

TÍTULO DE LA INVENCIÓN

ALFA-GLUCOSIDASA ÁCIDA MUY POTENTE CON

HIDRATOS DE CARBONO POTENCIADOS

REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS

5 Esta solicitud reivindica el beneficio de prioridad de la solicitud Provisional de EE.UU. 62/057,842, presentada el 30 de septiembre de 2014, la solicitud Provisional de EE.UU. 62/057,847, presentada el 30 de septiembre de 2014, la solicitud Provisional de EE.UU. 62/112,463, presentada el 5
10 de febrero de 2015, y la solicitud Provisional de EE.UU. 62/135,345, presentada el 19 de marzo de 2015, cada una de las cuales se incorpora como referencia en su totalidad.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

Campo de la Invención

15 La presente invención comprende los campos de la medicina, genética y bioquímica de glucoproteínas recombinante y, específicamente, se refiere a composiciones de alfa glucosidasa humana recombinante (rhGAA) que tienen un alto contenido total de glicanos portadores de manosa 6-
20 fosfato que fijan eficientemente como objetivo CIMPR en células de la musculatura y posteriormente suministran rhGAA a los lisosomas en donde pueden descomponer niveles anormalmente elevados de glucógeno acumulado. La rhGAA de la invención exhibe una fijación superior como objetivo a

células de la musculatura y el posterior suministro a lisosomas en comparación con productos de rhGAA convencionales y exhibe otras propiedades farmacocinéticas que la hacen particularmente efectiva para la terapia de reemplazo de enzimas de sujetos que tienen la enfermedad de Pompe.

DESCRIPCIÓN DE LA TÉCNICA RELACIONADA

Las terapias de reemplazo de enzimas existentes para la Enfermedad de Pompe utilizan productos de rhGAA convencionales que tienen un bajo contenido total en glicanos portadores de M6P y bis-M6P. Productos convencionales son conocidos bajo los nombres Lumizyme®, Myozyme® y Alglucosidasa alfa. "Lumizyme" y "Myozyme" son formas convencionales de rhGAA producidas o comercializadas como productos biológicos por Genzyme y aprobadas por la U.S. Food and Drug Administration y se describen como referencia a *Physician's Desk Reference* (2014) (que se incorpora con ello como referencia) o por los productos denominados "Lumizyme®" o "Myozyme®", aprobados para uso en los Estados Unidos por la FDA desde el 1 de octubre de 2014. Alglucosidasa Alfa se identifica como el nombre químico [199-arginina,223-histidina]prepro- α -glucosidasa (humana); fórmula molecular, C₄₇₅₈H₇₂₆₂N₁₂₇₄O₁₃₆₉S₃₅; número CAS 420794-05-0. Estos productos se administran a sujetos con la Enfermedad de Pompe, también

conocida como enfermedad de almacenamiento de glucógeno tipo II (GSD-II) o enfermedad de deficiencia de maltasa ácida. La terapia de reemplazo de enzimas busca tratar la Enfermedad de Pompe reemplazando la GAA ausente en lisosomas administrando
5 rhGAA, restableciendo así la capacidad de la célula de descomponer el glucógeno lisosomal.

La enfermedad de Pompe es una enfermedad de almacenamiento lisosomal hereditaria que resulta de una deficiencia en la actividad de α -glucosidasa ácida (GAA). Una
10 persona que padece la Enfermedad de Pompe carece de o tiene niveles reducidos de alfa-glucosidasa ácida (GAA), cuya enzima descompone el glucógeno, y una sustancia que el cuerpo utiliza como una fuente de energía. Esta deficiencia enzimática provoca una acumulación en exceso de glucógeno en
15 los lisosomas, que son organelas intra-celulares que contienen enzimas que habitualmente descomponen el glucógeno y otros desechos o productos residuales celulares. La acumulación de glucógeno en determinados tejidos de un sujeto que padece la Enfermedad de Pompe, especialmente los
20 músculos, afecta a la capacidad de las células a funcionar normalmente. En la enfermedad de Pompe, el glucógeno no es metabolizado adecuadamente y se acumula progresivamente en los lisosomas, especialmente en las células del músculo esquelético, en la forma de brote infantil de la enfermedad,

en células del músculo cardíaco. La acumulación de glucógeno lesiona las células del músculo y nerviosas, así como en otros tejidos afectados.

Tradicionalmente, dependiendo de la edad del brote, la enfermedad de Pompe se reconoce clínicamente como una forma infantil temprana o como una forma de brote tardía. La edad del brote tiende a ir en paralelo con la gravedad de la mutación genética que provoca la Enfermedad de Pompe. Las mutaciones genéticas más graves provocan una pérdida completa de la actividad de GAA, manifiesta como un brote temprano de la enfermedad durante la infancia. Mutaciones genéticas que disminuyen la actividad de GAA, pero que no la eliminan por completo, están asociadas con formas de la enfermedad de Pompe que tienen un brote y un progreso retardado. El brote infantil de la enfermedad de Pompe se manifiesta poco después del nacimiento y se caracteriza por una debilidad muscular, insuficiencia respiratoria e insuficiencia cardíaca. Si no es tratada, es habitualmente mortal en el espacio de dos años. El brote de la enfermedad de Pompe en jóvenes y adultos se manifiesta más tarde en la vida y habitualmente progresa más lentamente que la enfermedad de brote infantil. Esta forma de la enfermedad, aunque generalmente no afecta al corazón, puede resultar en la muerte debido al debilitamiento

de los músculos esqueléticos y de los implicados en la respiración.

El tratamiento actual no paliativo de la enfermedad de Pompe implica la terapia de reemplazo enzimático (ERT) utilizando GAA humana recombinante (rhGAA) tal como Lumizyme® o Myozyme®. La rhGAA se administra en un intento de reemplazar o complementar la GAA ausente o defectuosa en un sujeto que padece la Enfermedad de Pompe. Sin embargo, dado que la rhGAA en productos de rhGAA convencionales no fija como objetivo el tejido muscular, no se elimina de forma productiva después de la administración.

Esto se produce debido a que las rhGAAs convencionales carecen de un contenido total elevado de glicanos portadores de M6P y de bis-M6P que fijan como objetivo una molécula de rhGAA al CIMPR en las células de la musculatura dianas en donde subsiguientemente son transportadas a los lisosomas de las células. Esta captación celular de rhGAA para la terapia de reemplazo enzimática se facilita por el hidrato de carbono especializado, manosa-6-fosfato (M6P), que se une al receptor de manosa-6-fosfato catión independiente (CIMPR) presente en las superficies de las células para el subsiguiente suministro de la enzima exógena a lisosomas.

Existen siete sitios potenciales de glicosilación ligada a N en la rhGAA. Dado que cada uno de los sitios de

glicosilación es heterogéneo en el tipo de oligosacáridos ligados a N (N-glicanos) presentes, la rhGAA consiste en una mezcla compleja de proteínas con N-glicanos que tienen afinidades de unión variables para el receptor de M6P y otros receptores de hidratos de carbono. rhGAA, que contiene un alto contenido en manosa *N*-glicanos que tiene un grupo M6P (mono-M6P), se une a CIMPR con una baja afinidad ($\sim 6,000$ nM), mientras que rhGAA que contiene dos grupos M6P en el mismo N-glicano (bis-M6P) se une con una afinidad alta (~ 2 nM). En la Fig. 1A se muestran estructuras representativas de glicanos no fosforilados, mono-M6P y bis-M6P. El grupo manosa-6-P se muestra en la Fig. 1B. Una vez dentro del lisosoma, rhGAA puede degradar enzimáticamente el glucógeno acumulado. Sin embargo, rhGAAs convencionales tienen bajas concentraciones totales de glicanos portadores de M6P y bis-M6P y, por lo tanto, las células de la musculatura dianas dan malamente como resultado un suministro inferior de rhGAA a los lisosomas. La mayoría de las moléculas de rhGAA en estos productos convencionales no tienen N-glicanos fosforilados, careciendo por ello de afinidad por el CIMPR. Glicanos no fosforilados de alto contenido en manosa también pueden ser aclarados por el receptor de manosa, que resulta en el aclaramiento no productivo de la ERT (Fig. 2).

Los otros tipos de N-glicanos, hidratos de carbono complejos, que contienen galactosa y ácido siálico, también están presentes en la rhGAA. Dado que los N-glicanos complejos no están fosforilados, no tienen afinidad por el CIMPR. Sin embargo, N-glicanos de tipo complejo con residuos galactosa expuestos tienen una afinidad de moderada a elevada por el receptor de asialoglicoproteína en los hepatocitos del hígado, lo cual conduce a un rápido aclaramiento no productivo de rhGAA (Fig. 2).

La glicosilación de GAA o rhGAA puede ser modificada enzimáticamente *in vitro* por la fosfotransferasa y enzimas de descubrimiento descritas por Canfield, et al., patente de EE.UU. N° 6,534,300, para generar grupos M6P. La glicosilación enzimática no puede ser controlada adecuadamente y produce rhGAA que tiene propiedades inmunológicas y farmacológicas indeseables. rhGAA enzimáticamente modificada puede contener sólo N-glicanos con alto contenido en manosa que todos podrían ser fosforilados enzimáticamente en potencia *in vitro* con una fosfotransferasa/enzima de descubrimiento y puede contener una media de 5-6 grupos M6P por cada GAA. Los modelos de glicosilación producidos por el tratamiento enzimático *in vitro* de GAA son problemáticos debido a los residuos manosa terminales adicionales, particularmente residuos manosa

terminales no fosforilados que afectan negativamente a la farmacocinética de la rhGAA modificada. Cuando un producto enzimáticamente modificado de este tipo se administra *in vivo*, estos grupos manosa aumentan el aclaramiento no productivo de la GAA, aumentan la absorción de la GAA enzimáticamente modificada por parte de células inmunes y reducen la eficacia terapéutica de rhGAA debido a menos de los tejidos fijados como objetivo tales como miocitos del músculo cardíaco o esquelético. Por ejemplo, residuos manosa no fosforilados terminales son conocidos ligandos para los receptores de manosa en el hígado y el bazo, lo cual conduce a un rápido aclaramiento de la rhGAA enzimáticamente modificada y a una fijación como objetivo reducida de rhGAA al tejido diana. Además de ello, el modelo de glicosilación de GAA enzimáticamente modificada que tiene N-glicanos con alto contenido en manosa con residuos manosa no fosforilados terminales se asemeja a las glicoproteínas producidas en levaduras, mohos y actúan aumentando el riesgo de desencadenar respuestas inmunes o alérgicas tales como reacciones alérgicas (anafilácticas) graves o de hipersensibilidad que amenazan la vida, debido a la rhGAA enzimáticamente modificada.

Tal como se ha explicado antes, productos de rhGAA convencionales tales como Lumizyme® tienen bajas

concentraciones de glicanos mono-fosforilados e incluso más bajas de glicanos bis-fosforilados. Con el fin de que una terapia de la enfermedad de Pompe sea eficaz, la rhGAA debe ser suministrada a los lisosomas en las células de la

5 musculatura. La baja cantidad total de grupos que fijan como objetivo mono-M6P y bis-M6P en rhGAA convencional limita la absorción celular vía el suministro de CIMPR y lisosomal, haciendo así ineficiente una terapia de reemplazo enzimático convencional. Por ejemplo, mientras que productos de rhGAA

10 convencionales a 20 mg/kg o dosis mayores mejoran algunos aspectos de la enfermedad de Pompe, no son capaces de reducir adecuadamente el glucógeno acumulado en muchos tejidos dianas, particularmente músculos esqueléticos para un progreso inverso de la enfermedad.

15 Debido a la ineficacia de suministrar terapias de reemplazo enzimático convencionales a lisosomas, tales terapias están a menudo asociadas con otros problemas, incluyendo la generación de respuestas inmunes a GAA. Una gran parte de la GAA en una rhGAA convencional no contiene

20 glicanos que portan mono- o bis-M6P, que fijan como objetivo la rhGAA a células de la musculatura. Un sistema inmunológico de un sujeto está expuesto a este exceso de GAA no fosforilado y puede generar respuestas inmunes perjudiciales que reconocen la GAA. La inducción de respuestas inmunes a la

GAA no fosforilada que no penetra en los tejidos dianas no se suministra a los lisosomas aumenta el riesgo de fracaso del tratamiento debido a la inactivación inmunológica de la rhGAA administrada y aumenta el riesgo del paciente a experimentar reacciones auto-inmunes o alérgicas perjudiciales al tratamiento de la rhGAA. La rhGAA de acuerdo con la invención contiene significativamente menos de esta rhGAA no fijada como objetivo y no fosforilada, reduciendo así su exposición al sistema inmunológico de un paciente.

Desde el punto de vista logístico, dosis mayores imponen cargas adicionales al sujeto, así como a los profesionales médicos que tratan al sujeto tal como alargando el tiempo de infusión necesario para administrar rhGAA por vía intravenosa. Esto se debe a que la rhGAA convencional contiene un mayor contenido de rhGAA no fosforilada que no fija como objetivo el CIPMR en células de la musculatura. rhGAA que no se une al CIMPR en células de la musculatura y que luego penetra en los lisosomas no degrada glucógeno enzimáticamente allí. Cuando se administran dosis equivalentes de una rhGAA convencional y la rhGAA de acuerdo con la invención, más rhGAA en la composición de acuerdo con la invención une CIPMR a las células de la musculatura y luego se suministra al lisosoma. La rhGAA de la invención proporciona a un doctor la opción de administrar una menor

cantidad de rhGAA al tiempo que suministra la misma o más rhGAA al lisosoma.

Los actuales procedimientos de producción para producir rhGAA convencional tal como Myozyme®, Lumizyme® o

5 Alglucosidasa alfa, no han aumentado significativamente el contenido de M6P o bis-M6P , debido a que el procesamiento de hidratos de carbono celulares es por naturaleza complejo y extremadamente difícil de manipular. A la vista de estas deficiencias de los productos de rhGAA convencionales, los
10 autores de la invención buscaron diligentemente e identificaron modos de fijar eficazmente como objetivo rhGAA a células de la musculatura y suministrarla al lisosoma, minimizar el aclaramiento no productivo de rhGAA una vez administrada y, por lo tanto, fijar más productivamente como
15 objetivo rhGAA a tejido muscular.

BREVE SUMARIO DE LA INVENCION

En respuesta a los problemas asociados con la fijación como objetivo y la administración de formas convencionales de rhGAA y a las dificultades asociadas con la producción de
20 formas bien fijadas como objetivo de rhGAA de este tipo, los autores de la invención han investigado y desarrollado procesos para producir rhGAA que fijen más eficazmente como objetivo el CIMPR y lo suministren a los lisosomas en tejidos musculares, ya que tiene un mayor contenido de M6P- y bis-

M6P-glicano que las composiciones convencionales de rhGAA.

Además de ello, la rhGAA de la invención tiene N-glicanos de tipo complejo bien procesados que minimizan el aclaramiento no productivo de la rhGAA por parte de tejidos no diana.

5 Teniendo en cuenta los problemas asociados con los actuales tratamientos de reemplazo de enzimas utilizando productos de rhGAA convencionales, tales como Lumizyme®, a través de un estudio y una investigación diligentes han desarrollado un método para producir rhGAA en células CHO que
10 tienen un contenido total significativamente mayor de mono-M6P y bis-M6P glicanos que fijan como objetivo el CIMPR en células de la musculatura y luego suministran la rhGAA a los lisosomas.

La rhGAA producida por este método tiene también
15 propiedades farmacocinéticas ventajosas en virtud de su modelo de glicosilación global que aumenta la absorción de tejido diana y disminuye el aclaramiento no productivo tras la administración a un sujeto que padece la Enfermedad de Pompe. Los autores de la invención demuestran que la rhGAA de
20 la invención, tal como se ejemplifica por la rhGAA designada como ATB-200, es más potente en fijar como objetivo tejidos musculares del esqueleto que la rhGAA convencional tal como Lumizyme®. La rhGAA de acuerdo con la invención tiene una capacidad superior de fijar productivamente como objetivo

tejidos musculares diana en pacientes que padecen la Enfermedad de Pompe y reducen el aclaramiento no productivo de rhGAA tal como se ilustra por la Fig. 2.

La rhGAA superior de acuerdo con la invención puede completarse o combinarse adicionalmente con chaperonas o conjugarse a otros grupos que fijan como objetivo el CIMPR en tejido muscular tales como porciones de IGF2 que se unen a este receptor. Los Ejemplos que figuran más adelante demuestran que la rhGAA de la invención, ejemplificada por la rhGAA ATB-200, supera el patrón existente de cuidados para la terapia de reemplazo de enzimas, proporcionando un aclaramiento de glucógeno significativamente mejor en la musculatura del esqueleto en comparación con el régimen existente utilizando el producto de rhGAA convencional Lumizyme®.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Este expediente de solicitud contiene al menos un dibujo ejecutado en color.

Fig. 1 La Fig. 1A muestra un glicano no fosforilado, con alto contenido en manosa, un mono-M6P glicano y un bis-M6P glicano. La Fig. 1B muestra la estructura química del grupo M6P.

Fig. 2 La Fig. 2A describe la fijación productiva como objetivo de rhGAA a través de glicanos que portan M6P a

tejidos diana (p. ej., tejidos musculares de un sujeto con Enfermedad de Pompe). La Fig. 2B describe el aclaramiento no productivo de fármacos a tejidos no diana (*p.ej.*, hígado y bazo) o por la unión de glicanos no M6P a los tejidos dianas.

5 Fig. 3 La Fig. 3A representa gráficamente un receptor CIMPR (también conocido como receptor de IGF2) y dominios de este receptor. La Fig. 3B es una tabla que muestra la afinidad de unión (nmolar) de glicanos que portan bis- y mono-M6P para CIMPR, la afinidad de unión de glicanos de tipo
10 con alto contenido en manosa a receptores de manosa, y la afinidad de unión de glicano complejo des-sialiado para receptores de asialoglicoproteína. RhGAA que tiene glicanos que portan M6P y bis-M6P pueden unirse productivamente a CIMPR en células diana de la musculatura. RhGAA tiene
15 glicanos con alto contenido en manosa y los glicanos des-sialiados no pueden unirse productivamente a células no diana que portan los correspondientes receptores.

Fig. 4 Las Figs. 4A y 4B, respectivamente, muestran los resultados de la cromatografía de afinidad del CIMPR de
20 Lumizyme® y Myozyme®. Las líneas punteadas se refieren al gradiente de elución de M6P. La elución con M6P desplaza moléculas de GAA unidas a través de un glicano con contenido en M6P a CIMPR. Tal como se muestra en la Fig. 4A, el 78% de la actividad de GAA en Lumizyme® se eluyó antes de la adición

a M6P. La Fig. 4B muestra que el 73% de la actividad de GAA en Myozyme® se eluyó antes de la adición a M6P. Sólo el 22% o el 27% de la rhGAA en Lumizyme® o Myozyme, respectivamente, se eluyó con M6P. Estas figuras demuestran que la mayoría de la rhGAA en estos dos productos de rhGAA convencionales carecen de glicanos que tienen la M6P necesaria para fijar como objetivo CIMPR en tejidos del músculo diana.

Fig. 5 Una construcción de ADN para transformar células CHO con ADN que codifica rhGAA. Células CHO se transformaron con una construcción de ADN que codifica rhGAA (SEQ ID NO: 4).

Fig. 6 Las Figs. 6A y 6B muestran los resultados de la cromatografía de afinidad de Myozyme y rhGAA ATB-200.. Como resulta evidente de la Fig. 6B, aproximadamente el 70% de la rhGAA en la rhGAA ATB-200 contenía M6P.

Fig. 7 Purificación de rhGGA ATB-200, Realizaciones 1 y 2.

Fig. 8 Perfiles de elución con Polywax de Lumizyme® y rhGAAs ATB-200.

Fig. 9 Sumario de las estructuras de N-glicano de Lumizyme® en comparación con tres preparaciones diferentes de rhGAA ATB200, identificadas como BP-rhGAA, ATB200-1 y ATB200-2.

Fig. 10 La Fig. 10A compara la afinidad de unión a CIMPR de rhGAA ATB-200 (trazo de la izquierda) con la de Lumizyme® (trazo de la derecha). La Fig. 10B describe el contenido en Bis-M6P de Lumizyme® y rhGAA ATB-200.

5 Fig. 11 La Fig. 11A compara la actividad de rhGAA ATB-200 (trazo de la izquierda) con la actividad de rhGAA Lumizyme® (trazo de la derecha) dentro de fibroblastos normales a diversas concentraciones de GAA. La Fig. 11B compara la actividad de rhGAA ATB-200 (trazo de la izquierda)
10 con la actividad de rhGAA Lumizyme® (trazo de la derecha) dentro de fibroblastos de un sujeto que padece la Enfermedad de Pompe a diversas concentraciones de GAA. La Fig. 11C compara ($K_{\text{absorción}}$) de fibroblastos de sujetos normales y sujetos con la Enfermedad de Pompe.

15 Fig. 12 La Fig. 12A muestra la cantidad de glucógeno con relación a proteína en el músculo cardíaco después del contacto con vehículo (control negativo), con 20 mg/ml de Alglucosidasa alfa, o con 5, 10 o 20 mg/kg de rhGAA ATB-200. La Fig. 12B muestra la cantidad de glucógeno con relación a
20 proteína en el músculo cuádriceps después del contacto con vehículo (control negativo), con 20 mg/ml de Lumizyme®, o con 5, 10 o 20 mg/kg de rhGAA ATB-200. La Fig. 12C muestra la cantidad de glucógeno con relación a proteína en el músculo tríceps después del contacto con vehículo (control negativo),

con 20 mg/ml de Lumizyme®, o con 5, 10 o 20 mg/kg de rhGAA ATB-200. RhGAA ATB-200 producía reducciones significativas de glucógeno en los músculos cuádriceps y tríceps en comparación con el control negativo y en comparación con Lumizyme®.

5 Fig. 13 La estabilidad de rhGAA ATB-200 se mejora en presencia de chaperona AT2221. El primer trazo de la izquierda en la Fig. 13A muestra el porcentaje de proteína rhGAA ATB-200 no plegada a diversas temperaturas a pH 7,4 (pH de la sangre). El último trazo de la derecha muestra el
10 porcentaje de proteína rhGAA ATB-200 no plegada a diversas temperaturas a pH 5,2 (pH del lisosoma). Los tres trazos intermedios muestran los efectos de 10 µg, 30 µg o 100 µg DE CHAPERONA AT2221 sobre el plegamiento de la proteína. Estos
15 datos demuestran que AT2221 previene el no plegamiento de rhGAA ATB-200 al pH de la sangre en comparación con la muestra de control. La mejora de T_m a pH neutro por parte de AT2221 se resume en la Figura 13B.

Fig. 14 Esta tabla demuestra que la combinación de rhGAA ATB-200 y chaperona AT2221 proporcionó un aclaramiento de
20 glucógeno significativamente mejor en GAA en ratones inactivados que el tratamiento con Lumizyme® y AT2221 o controles de Lumizyme® o rhGAAs ATB200 sin la chaperona AT2221.

Fig. 15 Glucógeno residual en el músculo cuádriceps después de tratamiento con Lumizyme, rhGAA ATB-200, o rhGAA ATB-200 y diversas concentraciones de la chaperona AT2221.

Fig. 16 Mejora de la Patología del Músculo Esquelético en Ratones tratados con ATB200 + Miglustat (AT2221) frente a los tratados con ERT sólo. Tinción de glucógeno PAS (Fig. 16A) y EM (Fig. 16B) de tejido muscular de ratones KO GAA tratados con rhGAA convencional o rhGAA ATB-200 y miglustat (AT-2221). Fig. 16C; Evaluación de la proliferación lisosomal por el marcador LAMP-1. Fig. 16D Identificación de fibras musculares de Tipo I y Tipo II.

Fig. 17 Mejora de la Patología del Músculo Esquelético en Ratones tratados con ATB-200 + Miglustat (AT2221) frente a los tratados con ERT sólo. Tinción de glucógeno PAS (Fig. 17A) de tejido muscular de ratones KO GAA tratados con rhGAA convencional o rhGAA ATB-200 y miglustat (AT-2221). Fig. 17B; Evaluación de la proliferación lisosomal por el marcador LAMP-1.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Definiciones: Los términos utilizados en la presente descripción generalmente tienen los significados habituales que se les dan en la técnica, dentro del contexto de la presente invención y en el contexto específico en el que se emplea cada término. A continuación, o en cualquier otra

parte en la memoria descriptiva, se describen algunos términos o expresiones para proporcionar una orientación adicional para el especialista para describir las composiciones y métodos de la invención y cómo producirlos y
5 utilizarlos.

El término "GAA" se refiere a α -glucosidasa ácida humana (GAA), una enzima que cataliza la hidrólisis de enlaces α -1,4- y α -1,6-glucosídicos de glucógeno lisosomal, así como a variantes de inserción, relación o sustitución de las
10 secuencias de aminoácidos de GAA y fragmentos de una secuencia de GAA más larga que ejerce actividad enzimática. El término "rhGAA" se utiliza para distinguir GAA endógena de GAA sintética o producida de forma recombinante tal como la producida por transformación de células CHO con ADN que
15 codifica GAA. Una secuencia de ADN a modo de ejemplo que codifica GAA es NP_000143.2 (SEQ ID NO: 4) que se incorpora como referencia. GAA y rhGAA pueden estar presentes en una composición que contiene una mezcla de moléculas de GAA que tienen diferentes patrones de glicosilación tal como una
20 mezcla de moléculas de rhGAA que portan grupos mono-M6P o bis-M6P en sus glicanos, y moléculas de GAA que no portan M6P o bis-M6P. GAA y rhGAA se pueden completar también con otros compuestos tales como chaperonas, o se pueden unir a otros restos en un conjugado de GAA o rhGAA, tal como unir a un

resto IGF2 que fija como objetivo el conjugado a CIMPR y posteriormente lo suministra a los lisosomas.

Un "sujeto" p "paciente" es preferiblemente un ser humano, aunque también se pueden tratar otros mamíferos y
5 animales no humanos que tienen trastornos que implican la acumulación de glucógeno. Un sujeto puede ser un feto, un neonato, un niño, joven o un adulto con enfermedad de Pompe u otro trastorno de almacenamiento o acumulación de glucógeno. Un ejemplo de un individuo que está siendo tratado es un
10 individuo (feto, neonato, niño, joven, adolescente o ser humano adulto) que tiene GSD-II (*p.ej.*, GSD-II infantil, GSD-II juvenil o brote de GSD-II en adultos). El individuo puede tener actividad de GAA residual o actividad no mensurable. Por ejemplo, el individuo que tiene GSD-II puede tener
15 actividad de GAA que es menor que aproximadamente 1% de la actividad normal de GAA (GSD-II infantil), actividad de GAA que es aproximadamente 1-10% de la actividad normal de GAA (GSD-II juvenil) o actividad de GAA que es aproximadamente 10-40% de la actividad normal de GAA (GSD-II en adultos).

20 Los términos "tratar" y "tratamiento", tal como se utilizan en esta memoria, se refieren a la mejora de uno o más síntomas asociados con la enfermedad, prevención o demora en el brote de uno o más síntomas de la enfermedad y/o reducción en la gravedad o frecuencia de uno o más síntomas

de la enfermedad. Por ejemplo, tratamiento puede referirse a la mejora del estado cardíaco (*p.ej.*, aumento de los volúmenes diastólico final y/o sistólico final, o a la reducción, mejora o prevención de la cardiomiopatía progresiva que se encuentra típicamente en GSD-II) o de la función pulmonar (*p.ej.*, aumento de la capacidad vital durante el llanto sobre la capacidad de referencia y/o normalización de la desaturación de oxígeno durante el llanto); mejoras en el neurodesarrollo y/o las habilidades motoras (*p.ej.*, aumento en la puntuación de la AIMS (escala de movimientos involuntarios anormales)); reducción de las concentraciones de glucógeno en tejido del individuo afectado por la enfermedad; o cualquier combinación de estos efectos. En una realización preferida, el tratamiento incluye la mejora del estado cardíaco, particularmente en la reducción o prevención de cardiomiopatía asociada a GSD-II.

Los términos “mejorar”, “aumentar” o “reducir”, tal como se utilizan en esta memoria, indican valores que son con respecto a una medición de referencia tal como una medición en el mismo individuo antes del inicio del tratamiento descrito en esta memoria, o una medición en un individuo control (o múltiples individuos control) en ausencia del tratamiento descrito en esta memoria. Un individuo control es un individuo aquejado con la misma forma de GSD-II (ya sea

infantil, juvenil o de brote en adultos) que el individuo que está siendo tratado, que es de aproximadamente la misma edad que el individuo que está siendo tratado (para asegurar que sean equiparables las fases de la enfermedad en el individuo tratado y el o los individuos control).

El término "purificado". Tal como se utiliza en esta memoria, se refiere a material que ha sido asilado en condiciones que reducen o eliminan la presencia de materiales no relacionados, *es, decir*, contaminantes, incluyendo materiales nativos de los que se obtiene el material. Por ejemplo, una proteína purificada está, de preferencia, sustancialmente exenta de otras proteínas o ácidos nucleicos con los que está asociada en una célula; una molécula de ácido nucleico purificada está, de preferencia, sustancialmente exenta de proteínas u otras moléculas de ácidos nucleicos no relacionadas con las que se puede encontrar dentro de una célula. Como se utiliza en esta memoria, la expresión "sustancialmente exenta" se utiliza operacionalmente en el contexto de pruebas analíticas del material. Preferiblemente, material purificado sustancialmente exento de contaminantes es al menos 95% puro; más preferiblemente, al menos 97% puro, y aún más preferiblemente, al menos 99% puro. La pureza se puede evaluar mediante cromatografía, electroforesis en gel,

inmunoensayo, análisis de la composición, ensayo biológico, ensayo enzimático y otros métodos conocidos en la técnica. En una realización específica, purificado significa que la concentración de contaminantes está por debajo de una

5 concentración aceptable para las autoridades reguladoras para una administración segura a un ser humano o un animal no humano. Proteínas recombinantes se pueden aislar o purificar de células CHO utilizando métodos conocidos en la técnica, incluyendo separación cromatográfica por tamaños,

10 cromatografía de afinidad o cromatografía de intercambio aniónico.

La expresión "genéticamente modificado" o el término "recombinante" se refiere a células tales como células CHO que expresan un producto génico particular tal como rhGAA o

15 rhGAA ATB-200, después de la introducción de un ácido nucleico que comprende una secuencia codificante que codifica el producto génico, junto con elementos reguladores que controlan la expresión de la secuencia codificante. La introducción del ácido nucleico se puede conseguir por

20 cualquier método conocido en la técnica, incluyendo la fijación como objetivo de genes y la recombinación homóloga. Tal como se utiliza en esta memoria, la expresión también incluye células que han sido modificadas para expresar o sobre-expresar un gen o producto génico endógeno, normalmente

no expresado por dicha célula, *p.ej.*, mediante tecnología de activación génica.

“Enfermedad de Pompe” se refiere a una LSD recesiva autosomal caracterizada por una actividad deficiente de alfa glucosidasa ácida (GAA) que deteriora el metabolismo del glucógeno lisosomal. La deficiencia enzimática provoca la acumulación glucogénica lisosomal y produce debilitamiento progresivo de los músculos esqueléticos, función cardíaca reducida, insuficiencia respiratoria y/o deterioro del SNC en las últimas etapas de la enfermedad. Las mutaciones genéticas en el gen GAA resultan en una expresión menor o producen formas mutantes de la enzima con una estabilidad alterada y/o una actividad biológica que provoca, en última instancia, la enfermedad. (véase generalmente Hirschhorn R, 1995, Glycogen Storage Disease Type II: Acid α -Glucosidase (Acid Maltase) Deficiency, The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease, Scriver et al., comps., McGraw-Hill, Nueva York, 7ª ed., páginas 2443-2464). Las tres formas clínicas reconocidas de la Enfermedad de Pompe (infantil, juvenil y adulta) se correlacionan con el nivel de actividad de α -glucosidasa residual (Reuser A J et al., 1995, Glycogenosis Type II (Acid Maltase Deficiency), Muscle & Nerve Supplement 3, S61-S69). La enfermedad de Pompe infantil (tipo I o A) es la más común y la más grave, caracterizada por retraso en el desarrollo,

hipertrofia cardíaca hipotónica e insuficiencia
cardiorrespiratoria en el segundo año de vida. La
enfermedad de Pompe juvenil (de tipo II o B) es de gravedad
intermedia y está caracterizada por unos síntomas musculares
5 predominantes sin cardiomegalia. Los individuos con Pompe
juvenil suelen morir antes de cumplir 20 años por
insuficiencia respiratoria. La enfermedad de Pompe en adultos
(tipo III o C) presenta a menudo una miopatía lentamente
progresiva en la adolescencia o tan tarde como la sexta
10 década (Felicía K J et al., 1995, Clinical Variability in
Adult-Onset Acid Maltase Deficiency: Report of Affected
Sibs and Review of the Literature, Medicine 74, 131-135). En
Pompe, se ha demostrado que la α -glucosidasa se modifica
extensamente postraslacionalmente por glucosilación,
15 fosforilación y procesado proteolítico. Se requiere una
conversión de las formas precursora de 110 kilo Dalton
(niños) a madura de 76 a 70 niños por proteólisis en el
lisosoma para una catálisis óptima de glucógeno. Tal como se
utiliza en esta memoria, la expresión "Enfermedad de Pompe"
20 se refiere a todos los tipos de Enfermedad de Pompe. Las
formulaciones y las pautas posológicas divulgadas en esta
solicitud se pueden emplear para tratar, por ejemplo, la
enfermedad de Pompe de tipo I, tipo II o tipo III.

Realizaciones no limitantes de la invención

Una composición de rhGAA derivada de células CHO que contiene una cantidad de rhGAA que contiene N-glicanos que portan mono-manosa-6-fosfato (M6P) o bis-M6P más elevada que la rhGAA convencional tal como se ejemplifica por Lumizyme® (Alglucosidasa alfa; CAS 420794-05-0). Una composición de rhGAA a modo de ejemplo de acuerdo con la invención es ATB-200 (a veces designada ATB-200, ATB-200 o CBP-rhGAA) que se describe en los Ejemplos. La rhGAA de la invención (ATB-200) ha demostrado unirse al CIMPR con una alta afinidad ($K_D \sim 2-4$ nM) y ser eficientemente internalizada por fibroblastos de Pompe y mioblastos del músculo esquelético ($K_{\text{absorción}} \sim 7-14$ nM). ATB-200 fue caracterizada *in vivo* y demostró tener una semivida en el plasma aparente más corta ($t_{1/2} \sim 45$ min) que el actual ERT de rhGAA ($t_{1/2} \sim 60$ min).

La secuencia de aminoácidos de la rhGAA puede ser al menos 70%, 75%, 80%, 85%, 95% o 99% idéntica, o contener 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más deleciones, sustituciones o adiciones con la secuencia de aminoácidos descrita por SEQ ID NO: 1, 3 o 4. En algunas realizaciones de la GAA o rhGAA de la invención tal como en la rhGAA ATB-200, la GAA o rhGAA comprenderá una secuencia de aminoácidos de GAA de tipo salvaje como la de SEQ ID NO: 1 o 3. En otras realizaciones no limitantes, la rhGAA comprende un sub-conjunto de los residuos aminoácidos presentes en una GAA de tipo salvaje, en

donde el sub-conjunto incluye los residuos aminoácidos de la GAA de tipo salvaje que forman el sitio activo para la unión al sustrato y/o la reducción del sustrato. En una realización, la rhGAA es alfa glucosidasa, que es la enzima humana α -glucosidasa ácida (GAA) codificada por el más predominante de nueve haplotipos observados de este gen. La rhGAA de la invención, incluyendo rhGAA ATB-200, puede comprender una secuencia de aminoácidos que es un 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de alfa glucosidasa humana tal como la dada por el número de acceso AHE24104.1 (GI:568760974) (SEQ ID NO: 1) y que se incorpora como referencia a la patente de EE.UU. N° 8,592,362 o a la secuencia de aminoácidos de NP_000143.2 (SEQ ID NO: 4). Una secuencia de nucleótidos y aminoácidos para GAA también se da por SEQ ID NOS: 2 y 3, respectivamente. Variantes de esta secuencia de aminoácidos incluyen también aquellas con 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 o más deleciones, inserciones o sustituciones de aminoácidos a la secuencia de aminoácidos de GAA que figura más adelante. También se contemplan secuencias de polinucleótidos que codifican GAA y se pueden utilizar para expresar de forma recombinante rhGAAs de acuerdo con la invención.

Se pueden utilizar diversos algoritmos y/o programas de alineamiento para calcular la identidad entre dos secuencias,

incluyendo FASTA o BLAST, que están disponibles como parte del paquete de análisis de la secuencia GCG (Universidad de Wisconsin, Madison, Wis.), y se pueden utilizar con, *p.ej.*, ajuste por defecto. Por ejemplo, se contemplan

5 polipéptidos que tienen al menos un 70%, 85%, 90%, 95%, 98% o 99% de identidad con polipéptidos específicos descritos en esta memoria y que preferentemente exhiben en esencia las mismas funciones, así como polinucleótidos que codifican este tipo de polipéptidos. A no ser que se indique otra cosa, una

10 puntuación de similitud se basará en el uso de BLOSUM62. Cuando se usa BLASTP, el porcentaje de similitud se basa en la puntuación de los BLASTP positivos y el porcentaje de identidad de la secuencia se basa en la puntuación de las identidades de BLASTP. "Identidades" BLASTP muestra el número

15 y la fracción de residuos totales en los pares de secuencia de alta puntuación que son idénticos; y "Positivos" BLASTP muestra el número y la fracción de residuos para los que las puntuaciones de alineamiento tienen valores positivos y que son similares entre sí. Las secuencias de aminoácidos que

20 tienen estos grados de identidad o similitud o cualquier grado intermedio de identidad o similitud con las secuencias de aminoácidos divulgadas en el presente documento se contemplan y abarcan por esta divulgación. Las secuencias de polinucleótidos de polipéptidos similares se deducen

utilizando el código genético y se pueden obtener por medios convencionales, en particular por traducción inversa de su secuencia de aminoácidos utilizando el código genético.

Preferiblemente, no más de 70, 65, 60, 55, 45, 40, 35,
5 30, 25, 20, 15, 10 o 5% de la rhGAA total en la composición de acuerdo con la invención carece de un N-glicano portador de M6P o bis-M6P o carece de una capacidad de unirse al receptor de manosa-6-fosfato catiónico independiente (CIMPR). Alternativamente, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80,
10 85, 90, 95, 99%, <100% o más de la rhGAA en la composición comprende al menos un N-glicano portador de M6P y/o bis-M6P o tiene la capacidad de unirse a CIMPR.

Las moléculas de rhGAA en la composición de rhGAA de la invención pueden tener 1, 2, 3 o 4 grupos M6P en sus
15 glicanos. Por ejemplo, solamente un N-glicano en una molécula de rhGAA puede portar M6P (monofosforilado), un solo N-glicano puede portar dos grupos M6P (bis-fosforilados), o dos N-glicanos diferentes en la misma molécula de rhGAA pueden portar grupos M6P sencillos. Moléculas de rhGAA en la
20 composición de rhGAA pueden tener también N-glicanos no portadores de grupos M6P. En otra realización, por término medio los N-glicanos contienen más de 3 mol/mol de M6P y más de 4 mol/mol de ácido siálico. Por término medio, aproximadamente 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10% de los glicanos

totales en la rhGAA pueden estar en forma de un glicano mono-M6P, por ejemplo, aproximadamente 6.25% de los glicanos totales pueden portar un solo grupo M6P y, por término medio, al menos aproximadamente 0.5, 1, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0% de los glicanos totales en la rhGAA están en forma de un glicano bis-M6P y, por término medio, menos de 25% de la rhGAA total de la invención no contiene glicano fosforilado que se une a CIMPR.

La composición de rhGAA de acuerdo con la invención puede tener un contenido medio de N-glicanos portadores de M6P que oscila entre 0.5 y 7.0 mol/mol de rhGAA o cualquier valor intermedio de sub-intervalo, incluyendo 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 o 7.0 mol/mol de rhGAA. Tal como se muestra en los Ejemplos, la rhGAA de la invención se puede fraccionar para proporcionar composiciones de rhGAA con diferentes números medios de glicanos portadores de M6P o portadores de bis-M6P en la rhGAA, permitiendo así una personalización adicional de rhGAA que fija como objetivo los lisosomas en tejidos diana, seleccionando una fracción particular o combinando selectivamente diferentes fracciones.

Hasta 60% de los N-glicanos en la rhGAA puede estar completamente sialiado, por ejemplo hasta 10%, 20%, 30%, 40%, 50% o 60% de los N-glicanos pueden estar completamente

sializados. En algunas realizaciones, de 4 a 20% de los N-glicanos totales en la composición de rhGAA están completamente sializados.

En otras realizaciones, no más de 5%, 10%, 20% o 30% de N-glicanos en la rhGAA portan ácido siálico y un Gal terminal. Este intervalo incluye todos los valores y sub-intervalos intermedios, por ejemplo 7 a 30% de los N-glicanos totales en la rhGAA en la composición pueden portar ácido siálico y Gal terminal.

En aún otras realizaciones, no más de 5, 10, 15, 16, 17, 18, 19 o 20% de los N-glicanos en la rhGAA tienen un Gal terminal solamente y no contienen ácido siálico. Este intervalo incluye todos los valores y sub-intervalos intermedios, por ejemplo de 8 a 19% de los N-glicanos totales en la rhGAA en la composición pueden tener Gal terminal solamente y no contener ácido siálico.

En otras realizaciones de la invención, 40, 45, 50, 55 a 60% de los N-glicanos totales en la rhGAA en la composición son N-glicanos de tipo complejo; o no más de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7% de los N-glicanos totales en la rhGAA en la composición son N-glicanos de tipo híbrido; no más de 5, 10 o 15% de los N-glicanos de tipo con alto contenido en manosa en la rhGAA en la composición están no fosforilados; al menos 5% o 10% de los N-glicanos de tipo con alto contenido en manosa en la

rhGAA en la composición están mono-M6P fosforilados; y/o al menos 1 o 2% de los N-glicanos de tipo con alto contenido en manosa en la rhGAA en la composición están bis-M6P fosforilados. Estos valores incluyen todos los valores y sub-intervalos intermedios. Una composición de rhGAA de acuerdo con la invención puede cumplir uno o más de los intervalos de contenido arriba descritos.

En algunas realizaciones, la composición de rhGAA de la invención portará, por término medio, 2.0 a 8.0 de residuos de ácido siálico por cada mol de rhGAA. Este intervalo incluye todos los valores intermedios y sub-intervalos, incluyendo 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5 y 8.0 residuos/mol de rhGAA. Los residuos de ácido siálico pueden prevenir el aclaramiento no productivo por parte de receptores de asialoglicoproteína.

La composición de rhGAA de la invención es producida preferiblemente por células CHO tal como la línea CA-ATB-200 de células CHO, o por un sub-cultivo o derivado de un cultivo de células CHO de este tipo. Construcciones de ADN que expresan variantes alélicas de GAA u otra variante de secuencias de aminoácidos de GAA tales como las que son al menos un 90%, 95% o 99% idénticas con SEQ ID NO: 1, pueden construirse y expresarse en células CHO. Los expertos en la técnica pueden seleccionar vectores alternativos para la

transformación de células CHO para la producción de dichas construcciones de ADN.

Los autores de la invención han encontrado que rhGAA que tiene una capacidad superior de fijar como objetivo el CIMPR y lisosomas celulares, así como patrones de glicosilación que reducen su aclaramiento no productivo *in vivo* se pueden producir utilizando células de ovario de hamster chino (CHO). Se puede inducir a estas células para que expresen rhGAA con concentraciones de M6P y bis-M6P totales significativamente mayores que los productos de rhGAA convencionales. La GAA humana recombinante producida por estas células, por ejemplo tal como ejemplifica por rhGAA ATB-200 descrita en los Ejemplos tiene significativamente más grupos M6P y bis-M6P que fijan como objetivo células de la musculatura que GAA convencional tal como Lumizyme® y ha demostrado unirse eficientemente a CIMPR y ser absorbida eficientemente por el músculo esquelético y el músculo cardíaco. También se ha demostrado que tiene un patrón de glicosilación que proporciona un perfil farmacocinético favorable y reduce el aclaramiento no productivo *in vivo*.

La rhGAA de acuerdo con la invención puede formularse como una composición farmacéutica o utilizarse en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la Enfermedad de Pompe u otras afecciones asociadas con una

deficiencia de GAA. Las composiciones se pueden formular con un soporte o excipiente fisiológicamente aceptable. El soporte y la composición pueden ser estériles y adaptarse de otra manera al modo de administración.

5 Soportes farmacéuticamente aceptables adecuados incluyen, pero no se limitan a agua, disoluciones salinas (*p.ej.*, NaCl), solución salina, solución salina tamponada, alcoholes, glicerol, etanol, goma arábiga, aceites vegetales, alcoholes bencílicos, polietilenglicoles, gelatina, hidratos
10 de carbono tales como lactosa, amilosa o almidón, azúcares tales como manitol, sacarosa u otros, dextrosa, estearato de magnesio, talco, ácido silícico, ésteres de ácidos grasos, hidroximetilcelulosa, polivinil-pirrolidona, etc., así como combinaciones de los mismos. Si se desea, las preparaciones
15 farmacéuticas pueden mezclarse con agentes auxiliares, *p.ej.*, tensioactivos tales como polisorbato tal como polisorbato 80, lubricantes, conservantes, estabilizantes, agentes humectantes, emulsionantes, sales para influir sobre la presión osmótica, tampones, sustancias colorantes,
20 saborizantes y/o aromáticas y similares que no reaccionan de forma perjudicial con los compuestos activos. En una realización preferida, se utiliza un soporte soluble en agua, adecuado para la administración intravenosa.

La composición o el medicamento, si se desea, puede contener también pequeñas cantidades de agentes humectantes o emulsionantes, agentes tamponadores del pH. La composición puede ser una disolución, suspensión, emulsión líquida, un comprimido, una píldora, cápsula, formulación de liberación retardada o polvo. La composición también se puede formular como un supositorio con aglutinantes y soportes tradicionales tales como triglicéridos. La formulación oral puede contener soportes estándares tales como calidades farmacéuticas de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, polivinil.pirrolidona, sacarina sódica, celulosa, carbonato de magnesio, etc. En una realización preferida, la rhGAA se administra por infusión IV.

La composición o el medicamento se puede formular de acuerdo con procesos rutinarios en forma de una composición farmacéutica adaptada para la administración a seres humanos. Por ejemplo, en una realización preferida, una composición para la administración intravenosa es una disolución en tampón acuoso isotónico estéril. Cuando sea necesario, la composición puede incluir también un agente solubilizante y un anestésico local para disminuir el dolor en el sitio de la inyección. Generalmente, los ingredientes se suministran por separado o mezclados juntos en una forma de dosificación unitaria, por ejemplo en forma de un polvo liofilizado seco o

concentrado anhidro en un recipiente herméticamente sellado tal como una ampolla o saquito que indica la cantidad de agente activo. Cuando la composición es para administrarse mediante infusión, se puede dispensar con una botella de infusión que contiene agua estéril de calidad farmacéutica, solución salina o dextrosa/agua. Cuando la composición se administra mediante inyección, se puede proporcionar una ampolla de agua estéril para inyección o solución salina, con el fin de que los ingredientes se puedan mezclar antes de la administración.

La rhGAA se puede formular como formas neutras o de sal. Sales farmacéuticamente aceptables incluyen las formadas con grupos amino libres tales como las derivadas de ácidos clorhídrico, fosfórico, acético, oxálico, tartárico, etc., y las formadas con grupos carboxilo libres tales como las derivadas de hidróxidos de sodio, potasio, amonio, calcio, férrico, isopropilamina, trietilamina, 2-etilamino-etanol, histidina, procaína, etc.

rhGAA (o una composición o un medicamento que contiene GAA) se administra por una ruta apropiada. En una realización, la GAA se administra por vía intravenosa. En otras realizaciones, GAA se administra por administración directa a un tejido diana tal como el músculo del corazón o esquelético (*p.ej.*, intramuscular), o al sistema nervioso

(*p.ej.*, inyección directa en el cerebro; por vía intraventricular; por vía intratecal). Se puede usar más de una ruta simultáneamente, si se desea.

La rhGAA (o una composición o medicamento que contiene
5 GAA) se administra en una cantidad terapéuticamente efectiva (*p.ej.*, una cantidad de dosificación que, cuando se administra a intervalos regulares, es suficiente para tratar la enfermedad tal como mejorando los síntomas asociados con la enfermedad, evitando o retardando el brote de la
10 enfermedad y/o también reduciendo la gravedad o frecuencia de los síntomas de la enfermedad, tal como se describe arriba. La cantidad que será terapéuticamente eficaz en el tratamiento de la enfermedad dependerá de la naturaleza y extensión de los efectos de la enfermedad, y puede
15 determinarse mediante técnicas clínicas normalizadas. Además, ensayos *in vitro* o *in vivo* pueden emplearse opcionalmente para ayudar a identificar los intervalo óptimos de dosificación. La dosis precisa que se va a emplear dependerá de la ruta de administración, y de la gravedad de la
20 enfermedad, y debe decidirse de acuerdo con el criterio de un especialista y de las circunstancias de cada paciente. Pueden extrapolarse dosis eficaces a partir de las curvas de respuesta a la dosis derivadas de los sistemas de ensayo en modelos *in vitro* o animales. En una realización preferida, la

cantidad terapéuticamente eficaz es igual o menor que 20 mg de enzima/kg de peso corporal del individuo, preferiblemente en el intervalo de aproximadamente 1-10 mg de enzima/kg de peso corporal, e incluso más preferiblemente de

5 aproximadamente 10 mg de enzima/kg de peso corporal o aproximadamente 5 mg de enzima/kg de peso corporal. Se puede variar la dosis eficaz para un individuo concreto (por ejemplo, aumentarse o disminuirse) en el tiempo, dependiendo de las necesidades del individuo. Por ejemplo, en tiempos de

10 enfermedad física o estrés, o si se presentan o aumentan anticuerpos anti-GAA, o si empeoran los síntomas de la enfermedad, se puede aumentar la cantidad.

La cantidad terapéuticamente efectiva de GAA (o composición o medicamento que contiene GAA) se administra a

15 intervalos regulares, dependiendo de la naturaleza y el grado de los efectos de la enfermedad y sobre una base en curso. La administración en un "intervalo regular", como se usa en el presente documento, indica que la cantidad terapéuticamente eficaz se administra periódicamente (como se distingue a

20 partir de una sola dosificación). El intervalo puede determinarse mediante técnicas clínicas normalizadas. En realizaciones preferidas, GAA se administra mensualmente, bimensualmente; semanalmente; dos veces por semana; o diariamente. El intervalo de administración para un único

individuo no necesita ser un intervalo fijo, pero se puede variar en el tiempo, dependiendo de las necesidades del individuo. Por ejemplo, en tiempos de enfermedad física o estrés, o si se presentan o aumentan anticuerpos anti-GAA, o si empeoran los síntomas de la enfermedad, se pueden reducir los intervalos entre dosis. En algunas realizaciones, una cantidad terapéuticamente eficaz de 5, 10, 20, 50, 100, o 200 mg de enzima/kg de peso corporal se administra dos veces a la semana, semanalmente o en semanas alternas con o sin chaperona.

La GAA o rhGAA de la invención se puede preparar para un uso posterior tal como un vial o jeringa de dosis unitaria, o en un frasco o una bolsa para la administración intravenosa. Kits que contienen la GAA o rhGAA, así como excipientes opcionales u otros ingredientes activos tales como chaperonas u otros fármacos, se pueden envolver en un material de envasado y acompañar de instrucciones para la reconstitución, dilución o dosificación para tratar un sujeto en necesidad de un tratamiento de este tipo tal como un paciente que padece una enfermedad de Pompe.

GAA (o una composición o medicamento que contiene GAA) se puede administrar sola o en unión con otros agentes tales como una chaperona. Se puede administrar rhGAA con diferentes grados de glicosilación con mono-M6P o bis-M6P, o se pueden

administrar combinaciones de rhGAAs con diferentes grados de glicosilado M6P o bisM6P.

En algunas realizaciones, la composición de rhGAA de la invención formará complejo o se mezclará con una chaperona tal como AT-2220 o AT-2221. Chaperonas, a las que a veces se alude como "chaperonas farmacológicas" son compuestos que, cuando forman complejos o se co-administran con rhGAA modifican su farmacocinética y otras propiedades farmacológicas. Chaperonas representativas ejemplificadas en esta memoria incluyen AT2221 (miglustat, N-butil-desoxinojirimicina) y AT2220 (duvoglustat HCl, 1-desoxinojirimicina). Una complejación o mezcladura puede producirse fuera del cuerpo o dentro del cuerpo, por ejemplo, en los casos en los que se administran dosificaciones separadas de la rhGAA y chaperona. Por ejemplo, la fijación como objetivo de rhGAA activa, sus fracciones o derivados de la invención a CIMPR y posteriormente a lisosomas celulares puede mejorarse combinándola con duvoglustat-HCl (AT2220, desoxinojirimicina, AT2220) o miglustat (AT2221, N-butil-desoxinojirimicina). Los Ejemplos que figuran más adelante muestran reducciones significativas de sustrato de glucógeno en músculos esqueléticos claves de ratones inactivados en GAA que reciben la rhGAA bien fijada como objetivo en combinación con una chaperona.

Otro aspecto de la invención pertenece a células CHO o sus derivados u otros equivalentes que producen la rhGAA de acuerdo con la invención. Un ejemplo de una línea de células CHO es GA-ATB-200 o un sub-cultivo de la misma que produce una composición de rhGAA según se describe en esta memoria. Dichas líneas de células CHO pueden contener múltiples copias de un gen, tales como 5, 10, 15, o 20 o más copias, de un polinucleótido que codifica GAA.

La rhGAA de alto contenido en M6P y bis-M6P de la invención, tal como rhGAA ATB-200, se puede producir transformando células CHO (células de ovario de hamster chino) con una construcción de ADN que codifica GAA. Aunque las células CHO se han usado previamente para preparar rhGAA, no se apreciaba que las células CHO transformadas podrían cultivarse y seleccionarse en un medio que produciría rhGAA que tiene un alto contenido de glucanos M6P y bis M6P que fijan como objetivo el CIMPR.

Sorprendentemente, los autores de la invención encontraron que era posible transformar líneas de células CHO, seleccionar transformantes que producen rhGAA que contienen un alto contenido en glicanos portadores de M6P o bis-M6P que fijan como objetivo el CIMPR y expresar establemente esta rhGAA con alto contenido en M6P. Por lo tanto, un aspecto relacionado de la invención se dirige al

método para producir estas líneas de células CHO. Este método implica transformar una célula CHO con ADN que codifica GAA o una variante de GAA, seleccionando una célula CHO que integra de forma estable el ADN que codifica GAA en su(s)
5 cromosoma(s) y que expresan de forma estable GAA, y seleccionar una célula CHO que expresa GAA que tiene un alto contenido de glicanos que portan M6P o bis-M6P, y, opcionalmente, seleccionar una célula CHO que tiene N-glicanos con un alto contenido de ácido siálico y/o que tiene
10 N-glicanos con una baja cantidad de alto contenido en manosa no fosforilada.

Estas líneas de células CHO se pueden utilizar para producir rhGAA y composiciones de rhGAA de acuerdo con la invención, cultivando la línea de células CHO y recuperando
15 dicha composición del cultivo de células CHO.

La composición de rhGAA de la invención o sus fracciones o derivados se utilizan ventajosamente para tratar sujetos con una afección, trastorno o enfermedad asociado con GAA lisosomal insuficiente al administrar la composición de
20 rhGAA. Un sujeto en necesidad de tratamiento incluye los que padecen Enfermedad del Almacenamiento de Glucógeno Tipo II (Enfermedad de Pompe) así como otras afecciones, trastornos o enfermedades que se beneficiarían de la administración de la rhGAA.

Los Ejemplos que figuran más adelante demuestran que la rhGAA de la invención (ATB-200) es absorbida por células del músculo esquelético, se une a CIMPR y separa de forma efectiva glucógeno de células del músculo esquelético cuando
5 se administra a una dosificación significativamente menor que los productos de rhGAA convencionales. Se alcanzó una reducción de hasta el 75% de glucógeno en mioblastos del músculo esquelético en ratones inactivados de GAA utilizando un régimen bisemanal de administración intravenosa de ATB-
10 200. Estas reducciones excedían de las proporcionadas por la misma cantidad de Lumizyme®, demostrando que la rhGAA de la invención, que tiene un contenido potenciado de N-glicanos que portan M6P y bis-M6P, proporcionó reducciones superiores en el sustrato de glucógeno. Debido a la fijación mejorada
15 como objetivo, la farmacodinámica y farmacocinética, la composición de rhGAA de la invención se puede administrar en una dosificación más baja que los productos de rhGAA convencionales tales como Lumizyme® o Myozyme®.

Se puede utilizar para degradar, disminuir o separar
20 glucógeno de músculo cardíaco, músculo liso o músculo estriado. Ejemplos de músculos esqueléticos o estriados sujetos a tratamiento incluyen al menos un músculo seleccionado del grupo que consiste en abductor del meñique (pie), abductor del meñique (mano), abductor del dedo gordo,

abductor corto del pulgar, abductor largo del pulgar, aductor
 corto, aductor del dedo gordo, aductor largo, aductor magno,
 aductor del pulgar, ancóneo, articular del codo, articular
 de la rodilla, ariepiglótico, arijordanicus, auricular,
 5 biceps braquial, biceps femoral, braquial, braquio-radial,
 buccinador, ulboesponjoso, constrictor de la faringe
 inferior, constrictor de la faringe media, constrictor de la
 faringe superior, coracobraquial, corrugador superciliar,
 cremaster, cricotiroide, dartos, perineo transverso profundo,
 10 deltoide, depresor del ángulo de la boca, depresor del labio
 inferior, diafragma, digástrico, digástrico (vista
 anterior), erector espina-espinal, erector espina-iliocostal,
 erector espina-largo, extensor radial corto del carpo,
 extensor radial largo del carpo, extensor ulnar del carpo,
 15 extensor del meñique (mano), extensor corto de los dedos
 (mano), extensor corto de los dedos (pie), extensor largo de
 los dedos (pie), extensor largo del dedo gordo, extensor del
 índice, extensor corto del pulgar, extensor largo del pulgar,
 externo oblicuo del abdomen, flexor radial del carpo, flexor
 20 ulnar del carpo, flexor corto del quinto dedo (pie), flexor
 corto del meñique (mano), flexor corto de los dedos, flexor
 largo de los dedos (pie), flexor profundo de los dedos,
 flexor superficial de los dedos, flexor corto del dedo gordo,
 flexor largo del dedo gordo, flexor corto del pulgar, flexor

largo del pulgar, frontal, gastrocnemio, gemelo inferior,
 gemelo superior, geniogloso, geniohioideo, glúteo mayor,
 glúteo medio, glúteo mínimo, grácil, hiogloso, iliaco,
 oblicuo inferior, recto inferior, infraespinoso,
 5 intercostales externos, intercostales más internos,
 intercostales internos, interno oblicuo del abdomen,
 interóseos dorsales de la mano, interóseos dorsales del pie,
 interóseos palmares de la mano, interóseos plantares del pie,
 interespinales, intertransversales, músculos intrínsecos de
 10 la lengua, isquiocavernoso, cricoaritenoides lateral,
 pterigoideo lateral, recto lateral, dorsal ancho, elevador del
 ángulo de la boca, elevador ano-coxígeo, elevador ano-
 iliocoxígeo, elevador ano-pubocoxígeo, elevador ano-
 puborrectal, elevador ano-pubovaginal, elevador del labio
 15 superior, elevador del labio superior y del ala de la nariz,
 elevador del párpado superior, elevador de la escápula,
 elevador del velo del paladar, elevadores de las costillas,
 largo de la cabeza, longus colli, lumbricales del pie (4),
 lumbricales de la mano, masetero, pterigoideo medial, recto
 20 medial, mental, mentonero, m. campanilla, milohioideo, nasal,
 aritenoides oblicuo, oblicuo inferior de la cabeza, oblicuo
 superior de la cabeza, obturador externo, obturador interno
 (A), obturador interno (B), omohioideo, oponente del dedo
 meñique (mano), oponente del pulgar, orbicular de los ojos,

orbicular de la boca, palatogloso, palatofaríngeo, palmar
 corto, palmar largo, pectíneo, pectoral mayor, pectoral
 menor, peroneo corto, peroneo largo, tercer peroneo,
 piriforme (A), piriforme (B), plantar, platisma, popliteo,
 5 cricoaritenoides posterior, prócer, pronador cuadrado,
 pronador redondo, psoas mayor, psoas menor, piramidal,
 cuadrado femoral, cuadrado lumbar, cuadrado plantar, recto
 abdominal, recto anterior de la cabeza, recto posterior de la
 cabeza mayor, recto posterior de la cabeza menor, recto
 10 femoral, romboide mayor, romboide menor, risorio,
 salpingofaríngeo, sartorio, escaleno anterior, escaleno
 medio, escaleno mínimo, escaleno posterior, semimembranoso,
 semitendinoso, serrato anterior, serrato posterior inferior,
 serrato posterior superior, sóleo, esfínter del ano, esfínter
 15 de la uretra, esplenio de la cabeza, esplenio cervical,
 estapedio, esternocleidomastoideo, esternohioideo,
 esternotiroideo, estilogloso, estilohioideo, estilohioideo
 (vista anterior), estilofaríngeo, subclavio, subcostal,
 subescapular, transverso superficial del perineo, oblicuo
 20 superior, recto superior, supinador, supraespinado, temporal,
 temporoparietal, tensor de la fascia lata, tensor del
 tímpano, tensor del velo del paladar, y redondo mayor,
 redondo menor, tiro-aritenoides y vocal, tiroepiglótico,
 tirohioideo, tibial anterior, tibial posterior, transverso

aritennoide, transversoespinal-multifido, transversoespinal-rotador, transversoespinal-semiespinal, transverso abdominal, transverso torácico, trapecio, tríceps, vasto intermedio, vasto lateral, vasto medial, cigomático mayor Y cigomático menor.

La composición de GAA de la invención puede también administrarse a o utilizarse para tratar fibra muscular (de contracción lenta) de tipo 1 o fibra muscular (de contracción rápida) de tipo 2 o sujetos que acumulan glucógeno en fibras musculares de este tipo. Músculo de tipo I, de contracción lenta, o músculo "rojo", es denso con capilares y es rico en mitocondrias y mioglobina, dando al tejido muscular el característico color rojo. Puede llevar más oxígeno y mantener una actividad aerobia utilizando grasas o hidratos de carbono como combustible. Fibras de contracción lenta se contraen durante largos periodos de tiempo, pero con poca fuerza. El músculo de contracción rápida, de tipo II, tiene tres subtipos principales (IIa, IIx y IIb) que pueden variar tanto en la velocidad de contracción como en la fuerza generada. Fibras de contracción rápida se contraen rápidamente y con energía, pero se fatigan muy rápidamente, manteniendo sólo estallidos anaerobios de actividad antes de que la contracción del músculo se vuelva dolorosa. Contribuyen al máximo en la resistencia muscular y tienen un

potencial mayor para aumentar en masa. El tipo IIb es músculo anaerobio, glucolítico, "blanco" que es menos denso en mitocondrias y mioglobina. En animales pequeños (p.ej., roedores) este es el tipo de músculo rápido principal, lo que
5 explica el color pálido de su carne.

La composición de rhGAA de la invención, sus fracciones o derivados, se pueden administrar por vía sistémica, por ejemplo por infusión intravenosa (IV), o se pueden administrar directamente en un sitio deseado tal como el
10 músculo cardíaco o esquelético tal como el cuádriceps, tríceps o diafragma. Se puede administrar a miocitos, tejidos musculares, músculos o grupos de músculos particulares. Por ejemplo, un tratamiento de este tipo puede administrar por vía intramuscular la composición de rhGAA directamente en un
15 cuádriceps o tríceps o diafragma de un sujeto.

Como se ha mencionado arriba, la composición de rhGAA de la invención, sus fracciones o derivados se pueden complejar o mezclar con una chaperona tal como AT-2220 (Duvoglustat HCl, 1-Desoxinojirimicins) o AT-2221 (Miglustat, N-butil-
20 desoxinojirimicina) o sus sales para mejorar la farmacocinética de la administración de rhGAA. La rhGAA y la chaperona se pueden administrar juntas o por separado. Cuando se administran simultáneamente, la GAA en la composición se puede precargar con la chaperona. Alternativamente, la GAA y

la chaperona se pueden administrar por separado, ya sea al mismo tiempo o en diferentes momentos.

Dosificaciones representativas de AT2221 oscilan entre 0.25 y 400 mg/kg, preferiblemente entre 0.5-200 mg/kg, y lo más preferiblemente entre 2 y 50 mg/kg. Dosificaciones específicas de AT2221 incluyen 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 y 50 mg/kg. Estas dosificaciones se pueden combinar con rhGAA tal como rhGAA ATB-200, a una relación molar de AT2221 a rhGAA que oscila entre 15:1 y 150: 1.

Relaciones específicas incluyen 15:1, 20:1, 25:1, 50:1, 60:1, 65:1, 70:1, 75:1, 80:1, 85:1, 90: 1, 100:1, 125:1 y 150:1. rhGAA y AT2221 se pueden co-administrar en estas cantidades o relaciones molares ya sea concurrente, secuencial o separadamente. Los intervalos de arriba incluyen todos los sub-intervalos intermedios y valores tales como valores enteros entre los puntos extremos de los intervalos.

Dosificaciones representativas de AT2220 oscilan entre 0.1 y 120 mg/kg, preferiblemente entre 0.25 y 60, y lo más preferiblemente entre 0.6 y 15 mg/kg. Dosificaciones específicas de AT2220 incluyen 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 y 30 mg/kg. Estas dosificaciones se pueden combinar con rhGAA tal como rhGAA ATB-200, a una relación molar de AT2220 a rhGAA que oscila entre 15:1 y 150: 1.

Relaciones específicas incluyen 15:1, 20: 125:1, 50:1, 60: 1,

65:1, 70:1, 75:1, 80:1, 85:1, 90: 1, 100:1, 125:1 y 150:1.

rhGAA y AT2220 se pueden co-administrar en estas cantidades o relaciones molares ya sea concurrente, secuencial o separadamente. Los intervalos de arriba incluyen todos los sub-intervalos intermedios y valores tales como valores enteros entre los puntos extremos de los intervalos.

La composición de rhGAA de la invención, sus fracciones o derivados también se pueden utilizar para metabolizar, degradar, separar o disminuir de otra manera el glucógeno en tejido, músculo, fibra muscular, células musculares, lisosomas, organelas, compartimientos celulares o citoplasma. Al administrar la composición de rhGAA a un sujeto, opcionalmente junto con una chaperona o un fármaco que reduce respuestas inmunológicas a rhGAA.

En otra realización de su método de uso, la rhGAA de la invención se puede utilizar para modular la proliferación lisosomal, autofagia o exocitosis en una célula al administrarla, sus fracciones o derivados a células, tejidos o sujetos en necesidad de una modulación de este tipo, opcionalmente en combinación con una chaperona u, opcionalmente, con un conjugado con otro resto fijador de objetivo. La autofagia es un mecanismo catabólico que permite que una célula degrade glucógeno u otros componentes celulares innecesarios o disfuncionales a través de las

acciones de sus lisosomas. Este método también puede implicar administrar sistémica o localmente la composición de GAA a un sujeto en necesidad de tratamiento.

La rhGAA de acuerdo con la invención, que está
5 enriquecida en mono-M6P y bis-M6P, en comparación con Lumizyme® y Myozyme, y que tiene propiedades farmacocinéticas favorables por su patrón de glicosilación, también se puede utilizar para el tratamiento de otras afecciones que requieren la descomposición de hidratos de carbono complejos
10 tales como otros trastornos en los que el glucógeno u otros hidratos de carbono degradados por la rhGAA se acumulan en los lisosomas u otras partes de la célula tal como en el citoplasma accesible a rhGAA tal como la enfermedad de almacenamiento de glucógeno III. También se puede utilizar
15 para fines no terapéuticos tal como para la producción de alimentos, bebidas, productos químicos y farmacéuticos que requieren la descomposición de hidratos de carbono tales como almidón y glucógeno en sus monómeros.

EJEMPLOS

20 Los siguientes Ejemplos no limitantes ejemplifican aspectos de la invención.

Sección I: rhGAA ATB-200 y sus propiedades

Limitaciones de los productos de rhGAA de Myozyme® y Lumizyme® existentes

Para evaluar la capacidad del rhGAA en Myozyme® y Lumizyme®, los únicos tratamientos actualmente autorizados para la enfermedad de Pompe, estas preparaciones de rhGAA se inyectaron en una columna CIMPR (que se une a rhGAA que tiene grupos M6P) y se eluye posteriormente con un gradiente exento de M6. Fracciones se recogieron en una placa de 96 pocillos y la actividad de GAA se ensayó mediante sustrato 4MU- α -glucosa. Las cantidades relativas de rhGAA unida y no unida se determinaron en función de la actividad de GAA, y se notificaron como la fracción de enzima total.

La Fig. 5 describe los problemas asociados con ERTs convencionales (Myozyme® and Lumizyme®): 73% de la rhGAA en Myozyme® (Fig. 5B) y 78% de la rhGAA en Lumizyme® (Fig. 5A) no se unían al CIMPR, véanse los picos más a la izquierda en cada una de las figuras. Sólo el 27% de la rhGAA en Myozyme® y 22% de la rhGAA en Lumizyme® contenía M6P que la pueden fijar de forma productiva como objetivo al CIMPR en células musculares, véase la Fig. 2 que describe la fijación productiva como objetivo y el aclaramiento no productivo del fármaco.

Una dosis eficaz de Myozyme® y Lumizyme® corresponde a la cantidad de rhGAA que contiene M6P que se dirige al CIMPR de las células musculares. Sin embargo, la mayoría del rhGAA de estos dos productos convencionales no se dirige al

receptor CIMPR de las células musculares diana. La administración de un rhGAA convencional donde la mayoría del rhGAA no se dirige a las células musculares aumenta el riesgo de reacciones alérgicas o la inducción de inmunidad frente al rhGAA no dirigido.

Preparación de Células CHO Productoras de rhGAA ATB-200 que tiene un alto contenido de N-glicanos portadores de mono- o bis-M6P.

Células CHO fueron transfectadas con ADN que expresa rh-GAA, seguido de la selección de transformantes que producen rhGAA. En la Fig. 5 se muestra una construcción de ADN para transformar células CHO con ADN que codifica rh-GAA. Células CHO fueron transfectadas con ADN que expresa rh-GAA, seguido de la selección de transformantes que producen rhGAA.

Después de la transfección, las células CHO DG44 (DHFR-) que contienen un gen GAA integrado de forma estable se seleccionaron con medio deficiente en hipoxantina/timidina (-HT)). La amplificación de la expresión de GAA en dichas células se indujo mediante tratamiento con metotrexato (MTX, 500 nM). Agrupaciones de células que expresaban altas cantidades de GAA fueron identificadas mediante ensayos de actividad enzimática de GAA y se utilizaron para establecer clones individuales que producen rhGAA. Se generaron clones individuales sobre placas de medio semisólido, se cosecharon

mediante el sistema ClonePix y se transfirieron a placas de 24 pocillos profundos. Los clones individuales se sometieron a ensayo para determinar la actividad de la enzima GAA para identificar los clones que expresan un nivel elevado de GAA.

5 El medio acondicionado para determinar la actividad GAA usó un sustrato 4-MU- α -Glucosidasa. Los clones productores de altos niveles de GAA medida según ensayos de la enzima GAA se evaluaron adicionalmente para determinar la viabilidad, capacidad de crecimiento, productividad de GAA, estructura

10 del N-glicano y expresión estable de la proteína. Las líneas celulares CHO, incluida la línea celular CHO GA-ATB-200, que expresa rhGAA con N-glicanos mono-M6P o bis-M6P potenciados, se aislaron utilizando este procedimiento.

Purificación de rhGAA ATB-200 rhGAA

15 Se produjeron múltiples lotes de la rhGAA de acuerdo con la invención en matraces agitados y en biorreactores de perfusión utilizando la línea de células CHO GA-ATB-200 y se midió la unión a CIMPR. Se observó una unión similar al receptor CIMPR (~70%) a la mostrada en la Fig. 6B y Fig. 7

20 para rhGAA ATB-200 purificada de diferentes lotes de producción, indicando que la rhGAA ATB-200 se puede producir de forma consistente. Tal como se muestra en las Figs. 6A y 6B, rhGAAs Myozyme® y Lumizyme® exhibían una unión a CIMPR significativamente menor que la rhGAA ATB-200.

Comparación Analítica de ATB-200 a Lumizyme

Se utilizó cromatografía líquida débil de intercambio aniónico ("WAX") para fraccionar la rhGAA ATB-200 de acuerdo con el fosfato terminal. Se generaron perfiles de elución eluyendo el ERT con cantidad creciente de sal. Los perfiles se siguieron mediante UV (A280nm). rhGAA ATB-200 se obtuvo de células CHO y se purificó. Lumizyme® se obtuvo de una fuente comercial. Lumizyme® mostró un pico elevado a la izquierda de su perfil de elución. rhGAA ATB-200 exhibía cuatro picos prominentes que eluyen a la derecha de Lumizyme® (Fig. 8). Esto confirma que rhGAA ATB-200 se fosforiló en una mayor medida que Lumizyme®, ya que esta evaluación es por carga terminal más que por afinidad a CIMPR.

Caracterización de Oligosacáridos de rhGAA ATB-200

rhGAA ATB-200 purificada y glicanos Lumizyme® se evaluaron mediante MALDI-TOF para determinar las estructuras individuales de los glicanos encontradas en cada uno de los ERT (Fig. 9). Se encontró que muestras de ATB-200 contenían cantidades ligeramente menores de N-glicanos de tipo no fosforilado y alto contenido en manosa que Lumizyme®. El mayor contenido de glicanos M6P en ATB-200 que en Lumizyme, fija más eficazmente como objetivo rhGAA ATB-200 a células musculares. El alto porcentaje de estructuras mono-fosforiladas y bis-fosforiladas determinado mediante MALDI

concuenda con los perfiles de CIMPR que mostraron una unión significativamente mayor de ATB-200 al receptor de COMPR. El análisis de N-glicano mediante la espectrometría de masas MALDI-TOF confirmó que, en promedio, cada molécula de ATB200
5 contiene al menos una estructura de N-glicano bis-M6P natural. Este alto contenido en N-glicano bis-M6P en rhGAA ATB-200 se correlacionó directamente con la unión de alta afinidad a CIMPR en ensayos de unión en placa de receptor de M6P (K_D aproximadamente 2-4 nM) Figura 10A.

10 Caracterización de Afinidad a CIMPR de ATB-200

Además de tener un mayor porcentaje de rhGAA que se une al CIMPR, es importante comprender la calidad de dicha interacción. La unión al receptor de Lumizyme® y rhGAA ATB200 se determinó utilizando un ensayo de unión en placa CIMPR. En
15 resumen, se usaron placas revestidas con CIMPR para capturar GAA. Se aplicaron concentraciones variables de rhGAA al receptor inmovilizado, y el rhGAA no unido se eliminó por lavado. La cantidad de rhGAA remanente se determinó mediante la actividad de GAA. Tal como se muestra por la Fig. 10A,
20 rhGAA ATB-200 se unía a CIMPR de manera significativamente mejor que Lumizyme.

La Fig. 10B muestra el contenido relativo de glicanos bis-M6P en Lumizyme, una rhGAA convencional y ATB-200 de acuerdo con la invención. Para Lumizyme®, solo hay un

promedio del 10% de moléculas que tiene un glicano bis-fosforilado. Esto contrasta con ATB-200 en donde, por término medio, cada una de las moléculas de rhGAA tiene al menos un glicano bis-fosforilado.

- 5 rhGAA ATB-200 fue internalizada más eficientemente por fibroblastos que Lumizyme.

La absorción celular relativa de ATB-200 y rhGAA Lumizyme® se comparó utilizando líneas celulares de fibroblastos normales y de Pompe. Las comparaciones implicaban 5-100 nM de rhGAA ATB-200 de acuerdo con la invención con 10-500 nM de rhGAA Lumizyme® convencional. Tras 16 horas de incubación, el rhGAA externo se inactivó con base TRIS y las células se lavaron 3 veces con PBS antes de la cosecha. La GAA internalizada se midió mediante hidrólisis con 4MU- α -Glucósido y se representó con relación a la proteína celular total, y los resultados aparecen en la Fig. 11.

rhGAA ATB-200 también demostró ser eficientemente internalizada en células (Figura 11A y 11B), respectivamente demuestran que rhGAA ATB-200 es internalizada en células fibroblastos tanto normales como de Pompe y que es internalizada en mayor medida que rhGAA Lumizyme® convencional. rhGAA ATB-200 satura los receptores celulares a aproximadamente 20 nM, mientras que se necesitan

aproximadamente 250 nM de Lumizyme®. La constante de eficiencia de absorción ($K_{\text{absorción}}$) extrapolada de estos resultados es 2-3 nM para ATB-200 y 56 nM para Lumizyme® tal como se muestra por la Fig. 11C. Estos resultados sugieren que rhGAA ATB-200 es un tratamiento bien fijado como objetivo para la enfermedad de Pompe.

Sección II: Estudios Preclínicos

rhGAA ATB-200 con Glicosilación Superior era Significativamente Mejor que el Patrón de Cuidado ERT para el Aclaramiento de Glucógeno en Músculos Esqueléticos de Ratones GAA KO

Tal como se explica arriba, la terapia de reemplazo enzimático (ERT) utilizando GAA humana recombinante (rhGAA) es el único tratamiento aprobado disponible para la enfermedad de Pompe. Esta ERT requiere el hidrato de carbono especializado manosa-6-fosfato (M6P) para la absorción celular y el subsiguiente suministro a lisosomas a través de receptores de M6P catión independientes (CIMPRs) de la superficie celular. Sin embargo, la actual ERT de rhGAA contiene bajas cantidades de M6P que limitan la fijación como objetivo de fármacos y la eficacia en tejidos relevantes para la enfermedad. Los autores de la invención desarrollaron una línea celular de producción y un procedimiento de producción que proporcionan rhGAA (designada como rhGAA ATB-200) con una

glicosilación superior y un mayor contenido de M6P que la rhGAA convencional, particularmente la estructura de N-glicano bis-M6P de alta afinidad, para una fijación como objetivo mejorada de fármacos. La rhGAA ATB-200 se une al
5 CIMPR con una alta afinidad ($K_D \sim 2-4$ nM) y era eficientemente internalizada por fibroblastos de Pompe y mioblastos del músculo esquelético ($K_{\text{absorción}} \sim 7-14$ nM).

La rhGAA ATB-200 aclara glucógeno significativamente mejor que Lumizyme® en el músculo esquelético. Se evaluaron
10 los efectos de administrar Lumizyme® y rhGAA ATB-200 para el aclaramiento de glucógeno en ratones GAA KO. A los animales se les dieron dos administraciones de bolo IV (cada semana alterna); los tejidos se recolectaron dos semanas después de la última dosis y se analizaron en cuanto a la actividad de
15 GAA y el contenido en glucógeno (Fig. 12). La rhGAA ATB-200 y la rhGAA Lumizyme® eran igualmente efectivas para el aclaramiento de glucógeno en el corazón (Fig. 12A). Tal como se muestra en las Figs. 12B y 12C, la rhGAA ATB-200 a 5 mg/kg era equivalente a la rhGGA Lumizyme® a 20 mg/kg para reducir
20 el glucógeno en los músculos esqueléticos; ATB-200 dosificada a 10 y 20 mg/kg era significativamente mejor que Lumizyme® para el aclaramiento de glucógeno en los músculos esqueléticos;

Fundamento para la Co-administración de rhGAA ATB-200
con AT2221 (Tecnología CHART)

Una chaperona se une a y estabiliza la ERT de rhGAA, aumenta la absorción de enzimas activas en tejidos, mejora la tolerabilidad y mitiga potencialmente la inmunogenicidad. Tal como se muestra arriba, la estabilidad de la proteína de ERT bajo condiciones desfavorables se mejoró sustancialmente utilizando CHART™. CHART: terapia de reemplazo-chaperona avanzada, véase http://_www.amicusrx.com/chaperone.aspx (último acceso 22 de septiembre de 2015) que se incorpora como referencia. Tal como se muestra por las Figs. 13A y 13B, la estabilidad de ATB-200 fue significativamente mejorada por AT2221 (Miglustat, N-butil-desoxinojirimicina). El plegamiento de la proteína rhGAA se vigiló a 37°C mediante desnaturalización térmica en tampones neutros (pH 7.4 - entorno de plasma) o de carácter ácido (pH 5.2 - entorno lisosomal). AT2220 estabilizó la proteína rhGAA en tampón de pH neutro a lo largo de 24 horas.

Co-administración de Myozyme® con AT2221 (Miglustat)
20 Comparada con la Co-administración de rhGAA ATB-200 con
Miglustat

Ratones GAA KO de doce semanas de edad fueron tratados con Lumizyme® o ATB200, 20 mg/kg IV cada semana alterna 4 inyecciones; se co-administró Miglustat a razón de 10 mg/kg

PO, 30 min antes de rhGAA tal como se indicaba. Los tejidos se recogieron 14 días después de la última dosis de enzima para la medición del glucógeno. La Fig. 14 muestra la reducción relativa de glucógeno en el músculo esquelético del cuádriceps y tríceps.

Reducción de glucógeno en tejidos con rhGAA ATB-200 co-administrada con chaperona farmacológica AT2221 (Miglustat).

Se encontró que la combinación de una chaperona farmacológica y rhGAA ATB-200 potenciaba el aclaramiento de glucógeno *in vivo*. A ratones GAA KO se les dieron dos administraciones en bolo IV de rhGAA a razón de 20 mg/kg cada semana alterna. La chaperona farmacológica AT2221 se administró 30 min antes de rhGAA a dosificaciones de 0, 1, 2 y 10 mg/kg. Los tejidos se recolectaron dos semanas después de la última dosis de la ERT y se analizaron en cuanto a la actividad de GAA, el contenido de glucógeno específico para la célula y la proliferación de lisosomas.

Tal como se muestra por la Fig. 15, los animales que recibían ATB200+chaperona AT2221 exhibían un aclaramiento potenciado de glucógeno del músculo cuádriceps. La rhGAA ATB-200 (20 mg/kg) redujo el glucógeno más que la misma dosis de Lumizyme®, y cuando rhGAA ATB-200 se combinó con 10 mg/kg de AT2220 se lograron niveles normales de glucógeno en el músculo.

Tal como se muestra en las Figs. 16A y 16B, a diferencia de rhGAA convencional, que mostró una reducción limitada de glucógeno (indicada por una abundante señal PAS puntiforme), la rhGAA ATB-200 sola mostró una disminución significativa en las señales PAS. La co-administración con 10 mg/kg de miglustat resultó en una reducción adicional sustancial en el sustrato. La TEM reveló que la mayoría de glucógeno en los lisosomas era un material unido a membrana y denso de electrones, que corresponde a las señales PAS puntiformes. La co-administración de rhGAA ATB-200 con miglustat redujo el número, tamaño y densidad de lisosomas con contenido en sustrato, sugiriendo el suministro fijado como objetivo de rhGAA ATB-200 a las células musculares y el subsiguiente suministro a los lisosomas.

Del estudio (2 inyecciones de bolo IV cada semana alterna) arriba mostrado, los tejidos fueron procesados para la proliferación lisosomal utilizando un marcador LAMP 1, la regulación positiva es otro distintivo de la enfermedad de Pompe. LAMP: proteína de la membrana asociada a lisosomas.

Del estudio (2 inyecciones de bolo IV cada semana alterna) arriba mostrado, tejido del sóleo se procesó para la tinción de LAMP 1 en secciones adyacentes y el anticuerpo específico para las fibras de tipo I (NOQ7.5.4D) en secciones adyacentes Fig 16C y 16D) de rhGAA ATB-200 resulta en una reducción de

LAMP 1 más sustancial en comparación con rhGAA convencional, con reducciones que conducen a niveles vistos en animales de WT Figura 16C).

Además, a diferencia de rhGAA, en que el efecto está en su mayor parte restringido a fibras de tipo I (contracción lenta marcada con asteriscos), la rhGAA ATB-200 también condujo a una reducción significativa en las señales LAMP1 en una fracción de fibras de tipo II (contracción rápida) (cabezas de flecha en rojo) (Figura 16D). De manera importante, la co-administración con miglustat mejoró adicionalmente la reducción, mediada por ATB-200, de la proliferación de LAMP 1 en la mayoría de las fibras de tipo II (Fig. 16C y 16 D). Como resultado, no parecía haber una diferencia significativa específica para el tipo de fibra en el nivel de señales LAMP1. Se extrajeron conclusiones similares del cuádriceps y diafragma (datos no mostrados).

En un estudio separado y diseñado de forma similar, se examinó el efecto de ATB-200 $\pm$ AT2221 a lo largo de un plazo mayor con 4 inyecciones de bolo IV bisemanalmente. En el corazón, el almacén principal de glucógeno en los cardiomiocitos fue fácilmente aclarado mediante la administración repetida de rhGAA o ATB-200 a niveles vistos en animales de tipo salvaje (WT) (Fig. 17A). Sin embargo, el sustrato en células musculares lisas cardíacas parece ser

aclarado preferiblemente por la rhGAA ATB-200, sugiriendo una bio-distribución potencialmente más amplia de ATB-200 en comparación con rhGAA (los asteriscos marcan la luz de los vasos sanguíneos cardíacos). De manera importante, la co-
5 administración con miglustat mejoró adicionalmente la reducción mediada por ATB-200 de la proliferación de LAMP1.

Estos resultados demuestran que rhGAA ATB-200, que tiene altos niveles de M6P y bis-M6P en sus N-glicanos, fija eficientemente como objetivo el CIMPR en el músculo
10 esquelético. La rhGAA ATB-200 también tiene N-glicanos de tipo complejo bien procesados que minimizan el aclaramiento no productivo *in vivo*, tiene propiedades farmacocinéticas favorables para su uso *in vivo* y exhibe una buena fijación como objetivo a tejidos musculares claves *in vivo*. También
15 demuestran que la rhGAA ATB-200 es mejor que la norma de cuidado convencional, Lumizyme, para reducir el glucógeno en tejido muscular y que una combinación de rhGAA ATB-200 y chaperona AT2221 mejora adicionalmente la eliminación de glucógeno de los tejidos dianas y mejora la patología del
20 músculo.