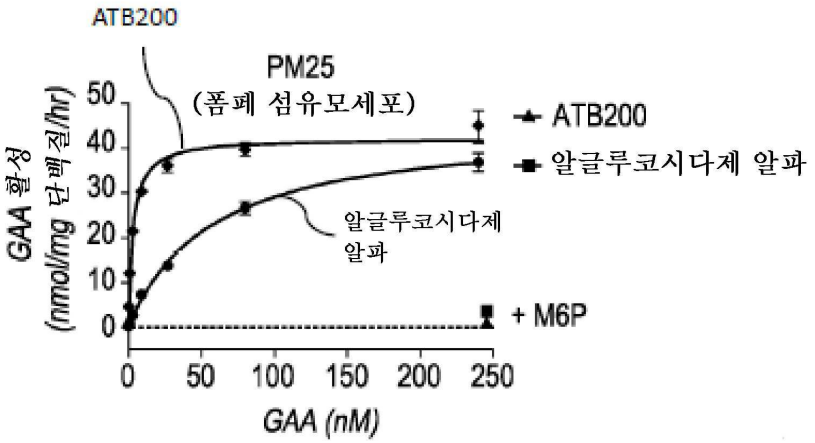
도면10b

글리칸	알글루코시다제 알파 (mol 비스-글리칸/mol 단백질)	ATB200 (mol 비스-글리칸/mol 단백질)
비스-M6P	0.1	1.3

도면11a



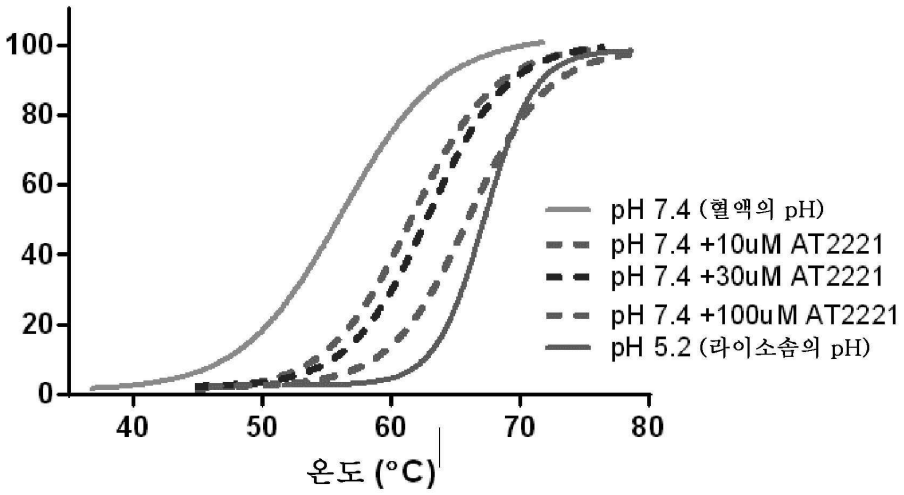
도면11b



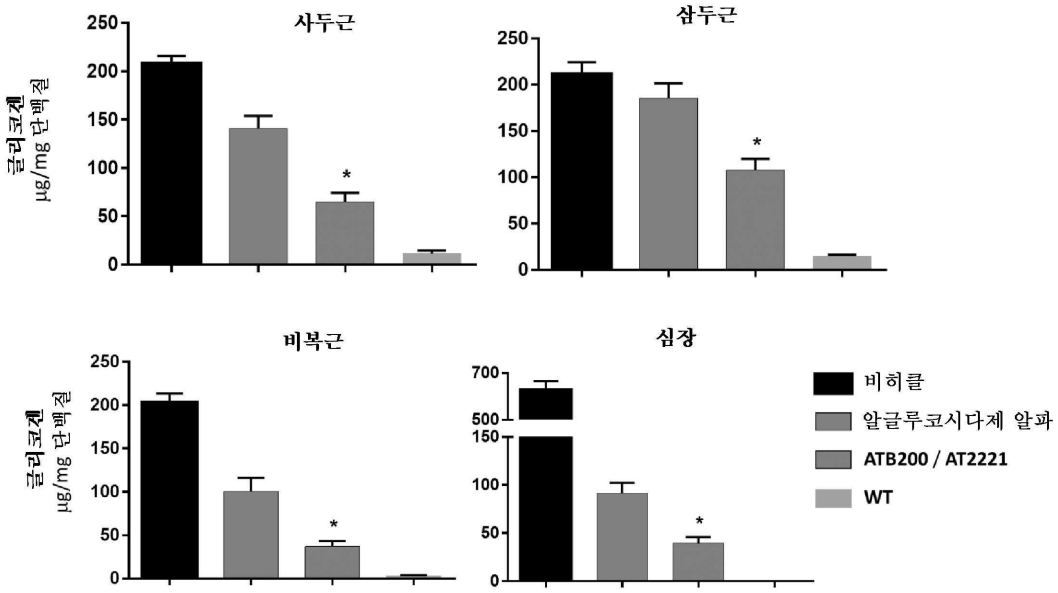
도면11c

세포주	$K_{흡수}$ (nM)	
	AT200	루미자임
정상	2	56
폼페	3	57

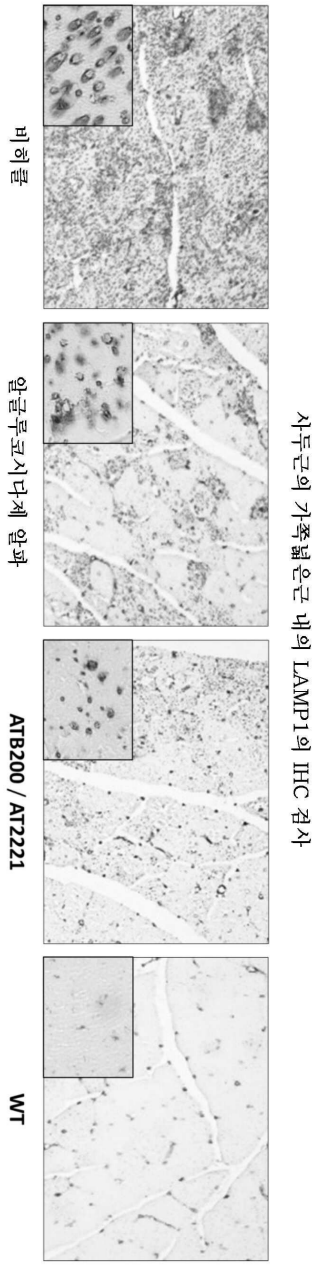
도면12


100
80
60
40
20
0
40
50
60
70
80
온도 (°C)
pH 7.4 (혈액의 pH)
pH 7.4 +10uM AT2221
pH 7.4 +30uM AT2221
pH 7.4 +100uM AT2221
pH 5.2 (라이소솜의 pH)

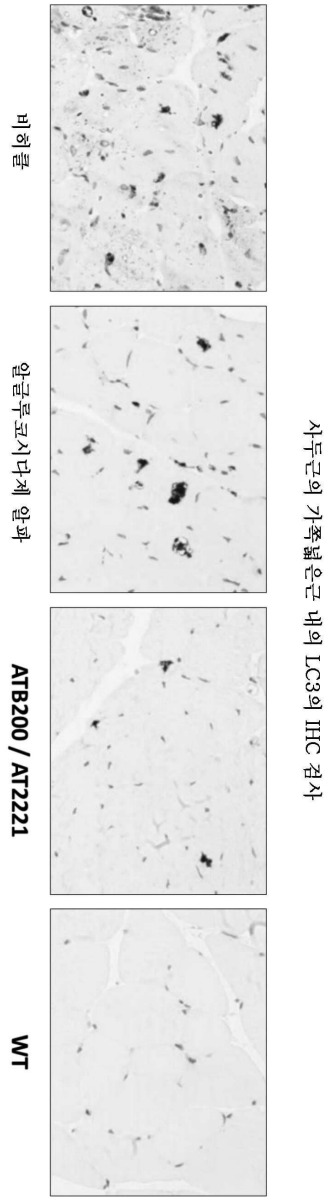
도면13


사두근
삼두근
비복근
심장
글리코겐
μg/mg 단백질
250
200
150
100
50
0
700
500
150
*
비히클
알글루코시다제 알파
ATB200 / AT2221
WT

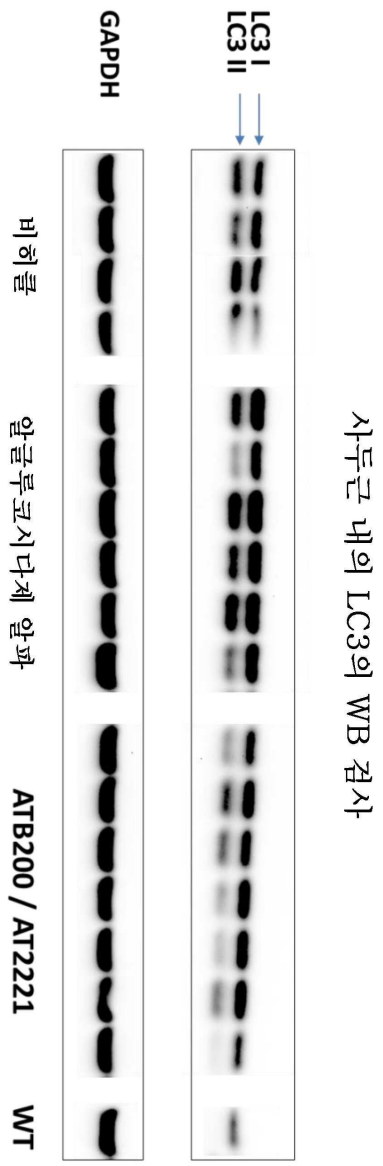
도면14



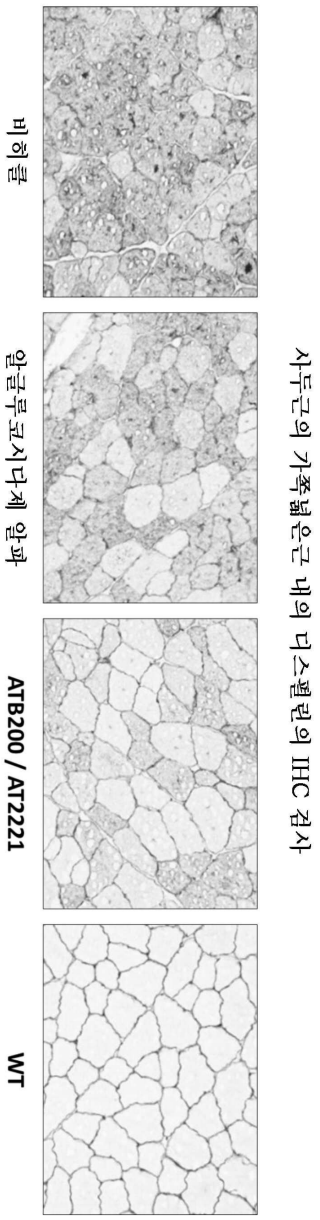
도면15a



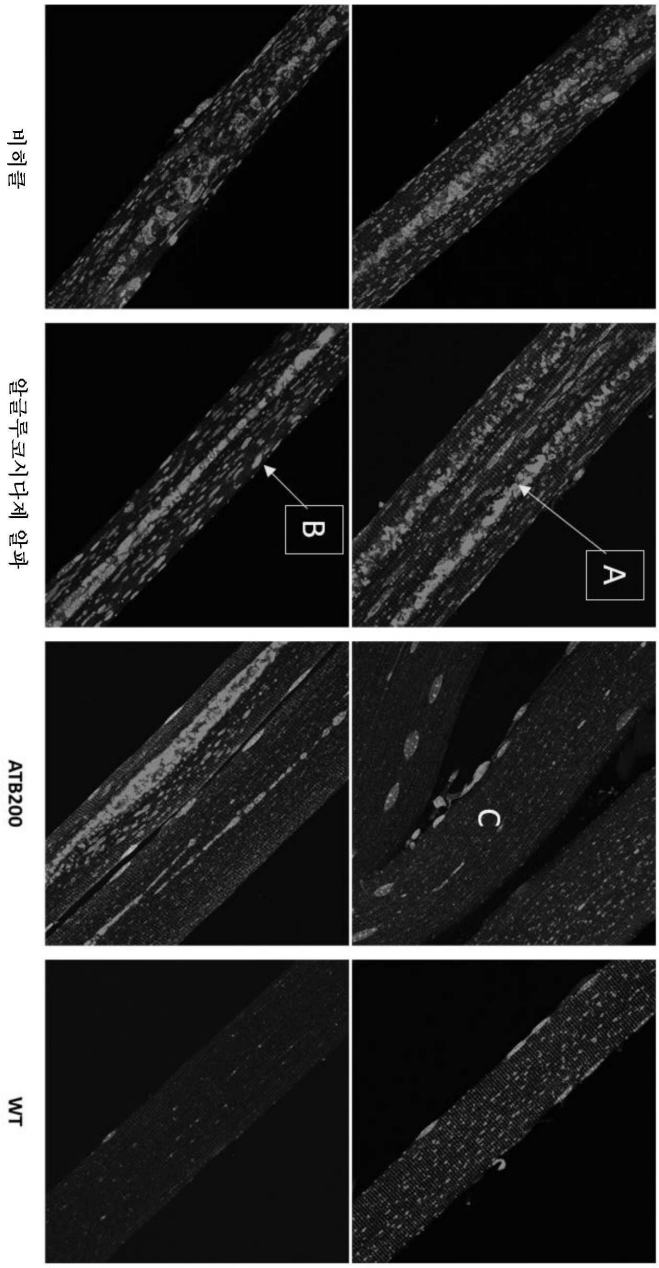
도면15b


사두근 내의 LC3의 WB 검사
LC3 I
LC3 II
GAPDH
비히클
알글루코시다제 알파
ATB200 / AT2221
WT

도면16

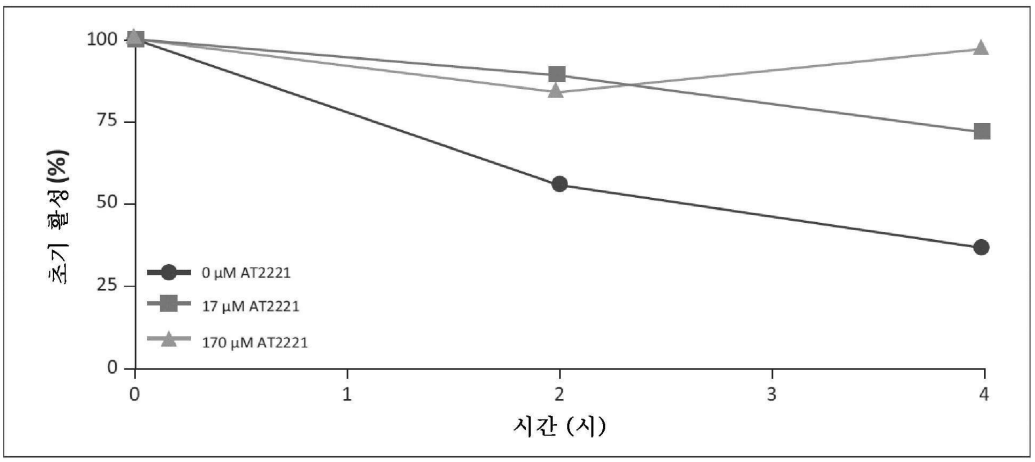


도면17

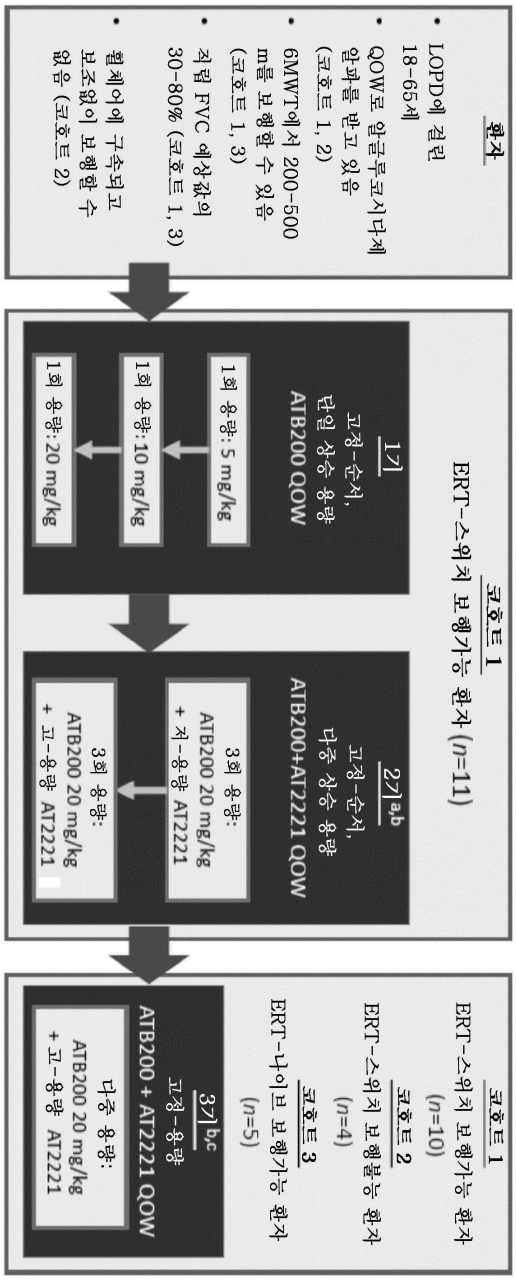


도면18

AT2221에 의한 ATB200의 안정화

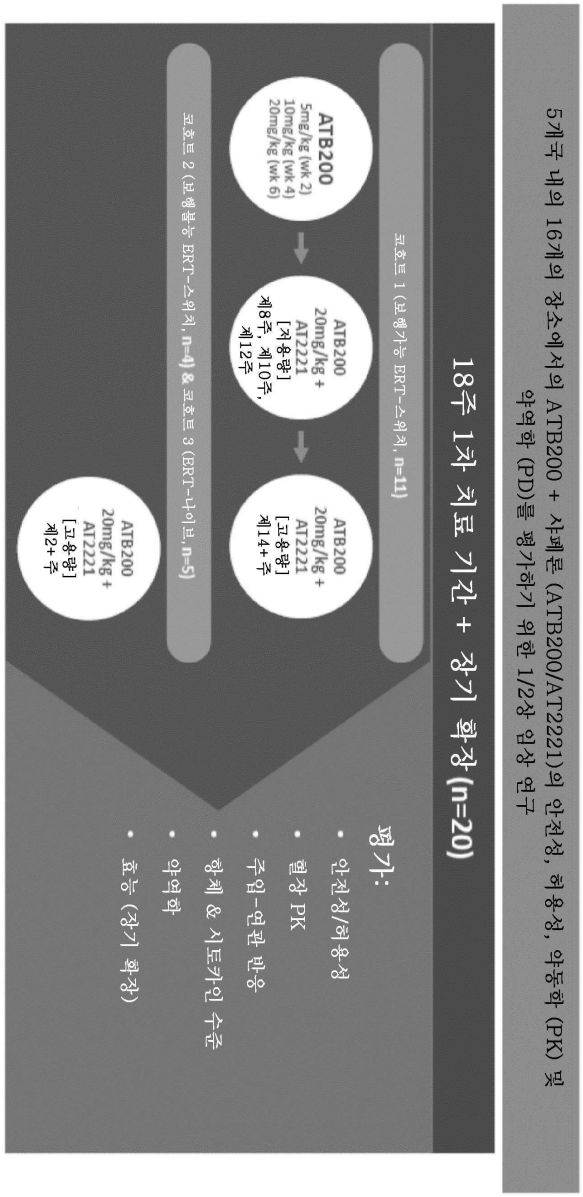


도면19a



6MWT = 6분 보행 검사; FVC = 강제 폐활량; QOW = 격주.
a 코호트 1로부터의 2명의 갑시 환자로부터의 안전성 메이터를 각각의 용량 수준에서 검토한 후 코호트 2 및 3에서 투여하였다. b 2기 및 3기 동안, ATB200 정맥내 주입을 시작하기 전에 AT2221을 경구 투여하였다. 모든 용량에 대해, ATB200을 4시간 기간 내에 정맥내 주입하였다. c 코호트 2 및 3의 처음 2명의 환자가 이들의 각각의 코호트에 대한 갑시 환자로서의 역할을 하였다.
1. Johnson FK et al. Presented at the 13th Annual WORLDSymposium™; February 13-17, 2017; San Diego, CA, USA. Poster no. LB-26 2. Roberts M et al. Presented at the 22nd International Congress of the World Muscle Society; October 3-7, 2017; St. Malo, France. Poster no. LB.P.3.

도면19b


5개국 내의 16개의 장소에서의 ATB200 + 샤페론 (ATB200/AT2221)의 안전성, 허용성, 약동학 (PK) 및 약역학 (PD)를 평가하기 위한 1/2상 임상 연구
18주 1차 치료 기간 + 장기 확장 (n=20)
코호트 1 (보행가능 ERT-스위치, n=11)
ATB200 5mg/kg (wk 2) 10mg/kg (wk 4) 20mg/kg (wk 6)
ATB200 20mg/kg + AT2221 [저용량] 제8주, 제10주, 제12주
ATB200 20mg/kg + AT2221 [고용량] 제14+ 주
코호트 2 (보행불능 ERT-스위치, n=4) & 코호트 3 (ERT-나이브, n=5)
ATB200 20mg/kg + AT2221 [고용량] 제2+ 주
평가:
안전성/허용성
혈장 PK
주입-연관 반응
항체 & 시토카인 수준
약역학
효능 (장기 확장)

도면19c

기준선 특성 (N=20)

기준선에서의 유의한 손상으로, 3개의 코호트에 걸쳐 등록된 환자는 전체 LOPD 집단을 대표한다

	코호트 1 ERT-스위치 보행가능 (N=11)	코호트 2 ERT-스위치 보행불능 (N=4)	코호트 3 ERT-나이브 (N=5)
나이, 세, 평균 (최소, 최대)	49.4 (28, 66)	36.0 (18, 56)	49.4 (24, 65)
성별, M:F	9:2	3:1	1:4
알글루코시다제 알파 중인 시간, 년, 평균 (SD)	4.8 (1.42)[a]	8.9 (3.8)	NA
6MWT, 미터, 평균 (SD)	392.0 (93.4)	NA	399.5 (83.5)
직립 FVC, 예상값의 %, 평균 (SD)	52.3 (13.2)	NA	53.4 (20.3)

NA = 적용가능하지 않음; SD = 표준 편차
[a] 코호트 1 환자는 기준선에서 2-6년 동안 알글루코시다제 알파 중인 것이 요구되었다

도면20

AT2221 약동학 요약

치료	C_{max} (ng/mL)[a]	t_{max} (h)[b]	AUC_{0-t} (ng·h/mL)[a]	$AUC_{0-\infty}$ (ng·h/mL)[a]	$t_{1/2}$ (h)[c]	CL/F (L/h)[c]	V_z/F (L)[c]
저용량 MD (N=11)	1504 (23.9)	3.0 (1.5-4.0)	11,968 (24.5)	12,913 (25.6)	6.5 (29.3)	10.3 (21.3)	97.3 (39.8)
고용량 MD (N=16)	3086 (29.4)	3.0 (1.0-4.0)	24,095 (25.9)	25,506 (25.9)	5.9 (18.3)	10.5 (22.9)	90.5 (34.1)

CL/F = AT2221 경구 생체이용률에 대해 조정된 혈장 클리어런스; V_z/F = AT2221 경구 생체이용률에 대해 조정된 겉보기 말기 분포 용적.
[a] 기하 평균 (CV%). [b] 중앙값 (최소-최대). [c] 산술 평균 (CV%).

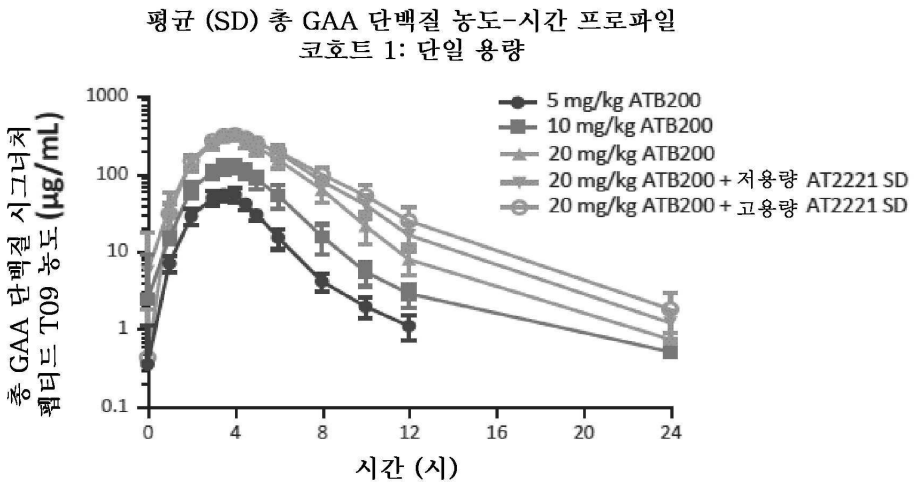
도면21

시그너처 펩티드 T09에 의한 총 GAA 단백질

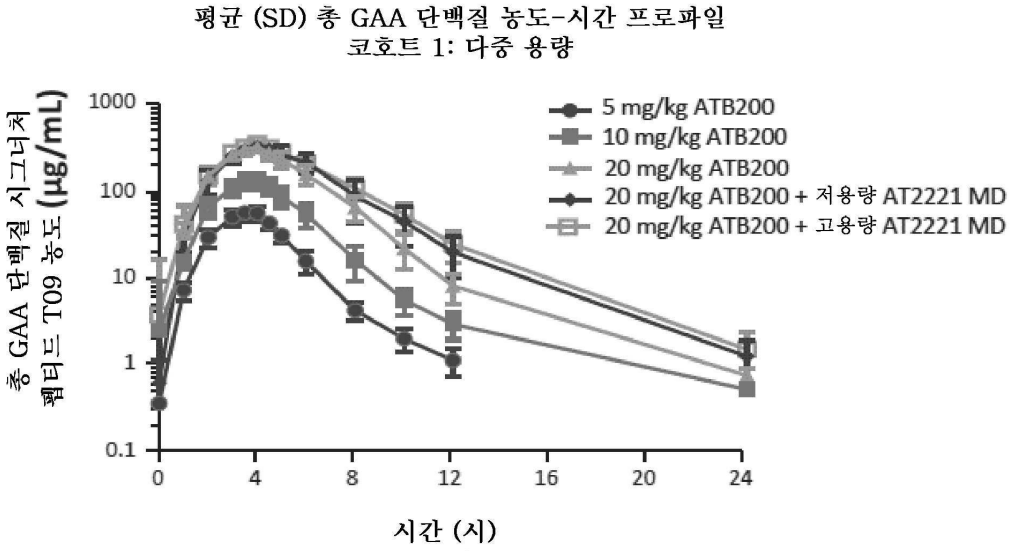
코호트	치료	C_{max} (ng/mL)[a]	t_{max} (hr)[b]	AUC $t_{max-24h}$ (ng·hr/mL)[a]	$AUC_{0-\infty}$ (ng·hr/mL)[a]	F_{rel} [c]	α $t_{½}$ (hr)[c]	CL_T (L/hr)[c]
1	ATB200 5 mg/kg 단독[d]	58.4 (19.1)	4.0 (3.0-4.0)	108 (25.1)	211 (17.2)	—	1.1 (10.2)	2.2 (16.9)
1	ATB200 10 mg/kg 단독[d]	135 (18.3)	4.0 (3.5-4.0)	287 (25.6)	**538 (24.4)**	2.6 (9.4)	**1.3 (10.6)**	1.7 (22.4)
1	ATB200 20 mg/kg 단독[d]	325 (13.5)	4.0 (3.5-4.0)	844 (20.8)	**1418 (16.9)**	6.9 (7.4)	1.5 (8.5)	1.3 (18.4)
1	ATB200 20 mg/kg + AT2221 저용량 MD[d]	335 (15.4)	4.0 (3.5-5.0)	1062 (23.8)	1662 (20.5)	1.17 (7.7)	1.8 (21.8)	1.1 (20.5)
1	ATB200 20 mg/kg + AT2221 고용량 MD[d]	345 (18.5)	4.0 (3.5-4.0)	1203 (24.2)	1821 (21.5)	1.28 (9.4)	2.1 (16.1)	1.0 (22.7)
3	ATB200 20 mg/kg + AT2221 고용량 MD[e]	322 (14.3)	4.0 (4.0-4.5)	1147 (20.9)	**1775 (19.3)**	N/A	**2.2 (9.9)**	0.8 (28.4)

AUC = 곡선하 면적; CL_T = 총 신체 클리어런스; C_{max} = 최대 약물 농도; CV = 변동 계수; MD = 다중 용량; $t_{1/2}$ = 반감기; t_{max} = 최대 약물 농도까지의 시간; F_{rel} = 20 mg/kg 및 10 mg/kg 대 5 mg/kg, 및 20 mg/kg ATB200 + 저용량 또는 고용량 AT2221 대 20 mg/kg 단독의 AUC 비.
[a] 기하 평균 (CV%). [b] 중앙값 (최소-최대). [c] 산술 평균 (CV%). [d]n=11. [e]n=5.

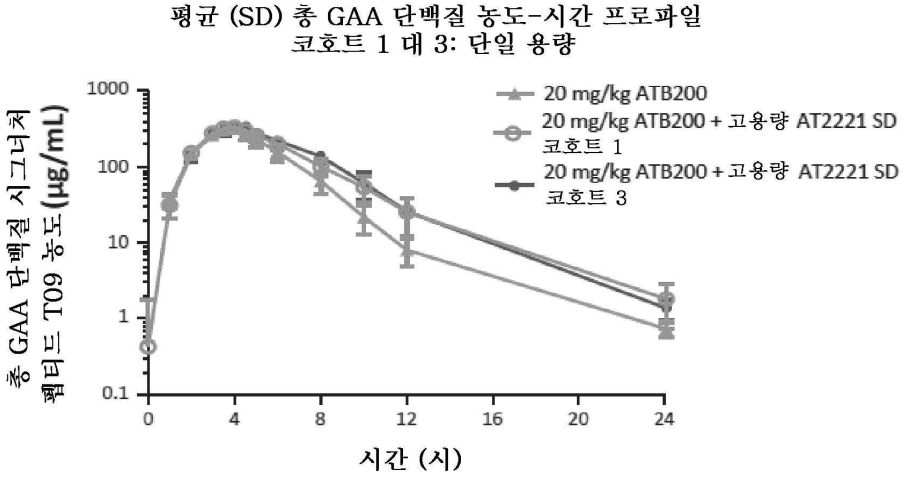
도면22a



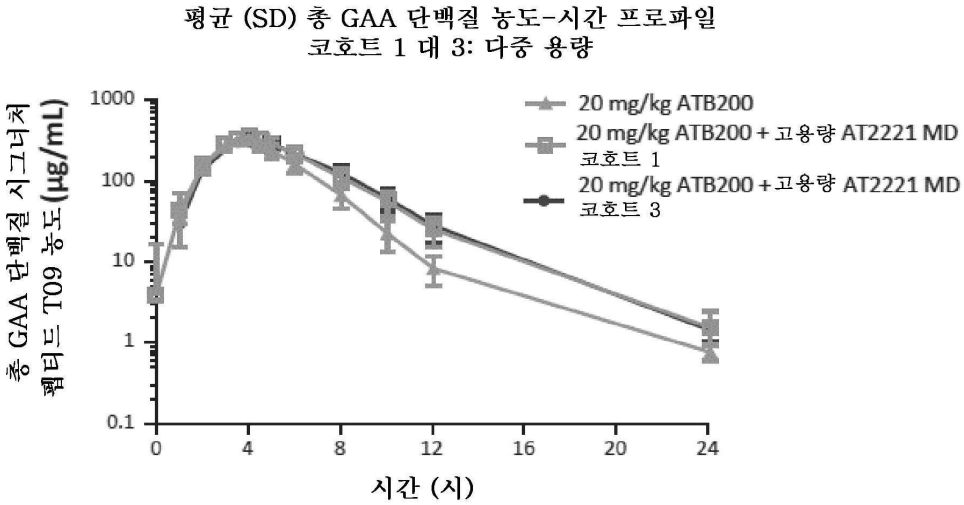
도면22b


평균 (SD) 총 GAA 단백질 농도-시간 프로파일
코호트 1: 다중 용량
총 GAA 단백질 시그너처 펩티드 T09 농도 (µg/mL)
1000
100
10
1
0.1
0
4
8
12
16
20
24
시간 (시)
5 mg/kg ATB200
10 mg/kg ATB200
20 mg/kg ATB200
20 mg/kg ATB200 + 저용량 AT2221 MD
20 mg/kg ATB200 + 고용량 AT2221 MD

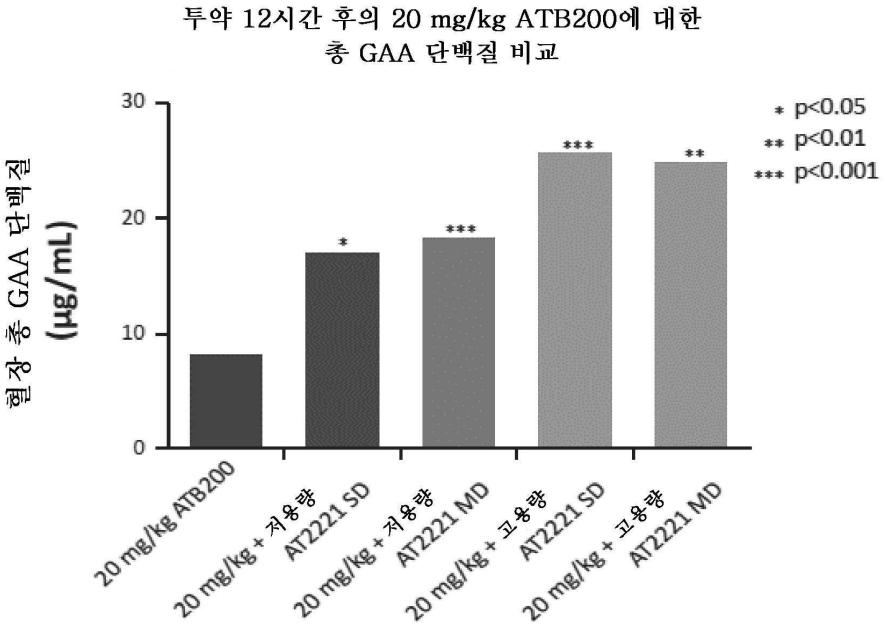
도면22c


평균 (SD) 총 GAA 단백질 농도-시간 프로파일
코호트 1 대 3: 단일 용량
총 GAA 단백질 시그너처 펩티드 T09 농도 (µg/mL)
1000
100
10
1
0.1
0
4
8
12
16
20
24
시간 (시)
20 mg/kg ATB200
20 mg/kg ATB200 + 고용량 AT2221 SD 코호트 1
20 mg/kg ATB200 + 고용량 AT2221 SD 코호트 3

도면22d

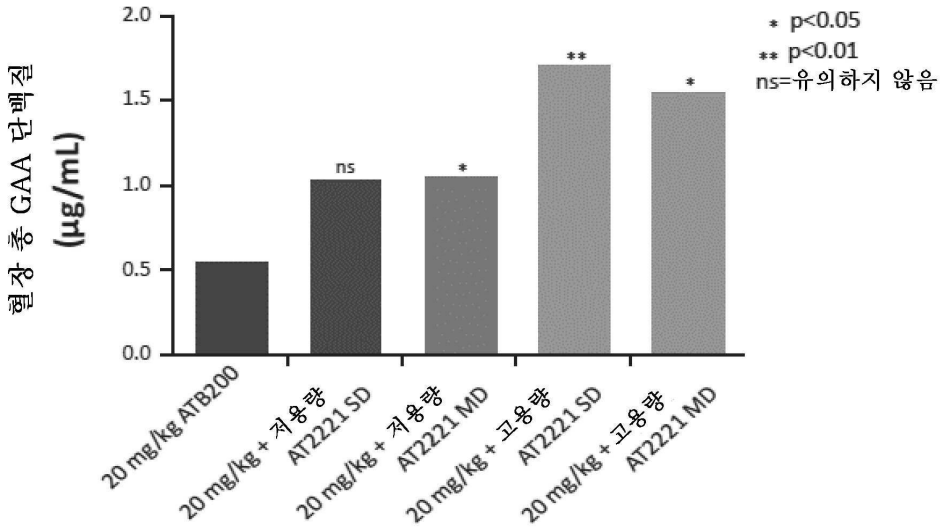

평균 (SD) 총 GAA 단백질 농도-시간 프로파일
코호트 1 대 3: 다중 용량
총 GAA 단백질 시그너처 펩티드 T09 농도 (µg/mL)
1000
100
10
1
0.1
0
4
8
12
16
20
24
시간 (시)
20 mg/kg ATB200
20 mg/kg ATB200 + 고용량 AT2221 MD 코호트 1
20 mg/kg ATB200 + 고용량 AT2221 MD 코호트 3

도면22e


투약 12시간 후의 20 mg/kg ATB200에 대한
총 GAA 단백질 비교
혈장 총 GAA 단백질 (µg/mL)
30
20
10
0
* p<0.05
** p<0.01
*** p<0.001
*
***
***
**
20 mg/kg ATB200
20 mg/kg + 저용량 AT2221 SD
20 mg/kg + 저용량 AT2221 MD
20 mg/kg + 고용량 AT2221 SD
20 mg/kg + 고용량 AT2221 MD

도면22f

투약 24시간 후의 20 mg/kg ATB200에 대한 총 GAA 단백질 비교



도면23

시그너처 펩티드 T09에 의한 총 GAA 단백질에 대한 ANOVA

기준	테스트	AUC 비 기준의 %	90% 하한 CI	90% 상한 CI
코호트 1 SD	코호트 1 MD	98.0	94.9	101.2
코호트 1 SD	코호트 3 SD	100.1	82.3	121.8
코호트 1 MD	코호트 3 MD	97.5	80.2	118.6

AUC = 곡선하 면적; CI = 신뢰 구간.

도면24a

6분 보행 검사

ERT-스위치 보행가능 환자 및 ERT-나이브 환자 양쪽 모두에 대해 6개월에 6MWT가 개선되었고, 12개월까지 지속적인 이익이 관찰되었다

6분 보행 검사 (m); 평균 (SD)

	기준선 (n=10)	CFBL M6 (n=10)	CFBL M9 (n=10)	CFBL M12 (n=8)
코호트 1 ERT-스위치 보행가능	397.2 (96.8)	+23.9 (52.2)	+24.5 (40.8)	+57.4 (34.4)
	기준선 (n=5)	CFBL M6 (n=5)	CFBL M9 (n=5)	CFBL M12 (n=2)
코호트 3 ERT-나이브	399.5 (83.5)	+41.8 (29.4)	+63.5 (23.1)	+86.8 (11.1)

- 6개월, 9개월 및 12개월에 각각 7/10, 8/10, 및 8/8명의 ERT-스위치 환자에서 6MWT가 증가하였다.
- 6개월, 9개월 및 12개월에 각각 5/5, 5/5, 및 2/2명의 ERT-나이브 환자에서 6MWT가 증가하였다.

도면24b

환자	기준선	기준선으로부터의 변화		
		6개월	9개월	12개월
코호트 1 보행가능 ERT-스위치				
1	544	+51	+56	+112
2	379	+125	+110	+103
3	339	+21	+45	+73
4	332	+8	+26	+45
5	456	−5	+8	+41
6	500	+55	+20	+33
7	220	+29	+21	+30
8	410	+38	+11	+22
9	464	−4	−9	—
10	328	−78	−43	—
평균 (SD)	397.2 (96.8)	+23.9 (52.2)	+24.5 (40.8)	+57.4 (34.4)
코호트 3 ERT-나이브				
1	480	+41	+72	+95
2	384	+62	+78	+79
3	460	+79	+89	—
4	406	+14	+44	—
5	267	+13	+35	—
평균 (SD)	399.5 (83.5)	+41.8 (29.4)	+63.5 (23.1)	+86.8 (11.1)

도면24c

기타 운동 기능 검사

	평가, 초	기준선, 평균 (SD)	6개월에 대한 기준선으로부터의 변화, 평균(SD)	9개월에 대한 기준선으로부터의 변화, 평균(SD)	12개월에 대한 기준선으로부터의 변화, 평균(SD)
코호트 1 ERT-스위치		n=10	n=10	n=10	n=8
	일어나 걸어가기	10.5 (6.6)	−1.8 (3.5)	−1.2 (3.3)	−1.0 (2.2)
	4-계단 오르기	4.1 (2.7)	−0.6 (1.6)	−0.4 (1.6)	−1.0 (1.5)
	10M 보행	7.4 (3.0)	+0.1 (1.9)	−0.1 (1.6)	−0.5 (1.7)
	가워스[a]	7.9 (2.9)	−1.1 (3.8)	4.5[b] (13.4)	−2.6 (1.9)
	GSGC 점수	12.6 (4.8)	+0.1 (3.9)	+0.5 (4.6)	−1.9 (2.2)
코호트 3 ERT-스위치		n=5	n=5	n=5	n=2
	일어나 걸어가기	9.4 (2.9)	−1.0 (1.1)	−0.6 (1.4)	−1.8 (0.5)
	4-계단 오르기	4.2 (1.5)	−0.6 (0.3)	0.0 (1.5)	−0.4 (0.4)
	10M 보행	7.9 (3.0)	−0.7 (1.1)	−1.3 (1.0)	−0.6 (0.0)
	가워스	13.9 (11.0)	7.9[c] (20.9)	−1.6 (3.9)	−2.1 (1.3)
	GSGC 점수	12.2 (3.6)	−1.8 (3.8)	−2.4 (3.4)	0.0 (1.4)

GSGC = 보행-계단-가워스-의자
GSGC는 4가지 운동 기능 평가의 관찰자-등급화 조합 점수이다: 보행 (10미터 보행), 4-계단 오르기, 가워스 (바닥에서 일어서기), 및 의자에서 일어나기. 각각의 테스트가 1점 (정상)에서 7점 (수행할 수 없음; 의자에서 일어나기 검사의 경우 최대 6점)까지 채점된다. 총점은 4점 내지 27점 범위이다.
[a]N=9, 환자가 검사 수행을 거부하는 것으로 인해 누락값이 수득되지 않음.
[b]기준선으로부터의 중앙값 변화가 -1.5였고, 7/9명의 환자가 감소가 있었다.
[c]기준선으로부터의 중앙값 변화가 -0.8이었고, 4/5명의 환자가 감소가 있었다.

도면25

코호트 2 환자에서의 근력 검사 (QMT)

	검사된 근육 군	기준선, 평균 (SD) n=4	6개월에 대한 기준선으로부터의 변화, 평균(SD) n=4	9개월에 대한 기준선으로부터의 변화, 평균(SD) n=4
정량적 근육 검사 - 힘측정계, 파운드 힘	어깨 내전[a]	5.7 (8.8)	+8.1 (12.8)	+9.6 (12.3)
	어깨 외전	16.7 (18.1)	+1.0 (6.6)	+0.5 (9.3)
	팔꿈치 굽힘	12.7 (13.7)	+2.4 (15.9)	+6.0 (19.3)
	팔꿈치 폄	12.3 (13.9)	+5.5 (4.7)	+7.5 (8.2)
도수 근육 검사, 파운드 힘[b]	어깨 내전[a]	5.7 (8.8)	+8.1 (12.8)	+9.6 (12.3)
	어깨 외전	16.7 (18.1)	+1.0 (6.6)	+0.5 (9.3)
	팔꿈치 굽힘	12.7 (13.7)	+2.4 (15.9)	+6.0 (19.3)
	팔꿈치 폄	12.3 (13.9)	+5.5 (4.7)	+7.5 (8.2)

측정치는 조합된 오른쪽 및 왼쪽에 대한 파운드의 힘을 나타낸다.
[a] 1명의 환자에 대해 어깨 내전이 입수가능하지 않음.
[b] 채점: (1) 가시적인 근육 운동이 있지만, 관절에서의 운동이 없음; (2) 관절에서의 운동이 있지만, 중력에 대항하지 않음; (3) 중력에 대항하여 운동하지만, 부가된 저항에 대항하지 않음; (4) 저항에 대항하여 운동하지만, 정상보다 적음; (5) 정상적인 힘.

도면26a

코호트 1에서의 도수 근육 검사 점수: ERT-스위치 보행가능 환자

6개월, 9개월 및 12개월에 ERT-스위치 환자에서 도수 근력의 증가가 관찰되었다

	신체 영역	기준선		기준선으로부터의 변화					
				6개월		9개월		12개월	
		평균 (SD)	n	평균 (SD)	n	평균 (SD)	n	평균 (SD)	n
코호트 1 ERT-스위치 보행가능	상체 최대 점수 40	**35.4** (5.7)	10	**+1.2** (2.4)	10	**+1.7** (2.8)	10	**+2.0** (3.9)	8
	하체 최대 점수 40	**31.0** (3.0)	10	**+0.9** (1.8)	9	**+2.2** (2.4)	10	**+2.3** (2.9)	8
	전신 최대 점수 80	**66.4** (8.1)	10	**+2.8** (3.4)	10	**+4.0** (3.1)	10	**+4.5** (2.8)	8

도면26b

코호트 2에서의 도수 근육 검사 점수: ERT-스위치 보행불능 환자

6개월 및 9개월에 ERT-스위치 보행불능 환자에서 도수 근력의 증가가 관찰되었다

	신체 영역	기준선		기준선으로부터의 변화			
				6개월		9개월	
		평균 (SD)	n	평균 (SD)	n	평균 (SD)	n
코호트 2 ERT-스위치 보행불능	상체 최대 점수 40	**13.3** (12.2)	3	**+5.7** (2.1)	3	**+2.3** (5.5)	3

도면26c

코호트 3에서의 도수 근육 검사 점수: ERT-나이브 환자

6개월, 9개월 및 12개월에 ERT-나이브 환자에서 도수 근력의 증가가 관찰되었다

	신체 영역	기준선		기준선으로부터의 변화					
				6개월		9개월		12개월	
		평균 (SD)	n	평균 (SD)	n	평균 (SD)	n	평균 (SD)	n
코호트 3 ERT-나이브	상체 최대 점수 40	36.8 (3.4)	5	**−0.2** (1.3)	5	**+0.8** (1.9)	5	**−0.5** (0.7)	2
	하체 최대 점수 40	29.0 (2.0)	4	**+0.5** (1.9)	4	**+1.3** (3.6)	4	**+4.5** (0.7)	2
	전신 최대 점수 80	66.9 (3.7)	5	**−0.7** (3.2)	5	**+1.3** (3.1)	5	**+4.0** (1.4)	2

도면27

폐 기능 검사: FVC, MIP, MEP

	평가	기준선, 평균(SD)	6 개월에 대한 기준선으로 부터의 변화, 평균(SD)	9개월에 대한 기준선으로 부터의 변화, 평균(SD)	12개월에 대한 기준선으로 부터의 변화, 평균(SD)
코호트 1 ERT-스위치		n=9	n=9	n=9	n=7
	FVC, 예상값의 %[a]	52.6 (14.7)	−1.3 (4.1)	−1.7 (3.9)	−3.1 (4.8)
	MIP	35.7 (11.0)	+0.3 (4.6)	−0.6 (3.0)	+0.3 (3.6)
	MEP	72.6 (32.6)	+16.1 (42.1)	+23.7 (38.1)	+36.8 (45.7)
코호트 3 ERT-나이브		n=5	n=5	n=5	n=2
	FVC, 예상값의 %	53.4 (20.3)	+4.2 (5.6)	+6.2 (5.3)	+6.0 (7.1)
	MIP	32.6 (18.5)	+11.0 (5.0)	+12.0 (10.3)	−0.5 (9.2)
	MEP	60.6 (8.3)	−0.4 (12.4)	+7.2 (15.3)	−2.0 (9.9)

MEP = 최대 호기압; MIP = 최대 흡기압.
[a]1명의 환자에 대해 FVC가 입수가능하지 않음
MEP 및 MIP는 물의 센티미터로 측정되었다.

도면28

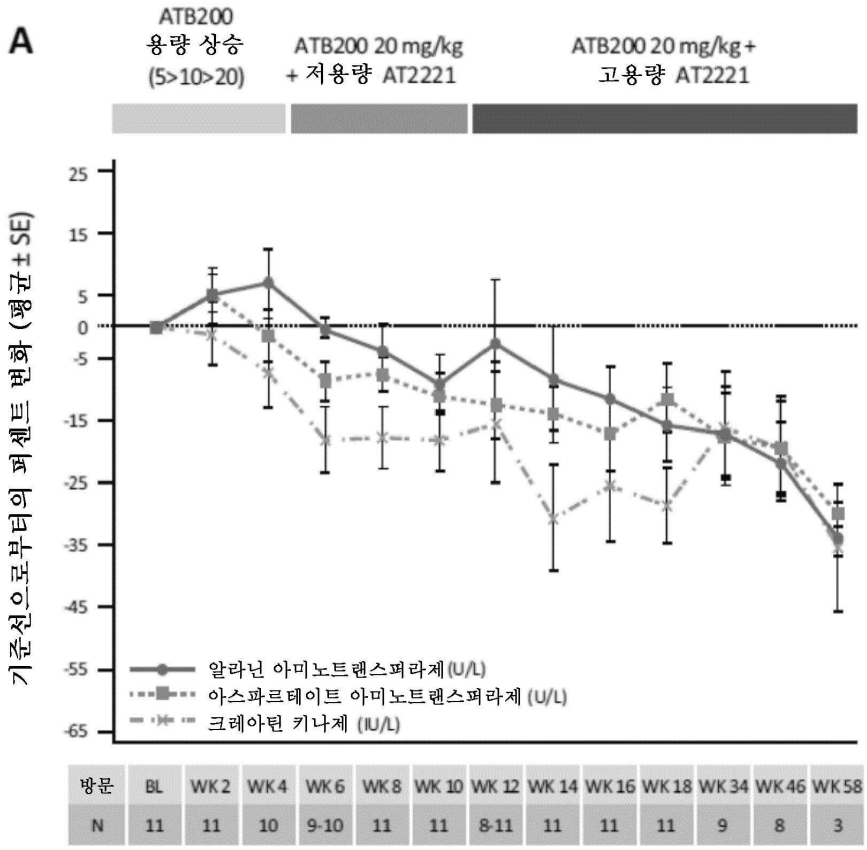
피로 중증도 척도

	기준선, 평균(SD)	6개월에 대한 기준선으로부터의 변화, 평균(SD)	9개월에 대한 기준선으로부터의 변화, 평균(SD)	12개월에 대한 기준선으로부터의 변화, 평균(SD)
코호트 1 보행가능 ERT-스위치	n=10	n=10	n=10	n=8
	53.5 (7.7)	-8.0 (10.7)	-6.8 (6.8)	-7.8 (6.0)
코호트 2 보행불능 ERT-스위치	n=4	n=2	n=2	—
	54.0 (8.5)	-3.5 (7.8)	-6.5 (5.0)	—
코호트 3 ERT-나이브	n=5	n=5	n=5	n=2
	39.2 (12.7)	-5.2 (11.7)	-7.8 (7.5)	-1.5 (2.1)

피로 중증도 척도는 각각 1 내지 7점의 척도로 채점되는 9개의 질문으로 이루어진다. 총점은 9 내지 63점 범위이고, 값이 높을수록 질환 상태로 인한 더 높은 수준의 피로를 나타낸다. 건강한 집단에서의 표준치는 ~21이다.[5]

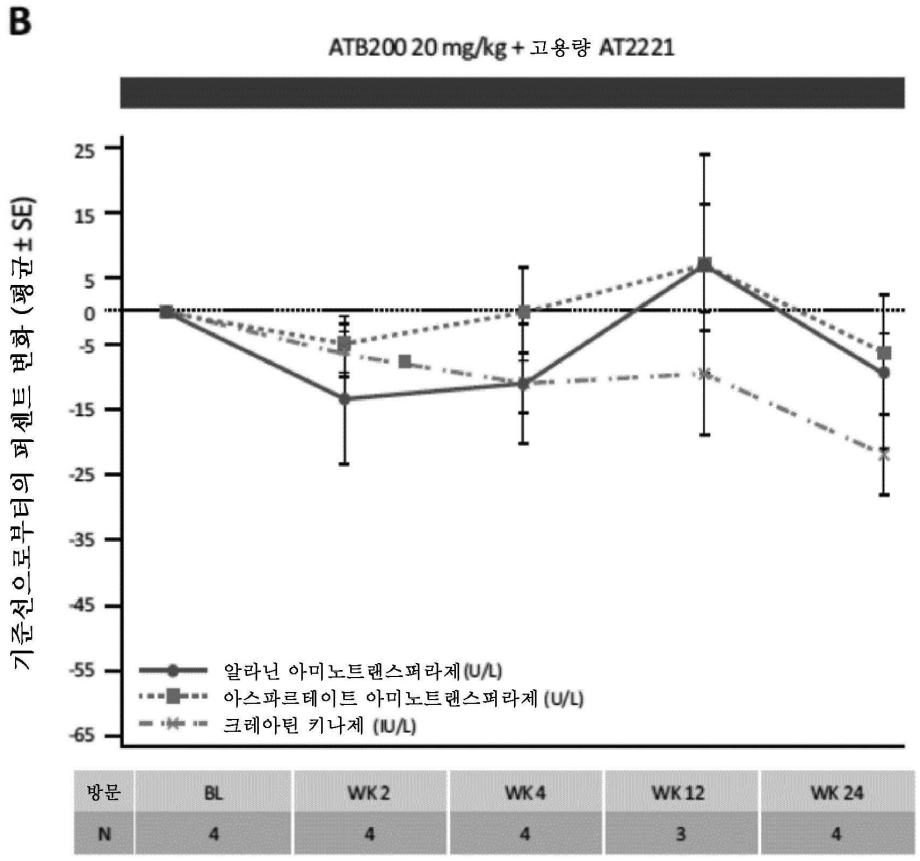
도면29a

코호트 1 환자에서의 근육 손상 마커의 기준선으로부터의 평균 백분율 변화



도면29b

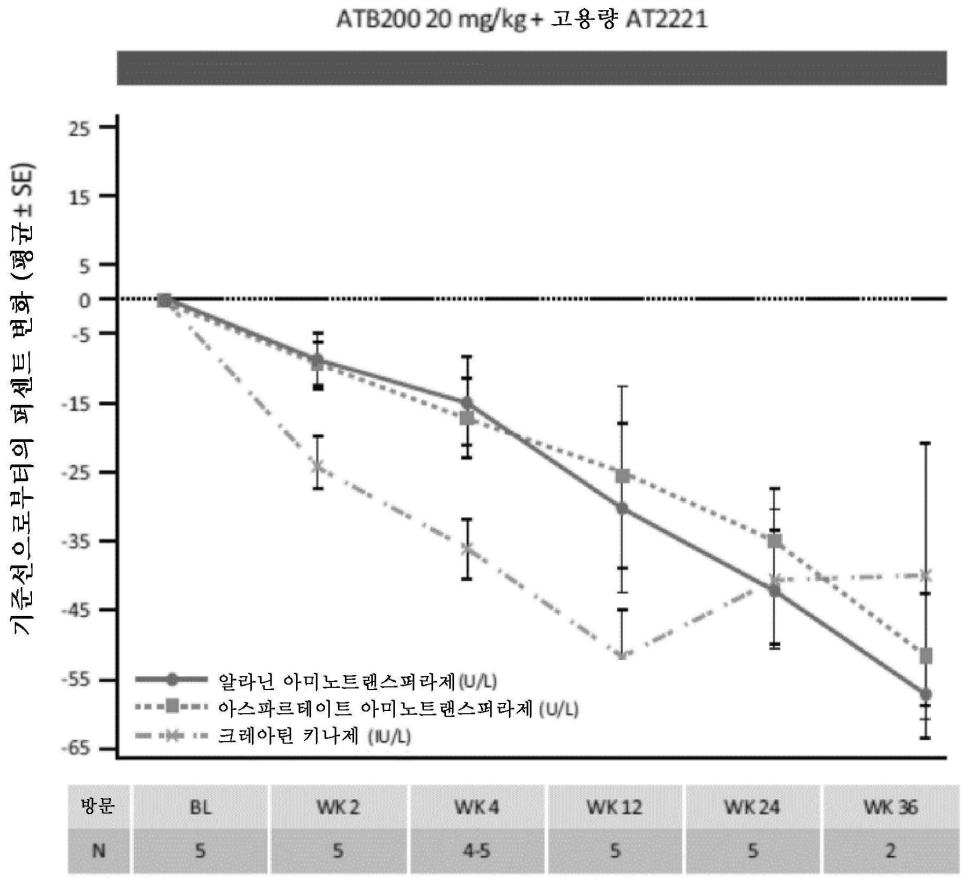
코호트 2 환자에서의 근육 손상 마커의 기준선으로부터의 평균 백분율 변화



방문	BL	WK 2	WK 4	WK 12	WK 24
N	4	4	4	3	4

도면29c

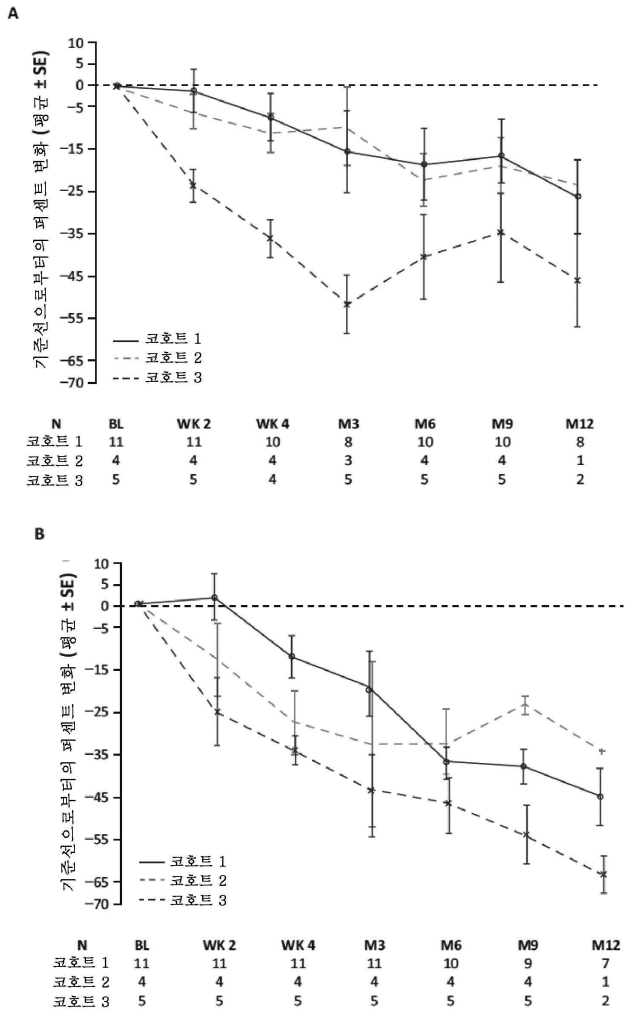
코호트 3 환자에서의 근육 손상 마커의 기준선으로부터의 평균 백분율 변화



방문	BL	WK 2	WK 4	WK 12	WK 24	WK 36
N	5	5	4-5	5	5	2

도면29d

기준선으로부터의 평균 백분율 변화:
(A) 근육 손상 마커 (크레아틴 키나제) 및
(B) 글리코겐 축적 마커 (소변 육탄당 사당류)



도면30

안전성 요약 (N=20)[a]

ATB200/AT2221에 대한 안전성 데이터는 모든 코호트에 걸쳐 550+ 회의 총 주입 후에 IAR의 비율이 매우 낮으면서 (<1%), AE가 일반적으로 경미하고 일시적이었음을 나타낸다

- AE가 일반적으로 경미하고 일시적이었다
  - 치료로 발생한 가장 통상적인 AE는 복통[b] (8/20), 설사 (8/20), 코인두염 (6/20), 구역 (5/20), 두통 (5/20), 및 상부 기도 감염 (5/20)이었다
- 550+ 회의 주입에서 3회의 IAR 사건이 있었고, 표준 예비투약에 의해 이를 제어하였다
  - 보행불능 ERT-스위치 환자에서의 1회의 IAR 사례 (피부 변색)
  - ERT-나이브 환자에서의 2회의 IAR 사례 (국소적인 가려움, 홍반 및 작열감)
- 최장 치료 기간은 20+ 개월이다

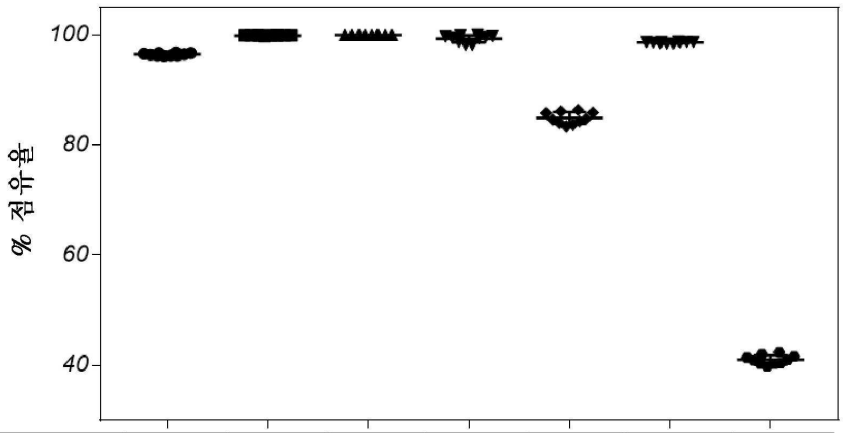
AE, 유해 사례; IAR, 주입-연관 반응
[a] 중간 데이터 분석을 통해 보고됨 (최대 20+ 개월)
[b] 상복부 통증 및 하복부 통증을 포함함

도면31

결론

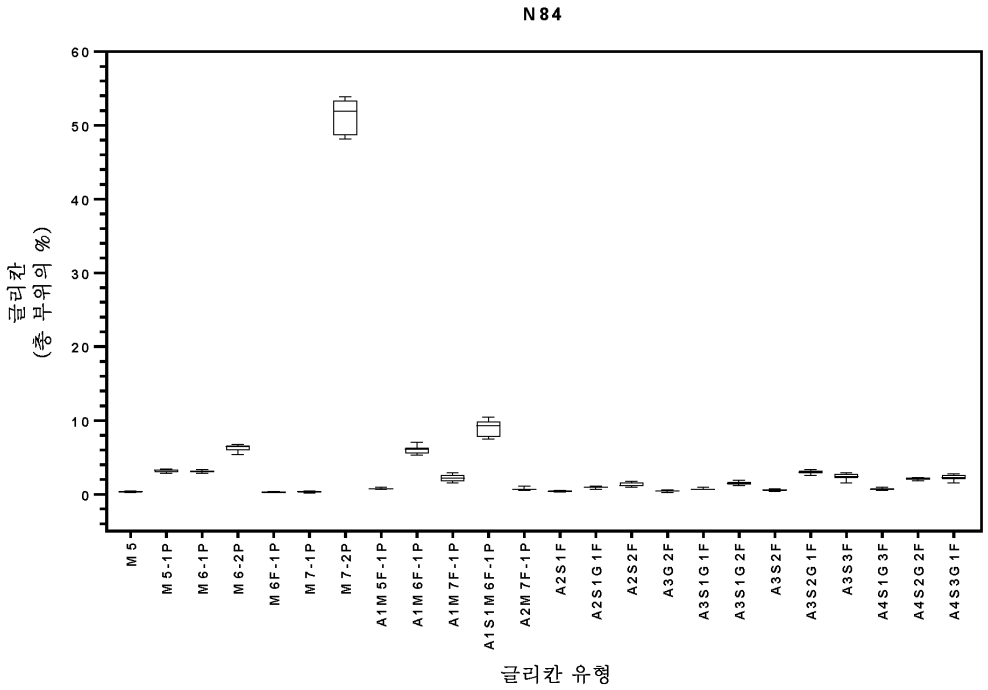
- 근육 기능
  - 12개월까지 ERT-스위치 보행가능 및 ERT-나이브 환자에서 6MWT 거리가 계속 개선되었다
  - 양쪽 코호트에서 다른 운동 기능 검사가 6MWT 결과와 일관되었다
  - 모든 코호트에서 도수 근력 증가가 관찰되었다
  - 6개월 및 9개월의 보행불능 ERT-스위치 환자에서의 팔꿈치 및 어깨 근력의 증가
- 폐 기능
  - FVC, MIP, 및 MEP가 ERT-스위치 환자에서 일반적으로 안정적이었다
  - FVC, MIP, 및 MEP가 ERT-나이브 환자에서 일반적으로 증가하였다
- 피로 중증도 척도
  - 모든 코호트에서 피로 점수의 개선이 관찰되었다
- 바이오마커 및 안전성
  - CK 및 Hex4 수준이 모든 코호트에서 감소되었다
  - ATB200/AT2221이 일반적으로 잘 허용되었다

도면32a

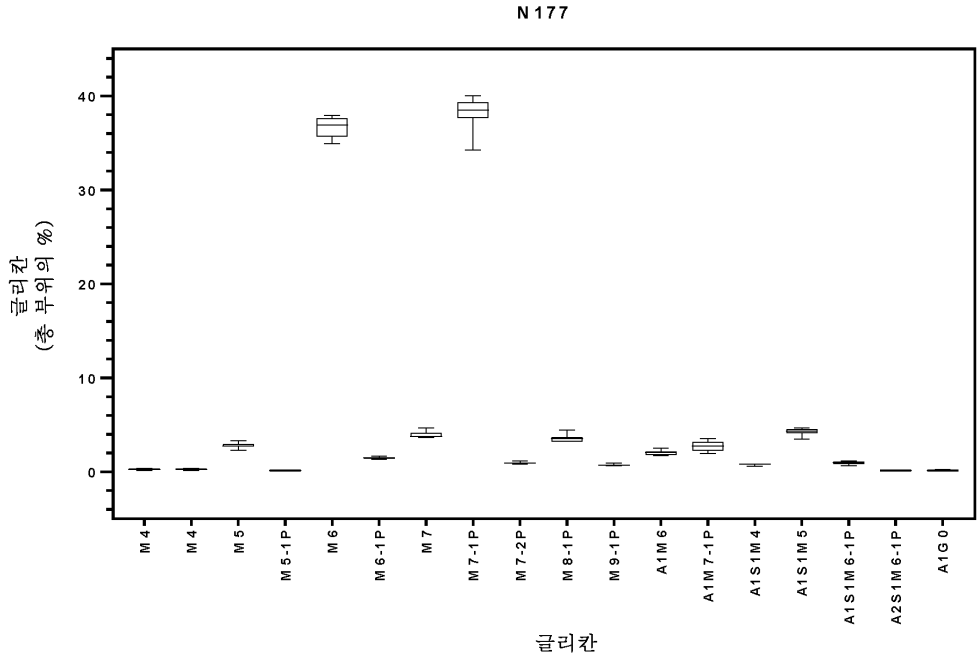


글리코실화 부위	Asn140	Asn233	Asn390	Asn470	Asn652	Asn882	Asn925
평균 점유율	97%	100%	100%	99%	85%	99%	41%
CV	0.2	0.01	0.0	0.22	0.34	0.04	0.26
N=	10						

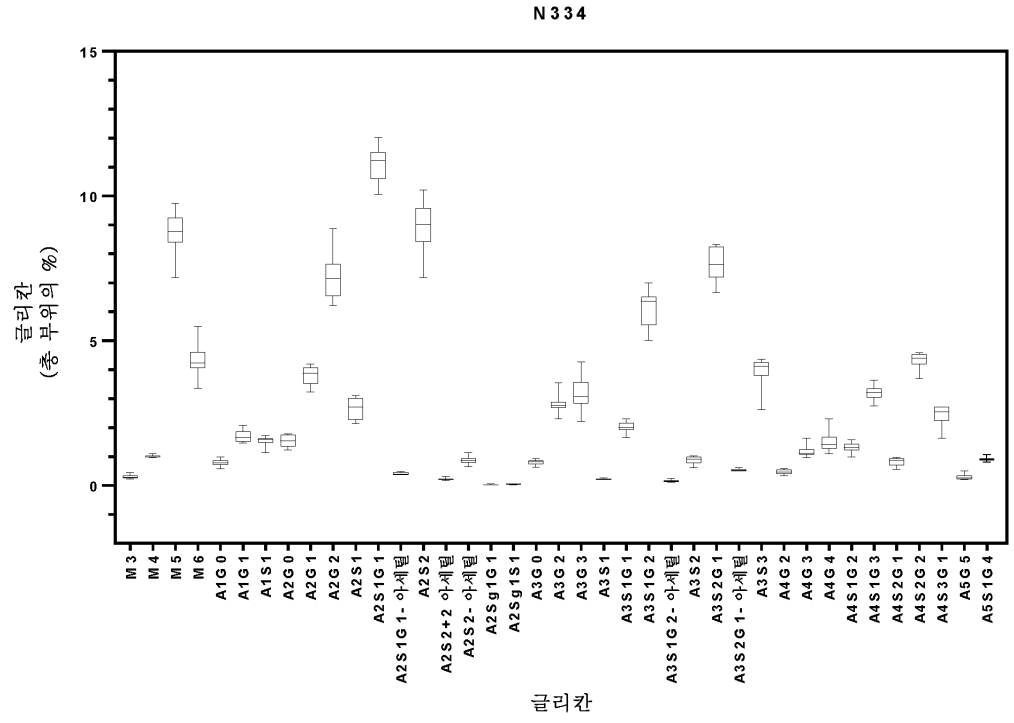
도면32b



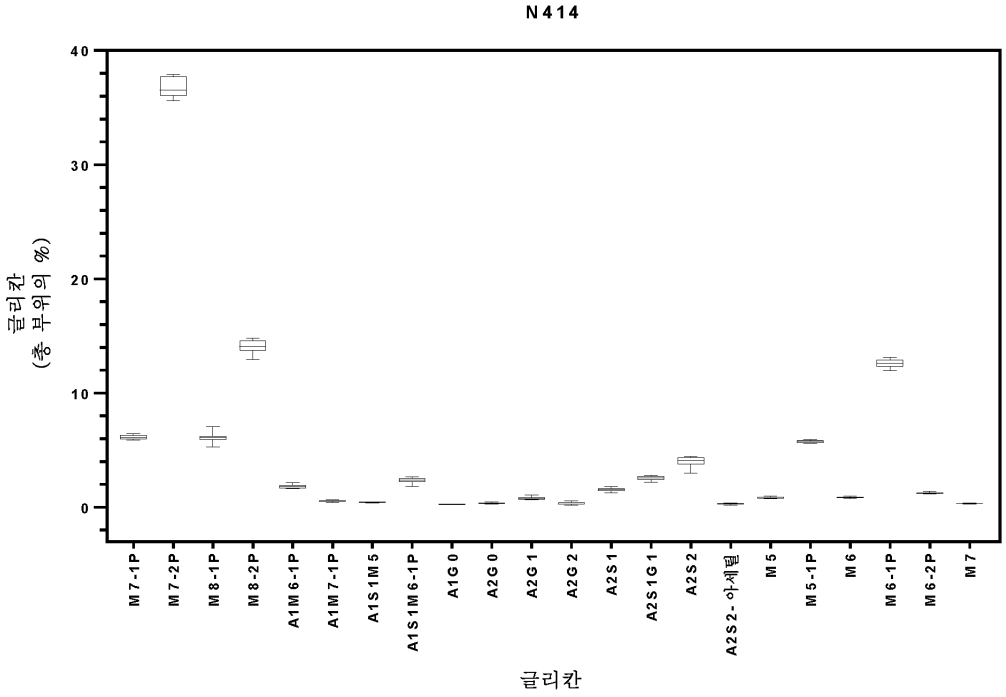
도면32c


N177
글리칸
(총 부위의 %)
40
30
20
10
0
M4
M4
M5
M5-1P
M6
M6-1P
M7
M7-1P
M7-2P
M8-1P
M9-1P
A1M6
A1M7-1P
A1S1M4
A1S1M5
A1S1M6-1P
A2S1M6-1P
A1G0
글리칸

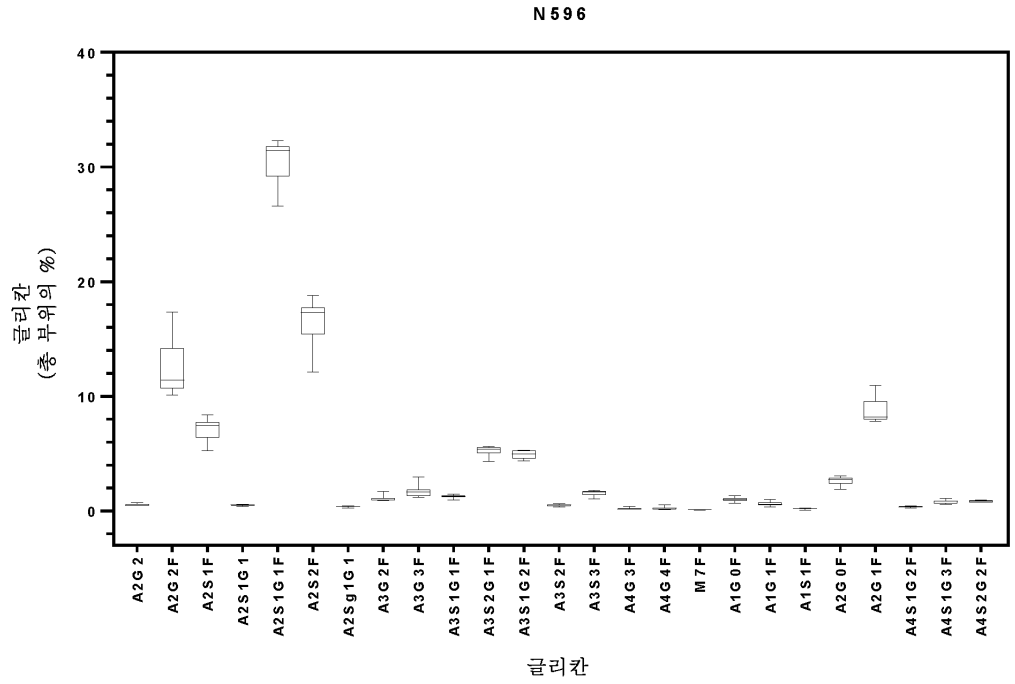
도면32d


N334
글리칸
(총 부위의 %)
15
10
5
0
M3
M4
M5
M6
A1G0
A1G1
A1S1
A2G0
A2G1
A2G2
A2S1
A2S1G1
A2S1G1-아세틸
A2S2
A2S2+2 아세틸
A2S2-아세틸
A2Sg1G1
A2Sg1S1
A3G0
A3G2
A3G3
A3S1
A3S1G1
A3S1G2
A3S1G2-아세틸
A3S2
A3S2G1
A3S2G1-아세틸
A3S3
A4G2
A4G3
A4G4
A4S1G2
A4S1G3
A4S2G1
A4S2G2
A4S3G1
A5G5
A5S1G4
글리칸

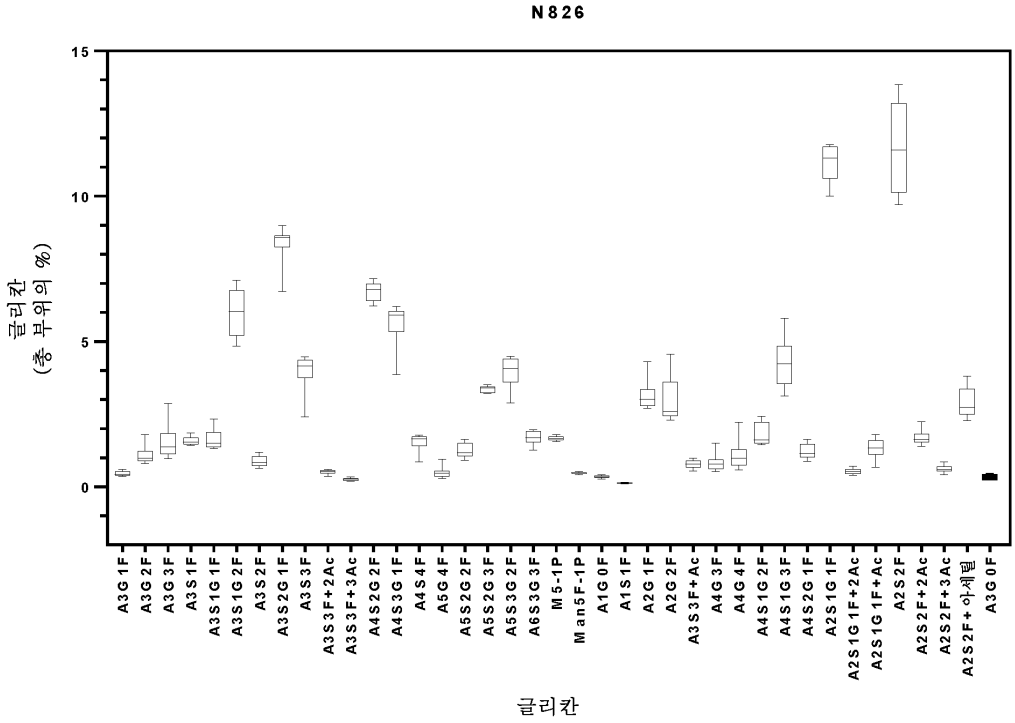
도면32e


N414
글리칸
(총 부위의 %)
40
30
20
10
0
M7-1P
M7-2P
M8-1P
M8-2P
A1M6-1P
A1M7-1P
A1S1M5
A1S1M6-1P
A1G0
A2G0
A2G1
A2G2
A2S1
A2S1G1
A2S2
A2S2-아세틸
M5
M5-1P
M6
M6-1P
M6-2P
M7
글리칸

도면32f

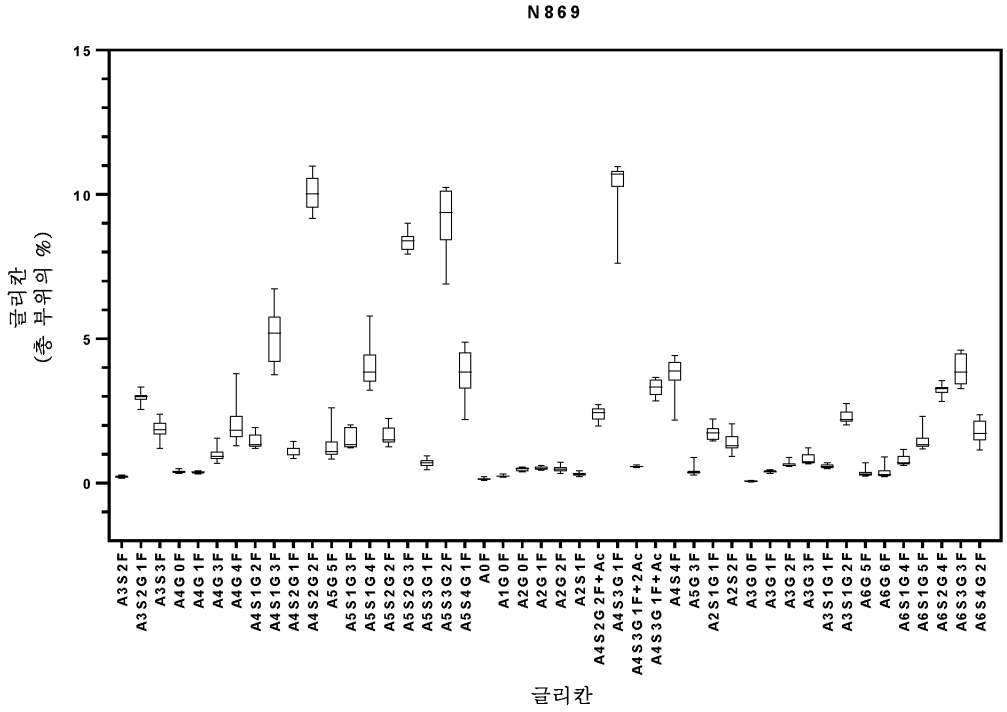

N596
글리칸
(총 부위의 %)
40
30
20
10
0
A2G2
A2G2F
A2S1F
A2S1G1
A2S1G1F
A2S2F
A2Sg1G1
A3G2F
A3G3F
A3S1G1F
A3S2G1F
A3S1G2F
A3S2F
A3S3F
A4G3F
A4G4F
M7F
A1G0F
A1G1F
A1S1F
A2G0F
A2G1F
A4S1G2F
A4S1G3F
A4S2G2F
글리칸

도면32g



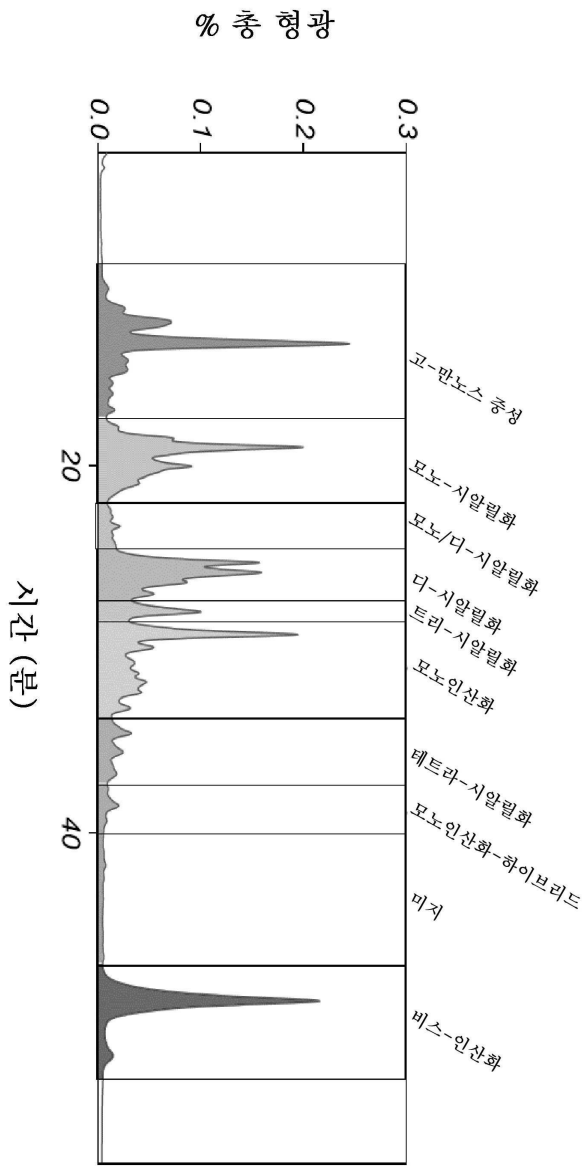
글리칸

도면32h

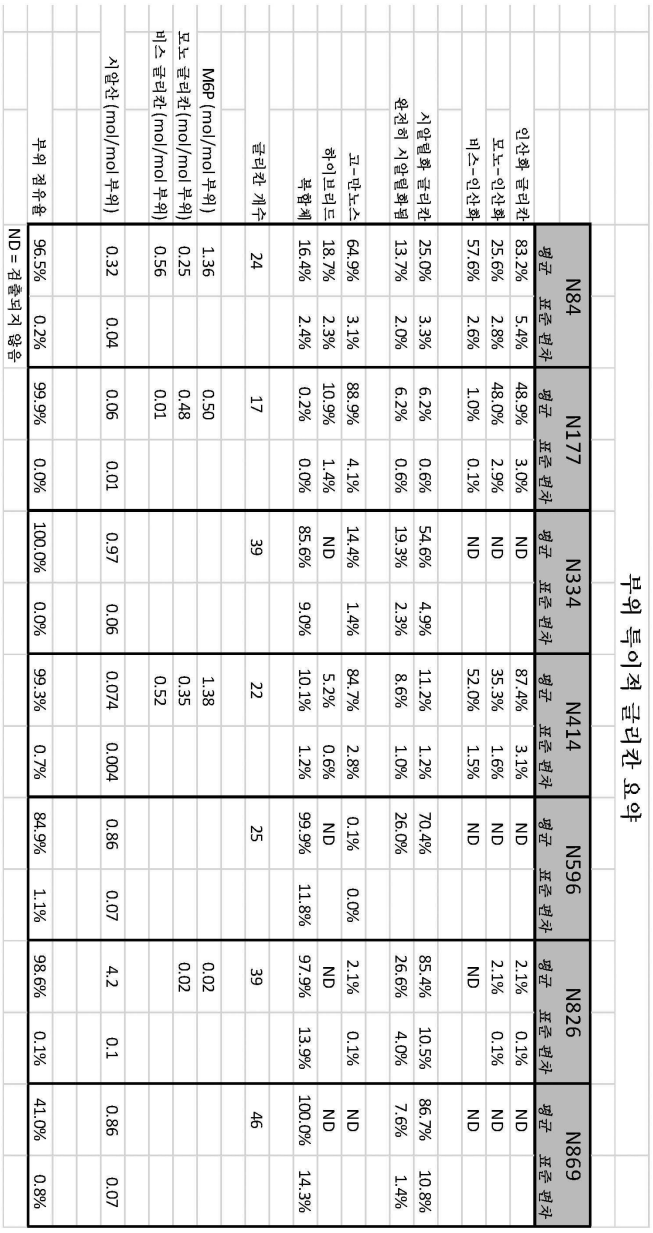


글리칸

도면33a


% 총 형광
0.0
0.1
0.2
0.3
20
40
시간 (분)
고-만노스 중성
모노-시알릴화
모노/디-시알릴화
디-시알릴화
트리-시알릴화
모노인산화
테트라-시알릴화
모노인산화-하이브리드
미지
비스-인산화

도면33b



부위 특이적 글리칸 요약

	N84		N177		N334		N414		N596		N826		N869	
	평균	표준 편차	평균	표준 편차	평균	표준 편차	평균	표준 편차	평균	표준 편차	평균	표준 편차	평균	표준 편차
인산화 글리칸	83.2%	5.4%	48.9%	3.0%	ND		87.4%	3.1%	ND		2.1%	0.1%	ND	
모노-인산화	25.6%	2.8%	48.0%	2.9%	ND		35.3%	1.6%	ND		2.1%	0.1%	ND	
비스-인산화	57.6%	2.6%	1.0%	0.1%	ND		52.0%	1.5%	ND		ND		ND	
시알릴화 글리칸	25.0%	3.3%	6.2%	0.6%	54.6%	4.9%	11.2%	1.2%	70.4%		85.4%	10.5%	86.7%	10.8%
완전히 시알릴화됨	13.7%	2.0%	6.2%	0.6%	19.3%	2.3%	8.6%	1.0%	26.0%		26.6%	4.0%	7.6%	1.4%
코-만노스	64.9%	3.1%	88.9%	4.1%	14.4%	1.4%	84.7%	2.8%	0.1%	0.0%	2.1%	0.1%	ND	
하이브리드	18.7%	2.3%	10.9%	1.4%	ND		5.2%	0.6%	ND		ND		ND	
복합체	16.4%	2.4%	0.2%	0.0%	85.6%	9.0%	10.1%	1.2%	99.9%	11.8%	97.9%	13.9%	100.0%	14.3%
글리칸 개수	24		17		39		22		25		39		46	
M6P (mol/mol 부위)	1.36		0.50				1.38				0.02			
모노 글리칸(mol/mol 부위)	0.25		0.48				0.35				0.02			
비스 글리칸(mol/mol 부위)	0.56		0.01				0.52							
시알산 (mol/mol 부위)	0.32	0.04	0.06	0.01	0.97	0.06	0.074	0.004	0.86	0.07	4.2	0.1	0.86	0.07
부위 점유율	96.5%	0.2%	99.9%	0.0%	100.0%	0.0%	99.3%	0.7%	84.9%	1.1%	98.6%	0.1%	41.0%	0.8%

ND = 검출되지 않음

서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> AMICUS THERAPEUTICS, INC.

<120> RECOMBINANT HUMAN ACID ALPHA-GLUCOSIDASE

<130> 14322.12-304

<140><141><150> 62/660,758

<151> 2018-04-20

<150> 62/624,638

<151> 2018-01-31

<150> 62/618,021

<151> 2018-01-16

<150> 62/567,334

<151> 2017-10-03

<150> 62/564,083

<151> 2017-09-27

<150> 62/506,574

<151> 2017-05-15

<150> 62/506,569

<151> 2017-05-15

<150> 62/506,561

<151> 2017-05-15

<160> 5

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 952

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 1

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

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

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

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

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

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

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

Ala Lys Gln Gly Leu Gln Gly Ala Gln Met Gly Gln Pro Trp Cys Phe
115 120 125
Phe Pro Pro Ser Tyr Pro Ser Tyr Lys Leu Glu Asn Leu Ser Ser Ser
130 135 140
Glu Met Gly Tyr Thr Ala Thr Leu Thr Arg Thr Thr Pro Thr Phe Phe
145 150 155 160
Pro Lys Asp Ile Leu Thr Leu Arg Leu Asp Val Met Met Glu Thr Glu
165 170 175

Asn Arg Leu His Phe Thr Ile Lys Asp Pro Ala Asn Arg Arg Tyr Glu
180 185 190
Val Pro Leu Glu Thr Pro Arg Val His Ser Arg Ala Pro Ser Pro Leu
195 200 205
Tyr Ser Val Glu Phe Ser Glu Glu Pro Phe Gly Val Ile Val His Arg
210 215 220
Gln Leu Asp Gly Arg Val Leu Leu Asn Thr Thr Val Ala Pro Leu Phe
225 230 235 240

Phe Ala Asp Gln Phe Leu Gln Leu Ser Thr Ser Leu Pro Ser Gln Tyr
245 250 255
Ile Thr Gly Leu Ala Glu His Leu Ser Pro Leu Met Leu Ser Thr Ser
260 265 270
Trp Thr Arg Ile Thr Leu Trp Asn Arg Asp Leu Ala Pro Thr Pro Gly
275 280 285
Ala Asn Leu Tyr Gly Ser His Pro Phe Tyr Leu Ala Leu Glu Asp Gly
290 295 300

Gly Ser Ala His Gly Val Phe Leu Leu Asn Ser Asn Ala Met Asp Val
305 310 315 320
Val Leu Gln Pro Ser Pro Ala Leu Ser Trp Arg Ser Thr Gly Gly Ile
325 330 335
Leu Asp Val Tyr Ile Phe Leu Gly Pro Glu Pro Lys Ser Val Val Gln

340 345 350

Gln Tyr Leu Asp Val Val Gly Tyr Pro Phe Met Pro Pro Tyr Trp Gly

355 360 365

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

370 375 380

Arg Gln Val Val Glu Asn Met Thr Arg Ala His Phe Pro Leu Asp Val

385 390 395 400

Gln Trp Asn Asp Leu Asp Tyr Met Asp Ser Arg Arg Asp Phe Thr Phe

405 410 415

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

420 425 430

Gln Gly Gly Arg Arg Tyr Met Met Ile Val Asp Pro Ala Ile Ser Ser

435 440 445

Ser Gly Pro Ala Gly Ser Tyr Arg Pro Tyr Asp Glu Gly Leu Arg Arg

450 455 460

Gly Val Phe Ile Thr Asn Glu Thr Gly Gln Pro Leu Ile Gly Lys Val

465 470 475 480

Trp Pro Gly Ser Thr Ala Phe Pro Asp Phe Thr Asn Pro Thr Ala Leu

485 490 495

Ala Trp Trp Glu Asp Met Val Ala Glu Phe His Asp Gln Val Pro Phe

500 505 510

Asp Gly Met Trp Ile Asp Met Asn Glu Pro Ser Asn Phe Ile Arg Gly

515 520 525

Ser Glu Asp Gly Cys Pro Asn Asn Glu Leu Glu Asn Pro Pro Tyr Val

530 535 540

Pro Gly Val Val Gly Gly Thr Leu Gln Ala Ala Thr Ile Cys Ala Ser

545 550 555 560

Ser His Gln Phe Leu Ser Thr His Tyr Asn Leu His Asn Leu Tyr Gly

565 570 575

Leu Thr Glu Ala Ile Ala Ser His Arg Ala Leu Val Lys Ala Arg Gly

580 585 590

Thr Arg Pro Phe Val Ile Ser Arg Ser Thr Phe Ala Gly His Gly Arg
595 600 605
Tyr Ala Gly His Trp Thr Gly Asp Val Trp Ser Ser Trp Glu Gln Leu
610 615 620

Ala Ser Ser Val Pro Glu Ile Leu Gln Phe Asn Leu Leu Gly Val Pro
625 630 635 640
Leu Val Gly Ala Asp Val Cys Gly Phe Leu Gly Asn Thr Ser Glu Glu
645 650 655
Leu Cys Val Arg Trp Thr Gln Leu Gly Ala Phe Tyr Pro Phe Met Arg
660 665 670
Asn His Asn Ser Leu Leu Ser Leu Pro Gln Glu Pro Tyr Ser Phe Ser
675 680 685

Glu Pro Ala Gln Gln Ala Met Arg Lys Ala Leu Thr Leu Arg Tyr Ala
690 695 700
Leu Leu Pro His Leu Tyr Thr Leu Phe His Gln Ala His Val Ala Gly
705 710 715 720
Glu Thr Val Ala Arg Pro Leu Phe Leu Glu Phe Pro Lys Asp Ser Ser
725 730 735
Thr Trp Thr Val Asp His Gln Leu Leu Trp Gly Glu Ala Leu Leu Ile
740 745 750

Thr Pro Val Leu Gln Ala Gly Lys Ala Glu Val Thr Gly Tyr Phe Pro
755 760 765
Leu Gly Thr Trp Tyr Asp Leu Gln Thr Val Pro Ile Glu Ala Leu Gly
770 775 780
Ser Leu Pro Pro Pro Pro Ala Ala Pro Arg Glu Pro Ala Ile His Ser
785 790 795 800
Glu Gly Gln Trp Val Thr Leu Pro Ala Pro Leu Asp Thr Ile Asn Val
805 810 815

His Leu Arg Ala Gly Tyr Ile Ile Pro Leu Gln Gly Pro Gly Leu Thr
820 825 830
Thr Thr Glu Ser Arg Gln Gln Pro Met Ala Leu Ala Val Ala Leu Thr

835 840 845

Lys Gly Gly Glu Ala Arg Gly Glu Leu Phe Trp Asp Asp Gly Glu Ser

850 855 860

Leu Glu Val Leu Glu Arg Gly Ala Tyr Thr Gln Val Ile Phe Leu Ala

865 870 875 880

Arg Asn Asn Thr Ile Val Asn Glu Leu Val Arg Val Thr Ser Glu Gly

885 890 895

Ala Gly Leu Gln Leu Gln Lys Val Thr Val Leu Gly Val Ala Thr Ala

900 905 910

Pro Gln Gln Val Leu Ser Asn Gly Val Pro Val Ser Asn Phe Thr Tyr

915 920 925

Ser Pro Asp Thr Lys Val Leu Asp Ile Cys Val Ser Leu Leu Met Gly

930 935 940

Glu Gln Phe Leu Val Ser Trp Cys

945 950

<210> 2

<211> 3624

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide

<400> 2

cagttgggaa agctgaggtt gtcgccgggg ccgcgggtgg aggtcgggga tgaggcagca 60

ggtaggacag tgacctcggt gacgcgaagg accccggcca cctctaggtt ctcctcgtcc 120

gcccgttgtt cagcgaggga ggctctgggc ctgccgcagc tgacggggaa actgaggcac 180

ggagcgggcc tgtaggagct gtccaggcca tctccaacca tgggagtgag gcacccgccc 240

tgctcccacc ggctcctggc cgtctgcgcc ctcgtgtcct tggcaaccgc tgcactcctg 300

gggcacatcc tactccatga tttcctgctg gttccccgag agctgagtgg ctcctcccca 360

gtcctggagg agactcaccc agctcaccag cagggagcca gcagaccagg gccccgggat 420

gcccaggcac accccggccg tcccagagca gtgcccacac agtgcgacgt ccccccccaac 480

agccgcttcg attgcgcccc tgacaaggcc atcacccagg aacagtgcga ggcccgcggc 540

tgctgctaca tccctgcaaa gcaggggctg cagggagccc agatggggca gccctggtgc 600

ttcttcccac ccagctaccc cagctacaag ctggagaacc tgagctcctc tgaaatgggc 660

tacacggcca ccctgacccg taccaccccc accttcttcc ccaaggacat cctgaccctg 720

cggctggacg tgatgatgga gactgagaac cgcctccact tcacgatcaa agatccagct 780

aacaggcgct acgaggtgcc cttggagacc ccgcgtgtcc acagccgggc accgtcccca 840

ctctacagcg tggagttctc cgaggagccc ttcggggtga tcgtgcaccg gcagctggac 900

ggccgcgtgc tgctgaacac gacggtggcg cccctgttct ttgcggacca gttccttcag 960

ctgtccacct cgctgccctc gcagtatatc acaggcctcg ccgagcacct cagtcccctg 1020

atgctcagca ccagctggac caggatcacc ctgtggaacc gggaccttgc gcccacgccc 1080

ggtgcgaacc tctacgggtc tcacccttтc tacctggcgc tggaggacgg cgggtcggca 1140

cacggggtgt tcctgctaaa cagcaatgcc atggatgtgg tcctgcagcc gagccctgcc 1200

cttagctgga ggtcgacagg tgggatcctg gatgtctaca tcttcctggg cccagagccc 1260

aagagcgtgg tgcagcagta cctggacgtt gtgggatacc cgttcatgcc gccatactgg 1320

ggcctgggct tccacctgtg ccgctggggc tactcctcca ccgctatcac ccgccaggtg 1380

gtggagaaca tgaccagggc ccacttcccc ctggacgtcc aatggaacga cctggactac 1440

atggactccc ggagggactt cacgttcaac aaggatggct tccgggactt cccggccatg 1500

gtgcaggagc tgcaccaggg cggccggcgc tacatgatga tcgtggatcc tgccatcagc 1560

agctcgggcc ctgccgggag ctacaggccc tacgacgagg gtctgcggag gggggttttc 1620

atcaccaacg agaccggcca gccgctgatt gggaaggtat ggcccgggtc cactgccttc 1680

cccgacttca ccaaccccac agccctggcc tggtgggagg acatggtggc tgagttccat 1740

gaccaggtgc ccttcgacgg catgtggatt gacatgaacg agccttccaa cttcatcaga 1800

ggctctgagg acggctgccc caacaatgag ctggagaacc caccctacgt gcctggggtg 1860

gttgggggga ccctccaggc ggccaccatc tgtgcctcca gccaccagtt tctctccaca 1920

cactacaacc tgcacaacct ctacggcctg accgaagcca tcgcctccca cagggcgctg 1980

gtgaaggctc gggggacacg cccatttgtg atctcccgct cgacctttgc tggccacggc 2040

cgatacgccg gccactggac gggggacgtg tggagctcct gggagcagct cgcctcctcc 2100

gtgccagaaa tcctgcagtt taacctgctg ggggtgcctc tggtcggggc cgacgtctgc 2160

ggcttcctgg gcaacacctc agaggagctg tgtgtgcgct ggacccagct gggggccttc 2220

taccccttca tgcggaacca caacagcctg ctcagtctgc cccaggagcc gtacagcttc 2280

agcgagccgg cccagcaggc catgaggaag gccctcaccc tgcgctacgc actcctcccc 2340

cacctctaca cactgttcca ccaggcccac gtcgcggggg agaccgtggc ccggcccctc 2400

ttcctggagt tccccaagga ctctagcacc tggactgtgg accaccagct cctgtggggg 2460

gaggccctgc tcatcacccc agtgctccag gccgggaagg ccgaagtgac tggctacttc 2520

cccttgggca catggtacga cctgcagacg gtgccaatag aggcccttgg cagcctccca 2580

cccccacctg cagctccccg tgagccagcc atccacagcg aggggcagtg ggtgacgctg 2640

ccggcccccc tggacaccat caacgtccac ctccgggctg ggtacatcat ccccctgcag 2700

ggccctggcc tcacaaccac agagtcccgc cagcagccca tggccctggc tgtggccctg 2760

accaagggtg gagaggcccg aggggagctg ttctgggacg atggagagag cctggaagtg 2820

ctggagcgag gggcctacac acaggtcatc ttcctggcca ggaataacac gatcgtgaat 2880

gagctggtac gtgtgaccag tgagggagct ggcctgcagc tgcagaaggt gactgtcctg 2940

ggcgtggcca cggcgcccca gcaggtcctc tccaacggtg tccctgtctc caacttcacc 3000

tacagccccg acaccaaggt cctggacatc tgtgtctcgc tgttgatggg agagcagttt 3060

ctcgtcagct ggtgttagcc gggcggagtg tgttagtctc tccagaggga ggctggttcc 3120

ccagggaagc agagcctgtg tgcgggcagc agctgtgtgc gggcctgggg gttgcatgtg 3180

tcacctggag ctgggcacta accattccaa gccgccgcat cgcttgtttc cacctcctgg 3240

gccggggctc tggcccccaa cgtgtctagg agagctttct ccctagatcg cactgtgggc 3300

cggggcctgg agggctgctc tgtgttaata agattgtaag gtttgccctc ctcacctgtt 3360

gccggcatgc gggtagtatt agccaccccc ctccatctgt tcccagcacc ggagaagggg 3420

gtgctcaggt ggaggtgtgg ggtatgcacc tgagctcctg cttcgcgcct gctgctctgc 3480

cccaacgcga ccgcttcccg gctgcccaga gggctggatg cctgccggtc cccgagcaag 3540

cctgggaact caggaaaatt cacaggactt gggagattct aaatcttaag tgcaattatt 3600

ttaataaaag gggcatttgg aatc 3624

<210> 3

<211> 952

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide

<400> 3

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

Ala Leu Val Ser Leu Ala Thr Ala Ala Leu Leu Gly His Ile Leu Leu

20 25 30

His Asp Phe Leu Leu Val Pro Arg Glu Leu Ser Gly Ser Ser Pro Val

35 40 45

Leu Glu Glu Thr His Pro Ala His Gln Gln Gly Ala Ser Arg Pro Gly

50 55 60

Pro Arg Asp Ala Gln Ala His Pro Gly Arg Pro Arg Ala Val Pro Thr

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Ile Thr Gln Glu Gln Cys Glu Ala Arg Gly Cys Cys Tyr Ile Pro

100 105 110

Ala Lys Gln Gly Leu Gln Gly Ala Gln Met Gly Gln Pro Trp Cys Phe

115 120 125

Phe Pro Pro Ser Tyr Pro Ser Tyr Lys Leu Glu Asn Leu Ser Ser Ser

130 135 140

Glu Met Gly Tyr Thr Ala Thr Leu Thr Arg Thr Thr Pro Thr Phe Phe

145 150 155 160

Pro Lys Asp Ile Leu Thr Leu Arg Leu Asp Val Met Met Glu Thr Glu

165 170 175

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

180 185 190

Val Pro Leu Glu Thr Pro Arg Val His Ser Arg Ala Pro Ser Pro Leu

195 200 205

Tyr Ser Val Glu Phe Ser Glu Glu Pro Phe Gly Val Ile Val His Arg

210 215 220

Gln Leu Asp Gly Arg Val Leu Leu Asn Thr Thr Val Ala Pro Leu Phe

225 230 235 240

Phe Ala Asp Gln Phe Leu Gln Leu Ser Thr Ser Leu Pro Ser Gln Tyr

245 250 255

Ile Thr Gly Leu Ala Glu His Leu Ser Pro Leu Met Leu Ser Thr Ser

260 265 270

```
Trp Thr Arg Ile Thr Leu Trp Asn Arg Asp Leu Ala Pro Thr Pro Gly
        275                 280                 285
Ala Asn Leu Tyr Gly Ser His Pro Phe Tyr Leu Ala Leu Glu Asp Gly

    290                 295                 300
Gly Ser Ala His Gly Val Phe Leu Leu Asn Ser Asn Ala Met Asp Val
305                 310                 315                 320
Val Leu Gln Pro Ser Pro Ala Leu Ser Trp Arg Ser Thr Gly Gly Ile
                325                 330                 335
Leu Asp Val Tyr Ile Phe Leu Gly Pro Glu Pro Lys Ser Val Val Gln
            340                 345                 350
Gln Tyr Leu Asp Val Val Gly Tyr Pro Phe Met Pro Pro Tyr Trp Gly

        355                 360                 365
Leu Gly Phe His Leu Cys Arg Trp Gly Tyr Ser Ser Thr Ala Ile Thr
    370                 375                 380
Arg Gln Val Val Glu Asn Met Thr Arg Ala His Phe Pro Leu Asp Val
385                 390                 395                 400
Gln Trp Asn Asp Leu Asp Tyr Met Asp Ser Arg Arg Asp Phe Thr Phe
                405                 410                 415
Asn Lys Asp Gly Phe Arg Asp Phe Pro Ala Met Val Gln Glu Leu His

            420                 425                 430
Gln Gly Gly Arg Arg Tyr Met Met Ile Val Asp Pro Ala Ile Ser Ser
        435                 440                 445
Ser Gly Pro Ala Gly Ser Tyr Arg Pro Tyr Asp Glu Gly Leu Arg Arg
    450                 455                 460
Gly Val Phe Ile Thr Asn Glu Thr Gly Gln Pro Leu Ile Gly Lys Val
465                 470                 475                 480
Trp Pro Gly Ser Thr Ala Phe Pro Asp Phe Thr Asn Pro Thr Ala Leu

                485                 490                 495
Ala Trp Trp Glu Asp Met Val Ala Glu Phe His Asp Gln Val Pro Phe
            500                 505                 510
Asp Gly Met Trp Ile Asp Met Asn Glu Pro Ser Asn Phe Ile Arg Gly
```

515 520 525

Ser Glu Asp Gly Cys Pro Asn Asn Glu Leu Glu Asn Pro Pro Tyr Val

530 535 540

Pro Gly Val Val Gly Gly Thr Leu Gln Ala Ala Thr Ile Cys Ala Ser

545 550 555 560

Ser His Gln Phe Leu Ser Thr His Tyr Asn Leu His Asn Leu Tyr Gly

565 570 575

Leu Thr Glu Ala Ile Ala Ser His Arg Ala Leu Val Lys Ala Arg Gly

580 585 590

Thr Arg Pro Phe Val Ile Ser Arg Ser Thr Phe Ala Gly His Gly Arg

595 600 605

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

610 615 620

Ala Ser Ser Val Pro Glu Ile Leu Gln Phe Asn Leu Leu Gly Val Pro

625 630 635 640

Leu Val Gly Ala Asp Val Cys Gly Phe Leu Gly Asn Thr Ser Glu Glu

645 650 655

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

660 665 670

Asn His Asn Ser Leu Leu Ser Leu Pro Gln Glu Pro Tyr Ser Phe Ser

675 680 685

Glu Pro Ala Gln Gln Ala Met Arg Lys Ala Leu Thr Leu Arg Tyr Ala

690 695 700

Leu Leu Pro His Leu Tyr Thr Leu Phe His Gln Ala His Val Ala Gly

705 710 715 720

Glu Thr Val Ala Arg Pro Leu Phe Leu Glu Phe Pro Lys Asp Ser Ser

725 730 735

Thr Trp Thr Val Asp His Gln Leu Leu Trp Gly Glu Ala Leu Leu Ile

740 745 750

Thr Pro Val Leu Gln Ala Gly Lys Ala Glu Val Thr Gly Tyr Phe Pro

755 760 765

Leu Gly Thr Trp Tyr Asp Leu Gln Thr Val Pro Ile Glu Ala Leu Gly
770 775 780
Ser Leu Pro Pro Pro Pro Ala Ala Pro Arg Glu Pro Ala Ile His Ser
785 790 795 800
Glu Gly Gln Trp Val Thr Leu Pro Ala Pro Leu Asp Thr Ile Asn Val

805 810 815
His Leu Arg Ala Gly Tyr Ile Ile Pro Leu Gln Gly Pro Gly Leu Thr
820 825 830
Thr Thr Glu Ser Arg Gln Gln Pro Met Ala Leu Ala Val Ala Leu Thr
835 840 845
Lys Gly Gly Glu Ala Arg Gly Glu Leu Phe Trp Asp Asp Gly Glu Ser
850 855 860
Leu Glu Val Leu Glu Arg Gly Ala Tyr Thr Gln Val Ile Phe Leu Ala

865 870 875 880
Arg Asn Asn Thr Ile Val Asn Glu Leu Val Arg Val Thr Ser Glu Gly
885 890 895
Ala Gly Leu Gln Leu Gln Lys Val Thr Val Leu Gly Val Ala Thr Ala
900 905 910
Pro Gln Gln Val Leu Ser Asn Gly Val Pro Val Ser Asn Phe Thr Tyr
915 920 925
Ser Pro Asp Thr Lys Val Leu Asp Ile Cys Val Ser Leu Leu Met Gly

930 935 940
Glu Gln Phe Leu Val Ser Trp Cys
945 950

<210> 4
<211> 952
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide
<400> 4
Met Gly Val Arg His Pro Pro Cys Ser His Arg Leu Leu Ala Val Cys

1 5 10 15

Ala Leu Val Ser Leu Ala Thr Ala Ala Leu Leu Gly His Ile Leu Leu

20 25 30

His Asp Phe Leu Leu Val Pro Arg Glu Leu Ser Gly Ser Ser Pro Val

35 40 45

Leu Glu Glu Thr His Pro Ala His Gln Gln Gly Ala Ser Arg Pro Gly

50 55 60

Pro Arg Asp Ala Gln Ala His Pro Gly Arg Pro Arg Ala Val Pro Thr

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Ile Thr Gln Glu Gln Cys Glu Ala Arg Gly Cys Cys Tyr Ile Pro

100 105 110

Ala Lys Gln Gly Leu Gln Gly Ala Gln Met Gly Gln Pro Trp Cys Phe

115 120 125

Phe Pro Pro Ser Tyr Pro Ser Tyr Lys Leu Glu Asn Leu Ser Ser Ser

130 135 140

Glu Met Gly Tyr Thr Ala Thr Leu Thr Arg Thr Thr Pro Thr Phe Phe

145 150 155 160

Pro Lys Asp Ile Leu Thr Leu Arg Leu Asp Val Met Met Glu Thr Glu

165 170 175

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

180 185 190

Val Pro Leu Glu Thr Pro His Val His Ser Arg Ala Pro Ser Pro Leu

195 200 205

Tyr Ser Val Glu Phe Ser Glu Glu Pro Phe Gly Val Ile Val Arg Arg

210 215 220

Gln Leu Asp Gly Arg Val Leu Leu Asn Thr Thr Val Ala Pro Leu Phe

225 230 235 240

Phe Ala Asp Gln Phe Leu Gln Leu Ser Thr Ser Leu Pro Ser Gln Tyr

245 250 255

Ile Thr Gly Leu Ala Glu His Leu Ser Pro Leu Met Leu Ser Thr Ser
260 265 270
Trp Thr Arg Ile Thr Leu Trp Asn Arg Asp Leu Ala Pro Thr Pro Gly
275 280 285

Ala Asn Leu Tyr Gly Ser His Pro Phe Tyr Leu Ala Leu Glu Asp Gly
290 295 300
Gly Ser Ala His Gly Val Phe Leu Leu Asn Ser Asn Ala Met Asp Val
305 310 315 320
Val Leu Gln Pro Ser Pro Ala Leu Ser Trp Arg Ser Thr Gly Gly Ile
325 330 335
Leu Asp Val Tyr Ile Phe Leu Gly Pro Glu Pro Lys Ser Val Val Gln
340 345 350

Gln Tyr Leu Asp Val Val Gly Tyr Pro Phe Met Pro Pro Tyr Trp Gly
355 360 365
Leu Gly Phe His Leu Cys Arg Trp Gly Tyr Ser Ser Thr Ala Ile Thr
370 375 380
Arg Gln Val Val Glu Asn Met Thr Arg Ala His Phe Pro Leu Asp Val
385 390 395 400
Gln Trp Asn Asp Leu Asp Tyr Met Asp Ser Arg Arg Asp Phe Thr Phe
405 410 415

Asn Lys Asp Gly Phe Arg Asp Phe Pro Ala Met Val Gln Glu Leu His
420 425 430
Gln Gly Gly Arg Arg Tyr Met Met Ile Val Asp Pro Ala Ile Ser Ser
435 440 445
Ser Gly Pro Ala Gly Ser Tyr Arg Pro Tyr Asp Glu Gly Leu Arg Arg
450 455 460
Gly Val Phe Ile Thr Asn Glu Thr Gly Gln Pro Leu Ile Gly Lys Val
465 470 475 480

Trp Pro Gly Ser Thr Ala Phe Pro Asp Phe Thr Asn Pro Thr Ala Leu
485 490 495
Ala Trp Trp Glu Asp Met Val Ala Glu Phe His Asp Gln Val Pro Phe

500 505 510

Asp Gly Met Trp Ile Asp Met Asn Glu Pro Ser Asn Phe Ile Arg Gly

515 520 525

Ser Glu Asp Gly Cys Pro Asn Asn Glu Leu Glu Asn Pro Pro Tyr Val

530 535 540

Pro Gly Val Val Gly Gly Thr Leu Gln Ala Ala Thr Ile Cys Ala Ser

545 550 555 560

Ser His Gln Phe Leu Ser Thr His Tyr Asn Leu His Asn Leu Tyr Gly

565 570 575

Leu Thr Glu Ala Ile Ala Ser His Arg Ala Leu Val Lys Ala Arg Gly

580 585 590

Thr Arg Pro Phe Val Ile Ser Arg Ser Thr Phe Ala Gly His Gly Arg

595 600 605

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

610 615 620

Ala Ser Ser Val Pro Glu Ile Leu Gln Phe Asn Leu Leu Gly Val Pro

625 630 635 640

Leu Val Gly Ala Asp Val Cys Gly Phe Leu Gly Asn Thr Ser Glu Glu

645 650 655

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

660 665 670

Asn His Asn Ser Leu Leu Ser Leu Pro Gln Glu Pro Tyr Ser Phe Ser

675 680 685

Glu Pro Ala Gln Gln Ala Met Arg Lys Ala Leu Thr Leu Arg Tyr Ala

690 695 700

Leu Leu Pro His Leu Tyr Thr Leu Phe His Gln Ala His Val Ala Gly

705 710 715 720

Glu Thr Val Ala Arg Pro Leu Phe Leu Glu Phe Pro Lys Asp Ser Ser

725 730 735

Thr Trp Thr Val Asp His Gln Leu Leu Trp Gly Glu Ala Leu Leu Ile

740 745 750

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Glu Gln Phe Leu Val Ser Trp Cys
945 950

<210> 5

<211> 896

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 5

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
```

【심사관 직권보정사항】

【직권보정 1】

【보정항목】 발명(고안)의 설명

【보정세부항목】 식별번호 0210

【변경전】

이러한 2-AA 및 LC-MS/MS 분석을 기초로, 그리고 도 33c에 추가로 요약된 바와 같이, 테스트된 ATB200는 평균 M6P 함량이 ATB200 mol 당 3-5 mol이고 (모노-M6P 및 비스-M6P 양쪽 모두에 대해 계산됨), 시알산 함량이 ATB200 mol 당 4-7 mol이다.

【변경후】

이러한 2-AA 및 LC-MS/MS 분석을 기초로, 그리고 도 33a에 추가로 요약된 바와 같이, 테스트된 ATB200는 평균 M6P 함량이 ATB200 mol 당 3-5 mol이고 (모노-M6P 및 비스-M6P 양쪽 모두에 대해 계산됨), 시알산 함량이 ATB200 mol 당 4-7 mol이다.