

ROYAUME DU MAROC

OFFICE MAROCAIN DE LA PROPRIETE (19)
INDUSTRIELLE ET COMMERCIALE



المملكة المغربية

المكتب المغربي
للملكية الصناعية والتجارية

(12) FASCICULE DE BREVET

(11) N° de publication : **MA 35125 B1** (51) Cl. internationale : **C12N 9/24; A61K 38/47**
(43) Date de publication : **02.05.2014**

(21) N° Dépôt : **36431**

(22) Date de Dépôt : **14.11.2013**

(30) Données de Priorité : **22.04.2011 US 61/478,336**

(86) Données relatives à l'entrée en phase nationale selon le PCT : **PCT/US2012/034479 20.04.2012**

(71) Demandeur(s) : **GENZYME CORPORATION, 500 Kendall Street Cambridge, MA 02142 (US)**

(72) Inventeur(s) : **CANFIELD, William, M. ; MORELAND, Rodney, J. ; KUDO, Mariko**

(74) Mandataire : **ABU-GHAZALEH INTELLECTUAL PROPERTY (TMP AGENTS)**

(54) Titre : **ALPHA GLUCOSIDASE ACIDE MODIFIEE A TRAITEMENT ACCELERE**

(57) Abrégé : L'invention concerne un polypeptide d'alpha-glucosidase acide humaine modifiée à hydrophobicité améliorée en position 201 de la SEQ No: 1, ainsi que des procédés de préparation et d'utilisation de l'alpha-glucosidase acide humaine modifiée dans le traitement de troubles de stockage glycogène.

- أ -

(جلوكوسيداز ألفا حمضي معدل بمعالجة متسارعة)

الملخص

يتعلق الاختراع الحالي بتوفير بولي بيتيد جلوكوسيداز- ألفا من حمض بشري معدل، كما يتعلق بتوفير طرق تصنيع جلوكوسيداز- ألفا من حمض بشري معدل واستخدامه لعلاج اضطرابات تخزين الجليكوجين.

(جلوكوسيداز ألفا حمضي معدل بمعالجة متسارعة)

02 MAI 2014

الوصف الكامل

الإسناد المرجعي للطلبات ذات الصلة:

[001] يستند الطلب الحالي في الأسبقية إلى طلب البراءة الأمريكية المؤقت رقم 478336/61، المودع في 22 أبريل، 2011، والذي تم تضمينه في هذا الطلب بالكامل كمرجع.

المجال التقني:

[002] يتعلق الكشف الحالي بشكل عام بجلوكوسيداز- ألفا من حمض بشري معدل واستخدامه في علاج أمراض تخزين الجليكوجين.

الخلفية التقنية:

[003] يعد مرض Pompe، والمعروف كذلك بمرض تخزين الجليكوجين (GSD) من النوع 2 ونقص في المالتاز الحمضي، عبارة عن اعتلال عَضَلِيّ أَيْضِيّ في الجسيمات الحالة متنحي سببه نقص في جلوكوسيداز- ألفا حمضي إنزيمي في الجسيمات الحالة (GAA). يعد GAA عبارة عن إكسو-1، 4 و 6-□- جلوكوسيداز يقوم بالتحليل المائي للجليكوجين إلى جلوكوز في الجسيمات الحالة. يؤدي نقص GAA إلى تراكم الجليكوجين في الجسيمات الحالة ويتسبب في ضرر مطرد لعضلات الجهاز التنفسي، والقلب، والهيكلي. يتراوح المرض من مسلك إصابة الأطفال بشكل مطرد وسريع والذي يكون في العادة مميتاً عند عمر من 1-2 إلى المسلك الذي يتطور بشكل أكثر بطئاً وعلى نحو غير متجانس والذي يتسبب في الإصابة بالمرض بشكل كبير

والوفيات المبكرة في الأطفال والبالغين. Hirschhorn RR, *The Metabolic and Molecular Bases*

of Inherited Disease, 3: 3389-3420 (2001, McGraw-Hill); Van der Ploeg and Reuser, *Lancet* 372: 1342-1351 (2008).

[004] تعد الخطوات المستخدمة في التخليق الحيوي، الاستهداف، والمعالجة للجسيمات الحالة ل

GAA معقدة. يعد منتج النقل الأولي لـ GAA بشري عبارة عن 952 من بولي بيتيدات حمض 5

أميني تحتوي على سبع مواضع متطابقة لإدخال جليكوزيل في الموضع N. Moreland et al., *J. N.*

(2005) *Biol. Chem.* 280: 6780-6791. تتضمن مواضع الجليكان في N على GAA مجموعة من

الجليكان من النوع المعقد والذي به محتوى مرتفع من المانوز، يتم تعديل بعضها بفوسفات-6

مانوز. يتم استهداف GAA بالجسيمات الحالة بواسطة مستقبل فوسفات-6 مانوز مستقل

الكاتيون. في الجسيم الحال، يتعرض الإنزيم لمعالجة إضافية بإنزيمات بروتياز وجلوكوسيداز، بما 10

ينجم عنه وجود بيتيد ناضج يمكنه تصفية الجليكوجين بشكل متزايد.

[005] يوضح الشكل 1 منظراً تخطيطياً لمسار معالجة GAA. Moreland et al., 2005. عادةً،

يتعرض GAA حتى أربع إجراءات شطر أثناء المعالجة. أولاً، يتم شطر منتج نقل GAA الأولي

بالقرب من الحمض الأميني 57 لتكون مادة منتجة بوزن جزئي ظاهر حوالي 100 إلى 110

كيلو دالتون. ثانياً، يتم شطر المادة الحاملة التي من 100 إلى 110 كيلو دالتون عند الأحماض 15

الأمينية 113 إلى 122 تقريباً لتكوين جزء من 3.9 كيلو دالتون (أحماض أمينية من 78-

113) و95 كيلو دالتون (أحماض أمينية من 122-952). من ثم يمكن أن يتم شطر البولي

بيتيد 95 كيلو دالتون عند الأحماض الأمينية 781 إلى 792 تقريباً للحصول على شظايا 76

كيلو دالتون (أحماض أمينية من 122-781) و19.4 كيلو دالتون (أحماض أمينية من 792-

952). تظل الأنواع التي من 76 كيلو دالتون مرتبطة ببولي بيتيدات من 19.4 و3.9 كيلو 20

دالتون. يحول الشطر الحال للبروتين الإضافي أنواع الـ 76 كيلو دالتون إلى 70 كيلو دالتون

(أحماض أمينية من 204-781) التي تظل مرتبطة ببولي بيتيدات من 19.4، 10.4، و3.9 كيلو دالتون.

[006] ينطوي العلاج البشري الحالي لمعالجة مرض Pompe على إعطاء GAA بشري ناتج عن عودة الارتباط الجيني (أي، MYOZYME™). على الرغم من أن GAA البشري الناتج عن عودة الارتباط الجيني يقلل بشكل فعال من تراكم الجليكوجين في المرضى، فإنه لا تتم معالجته بشكل كامل حتى يصبح في صورة الـ70 كيلو دالتون عند الإعطاء. وبسبب أن ألفة GAA للجليكوجين يمكن أن تزيد بشكل ملحوظ كنتيجة لمعالجة البروتياز (Moreland et al., 2005; Wisselaar et al., (1993) *J. Biol. Chem.* 268: 2223-2231)، بما يزيد من معدل معالجة GAA البشري الناتج عن عودة الارتباط الجيني بما يسمح بوجود فعالية علاجية محسنة لـGAA، تتضمن جرعات منخفضة و/أو إعطاء أقل تكراراً من علاج GAA. 10

الكشف عن الاختراع:

[007] وفقاً لذلك، نصف في هذا الطلب بولي بيتيدات GAA معدلة تتم معالجتها بشكل أسرع من GAA بشري غير معدل.

[008] تتضمن نماذج معينة جلوكوسيداز- ألفا من حمض بشري أو شظية نشطة حفزياً منه بما تعديل عند أو بالقرب من موضع المعالجة 70 كيلودالتون عند الطرف N. في بعض النماذج، يتم توفير بولي بيتيد يتضمن جلوكوسيداز- ألفا من حمض بشري (GAA) أو شظية نشطة حفزياً منه بما تعديل عند أو بالقرب من موضع المعالجة 70 كيلودالتون عند الطرف N. يمكن أن يتم اختيار شظية نشطة حفزياً من 70 كيلودالتون، 76 كيلودالتون، 82 كيلودالتون، 95 كيلودالتون أو أي شظية نشطة حفزياً أخرى. في نماذج معينة، يتضمن كذلك البولي بيتيد متوالية استهداف مستقبل. في بعض النماذج، تكون متوالية استهداف المستقبل عبارة عن متوالية IGF2. 20

[009] في أمثلة معينة، يتسبب التعديل في عدم قابلية للذوبان متزايدة عند أو بالقرب من موضع المعالجة 70 كيلودالتون عند الطرف N. في بعض الأمثلة، يتم تعديل البولي بيتيد عند واحد أو أكثر من الأحماض الأمينية المناظرة للمواضع 195-209 من المتواليات رقم: 1. في نماذج أخرى، يعد التعديل عند واحد أو أكثر من الأحماض الأمينية المناظرة لمواضع أحماض أمينية 200-204 من المتواليات رقم: 1. في نماذج معينة، يكون التعديل في الحمض الأميني المناظر للموضع 201 من المتواليات رقم: 1. في نماذج أخرى، يكون التعديل عبارة عن استبدال لواحد أو أكثر من الأحماض الأمينية بأكثر من حمض أميني غير ألف للماء. في نماذج أخرى، يكون التعديل عبارة عن إدخال لواحد أو أكثر من الأحماض الأمينية غير الآلفة للماء. في نماذج أخرى كذلك، يتم اختيار حمض أميني غير ألف للماء من الليوسين والتيروسين.

5

[010] في نماذج معينة، يكون للبولي بيتيد تطابق بنسبة 80% على الأقل لـ 500 من الأحماض الأمينية للمتواليات رقم: 1 على الأقل. في بعض الأمثلة، يكون للبولي بيتيد تطابق بنسبة 90% على الأقل لـ 500 من الأحماض الأمينية للمتواليات رقم: 1 على الأقل. في أمثلة أخرى، يكون للبولي بيتيد تطابق بنسبة 95% على الأقل لـ 500 من الأحماض الأمينية للمتواليات رقم: 1 على الأقل.

10

[011] في نماذج معينة، يظهر البولي بيتيد معالجة بروتياز في الجسيمات الحالة أكثر سرعة مقارنةً بجلوكوسيداز- ألفا من حمض بشري غير معدل. في بعض النماذج، تتم بشكل حال للبروتين معالجة 50% على الأقل من البولي بيتيد لتكون في صورة 70 كيلودالتون في غضون 20 ساعة من الإعطاء. في نماذج أخرى، تتم بشكل حال للبروتين معالجة جميع البولي بيتيدات لتكون في صورة 70 كيلودالتون في غضون 55 ساعة من الإعطاء.

15

[012] تتضمن بعض النماذج بولي بيتيدات مترافقة مع أوليجوسكاريد يتضمن فوسفات-6- مانوز واحد على الأقل.

[013] في نماذج معينة، يتم توفير حمض نووي يشفر بولي بيتيد GAA معدل. في نماذج أخرى، يتم توفير نقل عدوى بشكل ثابت لخلية عائلة بالحمض النووي. في نماذج أخرى، يمكن للخلية العائلة إفراز GAA معدل.

5

[014] في نماذج معينة، يتم توفير طريقة لتقليل أو منع تراكم الجليكوجين في نسيج، تتضمن إعطاء كمية فعالة من البولي بيتيد كما هو موصوف في هذا الطلب لمريض بحاجة لها. في نماذج أخرى، يعاني المريض من مرض تخزين الجليكوجين. في نماذج أخرى أيضاً، يكون مرض تخزين الجليكوجين هو داء Pompe.

[015] في نماذج أخرى، يتم توفير طريقة لعلاج مرض تخزين الجليكوجين، تتضمن إعطاء كمية فعالة علاجياً من GAA معدل لمريض بحاجة لها. في نماذج أخرى، يكون مرض تخزين الجليكوجين هو داء Pompe. في نماذج أخرى، يتم توفير تركيبة صيدلانية، تتضمن GAA معدل كما هو موصوف في هذا الطلب للاستخدام في علاج مرض تخزين الجليكوجين. في بعض النماذج، يكون البولي بيتيد مجفف بالتجميد.

10

الوصف المختصر للرسومات:

15

[016] الشكل 1 عبارة عن مخطط يوضح نموذج لطفرة من GAA بشري أصلي.

[017] الشكل 2 يوضح SDS-PAGE لـ GAA ناتج عن عودة الارتباط الجيني (المسار 1)، GAA مشيمي بشري (المسار 2)، و GAA اختباري بقري (المسار 3).

[018] الشكل 3 أ يوضح محاذاة GAA بشري من أحماض أمينية 197 إلى 206 مع GAAs

من فأر، هامبستر، بقري، ومن الطيور. الشكل 3 ب يوضح نتائج بقعة ويسترن مقارنةً بـ GAAs

تمت معالجتها مختلفة. يوضح المسار 1 GAA بشري منقى من المشيمة. يعد المساران 2 و3 عبارة

عن GAAs للمقارنة منقاة من خلايا 293T مصابة بالعدوى بينيات GAA بشري من النوع غير

المعالج. تعد الممرات من 4-7 عبارة عن GAAs معدلة منقاة من خلايا 293T مصابة بالعدوى

بينيات GAA بشري حيث يتم تغيير الهيستادين عند الحمض الأميني 201 إلى الأحماض الأمينية

التالية: الأرجنين (المسار 4)، الليوسين (المسار 5)، التيروسين (المسار 6)، والليسين (المسار 7).

[019] الشكل 4 يوضح تخليق حيوي لـ rhGAA (H201L) و rhGAA (WT) في خلايا CHO

مصابة بالعدوى بشكل ثابت.

[020] الشكل 5 يوضح امتصاص خلايا ليفية أولية من Pompe ومعالجة rhGAA (WT)

و rhGAA (H201L).

[021] الشكل 6 يوضح نتائج بقع ويسترن تم اختبارها مسبارياً بمضاد GAA 183-200 (الشكل

6أ) و GAA1 لجسم مضاد أحادي النسيلة (الشكل 6ب).

[022] الشكل 7 عبارة عن مخطط لنموذج معالجة لـ rhGAA (H201L).

الوصف التفصيلي للاختراع:

[023] للمساعدة في فهم الكشف الحالي، يتم أولاً تحديد مصطلحات معينة. يتم توفير

تعريفات إضافية طوال الطلب.

5

10

15

[024] كما هو مستخدم في هذا الطلب، يشير مصطلح "موضع المعالجة 70 كيلودالتون عند الطرف N" إلى موقع التعرف على إنزيم (إنزيمات) حال للبروتين يشطر GAA عند الموضع المناظر للأحماض الأمينية 200 إلى 204 للمتوالية رقم: 1 (GAA بشرية أصلية).

[025] كما هو مستخدم في هذا الطلب، يشير مصطلح "GAA معدل" إلى GAA بشري وصور متغيرة من GAA بها حمض أميني واحد على الأقل عند أو بالقرب من موضع المعالجة 70 كيلودالتون عند الطرف N والذي يختلف عن الحمض الأميني الموجود في GAA بشري أصلي. تتم كذلك الإشارة إلى GAA معدل بـ "GAA بشري معدل" في الوصف. يتضمن مصطلح "GAA معدل" بولي بيتيدات GAA كاملة الطول التي تحتوي على متواليات إشارة، كما بولي بيتيدات GAA تمت معالجتها جزئياً كما أفرزت من الخلايا.

[026] كما هو مستخدم في هذا الطلب، تتضمن الصور الفردية النكرة والمعرفة الإشارات إلى الجمع ما لم يشير المحتوى بوضوح إلى ما هو خلاف ذلك. بالتالي، على سبيل المثال، تتضمن الإشارة إلى طريقة تحتوي على "مركب" خليط من مركبين أو أكثر. يتم بشكل عام استخدام مصطلح "أو" بمعنى يتضمن "و/أو" ما لم تتم الإشارة بشكل واضح إلى ما هو خلاف ذلك.

[027] طوال المواصفة، يتم توفير أحجام بروتين وبولي بيتيد بوحدات "كيلو دالتون". سيدرك الخبير في المجال أن هذه الأحجام تعتمد على وزن جزئي ظاهري للبولي بيتيدات في اختبارات استشراد كهربائي مثل SDS-PAGE (انظر، أي، Moreland et al., 2005). ستعتمد الأوزان الجزئية المضبوطة على حالة إدخال الجليكوزيل والمتغيرات الأخرى مثل الارتباط بالبولي بيتيدات الأخرى، ويمكن أن يتم تحديدها بطرق مختلفة معروفة لذوي الخبرة في المجال.

[028] يتم تضمين جميع المراجع المقتبسة في هذا الطلب بكاملها. وحتى المدى التي تتعارض فيه المنشورات وبراءات الاختراع وطلبات البراءات المتضمنة كمراجع مع الاختراع الوارد في المواصفة، فإن المواصفة الحالية تعتبر هي الحاكمة في أي مادة متعارضة.

1- جلوكوسيداز- ألفا حمضي (GAA)

5 [029] كما هو موصوف أعلاه، GAA عبارة عن إنزيم من الجسيمات الحالة المستخدم في تصفية الجليكوجين. يتضمن مصطلح GAA كل من صور ذات طول كامل، وصور من النوع غير المعالج من البروتين، كما صور متغيرة نشطة حفزياً أخرى. سيحتفظ GAA النشط حفزياً والصور المتغيرة من GAA على الأقل بالنشاط الحفزي إزاء الجليكوجين. يعد العديد من الصور المتغيرة من GAA بشري أصلي معروفاً لذوي الخبرة في المجال، بما فيها تلك التي تم قطعها، أو اندماجها أو ترافقها مع البولي بيبتيديات، والتي تم تغييرها في متواليات الحمض الأميني الخاصة بها، أو تغييرها بشكل ناتج عن عودة الارتباط الجيني أو كيميائياً. على سبيل المثال، من المعروف أن الأحماض الأمينية الـ 77 على الأقل عند الطرف N يمكن إزالتها من GAA بشري أصلي (المتوالية رقم: 1) دون فقد فعاليتها. Moreland et al., 2005. بالإضافة إلى ذلك، تم وصف مترافقات وبروتينات اندماج. في بعض النماذج، يمكن أن يتم ترافق أو اندماج شظية نشطة حفزياً من GAA بمتوالية استهداف مستقبل. في بعض الأمثلة، يمكن التعرف على متوالية استهداف المستقبل بمستقبل خلوي. على سبيل المثال، يمكن أن يتم اندماج GAA مقطوع بنطاق IGF2 كما هو موصوف في طلب البراءة الأمريكية 7، 785، 856، والتي يتم تضمينها كمرجع في هذا الطلب بكاملها. تم كذلك التغيير في GAA لإضافة شقوق تخليقية، شقوق كربوهيدراتية و/أو مستويات متزايدة من فوسفات-6-مانوز. على سبيل المثال، يتم وصف إنزيمات من الجسيمات الحالة بشقوق كربوهيدراتية معدلة تحتوي على مستويات مرتفعة من فوسفات-6-مانوز في البراءات الأمريكية رقم 7، 001، 994؛ 7، 723، 296؛ 7، 786، 277؛ طلب البراءة الأمريكية

0173385/2010؛ وطلب PCT 075010/2010، والتي تم تضمينها في هذا الطلب كمراجع.

[030] في نماذج معينة، يكون لـ GAAs الموصوفة في هذا الطلب تطابق بنسبة 80%، 90%، 95%، أو 99% على الأقل مع GAA بشري أو صورة متغيرة من GAA. في بعض الأمثلة، يكون لـ GAAs تطابق بنسبة 80%، 90%، 95%، أو 99% على الأقل مع 500، 550، 600، 650، 700، 750، 800، 850، أو 900 على الأقل من الأحماض الأمينية للمتوالي رقم: 1.

[031] يمكن أن يتم استخدام أي من GAAs بشرية نشطة حفزياً موصوفة في هذا الجزء كمتوالي قاعدية لـ GAAs معدل تم وصفه في هذا الطلب. سيعرف أحد ذوي المهارة في المجال أي صورة من صور GAA المتغيرة هي المناسبة للاستخدام في الاختراع. حيث يكون لمتوالي GAA القاعدية طول مختلف أو نمط إدخال جليكوزيل مختلف مقارنةً بـ GAA بشري أصلي، سيكون للبولي بيتيدات التي تمت معالجتها أحجام مختلفة وفقاً لذلك.

GAA-2 معدل

[032] في نماذج مختلفة، يتم توفير بولي بيتيد يتضمن GAA بشري معدل يتم تعديله عند أو بالقرب من موضع المعالجة 70 كيلودالتون عند الطرف N. تتضمن المنطقة "القريبة" من موضع المعالجة 70 كيلودالتون عند الطرف N حتى 5 أحماض أمينية قبل أو بعد موضع المعالجة 70 كيلودالتون عند الطرف N. في نماذج معينة، تتضمن المنطقة عند أو بالقرب من موضع المعالجة 70 كيلودالتون عند الطرف N أحماض أمينية مناظرة للمواضع 195-209 من المتوالي رقم: 1.

[033] تتم معالجة GAAs معدلة تم وصفها في هذا الطلب بشكل أكثر سرعة من GAA غير المعدل. في نماذج معينة، يكون لـ GAAs المعدل عدم آلفة للماء متزايدة عند أو بالقرب من موضع

المعالجة 70 كيلودالتون عند الطرف N. في بعض النماذج، يكون لـ GAA المعدل معدل معالجة حالة للبروتين أسرع للصورة الناضجة من 70 كيلودالتون. في بعض النماذج، وبالاعتماد على المتواليات البادئة، تتم معالجة GAA المعدل لصورة متغيرة من الصورة الناضجة من 70 كيلودالتون. يمكن أن تتم معالجة GAA المعدل بحيث يظل البولي بيبتيد الناضج مرتبطاً بشظايا بولي بيبتيد إضافية. في نماذج معينة، تتم معالجة GAA المعدل من خلال نفس المسار كما GAA غير المعدل. 5 في نماذج أخرى، تتم معالجة GAA المعدل من خلال وسائط مختلفة مقارنةً بـ GAA غير المعدل. على سبيل المثال، يمكن أن تتم معالجة GAA كامل الطول معدل من خلال الوسائط 76 كيلو دالتون أو 82 كيلو دالتون، أو كليهما. يمكن أن يتم التعرف على GAA المعدل بواسطة نفس إنزيمات البروتياز كما GAA غير المعدل، ومعالجته بذات الترتيب أو بترتيب مختلف.

- 10 [034] في نماذج معينة، يتم تعديل GAA لزيادة عدم آلفته للماء عند أو بالقرب من موضع المعالجة 70 كيلودالتون عند الطرف N باستبدال حمض أميني واحد على الأقل بحمض أميني أكثر عدم آلفه للماء. في بعض النماذج، يمكن القيام بالاستبدال ضمن 5 أحماض أمينية قبل أو بعد موضع المعالجة 70 كيلودالتون عند الطرف N. في أمثلة معينة، يمكن القيام بالاستبدال في حمض أميني مناظر للموضع 195 إلى 209 من المتواليات رقم: 1. في أمثلة أخرى، يمكن القيام بالاستبدال في حمض أميني مناظر للموضع 200 إلى 204 من المتواليات رقم: 1. في نماذج 15 أخرى، يحتوي GAA البشري المعدل على حمض أميني غير آلف للماء في الموضع المناظر لموضع الحمض الأميني 201 من المتواليات رقم: 1. في بعض النماذج، يتم تعديل GAA بإدخال واحد أو أكثر من الأحماض الأمينية غير الآلفة للماء عند أو بالقرب من موضع المعالجة 70 كيلودالتون عند الطرف N. تتضمن التعديلات الإضافية حذف واحد أو أكثر من الأحماض الأمينية عند أو بالقرب من موضع المعالجة 70 كيلودالتون عند الطرف N. 20

[035] في نماذج معينة، يتم توفير GAA بشري معدل يحتوي على حمض أميني غير آلف للماء (طبيعي أو تخليقي) عند أكثر من موضع واحد عند موضع المعالجة 70 كيلودالتون عند الطرف N، أو ضمن 5 من الأحماض الأمينية لموضع المعالجة 70 كيلودالتون عند الطرف N. في أحد النماذج، يكون أحد الأحماض الأمينية المعدلة في الموضع المناظر للحمض الأميني 201 من المتواليات رقم: 1. 5

[036] في نماذج مختلفة يتم اختيار الحمض الأميني غير الآلف للماء من فالين، ليوسين، أيزوليوسين، الميثيونين، الفينيل ألانين، ترايبوتوفان، تيروسين، سيتين أو ألانين. في نماذج أخرى، يكون الحمض الأميني غير الآلف للماء عبارة عن ليوسين أو تيروسين. في بعض النماذج، يحتوي GAA البشري المعدل على حمض أميني تخليقي أو غير طبيعي يظهر خواص غير آفة للماء. بشكل عام، يكون الحمض الأميني المستبدل أكثر من حيث عدم الآفة للماء مقارنةً من الحمض الأميني من النوع غير المعالج، وبالتالي يزيد من عدم الآفة للماء عند أو بالقرب من موضع المعالجة 70 كيلودالتون عند الطرف N. 10

[037] في أحد النماذج التمثيلية، يتضمن GAA المعدل ليوسين في موضع مناظر للحمض الأميني 201 من المتواليات رقم: 1. في نموذج آخر، يتضمن GAA المعدل تيروسين في موضع مناظر للحمض الأميني 201 من المتواليات رقم: 1. 15

[038] في نماذج معينة، يتم توفير GAAs بشرية معدلة بها على الأقل تطابق بنسبة 80%، 90%، 95%، أو 99% على الأقل مع 500، 550، 600، 650، 700، 750، 800، 850، أو 900 على الأقل من الأحماض الأمينية للمتواليات رقم: 1، وحيث يتضمن GAA البشري المعدل حمض أميني واحد على الأقل في موضع المعالجة 70 كيلودالتون عند الطرف N مستبدل بحمض أميني أكثر عدم آفة للماء. 20

[039] في بعض النماذج، تتم معالجة 50% على الأقل من GAA البشري المعدل ليكون في الصورة 70 كيلودالتون في الجسيمات الحالة في غضون 20، 30، أو 40 ساعة. في نماذج أخرى كذلك، تتم معالجة جميع GAA البشري المعدل ليكون في الصورة 70 كيلودالتون في الجسيمات الحالة في غضون 55، 65، أو 75 ساعة.

5 [040] في نماذج معينة، يمكن أن يتم تحديد GAA بشري معدل للاختراع من خلال المعالجة الحالة للبروتين الأكثر سرعة للتحويل لصورة 70 كيلو دالتون ناضجة، أو صورة متغيرة مناظرة له. في نماذج أخرى، يمكن أن يتم تحديد GAA بشري معدل كما هو موصوف في هذا الطلب بإنتاج بولي بيتيد وسيط من 82 كيلو دالتون لا يتم إنتاجه أثناء معالجة حالة للبروتين لـ GAA بشري أصلي. في نماذج أخرى، يمكن أن يتم تحديد GAA بشري من خلال غياب بولي بيتيد وسيط من 76 كيلو دالتون يتم إنتاجه أثناء معالجة حالة للبروتين لـ GAA بشري غير معدل. 10

3- إنتاج GAA معدل

[041] في نماذج مختلفة، يمكن أن يتم إنتاج بولي بيتيد GAA معدل وفقاً للطرق المعروفة للماهر في المجال. على سبيل المثال، يمكن أن يتم التعبير عن بولي بيتيد GAA معدل وإفرازه من سلالات خلايا منقول إليها العدوى بشكل ثابت بأحماض نووية تشفر GAA معدل. تتضمن سلالات خلايا مناسبة خلايا الليف الأولية، خلايا مبيض هامستر صيني (CHO)، خلايا 293T، أو خلايا نباتية، من بين أخرى تم التعرف عليها بواسطة ذوي الخبرة في المجال. يتم وصف سلالات خلايا تمثيلية وطرق إنتاج في البراءات الأمريكية أرقام 7351410 و 7138262؛ وطلب البراءة الأمريكية رقم 0196345/2010، والتي تم تضمينها في هذا الطلب كمراجع بأكملها. في نماذج معينة، يتم إدخال حمض نووي يشفر GAA معدل في بلازميد أو ناقل يحتوي على معززات مناسبة ومتواليات تنظيمية للتعبير عن سلالة الخلايا. تتضمن المعززات المفيدة لإنتاج GAA معدل 15 20

في سلالات خلايا ثديية rpS21 ومعززات بيتا-أكتين (انظر، على سبيل المثال، البراءة الأمريكية رقم 7423135)، من بين أخرى كثيرة تم التعرف عليها من قبل المهرة في المجال. في نماذج معينة، يتم بشكل إضافي تغيير GAA معدل لزيادة معدلات إدخال الجليكوزيل أو فوسفات-6-مانوز أو إنقاصها، وبذلك تعزيز الإفراز و/أو استهداف الجسيمات الحالة.

4- تركيبات صيدلانية

5

[042] وفي بعض النماذج، يوجد GAA المعدل في تركيبة صيدلانية تشتمل على مادة إضافة واحدة على الأقل مثل مادة مالئة، عامل إكساب حجم، مادة مفتتة، محلول منظم، عامل تثبيت، أو سواغ. وتعرف تقنيات الصياغة الصيدلانية القياسية جيداً للمهرة في المجال (انظر، على سبيل المثال

2005 Physicians' Desk Reference®، Thomson Healthcare: Montvale, NJ, 2004;

Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20th ed., Gennado et al., Eds.

10

(Lippincott Williams & Wilkins: Philadelphia, PA, 2000). وتشمل مواد الإضافة الصيدلانية

المناسبة، على سبيل المثال، مانيتول، ونشا وجلوكوز ولاكتوز وسكروز، وجيلاتين، وشعير، وأرز،

ودقيق، وطباشير، جل السيليكا، ستيرات صوديوم، مونوستيرات جليسرول، تلك، وكلوريد

الصوديوم، والحليب المجفف الخالي من الدسم، والجليسرول، برويلين، وجليكول، وماء، وإيثانول،

وما شابه ذلك. في بعض النماذج، يمكن أن تشتمل التركيبة الصيدلانية على مواد كاشفة منظمة لـ

15

pH وعوامل ترطيب أو استحلاب. في نماذج أخرى، يمكن أن تشتمل التركيبات على مواد حافظة

أو مواد مثبتة.

[043] وفي بعض النماذج، يمكن أن تشتمل التركيبات الصيدلانية التي تشتمل على GAA

البشري المعدل على واحد أو أكثر مما يلي: مانيتول، بولي سوربات 80، فوسفات صوديوم ثنائي

القاعدة وخماسي الهيدرات، وفوسفات صوديوم أحادي القاعدة أحادي الهيدرات. في نموذج آخر،

20

يمكن أن تشتمل التركيبات الصيدلانية على 10 ملي مولار من هيسثيدين برقم هيدروجيني يبلغ

6.5 مع ما يصل إلى 2% من جليسين، وما يصل إلى 2% من مانيتول، وما يصل إلى 0.01% من بولي سوربات 80. يمكن أن توجد تركيبات صيدلانية مثالية إضافية في طلب براءة الاختراع رقم 075010/2010.

[044] يمكن أن تتغير صيغة التركيبات الصيدلانية بناءً على طريقة الإعطاء المقررة ومتغيرات

5 أخرى (انظر، على سبيل المثال، Rowe et al., Handbook of Pharmaceutical Excipients, 4th

(ed., APhA Publications, 2003). في بعض النماذج، يمكن أن تكون تركيبة GAA المعدلة عبارة

عن عجينة أو مسحوق مجفف بالتجميد. يمكن إعادة تشكيل التركيبة المجففة بالتجميد للإعطاء

عن طريق الحقن في الوريد، على سبيل المثال باستخدام الماء المعقم للحقن، USP. في نماذج

أخرى، يمكن أن تكون التركيبة عبارة عن محلول معقم خالي من مسببات الحمى.

10 [045] يمكن أن تشمل التركيبات الصيدلانية التي تم وصفها في هذه لوثيقة على GAA المعدل

بمثابة المركب النشط الوحيد أو يمكن توصيلها في توليفة مع مركب، تركيبة، أو مادة حيوية أخرى.

على سبيل المثال، يمكن أن تشمل التركيبة الصيدلانية أيضاً على واحد أو أكثر من الجسيمات

الصغيرة المفيدة لعلاج مرض Pompe و/ أو أثر جانبي مرتبط بمرض Pompe أو علاجه. في بعض

النماذج، يمكن أن تشمل التركيبة على ميجلوسينات و/ أو واحد أو أكثر من المركبات التي تم

15 وصفها، على سبيل المثال، في طلبات براءات الاختراع الأمريكية رقم 0050299/2003؛

0153768/2003؛ 0222244/2005؛ أو 0268094/2005. في بعض النماذج،

يمكن أن تشمل التركيبة الصيدلانية أيضاً على واحد أو أكثر من المركبات الكابتة للمناعة،

مثبطات mTOR، أو مثبطات الالتهام الذاتي. تشمل أمثلة المركبات الكابتة للمناعة على

راباميسين وفيلكاد. ويعتبر راباميسين أيضاً مثبط mTOR.

5- الطرق العلاجية

[046] في بعض النماذج، يتم استخدام GAA البشري المعدل لتقليل أو منع تراكم الجليكوجين في أنسجة مريض. في نماذج أخرى، يتم استخدام GAA البشري المعدل لعلاج مرض تخزين الجليكوجين. في نماذج أخرى أيضاً، يكون مرض تخزين الجليكوجين عبارة عن مرض Pompe. في نماذج توضيحية، تتم معالجة GAA المعدل لاحقاً في GAA الناضج في الجسم الحال بعد إعطائه للمريض. 5

[047] يمكن إعطاء GAA المعدل الموصوف في هذه الوثيقة بواسطة أي نظام إعطاء مناسب ويمكن أن تشتمل، على سبيل المثال لا الحصر، الإعطء بالحقن (بما في ذلك تحت الجلد، عن طريق الوريد، داخل الجمجمة، داخل النخاع، والحقن داخل المفصل، في العضل، داخل القراب، أو داخل الغشاء البريتوني)، عبر الجلد، أو عن طريق الفم (على سبيل المثال، في كبسولات، ومعلقات، أو أقراص). في أحد النماذج، يتم إعطاء GAA المعدل بواسطة الإعطء عبر الوريد. 10

[048] في نماذج إضافية، يمكن إعطاء GAA المعدل الذي يُرمز الحمض النووي للمريض. يمكن إعطاء الحمض النووي باستخدام ناقل مناسب للعلاج الجيني. يتم وصف أمثلة على طرق العلاج الجيني، على سبيل المثال، في براءات الاختراع الأمريكية رقم 5952516؛ 6066626؛ 6071890؛ و 6287857. 15

[049] يمكن أن يتم الإعطء لمريض في جرعة فردية أو في مرات إعطاء متكررة، وبأية مجموعة متنوعة من صور الملح المقبولة من الناحية الفسيولوجية، و/ أو مع مادة حاملة و/ أو مادة إضافة صيدلانية مقبولة كجزء من تركيبة صيدلانية. 20

[050] يتم إعطاء تركيبات GAA المعدل الموصوف في هذه الوثيقة بكميات فعالة علاجياً. عموماً، يمكن أن تختلف الكمية الفعالة علاجياً تبعاً لعمر المريض، والحالة العامة، وكذلك شدة 20

الحالة الطبية لهذا المريض. يمكن تحديد الجرعة بواسطة الطبيب وتعديلها، حسب الضرورة، لتناسب مع الآثار التي تمت ملاحظتها للعلاج.

[051] يتم إعطاء تركيبات GAA المعدل الموصوف في هذه الوثيقة بالتسريب في الوريد في

العيادات الخارجية، على سبيل المثال، كل 1، 2، 3، 4، 5، 6، 7، 8، 9، 10، أيام أو

أكثر، أو، على سبيل المثال أسبوعياً ونصف شهرياً وشهرياً، أو كل شهرين. يتم اختيار الجرعة 5

الملائمة الفعالة علاجياً من مركب بواسطة الطبيب المعالج ويمكن أن تتراوح من حوالي 1 ميكرو

جم/ كجم تقريباً إلى 500 مجم/ كجم تقريباً، ومن حوالي 10 مجم/ كجم تقريباً إلى 100

مجم/ كجم تقريباً، من حوالي 20 مجم/ كجم تقريباً إلى 100 مجم/ كجم تقريباً و من 20

مجم/ كجم تقريباً إلى 50 مجم/ كجم تقريباً. في بعض النماذج، يتم اختيار الجرعة العلاجية

المناسبة، على سبيل المثال، من 0.1، 0.25، 0.5، 0.75، 1، 5، 10، 15، 20، 30، 10

40، 50، 60، 70، و 100 مجم/ كجم. بالإضافة إلى ذلك، يمكن أن توجد أمثلة حول

الجرعات المحددة في [®]Physicians' Desk Reference.

[052] وفي بعض النماذج، تشتمل الطرق على إعطاء GAA البشري المعدل، وبالتالي زيادة

تصفية الجليكوجين في هذا المريض، على سبيل المثال، عند 10 % على الأقل، 15 % على

الأقل، 20 % على الأقل، 25 % على الأقل، 30 % على الأقل، 35 % على الأقل، 40 % 15

على الأقل، 50 % على الأقل، 60 % على الأقل، 70 % على الأقل، 80 % على الأقل،

90 % على الأقل، أو 100 % على الأقل، بالنسبة إلى النشاط الداخلي. في بعض النماذج،

تشتمل الطرق على إعطاء GAA البشري المعدل، وبالتالي زيادة تصفية الجليكوجين في هذا

المريض، على سبيل المثال، بواسطة 2، 3، 4، 5، 6، 7، 8، 9، 10، 20، 30، 40،

50، 100، أو 1000 مرة على الأقل، بالنسبة إلى النشاط الداخلي. يمكن تحديد تصفية 20

الجليكوجين المتزايدة، على سبيل المثال، بواسطة انخفاض الأعراض السريرية أو عن طريق الفحص السريري أو الحيوي المناسب مثل اختبار تخزين محلول جليكوجين.

[053] وفي بعض النماذج، يمكن تحديد زيادة تصفية الجليكوجين بعد علاج المريض باستخدام

تركيبية تشتمل على GAA البشري المعدل (انظر، على سبيل المثال، Zhu et al., J. Biol. Chem.

(2004) 50336-50341:279) بواسطة الملاحظة البيوكيميائية أو النسيجية للتراكم المنخفض لمحلول 5

الجليكوجين، على سبيل المثال، في الخلايا العضلية القلبية، الخلايا العضلية الهيكلية، أو الخلايا

الليفية الجلدية. ويمكن أيضا اختبار نشاط GAA، على سبيل المثال، في عينة خزعة من

العضلات، في الخلايا الليفية الجلدية المزروعة، في الخلايا الليمفاوية، والبقع الدموية المجففة. يتم

وصف اختبارات بقعة الدم المجففة على سبيل المثال في Umpathysivam et al., Clin. Chem.

(2004) 50:1785-1796 and Li et al., Clin. Chem. 47:1378-1383 (2001). ويمكن أيضا اختبار 10

علاج مرض Pompe، على سبيل المثال، من خلال مستويات الكرياتينين كيناز في المصل، وزيادة

الوظيفة الحركية (على سبيل المثال، كما تم تقييمه بواسطة مقياس Alberta Infant Motor)،

والتغيرات في مؤشر كتلة البطين الأيسر كما تم قياسه بواسطة رسم قلب، والنشاط الكهربائي

للقلب، كما تم قياسه بواسطة رسم القلب الكهربائي. يمكن أن يؤدي إعطاء التركيبة الصيدلانية

التي تشتمل على GAA المعدل أيضا إلى انخفاض في واحد أو أكثر من أعراض مرض Pompe 15

مثل تضخم القلب، اعتلال عضلة القلب، النوم خلال النهار، وضيق النفس الجهد، وعدم

النمو، صعوبات التغذية، "ترهلات"، شدوذ المشي، والصداع، نقص التوتر، ضخامة الأعضاء

(على سبيل المثال، تضخم القلب واللسان والكبد)، انحناء الظهر، وفقدان التوازن، وآلام أسفل

الظهر، وصداع الصباح، وضعف العضلات، وقصور في الجهاز التنفسي، تأرجح الكتف، انحناء

جانبي، وارتجاجات الوتر العميقة المنخفضة، توقف التنفس أثناء النوم، التعرض لالتهابات الجهاز 20

التنفسي، والقيء.

[054] وفي بعض النماذج، تشتمل الطرق على إعطاء تركيبات صيدلانية تشتمل على GAA البشري المعدل مع واحد أو أكثر من العلاجات الإضافية. يمكن إعطاء العلاجات الإضافية بشكل متزامن مع (بما في ذلك الإعطاء المتزامن في صورة صيغة مقترنة)، قبل، أو بعد إعطاء GAA البشري المعدل. في بعض الحالات، يمكن إعطاء علاج إضافي بين جرعات GAA المعدل. على سبيل المثال، يمكن استخدام العلاج بالجزء الصغير لإبطاء إعادة تراكم الجليكوجين، والسماح بجرعات أقل تكراراً من GAA المعدل.

[055] وفي بعض النماذج، تشتمل الطرق على معالجة مريض باستخدام خافض للحرارة، مضادات الهيستامين، و/ أو كابت للمناعة (قبل أو بعد أو أثناء العلاج باستخدام GAA المعدل الذي تم وصفه أعلاه). في بعض النماذج، يمكن معالجة مريض باستخدام خافض للحرارة، مضادات الهيستامين، و/ أو كابت للمناعة قبل العلاج باستخدام GAA المعدل لتقليل أو منع تفاعلات التسريب ذات الصلة. على سبيل المثال، يمكن معالجة المرضى مسبقاً باستخدام واحد أو أكثر من أسيتامينوفين، آزا ثيوبيرين، سيكلوفوسفاميد، سيكلوسبورين A، داي فينهدرامين، ميثوتركسات، ميكو فينولات، ستيرويدات عن طريق الفم، أو راباميسين.

[056] وفي بعض النماذج، تشتمل الطرق على معالجة مريض (قبل أو بعد أو أثناء العلاج العلاج باستخدام GAA البشري المعدل) مع العلاج بالجزء الصغير و/ أو العلاج الجيني، بما في ذلك العلاج بالجزء صغير و العلاج الجيني الموجه نحو علاج اضطراب تخزين الجليكوجين. يمكن أن يشتمل العلاج بالجزء الصغير على إعطاء ميجلوستات و/ أو واحد أو أكثر من المركبات التي تم وصفها، على سبيل المثال، في نشرات طلبات براءات الاختراع الأمريكية رقم 2003/0050299 و 2003/0153768؛ 2005/0222244؛ و 2005/0267094.

يمكن تنفيذ العلاج الجيني كما هو موضح، على سبيل المثال، في براءة الاختراع الأمريكية رقم

5

10

15

20

5952516؛ 6066626؛ 6071890؛ و 6287857؛ و نشرات طلبات براءات
الاختراع الأمريكية رقم 2003 / 0087868.6.

6- الأمثلة

[057] تعمل الأمثلة التالية على توضيح، وليس قصر، الكشف الحالي.

5 المثل رقم 1: الطرق والمواد

أ- كواشف ومواد الاختبار

[058] تم الحصول على كونكانافالين A، DEAE - سيفاروز FF، ومستحضر من نوع

سوبريدكس 200 من Amersham Pharmacia Biotech (NJ، Piscataway). تم الحصول على α

- ميثيل جلوكوسيد، بنزاميدين، و 4 ميثيل ميبيليفيريل D- α - جلوكوسيد من Sigma-Aldrich

10 (MO، Saint Louis). وكانت المواد الكيميائية الأخرى من نوع الكواشف أو أفضل، وكانت من

موردين قياسين. تم الحصول على المواد الهلامية SDS-PAGE من إينفيتروجن (CA، San Diego).

تم الحصول على زجاجات اسطوانية من Corning (NY، Corning). تم الحصول على وسط

Eagle المعدل بـ Dulbecco (DMEM) ومصل بقري جنيني (FBS) من JRH Biosciences

(Lenexa, KS). تم الحصول على الخلايا الليفية لمرض Pompe (GM00248) من Coriell Cell

15 .Repositories (Camden, NJ)

ب- نشاط جلوكوسيداز ألفا حمضي واختبار البروتين

[059] تم اختبار جلوكوسيداز - α حمضي باستخدام مقياس التآلق في طبق بعبار دقيق

باستخدام 4 - ميثيل ميبيليفيريل D- α - جلوكوسيد كما هو موضح مسبقاً. Oude Elferink et

al., Eur. J. Biochem. 139: 489-495 (1984). تم تقدير تركيز البروتين بواسطة الامتصاص في

20 280 نانومتر بافتراض أن $E^{1\%} = 10$ أو باستخدام اختبار Micro-BCA قياسي باستخدام

ألبومين مصلى بقري. (Smith et al., Anal. Biochem. 150: 76-85 (1985).

ج- استشراد كهربى باستخدام جل SDS- بولى أكريل أميد

[060] تم استخدام عينات مختزلة وغير مختزلة وعلامات الوزن الجزيئى (Amersham Pharmacia Biotech) على 4-20% أو 10% من جل تريس- جليسين SDS-PAGE. تم إجراء الاستشراد الكهربى عند 150 فولت لمدة 1.5 ساعة، وتم تصوير البروتينات باستخدام صبغة Coomassie الأزرق أو الفضة. (Blum et al., Electrophoresis 93-99 (1987)).

5

د- عزل GAA الناتج عن عودة الارتباط الجينى والمشيمى

[061] كان إنتاج وتنقية GAA الناتج عن عودة الارتباط الجينى والمشيمى البشرى كما تم وصفه (Mutsaers et al., Archives of Biochem. and Biophys. 231: 454-460 (1984); Martiniuk et al., Biochimica et Biophysica Acta 911: 244-251 (1987); Moreland et al., (2005)).

هـ - الأجسام المضادة وتحليل بقعة ويسترن

10

[062] كما هو موضح مسبقاً (Moreland et al., 2005)، تم تحصين الأرانب باستخدام الببتيدات المخلفة المقترنة بـ KLH. كانت متوالية كل ببتيد كما يلي: مضاد - GAA 57-74 (المتوالية رقم: 2)، ومضاد - GAA 78-94 (المتوالية رقم: 3)، ومضاد - GAA 183-200 (المتوالية رقم: 4). تم إنتاج الأجسام المضادة عديدة النسيلة المشتقة من الماعز ضد GAA المشيمى البشرى المنقى. تم مسبقاً وصف الجسم المضاد وحيد النسيلة GAA1. (Moreland et al., 2005). تم إجراء بقع ويسترن كما هو موضح مسبقاً. (Moreland et al., 2005).

15

و- امتصاص الخلايا الليفية لـ rhGAA

[063] لكل نقطة زمنية، تم تحضين حوالي 5×10^5 من خلايا مرض Pompe الليفية في DMEM بالإضافة إلى 10% من FBS مع 250 نانومولار من rhGAA(WT) أو

20

rhGAA(H201L). خلال 16 ساعة، تم غسل الخلايا وتمت إضافة وسط جديد لم يشتمل على GAA. عند نقاط زمنية معينة، تمت إزالة الخلايا و غسلها 5 مرات باستخدام محلول فوسفات ملحي منظم وتخزينها عند -80 درجة مئوية. بعد النقطة الزمنية الأخيرة، تمت إذابة كل كريات الخلية وتحليلها في وقت واحد مع 0.25% من تريتون. تم تشكيل كريات من البقايا الخلوية وتم إجراء تحليل بقعة ويسترن على المواد الطافية من كل نقطة زمنية باستخدام الأجسام المضادة لمضاد GAA.

5

ز- تحضير بنيات التعبير وطرق عدوى عابرة

[064] تم تصنيع بلازميدات التعبير عن GAA الناتج عن عودة الارتباط الجيني مع وبدون استبدال أو حالات حذف الأحماض الأمينية في pcDNA6 (إينفيتروجن)، وذلك باستخدام إجراءات قياسية. تمت زراعة خلايا كلى بشرية 293T في DMEM، يتم إكماله باستخدام 10% من FBS تحت 5% من CO₂ عند 37 درجة مئوية. تم خلط 6 ميكروجرام لكل بلازميد باستخدام كاشف تعداد فيوجين 6 (Roche)، وإضافته إلى 2.5 × 10⁶ سم من الخلايا في طبق قطره 10 سم. بعد 72 ساعة تم غسل الخلايا الملتصقة باستخدام PBS مرتين وتحليله باستخدام PBS يحتوي على 0.25% من تريتون. تم ترسيب البقايا الخلوية بواسطة الطرد المركزي وتم تخزين المواد الطافية عند -20 درجة مئوية.

10

15

ح- وضع العلامات الأيضية والترسيب المناعي

[065] تم إنتاج سلالات خلية CHO المستقرة التي تعبر عن rhGAA(WT) أو rhGAA(H201L) وفقاً للطريقة التي تم وصفها مسبقاً. (Qiu et al., J. Biol. Chem. 278: 32744-32752 (2003)). تم تحضين حوالي 5 × 10⁶ سم من الخلايا في طبق قطره 10 سم في ميثيونين يفتقر إلى DMEM وسيستين لمدة 30 دقيقة. تم تعليم الخلايا بالنبض لمدة 2 ساعتين باستخدام 150 ميكروكيوري/مل (1175 كيوري/ملي مول من علامة Tran35S) في ميثيونين يفتقر إلى DMEM

20

وسيستين. بعد غسل الخلايا باستخدام DMEM مرتين وتم تسجيل النقطة الزمنية عند ساعة الصفر، ثم تم تحضين الخلايا في DMEM دون علامة عند 37 درجة مئوية. عند كل نقطة زمنية، تم غسل الخلايا مرتين باستخدام PBS. تم تخزين الأطباق عند درجة حرارة -20 درجة مئوية. بعد النقطة الزمنية الأخيرة، تم تحليل الخلايا باستخدام PBS يحتوي على 0.25 % من تريتون (PBST). تمت إزالة البقايا الخلوية بواسطة الطرد المركزي و تمت إضافة 60 ميكرو لتر من 50 % من ملاط كونكانافالين أ سيفاروز إلى المادة الطافية. بعد 2 ساعتين من التحضين، تم غسل الخرزات 3 مرات باستخدام PBST. وتمت تصفية GAA المعلم باستخدام PBS يحتوي على 0.5 مولار من α - ميثيل جلوكوسيد. ثم تم ترسيب GAA الموجود في ناتج الصفية منعياً باستخدام الألفة لمضاد GAA المنقى المشتق من الماعز مع NHS- سيفاروز. تم غسل ناتج الترسيب 3 مرات باستخدام PBST وتم إضافة 40 ميكرو لتر من 2x من محلول عينة SDS المنظم الذي يحتوي على مركابتو إيثانول β إلى الخرزات. تم غلي العينات قبل تحليل بقعة ويسترن.

ط- الاختصارات

[066] وكما هو مستخدم في هذه الوثيقة، يشير مصطلح " rhGAA " إلى جلوكوسيداز α الحمضي الناتج من عودة الارتباط الجيني البشري. ويشير مصطلح " CHO " إلى مبيض همستر صيني. يشير المصطلح " MSX " إلى ميثيونين سلفوكسيمين. يشير المصطلح " ERT " إلى العلاج باستبدال الإنزيم.

[067] كما استخدم في هذه الوثيقة، يشير مصطلح " GAA (H201R) " إلى GAA مُعدل به استبدال حمض أميني في الموضع 201 من هيسثيدين إلى أرجينين. ويشير المصطلح " GAA (H201L) " إلى GAA مُعدل به استبدال حمض أميني في الموضع 201 من هيسثيدين إلى ليوسين. ويشير المصطلح " GAA (H201Y) " إلى GAA مُعدل به استبدال حمض أميني في الموضع 201

من هيسيتيدين إلى تيروسين. ويشير المصطلح "GAA (H201K)" إلى GAA مُعدل به استبدال حمض أميني في الموضع 201 من هيسيتيدين إلى ليسين.

مثال 2: مقارنة بين GAA البشري والبكري والخاص بالهمستر

[068] عندما يتم فحص GAA المنقى من المشيمة بواسطة SDS-PAGE، توفرت مجموعتين

5 مناظرتين لبولي بيتيد بكمية تبلغ 76 - و 70 كيلو دالتون تقريباً بصورة متساوية (الشكل 2).

وبالمثل، أوضح rhGAA الذي تم التعبير عنه بصورة مفرطة في خلايا مبيض همستر صيني (CHO)

وتنقيته من نواتج تحليل الخلية مسبقاً نطاقات تبلغ 76 و- 70 كيلو دالتون. Moreland et al.,

2005. على العكس، يوجد GAA المنقى الخاص بالهمستر من خلايا CHO بصورة حصرية في

صورة بولي بيتيد يبلغ 70 كيلو دالتون. لتحديد ما إذا كانت سيادة 70 كيلو دالتون فريدة

10 للهمستر، تمت تنقية GAA من خصية بقرية وتمييزه بواسطة SDS-PAGE مصبوغ بالفضة (4-)

20 % من أكريلاميد)، واتضح احتوائه أيضاً على بولي بيتيد بوزن ذري 70 كيلو دالتون فقط

(الشكل 2).

مثال 3: يؤثر الحمض الأميني عند موضع 201 في GAA على فعالية التحويل من صورة

تبلغ 76 إلى 70 كيلو دالتون ويحدد ترتيب انشطارات البروتين

15 [069] توضح محاذاة متواليات GAA من الثدييات عند موقع يحلل البروتين بين الأحماض

الأمينية 197 و 206 (الشكل 3 أ) أنه يتم الاحتفاظ بالمتواليات التي تم احتجازها بصورة كبيرة

ولكن تعرض المتواليات المستأصلة بعض الاختلاف. يحتوي GAA البشري على هيسيتيدين في

الموضع 201 بينما GAA من الهمستر والأبقار يشتمل على وحدات بنائية ليوسين وتيروسين

كارهة للماء، على التوالي. لتحديد ما إذا كانت استبدالات الحمض الأميني هذه هي المسؤولة

20 عن الاختلافات التي تحددها الأنواع في المعالجة، يتم تصميم بلازميدات التعبير عن GAA التي

يختلف فيها الحمض الأميني 201. تم استبدال هيسيتيدين بليوسين (H201L)، تيروسين

(H201Y)، أرجينين (H201R) أو ليسين (H201K). تم نقل العدوى لخلايا الكلى الجنينية البشرية (293T) بكل تركيبة يليه تحليل بقعة ويسترن بالجسم المضاد وحيد النسيلة لـ GAA. وأوضح تحليل بقعة ويسترن لنتائج تحليل الخلية أنه عندما تم استبدال الحمض الأميني 201 في GAA بليوسين أو تيروسين، كان التحويل من صورة 76 - إلى 70 كيلو دالتون أكثر كفاءة بشكل كبير مقارنة بالنوع البري (الشكل 3ب، الممرات 2-7). يبدو أن استبدال الحمض الأميني يسبب تشكيل مركب وسيط جديد يبلغ ~ 82 كيلو دالتون، كما يتضح من العلامة النجمية (الشكل 3ب). في الناقل تم فقط (الشكل 3، المسار 8)، تحميل تسع أضعاف من ناتج تحليل الخلية لتصوير GAA الداخلي مقارنة بنواتج التحليل من خلايا 293T التي تم نقل العدوى إليها انتقالياً.

[070] لتمييز معدل معالجة GAA النوع البري مقارنة بـ GAA (H201L)، تم إجراء تجربة التقاط النبض. تم تعليم سلالات الخلية CHO المستقرة التي تعبر عن كل GAA اشعاعياً لمدة 2 ساعتين باستخدام $Tran^{35}S$ ومتابعته للمرات التي تم توضيحها باستخدام أوساط لا تشتمل على علامة (الشكل رقم 4). تمت تنقية rhGAA من نواتج تحليل الخلية بواسطة Con A يليه الكبت المناعي كما هو موضح في المثال رقم 1. كان الزمن صفر عبارة عن الزمن بعد مرور ساعتين من النبض. عند النقطة الزمنية 55 ساعة، تمت معالجة GAA(H201L) بالكامل إلى الصورة 70 كيلو دالتون، بينما تمت معالجة القليل جداً من GAA من النوع البري إلى الصورة 70 كيلو دالتون بعد 120 ساعة. ولوحظت أنواع 95 كيلو دالتون في الخلايا التي تعبر عن GAA من النوع البري لكنها لم تكن موجودة في H201L. تم تمييز هوية الوسيط 95 كيلو دالتون مسبقاً (Moreland et al., 2005) ويتم وصفه في الشكل رقم 1.

[071] لتحديد ما إذا كان rhGAA(H201L) يخضع لمعالجة متسارعة في دراسات الامتصاص، تمت تنقية الصورة التي تم إفرازها من rhGAA(H201L) و rhGAA(WT) من سلالات خلية CHO لنتائج عودة الارتباط الجيني المستقرة. تم إجراء دراسات الامتصاص في الخلايا الليفية لمرض Pompe

لأنها تعاني من نقص في GAA (الشكل رقم 5). كما هو موضح في المثال 1، تم تحضين الخلايا الليفية لـ Pompe التي تفتقر إلى GAA (GM00248) مع 250 نانو متر من rhGAA (WT) و rhGAA (H201L). عند نقطة زمنية معينة تم تجميع الخلايا الليفية وتجميدها عند -80 درجة مئوية. تم استشعار بقعة ويسترن SDS-PAGE المنخفضة (7.5% من أكريلاميد) من نواتج تحليل الخلية باستخدام الجسم المضاد وحيد النسيلة إلى GAA البشري (تستقر القمة اللاصقة غير المعروفة الخاصة به داخل الأحماض الأمينية 204-782). بعد امتصاص GAA، كانت الصور التي تبلغ 95 كيلو دالتون و 76 كيلو دالتون بارزة لـ rhGAA(WT) ولم تتم ملاحظتها لـ rhGAA(H201L) (الشكل رقم 5، والممرات 5-13). اجتمع مع الفرق في المعالجة مرة أخرى مظهر المركب الوسيط الذي يبلغ ~ 82 كيلو دالتون مع GAA (H201L).

10 [072] لتمييز المركب الوسيط الذي يبلغ ~ 82 كيلو دالتون، تم استشعار بقعة ويسترن التي تحتوي على rhGAA المنقى، GAA المشيمي، و rhGAA(H201L) باستخدام الجسم المضاد لمضاد GAA الذي يتعرف على الأحماض الأمينية 183-200 (وبالتالي يرتبط بجزء يبلغ 10.4 كيلو دالتون تم إطلاقه من GAA تمت معالجته بشكل كامل) (الشكل 6أ). تمت تنقية rhGAA، GAA المشيمي، و rhGAA(H201L) الناضج كما هو موضح في المثال رقم 1. لا تزال أنواع تبلغ 15 76 كيلو دالتون من المشيمة تشتمل على الأحماض الأمينية 183-200، كما يتضح بواسطة الارتباط بالجسم المضاد. في المقابل، لا يشتمل المركب الوسيط الذي يبلغ 82 كيلو دالتون على هذه الأحماض الأمينية، كما يتضح من نقص الارتباط بالجسم المضاد. يرجع ذلك إلى أن انقسام موقع التعرف على الجسم المضاد قد حدث بالفعل، كما يتضح من المجموعة التي تبلغ ~ 10 كيلو دالتون في المسار 3. أوضح جسم مضاد وحيد النسيلة منفصل لـ GAA وجود مركب وسيط يبلغ 82 كيلو دالتون في عينة من rhGAA(H201L) (الشكل رقم 6ب).

[073] يمكن استنتاج أن المركب الوسيط الذي يبلغ 82 كيلو دالتون ينتج من تحلل البروتين السريع في موقع الانقسام بين الأحماض الأمينية 200-204. يتم الانقسام قبل الانقسام بين الأحماض الأمينية 782-792. كما هو مبين في الشكل رقم 6 أ، لا يحتوي بولي بيتيد يبلغ 82 كيلو دالتون على جزء يبلغ ~ 10 كيلو دالتون من الأحماض الأمينية 122-200. تقترح هذه النتائج مسار معالجة بديل ل rhGAA(H201L) كما هو مبين في الشكل رقم 7. تتباعد معالجة النوع البري مقابل GAA(H201L) بعد المركب الوسيط الذي يبلغ 95 كيلو دالتون. ينقسم GAA بالقرب من نهاية الكربوكسيل (بين الأحماض الأمينية 781-792) لإعطاء مركب وسيط يبلغ 76 كيلو دالتون بينما ينقسم GAA(H201L) بين الأحماض الأمينية 200-204 لإعطاء مركب وسيط يبلغ 82 كيلو دالتون وسيطة. يسفر كلا المسارين في النهاية عن GAA ناضج يبلغ 70 كيلو دالتون.

5

10

[074] ستتضح نماذج أخرى من الكشف الحالي لهؤلاء المهرة في المجال عند أخذ المواصفة وتطبيق النماذج التي تم الكشف عنها في هذه الوثيقة في الاعتبار. يقصد بالمواصفة والأمثلة أن تكون على سبيل المثال فقط.

15

<110> GENZYME CORPORATION

<120> MODIFIED ACID ALPHA GLUCOSIDASE WITH ACCELERATED PROCESSING

5

<130> 07680.0072-00304

<150> US61/478,336

<151> 2011-04-22

<160> 4

<170> PatentIn version 3.5

15

<210> 1

<211> 952

<212> PRT

<213> Homo sapiens

20

<400> 1

Met Gly Val Arg His Pro Pro Cys Ser His Arg Leu Leu Ala Val Cys
1 5 10 15
25

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

30

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

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

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

Gln Cys Asp Val Pro Pro Asn Ser Arg Phe Asp Cys Ala Pro Asp Lys
85 90 95
45

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

50

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

Phe Pro Pro Ser Tyr Pro Ser Tyr Lys Leu Glu Asn Leu Ser Ser Ser
 130 135 140
 5

Glu Met Gly Tyr Thr Ala Thr Leu Thr Arg Thr Thr Pro Thr Phe Phe
 145 150 155 160
 10

Pro Lys Asp Ile Leu Thr Leu Arg Leu Asp Val Met Met Glu Thr Glu
 165 170 175
 15

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

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

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

Gln Leu Asp Gly Arg Val Leu Leu Asn Thr Thr Val Ala Pro Leu Phe
 225 230 235 240
 30

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

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

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

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

Gly Ser Ala His Gly Val Phe Leu Leu Asn Ser Asn Ala Met Asp Val
 305 310 315 320
 50

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

325 330 335

Leu Asp Val Tyr Ile Phe Leu Gly Pro Glu Pro Lys Ser Val Val Gln
 5340 345 350

Gln Tyr Leu Asp Val Val Gly Tyr Pro Phe Met Pro Pro Tyr Trp Gly
 355 360 365
 10

Leu Gly Phe His Leu Cys Arg Trp Gly Tyr Ser Ser Thr Ala Ile Thr
 370 375 380
 15

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

20

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

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

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

Ser Gly Pro Ala Gly Ser Tyr Arg Pro Tyr Asp Glu Gly Leu Arg Arg
 450 455 460
 35

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

40

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

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

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

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

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

Ser His Gln Phe Leu Ser Thr His Tyr Asn Leu His Asn Leu Tyr Gly
 10 565 570 575

Leu Thr Glu Ala Ile Ala Ser His Arg Ala Leu Val Lys Ala Arg Gly
 580 585 590
 15

Thr Arg Pro Phe Val Ile Ser Arg Ser Thr Phe Ala Gly His Gly Arg
 595 600 605
 20

Tyr Ala Gly His Trp Thr Gly Asp Val Trp Ser Ser Trp Glu Gln Leu
 610 615 620
 25

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

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

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

Asn His Asn Ser Leu Leu Ser Leu Pro Gln Glu Pro Tyr Ser Phe Ser
 675 680 685
 40

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

45
 Leu Leu Pro His Leu Tyr Thr Leu Phe His Gln Ala His Val Ala Gly
 705 710 715 720

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

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

5

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

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

Ser Leu Pro Pro Pro Pro Ala Ala Pro Arg Glu Pro Ala Ile His Ser
 785 15 790 795 800

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

20

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

25

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

30

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

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

Arg Asn Asn Thr Ile Val Asn Glu Leu Val Arg Val Thr Ser Glu Gly
 40 885 890 895

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

45

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

50

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

Glu Gln Phe Leu Val Ser Trp Cys

945 950

5

<210> 2

<211> 18

<212> PRT

<213>1 Homo sapiens

<400> 2

Gln Gln Gly Ala Ser Arg Pro Gly Pro Arg Asp Ala Gln Ala His Pro

1 15 5 10 15

Gly Arg

20

<210> 3

<211> 16

<212> PRT

<213>2 Homo sapiens

<400> 3

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

1 30 5 10 15

<210> 4

<211> 18

<212>3 PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Ile Ly40 Asp Pro Ala Asn Arg Arg Tyr Glu Val Pro Leu Glu Thr Pro

1 5 10 15

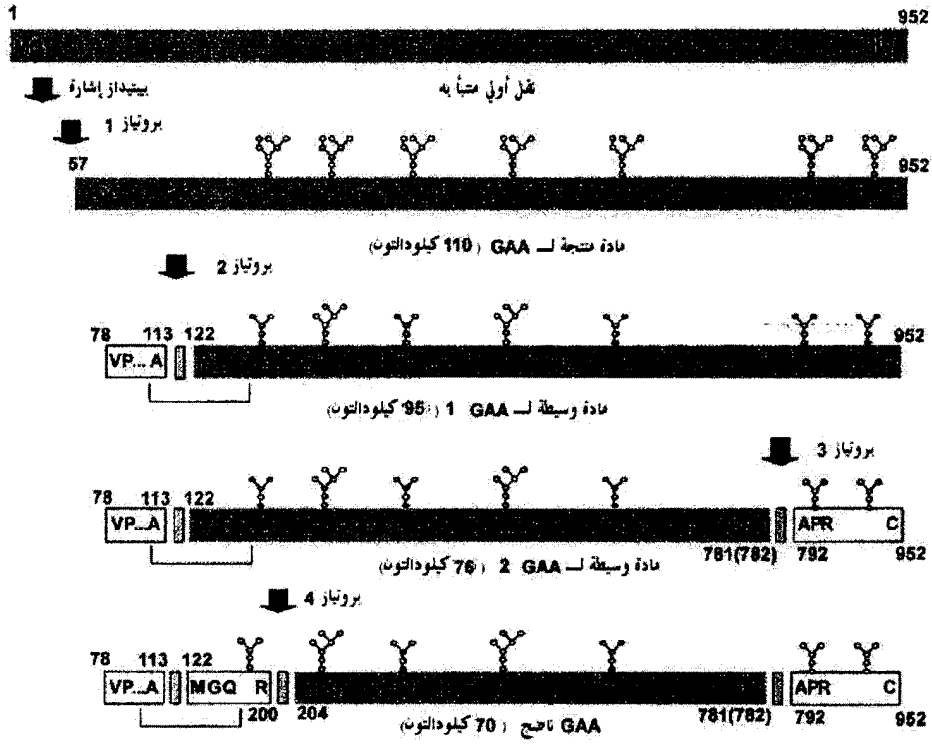
Arg Val

45

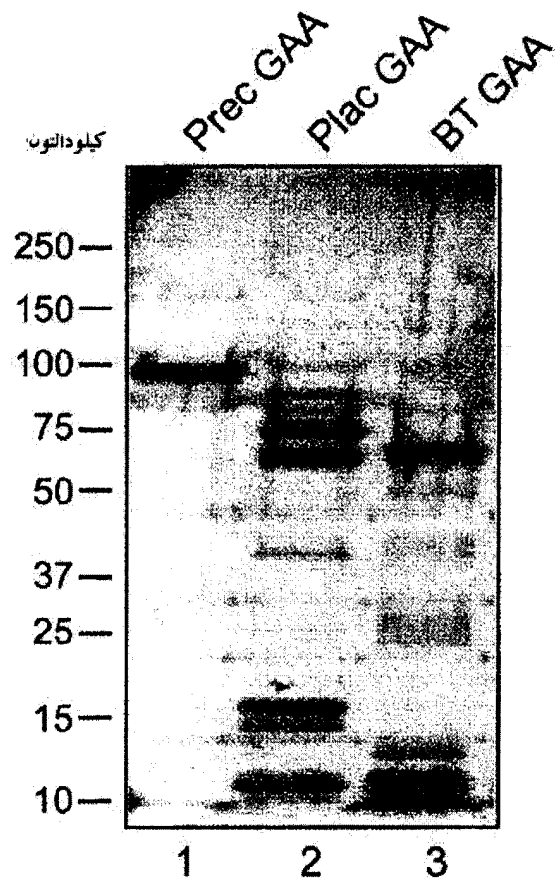
عناصر الحماية

- 1- بولي بيتيد يتضمن جلوكوسيداز- ألفا من حمض بشري أو شظية نشطة حفزياً منه بما
تعديل عند أو بالقرب من موضع المعالجة 70 كيلودالتون عند الطرف N. 2
- 2- البولي بيتيد وفقاً لعنصر الحماية 1، حيث يتضمن التعديل:
1
(أ) تعديل يزيد من عدم الألفة للماء عند أو بالقرب من موضع المعالجة 70 كيلودالتون عند
2
الطرف N؛ 3
- (ب) تعديل لواحد أو أكثر من الأحماض الأمينية المناظرة للمواضع 195-209 للمتواليه
4
رقم: 1؛ 5
- (ج) تعديل لواحد أو أكثر من الأحماض الأمينية المناظرة للمواضع 200-204 للمتواليه
6
رقم: 1؛ 7
- (د) تعديل في الحمض الأميني المناظر للموضع 201 من المتواليه رقم: 1؛ 8
- (هـ) استبدال لواحد أو أكثر من الأحماض الأمينية بحمض أميني غير ألف للماء بصورة أكثر؛
9
أو 10
- (و) إدخال واحد أو أكثر من الأحماض الأمينية غير ألف للماء. 11
- 3- البولي بيتيد وفقاً لعنصر الحماية 1 أو 2، حيث يتضمن البولي بيتيد:
1
(أ) تطابق مقداره 80% على الأقل مع 500 من أحماض أمينية على الأقل من المتواليه رقم:
2
1؛ 3
- (ب) تطابق مقداره 90% على الأقل مع 500 من أحماض أمينية على الأقل من المتواليه
4
رقم: 1؛ أو 5
- (ج) تطابق مقداره 95% على الأقل مع 500 من أحماض أمينية على الأقل من المتواليه
6
رقم: 1. 7

- 1 4- البولي بيتيد وفقاً لأي من عناصر الحماية من 1 إلى 3، حيث يتم اختيار الشظية من
- 2 70 كيلو دالتون، 76 كيلو دالتون، 82 كيلو دالتون، 95 كيلو دالتون، أو أي شظية نشطة
- 3 حفزياً أخرى من جلوكوسيداز- ألفا من حمض بشري.
- 1 5- البولي بيتيد وفقاً لأي من عناصر الحماية من 1 إلى 4، حيث
- 2 (أ) البولي بيتيد يظهر معالجة بروتياز للحسيمات الحالة أكثر سرعة عند مقارنتها
- 3 بجلوكوسيداز- ألفا من حمض بشري غير معدل؛
- 4 (ب) تتم معالجة 50% على الأقل من البولي بيتيد بشكل حال للبروتين لتكون في صورة
- 5 70 كيلو دالتون في غضون 20 ساعة من الإعطاء؛ أو
- 6 (ج) تتم معالجة جميع البولي بيتيد بشكل كبير بشكل حال للبروتين ليكون في صورة 70
- 7 كيلو دالتون في غضون 55 ساعة من الإعطاء.
- 1 6- حمض نووي يشفر بولي بيتيد مختار من أي من عناصر الحماية من 1-5.
- 1 7- خلية عائلة تم نقل العدوى إليها بشكل ثابت بالحمض النووي وفقاً لعنصر الحماية 6.
- 1 8- طريقة لتقليل أو منع تراكم الجليكوجين في النسيج، تتضمن إعطاء كمية فعالة من البولي
- 2 بيتيد وفقاً لأي من عناصر الحماية من 1 إلى 5 لمريض بحاجة له.
- 1 9- تركيبة صيدلانية تتضمن بولي بيتيد وفقاً لأي من عناصر الحماية من 1 إلى 5
- 2 للاستخدام في علاج مرض تخزين الجليكوجين.
- 1 10- استخدام بولي بيتيد وفقاً لأي من عناصر الحماية من 1 إلى 5 في تصنيع دواء لتقليل
- 2 أو منع تراكم الجليكوجين في النسيج.



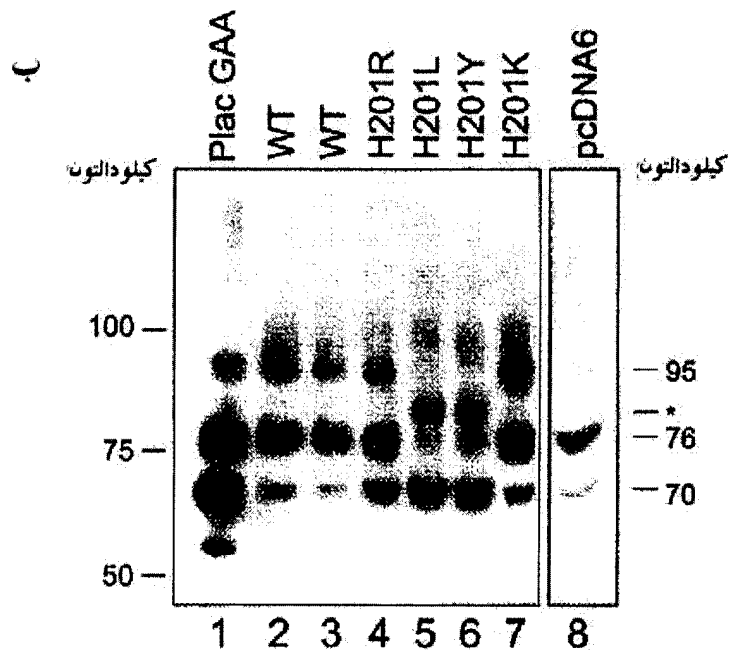
الشكل 1



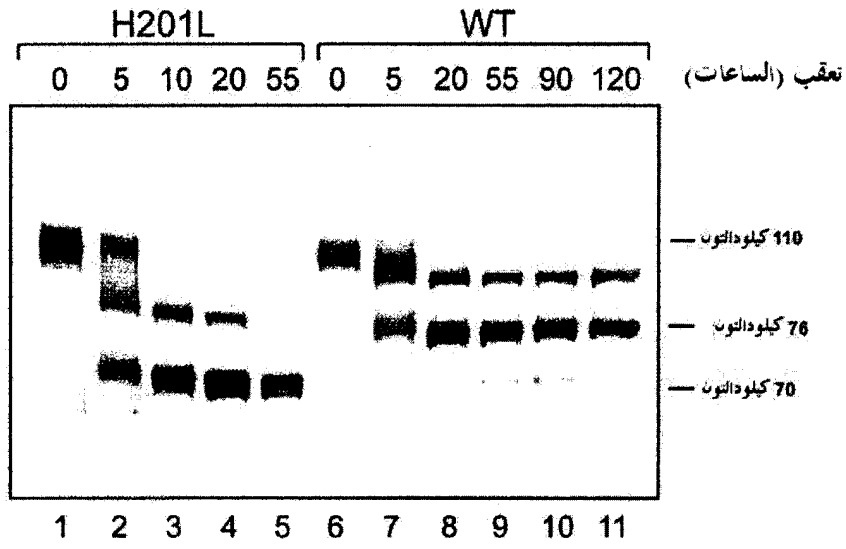
الشكل 2

201
|
197 206

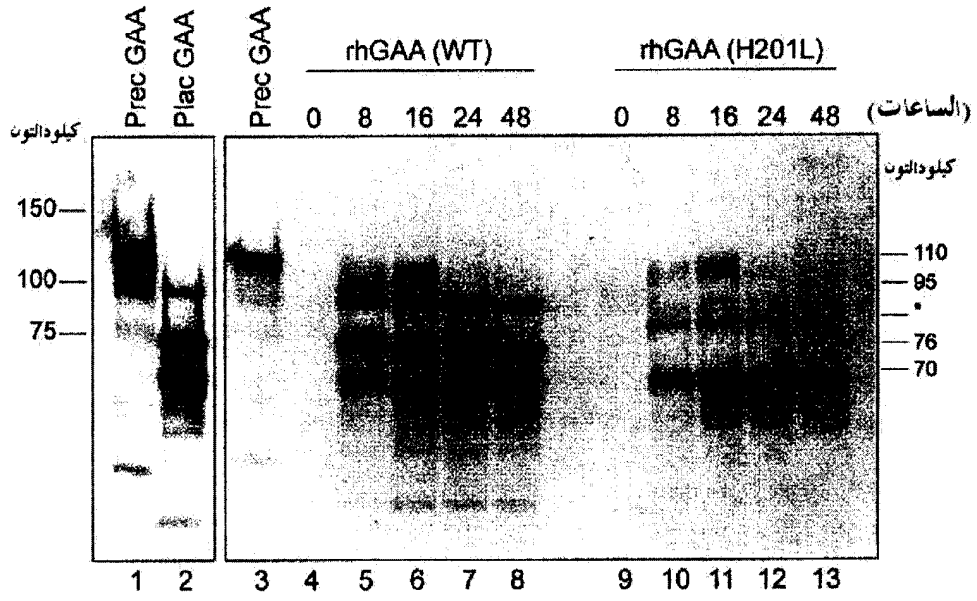
بشري TPRVHSRAPS
 فاري TPRVLSQAPS
 هامستر TPRVLSRAPS
 بقري TPRVYSQAPF



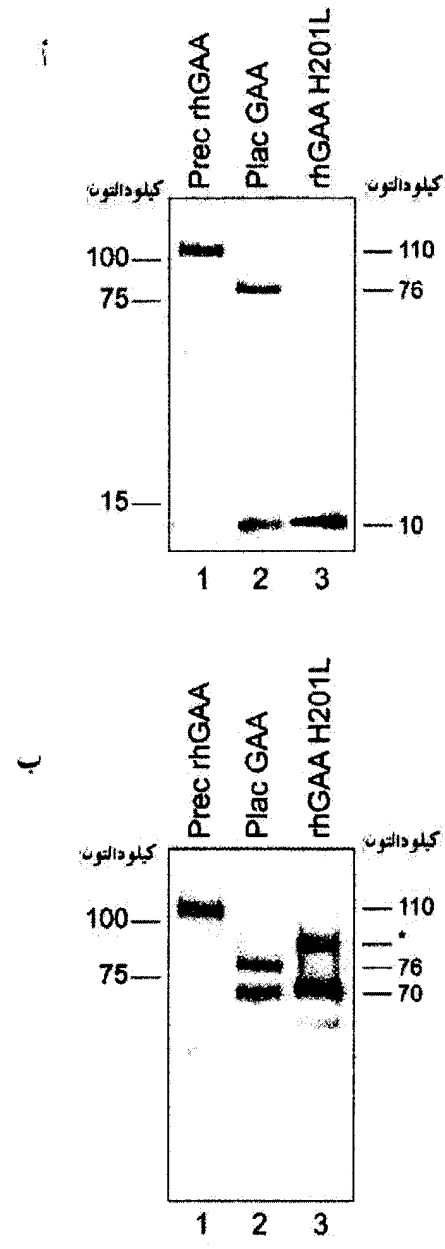
الشكل 3



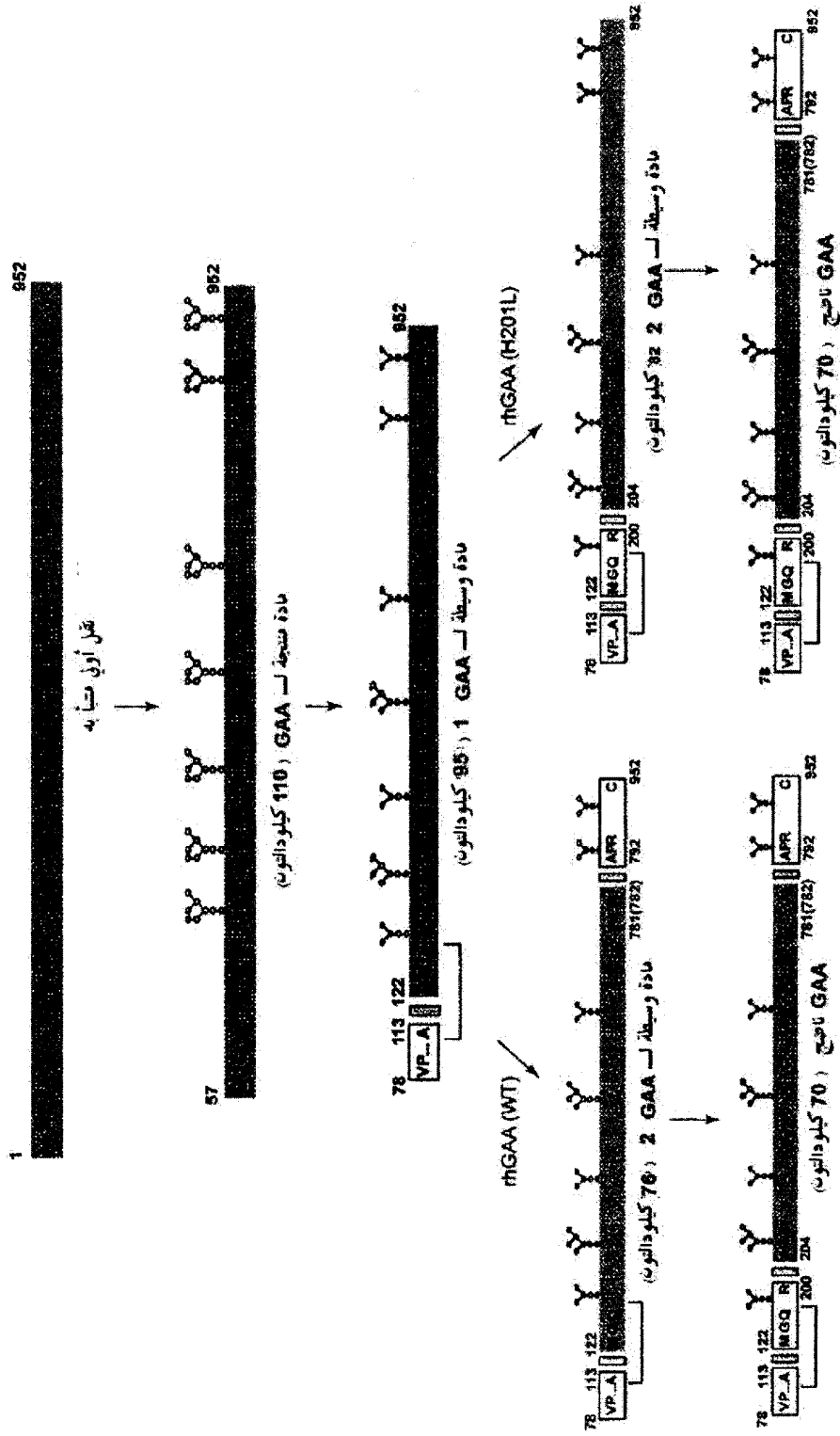
الشكل 4



الشكل 5



الشكل 6



الشكل 7