



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 119113091 A

(43) 申请公布日 2024. 12. 13

(21) 申请号 202410825915.X

(22) 申请日 2018.05.15

(30) 优先权数据

62/506,561 2017.05.15 US
62/506,569 2017.05.15 US
62/506,574 2017.05.15 US
62/529,300 2017.07.06 US
62/564,083 2017.09.27 US
62/567,334 2017.10.03 US
62/618,021 2018.01.16 US
62/624,638 2018.01.31 US
62/660,758 2018.04.20 US

(62) 分案原申请数据

201880045818.1 2018.05.15

(71) 申请人 阿米库斯治疗学公司

地址 美国宾夕法尼亚州

(72) 发明人 H·杜 拉塞尔·戈乔尔

里奇·肯纳 易·伦 亨·查尔
谢尔盖·特斯勒 温迪·桑德兰
恩里克·迪隆

(74) 专利代理机构 北京律诚同业知识产权代理有限公司 11006

专利代理师 徐金国 吴启超

(51) Int.Cl.

A61K 38/47 (2006.01)
A61P 21/00 (2006.01)
A61P 43/00 (2006.01)
A61P 25/00 (2006.01)

权利要求书7页 说明书47页

序列表 (电子公布) 附图51页

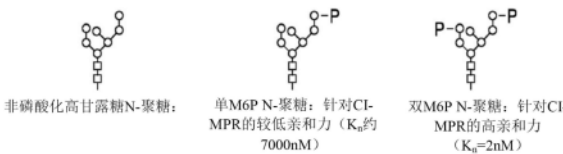
(54) 发明名称

重组人类酸性 α -葡萄糖苷酶

(57) 摘要

本案提供一种重组酸性 α -葡萄糖苷酶及包含重组酸性 α -葡萄糖苷酶的医药组合物,其中所述重组酸性 α -葡萄糖苷酶在中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞中表现且当相较于带有阿葡萄糖苷酶 α 的一个或两个甘露糖-6-磷酸酯残基的N-聚糖单元的含量来说,包含增加含量的带有一个或两个甘露糖-6-磷酸酯残基的N-聚糖单元。本文也提供产生、纯化、及调配重组酸性 α -葡萄糖苷酶或医药组合物以用于施用至受试者的方法及使用所述重组酸性 α -葡萄糖苷酶或医药组合物治疗诸如庞贝病的疾病或病症的方法。

高甘露糖及磷酸化寡糖的结构及受体亲和力



1. 一种治疗有需要的受试者的庞贝病的方法,其包含以下步骤:向所述受试者施用来自中国仓鼠卵巢(CHO)细胞的重组人类酸性 α -葡萄糖苷酶(rhGAA)分子的群体;

其中所述rhGAA分子包含七个潜在N-糖基化位点;

其中所述rhGAA分子平均包含3-4个甘露糖-6-磷酸酯(M6P)残基;

其中当使用液相色谱-串联质谱法(LC-MS/MS)测定时,所述rhGAA分子在所述第一潜在N-糖基化位点处平均包含每摩尔rhGAA至少约0.5摩尔双甘露糖-6-磷酸酯(双M6P);且

其中rhGAA的所述群体是以能够逆转所述受试者的疾病进程的剂量施用。

2. 根据权利要求1所述的方法,其中逆转疾病进程包括减小的所述受试者的肌肉中的溶酶体大小。

3. 根据权利要求1或权利要求2所述的方法,其中逆转疾病进程包括解决的所述受试者的肌肉中的自噬堆积。

4. 根据权利要求3所述的方法,其中在治疗之后所述受试者中分析的肌肉纤维的少于65%具有自噬堆积。

5. 根据权利要求1-4中任一项所述的方法,其中所述受试者是ERT切换患者。

6. 根据权利要求5所述的方法,其中,所述ERT切换患者先前已经用阿葡糖苷酶 α 治疗了至少两年。

7. 根据权利要求1-6所述的方法,其中在治疗之后所述受试者中分析的肌肉纤维的至少36%具有正常或接近正常的外观。

8. 一种治疗有需要的受试者的庞贝病的方法,其包含以下步骤:向所述受试者施用来自中国仓鼠卵巢(CHO)细胞的重组人类酸性 α -葡萄糖苷酶(rhGAA)分子的群体;

其中所述rhGAA分子包含七个潜在N-糖基化位点;

其中所述rhGAA分子平均包含3-4个甘露糖-6-磷酸酯(M6P)残基;

其中当使用LC-MS/MS测定时,所述rhGAA分子在所述第一潜在N-糖基化位点处平均包含每摩尔rhGAA至少约0.5摩尔双甘露糖-6-磷酸酯(双M6P);且

其中在治疗之后所述受试者的肌肉中的所述肝糖含量比当以相同剂量施用阿葡糖苷酶 α 时较快地减少。

9. 根据权利要求8所述的方法,其中在治疗之后所述受试者的肌肉中的所述肝糖含量以比当以相同剂量施用阿葡糖苷酶 α 时的速率快至少约1.25、1.5、1.75、2.0、或3.0倍的速率减少。

10. 根据权利要求8或权利要求9所述的方法,其中在治疗之后,在一次、两次、三次、四次、五次、或六次施用之后评定时,所述受试者的肌肉中的所述肝糖含量是比当以相同剂量施用阿葡糖苷酶 α 时更有效地减少。

11. 根据权利要求10所述的方法,其中在治疗之后所述受试者的肌肉中的所述肝糖含量是比当以相同剂量施用阿葡糖苷酶 α 时至少约10%、20%、30%、50%、75%、或90%更有效地减少。

12. 根据权利要求10或权利要求11所述的方法,其中所述肝糖含量是在六次施用之后评定。

13. 根据权利要求8-12中任一项所述的方法,其中所述受试者在治疗之后展现减少水平的尿己糖四糖。

14. 根据权利要求13所述的方法, 其中在治疗之后六个月时尿己糖四酹的所述水平相较于基线减少至少30%。

15. 根据权利要求13所述的方法, 其中所述受试者为有行动力的ERT切换患者或无行动力的ERT切换患者, 且其中在治疗之后六个月时所述受试者的尿己糖四酹的水平相较于基线减少至少35%。

16. 根据权利要求13所述的方法, 其中所述受试者为有行动力的ERT原始患者且在治疗之后六个月时所述受试者的尿己糖四酹的水平相较于基线减少至少45%。

17. 一种治疗有需要的受试者的庞贝病的方法, 其包含以下步骤: 向所述受试者施用来自中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞的重组人类酸性 α -葡萄糖苷酶 (rhGAA) 分子的群体;

其中所述rhGAA分子包含七个潜在N-糖基化位点;

其中所述rhGAA分子平均包含3-4个甘露糖-6-磷酸酯 (M6P) 残基;

其中当使用LC-MS/MS测定时, 所述rhGAA分子在所述第一潜在N-糖基化位点处平均包含每摩尔rhGAA至少约0.5摩尔双甘露糖-6-磷酸酯 (双M6P); 且

其中rhGAA分子的所述群体是以能够改善所述受试者的运动功能的剂量施用。

18. 根据权利要求17所述的方法, 其中所述受试者中的所述改善的运动功能是通过选自以下各项组成的群的至少一种运动功能测试测量: 六分钟步行测试 (6MWT)、计时起立行走测试、四层楼梯攀爬测试、十米步行测试、Gowers氏测试、步态-楼梯-gower-椅子 (GSGC) 测试、或前述的组合。

19. 根据权利要求18所述的方法, 其中相较于基线, 在治疗之后六个月时所述受试者的6MWT距离增加至少20米, 在治疗之后六个月时所述受试者的计时起立行走测试时间减少至少1秒, 在治疗之后六个月时所述受试者的四层楼梯攀爬测试减少至少0.6秒, 在治疗之后六个月时所述受试者的十米步行测试时间减少至少0.7秒, 在治疗之后六个月时所述受试者的Gowers氏测试时间减少至少1秒, 或在治疗之后六个月时所述受试者的GSGC记分减少至少1。

20. 根据权利要求18所述的方法, 其中所述受试者为有行动力的ERT切换患者, 且其中, 相较于基线, 在治疗之后六个月时所述受试者的6MWT距离增加至少20米, 在治疗之后六个月时所述受试者的计时起立行走测试时间减少至少1.5秒, 在治疗之后六个月时所述受试者的四层楼梯攀爬测试时间减少至少0.6秒, 或在治疗之后六个月时所述受试者的Gowers氏测试时间减少至少1秒。

21. 根据权利要求18所述的方法, 其中所述受试者为有行动力的ERT原始患者, 且其中, 相较于基线, 在治疗之后六个月时所述受试者的6MWT距离增加至少40米, 在治疗之后六个月时所述受试者的计时起立行走测试时间减少至少1秒, 在治疗之后六个月时所述受试者的四层楼梯攀爬测试减少至少0.6秒, 在治疗之后六个月时所述受试者的十米步行测试时间减少至少0.7秒, 或在治疗之后六个月时所述受试者的GSGC记分减少至少1。

22. 根据权利要求18所述的方法, 其中所述受试者先前接收阿葡糖苷酶 α 酶替代疗法, 其中相较于在所述先前阿葡糖苷酶 α 酶替代疗法之后所述受试者的运动功能测试结果, 在利用rhGAA的所述群体治疗之后所述受试者展现至少一种运动功能的改善。

23. 一种治疗有需要的受试者的庞贝病的方法, 其包含以下步骤: 向所述受试者施用来自中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞的重组人类酸性 α -葡萄糖苷酶 (rhGAA) 分子的群体;

其中所述rhGAA分子包含七个潜在N-糖基化位点；

其中所述rhGAA分子平均包含3-4个甘露糖-6-磷酸酯(M6P)残基；

其中当使用LC-MS/MS测定时,所述rhGAA分子在所述第一潜在N-糖基化位点处平均包含每摩尔rhGAA至少约0.5摩尔双甘露糖-6-磷酸酯(双M6P);且

其中rhGAA分子的所述群体是以能够改善所述受试者的上身力量的剂量施用。

24.根据权利要求23所述的方法,其中所述受试者的所述改善的上身力量是通过徒手肌肉力量记分测量。

25.根据权利要求24所述的方法,其中所述受试者为有行动力的ERT切换患者且在治疗之后六个月时展现相较于基线的至少1的上身徒手肌肉力量记分的改善。

26.根据权利要求24所述的方法,其中所述受试者为无行动力的ERT切换患者且在治疗之后六个月时展现相较于基线的至少5.5的上身徒手肌肉力量记分的改善。

27.根据权利要求23所述的方法,其中所述受试者的所述改善的上身力量为改善的上肢力量,其中上肢力量是通过选自由以下各项组成的群的至少一种上肢肌群的定量肌肉测试或徒手肌肉测试测量:肩膀内收、肩膀外展、肘屈曲、及肘伸展。

28.根据权利要求27所述的方法,其中所述受试者为无行动力的ERT切换患者,且其中,相较于基线,在治疗之后六个月时所述受试者的肩膀内收改善至少8磅的力,在治疗之后六个月时所述受试者的肩膀外展改善至少1磅的力,在治疗之后六个月时所述受试者的肘屈曲改善至少2磅的力,或在治疗之后六个月时所述受试者的肘伸展改善至少5磅的力。

29.根据权利要求23所述的方法,其中所述受试者为有行动力的且在治疗之后进一步展现改善的下身力量及/或全身力量。

30.根据权利要求23所述的方法,其中所述受试者先前接收阿葡糖苷酶 α 酶替代疗法,其中相较于在所述先前阿葡糖苷酶 α 酶替代疗法之后所述受试者的上身力量,在利用rhGAA的所述群体治疗之后所述受试者展现上身力量的改善。

31.一种治疗有需要的受试者的庞贝病的方法,其包含以下步骤:向所述受试者施用来自中国仓鼠卵巢(CHO)细胞的重组人类酸性 α -葡萄糖苷酶(rhGAA)分子的群体;

其中所述rhGAA分子包含七个潜在N-糖基化位点;

其中所述rhGAA分子平均包含3-4个甘露糖-6-磷酸酯(M6P)残基;

其中当使用LC-MS/MS测定时,所述rhGAA分子在所述第一潜在N-糖基化位点处平均包含每摩尔rhGAA至少约0.5摩尔双甘露糖-6-磷酸酯(双M6P);且

其中rhGAA分子的所述群体是以能够改善所述受试者的肺功能的剂量施用。

32.根据权利要求31所述的方法,其中所述受试者中的所述改善的肺功能是通过选自由以下各项组成的群的至少一个肺功能测试来测量:直立用力肺活量(FVC)测试、最大呼气压力(MEP)测试、最大吸气压(MIP)测试、及前述的组合。

33.根据权利要求32所述的方法,其中相较于基线,在治疗之后六个月时所述受试者的FVC改善至少4%,在治疗之后六个月时所述受试者的MEP改善至少16厘米水柱,或在治疗之后六个月时所述受试者的MIP改善至少0.3厘米水柱。

34.根据权利要求32所述的方法,其中所述受试者为有行动力的ERT切换患者且其中,相较于基线,在治疗之后六个月时所述受试者的MEP改善至少16厘米水柱。

35.根据权利要求32所述的方法,其中所述受试者为有行动力的ERT原始患者且其中,

相较于基线,在治疗之后六个月时所述受试者的FVC改善至少4%或在治疗之后六个月时所述受试者的MIP改善至少11厘米水柱。

36.根据权利要求32所述的方法,其中所述受试者先前接收阿葡糖苷酶 α 酶替代疗法,其中相较于在所述先前阿葡糖苷酶 α 酶替代疗法之后所述受试者的肺功能测试结果,在利用rhGAA的所述群体治疗之后所述受试者展现至少一个肺功能测试的改善。

37.一种治疗有需要的受试者的庞贝病的方法,其包含以下步骤:向所述受试者施用来自中国仓鼠卵巢(CHO)细胞的重组人类酸性 α -葡萄糖苷酶(rhGAA)分子的群体;

其中所述rhGAA分子包含七个潜在N-糖基化位点;

其中所述rhGAA分子平均包含3-4个甘露糖-6-磷酸酯(M6P)残基;

其中当使用LC-MS/MS测定时,所述rhGAA分子在所述第一潜在N-糖基化位点处平均包含每摩尔rhGAA至少约0.5摩尔双甘露糖-6-磷酸酯(双M6P);且

其中rhGAA分子的所述群体是以能够减少所述受试者的疲劳的剂量施用,所述疲劳是根据疲劳严重程度量表(FSS)记分所测量的。

38.根据权利要求37所述的方法,其中在治疗之后六个月时所述受试者的FSS记分相较于基线减少至少3.5。

39.根据权利要求38所述的方法,其中所述受试者为无行动力的ERT切换患者。

40.根据权利要求37或权利要求38所述的方法,其中所述受试者为有行动力的ERT切换患者且其中在治疗之后六个月时所述受试者的FSS记分相较于基线减少至少8。

41.根据权利要求37或权利要求38所述的方法,其中所述受试者为有行动力的ERT原始患者且其中在治疗之后六个月时所述受试者的FSS记分相较于基线减少至少5。

42.根据权利要求37所述的方法,其中所述受试者先前接收阿葡糖苷酶 α 酶替代疗法,其中相较于在所述先前阿葡糖苷酶 α 酶替代疗法之后所述受试者的FSS记分,在利用rhGAA的所述群体治疗之后所述受试者具有较低FSS记分。

43.一种治疗有需要的受试者的庞贝病的方法,其包含以下步骤:向所述受试者施用来自中国仓鼠卵巢(CHO)细胞的重组人类酸性 α -葡萄糖苷酶(rhGAA)分子的群体;

其中所述rhGAA分子包含七个潜在N-糖基化位点;

其中所述rhGAA分子平均包含3-4个甘露糖-6-磷酸酯(M6P)残基;

其中当使用LC-MS/MS测定时,所述rhGAA分子在所述第一潜在N-糖基化位点处平均包含每摩尔rhGAA至少约0.5摩尔双甘露糖-6-磷酸酯(双M6P);且

其中rhGAA的所述群体是以能够减少选自由以下各项组成的群的至少一种肌肉损伤生物标志物的水平的剂量施用:肌酸激酶、丙胺酸转胺酶(ALT)、天冬胺酸转胺酶(AST)、及前述的组合。

44.根据权利要求43所述的方法,其中所述至少一种肌肉损伤生物标志物为肌酸激酶。

45.根据权利要求43所述的方法,其中,相较于基线,在治疗之后六个月时所述受试者的肌酸激酶水平减少至少15%,在治疗之后六个月时所述受试者的ALT水平减少至少5%,或在治疗之后六个月时所述受试者的AST水平减少至少5%。

46.根据权利要求43所述的方法,其中所述受试者为有行动力的ERT切换患者且其中,相较于基线,在治疗之后六个月时所述受试者的肌酸激酶水平减少至少15%,在治疗之后六个月时所述受试者的ALT水平减少至少15%,或在治疗之后六个月时所述受试者的AST水

平减少至少10%。

47. 根据权利要求43所述的方法, 其中所述受试者为无行动力的ERT切换患者且其中, 相较于基线, 在治疗之后六个月时所述受试者的肌酸激酶水平减少至少20%, 在治疗之后六个月时所述受试者的ALT水平减少至少5%, 或在治疗之后六个月时所述受试者的AST水平减少至少5%。

48. 根据权利要求43所述的方法, 其中所述受试者为有行动力的ERT原始患者且其中, 相较于基线, 在治疗之后六个月时所述受试者的肌酸激酶水平减少至少35%, 在治疗之后六个月时所述受试者的ALT水平减少至少35%, 或在治疗之后六个月时所述受试者的AST水平减少至少30%。

49. 根据权利要求1-48中任一项所述的方法, 其中rhGAA分子的所述群体是以约1mg/kg至约100mg/kg的剂量施用。

50. 根据权利要求1-49中任一项所述的方法, 其中rhGAA分子的所述群体是以约20mg/kg的剂量施用。

51. 根据权利要求1-50中任一项所述的方法, 其中rhGAA分子的所述群体rhGAA是两月一次、每月一次、两周一次、每周一次、每周两次、或每日一次施用。

52. 根据权利要求51所述的方法, 其中rhGAA分子的所述群体是两周一次施用。

53. 根据权利要求1-52中任一项所述的方法, 其中rhGAA分子的所述群体是静脉内施用。

54. 根据权利要求1-53中任一项所述的方法, 其中rhGAA分子的所述群体是与药理学伴侣蛋白并行地或顺序地施用。

55. 根据权利要求54所述的方法, 其中所述药理学伴侣蛋白为美格鲁特或其医药学上可接受的盐。

56. 根据权利要求55所述的方法, 其中所述美格鲁特或其医药学上可接受的盐是经口施用。

57. 根据权利要求55或权利要求56所述的方法, 其中所述美格鲁特其医药学上可接受的盐是以约200mg至约600mg的剂量施用。

58. 根据权利要求57所述的方法, 其中所述美格鲁特其医药学上可接受的盐是以约260mg的剂量施用。

59. 根据权利要求57所述的方法, 其中rhGAA分子的所述群体是以约5mg/kg至约20mg/kg的剂量静脉内施用且所述美格鲁特或其医药学上可接受的盐是以约233mg至约500mg的剂量经口施用。

60. 根据权利要求56所述的方法, 其中所述美格鲁特其医药学上可接受的盐是以约50mg至约200mg的剂量经口施用。

61. 根据权利要求56所述的方法, 其中rhGAA分子的所述群体是以约20mg/kg的剂量静脉内施用且所述美格鲁特或其医药学上可接受的盐是以约260mg的剂量经口施用。

62. 根据权利要求55-61中任一项所述的方法, 其中所述美格鲁特或其医药学上可接受的盐是在所述rhGAA的施用之前施用。

63. 根据权利要求62所述的方法, 其中所述美格鲁特或其医药学上可接受的盐是在所述rhGAA的施用之前约一小时施用。

64. 权利要求62或权利要求63的方法,其中所述受试者在施用美格鲁特或其医药学上可接受的盐之前至少两个小时及之后至少两个小时禁食。

65. 根据权利要求1-64中任一项所述的方法,其中所述rhGAA分子包含与SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:5至少95%一致的胺基酸序列。

66. 根据权利要求1-65中任一项所述的方法,其中所述rhGAA分子包含与SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:5一致的胺基酸序列。

67. 根据权利要求1-66中任一项所述的方法,其中当使用LC-MS/MS测定时,所述rhGAA分子的至少30%包含带有一个甘露糖-6-磷酸酯残基(单M6P)或双M6P的一或多个N-聚糖单元。

68. 根据权利要求1-67中任一项所述的方法,其中当使用LC-MS/MS测定时,所述rhGAA分子包含每摩尔rhGAA平均约0.5摩尔至约7.0摩尔的单M6P或双M6P。

69. 根据权利要求1-68中任一项所述的方法,其中当使用LC-MS/MS测定时,所述rhGAA分子包含每摩尔rhGAA平均至少2.5摩尔的M6P及每摩尔rhGAA至少4摩尔唾液酸。

70. 根据权利要求1-69中任一项所述的方法,其中,每摩尔rhGAA,所述rhGAA分子包含平均:

(a) 在所述第二潜在N-糖基化位点处约0.4至约0.6摩尔单M6P;

(b) 在所述第四潜在N-糖基化位点处约0.4至约0.6摩尔双M6P;及

(c) 在所述第四潜在N-糖基化位点处约0.3至约0.4摩尔单M6P,其中使用LC-MS/MS测定(a) - (c)。

71. 根据权利要求70所述的方法,其中,每摩尔rhGAA,所述rhGAA分子进一步包含约4摩尔至约7.3摩尔唾液酸;且

其中,每摩尔rhGAA,所述rhGAA分子包含平均:

(a) 在所述第三潜在N-糖基化位点处约0.9至约1.2摩尔唾液酸;

(b) 在所述第五潜在N-糖基化位点处约0.8至约0.9摩尔唾液酸;及

(c) 在所述第六潜在N-糖基化位点处约1.5至约4.2摩尔唾液酸;其中使用LC-MS/MS测定(a) - (c)。

72. 根据权利要求1-71中任一项所述的方法,其中rhGAA分子的所述群体是以医药组合物调配。

73. 根据权利要求72所述的方法,其中所述医药组合物进一步包含至少一种缓冲液及至少一种赋形剂,所述至少一种缓冲液选自由柠檬酸盐、磷酸盐、及前述的组合组成的群,所述至少一种赋形剂选自由甘露醇、聚山梨醇酯80、及前述的组合组成的群;其中所述医药组合物具有约5.0至约7.0的pH。

74. 根据权利要求73所述的方法,其中所述医药组合物具有约5.0至约6.0的pH。

75. 根据权利要求73或权利要求74所述的方法,其中所述医药组合物进一步包含水、酸化剂、碱化剂、或前述的组合。

76. 根据权利要求73所述的方法,其中,在所述医药组合物,rhGAA分子的所述群体是以约5-50mg/mL的浓度存在,所述至少一种缓冲液为以约10-100mM的浓度存在的柠檬酸钠缓冲液,所述至少一种赋形剂为以约10-50mg/mL的浓度存在的甘露醇及以约0.1-1mg/mL的浓度存在的聚山梨醇酯80,且所述医药组合物进一步包含水及视情况包含酸化剂及/或碱化

剂;其中所述医药组合物具有约6.0的pH。

77.根据权利要求76所述的方法,其中,在所述医药组合物中,rhGAA分子的所述群体是以约15mg/mL的浓度存在,所述柠檬酸钠缓冲液是以约25mM的浓度存在,所述甘露醇是以约20mg/mL的浓度存在,且所述聚山梨醇酯80是以约0.5mg/mL的浓度存在。

重组人类酸性 α -葡萄糖苷酶

[0001] 本申请为申请日2018年5月15、申请号201880045818.1、发明名称“重组人类酸性 α -葡萄糖苷酶”的发明专利申请的分案申请。

技术领域

[0002] 本申请案主张2017年5月15日申请的美国临时申请案序列号第62/506,561号、2017年5月15日申请的美国临时申请案序列号第62/506,569号、2017年5月15日申请的美国临时申请案序列号第62/506,574号、2017年9月27日申请的美国临时申请案序列号第62/564,083号、2017年10月3日申请的美国临时申请案序列号第62/567,334号、2018年1月16日申请的美国临时申请案序列号第62/618,021号、2018年1月31日申请的美国临时申请案序列号第62/624,638号、及2018年4月20日申请的美国临时申请案序列号第62/660,758号的权益,主张这些申请案中每一者的优先权且其中每一者以全文引用方式并入本文。

[0003] 本发明涉及医学、遗传学及重组糖蛋白生物化学领域,且具体来说,是关于重组人类 α -葡萄糖苷酶(recombinant human α -glucosidase;rhGAA)组合物,其具有较高总含量的带甘露糖-6-磷酸酯的N-聚糖,从而有效地靶向细胞上的CIMPR且随后将rhGAA递送至溶酶体,在溶酶体中,所述rhGAA可分解异常高水平的所累积肝糖。本发明的rhGAA相较于传统rhGAA产品展现优异的对肌细胞的靶向及向溶酶体之后续递送且展现其他药物动力学性质,使得其尤其有效地用于患有庞贝病的受试者的酶替代疗法。

[0004] 本发明也提供用于治疗庞贝病的方法,其包含向个体施用rhGAA及药理学伴侣蛋白的组合。例如,在一些实施例中,本发明提供用于治疗庞贝病的方法,其包含向个体施用rhGAA及美格鲁特(miglustat)的组合。本发明的rhGAA在治疗及逆转罹患庞贝病的受试者中的疾病进程方面展现令人惊讶的功效。

背景技术

[0005] 庞贝病为一种由缺乏酸性 α -葡萄糖苷酶(GAA)活性而产生的遗传性溶酶体贮积症。患有庞贝病的人缺少酸性 α -葡萄糖苷酶(GAA)或具有降低水平的酸性 α -葡萄糖苷酶,所述酶将肝糖分解成作为肌肉的主要能量来源的葡萄糖。这种酶缺乏引起溶酶体中过量的肝糖累积,这些溶酶体为含有一般地分解肝糖及其他细胞碎屑或废产物的酶的细胞内胞器。在患有庞贝病的受试者的某些组织、尤其上肌肉中的肝糖累积削弱细胞正常起作用的能力。在庞贝病中,肝糖并未适当地代谢且逐渐地累积在溶酶体中,尤其在骨骼肌细胞及在疾病的婴儿型发病形式中是累积在心肌细胞中。肝糖的累积破坏肌肉及神经细胞以及其他受影响组织中的那些细胞。

[0006] 传统上,取决于发病的年龄,庞贝病在临床上被视为早期婴儿型形式或晚发型形式。发病的年龄趋向于与引起庞贝病的遗传突变的严重性平行。最严重的遗传突变引起GAA活性的完全损失且在婴儿期期间表现为早期发病疾病。减少GAA活性但并未完全消除的遗传突变与患有延迟型发病及进程的庞贝病形式相关联。婴儿型发病庞贝病在出生后不就表现且特征在于肌肉虚弱、呼吸功能不全及心力衰竭。未治疗时,通常在两年内是致命的。青

少年及成年发病的庞贝病在生命稍后期表现且通常比婴儿型发病的疾病更缓慢地进程。虽然这形式的疾病通常不影响心脏,但其也可造成死亡,这是因为骨骼肌及涉及呼吸的肌肉的弱化。

[0007] 庞贝病的当前非舒减治疗涉及使用重组人类GAA(recombinant human GAA; rhGAA)的酶替代疗法(enzyme replacement therapy;ERT),所述重组人类GAA是已知为Lumizyme®、Myozyme®、或阿葡糖苷酶 α 。这种传统酶替代疗法设法通过施用rhGAA替换溶酶体中遗漏的GAA因此恢复细胞分解溶酶体肝糖的能力来治疗庞贝病。“Lumizyme®”及“Myozyme®”是通过Genzyme作为生物学剂生产或出售且通过美国食品及药物管理局批准的传统形式的rhGAA,且参考Physician's Desk Reference(2014)(其据这以引用方式并入)来描述。阿葡糖苷酶 α 是鉴定为化学名称[199-精胺酸,223-组胺酸]前驱升- α -葡萄糖苷酶(人类);分子式为 $C_{4758}H_{7262}N_{1274}O_{1369}S_{35}$;CAS编号420794-05-0。这些产品是施用至患有庞贝病的受试者,所述庞贝病也称为II型肝糖储积病(glycogen storage disease type II;GSD-II)或酸性麦芽糖酶缺乏病。

[0008] rhGAA分子的细胞吸收是通过特殊碳水化合物甘露糖-6-磷酸酯(M6P)促进,所述碳水化合物结合至存在于诸如肌细胞的靶细胞上的阳离子独立性甘露糖-6-磷酸酯受体(cation-independent mannose-6-phosphate receptor;CIMPR)。在结合之后,rhGAA分子通过靶细胞吸收且随后转运至细胞内的溶酶体中。然而,大多数传统rhGAA产品缺少高总含量的带单M6P及双M6P的N-聚糖(也就是说,分别是带有一个M6P残基的N-聚糖或带有两个M6P残基的N-聚糖),从而限制其通过CIMPR的细胞吸收及溶酶体递送,因此使得传统酶替代疗法低效。例如,虽然20mg/kg或更高剂量的传统rhGAA产品确实改善庞贝病的一些方面,但其尤其不能充分地(i)治疗隐伏的细胞功能障碍,(ii)恢复肌肉结构,或(iii)减少在诸如骨骼肌的许多靶组织中的累积肝糖以逆转疾病进程。另外,较高剂量可对受试者以及治疗受试者的医学专业人士施加另外的负担,诸如使静脉内施用rhGAA所需的输注时间加长。仍然存在对进一步改善用于治疗庞贝病的酶替代疗法的需要,诸如具有改善组织吸收、改善酶活性、改善稳定性、或减少免疫原性的rhGAA。

[0009] GAA或rhGAA的糖基化可通过磷酸转移酶及Canfield等人的美国专利第6,534,300号所描述的揭露酶来活体外(in vitro)酶促修饰以产生M6P基团。酶促糖基化不能充分受控且产生具有不合需要的免疫学及药理学性质的rhGAA。经酶促修饰的rhGAA可仅含有高甘露糖N-聚糖,其全部可潜在地经磷酸转移酶/揭露酶活体外酶促磷酸化且可含有每GAA平均5-6个M6P基团。通过GAA的活体外酶促治疗产生的糖基化型式是有问题的,因为另外的末端甘露糖残基、尤其非磷酸化末端甘露糖残基负面地影响修饰后rhGAA的药物动力学。当这种经酶促修饰产品活体内施用时,这些甘露糖基团增加GAA的非大量清除,增加经酶促修饰GAA通过免疫细胞的吸收,且因为达到靶组织的GAA较少而减少rhGAA治疗功效,这些靶组织诸如心脏或骨骼肌细胞。例如,末端非磷酸化甘露糖残基为肝及脾中的甘露糖受体的已知配位体,其导致经酶促修饰rhGAA的快速清除及rhGAA对靶组织的减少靶向。此外,具有带末端非磷酸化甘露糖残基的高甘露糖N-聚糖的经酶促修饰GAA的糖基化型式类似于在酵母及霉菌中产生的糖蛋白上的糖基化型式,且增加触发对经酶促修饰rhGAA的免疫或过敏反应、诸如危急生命的严重过敏(过敏性)或高敏性反应的风险。

[0010] 鉴于传统rhGAA产品及磷酸化rhGAA的活体外方法的这些缺陷,发明人致力于寻找一种经确认方式来产生具有优化N-聚糖分布的rhGAA以增强生物分布及溶酶体吸收且进而最小化rhGAA在一旦被施用时的非大量清除。本发明为稳定或衰退的庞贝症患者提供一种有效疗法,其在细胞水平逆转疾病进程。发明人也报告:本发明的rhGAA逆转疾病进程一包括比当前照护标准更有效地清除溶酶体肝糖一旦经本发明的rhGAA治疗的患者展现令人惊讶及显著的健康改善,包括肌肉强度、运动功能、及/或肺功能的改善,及/或包括疾病进程的逆转,以上在来自临床研究的各种功效结果(例如,实例10及11)中证明。

发明内容

[0011] 本发明是涉及治疗受试者的诸如庞贝病的疾病或病症的方法,其包含施用重组人类酸性 α -葡萄糖苷酶(rhGAA)分子的群体。

[0012] 本文描述的rhGAA分子可在中国仓鼠卵巢(Chinese hamster ovary;CHO)细胞中表现且包含七个潜在的N-糖基化位点。在一些实施方案中,使用液相色谱-串联质谱法(LC-MS/MS)测定本文所述的rhGAA分子群体的N-糖基化分布。在一些实施例中,rhGAA分子平均包含3-4个甘露糖-6-磷酸酯(M6P)残基。在一些实施例中,rhGAA分子平均在第一潜在N-糖基化位点处包含每摩尔rhGAA约0.5摩尔双磷酸化N-聚糖基团(双M6P)。在一些实施例中,rhGAA包含与SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:5至少95%一致的氨基酸序列。在一些实施例中,rhGAA包含与SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:5一致的氨基酸序列。在一些实施例中,rhGAA分子的至少30%的分子包含带有一个或两个M6P残基的一或多个N-聚糖单元。在一些实施例中,rhGAA分子包含每摩尔rhGAA平均约0.5摩尔至约7.0摩尔的带有一个或两个M6P残基的N-聚糖单元。在一些实施例中,rhGAA分子包含每摩尔rhGAA平均至少2.5摩尔的M6P残基及每摩尔rhGAA至少4摩尔唾液酸残基。在一些实施例中,在第一潜在N-糖基化位点处包含每分子平均3-4个M6P残基及每摩尔rhGAA平均约0.5摩尔双M6P的rhGAA分子进一步包含在第二潜在N-糖基化位点处每摩尔rhGAA平均约0.4至约0.6摩尔的单磷酸化N-聚糖(单M6P)、在第四潜在N-糖基化位点处每摩尔rhGAA约0.4至约0.6摩尔的双M6P、及在第四潜在N-糖基化位点处每摩尔rhGAA约0.3至约0.4摩尔的单M6P。在一些实施例中,rhGAA分子进一步包含每摩尔rhGAA平均约4摩尔至约5.4摩尔的唾液酸残基,包括在第三潜在N-糖基化位点处每摩尔rhGAA约0.9至约1.2摩尔唾液酸、在第五潜在N-糖基化位点处每摩尔rhGAA约0.8至约0.9摩尔唾液酸、及在第六潜在N-糖基化位点处每摩尔rhGAA约1.5至约4.2摩尔唾液酸。在一些实施例中,rhGAA分子的群体是以医药组合物调配。在一些实施例中,包含rhGAA分子的群体的医药组合物进一步包含选自由柠檬酸盐、磷酸盐、及前述的组合组成的群的至少一种缓冲液,及选自由甘露醇、聚山梨醇酯80、及前述的组合组成的群的至少一种赋形剂。在一些实施例中,医药组合物的pH为约5.0至约7.0、约5.0至约6.0、或约6.0。在一些实施例中,医药组合物进一步包含水、酸化剂、碱化剂、或前述的组合。在一些实施例中,医药组合物具有6.0的pH且包含约5-50mg/mL的rhGAA分子的群体、约10-100mM的柠檬酸钠缓冲液、约10-50mg/mL甘露醇、约0.1-1mg/mL聚山梨醇酯80、及水,且视情况包含酸化剂及/或碱化剂。在一些实施例中,医药组合物具有6.0的pH且包含约15mg/mL的rhGAA分子的群体、约25mM的柠檬酸钠缓冲液、约20mg/mL甘露醇、约0.5mg/mL聚山梨醇酯80、及水,且视情况包含酸化剂及/或碱化剂。

[0013] 在一些实施例中, rhGAA分子的群体是以约1mg/kg至约100mg/kg的剂量施用。在一些实施例中, rhGAA分子的群体是以约20mg/kg的剂量施用。在一些实施例中, rhGAA分子的群体是两月一次、每月一次、两周一次、每周一次、每周两次、或每日一次地施用, 例如, 两周一次地施用。在一些实施例中, rhGAA分子的群体是静脉内施用。

[0014] 在一些实施例中, rhGAA分子的群体是与诸如美格鲁特(也称为AT2221)的药理学伴护蛋白或其医药学上可接受的盐并行地或顺序地施用。在一些实施例中, 美格鲁特或其医药学上可接受的盐是经口施用, 例如以约200mg至约600mg、及视情况约260mg的剂量施用。在一些实施例中, rhGAA分子的群体是以约5mg/kg至约20mg/kg的剂量静脉内施用且美格鲁特或其医药学上可接受的盐是以约233mg至约500mg的剂量经口施用。在一些实施例中, rhGAA分子的群体是以约5mg/kg至约20mg/kg的剂量静脉内施用且美格鲁特或其医药学上可接受的盐是以约50mg至约200mg的剂量经口施用。在一个实施例中, rhGAA分子的群体是以约20mg/kg的剂量静脉内施用且美格鲁特或其医药学上可接受的盐是以约260mg的剂量经口施用。在一些实施例中, 美格鲁特或其医药学上可接受的盐是在施用rhGAA分子的群体之前(例如, 在施用rhGAA分子的群体之前约一小时)施用。在至少一个实施例中, 受试者在施用美格鲁特或其医药学上可接受的盐之前至少两个小时及之后至少两个小时禁食。

[0015] 本发明的实施例证明本文描述的rhGAA治疗并逆转患有庞贝病的受试者的疾病进程的功效。

[0016] 在一些实施例中, rhGAA分子的群体是以能够逆转受试者的肌肉纤维中的细胞破坏的剂量施用。例如, 在治疗之后, 受试者的肌肉或肌肉纤维展现正常化的溶酶体大小及/或自噬堆积的解除。在一些实施例中, 在治疗之后, 受试者中分析的肌肉纤维的少于65%具有自噬堆积。在一些实施例中, 在治疗之后, 受试者中分析的肌肉纤维的至少36%具有正常或接近正常的外观。在一些实施方案中, 在治疗后经历疾病进展逆转的受试者是ERT转换患者, 例如先前已经用阿葡糖苷酶 α 治疗至少两年的ERT转换患者。

[0017] 在一些实施例中, rhGAA分子的群体是以能够在受试者的肌肉中比相同剂量的阿葡糖苷酶 α 更快地减少肝糖含量的剂量施用。rhGAA可比相同剂量的阿葡糖苷酶 α 快至少约1.25、1.5、1.75、2.0、或3.0倍地减少肝糖含量。在一些实施例中, rhGAA分子的群体是以在一次、两次、三次、四次、五次、或六次施用之后评定时进一步能够在受试者的肌肉中比以相同剂量施用的阿葡糖苷酶 α 更有效地减少肝糖含量的剂量施用。在一些实施例中, rhGAA分子的群体比以相同剂量施用的阿葡糖苷酶 α 至少约10%、20%、30%、50%、75%、或90%更有效地减少肝糖含量。在一些实施例中, 在治疗之后, 受试者展现较低水平的肝糖累积生物标志物尿己糖四糖(Hex4)。在至少一个实施例中, 受试者中的Hex4水平在治疗之后六个月相对于基线减少至少30%。例如, 先前利用酶替代疗法治的有行动力或无行动力的受试者(ERT切换患者)可在治疗之后六个月相对于基线展现至少35%的Hex4水平减少。在另一情况中, 先前未接收酶替代疗法的有行动力的受试者(ERT原始患者)可在治疗之后六个月相对于基线展现至少45%的Hex4水平减少。

[0018] 在一些实施例中, rhGAA分子的群体是以能够改善受试者的运动功能的剂量施用。运动功能的改善可通过运动功能测试测量, 所述运动功能测试诸如六分钟步行测试(six-minute walk test; 6MWT)、计时起立行走测试、四层楼梯攀爬测试、十米步行测试、Gowers氏测试、步态-楼梯-gower-椅子(gait-stair-gower-chair; GSGC)测试、或前述的组合。在

一些实施例中,在治疗之后六个月的受试者(在相较于基线时)显示至少20米的6MWT距离增加、至少1秒的计时起立行走测试时间减少、至少0.6秒的四层楼梯攀爬测试时间减少、至少0.7秒的十米步行测试时间减少、至少1秒的Gowers氏测试时间减少、及/或至少1的GCSC记分减少。例如,有行动力的ERT切换患者在治疗之后六个月(相较于基线)可展现至少20米的6MWT增加、至少1.5秒的计时起立行走测试时间减少、至少0.6秒的四层楼梯攀爬测试时间减少、及/或至少1秒的Gowers氏测试时间减少。在另一情况中,有行动力的ERT原始患者在治疗之后六个月(相较于基线)可展现至少40米的6MWT距离增加、至少1秒的计时起立行走测试时间减少、至少0.6秒的四层楼梯攀爬测试时间减少、至少0.7秒的十米步行测试时间减少、及/或至少1的GSGC记分减少。在一些实施例中,ERT切换患者在治疗之后在至少一个运动功能测试中相对于在利用阿葡糖苷酶 α 之前述ERT之后的患者的运动功能测试结果展现改善。

[0019] 在一些实施例中,rhGAA分子的群体是以能够改善受试者的上身力量的剂量施用。在一些实施例中,rhGAA分子的群体是施用至有行动力的受试者且进一步能够改善受试者的下身力量及/或全身力量。

[0020] 在一些实施例中,上身力量的改善是使用徒手肌肉力量记分来测量。受试者的徒手肌肉力量记分可在治疗之后六个月相对于基线改善至少1(对于有行动力的ERT切换患者来说)或至少5.5(对无行动力的ERT切换患者来说)。在一些实施例中,ERT切换患者在治疗之后在上身力量中相对于在利用阿葡糖苷酶 α 之前述ERT之后的患者的上身力量展现改善。

[0021] 在一些实施例中,rhGAA分子的群体是以能够改善上肢力量的剂量施用,上肢力量通过定量肌肉测试或肩膀内收、肩膀外展、肘屈曲、及/或肘伸展的徒手肌肉测试来测量。例如,在治疗之后六个月,相对于基线,无行动力的ERT切换患者可展现至少8磅力的肩膀内收改善、至少1磅力的肩膀外展改善、至少2磅力的肘屈曲改善、及/或至少5磅力的肘伸展改善。

[0022] 在一些实施例中,rhGAA分子的群体是以能够改善受试者的肺功能的剂量施用。运动功能的改善可通过肺功能测试测量,所述肺功能测试诸如直立(坐立)用力肺活量测试、最大呼气压(maximal expiratory pressure; MEP)测试、最大吸气压(maximal inspiratory pressure; MIP)测试、或前述的组合。在一些实施例中,受试者在治疗之后六个月(当与基线比较时)显示至少4%的FVC改善、至少16厘米水柱的MEP改善、及/或至少0.3厘米水柱的MIP改善。例如,有行动力的ERT切换患者在治疗之后六个月(相较于基线)可展现至少16厘米水柱的MEP改善。在另一情况中,有行动力的ERT原始患者在治疗之后六个月(相较于基线)可展现至少4%的FVC改善及/或至少11厘米水柱的MIP改善。在一些实施例中,ERT切换患者在治疗之后在至少一个肺功能测试中相对于在利用阿葡糖苷酶 α 之前述ERT之后的患者的肺功能测试结果展现改善。

[0023] 在一些实施例中,rhGAA分子的群体是以能够减少受试者的疲劳的剂量施用,疲劳根据疲劳严重程度量表(fatigue severity scale; FSS)记分所测量。例如,受试者可为无行动力的ERT切换患者且在治疗之后六个月时相对于基线展现至少3.5的FSS记分减少。在另一实例中,受试者可为有行动力的ERT切换患者且在治疗之后六个月时相对于基线展现至少8的FSS记分减少。在又一实例中,受试者可为有行动力的ERT原始患者且在治疗之后六个月时相对于基线展现至少5的FSS记分减少。在一些实施例中,ERT切换患者在治疗之后相

对于在利用阿葡萄糖苷酶 α 之前述ERT之后的患者的FSS记分展现较低的FSS记分。

[0024] 在一些实施例中, rhGAA分子的群体是以能够减少肌肉损伤的至少一种生物标志物的水平的剂量施用, 所述至少一种生物标志物例如肌酸激酶(creatine kinase; CK)、丙氨酸转氨酶(alanine aminotransferase; ALT)、天冬氨酸转氨酶(aspartate aminotransferase; AST)、或前述的组合。在一些实施例中, 受试者的CK水平在治疗之后六个月相对于基线减少至少15%, 受试者的ALT水平在治疗之后六个月相对于基线减少至少5%, 及/或受试者的AST水平在治疗之后六个月相对于基线减少至少5%。例如, 受试者可为有行动力的ERT切换患者且在治疗之后六个月时相对于基线展现至少15%的CK水平减少、至少15%的ALT水平减少、及/或至少10%的AST水平减少。在另一实例中, 受试者可为无行动力的ERT切换患者且在治疗之后六个月时相对于基线展现至少20%的CK水平减少、至少5%的ALT水平减少、及/或至少5%的AST水平减少。在又一实例中, 受试者可为有行动力的ERT原始患者且在治疗之后六个月时相对于基线展现至少35%的CK水平减少、至少35%的ALT水平减少、及/或至少30%的AST水平减少。

附图说明

[0025] 第1A图展示非磷酸化高甘露糖N-聚糖、单M6P N-聚糖、及双M6P N-聚糖。第1B图展示M6P基团的化学结构。每一正方形表示N-乙酰葡萄糖胺糖(GlcNAc), 每一圆形表示甘露糖, 且每一P表示磷酸盐。

[0026] 第2A图描述rhGAA通过带M6P的N-聚糖对靶组织(例如患有庞贝病的受试者的肌肉组织)的大量靶向。第2B图描述对非靶组织(例如肝及脾)的非大量药物清除或通过非M6P N-聚糖与非靶组织的结合。

[0027] 第3图为用于制造、俘获及纯化重组溶酶体蛋白质的示范性方法的示意图。

[0028] 第4图展示利用编码rhGAA的DNA转变CHO细胞的DNA构筑体。

[0029] 第5图展示在利用(实施例2)及不利用(实施例1)阴离子交换(AEX)管柱上的俘获的情况下ATB200 rhGAA的CIMPR亲和力层析的结果的图表。

[0030] 第6A图-第6H图展示使用了两种不同的LC-MS/MS分析技术的ATB200 rhGAA的位点特异性N-糖苷化分析的结果。第6A图展示用于ATB200的七个潜在N-糖基化位点的位点占用率。第6B图展示用于ATB200的第一潜在N-糖基化位点的N-糖基化分布的两个分析。第6C图展示用于ATB200的第二潜在N-糖基化位点的N-糖基化分布的两个分析。第6D图展示用于ATB200的第三潜在N-糖基化位点的N-糖基化分布的两个分析。第6E图展示用于ATB200的第四潜在N-糖基化位点的N-糖基化分布的两个分析。第6F图展示用于ATB200的第五潜在N-糖基化位点的N-糖基化分布的两个分析。第6G图展示用于ATB200的第六潜在N-糖基化位点的N-糖基化分布的两个分析。第6H图概述第一、第二、第三、第四、第五、及第六潜在N-糖基化位点的单磷酸化及双磷酸化物质的相对百分比。

[0031] 第7图展示Lumizyme®(阿葡萄糖苷酶 α , 较细线, 洗脱至左侧)及ATB200(较粗线, 洗脱至右侧)的Polywax洗脱分布的图表。

[0032] 第8图展示Lumizyme®相较于识别为BP-rhGAA、ATB200-1及ATB200-2的ATB200 rhGAA的三种不同制剂的N-聚糖结构的摘要的表。

[0033] 第9A图及第9B图分别为展示Lumizyme®及Myozyme®的CIMPR亲和力层析的结

果的图表。

[0034] 第10A图为将ATB200 rhGAA的CIMPR结合亲和力(左侧迹线)与Lumizyme®的彼CIMPR结合亲和力(右侧迹线)比较的图表。第10B图为比较Lumizyme®及ATB200rhGAA的双M6P含量的表。

[0035] 第11A图为在各种GAA浓度下比较正常纤维母细胞内部ATB200 rhGAA活性(左侧迹线)与Lumizyme® rhGAA活性(右侧迹线)的图表。第11B图为在各种GAA浓度下比较来自患有庞贝病的受试者的纤维母细胞内部ATB200 rhGAA活性(左侧迹线)与Lumizyme® rhGAA活性(右侧迹线)的表。第11C图为比较来自正常受试者及患有庞贝病的受试者的纤维母细胞的 $K_{\text{吸收}}$ 的表。

[0036] 第12图描绘在染料的荧光在蛋白质变性时增加时在使用SYPRO Orange的热稳定性检定中评估的ATB200在酸性或中性pH缓冲液中的稳定性。

[0037] 第13图展示使用淀粉葡萄糖苷酶消化测定的WT小鼠或利用媒剂、阿葡糖苷酶 α 、或ATB200/AT2221治疗的Gaa KO小鼠的组织肝糖含量。柱条表示7只小鼠/组的平均值 $\pm$ SEM。* $p < 0.05$, 在单向ANOVA分析下使用邓奈特方法进行的多重比较中相较于阿葡糖苷酶 α 来说。

[0038] 第14图描绘利用媒剂、阿葡糖苷酶 α 、或ATB200/AT2221治疗的Gaa KO小鼠或WT小鼠的肌肉纤维中的LAMP1阳性囊泡。影像是自外股肌获取且表示每组7只小鼠。放大率=200x(插图1,000x)。

[0039] 第15A图展示利用媒剂、阿葡糖苷酶 α 、或ATB200/AT2221治疗的Gaa KO小鼠或WT小鼠的肌肉纤维中的LC3阳性聚集体。影像是自外股肌获取且表示每组7只小鼠。放大率=400x。第15B图展示LC3 II蛋白质的西方墨点分析。每一泳道加载总共30mg蛋白质。

[0040] 第16图展示利用媒剂、阿葡糖苷酶 α 、或ATB200/AT2221治疗的Gaa KO小鼠或WT小鼠的肌肉纤维中的Dysferlin表现。影像是自外股肌获取且表示每组7只小鼠。放大率=200x。

[0041] 第17图描绘自利用媒剂、阿葡糖苷酶 α 、或ATB200治疗的Gaa KO小鼠的白色腓肠肌分离的单个纤维中LAMP1(绿色)及LC3(红色)的共免疫荧光染色。“C”描述自噬碎片的清除和不存在扩大溶酶体。自每一动物检查最少30个纤维。

[0042] 第18图描绘相较于单独的ATB200,分别在17 μ M及170 μ M AT2221下ATB200通过AT2221的稳定。

[0043] 第19A图及第19B图展示ATB200-02研究设计。低剂量=130mg。高剂量=260mg。在第26A图中,“6MWT”=6分钟步行测试;“FVC”=用力肺活量;“QOW”=每隔一周。“a”=在群组2及3中给药之前,在每一剂量水平下审查来自群组1的2位警哨患者的安全数据;“b”=在阶段2及3期间,在开始ATB200静脉内输注之前经口施用AT2221。针对所有剂量,ATB200是静脉内输注4小时的持续时间。“c”=群组2及3中的前2位患者用作其相应群组的警哨患者。第19C图概述跨于群组1、2、及3登记的患者的基线特性。“NA”=不适用。“SD”=标准偏差。“a”=要求群组1患者在基线服用阿葡糖苷酶 α 达2-6年。LOPD=晚发型庞贝病。

[0044] 第20图描绘AT2221的药物动力学数据。“AUC”=曲线下方面积;“CL/F”=针对AT2221经口生物可用性调整的血浆清除率;“ C_{max} ”=最大药物浓度;“CV”=变异系数;“ $t_{1/2}$ ”=半衰期;“ t_{max} ”=达到最大药物浓度的时间;“ V_z/F ”=针对AT2221经口生物可用性调整的

表观终末期分布体积。“a”=几何平均值(CV%);“b”=中值(min-max);“c”=算术平均值(CV%)。

[0045] 第21图描绘群组1及3的通过署名肽(signature peptide)T09的总GAA蛋白质。“AUC”=曲线下方面积;“CL_T”=全身清除率;“C_{max}”=最大药物浓度;“CV”=变异系数;“MD”=多剂量;“t_{1/2}”=半衰期;“t_{max}”=达到最大药物浓度的时间;“F_{rel}”=单独的20mg/kg ATB 200及单独的10mg/kg ATB200对比单独的5mg/kg ATB200,及20mg/kg ATB200+低剂量或高剂量AT2221相对单独的20mg/kg ATB200的AUC比率。“a”=几何平均值(CV%);“b”=中值(min-max);“c”=算术平均值(CV%);“d”=n=11;“e”=n=5。低剂量=130mg。高剂量=260mg。

[0046] 第22A图、第22B图、第22C图、第22D图、第22E图、及第22F图按群组描绘总GAA蛋白质。低剂量=130mg。高剂量=260mg。第22A图展示群组1(单剂量)的平均总GAA蛋白质浓度-时间分布。第22B图展示群组1(多剂量)的平均总GAA蛋白质浓度-时间分布。第22C图展示群组1对比群组3(单剂量)的平均总GAA蛋白质浓度-时间分布。第22D图展示群组1对比群组3(多剂量)的平均总GAA蛋白质浓度-时间分布。第22E图展示在给药后12小时与20mg/kg ATB200进行的总GAA蛋白质比较;*= $p<0.05$;**= $p<0.01$ ***= $p<0.001$ 。第22F图展示在给药后24小时与20mg/kg ATB200进行的总GAA蛋白质比较;*= $p<0.05$;**= $p<0.01$;“ns”=不显著。

[0047] 第23图展示对通过署名肽T09的总GAA蛋白质的变异数分析(analysis of variance;ANOVA)。曲线下方面积(area under the curve;AUC)是以 $\mu\text{g}\cdot\text{h/mL}$ 提供;“CI”=信赖区间。

[0048] 第24A图描绘来自6分钟步行测试(6-Minute Walk Test;“6MWT”)的分析及可利用期中数据的概要,展示群组1及群组3中的患者的在第6个月、第9个月、及第12个月时自基线的变化(change from baseline;“CFBL”)。

[0049] 第24B图描绘个别群组1及群组3患者的6MWT数据。

[0050] 第24C图描绘来自其他运动功能测试:计时起立行走运动功能测试;4层楼梯攀爬测试;十米(10M)步行测试;Gowers氏测试;及步态-楼梯-gower-椅子(gait-stair-gower-chair;“GSGC”)运动功能测试的分析及可利用期中数据的概要,展示群组1及群组3中的患者的在第6个月、第9个月、及第12个月时自基线的变化(change from baseline;“CFBL”)。GSGC为以下四种运动功能评定的观察者分级组合记分:步态(10米步行)、4层楼梯攀爬、Gowers氏(自地板站立)、及自椅子坐起。每一测试自1(正常)至7(无法执行;针对自椅子坐起的测试最大记分为6)记分。总记分范围为4至27。“a”=n=9,未获得的缺失值是因为患者拒绝执行测试;“b”=自基线的中值变化为-1.5,且7/9的患者具有减少量;“c”=自基线的中值变化为-0.8,且4/5的患者具有减少量。

[0051] 第25图描绘来自肌肉力量测试(QMT)的分析及可利用期中数据的概要,展示群组2中的患者的在第6个月及第9个月时自基线的变化(change from baseline;“CFBL”)。QMT=定量肌肉测试。所展示值表示右侧及左侧组合的力的磅数。“a”=对一位受试者肩膀内收不可用;“b”=记分:(1)可见肌肉移动,但在关节处无移动;(2)在关节处移动,但不对抗重力;(3)对抗重力的移动,但不对抗增加的阻力;(4)对抗阻力的移动,但不及正常状态;(5)正常力量。

[0052] 第26A图描绘群组1患者中来自徒手肌肉测试(manual muscle test;MMT)的分析及可利用期中数据的概要。对上身(最大记分:40)、下身(最大记分:40)、及全身(最大记分:80)计算MMT记分。在群组1患者中,在第6个月、第9个月、及第12个月时观察到徒手肌肉力量的增加。“SD”=标准偏差。

[0053] 第26B图描绘群组2患者中来自徒手肌肉测试(manual muscle test;MMT)的分析及可利用期中数据的概要。对上身(最大记分:40)计算MMT记分。在群组2患者中,在第6个月及第9个月时观察到徒手肌肉力量的增加。“SD”=标准偏差。MMT结果大体上与QMT结果一致(第28图中展示)。

[0054] 第26C图描绘群组3患者中来自徒手肌肉测试(manual muscle test;MMT)的分析及可利用期中数据的概要。对上身(最大记分:40)、下身(最大记分:40)、及全身(最大记分:80)计算MMT记分。在群组3患者中,在第6个月、第9个月、及第12个月的每一者时观察到徒手肌肉力量的增加。“SD”=标准偏差。

[0055] 第27图描绘来自坐立用力肺活量(FVC)、最大吸气压(“MIP”)、及最大呼气压(“MEP”)的分析及可利用期中数据的概要,展示群组1及群组3中的患者的在第6个月、第9个月、及第12个月时自基线的变化(change from baseline;“CFBL”)。“a”=对一位受试者FVC不可用。MEP及MIP是以厘米水柱测量。

[0056] 第28图描绘来自疲劳严重程度量表(Fatigue Severity Scale;“FSS”)的分析及可利用期中数据的概要,所述疲劳严重程度量表是一种由九项问题组成的自我评定调查表,每一问题以1至7的量表来记分。总记分范围为9至63,其中较高值表示因为疾病病状导致的较高疲劳程度。健康群体中的正常值为约21。第28图展示群组1、群组2、及群组3中的患者的在第6个月、第9个月、及第12个月时自基线的变化(change from baseline;“CFBL”)。

[0057] 第29A图-第29C图描绘所有患者群组中标志物损伤的标志物(丙胺酸转胺酶、天冬胺酸转胺酶、及肌酸激酶)的自基线的平均变化百分比。第29A图描绘历经58周来自群组1患者的数据,第29B图描绘历经24周来自群组2患者的数据,且第29C图描绘历经36周来自群组3患者的数据。第29D图描绘群组1、群组2、及群组3中的患者的直至12个月的肌肉损伤的标志物(CK=肌酸激酶)及疾病底物的标志物(Hex4=尿己糖四酹)的自基线的平均变化百分比。“BL”=基线。“SE”=标准误差。“WK”=周。“M”=月。

[0058] 第30图概述来自ATB200-02研究的安全数据。“AE”=不利事件。“IAR”=输注相关反应;“a”=通过期中数据分析报告(最多20+个月);“b”=包括上腹痛及下腹痛。

[0059] 第31图概述来自ATB200-02研究的可利用功效及安全数据。

[0060] 第32A-32H图示出了使用蛋白酶消化的ATB200的LC-MS/MS分析,对ATB200rhGAA的位点特异性N-糖基化分析的结果,包括第七个潜在的N-糖基化位点的N-糖基化分布。第32A-32H图提供了以不同规模生产的十批ATB200的平均数据。

[0061] 第32A图显示了ATB200的七个潜在的N-糖基化位点的平均位点占有率。根据SEQ ID NO:1提供N-糖基化位点。CV=变异系数。

[0062] 第32B-32H图显示了ATB200的所有七个潜在N-糖基化位点的位点特异性N-糖基化分析,其位点编号根据SEQ ID NO:5提供。各条表示识别为所分析的十批ATB200的特定N-聚糖基团的N聚糖物质的最大和最小百分比。第32B图示出了ATB200的第一潜在的N-糖基化位点的N-糖基化分布。第32C图显示了ATB200的第二个潜在的N-糖基化位点的N-糖基化分布。

第32D图示出了ATB200的第三潜在的N-糖基化位点的N-糖基化分布。第32E图示出了ATB200的第四潜在的N-糖基化位点的N-糖基化分布。第32F图显示了ATB200的第五个潜在的N-糖基化位点的N-糖基化分布。第32G图示出了ATB200的第六个潜在的N-糖基化位点的N-糖基化分布。第32H图显示了ATB200的第七个潜在的N-糖基化位点的N-糖基化分布。

[0063] 也如第32A-32H图所示,第33A-33B图进一步表征和总结了ATB200的N-糖基化分布。第33A图显示了ATB200的2-邻氨基苯甲酸(2-AA)聚糖图分布和LC/MS-MS分析,并总结了ATB200中识别出的N-聚糖种类占总荧光的百分比。表5还列出了2-AA聚糖图分布和LC-MS/MS分析的数据。第33B图总结了对于ATB200的所有七个潜在N-糖基化位点,平均位点占用率和平均N-聚糖分布,包括总磷酸化、单磷酸化、双磷酸化和唾液酸化,ND=未检测到。

具体实施方式

[0064] 在描述本发明的若干示范性实施例之前,应理解本发明不限于以下描述中阐述的构造细节或方法步骤。本发明能够有其他实施例且以各种方式实践或进行。

[0065] I. 定义

[0066] 本说明书使用的术语在本发明的上下文内及在使用每一术语的特定情形中大体上具有其在本项技术中的普通含义。某些术语在下文或在说明书中其他处论述来为行医者提供描述本发明的组合物及方法及如何制得及使用的另外的指导。冠词“一(a)”及“一(an)”是指一个或多于一个(也就是说,至少一个)所述冠词的语法对象。除非上下文另外清楚地指示,否则术语“或”意味着术语“及/或”且可与术语“及/或”互换地使用。在本申请案中,除非另外具体地说明,否则单数的使用包括复数。此外,术语“包括(including)”以及其他形式诸如“包括(includes)”及“包括(included)”的使用不受限制。本文描述的任何范围将理解为包括端点及端点之间的所有值。在本说明书中,除非上下文另外由于表达语言或必要暗示而需要的情况,否则用词“包含(comprises)”或变化形式诸如“包含(comprising)”是以包括性意义使用,也就是说,用以指定所述特征的存在但不排除在本发明的各种实施例中存在或增加其他特征。

[0067] 术语“GAA”是指催化溶酶体肝糖的 α -1,4-糖苷键及 α -1,6-糖苷键的水解的人类酸性 α -葡萄糖苷酶(GAA)以及GAA氨基酸序列的插入、相关、或取代变异体及发挥酶促活性的较长GAA序列的片段。人类酸性 α -葡萄糖苷酶是通过GAA基因(美国国家生物科技信息中心(National Centre for Biotechnology Information;NCBI)基因ID 2548)编码,其已映像(mapped)至染色体17(位置17q25.2-q25.3)的长臂。编码GAA的示范性DNA序列为NP 000143.2,其是以引用方式并入。当前已在人类GAA基因中鉴别出多于500种突变,其中许多与庞贝病相关联。造成酸性 α -葡萄糖苷酶的错误折迭或错误加工的突变包括T1064C(Leu355Pro)及C2104T(Arg702Cys)。另外,影响酶的成熟及加工的GAA突变包括Leu405Pro及Met519Thr。氨基酸残基516-521处的保守六肽WIDMNE是酸性 α -葡萄糖苷酶蛋白质的活性所需的。如本文所使用,缩写“GAA”意欲指代人类酸性 α -葡萄糖苷酶,而斜体缩写“Gaa”意欲指代编码人类酸性 α -葡萄糖苷酶的人类基因。斜体缩写“Gaa”意欲指代编码非人类酸性 α -葡萄糖苷酶的非人类基因,包括但不限于大鼠或小鼠基因,且缩写“Gaa”意欲指代非人类酸性 α -葡萄糖苷酶。

[0068] 术语“rhGAA”意欲指代重组人类酸性 α -葡萄糖苷酶且是用于将内源性GAA与合成

或重组产生的GAA（例如，由利用编码GAA的DNA转变的CHO细胞产生的GAA）区别。术语“rhGAA”涵盖个别rhGAA分子的群体。本文提供rhGAA分子的群体的特性。术语“传统rhGAA产品”意欲指代含有阿葡糖苷酶 α 的产品，诸如Lumizyme®或Myozyme®。

[0069] 术语“经遗传修饰”或“重组”是指在引入包含编码基因产物的编码序列的核酸连同控制编码序列的表现的调控组件之后表现诸如rhGAA的特定基因产物的细胞，诸如CHO细胞。核酸的引入可通过本项技术中所知的包括基因靶向及同源重组的任何方法来完成。如本文所使用，术语也包括已经工程化来例如通过基因活化技术表现或过度表现这种细胞不正常表现的內源性基因或基因产物的细胞。

[0070] 如本文所使用的术语“纯化”是指已在减少或消除无关材料的存在的条件下分离的材料，这些无关材料也就是说污染物，包括自其获得材料的原始材料。例如，纯化蛋白质优选地基本上不含在细胞中与其相关联的其他蛋白质或核酸；纯化核酸分子优选地基本上不含在细胞内可与其一起发现的蛋白质或其他无关核酸分子。如本文所使用，术语“基本上不含”是在材料的分析测试的上下文中在操作上使用。优选地，基本上不含污染物的纯化材料为至少95%纯；更优选地，至少97%纯，及又更优选地至少99%纯。纯度可通过层析法、凝胶电泳、免疫检定、组成分析、生物检定、酶促检定及本项技术中所知的其他方法来评估。在特定实施例中，纯化意指污染物的水平低于管制机构对安全施用至人类或非人类动物可接受的水平。诸如rhGAA的重组蛋白质可使用这项技术中所知的方法自CHO细胞分离或纯化，这些方法包括层析粒度分离、亲和力层析、或阴离子交换层析法。在一些实施例中，rhGAA是通过包含阴离子交换层析法的方法，然后执行固定金属亲和力层析，视情况，然后在使用第三层析管柱纯化来纯化。

[0071] 如本文所使用，术语“阿葡糖苷酶 α ”意欲指代鉴定为[199-精胺酸，223-组胺酸]前驱升- α -葡萄糖苷酶（人类）的重组人类酸性 α -葡萄糖苷酶；化学摘要注册号420794-05-0。阿葡糖苷酶 α 在美国获准由Genzyme作为产品Lumizyme®及Myozyme®上市出售。

[0072] 如本文所使用，术语“ATB200”意欲指代国际申请案PCT/US2015/053252中描述的重组人类酸性 α -葡萄糖苷酶，所述国际申请案的公开内容以引用方式并入本文。

[0073] 如本文所使用，术语“聚糖”意欲指代共价结合至蛋白质或多肽上的胺基酸残基的多糖链。如本文所使用，术语“N-聚糖”或“N-连接聚糖”意欲指代通过与蛋白质或多肽上的胺基酸残基的氮原子的共价结合连接至所述胺基酸残基的多糖链。例如，N-聚糖可共价结合至天冬酰胺酸残基的侧链氮原子。聚糖可含有一个或若干个单糖单元，且单糖单元可共价连接来形成直链或支链。在至少一个实施例中，连接至rhGAA的N-聚糖单元可包含各自独立地选自N-乙酰葡萄糖胺糖、甘露糖、半乳糖、海藻糖、甘露糖-6-磷酸酯或唾液酸的一或多个单糖单元。蛋白质上的N-聚糖单元可通过诸如质谱法的任何适当分析技术来测定。在一些实施例中，连接至rhGAA的N-聚糖单元是通过液相层析-串联式质谱法（liquid chromatography-tandem mass spectrometry；LC-MS/MS）利用诸如以下各项的仪器来测定：Thermo Scientific™Orbitrap Velos Pro™质谱仪、Thermo Scientific™Orbitrap Fusion™Lumos Tribid™质谱仪或WatersXevo®G2-XS QToF质谱仪。

[0074] 如本文所使用，术语“高甘露糖N-聚糖”意欲指代具有一至六个或更多个甘露糖单元的N-聚糖。在一些实施例中，高甘露糖N-聚糖单元可含有键结至天冬酰胺酸残基且进一步键结至分支聚甘露糖链的的双（N-乙酰葡萄糖胺糖）链。如本文可互换地使用，术语“M6P”或

“甘露糖-6-磷酸酯”意欲指代在6位置处磷酸化,也就是说,在6位置处具有键结至羟基的磷酸基的甘露糖单元。在一些实施例中,一或多个N-聚糖单元的一或多个甘露糖单元在6位置处经磷酸化以形成甘露糖-6-磷酸酯单元。在一些实施例中,术语“M6P”或“甘露糖-6-磷酸酯”是指在磷酸基上具有作为“帽盖”的N-乙酰葡萄糖胺糖(GlcNAc)的甘露糖磷酸二酯,以及具有缺乏GlcNAc帽盖的暴露磷酸基的甘露糖单元。在至少一个实施例中,蛋白质的N-聚糖可具有多个M6P基团,其中至少一个M6P基团具有GlcNAc帽盖且至少一个其他M6P基团缺乏GlcNAc帽盖。

[0075] 如本文所用,术语“复合N-聚糖”是指包含除GlcNAc和甘露糖以外的糖类型的N-聚糖,例如一种或多种半乳糖和/或唾液酸单元。在至少一个实施例中,复合N-聚糖可为高甘露糖N-聚糖,其中一或多个甘露糖单元进一步键结至一或多个单糖单元,这些单糖单元各自独立地选自N-乙酰葡萄糖胺糖、半乳糖、及唾液酸。如本文所用,“杂合N-聚糖”是指包含至少一个高甘露糖分支和至少一个复杂分支的N-聚糖。非磷酸化、单M6P、及双M6P N-聚糖的代表性结构展示于第1A图中。甘露糖-6-磷酸酯基团展示在第1B图中。

[0076] 如本文所使用,肌肉纤维中的溶酶体的“正常化”是指通过减少肌肉纤维中累积肝糖的大小及数量以便受影响肌肉纤维将基本上类似于正常溶酶体形态来将所述受影响肌肉纤维恢复至野生型肌肉纤维的溶酶体形态,从而最终引起疾病进程逆转的过程。

[0077] 如本文所用,“疾病进程的逆转”尤其是指充分(i)减少或消除糖原积累,(ii)减少或消除溶酶体肿胀和/或功能障碍,和(iii)减少或消除自噬碎片的积累。在有行动力的ERT庞贝病患者中,疾病进程的逆转可能表现为以下两项或多项以下“临床改善”;(a)六分钟步行测试距离平均增加至少20米;(b)最大呼气压力平均增加至少16厘米水柱;(c)疲劳严重程度评分平均降低至少7。在无行动力的ERT庞贝病患者中,疾病进程的逆转可能表现为以下两项或多项以下“临床改善”:(a)至少8磅力的平均肩关节内收改善;(b)至少5磅力的平均肘伸展改善;以及(c)疲劳严重程度评分平均降低至少3.5。ERT原始庞贝病患者的疾病进程逆转可能表现为以下两项或多项以下“临床改善”;(a)六分钟步行测试距离的平均增加至少40米;(b)直立(坐着)的用力肺活量平均增加至少4%;(c)最大吸气压力的平均增加为至少11厘米水柱,和(d)疲劳严重程度评分平均下降至少5。

[0078] 与施用阿葡萄糖苷酶 α 相比,本文公开的治疗方法的优点在于用前者治疗的庞贝患者表现出延长的临床改善。例如,可以在从第一次治疗开始的两到三年或更长时间观察到改善,包括例如从第一次治疗开始的四年,五年或六年。相比之下,经过两年的标准护理(例如,阿葡萄糖苷酶 α)的酶替代疗法后,庞贝病患者要么(i)在治疗前保持基线水平升高,但在两年或三年后没有明显改善评分或(ii)在接受标准护理后的两到三年内逐渐下降并失去任何收益。“Kuperus等人2017,酶替代疗法在庞贝病中的长期益处;一项为期5年的前瞻性研究,神经病学,89:2365-2373”。相反,本文所述的rhGAA比标准的护理更有效地清除了溶酶体糖原,并且已显示可引起患者的改善(例如,“有行动力ERT切换”,研究ATB200-02的群组1),但预期不会在服用酶替代疗法至少两年后改善。迄今为止,即使在治疗后两年后,使用本文所述的rhGAA或药物组合物的临床数据仍有望持续改善患者的预后。因此,在一些实施例中,用本文所述的rhGAA或药物组合物治疗的患者在治疗后两年以上继续表现出一种或多种临床改善的进程(改善超出了两年标记前或两年标记时刻所达到的改善)。

[0079] 如本文所使用,“溶酶体病理学的逆转”意味着由于缺乏最佳GAA活性的导致已累

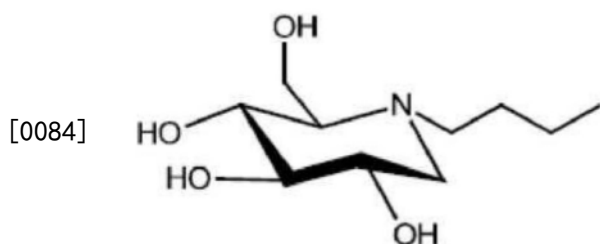
积在细胞中的肝糖部分或完全清除。

[0080] 如本文所使用,用力肺活量或“FVC”为在受试者做出可能的最深呼吸之后可自受试者的肺用力呼出的空气量。

[0081] 如本文所使用,“六分钟步行测试”(6MWT)为用于测量个体在硬质、平坦表面上历经总共六分钟能够步行的距离的测试。所述测试是通过使个体在六分钟内尽可能远地步行来进行。

[0082] 如本文所使用的,“十米步行测试”(10MWT)是用于测量个体穿着步行鞋在平坦表面上步行十米所花费的时间的测试。

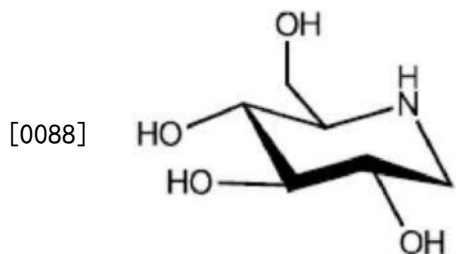
[0083] 如本文所使用,化合物美格鲁特也称为N-丁基-1-脱氧野尻霉素或NB-DNJ或(2R,3R,4R,5S)-1-丁基-2-(羟甲基)哌啶-3,4,5-三醇,其为具有以下化学式的化合物:



[0085] 美格鲁特的一种调配物是以商标名 **zavesca®** 市售,以作为用于1型高歇氏病的单一疗法。在一些实施例中,美格鲁特是指代为AT2221。

[0086] 如下文所论述,美格鲁特的医药学上可接受的盐也可用于本发明。当使用美格鲁特的盐时,盐的剂量将经调整以便患者接收的美格鲁特的剂量等于当使用美格鲁特游离碱时将接收的量。

[0087] 如本文所使用,化合物杜格鲁特(duvoglustat)也称为1-脱氧野尻霉素或DNJ或(2R,3R,4R,5S)-2-(羟甲基)哌啶-3,4,5-三醇,其为具有以下化学式的化合物:



[0089] 如本文所使用,术语“药理学伴护蛋白”或有时简单来说术语“伴护蛋白”意欲指代特异地结合至酸性 α -葡萄糖苷酶且具有以下效应的一或多个的分子:

- [0090] • 增强蛋白质的稳定分子构形的形成;
- [0091] • 增强蛋白质自内质网至另一细胞位置、优选地原始细胞位置的得当运送,以便防止蛋白质的内质网相关联降解;
- [0092] • 防止构形不稳定或错误折迭的蛋白质的聚集;
- [0093] • 恢复及/或增强蛋白质的至少部分野生型功能、稳定性、及/或活性;及/或
- [0094] • 改善藏有酸性 α -葡萄糖苷酶的细胞的表现型或功能。

[0095] 因此,酸性 α -葡萄糖苷酶的药理学伴护蛋白为结合至酸性 α -葡萄糖苷酶,从而产生酸性 α -葡萄糖苷酶的得当折迭、运送、非聚集、及活性。如本文所使用,这个术语包括但不限于活性位点特异性伴护蛋白(active site-specific chaperone;ASSC),其结合在酶、抑

制剂或拮抗剂、及促效剂的活性位点中。在至少一个实施例中,药理学伴护蛋白可为酸性 α -葡萄糖苷酶的抑制剂或拮抗剂。如本文所使用,术语“拮抗剂”意欲指代结合至酸性 α -葡萄糖苷酶且部分地或完全地阻断、抑制、减少、或中和酸性 α -葡萄糖苷酶的活性的任何分子。在至少一个实施例中,药理学伴护蛋白为美格鲁特。用于酸性 α -葡萄糖苷酶的药理学伴护蛋白的另一非限制性实例为杜格鲁特。

[0096] 如本文所使用,术语“活性位点”意欲指代蛋白质中与所述蛋白质的特异生物活性相关联及所述特异生物活性所必需的区域。在至少一个实施例中,活性位点可为结合底物或其他结合配偶体且贡献出直接参与构成及破坏化学键的氨基酸残基的位点。本发明中的活性位点可涵盖酶的催化位点、抗体的抗原结合位点、受体的配位体结合结构域、调节蛋白的结合结构域、或分泌蛋白质的受体结合结构域。活性位点也可涵盖转录因子及调节蛋白的转录活化、蛋白质-蛋白质相互作用、或DNA结合结构域。

[0097] 如本文所使用,术语“AUC”或“曲线下方面积”意欲指代评估身体随时间对给定药物的总体暴露量的数学计算。在绘制出施用至受试者的药物的血液中浓度如何在给药之后随时间变化的图表中,药物浓度变量位于y轴上且时间位于x轴上。针对指定时间间隔在药物浓度曲线与x轴之间的面积为AUC。AUC是用作用于给药时程的指导且用于比较在体内可利用的不同药物的生物可用性。

[0098] 如本文所使用,术语“ $C_{\max}$ ”意欲指代在施用受试者之后达成的最大药物血浆浓度。

[0099] 如本文所使用,术语“分布体积”或“V”意欲指代在血液血浆中观察到的相同浓度下含有所施用药物的总量所必需的理论体积,且其表示药物分布在身体组织中而非血浆中的程度。较高的V值指示较大程度的组织分布。“中心分布体积”或“ V_c ”意欲指代在血液及由血液高度灌注的组织内的分布体积。“周边分布体积”或“ V_2 ”意欲指代周边组织内的分布体积。

[0100] 如本文可互换使用的,术语“清除率”、“全身性清除率”或“CL”意欲指代每单位时间完全清除所施用药物的血浆体积。“周边清除率”意欲指代每单位时间清除所施用药物的周边组织体积。

[0101] 如本文所使用,术语“医药学上可接受的”意欲指代生理学上可耐受的且在施用至人类时典型地不产生不良反应的分子实体及组合物。优选地,如本文所使用,术语“医药学上可接受的”意味着通过联邦或州政府的管制机关批准或列在美国药典或其他普遍认可的药典中,适用于动物,且更特地说适用于人类。如本文所使用,术语“载剂”意欲指代与化合物一起施用的稀释剂、佐剂、赋形剂、或媒剂。适合的医药载剂在这项技术中为已知的,且在至少一个实施例中,描述在“Remington's Pharmaceutical Sciences”, E.W.Martin, 第18版或其他版本。

[0102] 如本文所使用的术语“医药学上可接受的盐”意欲指一种盐,其在完善医学判断的范畴内适用于与人类及低等动物的组织接触而无不当毒性、刺激、过敏反应、及类似者,与合理利益/风险比率相称,大体上为水溶性或油溶性或水可分散或油可分散的,且有效用于其设计用途的。术语包括医药学上可接受的酸加成盐及医药学上可接受的碱加成盐。适合的盐的清单见于例如S.M.Berge等人, J.Pharm.Sci., 1977, 66, 第1-19页, 其以引用方式并入本文。如本文所使用的术语“医药学上可接受的酸加成盐”意欲指保持游离碱的生物有效性及性质且在生物学上或在其他情况下不为不合需要的那些盐,是用无机酸形成的。如本

文所使用的术语“医药学上可接受的碱加成盐”意欲指保持游离酸的生物有效性及性质且在生物学上或在其他情况下不为不合需要的那些盐,是用无机碱形成的。

[0103] 如本文所使用,术语“缓冲液”是指含有弱酸及其共轭碱以有助于防止改变pH的溶液。

[0104] 如本文所使用,术语“治疗有效剂量”及“有效量”意欲指代酸性 α -葡萄糖苷酶及/或美格鲁特及/或前述的组的量,其足以在受试者中产生治疗反应。治疗反应可为使用者(例如,临床医师)将认为是对疗法的有效反应,包括对本文描述及这项技术中所知的任何代用临床标志物或症状的有效反应的任何反应。因此,在至少一个实施例中,治疗反应可为庞贝病的一或多个症状或标志物(诸如这项技术中所知的那些者)的改善或抑制。庞贝病的症状或标志物包括但不限于减少的酸性 α -葡萄糖苷酶组织活性;心肌病;心脏肥大;进行性肌肉虚弱,尤其在躯干或下肢中;深度低张症;巨舌症(且在一些情况下,舌头突起);吞咽、吸吮、及/或进食困难;呼吸功能不全;肝肿大(中等);面部肌肉松弛;无反射;锻炼不持久;运动性呼吸困难;端坐呼吸;睡眠呼吸中止;早晨头痛;嗜眠症;脊柱前凸及/或脊柱侧凸;减少的深腱反射;下背部疼痛;及无法满足发育的运动里程碑(motor milestone)。应注意,对酸性 α -葡萄糖苷酶具有抑制效应的美格鲁特的浓度可出于本发明的目的构成“有效量”,这是由于在活体内施用之后美格鲁特的稀释(及由于平衡改变引起之后续结合变换)、生物可用性、及新陈代谢。

[0105] 治疗反应也可包括分子反应,诸如肝糖累积、溶酶体增殖、及自噬区的形成。治疗反应可通过比较在利用本文描述的rhGAA治疗之前及之后肌肉生物检体的生理学及分子反应来评估。例如,存在于生物检体样本中的肝糖的量可用作测定治疗反应的标志物。另一实例包括诸如LAMP-1、LC3、及Dysferlin的生物标志物,其可用作溶酶体储积功能障碍的指示物。例如,在利用本文描述的rhGAA治疗之前及之后收集的肌肉生物检体可利用识别生物标志物之一的抗体来染色。

[0106] 如本文所使用,术语“酶替代疗法”或“ERT”意欲指代将非原生、纯化酶引入缺乏这种酶的个体中。所施用蛋白质可自天然来源获得或通过重组表现获得。术语也是指在需要或受益于纯化酶的施用的个体中引入纯化酶。在至少一个实施例中,这个体缺乏酶。所引入的酶可为活体外产生的纯化、重组酶,或自诸如例如胎盘或动物乳汁的分离组织或流体或自植物纯化的蛋白质。

[0107] 如本文所使用,术语“组合疗法”意欲指代其中两种或两种以上个别疗法并行地或顺序地施用的任何疗法。在一些实施例中,组合疗法的结果为相较于当个别地执行每一疗法时的每一疗法的效应有所增强。增强可包括各种疗法的效应的任何改善,其可相较于在单独执行时通过疗法达成的结果产生有利的结果。增强效应或结果可包括协同增强,其中增强效应大于自身执行时每一疗法的相加效应;相加增强,其中增强效应基本上等于自身执行时每一疗法的相加效应;或不及协同效应,其中增强效应低于自身执行时每一疗法的相加效应,但好于自身执行时每一疗法的效应。增强效应可通过这项技术中所知的任何手段测量,通过这些手段可测量治疗功效或结果。

[0108] 如本文所使用的术语“并行地”意欲指与同时或之前或之后的合理短时期内,如熟习此项技术者将理解的。例如,若两个治疗互相并行地施用,则一个治疗可在另一个治疗之前或之后施用以允许来准备两个治疗中之一者的所需的时间。因此,两个治疗的“并行施

用”包括但不限于一个治疗在另一治疗之后30分钟或更少、约30分钟、20分钟或更少、约20分钟、约15分钟、约10分钟、约9分钟、约8分钟、约7分钟、约6分钟、约5分钟、约4分钟、约3分钟、约2分钟、约1分钟、或小于1分钟。

[0109] “庞贝病”是指以缺乏酸性 α -葡萄糖苷酶 (GAA) 活性从而有损溶酶体肝糖新陈代谢为特征的体染色体隐性LSD。酶缺乏导致溶酶体肝糖累积且造成进行性骨骼肌虚弱、减弱心脏功能、呼吸功能不全、及/或在疾病晚期的CNS损伤。GAA基因的遗传突变造成酶的较低表现或产生具有经改变稳定性及/或最终导致疾病的生物活性的酶的突变体形式(大体上参见Hirschhorn R, 1995, Glycogen Storage Disease Type II: Acid α -glucosidase (Acid Maltase) Deficiency, The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease, Scriver等人编, McGraw-Hill, New York, 第7版., 第2443-2464页)。庞贝病的三种经识别的临床形式(婴儿型、青少年型及成人型)与残留的 α -葡萄糖苷酶活性的水平相关(Reuser A J等人, 1995, Glycogenosis Type II (Acid Maltase Deficiency), Muscle & Nerve Supplement 3, S61-S69)。婴儿型庞贝病(I型或A型)最为常见且最为严重, 其以发育失败、全身低渗压、心肥大、及生命第二年内心肺衰竭为特征。青少年型庞贝病(II型或B型)严重程度中等且以肌肉症状突出而无心脏肥大为特征。青少年型庞贝症个体通常由于呼吸衰竭而在达到20岁之前死亡。成人型庞贝病(III型或C型)常常表现为青少年期或晚至六十岁的缓慢进行性肌病变(Felicia K J等人, 1995, Clinical Variability in Adult-Onset Acid Maltase Deficiency: Report of Affected Sibs and Review of the Literature, Medicine 74, 131-135)。在庞贝症中, 已证实 α -葡萄糖苷酶通过糖基化、磷酸化、及蛋白水解处理而得以广泛地转译后修饰。最佳肝糖催化需要通过溶酶体中的蛋白水解将110千道耳顿(kDa)前体转化为76及70kDa成熟形式。如本文所使用, 术语“庞贝病”是指所有类型的庞贝病。本申请案中公开的调配物及给药方案可用以治疗例如I型、II型或III型庞贝病。

[0110] “受试者”或“患者”优选地为人类, 但也可治疗患有涉及肝糖的累积的病征的其他哺乳动物及非人类动物。受试者可为患有庞贝病或其他肝糖储积或累积病征的胎儿、新生儿、儿童、青少年、或成人。所治疗的个体的一个实例为患有GSD-II (例如, 婴儿型发病GSD-II、青少年型发病GSD-II、或成人型发病GSD-II)的个体(胎儿、新生儿、儿童、青少年、青年、或成人人类)。个体可具有残留GAA活性, 或不具有可测量的活性。例如, 患有GSD-II的个体可具有小于正常GAA活性的约1%的GAA活性(婴儿型GSD-II)、正常GAA活性的约1-10%的GAA活性(青少年型GSD-II)、或正常GAA活性的约10-40%的GAA活性(成人型GSD-II)。在一些实施例中, 受试者或患者为“经历ERT”或“ERT切换”患者, 其是指先前已接收酶替代疗法的庞贝病患者。在一些实施例中, 受试者或患者为“ERT原始”患者, 其是指先前未接收酶替代疗法的庞贝病患者。在某些实施例中, 受试者或患者为有行动力的(例如, 有行动力的ERT切换患者或有行动力的ERT原始患者)。在某些实施例中, 受试者或患者为无行动力的(例如, 无行动力的ERT切换患者)。有行动力或无行动力的状态可通过六分钟步行测试(six-minute walk test; 6MWT)测定。在一些实施例中, 有行动力的患者为能够在6MWT中步行至少200米的庞贝病患者。在一些实施例中, 无行动力的患者为无辅助情况下不能步行或坐轮椅的庞贝病患者。

[0111] 如本文所使用的术语“治疗(treat)”及“治疗(treatment)”是指与疾病相关联的一或多个症状的改善、疾病的一或多个症状的发病的预防或延迟、及/或疾病的一或多个症

状的严重程度或频率的减轻。例如,治疗可指代心脏状态的改善(例如,舒张末期及/或收缩末期体积的增加,或在GSD-II中典型所见的进行性心肌病的减少、改善或预防)或肺功能的改善(例如,相对基线容量的啼泣时肺活量的增加,及/或在啼泣期间氧去饱和的正常化);神经发育及/或运动技能的改善(例如,AIMS记分增加);个体的受疾病影响的组织中肝糖水平的减少;或这些效应的任何组合。在一个优选实施例中,治疗包括心脏状态的改善,尤其GSD-II相关联心肌病的减少或预防。

[0112] 如本文所使用的术语“改善”、“增加”及“减少”指示相对于基线测量值的值,所述基线测量值诸如在起始本文描述的治疗之前在同一个体中的测量值,或在不存在本文描述的治疗的对照个体(或多个对照个体)中的测量值。对照个体为罹患与所治疗个体相同形式的GSD-II(婴儿型发病、青少年发病、或成人型发病)的个体,其与所治疗的个体约相同年龄(以确保治疗个体及对照个体中疾病的阶段为可比较的)。

[0113] 如本文所使用,术语“约”及“大致”意欲指代给定测量的性质或精度的情况下,所测量数量的可接受误差程度。例如,误差程度可通过这项技术中所理解的对测量提供的有效数字的数量来指示,且包括但不限于对所述测量报告的最精确有效数字的 ± 1 的变化。典型示范性误差程度为给定值或值的范围的20百分比(%)的内、优选10%内、及更优选5%内。除非另有说明,否则本文给定的数字量为近似值,意味着可在未明确陈述时推断出术语“约”或“大致”。

[0114] II重组人类酸性 α -葡萄糖苷酶(rhGAA)

[0115] 在一些实施例中,重组人类酸性 α -葡萄糖苷酶(rhGAA)为具有如SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、或SEQ ID NO:5中阐述的氨基酸序列的酶。在一些实施例中,rhGAA是通过如SEQ ID NO:2中阐述的核苷酸序列编码。

[0116] 表1.核苷酸序列及蛋白质序列

[0117]

SEQ ID NO:	序列
1	MGVRHPPCSHRLLAVCALVSLATAALLGHILLHDFLLVPRELSGSSPVLEETHPAHQQGA SRPGRDAQAHPRPRAVPTQCDVPPNSRFDCAPDKAITQEQCEARGCCYIPAKQGLQGA QMGQPWCFFPPSYPSYKLENLSSEMGYTATLTRTTPTFFPKDILTLRLDVMETENRLH FTIKDPANRRYEVPLETPRVHSRAPSPLYSVEFSEEPFGVIVHRQLDGRVLLNTTVAPLF FADQFLQLSTSLPSQYITGLAEHLSPLMLSTSWTRITLWNRDLAPTPGANLYGSHPFYLA LEDGGSAHGVFLLNSNAMDVVLQPSPALSWRSTGGILDVYIFLGPEPKSVVQQYLDVVGY PFMPYWGLGFHLCRWGYSSAITRQVVENMTRAHFPLDVQWNDLDYMDSRDFTFNKDG FRDFPAMVQELHQGRRYMMIVDPAISSSGPAGSYRPYDEGLRRGVFITNETGQPLIGKV WPGSTAFPDTNPTALAWWEDMVAEFHDQVPFDGMWIDMNEPSNFIRGSEDGCPNNELEN PPYVPGVVGGTLQAATICASSHQFLSTHYNLHNLGYLGEAIAASHRALVKARGTRPFVISR STFAGHGRYAGHWTGDVWSSWEQLASSVPEILQFNLLGVPLVGADVCGFLGNTSEELCVR WTQLGAFYPFMRNHNSLLSLPQEPYSFSEPAQQAMRKALTLRYALLPHLYTLFHQAHVAG ETVARPLFLEFPKDSSTWTVDHQLLWGEALLITPVLQAGKAEVTGYFPLGTWYDLQTVPI EALGSLPPPPAAPREPAIHSEGQWVTLPAPLDTINVHLRAGYIIPLQGPGLTTTESRQQP MALAVALTKGGEARGELFWDDGESLEVLERGAYTQVIFLARNTIVNELVRVTSEGAGLQ LQKVTVLGVATAPQQVLSNGVPVSNFTYSPDTKVLDICVSLLMGEQFLVSWC
2	cagttgggaaagctgaggttgcgcggggccgcgggtggaggtcggggatgagcagcaggttagcagctgacctcggtagcgaaggac cccggccacctctaggttctctcgtccgcccgttgcagcgagggaggtctctgggctgccgagctgacgggaaactgaggcacggagcg ggctgttaggagctgtccaggccatctccaacctgggagtgaggcaccgccctgtccaccggctctgcccgtctgcgcctcgtgtccttg gcaaccgctgcactcctggggcacatctactccatgatttctgctggttccccgagagctgagtggtcctccccagtcctggaggagactacc cagctcaccagcagggagccagcagaccaggccccgggatgccagccacccccggcgtcccagagcagtgcccacacagctgcacgt ccccccaacagccgttcgattgcgccctgacaaggccatcaccaggaacagtgcgaggccccgggtgctgtacatccctgcaaaagcag gggctgcaggagcccagatggggcagccctggtgtcttctccaccagctacccagctacaagctggagaacctgagctccttgaaatggg ctacacggccacctgacctaccacccccaccttcttccccagacatctgacctgcggctggagctgatgatgagactgagaaccgct ccacttcacgatcaaaagatcagctaacaggcgctacgaggtgcccttgagacccccggtgtccacagccgggcaccgtcccactctacagc tggagttctccgaggagcccttcgggtgatcgtgcaccggcagctggacggccgcgtgctgctgaacacgacggtggcgccccgttcttgcg gaccagttcctcagctgtccacctcgtgccctgcagtatatacaggcctcggcgagcacctcagtcctgatgctcagcaccagctggacca ggatcacctgtggaaccgggaccttgcgccacggcgggtgcgaacctctacgggtctcaccctttctacctggcgctggaggacggcgggtcg gcacacggggtgttctgctaacagcaatgccatggatgtgtctcgcagccgagccctgaccttagctggaggtcgacaggtgggatcctggat gtctacatcttctgggccagagcccaagagcgtggtgcagcagtaacctggacgttgtgggataccgttcatgcggccatactgggcctgggt

[illegible]

[0119]

	LQKVTVLGVATAPQQVLSNGVPVSNFTYSPDTKVLDICVSLLMGEQFLVSWC
5	QQGASRPGPRDAQAHPGRPRAVPTQCDVPPNSRFDCAPDKAITQEQCEARGCCYIPAKQG LQGAQMGPWCFFPPSPSYKLENLSSEMGYTATLTRTPTFFPKDILTLRLDVMME NRLHFTIKDPANRRYEVPLETPRVHSRAPSPLYSVEFSEEPFGVIVHRQLDGRVLLNTTV APLFFADQFLQLSTSLPSQYITGLAEHLSPLMLSTSWTRITLWNRDLAPTGANLYGSH FYLALEDGGSAGHVFLLSNAMDVVLQSPALSWRSTGGILDVYIFLGPEPKSVVQQYLD VVGYPFMPPYWGLGFHLCRWGYSSAITRQVVENMTRAHFPLDVQWNDLDYMDSRDFTF NKDGRDFPAMVQELHQGGRRYMMIVDPAISSSGPAGSYRPYDEGLRRGVFITNETGQPL IGKVWPGSTAFPDFTNPTALAWWEDMVAEFHDQVPFDGMWIDMNEPSNFIRGSEDGCPNN ELENPPYVPGVVGGTLQAATICASSHQFLSTHYNLHNL YGLTEAIASTRALVKARGTRPF VISRSTFAGHGRYAGHWTDGVWSSWEQLASSVPEILQFNLLGVPLVGADVCGFLGNTSEE LCVRWTQLGAFYPMRHNLSLLSPQEPYSFSEPAQQAMRKALTLRYALLPHLYTLFHQA HVAGETVARPLFLEFPKDSSTWTVDHQLLWGEALLITPVLQAGKAEVTGYFPLGTWYDLQ TVPIEALGSLPPPPAAPREPAIHSEGWVTLPAPLDTINVHLRAGYIPLQGPGLTTTES RQQPMALAVALTGGEARGELFWDDGESLEVLERGAYTQVIFLARNTIVNELVRVTSEG AGLQLQKVTVLGVATAPQQVLSNGVPVSNFTYSPDTKVLDICVSLLMGEQFLVSWC

[0120] 在一些实施例中, rhGAA具有如SEQ ID NO:1中阐述的野生型GAA胺基酸序列, 如美国专利第8,592,362号所述且具有GenBank登记号AHE24104.1 (GI:568760974)。在一些实施例中, rhGAA具有如SEQ ID NO:2中编码的野生型GAA胺基酸序列, mRNA序列具有GenBank登记号Y00839.1。在一些实施例中, rhGAA具有如SEQ ID NO:3中阐述的野生型GAA胺基酸序列。在一些实施例中, rhGAA具有如SEQ ID NO:4中阐述的GAA胺基酸序列, 且具有美国国家生物科技信息中心(National Centre for Biotechnology Information; NCBI) 登记号NP_000143.2。在一些实施例中, rhGAA为阿葡糖苷酶 α , 其是通过GAA基因的最主要的九个观察到的单倍型编码的人类酸性 α -葡萄糖苷酶。

[0121] 在一些实施例中, rhGAA最初是表示为具有如SEQ ID NO:1中阐述的野生型GAA的全长952个胺基酸序列, 且rhGAA经历细胞内加工, 从而去除胺基酸的一部分, 例如前56个胺基酸。因此, 寄主细胞分泌的rhGAA可具有比细胞内最初表现的rhGAA短的胺基酸序列。在一个实施例中, 较短蛋白质具有SEQ ID NO:5中阐述的胺基酸序列, 其与SEQ ID NO:1不同之处仅在于已去除包含信号肽及前驱肽的前56个胺基酸, 从而产生具有896个胺基酸的蛋白质。胺基酸数量的其他变化也为可能的, 诸如相对于SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:5描述的胺基酸序列具有1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、或更多缺失、取代及/或插入。在一些实施例中, rhGAA产品包括具有不同胺基酸长度的重组人类酸性 α -葡萄糖-糖苷酶分子的混合物。

[0122] 在一些实施例中, rhGAA包含与SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:5至少90%、95%、98%或99%一致的胺基酸序列。各种比对算法及/或程序可用以计算两个序列之间的一致性, 包括FASTA或BLAST, 其可作为GCG序列分析包装(University of Wisconsin, Madison, Wis.)的一部分获得, 且可以例如默认设定来使用。例如, 涵盖具有与本文描述的特异性多肽至少90%、95%、98%或99%一致性且优选地展现基本上相同功能的多肽, 以及编码这种多肽的多核苷酸。除非另外指示, 否则相似性记分将基于BLOSUM62的使用。当使用BLASTP时, 相似性百分比是基于BLASTP正记分且序列一致性百分比是基于BLASTP一致性记分。BLASTP“一致性”展示高记分序列对中为一致的总残基数量及分数; 且BLASTP“正值”展示比对记分具有正值且彼此类似的残基数量及分数。本公开内容预期且涵盖与本文公开的胺基酸序列具有这些一致性或相似性程度或任何中间一致性或相似性程度的胺基酸序列。使用遗传码推论类似多肽的多核苷酸序列且可通过传统手段, 尤其通过使用遗传码反向转译其胺基酸序列来获得。

[0123] 在一些实施例中, rhGAA在蛋白质中的一或多个氨基酸残基处经历转译后修饰及/或化学修饰。例如, 甲硫氨酸及色氨酸残基可经历氧化。作为另一实例, N末端羧酰胺可形成焦羧酸盐。作为另一实例, 天冬酰胺残基可经历脱酰胺成天冬氨酸。作为又一实例, 天冬氨酸残基可经历异构化成异天冬氨酸。作为另一实例, 蛋白质中的未配对半胱氨酸残基可与游离的羧基甘氨酸及/或半胱氨酸形成二硫键。因此, 在一些实施例中, 酶最初表示为具有在SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、或SEQ ID NO:5中阐述的氨基酸序列, 或通过SEQ ID NO:2编码的氨基酸序列, 且酶经历这些转译后修饰及/或化学修饰中的一或多个。这种修饰也在本公开内容的范畴内。

[0124] III. rhGAA的N连接糖基化

[0125] 在单一rhGAA分子上存在七个潜在N连接糖基化位点。这些潜在糖基化位点在SEQ ID NO:5的以下位置处: N84、N177、N334、N414、N596、N826、及N869。类似地, 对于SEQ ID NO:1的全长氨基酸序列来说, 这些潜在糖基化位点是处于以下位置: N140、N233、N390、N470、N652、N882、及N925。rhGAA的其他变异体可具有类似糖基化位点, 这取决于天冬酰胺残基的位置。大体上, 蛋白质氨基酸序列中的Asn-X-Ser或Asn-X-Thr的序列指示潜在糖基化位点, 其中例外的是X不可为His或Pro。

[0126] 本文描述的rhGAA分子可在其N-聚糖上平均具有1、2、3、或4个甘露糖-6-磷酸酯(mannose-6-phosphate; M6P)基团。例如, rhGAA分子上的仅一个N-聚糖可带有M6P(单磷酸化或单M6P), 单一N-聚糖可带有两个M6P基团(双磷酸化或双M6P), 或同一rhGAA分子上的两个不同的N-聚糖可各自带有单一M6P基团。在一些实施例中, 本文描述的rhGAA分子平均在其N-聚糖上具有3-4个M6P基团。重组人类酸性 α -葡萄糖苷酶分子也可具有不带有M6P基团的N-聚糖。在另一实施例中, rhGAA平均包含每摩尔rhGAA大于2.5摩尔M6P及每摩尔rhGAA大于4摩尔唾液酸。在一些实施例中, rhGAA平均包含每摩尔rhGAA约3-3.5摩尔M6P。在一些实施例中, rhGAA平均包含每摩尔rhGAA约4-5.4摩尔唾液酸。在rhGAA上平均至少约3、4、5、6、7、8、9、10%或20%的总N-聚糖可呈单M6P N-聚糖形式, 例如, 约6.25%的总N-聚糖可运载单一M6P基团且在rhGAA上平均至少约0.5、1、1.5、2.0、2.5、3.0%的总N-聚糖呈双M6P N-聚糖形式且平均小于25%的总rhGAA不含有结合至CIMPR的磷酸化N-聚糖。在一些实施例中, 在rhGAA上平均约10%至约14%的总N-聚糖为单磷酸化的。在一些实施例中, 在rhGAA上平均约7%至约25%的总N-聚糖为双磷酸化的。在一些实施例中, rhGAA平均包含每摩尔rhGAA约1.3摩尔双M6P。

[0127] 本文描述的rhGAA可具有范围在每摩尔rhGAA 0.5至7.0摩尔M6P或其任何中间值或子范围的运载M6P的N-聚糖的平均含量, 包括每摩尔rhGAA 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、7.0摩尔M6P。rhGAA可经分馏以提供具有不同平均数量的带有单M6P或带有双M6P的N-聚糖的rhGAA制剂, 因此允许通过选择特定馏分或通过选择性地组合不同的馏分来进一步定制靶向靶组织中的溶酶体的rhGAA。

[0128] 在一些实施例中, 在rhGAA上多至60%的N-聚糖可完全唾液酸化, 例如, 多至10%、20%、30%、40%、50%或60%的N-聚糖可完全唾液酸化。在一些实施例中, 完全唾液酸化不超过50%的N-聚糖。在一些实施例中, 4%至20%的总N-聚糖经完全唾液酸化。在其他实施例中, 在rhGAA上不多于5%、10%、20%或30%的N-聚糖运载唾液酸及末端半乳糖残基(Gal)。这个范围包括所有中间值及子范围, 例如, 在rhGAA上7%至30%的总N-聚糖可运载

唾液酸及末端半乳糖。在其他实施例中,在rhGAA上不多于5%、10%、15%、16%、17%、18%、19%、或20%的N-聚糖仅具有末端半乳糖且不含有唾液酸。这个范围包括所有中间值及子范围,例如,组合物中在rhGAA上8%至19%的总N-聚糖可仅具有末端半乳糖且不含有唾液酸。

[0129] 在一些实施例中,在rhGAA上40%、45%、50%、或55%至60%的总N-聚糖为复合型N-聚糖;或在rhGAA上不多于1%、2%、3%、4%、5%、6%、或7%的总N-聚糖为混合型N-聚糖;在rhGAA上不多于5%、10%、或15%的高甘露糖型N-聚糖未磷酸化;在rhGAA上至少5%或10%的高甘露糖型N-聚糖为单磷酸化的;及/或在rhGAA上至少1%或2%的高甘露糖型N-聚糖为双磷酸化的。这些值包括所有中间值及子范围。rhGAA可满足上文所述的含量范围中的一或多个。

[0130] 在一些实施例中,rhGAA可每摩尔rhGAA平均带有2.0至8.0摩尔的唾液酸残基。这个范围包括其所有中间值及其子范围,包括每摩尔rhGAA有2.0、2.5、3.0、3.5、4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、及8.0摩尔唾液酸残基。在不受理论约束的情况下,认为带有唾液酸残基的N-聚糖单元的存在可防止rhGAA被无唾液酸糖蛋白受体的非大量清除。

[0131] 在一或多个实施例中,rhGAA在某些潜在N-糖基化位点处具有特定N-糖基化分布。在一些实施例中,rhGAA具有七个潜在N-糖基化位点。在一些实施例中,至少20%的rhGAA在第一潜在N-糖基化位点(例如,对SEQ ID NO:5为N84且对SEQ ID NO:1为N140)处磷酸化。例如,至少20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、或95%的rhGAA可在第一潜在N-糖基化位点处磷酸化。这种磷酸化可为单M6P及/或双M6P单元的结果。在一些实施例中,至少10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、或95%的rhGAA在第一潜在N-糖基化位点处带有单M6P单元。在一些实施例中,至少10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、或95%的rhGAA在第一潜在N-糖基化位点处带有双M6P单元。在一些实施例中,rhGAA在第一潜在N-糖基化位点处包含每摩尔rhGAA平均约1.4摩尔M6P(单M6P及双M6P)。在一些实施例中,rhGAA在第一潜在N-糖基化位点处包含每摩尔rhGAA平均约至少0.5摩尔双M6P。在一些实施例中,rhGAA在第一潜在N-糖基化位点处包含每摩尔rhGAA平均约0.25摩尔单M6P。在一些实施例中,rhGAA在第一潜在N-糖基化位点处包含每摩尔rhGAA平均约0.2摩尔到约0.3摩尔唾液酸。在至少一个实施例中,rhGAA包含如第6A图中描绘的第一潜在N-糖基化位点占用率及如第6B图中描绘的N-糖基化分布。在至少一个实施例中,rhGAA包含如第32A图中描绘的第一潜在N-糖基化位点占用率及如第32B图或第33B图中描绘的N-糖基化分布。

[0132] 在一些实施例中,至少20%的rhGAA在第二潜在N-糖基化位点(例如,对SEQ ID NO:5为N177且对SEQ ID NO:1为N223)处磷酸化。例如,至少20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、或95%的rhGAA可在第二N-糖基化位点处磷酸化。这种磷酸化可为单M6P及/或双M6P单元的结果。在一些实施例中,至少10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、或95%的rhGAA在第二N-糖基化位点处带有单M6P单元。在一些实施例中,至少10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、或95%的rhGAA在第二N-糖基化位点处带有双M6P单元。在一些实施例中,rhGAA

在第二潜在N-糖基化位点处包含每摩尔rhGAA平均约0.5摩尔M6P(单M6P及双M6P)。在一些实施例中, rhGAA在第二潜在N-糖基化位点处包含每摩尔rhGAA平均约0.4摩尔到约0.6摩尔单M6P。在至少一个实施例中, rhGAA包含如第6A图中描绘的第二潜在N-糖基化位点占用率及如第6C图中描绘的N-糖基化分布。在至少一个实施例中, rhGAA包含如第32A图中描绘的第二潜在N-糖基化位点占用率及如第32C图或第33B图中描绘的N-糖基化分布。

[0133] 在一或多个实施例中, 至少5%的rhGAA在第三潜在N-糖基化位点(例如, 对SEQ ID NO:5为N334且对SEQ ID NO:1为N390)处磷酸化。在其他实施例中, 小于5%、10%、15%、20%、或25%的rhGAA在第三潜在N-糖基化位点处磷酸化。例如, 第三潜在N-糖基化位点可具有非磷酸化高甘露糖N-聚糖的混合物, 二触角、三触角、及四触角复合N-聚糖, 以及作为主要物质的混合N-聚糖。在一些实施例中, 至少3%、5%、8%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、或50%的rhGAA在第三潜在N-糖基化位点处唾液酸化。在一些实施例中, rhGAA在第三潜在N-糖基化位点处包含每摩尔rhGAA平均约0.9至约1.2摩尔唾液酸。在至少一个实施例中, rhGAA包含如第6A图中描绘的第三潜在N-糖基化位点占用率及如第6D图中描绘的N-糖基化分布。在至少一个实施例中, rhGAA包含如第32A图中描绘的第三潜在N-糖基化位点占用率及如第32D图或第33B图中描绘的N-糖基化分布。

[0134] 在一些实施例中, 至少20%的rhGAA在第四潜在N-糖基化位点(例如, 对SEQ ID NO:5为N414且对SEQ ID NO:1为N470)处磷酸化。例如, 至少20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、或95%的rhGAA可在第四潜在N-糖基化位点处磷酸化。这种磷酸化可为单M6P及/或双M6P单元的结果。在一些实施例中, 至少10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、或95%的rhGAA在第四潜在N-糖基化位点处带有单M6P单元。在一些实施例中, 至少10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、或95%的rhGAA在第四潜在N-糖基化位点处带有双M6P单元。在一些实施例中, 至少3%、5%、8%、10%、15%、20%、或25%的rhGAA在第四潜在N-糖基化位点处唾液酸化。在一些实施例中, rhGAA在第四潜在N-糖基化位点处包含每摩尔rhGAA平均约1.4摩尔M6P(单M6P及双M6P)。在一些实施例中, rhGAA在第四潜在N-糖基化位点处包含每摩尔rhGAA平均约0.4至约0.6摩尔双M6P。在一些实施例中, rhGAA在第四潜在N-糖基化位点处包含每摩尔rhGAA平均约0.3至约0.4摩尔单M6P。在至少一个实施例中, rhGAA包含如第6A图中描绘的第四潜在N-糖基化位点占用率及如第6E图中描绘的N-糖基化分布。在至少一个实施例中, rhGAA包含如第32A图中描绘的第四潜在N-糖基化位点占用率及如第32E图或第33B图中描绘的N-糖基化分布。

[0135] 在一些实施例中, 至少5%的rhGAA在第五潜在N-糖基化位点(例如, 对SEQ ID NO:5为N596且对SEQ ID NO:1为N692)处磷酸化。在其他实施例中, 小于5%、10%、15%、20%、或25%的rhGAA在第五潜在N-糖基化位点处磷酸化。例如, 第五潜在N-糖基化位点可具有作为主要物质的岩藻糖基化二触角复合N-聚糖。在一些实施例中, 至少3%、5%、8%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、或95%的rhGAA在第五潜在N-糖基化位点处唾液酸化。在一些实施例中, rhGAA在第五潜在N-糖基化位点处包含每摩尔rhGAA平均约0.8至约0.9摩尔唾液酸。在至少一个实施例中, rhGAA包含如第6A图中描绘的第五潜在N-糖基化位点占用率及如第6F图中描绘的N-糖

基化分布。在至少一个实施例中, rhGAA包含如第32A图中描绘的第五潜在N-糖基化位点占用率及如第32F图及第33B图中描绘的N-糖基化分布。

[0136] 在一些实施例中, 至少5%的rhGAA在第六N-糖基化位点(例如, 对SEQ ID NO:5为N826且对SEQ ID NO:1为N882)处磷酸化。在其他实施例中, 小于5%、10%、15%、20%、或25%的rhGAA在第六N-糖基化位点处磷酸化。例如, 第六N-糖基化位点可具有作为主要物质的二触角、三触角、及四触角复合N-聚糖的混合物。在一些实施例中, 至少3%、5%、8%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、或95%的rhGAA在第六N-糖基化位点处唾液酸化。在一些实施例中, rhGAA在第六潜在N-糖基化位点处包含每摩尔rhGAA平均约1.5至约4.2摩尔唾液酸。在一些实施例中, rhGAA在第六潜在N-糖基化位点处包含每摩尔rhGAA平均约0.9摩尔乙酰化唾液酸。在至少一个实施例中, rhGAA包含如第6A图中描绘的第六潜在N-糖基化位点占用率及如第6G图中描绘的N-糖基化分布。在至少一个实施例中, rhGAA包含如第32A图中描绘的第六潜在N-糖基化位点占用率及如第32G图及第33B图中描绘的N-糖基化分布。

[0137] 在一些实施例中, 至少5%的rhGAA在第七潜在N-糖基化位点(例如, 对SEQ ID NO:5为N869且对SEQ ID NO:1为N925)处磷酸化。在其他实施例中, 小于5%、10%、15%、20%、或25%的rhGAA在第七潜在N-糖基化位点处磷酸化。在一些实施例中, 小于40%、45%、50%、55%、60%、或65%的rhGAA在第七潜在N-糖基化位点处具有任何N-聚糖。在一些实施例中, 至少30%、35%、或40%的rhGAA在第七潜在N-糖基化位点处具有N-聚糖。在一些实施例中, rhGAA每摩尔rhGAA在第七潜在N-糖基化位点处平均具有0.86摩尔唾液酸。在至少一个实施例中, rhGAA包含如第6A图中描绘的第七潜在N-糖基化位点占用率及如第32H图或第33B图描绘的N-糖基化分布。

[0138] 在一些实施例中, rhGAA包含每rhGAA分子平均3-4个M6P残基及每摩尔rhGAA约4至约7.3摩尔唾液酸。在一些实施例中, rhGAA进一步包含平均在第一潜在N-糖基化位点处每摩尔rhGAA约0.5摩尔双M6P, 在第二潜在N-糖基化位点处每摩尔rhGAA约0.4至约0.6摩尔单M6P, 在第三潜在N-糖基化位点处每摩尔rhGAA约0.9至约1.2摩尔唾液酸, 在第四潜在N-糖基化位点处每摩尔rhGAA约0.4至约0.6摩尔双M6P, 在第四潜在N-糖基化位点处每摩尔rhGAA约0.3至约0.4摩尔单M6P, 在第五潜在N-糖基化位点处每摩尔rhGAA约0.8至约0.9摩尔唾液酸, 及在第六潜在N-糖基化位点处每摩尔rhGAA约1.5至约4.2摩尔唾液酸。在至少一个实施例中, rhGAA包含如第6A-第6H图中描绘的第七潜在N-糖基化位点占用率及N-糖基化分布。在至少一个实施例中, rhGAA包含七个潜在N-糖基化位点, 其中占用率及N-糖基化分布如第32A图-第32H图及第33A图-第33B图中所描绘。

[0139] 制备rhGAA的方法公开在2014年9月30日申请的美国临时专利申请案第62/057, 842号中, 所述申请案的全部内容是以引用方式并入本文中。

[0140] 一旦处于溶酶体内部, rhGAA可酶促降解累积的肝糖。然而, 传统rhGAA产品具有总体低水平的带有单M6P及双M6P的N-聚糖, 且因此较差地靶向肌细胞, 从而造成rhGAA至溶酶体的低劣递送。这些传统产品中的大多数rhGAA分子不具有磷酸化N-聚糖, 进而缺乏对CIMPR的亲合力。非磷酸化高甘露糖N-聚糖也可通过甘露糖受体清除, 从而产生ERT的非大量清除(第2B图)。对比来说, 如第2A图所示, 本文描述的rhGAA可含有较高量的带有单M6P及双M6P的N-聚糖, 从而导致rhGAA大量吸收到诸如肌肉的特异组织中。

[0141] IV.N-连接糖基化rhGAA的产生及纯化

[0142] 如国际申请案PCT/US2015/053252所述(其全部内容是以引用方式并入本文中), 诸如中国仓鼠卵巢(Chinese hamster ovary;CHO)细胞的细胞可用以产生本文描述的rhGAA。在CHO细胞中表达高M6P rhGAA优于至少部分翻译后修饰rhGAA的聚糖分布,因为只有前者可以通过聚糖降解转化为具有最佳糖原水解能力的rhGAA形式,从而提高治疗效果。

[0143] 在一些实施例中,rhGAA优选地通过一或多个CHO细胞系产生,这些CHO细胞系利用编码本文描述的rhGAA的DNA构筑体转变。这种CHO细胞系可含有基因的多个复本,诸如编码GAA的多核苷酸的5、10、15、或20个或更多个复本。可构筑DNA构筑体且在CHO细胞中表现,这些DNA构筑体表现酸性 α -葡萄糖苷酶的对偶基因变异体或其他变异体酸性 α -葡萄糖苷酶氨基酸序列,诸如与SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:5至少90%、95%、98%、或99%一致的那些氨基酸序列。熟习此项技术者可选择适用于转变CHO细胞以用于产生这种DNA构筑体的替代载体。

[0144] 用于制备这种CHO细胞系的方法描述在国际申请案PCT/US2015/053252中,所述申请案的全部内容是以引用方式并入本文中。简单来说,这些方法涉及利用编码GAA或GAA变异体的DNA转变CHO细胞,选择将编码GAA的DNA稳定整合至其染色体中且稳定表现GAA的CHO细胞,且选择表现具有高含量的带有单M6P或双M6P的N-聚糖的GAA的CHO细胞,及视情况,选择具有含高唾液酸含量的N-聚糖及/或具有含低的非磷酸化高甘露糖含量的N-聚糖的CHO细胞。所选择CHO细胞系可用以通过培养CHO细胞系且自CHO细胞的培养物回收所述组合物来产生rhGAA及rhGAA组合物。在一些实施例中,由所选择CHO细胞系产生的rhGAA含有高含量的带有靶向CIMPR的单M6P或双M6P的N-聚糖。在一些实施例中,如本文描述产生的rhGAA具有低水平的具有末端半乳糖的复合N-聚糖。在一些实施例中,所选择CHO细胞系称为GA-ATB200或ATB200-X5-14。在一些实施例中,所选择CHO细胞系涵盖这种CHO细胞培养物的继代培养物或衍生物。在一些实施例中,由所选择CHO细胞系产生的rhGAA称为ATB200。

[0145] 如本文描述产生的rhGAA可通过遵照国际申请案PCT/US2017/024981及美国临时申请案第62/506,569号中描述的方法来纯化,两个申请案皆是以全文引用方式并入本文中。用于产生、俘获、及纯化由CHO细胞系产生的rhGAA的示范性方法展示在第3图中。

[0146] 简单来说,生物反应器601含有诸如CHO细胞的细胞的培养物,这些细胞表现且分泌rhGAA至周围液体培养基中。生物反应器601可为用于培养细胞的任何适当的生物反应器,诸如灌注、分批或分批进料生物反应器。在细胞经充分时间段以产生rhGAA之后,自生物反应器去除培养基。这种培养基去除可对灌注生物反应器为连续的或可针对分批或进料分批反应器为逐批进行的。培养基可通过过滤系统603过滤以去除细胞。过滤系统603可为任何适合的过滤系统,包括交替切向流过滤(alternating tangential flow filtration; ATF)系统、切向流过滤(tangential flow filtration;TFF)系统、及/或离心过滤系统。在各种实施例中,过滤系统利用具有在约10纳米与约2微米之间的孔隙大小的过滤器。

[0147] 在过滤之后,将滤液装载至蛋白质俘获系统605上。蛋白质俘获系统605可包括一或多个层析管柱。若使用多于一个层析管柱,则管柱可串联置放以便一旦装载第一管柱即可开始装载下一管柱。或者,培养基去除方法可在切换管柱的时间期间停止。

[0148] 在各种实施例中,蛋白质俘获系统605包括用于rhGAA的直接产物俘获、尤其是具有高M6P含量的rhGAA的一或多个阴离子交换(anion exchange; AEX)管柱。通过蛋白质俘

获系统605俘获的rhGAA通过改变pH及/或管柱中的盐含量自管柱洗脱。用于AEX管柱的示范性条件提供于表2中。

[0149] 表2. 用于AEX管柱的示范性条件

程序	缓冲液	流动速率 (cm/h)	体积(CV)	温度 (°C)
使用前卫生处理	0.1-10 M NaOH	< 25-2500	> 1-3 (> 10-120 min)	15-25
预平衡	20-2000 mM 磷酸盐缓冲液 (PB), pH 6.9-7.3	< 25-2500	> 1-5	15-25
平衡	4-400 mM PB, pH 6.9-7.3	< 25-2500	> 1-5	2-15
装载	NA	< 10-1000	NA	2-15
[0150] 洗涤 1	4-400 mM PB, pH 6.9-7.3	< 25-2500	> 2-10	2-15
洗涤 2	4-400 mM PB, pH 6.9-7.3	< 25-2500	> 2-10	15-25
洗脱	4-400 mM PB, 20-2000 mM NaCl, pH 6.1-6.5	< 25-2500	NA	15-25
汽提	4-400 mM PB, 0.1-10 M NaCl, pH 6.1-6.5	< 25-2500	> 1-5	15-25
使用后卫生处理	0.1-10 M NaOH	< 25-2500	> 1-3 (> 10-120 min)	15-25
储存	0.01-1.0 M NaOH	< 25-2500	> 1-5	15-25

[0151] 经洗脱rhGAA可进行进一步纯化步骤及/或质量保证步骤。例如,经洗脱rhGAA可进行病毒杀死步骤607。这种病毒杀死607可包括以下一或多个:低pH杀死、清洁剂杀死、或这项技术中所知其他技术。来自病毒杀死步骤607的rhGAA可引入第二层析法系统609中以进一步纯化rhGAA产品。或者,来自蛋白质俘获系统605的经洗脱rhGAA可直接地供给到第二层析法系统609。在各种实施例中,第二层析法系统609包括用于进一步去除杂质的一或多个固定金属亲和力层析(immobilized metal affinity chromatography; IMAC)管柱。用于IMAC管柱的示范性条件提供于下文表3中。

[0152] 表3. 用于IMAC管柱的示范性条件

[0153]

程序	缓冲液	流动速率 (cm/h)	Vol (CV)
清洗	4-400 mM PB, pH 6.3-6.7	< 25-2500	> 1-5
使用前卫生处理	0.01-1.0 M NaOH	< 25-2500	> 1-3 (10-30 min)
平衡	4-400 mM PB, pH 6.5	< 25-2500	> 1-5
用 WFI 洗涤	注射用水(WFI)	< 25-2500	> 1-3
螯合	0.01-1.0 M 乙酸铜	< 25-2500	> 1-5
用 WFI 洗涤	WFI	< 25-2500	> 2-10
用酸性缓冲液洗涤	2-200 mM 乙酸钠, 0.05-5 M NaCl, pH 3.5-4.5	< 25-2500	> 2-10
平衡	4-400 mM PB, pH 6.3-6.7	< 25-2500	> 1-5
用洗脱缓冲液空转	4-400 mM PB, 15-1500 mM 甘氨酸, pH 6.1-6.5	< 25-2500	> 2-20
平衡	4-400 mM PB, pH 6.3-6.7	< 25-2500	> 1-5
装载	NA	< 25-2500	> 1-5
洗涤 1	4-400 mM PB, pH 6.3-6.7	< 25-2500	> 2-10
洗涤 2	4-400 mM PB, 0.1-10 M NaCl, 5-30% 丙二醇, pH 6.3-6.7	< 25-2500	> 2-10
洗涤 3	4-400 mM PB, pH 6.3-6.7	< 25-2500	> 2-10
洗脱	4-400 mM PB, 15-1500 mM 甘氨酸, pH 6.1-6.5	< 25-2500	NA
汽提	4-400 mM PB, 50-5000 mM 咪唑, pH 6.3-6.7	< 25-2500	> 1-5
使用后卫生处理	0.01-1M NaOH	< 25-2500	> 1-3 (10-30 min)
清洗	4-400 mM PB, pH 6.3-6.7	< 25-2500	> 1-5
储存	5-30%乙醇	< 25-2500	> 1-5

[0154] 在将rhGAA装载至第二层析法系统609上之后, 自管柱洗脱重组蛋白质。经洗脱rhGAA可进行病毒杀死步骤611。与病毒杀死607一样, 病毒杀死611可包括以下一或多个: 低pH杀死、清洁剂杀死、或这项技术中所知其他技术。在一些实施例中, 仅使用病毒杀死607或611其一, 或在纯化方法中的相同阶段执行这些病毒杀死步骤。

[0155] 来自病毒杀死步骤611的rhGAA可引入第三层析法系统613中以进一步纯化重组蛋白质产品。或者, 来自第二层析法系统609的经洗脱重组蛋白质可直接地供给到第三层析法系统613。在各种实施例中, 第三层析法系统613包括用于进一步去除杂质的一或多个阳离

子交换层析法(cation exchange chromatography; CEX)管柱及/或粒径排阻层析法(size exclusion chromatography; SEC)管柱。rhGAA产品随后自第三层析法系统613洗脱。用于CEX管柱的示范性条件提供于下文表4中。

[0156] 表4. 用于CEX管柱的示范性条件

程序	缓冲液	流动速率 (cm/h)	Vol (CV)
使用前卫生处理	0.1-10 M NaOH	< 25-2500	> 1-3 (> 10-120 min)
平衡	2-200 mM 柠檬酸钠, pH 4.0-5.0	< 30-3000	> 2-10
装填	NA	< 30-3000	NA
洗涤	2-200 mM 柠檬酸钠, pH 4.0-5.0	< 30-3000	> 2-10
洗脱	2-200 mM 柠檬酸钠, 15-1500 mM NaCl, pH 4.0-5.0	< 30-3000	> 2-10
汽提	2-200 mM 柠檬酸钠, 0.1-10 M NaCl, pH 4.0-5.0	< 30-3000	> 1-5
使用后卫生处理	0.1-10 M NaOH	< 25-2500	> 1-3 (> 10-120 min)
储存	0.01-1.0 M NaOH	< 30-3000	> 1-5

[0158] rhGAA产品也可进行进一步加工。例如,另一过滤系统615可用以去除病毒。在一些实施例中,这种过滤可利用具有在5 μm 与50 μm 之间的孔隙大小的过滤器。其他产品加工可包括产品调整步骤617,其中重组蛋白质产品可经杀菌、过滤、浓缩、储存、及/或使另外的组分添加至最终产物调配物。

[0159] 如本文所使用,术语“ATB200”是指具有高含量的带有单M6P及双M6P的N-聚糖的rhGAA,其是由GA-ATB200细胞系产生且使用本文描述的方法纯化。

[0160] V. 医药组合物

[0161] 在各种实施例中,提供医药组合物,其包含本文描述的单独的或与其他治疗剂组合的rhGAA,及/或医药学上可接受的载剂。

[0162] 在一或多个实施例中,本文描述的医药组合物包含医药学上可接受的盐。

[0163] 在一些实施例中,本文使用的医药学上可接受的盐为医药学上可接受的酸加成盐。医药学上可接受的酸加成盐可包括但不限于盐酸、氢溴酸、硫酸、胺磺酸、硝酸、磷酸、及类似物,以及包括但不限于以下各项的有机酸:乙酸、三氟乙酸、己二酸、抗坏血酸、天冬酰胺酸、苯磺酸、苯甲酸、丁酸、樟脑酸、樟脑磺酸、肉桂酸、柠檬酸、二葡萄糖酸、乙烷磺酸、麸胺酸、羟基乙酸、甘油磷酸、半磺酸、己酸、甲酸、富马酸、2-羟基乙烷磺酸(2-羟乙磺酸)、乳酸、羟基顺丁烯二酸、苹果酸、丙二酸、扁桃酸、对称三甲苯磺酸、甲烷磺酸、萘磺酸、烟碱酸、2-萘磺酸、草酸、扑酸、果胶酯酸、苯基乙酸、3-苯基丙酸、三甲基乙酸、丙酸、丙酮酸、水杨酸、硬脂酸、丁二酸、磺胺酸、酒石酸、对甲苯磺酸、十一烷酸、及类似物。

[0164] 在一些实施例中,本文使用的医药学上可接受的盐为医药学上可接受的碱加成

盐。医药学上可接受的碱加成盐可包括但不限于氨,或铵或金属阳离子的氢氧化物、碳酸盐、或重碳酸盐,所述金属阳离子诸如钠、钾、锂、钙、镁、铁、锌、铜、锰、铝、及类似物。来源于医药学上可接受的有机无毒碱的盐包括但不限于以下各项的盐:一级胺、二级胺、及三级胺、四级胺化合物、包括天然存在经取代胺的经取代胺、环胺及碱离子交换树脂,诸如甲胺、二甲胺、三甲胺、乙胺、二乙胺、三乙胺、异丙胺、三丙胺、三丁胺、乙醇胺、二乙醇胺、2-二甲氨基乙醇、2-二乙氨基乙醇、二环基胺、离胺酸、精胺酸、组胺酸、咖啡因、海卓胺、胆碱、甜菜碱、乙二胺、葡萄糖胺、甲基还原葡萄糖胺、可可碱、嘌呤、哌嗪、哌啶、N-乙基哌啶、四甲铵化合物、四乙铵化合物、吡啶、N,N-二甲基苯胺、N-甲基哌啶、N-甲基吗啉、二环基胺、二苄基胺、N,N-二苄基苯乙胺、1-phenamine、N,N'-二苄基乙二胺、聚胺树脂、及类似物。

[0165] 在一些实施例中, rhGAA或其医药学上可接受的盐可调配为适合于静脉内施用的医药组合物。在一些实施例中,医药组合物为于无菌等张水性缓冲液中的溶液。必要时,组合物也可包括增溶剂及局部麻醉剂以减轻注射位点处的疼痛。医药组合物的成分可分别地供应或以单位剂型混合在一起,例如,作为在诸如指示活性剂的数量安瓿或包裹的气密封容器中的干燥的冷冻干燥粉末或无水浓缩物。在组合物将通过输注施用的情况下,可利用含有无菌医药级水、盐水或葡萄糖/水的输注瓶来分配所述组合物。在一些实施例中,输注可在医院或诊所进行。在一些实施例中,输注可在医院或诊所设施外部进行,例如,在受试者的居所进行。在组合物是通过注射施用的情况下,可提供灭菌注射用水或盐水的安瓿以便成分可在施用之前混合。

[0166] 在一些实施例中, rhGAA或其医药学上可接受的盐可调配用于经口施用。可经口施用的组合物可调配成以下形式:锭剂、胶囊、胚珠、酏剂、溶液或悬浮液、凝胶、糖浆、漱口剂、或用于在使用之前以水或其他适合媒剂复水的干粉,视情况,利用调味剂及着色剂以用于立即释放、延迟释放、改质释放、持续释放、脉冲式释放、或受控释放应用。也可使用固体组合物,诸如锭剂、胶囊、口含锭、丸粒、丸剂、推注剂、粉剂、糊剂、颗粒、弹丸剂、糖衣锭、或预混合制剂。用于经口用途的固体及液体组合物可根据这项技术中熟知的方法制备。这种组合物也可含有一或多种医药学上可接受的载剂及赋形剂,其可呈固体或液体形式。锭剂或胶囊可通过传统手段利用包括但不限于黏合剂、填料、润滑剂、崩解剂、或润湿剂的医药学上可接受的赋形剂制备。适合的医药学上可接受的赋形剂在这项技术中已知且包括但不限于预糊化淀粉、聚乙烯吡咯酮、普维酮、羟丙基甲基纤维素(hydroxypropyl methylcellulose; HPMC)、羟丙基乙基纤维素(hydroxypropyl ethylcellulose; HPEC)、羟丙基纤维素(hydroxypropyl cellulose; HPC)、蔗糖、明胶、阿拉伯胶、乳糖、微晶纤维素、磷酸氢钙、硬脂酸镁、硬脂酸、甘油山萮酸酯、滑石、硅石、玉米、马铃薯或树薯淀粉、淀粉羟基酸钠、十二烷基硫酸钠、柠檬酸钠、碳酸钙、磷酸氢二钙、甘胺酸交联甲基羧纤维素钠、及复合硅酸盐。锭剂可通过这项技术中熟知的方法包衣。

[0167] 在一些实施例中,本文描述的医药组合物可根据国际申请案PCT/US2017/024982及美国临时申请案第62/506,574号来调配,两个申请案是以全文引用方式并入本文中。例如,在一些实施例中,本文描述的医药组合物的pH为约5.0至约7.0或约5.0至约6.0。在一些实施例中,pH范围为约5.5至约6.0。在一些实施例中,医药组合物的pH为6.0。在一些实施例中,pH可通过使用pH调节剂(例如,碱化剂及酸化剂)诸如氢氧化钠及/或盐酸来调整至目标pH。

[0168] 本文描述的医药组合物可包含缓冲液系统,诸如柠檬酸盐系统、磷酸盐系统、及前述的组合。柠檬酸盐及/或磷酸盐可为柠檬酸钠或磷酸钠。其他盐包括钾盐及铵盐。在一或多个实施例中,缓冲液包含柠檬酸盐。在其他实施例中,缓冲液包含柠檬酸钠(例如,柠檬酸钠脱水物及柠檬酸一水合物的混合物)。在一或多个实施例中,包含柠檬酸盐的缓冲液溶液可包含柠檬酸钠及柠檬酸。在一些实施例中,存在柠檬酸盐及磷酸盐缓冲液。

[0169] 在一些实施例中,本文描述的医药组合物包含至少一种赋形剂。赋形剂可起张力剂、增积剂、及/或稳定剂的作用。张力剂为有助于确保调配物具有类似于或相同于人类血液的渗透压的组分。增积剂为向调配物(例如冷冻干燥)增加质量并向饼块提供足够结构的成分。稳定剂为可防止或最小化在疏水性空气-水界面表面处的聚集体形成的化合物。一种赋形剂可同时起张力剂及增积剂的作用。例如,甘露醇可起张力剂作用且也提供作为增积剂的益处。

[0170] 张力剂的实例包括氯化钠、甘露醇、蔗糖、及海藻糖。在一些实施例中,张力剂包含甘露醇。在一些实施例中,张力剂的总量范围为约10mg/mL至约50mg/mL的量。在其他实施例中,张力剂的总量范围为约10、11、12、13、14、或15mg/mL至约16、20、25、30、35、40、45、或50mg/mL的量。

[0171] 在一些实施例中,赋形剂包含稳定剂。在一些实施例中,稳定剂为表面活性剂。在一些实施例中,稳定剂为聚山梨醇酯80。在一或多个实施例中,稳定剂的总量范围为约0.1mg/mL至约1.0mg/mL。在其他实施例中,稳定剂的总量范围为约0.1、0.2、0.3、0.4、或0.5mg/mL至约0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、或1.0mg/mL。在其他实施例中,稳定剂的总量为约1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、或1.0mg/mL。

[0172] 在一些实施例中,医药组合物包含(a) rhGAA(诸如ATB200), (b) 至少一种选自由柠檬酸盐、磷酸盐、及前述的组合组成的群的缓冲液,及(c) 至少一种选自由甘露醇、聚山梨醇酯80、及前述的组合组成的群的赋形剂,且具(i) 约5.0至约6.0、或(ii) 约5.0至约7.0的pH。在一些实施例中,组合物进一步包含水。在一些实施例中,组合物可进一步包含酸化剂及/或碱化剂。

[0173] 在一些实施例中,医药组合物包含(a) 浓度为约5-50mg/mL、约5-30mg/mL、或约15mg/mL的rhGAA(诸如ATB200), (b) 浓度为约10-100mM或约25mM的柠檬酸钠缓冲液, (c) 浓度为约10-50mg/mL、或约20mg/mL的甘露醇, (d) 以约0.1-1mg/mL、约0.2-0.5mg/mL、或约0.5mg/mL的浓度存在的聚山梨醇酯80,及(e) 水,且具有约6.0的pH。在至少一个实施例中,医药组合物包含(a) 15mg/mL rhGAA(诸如ATB200)、(b) 25mM柠檬酸钠缓冲液、(c) 20mg/mL甘露醇、(d) 0.5mg/mL聚山梨醇酯80、及(e) 水,且具有约6.0的pH。在一些实施例中,组合物可进一步包含酸化剂及/或碱化剂。

[0174] 在一些实施例中,包含rhGAA的医药组合物是在施用至有需要的受试者之前稀释。

[0175] 在一些实施例中,本文描述的医药组合物包含伴侣蛋白。在一些实施例中,伴侣蛋白为美格鲁特或其医药学上可接受的盐。在另一实施例中,伴侣蛋白为杜格鲁特或其医药学上可接受的盐。

[0176] 在一些实施例中,本文描述的rhGAA是调配在一种医药组合物中而诸如美格鲁特的伴侣蛋白是调配在另一医药组合物中。在一些实施例中,包含美格鲁特的医药组合物是基于可作为Zavesca® (Actelion Pharmaceuticals) 商购的调配物。

[0177] 在一些实施例中,本文描述的医药组合物可经历冻干(冷冻干燥)方法以提供饼块或粉末。因此,本发明的另一方面是关于冻干之后的医药组合物。冷冻干燥混合物可包含本文描述的rhGAA(例如,ATB200),选自由柠檬酸盐、磷酸盐、及前述的组合组成的群的缓冲液,及至少一种选自由海藻糖、甘露醇、聚山梨醇酯80、及前述的组合组成的群的赋形剂。在一些实施例中,其他成分(例如,其他赋形剂)可添加至冷冻干燥混合物。包含冷冻干燥调配物的医药组合物可提供在小瓶中,其随后可储存、运输、复水及/或施用至患者。

[0178] VI. 治疗方法

[0179] A. 疾病的治疗

[0180] 本发明的另一方面是关于通过施用本文描述的rhGAA或医药组合物治疗与肝糖储积调节不良有关的疾病或病症的方法。在一些实施例中,疾病为庞贝病(也称为酸性麦芽糖酶缺乏(acid maltase deficiency;AMD)及II型肝糖储积病(GSD II))。在一些实施例中,rhGAA为ATB200。在一些实施例中,医药组合物包含ATB200。

[0181] 本文描述的rhGAA或医药组合物通过适当路线施用。在一个实施例中,rhGAA或医药组合物是静脉内施用。在其他实施例中,rhGAA或医药组合物是通过直接施用至靶组织以达心脏或骨骼肌(例如,肌肉内)、或神经系统(例如,直接注射至脑中;心室内;鞘内)来施用。在一些实施例中,rhGAA或医药组合物是经口施用。若需要,则可并行地使用多于一种路线。

[0182] 在一些实施例中,本文描述的rhGAA或医药组合物的治疗效应可基于以下标准的一或多个来评定:(1)心脏状态(例如,舒张末期及/或收缩末期体积的增加,或在GSD-II中典型所见的进行性心肌病的减少、改善或预防),(2)肺功能(例如,相对基线容量的啼泣时肺活量的增加,及/或在啼泣期间氧去饱和的正常化),(3)神经发育及/或运动技能(例如,AIMS记分增加),及(4)个体的受疾病影响的组织中肝糖水平的减少。

[0183] 在一些实施例中,受试者的心脏状态在施用一或多个剂量的本文描述的rhGAA或医药组合物之后相较于利用媒剂治疗的受试者的彼心脏状态或治疗之前的受试者的彼心脏状态改善10%、20%、30%、40%、或50%(或居间的任何百分比)。受试者的心脏状态可通过测量舒张末期及/或收缩末期体积及/或通过临床评估心肌病来评定。在一些实施例中,受试者的肺功能在施用一或多个剂量的ATB200或包含ATB200的医药组合物之后相较于利用媒剂治疗的受试者的彼肺功能或治疗之前的受试者的彼肺功能改善10%、20%、30%、40%、或50%(或居间的任何百分比)。在某些实施例中,在自施用算1周、2周、3周、1个月、2个月、或更久(或居间的任何时间段)之后达成改善。在某些实施例中,ATB200或包含ATB200的医药组合物在自施用算1周、2周、3周、1个月、2个月、或更久(或居间的任何时间段)之后改善受试者的肺功能。

[0184] 在一些实施例中,受试者的肺功能在施用一或多个剂量的本文描述的rhGAA或医药组合物之后相较于利用媒剂治疗的受试者的彼肺功能或治疗之前的受试者的彼肺功能改善10%、20%、30%、40%、或50%(或居间的任何百分比)。受试者的肺功能可通过相对基线容量的啼泣时肺活量及/或啼泣期间氧去饱和作用的正常化来评定。在一些实施例中,受试者的肺功能在施用一或多个剂量的ATB200或包含ATB200的医药组合物之后相较于利用媒剂治疗的受试者的彼肺功能或治疗之前的受试者的彼肺功能改善10%、20%、30%、40%、或50%(或居间的任何百分比)。在某些实施例中,在自施用算1周、2周、3周、1个月、2

个月、或更久(或居间的任何时间段)之后达成改善。在某些实施例中,ATB200或包含ATB200的医药组合物在自施用算1周、2周、3周、1个月、2个月、或更久(或居间的任何时间段)之后改善受试者的肺功能。

[0185] 在一些实施例中,受试者的神经发育及/或运动技能在施用一或多个剂量的本文描述的rhGAA或医药组合物之后相较于利用媒介治疗的受试者的彼神经发育及/或运动技能或治疗之前的受试者的彼神经发育及/或运动技能改善10%、20%、30%、40%、或50%(或居间的任何百分比)。受试者的神经发育及/或运动技能可通过测定AIMS记分来评定。AIMS为12项固定量表,其是临床医师施用并记分的(参见Rush JAJr., Handbook of Psychiatric Measures, American Psychiatric Association, 2000, 166-168)。1-10项是在5分固定量表上分级。1-4项评定口面移动。5-7项应对肢体及躯干运动困难。8-10项评定通过检查人判断的总体严重程度,及患者对移动的意识及与其相关联的痛苦。11-12项为关于牙齿及/或假牙的问题(这种问题可导致运动困难的错误诊断)的是/非题。在一些实施例中,受试者的神经发育及/或运动技能在施用一或多个剂量的ATB200或包含ATB200的医药组合物之后相较于利用媒介治疗的受试者的彼神经发育及/或运动技能或治疗之前的受试者的彼神经发育及/或运动技能改善10%、20%、30%、40%、或50%(或居间的任何百分比)。在某些实施例中,在自施用算1周、2周、3周、1个月、2个月、或更久(或居间的任何时间段)之后达成改善。在某些实施例中,ATB200或包含ATB200的医药组合物在自施用算1周、2周、3周、1个月、2个月、或更久(或居间的任何时间段)之后改善受试者的神经发育及/或运动技能。

[0186] 在一些实施例中,受试者的某一组织的肝糖水平在施用一或多个剂量的本文描述的rhGAA或医药组合物之后相较于利用媒介治疗的受试者的彼肝糖水平或治疗之前的受试者的彼肝糖水平减少10%、20%、30%、40%、或50%(或居间的任何百分比)。在一些实施例中,组织为肌肉,诸如四头肌、三角肌、及腓肠肌。组织的肝糖水平可使用这项技术中所知的方法分析。已知肝糖水平的测定是基于淀粉葡萄糖苷酶消化,且描述于诸如以下的出版物中:Amalfitano等人(1999), "Systemic correction of the muscular disorder glycogen storage disease type ii after hepatic targeting of a modified adenovirus vector encoding human acid-alpha-glucosidase", Proc Natl Acad Sci USA, 96:8861-8866。在一些实施例中,受试者的肌肉中的肝糖水平在施用一或多个剂量的ATB200或包含ATB200的医药组合物之后相较于利用媒介治疗的受试者的彼肝糖水平或治疗之前的受试者的彼肝糖水平减少10%、20%、30%、40%、或50%(或居间的任何百分比)。在某些实施例中,在自施用算1周、2周、3周、1个月、2个月、或更久(或居间的任何时间段)之后达成减少。在某些实施例中,ATB200或包含ATB200的医药组合物在自施用算1周、2周、3周、1个月、2个月、或更久(或居间的任何时间段)之后减少受试者的肌肉中的肝糖水平。

[0187] B. 生物标志物

[0188] 受试者的肌肉纤维中的肝糖累积的生物标志物诸如尿己糖四糖(Hex4)可用以评定并比较酶替代疗法在患有庞贝病的受试者中的治疗效应。在一些实施例中, rhGAA或包含rhGAA的医药组合物对肝糖累积的治疗效应是通过测量受试者中Hex4的水平来评定。

[0189] 肌肉损伤或破坏的生物标志物诸如肌酸激酶(creatine kinase; CK)、丙胺酸转胺酶(alanine aminotransferase; ALT)、及天冬胺酸转胺酶(aspartate aminotransferase;

AST) 可用以评定并比较酶替代疗法在患有庞贝病的受试者中的治疗效应。在一些实施例中, rhGAA或包含rhGAA的医药组合物对肌肉破坏的治疗效应是通过测量受试者中CK、ALT、及/或AST的水平来评定。在至少一个实施例中, rhGAA或包含rhGAA的医药组合物对肌肉破坏的治疗效应是通过测量受试者中CK的水平来评定。

[0190] 生物标志物诸如LAMP-1、LC3、及Dysferlin也可用于评定并比较本文描述的rhGAA或医药组合物的治疗效应。在庞贝病中, GAA无法水解溶酶体肝糖导致在一些组织中经肝糖填充的大溶酶体的异常累积。(Raben等人, JBC 273:19086-19092, 1998。)在庞贝病的小鼠模型中的研究已展示骨骼肌中的增多溶酶体不能充分地解释机械效能的减少, 且含有经降解肌原纤维的大内容物的存在(也就是说, 自噬堆积) 贡献了肌肉功能的损伤。(Raben等人, Human摩尔Genet 17:3897-3908, 2008。)报告也暗示受损自噬通量与庞贝症患者中的不良治疗结果相关联。(Nascimbeni等人, Neuropathology and Applied Neurobiology doi: 10.1111/nan.12214, 2015; Fukuda等人, Mol Ther 14:831-839, 2006。)另外, 晚发型庞贝病在未分类的肢带肌肉营养不良(limb-girdle muscular dystrophy; LGMD) 中为普遍的(Preisler等人, Mol Genet Metab 110:287-289, 2013), 其是由肌肉萎缩蛋白-糖蛋白复合物(dystrophin-glycoprotein complex; DGC) 的各种成分的缺乏所引起。IHC检查显示在Gaa KO小鼠的骨骼肌纤维中dysferlin的基本上增加的肌浆性存在。

[0191] 各种已知的方法可用于测量这种生物标志物的基因表现水平及/或蛋白质水平。例如, 可获得来自利用本文描述的rhGAA或医药组合物治疗的受试者的样本, 诸如组织、尤其是肌肉的生物检体。在一些实施例中, 样本为受试者中肌肉的生物检体。在一些实施例中, 肌肉是选自四头肌、三角肌、及腓肠肌。自受试者获得的样本可利用一或多种抗体或检测这种生物标志物的其他检测剂染色。样本也可或替代地经加工以用于通过例如RT-qPCR方法检测诸如mRNA的编码生物标志物的核酸的存在。

[0192] 在一些实施例中, 一或多种生物标志物的基因表现水平及/或蛋白质水平是在自利用本文描述的rhGAA或医药组合物治疗之前及之后的个体获得的肌肉生物检体中测量。在一些实施例中, 一或多种生物标志物的基因表现水平及/或蛋白质水平是在自利用媒剂治疗的个体获得的肌肉生物检体中测量。在一些实施例中, 一或多种生物标志物的基因表现水平及/或蛋白质水平在施用一或多个剂量的本文描述的rhGAA或医药组合物之后相较于利用媒剂治疗的受试者的彼基因表现水平及/或蛋白质水平或治疗之前的受试者的彼基因表现水平及/或蛋白质水平减少10%、20%、30%、40%、或50% (或居间的任何百分比)。在一些实施例中, 一或多种生物标志物的基因表现水平及/或蛋白质水平在施用一或多个剂量的ATB200或包含ATB200的医药组合物之后相较于利用媒剂治疗的受试者的彼基因表现水平及/或蛋白质水平或治疗之前的受试者的彼基因表现水平及/或蛋白质水平减少10%、20%、30%、40%、或50% (或居间的任何百分比)。在某些实施例中, 在自施用算1周、2周、3周、1个月、2个月、或更久(或居间的任何时间段) 之后达成减少。在某些实施例中, ATB200或包含ATB200的医药组合物在自施用算1周、2周、3周、1个月、2个月、或更久(或居间的任何时间段) 之后减少一或多种生物标志物的基因表现水平及/或蛋白质水平。

[0193] C.rhGAA的给药

[0194] 医药调配物或复水组合物是以治疗有效量(例如, 当以规则间隔施用时足以治疗疾病, 诸如改善与疾病相关联的症状、防止或延迟疾病的发病、及/或减轻疾病症状的严重

程度或频率的剂量的量)施用。在治疗疾病方面为治疗有效的量可取决于疾病的性质及疾病的效应的程度,且可通过标准临床技术测定。另外,活体外或活体内检定可视情况用于帮助鉴别最佳剂量范围。在至少一个实施例中,本文描述的rhGAA或包含rhGAA的医药组合物是以约1mg/kg至约100mg/kg、诸如约5mg/kg至约30mg/kg、典型地约5mg/kg至约20mg/kg的剂量施用。在至少一个实施例中,本文描述的rhGAA或医药组合物是以约5mg/kg、约10mg/kg、约15mg/kg、约20mg/kg、约25mg/kg、约30mg/kg、约35mg/kg、约40mg/kg、约50mg/kg、约50mg/kg、约60mg/kg、约70mg/kg、约80mg/kg、约90mg/kg、或约100mg/kg的剂量施用。在一些实施例中, rhGAA是以5mg/kg、10mg/kg、20mg/kg、50mg/kg、75mg/kg、或100mg/kg的剂量施用。在至少一个实施例中, rhGAA或医药组合物是以约20mg/kg的剂量施用。在一些实施例中, rhGAA或医药组合物与药理学伴侣蛋白并行地或顺序地施用。在一些实施例中,药理学伴侣蛋白为美格鲁特。在至少一个实施例中,美格鲁特是以约260mg的经口剂量施用。用于特定个体的有效剂量可随时间变化(例如,增加或减少),这取决于个体的需要。例如,在身体有疾患或压力时,或若抗酸性 α -葡萄糖苷酶抗体变得存在或增加时,或若疾病症状恶化时,可增加所述量。

[0195] 在一些实施例中,本文描述的rhGAA或医药组合物的治疗有效剂量低于传统rhGAA产品的彼治疗有效剂量。例如,若传统rhGAA产品的治疗有效剂量为20mg/kg,则产生与传统rhGAA产品相比相同或更好治疗效应所需的本文描述的rhGAA或医药组合物的剂量可低于20mg/kg。治疗效应可基于上述论述的一或多个标准(例如,心脏状态、肝糖水平、或生物标志物表现)来评定。在一些实施例中,本文描述的rhGAA或医药组合物的治疗有效剂量低于传统rhGAA产品的彼治疗有效剂量至少约5%、10%、15%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、或更大。

[0196] 在一些实施例中,本文描述的rhGAA或医药组合物的治疗效应包含运动功能的改善、肌肉力量的改善(上身、下身、或全身)、肺功能的改善、减少疲劳、减少水平的肌肉损伤的至少一种生物标志物、减少水平的肝糖累积的至少一种生物标志物、或前述的组合。在一些实施例中,本文描述的rhGAA或医药组合物的治疗效应包含肌肉纤维中溶酶体病理学的逆转、肌肉纤维中肝糖含量的较快及/或更多的有效减少、六分钟步行测试距离的增加、计时起立行走测试时间的减少、四层楼梯攀爬测试时间的减少、十米步行测试时间的减少、步态-楼梯-gower-椅子记分的减少、上肢力量的增加、肩膀内收的改善、肩膀外展的改善、肘屈曲的改善、肘伸展的改善、上身力量的改善、下身力量的改善、全身力量的改善、直立(坐立)用力肺活量的改善、最大呼气压的改善、最大吸气压的改善、疲劳严重程度量表记分的减少、尿己糖四糖水平的减少、肌酸激酶水平的减少、丙胺酸转胺酶水平的减少、天冬胺酸转胺酶水平的减少、或其任何组合。

[0197] 在一些实施例中,在以相同剂量施用时,本文描述的rhGAA或医药组合物比传统rhGAA产品更快地达成所要治疗效应。治疗效应可基于上述论述的一或多个标准(例如,心脏状态、肝糖水平、或生物标志物表现)来评定。例如,若传统rhGAA产品的单剂量在一周内降低所治疗个体的组织中的肝糖水平达10%,则当施用相同剂量的本文描述的rhGAA或医药组合物时,可在少于一周内达成相同程度的减少。在一些实施例中,当以相同剂量施用时,本文描述的rhGAA或医药组合物可比传统rhGAA产品快至少约1.25、1.5、1.75、2.0、3.0倍、或更快地达成所要治疗效应。

[0198] 在一些实施例中,治疗有效量的rhGAA(或包含rhGAA的组合物或药剂)是施用一次以上。在一些实施例中,本文描述的rhGAA或医药组合物是以规则间隔施用,这取决于疾病的性质及疾病的效应的程度,且取决于正在发展的状况。如本文所使用的以“规则间隔”施用指示治疗有效量是周期性地施用(与单次剂量区别)。间隔可通过标准临床技术测定。在某些实施例中,rhGAA是两月一次、每月一次、两周一次、每周一次、每周两次、或每日一次施用。在一些实施例中,rhGAA是每周两次、每周一次、或每隔一周静脉内施用。用于单个体的施用间隔不需为固定间隔,但可随时间变化,这取决于个体的需要。例如,在身体有疾患或压力时,若抗rhGAA抗体存在或增加时,或若疾病症状恶化时,可减少剂量之间的间隔。

[0199] 在一些实施例中,当以相同剂量使用时,如本文描述的rhGAA或医药组合物可比传统rhGAA产品施用频率更低,且仍能够与传统rhGAA产品相比产生相同或更好的治疗效应。例如,若每周一次以20mg/kg施用传统rhGAA产品,则如本文描述的rhGAA或医药组合物可在以20mg/kg施用时与传统rhGAA产品相比产生相同或更好的治疗效应,即使rhGAA或医药组合物施用频率更低,例如,两周一次或每月一次施用时,也如这。治疗效应可基于上述论述的一或多个标准(例如,心脏状态、肝糖水平、或生物标志物表现)来评定。在一些实施例中,本文描述的rhGAA或医药组合物的两个剂量之间的间隔比传统rhGAA产品的彼间隔更长。在一些实施例中,rhGAA或医药组合物的两个剂量之间的间隔比传统rhGAA产品的彼间隔长至少约1.25、1.5、1.75、2.0、3.0倍、或更长。

[0200] 在一些实施例中,在相同治疗条件下(例如,以相同间隔施用相同剂量),本文描述的rhGAA或医药组合物以比通过传统rhGAA产品提供的彼治疗效应更优异的程度提供治疗效应。治疗效应可基于上述论述的一或多个标准(例如,心脏状态、肝糖水平、或生物标志物表现)来评定。例如,当相较于每周一次以20mg/kg施用的传统rhGAA产品时,每周一次以20mg/kg施用的rhGAA或医药组合物可以更高程度减少所治疗个体的组织中的肝糖水平。在一些实施例中,当在相同治疗条件下施用时,本文描述的rhGAA或医药组合物提供比传统rhGAA产品的那些治疗效应大至少约1.25、1.5、1.75、2.0、3.0倍、或更大的治疗效应。

[0201] D. 组合法

[0202] 在一或多个实施例中,本文描述的rhGAA或包含rhGAA的医药组合物是与药理学伴侣蛋白并行地或顺序地施用。在一些实施例中,rhGAA或医药组合物是通过相较于药理学伴侣蛋白来说不同的路线来施用。例如,药理学伴侣蛋白可经口施用而rhGAA或医药组合物是静脉内施用。

[0203] 在各种实施例中,药理学伴侣蛋白为美格鲁特。在一些实施例中,美格鲁特是以约50mg至约600mg的经口剂量施用。在至少一个实施例中,美格鲁特是以约200mg至约600mg的经口剂量,或以约200mg、约250mg、约300mg、约350mg、约400mg、约450mg、约500mg、约550mg、或约600mg的经口剂量施用。在至少一个实施例中,美格鲁特是以约233mg至约500mg的经口剂量施用。在至少一个实施例中,美格鲁特是以约250至约270mg的经口剂量,或以约250mg、约255mg、约260mg、约265mg或约270mg的经口剂量施用。在至少一个实施例中,美格鲁特是以约260mg的经口剂量施用。

[0204] 熟习此项技术者将理解的是,在约200mg至600mg范围或属于其中的任何较小范围内的美格鲁特的经口剂量可取决于成人患者的体重而适用于所述成人患者。例如,对于具有体重显著低于约70kg的患者,包括但不限于幼儿、儿童、或重量不足的成人,可通过医师

适当地考虑较小剂量。因此,在至少一个实施例中,美格鲁特是以约50mg至约200mg的经口剂量、或以约50mg、约75mg、约100mg、125mg、约150mg、约175mg、或约200mg的经口剂量施用。在至少一个实施例中,美格鲁特是以约65mg至约195mg的经口剂量,或以约65mg、约130mg、或约195mg的经口剂量施用。

[0205] 在一些实施例中,rhGAA是以约5mg/kg至约20mg/kg的剂量静脉内施用且美格鲁特是以约50mg至约600mg的剂量经口施用。在一些实施例中,rhGAA是以约5mg/kg至约20mg/kg的剂量静脉内施用且美格鲁特是以约50mg至约200mg的剂量经口施用。在一些实施例中,rhGAA是以约5mg/kg至约20mg/kg的剂量静脉内施用且美格鲁特是以约200mg至约600mg的剂量经口施用。在一些实施例中,rhGAA是以约5mg/kg至约20mg/kg的剂量静脉内施用且美格鲁特是以约233mg至约500mg的剂量经口施用。在一个实施例中,rhGAA是以约20mg/kg的剂量静脉内施用且美格鲁特是以约260mg的剂量经口施用。

[0206] 在一些实施例中,美格鲁特及rhGAA是并行地施用。例如,美格鲁特可在rhGAA的施用之前或之后10、9、8、7、6、5、4、3、2、或1分钟内施用。在一些实施例中,美格鲁特是在rhGAA的施用之前或之后5、4、3、2、或1分钟内施用。

[0207] 在一些实施例中,美格鲁特及rhGAA是顺序地施用。在至少一个实施例中,美格鲁特是在rhGAA的施用之前施用。在至少一个实施例中,美格鲁特是在rhGAA的施用之前小于三小时施用。在至少一个实施例中,美格鲁特是在rhGAA的施用之前约两个小时施用。例如,美格鲁特可在rhGAA的施用之前约1.5小时、约1小时、约50分钟、约30分钟、或约20分钟施用。在至少一个实施例中,美格鲁特是在rhGAA的施用之前约一小时施用。

[0208] 在一些实施例中,美格鲁特是在rhGAA的施用之后施用。在至少一个实施例中,美格鲁特是在rhGAA的施用之后三小时内施用。在至少一个实施例中,美格鲁特是在rhGAA的施用之后两个小时内施用。例如,美格鲁特可在rhGAA的施用之后约1.5小时、约1小时、约50分钟、约30分钟、或约20分钟内施用。

[0209] 在一些实施例中,受试者在美格鲁特的施用之前至少两小时及施用之后至少两小时禁食。

[0210] E. 套组

[0211] 本发明的另一方面是关于包含本文描述的rhGAA或医药组合物的套组。在一或多个实施例中,套组包含容器(例如,小瓶、管、袋子、等等),其包含rhGAA或医药组合物(冻干之前或之后),且包含用于复水、稀释及施用的说明。

[0212] 实例

[0213] 实例1:具有高含量的带有单M6P或双M6P的N-聚糖的产生rhGAA的CHO细胞的制备。

[0214] 利用表现rhGAA的DNA构筑体转染DG44 CHO (DHFR-) 细胞。DNA构筑体展示在第4图中。在转染之后,利用缺乏次黄嘌呤/胸苷(-HT)的培养基选择含有稳定整合的GAA基因的CHO细胞。这些细胞中的GAA表现是通过胺甲喋呤处理(MTX, 500nM)来诱导。

[0215] 表现高量的GAA的细胞池是通过GAA酶活性检定来鉴别且用于建立产生rhGAA的个别纯系。在半固体培养板上产生个别纯系,通过ClonePix系统拾取,且转移至24深孔板。分析个别纯系的GAA酶活性以鉴别表现高水平的GAA的纯系。用于测定GAA活性的条件培养基使用4-MU- α -葡萄糖苷酶底物。进一步评估如通过GAA酶检定所测量的产生较高水平的GAA的纯系的生存力、生长能力、GAA生产率、N-聚糖结构及稳定蛋白质表现。使用这个程序分离

表现具有增强的单M6P或双M6P N-聚糖的rhGAA的CHO细胞系,包括CHO细胞系GA-ATB200。

[0216] 实例2:rhGAA的纯化

[0217] 在摇瓶及在灌注生物反应器中使用CHO细胞系GA-ATB200产生根据本发明的多批rhGAA,产物是称为“ATB200”。弱阴离子交换(weak anion exchange;“WAX”)液相层析用于根据末端磷酸酯分馏ATB200 rhGAA。通过洗脱具有渐增量的盐的ERT来产生洗脱分布。通过UV(A280nm)监视分布。对来自不同生产批次的纯化ATB200 rhGAA观察到类似的CIMPR受体结合(至少约70%)分布(第5图),从而指示ATB200 rhGAA可一致地产生。

[0218] 实例3:ATB200 rhGAA的寡糖表征

[0219] 使用两种不同的LC-MS/MS分析技术分析ATB200 rhGAA的位点特异性N-聚糖分布。前两种LC-MS/MS方法的结果如第6A-6H图所示。具有2-AA聚糖图谱的第三LC-MS/MS方法的结果示于第32A-32H图,第图33A-33B图和表5中。

[0220] 在第一分析中,在LC-MS/MS分析之前使蛋白质变性、还原、烷基化、及消化。在蛋白质变性及还原期间,将200 μ g的蛋白质样本、5 μ L的1摩尔/L tris-HCl(最终浓度50mM)、75 μ L的8摩尔/L胍HCl(最终浓度6M)、1 μ L的0.5摩尔/L EDTA(最终浓度5mM)、2 μ L的1摩尔/L DTT(最终浓度20mM)、及Milli-Q®冰添加至1.5mL管以提供100 μ L的总体积。将样本混合且在56 $^{\circ}$ C下于无水浴中孵化30分钟。在烷基化期间,将变性及还原的蛋白质样本与5 μ L的1摩尔/L碘乙酰胺(IAM,最终浓度50mM)混合,随后在10-30 $^{\circ}$ C下于黑暗中孵化30分钟。在烷基化之后,将400 μ L预冷却的丙酮添加至样本且将混合物在-80 $^{\circ}$ C冷冻下冻结4小时。随后将样本在13000rpm下在4 $^{\circ}$ C下离心5min且将上清液去除。将400 μ L的预冷却丙酮添加至团块,随后将其在13000rpm下在4 $^{\circ}$ C下离心5min且将上清液去除。随后将样本在冰上于黑暗中空气干燥以去除丙酮残余物。将四十微升的8M尿素及160 μ L的100mM NH_4HCO_3 添加至样本以溶解蛋白质。在胰蛋白酶消化期间,随后将50 μ g的蛋白质与胰蛋白酶消化缓冲液一起添加至100 μ L的最终体积,且添加5 μ L的0.5mg/mL胰蛋白酶(蛋白质与酶比率为20/1w/w)。将溶液充分混合且在37 $^{\circ}$ C下孵化隔夜(16 $\pm$ 2小时)。添加2.5微升的20% TFA(最终浓度0.5%)以将反应淬灭。随后使用Thermo Scientific™Orbitrap Velos Pro™质谱仪分析样本。

[0221] 在第二LC-MS/MS分析中,根据类似的变性、还原、烷基化、及消化程序制备ATB200样本,只不过碘乙酸(iodoacetic acid;IAA)是用作烷基化试剂替代IAM,且随后使用Thermo Scientific™Orbitrap Fusion™Lumos Tribid™质谱仪分析。

[0222] 第一分析及第二分析的结果显示在第6A图-第6H图。在第6A图-第6H图中,第一分析的结果是由左侧条柱(深灰色)表示且来自第二分析的结果是由右侧条柱(浅灰色)表示。用于聚糖表示的符号命名法是根据Varki,A.,Cummings,R.D.,Esko J.D.等人,Essentials of Glycobiology,第2版(2009)。

[0223] 自第6A图-第6H图可见,两个分析提供类似的结果,但结果之间存在一些变化。这个变化可因为许多因素,包括所使用的仪器及N-聚糖分析的完整性。例如,若未鉴别及/或未定量磷酸化N-聚糖的一些物质,则磷酸化N-聚糖的总数可为未被充分表示的,且在彼位点处带有磷酸化N-聚糖的rhGAA的百分比可为未被充分表示的。作为另一实例,若未鉴别及/或未定量非磷酸化N-聚糖的一些物质,则非磷酸化N-聚糖的总数可能未被充分表示,且在彼位点处带有磷酸化N-聚糖的rhGAA的百分比可被过度表示。

[0224] 第6A图展示ATB200的N-糖基化位点占用率。自第6A图可见,第一、第二、第三、第

四、第五、及第六N-糖基化位点几乎都被占用,其中两个分析检测到在每一潜在N-糖基化位点处大约或超过90%及至多约100%的ATB200酶具有检测到的N-聚糖。然而,第七潜在N-糖基化位点约一半时间是经N-糖基化的。

[0225] 第6B图展示第一潜在N-糖基化位点N84的N-糖基化分布。自第6B图可见,主要的N-聚糖物质为双M6P N-聚糖。第一分析及第二分析检测到在第一位点处超过75%的ATB200具有双M6P,其对应于在第一位点处平均每摩尔ATB200约0.8摩尔双M6P。

[0226] 第6C图展示第二潜在N-糖基化位点N177的N-糖基化分布。自第6C图可见,主要的N-聚糖物质为单M6P N-聚糖及非磷酸化高甘露糖N-聚糖。第一分析及第二分析检测到在第二位点处超过40%的ATB200具有单M6P,其对应于在第二位点处平均每摩尔ATB200约0.4至约0.6摩尔单M6P。

[0227] 第6D图展示第三潜在N-糖基化位点N334的N-糖基化分布。自第6D图可见,主要的N-聚糖物质为非磷酸化高甘露糖N-聚糖,二触角、三触角、及四触角复合N-聚糖,及混合N-聚糖。第一分析及第二分析检测到在第三位点处超过20%的ATB200具有唾液酸残基,其对应于在第三位点处平均每摩尔ATB200约0.9至约1.2摩尔唾液酸。

[0228] 第6E图展示第四潜在N-糖基化位点N414的N-糖基化分布。自第6E图可见,主要的N-聚糖物质为双M6P及单M6P N-聚糖。第一分析及第二分析检测到在第四位点处超过40%的ATB200具有双M6P,其对应于在第四位点处平均每摩尔ATB200约0.4至约0.6摩尔双M6P。第一分析及第二分析也检测到在第四位点处超过25%的ATB200具有单M6P,其对应于在第四位点处平均每摩尔ATB200约0.3至约0.4摩尔单M6P。

[0229] 第6F图展示第五潜在N-糖基化位点N596的N-糖基化分布。自第6F图可见,主要的N-聚糖物质为岩藻糖基化二触角复合N-聚糖。第一分析及第二分析检测到在第五位点处超过70%的ATB200具有唾液酸残基,其对应于在第五位点处平均每摩尔ATB200约0.8至约0.9摩尔唾液酸。

[0230] 第6G图展示第六潜在N-糖基化位点N826的N-糖基化分布。自第6G图可见,主要的N-聚糖物质为二触角、三触角、及四触角复合N-聚糖。第一分析及第二分析检测到在第六位点处超过80%的ATB200具有唾液酸残基,其对应于在第六位点处平均每摩尔ATB200约1.5至约1.8摩尔唾液酸。

[0231] 在第七位点N869处的N-糖基化的分析展示大致40% N-糖基化,其中最普遍的N-聚糖为A4S3S3GF(12%)、A5S3G2F(10%)、A4S2G2F(8%)及A6S3G3F(8%)。

[0232] 第6H图展示在七个潜在N-糖基化位点的每一者处的磷酸化的概要。自第6H图可见,第一分析及第二分析在第一、第二、及第四潜在N-糖基化位点处检测到高磷酸化水平。两个分析检测到在第一位点处超过80%的ATB200为单或双磷酸化的,在第二位点处超过40%的ATB200为单磷酸化的,且在第四位点处超过80%的ATB200为单或双磷酸化的。

[0233] 根据如下所述的LC-MS/MS方法进行了ATB200的另一种N-糖基化分析。所述分析产生了十批ATB200的平均N-糖基化分布(第32A-32H图,第33A-33B图)。

[0234] 来自ATB200的N-连接的聚糖用PNGase-F酶促释放,并用2-邻氨基苯甲酸(2-AA)标记。2-AA标记的N-聚糖通过固相萃取(SPE)进一步处理,以去除多余的盐和其他污染物。将纯化的2-AA N-聚糖溶解在乙腈/水(20/80;v/v)中,并将10微克装到氨基聚合物分析管柱(apHera™, Supelco)上,用于具有荧光检测功能的高效液相色谱(HPLC-FLD)和高分辨率质

谱 (HRMS) 分析。

[0235] 液相色谱 (LC) 分离是在正相条件下在梯度洗脱模式中以流动相A (乙腈中2%乙酸) 和流动相B (5%乙酸; 20毫摩尔乙酸铵水溶液用氢氧化铵调节至pH 4.3) 进行。最初的流动相组成为70%A/30%B。为了进行荧光检测, 检测器 (RF-20Axs, Shimadzu) 的参数为激发 (Ex): 320nm; 发射 (Em): 420nm。使用在独立数据采集 (IDA) 模式下运行的四极杆飞行时间质谱仪 (Sciex X500B QTOF) 进行HRMS分析。使用来自ProteoWizard的MSConvert将获取的数据文件转换为mzML文件, 然后使用GRITS Toolbox 1, 2Morning Blend软件 (UGA) 进行聚糖数据库搜索和随后对鉴定出的N-聚糖进行注释。使用前体单同位素质量数 (m/z) 和产物离子m/z鉴定N-聚糖。使用GlycoWorkbench 2应用程序在计算机上确认了实验产物离子和碎片化模式。

[0236] 为了确定来自ATB200的N-连接聚糖的相对定量, 将从HPLC-FLD-QTOF MS/MS实验中获得的数据进行如下处理。对FLD色谱图中的所有N-聚糖峰进行积分, 并为每个峰分配FLD色谱图中所有峰总面积的百分比。荧光信号以峰面积表示, 是样品中每种N-聚糖含量的定量度量 (图33A)。但是, 在大多数情况下, 同一FLD峰中包含多种N-聚糖。因此, 还需要质谱仪数据来获得每种N-聚糖物质的相对定量 (表5)。从数据中“提取”出每个N-聚糖的离子强度信号, 以创建一个称为萃取离子色谱图 (XIC) 的色谱峰。XIC与FLD色谱峰对准, 并且仅特定於一种N-聚糖物质。然后对由离子强度信号产生的XIC峰进行积分, 并且该峰面积是存在的聚糖量的相对定量度量。FLD峰面积和质谱仪XIC峰面积均用于对这里报道的ATB200的所有N-连接的聚糖物质进行相对定量。

[0237] LC-MS/MS分析的结果提供于下文表5中。聚糖表示的符号命名法是根据以下的方法: Wopereis W等人, 2006. Abnormal glycosylation with hypersialylated O-glycans in patients with Sialuria. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1762:598—607; Gornik O等人, 2007. Changes of serum glycans during sepsis and acute pancreatitis. *Glycobiology*. 17:1321-1332 <https://doi.org/10.1093/glycob/cwm.106>; Kattla JJ等人, 2011. Biologic protein glycosylation. In: Murray Moo-Young (ed.), *Comprehensive Biotechnology*, Second Edition, 3:467-486; Tharmalingarn-Jaikarjsn T等人, N-glycan profiling of bovine follicular fluid at key dominant follicle developmental stages. 2014. *Reproduction*. 148:569-580; Clerc F等人, Human plasma protein N-glycosylation, 2015. *Glycoconj J*. DOI 10.1007/s10719-015-9626-2; 及 Blackler RJ等人 2016. Single-chain antibody-fragment M6P-1 possesses a mannose6-phosphate monosaccharide-specific binding pocket that distinguishes N-glycan phosphorylation in a branch-specific manner. *Glycobiology*. 26-2:181-192。

[0238] 表5: 基于2-AA聚糖图谱和LC-MS/MS鉴定在ATB200上鉴定的寡糖类型和发生率

[0239]

High Mannose N-Glycans	% Total	Complex N-Glycans	% Total	Complex N-Glycans	% Total	Complex N-Glycans	% Total
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
Hybrid N-Glycans	% Total	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
Summary	Total	A4G4	0.91	FA4G4(2LN)S3	0.33	A3	0.11
High Mannose N-Glycans	38%	FA1G1S1	0.91	FA2G2Sg1	0.32	FA3G3S3+1Ac	0.1
Hybrid N-Glycans	5%	FA2G2S2+2Ac	0.76	FA4G4(1LN)S4	0.31	A2G2S1+1Ac	0.09
Complex N-Glycans	57%	A4G4S2	0.69	A3G3S3	0.29	FA3G1S1	0.06

[0240] 根据这种2-AA和LC-MS/MS分析,并进一步如图33B所总结,所测试的ATB200的平均M6P含量为3-5摩尔/摩尔ATB200(考虑到单M6P和双M6P)和每摩尔ATB200的唾液酸含量为4-7摩尔。

[0241] 如第32A-32H图所示并在图33B中所总结,ATB200的第一潜在N-糖基化位点具有约1.4摩尔M6P/摩尔ATB200的平均M6P含量,其中每摩尔ATB200约0.25摩尔单M6P的平均单M6P含量以及每摩尔ATB200约0.56摩尔双M6P的平均双M6P含量;ATB200的第二个潜在的N-糖基化位点的平均M6P含量为约0.5摩尔M6P/摩尔ATB200,主要的磷酸化N-聚糖物质为单M6P N-聚糖;ATB200的第三个潜在的N-糖基化位点的平均唾液酸含量为约1摩尔唾液酸/摩尔ATB200;ATB200的第四个潜在的N-糖基化位点的平均M6P含量约为1.4摩尔M6P/摩尔ATB200,其中平均单M6P含量约为0.35摩尔单M6P/摩尔ATB200和平均双M6P含量约为0.52摩尔双M6P/摩尔ATB200;ATB200的第五个潜在的N-糖基化位点的平均唾液酸含量为约0.86摩尔唾液酸/摩尔ATB200;ATB200的第六个潜在的N-糖基化位点的平均唾液酸含量为约4.2摩尔唾液酸/摩尔ATB200;及ATB200的第七个潜在的N-糖基化位点的平均唾液酸含量约为0.86摩尔唾液酸/摩尔TB200。

[0242] 同样根据这种2-AA和LC-MS/MS分析技术,ATB200的第一潜在N-糖基化位点处平均

约65%的N-聚糖是高甘露糖N-聚糖,ATB200的第二个潜在N-糖基化位点处的约89%的N-聚糖为高甘露糖N-聚糖,ATB200的第三个潜在的N-糖基化位点中超过一半的N-聚糖被唾液酸化(近20%完全唾液酸化),ATB200的第三个潜在N-糖基化位点上约有85%的N-聚糖是复合N-聚糖,ATB200的第四个潜在N-糖基化位点上约84%的N-聚糖是高甘露糖N-聚糖,ATB200的第五个潜在N-糖基化位点上约70%的N-聚糖被唾液酸化(约26%完全唾液酸化),而在ATB200的第五个潜在N-糖基化位点上约100%的N-聚糖是复合N-聚糖,在ATB200第六个潜在N-糖基化位点的N-聚糖中约有85%被唾液酸化(近27%完全唾液酸化),ATB200第六个潜在N-糖基化位点的约98%的N-聚糖是复合N-聚糖,ATB200第七个潜在N-糖基化位点的约87%的N-聚糖被唾液酸化(近8%被完全唾液酸化),并且ATB200的第七个潜在N-糖基化位点处约100%的N-聚糖是复合N-聚糖。

[0243] 实例4:ATB200及Myozyme®/Lumizyme®的分析比较

[0244] 纯化的ATB200及Lumizyme® N-聚糖是通过MALDI-TOF评估来测定在每一ERT上发现的个别N-聚糖结构。Lumizyme®是自商业来源获得。如第7图所示,ATB200展现Lumizyme®右侧的四个主峰洗脱。这证实ATB200经磷酸化至比Lumizyme®大的程度,因为这个评估是通过末端电荷而非CIMPR亲和力进行。如第8图中所总结,发现ATB200样本比Lumizyme®含有较低量的非磷酸化高甘露糖型N-聚糖。

[0245] 为评估Myozyme®及Lumizyme®中的传统rhGAA与CIMPR相互作用的能力,将两个传统rhGAA制剂注射至CIMPR亲和力管柱(其结合具有M6P基团的rhGAA)上且收集流过者。随后利用自由M6梯度洗脱结合的物质。将馏分收集在96孔板中且通过4MU- α -葡萄糖底物分析GAA活性。分离(流过)及结合(M6P洗脱)rhGAA的相对量是基于GAA活性测定且报告为总酶的分数的分数。第9A图及第9B图展示Myozyme®及Lumizyme®中的rhGAA的结合分布:Myozyme®中73%的rhGAA(第9B图)及Lumizyme®中78%的rhGAA(第9A图)不结合至CIMPR。的确,Myozyme®中仅27%的rhGAA及Lumizyme®中22%的rhGAA含有可为大量以使其靶向至肌细胞上的CIMPR的M6P。对比来说,如第5图所示,在相同条件下,发现ATB200中多于70%的rhGAA结合至CIMPR。

[0246] 除具有可结合至CIMPR的较大百分比的rhGAA之外,重要的是理解彼相互作用的质量。Lumizyme®及ATB200受体结合是使用CIMPR板结合检定来测定。简单来说,涂布CIMPR的板是用于俘获GAA。将变化浓度的rhGAA应用于固定受体且洗掉未结合rhGAA。剩余rhGAA的量是通过GAA活性测定。如第10A图所示,ATB200比Lumizyme®显著更好地结合至CIMPR。第10B图展示Lumizyme®(传统rhGAA产品)及根据本发明的ATB200中的双M6P N-聚糖的相对含量。对Lumizyme®来说,存在平均仅10%的具有双磷酸化N-聚糖的分子。对比来说,平均ATB200中每个rhGAA分子具有至少一个双磷酸化N-聚糖。

[0247] 总体上,ATB200中比Lumizyme®中含量更高的M6P N-聚糖指示ATB200中较高部分的rhGAA分子可靶向肌细胞。如上文所示,通过MALDI测定的高百分比的单磷酸化及双磷酸化结构符合CIMPR分布,从而说明ATB200对CIMPR受体的明显更大的结合。通过MALDI-TOF质谱法的N-聚糖分析证实平均每一ATB200分子含有至少一个天然双M6P N-聚糖结构。ATB200上的这种较高双M6P N-聚糖含量在M6P受体板结合检定中直接与对CIMPR的高亲和

力结合 (K_D 约2-4nM) 相关。

[0248] ATB200及Lumizyme® rhGAA的相对细胞吸收是使用正常及庞贝症纤维母细胞系来比较。比较涉及5-100nM的根据本发明的ATB200与10-500nM的传统rhGAA产品Lumizyme®。在16小时孵化之后,外部rhGAA是利用TRIS碱钝化且将细胞在收获之前用PBS洗涤3次。通过4MU- α -糖苷水解测量内在化GAA且相对于总细胞蛋白质作图并将结果呈现在第11A图-第11C图中。

[0249] ATB200也经显示为有效地内在化于细胞中。如第11A图-第11B图中所描绘,ATB200内在化于正常及庞贝症纤维母细胞中,且比传统rhGAA产品Lumizyme®内在化至更大程度。ATB200在约20nM下使细胞受体饱和,而需要约250nM的Lumizyme®来使细胞受体饱和。自这些结果外推的吸收效率常数 ($K_{吸收}$) 对ATB200来说为2-3nM且对Lumizyme®来说为56nM,如第11C图所示。这些结果暗示ATB200为用于庞贝病的良好靶向治疗。

[0250] 实例5:ATB200及药理学伴侣蛋白

[0251] 在染料的荧光在蛋白质变性时增加时在使用SYPRO Orange的热稳定性检定中评估ATB200在酸性或中性pH缓冲液中的稳定性。如第12图所示,以浓度依赖性方式添加pH 7.4的AT2221稳定化ATB200,相当于在pH 5.2下ATB200的稳定性,这为模拟溶酶体的酸性环境的条件。如表6中所总结,AT2221的添加使ATB200的熔融温度 (T_m) 增加几乎10°C。

[0252] 表6.ATB200与AT2221组合的稳定性

[0253]

测试条件	T_m (°C)
pH 7.4	56.2
pH 7.4 + 10 μ M AT2221	61.6
pH 7.4 + 30 μ M AT2221	62.9
pH 7.4 + 100 μ M AT2221	66.0
pH 5.2	67.3

[0254] 实例6:在Gaa KO小鼠中共同施用ATB200及AT2221

[0255] 在Gaa KO小鼠中评估ATB200及AT2221的治疗效应且与阿葡糖苷酶 α 的那些治疗效应进行比较。对于研究来说,使用雄性Gaa KO (3至4个月大) 及年龄匹配的野生型 (wild-type; WT) 小鼠。阿葡糖苷酶 α 是通过推注尾部静脉内 (IV) 注射来施用。在共同施用方案中,AT2221是通过口部胃管灌食法 (PO) 在ATB200的IV注射之前30分钟施用。治疗两周一次给予。自最后一次施用14天之后牺牲所治疗的小鼠且收集各种组织以供进一步分析。表7总结研究设计:

[0256] 表7.共同施用研究设计

	基因型	治疗	每次施用的药物剂量(两周一次)	施用数量
	<i>Gaa</i> KO	媒剂	N/A	6
[0257]	<i>Gaa</i> KO	阿葡糖苷酶 α	20 mg/kg	6
	<i>Gaa</i> KO	ATB200/AT2221	20 mg/kg (ATB200) 10 mg/kg (AT2221)	6
	WT (Sve 129)	未治疗	N/A	N/A

[0258] 组织样本中的组织肝糖含量是使用淀粉葡萄糖苷酶消化测定,如上文所论述。如第13图所示,20mg/kg ATB200及10mg/kg AT2221的组合相较于相同剂量的阿葡糖苷酶 α 显著地减少四种不同组织(四头肌、三角肌、腓肠肌、及心脏)中的肝糖含量。

[0259] 也遵照论述于以下各项中的方法分析组织样本的生物标志物改变:Khanna R等人(2012),“The pharmacological chaperone AT2220 increases recombinant human acid α -glucosidase uptake and glycogen reduction in a mouse model of Pompe disease”,Plos One7 (7):e40776;及Khanna,R等人(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。如第14图所示,在*Gaa* KO动物的肌肉纤维中相较于WT看到LAMP1阳性囊泡的深度增加及扩大,指示溶酶体增殖。ATB200/AT2221的共同施用产生具有正常化LAMP1水平的更多纤维,而剩余的LAMP1阳性囊泡也减小了尺寸大小(插图)。

[0260] 类似地,未治疗*Gaa*KO小鼠的肌肉纤维中密集的LC3阳性聚集体表示自噬区的存在及自噬堆积。LC3阳性聚集体(红色)在利用ATB200/AT2221共同施用治疗的小鼠中相较于利用阿葡糖苷酶 α 治疗的小鼠优选减小(第15A图)。当使用西方墨点评定LC3的表现时,得到类似的观察结果。如第15B图所示,利用ATB200/AT2221治疗的大多数动物展示LC3 II的水平显著减少,所述LC3 II为与自噬体相关联的脂质化形式,从而暗示改善的自噬通量。比较来说,阿葡糖苷酶 α 对自噬的效应为适度的。

[0261] 也评定Dysferlin,它是涉及膜修复且其缺乏/错误运送与许多肌肉营养不良相关联的蛋白质。如第16图所示,dysferlin是大量地累积在*Gaa* KO小鼠的肌浆中。相较于阿葡糖苷酶 α ,ATB200/AT2221能够在较大的肌肉纤维中使dysferlin恢复至肌纤维膜。

[0262] 这些数据与在细胞水平在利用ATB200及美格鲁特治疗的人类庞贝病患者(例如,患者展现水平减少的肝糖累积及肌肉损伤的生物标志物)中证明的改善一致,从而不仅导致庞贝病的有效治疗而且引起疾病进程的逆转。人类庞贝病患者中的临床数据总结在下文实例8-13中。

[0263] 实例7:单一纤维分析

[0264] 如第17图所示,大多数媒剂治疗的小鼠展示粗略扩大的溶酶体(绿色)(参见,例如“B”)及大块自噬堆积的存在(红色)(参见,例如“A”)。Myozyme®治疗的小鼠不展示相较于媒剂治疗的小鼠的任何显著差异。对比来说,自利用ATB200治疗的小鼠分离的大多数纤维展示剧烈减小的溶酶体大小(参见,例如“C”)。此外,具有自噬堆积的区域也减少了不同的程度(参见,例如“C”)。作为结果,自ATB200治疗的小鼠分析的肌肉纤维的大部分(36-60%)呈现为正常或接近正常的。下文表8总结第17图中展示的单一纤维分析。

[0265] 表8.单一纤维分析

治疗	所分析动物	所分析纤维的总数(n)	溶酶体扩大	具有自噬堆积的纤维	具有正常或接近正常外观的纤维
WT	2	65	-	-	100%
媒剂	2	65	+	>90%	<10%
Alglucosidase alfa	4	150	+	>90%	<10%
ATB200	5	188	大多数纤维中的大小剧烈减小	40-64%*	36-60%

[0267] *这包括具有不同减少程度的自噬堆积的纤维。总体来说,堆积的程度在ATB200治疗的群组中相较于媒剂或阿葡糖苷酶 α 治疗的群组为较小的。

[0268] 总体来说,数据指示:当施用至Gaa KO小鼠时,单独的及通过药理学伴护蛋白AT2221在血液的中性pH下进一步稳定的具有其较高M6P含量的ATB200在组织靶向及溶酶体运送方面相较于阿葡糖苷酶 α 更有效,这与ATB200通过AT2221的稳定化一致,如第18图所描绘。作为结果,ATB200的施用及ATB200/AT2221的共同施用在校正一些疾病相关病理学参数诸如肝糖累积、溶酶体增殖、及自噬区形成方面比阿葡糖苷酶 α 更有效。由于这些积极治疗效应,显示ATB200的施用及ATB200/AT2221共同施用改善肌肉纤维自破坏复原的可能性且甚至通过清除肝糖而逆转破坏,所述肝糖已由于缺乏最佳GAA活性而累积在细胞中。与实例6一样,这些数据也与在细胞水平在人类庞贝病患者中证明的改善一致,这些改善在ATB200及美格鲁特的施用之后引起庞贝病的有效治疗及疾病进程的逆转。人类庞贝病患者中的临床数据总结在下文实例8-13中。

[0269] 实例8:ATB200-02试验:在患有庞贝病的患者中的ATB200/AT2221的非人类研究

[0270] 在Gaa敲除小鼠中进行临床前研究以评估在改变ATB200酶替代疗法(enzyme replacement therapy;ERT)及AT2221伴护蛋白剂量下的药物动力学(pharmacokinetics; PK)及肝糖减少的效率。这些数据用于估计人类中可比较的AT2221伴护蛋白剂量。随后将研究ATB200-02(NCT02675465)设计为开放标记固定序列、上升剂量、先于人类中、1/2期研究以评估在患有庞贝病的患者中ATB200与AT2221共同施用的安全性、可耐受性、PK、药效学

(pharmacodynamics;PD)、及功效。第19A图-第19B图呈现ATB200-02研究设计。先前已接收利用阿葡糖苷酶 α 的酶替代疗法的有行动力的患者是称为有行动力的ERT切换(或ERT切换有行动力)患者或群组1患者。先前已接收利用阿葡糖苷酶 α 的酶替代疗法的无行动力的患者是称为无行动力的ERT切换(或ERT切换无行动力)患者或群组2患者。先前未接收利用阿葡糖苷酶 α 的酶替代疗法的有行动力的患者是称为ERT原始(或ERT原始有行动力)患者或群组3患者。

[0271] 五个国家的十六个临床场所参与ATB200-02研究。研究使用以下关键纳入标准:年龄18-65岁的男性及女性,其基于记载的GAA酶活性缺乏或GAA表现型而诊断为患有庞贝病,且在试验起始之前已接收利用阿葡糖苷酶 α 的酶替代疗法2-6年(群组1)(或对群组2是>2年)。合格受试者为当前正在以每隔一周的频率接收阿葡糖苷酶 α 且已完成最后2次输注而没有造成剂量中断的药物有关不利事件(adverse event;AE)的那些受试者(群组1及2)。受试者必须能够在6分钟步行测试(6-Minute Walk Test;6MWT)步行200米与500米之间(群组1及3),具有为预测正常值的30-80%的直立用力肺活量(forced vital capacity;FVC)(群组1及3),或要坐轮椅且不能在无辅助情况下步行(群组2)。用于6MWT及FVC测试的方案可例如见于Lachman及Schoser, Journal of Rare Diseases, 2013, 8:160, 及Bittner及Singh, The 6Minute Walk Test, Cardiology Advisor, 2013。第19C图提供20位受试者的基线特性。评定群组1、2及3的安全性、可耐受性、及生物标志物。评定群组1及3的以下功能评定结果:6MWT、其他运动功能测试(时间测试及步态-楼梯-gower-椅子(gait-stair-gower-chair;GSGC))、徒手肌肉测试、及肺功能(FVC、最大吸气压(maximal inspiratory pressure;MIP)/最大呼气压(maximal expiratory pressure;MEP))。用于时间测试及GSGC测试的方案可例如见于Lachman及Schoser, Journal of Rare Diseases, 2013, 8:160。对于群组2,功能评定包括肌肉力量测试。

[0272] 实例9:来自ATB200-02试验的期中PK结果

[0273] 用于AT2221的药物动力学数据的概要提供于第20图中。在5mg/kg、10mg/kg、及20mg/kg下用于ATB200的血浆中的总GAA蛋白质浓度是通过rhGAA特异性“署名”肽T09(主要)及T50(确认)的经验证LC-MS/MS定量对完成阶段1及2的11位群组1患者,以及完成阶段3的PK研究的五位群组2患者进行测定。对于阶段1,在开始ATB200输注之前及在开始输注之后的1、2、3、3.5、4、4.5、5、6、8、10、12、及24小时收集用于血浆总GAA蛋白质浓度的血液样本。对于阶段2及阶段3,在开始输注之前及在开始输注之后的1、2、3、3.5、4、4.5、5、6、8、10、12、及24小时收集用于血浆总GAA蛋白质浓度的血液样本。

[0274] 也对完成阶段1及2的11位群组1患者,以及对完成阶段3中的PK研究的五位群组2患者执行AT2221 PK分析。恰好在AT2221经口施用之前(时间0)及在AT2221经口施用之后的1、1.5、2、2.5、3、4、5、6、9、11、及25小时获取用于血浆AT2221浓度的血液样本。血浆AT2221是通过经验证LC-MS/MS检定来测定。

[0275] 如第21图所示,当单独施用,ATB200的水平以稍微大于剂量比例方式增加。20mg/kg下的ATB200与单一高剂量(260mg)的AT2221的共同施用使总GAA蛋白质暴露曲线下方面积(area under the curve;AUC)相较于以20mg/kg单独施用的ATB200增加大致17%(第21图、第22C图)。20mg/kg下的ATB200与多个高剂量(260mg)的AT2221的共同施用使总GAA蛋白质暴露曲线下方面积(area under the curve;AUC)相较于以20mg/kg单独施用的

ATB200增加大致29% (第21图、第22D图)。在末端消除阶段期间在对数尺度上观察到分布半衰期及部分AUC-24h的增加(第21图、第22A图、第22B图)。如第21图所示,分布半衰期(α 阶段)增加40%,与血浆中高剂量AT2221对ATB200的稳定化效应一致。分布半衰期的增加伴随有自达到最大血浆浓度的时间至给药后24小时的达到42.2%的部分AUC增加(第21图、第22B图)。在低剂量AT2221及高剂量AT2221对比单独ATB200的给药后12小时及24小时比较中观察到通过AT2221对ATB200稳定化的进一步证据(第22E图及第22F图)。在ERT原始(群组3)患者与ERT切换患者(群组1)之间不存在血浆总GAA蛋白质暴露的统计学显著差异(第23图)。署名肽T50的PK布置与署名肽T09的布置没有区别(AUC比率:1.00)。

[0276] 实例10:来自ATB200-02试验的期中功效结果

[0277] 如第24A图及第24B图所示,在第6个月有行动力的ERT切换患者及ERT原始患者的6MWT改善并且直至第12个月观察到持续益处。分别在第6个月、第9个月、及第12个月7/10、8/10、及8/8的ERT切换患者的6MWT增加。分别在第6个月、第9个月、及第12个月5/5、5/5、及2/2的ERT原始患者的6MWT增加。

[0278] 如第24C图、第26A图、及第26C图所示,运动功能测试及徒手肌肉力量连同6MWT的改善与ERT切换及ERT原始患者历经12个月的肌肉功能的总体改善一致。

[0279] 如第25图及第26B图所示,在第6个月及第9个月,在所有无行动力的ERT切换患者中观察到上肢力量的一致及显著增加。

[0280] 如第27图所示,分别在第6个月、第9个月、及第12个月在5/9、6/9、及3/7的ERT切换患者中FVC为稳定或增加的,且分别在第6个月、第9个月、及第12个月在5/5、5/5、及2/2的ERT原始患者中FVC为稳定或增加的。也如第27图所示,在ERT切换有行动力的患者中最大吸气压(maximal inspiratory pressure;MIP)为稳定的且最大呼气压力(maximal expiratory pressure;MEP)增加,而在ERT原始患者中MIP增加且MEP为稳定的。

[0281] 疲劳严重程度量表(Fatigue Severity Scale;“FSS”)为由九个问题组成的自我评定调查表,每一问题在1至7的量表上记分。总记分范围为9至63,其中较高值表示因为疾病病状的较高疲劳程度。健康群体中的正常值为大致21(Grace J等人Parkinsonism Relat Disord.2007;13:443-445)。如第28图所示,所有群组在基线受疲劳显著影响,且所有群组在接收ATB200/AT2221之后证明其FSS的改善。

[0282] 实例11:来自ATB200-02试验的期中结果:肌肉损伤的标志物

[0283] 评定以下肌肉破坏标志物:肌酸激酶(creatine kinase;CK)、丙胺酸转胺酶(alanine aminotransferase;ALT)、及天冬胺酸转胺酶(aspartate aminotransferase;AST)。临床试验的九个月之后可获得的结果是报告在第29A图-第29C图中(来自分别对群组1、2、及3来说最多58周、24周、及36周的数据;较低n值反映一些数据不能被分析或尚未分析)。在这些相应时间点观察到的自基线的平均减少对有行动力的ERT切换患者(n=9)来说为大致30-35%,对无行动力的ERT切换患者(n=4)来说为5-20%,且对ERT原始患者(n=5)来说为40-55%。在临床试验的十二个月之后可获得CK酶的结果是报告于第29D图中(来自对群组1、2、及3来说最多12个月的数据;较低n值反映一些数据不能被分析或尚未分析)。

[0284] 评定作为肝糖累积的标志物的尿己糖四糖(Hex4)。在临床试验的十二个月之后可获得Hex4的结果报告于第29D图中(来自对群组1、2、及3来说最多12个月的数据;较低n值反映一些数据不能被分析或尚未分析)。

[0285] 实例12:来自ATB200-02试验的期中安全性结果

[0286] 治疗的最长持续时间是历经20个月。不利事件(adverse event;AE)大体为轻度及短暂的,其中跨于所有三个群组在历经400次总输注之后存在极低速率的输注相关反应(小于1%)。这些事件发生是通过标准预用药来控制。

[0287] 直至72周报告为治疗有关的最普遍AE为恶心(3/20)、颤动(3/20)、头痛(3/20)、疲劳(3/20)、腹泻(2/20)、肌肉痉挛(2/20)、及关节肿胀(2/20)。

[0288] 直至20+个月报告为治疗有关的最普遍AE为腹痛(包括上腹痛及下腹痛)(8/20)、腹泻(8/20)、鼻咽炎(6/20)、恶心(5/20)、头痛(5/20)、及上呼吸道感染(5/20)(第30图)。报告了一个严重AE,其与研究药物无关(因下呼吸道感染而住院治疗)。无患者由于AE而中断研究。

[0289] 在550+次输注中发生三次输注相关反应(infusion-associated reaction; IAR),其是通过标准预用药来控制。在无行动力的ERT切换患者(群组2)中发生一个IAR事件(皮肤脱色)。在ERT原始患者(群组3)中发生两个IAR事件(局部瘙痒、红斑、及烧灼感)(第30图)。

[0290] 实例13:来自ATB200-02试验的期中结果的总结及结论

[0291] 如第31图中所总结,来自ATB200-02试验的期中数据存在一致性,从而证实肌肉损伤及底物累积的标志物、肌肉功能测试(计时测试及耐久性)、徒手肌肉力量的显著及意外的平行改善,以及跨于不同群组的呼吸功能测试的稳定及/或改善。分别在第6个月及第9个月在16/18及10/10的患者中肌肉功能有所改善。6MWT距离的增加在ERT切换有行动力的患者及ERT原始患者中直至第12个月是一致及持久的,在ERT切换有行动力的患者及ERT原始患者中其他运动功能测试的改善也是如此。定性及定量测量展示在第6个月及第9个月在无行动力的ERT切换患者中的上肢力量增加。FVC、MIP、及MEP在ERT切换患者中为大体上稳定的且在ERT原始患者中有所增加。在所有群组中观察到疲劳记分的改善。生物标志物水平(例如,CK及Hex4的水平)在所有群组中减少且ATB200/AT2221大体上良好耐受。

[0292] 因此,疗法的多维影响暗示ATB200/AT2221的组合方案有潜力成为用于患有庞贝病的患者的重要治疗选项。这些临床结果支持来自实例7中描述的单一纤维分析研究的结果,从而证明治疗在自肌肉纤维清除病理学方面是有效的。临床试验的进一步研究仍在进行中。

高甘露糖及磷酸化寡糖的结构及受体亲和力

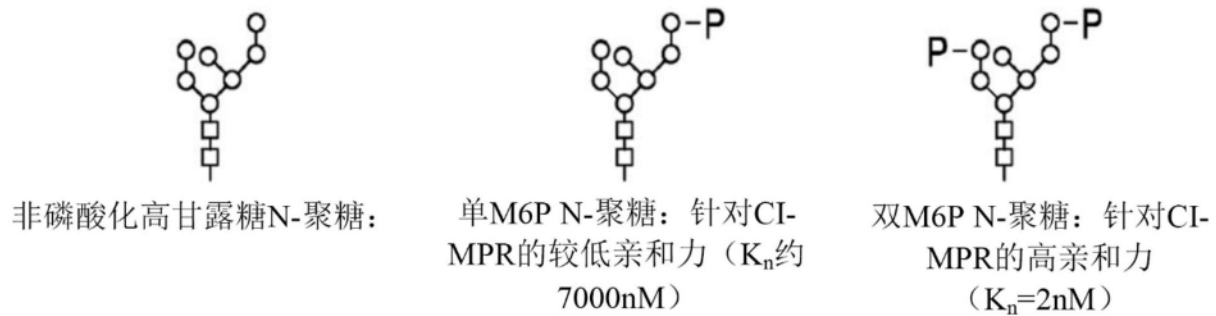


图1A

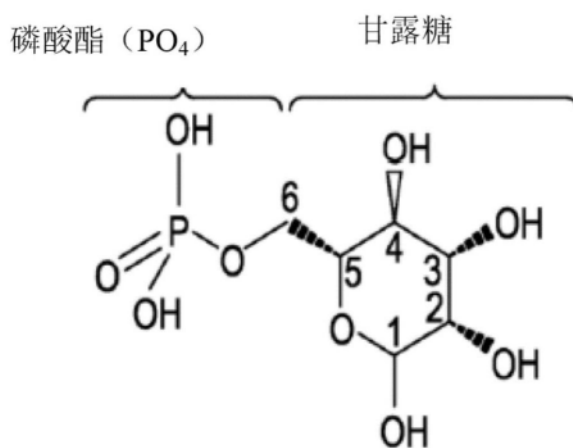


图1B

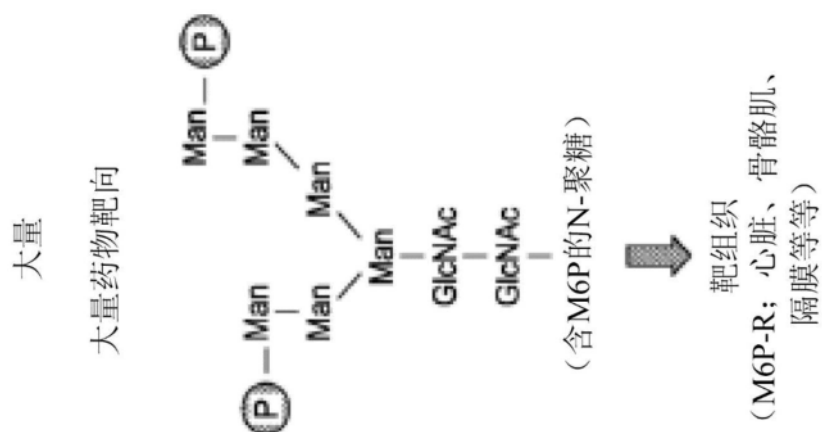


图2A

大量及非大量靶向聚糖特异性受体的比较

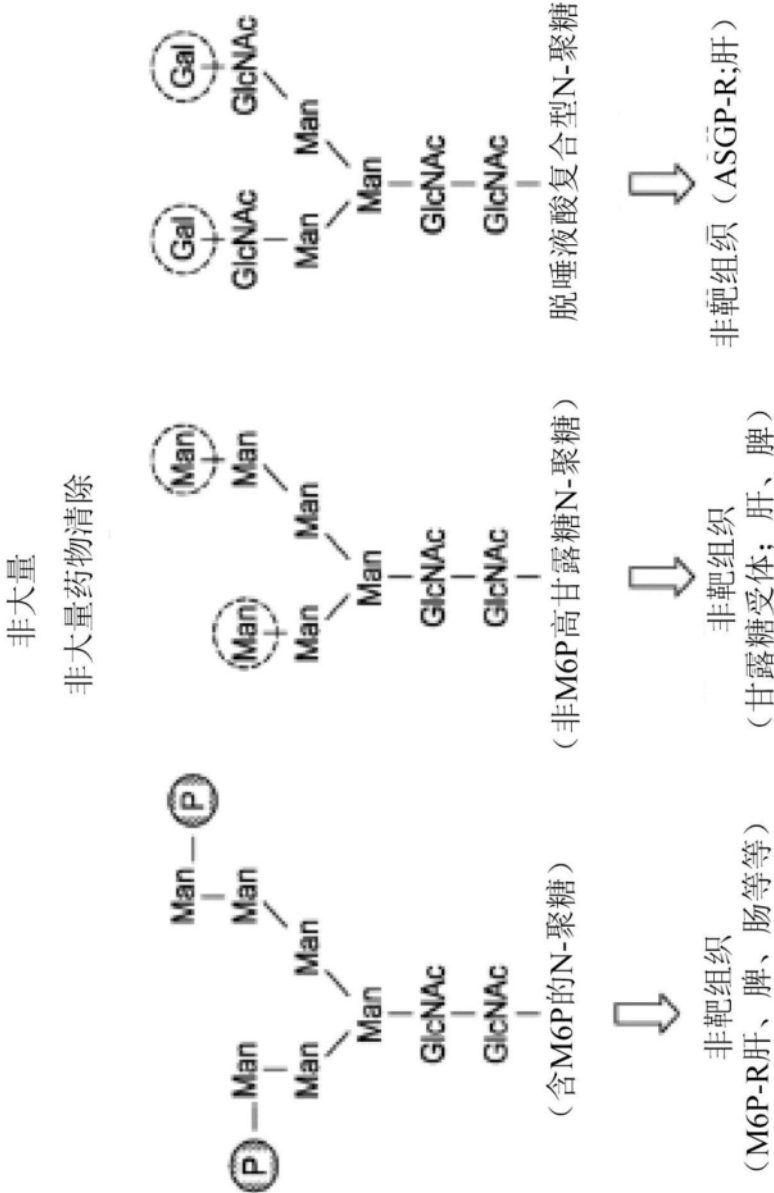


图2B

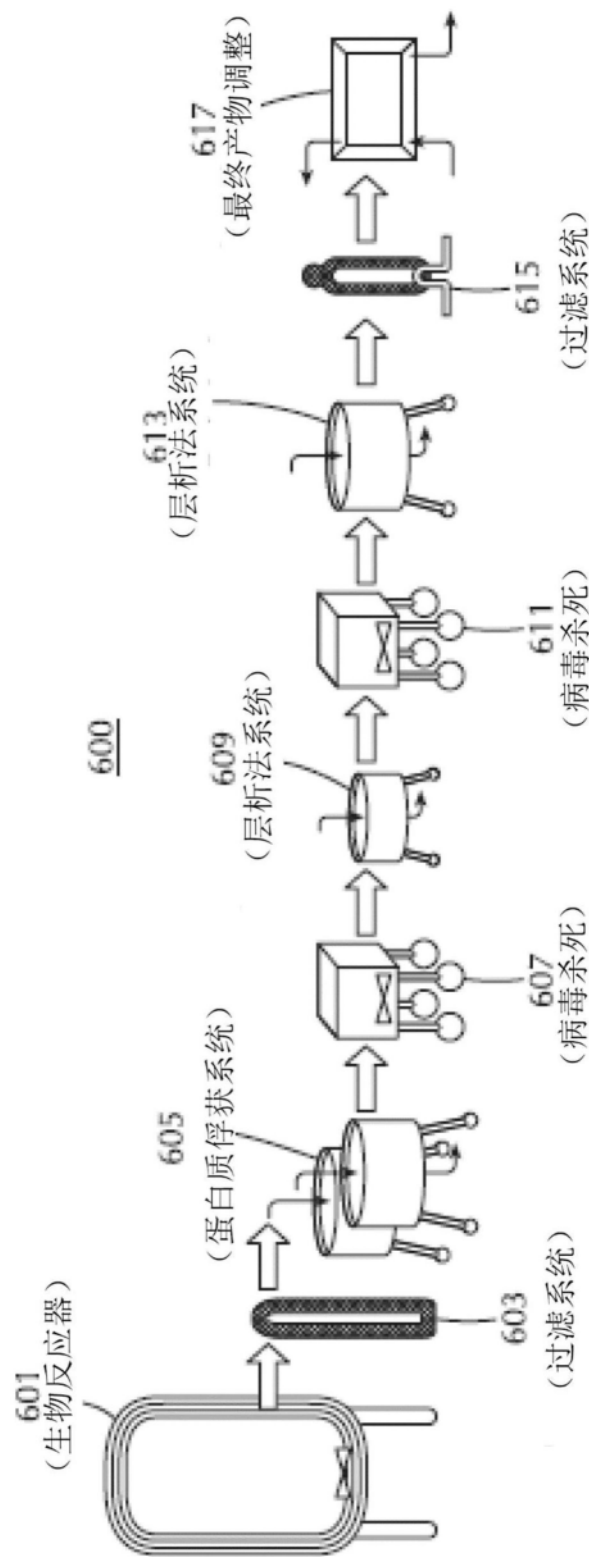


图3

(ATB200载体构筑)

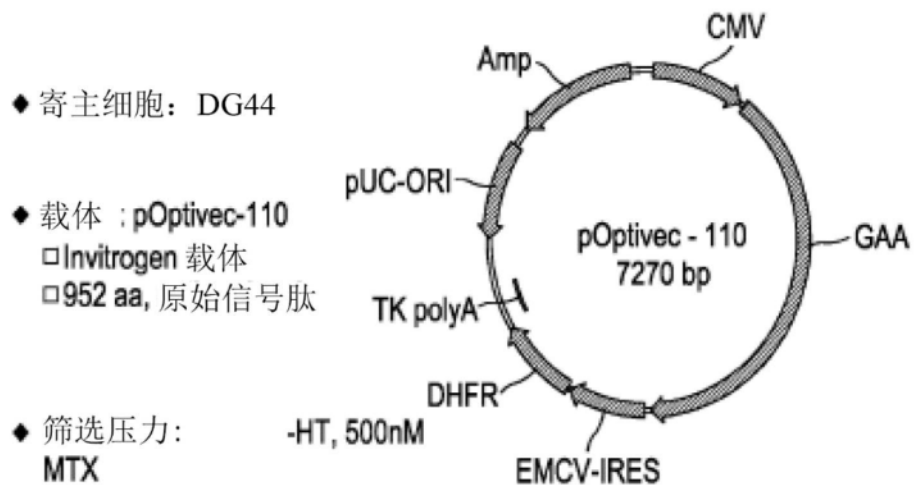
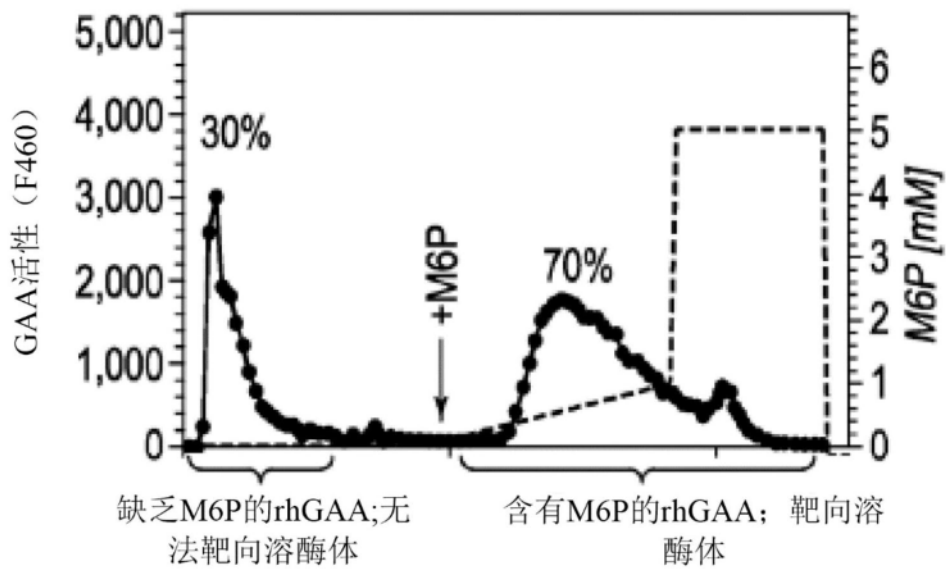


图4

实施例1



实施例2

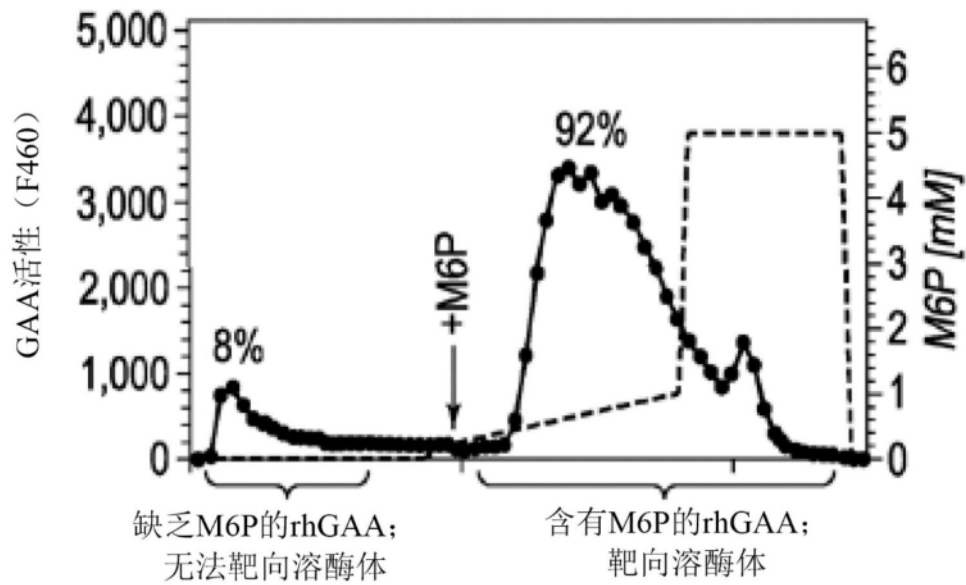


图5



图6A

N84的N-糖基化分布

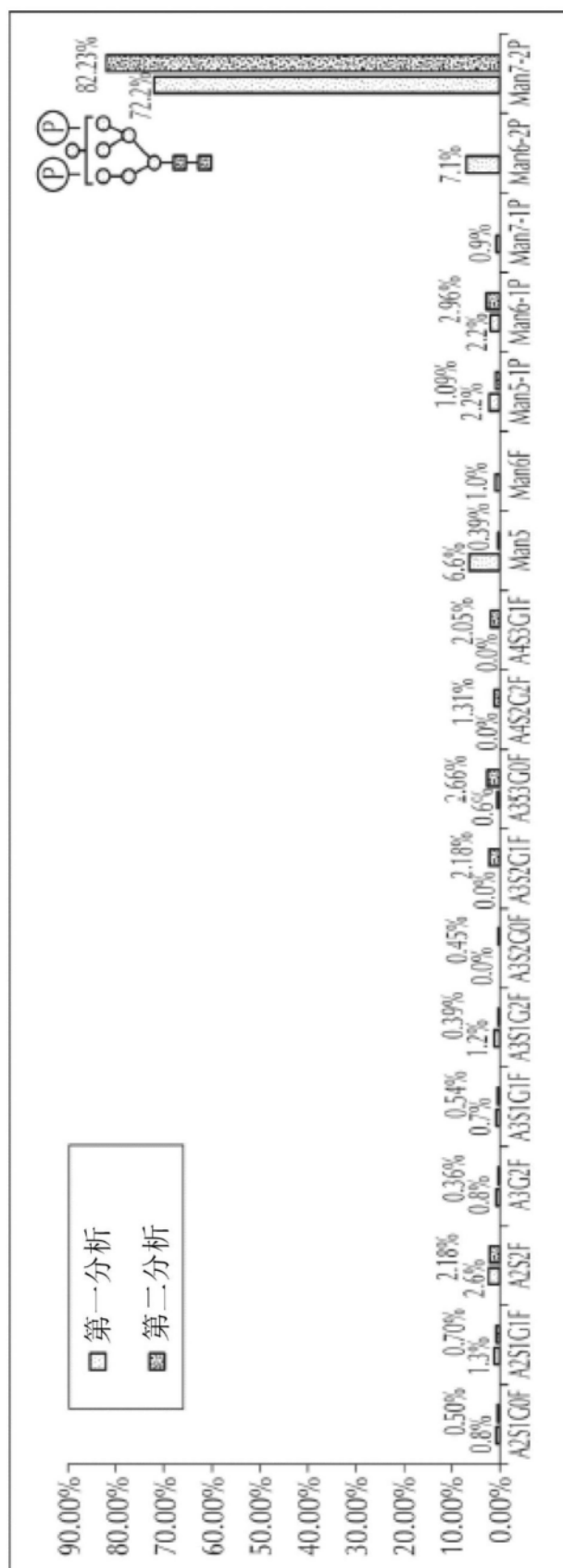


图6B

N177的N-糖基化分布

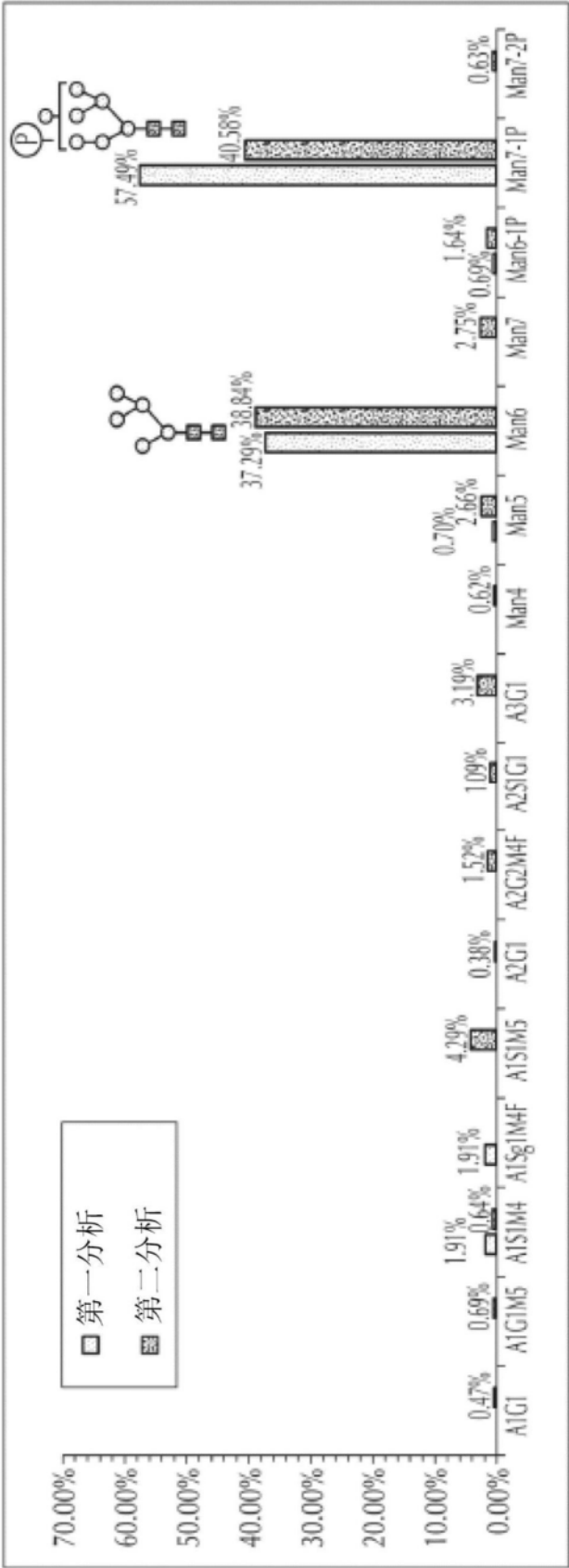


图6C

N334的N-糖基化分布

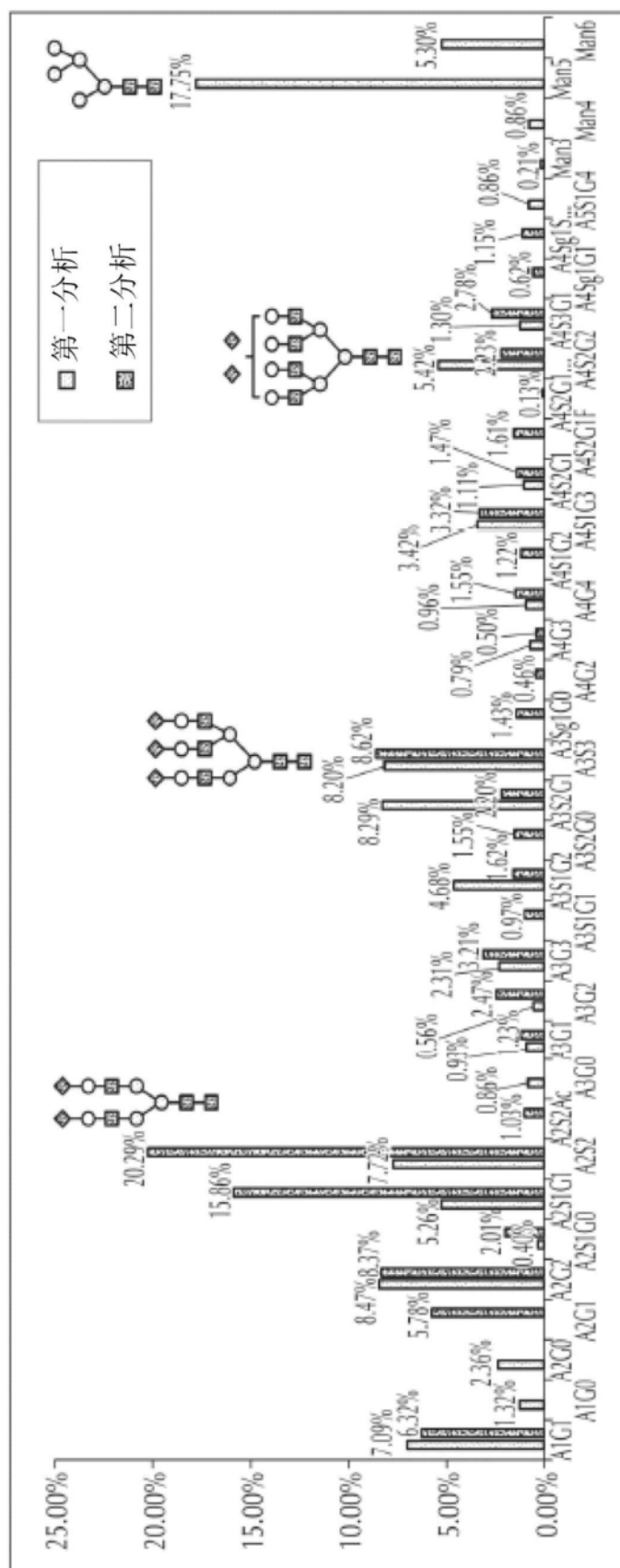


图6D

N414的N-糖基化分布

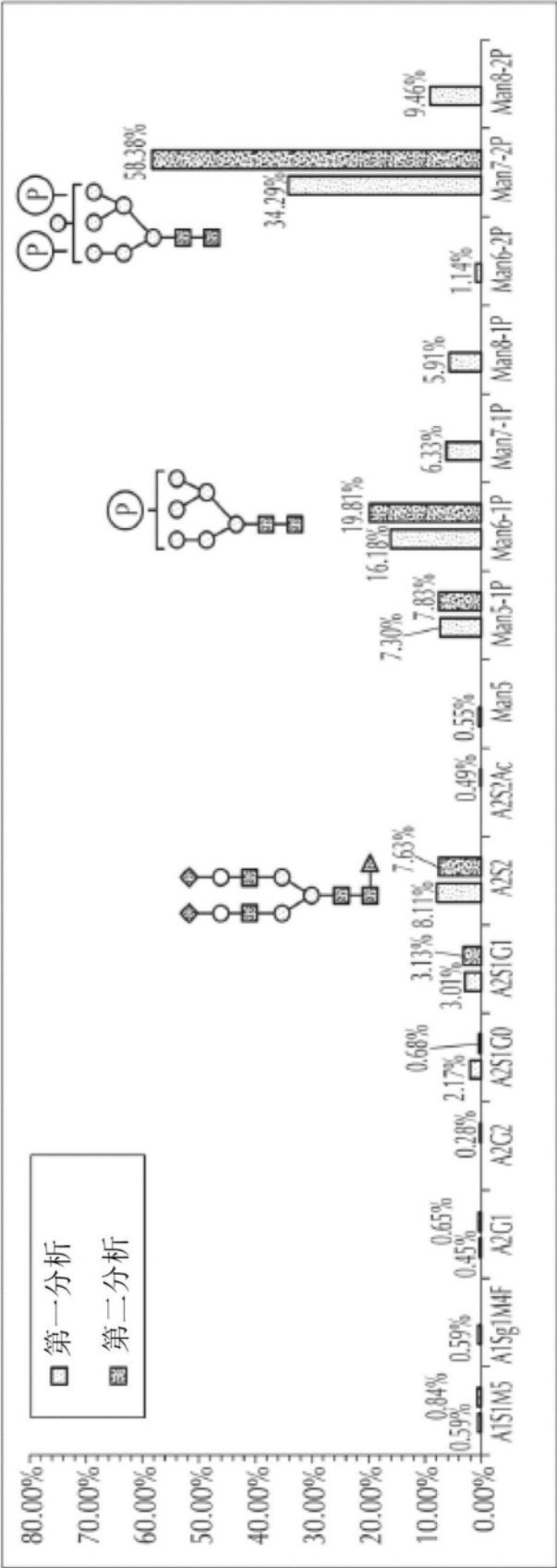


图6E

N596的N-糖基化分布

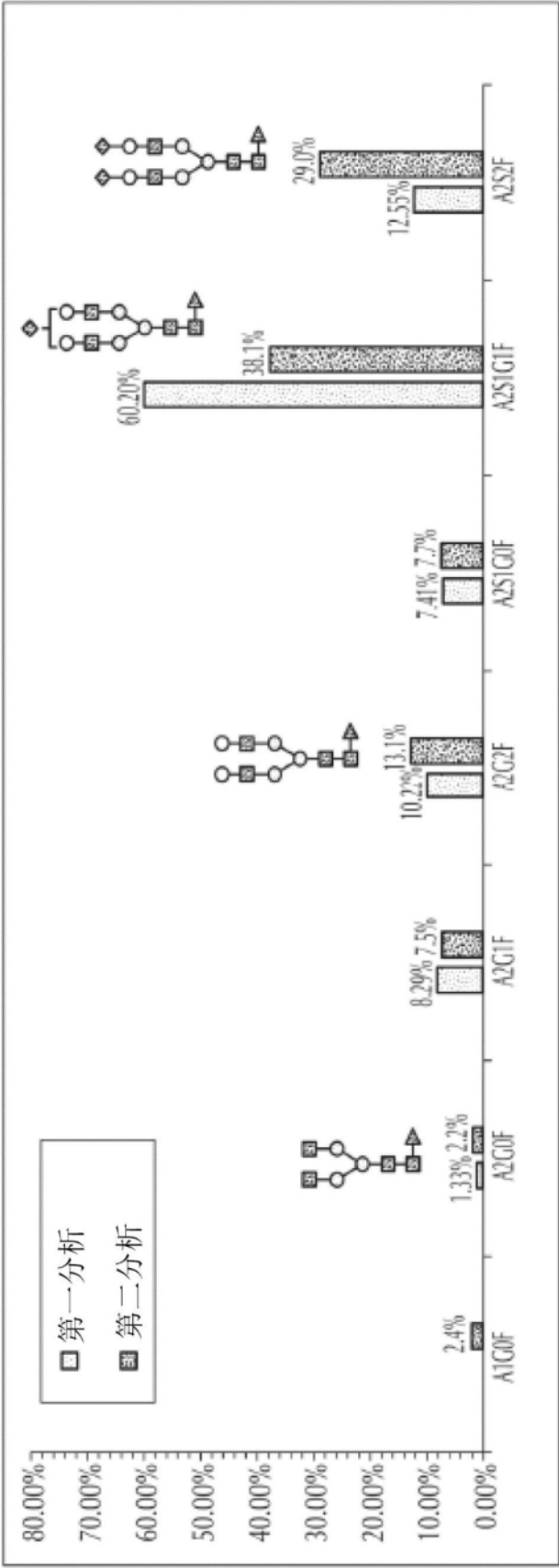


图6F

N826的N-糖基化分布

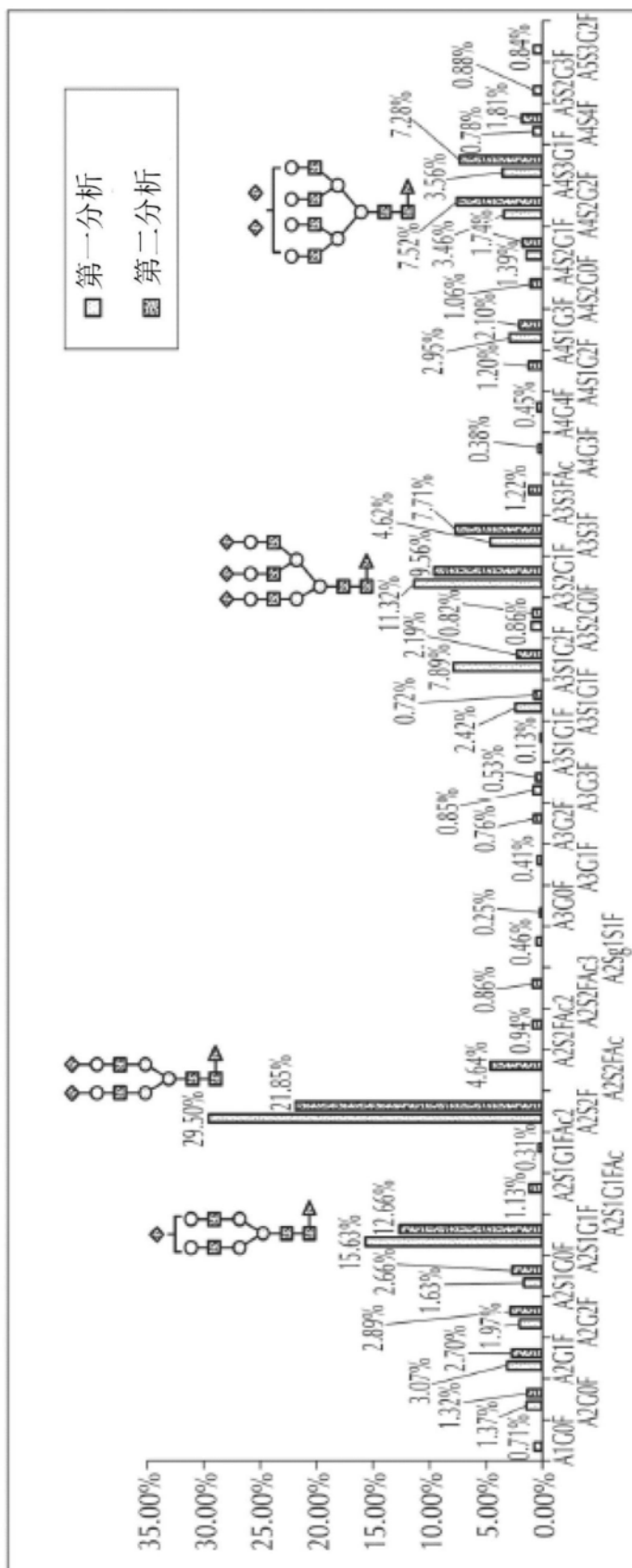


图6G

在每一N-糖基化位点中的双M6P及单M6P的相对百分比

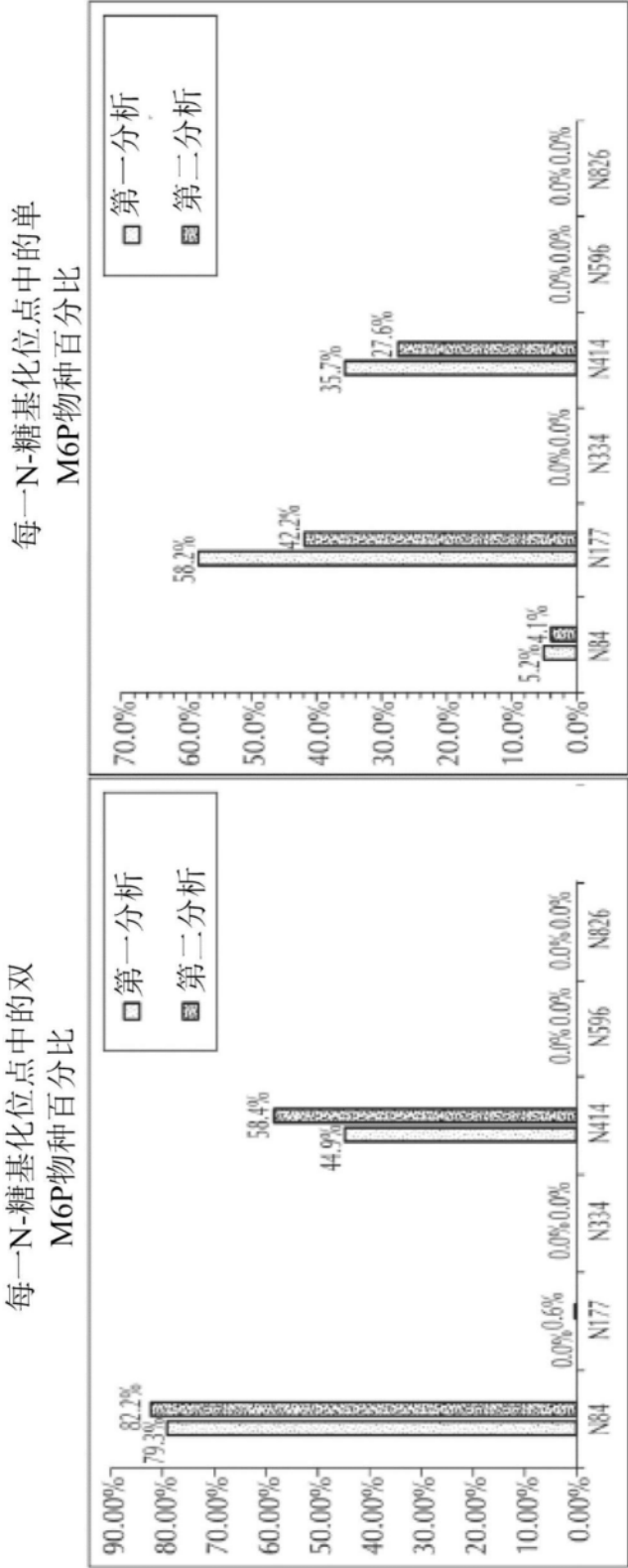


图6H

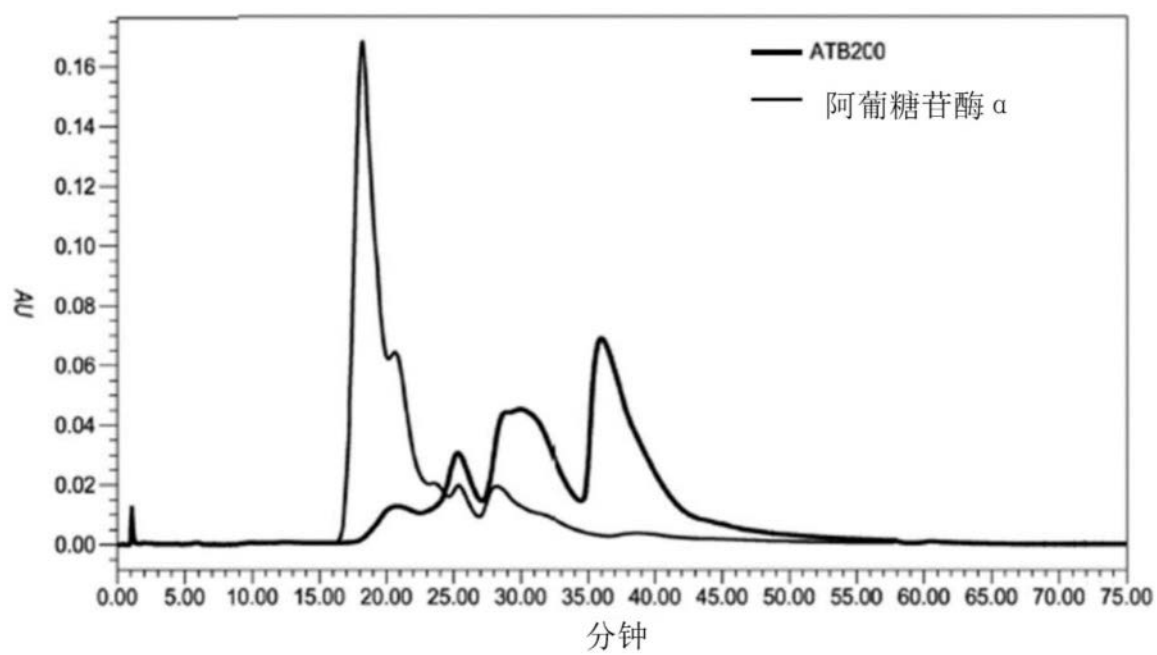


图7

N-聚糖在rhGAA制备上的分布

	Lumizyme	BP-rhGAA*	ATB200	
			1	2
复合型N-聚糖	70.7%	48.9%	51.0%	47.5%
混合型N-聚糖	6.7%	9.7%	4.4%	3.7%
高甘露糖型N-聚糖:				
非磷酸化	15.8%	23.7%	14.0%	9.9%
单M6P	5.2%	10.4%	13.4%	14.2%
双M6P	1.6%	6.8%	17.2%	24.7%

图8

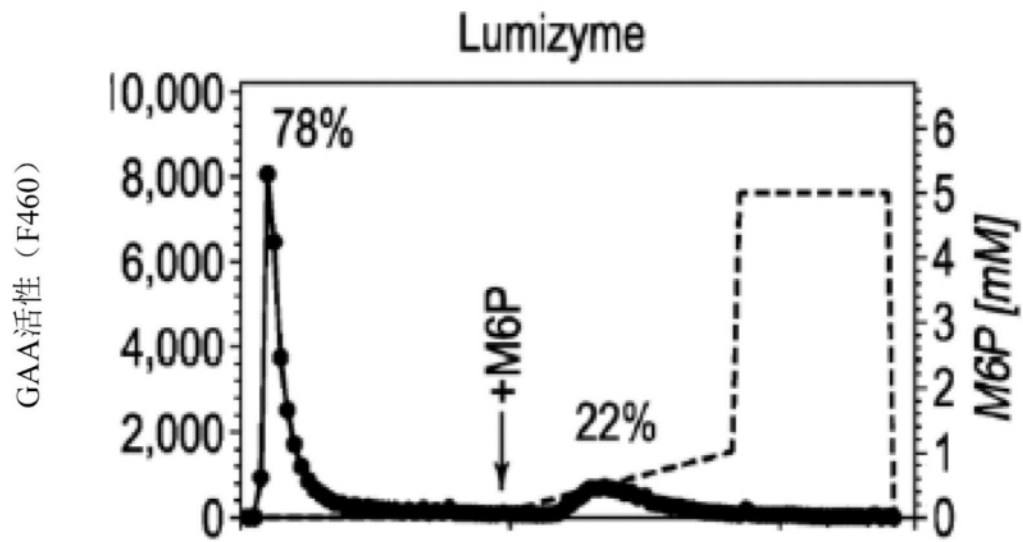


图9A

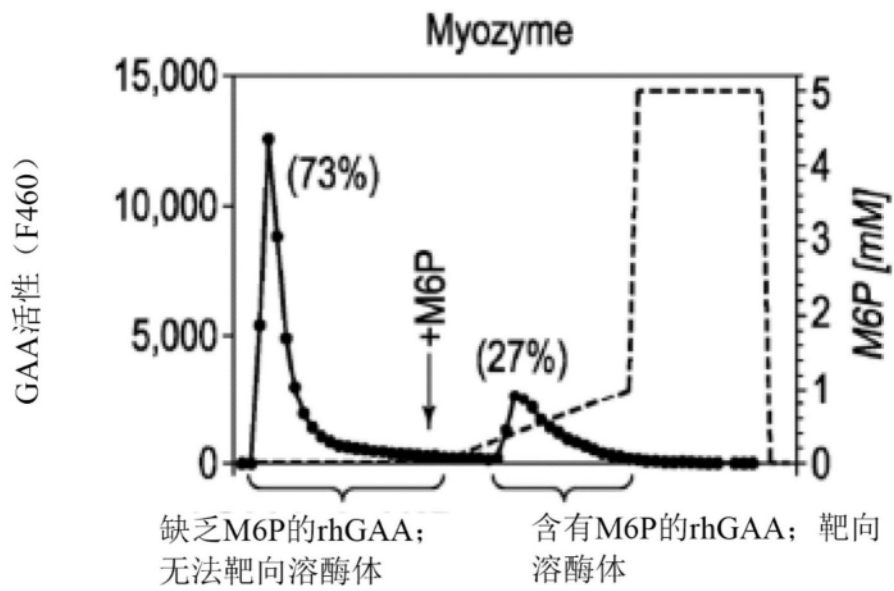


图9B

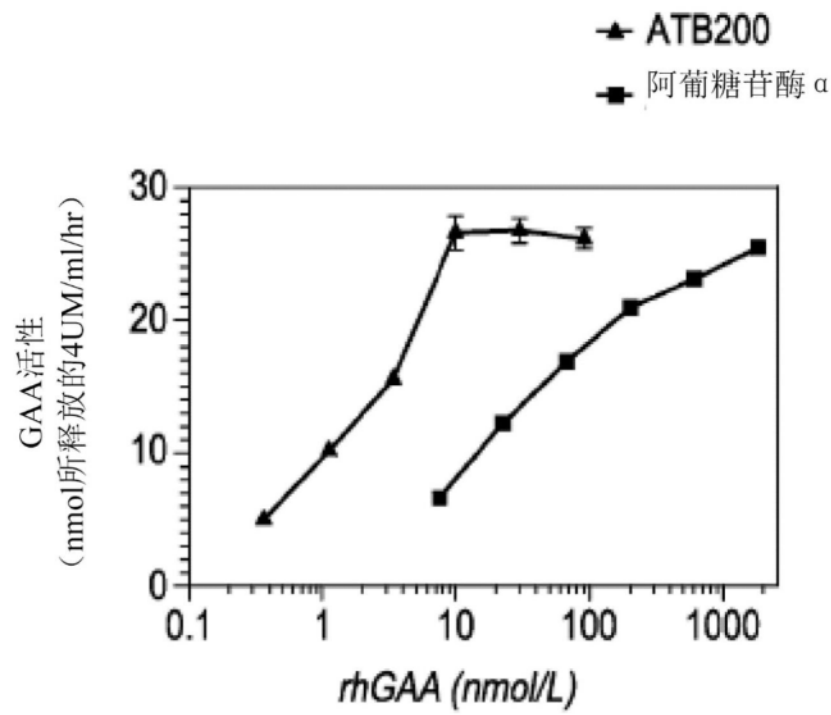


图10A

聚糖	阿葡糖苷酶阿尔法 (mol双聚糖/mol蛋白质)	ATB200(mol双聚糖/mol蛋白质)
双M6P	0.1	1.3

图10B

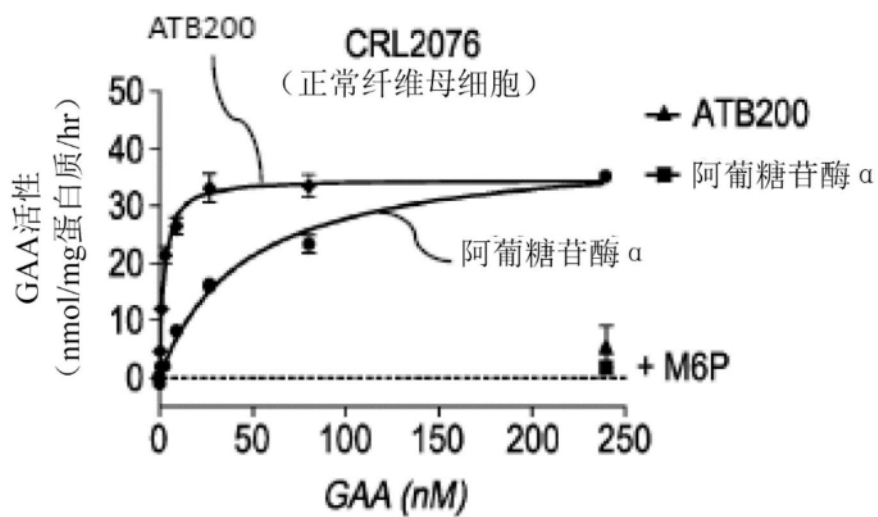


图11A

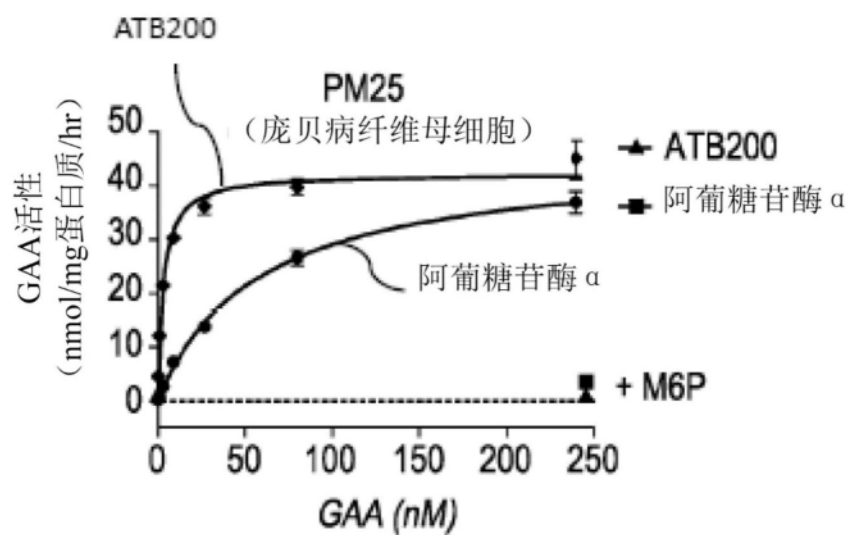


图11B

细胞系	$K_{\text{吸收}}$ (nM)	
	AT200	Lumizyme
正常	2	56
庞贝病	3	57

图11C

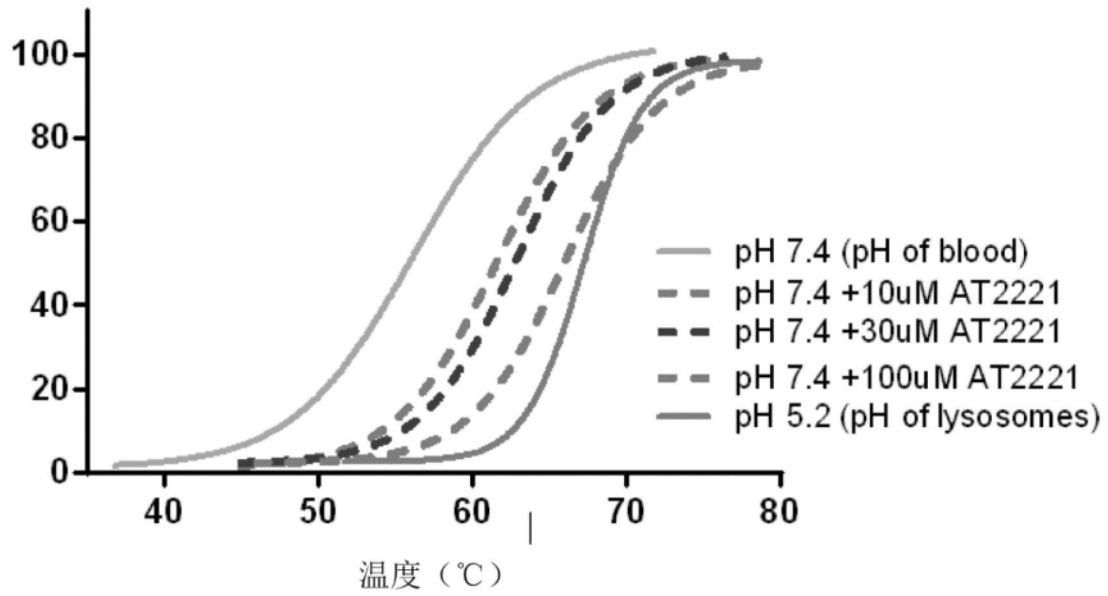


图12

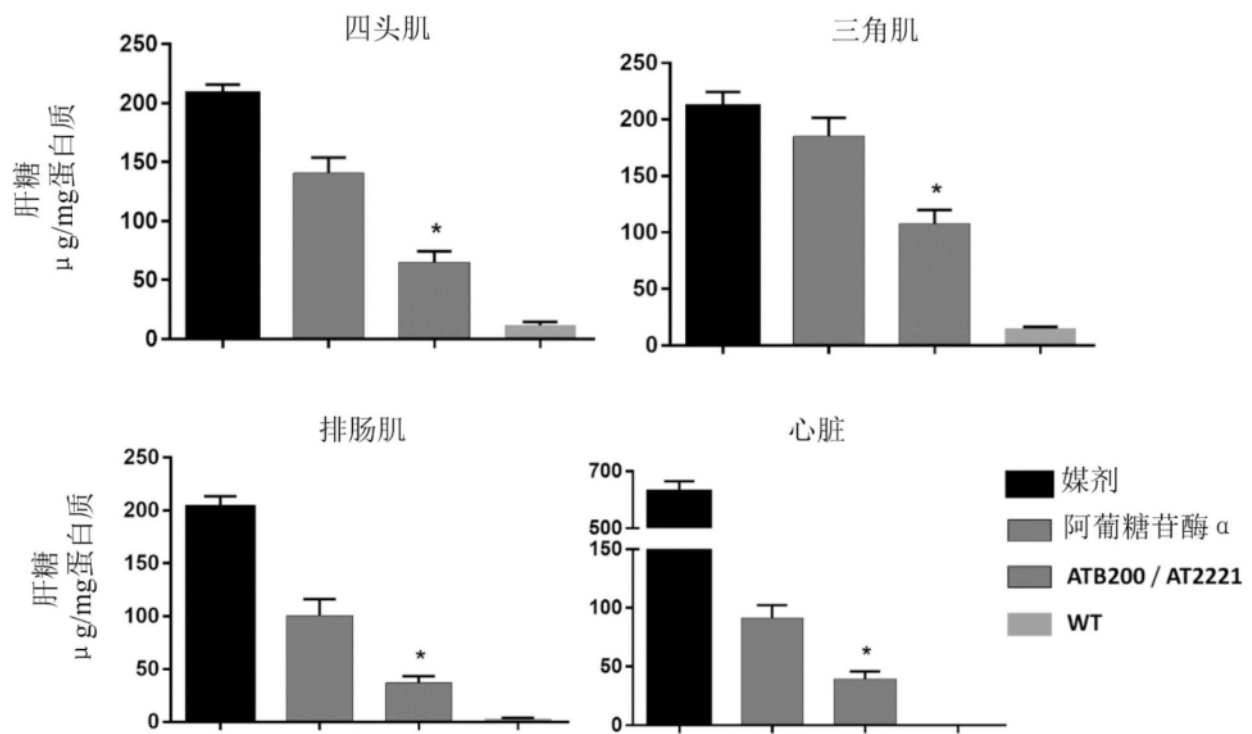


图13

四头肌的外股肌中的LAMP1的IHC检查

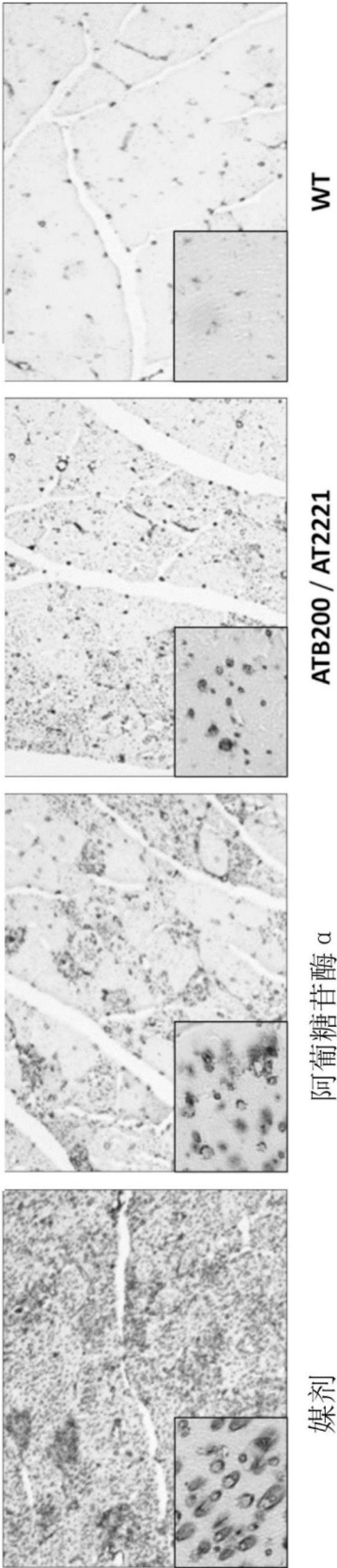


图14

四头肌的外股肌中的LC3的IHC检查

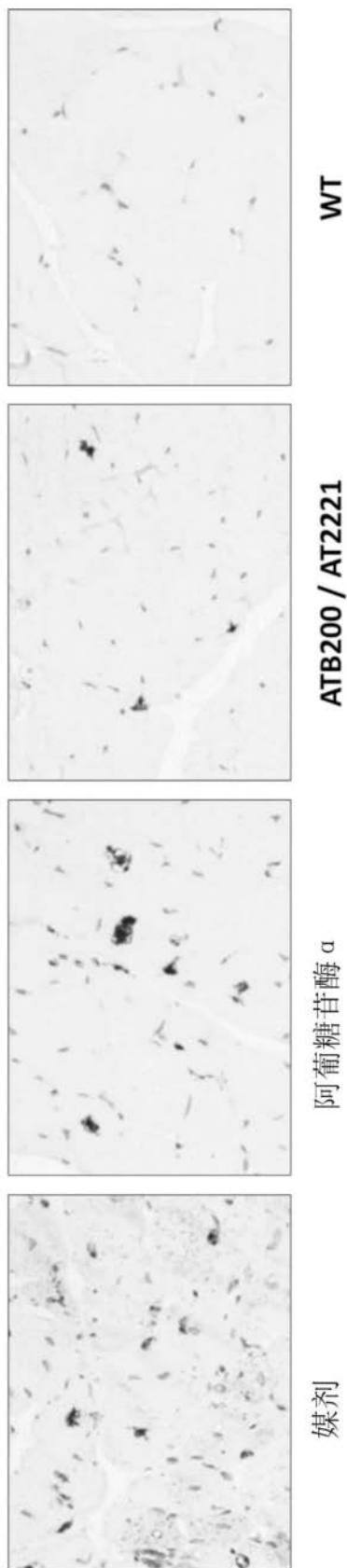


图15A

四头肌中的LC3的WB检查

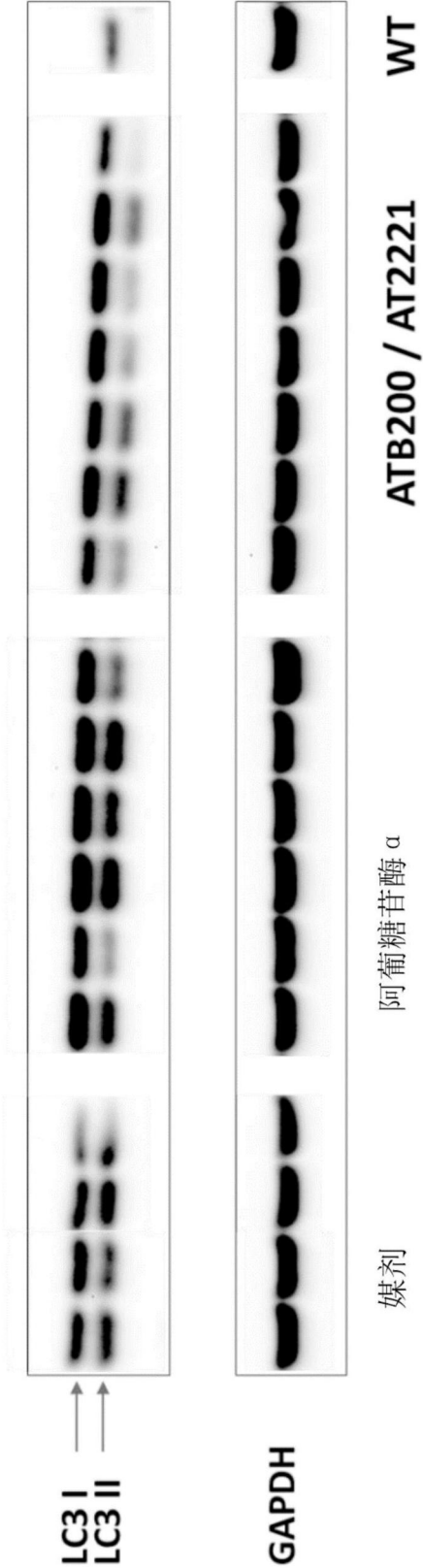


图15B

四头肌的外股肌中的Dysferlin的IHC检查

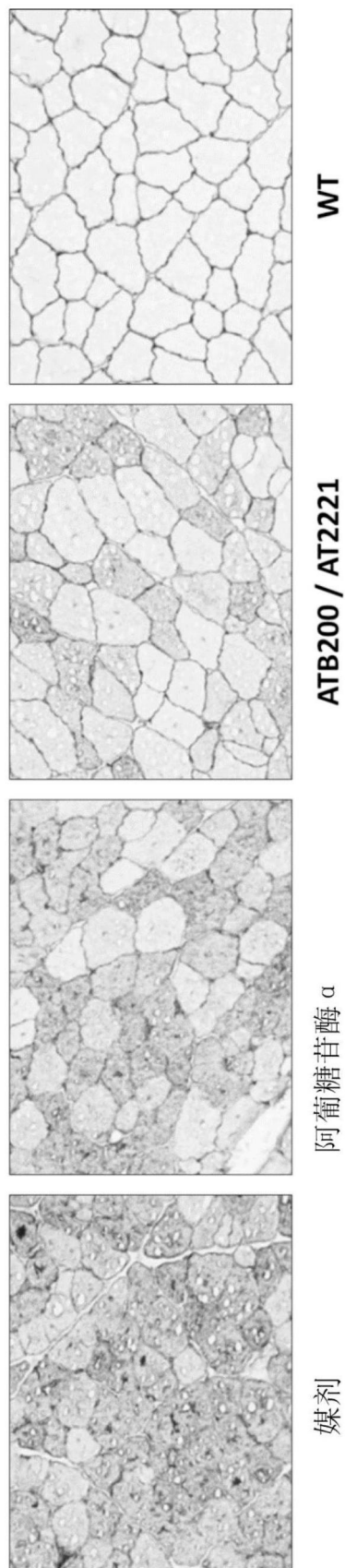


图16

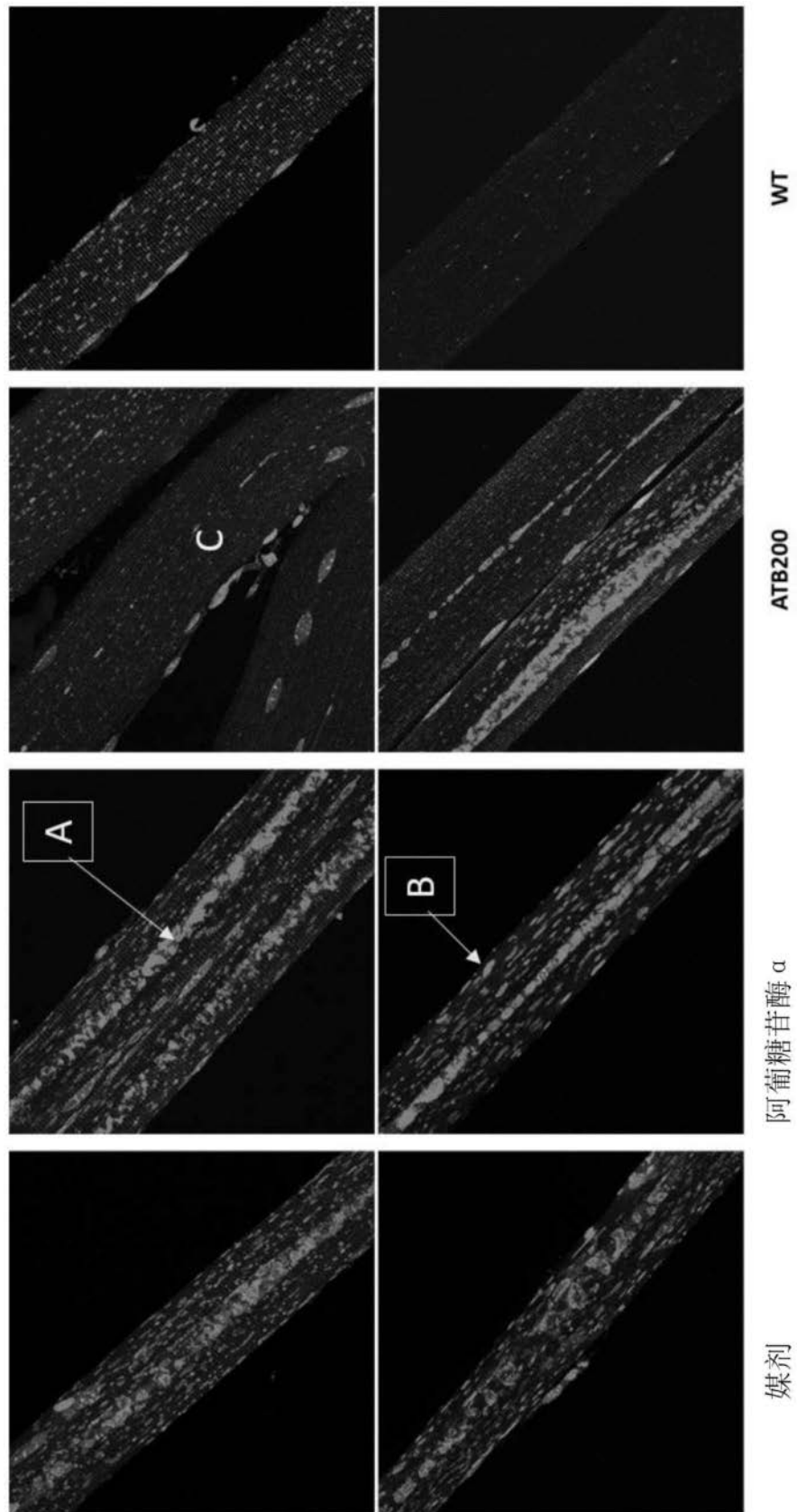


图17

AT2221导致ATB200的稳定化

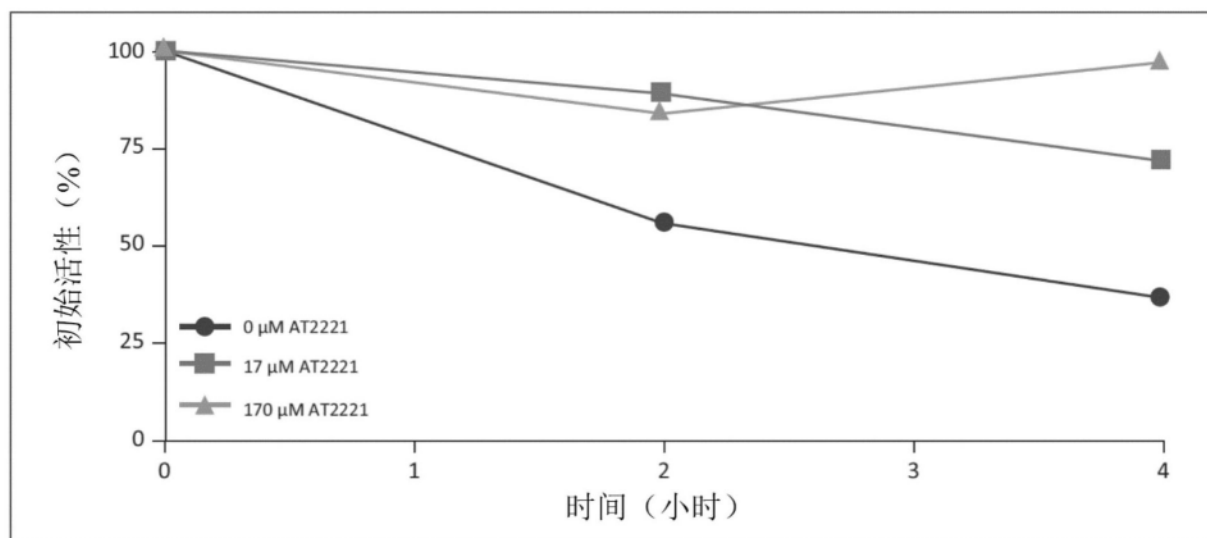
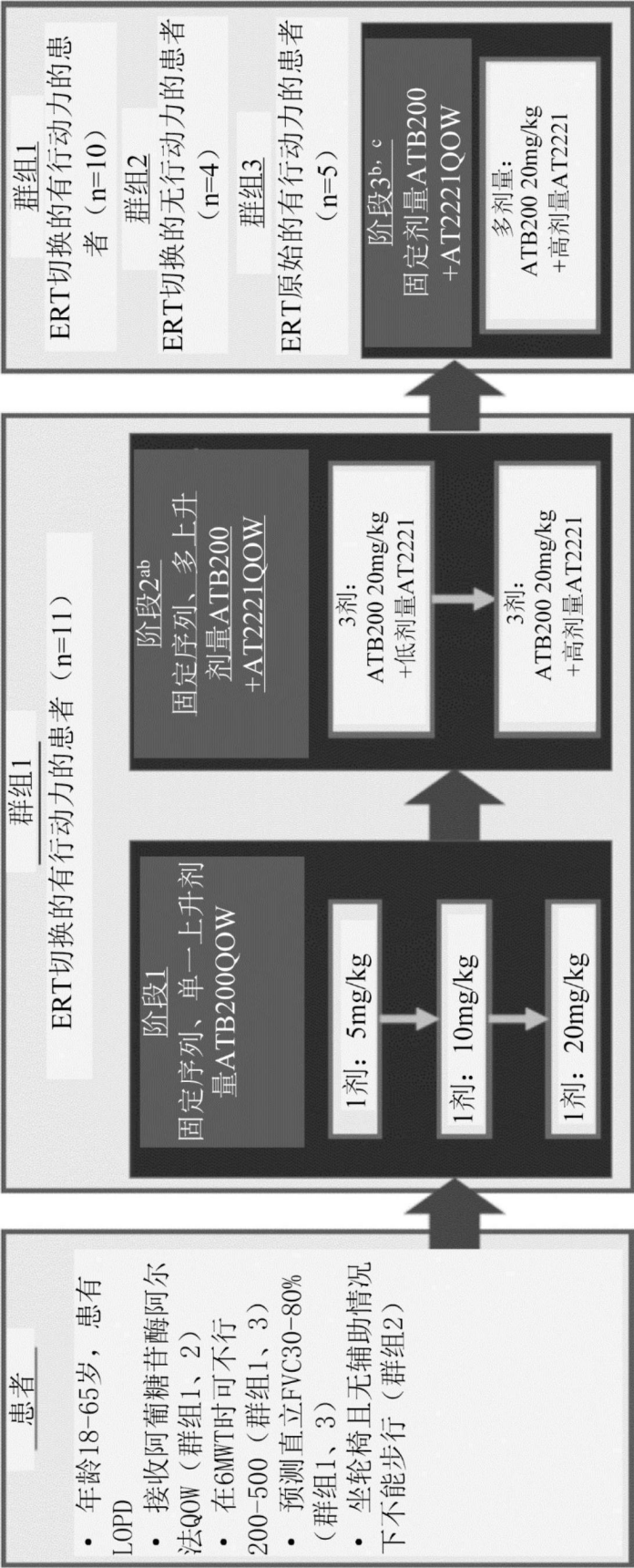


图18



6MWT=6分钟步行测试; FVC=用力肺活量; QOW=每周一次。
a在群组2及3中给药之前，在每一剂量水平下审查来自群组1的2位患者的安全数据。B在阶段2及3期间，在开始ATB200静脉内输注之前经口施用AT2221。针对所有剂量，在4小时内静脉内输注ATB200^c群组2及3中之前2位患者用作其相应群组的患者。
I. Johnson FK等人，在2017年2月13-17日第13届Annual World SymposiumTM提出；San Diego, CA, USA. Plster no LB-26 2. Roberts M等人，在2017年10月3-7日第22次世界肌肉学会国际会议提出；St. Malo, France Poster no. I.B.P.3.

图19A

81

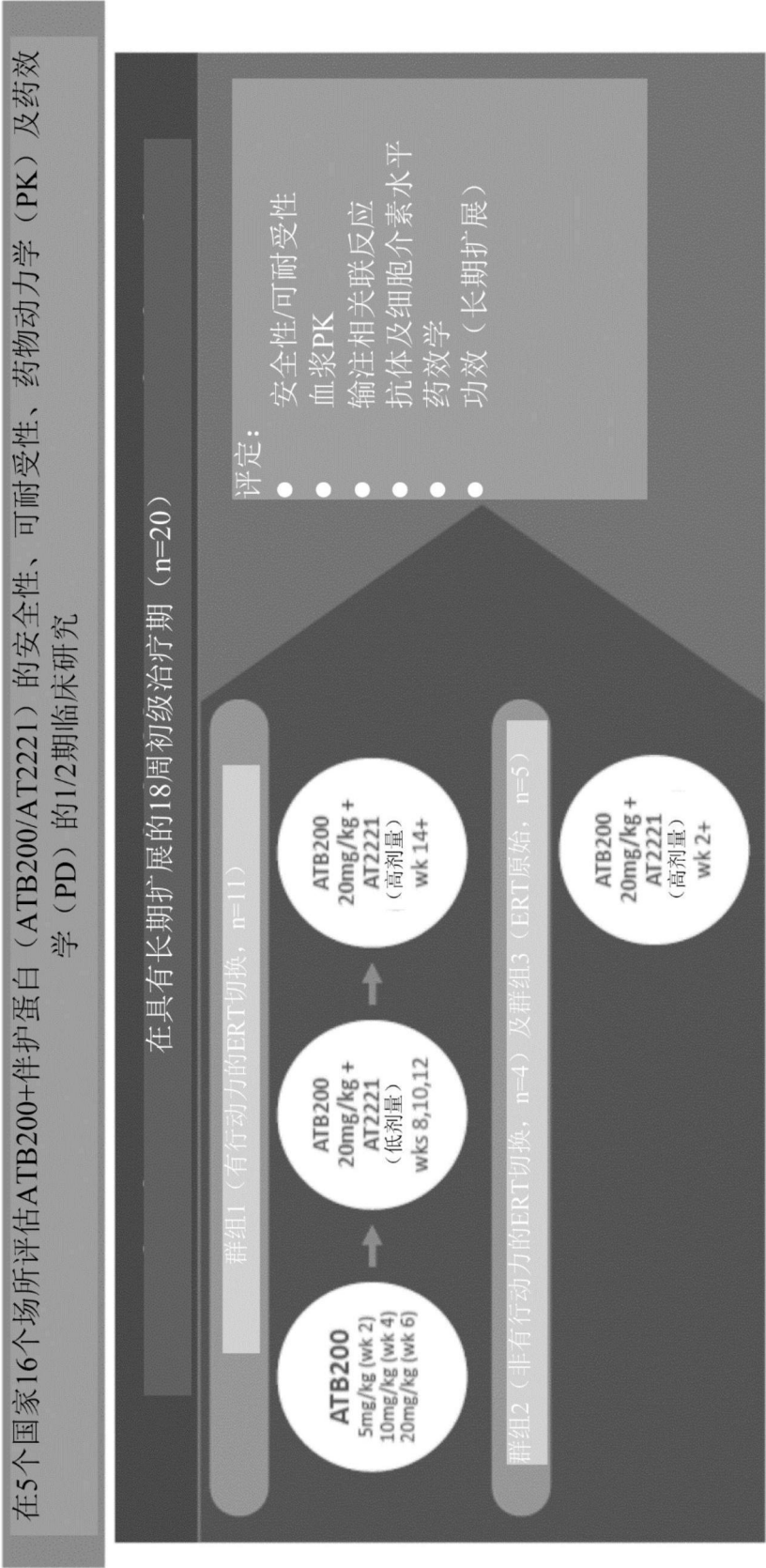


图19B

基线特性 (N=20)

跨三个群组登记的患者代表总体LOPD群体，其在基线时具有显著损伤

	群组1 ERT切换 有行动力 (N=11)	群组2 ERT切换 无行动力 (N=4)	群组3 ERT原始 (N=5)
年龄，岁，平均值 (min,max)	49.4 (28, 66)	36.0 (18, 56)	49.4 (24, 65)
性别，M; F	9:2	3:1	1:4
服用阿葡糖苷酶 α 的时间， 年，平均值 (SD)	4.8 (1.42) ^a	8.9 (3.8)	NA
6MWT，米，平均值 (SD)	392.0 (93.4)	NA	399.5 (83.5)
FVC直立，预测%，平均值 (SD)	52.3 (13.2)	NA	53.4 (20.3)

NA=不适用；SD=标准差。
^a要求群组1患者在基线已服用阿葡糖苷酶 α 达2-6年。

图19C

AT2221药物动力学概要

治疗	C _{max} (ng/mL) ^a	t _{max} (h) ^b	AUC _{0-t} (ng·h/mL) ^a	AUC _{0-∞} (ng·h/mL) ^a	t _{1/2} (h) ^c	CL/F (L/h) ^c	V _z /F (L) ^c
低剂量 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)
High Dose 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=针对AT2221经口生物可用性调整的血浆清除率；V_z/F=针对AT2221经口生物可用性调整的表现终末期体积分布。
^a几何平均值 (CV%)。^b中值 (min-max)。^c算术平均值 (CV%)。

图20

通过署名肽T09的总GAA蛋白质

群组	治疗	C _{max} (ng/mL) ^a	t _{max} (hr) ^b	AUC t _{max-24h} (ng·hr/mL) ^a	AUC _{0-∞} (ng·hr/mL) ^a	F _{rel} ^c	α t _{1/2} (hr) ^c	CL _T (L/hr) ^c
1	ATB200 5 mg/kg 单独 ^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 单独 ^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 单独 ^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 低剂量 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 高剂量 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 高剂量 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=曲线下方面积；CLT=全身清除率；C_{max}=最大药物浓度；CV=变异系数；MD=多剂量；T_{1/2}=半衰期；t_{max}=达到最大药物浓度的时间；F_{rel}=20mg/kg及10mg/kg对比5kg/kg，及20mg/kg+低剂量或高剂量AT2221对比单独20mg/kg的ATC比率。

^a几何平均值（CV%）。^b中值（min-max）。^c算术平均值（CV%）。^dn=11。^en=5。

图21

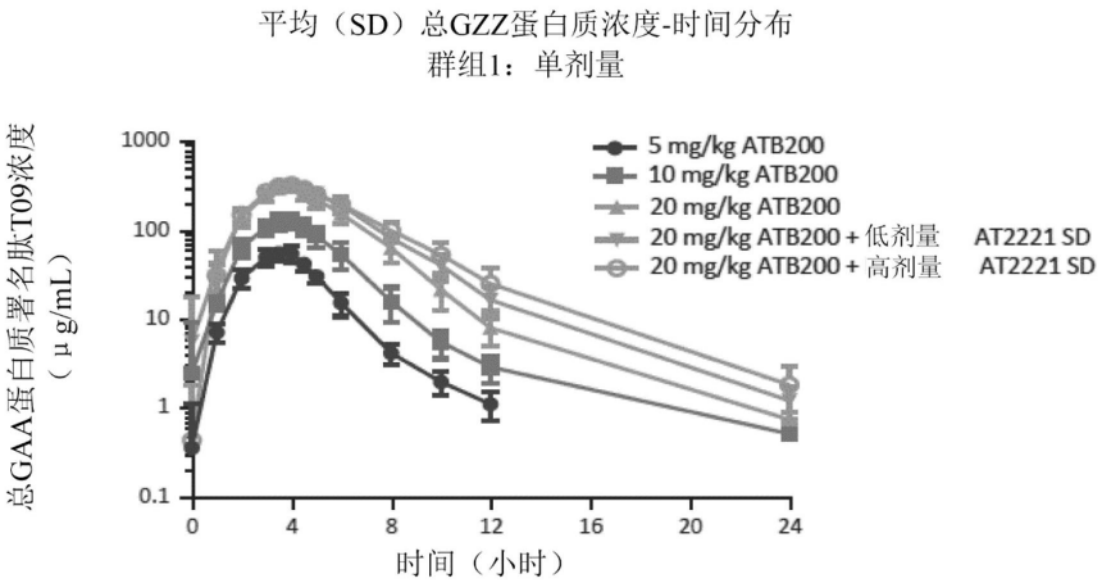


图22A

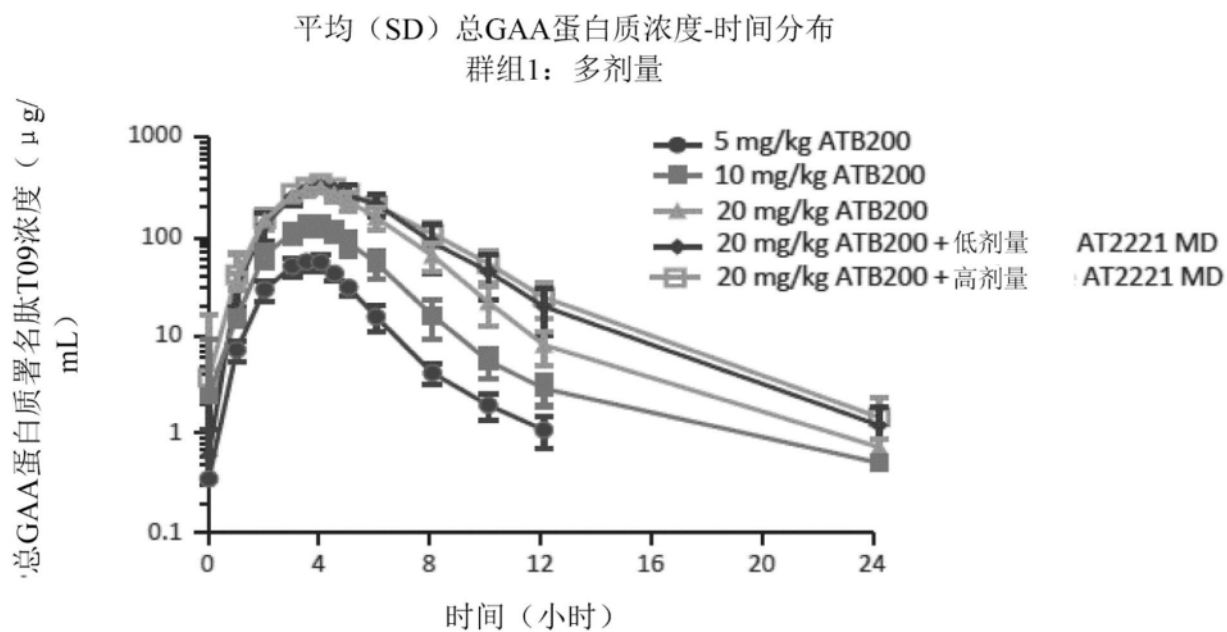


图22B

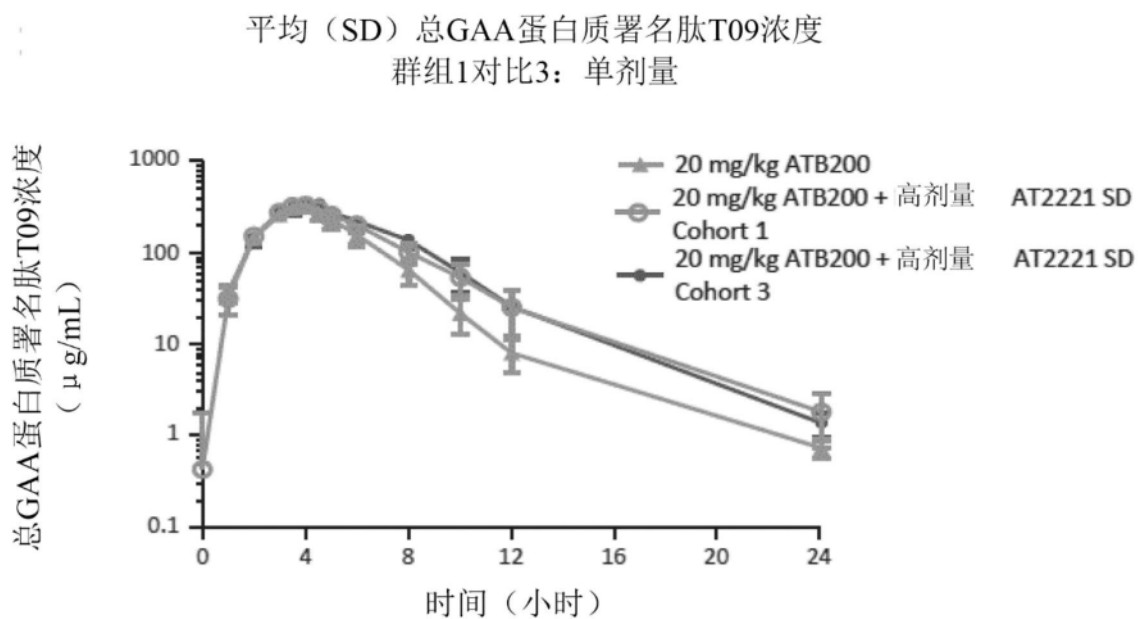


图22C

平均 (SD) 总GAA蛋白质浓度-时间分布
群组1对比3: 单剂量

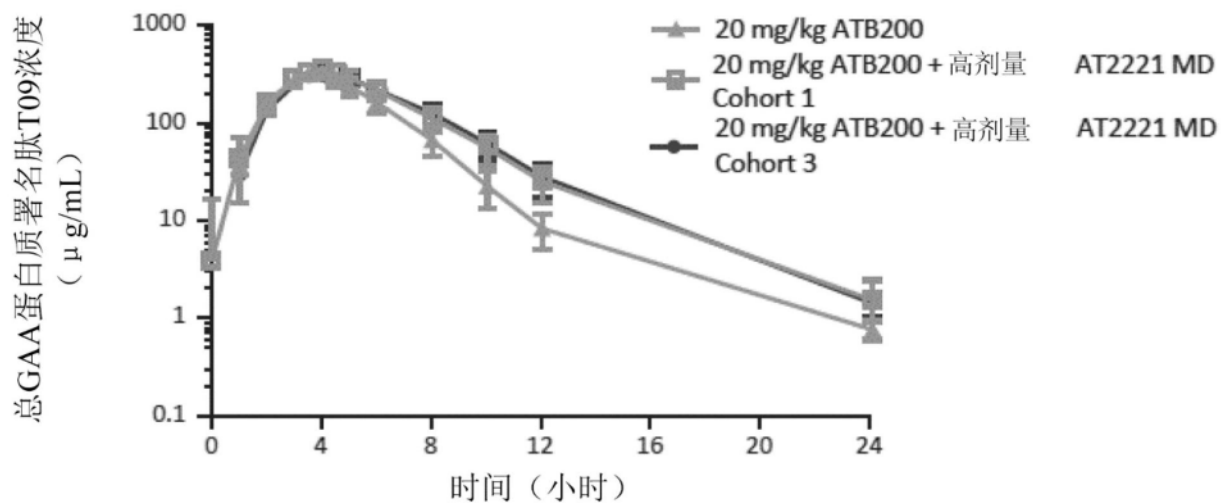


图22D

在给药后12小时与20mg/kg ATB200进行的总GAA蛋白质比较

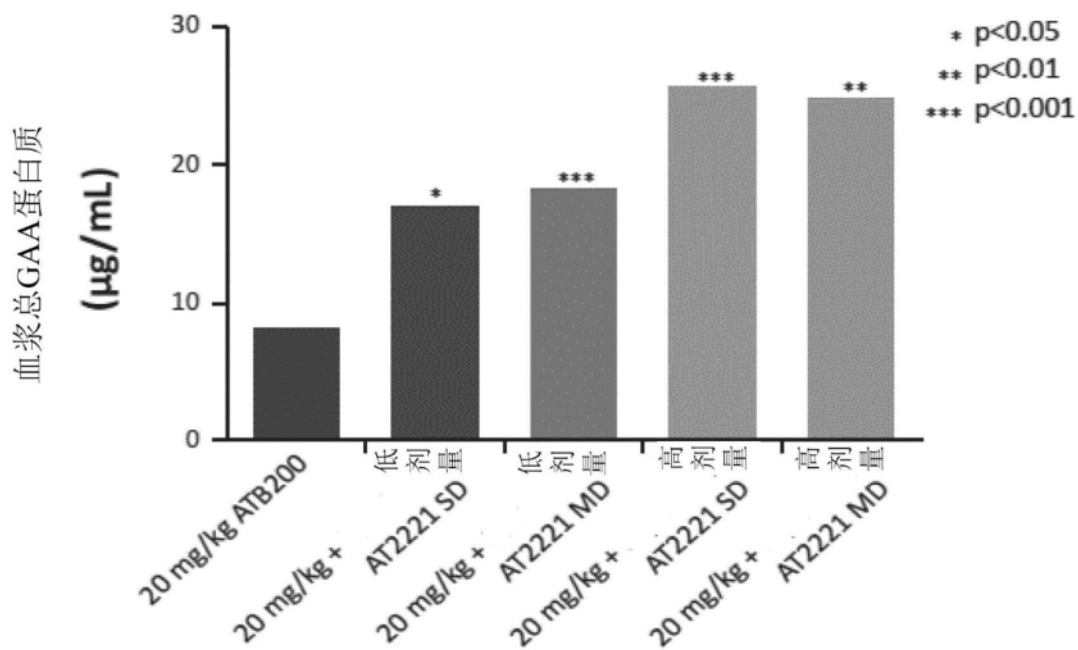


图22E

在给药后24小时与20mg/kg ATB200进行的总GAA蛋白质比较

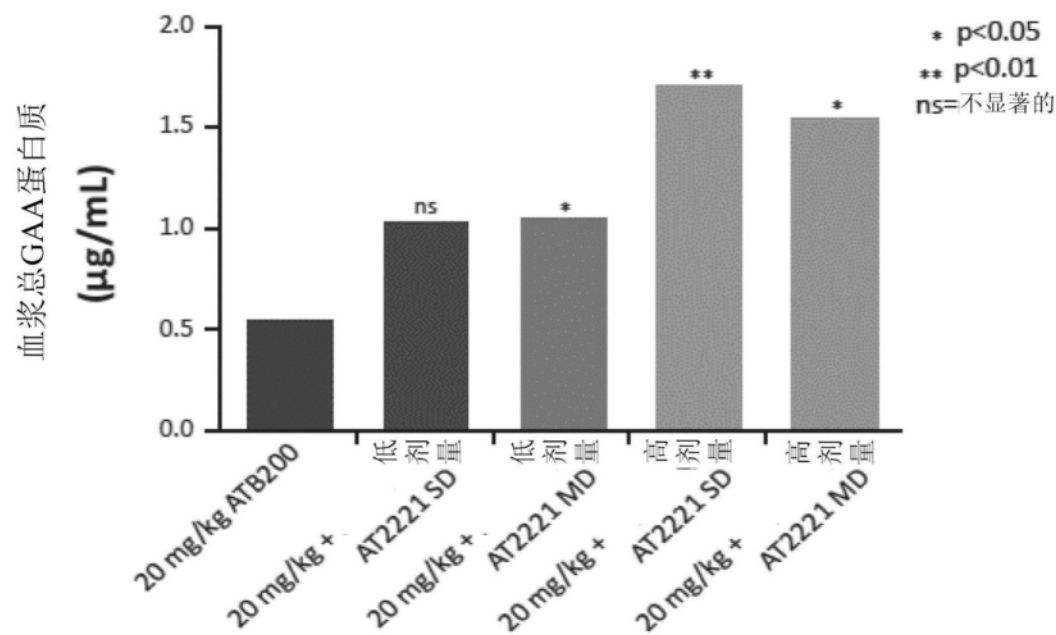


图22F

通过署名肽T09的总GAA蛋白质的ANOVA

参考	测试	AUC比率 参考%	90%下界CI	90%上界CI
Cohort 1 SD	Cohort 1 MD	98.0	94.9	101.2
Cohort 1 SD	Cohort 3 SD	100.1	82.3	121.8
Cohort 1 MD	Cohort 3 MD	97.5	80.2	118.6

AUC=曲线下方面积；CI=信赖区间。

图23

6分钟步行测试

在第6个月两个ERT切换有行动力的患者及ERT原始患者的6MWT改良并且直至第12个月观察到持续益处

6分钟步行测试（m）；平均值（SD）

群组1 ERT切换 有行动力	基线 (n=10)	CFBL M6 (n=10)	CFBL M9 (n=10)	CFBL M12 (n=8)
	397.2 (96.8)	+23.9 (52.2)	+24.5 (40.8)	+57.4 (34.4)
群组3 ERT原始	基线 (n=5)	CFBL M6 (n=5)	CFBL M9 (n=5)	CFBL M12 (n=2)
	399.5 (83.5)	+41.8 (29.4)	+63.5 (23.1)	+86.8 (11.1)

- 分别在第6个月、第9个月及第12个月7/10、8/10及8/8的ERT切换患者的6MWT增加
- 分别在第6个月、第9个月及第12个月5/5、5/5及2/2的ERT原始患者的6MWT增加

图24A

患者	基线	自基线的变化		
		第6月	第9月	第12月
群组1 有行动力的ERT切换				
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	—
平均值 (SD)	397.2 (96.8)	+23.9 (52.2)	+24.5 (40.8)	+57.4 (34.4)
群组3 ERT原始				
1	480	+41	+72	+95
2	384	+62	+78	+79
3	460	+79	+89	—
4	406	+14	+44	—
5	267	+13	+35	—
平均值 (SD)	399.5 (83.5)	+41.8 (29.4)	+63.5 (23.1)	+86.8 (11.1)

图24B

其他运动功能测试

	评定, sec	基线, 平均值 (SD)	自基线至第6个月的变化, 平均值 (SD)	自基线至第9个月的变化, 平均值 (SD)	自基线至第12个月的变化, 平均值 (SD)
群组1 ERT切换		n=10	n=10	n=10	n=8
计时起立行走		10.5 (6.6)	-1.8 (3.5)	-1.2 (3.3)	-1.0 (2.2)
4层楼梯攀爬		4.1 (2.7)	-0.6 (1.6)	-0.4 (1.6)	-1.0 (1.5)
10M步行		7.4 (3.0)	+0.1 (1.9)	-0.1 (1.6)	-0.5 (1.7)
Gowers ^a		7.9 (2.9)	-1.1 (3.8)	4.5 ^b (13.4)	-2.6 (1.9)
GSGC记分		12.6 (4.8)	+0.1 (3.9)	+0.5 (4.6)	-1.9 (2.2)
群组3 ERT原始		n=5	n=5	n=5	n=2
计时起立行走		9.4 (2.9)	-1.0 (1.1)	-0.6 (1.4)	-1.8 (0.5)
4层楼梯攀爬		4.2 (1.5)	-0.6 (0.3)	0.0 (1.5)	-0.4 (0.4)
10M步行		7.9 (3.0)	-0.7 (1.1)	-1.3 (1.0)	-0.6 (0.0)
Gowers		13.9 (11.0)	7.9 ^c (20.9)	-1.6 (3.9)	-2.1 (1.3)
GSGC记分		12.2 (3.6)	-1.8 (3.8)	-2.4 (3.4)	0.0 (1.4)

GSGC=步态, 楼梯, Gowers, 椅子。

GSGC为以下4种运动功能评定的观察者分级组合记分: 步态 (10m步行)、4层楼梯攀爬、Gowers氏 (自地板站起) 及自椅子坐起。

每一测试自1 (正常) 至7 (无法执行, 针对自椅子坐起的最大记分为6) 记分。总记分范围为4至27。

^aN=9, 由于患者拒绝执行测试而未获得缺失值。

^b自基线的中值变化为-1.5, 且7/9的患者具有减少量。

^c自基线的中值变化为-0.8, 且4/5的患者具有减少量。

图24C

群组2患者中的肌肉强度测试（QMT）

	所测试的肌群	基线，平均值 (SD) n=4	自基线至第6个月 的变化， 平均值 (SD) n=4	自基线至第9个月 的变化， 平均值 (SD) n=4
定量肌肉测试-测力计，力的磅数	肩膀内收 ^a	5.7 (8.8)	+8.1 (12.8)	+9.6 (12.3)
	肩膀外展	16.7 (18.1)	+1.0 (6.6)	+0.5 (9.3)
	肘屈曲	12.7 (13.7)	+2.4 (15.9)	+6.0 (19.3)
	肘伸展	12.3 (13.9)	+5.5 (4.7)	+7.5 (8.2)
徒手肌肉测试 徒手记分 ^b	肩膀内收 ^a	5.7 (8.8)	+8.1 (12.8)	+9.6 (12.3)
	肩膀外展	16.7 (18.1)	+1.0 (6.6)	+0.5 (9.3)
	肘屈曲	12.7 (13.7)	+2.4 (15.9)	+6.0 (19.3)
	肘伸展	12.3 (13.9)	+5.5 (4.7)	+7.5 (8.2)

度量值为右侧及左侧组合的力的磅数。
^a对1位患者不可获得肩膀内收。
^b记分：（1）可见肌肉移动，但在关节处无移动；（2）在关节处移动，但不对抗重力；（3）对抗重力的移动，但不对抗附加的阻力；（4）对抗阻力的移动，但不及正常状态；（5）正常强度。

图25

群组1中的徒手肌肉测试记分：ERT切换的有行动力的患者

在第6个月、第9个月及第12个月时在ERT切换患者中观察到徒手肌肉强度的增加

	身体区域	基线		自基线的变化					
		平均值 (SD)	n	第6月		第9月		第12月	
				平均值 (SD)	n	平均值 (SD)	n	平均值 (SD)	n
群组1ERT切换有行动力	上身 最大记分40	35.4 (5.7)	10	+1.2 (2.4)	10	+1.7 (2.8)	10	+2.0 (3.9)	8
	下身 最大记分40	31.0 (3.0)	10	+0.9 (1.8)	9	+2.2 (2.4)	10	+2.3 (2.9)	8
	全身 最大记分80	66.4 (8.1)	10	+2.8 (3.4)	10	+4.0 (3.1)	10	+4.5 (2.8)	8

图26A

群组2中的徒手肌肉测试记分：ERT切换的无行动力的患者

在第6个月及第9个月时在ERT切换的无行动力的患者中观察到徒手肌肉强度的增加

	身体区域	基线		自基线的变化			
				第6月		第9月	
		平均值 (SD)	n	平均值 (SD)	n	平均值 (SD)	n
群组2 ERT切换无行动力	上身 最大记分40	13.3 (12.2)	3	+5.7 (2.1)	3	+2.3 (5.5)	3

图26B

群组3中的徒手肌肉测试记分：ERT原始患者

在第6个月、第9个月及第12个月时在ERT原始患者中观察到徒手肌肉强度的增加

	身体区域	基线		自基线的变化					
				第6月		第9月		第12月	
		平均值 (SD)	n	平均值 (SD)	n	平均值 (SD)	n	平均值 (SD)	n
群组3 ERT原始	上身 最大记分40	36.8 (3.4)	5	-0.2 (1.3)	5	+0.8 (1.9)	5	-0.5 (0.7)	2
	下身 最大记分40	29.0 (2.0)	4	+0.5 (1.9)	4	+1.3 (3.6)	4	+4.5 (0.7)	2
	全身 最大记分80	66.9 (3.7)	5	-0.7 (3.2)	5	+1.3 (3.1)	5	+4.0 (1.4)	2

图26C

肺功能测试：FVC、MIP、MEP

	评定	基线，平均值 (SD)	自基线至第6个月 的变化，平均值 (SD)	自基线至第9个月 的变化，平均值 (SD)	自基线至第12个 月的变化，平均 值 (SD)
群组1 ERT切换		n=9	n=9	n=9	n=7
	FVC，预测% ^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)
群组3 ERT原始		n=5	n=5	n=5	n=2
	FVC，预测%	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=最大呼气压；MIP=最大吸气压。

^a对1位患者未获得FVC。

MIP及MEP是以厘米水柱数测量

图27

疲劳严重程度量表

	基线，平均值 (SD)	自基线至第6个月 的变化，平均值 (SD)	自基线至第9个月 的变化，平均值 (SD)	自基线至第12个 月的变化，平均 值 (SD)
群组1 有行动力的ERT切换	n=10	n=10	n=10	n=8
	53.5 (7.7)	-8.0 (10.7)	-6.8 (6.8)	-7.8 (6.0)
群组2 无行动力的ERT切换	n=4	n=2	n=2	—
	54.0 (8.5)	-3.5 (7.8)	-6.5 (5.0)	—
群组3 ERT原始	n=5	n=5	n=5	n=2
	39.2 (12.7)	-5.2 (11.7)	-7.8 (7.5)	-1.5 (2.1)

疲劳严重程度量表由九个问题组成，每一问题在1至7的量表上记分。总记分范围为9至63，其中较高值表示由于疾病病状导致的较高疲劳程度。健康群体中的正常值为月21。⁵

图28

在群组1患者中，在肌肉破坏的标志物中自基线的平均变化百分比

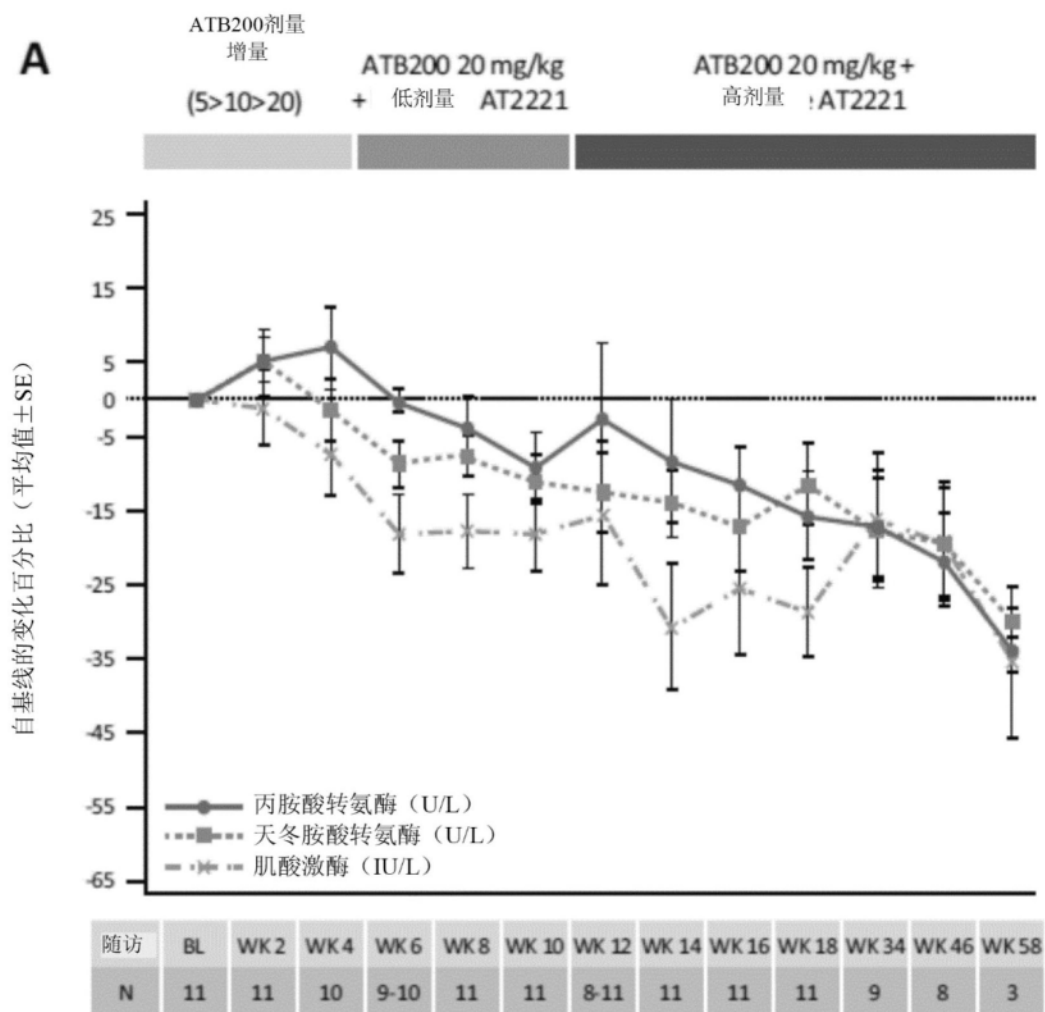


图29A

在群组2患者中，在肌肉破坏的标志物中自基线的平均变化百分比

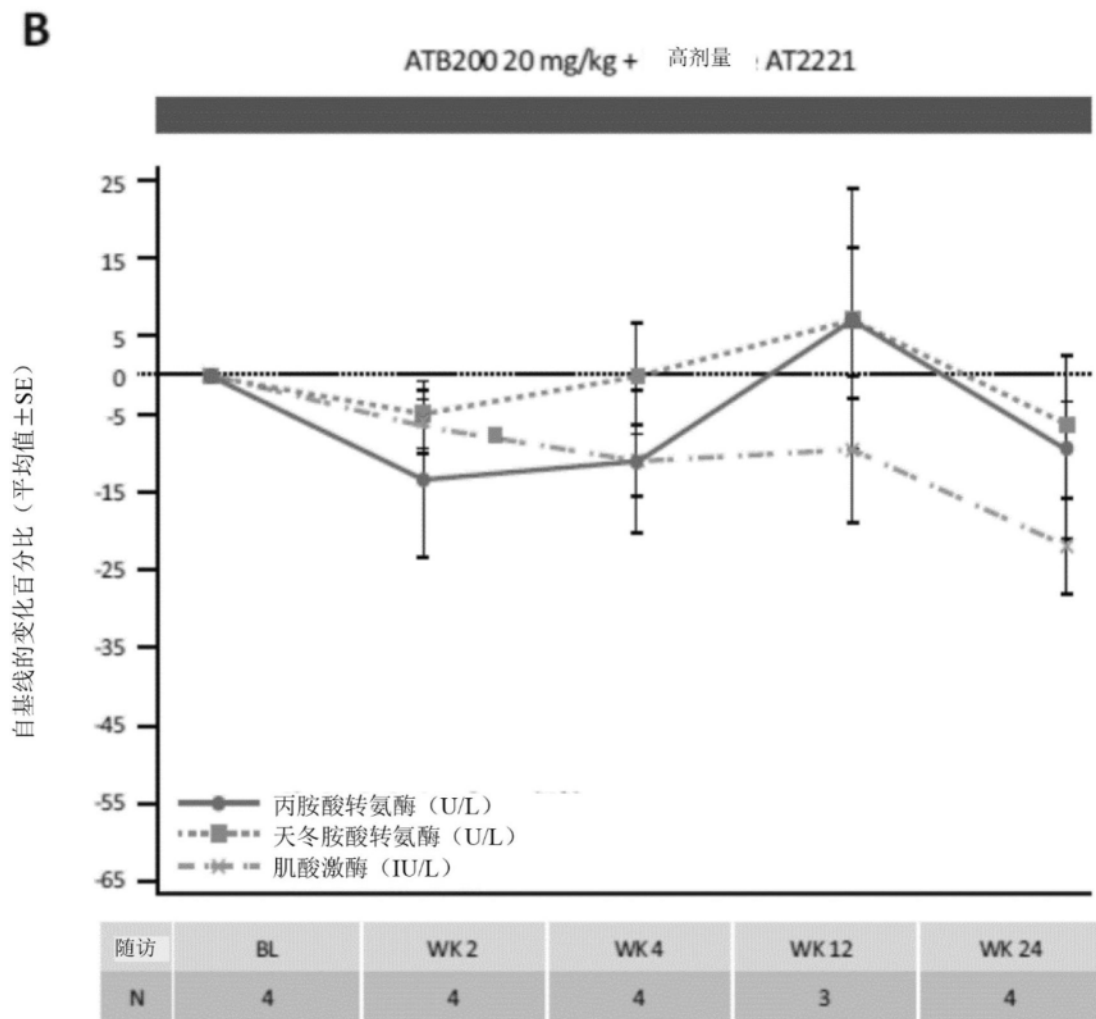


图29B

在群组3患者中，在肌肉破换的标志物中自基线的平均变化百分比

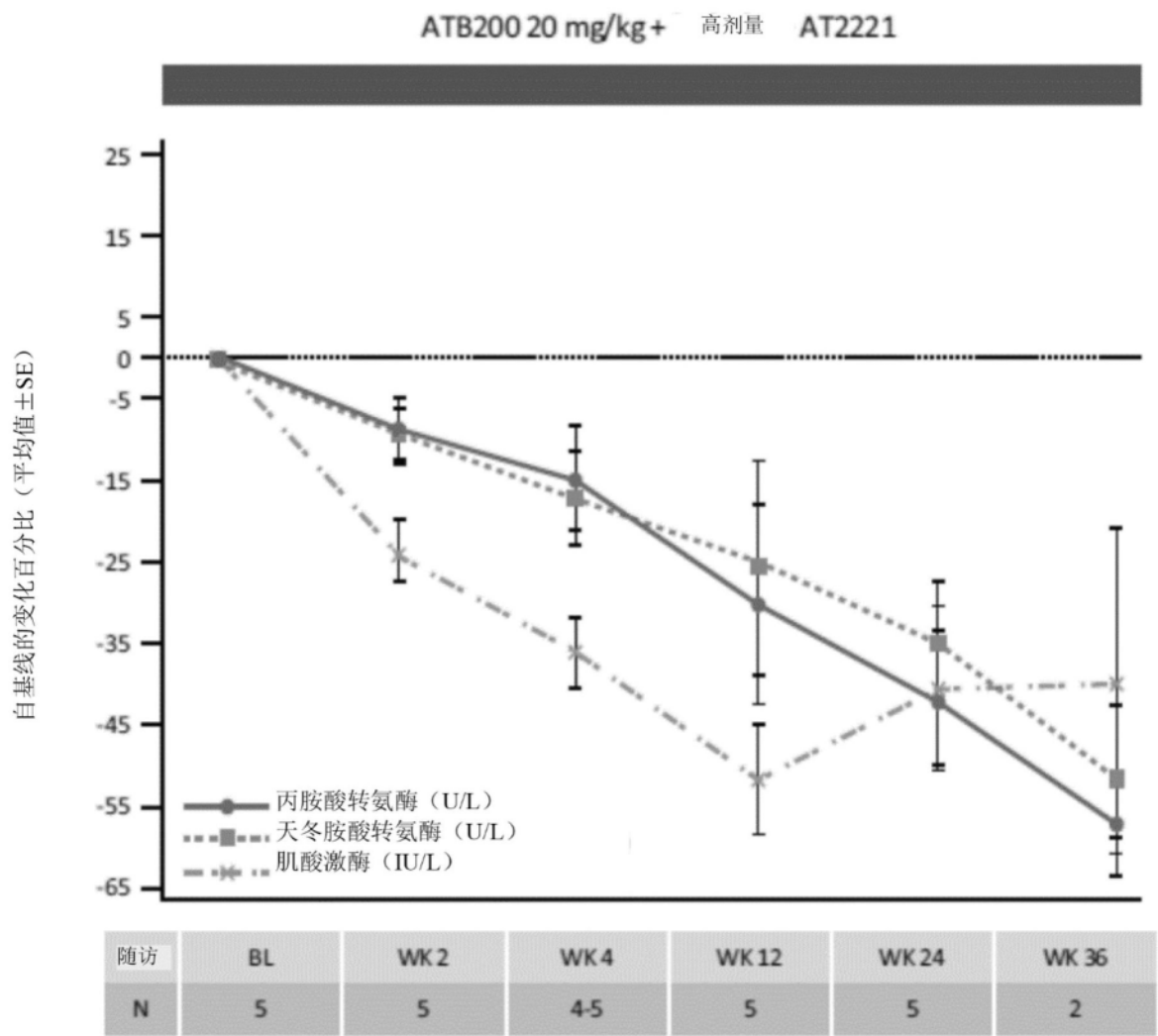


图29C

在 (A) 肌肉破坏的标志物 (肌酸激酶) 及 (B) 肝糖累积的标志物 (Hex4) 中自基线的平均变化百分比

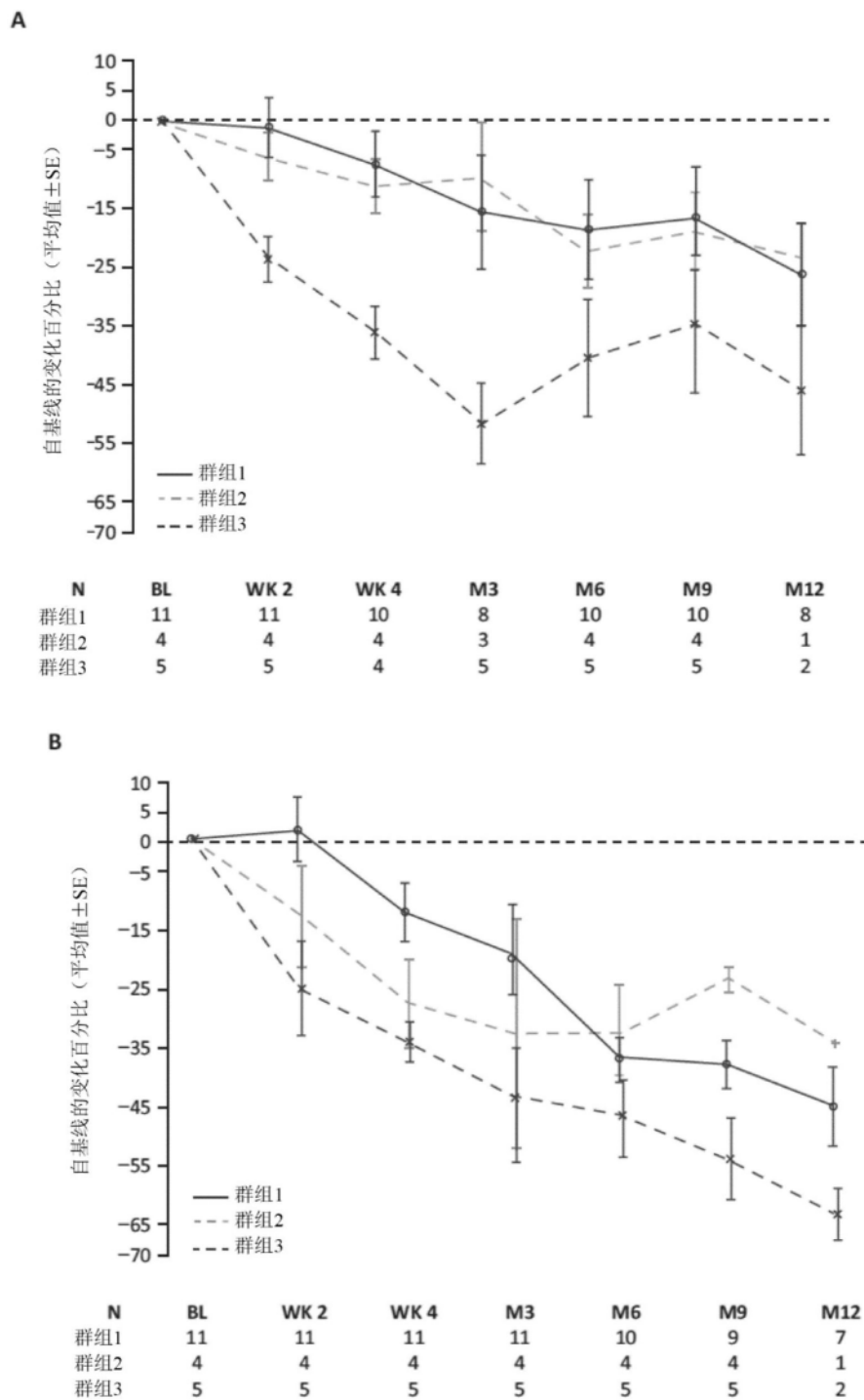


图29D

安全性概要(N=20)^a

ATB200/AT2221的安全性数据显示跨于所有群组，在550+总输注之后，AE已大体上为轻度及短暂的，并具有极低速率的IAR (<1%)

■ AE大体上为轻度及短暂的

— 最常见的治疗紧急AE为腹痛^b (8/20)、腹泻 (8/20)、鼻咽炎 (6/20)、恶心 (5/20)、头痛 (5/20) 及上呼吸道感染 (5/20)

■ 550+输注中发生3次IAR，它是通过标准预用药来控制

— 在无行动力的ERT切换患者中的1次IAR事件 (皮肤脱色)

— 在ERT原始患者中的3次IAR事件 (局部瘙痒；红斑及烧灼感)

■ 治疗的最长持续时间为20+个月

AE，不利事件；IAR，输注相关反应。

^a通过期中资料分析报告 (最多20+个月)。

^b包括上腹痛及下腹痛。

图30

结论

■ 肌肉功能

-在ERT切换的有行动力的患者及ERT原始患者中6MWT距离持续改良直至第12个月

-其他运动功能测试与两个群组中的6MWT结果一致

-在所有群组中在徒手肌肉强度方面观察到增加

-在第6个月及第9个月，在无行动力的ERT切换患者中肘及肩膀肌肉强度增加

■ 肺功能

-FVC、MIP及MEP在ERT切换患者中为大体上稳定的

-FVC、MIP及MEP在ERT原始患者中为大体上增加

■ 疲劳严重程度量表

-在所有群组中观察到疲劳记分的改良

■ 生物标志物及安全性

-在所有群组中CK及Hex4水平减少

-ATB200/AT2221大体上为良好耐受的

图31

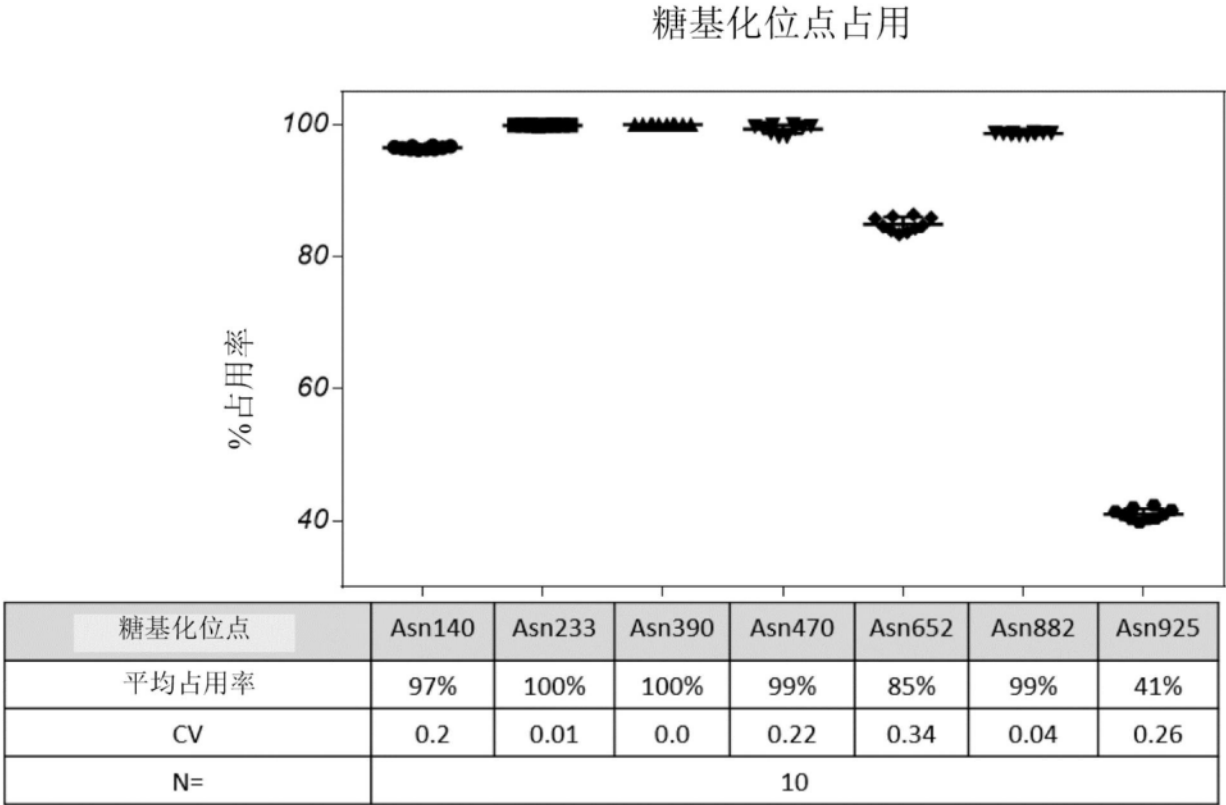


图32A

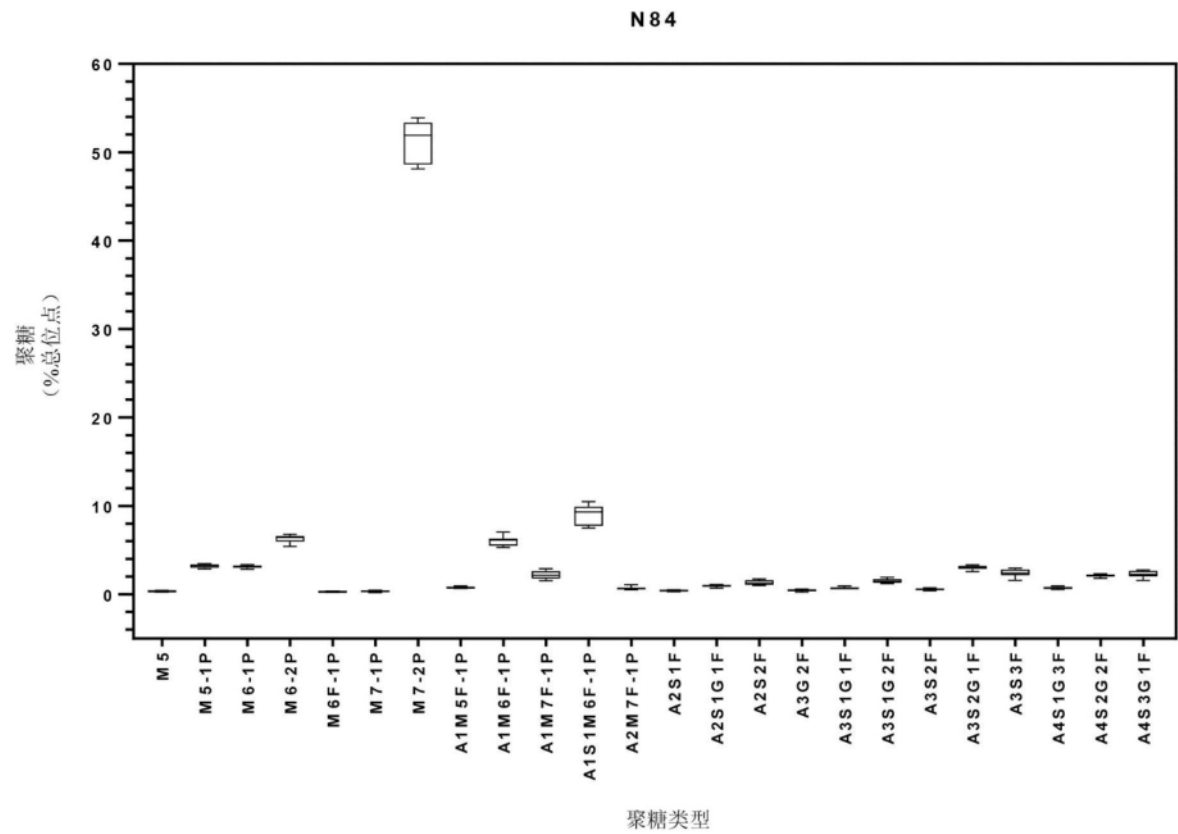


图32B

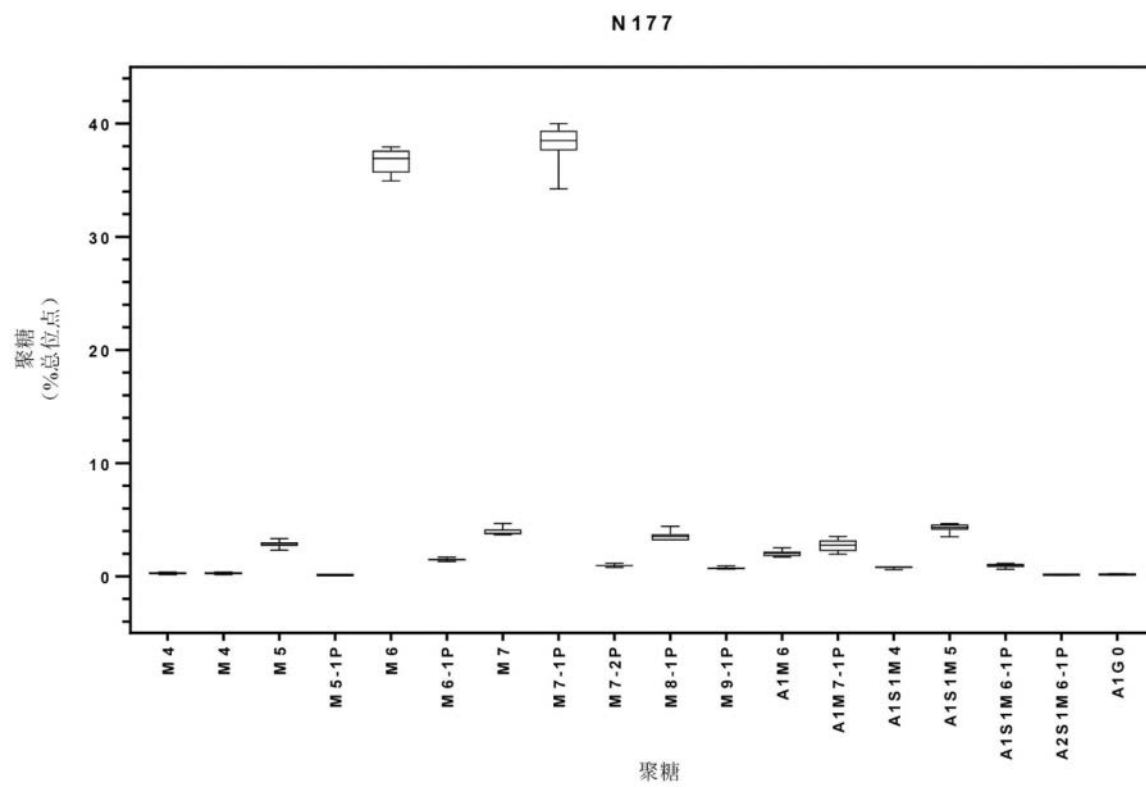


图32C

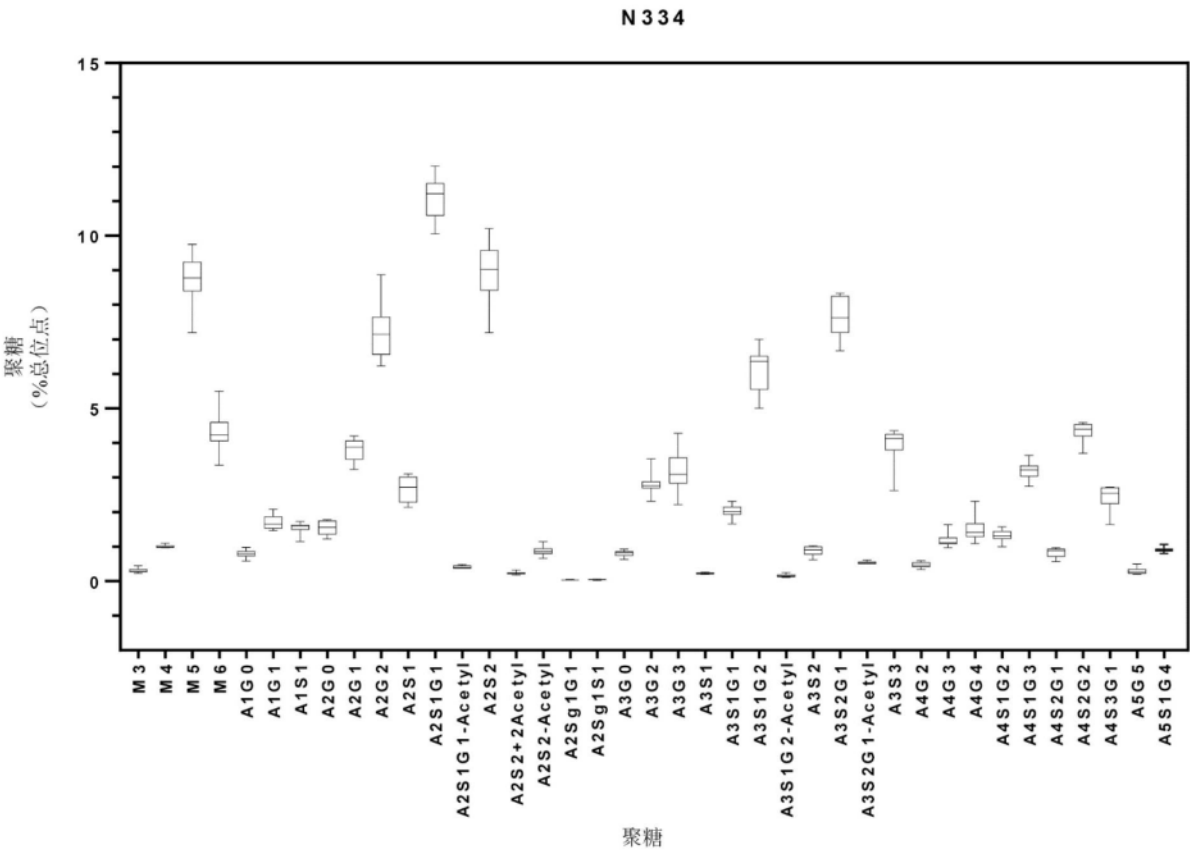


图32D

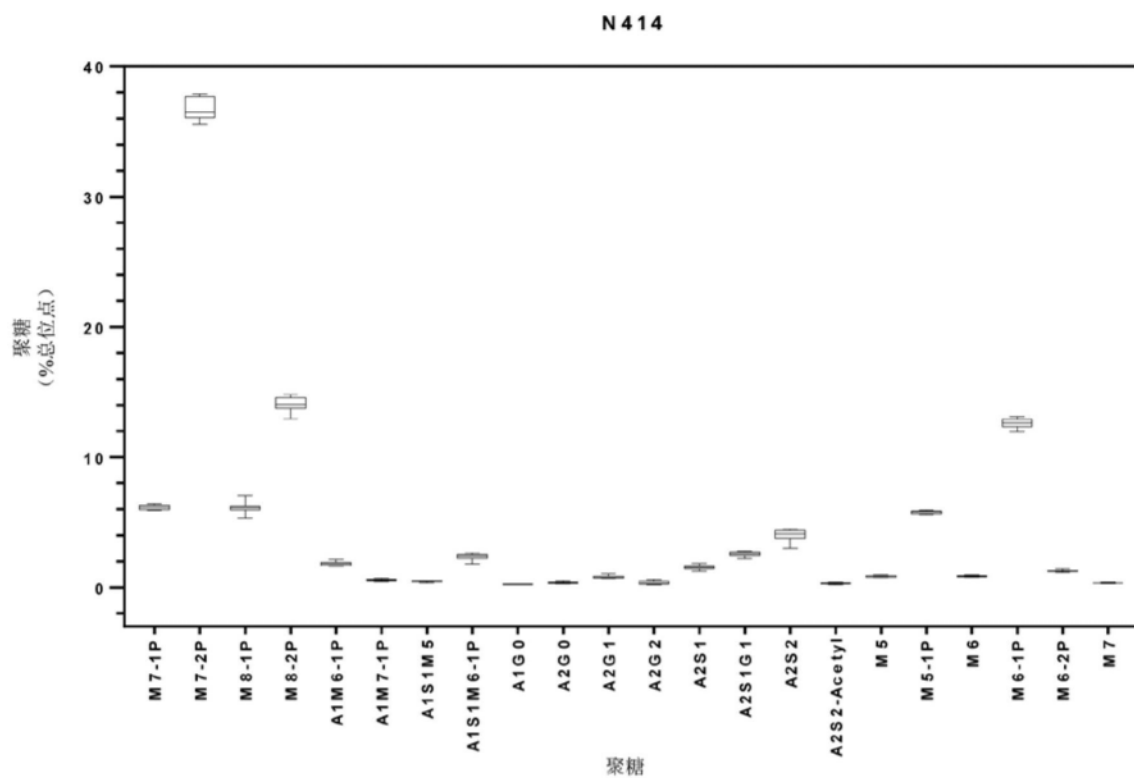


图32E

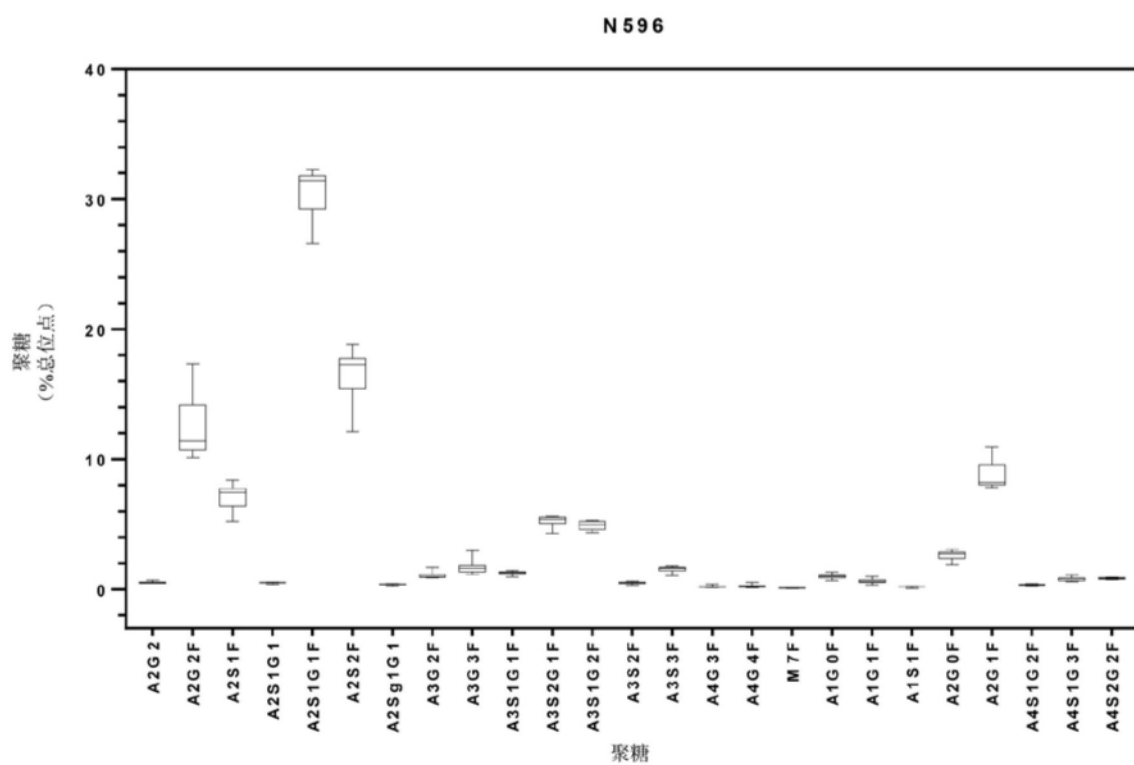


图32F

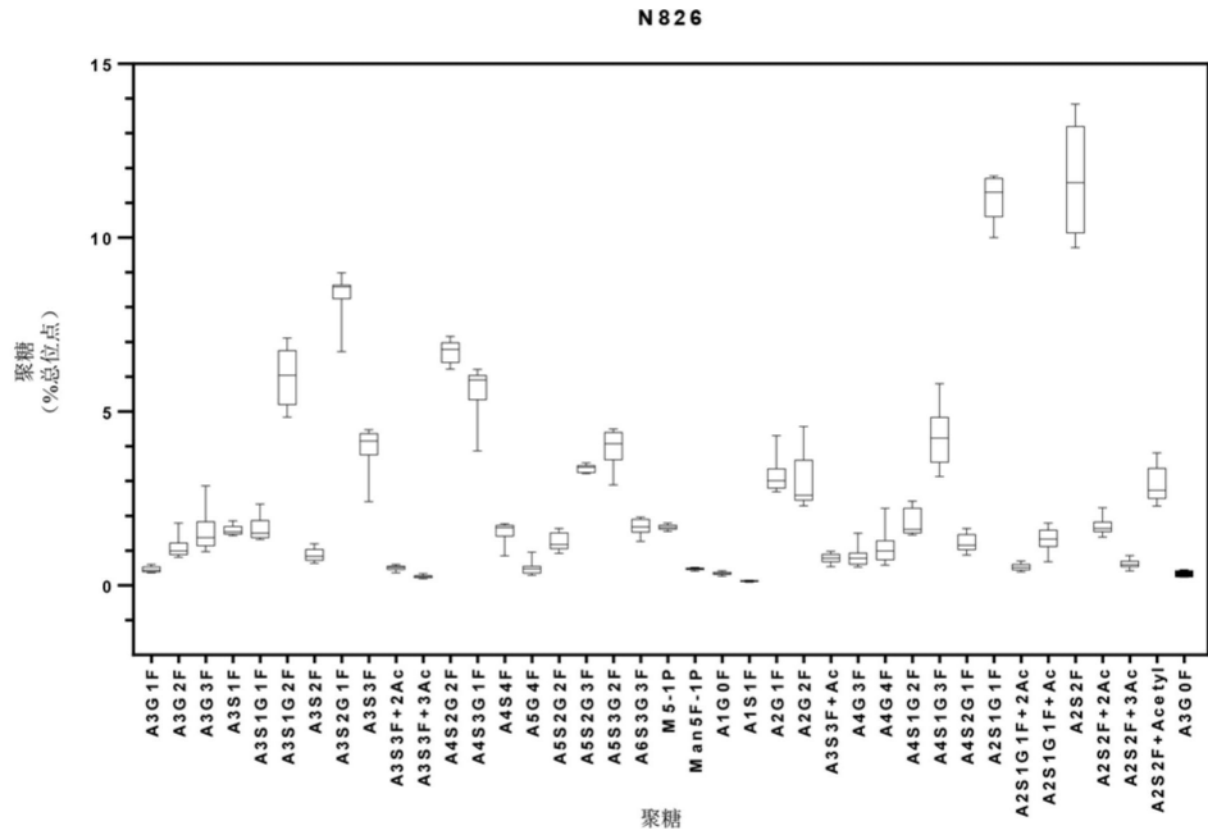


图32G

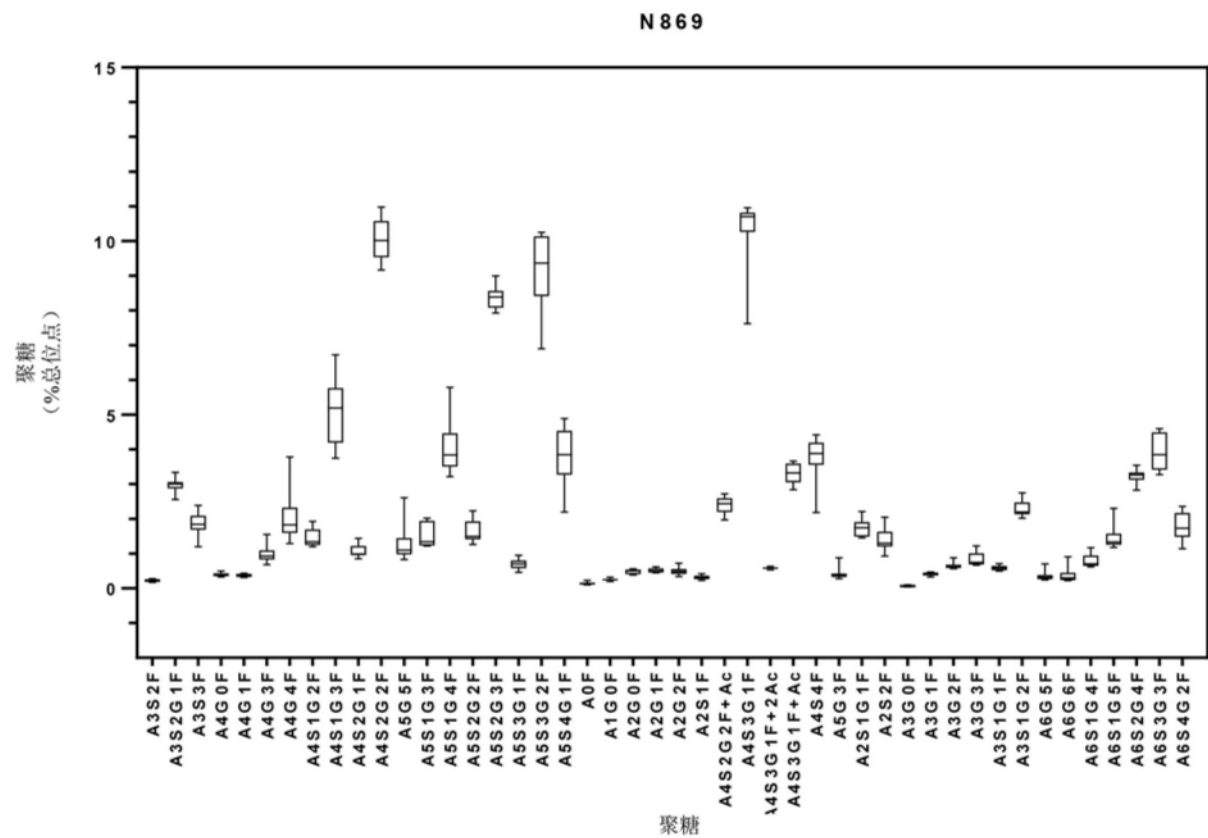


图32H

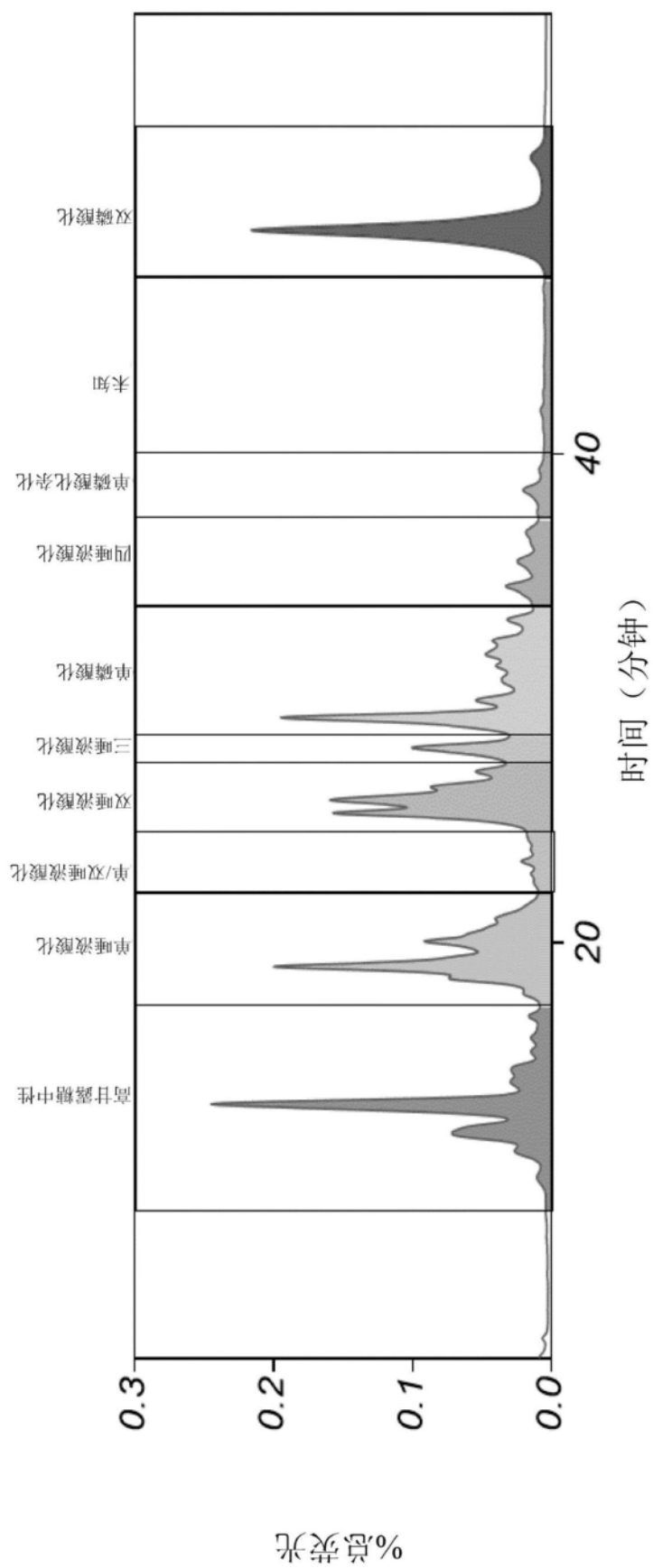


图33A

位点特异性聚糖总结							
	N84	N177	N334	N414	N596	N826	N869
	平均标准差	平均标准差	平均标准差	平均标准差	平均标准差	平均标准差	平均标准差
磷酸化聚糖	83.2%	5.4%	ND	87.4%	ND	2.1%	ND
	单磷酸化	25.6%	2.8%	35.3%	ND	2.1%	ND
	双磷酸化	57.6%	2.6%	52.0%	ND	ND	ND
唾液酸化聚糖	25.0%	3.3%	54.6%	11.2%	70.4%	85.4%	86.7%
	完全唾液酸化	13.7%	2.0%	19.3%	8.6%	26.0%	7.6%
							1.4%
高甘露糖	64.9%	3.1%	14.4%	84.7%	0.1%	2.1%	ND
	混合	18.7%	2.3%	ND	5.2%	ND	ND
	复合	16.4%	2.4%	85.6%	10.1%	99.9%	100.0%
聚糖数量	24	17	39	22	25	39	46
M6P (mol/mol位点)	1.36	0.50		1.38		0.02	
	单聚糖 (mol/mol位点)	0.25	0.48	0.35		0.02	
	双聚糖 (mol/mol位点)	0.56	0.01		0.52		
唾液酸 (mol/mol位点)	0.32	0.06	0.97	0.074	0.86	4.2	0.86
							0.07
位点占用率	96.5%	99.9%	100.0%	99.3%	84.9%	98.6%	41.0%
	0.2%	0.0%	0.0%	0.7%	1.1%	0.1%	0.8%
	未检测到						

图33B