

FEXAMÉTODOS PARA TRATAR LA ENFERMEDAD DE POMPE DE INICIO INFANTIL EN PACIENTES PEDIÁTRICOS

CAMPO TÉCNICO

La divulgación se refiere a métodos para tratar la enfermedad de Pompe
5 de inicio infantil (IOPD, por sus siglas en inglés) en pacientes pediátricos
mediante la administración de α -glucosidasa humana recombinante.

ANTECEDENTES

La enfermedad de Pompe (también conocida como enfermedad por
almacenamiento de glucógeno de tipo II (GSD-II, por sus siglas en inglés) o
10 enfermedad por deficiencia de maltasa ácida) es una enfermedad hereditaria por
almacenamiento lisosómico que es resultado de una deficiencia en la actividad
de la α -glucosidasa ácida (GAA, por sus siglas en inglés). Una persona que tiene
la enfermedad de Pompe carece o tiene niveles reducidos de GAA, la enzima
que descompone el glucógeno en glucosa, principal fuente de energía para los
15 músculos. Esta deficiencia enzimática provoca una acumulación en exceso de
glucógeno en 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
20 padece la enfermedad de Pompe, especialmente los músculos, afecta a la
capacidad de las células para actuar con normalidad. En la enfermedad de
Pompe, el glucógeno no se metaboliza adecuadamente y se acumula
progresivamente en los lisosomas, especialmente en células del músculo
esquelético, en la forma de inicio infantil de la enfermedad, en células del
25 músculo cardíaco. La acumulación de glucógeno lesiona las células musculares
y nerviosas, así como aquellas en otros tejidos afectados.

El tratamiento actual no paliativo de la enfermedad de Pompe implica la
terapia de reemplazo enzimático (ERT, por sus siglas en inglés) usando
productos de α -glucosidasa alfa recombinante comercializados con las marcas
30 registradas LUMIZYME®, MYOZYME® o NEXVIAZYME®. Esta terapia de
reemplazo enzimático convencional busca tratar la Enfermedad de Pompe
reemplazando la GAA ausente en lisosomas administrando rhGAA,

restableciendo de este modo la capacidad de las células para descomponer el glucógeno lisosómico. LUMIZYME®, MYOZYME® y NEXVIAZYME® son formas convencionales de rhGAA producidas o comercializadas como productos biológicos por Sanofi Genzyme y aprobadas por la Administración de Alimentos y Fármacos de los EE.UU. y se describen con referencia al *Physician's Desk Reference* (2014) (que se incorpora en el presente documento por referencia).

Sin embargo, la ERT comercializada actualmente, en el mejor de los casos, ofrece una mejora limitada en las mediciones de la función muscular, la fuerza y la función respiratoria durante una duración finita seguida de un lento declive de estos parámetros (Toscano y Schoser, (2013) *J Neurol* 260, 951-959; Wyatt et al., (2012) *Health Technol Assess* 16(39)). Existe la necesidad de tratamientos para la enfermedad de Pompe que ofrezcan una mejora a largo plazo.

Recientemente, se han desarrollado formulaciones novedosas de rhGAA que proporcionan una eficacia mejorada en el restablecimiento de la capacidad de las células para descomponer el glucógeno, aumentando la eficiencia de unión de la rhGAA a los receptores lisosómicos. Además, los inventores también han descubierto una mayor eficacia cuando la rhGAA se combina con un estabilizador enzimático. Sin embargo, estos métodos de tratamiento sólo se han establecido para poblaciones de pacientes adultos. Existe la necesidad de tratar la enfermedad de Pompe de inicio infantil en poblaciones pediátricas (< 18 años de edad).

SUMARIO

Diversos aspectos de la presente divulgación se refieren al tratamiento de la enfermedad de Pompe en pacientes pediátricos mediante la administración de una α -glucosidasa humana recombinante (rhGAA) en combinación con un estabilizador enzimático.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La FIG. 1A muestra un N-glicano con alto contenido de manosa no fosforilado, un N-glicano mono-M6P y un N-glicano bis-M6P. La FIG. 1B muestra la estructura química del grupo M6P. Cada cuadrado representa N-

acetilglucosamina (GlcNAc), cada círculo representa manosa y cada P representa fosfato.

La FIG. 2A describe el direccionamiento productivo de rhGAA a través de N-glicanos que llevan M6P a tejidos diana (por ejemplo, tejidos musculares del sujeto con enfermedad de Pompe). La FIG. 2B describe el aclaramiento de fármaco no productivo en tejidos no diana (por ejemplo, hígado y bazo) o mediante la unión de N-glicanos no M6P a tejidos no diana.

La FIG. 3 es un diagrama esquemático de un proceso de ejemplo para la fabricación, captura y purificación de una proteína lisosómica recombinante.

La FIG. 4 muestra una construcción de ADN para transformar células CHO con ADN que codifica rhGAA.

La FIG. 5 es un gráfico que muestra los resultados de la cromatografía de afinidad de CIMPR de rhGAA ATB200 con (Realización 2) y sin (Realización 1) captura en una columna de intercambio aniónico (AEX, por sus siglas en inglés).

Las FIG. 6A - FIG. 6H muestran los resultados de un análisis de N-glicosilación específica de sitio de rhGAA ATB200, usando dos técnicas analíticas de LC-MS/MS diferentes. La FIG. 6A muestra la ocupación de sitios de los siete sitios de N-glicosilación potenciales para ATB200. La FIG. 6B muestra dos análisis del perfil de N-glicosilación del primer sitio de N-glicosilación potencial para ATB200. La FIG. 6C muestra dos análisis del perfil de N-glicosilación del segundo sitio de N-glicosilación potencial para ATB200. La FIG. 6D muestra dos análisis del perfil de N-glicosilación del tercer sitio de N-glicosilación potencial para ATB200. La FIG. 6E muestra dos análisis del perfil de N-glicosilación del cuarto sitio de N-glicosilación potencial para ATB200. La FIG. 6F muestra dos análisis del perfil de N-glicosilación del quinto sitio de N-glicosilación potencial para ATB200. La FIG. 6G muestra dos análisis del perfil de N-glicosilación del sexto sitio de N-glicosilación potencial para ATB200. La FIG. 6H resume el porcentaje relativo de especies monofosforiladas y bisfosforiladas para el primer, segundo, tercer, cuarto, quinto y sexto sitios de N-glicosilación potenciales.

La FIG. 7 es un gráfico que muestra los perfiles de elución de Polywax de LUMIZYME® (línea más fina, que eluye a la izquierda) y ATB200 (línea más gruesa, que eluye a la derecha).

La FIG. 8 es una tabla que muestra un resumen 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.

La FIG. 9A y la FIG. 9B son gráficos que muestran los resultados de la cromatografía de afinidad de CIMPR de LUMIZYME® y MYOZYME®, respectivamente.

La FIG. 10A es un gráfico que compara la afinidad de unión a CIMPR de rhGAA ATB200 (trazo izquierdo) con la de LUMIZYME® (trazo derecho). La FIG. 10B es una tabla que compara el contenido de bis-M6P de LUMIZYME® y rhGAA ATB200.

La FIG. 11A es un gráfico que compara la actividad de rhGAA ATB200 (trazo izquierdo) con la actividad de rhGAA LUMIZYME® (trazo derecho) en el interior de los fibroblastos normales a diversas concentraciones de GAA. La FIG. 11B es una tabla que compara la actividad de rhGAA ATB200 (trazo izquierdo) con la actividad de rhGAA LUMIZYME® (trazo derecho) dentro de los fibroblastos de un sujeto que tiene la enfermedad de Pompe en diversas concentraciones de GAA. La FIG. 11C es una tabla que compara la $K_{captación}$ de fibroblastos de sujetos normales y sujetos con enfermedad de Pompe.

La FIG. 12 representa la estabilidad de ATB200 en tampones de pH ácido o neutro evaluada en un ensayo de termoestabilidad usando SYPRO Orange, ya que la fluorescencia del colorante aumenta cuando las proteínas se desnaturalizan.

La FIG. 13 muestra el contenido de glucógeno tisular de ratones TS o ratones con inactivación de *Gaa* tratados con un vehículo, alglucosidasa alfa o ATB200/AT2221, determinado usando digestión con amiloglucosidasa. Las barras representan la Media $\pm$ EEM de 7 ratones/grupo. * $p < 0.05$ en comparación con alglucosidasa alfa en comparación múltiple usando el método de Dunnett en análisis ANOVA unidireccional.

La FIG. 14 representa vesículas positivas para LAMP1 en fibras musculares de ratones con inactivación de *Gaa* tratados con un vehículo, alglucosidasa alfa o ATB200/AT2221 o ratones TS. Las imágenes se tomaron del vasto lateral y fueron representativas de 7 ratones por grupo. Aumento = 200x (1,000x en los recuadros).

La FIG. 15A muestra agregados positivos para LC3 en fibras musculares de ratones con inactivación de *Gaa* tratados con un vehículo, alglucosidasa alfa o ATB200/AT2221 o ratones TS. Las imágenes se tomaron del vasto lateral y fueron representativas de 7 ratones por grupo. Aumento = 400x. La FIG. 15B muestra un análisis por transferencia Western de la proteína LC3 II. Se cargó un total de 30 mg de proteína en cada carril.

La FIG. 16 muestra la expresión de Disferlina en fibras musculares de ratones con inactivación de *Gaa* tratados con un vehículo, alglucosidasa alfa o ATB200/AT2221 o ratones TS. Las imágenes se tomaron del vasto lateral y fueron representativas de 7 ratones por grupo. Aumento = 200x.

La FIG. 17 representa la tinción co-inmunofluorescente de LAMP1 (verde) (véase, por ejemplo, "B") y LC3 (rojo) (véase, por ejemplo, "A") en fibras individuales aisladas del gastrocnemio blanco de ratones con inactivación de *Gaa* tratados con un vehículo, alglucosidasa alfa o ATB200. "C" representa el aclaramiento de desechos autofágicos y la ausencia de lisosomas agrandados. Se examinó un mínimo de 30 fibras de cada animal.

La FIG. 18 representa la estabilización de ATB200 por AT2221 a 17 μ M y AT2221 170 μ M, respectivamente, en comparación con ATB200 sola.

Las FIG. 19A – FIG. 19H muestran los resultados de un análisis de N-glicosilación de sitio específico de rhGAA ATB200, incluyendo un perfil de N-glicosilación para el séptimo sitio de N-glicosilación potencial, usando análisis por LC-MS/MS de ATB200 digerida por proteasa. Las FIG. 19A – FIG. 19H proporcionan datos promedio de diez lotes de ATB200 producidos a diferentes escalas.

La FIG. 19A muestra la ocupación de sitios promedio de los siete sitios de N-glicosilación potenciales para ATB200. Los sitios de N-glicosilación se proporcionan de acuerdo con la SEQ ID NO: 1. CV = coeficiente de variación.

Las FIG. 19B - FIG. 19H muestran los análisis de N-glicosilación específica de sitio de los siete sitios de N-glicosilación potenciales para ATB200, con números de sitio proporcionados de acuerdo con la SEQ ID NO: 5. Las barras representan el porcentaje máximo y mínimo de especies de N-glicanos identificadas como un grupo de N-glicanos particular para los diez lotes de ATB200 analizados. La FIG. 19B muestra el perfil de N-glicosilación del primer sitio de N-glicosilación potencial para ATB200. La FIG. 19C muestra el perfil de N-glicosilación del segundo sitio de N-glicosilación potencial para ATB200. La FIG. 19D muestra el perfil de N-glicosilación del tercer sitio de N-glicosilación potencial para ATB200. La FIG. 19E muestra el perfil de N-glicosilación del cuarto sitio de N-glicosilación potencial para ATB200. La FIG. 19F muestra el perfil de N-glicosilación del quinto sitio de N-glicosilación potencial para ATB200. La FIG. 19G muestra el perfil de N-glicosilación del sexto sitio de N-glicosilación potencial para ATB200. La FIG. 19H muestra el perfil de N-glicosilación del séptimo sitio de N-glicosilación potencial para ATB200.

Las FIG. 20A – FIG. 20B caracterizan adicionalmente y resumen el perfil de N-glicosilación del ATB200, como también se muestra en las Fig. 19A-19H. La FIG. 20A muestra el mapeo de glicanos de ácido 2-antranílico (2-AA) y el análisis por LC/MS-MS de ATB200 y resume las especies de N-glicanos identificadas en ATB200 como porcentaje de la fluorescencia total. En la Tabla 7 también se representan datos del mapeo de glicanos 2-AA y del análisis por LC-MS/MS. La FIG. 20B resume la ocupación de sitios promedio y el perfil de N-glicanos promedio, incluyendo la fosforilación, la monofosforilación, la bisfosforilación y la sialilación totales, para los siete sitios de N-glicosilación potenciales para ATB200. ND = no detectado.

La FIG. 21 muestra el esquema de diseño del estudio ATB200-03.

La FIG. 22 muestra las características basales de distancia caminada en 6 minutos (6MWD) y capacidad vital forzada (FVC) en sedestación de los 122 sujetos que participaron en el estudio ATB200-03. Grupo de AT-GAA: sujetos que recibieron el tratamiento con ATB200/AT2221; Grupo de alglucosidasa alfa: sujetos que recibieron el tratamiento con alglucosidasa alfa/placebo.

La FIG. 23A representa los datos de 6MWD y FVC, que muestran el valor basal, el cambio con respecto al valor basal ("CFBL", por sus siglas en inglés) en la semana 52, la diferencia y el valor de P, para la población global (n=122). Grupo de AT-GAA: sujetos que recibieron el tratamiento con ATB200/miglustat; Grupo de alglucosidasa alfa: sujetos que recibieron el tratamiento con alglucosidasa alfa/placebo.

La FIG. 23B representa los datos de 6MWD y FVC que muestran el cambio con respecto al valor basal a lo largo del tiempo para la población global (n=122). Grupo de cipaglucosidasa alfa/miglustat: sujetos que recibieron el tratamiento con ATB200/miglustat; Alglucosidasa alfa/placebo: sujetos que recibieron el tratamiento con alglucosidasa alfa/placebo.

La FIG. 24 representa los datos de 6MWD y FVC, que muestran el valor basal, el CFBL en la semana 52, la diferencia y el valor de P, para la población con experiencia con ERT (n=95). Grupo de AT-GAA: sujetos que recibieron el tratamiento con ATB200/miglustat; Grupo de alglucosidasa alfa: sujetos que recibieron el tratamiento con alglucosidasa alfa/placebo.

La FIG. 25 representa los cambios de 6MWD y FVC con respecto al valor basal en la semana 12, la semana 26, la semana 38 y la semana 52, para la población con experiencia con ERT (n=95).

La FIG. 26A representa los datos de 6MWD y FVC, que representan el valor basal, el CFBL en la semana 52, la diferencia y el valor de P, para la población sin tratamiento previo con ERT (n=27). Grupo de AT-GAA: sujetos que recibieron el tratamiento con ATB200/miglustat; Grupo de alglucosidasa alfa: sujetos que recibieron el tratamiento con alglucosidasa alfa/placebo.

La FIG. 26B representa los datos de 6MWD y FVC que muestran el cambio con respecto al valor basal a lo largo del tiempo para la población sin tratamiento previo con ERT (n=27). Grupo de cipaglucosidasa alfa/miglustat: sujetos que recibieron el tratamiento con ATB200/miglustat; Alglucosidasa alfa/placebo: sujetos que recibieron el tratamiento con alglucosidasa alfa/placebo.

La FIG. 27 representa las características basales de los criterios de valoración secundarios clave y los biomarcadores para la población global y la

población con experiencia con ERT. Grupo de AT-GAA: sujetos que recibieron el tratamiento con ATB200/miglustat; Grupo de alglucosidasa alfa: sujetos que recibieron el tratamiento con alglucosidasa alfa/placebo.

5 La FIG. 28 representa los cambios del ensayo muscular manual (MMT, por sus siglas en inglés) inferior con respecto al valor basal en la semana 12, la semana 26, la semana 38 y la semana 52, para la población global (izquierda) y la población con experiencia con ERT (derecha).

La FIG. 29 representa los cambios de marcha, escaleras, Gowers, silla (GSGC, por sus siglas en inglés) con respecto al valor basal en la semana 12, la semana 26, la semana 38 y la semana 52, para la población global (izquierda) y la población con experiencia con ERT (derecha). Grupo de cipaglucosidasa alfa/miglustat: sujetos que recibieron el tratamiento con ATB200/miglustat; Alglucosidasa alfa/placebo: sujetos que recibieron el tratamiento con alglucosidasa alfa/placebo.

15 La FIG. 30 representa el sistema de información de medición de resultados informados por los pacientes (PROMIS) para los cambios en la función física con respecto al valor basal en la semana 12, la semana 26, la semana 38 y la semana 52, para la población global (izquierda) y la población con experiencia con ERT (derecha).

20 La FIG. 31 representa el PROMIS para los cambios en la fatiga con respecto al valor basal en la semana 12, la semana 26, la semana 38 y la semana 52, para la población global (izquierda) y la población con experiencia con ERT (derecha).

25 La FIG. 32 representa los cambios del biomarcador creatina cinasa (CK) con respecto al valor basal en la semana 12, la semana 26, la semana 38 y la semana 52, para la población global (izquierda) y la población con experiencia con ERT (derecha).

30 La FIG. 33 representa los cambios del biomarcador tetrasacárido de hexosa (Hex4) en orina con respecto al valor basal en la semana 12, la semana 26, la semana 38 y la semana 52, para la población global (izquierda) y la población con experiencia con ERT (derecha).

La FIG. 34 muestra el mapa de calor de los criterios de valoración primarios, secundarios y de biomarcadores para la población global (izquierda) y la población con experiencia con ERT (derecha). Grupo de AT-GAA: sujetos que recibieron el tratamiento con ATB200/miglustat; Grupo de alglucosidasa alfa: sujetos que recibieron el tratamiento con alglucosidasa alfa/placebo.

La FIG. 35 resume los datos de seguridad del estudio ATB200-03. Grupo de AT-GAA: sujetos que recibieron el tratamiento con ATB200/miglustat; Grupo de alglucosidasa alfa: sujetos que recibieron el tratamiento con alglucosidasa alfa/placebo. TEAE: acontecimiento adverso emergente del tratamiento, por sus siglas en inglés; IAR: reacción asociada a la infusión, por sus siglas en inglés.

La FIG. 36 resume los resultados del estudio ATB200-03.

La FIG. 37 describe los objetivos del estudio y los métodos estadísticos del estudio ATB200-03.

La FIG. 38 describe los criterios de valoración primarios y secundarios del estudio ATB200-03.

La FIG. 39 resume la disposición de los pacientes del estudio ATB200-03.

La FIG. 40 resume los datos demográficos basales del estudio ATB200-03.

Las FIG. 41A – FIG. 41B muestran un análisis de subgrupos para el cambio con respecto al valor basal en 6MWD y FVC por estado basal en la población global (n=122) (FIG. 41A) y pacientes con experiencia con ERT (n=95) (FIG. 41B) en el estudio ATB200-03.

La FIG. 42 muestra una lista de acontecimientos adversos emergentes del tratamiento (TEAE) en ≥ 10 % de los pacientes de cualquier grupo en el estudio ATB200-03.

La FIG. 43 muestra el diseño del estudio para el estudio de Fase I/II ATB200-02. El asterisco indica que la ERT previa fue con alglucosidasa alfa 20 mg/kg C.2.S. C.2.S., cada 2 semanas

La FIG. 44 muestra un resumen de los criterios de valoración y cohortes informados para el estudio ATB200-02.

La FIG. 45 muestra las características basales y la disposición de los pacientes para el estudio ATB200-02. El asterisco indica que 1 paciente sin

tratamiento previo con ERT había recibido 1 dosis de alglucosidasa alfa >6 meses antes de entrar en el estudio. M significa metros; H:M significa relación hombre:mujer; N/A significa no aplicable; DE significa desviación estándar.

Las FIG. 46A – FIG. 46B muestran el cambio medio con respecto al valor basal (CFBL) en la distancia caminada en 6 minutos (6MWD) a lo largo del tiempo en sujetos con experiencia con ERT (FIG. 46A) y sin tratamiento previo con ERT (FIG. 46B) en el estudio ATB200-02.

Las FIG. 47A – FIG. 47B muestran el cambio medio con respecto al valor basal (CFBL) en el porcentaje predicho de capacidad vital forzada (FVC) en sedestación a lo largo del tiempo en sujetos con experiencia con ERT (FIG. 47A) y sin tratamiento previo con ERT (FIG. 47B) en el estudio ATB200-02.

Las FIG. 48A – FIG. 48B muestran el cambio medio con respecto al valor basal (CFBL) en la puntuación de extremidades inferiores de ensayo muscular manual (MMT) a lo largo del tiempo en sujetos con experiencia con ERT (FIG. 48A) y sin tratamiento previo con ERT (FIG. 48B) en el estudio ATB200-02.

Las FIG. 49A – FIG. 49B muestran el porcentaje de cambio medio con respecto al valor basal (CFBL) en los niveles de tetrasacárido de hexosa (Hex4) en orina (FIG. 49A) y en los niveles de creatina cinasa (CK) en plasma (FIG. 49B) en sujetos con experiencia con ERT y sin tratamiento previo con ERT en el estudio ATB200-02.

La FIG. 50 muestra un resumen de los acontecimientos adversos emergentes del tratamiento (TEAE) en el estudio ATB200-02. El asterisco indica linfoma difuso de linfocitos B grandes. IAR significa reacción asociada a la infusión; TEAE significa acontecimiento adverso emergente del tratamiento con fecha de inicio en o después de la primera dosis del fármaco de estudio.

La FIG. 51 muestra una comparación de los efectos a largo plazo de cipaglucosidasa alfa/miglustat y avalglucosidasa alfa sobre el cambio con respecto al valor basal para la 6MWD y el porcentaje predicho de FVC (sedestación) en sujetos con experiencia con ERT.

La FIG. 52 muestra una comparación de los efectos a largo plazo de cipaglucosidasa alfa/miglustat y avalglucosidasa alfa sobre el cambio con

respecto al valor basal para la 6MWD y el porcentaje predicho de FVC (sedestación) en sujetos sin tratamiento previo con ERT.

Las FIG. 53A – FIG. 53B muestran el porcentaje predicho del ensayo de caminata de 6 minutos (6MWT, por sus siglas en inglés) durante el tratamiento de sujetos con experiencia con ERT con alglucosidasa alfa. La FIG. 53B muestra los datos vueltos a representar de la FIG. 53A sólo a partir del año 2 en adelante.

La FIG. 54 muestra el porcentaje predicho de FVC durante el tratamiento de sujetos con experiencia con ERT con alglucosidasa alfa.

La FIG. 55 muestra un resumen de los criterios de valoración y cohortes para la Cohorte 2 (pacientes con experiencia con ERT no ambulatorios) del estudio ATB200-02.

La FIG. 56 muestra las características basales y la disposición de los pacientes para la Cohorte 2 (pacientes con experiencia con ERT no ambulatorios) del estudio ATB200-02. El asterisco indica que la evaluación basal es el último resultado no ausente en o antes de la administración de la primera dosis de la medicación del estudio (dosis de coadministración de cipaglucosidasa alfa 20 mg/kg + 260 mg de miglustat). H:M significa relación hombre:mujer; DE significa desviación estándar.

La FIG. 57 muestra el cambio con respecto al valor basal (CFBL) en el porcentaje predicho de capacidad vital forzada (FVC) en sedestación a lo largo del tiempo en la Cohorte 2 (pacientes con experiencia con ERT no ambulatorios).

La FIG. 58 muestra un resumen de los acontecimientos adversos emergentes del tratamiento (TEAE) para la Cohorte 2 (pacientes con experiencia con ERT no ambulatorios) en el estudio ATB200-02. El asterisco indica urticaria considerada como IAR. IAR significa reacción asociada a la infusión; TEAE significa acontecimiento adverso emergente del tratamiento con fecha de inicio en o después de la primera dosis del fármaco de estudio.

La FIG. 59 muestra las características basales de los siete estudios clínicos identificados por la revisión bibliográfica sistemática (SLR, por sus siglas en inglés)

La FIG. 60 muestra los resultados de eficacia longitudinales frente al ensayo para la 6MWD (m) y FVC (% predicho) según los cambios con respecto al valor basal para cada uno de los estudios identificados.

La FIG. 61 muestra una Red para la 6MWD (m) y FVC en sedestación (% predicho).

La FIG. 62 muestra un diagrama de bosque de las estimaciones del efecto relativo con intervalos de credibilidad del 95 % para la 6MWD en el escenario del caso base (análisis principal).

La FIG. 63 muestra un diagrama de bosque de las estimaciones del efecto relativo con intervalos de credibilidad del 95 % para la FVC en el escenario del caso base (análisis principal).

La FIG. 64 muestra un diagrama de bosque de las estimaciones del efecto relativo con intervalos de credibilidad del 95 % para la 6MWD según la duración de la ERT.

La FIG. 65 muestra un diagrama de bosque de las estimaciones del efecto relativo con intervalos de credibilidad del 95 % para la FVC según la duración de la ERT.

La FIG. 66 muestra un diagrama de bosque de las estimaciones del efecto relativo con intervalos de credibilidad del 95 % para la 6MWD en el escenario del caso base (análisis de sensibilidad).

La FIG. 67 muestra un diagrama de bosque de las estimaciones del efecto relativo con intervalos de credibilidad del 95 % para la FVC en el escenario del caso base (análisis de sensibilidad).

La FIG. 68 muestra un diagrama de líneas de NT-proBNP para un paciente pediátrico durante el curso de tratamiento con Myozyme y ATB200/AT2221.

La FIG. 69 muestra un diagrama de líneas de la fracción de acortamiento (fs) de ecocardiografía para un paciente pediátrico durante el curso de tratamiento con Myozyme y ATB200/AT2221.

La FIG. 70 muestra un mapa de GMFM para un paciente pediátrico durante el curso de tratamiento con Myozyme y ATB200/AT2221.

La FIG. 71 muestra un diagrama de Hex4 en orina para un paciente pediátrico durante el curso de tratamiento con Myozyme y ATB200/AT2221.

Las FIG. 72A-72C muestran una MRI cinética del eje largo (Fig. 72A), el eje corto del ventrículo izquierdo (Fig. 72B) y el ápice (Fig. 72C).

5 La FIG. 73 muestra la media $\pm$ DE (barras de error) que describe la concentración de miglustat (ng/ml) para la cápsula o los prototipos 1, 2, 3 o 4 a lo largo de 24 horas en conejos.

10 La FIG. 74 muestra la media $\pm$ DE transformada logarítmicamente (barras de error) que describe la concentración de miglustat (ng/ml) para la cápsula o los prototipos 1, 2, 3 o 4 a lo largo de 24 horas en conejos.

La FIG. 75 muestra diagramas de resumen de PK de la media $\pm$ DE (barras de error) y la concentración de miglustat media $\pm$ DE (barras de error) transformada logarítmicamente durante 72 horas después de la administración a seres humanos del prototipo 3 o 4 a una dosis de 260 mg.

15 La FIG. 76 muestra diagramas de resumen de PK de la media $\pm$ DE (barras de error) y la concentración de miglustat media $\pm$ DE (barras de error) transformada logarítmicamente durante 72 horas después de la administración a seres humanos del prototipo 3 o 4 a una dosis de 1040 mg.

20 La FIG. 77 muestra un diagrama de resumen de PK de proporcionalidad de la dosis a lo largo de 72 horas para la concentración de miglustat media $\pm$ DE (barras de error) en seres humanos después de la administración del prototipo 3 o 4 a dosis de 260 mg o 1040 mg.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

25 En el presente documento se proporcionan métodos para tratar la enfermedad de Pompe de inicio infantil (IOPD) que comprenden administrar a un individuo menor de 18 años una α -glucosidasa humana recombinante (rhGAA) y un estabilizador enzimático. Los métodos pueden proporcionar beneficios tales como la mejora de la función cardíaca (por ejemplo, LVMi o fracción de eyección), la función motora, la fuerza muscular y/o la función pulmonar. Los
30 métodos proporcionados en el presente documento también tienen un perfil de seguridad favorable. Los beneficios de los métodos proporcionados en el

presente documento son una mejora de las opciones actuales de terapia de reemplazo enzimático (ERT) para el tratamiento de la enfermedad de Pompe.

Las opciones de ERT actuales para tratar la enfermedad de Pompe ofrecen mejoras de duración limitada, seguidas de un declive lento. En 2012, se
5 realizó una revisión sistemática de todos los estudios realizados en sujetos con enfermedad de Pompe de inicio tardío (LOPD, por sus siglas en inglés) (Toscano y Schoser, (2013) *J Neurol* 260, 951-959). La revisión incluyó datos de 368 sujetos con LOPD de estudios publicados, incluyendo 27 sujetos juveniles (intervalo de edad: de 2 a 17 años) y 251 sujetos adultos que recibieron
10 alglucosidasa alfa durante al menos los 2 años anteriores. Los resultados indicaron que > 30 % de los sujetos no mostraron una mejora inicial durante el tratamiento con alglucosidasa alfa y siguieron experimentando un deterioro de las funciones musculares y respiratorias a pesar del tratamiento. En el grupo de sujetos que respondieron inicialmente al tratamiento con alglucosidasa alfa,
15 varios estudios adicionales a más largo plazo mostraron que las mejoras por lo general duraban sólo aproximadamente 2 años. A partir de entonces, los sujetos se estabilizaron antes de comenzar a decaer progresivamente.

En 2012, el programa de Evaluación de Tecnologías Sanitarias del Reino Unido, como parte del Instituto Nacional de Investigación Sanitaria (Wyatt et al.,
20 (2012) *Health Technol Assess* 16(39), publicó recomendaciones extraídas de la revisión de los datos longitudinales para 81 pacientes con enfermedad de Pompe (incluyendo las formas de inicio infantil y tardío (niños y adultos)) que recibieron el tratamiento de referencia de ERT aprobado actual, alglucosidasa alfa. Se evaluaron marcadores clave de la progresión de la enfermedad de Pompe
25 (capacidad vital forzada, dependencia de ventilación, movilidad, Ensayo de marcha de 6 minutos, fuerza muscular e índice de masa corporal) y se modelaron a lo largo del tiempo del tratamiento con terapia de alglucosidasa alfa. Los resultados de esta evaluación indicaron que se produjeron mejoras en la FVC, la distancia caminada en 6 minutos y la fuerza muscular de los pacientes con LOPD
30 durante los 2 primeros años después del comienzo de la ERT con alglucosidasa alfa, y que se produjo un declive con la continuación del tratamiento más allá de este plazo. Adicionalmente, un estudio de 3 años en 38 sujetos con LOPD que

recibieron alglucosidasa alfa mostró que los sujetos demostraron una mejora de la función motora en el primer año de tratamiento, que se mantuvo en general estable en el segundo año y comenzó a decaer en el tercer año (Regnery et al., (2012) *Journal of Inherited Metabolic Disease* 35: 837–845).

5 Además, un informe que proporciona un seguimiento de 10 años de un estudio de Fase 3 de LUMIZYME® (Genzyme Corporation) mostró que después de experimentar cierta mejora de la función motora y pulmonar durante el primer par de años de tratamiento, los sujetos comenzaron a decaer lentamente con el
10 tratamiento en curso (van der Ploeg et al., (2017) *European journal of neurology* 24.6: 768-e31). En el estudio, desde los año 3 a 6 de terapia, hubo un descenso promedio de aproximadamente el 10 % en el porcentaje predicho de la distancia caminada en 6 minutos, y aproximadamente el 80 % de los sujetos experimentaron un declive.

El problema de tolerabilidad más grave de la alglucosidasa alfa es la
15 aparición de reacciones asociadas a la infusión (IAR), que, en algunos casos pueden incluir anafilaxia potencialmente mortal u otras respuestas alérgicas graves (Resumen de las características del producto MYOZYME®, diciembre de 2018). El tratamiento de estos acontecimientos incluye la reducción de la dosis, la las tasas de infusión reducidas y la prolongación de los tiempos de infusión,
20 así como la interrupción o suspensión de la dosis. También se usa regularmente la premedicación con antihistamínicos y corticoides (antes de la infusión) para prevenir y reducir la aparición y la gravedad de las IAR y las hipersensibilidades relacionadas con la infusión de alglucosidasa alfa. A pesar de estas medidas, los
25 pacientes con enfermedad de Pompe pueden seguir experimentando IAR, y algunos no pueden tolerar infusiones regulares de la ERT aprobada actualmente.

En 2017, el Consorcio Europeo de Pompe, una red de expertos de 11 países europeos en el campo de la enfermedad de Pompe, realizó una revisión sistemática de la bibliografía (van der Ploeg et al., (2017) *European journal of neurology* 24.6: 768-e31). A partir de los datos obtenidos de un estudio clínico y
30 43 estudios observacionales, que abarcan un total de 586 sujetos adultos individuales, el consorcio evaluó las pruebas de un efecto de la ERT a nivel de grupo. El consenso actual del Consorcio Europeo de Pompe es interrumpir la

terapia con ERT tras la aparición de IAR graves o un empeoramiento clínico progresivo de los síntomas de la enfermedad, así como la aparición de títulos elevados de anticuerpos neutralizantes (Ab), que inactivan eficazmente el tratamiento con ERT existente. La recomendación de consenso del Consorcio Europeo de Pompe también incluyó la consideración de reiniciar el tratamiento con ERT si la progresión de la enfermedad y el empeoramiento clínico reaparecen después de haber detenido la ERT.

La captación celular de una molécula de rhGAA se ve facilitada por el hidrato de carbono especializado, manosa-6-fosfato (M6P), que se une al receptor de manosa-6-fosfato independiente de cationes (CIMPR, por sus siglas en inglés) presente en las células diana, tales como las células musculares. Tras la unión, la molécula de rhGAA es recogida por las células diana y posteriormente se transporta a los lisosomas dentro de las células. Sin embargo, la mayoría de los productos de rhGAA convencionales carecen de un alto contenido total de N-glicanos que llevan mono-M6P y bis-M6P (es decir, N-glicanos que llevan un resto de M6P o N-glicanos que llevan dos restos de M6P, respectivamente), lo que limita su captación celular a través de CIMPR y el suministro lisosómico, haciendo que la terapia de reemplazo enzimático convencional no sea suficientemente eficaz. Por ejemplo, aunque los productos de rhGAA convencionales a dosis de 20 mg/kg o superiores mejoran algunos aspectos de la enfermedad de Pompe, no son capaces de tratar adecuadamente, entre otras cosas, (i) la disfunción celular subyacente, (ii) restablecer la estructura muscular o (iii) reducir el glucógeno acumulado en muchos tejidos diana, tales como los músculos esqueléticos, para revertir la progresión de la enfermedad. Además, dosis mayores pueden imponer cargas adicionales al sujeto, así como a los profesionales médicos que tratan al sujeto tal como alargar el tiempo de infusión necesario para administrar rhGAA por vía intravenosa.

La glicosilación de GAA o rhGAA puede modificarse enzimáticamente *in vitro* por la fosfotransferasa y enzimas de descubrimiento descritas por Canfield, et al., Patente de los EE.UU. N.º 6,534,300, para generar grupos M6P. Sin embargo, la glicosilación enzimática no se puede controlar adecuadamente y puede producir rhGAA que tenga propiedades inmunitarias y farmacológicas no

deseables. Las rhGAA modificadas enzimáticamente pueden contener sólo oligosacáridos con alto contenido de manosa que potencialmente podrían fosforilarse enzimáticamente *in vitro* con una fosfotransferasa o una enzima descubridora. Los modelos de glicosilación producidos por el tratamiento enzimático *in vitro* de GAA son problemáticos debido a los restos manosa terminales adicionales, particularmente restos 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 modificada enzimáticamente por las células inmunitarias y reducen la eficacia terapéutica de la rhGAA debido a la menor cantidad de GAA que llega a los tejidos diana, tales como miocitos de músculo esquelético. Por ejemplo, restos manosa no fosforilados terminales son ligandos conocidos para los receptores de manosa en el hígado y el bazo, lo que conduce a un rápido aclaramiento de la rhGAA enzimáticamente modificada y a un direccionamiento reducido de rhGAA al tejido diana. Además de ello, el modelo de glicosilación de GAA enzimáticamente modificada que tiene N-glicanos con alto contenido de manosa con restos manosa no fosforilados terminales se asemeja a las glicoproteínas producidas en levaduras y mohos, y aumenta el riesgo de desencadenar respuestas inmunitarias o alérgicas tales como reacciones alérgicas (anafilácticas) graves o de hipersensibilidad potencialmente mortales, debido a la rhGAA enzimáticamente modificada.

En comparación con los productos de rhGAA recombinante convencionales y la rhGAA fosforilada *in vitro*, la rhGAA utilizada en la terapia de dos componentes descrita en el presente documento tiene un perfil de N-glicanos optimizado para la biodistribución y la captación lisosómica potenciadas, minimizando de este modo el aclaramiento no productivo de la rhGAA una vez administrada. Estas formulaciones proporcionan a los pacientes con Pompe estables o en declive una terapia eficaz que invierte la progresión de la enfermedad a nivel celular, incluyendo el aclaramiento del glucógeno lisosómica de forma más eficiente que el tratamiento de referencia actual. Los pacientes tratados con la terapia de dos componentes que comprende rhGAA y un

estabilizador enzimático (por ejemplo, miglustat) presentan mejoras significativas de la salud, incluyendo mejoras en la función cardíaca, la fuerza muscular, la función motora y/o la función pulmonar, y/o incluyendo una reversión de la progresión de la enfermedad.

5 Además, una comparación de tres ensayos clínicos aleatorizados (LOTS: alglucosidasa alfa frente a placebo; COMET: avalglucosidasa alfa frente a alglucosidasa alfa; y PROPEL: cipaglucosidasa alfa/miglustat frente a alglucosidasa alfa) comparten la 6MWD y el % predicho de FVC como criterios de valoración primarios o secundarios clave. Usando datos de pacientes del
10 ensayo clínico aleatorizado (RCT, por sus siglas en inglés) PROPEL, más los datos agregados publicados de otros RCT, ensayos de Fase I/II y ensayos de extensión abiertos, se realizó una metarregresión en red multinivel, ajustando para diversas covariables basales, incluyendo la duración del ERT previo. El escenario del caso base tenía covariables que se asemejaban a las de la
15 población de PROPEL (sin tratamiento previo y con experiencia con ERT) y analizaba el cambio de 6MWD y FVC con respecto al valor basal a las 52 semanas. Cipaglucosidasa alfa/miglustat se vio favorecida frente a alglucosidasa alfa y avalglucosidasa alfa para la 6MWD y la FVC, con efectos relativos de 6MWD de 16.3 metros (intervalo de confianza del 95 %: 9.6-24.3) y 29.5 metros
20 (7.4-52.6), respectivamente, y efectos relativos de FVC del 3.1 % (2.4-3.8) y 2.8 % (1.0-4.6), respectivamente. Para los sujetos sin tratamiento previo, los efectos relativos de cipaglucosidasa alfa/miglustat siguieron siendo significativos para ambos criterios de valoración, excepto cipaglucosidasa alfa/miglustat frente a Aval para la FVC: 0.4 % (-0.8-1.7). Estos resultados sugieren que
25 cipaglucosidasa alfa/miglustat puede diferenciarse clínicamente en pacientes con LOPD en criterios de valoración motores y respiratorios clave, particularmente en la población con experiencia con ERT.

Algunos beneficios de esta terapia de dos componentes se describen en Gragnaniello et al., "Newborn screening for Pompe disease in Italy: Long-term
30 results and future challenges", Molecular Genetics and Metabolism Reports 33 (2022), que se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad. Gragnaniello 2022 demostró que un paciente con IOPD que recibía

cipaglicosidasa alfa/miglustat presentaba mejoras en la creatina fosfocinasa sérica (CPK), el tetrasacárido de glucosa en orina (Glc4) y el índice de masa ventricular izquierda (LVMI) después de cambiar desde el ERT de referencia.

DEFINICIONES

- 5 Los términos utilizados en la presente memoria descriptiva generalmente tienen sus significados habituales en la técnica, dentro del contexto de la presente divulgación y en el contexto específico en donde se usa cada término. A continuación, o en cualquier otra parte en la memoria descriptiva, se analizan algunos términos o expresiones para proporcionar una orientación adicional al
- 10 experto para describir las composiciones y métodos de la divulgación y cómo producirlos y usarlos. Los artículos "un" y "una" se refieren a uno o más de uno (es decir, al menos a uno) del objeto gramatical del artículo. El término "o" significa, y se usa indistintamente con, el término "y/o", a menos que el contexto indique claramente otra cosa. En esta memoria descriptiva, el uso del singular
- 15 incluye el plural a menos que se indique específicamente lo contrario. Además, el uso del término "incluye", así como otras formas, tales como "incluyen" e "incluido", no son limitantes. Se entenderá que cualquier intervalo descrito en el presente documento incluye los puntos finales y todos los valores entre los puntos finales. En la presente memoria descriptiva, excepto cuando el contexto
- 20 requiere otra cosa debido al lenguaje expreso o la implicación necesaria, la palabra "comprender" o variaciones tales como "que comprende" se usan en un sentido inclusivo, es decir, para especificar la presencia de las características indicadas, pero sin excluir la presencia o adición de otras características en diversas realizaciones de la divulgación.
- 25 El término "GAA" se refiere a α -glucosidasa ácida humana (GAA), enzima que cataliza la hidrólisis de enlaces α -1,4 y α -1,6-glucosídicos de glucógeno lisosómico, así como a variantes de inserción, relación o sustitución de las secuencias de aminoácidos de GAA y fragmentos de una secuencia de GAA más larga que ejerce actividad enzimática. La α -glucosidasa ácida humana está
- 30 codificada por el gen GAA (ID del Gen del National Centre for Biotechnology Information (NCBI) 2548), que se ha mapeado en el brazo largo del cromosoma 17 (ubicación 17q25.2-q25.3). Una secuencia de ejemplo de aminoácidos de

GAA es NP 000143.2, que se incorpora por referencia. Esta divulgación abarca también secuencias de ADN que codifican la secuencia de aminoácidos de NP 000143.2. En el gen de GAA humana se han identificado actualmente más de 500 mutaciones, muchas de las cuales se asocian a la enfermedad de Pompe.

5 Las mutaciones que dan como resultado el plegamiento incorrecto o el procesamiento incorrecto de la enzima α -glucosidasa ácida incluyen T1064C (Leu355Pro) y C2104T (Arg702Cys). Además, las mutaciones de GAA que afectan a la maduración y el procesamiento de la enzima incluyen Leu405Pro y Met519Thr. Se necesita el hexapéptido WIDMNE conservado (SEQ ID N: 7) en
10 los restos de aminoácido 516-521 para la actividad de la proteína α -glucosidasa ácida. Como se usa en el presente documento, se pretende que la abreviatura "GAA" se refiera a la enzima α -glucosidasa ácida humana, mientras que se pretende que la abreviatura en cursiva "Gaa" se refiera al gen humano que codifica la enzima α -glucosidasa ácida humana. Se pretende que la abreviatura
15 "Gaa" se refiera a genes no humanos que codifican enzimas α -glucosidasas ácidas no humanas, incluyendo, pero sin limitación, genes de rata o ratón, y se pretende que la abreviatura "Gaa" se refiera a enzimas α -glucosidasas ácidas no humanas.

Se pretende que el término "rhGAA" se refiera a la enzima α -glucosidasa
20 ácida humana recombinante y se usa para distinguir la GAA endógena de la sintética o producida por recombinación (por ejemplo, GAA producida a partir de células CHO u otras células hospedadoras transformadas con ADN que codifica GAA). El término "rhGAA" abarca una población de moléculas individuales de rhGAA. En el presente documento se proporcionan características de la
25 población de moléculas de rhGAA. Se pretende que la expresión "producto de rhGAA convencional" se refiera a productos que contienen α -glucosidasa alfa, tal como LUMIZYME®, MYOZYME®, o α -glucosidasa alfa, tal como NEXVIAZYME®.

La expresión "modificada genéticamente" o el término "recombinante" se
30 refieren a células, tales como células CHO, que expresan un producto génico particular, tal como rhGAA, 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 puede lograrse mediante cualquier método conocido en la técnica, incluyendo el direccionamiento génico y la recombinación homóloga. Como se usa en el presente documento, la expresión incluye además
5 células que se han modificado por ingeniería para expresar o sobreexpresar un gen endógeno o un producto génico que no es expresado normalmente por dicha célula, por ejemplo, mediante tecnología de activación génica.

Como se usa en el presente documento, se pretende que la expresión "alglucosidasa alfa" se refiera a una α -glucosidasa ácida humana recombinante
10 identificada como [199-arginina,223-histidina]prepro- α -glucosidasa (humana); Número de Registro de los Resúmenes Químicos 420794-05-0. La alglucosidasa alfa se aprobó para su comercialización en los Estados Unidos por Genzyme, como los productos LUMIZYME® y MYOZYME®.

Como se usa en el presente documento, el término "ATB200" se refiere a
15 una α -glucosidasa ácida humana recombinante descrita en la Solicitud de Pat. internacional N.º PCT/2015/053252, la Pat. de los EE.UU. N.º 10,208,299 y la Pat. de los EE.UU. N.º 10,961,522, cuya divulgación se incorpora en el presente documento por referencia. ATB200 también se denomina "cipaglucosidasa alfa" o "cipaglucosidasa alfa-atga". En algunas realizaciones, "ATB200" se refiere a
20 una rhGAA con un alto contenido de N-glicanos que llevan mono-M6P y bis-M6P, que se produce a partir de una estirpe celular GA-ATB200 y se purifica usando métodos descritos en el presente documento. La cipaglucosidasa alfa se comercializa actualmente con el nombre de POMBILITI™ en los Estados Unidos y POMBILITI® en la Unión Europea. POMBILITI está indicado actualmente, en
25 combinación con OPFOLDA, para el tratamiento de pacientes adultos con enfermedad de Pompe de inicio tardío. La Información de prescripción de los EE.UU. y el Resumen de la Unión Europea de las características del producto para POMBILITI se incorporan en el presente documento por referencia en su totalidad.

30 Como se usa en el presente documento, se pretende que el término "glicano" se refiera a un oligosacárido unido covalentemente a un resto de aminoácido en una proteína o polipéptido. Como se usa en el presente

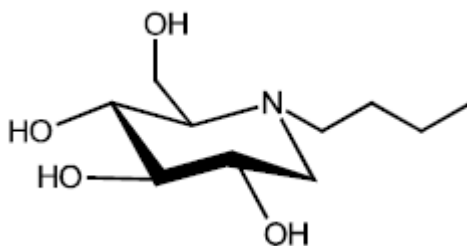
documento, se pretende que la expresión "N-glicano" o "glicano unido a N" se refiera a una cadena de polisacárido unida a un resto de asparagina en una proteína o polipéptido mediante un enlace covalente a un átomo de nitrógeno del resto de asparagina. En algunas realizaciones, las unidades de N-glicano unidas a una rhGAA se determinan mediante cromatografía de líquidos-espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS) utilizando un instrumento tal como el espectrómetro de masas Thermo Scientific™ Orbitrap Velos Pro™, el espectrómetro de masas Thermo Scientific™ Orbitrap Fusion™ Lumos Tribid™ o el espectrómetro de masas Waters Xevo® G2-XS QTof.

Como se usa en el presente documento, la capacidad vital forzada, o "FVC", es la cantidad de aire que puede exhalarse por la fuerza de los pulmones de un sujeto después de que el sujeto realice la respiración más profunda posible.

Como se usa en el presente documento, un "ensayo de caminata de seis minutos" (6MWT) es un ensayo para medir la distancia que un individuo es capaz de caminar durante un total de seis minutos sobre una superficie dura y plana. El ensayo se realiza haciendo que el individuo camine lo más lejos posible en seis minutos.

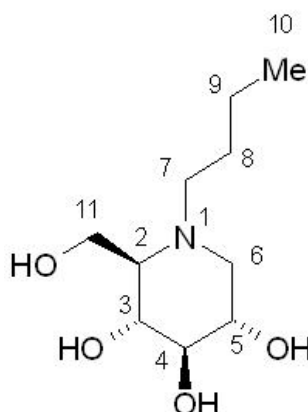
Como se usa en el presente documento, un "ensayo de caminata de diez metros" (10MWT, por sus siglas en inglés) es un ensayo para medir el tiempo que tarda una persona con calzado para caminar en caminar diez metros sobre una superficie plana.

Como se usa en el presente documento, el compuesto miglustat, también conocido como N-butil-1-desoxinojirimicina NB-DNJ o (2R,3R,4R,5S)-1-butil-2-(hidroximetil)piperidin-3,4,5-triol, es un compuesto que tiene la siguiente fórmula química:



Como alternativa se muestra como:

5



10

Una formulación de miglustat se comercializa con el nombre comercial ZAVESCA® como monoterapia para la enfermedad de Gaucher de tipo 1. En algunas realizaciones, el miglustat se denomina AT2221.

15

Actualmente se comercializa otra formulación de miglustat con el nombre OPFOLDA™ en los Estados Unidos y OPFOLDA® en la Unión Europea. OPFOLDA está indicado actualmente, en combinación con POMBILITI, para el tratamiento de pacientes adultos con enfermedad de Pompe de inicio tardío. La Información de prescripción de los EE.UU. y el Resumen de la Unión Europea de las características del producto para OPFOLDA se incorporan en el presente documento por referencia en su totalidad.

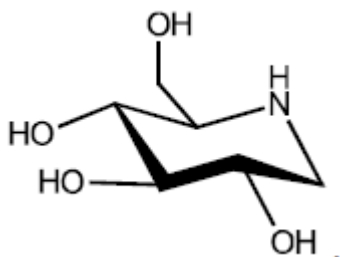
20

Como se describe a continuación, en la presente divulgación también pueden usarse sales farmacéuticamente aceptables de miglustat. Cuando se usa una sal de miglustat, la dosificación de la sal se ajustará de tal manera que la dosis de miglustat recibida por el paciente sea equivalente a la cantidad que habría recibido si se hubiera usado la base libre de miglustat.

25

Como se usa en el presente documento, el compuesto duvoglustat, también conocido como 1-desoxinojirimicina o DNJ o (2R,3R,4R,5S)-2-(hidroximetil)piperidin-3,4,5-triol, es un compuesto que tiene la siguiente fórmula química:

30



Como se usa en el presente documento, la expresión "estabilizador enzimático" se refiere a una molécula que se une específicamente a la α -glucosidasa ácida y tiene uno o más de los siguientes efectos:

- 5 • potencia la formación de una conformación molecular estable de la proteína;
- potencia el tráfico adecuado de la proteína desde el retículo endoplásmico a otra ubicación celular, preferentemente una ubicación celular nativa, para evitar la degradación de la proteína asociada al retículo endoplásmico;
- 10 • impide la agregación de proteínas conformacionalmente inestables o mal plegadas;
- restablece y/o potencia al menos parcialmente la función, estabilidad y/o actividad de tipo silvestre de la proteína;
- 15 • mejora el fenotipo o la función de la célula que alberga la α -glucosidasa ácida; y/o
- estabilizar la α -glucosidasa ácida *in vitro* y/o *in vivo* (por ejemplo, en el torrente sanguíneo de un paciente).

Por lo tanto, un estabilizador enzimático para la α -glucosidasa es una molécula que se une a la α -glucosidasa ácida, dando como resultado un plegamiento, tránsito, no agregación y/o actividad adecuados de la α -glucosidasa ácida. En al menos una realización, el estabilizador enzimático es miglustat. Otro ejemplo no limitante de un estabilizador enzimático para la α -glucosidasa ácida es duvoglustat.

Como se usa en el presente documento, se pretende que la expresión "farmacéuticamente aceptable" se refiera a entidades y composiciones moleculares que son fisiológicamente tolerables y que generalmente no producen reacciones adversas cuando se administran a un ser humano. Preferentemente, como se usa en el presente documento, la expresión "farmacéuticamente aceptable" significa que ha sido aprobada por una agencia reguladora del gobierno federal o estatal o que ha sido enumerada en la Farmacopea de Estados Unidos u otras farmacopeas reconocidas en general para su uso en animales y, más particularmente, en seres humanos. Como se

usa en el presente documento, el término "portador" se refiere a un diluyente, adyuvante, excipiente o vehículo con el que se administra un compuesto. Se conocen en la técnica portadores farmacéuticamente adecuados y, en al menos una realización, se describen en "Remington's Pharmaceutical Sciences" por E.

5 W. Martin, 18ª Edición, u otras ediciones.

Se pretende que la expresión "sal farmacéuticamente aceptable" como se usa en el presente documento, signifique una sal que es, dentro del alcance del criterio médico correcto, adecuada para el uso en contacto con los tejidos de seres humanos y animales inferiores sin la toxicidad, irritación y respuesta
10 alérgica indebidas y similares, acorde con una relación beneficio/riesgo razonable, generalmente dispersable o soluble en agua o aceite, y eficaz para su uso previsto. La expresión incluye sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables y sales de adición de base farmacéuticamente aceptables. Se encuentran listas de sales adecuadas, por ejemplo, en S. M.
15 Berge et al., J. Pharm. Sci., 1977, 66, págs. 1-19, incorporado en el presente documento por referencia. La expresión "sal de adición de ácido farmacéuticamente aceptable", como se usa en el presente documento, se refiere a aquellas sales que conservan la eficacia biológica y las propiedades de las bases libres y que no son biológicamente o de otro modo no deseables,
20 formadas con ácidos inorgánicos. La expresión "sal de adición de base farmacéuticamente aceptable", como se usa en el presente documento, se refiere a aquellas sales que conservan la eficacia biológica y las propiedades de los ácidos libres y que no son biológicamente o de otro modo no deseables, formadas con bases inorgánicas.

25 Como se usa en el presente documento, el término "tampón" se refiere a una solución que contiene un ácido débil y su base conjugada o una base débil y su ácido conjugado que ayuda a impedir cambios en el pH.

Como se usan en el presente documento, se pretende que las expresiones "dosis terapéuticamente eficaz" y "cantidad eficaz" se refieran a una
30 cantidad de α -glucosidasa y/o de miglustat y/o de una terapia de dos componentes de los mismos, que es suficiente para dar como resultado una respuesta terapéutica en un sujeto.

La respuesta terapéutica puede incluir también respuestas moleculares tales como la acumulación de glucógeno, la proliferación lisosómica y la formación de zonas autofágicas. Las respuestas terapéuticas pueden evaluarse comparando las respuestas fisiológicas y moleculares de las biopsias musculares antes y después del tratamiento con una rhGAA descrita en el presente documento. Por ejemplo, la cantidad de glucógeno presente en las muestras de biopsia puede usarse como marcador para determinar la respuesta terapéutica. Otro ejemplo incluye biomarcadores tales como LAMP-1, LC3 y Disferlina, que pueden usarse como indicadores de disfunción del almacenamiento lisosómico. Por ejemplo, las biopsias musculares recogidas antes y después del tratamiento con una rhGAA descrita en el presente documento pueden teñirse con un anticuerpo que reconozca uno o más de los biomarcadores. La respuesta terapéutica puede incluir también una disminución de la fatiga o una mejora de otros resultados informados por los pacientes (por ejemplo, actividades de la vida diaria, bienestar, etc.).

Como se usa en el presente documento, se pretende que la expresión "terapia de reemplazo enzimático" o "ERT" se refiera a la introducción de una enzima purificada no nativa en un individuo que tiene una deficiencia de dicha enzima. La proteína administrada se puede obtener de fuentes naturales o por expresión recombinante. La expresión también se refiere a la introducción de una enzima purificada en un individuo que de otro modo requeriría o se beneficiaría de la administración de una enzima purificada. En al menos una realización, dicho individuo padece insuficiencia enzimática. La enzima introducida puede ser una enzima recombinante purificada, producida *in vitro*, o una proteína purificada a partir de un tejido o fluido aislado, tal como, por ejemplo, placenta o leche animal, o de plantas.

Como se usa en el presente documento, se pretende que la expresión "terapia de dos componentes" se refiera a cualquier terapia en la que dos o más terapias individuales se administran de forma simultánea o secuencial. En alguna realización, los resultados de la terapia de dos componentes están potenciados en comparación con el efecto de cada terapia cuando se realiza individualmente. La potenciación puede incluir cualquier mejora del efecto de las diversas terapias

que pueda dar un resultado ventajoso en comparación con los resultados conseguidos por las terapias cuando se realizan solas. El efecto o los resultados potenciados pueden incluir una mejora sinérgica, en donde el efecto potenciado es mayor que los efectos aditivos de cada terapia cuando se realiza sola; una
5 potenciación aditiva, en donde el efecto potenciado es sustancialmente igual al efecto aditivo de cada terapia cuando se realiza sola; o menos que un efecto aditivo, en donde el efecto potenciado es menor que el efecto aditivo de cada terapia cuando se realiza sola, pero sigue siendo mejor que el efecto de cada terapia cuando se realiza sola. El efecto mejorado se puede medir por cualquier
10 medio conocido en la técnica mediante el cual se pueda medir la eficacia o el resultado de la terapia.

La expresión "enfermedad de Pompe" se refiere a una LSD autosómica recesiva caracterizada por una actividad de alfa-glucosidasa ácida (GAA) deficiente que altera el metabolismo glucogénico lisosómico. La deficiencia
15 enzimática provoca la acumulación glucogénica lisosómica y produce debilitamiento progresivo de los músculos esqueléticos, función cardíaca reducida, insuficiencia respiratoria y/o deterioro del SNC en las últimas fases 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
20 alterada y/o una actividad biológica que provoca, en última instancia, la enfermedad (véase en general 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
25 enfermedad de Pompe (infantil, juvenil y en adultos) se correlacionan con el nivel de actividad residual de la α -glucosidasa (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
30 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 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 década (Felicia K J et al., 1995, Clinical Variability in Adult-Onset Acid Maltase Deficiency: Report of Affected Sibs and Review of the Literature, Medicine 74, 131-135). En la enfermedad de Pompe, se ha demostrado que la α -glucosidasa se modifica extensamente de manera postraducciona por glicosilación, fosforilación y procesamiento proteolítico. Se requiere la conversión del precursor de 110 kilodalton (kDa) en formas maduras de 76 y 70 kDa por proteólisis en el lisosoma para una catálisis de glucógeno óptima. Las formulaciones y las pautas posológicas divulgadas en la presente solicitud pueden emplearse para tratar, por ejemplo, la enfermedad de Pompe de tipo I, de tipo II o de tipo III.

Actualmente se considera que la enfermedad de Pompe es un espectro continuo de fenotipos, en el que los fenotipos clínicamente más graves y de progresión rápida son la enfermedad de Pompe de inicio infantil clásica (IOPD) y los fenotipos menos graves y de progresión lenta son la enfermedad de Pompe de inicio tardío (LOPD). Los síntomas de la enfermedad de Pompe pueden aparecer por primera vez en cualquier momento de la vida. La forma más grave de IOPD aparece en los primeros 3 meses de vida. La progresión de la IOPD se caracteriza por debilidad muscular, disfunción cardíaca y disfunción respiratoria, y la esperanza de vida es de aproximadamente 2 años. IOPD atípica infantil, de inicio juvenil y no clásica son algunas de las expresiones utilizadas para describir a los pacientes pediátricos con enfermedad de Pompe que no tienen la miocardiopatía hipertrófica significativa y progresiva que se observa en la IOPD clásica y, por lo tanto, su fenotipo es más estrechamente comparable con la de la LOPD.

La enfermedad de Pompe de inicio tardío puede manifestarse en la infancia o en la edad adulta y no presenta afectación cardíaca clínicamente aparente (Leslie y Bailey, 2017). La enfermedad de Pompe de inicio tardío se denomina con frecuencia enfermedad de Pompe de inicio juvenil cuando aparece en la subpoblación pediátrica de la categoría de LOPD. La LOPD tiene una

velocidad de progresión más lenta en comparación con la IOPD clásica, y la mayoría de los pacientes experimentan debilidad progresiva de la cintura de las extremidades e insuficiencia respiratoria debido a la afectación de los músculos de las extremidades proximales inferiores y superiores, los músculos paraespinales y el diafragma. Las manifestaciones clínicas incluyen dificultad para caminar y subir escaleras y limitaciones progresivas de las actividades motoras de la vida diaria con progresión a una necesidad de apoyo ambulatorio seguida de dependencia de la silla de ruedas (Reuser, et al. 2001). Las manifestaciones clínicas de la enfermedad se ven agravadas por la afectación respiratoria, inicialmente en forma de trastornos respiratorios del sueño y ortopnea (dificultad para respirar en decúbito supino). La naturaleza progresiva de la enfermedad de Pompe generalmente da como resultado el uso de ventilación mecánica asistida invasiva.

Como se usa en el presente documento, "significativo" se refiere a la significación estadística. El término hace referencia a las pruebas estadísticas de que existe una diferencia entre dos grupos de tratamiento. Puede definirse como la probabilidad de tomar la decisión de rechazar la hipótesis nula cuando ésta es realmente verdadera. La decisión con frecuencia se toma usando un valor de $p < 0.05$ derivado de un análisis estadístico adecuado para la comparación. Véase, por ejemplo, el Ejemplo 9.

Un "sujeto" o "paciente" es preferentemente un ser humano, aunque también pueden tratarse otros mamíferos y animales no humanos que tengan trastornos que implican la acumulación de glucógeno. Un sujeto puede ser un feto, un neonato, un niño, joven o un adolescente con enfermedad de Pompe u otro trastorno de almacenamiento o acumulación de glucógeno. Un ejemplo de un individuo que se está tratando es un individuo (feto, neonato, niño, joven o adolescente adulto) que tiene GSD-II (por ejemplo, GSD-II infantil o GSD-II juvenil). El individuo puede tener actividad de GAA residual o actividad no mensurable. Por ejemplo, el individuo que tiene GSD-II puede tener una actividad de GAA que sea inferior a aproximadamente el 1 % de la actividad normal de GAA (GSD-II infantil), una actividad de GAA que sea aproximadamente el 1-10 % de la actividad normal de GAA (GSD-II juvenil). En algunas realizaciones, el

sujeto o paciente tiene menos de 18 años de edad. En algunas realizaciones, el sujeto o paciente es un paciente "con experiencia con ERT" o "con cambio de ERT", refiriéndose a un paciente con enfermedad de Pompe que ha recibido previamente terapia de reemplazo enzimático. En algunas realizaciones, un

5 paciente "con experiencia con ERT" o "con cambio de ERT" es un paciente con enfermedad de Pompe que ha recibido o está recibiendo alglucosidasa alfa durante 24 meses o más. En algunas realizaciones, un paciente "con experiencia con ERT" o "con cambio de ERT" es un paciente con enfermedad de Pompe que

10 está en declive con la ERT actualmente aprobada (por ejemplo, MYOZYME®, LUMIZYME® o NEXVIAZYME®). En algunas realizaciones, el sujeto es un paciente que ha recibido previamente terapia de reemplazo enzimático (ERT). En algunas realizaciones, el sujeto o paciente es un paciente "sin tratamiento previo con ERT", refiriéndose a un paciente con enfermedad de Pompe que no ha recibido previamente terapia de reemplazo enzimático. En determinadas

15 realizaciones, el sujeto o paciente es ambulatorio (por ejemplo, un paciente con cambio de ERT ambulatorio o un paciente sin tratamiento previo con ERT ambulatorio). En determinadas realizaciones, el sujeto o paciente es no ambulatorio (por ejemplo, un paciente con cambio de ERT no ambulatorio). El estado ambulatorio o no ambulatorio puede determinarse mediante un ensayo

20 de caminata de seis minutos (6MWT). En algunas realizaciones, un paciente ambulatorio es un paciente con enfermedad de Pompe que es capaz de caminar al menos 200 metros en el 6MWT. En algunas realizaciones, un paciente no ambulatorio es un paciente con enfermedad de Pompe que no puede caminar sin ayuda o que está postrado en una silla de ruedas. En algunas realizaciones,

25 el sujeto está usando anticonceptivos eficaces. En algunas realizaciones, el sujeto y/o la pareja del sujeto están usando métodos anticonceptivos altamente eficaces, tales como los que dan lugar a una baja tasa de fallos (por ejemplo, < 1 % al año) cuando se usan de forma consistente y correcta. Los ejemplos de métodos anticonceptivos muy eficaces incluyen, pero sin limitación: la

30 abstinencia total; la anticoncepción hormonal combinada (con estrógenos y progestágenos) asociada a la inhibición de la ovulación; la anticoncepción hormonal oral, intravaginal y transdérmica sólo con progestágenos asociada a la

inhibición de la ovulación; el dispositivo intrauterino oral, inyectable e implantable; el sistema intrauterino de liberación de hormonas; la oclusión tubárica bilateral; y la vasectomía. En algunas realizaciones, el sujeto es posmenopáusico. En algunas realizaciones, el sujeto no está en edad fértil. En algunas realizaciones, el sujeto es permanentemente estéril. En algunas realizaciones, el sujeto no está embarazada. En algunas realizaciones, el sujeto no está amamantando.

En algunas realizaciones, el paciente ha recibido previamente terapia de reemplazo enzimático (ERT). En algunas realizaciones, el paciente está en declive con la ERT actualmente aprobada (por ejemplo, MYOZYME®, LUMIZYME® o NEXVIAZYME®). En algunas realizaciones, si tienen potencial reproductivo, los pacientes tanto masculinos como femeninos han acordado usar un método anticonceptivo altamente eficaz durante toda la duración del tratamiento y hasta 90 días después de su última dosis. En algunas realizaciones, los pacientes que están tomando agonistas de los receptores β_2 o β -bloqueantes no selectivos (por ejemplo, propranolol, nadolol, carvedilol) mantienen una dosis estable según corresponda y determine el médico tratante.

Los términos "tratar" y "tratamiento", como se usan en el presente documento, se refieren a la mejora de uno o más síntomas asociados a la enfermedad, el retardo en el inicio de uno o más síntomas de la enfermedad y/o la reducción en la gravedad o frecuencia de uno o más síntomas de la enfermedad. Por ejemplo, el tratamiento puede referirse a la mejora del estado cardíaco (por ejemplo, aumento de los volúmenes diastólico final y/o sistólico final, o a la reducción o mejora de la miocardiopatía progresiva que se encuentra normalmente en GSD-II) o de la función pulmonar (por ejemplo, aumento de la capacidad vital durante el llanto sobre la capacidad basal y/o normalización de la desaturación de oxígeno durante el llanto); mejoras en el neurodesarrollo y/o las habilidades motoras (por ejemplo, aumento en la puntuación de la AIMS (escala de movimientos involuntarios anormales, por sus siglas en inglés)); la reducción de las concentraciones de glucógeno en tejido del individuo afectado por la enfermedad; o cualquier combinación de estos efectos. En una realización,

el tratamiento incluye la mejora del estado cardíaco, particularmente en la reducción de miocardiopatía asociada a GSD-II.

Los términos "mejorar", "aumentar" o "reducir", como se usan en el presente documento, indican valores relativos a una medición basal o a los valores correspondientes de un tratamiento de control, tales como una medición en el mismo individuo antes del inicio del tratamiento descrito en el presente documento, una medición en un individuo de control (o en múltiples individuos de control) en ausencia del tratamiento descrito en el presente documento, o una medición después de un tratamiento de control. Un individuo de control es un individuo que padece la misma forma de GSD-II (ya sea infantil, juvenil o de inicio en adultos) que el individuo que se está tratando, que es de aproximadamente la misma edad que el individuo que se está tratando (para garantizar que sean equiparables las fases de la enfermedad en el individuo tratado y el o los individuos de control). En algunas realizaciones, un tratamiento de control comprende la administración de alglucosidasa alfa y un placebo para un estabilizador enzimático (véase el Ejemplo 9).

Como se usa en el presente documento, las expresiones "estabilizar la función motora", "estabilizar la función pulmonar" y expresiones similares se refieren a reducir o detener el declive de la función motora y pulmonar y/o restablecer la función motora y/o pulmonar. Dado que se espera que los pacientes con enfermedad de Pompe no tratados tengan una disminución significativa de la función motora y pulmonar a lo largo del tiempo, las potenciaciones en la tasa de deterioro de la función motora y/o pulmonar y/o las potenciaciones en la función motora y/o pulmonar demuestran un beneficio de la terapia como se describe en el presente documento. Además, dado que los pacientes con enfermedad de Pompe con experiencia con ERT con frecuencia continúan en declive de la función motora y/o pulmonar a lo largo del tiempo, la estabilización de la función motora y/o pulmonar usando la terapia descrita en el presente documento puede incluir la reducción y/o detención del declive de la función motora y/o pulmonar en comparación con los pacientes que reciben el tratamiento con ERT anterior (por ejemplo, MYOZYME®, LUMIZYME® o NEXVIAZYME®).

Como se usa en el presente documento, se pretende que los términos "aproximadamente" y "alrededor de" se refieran a un grado de error aceptable para la cantidad medida dada la naturaleza o precisión de las mediciones. Por ejemplo, el grado de error puede indicarse por el número de cifras significativas proporcionadas por la medición, como se entiende en la técnica, e incluye, pero sin limitación, una variación de ± 1 en la cifra significativa más precisa presentada para la medición. Los grados de error de ejemplo típicos están dentro del 20 por ciento (%), preferentemente dentro del 10 % y, más preferentemente, dentro del 5 % de un valor dado o intervalo de valores. Las cantidades numéricas proporcionadas en el presente documento son aproximadas a menos que se indique lo contrario, lo que significa que la expresión "alrededor de" o el término "aproximadamente" puede inferirse cuando no se indique expresamente.

Todas las referencias, artículos, publicaciones, patentes, publicaciones de patentes y solicitudes de patentes citadas en el presente documento se incorporan por referencia en su totalidad a todos los efectos. Sin embargo, la mención de cualquier referencia, artículo, publicación, patente, publicación de patente y solicitud de patente citados en el presente documento no constituye, ni debe considerarse, un reconocimiento o cualquier forma de sugerencia de que constituyen el estado de la técnica válido o forman parte del conocimiento general común en cualquier país del mundo.

Los encabezamientos de sección utilizados en el presente documento tienen únicamente fines organizativos y no deben considerarse limitantes de la materia objeto descrita.

A-GLUCOSIDASA ÁCIDA HUMANA RECOMBINANTE (rhGAA)

En algunas realizaciones, la α -glucosidasa ácida humana recombinante (rhGAA) es una enzima que tiene una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 1, la SEQ ID NO: 3, la SEQ ID NO: 4, la SEQ ID NO: 5 o SEQ ID NO: 6. En algunas realizaciones, la rhGAA está codificado por una secuencia de nucleótidos como se expone en la SEQ ID NO: 2.

Tabla 1. Secuencias de nucleótidos y secuencias de proteínas

SEQ ID NO	Secuencias
5 10 15 20 25 30	1 MGVRHPPCSHRLLAVCALVSLATAALLGHILLHDFLLVPRELSGSS PVLEETHPAHQQGA SRPGPRDAQAHGPRPRAVPTQCDVPPNSRFDCAPDKAITQEQC EARGCCYIPAKQGLQGA QMGQPWCFFPPSYPSYKLENLSSSEMGYTATLTRTTPTFFPKDIL TLRLDVMMETENRLH FTIKDPANRRYEVPLETPRVHSRAPSPLYSVEFSEEPFGVIVHRQL DGRVLLNTTVAPLF FADQFLQLSTSLPSQYITGLAEHLSPLMLSTSWTRITLWNRDLAPT PGANLYGSHPFYLA LEDGGSAGHVFLNSNAMDVVLQSPALSWRSTGGILDVYIFLGP EPKSVVQQYLDVVG PFMPPYWGLGFHLCRWGYSSAITRQVVENMTRAHFPLDVQWN DLDYMDSRRDFTFNKDG FRDFPAMVQELHQGGRRYMMIVDPAISSSGPAGSYRPHYDEGLRR GVFITNETGQPLIGKV WPGSTAFPDFTNPTALAWWEDMVAEFHDQVPFDGMWIDMNEP SNFIRGSEDGCPNNELEN PPYVPGVVGGLQAATICASSHQFLSTHYNLHNLYGLTEAIAISHR ALVKARGTRPFVISR STFAGHGRYAGHWTGDVWSSWEQLASSVPEILQFNLLGVPLVG ADVCGFLGNTSEELCVR WTQLGAFYPFMRNHNSLLSLPQEPYSFSEPAQQAMRKALTLRYA LLPHLYTLFHQAHVAG ETVARPLFLEFPKDSSTWTVDHQLLWGEALLITPVLQAGKAEVTG YFPLGTWYDLQTVPI EALGSLPPPPAAPREPAIHSEGQWVTLPAPLDTINVHLRAGYIPL QGPGLTTTESRQQP

SEQ ID NO	Secuencias
5	MALAVALTKGGEARGELFWDDGESLEVLERGAYTQVIFLARNTI VNELVRVTSEGAGLQ LQKVTVLGVATAPQQVLSNGVPVSNFTYSPDTKVLDICVSLLMGE QFLVSWC
2	cagttgggaaagctgaggttgtcgccggggccgcgggtggaggtcggggatgaggcagc aggtaggacagtgacctcggtgacgcgaaggaccccgccacctctaggttctcctctcc gcccgtttcagcgagggaggctctgggcctgccgcagctgacggggaaactgaggcac ggagcgggcctgtaggagctgtccaggccatctccaacatgggagtgaggcacccgccc tgctcccaccggctcctggccgtctgcgccctcgtgtccttggaaccgctgcactcctggggc acatcctactccatgatttctgtggtccccgagagctgagtggctcctcccgagctcctggag gagactcaccagctcaccagcaggagccagcagaccaggggcccgggatgccag gcacaccccgccgtcccagagcagtgccacacagtgcgacgtccccccaacagccg cttcgattgcgcccctgacaaggccatcaccaggaacagtgcgaggcccgcggtctgtgc tacatccctgcaaagcaggggtgcagggagcccagatggggcagccctggtgtcttcc caccagctacccagctacaagctggagaacctgagctccttgaaatgggctacacgg ccacctgacctgaccacccccaccttcttcccaaggacatcctgacctgcggctggac gtgatgatggagactgagaaccgcctccacttcacgatcaaagatccagctaacaggcgct acgaggtgcccttgagaccccgctgtccacagccgggacccgtccccactctacagcgt ggagttctcgaggagccctcggggtgatcgtgcaccggcagctggacggccgcgtgctg ctgaacacgacggtggcgcccctgttctttgcggaccagttccttcagctgtccacctcgtgc cctcgcagtatatcacaggcctcgccgagcacctcagtcacctgatgctcagcaccagctgg accaggatcacctgtggaaccgggaccttgcgccacgcccgggtggaacctctacgggt ctcaccctttctacctggcgctggaggacggcggtcggcacacgggggtgttctgctaacc agcaatgcatggatgtggtcctgcagccgagccctgcccttagctggaggtcgacaggtg ggatcctggatgtctacatcttctggggccagagcccaagagcgtggtgcagcagtaacctg gacgttgtgggatacccggtcatgccgcatactggggcctgggcttcacctgtgccgctgg ggctactcctccaccgctatcacccgccaggtgggtggagaacatgaccaggggccactcc ccctggacgtccaatggaacgacctggactacatggactcccgaggaggacttcacgttaa caaggatggcttccgggacttccggccatggtgcaggagctgcaccaggggcgccggcg ctacatgatgatcgtggatcctgccatcagcagctcggggcctgccgggagctacaggccct

SEQ ID NO	Secuencias
5	acgacgagggctctgcgaggggggtttcatcaccaacgagaccggccagccgctgattg ggaaggatagggccgggtccactgcctccccgacttcaccaacccacagccctggcctg gtgggaggacatgggtggctgagttccatgaccaggtgcccttcgacggcatgtggattgacat gaacgagccctccaacttcacagaggctctgaggacggctgccccacaatgagctggag aaccacccctacgtgcctggggtgggtggggggaccctccaggcggccaccatctgtgcctc cagccaccagtttctctccacacactacaacctgcacaacctctacggcctgaccgaagcc atcgctcccacagggcgctggtgaaggctcgggggacacgcccatttgtatctccgctc
10	gaccttgctggccacggccgatacgccggccactggacgggggacgtgtggagctcctgg gagcagctcgctcctccgtgccagaaatcctgcagtttaacctgctgggggtgcctctggtc ggggccgacgtctcggttctctgggcaacacctcagaggagctgtgtgtgcgtggaccc agctgggggccttctaccccttcacggaaccacaacagcctgtcagctctccccaggag ccgtacagcttcagcgagccggccagcaggccatgaggaaggccctcacctgcgctac
15	gcactcctccccacctctacacactgttccaccaggccacgtcggggggagaccgtgg cccgccccctctctggagttcccaaggactctagcacctggactgtggaccaccagctc ctgtgggggggagggcctgtcatccccagtgctccaggccgggaaggccgaagtgact ggctacttccccttgggcacatggtacgacctgcagacgggtgccaatagaggcccttggcag cctcccacccccacctgcagctccccgtgagccagccatccacagcgaggggacgtgggt
20	gacgctgcgggccccctggacaccatcaacgtccacctccgggctgggtacatcatcccc ctgcagggccctggcctcacaaccacagagtcggccagcagcccatggccctggctgtg gccctgaccaaggggtggagaggcccgaggggagctgttctgggacgatggagagagcct ggaagtgtgagcgaggggcctacacacaggctcatcttctggccaggaataaacacgat
25	cgatgaatgagctggtacgtgtgaccagtgagggagctggcctgcagctgcagaagggtgact gtcctgggctggccacggcgccccagcaggtcctctccaacgggtgtccctgtctccaacttc acctacagccccgacaccaaggctcctggacatctgtgtctcgctgttgatgggagagcagttt ctcgtcagctggtgttagccgggaggagtggttagtctctccagagggaggctggttcccca
30	gggaagcagagcctgtgtgcgggcagcagctgtgtgcgggcctgggggtgcatgtgtcac ctggagctgggcactaaccattccaagccgcccgcacgtgtgttccacctcctgggcccgggg ctctggcccccaacgtgtctaggagagcttctccctagatcgactgtgggcccggggcctgg agggtgtctgtgttaataagattgtaagggttgcctcctcacctgttgccggcatgcgggta gtattagccacccccctccatctgttccagcaccggagaaggggggtgtcaggtggaggtg

SEQ ID NO	Secuencias
5	tggggtatgcacctgagctcctgcttcgcgcctgctgctctgccccaacgcgaccgcttcccg gctgcccagaggggctggatgcctgccgggtccccgagcaagcctgggaactcaggaaaatt cacaggacttgggagattctaaatcttaagtgaattattttaataaaaggggcatcttgaatc
10	3 MGVRHPPCSHRLAVCALVSLATAALLGHILLHDFLLVPRELSGSS PVLEETHPAHQQGA SRPGPRDAQAHPRPRAVPTQCDVPPNSRFDCAPDKAITQEQC EARGCCYIPAKQGLQGA QMGQPWCFFPPSYPSYKLENLSSSEMGYTATLTRTTPTFFPKDIL TLRLDVMMETENRLH FTIKDPANRRYEVPLETPRVHSRAPSPLYSVEFSEEPFGVIVHRQL DGRVLLNTTVAPLF
15	FADQFLQLSTSLPSQYITGLAEHLSPLMLSTSWTRITLWNRDLAPT PGANLYGSHPFYLA LEDGGSAGHVFLSNSNAMDVVLQPSPALSWRSTGGILDVYIFLGP EPKSVVQQYLDVVG
20	Y PFMPYWGGLGFHLCRWGYSSTAITRQVENMTRAHFPLDVQWN DLDYMDSRRDFTFNKDG FRDFPAMVQELHQGGRRYMMIVDPAISSSGPAGSYRPHYDEGLRR GVFITNETGQPLIGKV WPGSTAFPDTNPTALAWWEDMVAEFHDQVPFDGMWIDMNEP SNFIRGSEDGCPNNELEN
25	PPYVPGVGGTLQAATICASSHQFLSTHYNLHNLYGLTEAIAHR ALVKARGTRPFVISR STFAGHGRYAGHWTGDVWSSWEQLASSVPEILQFNLLGVPLVG ADVCGFLGNTSEELCVR
30	WTQLGAFYPFMRNHNSLLSLPQEPYSFSEPAQQAMRKALTLRYA LLPHLYTLFHQAHVAG ETVARPLFLEFPKDSSTWTVDHQLLWGEALLITPVLQAGKAEVTG YFPLGTWYDLQTVPI

SEQ ID NO	Secuencias
5	EALGSLPPPPAAPREPAIHSEGQWVTLPAPLDTINVHLRAGYIIPL QGPGLTTTESRQQP MALAVALTKGGEARGELFWDDGESLEVLERGAYTQVIFLARNTI VNELVRVTSEGAGLQ LQKVTVLGVATAPQQVLSNGVPVSNFTYSPDTKVLDICVSLLMGE QFLVSWC
10	4 MGVRHPPCSHRL LAVCALVSLATAALLGHILLHDFLLVPRELSGSS PVLEETHPAHQQGA SRPGPRDAQAHPRPRAVPTQCDVPPNSRFDCA PDKAITQE QC EARGCCYIPAKQGLQGA QMGQPWCFFPPSYPSYKLENLSSEMGYTATLTRTTPTFFPKDIL TLRLDVMMETENRLH
15	FTIKDPANRRYEVPLETPHVHSRAPSPLYSVEFSEEPFGVIVRRQL DGRVLLNTTVAPLF FADQFLQLSTSLPSQYITGLAEHLSPLMLSTSWTRITLWNRDLAPT PGANLYGSHPFYLA
20	LEDGGS AHGVFLSNSAMDVVLQPSPALSWRSTGGILDVYIFLGP EPKSVVQQYLDVVG Y PFMPPYWGLGFHL CRWGYSSAITRQVVENMTRAHFPLDVQWN DLDYMDSR RDFTFNKDG FRDFPAMVQELHQGGRRYMMIVDPAISSSGPAGSYR PYDEGLRR GVFITNETGQPLIGKV
25	WPGSTAFPDFTNPTALAWWEDMVAEFHDQVPFDGMWIDMNEP SNFIRGSEDGCPNNELEN PPYVPGVVG GTLQAATICASSHQFLSTHYNLHNLYGLTEA IASHR ALVKARGTRPFVISR
30	STFAGHGRYAGHWTGDVWSSWEQLASSVPEILQFNLLGVPLVG ADVCGFLGNTSEELCVR WTQLGAFYPFMRNHNSLLSLPQEPYSFSEPAQQAMRKALTLRYA LLPHLYTLFHQAHVAG

SEQ ID NO	Secuencias
5	ETVARPLFLEFPKDSSTWTVDHQLLWGEALLITPVLQAGKAEVTG YFPLGTWYDLQTPPV EALGSLPPPPAAPREPAIHSEGQWVTLPAPLDTINVHLRAGYIPL QGPGLTTTESRQQP MALAVALTKGGEGARGELFWDDGESLEVLERGAYTQVIFLARNTI VNELVRVTSEGAGLQ LQKVTVLGVATAPQQVLSNGVPVSNFTYSPDTKVLDICVSLLMGE QFLVSWC
10	5
15	QQGASRPGPRDAQAHPRPRAVPTQCDVPPNSRFDCAPDKAIT QEQCEARGCCYIPAKQG LQGAQMGPWCFFPPSYPSYKLENLSSEMGYTATLTRTTPTFF PKDILTLRLDVMMETE NRLHFTIKDPANRRYEVPLETPRVHSRAPSPLYSVEFSEEPFGVIV HRQLDGRVLLNTTV APLFFADQFLQLSTSLPSQYITGLAEHLSPLMLSTSWTRITLWNRD LAPTPGANLYGSHP FYLALEDGGSAGHVFLNNSNAMDVVLQPSPALSWRSTGGILDVYI FLGPEPKSVVQQYLD VVGYPFMPPYWGLGFHLCRWGYSSAITRQVVENMTRAHFPLD VQWNDLDYMDSRRDFTF NKDGFRDFPAMVQELHQGGRRYMMIVDPAISSSGPAGSYRPPYD EGLRRGVFITNETGQPL IGKVWPGSTAFDPFTNPTALAWWEDMVAEFHDQVPFDGMWIDM NEPSNFIRGSEDGCPNN ELENPPYVPGVVGGTLQAATICASSHQFLSTHYNLHNLGLTEAIA SHRALVKARGTRPF VISRSTFAGHGRYAGHWTGDVWSSWEQLASSVPEILQFNLLGVP LVGADVCGFLGNTSEE LCVRWTQLGAFYPFMRNHNSLLSLPQEPYSFSEPAQQAMRKALT LRYALLPHLYTLFHQA
20	
25	
30	

SEQ ID NO	Secuencias
5	HVAGETVARPLFLEFPKDSSTWTVDHQLLWGEALLITPVLQAGKA EVTGYFPLGTWYDLQ TVPIEALGSLPPPPAAPREPAIHSEGQWVTLPAPLDTINVHLRAGYI IPLQGPGLTTTES RQQPMALAVALTKGGEARGELFWDDGESLEVLERGAYTQVIFLA RNNTIVNELVRVTSEG AGLQLQKVTVLGVATAPQQVLSNGVPVSNFTYSPDTKVLDICVSL LMGEQFLVSWC
6	QQGASRPGPRDAQAHPRPRAVPTQCDVPPNSRFDCAPDKAIT QEQCEARGCCYIPAKQGLQGAQMGPWCFFPPSYPSYKLENLS SSEMGYTATLTRTTPTFFPKDILTLRLDVMMETENRLHFTIKDPAN RRYEVPLETPHVHSRAPSPLYSVEFSEEPFGVIVRRQLDGRVLLN TTVAPLFFADQFLQLSTSLPSQYITGLAEHLSPLMLSTSWTRITLW NRD LAPTPGANLYGSHPFYLALEDGGS AHGVFLLNSNAMDVVLQ PSPALSWRSTGGILDVYIFLGPEPKSVVQQYLDVVGYPFMPPIYW GLGFHL CRWGYSSAITRQVVENMTRAHFPLDVQWNDLDYMD S RRDFTFNKDGFRDFPAMVQELHQGGRRYMMIVDPAISSSGPAGS YRPYDEGLRRGVFITNETGQPLIGKVWPGSTAFPDTNPTALAW WEDMVAEFHDQVPFDGMWIDMNEPSNFIRGSEDGCPNNELENP PYVPGVVGGTLQAATICASSHQFLSTHYNLHNL YGLTEAIASHRAL VKARGTRPFVISRSTFAGHG RYAGHWTGDVWSSWEQLASSVPEI LQFNLLGVPLVGADVCGFLGNTSEELCVRWTQLGAFYPFMRNHN SLLSLPQEPYSFSEPAQQAMRKALTRYALLPHLYTLFHQAHVAG ETVARPLFLEFPKDSSTWTVDHQLLWGEALLITPVLQAGKAEVTG YFPLGTWYDLQTVPVEALGSLPPPPAAPREPAIHSEGQWVTLPA PLDTINVHLRAGYIIP LQGPGLTTTESRQQPMALAVALTKGGEAR GE LFWDDGESLEVLERGAYTQVIFLAR NNTIVNELVRVTSEGAGLQL QKVTVLGVATAPQQVLSNGVPVSNFTYSPDTKVLDICVSLLMGEQ FLVSWC

En algunas realizaciones, la rhGAA tiene una secuencia de aminoácidos de GAA como se expone en la SEQ ID NO: 1, como se describe en la Patente de los EE.UU. N.º 8,592,362 y tiene un número de registro de GenBank AHE24104.1 (GI:568760974). En algunas realizaciones, la rhGAA tiene una
5 secuencia de aminoácidos de GAA codificada en la SEQ ID NO: 2, la secuencia de ARNm que tiene el número de registro del GenBank Y00839.1. En algunas realizaciones, la rhGAA tiene una secuencia de aminoácidos de GAA como se expone en la SEQ ID NO: 3. En algunas realizaciones, la rhGAA tiene una
10 secuencia de aminoácidos de GAA como se expone en la SEQ ID NO: 4 y tiene el número de registro NP_000143.2 del National Center for Biotechnology Information (NCBI) o el número de registro P10253 de UniProtKB.

En algunas realizaciones, la rhGAA se expresa inicialmente como una proteína que tiene la secuencia de 952 aminoácidos de longitud completa de GAA de tipo silvestre como se expone en la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 4, y
15 la rhGAA experimenta un procesamiento intracelular que elimina una porción de los aminoácidos, por ejemplo, los primeros 56 aminoácidos. En consecuencia, la rhGAA que es secretada por la célula hospedadora puede tener una secuencia de aminoácidos más corta que la rhGAA expresada inicialmente dentro de la célula. En algunas realizaciones, la proteína más corta tiene la secuencia de
20 aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 5, que sólo difiere de la SEQ ID NO: 1 en que se han eliminado los primeros 56 aminoácidos que comprenden el péptido señal y el péptido precursor, dando como resultado de esta manera una proteína que tiene 896 aminoácidos. En algunas realizaciones, la proteína más corta tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 6, que sólo
25 difiere de la SEQ ID NO: 4 en que se han eliminado los primeros 56 aminoácidos que comprenden el péptido señal y el péptido precursor, dando como resultado de esta manera una proteína que tiene 896 aminoácidos. También son posibles otras variaciones en el número de aminoácidos, tales como 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 o más supresiones, sustituciones y/o inserciones con
30 respecto a la secuencia de aminoácidos descrita por la SEQ ID NO: 1, la SEQ ID NO: 4, la SEQ ID NO: 5 o SEQ ID NO: 6. En algunas realizaciones, el producto

rhGAA incluye una mezcla de moléculas de α -glucosidasa ácida humana recombinante que tienen diferentes longitudes de aminoácidos.

En algunas realizaciones, la rhGAA comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 % o 99 % idéntica a la SEQ ID NO: 4 o la SEQ ID NO: 6. Se pueden usar diversos algoritmos y/o programas de alineación para calcular la identidad entre dos secuencias, entre los que se incluyen FASTA, o BLAST, que están disponibles como parte del paquete de análisis de secuencias GCG (University of Wisconsin, Madison, Wis.), y se pueden usar con, por ejemplo, una parametrización predeterminada. Por ejemplo, se contemplan polipéptidos que tienen al menos un 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 % o 99 % de identidad con polipéptidos específicos descritos en el presente documento y que preferentemente presentan en esencia las mismas funciones, así como polinucleótidos que codifican dichos polipéptidos. A no ser que se indique otra cosa, una puntuación de similitud se basará en el uso de BLOSUM62. Cuando se usa BLASTP, el porcentaje de similitud se basa en la puntuación de positivos de BLASTP y el porcentaje de identidad de secuencia se basa en la puntuación de identidades de BLASTP. "Identidades" BLASTP muestra el número y la fracción de restos totales en los pares de secuencia de alta puntuación que son idénticos; y "Positivos" BLASTP muestra el número y la fracción de restos para los que las puntuaciones de alineación tienen valores positivos y que son similares entre sí. Las secuencias de aminoácidos que 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 polinucleotídicas de polipéptidos similares se deducen usando el código genético y se pueden obtener por medios convencionales, en particular, traduciendo de forma inversa su secuencia de aminoácidos usando el código genético.

En algunas realizaciones, la rhGAA experimenta modificaciones postraduccionales y/o químicas en uno o más restos de aminoácidos de la proteína. Por ejemplo, los restos de metionina y triptófano pueden sufrir oxidación. Como otro ejemplo, la glutamina N-terminal en la SEQ ID NO: 6 puede

modificarse adicionalmente para formar piroglutamato. Como otro ejemplo, los restos de asparagina pueden sufrir desamidación a ácido aspártico. Como otro ejemplo más, los restos de ácido aspártico pueden sufrir isomerización a ácido isoaspártico. Como otro ejemplo más, los restos de cisteína no apareados en la proteína pueden formar enlaces disulfuro con cisteína y/o glutatión libre. En consecuencia, en algunas realizaciones, la enzima se expresa inicialmente como una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 1, la SEQ ID NO: 3, la SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 5 o una secuencia de aminoácidos codificada por la SEQ ID NO: 2, y la enzima experimenta una o más de estas modificaciones postraduccionales y/o químicas. Dichas modificaciones están también comprendidas dentro del alcance de la presente divulgación.

GLICOSILACIÓN LIGADA A N DE rhGAA

Existen siete sitios de glicosilación ligada a N potenciales en una única molécula de rhGAA. Estos sitios de glicosilación potenciales están en las siguientes posiciones de la SEQ ID NO: 6: N84, N177, N334, N414, N596, N826 y N869. De forma similar, para la secuencia de aminoácidos de longitud completa de SEQ ID NO: 4, estos sitios de glicosilación potenciales están en las siguientes posiciones: N140, N233, N390, N470, N652, N882 y N925. Otras variantes de rhGAA pueden tener sitios de glicosilación similares, dependiendo de la localización de los restos de asparagina. Generalmente, las secuencias de Asn-X-Ser o Asn-X-Th en la secuencia de aminoácidos de la proteína indican sitios de glicosilación potenciales, con la excepción de que X no puede ser HIS o PRO.

Las moléculas de rhGAA descritas en el presente documento pueden tener, en promedio, 1, 2, 3 o 4 grupos manosa-6-fosfato (M6P) en sus N-glicanos. Por ejemplo, sólo un N-glicano en una molécula de rhGAA puede llevar M6P (mono-fosforilado o mono-M6P), un único N-glicano puede llevar dos grupos M6P (bis-fosforilado o bis-M6P), o dos N-glicanos diferentes en la misma molécula de rhGAA pueden llevar cada uno grupos M6P únicos. En algunas realizaciones, las moléculas de rhGAA descritas en el presente documento tienen en promedio 3-4 mol de grupos M6P en sus N-glicanos por mol de rhGAA. Las moléculas de α -glucosidasa ácida humana recombinante pueden tener

también N-glicanos que no llevan grupos M6P. En otra realización, en promedio la rhGAA comprende más de 2.5 mol de M6P por mol de rhGAA y más de 4 mol de ácido siálico por mol de rhGAA. En algunas realizaciones, en promedio la rhGAA comprende aproximadamente 3-3.5 mol de M6P por mol de rhGAA. En algunas realizaciones, en promedio la rhGAA comprende aproximadamente 4-5.4 mol de ácido siálico por mol de rhGAA. En promedio, al menos aproximadamente el 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 % o 20 % de los N-glicanos totales en la rhGAA pueden estar en forma de un N-glicano mono-M6P, aproximadamente el 6.25 % de los N-glicanos totales pueden llevar un único grupo M6P y en promedio, al menos aproximadamente el 0.5, 1, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0 % de los N-glicanos totales en la rhGAA están en forma de un N-glicano bis-M6P y en promedio menos del 25 % de la rhGAA total no contiene ningún N-glicano fosforilado que se una a CIMPR. En algunas realizaciones, en promedio de aproximadamente el 10 % a aproximadamente el 14 % de los N-glicanos totales en la rhGAA están monofosforilados. En algunas realizaciones, en promedio de aproximadamente el 7 % a aproximadamente el 25 % de los N-glicanos totales en la rhGAA están bisfosforilados. En algunas realizaciones, en promedio la rhGAA comprende aproximadamente 1.3 mol de bis-M6P por mol de rhGAA.

La rhGAA descrita en el presente documento puede tener en promedio de 0.5 a 7.0 mol de M6P por mol de rhGAA o cualquier valor intermedio o subintervalo del mismo, 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 de M6P por mol de rhGAA. La rhGAA se puede fraccionar para proporcionar preparaciones de rhGAA con diferentes números promedio de N-glicanos que llevan mono-M6P o bis-M6P, lo que permite una mayor personalización de la rhGAA dirigida a los lisosomas en los tejidos diana mediante la selección de una fracción particular o mediante la combinación selectiva de diferentes fracciones.

En algunas realizaciones, hasta el 60 % de los N-glicanos en la rhGAA puede estar totalmente sialilados, por ejemplo, hasta el 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 % o 60 % de los N-glicanos pueden estar totalmente sialilados. En algunas realizaciones, no más del 50 % de los N-glicanos de la rhGAA están totalmente sialilados. En algunas realizaciones, del 4 % al 20 % de los N-glicanos totales

están totalmente sialilados. En otras realizaciones, no más del 5 %, 10 %, 20 % o 30 % de los N-glicanos de la rhGAA llevan ácido siálico y un resto terminal de galactosa (Gal). Este intervalo incluye todos los valores intermedios y subintervalos, por ejemplo, del 7 % al 30 % de los N-glicanos totales en la rhGAA pueden llevar ácido siálico y galactosa terminal. En otras realizaciones, no más del 5 %, 10 %, 15 %, 16 %, 17 %, 18 %, 19 % o 20 % de los N-glicanos en la rhGAA tienen una galactosa terminal solamente y no contienen ácido siálico. Este intervalo incluye todos los valores y subintervalos intermedios, por ejemplo, del 8 % al 19 % de los N-glicanos totales en la rhGAA en la composición pueden tener galactosa terminal solamente y no contener ácido siálico.

En algunas realizaciones, del 40 % al 60 %, del 45 % al 60 %, del 50 % al 60 % o del 55 % al 60 % de los N-glicanos totales en la rhGAA son N-glicanos de tipo complejo; o no más del 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 % o 7 % de los N-glicanos totales en la rhGAA son N-glicanos de tipo híbrido; no más del 5 %, 10 %, 15 %, 20 % o 25 % de los N-glicanos de tipo de alto contenido de manosa en la rhGAA no están fosforilados; al menos el 5 % o 10 % de los N-glicanos de tipo de alto contenido de manosa están monofosforilados; y/o al menos el 1 % o 2 % de los N-glicanos de tipo de alto contenido de manosa en la rhGAA están bisfosforilados. Estos valores incluyen todos los valores intermedios y subintervalos. Una rhGAA puede cumplir uno o más de los intervalos de contenido descritos anteriormente.

En algunas realizaciones, la rhGAA puede tener, en promedio, de 2.0 a 8.0 moles de restos de ácido siálico por mol de rhGAA. Este intervalo incluye todos los valores intermedios y subintervalos, 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 mol de restos de ácido siálico por mol de rhGAA. Sin pretender quedar vinculados a teoría alguna, se cree que la presencia de unidades de N-glicano que llevan restos de ácido siálico puede evitar el aclaramiento no productivo de la rhGAA por parte de los receptores de asialoglicoproteína.

En una o más realizaciones, la rhGAA tiene un determinado perfil de N-glicosilación en determinados sitios de N-glicosilación potenciales. En algunas realizaciones, la rhGAA tiene siete sitios de N-glicosilación potenciales. En

algunas realizaciones, al menos el 20 % de la rhGAA se fosforila en el primer sitio de N-glicosilación potencial (por ejemplo, N84 para la SEQ ID NO: 6 y N140 para la SEQ ID NO: 4). Por ejemplo, al menos el 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, o 95% de la rhGAA puede fosforilarse en el primer sitio de N-glicosilación potencial. Esta fosforilación puede ser el resultado de unidades mono-M6P y/o bis-M6P. En algunas realizaciones, al menos el 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, o 95% de la rhGAA lleva una unidad de mono-M6P en el primer sitio de N-glicosilación potencial. En algunas realizaciones, al menos el 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, o 95% de la rhGAA lleva una unidad de bis-M6P en el primer sitio de N-glicosilación potencial. En algunas realizaciones, la rhGAA comprende en promedio aproximadamente 1.4 mol de M6P (mono-M6P y bis-M6P) por mol de rhGAA en el primer sitio de N-glicosilación potencial. En algunas realizaciones, la rhGAA comprende aproximadamente en promedio al menos 0.5 mol de bis-M6P por mol de rhGAA en el primer sitio de N-glicosilación potencial. En algunas realizaciones, la rhGAA comprende en promedio aproximadamente 0.25 mol de mono-M6P por mol de rhGAA en el primer sitio de N-glicosilación potencial. En algunas realizaciones, la rhGAA comprende en promedio de aproximadamente 0.2 mol a aproximadamente 0.3 mol de ácido siálico por mol de rhGAA en el primer sitio de N-glicosilación potencial. En al menos una realización, la rhGAA comprende una primera ocupación de sitio de N-glicosilación potencial como se representa en la Fig. 6A y un perfil de N-glicosilación como se representa en la Fig. 6B. En al menos una realización, la rhGAA comprende una primera ocupación de sitio de N-glicosilación potencial como se representa en la Fig. 19A y un perfil de N-glicosilación como se representa en la Fig. 19B o la Fig. 20B.

En algunas realizaciones, al menos el 20 % de la rhGAA se fosforila en el segundo sitio de N-glicosilación potencial (por ejemplo, N177 para la SEQ ID NO: 6 y N223 para la SEQ ID NO: 4). Por ejemplo, al menos el 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, o 95% de la rhGAA puede fosforilarse en el segundo sitio de N-glicosilación. Esta fosforilación

puede ser el resultado de unidades mono-M6P y/o bis-M6P. En algunas realizaciones, al menos el 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, o 95% de la rhGAA lleva una unidad de mono-M6P en el segundo sitio de N-glicosilación. En algunas realizaciones, al menos el 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, o 95% de la rhGAA porta una unidad bis-M6P en el segundo sitio de N-glicosilación. En algunas realizaciones, la rhGAA comprende en promedio aproximadamente 0.5 mol de M6P (mono-M6P y bis-M6P) por mol de rhGAA en el segundo sitio de N-glicosilación potencial. En algunas realizaciones, la rhGAA comprende en promedio de aproximadamente 0.4 a aproximadamente 0.6 mol de mono-M6P por mol de rhGAA en el segundo sitio de N-glicosilación potencial. En al menos una realización, la rhGAA comprende una segunda ocupación de sitio de N-glicosilación potencial como se representa en la Fig. 6A y un perfil de N-glicosilación como se representa en la Fig. 6C. En al menos una realización, la rhGAA comprende una segunda ocupación de sitio de N-glicosilación potencial como se representa en la Fig. 19A y un perfil de N-glicosilación como se representa en la Fig. 19C o la Fig. 20B.

En una o más realizaciones, al menos el 5 % de la rhGAA se fosforila en el tercer sitio de N-glicosilación potencial (por ejemplo, N334 para la SEQ ID NO: 6 y N390 para la SEQ ID NO: 4). En otras realizaciones, menos del 5 %, 10 %, 15 %, 20 % o 25 % de la rhGAA se fosforila en el tercer sitio de N-glicosilación potencial. Por ejemplo, el tercer sitio de N-glicosilación potencial puede tener una mezcla de N-glicanos con un alto contenido de manosa no fosforilados, N-glicanos complejos di-, tri-, y tetra-antenarios y N-glicanos híbridos como especies principales. En algunas realizaciones, al menos el 3 %, 5 %, 8 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 % o 50 % de la rhGAA se sialila en el tercer sitio de N-glicosilación potencial. En algunas realizaciones, la rhGAA comprende en promedio de aproximadamente 0.9 a aproximadamente 1.2 mol de ácido siálico por mol de rhGAA en el tercer sitio de N-glicosilación potencial. En al menos una realización, la rhGAA comprende una tercera ocupación de sitio de N-glicosilación potencial como se representa en la Fig. 6A y un perfil de N-

glicosilación como se representa en la Fig. 6D. En al menos una realización, la rhGAA comprende una tercera ocupación de sitio de N-glicosilación potencial como se representa en la Fig. 19A y un perfil de N-glicosilación como se representa en la Fig. 19D o la Fig. 20B.

5 En una o más realizaciones, al menos el 20 % de la rhGAA se fosforila en el cuarto sitio de N-glicosilación potencial (por ejemplo, N414 para la SEQ ID NO: 6 y N470 para la SEQ ID NO: 4). Por ejemplo, al menos el 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, o 95% de la rhGAA puede fosforilarse en el cuarto sitio de N-glicosilación potencial. Esta

10 fosforilación puede ser el resultado de unidades mono-M6P y/o bis-M6P. En algunas realizaciones, al menos el 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, o 95% de la rhGAA lleva una unidad de mono-M6P en el cuarto sitio de N-glicosilación potencial. En algunas realizaciones, al menos el 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%,

15 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, o 95% de la rhGAA lleva una unidad de bis-M6P en el cuarto sitio de N-glicosilación potencial. En algunas realizaciones, al menos el 3 %, 5 %, 8 %, 10 %, 15 %, 20 % o 25 % de la rhGAA se sialila en el cuarto sitio de N-glicosilación potencial. En algunas realizaciones, la rhGAA comprende en promedio aproximadamente 1.4 mol de M6P (mono-

20 M6P y bis-M6P) por mol de rhGAA en el cuarto sitio de N-glicosilación potencial. En algunas realizaciones, la rhGAA comprende en promedio de aproximadamente 0.4 a aproximadamente 0.6 mol de bis-M6P por mol de rhGAA en el cuarto sitio de N-glicosilación potencial. En algunas realizaciones, la rhGAA comprende en promedio de aproximadamente 0.3 a aproximadamente 0.4 mol

25 de mono-M6P por mol de rhGAA en el cuarto sitio de N-glicosilación potencial. En al menos una realización, la rhGAA comprende una cuarta ocupación de sitio de N-glicosilación potencial como se representa en la Fig. 6A y un perfil de N-glicosilación como se representa en la Fig. 6E. En al menos una realización, la rhGAA comprende una cuarta ocupación de sitio de N-glicosilación potencial

30 como se representa en la Fig. 19A y un perfil de N-glicosilación como se representa en la Fig. 19E o la Fig. 20B.

En una o más realizaciones, al menos el 5 % de la rhGAA se fosforila en el quinto sitio de N-glicosilación potencial (por ejemplo, N596 para la SEQ ID NO: 6 y N692 para la SEQ ID NO: 4). En otras realizaciones, menos del 5 %, 10 %, 15 %, 20 % o 25 % de la rhGAA se fosforila en el quinto sitio de N-glicosilación potencial. Por ejemplo, el quinto sitio de N-glicosilación potencial puede tener N-glicanos complejos diantennarios fucosilados como especies principales. En algunas realizaciones, al menos el 3%, 5%, 8%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, o 95% de la rhGAA está sialilado en el quinto sitio de N-glicosilación potencial. En algunas realizaciones, la rhGAA comprende en promedio de aproximadamente 0.8 a aproximadamente 0.9 mol de ácido siálico por mol de rhGAA en el quinto sitio de N-glicosilación potencial. En al menos una realización, la rhGAA comprende una quinta ocupación de sitio de N-glicosilación potencial como se representa en la Fig. 6A y un perfil de N-glicosilación como se representa en la Fig. 6F. En al menos una realización, la rhGAA comprende una quinta ocupación de sitio de N-glicosilación potencial como se representa en la Fig. 19A y un perfil de N-glicosilación como se representa en la Fig. 19F o la Fig. 20B.

En una o más realizaciones, al menos el 5 % de la rhGAA se fosforila en el sexto sitio de N-glicosilación (por ejemplo, N826 para la SEQ ID NO: 6 y N882 para la SEQ ID NO: 4). En otras realizaciones, menos del 5 %, 10 %, 15 %, 20 % o 25 % de la rhGAA se fosforila en el sexto sitio de N-glicosilación. Por ejemplo, el sexto sitio de N-glicosilación puede tener una mezcla de N-glicanos complejos di-, tri- y tetra-antennarios como especies mayoritarias. En algunas realizaciones, al menos el 3%, 5%, 8%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% o 95% de la rhGAA está sialilado en el sexto sitio de N-glicosilación. En algunas realizaciones, la rhGAA comprende en promedio de aproximadamente 1.5 a aproximadamente 4.2 mol de ácido siálico por mol de rhGAA en el sexto sitio de N-glicosilación potencial. En algunas realizaciones, la rhGAA comprende en promedio aproximadamente 0.9 mol de ácido siálico acetilado por mol de rhGAA en el sexto sitio de N-glicosilación potencial. En algunas realizaciones, la rhGAA comprende un promedio de al menos 0.05 mol de especies de glicanos con restos de poli-N-

acetil-D-lactosamina (poli-LacNAc) por mol de rhGAA en el sexto sitio de N-glicosilación potencial. En algunas realizaciones, más del 10 % de la rhGAA comprende un glicano que lleva un resto de poli-LacNAc en el sexto sitio de N-glicosilación potencial. En al menos una realización, la rhGAA comprende una

5 sexta ocupación de sitio de N-glicosilación potencial como se representa en la Fig. 6A y un perfil de N-glicosilación como se representa en la Fig. 6G. En al menos una realización, la rhGAA comprende una sexta ocupación de sitio de N-glicosilación potencial como se representa en la Fig. 19A y un perfil de N-glicosilación como se representa en la Fig. 19G o la Fig. 20B.

10 En una o más realizaciones, al menos el 5 % de la rhGAA se fosforila en el séptimo sitio de N-glicosilación potencial (por ejemplo, N869 para la SEQ ID NO: 6 y N925 para la SEQ ID NO: 4). En otras realizaciones, menos del 5 %, 10 %, 15 %, 20 % o 25 % de la rhGAA se fosforila en el séptimo sitio de N-glicosilación potencial. En algunas realizaciones, menos del 40 %, 45 %, 50 %, 15 55 %, 60 % o 65 % de la rhGAA tiene algún glicano en el séptimo sitio de N-glicosilación potencial. En algunas realizaciones, al menos el 30 %, 35 % o 40 % de la rhGAA tiene un glicano en el séptimo sitio de N-glicosilación potencial. En algunas realizaciones, la rhGAA comprende en promedio al menos 0.5 mol de ácido siálico por mol de rhGAA en el séptimo sitio de N-glicosilación potencial.

20 En algunas realizaciones, la rhGAA comprende en promedio al menos 0.8 mol de ácido siálico por mol de rhGAA en el séptimo sitio de N-glicosilación potencial. En algunas realizaciones, la rhGAA comprende en promedio aproximadamente 0.86 mol de ácido siálico por mol de rhGAA en el séptimo sitio de N-glicosilación potencial. En algunas realizaciones, la rhGAA comprende un promedio de al

25 menos 0.3 mol de especies de glicanos que llevan restos de poli-LacNAc por mol de rhGAA en el séptimo sitio de N-glicosilación potencial. En algunas realizaciones, casi la mitad de la rhGAA comprende un glicano que lleva un resto de poli-LacNAc en el séptimo sitio de N-glicosilación potencial. En al menos una realización, todos los N-glicanos identificados en el séptimo sitio de N-

30 glicosilación potencial son N-glicanos complejos. En al menos una realización, la rhGAA comprende una séptima ocupación de sitio de N-glicosilación potencial

como se representa en la Fig. 6A o como se representa en la Fig. 19A y un perfil de N-glicosilación como se representa en la Fig. 19H o en la Fig. 20B.

En algunas realizaciones, la rhGAA comprende en promedio 3-4 mol de restos de M6P por mol de rhGAA y aproximadamente de 4 a aproximadamente 7.3 mol de ácido siálico por mol de rhGAA. En algunas realizaciones, la rhGAA comprende además en promedio al menos aproximadamente 0.5 mol de bis-M6P por mol de rhGAA en el primer sitio de N-glicosilación potencial, de aproximadamente 0.4 a aproximadamente 0.6 mol de mono-M6P por mol de rhGAA en el segundo sitio de N-glicosilación potencial, de aproximadamente 0.9 a aproximadamente 1.2 mol de ácido siálico por mol de rhGAA en el tercer sitio de N-glicosilación potencial, de aproximadamente 0.4 a aproximadamente 0.6 mol de bis-M6P por mol de rhGAA en el cuarto sitio de N-glicosilación potencial, de aproximadamente 0.3 a aproximadamente 0.4 mol de mono-M6P por mol de rhGAA en el cuarto sitio de N-glicosilación potencial, de aproximadamente 0.8 a aproximadamente 0.9 mol de ácido siálico por mol de rhGAA en el quinto sitio de N-glicosilación potencial y de aproximadamente de 1.5 a aproximadamente 4.2 mol de ácido siálico por mol de rhGAA en el sexto sitio de N-glicosilación potencial. En algunas realizaciones, la rhGAA comprende además en promedio al menos 0.5 mol de ácido siálico por mol de rhGAA en el séptimo sitio de N-glicosilación potencial. En algunas realizaciones, la rhGAA comprende en promedio al menos 0.8 mol de ácido siálico por mol de rhGAA en el séptimo sitio de N-glicosilación potencial. En al menos una realización, la rhGAA comprende además en promedio aproximadamente 0.86 mol de ácido siálico por mol de rhGAA en el séptimo sitio de N-glicosilación potencial. En al menos una realización, la rhGAA comprende siete sitios de N-glicosilación potenciales con perfiles de ocupación y N-glicosilación como se representan en las Fig. 6A-6H. En al menos una realización, la rhGAA comprende siete sitios de N-glicosilación potenciales con perfiles de ocupación y N-glicosilación como se representan en las Fig. 19A-19H y las Fig. 20A-20B.

Se divulgan métodos para fabricar rhGAA, por ejemplo, en la Solicitud de Pat. internacional N.º PCT/2015/053252, la Pat. de los EE.UU. N.º 10,208,299, la Pat. de los EE.UU. N.º 10,961,522 y la Solicitud de Patente internacional de

los EE.UU. N.º 62/057,842, presentada el 30 de septiembre de 2014, cuya divulgación completa se incorpora en el presente documento por referencia.

Una vez dentro del lisosoma, la rhGAA puede degradar enzimáticamente el glucógeno acumulado. Sin embargo, los productos de rhGAA convencionales tienen niveles totales bajos de N-glicanos que llevan mono-M6P y bis-M6P y, por lo tanto, se dirigen deficientemente a las células musculares diana dando 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. Los N-glicanos con alto contenido de manosa no fosforilados también pueden ser aclarados por el receptor de manosa, dando como resultado un aclaramiento no productivo de la ERT (Fig. 2B). Por el contrario, como se muestra en la Fig. 2A, una rhGAA descrita en el presente documento puede contener una mayor cantidad de N-glicanos que llevan mono-M6P y bis-M6P, conduciendo a una captación productiva de la rhGAA en tejidos específicos tales como el músculo.

PRODUCCIÓN Y PURIFICACIÓN DE RHGAA GLICOSILADA UNIDAD A N

Como se describe en la Pat. internacional N.º PCT/2015/053252, la Pat. de los EE.UU. N.º 10,208,299 y la Pat. de los EE.UU. N.º 10,961,522, cuya totalidad se incorpora en el presente documento por referencia, pueden usarse células tales como Células de ovario de hámster chino (CHO) para producir la rhGAA descrita en las mismas. La expresión de rhGAA con alto contenido de M6P en células CHO es más ventajosa que la modificación del perfil de glicanos de una rhGAA de manera postraduccional, al menos en parte porque sólo la primera puede convertirse mediante la degradación de glicanos en una forma de rhGAA con una hidrólisis de glucógeno óptima, potenciando de este modo la eficacia terapéutica.

En algunas realizaciones, la rhGAA se produce preferentemente en una o más estirpes de células CHO transformadas con una construcción de ADN que codifica la rhGAA descrita en el presente documento. Dichas estirpes 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. Las construcciones de ADN,

que expresan variantes alélicas de la α -glucosidasa ácida u otras secuencias de aminoácidos de α -glucosidasa ácida variante tales como aquellas que son al menos un 90 %, 95 %, 98 % o 99 % idénticas a la SEQ ID NO: 4 o la SEQ ID NO: 6, pueden construirse y expresarse en células CHO. Los expertos en la materia pueden seleccionar vectores alternativos adecuados para transformar células CHO para la producción de dichas construcciones de ADN.

Se describen métodos para fabricar dichas estirpes celulares CHO en la Pat. internacional N.º PCT/2015/053252, la Pat. de los EE.UU. N.º 10,208,299 y la Pat. de los EE.UU. N.º 10,961,522, cuya totalidad se incorpora en el presente documento por referencia. Brevemente, estos métodos implican transformar una célula CHO con ADN que codifica GAA o una variante de GAA, seleccionar una célula CHO que integra de forma estable el ADN que codifica GAA en su cromosoma o cromosomas y que expresa de forma estable GAA, y seleccionar una célula CHO que expresa GAA que tiene un alto contenido de N-glicanos que llevan mono-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 N-glicanos con un alto contenido de manosa y bajo grado de no fosforilación. Las estirpes de células CHO seleccionadas pueden usarse para producir rhGAA y composiciones de rhGAA cultivando la estirpe de células CHO y recuperando dicha composición del cultivo de células CHO. En algunas realizaciones, una rhGAA producida a partir de las estirpes celulares CHO seleccionadas contiene un alto contenido de N-glicanos que llevan mono-M6P o bis-M6P que se dirigen al CIMPR. En algunas realizaciones, una rhGAA producida como se describe en el presente documento tiene niveles bajos de N-glicanos complejos con galactosa terminal. En algunas realizaciones, las estirpes de células CHO seleccionadas se denominan GA-ATB200 o ATB200-X5-14. En algunas realizaciones, las estirpes de células CHO seleccionadas abarcan un subcultivo o derivado de dicho cultivo de células CHO. En algunas realizaciones, una rhGAA producida a partir de las estirpes de células CHO seleccionadas se denomina ATB200.

Una rhGAA producida como se describe en el presente documento puede purificarse siguiendo los métodos descritos en la Pat. de los EE.UU. N.º

10,227,577 y en la Solicitud provisional de los EE.UU. N.º 62/506,569, ambas incorporadas en el presente documento por referencia en su totalidad. En la Fig. 3 se muestra un proceso de ejemplo para producir, capturar y purificar una rhGAA producida a partir de estirpes de células CHO.

5 Brevemente, el biorreactor 601 contiene un cultivo de células, tales como células CHO, que expresan y secretan rhGAA en el medio de cultivo líquido circundante. El biorreactor 601 puede ser cualquier biorreactor adecuado para cultivar las células, tal como un biorreactor de perfusión, discontinuo o alimentado discontinuo. El medio de cultivo se elimina del biorreactor después
10 de un período de tiempo suficiente para que las células produzcan rhGAA. Dicha eliminación de medio puede ser continua para un biorreactor de perfusión o puede ser discontinua para un reactor discontinuo o alimentado discontinuo. El medio puede filtrarse mediante el sistema de filtración 603 para eliminar las células. El sistema de filtración 603 puede ser cualquier sistema de filtración
15 adecuado, incluyendo un sistema de filtración de flujo tangencial alterno (ATF, por sus siglas en inglés), un sistema de filtración de flujo tangencial (TFF, por sus siglas en inglés) y/o un sistema de filtración centrífuga. En diversas realizaciones, el sistema de filtración utiliza un filtro que tiene un tamaño de poro de entre aproximadamente 10 nanómetros y aproximadamente 2 micrómetros.

20 Después de la filtración, el filtrado se carga en un sistema 605 de captura de proteínas. El sistema 605 de captura de proteínas puede incluir una o más columnas de cromatografía. Si se usa más de una columna de cromatografía, entonces las columnas se pueden colocar en serie para que la siguiente columna pueda comenzar a cargarse una vez que se cargue la primera columna. Como
25 alternativa, el proceso de eliminación de medios se puede detener durante el tiempo en que se cambian las columnas.

 En diversas realizaciones, el sistema 605 de captura de proteínas incluye una o más columnas de intercambio aniónico (AEX) para la captura directa de productos de rhGAA, particularmente la rhGAA que tiene un alto contenido de
30 M6P. La rhGAA capturada por el sistema 605 de captura de proteínas se eluye de la columna o columnas cambiando el pH y/o el contenido de sal en la columna. En la Tabla 2 se proporcionan condiciones de ejemplo para una columna de AEX.

Tabla 2. Condiciones de ejemplo para una columna de AEX

	Procedimiento	Tampón	Caudal (cm/h)	Volumen (CV)	Temperatura (°C)
5	Higienización antes del uso	NaOH 0.1-10 M	≤ 25- 2500	≥ 1-3 (≥ 10- 120 min)	15 – 25
10	Pre-Equilibrado	Tampón fosfato (PB) 20-2000 mM, pH 6.9-7.3	≤ 25- 2500	≥ 1-5	15 – 25
	Equilibrado	PB 4-400 mM, pH 6.9-7.3	≤ 25- 2500	≥ 1-5	2 – 15
	Carga	NA	≤ 10- 1000	NA	2 – 15
15	Lavado1	PB 4-400 mM, pH 6.9-7.3	≤ 25- 2500	≥ 2-10	2 – 15
20	Lavado2	PB 4-400 mM, pH 6.9-7.3	≤ 25- 2500	≥ 2-10	15 – 25
	Elución	PB 4-400 mM, NaCl 20-2000 mM, pH 6.1-6.5	≤ 25- 2500	NA	15 – 25
	Separación	PB 4-400 mM, NaCl 0.1-10 M, pH 6.1-6.5	≤ 25- 2500	≥ 1-5	15 – 25
25	Higienización después del uso	NaOH 0.1-10 M	≤ 25- 2500	≥ 1-3 (≥ 10- 120 min)	15 – 25
	Almacenamiento	NaOH 0.01-1.0 M	≤ 25- 2500	≥ 1-5	15 – 25

La rhGAA eluida puede someterse a etapas de purificación y/o etapas de control de calidad adicionales. Por ejemplo, la rhGAA eluida puede someterse a una etapa de destrucción de virus 607. Una etapa 607 de destrucción de virus puede incluir una o más de una destrucción a pH bajo, una destrucción con

detergente u otra técnica conocida en la materia. La rhGAA de la etapa de destrucción de virus 607 puede introducirse en un segundo sistema de cromatografía 609 para purificar adicionalmente el producto de rhGAA. Como alternativa, la rhGAA eluida del sistema 605 de captura de proteínas puede alimentarse directamente al segundo sistema de cromatografía 609. En diversas realizaciones, el segundo sistema de cromatografía 609 incluye una o más columnas de cromatografía de afinidad por metales inmovilizados (IMAC) para la eliminación adicional de impurezas. En la Tabla 3 a continuación se proporcionan condiciones de ejemplo para una columna de IMAC.

10 **Tabla 3. Condiciones de ejemplo para una columna de IMAC**

	Procedimiento	Tampón	Caudal (cm/h)	Vol (CV)
	Aclarado	PB 4-400 mM, pH 6.3-6.7	≤ 25-2500	≥ 1-5
15	Higienización antes del uso	NaOH 0.01-1.0 M	≤ 25-2500	≥ 1-3 (10 - 30 min)
	Equilibrado	PB 4-400 mM, pH 6.5	≤ 25-2500	≥ 1-5
	Lavado con WFI	Agua para inyección (WFI)	≤ 25-2500	≥ 1-3
	Quelación	Acetato de cobre 0.01-1.0 M	≤ 25-2500	≥ 1-5
20	Lavado con WFI	WFI	≤ 25-2500	≥ 2-10
	Lavado con tampón ácido	Acetato sódico 2-200 mM, NaCl 0.05-5 M, pH 3.5-4.5	≤ 25-2500	≥ 2-10
	Equilibrado	PB 4-400 mM, pH 6.3-6.7	≤ 25-2500	≥ 1-5
25	Ejecución de blanco con tampón de elución	PB 4-400 mM, glicina 15-1500 mM, pH 6.1-6.5	≤ 25-2500	≥ 2-20
	Equilibrado	PB 4-400 mM, pH 6.3-6.7	≤ 25-2500	≥ 1-5
	Carga	NA	≤ 25-2500	≥ 1-5
30	Lavado1	PB 4-400 mM, pH 6.3-6.7	≤ 25-2500	≥ 2-10

5	Lavado2	PB 4-400 mM, NaCl 0.1-10 M, propilenglicol al 5-30 %, pH 6.3-6.7	$\leq 25-2500$	$\geq 2-10$
	Lavado3	PB 4-400 mM, pH 6.3-6.7	$\leq 25-2500$	$\geq 2-10$
	Elución	PB 4-400 mM, glicina 15-1500 mM, pH 6.1-6.5	$\leq 25-2500$	NA
	Separación	PB 4-400 mM, imidazol 50-5000 mM, pH 6.3-6.7	$\leq 25-2500$	$\geq 1-5$
10	Higienización después del uso	NaOH 0.01-1 M	$\leq 25-2500$	$\geq 1-3$ (10 - 30 min)
	Aclarado	PB 4-400 mM, pH 6.3-6.7	$\leq 25-2500$	$\geq 1-5$
	Almacenamiento	etanol al 5-30%	$\leq 25-2500$	$\geq 1-5$

15 Después de cargar la rhGAA en el segundo sistema de cromatografía 609, la proteína recombinante se eluye de la columna o columnas. La rhGAA eluida puede someterse a una etapa de destrucción de virus 611. Al igual que con la destrucción de virus 607, la destrucción de virus 611 puede incluir una o más de una destrucción a pH bajo, una destrucción con detergente u otra técnica conocida en la materia. En algunas realizaciones, solo se utiliza una de la destrucción de virus 607 o 611, o las destrucciones de virus se realizan en la misma etapa en el proceso de purificación.

20 La rhGAA de la etapa de destrucción de virus 611 puede introducirse en un tercer sistema de cromatografía 613 para purificar adicionalmente el producto de proteína recombinante. Como alternativa, la proteína recombinante eluida del segundo sistema de cromatografía 609 puede alimentarse directamente al tercer sistema de cromatografía 613. En diversas realizaciones, el tercer sistema de cromatografía 613 incluye una o más columnas de cromatografía de intercambio catiónico (CEX) y/o columnas de cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) para la eliminación adicional de impurezas. Después, el producto de rhGAA se eluye del tercer sistema de cromatografía 613. En la Tabla 4 a continuación se proporcionan condiciones de ejemplo para una columna de CEX.

Tabla 4. Condiciones de ejemplo para una columna de CEX

	Procedimiento	Tampón	Caudal (cm/h)	Vol (CV)
5	Higienización antes del uso	NaOH 0.1-10 M	$\leq 25-2500$	$\geq 1-3$ ($\geq 10-120$ min)
	Equilibrado	Citrato sódico 2-200 mM, pH 4.0-5.0	$\leq 30-3000$	$\geq 2-10$
10	Carga	NA	$\leq 30-3000$	NA
	Lavado	Citrato sódico 2-200 mM, pH 4.0-5.0	$\leq 30-3000$	$\geq 2-10$
	Elución	Citrato sódico 2-200 mM, NaCl 15-1500 mM, pH 4.0-5.0	$\leq 30-3000$	$\geq 2-10$
15	Separación	Citrato sódico 2-200 mM, NaCl 0.1-10 M, pH 4.0-5.0	$\leq 30-3000$	$\geq 1-5$
	Higienización después del uso	NaOH 0.1-10 M	$\leq 25-2500$	$\geq 1-3$ ($\geq 10-120$ min)
20	Almacenamiento	NaOH 0.01-1.0 M	$\leq 30-3000$	$\geq 1-5$

El producto de rhGAA también puede someterse a un procesamiento adicional. Por ejemplo, puede usarse otro sistema de filtración 615 para eliminar virus. En algunas realizaciones, dicha filtración puede utilizar filtros con tamaños de poro entre 5 y 50 μm . Otro procesamiento del producto puede incluir una etapa 617 de ajuste de producto, en la que el producto de proteína recombinante puede esterilizarse, filtrarse, concentrarse, almacenarse y/o tener componentes adicionales para añadir a la formulación de producto final.

COMPOSICIONES FARMACÉUTICAS

En diversas realizaciones, se proporciona una composición farmacéutica que comprende la rhGAA descrita en el presente documento, ya sea sola o en combinación con otros agentes terapéuticos, y/o un portador farmacéuticamente aceptable.

En una o más realizaciones, una composición farmacéutica descrita en el presente documento comprende una sal farmacéuticamente aceptable.

En algunas realizaciones, la sal farmacéuticamente aceptable utilizada en el presente documento es una sal de adición de ácido farmacéuticamente aceptable. La sal de adición de ácido farmacéuticamente aceptable puede incluir, pero sin limitación, ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido sulfámico, ácido nítrico, ácido fosfórico y similares, y ácidos orgánicos incluyendo, pero sin limitación, ácido acético, ácido trifluoroacético, ácido adípico, ácido ascórbico, ácido aspártico, ácido bencenosulfónico, ácido benzoico, ácido butírico, ácido alcanfórico, ácido alcanforsulfónico, ácido cinámico, ácido cítrico, ácido diglucónico, ácido etanosulfónico, ácido glutámico, ácido glicólico, ácido glicerofosfórico, ácido hemisulfónico, ácido hexanoico, ácido fórmico, ácido fumárico, ácido 2-hidroxietanosulfónico (ácido isetiónico), ácido láctico, ácido hidroximaleico, ácido málico, ácido malónico, ácido mandélico, ácido mesitilenosulfónico, ácido metanosulfónico, ácido naftalenosulfónico, ácido nicotínico, ácido 2-naftalenosulfónico, ácido oxálico, ácido pamoico, ácido pectínico, ácido fenilacético, ácido 3-fenilpropiónico, ácido piválico, ácido propiónico, ácido pirúvico, ácido salicílico, ácido esteárico, ácido succínico, ácido sulfanílico, ácido tartárico, ácido p-toluenosulfónico, ácido undecanoico y similares.

En algunas realizaciones, la sal farmacéuticamente aceptable utilizada en el presente documento es una sal de adición de base farmacéuticamente aceptable. La sal de adición de base farmacéuticamente aceptable puede incluir, pero sin limitación, amoníaco o hidróxido, carbonato o bicarbonato de amonio o un catión metálico tal como sodio, potasio, litio, calcio, magnesio, hierro, cinc, cobre, manganeso, aluminio y similares. Las sales derivadas de bases atóxicas orgánicas farmacéuticamente aceptables, incluyen, pero sin limitación, sales de aminas primarias, secundarias, y terciarias, compuestos de amina cuaternaria, aminas sustituidas, incluyendo las aminas sustituidas de origen natural, aminas cíclicas y resinas de intercambio iónico básicas, tales como metilamina, dimetilamina, trimetilamina, etilamina, dietilamina, trietilamina, isopropilamina, tripropilamina, tributilamina, etanolamina, dietanolamina, 2-dimetilaminoetanol,

2-dietilaminoetanol, diciclohexilamina, lisina, arginina, histidina, cafeína, hidrabramina, colina, betaína, etilendiamina, glucosamina, metilglucamina, teobromina, purinas, piperazina, piperidina, N-etilpiperidina, compuestos de tetrametilamonio, compuestos de tetraetilamonio, piridina, N,N-dimetilanilina, N-
5 metilpiperidina, N-metilmorfolina, diciclohexilamina, bibencilamina, N,N-dibencilfenetilamina, 1-efenamina, N,N'-dibenciletilendiamina, resinas de poliamina y similares.

En algunas realizaciones, la rhGAA o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma puede formularse en forma de una composición
10 farmacéutica adaptada para la administración intravenosa. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica es una solución 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. Los ingredientes de la composición farmacéutica pueden
15 suministrarse por separado o se mezclan entre sí en una forma farmacéutica unitaria, por ejemplo, en forma de un polvo liofilizado seco o concentrado exento de agua en un recipiente sellado herméticamente tal como una ampolla o bolsita en la que se indica la cantidad del principio activo. Cuando la composición es para administrarse mediante infusión, puede dispensarse con una botella de
20 infusión que contiene agua estéril de calidad farmacéutica, solución salina o dextrosa/agua. En algunas realizaciones, la infusión puede tener lugar en un hospital o clínica. En algunas realizaciones, la infusión puede tener lugar fuera del hospital o la clínica, por ejemplo, en la residencia del sujeto. Cuando la composición se administra mediante inyección, puede proporcionarse una
25 ampolla de agua estéril para inyección o solución salina con el fin de que los ingredientes puedan mezclarse antes de la administración.

En algunas realizaciones, la rhGAA o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma se administra cada 2 semanas en forma de una infusión intravenosa que dura aproximadamente 4 horas. En algunas realizaciones, el
30 volumen total de infusión se determina por el peso corporal del paciente. La velocidad de infusión puede reducirse y la duración de la infusión puede aumentarse si el paciente experimenta una IAR.

En algunas realizaciones, la velocidad de infusión inicial es de 1.5 mg/kg/hora. En algunas realizaciones, la velocidad de infusión se aumenta gradualmente en 3 mg/kg/hora cada 30 minutos si no hay signos de reacciones asociadas a la infusión (IAR) hasta que se alcanza una velocidad máxima de 10.5 mg/kg/hora; después, la velocidad de infusión se mantiene a 10.5 mg/kg/hora hasta completar la infusión. En algunas realizaciones, la duración total aproximada de la infusión es de 4 horas

Las infusiones deben administrarse de forma escalonada usando una bomba de infusión. Las velocidades de infusión pueden aumentarse desde la velocidad inicial cada 30 minutos +/- 5 minutos hasta alcanzar la velocidad máxima, como se muestra en la tabla a continuación, basándose en la dosis y el peso del paciente.

Tabla 5: Volúmenes y velocidades de infusión recomendados para una dosis de 30 mg/kg

Intervalo de peso de sujetos (kg)	Volumen de infusión total (ml)	Etapas 1 1.5 mg/kg/h (ml/h)	Etapas 2 4.5 mg/kg/h (ml/h)	Etapas 3 7.5 mg/kg/h (ml/h)	Etapas 4 10.5 mg/kg/h (ml/h)
1.25 – 10	50	3	8	13	18
10.1 – 20	100	5	15	25	35
20.1 – 30	150	8	23	38	53
30.1 – 35	200	10	30	50	70
35.1 – 50	250	13	38	63	88
50.1 – 60	300	15	45	75	105
60.1 – 100	500	25	75	125	175
100.1 – 120	600	30	90	150	210

El problema de tolerabilidad más grave de la rhGAA o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma es la aparición de reacciones asociadas a la infusión (IAR), que, en algunos casos, pueden incluir anafilaxia potencialmente mortal u otras respuestas alérgicas graves. En algunas

realizaciones, antes de la administración de la rhGAA o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, se administran pretratamientos con antihistamínicos, antipiréticos y/o corticoesteroides. Si se usó un pretratamiento con terapia de reemplazo enzimático (ERT), antes de la administración de la

5 rhGAA o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, se administran pretratamientos con antihistamínicos, antipiréticos y/o corticoesteroides.

En algunas realizaciones, la rhGAA o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma puede formularse para la administración oral. Las composiciones administrables por vía oral pueden formularse en forma de

10 comprimidos, cápsulas, óvulos, elixires, soluciones o suspensiones, geles, jarabes, colutorios o polvo seco para su reconstitución con agua u otro vehículo adecuado antes de su uso, opcionalmente con agentes aromatizantes y colorantes para aplicaciones de liberación inmediata, retardada, modificada, sostenida, pulsátil o controlada. También pueden usarse composiciones sólidas

15 tales como comprimidos, cápsulas, pastillas para chupar, píldoras, bolos, polvo, pastas, gránulos, grageas, balas o preparaciones de premezcla. Pueden prepararse composiciones sólidas y líquidas para uso oral de acuerdo con los métodos bien conocidos en la técnica. Dichas composiciones pueden contener también uno o más portadores y excipientes farmacéuticamente aceptables que

20 pueden estar en forma sólida o líquida. Pueden prepararse comprimidos o cápsulas por medios convencionales con excipientes farmacéuticamente aceptables, incluyendo, pero sin limitación, agentes aglutinantes, cargas, lubricantes, disgregantes o agentes humectantes. Se conocen en la técnica excipientes farmacéuticamente aceptables adecuados e incluyen, pero sin

25 limitación, almidón pregelatinizado, polivinilpirrolidona, povidona, hidroxipropil metilcelulosa (HPMC), hidroxipropil etilcelulosa (HPEC), hidroxipropil celulosa (HPC), sacarosa, gelatina, goma arábica, lactosa, celulosa microcristalina, hidrogenofosfato de calcio, estearato de magnesio, ácido esteárico, behenato de glicerilo, talco, sílice, maíz, almidón de patata o tapioca, almidón glicolato de

30 sodio, lauril sulfato de sodio, citrato de sodio, carbonato de calcio, fosfato de calcio dibásico, glicina croscarmelosa de sodio y silicatos complejos. Los comprimidos se pueden recubrir mediante métodos bien conocidos en la técnica.

En algunas realizaciones, una composición farmacéutica descrita en el presente documento puede formularse de acuerdo con el documento U.S. 10,512,676 y la Solicitud provisional de los EE.UU. N.º 62/506,574, ambas incorporadas en el presente documento por referencia en su totalidad. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el pH de una composición farmacéutica descrita en el presente documento es de aproximadamente 5.0 a aproximadamente 7.0 o de aproximadamente 5.0 a aproximadamente 6.0. En algunas realizaciones, el pH varía de aproximadamente 5.5 a aproximadamente 6.0. En algunas realizaciones, el pH de la composición farmacéutica es de 6.0.

5 En algunas realizaciones, el pH puede ajustarse a un pH objetivo usando ajustadores de pH (es decir, agentes alcalinizantes y agentes acidificantes) tales como hidróxido de sodio y/o ácido clorhídrico.

10

La composición farmacéutica descrita en el presente documento puede comprender un sistema tampón tal como un sistema de citrato, un sistema de fosfato y una combinación de los mismos. El citrato y/o el fosfato pueden ser un citrato de sodio o fosfato de sodio. Otras sales incluyen sales de potasio y amonio. En una o más realizaciones, el tampón comprende un citrato. En realizaciones adicionales, el tampón comprende citrato de sodio (por ejemplo, una mezcla de dihidrato de citrato de sodio y monohidrato de ácido cítrico). En una o más realizaciones, las soluciones tampón que comprenden un citrato pueden comprender citrato de sodio y ácido cítrico. En algunas realizaciones, hay presente tanto un tampón de citrato como de fosfato.

15

20

En algunas realizaciones, una composición farmacéutica descrita en el presente documento comprende al menos un excipiente. El excipiente puede actuar como agente de tonicidad, agente de carga y/o estabilizador. Los agentes de tonicidad son componentes que ayudan a garantizar que la formulación tenga una presión osmótica similar o igual a la sangre humana. Los agentes de carga son ingredientes que añaden masa a las formulaciones (por ejemplo, liofilizados) y proporcionan una estructura adecuada a la torta. Los estabilizadores son compuestos que pueden prevenir o minimizar la formación de agregados en las superficies interfaciales hidrófobas aire-agua. Un excipiente puede actuar como agente de tonicidad y agente de carga al mismo tiempo. Por ejemplo, el manitol

25

30

puede actuar como agente de tonicidad y también proporcionar beneficios como agente de carga.

Los ejemplos de agentes de tonicidad incluyen cloruro de sodio, manitol, sacarosa y trehalosa. En algunas realizaciones, el agente de tonicidad comprende manitol. En algunas realizaciones, la cantidad total de uno o más agentes de tonicidad varía en una cantidad de aproximadamente 10 mg/ml a aproximadamente 50 mg/ml. En realizaciones adicionales, la cantidad total de uno o más agentes de tonicidad varía en una cantidad de aproximadamente 10, 11, 12, 13, 14 o 15 mg/ml a aproximadamente 16, 20, 25, 30, 35, 40, 45 o 50 mg/ml.

En algunas realizaciones, el excipiente comprende un estabilizador. En algunas realizaciones, el estabilizador es un tensioactivo. En algunas realizaciones, el estabilizador es polisorbato 80. En una o más realizaciones, la cantidad total de estabilizador varía de aproximadamente 0.1 a aproximadamente 1.0 mg/ml. En realizaciones adicionales, la cantidad total de estabilizador varía de aproximadamente 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 o 0.5 mg/ml a aproximadamente 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9 o 1.0 mg/ml. En más realizaciones adicionales, la cantidad total de estabilizador es de aproximadamente 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9 o 1.0 mg/ml.

En algunas realizaciones, la composición farmacéutica comprende uno o más de los siguientes excipientes: dihidrato de citrato de sodio, monohidrato de ácido cítrico, manitol o polisorbato-80.

En algunas realizaciones, una composición farmacéutica comprende (a) una rhGAA (tal como ATB200 o cipaglucosidasa alfa), (b) al menos un tampón seleccionado del grupo que consiste en un citrato, un fosfato y una combinación de los mismos, y (c) al menos un excipiente seleccionado del grupo que consiste en manitol, polisorbato 80 y una combinación de los mismos, y tiene un pH de (i) de aproximadamente 5.0 a aproximadamente 6.0, o (ii) de aproximadamente 5.0 a aproximadamente 7.0. En algunas realizaciones, la composición comprende además agua. En algunas realizaciones, la composición puede comprender además un agente acidificante y/o un agente alcalinizante.

En algunas realizaciones, la composición farmacéutica comprende (a) una rhGAA (tal como ATB200 o cipaglicosidasa alfa) a una concentración de aproximadamente 5-50 mg/ml, aproximadamente 5-30 mg/ml o aproximadamente 15 mg/ml, (b) tampón de citrato de sodio a una concentración de aproximadamente 10-100 mM o aproximadamente 25 mM, (c) manitol a una concentración de aproximadamente 10-50 mg/ml o aproximadamente 20 mg/ml, (d) polisorbato 80, presente a una concentración de aproximadamente 0.1-1 mg/ml, aproximadamente 0.2-0.5 mg/ml o aproximadamente 0.5 mg/ml, y (e) agua, y tiene un pH de aproximadamente 6.0. En al menos una realización, la composición farmacéutica comprende (a) rhGAA 15 mg/ml (tal como ATB200 o cipaglicosidasa alfa) (b) tampón de citrato de sodio 25 mM, (c) manitol 20 mg/ml (d) polisorbato 80 0.5 mg/ml, y (e) agua, y tiene un pH de aproximadamente 6.0. En algunas realizaciones, la composición puede comprender además un agente acidificante y/o un agente alcalinizante.

En algunas realizaciones, la composición farmacéutica que comprende rhGAA (por ejemplo, ATB200 o cipaglicosidasa alfa) se diluye antes de su administración a un sujeto que la necesite. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica descrita en el presente documento puede someterse a un proceso de liofilización (liofilización) para proporcionar una torta o polvo. En consecuencia, en algunas realizaciones, la composición farmacéutica descrita en el presente documento pertenece a una composición de rhGAA después de la liofilización. La mezcla liofilizada puede comprender la rhGAA descrita en el presente documento (por ejemplo, ATB200), tampón seleccionado del grupo que consiste en un citrato, un fosfato y combinaciones de los mismos, y al menos un excipiente seleccionado del grupo que consiste en trehalosa, manitol, polisorbato 80 y una combinación de los mismos. En algunas realizaciones, a la mezcla liofilizada pueden añadirse otros ingredientes (por ejemplo, otros excipientes). La composición farmacéutica que comprende la formulación liofilizada puede proporcionarse en un vial, que después puede almacenarse, transportarse, reconstituirse y/o administrarse a un paciente.

En algunas realizaciones, la composición farmacéutica que comprende una rhGAA (por ejemplo, ATB200 o cipaglicosidasa alfa) como se describe en

el presente documento es un polvo liofilizado en viales de vidrio. En algunas realizaciones, cada vial puede contener aproximadamente 105 mg de rhGAA liofilizada (por ejemplo, ATB200 o cipaglucosidasa alfa). El polvo puede reconstituirse en agua estéril y después diluirse con cloruro de sodio al 0.9 %

5 antes de administrarlo por infusión IV. En algunas realizaciones, después de la reconstitución, el concentrado obtenido contiene 15 mg de rhGAA (por ejemplo, ATB200 o cipaglucosidasa alfa) por ml. En algunas realizaciones, después de la reconstitución con 7.2 ml de diluyente, el vial contiene un volumen utilizable de 7.0 ml de concentrado que contiene rhGAA 15 mg/ml (por ejemplo, ATB200 o

10 cipaglucosidasa alfa). En algunas realizaciones, el diluyente es agua estéril y/o cloruro de sodio al 0.9 %. En algunas realizaciones, cada vial puede incluir un sobrellenado para compensar la pérdida de líquido durante la preparación. En algunas realizaciones, la presente divulgación proporciona un vial (por ejemplo, un vial de vidrio) que contiene 105 mg de composición de rhGAA (por ejemplo,

15 ATB200 o cipaglucosidasa alfa) liofilizada que comprende rhGAA (por ejemplo, ATB200 o cipaglucosidasa alfa), dihidrato de citrato de sodio, monohidrato de ácido cítrico, manitol, polisorbato 80, en donde la cantidad/concentración de cada ingrediente puede seleccionarse de las descritas en el presente documento.

En algunas realizaciones, el número de viales que se ha de reconstituir se

20 basa en el peso corporal del paciente y en el hecho de que cada vial contiene 105 mg de rhGAA (por ejemplo, ATB200 o cipaglucosidasa alfa). En consecuencia, en algunas realizaciones, dosis del paciente (mg) = Peso del sujeto (kg) x dosis (mg/kg); y Número de viales necesarios = dosis del paciente (en mg)/105 (mg por vial). En algunas realizaciones, si el número de viales

25 incluye una fracción, se redondea al número entero superior.

Por ejemplo, en un paciente de 10 kg dosificado a 30 mg/kg: Dosis del paciente (mg) = 10 kg X 30 mg/kg = 300 mg dosis total; Número de viales necesarios = 300/105 mg por vial = 2.857 redondeado a 3 viales con fines de dispensación. La dosis del paciente es de 30 mg/kg, por lo que se extraerá el

30 volumen completo de los 2 primeros viales pero al 3.^{er} vial se le extraerán 6.0 ml y se añadirán a la bolsa de infusión.

En algunas realizaciones, el método de reconstitución comprende o consiste esencialmente en los siguientes procesos: (1) reconstituir cada vial inyectando lentamente 7.2 ml de Agua Estéril para Inyección, en la pared interior de cada vial y no directamente sobre la torta liofilizada; (2) hacer rodar cada vial suavemente, no invertir, girar ni agitar; (3) diluir una cantidad de rhGAA reconstituida basada en el peso corporal del paciente en Cloruro de sodio para Inyección al 0.9 %, inmediatamente después de la reconstitución hasta el volumen de infusión total para la dosis de 30 mg/kg basada en el peso del paciente; (4) antes de añadir la rhGAA reconstituida, eliminar el aire y la cantidad total igual al volumen reconstituido de la bolsa de Cloruro de sodio para Inyección al 0.9 %; (5) extraer lentamente la solución reconstituida de cada vial evitando la formación de espuma en la jeringa; (6) Añadir lentamente la solución de cipaglicosidasa alfa reconstituida directamente en la bolsa de Cloruro de sodio para Inyección al 0.9 % (no añadir directamente en el espacio de aire que pueda quedar dentro de la bolsa de infusión) evitando la formación de espuma en la bolsa de infusión (Como alternativa, la dilución del producto puede lograrse usando una bolsa de infusión vacía del tamaño adecuado para añadir el volumen necesario de Cloruro de sodio para Inyección al 0.9 % y la rhGAA reconstituida basándose en el peso del paciente). Se recomienda usar bolsas precargadas de Cloruro de sodio para Inyección al 0.9 %; (7) invertir o masajear suavemente la bolsa de infusión para mezclar; y (8) cubrir la bolsa de infusión y el tubo para proteger el medicamento de la luz. Después de la reconstitución, cada vial producirá una concentración de 15 mg/ml. La dosis total extraíble por vial es de 105 mg por 7 ml.

En algunas realizaciones, sólo se diluye la cantidad exacta de rhGAA reconstituida basándose en el peso corporal del paciente. En algunas realizaciones, para la extracción parcial del vial reconstituido, las cantidades se redondean hacia arriba o hacia abajo hasta 1 decimal. En algunas realizaciones, la bolsa de infusión no se agita para mezclar o se usa un tubo neumático para transportar la bolsa de infusión. En algunas realizaciones, las soluciones reconstituidas y diluidas pueden contener partículas en forma de finas hebras

blancas o fibras translúcidas después de la preparación inicial y pueden aumentar a lo largo del tiempo.

La presente divulgación también proporciona una composición farmacéutica que comprende un estabilizador enzimático. En algunas realizaciones, una composición farmacéutica descrita en el presente documento comprende un estabilizador enzimático. En algunas realizaciones, el estabilizador enzimático es miglustat o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. En otra realización, el estabilizador enzimático es duvoglustat o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

En algunas realizaciones, una rhGAA descrita en el presente documento se formula en una composición farmacéutica mientras que un estabilizador enzimático tal como miglustat se formula en otra composición farmacéutica. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica que comprende miglustat se basa en una formulación disponible en el mercado como ZAVESCA® (Actelion Pharmaceuticals). En algunas realizaciones, la composición farmacéutica que comprende miglustat comprende celulosa microcristalina, almidón pregelatinizado, sucralosa en polvo Emprove®, estearato de magnesio y/o dióxido de silicio coloidal. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica es una cápsula de gelatina dura para la administración oral, que comprende aproximadamente 65 mg de miglustat, celulosa microcristalina, almidón pregelatinizado, sucralosa en polvo Emprove®, estearato de magnesio y/o dióxido de silicio coloidal.

En algunas realizaciones, una composición farmacéutica que comprende miglustat comprende el 20 %-40 % en peso de miglustat, tal como el 30-35 % en peso de miglustat. En algunas realizaciones, una composición farmacéutica que comprende miglustat comprende además el 40 %-60 % en peso de celulosa microcristalina, tal como el 45-55 % en peso de celulosa microcristalina. En algunas realizaciones, una composición farmacéutica que comprende miglustat comprende además el 5 %-25 % en peso de almidón pregelatinizado, tal como el 10-20 % en peso de almidón pregelatinizado. En algunas realizaciones, una composición farmacéutica que comprende miglustat comprende además el 0.1 %-5 % en peso de sucralosa, tal como el 0.2-1 % en peso de sucralosa. En

algunas realizaciones, una composición farmacéutica que comprende miglustat comprende además el 0.1 %-5 % en peso de estearato de magnesio, tal como el 0.2-1 % en peso de estearato de magnesio. En algunas realizaciones, una composición farmacéutica que comprende miglustat comprende además el

5 0.1 %-5 % en peso de dióxido de silicio coloidal, tal como el 0.2-1 % en peso de dióxido de silicio coloidal. En algunas realizaciones, una composición farmacéutica que comprende miglustat se proporciona en una cápsula de gelatina dura para la administración oral. En algunas realizaciones, la

10 composición farmacéutica es una cápsula de gelatina dura para la administración oral, que comprende aproximadamente el 20 %-40 % (por ejemplo, el 30-35 %) en peso de miglustat, el 40 %-60 % (por ejemplo, el 45-55 %) en peso de celulosa microcristalina, el 5 %-25 % (por ejemplo, el 10-20 %) en peso de almidón pregelatinizado, el 0.1 %-5 % (por ejemplo, el 0.2 %-1 %) en peso de sucralosa, el 0.1 %-5 % (por ejemplo, el 0.2 %-1 %) en peso de estearato de

15 magnesio y/o el 0.1 %-5 % (por ejemplo, el 0.2 %-1 %) en peso de dióxido de silicio coloidal. En algunas realizaciones, una composición farmacéutica que comprende miglustat se proporciona en una forma farmacéutica oral líquida, tal como una solución, dispersión, o suspensión oral. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica es una forma farmacéutica líquida oral, que

20 comprende aproximadamente el 20 %-40 % (por ejemplo, el 30-35 %) en peso de miglustat, el 40 %-60 % (por ejemplo, el 45-55 %) en peso de celulosa microcristalina, el 5 %-25 % (por ejemplo, el 10-20 %) en peso de almidón pregelatinizado, el 0.1 %-5 % (por ejemplo, el 0.2 %-1 %) en peso de sucralosa, el 0.1 %-5 % (por ejemplo, el 0.2 %-1 %) en peso de estearato de magnesio y/o

25 el 0.1 %-5 % (por ejemplo, el 0.2 %-1 %) en peso de dióxido de silicio coloidal.

En algunas realizaciones, una composición farmacéutica que comprende miglustat comprende de aproximadamente 50 a aproximadamente 100 mg de miglustat, tal como aproximadamente 65 mg de miglustat. En algunas realizaciones, una composición farmacéutica que comprende miglustat

30 comprende de aproximadamente 50 a aproximadamente 150 mg de celulosa microcristalina, tal como de aproximadamente 75 a aproximadamente 125 mg de celulosa microcristalina. En algunas realizaciones, una composición

farmacéutica que comprende miglustat comprende de aproximadamente 20 a aproximadamente 50 mg de almidón pregelatinizado, tal como de aproximadamente 30 a aproximadamente 40 mg de almidón pregelatinizado. En algunas realizaciones, una composición farmacéutica que comprende miglustat

5 comprende de aproximadamente 0.1 a aproximadamente 5 mg de sucralosa, tal como de aproximadamente 0.5 a aproximadamente 2 mg de sucralosa. En algunas realizaciones, una composición farmacéutica que comprende miglustat comprende de aproximadamente 0.1 a aproximadamente 5 mg de estearato de magnesio, tal como de aproximadamente 0.5 a aproximadamente 2 mg de

10 estearato de magnesio. En algunas realizaciones, una composición farmacéutica que comprende miglustat comprende de aproximadamente 0.1 a aproximadamente 5 mg de dióxido de silicio coloidal, tal como de aproximadamente 0.2 mg a aproximadamente 1 mg de dióxido de silicio coloidal. En algunas realizaciones, una composición farmacéutica que comprende

15 miglustat se proporciona en una cápsula de gelatina dura para la administración oral. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica es una cápsula de gelatina dura para la administración oral, que comprende de aproximadamente 50 a aproximadamente 100 mg (por ejemplo, 65 mg) de miglustat, de aproximadamente 50 a aproximadamente 150 mg (por ejemplo, de 75 mg a

20 aproximadamente 125 mg) de celulosa microcristalina, de aproximadamente 20 a aproximadamente 50 mg (por ejemplo, de 30 mg a aproximadamente 40 mg) de almidón pregelatinizado, de aproximadamente 0.1 mg a aproximadamente 5 mg (por ejemplo, de 0.5 mg a aproximadamente 2 mg) de sucralosa, de aproximadamente 0.1 mg a aproximadamente 5 mg (por ejemplo, de 0.5 mg a

25 aproximadamente 2 mg) de estearato de magnesio y/o de aproximadamente 0.1 mg a aproximadamente 5 mg (por ejemplo, de 0.5 mg a aproximadamente 2 mg) de dióxido de silicio coloidal. En algunas realizaciones, una composición farmacéutica que comprende miglustat se proporciona en una forma farmacéutica oral líquida, tal como una solución, dispersión o suspensión oral.

30 En algunas realizaciones, la composición farmacéutica es una forma farmacéutica líquida oral, que comprende de aproximadamente 50 a aproximadamente 100 mg (por ejemplo, 65 mg) de miglustat, de

aproximadamente 50 a aproximadamente 150 mg (por ejemplo, de 75 mg a aproximadamente 125 mg) de celulosa microcristalina, de aproximadamente 20 a aproximadamente 50 mg (por ejemplo, de 30 mg a aproximadamente 40 mg) de almidón pregelatinizado, de aproximadamente 0.1 mg a aproximadamente 5 mg (por ejemplo, de 0.5 mg a aproximadamente 2 mg) de sucralosa, de aproximadamente 0.1 mg a aproximadamente 5 mg (por ejemplo, de 0.5 mg a aproximadamente 2 mg) de estearato de magnesio y/o de aproximadamente 0.1 mg a aproximadamente 5 mg (por ejemplo, de 0.5 mg a aproximadamente 2 mg) de dióxido de silicio coloidal.

10 En algunas realizaciones, una composición farmacéutica que comprende miglustat se proporciona en una cápsula de gelatina dura para la administración oral que comprende aproximadamente 65 mg de miglustat, aproximadamente 100 mg de celulosa microcristalina, aproximadamente 32.6 mg de almidón pregelatinizado, aproximadamente 1 mg de sucralosa en polvo, 15 aproximadamente 1 mg de estearato de magnesio y aproximadamente 0.4 mg de dióxido de silicio coloidal.

En algunas realizaciones, una composición farmacéutica que comprende miglustat se proporciona en una solución, dispersión o suspensión oral, que comprende aproximadamente 65 mg de miglustat, aproximadamente 100 mg de 20 celulosa microcristalina, aproximadamente 32.6 mg de almidón pregelatinizado, aproximadamente 1 mg de sucralosa en polvo, aproximadamente 1 mg de estearato de magnesio y aproximadamente 0.4 mg de dióxido de silicio coloidal.

En algunas realizaciones, una composición farmacéutica que comprende miglustat se proporciona en una solución, dispersión o suspensión oral, que 25 comprende aproximadamente 130 mg de miglustat, aproximadamente 200 mg de celulosa microcristalina, aproximadamente 65.2 mg de almidón pregelatinizado, aproximadamente 2 mg de sucralosa en polvo, aproximadamente 2 mg de estearato de magnesio y aproximadamente 0.8 mg de dióxido de silicio coloidal.

30 En algunas realizaciones, una composición farmacéutica que comprende miglustat se proporciona en una solución, dispersión o suspensión oral, que comprende aproximadamente 195 mg de miglustat, aproximadamente 300 mg

de celulosa microcristalina, aproximadamente 97.8 mg de almidón pregelatinizado, aproximadamente 3 mg de sucralosa en polvo, aproximadamente 3 mg de estearato de magnesio y aproximadamente 1.2 mg de dióxido de silicio coloidal.

- 5 En algunas realizaciones, una composición farmacéutica que comprende miglustat se proporciona en una solución, dispersión o suspensión oral, que comprende aproximadamente 260 mg de miglustat, aproximadamente 400 mg de celulosa microcristalina, aproximadamente 130.4 mg de almidón pregelatinizado, aproximadamente 4 mg de sucralosa en polvo,
 10 aproximadamente 4 mg de estearato de magnesio y aproximadamente 1.6 mg de dióxido de silicio coloidal.

- En algunas realizaciones, un paciente puede tener dificultades para tragar una cápsula de gelatina dura. En consecuencia, en algunas realizaciones, se proporciona una composición farmacéutica que comprende miglustat en una
 15 solución oral. En algunas realizaciones, la solución oral está aromatizada.

- En algunas realizaciones, se proporciona una composición farmacéutica que comprende miglustat en forma de una solución oral que comprende uno o más excipientes. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica que comprende miglustat comprende un conservante, un agente tamponante, un
 20 espesante (o un agente espesante), un edulcorante, un aromatizante y/o un vehículo.

- En algunas realizaciones, una composición farmacéutica que comprende miglustat es una solución oral que comprende el 1.0-10.0%, 1.5-8%, 2.0-5.0%, 2.0-6.5%, 2-7%, 2.5-5.0%, 2.5-6.5%, 2.5-7%, 3.0-5.0%, 3-6.5%, 3-7%, 3.5-5.0%,
 25 3.5-6%, 3.5-7%, 4.0-5.0%, 4-6.5%, 4-7%, 4.5-5.0%, 4.5-6%, 4.5-7% 2.0-4.5%, 2.5-4.5%, 3.0-4.5%, 3.5-4.5%, 4.0-4.5%, 2.0-4.0%, 2.5-4.0%, 3.0-4.0%, o 3.5-4.0% de miglustat en peso. En algunas realizaciones, una composición farmacéutica que comprende miglustat es una solución oral que comprende menos de o igual a aproximadamente el 5 % de miglustat en peso. En algunas
 30 realizaciones, una composición farmacéutica que comprende miglustat es una solución oral que comprende de 1 a 200 mg/ml, tal como de 10 a 100 mg/ml, de 10 a 50 mg/ml o de 20 a 60 mg/ml. Las concentraciones de miglustat de ejemplo

incluyen aproximadamente 5 mg/ml, 10 mg/ml, 15 mg/ml, 20 mg/ml, 30 mg/ml, 40 mg/ml, 50 mg/ml, 60 mg/ml, 70 mg/ml, 80 mg/ml, 90 mg/ml o 100 mg/ml.

En algunas realizaciones, una composición farmacéutica que comprende miglustat es una solución oral que comprende un sistema de tampón tal como un sistema de citrato, un sistema de fosfato o una combinación de los mismos. El citrato y/o el fosfato pueden ser una sal de sodio (por ejemplo, citrato de sodio o fosfato de sodio). Otras sales incluyen sales de potasio y amonio. En una o más realizaciones, el tampón comprende un citrato. En realizaciones adicionales, el tampón comprende citrato de sodio (por ejemplo, una mezcla de dihidrato de citrato de sodio y monohidrato de ácido cítrico). En una o más realizaciones, las soluciones tampón que comprenden un citrato pueden comprender citrato de sodio y ácido cítrico. En algunas realizaciones, hay presente tanto un tampón de citrato como de fosfato.

En algunas realizaciones, una composición farmacéutica que comprende miglustat es una solución oral que comprende un espesante o un agente espesante. En algunas realizaciones, el espesante se selecciona de hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC), hidroxipropiletilcelulosa (HPEC), hidroxipropilcelulosa (HPC), gelatina o celulosa microcristalina. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica que comprende miglustat es una solución oral que comprende el 0.5-5 %, 1.0-3.0 % o 1.0-2.0 % de un espesante en peso. En algunas realizaciones, el espesante es hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC).

En algunas realizaciones, una composición farmacéutica que comprende miglustat es una solución oral que comprende un edulcorante. En algunas realizaciones, el edulcorante se selecciona de sacarosa o sucralosa. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica que comprende miglustat es una solución oral que comprende el 0.1-1 %, 0.1-0.5 %, 0.1-0.3 % o 0.15-0.25 % de edulcorante en peso. En algunas realizaciones, el edulcorante es sucralosa.

En algunas realizaciones, una composición farmacéutica que comprende miglustat es una solución oral que comprende un conservante. En algunas realizaciones, el conservante es sorbato de potasio. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica que comprende miglustat es una solución oral que

comprende el 0.1-1 %, 0.1-0.5 %, 0.1-0.3 % o 0.15-0.25 % de conservante en peso.

En algunas realizaciones, una composición farmacéutica que comprende miglustat es una solución oral que comprende un agente aromatizante. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica que comprende miglustat es una solución oral que comprende el 0.1-0.5 %, 0.1-0.3 % o 0.15-0.25 % de un agente aromatizante en peso.

En algunas realizaciones, el resto de la solución oral que comprende miglustat es agua. En algunas realizaciones, el agua comprende más de o igual al 80 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 % o 95 % de agua.

En algunas realizaciones, el pH de la solución oral que comprende miglustat se ajusta con un ácido fuerte (por ejemplo, ácido clorhídrico) y/o una base fuerte (por ejemplo, hidróxido de sodio). En algunas realizaciones, el pH de la solución oral que comprende miglustat se ajusta a 5.0 +/- 0.5. Dicho de otra manera, en algunas realizaciones, el pH de la solución oral que comprende miglustat está en un intervalo de 4.5-5.5, 4.7-5.3, 4.9-5.1 o es de aproximadamente 5.0.

En algunas realizaciones, una solución oral que comprende miglustat es una solución oral que comprende el 1.0-10.0%, 2.0-5.0%, 2.5-5.0%, 3.0-5.0%, 3.5-5.0%, 4.0-5.0%, 4.5-5.0%, 2.0-4.5%, 2.5-4.5%, 3.0-4.5%, 3.5-4.5%, 4.0-4.5%, 2.0-4.0%, 2.5-4.0%, 3.0-4.0%, o 3.5-4.0% de miglustat en peso. En algunas realizaciones, una solución oral comprende menos de o igual al 4 % de miglustat en peso.

En algunas realizaciones, una solución oral que comprende miglustat es una solución oral que comprende de 1 a 200 mg/ml, tal como de 10 a 100 mg/ml, de 10 a 50 mg/ml o de 20 a 60 mg/ml. Las concentraciones de miglustat de ejemplo incluyen aproximadamente 5 mg/ml, 10 mg/ml, 15 mg/ml, 20 mg/ml, 30 mg/ml, 40 mg/ml, 50 mg/ml, 60 mg/ml, 70 mg/ml, 80 mg/ml, 90 mg/ml o 100 mg/ml.

En algunas realizaciones, una solución oral que comprende miglustat contiene un agente tamponante. En algunas realizaciones, el agente tamponante es citrato de sodio. En algunas realizaciones, una solución oral que comprende

miglustat es una solución oral que comprende el 0.5-1%, 0.5-0.55%, 0.55-0.6%, 0.6-0.65%, 0.65-0.7%, 0.7-0.8%, 0.8-0.85%, 0.85-0.9%, o 0.9-0.95%. de citrato de sodio en peso. En algunas realizaciones, una solución oral comprende menos de, más de o igual a aproximadamente el 0.65 % de citrato de sodio en peso. En algunas realizaciones, una solución oral comprende menos de, más de o igual a aproximadamente el 0.84 % de citrato de sodio en peso. En algunas realizaciones, una solución oral comprende una concentración de citrato de sodio de 0.1 a 100 mg/ml, tal como de 0.5 a 50 mg/ml, de 1 a 20 mg/ml o de 5 a 15 mg/ml. Las concentraciones de citrato de sodio de ejemplo incluyen 1 mg/ml, 2 mg/ml, 3 mg/ml, 4 mg/ml, 5 mg/ml, 6 mg/ml, 7 mg/ml, 8 mg/ml, 9 mg/ml, 10 mg/ml, 11 mg/ml, 12 mg/ml, 13 mg/ml, 14 mg/ml, 15 mg/ml, 20 mg/ml, 25 mg/ml, 30 mg/ml, 35 mg/ml, 40 mg/ml o 50 mg/ml,

En algunas realizaciones, una solución oral que comprende miglustat contiene un agente tamponante. En algunas realizaciones, el agente tamponante es ácido cítrico. En algunas realizaciones, una solución oral que comprende miglustat es una solución oral que comprende el 0.1-0.5 %, 0.1-0.2 %, 0.2-0.3 %, 0.25-0.3 %, 0.3-0.35 %, 0.35-0.4 %, 0.4-0.5 % de ácido cítrico en peso. En algunas realizaciones, una solución oral comprende menos de, más de o igual a aproximadamente el 0.27 % de ácido cítrico en peso. En algunas realizaciones, una solución oral comprende menos de, más de o igual a aproximadamente el 0.35 % de ácido cítrico en peso. En algunas realizaciones, una solución oral comprende una concentración de ácido cítrico de 0.1 a 100 mg/ml, tal como de 0.5 a 50 mg/ml, de 1 a 20 mg/ml o de 5 a 15 mg/ml. Las concentraciones de ácido cítrico de ejemplo incluyen 0.5 mg/ml, 1 mg/ml, 1.5 mg/ml, 2 mg/ml, 2.5 mg/ml, 3 mg/ml, 3.5 mg/ml, 4 mg/ml, 4.5 mg/ml, 5 mg/ml, 6 mg/ml, 7 mg/ml, 8 mg/ml, 9 mg/ml, 10 mg/ml, 15 mg/ml, 20 mg/ml, 25 mg/ml, 30 mg/ml, 35 mg/ml, 40 mg/ml o 50 mg/ml,

En algunas realizaciones, una solución oral que comprende miglustat contiene un agente espesante. En algunas realizaciones, el agente espesante es hipromelosa. En algunas realizaciones, una solución oral que comprende miglustat es una solución oral que comprende el agente espesante a 1-10 mg/ml, 10-20 mg/ml, 1-5 mg/ml, 10 mg/ml, 11 mg/ml, 12 mg/ml, 13 mg/ml, 14 mg/ml,

15 mg/ml, 16 mg/ml, 17 mg/ml, 18 mg/ml, 19 mg/ml o 20 mg/ml. En algunas realizaciones, la solución oral comprende el agente espesante a menos de, más de o igual a aproximadamente 15 mg/ml. En algunas realizaciones, una solución oral que comprende miglustat es una solución oral que comprende el 1-5 %, 1.5-2 %, 1-1.5 %, 1-2 %, 2.5-3 %, 3.5-4 %, 4.5-5 % o 5.5-6 % del agente espesante en peso. En algunas realizaciones, una solución oral comprende menos de, más de o igual a aproximadamente el 1.5 % de agente espesante en peso.

En algunas realizaciones, una solución oral que comprende miglustat contiene un edulcorante. En algunas realizaciones, el edulcorante es sucralosa.

10 En algunas realizaciones, una solución oral que comprende miglustat es una solución oral que comprende el edulcorante a 1-5 mg/ml, 1 mg/ml, 2 mg/ml, 3 mg/ml, 4 mg/ml, 5 mg/ml, 6 mg/ml, 7 mg/ml, 8 mg/ml, 9 mg/ml o 10 mg/ml. En algunas realizaciones, la solución oral comprende el edulcorante a menos de, más de o igual a aproximadamente 2 mg/ml. En algunas realizaciones, una

15 solución oral que comprende miglustat es una solución oral que comprende el 0.1-0.2%, 0.15-0.2%, 0.1-0.5%, 0.1-0.25%, 0.15-0.25%, 0.2-0.25%, 0.25-0.3%, 0.25-0.35%, 0.3-0.4%, 0.4-0.5% del edulcorante en peso. En algunas realizaciones, una solución oral comprende menos de, más de o igual a aproximadamente el 0.2 % de edulcorante en peso.

20 En algunas realizaciones, una solución oral que comprende miglustat contiene un conservante. En algunas realizaciones, el conservante es sorbato de potasio. En algunas realizaciones, una solución oral que comprende miglustat es una solución oral que comprende el conservante a 1-5 mg/ml, 1 mg/ml, 2 mg/ml, 3 mg/ml, 4 mg/ml, 5 mg/ml, 6 mg/ml, 7 mg/ml, 8 mg/ml, 9 mg/ml o

25 10 mg/ml. En algunas realizaciones, la solución oral comprende el conservante a menos de, más de o igual a aproximadamente 2 mg/ml. En algunas realizaciones, una solución oral que comprende miglustat es una solución oral que comprende el 0.1-0.2 %, 0.15-0.2 %, 0.1-0.5 %, 0.1-0.25 %, 0.15-0.25 %, 0.2-0.25 %, 0.25-0.3 %, 0.25-0.35 %, 0.3-0.4 %, 0.4-0.5 % del conservante en

30 peso. En algunas realizaciones, una solución oral comprende menos de, más de o igual a aproximadamente el 0.2 % de conservante en peso.

En algunas realizaciones, una solución oral que comprende miglustat contiene un aroma. En algunas realizaciones, el sabor es bayas mixtas. En algunas realizaciones, una solución oral que comprende miglustat es una solución oral que comprende el aroma a 1-5 mg/ml, 1 mg/ml, 2 mg/ml, 3 mg/ml, 4 mg/ml, 5 mg/ml, 6 mg/ml, 7 mg/ml, 8 mg/ml, 9 mg/ml o 10 mg/ml. En algunas realizaciones, la solución oral comprende el aroma a menos de, más de o igual a aproximadamente 2 mg/ml. En algunas realizaciones, una solución oral que comprende miglustat es una solución oral que comprende el 0.1-0.2 %, 0.15-0.2 %, 0.1-0.5 %, 0.1-0.25 %, 0.15-0.25 %, 0.2-0.25 %, 0.25-0.3 %, 0.25-0.35 %, 0.3-0.4 %, 0.4-0.5 % del aroma en peso. En algunas realizaciones, una solución oral comprende menos de, más de o igual a aproximadamente el 0.2 % de aroma en peso.

A continuación se proporcionan varias composiciones farmacéuticas de ejemplo que comprenden miglustat en una solución oral.

Componen te	Funcionali dad	Prototipo 1		Prototipo 2		Prototipo 3		Prototipo 4	
		mg/ ml	% (p/ v)	mg/ ml	% (p/ v)	mg/ ml	% (p/ v)	mg/ ml	% (p/ v)
Miglustat	Sustancia farmacológi ca	40	4.0 0	40	4.0 0	40	4.0 0	40	4.0 0
Citrato de sodio USP/Ph. Eur. (Dihidrato)	Agente tamponante	6.52 4	0.6 5	6.52 4	0.6 5	6.52 4	0.6 5	8.38 8	0.8 4
Ácido cítrico Monohidra to	Agente tamponante	2.69 3	0.2 7	2.69 3	0.2 7	2.69 3	0.2 7	3.46 3	0.3 5

	USP/Ph. Eur.								
5	Hiromelosa USP/EP/J P	Agente espesante	---	---	15	1.5	15	1.5	---
	Sucralosa NF/Ph. Eur.	Edulcorante	2	0.2 0	2	0.2 0	2	0.2 0	2 0.2 0
10	Sorbato de potasio NF	Conservante	2	0.2 0	2	0.2 0	2	0.2 0	2 0.2 0
15	Aroma (Bayas mixtas)	Aroma	---	---	---	---	2	0.2 0	---
20	Agua purificada USP/Ph. Eur.	Vehículo	c.s.p .	---	c.s.p .	---	c.s.p .	---	c.s.p .
	Ácido clorhídrico	Modificador del pH	Para un ajuste del pH a 5.0 ± 0.5						
25	Hidróxido de sodio	Modificador del pH	Para un ajuste del pH a 5.0 ± 0.5						

MÉTODOS DE TRATAMIENTO

A. Tratamiento de enfermedades

Otro aspecto de la divulgación se refiere a un método de tratamiento de una enfermedad o trastorno relacionado con la desregulación del almacenamiento de glucógeno mediante la administración de la rhGAA o composición farmacéutica descrita en el presente documento. En algunas realizaciones, la enfermedad es la enfermedad de Pompe (también conocida como deficiencia de maltasa ácida (DMAA) y enfermedad por almacenamiento

de glucógeno de tipo II (GSD II)). En algunas realizaciones, la rhGAA es ATB200 o cipaglicosidasa alfa. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica comprende rhGAA (por ejemplo, ATB200 o cipaglicosidasa alfa). En el presente documento también se proporcionan usos de rhGAA o ATB200 o
5 cipaglicosidasa alfa para tratar la enfermedad de Pompe.

En algunas realizaciones, el sujeto tratado mediante los métodos divulgados en el presente documento es un paciente pediátrico. En algunas realizaciones, el sujeto puede tener una edad de 0 a 18 años o cualquier valor intermedio o subintervalo de la misma, incluyendo 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10,
10 11 o 12 meses de edad o 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 o 18 años de edad.

En algunas realizaciones, el sujeto tratado mediante los métodos divulgados en el presente documento es un paciente con experiencia con ERT. En algunas realizaciones, el paciente con experiencia con ERT está recibiendo actualmente una ERT aprobada (por ejemplo, MYOZYME®, LUMIZYME® o
15 NEXVIAZYME®). En algunas realizaciones, el paciente con experiencia con ERT está en declive con su tratamiento actual. En algunas realizaciones, los métodos divulgados en el presente documento se inician aproximadamente 2 semanas después de la última dosis de ERT. En algunas realizaciones, el sujeto tratado
20 mediante los métodos divulgados en el presente documento es un paciente sin tratamiento previo con ERT.

En algunas realizaciones, se puede esperar observar al paciente de nuevo cada 3 meses para garantizar el beneficio clínico proporcionado al paciente y, por lo tanto, continuar el tratamiento. Esta frecuencia de visita puede ser
25 necesaria hasta que el medicamento esté disponible en el mercado. En algunas realizaciones, la respuesta de un paciente al tratamiento se evalúa periódicamente basándose en una valoración de los principales parámetros clínicos y de laboratorio de la enfermedad. En algunas realizaciones, una rhGAA como se describe en el presente documento (tal como cipaglicosidasa alfa) y
30 miglustat se administran cada dos semanas. En algunas realizaciones, una dosis de rhGAA tal como cipaglicosidasa alfa es de aproximadamente 30 mg/kg de peso corporal administrada en infusión de 4 horas. En algunas realizaciones, si

la infusión se retrasa, no debe iniciarse más de 3 horas después de la administración oral de miglustat.

En algunas realizaciones, los sujetos reciben cápsulas de miglustat (o una dispersión líquida preparada a partir de cápsulas de miglustat) aproximadamente 1 hora (es decir, 1 hora $\pm$ 10 minutos) antes de la infusión de cipaglucosidasa alfa. El número de cápsulas, cantidad de agua que ha de usarse y cantidad de dispersión que ha de dosificarse se resumen en la tabla a continuación. Por ejemplo, a los sujetos que reciben 260 mg o 195 mg de miglustat, se les administrarán 4 cápsulas o 3 cápsulas de miglustat por vía oral, respectivamente.

En algunas realizaciones, si el sujeto no puede tragar las cápsulas de miglustat, la cápsula puede abrirse y el contenido puede transferirse al agua. En algunas realizaciones, los sujetos reciben una administración de dispersión líquida preparada a partir de cápsulas de miglustat aproximadamente 1 hora (es decir, 1 hora $\pm$ 10 minutos) antes de la infusión de cipaglucosidasa alfa. El número de cápsulas, la cantidad de agua que ha de usarse, y la cantidad de dispersión que ha de dosificarse se resumen en la tabla a continuación. Por ejemplo, para sujetos que reciben 260 mg de miglustat, se usarán 20 ml de agua para dispersar 4 cápsulas de miglustat y se les proporcionarán 20 ml.

Tabla: Número de cápsulas y cantidad de agua que ha de usarse para preparar la dispersión

Dosis de miglustat (mg)	N.º de cápsulas que han de dispersarse (cápsulas)	Cantidad de agua utilizada para dispersar (ml)	Cantidad de dispersión retirada y administrada (ml)
260	4	20	20
195	3	20	20
175	3	20	18
130	2	10	10
115	2	10	8.8
85	2	10	6.5
65	1	5	5

40	1	5	3.1
20	1	5	1.5

En algunas de las realizaciones anteriores, la rhGAA (tal como cipaglucoosidasa alfa) se administra mediante infusión cada dos semanas.

- 5 En algunas realizaciones, el miglustat se administra en forma de una solución oral como se describe en el presente documento. Como se ha descrito anteriormente, las soluciones orales de ejemplo pueden comprender miglustat con uno o más excipientes tales como un conservante, un agente tamponante, un espesante (o un agente espesante), un edulcorante, un aroma y/o un
- 10 vehículo. En algunas realizaciones, la solución oral comprende miglustat y uno o más de citrato de sodio, ácido cítrico, hipromelosa, sucralosa, sorbato de potasio, aromatizante y/o agua.

- La rhGAA o composición farmacéutica descrita en el presente documento se administra por una vía adecuada. En una realización, la rhGAA o composición
- 15 farmacéutica se administra por vía intravenosa. En algunas realizaciones, la rhGAA o composición farmacéutica se administra por vía intravenosa usando una bomba de infusión. En algunas realizaciones, cuando se administra por vía intravenosa, la bolsa de infusión y el tubo se cubren para protegerlos de la luz. En otras realizaciones, la rhGAA o composición farmacéutica se administra
- 20 mediante administración directa a un tejido diana, tal como el corazón o el músculo esquelético (por ejemplo, intramuscular), o el sistema nervioso (por ejemplo, inyección directa en el cerebro; por vía intraventricular; por vía intratecal). En algunas realizaciones, la rhGAA o composición farmacéutica se administra por vía oral. Se puede usar más de una vía simultáneamente, si se
- 25 desea.

- En algunas realizaciones, los efectos terapéuticos de la rhGAA o composición farmacéutica descrita en el presente documento pueden evaluarse basándose en uno o más de los siguientes criterios: (1) estado cardíaco (por ejemplo, aumento de los volúmenes telediastólico y/o telesistólico, o reducción,
- 30 mejora o prevención de la miocardiopatía progresiva que se encuentra normalmente en la GSD-II), (2) función pulmonar (por ejemplo, aumento de la capacidad vital durante el llanto con respecto a la capacidad basal y/o

normalización de la desaturación de oxígeno durante el llanto), (3) desarrollo neurológico y/o habilidades motoras (por ejemplo, aumento de la puntuación de la AIMS) y (4) reducción de los niveles de glucógeno en el tejido del individuo afectado por la enfermedad.

- 5 En algunas realizaciones, el estado cardíaco de un sujeto mejora en un 10 %, 20 %, 30 %, 40 % o 50 % (o cualquier porcentaje intermedio) después de la administración de una o más dosis de la rhGAA o composición farmacéutica descrita en el presente documento, en comparación con el de un sujeto tratado con un vehículo o con el de un sujeto antes del tratamiento. El estado cardíaco
- 10 de un sujeto puede evaluarse mediante la medición de los volúmenes telediastólico y/o telesistólico y/o mediante la evaluación clínica de la miocardiopatía. En algunas realizaciones, la función pulmonar de un sujeto mejora en un 10 %, 20 %, 30 %, 40 % o 50 % (o cualquier porcentaje intermedio) después de la administración de una o más dosis de ATB200 o cipaglucosidasa
- 15 alfa, o una composición farmacéutica que comprende ATB200 o cipaglucosidasa alfa, en comparación con la de un sujeto tratado con un vehículo o la de un sujeto antes del tratamiento. En determinadas realizaciones, la mejora se consigue después de 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 1 mes, 2 meses o más desde la administración (o cualquier período de tiempo entre medias). En determinadas
- 20 realizaciones, la rhGAA (por ejemplo, ATB200 o cipaglucosidasa alfa) o composición farmacéutica que comprende rhGAA (por ejemplo, ATB200 o cipaglucosidasa alfa) mejora y/o estabiliza la función pulmonar de un sujeto después de 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 1 mes, 2 meses o más desde la administración (o cualquier período de tiempo entre medias).
- 25 En algunas realizaciones, la función pulmonar de un sujeto mejora en un 10 %, 20 %, 30 %, 40 % o 50 % (o cualquier porcentaje intermedio) después de la administración de una o más dosis de la rhGAA o composición farmacéutica descrita en el presente documento, en comparación con la de un sujeto tratado con un vehículo o la de un sujeto antes del tratamiento. La función pulmonar de
- 30 un sujeto puede evaluarse mediante la capacidad vital de llanto por encima de la capacidad basal y/o la normalización de la desaturación de oxígeno durante el llanto. En algunas realizaciones, la función pulmonar de un sujeto mejora en un

10 %, 20 %, 30 %, 40 % o 50 % (o cualquier porcentaje intermedio) después de la administración de una o más dosis de rhGAA (por ejemplo, ATB200 o cipaglucoasidasa alfa) o composición farmacéutica que comprende rhGAA (por ejemplo, ATB200 o cipaglucoasidasa alfa), en comparación con la de un sujeto tratado con un vehículo o la de un sujeto antes del tratamiento. En determinadas realizaciones, la mejora se consigue después de 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 1 mes, 2 meses o más desde la administración (o cualquier período de tiempo entre medias). En determinadas realizaciones, la rhGAA (por ejemplo, ATB200 o cipaglucoasidasa alfa) o composición farmacéutica que comprende rhGAA (por ejemplo, ATB200 o cipaglucoasidasa alfa) mejora la función pulmonar de un sujeto después de 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 1 mes, 2 meses o más desde la administración (o cualquier período de tiempo entre medias).

En algunas realizaciones, el neurodesarrollo y/o las habilidades motoras de un sujeto mejoran en un 10 %, 20 %, 30 %, 40 % o 50 % (o cualquier porcentaje intermedio) después de la administración de una o más dosis de la rhGAA (por ejemplo, ATB200 o cipaglucoasidasa alfa) o composición farmacéutica de rhGAA (por ejemplo, ATB200 o cipaglucoasidasa alfa) descrita en el presente documento, en comparación con los de un sujeto tratado con un vehículo o los de un sujeto antes del tratamiento. El neurodesarrollo y/o las capacidades motoras de un sujeto pueden evaluarse determinando una puntuación de AIMS. La AIMS es una escala anclada de 12 puntos que administra y puntúa el facultativo (véase Rush JA Jr., *Handbook of Psychiatric Measures*, American Psychiatric Association, 2000, 166-168). Los puntos 1-10 se valoran en una escala anclada de 5 puntos. Los puntos 1-4 evalúan los movimientos orofaciales. Los puntos 5-7 tratan de la discinesia de las extremidades y troncal. Los puntos 8-10 se refieren a la gravedad global juzgada por el examinador y a la conciencia del paciente de los movimientos y de la angustia asociada a ellos. Los puntos 11-12 son preguntas de sí/no relativas a problemas con los dientes y/o prótesis dentales (dichos problemas pueden conducir a un diagnóstico erróneo de discinesia). En algunas realizaciones, el neurodesarrollo y/o las habilidades motoras de un sujeto mejoran en un 10 %, 20 %, 30 %, 40 % o 50 % (o cualquier porcentaje intermedio) después de la

administración de una o más dosis de rhGAA (por ejemplo, ATB200 o cipaglucosidasa alfa) o la composición farmacéutica que comprende rhGAA (por ejemplo, ATB200 o cipaglucosidasa alfa), en comparación con los de un sujeto tratado con un vehículo o los de un sujeto antes del tratamiento. En determinadas realizaciones, la mejora se consigue después de 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 1 mes, 2 meses o más desde la administración (o cualquier período de tiempo entre medias). En determinadas realizaciones, la rhGAA (por ejemplo, ATB200 o cipaglucosidasa alfa) o la composición farmacéutica que comprende rhGAA (por ejemplo, ATB200 o cipaglucosidasa alfa) mejora y/o estabiliza el neurodesarrollo y/o las habilidades motoras de un sujeto después de 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 1 mes, 2 meses o más desde la administración (o cualquier período de tiempo entre medias).

En algunas realizaciones, el nivel de glucógeno de un determinado tejido de un sujeto se reduce en un 10 %, 20 %, 30 %, 40 % o 50 % (o cualquier porcentaje intermedio) después de la administración de una o más dosis de la rhGAA o composición farmacéutica descrita en el presente documento, en comparación con la de un sujeto tratado con un vehículo o la de un sujeto antes del tratamiento. En algunas realizaciones, el tejido es músculo, tal como cuádriceps, tríceps y gastrocnemio. El nivel de glucógeno de un tejido puede analizarse usando métodos conocidos en la técnica. La determinación de los niveles de glucógeno es bien conocida, se basa en la digestión con amiloglucosidasa, y se describe en publicaciones tales como: Amalfitano et al. (1999), *Proc Natl Acad Sci USA*, 96:8861-8866. En algunas realizaciones, el nivel de glucógeno en el músculo de un sujeto se reduce en un 10 %, 20 %, 30 %, 40 % o 50 % (o cualquier porcentaje intermedio) después de la administración de una o más dosis de rhGAA (por ejemplo, ATB200 o cipaglucosidasa alfa) o composición farmacéutica que comprende rhGAA (por ejemplo, ATB200 o cipaglucosidasa alfa), en comparación con el de un sujeto tratado con un vehículo o el de un sujeto antes del tratamiento. En determinadas realizaciones, la reducción se consigue después de 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 1 mes, 2 meses o más desde la administración (o cualquier período de tiempo entre medias). En determinadas realizaciones, la rhGAA (por ejemplo, ATB200 o

cipaglicosidasa alfa) o la composición farmacéutica que comprende rhGAA (por ejemplo, ATB200 o cipaglicosidasa alfa) reduce el nivel de glucógeno en el músculo de un sujeto después de 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 1 mes, 2 meses o más desde la administración (o cualquier período de tiempo entre 5 medias).

B. Biomarcadores

Los biomarcadores de la acumulación de glucógeno en un sujeto, tales como el tetrasacárido de hexosa en orina (Hex4), pueden usarse para evaluar y comparar los efectos terapéuticos de la terapia de reemplazo enzimático en un 10 sujeto con enfermedad de Pompe. En algunas realizaciones, el efecto terapéutico de la rhGAA o una composición farmacéutica que comprende rhGAA sobre la acumulación de glucógeno se evalúa midiendo los niveles de Hex4 en orina en un sujeto.

Pueden usarse biomarcadores de lesión o daño muscular tales como la 15 creatina cinasa (CK), la alanina aminotransferasa (ALT) y la aspartato aminotransferasa (AST) para evaluar y comparar los efectos terapéuticos de la terapia de reemplazo enzimático en un sujeto con enfermedad de Pompe. En algunas realizaciones, el efecto terapéutico de la rhGAA o una composición farmacéutica que comprende rhGAA sobre el daño muscular se evalúa midiendo 20 los niveles de CK, ALT y/o AST en un sujeto. En al menos una realización, el efecto terapéutico de la rhGAA o una composición farmacéutica que comprende rhGAA sobre el daño muscular se evalúa midiendo los niveles de CK en un sujeto.

También pueden usarse biomarcadores tales como LAMP-1, LC3 y 25 Disferlina para evaluar y comparar los efectos terapéuticos de la rhGAA o composición farmacéutica descrita en el presente documento. En la enfermedad de Pompe, la incapacidad de la GAA para hidrolizar el glucógeno lisosómico conduce a la acumulación anormal de grandes lisosomas llenos de glucógeno en algunos tejidos. (Raben et al., JBC 273: 19086-19092, 1998). Los estudios 30 realizados en un modelo de ratón de la enfermedad de Pompe han demostrado que el aumento del tamaño de los lisosomas en el músculo esquelético no puede explicar adecuadamente la reducción del rendimiento mecánico y que la

presencia de grandes inclusiones que contienen miofibrillas degradadas (es decir, acumulación autofágica) contribuye al deterioro de la función muscular. (Raben et al., Human Mol Genet 17: 3897-3908, 2008). Los informes también sugieren que el deterioro del flujo de autofagia se asocia a un mal resultado terapéutico en los pacientes con enfermedad de Pompe. (Nascimbeni et al., Neuropathology and Applied Neurobiology doi: 10.1111/nan.12214, 2015; Fukuda et al., Mol Ther 14: 831-839, 2006). Además, la enfermedad de Pompe de inicio tardío es prevalente en distrofias musculares de cinturas no clasificadas (LGMD, por sus siglas en inglés) (Preisler et al., Mol Genet Metab 110: 287-289, 2013), que es un grupo de enfermedades neuromusculares genéticamente heterogéneas con más de 30 subtipos definidos genéticamente de gravedad variable. El examen por IHC reveló una presencia sarcoplásmica sustancialmente elevada de disferlina en las fibras musculares esqueléticas de ratones con inactivación de *Gaa*.

Pueden usarse diversos métodos conocidos para medir el nivel de expresión génica y/o nivel de proteína de dichos biomarcadores. Por ejemplo, puede obtenerse una muestra de un sujeto tratado con la rhGAA o composición farmacéutica descrita en el presente documento, tal como una biopsia de tejidos, en particular, el músculo. En algunas realizaciones, la muestra es una biopsia de músculo de un sujeto. En algunas realizaciones, el músculo se selecciona de cuádriceps, tríceps y gastrocnemio. La muestra obtenida de un sujeto puede teñirse con uno o más anticuerpos u otros agentes de detección que detecten dichos biomarcadores o pueden identificarse y cuantificarse mediante espectrometría de masas. Las muestras pueden procesarse también o como alternativa para detectar la presencia de ácidos nucleicos, tales como ARNm, que codifican los biomarcadores a través de, por ejemplo, métodos de RT-qPCR.

En algunas realizaciones, el nivel de expresión génica y/o nivel de proteína de uno o más biomarcadores se mide en una biopsia muscular obtenida de un individuo antes y después del tratamiento con la rhGAA o composición farmacéutica descrita en el presente documento. En algunas realizaciones, el nivel de expresión génica y/o nivel de proteína de uno o más biomarcadores se mide en una biopsia muscular obtenida de un individuo tratado con un vehículo.

En algunas realizaciones, el nivel de expresión génica y/o el nivel de proteína de uno o más biomarcadores se reduce en un 10 %, 20 %, 30 %, 40 % o 50 % (o cualquier porcentaje intermedio) después de la administración de una o más dosis de la rhGAA o composición farmacéutica descrita en el presente documento, en comparación con la de un sujeto tratado con un vehículo o la de un sujeto antes del tratamiento. En algunas realizaciones, el nivel de expresión génica y/o nivel de proteína de uno o más biomarcadores se reduce en un 10 %, 20 %, 30 %, 40 % o 50 % (o cualquier porcentaje intermedio) después de la administración de una o más dosis de rhGAA (por ejemplo, ATB200 o cipaglicosidasa alfa) o la composición farmacéutica que comprende rhGAA (por ejemplo, ATB200 o cipaglicosidasa alfa), en comparación con los de un sujeto tratado con un vehículo o los de un sujeto antes del tratamiento. En determinadas realizaciones, la reducción se consigue después de 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 1 mes, 2 meses o más desde la administración (o cualquier período de tiempo entre medias). En determinadas realizaciones, la rhGAA (por ejemplo, ATB200 o cipaglicosidasa alfa) o la composición farmacéutica que comprende rhGAA (por ejemplo, ATB200 o cipaglicosidasa alfa) reduce el nivel de expresión génica y/o nivel de proteína de uno o más biomarcadores después de 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 1 mes, 2 meses o más desde la administración (o cualquier período de tiempo entre medias).

C. Dosis de rhGAA

La formulación farmacéutica o composición reconstituida se administra en una cantidad terapéuticamente eficaz (por ejemplo, una cantidad de dosificación que, cuando se administra a intervalos regulares, es suficiente para tratar la enfermedad, tal como mediante la mejora de los síntomas asociados a la enfermedad, el retraso de la aparición de la enfermedad, y/o la disminución de la gravedad o frecuencia de los síntomas de la enfermedad). La cantidad terapéuticamente eficaz en el tratamiento de la enfermedad puede depender de la naturaleza y el alcance de los efectos de la enfermedad. Además, pueden emplearse opcionalmente ensayos *in vitro* o *in vivo* para ayudar a identificar los intervalos de dosificación óptimos. En al menos una realización, una rhGAA descrita en el presente documento o composición farmacéutica que comprenda

a rhGAA se administra a una dosis de aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 100 mg/kg, tal como de aproximadamente 5 mg/kg a aproximadamente 50 mg/kg, normalmente de aproximadamente 20 mg/kg a aproximadamente 40 mg/kg. En al menos una realización, la rhGAA o

5 composición farmacéutica descrita en el presente documento se administra a una dosis de aproximadamente 5 mg/kg, aproximadamente 10 mg/kg, aproximadamente 15 mg/kg, aproximadamente 20 mg/kg, aproximadamente 25 mg/kg, aproximadamente 30 mg/kg, aproximadamente 35 mg/kg, aproximadamente 40 mg/kg, aproximadamente 45 mg/kg, aproximadamente

10 50 mg/kg, aproximadamente 60 mg/kg, aproximadamente 70 mg/kg, aproximadamente 80 mg/kg, aproximadamente 90 mg/kg o aproximadamente 100 mg/kg. En algunas realizaciones, la rhGAA se administra a una dosis de 5 mg/kg, 10 mg/kg, 20 mg/kg, 25 mg/kg, 30 mg/kg, 35 mg/kg, 40 mg/kg, 50 mg/kg, 75 mg/kg o 100 mg/kg. En al menos una realización, la rhGAA o

15 composición farmacéutica se administra a una dosis de aproximadamente 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 o 40 mg/kg. En al menos una realización, la rhGAA o composición farmacéutica se administra a una dosis de aproximadamente 30 mg/kg. En al menos una realización, la rhGAA o composición farmacéutica se administra a una dosis de

20 aproximadamente 25 mg/kg. En al menos una realización, la rhGAA o composición farmacéutica se administra a una dosis de aproximadamente 20 mg/kg.

En al menos una realización, la dosis de rhGAA depende de la edad del paciente. En al menos una realización, la dosis de rhGAA depende del peso del

25 paciente. En al menos una realización, la dosis de rhGAA depende de la edad y el peso del paciente. En al menos una realización, la dosis de rhGAA se proporciona de acuerdo con la Tabla 6A a continuación.

En al menos una realización, la dosis de rhGAA y/o miglustat se proporciona en las Tablas 6A y 6B a continuación. En algunas realizaciones, la

30 rhGAA o composición farmacéutica se administra al mismo tiempo o secuencialmente con un estabilizador enzimático. En algunas realizaciones, el estabilizador enzimático es miglustat. En al menos una realización, el miglustat

se administra como una dosis oral en un intervalo de aproximadamente 20 mg a aproximadamente 260 mg dependiendo de la edad y el peso del paciente o cualquier valor intermedio o subintervalo del mismo incluyendo 20, 40, 65, 85, 115, 130, 175, 195 o 260 mg. La dosis eficaz para un individuo particular también puede variarse (por ejemplo, aumentarse o disminuirse) a lo largo del tiempo, dependiendo de las necesidades del individuo. Por ejemplo, en momentos de enfermedad o estrés físico, o si hay presentes anticuerpos anti- α -glucosidasa ácida o aumentan, o si empeoran los síntomas de la enfermedad, la cantidad de rhGAA y/o miglustat puede ajustarse.

En algunas realizaciones, el efecto terapéutico de la rhGAA o composición farmacéutica descrita en el presente documento comprende una mejora y/o estabilización de la función motora, una mejora y/o estabilización de la fuerza muscular (cuerpo superior, cuerpo inferior o cuerpo total), una mejora y/o estabilización de la función pulmonar, disminución de la fatiga, niveles reducidos de al menos un biomarcador de lesión muscular, niveles reducidos de al menos un biomarcador de acumulación de glucógeno o una combinación de los mismos. En algunas realizaciones, el efecto terapéutico de la rhGAA o composición farmacéutica descrita en el presente documento comprende una reversión de la patología lisosómica en una fibra muscular, una reducción más rápida y/o más eficaz del contenido de glucógeno en una fibra muscular, un aumento de la distancia del ensayo de caminata de seis minutos, una disminución del tiempo del ensayo *timed up and go*, una disminución en el tiempo del ensayo de subida de cuatro escaleras, una disminución en el tiempo del ensayo de caminata de diez metros, una disminución en la puntuación de marcha-escalera-Gower-silla, un aumento en la fuerza de las extremidades superiores, una mejora y/o estabilización en la aducción del hombro, una mejora y/o estabilización en la abducción del hombro, una mejora y/o estabilización en la flexión del codo, una mejora y/o estabilización en la extensión del codo, una mejora y/o estabilización en la fuerza de la parte superior del cuerpo, una mejora y/o estabilización en la fuerza de la parte inferior del cuerpo, una mejora y/o estabilización en la fuerza total del cuerpo, una mejora en la capacidad vital forzada en posición vertical (sedestación), una mejora y/o estabilización en la presión espiratoria máxima,

una mejora y/o estabilización en la presión inspiratoria máxima, una disminución en la puntuación de la escala de gravedad de la fatiga, una reducción en los niveles de hexosa tetrasacárido en orina, una reducción en los niveles de creatina cinasa, una reducción en los niveles de alanina aminotransferasa, una
5 reducción en los niveles de aspartato aminotransferasa o cualquier combinación de los mismos.

En algunas realizaciones, la rhGAA o composición farmacéutica descrita en el presente documentos consigue los efectos terapéuticos deseados más rápidamente que los productos de rhGAA convencionales cuando se administran
10 a la misma dosis. Los efectos terapéuticos pueden evaluarse basándose en uno o más de los criterios analizados anteriormente (por ejemplo, el estado cardíaco, el nivel de glucógeno o la expresión de biomarcadores). Por ejemplo, si una dosis única de un producto de rhGAA convencional disminuye los niveles de glucógeno en el tejido de un individuo tratado en un 10 % en una semana, puede
15 conseguirse el mismo grado de reducción en menos de una semana cuando se administra la misma dosis de la rhGAA o composición farmacéutica descrita en el presente documento. En algunas realizaciones, cuando se administra a la misma dosis, la rhGAA o composición farmacéutica descrita en el presente documento puede conseguir los efectos terapéuticos deseados al menos
20 aproximadamente 1.25, 1.5, 1.75, 2.0, 3.0 o más veces más rápido que los productos de rhGAA convencionales.

En algunas realizaciones, la cantidad terapéuticamente eficaz de rhGAA (o composición o medicamento que comprende rhGAA) se administra más de una vez. En algunas realizaciones, la rhGAA o composición farmacéutica
25 descrita en el presente documentos se administra a intervalos regulares, dependiendo de la naturaleza y el alcance de los efectos de la enfermedad, y de forma continuada. La administración en un "intervalo regular", como se usa en el presente documento, indica que la cantidad terapéuticamente eficaz se administra periódicamente (a diferencia de una sola dosificación). El intervalo
30 puede determinarse mediante técnicas clínicas convencionales. En determinadas realizaciones, la rhGAA se administra bimensualmente, mensualmente, quincenalmente, semanalmente, dos veces por semana o a

diario. En algunas realizaciones, la rhGAA se administra por vía intravenosa dos veces por semana, semanalmente o cada dos semanas. No es necesario que el intervalo de administración para un único individuo sea un intervalo fijo, sino que puede variarse a lo largo del tiempo, dependiendo de las necesidades del individuo. Por ejemplo, en momentos de enfermedad o estrés físico, si hay presentes anticuerpos anti-rhGAA o aumentan, o si empeoran los síntomas de la enfermedad, el intervalo entre las dosis puede reducirse.

En algunas realizaciones, cuando se usa a la misma dosis, la rhGAA o composición farmacéutica como se describe en el presente documento puede administrarse con menos frecuencia que los productos de rhGAA convencionales y, sin embargo, ser capaz de producir los mismos o mejores efectos terapéuticos que los productos de rhGAA convencionales. Por ejemplo, si un producto de rhGAA convencional se administra a 20 mg/kg, 30 mg/kg o 40 mg/kg semanalmente, la rhGAA o composición farmacéutica como se describe en el presente documento puede producir los mismos o mejores efectos terapéuticos que el producto de rhGAA convencional cuando se administra a 20 mg/kg, 30 mg/kg o 40 mg/kg, aunque la rhGAA o composición farmacéutica se administre con menos frecuencia, por ejemplo, quincenal o mensualmente. Los efectos terapéuticos pueden evaluarse basándose en uno o más de los criterios analizados anteriormente (por ejemplo, el estado cardíaco, el nivel de glucógeno o la expresión de biomarcadores). En algunas realizaciones, un intervalo entre dos dosis de la rhGAA o composición farmacéutica descrita en el presente documento es más largo que el de los productos de rhGAA convencionales. En algunas realizaciones, el intervalo entre dos dosis de la rhGAA o composición farmacéutica es al menos de aproximadamente 1.25, 1.5, 1.75, 2.0, 3.0 o más veces más largo que el de los productos de rhGAA convencionales.

En algunas realizaciones, en las mismas condiciones de tratamiento (por ejemplo, la misma dosis administrada en el mismo intervalo), la rhGAA o composición farmacéutica descrita en el presente documento proporcionan efectos terapéuticos en un grado superior al proporcionado por los productos de rhGAA convencionales. Los efectos terapéuticos pueden evaluarse basándose

en uno o más de los criterios analizados anteriormente (por ejemplo, el estado cardíaco, el nivel de glucógeno o la expresión de biomarcadores). Por ejemplo, en comparación con un producto de rhGAA convencional administrado a 20 mg/kg, 30 mg/kg o 40 mg/kg semanalmente, la rhGAA o composición farmacéutica administrados a 20 mg/kg o 30 mg/kg semanalmente pueden reducir en mayor grado los niveles de glucógeno en el tejido de un individuo tratado. En algunas realizaciones, cuando se administra en las mismas condiciones de tratamiento, la rhGAA o composición farmacéutica descrita en el presente documento proporciona efectos terapéuticos que son al menos aproximadamente 1.25, 1.5, 1.75, 2.0, 3.0 o más veces mayores que los de los productos de rhGAA convencionales.

D. Terapia de dos componentes

En una o más realizaciones, la rhGAA o composición farmacéutica que comprende la rhGAA descrita en el presente describe se administra simultáneamente o secuencialmente con un estabilizador enzimático. En algunas realizaciones, la rhGAA o composición farmacéutica se administra por una vía diferente en comparación con la del estabilizador enzimático. Por ejemplo, un estabilizador enzimático puede administrarse por vía oral mientras que la rhGAA o composición farmacéutica se administran por vía intravenosa.

En algunas realizaciones, la terapia de dos componentes se administra en combinación con terapias adicionales tales como terapia génica o terapia de reducción de sustrato. Los candidatos a terapia génica de ejemplo incluyen aquellos que codifican el gen *GAA* con marcadores opcionales tales como el factor de crecimiento similar a insulina II (IGF2) o variantes de los mismos y/o la proteína de unión a inmunoglobulina (Bip) o variantes de la misma. Las estrategias de terapia de reducción de sustrato de ejemplo incluyen la inhibición de la síntesis de glucógeno usando moléculas pequeñas o inhibición genética. En algunas realizaciones, la terapia de dos componentes comprende ERT o una chaperona farmacológica como primer componente de la terapia y terapia génica o terapia de reducción de sustrato como segundo componente de la terapia. Dicha terapia de reducción de sustratos incluye, por ejemplo, la inhibición de moléculas pequeñas de glucogenina (GYG) o glucógeno sintasa (GYS) (por

ejemplo, el inhibidor de moléculas pequeñas GYS1 actualmente en ensayo en seres humanos NCT05249621) o enfoques genéticos (por ejemplo, la supresión mediada por oligonucleótidos antisentido de la síntesis de GYS1 muscular).

5 En diversas realizaciones, el estabilizador enzimático es miglustat. Sin desear quedar ligados a teoría alguna, se cree que cuando se coadministra, el miglustat estabiliza la rhGAA (por ejemplo, ATB200 o cipaglicosidasa alfa) frente a la desnaturalización en la circulación sistémica, lo que potencia el suministro del componente activo rhGAA (por ejemplo, ATB200 o cipaglicosidasa alfa) a los lisosomas.

10 En algunas realizaciones, el miglustat se administra a una dosis oral de aproximadamente 10 mg a aproximadamente 600 mg. En al menos una realización, el miglustat se administra a una dosis oral de aproximadamente 20 mg a aproximadamente 300 mg, o a una dosis oral de aproximadamente 20 mg, aproximadamente 40 mg, aproximadamente 65 mg, aproximadamente 15 85 mg, aproximadamente 115 mg, aproximadamente 130 mg, aproximadamente 175 mg, aproximadamente 195 mg o aproximadamente 260 mg. Las dosis orales de ejemplo para miglustat también incluyen de aproximadamente 15 mg a aproximadamente 25 mg, de aproximadamente 30 mg a aproximadamente 50 mg, de aproximadamente 50 mg a aproximadamente 80 mg, de 20 aproximadamente 70 mg a aproximadamente 100 mg, de aproximadamente 100 mg a aproximadamente 130 mg, de aproximadamente 110 mg a aproximadamente 150 mg, de aproximadamente 150 mg a aproximadamente 200 mg, de aproximadamente 170 mg a aproximadamente 220 mg y de aproximadamente 200 mg a aproximadamente 300 mg.

25 En al menos una realización, la dosis de miglustat depende de la edad del paciente. En al menos una realización, la dosis de miglustat depende del peso del paciente. En al menos una realización, la dosis de miglustat depende de la edad y el peso del paciente.

30 En al menos una realización, la dosis de rhGAA se proporciona en la tabla a continuación.

Tabla 6A: Dosis para rhGAA

	Grupo de edad	Grupo de peso (kg)	Dosis inicial de cipaglucosidasa alfa (mg/kg)
5	De 0 a < 30 días	< 10	30
	De 1 a < 6 meses	< 10	30
	De 6 meses a < 2 años	< 10	30
De 10 a <20		30	
10	De 2 a < 6 años	< 10	30
		De 10 a <20	30
		De 20 a <30	30
		De 30 a <40	30
	De 6 a < 12 años	De 10 a <20	30
De 20 a <30		30	
De 30 a <40		30	
De 40 a <50		30	
≥ 50		30	
20	De 12 a < 18 años	De 30 a <40	30
		De 40 a <50	30
		≥ 50	30

En al menos una realización, la dosis de miglustat se proporciona en la tabla a continuación.

Tabla 6B: Dosis para Miglustat

	Grupo de edad	Grupo de peso (kg)	Dosis de miglustat fija (mg)
25	De 0 a < 30 días	< 10	20
	De 1 a < 6 meses	< 10	40
	De 6 meses a < 2 años	< 10	65
30		De 10 a <20	85

5	De 2 a < 6 años	< 10	85
		De 10 a <20	115
		De 20 a <30	130
		De 30 a <40	175
	De 6 a < 12 años	De 10 a <20	115
		De 20 a <30	130
		De 30 a <40	175
		De 40 a <50	195
≥ 50		260	
De 12 a < 18 años	De 30 a <40	175	
	De 40 a <50	195	
	≥ 50	260	

El miglustat presentó una farmacocinética lineal con un aumento del área plasmática bajo la curva de concentración-tiempo (ABC) y de la concentración máxima ($C_{\text{máx}}$) aproximadamente proporcional con el aumento de las dosis de 130 mg (0.5 veces la dosis recomendada de 260 mg en pacientes que pesan $\geq$ 50 kg) a 260 mg. A la dosis recomendada de 260 mg, la $C_{\text{máx}}$ media fue de aproximadamente 3 mcg/ml y el ABC media fue de aproximadamente 25 mcg*h/ml. El tiempo medio para alcanzar la concentración máxima varió de 2 horas a 3 horas.

En algunas realizaciones, la rhGAA se administra por vía intravenosa a una dosis descrita en el presente documento, tal como una dosis de aproximadamente 5 mg/kg a aproximadamente 40 mg/kg y el miglustat se administra por vía oral a una dosis descrita en el presente documento, tal como una dosis de aproximadamente 10 mg a aproximadamente 600 mg. En algunas realizaciones, la rhGAA se administra por vía intravenosa a una dosis descrita en el presente documento, tal como una dosis de aproximadamente 15 mg/kg a aproximadamente 40 mg/kg y el miglustat se administra por vía oral a una dosis descrita en el presente documento, tal como una dosis de aproximadamente 15 mg a aproximadamente 300 mg. En algunas realizaciones, la rhGAA se administra por vía intravenosa a una dosis de aproximadamente 30 mg/kg, en donde el volumen total de infusión se determina por el peso corporal del sujeto

(por ejemplo, como se expone en la Tabla 5). En algunas realizaciones, el miglustat se administra por vía oral a una dosis determinada por la edad y/o el peso del sujeto (por ejemplo, como se expone en la Tabla 6B).

En algunas realizaciones, el miglustat y la rhGAA se administran
5 simultáneamente. Por ejemplo, el miglustat puede administrarse dentro de 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1 minuto antes o después de la administración de la rhGAA. En algunas realizaciones, el miglustat se administra dentro de 5, 4, 3, 2 o 1 minuto antes o después de la administración de la rhGAA.

En algunas realizaciones, el miglustat y la rhGAA se administran
10 secuencialmente. En al menos una realización, el miglustat se administra antes de la administración de la rhGAA. En al menos una realización, el miglustat se administra menos de tres horas antes de la administración de la rhGAA. En al menos una realización, el miglustat se administra aproximadamente dos horas
15 antes de la administración de la rhGAA. En al menos una realización, el miglustat se administra en un intervalo de 50 minutos a 90 minutos antes de la administración de la rhGAA. Por ejemplo, el miglustat puede administrarse aproximadamente 1.5 horas, aproximadamente 1 hora, aproximadamente 50 minutos, aproximadamente 30 minutos o aproximadamente 20 minutos antes de la administración de la rhGAA. En al menos una realización, el miglustat se
20 administra aproximadamente una hora antes de la administración de la rhGAA. En algunas realizaciones, el miglustat se administra por vía oral aproximadamente una hora antes de la administración de la rhGAA.

En algunas realizaciones, el miglustat se administra después de la administración de la rhGAA. En al menos una realización, el miglustat se
25 administra en tres horas después de la administración de la rhGAA. En al menos una realización, el miglustat se administra en dos horas después de la administración de la rhGAA. Por ejemplo, el miglustat puede administrarse en aproximadamente 1.5 horas, aproximadamente 1 hora, aproximadamente 50 minutos, aproximadamente 30 minutos o aproximadamente 20 minutos después
30 de la administración de la rhGAA.

En algunas realizaciones, el sujeto ayuna durante al menos dos horas antes de la administración de miglustat. En algunas realizaciones, el sujeto

ayuna durante al menos dos horas después de la administración de miglustat. En algunas realizaciones, el sujeto ayuna al menos dos horas antes y dos horas después de la administración de miglustat.

5 En algunas realizaciones, el sujeto ayuna durante al menos dos horas antes y al menos dos horas después de la administración de miglustat, y el miglustat se administra aproximadamente una hora antes de la administración de la rhGAA. En algunas realizaciones, el ayuno, la administración de miglustat y la administración de rhGAA siguen el siguiente calendario de dosificación:

10 En algunas realizaciones, la terapia de dos componentes de acuerdo con la presente divulgación mejora uno o más síntomas de la enfermedad en un sujeto con enfermedad de Pompe en comparación con (1) el valor basal, o (2) un tratamiento de control que comprende administrar alglucosidasa alfa y un placebo para el estabilizador enzimático. En dicho tratamiento de control, se administró un placebo en lugar del estabilizador enzimático.

15 En el presente documento se proporciona un método para mejorar la función motora y/o la función pulmonar durante al menos 24 meses o al menos 36 meses en un sujeto que tiene la enfermedad de Pompe, comprendiendo el método administrar al sujeto una población de moléculas de α -glucosidasa ácida humana recombinante (rhGAA), simultáneamente o secuencialmente con un
20 estabilizador enzimático; en donde cada molécula de rhGAA comprende siete sitios de N-glicosilación potenciales; en donde el 40 %-60 % de los N-glicanos en las moléculas de rhGAA son N-glicanos de tipo complejo; en donde las moléculas de rhGAA comprenden al menos 0.5 mol de bis-manosa-6-fosfato (bis-M6P) por mol de rhGAA en el primer sitio de N-glicosilación potencial
25 determinado usando cromatografía de líquidos y espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS); y en donde el método mejora la función motora y/o la función pulmonar en el sujeto en comparación con el valor basal.

En algunas realizaciones, el sujeto tratado mediante terapia de dos componentes es un paciente con experiencia con ERT. En algunas
30 realizaciones, el sujeto con experiencia con ERT había sido tratado previamente con alglucosidasa alfa. En algunas realizaciones, el sujeto con experiencia con ERT había sido tratado previamente con alglucosidasa alfa durante de

aproximadamente 2 a aproximadamente 6 años. En algunas realizaciones, el sujeto con experiencia con ERT había sido tratado previamente con alglucosidasa alfa durante al menos aproximadamente 7 años. En algunas realizaciones, el sujeto con experiencia con ERT no es ambulatorio. En algunas realizaciones, el sujeto con experiencia con ERT es ambulatorio. En algunas realizaciones, el sujeto es un sujeto sin tratamiento previo con ERT.

En algunas realizaciones, la terapia de dos componentes de acuerdo con la presente divulgación mejora y/o estabiliza la función motora del sujeto, medida mediante un ensayo de caminata de 6 minutos (6MWT). En algunas realizaciones, en comparación con el valor basal, la distancia caminada en 6 minutos (6MWD) del sujeto aumenta en al menos 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30 o 50 metros o al menos un 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 % o 10 % después de 12, 26, 38 o 52 semanas, o después de 18, 24, 30 o 36 meses de tratamiento. En algunas realizaciones, la 6MWD del sujeto aumenta en al menos 20 metros o al menos un 5 % después de 52 semanas de tratamiento. En algunas realizaciones, en comparación con el tratamiento de control, la 6MWD del sujeto mejora en al menos 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 30, 40 o 50 metros después de 12, 26, 38 o 52 semanas, o después de 18, 24, 30 o 36 meses de tratamiento. En algunas realizaciones, en comparación con el tratamiento de control, la 6MWD del sujeto mejora en al menos 13 metros después de 52 semanas de tratamiento. En algunas realizaciones de los métodos para tratar a un sujeto con experiencia con ERT, la función motora se mide mediante un ensayo de caminata de 6 minutos; y la mejora con respecto al valor basal en la distancia caminada en 6 minutos (6MWD) es de al menos 15, 16, 17, 18, 19, 20 o 21 metros a los 24 meses después del inicio del tratamiento. En algunas realizaciones de los métodos para tratar a un sujeto con experiencia con ERT, la función motora se mide mediante un ensayo de caminata de 6 minutos; y la mejora con respecto al valor basal en la distancia caminada en 6 minutos (6MWD) es de al menos 35, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46 o 47 metros a los 36 meses después del inicio del tratamiento. En algunas realizaciones de los métodos para tratar a un sujeto sin tratamiento previo con ERT, la función motora se mide mediante un ensayo de caminata de

- 6 minutos; y la mejora con respecto al valor basal en la distancia caminada en 6 minutos (6MWD) es de al menos 55, 56, 57, 58, 59 o 60 metros a los 24 meses después del inicio del tratamiento. En algunas realizaciones de los métodos para tratar a un sujeto sin tratamiento previo con ERT, la función motora se mide
- 5 mediante un ensayo de caminata de 6 minutos; y la mejora con respecto al valor basal en la distancia caminada en 6 minutos (6MWD) es de al menos 34, 35, 40, 41, 42 o 43 metros a los 36 meses después del inicio del tratamiento. En algunas realizaciones, el sujeto tiene una 6MWD basal inferior a 300 metros. En algunas realizaciones, el sujeto tiene una 6MWD basal superior o igual a 300 metros.
- 10 En algunas realizaciones, la terapia de dos componentes de acuerdo con la presente divulgación estabiliza la función pulmonar del sujeto, medida mediante un ensayo de capacidad vital forzada (FVC). En algunas realizaciones, después de 12, 26, 38 o 52 semanas, o después de 18, 24, 30 o 36 meses de tratamiento, el porcentaje predicho de FVC del sujeto aumenta en comparación
- 15 con el valor basal, o disminuye en menos del 0.1%, 0.2%, 0.3%, 0.4%, 0.5%, 0.6%, 0.7%, 0.8%, 0.9%, 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, o 10% en comparación con el valor basal. En algunas realizaciones, después de 52 semanas de tratamiento, el porcentaje predicho de FVC del sujeto disminuye menos del 1 % en comparación con el valor basal. En algunas realizaciones, en
- 20 comparación con el tratamiento de control, el porcentaje predicho de FVC del sujeto mejora significativamente y/o se estabiliza después del tratamiento. En algunas realizaciones, en comparación con el tratamiento de control, el porcentaje predicho de FVC del sujeto mejora significativamente en al menos un
- 25 0.5 %, 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 % o 6 % después de 12, 26, 38 o 52 semanas, o después de 18, 24, 30 o 36 meses de tratamiento. En algunas realizaciones, en comparación con el tratamiento de control, el porcentaje predicho de FVC del sujeto mejora significativamente en al menos un 3 % después de 52 semanas de tratamiento. En algunas realizaciones de métodos para tratar a un sujeto con
- 30 experiencia con ERT, la función pulmonar se mide mediante un ensayo de capacidad vital forzada (FVC) en sedestación y el porcentaje predicho de FVC del sujeto es estable en comparación con el valor basal a los 24 meses o 36 meses después del inicio del tratamiento. En algunas realizaciones de métodos

para tratar a un sujeto sin tratamiento previo con ERT, la función pulmonar se mide mediante un ensayo de capacidad vital forzada (FVC) en sedestación; y la mejora con respecto al valor basal en el porcentaje predicho de FVC del sujeto es de al menos el 6.4, 6.5, 6.6, 6.7 o 6.8 % a los 24 meses después del inicio del tratamiento. En algunas realizaciones de métodos para tratar a un sujeto sin tratamiento previo con ERT, la función pulmonar se mide mediante un ensayo de capacidad vital forzada (FVC) en sedestación; y la mejora con respecto al valor basal en el porcentaje predicho de FVC del sujeto es de al menos el 5.7, 5.8, 5.9, 6.0, 6.1 o 6.2 % a los 24 meses después del inicio del tratamiento. En algunas realizaciones, el sujeto tiene una FVC basal inferior al 55 %. En algunas realizaciones, el sujeto tiene una FVC basal superior o igual al 55 %. En algunas realizaciones, el sujeto tiene una FVC basal inferior al 50 %. En algunas realizaciones, el sujeto tiene una FVC basal superior o igual al 50 %.

En algunas realizaciones, la terapia de dos componentes de acuerdo con la presente divulgación mejora y/o estabiliza la fuerza muscular del sujeto, medida mediante un ensayo muscular manual (MMT). En algunas realizaciones, en comparación con el valor basal, la puntuación de extremidades inferiores de MMT del sujeto mejora, como indica un aumento de al menos 0.1, 0.3, 0.5, 0.7, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 o 3.0 puntos después de 12, 26, 38 o 52 semanas, o después de 18, 24, 30 o 36 meses de tratamiento. En algunas realizaciones, en comparación con el tratamiento de control, la puntuación de extremidades inferiores de MMT del sujeto mejora significativamente y/o se estabiliza después del tratamiento. En algunas realizaciones de métodos para tratar a un sujeto con experiencia con ERT, la fuerza muscular se mide mediante un MMT; y la mejora con respecto al valor basal en una puntuación de extremidades inferiores de MMT es de al menos 1.9, 2, 2.1, 2.2 o 2.3 puntos a los 24 meses después del inicio del tratamiento. En algunas realizaciones de métodos para tratar a un sujeto con experiencia con ERT, la fuerza muscular se mide mediante un MMT; y la mejora con respecto al valor basal en una puntuación de extremidades inferiores de MMT es de al menos 1.5, 1.6, 1.7, 1.8 o 1.9 puntos a los 36 meses después del inicio del tratamiento. En algunas realizaciones de métodos para tratar a un sujeto sin tratamiento previo con ERT, la fuerza muscular se mide

mediante un MMT; y la mejora con respecto al valor basal en una puntuación de extremidades inferiores de MMT es de al menos 1.0, 1.1, 1.2, 1.3, 1.4 o 1.5 puntos a los 24 meses después del inicio del tratamiento. En algunas realizaciones de métodos para tratar a un sujeto sin tratamiento previo con ERT, 5 la fuerza muscular se mide mediante un MMT; y la mejora con respecto al valor basal en una puntuación de extremidades inferiores de MMT es de al menos 2.8, 2.9, 3.0, 3.1, 3.2 o 3.3 puntos a los 36 meses después del inicio del tratamiento. En algunas realizaciones, el sujeto tiene una puntuación de extremidades inferiores de MMT basal inferior a 25. En algunas realizaciones, el sujeto tiene 10 una puntuación de extremidades inferiores de MMT basal superior o igual a 25.

En algunas realizaciones, la terapia de dos componentes de acuerdo con la presente divulgación mejora y/o estabiliza la función motora del sujeto, medida mediante un ensayo de marcha, escalera, Gower, silla (GSGC). En algunas realizaciones, en comparación con el valor basal, la puntuación de GSGC del 15 sujeto mejora, como indica una disminución de al menos 0.1, 0.3, 0.5, 0.7, 1.0, 1.5 o 2.5 puntos después de 12, 26, 38 o 52 semanas, o después de 18, 24, 30 o 36 meses de tratamiento. En algunas realizaciones, en comparación con el valor basal, la puntuación de GSGC del sujeto mejora, como indica una disminución de al menos 0.5 puntos después de 52 semanas de tratamiento. En 20 algunas realizaciones, en comparación con el tratamiento de control, la puntuación de GSGC del sujeto mejora significativamente después del tratamiento. En algunas realizaciones, en comparación con el tratamiento de control, la puntuación de GSGC del sujeto mejora significativamente, como indica una disminución de al menos 0.3, 0.5, 0.7, 1.0, 1.5, 2.5 o 5 puntos después de 25 12, 26, 38 o 52 semanas, o después de 18, 24, 30 o 36 meses de tratamiento. En algunas realizaciones, en comparación con el tratamiento de control, la puntuación de GSGC del sujeto mejora significativamente, como indica una disminución de al menos 1.0 punto después de 52 semanas de tratamiento.

En algunas realizaciones, la terapia de dos componentes de acuerdo con 30 la presente divulgación reduce el nivel de al menos un marcador de daño muscular después del tratamiento. En algunas realizaciones, el al menos un marcador de daño muscular comprende creatina cinasa (CK). En algunas

realizaciones, en comparación con el valor basal, el nivel de CK del sujeto se reduce en al menos un 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 40 % o 50 % después de 12, 26, 38 o 52 semanas, o después de 18, 24, 30 o 36 meses de tratamiento. En algunas realizaciones, en comparación con el valor basal, el nivel de CK del sujeto se reduce en al menos un 20 % después de 52 semanas de tratamiento. En algunas realizaciones, en comparación con el tratamiento de control, el nivel de CK del sujeto se reduce significativamente después del tratamiento. En algunas realizaciones, en comparación con el tratamiento de control, el nivel de CK del sujeto se reduce significativamente en al menos un 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 40 % o 50 % después de 12, 26, 38 o 52 semanas, o después de 18, 24, 30 o 36 meses de tratamiento. En algunas realizaciones, en comparación con el tratamiento de control, el nivel de CK del sujeto se reduce significativamente en al menos un 30 % después de 52 semanas de tratamiento.

En algunas realizaciones, la terapia de dos componentes de acuerdo con la presente divulgación reduce el nivel de al menos un marcador de acumulación de glucógeno después del tratamiento. En algunas realizaciones, el al menos un marcador de acumulación de glucógeno comprende tetrasacárido de hexosa en orina (Hex4). En algunas realizaciones, en comparación con el valor basal, el nivel de Hex4 en orina del sujeto se reduce en al menos un 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 40 %, 50 % o 60 % después de 12, 26, 38 o 52 semanas, o después de 18, 24, 30 o 36 meses de tratamiento. En algunas realizaciones, en comparación con el valor basal, el nivel de Hex4 en orina del sujeto se reduce en al menos un 30 % después de 52 semanas de tratamiento. En algunas realizaciones, en comparación con el tratamiento de control, el nivel de Hex4 en orina del sujeto se reduce significativamente después del tratamiento. En algunas realizaciones, en comparación con el tratamiento de control, el nivel de Hex4 en orina del sujeto se reduce significativamente en al menos un 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 40 %, 50 % o 60 % después de 12, 26, 38 o 52 semanas, o después de 18, 24, 30 o 36 meses de tratamiento. En algunas realizaciones, en comparación con el tratamiento de control, el nivel de Hex4 en orina del sujeto se reduce significativamente en al menos un 40 % después de 52 semanas de tratamiento.

En algunas realizaciones, la terapia de dos componentes de acuerdo con la presente divulgación mejora y/o estabiliza uno o más síntomas de la enfermedad en un sujeto paciente con experiencia con ERT con enfermedad de Pompe en comparación con (1) el valor basal, o (2) un tratamiento de control que comprende administrar alglucosidasa alfa y un placebo para el estabilizador enzimático.

En algunas realizaciones, la terapia de dos componentes para un sujeto con experiencia con ERT con enfermedad de Pompe mejora y/o estabiliza la función motora del sujeto, medida mediante un 6MWT. En algunas realizaciones, en comparación con el valor basal, la 6MWD del sujeto aumenta en al menos 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, o 50 metros o al menos un 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, o 10% después de 12, 26, 38, o 52 semanas, o después de 18, 24, 30 o 36 meses de tratamiento. En algunas realizaciones, la 6MWD del sujeto aumenta en al menos 15 metros o al menos un 5 % después de 52 semanas de tratamiento. En algunas realizaciones, en comparación con el tratamiento de control, la 6MWD del sujeto mejora significativamente después del tratamiento. En algunas realizaciones, en comparación con el tratamiento de control, la 6MWD del sujeto mejora significativamente en al menos 10, 12, 14, 15, 16, 18, 20, 30, 40, o 50 metros después de 12, 26, 38 o 52 semanas, o después de 18, 24, 30 o 36 meses de tratamiento. En algunas realizaciones, en comparación con el tratamiento de control, la 6MWD del sujeto mejora significativamente en al menos 15 metros después de 52 semanas de tratamiento. En algunas realizaciones, el sujeto tiene una 6MWD basal inferior a 300 metros. En algunas realizaciones, el sujeto tiene una 6MWD basal superior o igual a 300 metros.

En algunas realizaciones, la terapia de dos componentes para un sujeto con experiencia con ERT con enfermedad de Pompe mejora y/o estabiliza la función pulmonar del sujeto, medida mediante un ensayo de FVC. En algunas realizaciones, después de 12, 26, 38 o 52 semanas, o después de 18, 24, 30 o 36 meses de tratamiento, el porcentaje predicho de FVC del sujeto aumenta en al menos un 0.1%, 0.2%, 0.3%, 0.4%, 0.5%, 1%, 2%, 3%, 4%, o 5% en comparación con el valor basal. En algunas realizaciones, después de 52

semanas de tratamiento, el porcentaje predicho de FVC del sujeto aumenta en al menos un 0.1 % en comparación con el valor basal. En algunas realizaciones, en comparación con el tratamiento de control, el porcentaje predicho de FVC del sujeto mejora significativamente y/o se estabiliza después del tratamiento. En algunas realizaciones, en comparación con el tratamiento de control, el porcentaje predicho de FVC del sujeto mejora significativamente en al menos un 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 8 % o 10 % después de 12, 26, 38 o 52 semanas, o después de 18, 24, 30 o 36 meses de tratamiento. En algunas realizaciones, en comparación con el tratamiento de control, el porcentaje predicho de FVC del sujeto mejora significativamente en al menos un 4 % después de 52 semanas de tratamiento. En algunas realizaciones, el sujeto tiene una FVC basal inferior al 55 %. En algunas realizaciones, el sujeto tiene una FVC basal superior o igual al 55 %.

En algunas realizaciones, la terapia de dos componentes para un sujeto con experiencia con ERT con enfermedad de Pompe mejora y/o estabiliza la función motora del sujeto, medida mediante un ensayo de GSGC. En algunas realizaciones, en comparación con el valor basal, la puntuación de GSGC del sujeto mejora, como indica una disminución de al menos 0.1, 0.3, 0.5, 0.7, 1.0, 1.5 o 2.5 puntos después de 12, 26, 38 o 52 semanas, o después de 18, 24, 30 o 36 meses de tratamiento. En algunas realizaciones, en comparación con el valor basal, la puntuación de GSGC del sujeto mejora, como indica una disminución de al menos 0.5 puntos después de 52 semanas de tratamiento. En algunas realizaciones, en comparación con el tratamiento de control, la puntuación de GSGC del sujeto mejora significativamente y/o se estabiliza después del tratamiento. En algunas realizaciones, en comparación con el tratamiento de control, la puntuación de GSGC del sujeto mejora significativamente, como indica una disminución de al menos 0.3, 0.5, 0.7, 1.0, 1.5, 2.5 o 5 puntos después de 12, 26, 38 o 52 semanas, o después de 18, 24, 30 o 36 meses de tratamiento. En algunas realizaciones, en comparación con el tratamiento de control, la puntuación de GSGC del sujeto mejora significativamente, como indica una disminución de al menos 1.0 punto después de 52 semanas de tratamiento.

En algunas realizaciones, la terapia de dos componentes para un sujeto con experiencia con ERT con enfermedad de Pompe reduce el nivel de al menos un marcador de daño muscular después del tratamiento. En algunas realizaciones, el al menos un marcador de daño muscular comprende CK. En algunas realizaciones, en comparación con el valor basal, el nivel de CK del sujeto se reduce en al menos un 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 40 % o 50 % después de 12, 26, 38 o 52 semanas, o después de 18, 24, 30 o 36 meses de tratamiento. En algunas realizaciones, en comparación con el valor basal, el nivel de CK del sujeto se reduce en al menos un 15 % después de 52 semanas de tratamiento. En algunas realizaciones, en comparación con el tratamiento de control, el nivel de CK del sujeto se reduce significativamente después del tratamiento. En algunas realizaciones, en comparación con el tratamiento de control, el nivel de CK del sujeto se reduce significativamente en al menos un 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 40 % o 50 % después de 12, 26, 38 o 52 semanas, o después de 18, 24, 30 o 36 meses de tratamiento. En algunas realizaciones, en comparación con el tratamiento de control, el nivel de CK del sujeto se reduce significativamente en al menos un 30 % después de 52 semanas de tratamiento.

En algunas realizaciones, la terapia de dos componentes para un sujeto con experiencia con ERT con enfermedad de Pompe reduce el nivel de al menos un marcador de acumulación de glucógeno después del tratamiento. En algunas realizaciones, el al menos un marcador de acumulación de glucógeno comprende Hex4 en orina. En algunas realizaciones, en comparación con el valor basal, el nivel de Hex4 en orina del sujeto se reduce en al menos un 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 40 %, 50 % o 60 % después de 12, 26, 38 o 52 semanas, o después de 18, 24, 30 o 36 meses de tratamiento. En algunas realizaciones, en comparación con el valor basal, el nivel de Hex4 en orina del sujeto se reduce en al menos un 25 % después de 52 semanas de tratamiento. En algunas realizaciones, en comparación con el tratamiento de control, el nivel de Hex4 en orina del sujeto se reduce significativamente después del tratamiento. En algunas realizaciones, en comparación con el tratamiento de control, el nivel de Hex4 en orina del sujeto se reduce significativamente en al

menos un 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 40 %, 50 % o 60 % después de 12, 26, 38 o 52 semanas, o después de 18, 24, 30 o 36 meses de tratamiento. En algunas realizaciones, en comparación con el tratamiento de control, el nivel de Hex4 en orina del sujeto se reduce significativamente en al menos un 40 %
5 después de 52 semanas de tratamiento.

E. Kits

Otro aspecto de la divulgación se refiere a kits adecuados para realizar la terapia con rhGAA descrita en el presente documento. En una o más realizaciones, el kit comprende un recipiente (por ejemplo, vial, tubo, bolsa, etc.)
10 que comprende la rhGAA o composición farmacéutica (ya sea antes o después de la liofilización) e instrucciones para la reconstitución, dilución y administración. En una o más realizaciones, el kit comprende un recipiente (por ejemplo, vial, tubo, bolsa, etc.) que comprende un estabilizador enzimático (por ejemplo, miglustat) y una composición farmacéutica que comprende rhGAA (antes o
15 después de la liofilización), e instrucciones para la reconstitución, dilución y administración de rhGAA con el estabilizador enzimático.

EJEMPLOS

La presente invención se ilustra adicionalmente con los siguientes ejemplos no limitantes.

20 Ejemplo 1: Preparación de células CHO que producen rhGAA que tiene un alto contenido de N-glicanos que llevan mono o bis-M6P.

Se transfectaron células DG44 CHO (DHFR-) con una construcción de ADN que expresa rhGAA. La construcción de ADN se muestra en la Fig. 4. Después de la transfección, se seleccionaron las células CHO que contenían un
25 gen de GAA integrado de forma estable con medio deficiente en hipoxantina/timidina (-HT)). la expresión de GAA en estas células se indujo mediante tratamiento con metotrexato (MTX, 500 nM).

Los grupos de células que expresaban grandes cantidades de GAA se identificaron mediante ensayos de actividad de la enzima GAA y se utilizaron
30 para establecer clones individuales productores de rhGAA. Se generaron clones individuales sobre placas de medio semisólido, se recogieron 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 expresaban un nivel elevado de GAA. El medio acondicionado para determinar la actividad GAA usó un sustrato 4-MU- α -Glucosidasa. Los clones productores de altos niveles de GAA medida por ensayos de la enzima GAA se evaluaron adicionalmente para determinar la viabilidad, capacidad de crecimiento, productividad de GAA, estructura de N-glicanos y expresión estable de la proteína. Las estirpes de células CHO, incluyendo la estirpe de células CHO GA-ATB200, que expresaban rhGAA con N-glicanos mono-M6P o bis-M6P potenciados, se aislaron usando este procedimiento.

Ejemplo 2: Purificación de rhGAA

Se produjeron múltiples lotes de la rhGAA de acuerdo con la divulgación en matraces agitados y en biorreactores de perfusión usando la estirpe celular CHO GA-ATB200, cuyo producto se denomina "ATB200". Se usó cromatografía de líquidos de intercambio aniónico débil ("WAX") para fraccionar la rhGAA ATB200 de acuerdo con el fosfato terminal y el ácido siálico. Se generaron perfiles de elución eluyendo el ERT con cantidad creciente de sal. Los perfiles se siguieron mediante UV (A280nm). Se observaron perfiles similares de unión al receptor CIMPR (al menos ~70 %) para la rhGAA ATB200 purificada de diferentes lotes de producción (Fig. 5), lo que indica que la rhGAA ATB200 puede producirse de forma consistente.

Ejemplo 3: Caracterización de oligosacáridos de rhGAA ATB200

También se analizó la rhGAA ATB200 para determinar los perfiles de N-glicanos específicos de sitio usando técnicas analíticas de LC-MS/MS diferentes. Los resultados de los dos primeros métodos de LC-MS/MS se muestran en las Fig. 6A-6H. Los resultados de un tercer método de LC-MS/MS con mapeo de glicanos 2-AA se muestran en las Fig. 19A-19H, Fig. 20A-20B, y la Tabla 7.

En el primer análisis por LC-MS/MS, la proteína se desnaturizó, se redujo, se alquiló y se digirió antes del análisis por LC-MS/MS. Durante la desnaturización y la reducción de la proteína, se añadieron 200 μ g de muestra de proteína, 5 μ l de tris-HCl 1 mol/l (concentración final, 50 mM), 75 μ l de guanidina HCl 8 mol/l (concentración final 6 M), 1 μ l de EDTA 0.5 mol/l

(concentración final 5 mM), 2 µl de DTT 1 mol/l (concentración final 20 mM) y agua Milli-Q® a un tubo de 1.5 ml para proporcionar un volumen total de 100 µl. La muestra se mezcló y se incubó a 56°C durante 30 minutos en un baño seco. Durante la alquilación, la muestra de proteína desnaturalizada y reducida se

5 mezcló con 5 µl de yodoacetamida 1 mol/l (IAM, concentración final 50 mM), después se incubó a 10-30 °C en la oscuridad durante 30 minutos. Tras la alquilación, se añadieron 400 µl de acetona previamente enfriada a la muestra, y la mezcla se congeló a -80°C durante 4 horas. La muestra se centrifugó después durante 5 minutos a 13000 rpm a 4 °C y se eliminó el sobrenadante. Se

10 añadieron 400 µl de acetona preenfriada a los gránulos, que después se centrifugaron durante 5 minutos a 13000 rpm a 4 °C y el sobrenadante se eliminó. A continuación, la muestra se secó al aire sobre hielo en la oscuridad para eliminar el residuo de acetona. Se añadieron cuarenta microlitros de urea 8 M y 160 µl de NH₄HCO₃ 100 mM a la muestra para disolver la proteína. Durante

15 la digestión con tripsina, después se añadieron 50 µg de la proteína a tampón de digestión con tripsina hasta un volumen final de 100 µl, y se añadieron 5 µl de tripsina 0.5 mg/ml (relación de proteína a enzima de 20/1 p/p). La solución se mezcló bien y se incubó durante la noche (16 ± 2 horas) a 37 °C. Se añadieron dos microlitros y medio de TFA al 20 % (concentración final 0.5 %) para inactivar

20 la reacción. La muestra se analizó a continuación usando un espectrómetro de masas Thermo Scientific™ Orbitrap Velos Pro™.

En el segundo análisis por LC-MS/MS, la muestra de ATB200 se preparó de acuerdo con un procedimiento similar de desnaturalización, reducción, alquilación y digestión, excepto por que se usó ácido yodoacético (IAA) como

25 reactivo de alquilación en lugar de IAM, y después se analizó usando el espectrómetro de masas Thermo Scientific™ Orbitrap Fusion™ Lumos Tribid™.

En las Figuras 6A-6H se muestran los resultados del primer y el segundo análisis. En las Fig. 6A-6H, los resultados del primer análisis se representan mediante la barra de la izquierda (gris oscuro) y los resultados del segundo

30 análisis se representan mediante la barra de la derecha (gris claro). La nomenclatura de símbolos para la representación del glicano está de acuerdo

con Varki, A., Cummings, R.D., Esko J.D., et al., Essentials of Glycobiology, 2^a edición (2009).

Como puede observarse a partir de las Fig. 6A-6H, los dos análisis proporcionaron resultados similares, aunque se produjo cierta variación entre los resultados. Esta variación se puede deber a numerosos factores, incluyendo el instrumento utilizado y la completitud del análisis de N-glicanos. Por ejemplo, si algunas especies de N-glicanos fosforilados no se identifican y/o no se cuantifican, entonces, el número total de N-glicanos fosforilados puede estar infrarrepresentado, y el porcentaje de rhGAA que lleva los N-glicanos fosforilados en dicho sitio puede estar infrarrepresentado. Como ejemplo adicional, si algunas especies de N-glicanos no fosforilados no se identifican y/o no se cuantifican, entonces, el número total de N-glicanos no fosforilados puede estar infrarrepresentados, y el porcentaje de rhGAA que lleva los N-glicanos fosforilados en dicho sitio puede estar sobrerrepresentado.

La Fig. 6A muestra la ocupación del sitio de N-glicosilación de ATB200. Como se puede observar a partir de la Fig. 6A, el primer, segundo, tercero, cuarto, quinto y sexto sitios de N-glicosilación están principalmente ocupados, donde ambos análisis detectan aproximadamente y más del 90 % y hasta aproximadamente el 100 % de la enzima ATB200 que tiene un N-glicano detectado en cada sitio de N-glicosilación potencial. Sin embargo, el séptimo sitio de N-glicosilación potencial está N-glicosilado aproximadamente la mitad del tiempo.

La Fig. 6B muestra el perfil de N-glicosilación del primer sitio de N-glicosilación potencial, N84. Como puede observarse a partir de la Fig. 6B, la principal especie de N-glicano es N-glicanos bis-M6P. Tanto el primer análisis como el segundo detectaron más del 75 % de la ATB200 que tiene bis-M6P en el primer sitio, lo que corresponde a un promedio de aproximadamente 0.8 mol de bis-M6P por mol de ATB200 en el primer sitio.

La Fig. 6C muestra el perfil de N-glicosilación del segundo sitio de N-glicosilación potencial, N177. Como puede observarse a partir de la Fig. 6C, las especies principales de N-glicanos son los N-glicanos mono-M6P y los N-glicanos con alto contenido de manosa no fosforilados. Tanto el primer análisis como el

segundo detectaron más del 40 % de la ATB200 que tiene mono-M6P en el segundo sitio, lo que corresponde a un promedio de aproximadamente 0.4 a aproximadamente 0.6 mol de mono-M6P por mol de ATB200 en el segundo sitio.

La Fig. 6D muestra el perfil de N-glicosilación del tercer sitio de N-glicosilación potencial, N334. Como puede observarse a partir de la Fig. 6D, las especies principales de N-glicanos son los N-glicanos con alto contenido de manosa no fosforilados, los N-glicanos complejos di, tri y tetra antenarios y los N-glicanos híbridos. Tanto el primer análisis como el segundo detectaron más del 20 % de la ATB200 que tiene un resto de ácido siálico en el tercer sitio, lo que corresponde a un promedio de aproximadamente 0.9 a aproximadamente 1.2 mol de ácido siálico por mol de ATB200 en el tercer sitio.

La Fig. 6E muestra el perfil de N-glicosilación del cuarto sitio de N-glicosilación potencial, N414. Como puede observarse a partir de la Fig. 6E, las principales especies de N-glicanos son los N-glicanos bis-M6P y mono-M6P. Tanto el primer análisis como el segundo detectaron más del 40 % de la ATB200 que tiene bis-M6P en el cuarto sitio, lo que corresponde a un promedio de aproximadamente 0.4 a aproximadamente 0.6 mol de bis-M6P por mol de ATB200 en el cuarto sitio. Tanto el primer análisis como el segundo también detectaron más del 25 % de la ATB200 que tiene mono-M6P en el cuarto sitio, lo que corresponde a un promedio de aproximadamente 0.3 a aproximadamente 0.4 mol de mono-M6P por mol de ATB200 en el cuarto sitio.

La Fig. 6F muestra el perfil de N-glicosilación del quinto sitio de N-glicosilación potencial, N596. Como puede observarse a partir de la Fig. 6F, las principales especies de N-glicanos son los N-glicanos complejos diantenario fucosilados. Tanto el primer análisis como el segundo detectaron más del 70 % de la ATB200 que tiene un resto de ácido siálico en el quinto sitio, lo que corresponde a un promedio de aproximadamente 0.8 a aproximadamente 0.9 mol de ácido siálico por mol de ATB200 en el quinto sitio.

La Fig. 6G muestra el perfil de N-glicosilación del sexto sitio de N-glicosilación potencial, N826. Como puede observarse a partir de la Fig. 6G, las principales especies de N-glicanos son los N-glicanos complejos di, tri, y tetra antenarios. Tanto el primer análisis como el segundo detectaron más del 80 %

de la ATB200 que tiene un resto de ácido siálico en el sexto sitio, lo que corresponde a un promedio de aproximadamente 1.5 a aproximadamente 1.8 mol de ácido siálico por mol de ATB200 en el sexto sitio.

Un análisis de la N-glicosilación en el séptimo sitio, N869, mostró
5 aproximadamente un 40 % de N-glicosilación, siendo los N-glicanos más comunes A4S3S3GF (12 %), A5S3G2F (10 %), A4S2G2F (8 %) y A6S3G3F (8 %).

La Fig. 6H muestra un resumen de la fosforilación en cada uno de los siete
sitios de N-glucosilación potenciales. Como puede observarse a partir de la Fig.
10 6H, tanto el primer como el segundo análisis detectaron niveles altos de fosforilación en el primero, segundo y cuarto sitios de N-glicosilación potenciales. Ambos análisis detectaron que más del 80 % de la ATB200 estaba mono o bisfosforilada en el primer sitio, más del 40 % de la ATB200 estaba monofosforilada en el segundo sitio, y más del 80 % de la ATB200 estaba mono
15 o bisfosforilada en el cuarto sitio.

Se realizó otro análisis de N-glicosilación de ATB200 de acuerdo con un método de LC-MS/MS como se describe a continuación. Este análisis dio como resultado un perfil de N-glicosilación promedio en diez lotes de ATB200 (Fig. 19A-19H, Fig. 20A-20B).

20 Los glicanos unidos a N de ATB200 se liberaron enzimáticamente con PNGasa-F y se marcaron con ácido 2-antranílico (2-AA). Los N-glicanos marcados con 2-AA se procesaron adicionalmente mediante extracción en fase sólida (SPE) para eliminar el exceso de sales y otros contaminantes. Los N-glicanos 2-AA purificados se disolvieron en acetonitrilo/agua (20/80; v/v) y se
25 cargaron 10 microgramos en una columna analítica de aminopolímeros (apHera™, Supelco) para cromatografía de líquidos de alta resolución con detección de fluorescencia (HPLC-FLD) y análisis por espectrometría de masas de alta resolución (HRMS).

La separación por cromatografía de líquidos (LC) se realizó en
30 condiciones de fase normal en un modo de elución en gradiente con fase móvil A (ácido acético al 2 % en acetonitrilo) y fase móvil B (ácido acético al 5 %; acetato de amonio 20 milimolar en agua ajustada a pH 4.3 con hidróxido de

amonio). La composición inicial de la fase móvil fue del 70 % de A/30 % de B. Para la detección de fluorescencia, los parámetros del detector (RF-20Axs, Shimadzu) fueron Excitación (Ex): 320 nm; Emisión (Em): 420 nm. El análisis por HRMS se realizó usando un espectrómetro de masas cuadrupolar de tiempo de
5 vuelo (Sciex X500B QTOF) que funcionaba en modo de obtención de datos independiente (IDA). Los archivos de datos obtenidos se convirtieron en archivos mzML usando MSConvert de ProteoWizard, y después se usó el software GRITS Toolbox 1.2 Morning Blend (UGA) para la búsqueda en la base de datos de glicanos y la posterior anotación de los N-glicanos identificados. Los N-glicanos
10 se identificaron usando tanto las masas monoisotópicas precursoras (m/z) como las m/z de los iones producto. Los iones producto experimentales y los patrones de fragmentación se confirmaron informáticamente usando la Aplicación GlycoWorkbench 2.

Para determinar la cuantificación relativa de los glicanos unidos a N de
15 ATB200, los datos obtenidos del experimento HPLC-FLD-QTOF MS/MS se procesaron de la siguiente manera. Se integraron todos los picos de N-glicanos en el cromatograma de FLD, y a cada pico se le asignó un porcentaje del área total de todos los picos en el cromatograma de FLD. La señal fluorescente, expresada como área del pico, es una medida cuantitativa de la cantidad de cada
20 N-glicano en la muestra. Sin embargo, en la mayoría de los casos, el mismo pico de FLD contenía múltiples especies de N-glicanos. Por lo tanto, también se requirieron los datos del espectrómetro de masas para obtener la cuantificación relativa de cada especie de N-glicano (Tabla 7). La señal de intensidad iónica de cada N-glicano se "extrajo" de los datos para crear un pico cromatográfico
25 denominado cromatograma de iones extraídos (XIC). El XIC se alineó con el pico cromatográfico de FLD y fue específico de una sola especie de N-glicano. Después, el pico de XIC creado a partir de la señal de intensidad iónica se integró y esta área de pico es una medida cuantitativa relativa de la cantidad de glicano presente. Tanto las áreas de los picos de FLD como las áreas de los picos de
30 XIC del espectrómetro de masas se usaron para permitir la cuantificación relativa de todas las especies de glicanos unidos a N de ATB200 de las publicadas en el presente documento.

Los resultados este análisis por LC-MS/MS se proporcionan en la Tabla 7 a continuación. La nomenclatura de los símbolos para la representación de los glicanos es de acuerdo con Wopereis W, et al. 2006. Abnormal glycosylation with hypersialylated O-glycans in patients with Sialuria. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1762:598–607; Gornik O, et al. 2007. Changes of serum glycans during sepsis and acute pancreatitis. *Glycobiology*. 17:1321-1332; Kattla JJ, et al. 2011. Biologic protein glycosylation. En: Murray Moo-Young (ed.), *Comprehensive Biotechnology*, Segunda Edición, 3:467–486; Tharmalingam-Jaikaran T, et al. N-glycan profiling of bovine follicular fluid at key dominant follicle developmental stages. 2014. *Reproduction*. 148:569–580; Clerc F, et al. Human plasma protein N-glycosylation. 2015. *Glycoconj J*. DOI 10.1007/s10719-015-9626-2; y Blackler RJ, et al. 2016. El fragmento de anticuerpo monocatenario M6P-1 posee un bolsillo de unión específico para monosacáridos de manosa 6-fosfato que distingue la fosforilación de N-glicanos de forma específica de rama. *Glycobiology*. 26-2:181–192.

Tabla 7: Tipo y prevalencia de los oligosacáridos identificados en ATB200 basándose en el mapeado de glicanos 2-AA y la identificación de LC-MS/MS

Alto contenido de manosa N-Glicanos	% Total	Complejo o N-Glicanos	% Total	Complejo N-Glicanos	% Total	Complejo N-Glicanos	% Total
2P-M7	11.39	FA2G2S1	3.89	A3G3S1+1Ac	0.65	FA2G2S1+1Ac	0.29
P-M7	7.97	FA2G2S2	3.42	A3G2S2+1Ac	0.64	A4G3	0.29
M6	6.89	A2G2S2	3.32	A1G1S1	0.63	A4G4+3K DN	0.29
P-M6	3.42	FA2G2	2.77	A4G3S1	0.61	A4G4S3	0.28
M5	2.06	FA4G4S3	2.26	FA3G3	0.61	FA5G4	0.24
P-M5	1.67	A2G2S1	2.25	A1G1	0.6	A4G3S2	0.21

5	2P-M8	1.2 7	FA3G3S1	2.12	FA2G2S2 +1Ac	0.57	FA1	0.21
	P-M8	1.1 7	A3G3S2	1.8	A3G2S1	0.57	FA4G4	0.21
	BP-M6	0.9	FA2G1	1.66	A3G2S1	0.56	A3G1	0.21
	M7	0.8 1	A2G2	1.46	A2G2S2+ 1Ac	0.5	FA4G3S2	0.21
	BP-M7	0.6 9	FA3G3S1	1.42	FA3G2	0.45	FA3G2S2	0.21
10	M4	0.1 4	A4G4S1	1.28	A3G3+3K DN	0.45	A1	0.2
	BP2-M5	0.0 4	FA3G3S2	1.25	A4G3S1	0.45	A4G2	0.19
	BP2-M6	0.0 1	FA4G4(1L N)S3	1.1	A2G1S1	0.41	FA4G3	0.19
15	Híbrido N-Glicanos	% Tot al	FA4G4S1	1.08	A3G2	0.4	FA3	0.18
	FA1P-M6	2.1 6	A3G3	1.08	FA4G4S1 +LN	0.4	A1G1S1	0.18
	M5A1G1S1	1.5 6	FA4G4S4	1.07	FA3G2S1	0.39	A4G1S1	0.16
20	FP- M6A1G1S1	0.4 2	FA3G3S3	1.04	FA2	0.38	FA1G1	0.15
	A1M5	0.3 6	FA4G4S2	0.94	FA4G4S2 +LN	0.38	FA3G1	0.14
	A1G1M5	0.3 2	A2G1	0.94	A3G2S2	0.37	FA5G4S2	0.12
25	P- M6A1G1S1	0.1 7	FA2G1S1	0.94	A2	0.34	A3G1S1	0.11
	Sumario	Tot al	A4G4	0.91	FA4G4(2L N)S3	0.33	A3	0.11

5	Alto contenido de manosa N-Glicanos	38 %	FA1G1S1	0.91	FA2G2Sg 1	0.32	FA3G3S3 +1Ac	0.1
	Híbrido N-Glicanos	5%	FA2G2S2 +2Ac	0.76	FA4G4(1L N)S4	0.31	A2G2S1+1 Ac	0.09
	Complejo N-Glicanos	57 %	A4G4S2	0.69	A3G3S3	0.29	FA3G1S1	0.06

Basándose en este análisis por 2-AA y LC-MS/MS, y como se resume más adelante, la ATB200 analizada tiene un contenido de M6P promedio de 3-5 mol por mol de ATB200 (teniendo en cuenta tanto el mono-M6P como el bis-M6P) y un contenido de ácido siálico de 4-7 mol por mol de ATB200.

Como se muestra en las Fig. 19A-19H y se resume en la Fig. 20B, el primer sitio de N-glicosilación potencial de ATB200 tiene un contenido de M6P promedio de aproximadamente 1.4 mol de M6P/mol de ATB200, representando un contenido de mono-M6P promedio de aproximadamente 0.25 mol de mono-M6P/mol de ATB200 y un contenido de bis-M6P promedio de aproximadamente 0.56 mol de bis-M6P/mol de ATB200; el segundo sitio de N-glicosilación potencial de ATB200 tiene un contenido de M6P promedio de aproximadamente 0.5 mol de M6P/mol de ATB200, siendo las principales especies de N-glicanos fosforilados los N-glicanos mono-M6P; el tercer sitio de N-glicosilación potencial de ATB200 tiene un contenido de ácido siálico promedio de aproximadamente 1 mol de ácido siálico/mol de ATB200; el cuarto sitio de N-glicosilación potencial de ATB200 tiene un contenido de M6P promedio de aproximadamente 1.4 mol de M6P/mol de ATB200, lo que representa un contenido de mono-M6P promedio de aproximadamente 0.35 mol de mono-M6P/mol de ATB200 y un contenido de bis-M6P promedio de aproximadamente 0.52 mol de bis-M6P/mol de ATB200; el quinto sitio de N-glicosilación potencial de ATB200 tiene un contenido de ácido siálico promedio de aproximadamente 0.86 mol de ácido siálico/mol de ATB200; el sexto sitio de N-glicosilación potencial de ATB200 tiene un contenido de ácido siálico promedio de aproximadamente 4.2 mol de ácido siálico/mol de ATB200; y el séptimo sitio de N-glicosilación potencial de ATB200 tiene un contenido de

ácido siálico promedio de aproximadamente 0.86 mol de ácido siálico/mol de ATB200.

También de acuerdo con esta técnica analítica de 2-AA y LC-MS/MS, un promedio de aproximadamente el 65 % de los N-glicanos en el primer sitio de N-glicosilación potencial de ATB200 son N-glicanos de alto contenido de manosa, aproximadamente el 89 % de los N-glicanos en el segundo sitio de N-glicosilación potencial del ATB200 son N-glicanos de alto contenido de manosa, más de la mitad de los N-glicanos en el tercer sitio de N-glicosilación potencial de ATB200 están sialilados (con aproximadamente el 20 % totalmente sialilado) y aproximadamente el 85 % de los N-glicanos en el tercer sitio de N-glicosilación potencial de ATB200 son N-glicanos complejos, aproximadamente el 84 % de los N-glicanos en el cuarto sitio de N-glicosilación potencial de ATB200 son N-glicanos de alto contenido de manosa, aproximadamente el 70 % de los N-glicanos en el quinto sitio de N-glicosilación potencial de ATB200 están sialilados (con aproximadamente el 26 % totalmente sialilado) y aproximadamente el 100 % de los N-glicanos en el quinto sitio de N-glicosilación potencial de ATB200 son N-glicanos complejos, aproximadamente el 85 % de los N-glicanos en el sexto sitio de N-glicosilación potencial de ATB200 están sialilados (con aproximadamente el 27 % totalmente sialilado) y aproximadamente el 98 % de los N-glicanos en el sexto sitio de N-glicosilación potencial de ATB200 son N-glicanos complejos, y aproximadamente el 87 % de los N-glicanos en el séptimo sitio de N-glicosilación potencial de ATB200 están sialilados (con aproximadamente el 8 % totalmente sialilado) y aproximadamente el 100 % de los N-glicanos en el séptimo sitio de N-glicosilación potencial de ATB200 son N-glicanos complejos.

Ejemplo 4: Comparación analítica de ATB200 y MYOZYME®/LUMIZYME®

Los N-glicanos purificados de ATB200 y LUMIZYME® se evaluaron mediante MALDI-TOF para determinar las estructuras individuales de N-glicanos encontradas en cada ERT. LUMIZYME® se obtuvo de una fuente comercial. Como se muestra en la Fig. 7, ATB200 presentó cuatro picos prominentes eluyendo a la derecha de LUMIZYME®. Esto confirma que ATB200 se fosforiló

en mayor medida que LUMIZYME® puesto que esta evaluación es por carga terminal y no por afinidad de CIMPR. Como se resume en la Fig. 8, se observó que las muestras de ATB200 contenían menores cantidades de N-glicanos de tipo alto contenido de manosa no fosforilados que LUMIZYME®.

5 Para evaluar la capacidad de las rhGAA convencionales en MYOZYME® y LUMIZYME® de interactuar con el CIMPR, se inyectaron las dos preparaciones de rhGAA convencionales en una columna de afinidad de CIMPR (que se une a rhGAA que tienen grupos M6P) y se recogió el flujo a través. El material unido se eluyó con un gradiente de M6 libre. Las fracciones se recogieron en placas
10 de 96 pocillos y se analizó la actividad de GAA mediante el sustrato 4MU- α -glucosidasa. Las cantidades relativas de rhGAA no unida (flujo a través) y unida (eluida con M6P) se determinaron basándose en la actividad de GAA y se publicaron como fracción de la enzima total. Las Fig. 9A y 9B muestran el perfil de unión de rhGAA en MYOZYME® y LUMIZYME®: El 73 % de la rhGAA en
15 MYOZYME® (Fig. 9B) y el 78 % de la rhGAA en LUMIZYME® (Fig. 9A) no se unieron al CIMPR. De hecho, sólo el 27 % de la rhGAA en MYOZYME® y el 22 % de la rhGAA en LUMIZYME® contenían M6P que puede ser productivo para dirigirlo al CIMPR en células musculares. Por el contrario, como se muestra en la Fig. 5, en las mismas condiciones, más del 70 % de la rhGAA en ATB200 se
20 unió al CIMPR.

Además de tener un mayor porcentaje de rhGAA que se une al CIMPR, es importante comprender la calidad de dicha interacción. La unión a receptores de LUMIZYME® y ATB200 se determinó usando un ensayo de unión en placa de CIMPR. En resumen, se usaron placas revestidas con CIMPR para capturar
25 GAA. Se aplicaron concentraciones variables de rhGAA al receptor inmovilizado, y la rhGAA no unida se eliminó por lavado. La cantidad de rhGAA remanente se determinó mediante la actividad de GAA. Como se muestra en la Fig. 10A, ATB200 se unió a CIMPR significativamente mejor que LUMIZYME®. La Fig. 10B muestra el contenido relativo de N-glicanos bis-M6P en LUMIZYME® (un
30 producto de rhGAA convencional) y ATB200 de acuerdo con la invención. Para LUMIZYME®, sólo hay un promedio del 10 % de moléculas que tienen un N-

glicano bis-fosforilado. Por el contrario, en promedio, cada molécula de rhGAA en ATB200 tiene al menos un N-glicano bisfosforilado.

En general, el mayor contenido de N-glicanos M6P en ATB200 que en LUMIZYME® indica que la mayor porción de moléculas de rhGAA en ATB200 puede tener dirigirse a células musculares. Como se ha demostrado anteriormente, el elevado porcentaje de estructuras monofosforiladas y bisfosforiladas determinadas por MALDI concuerda con los perfiles de CIMPR que ilustran una unión significativamente mayor de ATB200 al receptor de CIMPR. El análisis de N-glicano mediante la espectrometría de masas MALDI-TOF confirmó que, en promedio, cada molécula de ATB200 contiene al menos una estructura de N-glicano bis-M6P natural. Este alto contenido en N-glicano bis-M6P en ATB200 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).

La captación celular relativa de rhGAA de ATB200 y LUMIZYME® se compararon usando estirpes celulares de fibroblastos normales y de Pompe. Las comparaciones implicaban 5-100 nM de ATB200 de acuerdo con la divulgación con 10-500 nM de producto de rhGAA LUMIZYME® convencional. Tras 16 horas de incubación, la rhGAA externa se inactivó con base TRIS y las células se lavaron 3 veces con PBS antes de la recogida. La GAA internalizada se midió mediante hidrólisis de 4MU- α -Glucósido y se representó con respecto a la proteína celular total, y los resultados aparecen en las Fig. 11A-11C.

También se demostró que ATB200 se internaliza eficazmente en las células. Como se representa en las Fig. 11A-11B, ATB200 se internaliza tanto en células de fibroblastos normales como de Pompe y se internaliza en mayor grado que el producto de rhGAA convencional LUMIZYME®. ATB200 satura los receptores celulares a aproximadamente 20 nM, mientras que se necesita aproximadamente 250 nM de LUMIZYME® para saturar los receptores celulares. La constante de eficiencia de absorción ($K_{\text{absorción}}$) extrapolada de estos resultados es de 2-3 nM para ATB200 y 56 nM para LUMIZYME® como se muestra mediante la Fig. 11C. Estos resultados sugieren que ATB200 es un tratamiento bien dirigido para la enfermedad de Pompe.

Ejemplo 5: ATB200 y estabilizador enzimático

La estabilidad de ATB200 en tampones de pH ácido o neutro se evaluó en un ensayo de termoestabilidad usando SYPRO Orange, ya que la fluorescencia del colorante aumenta cuando las proteínas se desnaturalizan.

- 5 Como se muestra en la Fig. 12, la adición de miglustat estabilizó ATB200 a pH 7.4 de manera dependiente de la concentración, comparable a la estabilidad de ATB200 a pH 5.2, una condición que imita el entorno ácido del lisosoma. Como se resume en la Tabla 10, la adición de miglustat aumentó la temperatura de fusión (T_f) de ATB200 en casi 10 °C.

10 **Tabla 10. Estabilidad de ATB200 con miglustat**

Condiciones de ensayo	T_f (°C)
pH 7.4	56.2
pH 7.4 + miglustat 10 μ M	61.6
pH 7.4 + miglustat 30 μ M	62.9
pH 7.4 + miglustat 100 μ M	66.0
pH 5.2	67.3

Ejemplo 6: Coadministración de ATB200 y miglustat en ratones con inactivación de *Gaa*

- Se evaluaron los efectos terapéuticos de ATB200 y miglustat y se compararon con los de Alglucosidasa alfa en ratones con inactivación de *Gaa*.
 25 Para el estudio, se usaron ratones macho con inactivación de *Gaa* (de 3 a 4 meses de edad) y ratones de tipo silvestre (TS) emparejados por edad. Se administró alglucosidasa alfa a través de una inyección intravenosa (IV) en embolada en la vena de la cola. En la pauta de coadministración, se administró miglustat por sonda por vía oral (VO) 30 minutos antes de la inyección IV de
 30 ATB200. El tratamiento se administró quincenalmente. Los ratones tratados se sacrificaron a los 14 días de la última administración y se recogieron diversos tejidos para su posterior análisis. La Tabla 11 resume el diseño del estudio:

Tabla 11. Coadministración del diseño del estudio

	Genotipo	Tratamiento	Dosis de fármaco por administración (quincenalmente)	Número de administración
5	Inactivación de <i>Gaa</i>	Vehículo	N/A	6
	Inactivación de <i>Gaa</i>	Alglucosidasa alfa	20 mg/kg	6
10	Inactivación de <i>Gaa</i>	ATB200/miglustat	20 mg/kg (ATB200) 10 mg/kg (miglustat)	6
	TS (Sve 129)	Sin tratar	N/A	N/A

El contenido de glucógeno tisular en las muestras de tejidos se determinó mediante digestión con amiloglucosidasa, como se ha analizado anteriormente. Como se muestra en la Fig. 13, una combinación de ATB200 20 mg/kg y miglustat 10 mg/kg disminuyó significativamente el contenido de glucógeno en cuatro tejidos diferentes (cuádriceps, tríceps, gastrocnemio y corazón) en comparación con la misma dosis de alglucosidasa alfa.

También se analizaron muestras de tejido para detectar cambios en los biomarcadores siguiendo los métodos considerados en: Khanna R, et al. (2012), "The pharmacological chaperone [i.e., enzyme stabilizer] AT2220 increases recombinant human acid α -glucosidase uptake and glycogen reduction in a mouse model of Pompe disease", Plos One 7(7): e40776; y Khanna, R et al. (2014), "The Pharmacological Chaperone AT2220 Increases the Specific Activity and Lysosomal Delivery of Mutant Acid α -Glucosidase, and Promotes Glycogen Reduction in a Transgenic Mouse Model of Pompe Disease", PLoS ONE 9(7): e102092. Como se muestra en la Fig. 14, se observó un profundo aumento y agrandamiento de las vesículas positivas para LAMP1 en las fibras musculares de los animales con inactivación de *Gaa* en comparación con los TS, indicativo de proliferación lisosómica. La coadministración de ATB200 / miglustat dio lugar a un mayor número de fibras con un nivel de LAMP1 normalizado, mientras que

las vesículas positivas para LAMP1 restantes también redujeron su tamaño (recuadros).

Del mismo modo, los agregados de LC3-positivos intensos en las fibras musculares de ratones con inactivación de *Gaa* no tratados significan la presencia de zonas autofágicas y la acumulación de autofagia. Los agregados de LC3-positivos (rojo) se redujeron preferentemente en los ratones tratados con coadministración de ATB200 / miglustat en comparación con los ratones tratados con alglucosidasa alfa (Fig. 15A). Una observación similar se realizó cuando se evaluó la expresión de LC3 usando transferencia Western. Como se muestra en la Fig. 15B, la mayoría de los animales tratados con ATB200 / miglustat mostraron una disminución significativa de los niveles de LC3 II, la forma lipídada que se asocia a los autofagosomas, lo que sugiere una mejora del flujo de autofagia. En comparación, el efecto de la alglucosidasa alfa sobre la autofagia fue modesto.

También se evaluó la disferlina, una proteína implicada en la reparación de membranas y cuya deficiencia/tráfico erróneo se asocia a varias distrofias musculares. Como se muestra en la Fig. 16, la disferlina (marrón) estaba fuertemente acumulada en el sarcoplasma de los ratones con inactivación de *Gaa*. En comparación con la alglucosidasa alfa, ATB200 / miglustat fue capaz de restablecer la disferlina al sarcolema en un mayor número de fibras musculares.

Estos datos concuerdan con las mejoras a nivel celular demostrados en pacientes humanos con enfermedad de Pompe tratados con ATB200 y miglustat, (por ejemplo, los pacientes presentan niveles reducidos de biomarcadores de acumulación de glucógeno y lesión muscular), conduciendo no sólo a un tratamiento eficaz de la enfermedad de Pompe, sino también a una inversión de la progresión de la enfermedad. Los datos clínicos en pacientes humanos con enfermedad de Pompe se resumen en los Ejemplos 8 y 9, a continuación.

Ejemplo 7: Análisis de fibra única

Como se muestra en la Fig. 17, la mayoría de los ratones tratados con vehículo mostraron lisosomas groseramente agrandados (verde) (véase, por ejemplo, "B") y la presencia de acumulación autofágica masiva (rojo) (véase, por ejemplo, "A"). Los ratones tratados con MYOZYME® no mostraron ninguna

diferencia significativa en comparación con los tratados con vehículo. Por el contrario, la mayoría de las fibras aisladas de ratones tratados con ATB200 mostraron una disminución drástica del tamaño de los lisosomas (véase, por ejemplo, "C"). Además, el área con acumulación autofágica también se redujo en diversos grados (véase, por ejemplo, "C"). Como resultado, una parte significativa de las fibras musculares analizadas (36-60 %) de los ratones tratados con ATB200 parecían normales o casi normales. La Tabla 12 a continuación resume el análisis de fibra única mostrado en la Fig. 17.

Tabla 12. Análisis de fibra única

Tratamiento	Animal analizado	Número total de fibras analizadas (n)	Agrandamiento de lisosomas	Fibras con acumulación de autofagia	Fibras de aspecto normal o casi normal
TS	2	65	-	-	100%
Vehículo	2	65	+	>90%	<10%
Alglucosidasa alfa	4	150	+	>90%	<10%
ATB200	5	188	Disminución drástica del tamaño en la mayoría de las fibras	40-64%*	36-60%

* Se incluyeron fibras con un grado variable de reducción de la acumulación autofágica. En general, el grado de la acumulación fue menor en el grupo tratado con ATB200 en comparación con el grupo tratado con vehículo o con alglucosidasa alfa.

En general, los datos indican que ATB200, con su mayor contenido de M6P, tanto sola como estabilizada adicionalmente por el estabilizador enzimático

miglustat al pH neutro de la sangre, es más eficaz en la orientación tisular y el tráfico lisosómico en comparación con la alglucosidasa alfa cuando se administra a ratones con inactivación de *Gaa*, lo que concuerda con la estabilización de la ATB200 por miglustat, como se representa en la Fig. 18. Como resultado, la administración de ATB200 y la coadministración de ATB200/miglustat fue más eficaz que la alglucosidasa alfa para corregir algunas de las patologías relevantes para la enfermedad, tales como la acumulación de glucógeno, la proliferación lisosómica y la formación de zonas autofágicas. Debido a estos efectos terapéuticos positivos, se ha demostrado que la coadministración de ATB200 y ATB200/miglustat mejora las posibilidades de recuperación de las fibras musculares desde el daño e incluso revertir el daño al eliminar el glucógeno que se había acumulado en la célula debido a la falta de actividad de GAA óptima. Al igual que en el Ejemplo 6, estos datos también concuerdan con las mejoras a nivel celular demostradas en pacientes humanos con enfermedad de Pompe que conducen tanto a un tratamiento eficaz de la enfermedad de Pompe como a la inversión de la progresión de la enfermedad después de la administración de ATB200 y miglustat. Los datos clínicos en pacientes humanos con enfermedad de Pompe se resumen en los Ejemplos 8 y 9, a continuación.

Ejemplo 8: El ensayo ATB200-02

Se realizó un estudio clínico de fase 1/2 (ATB200-02, NCT-02675465) abierto, de secuencia fija y dosis ascendente para evaluar la seguridad, tolerabilidad, farmacocinética, farmacodinámica y eficacia provisional de la infusión IV de ATB200 con miglustat en sujetos adultos con enfermedad de Pompe. Los datos se comunicaron en la Publicación internacional N.º WO 2020/163480, cuya divulgación se incorpora en el presente documento por referencia.

Ejemplo 9: El ensayo ATB200-03: un estudio de fase 3 en seres humanos de ATB200/miglustat en pacientes con enfermedad de Pompe

El ensayo ATB200-03 fue un estudio de fase 3, con doble ocultación, aleatorizado, multicéntrico e internacional de ATB200/miglustat en sujetos adultos con enfermedad de Pompe de inicio tardío (LOPD) que habían recibido terapia de reemplazo enzimático con alglucosidasa alfa (es decir, con

experiencia con ERT) o que nunca habían recibido ERT (es decir, sin tratamiento previo con ERT), en comparación con alglucosidasa alfa/placebo.

Diseño del estudio

Como se muestra en la Fig. 21, el ensayo consistió en un período de cribado de hasta 30 días, un período de tratamiento de 12 meses y un período de seguimiento de seguridad de 30 días. Los sujetos elegibles se asignaron aleatoriamente en una relación de 2:1 para recibir ATB200/miglustat o alglucosidasa alfa/placebo y se estratificaron por estado de ERT (con experiencia con ERT, sin tratamiento previo con ERT) y distancia caminada en 6 minutos basal (6MWD) (75 a < 150 metros, 150 a < 400 metros, ≥ 400 metros).

Las evaluaciones de eficacia (es decir, las evaluaciones funcionales) incluyeron la evaluación de la función ambulatoria (6MWT), ensayos de la función motora (ensayo de Marcha, Escaleras, Gower y Maniobra de Silla [GSGC] y ensayo *Timed Up and Go* [TUG]), ensayos de fuerza muscular (ensayos musculares manuales y ensayos musculares cuantitativos) y ensayos de la función pulmonar (FVC, SVC, MIP, MEP y SNIP). Se registraron los resultados informados por los pacientes (Escala de Actividad Específica de Pompe (R Pact) construida por Rasch, Instrumento EuroQol 5 Dimensiones 5 Niveles (EQ-5D-5L), instrumentos del Sistema de Información de Medición de resultados informados por los Pacientes (PROMIS®) para función física, fatiga, disnea y extremidades superiores e Impresión Global del Cambio del Sujeto). También se realizó la Impresión Global de Cambio del Médico.

Las evaluaciones farmacodinámicas incluyeron la medición de biomarcadores de lesión muscular (creatina cinasa [CK]) y sustrato de la enfermedad (tetrasacárido de hexosa en orina (Hex4)). Se recogieron muestras de sangre dispersas para determinar los niveles de proteína GAA total y las concentraciones de miglustat en plasma para un análisis PK poblacional en sujetos con experiencia con ERT. Se realizaron muestreos de sangre en serie para la caracterización del perfil PK de la proteína GAA total y miglustat en sujetos sin tratamiento previo con ERT.

Las evaluaciones de seguridad incluyeron controlar los acontecimientos adversos (AE), incluyendo reacciones asociadas a la infusión (IAR), ensayos de

laboratorio clínico (química, hematología y análisis de orina), constantes vitales, exámenes físicos incluyendo peso, electrocardiogramas (ECG) e inmunogenicidad. También se registraron los medicamentos simultáneos y las terapias no farmacológicas.

5 Selección de sujetos

Los sujetos que participaron en el estudio cumplían todos los siguientes criterios de inclusión y ninguno de los criterios de exclusión. En total, participaron 122 sujetos en el ensayo ATB200-03. Entre ellos, 85 sujetos (con experiencia con ERT: 65; sin tratamiento previo con ERT: 20) recibieron el tratamiento con ATB200/miglustat, y 37 sujetos (con experiencia con ERT: 30; sin tratamiento previo con ERT: 7) recibieron el tratamiento con alglucosidasa alfa/placebo. Como se muestra en la Fig. 22, los datos basales de 6MWD y FVC fueron representativos de la población y, en general, similares en los dos brazos de tratamiento.

15 Criterios de inclusión:

1. El sujeto firmó un consentimiento informado antes de que se realizara cualquier procedimiento relacionado con el estudio.
2. Los sujetos hombres y mujeres tenían ≥ 18 años y pesaban ≥ 40 kg en el momento del cribado.
- 20 3. Las mujeres en edad fértil y los hombres aceptaron usar métodos anticonceptivos médicamente aceptados durante el estudio y 90 días después de la última dosis del fármaco de estudio.
4. El sujeto tiene un diagnóstico de LOPD basado en la documentación de uno de los siguientes:
 - 25 a. deficiencia de la enzima GAA
 - b. Genotipado de GAA
5. El sujeto se clasificó como uno de los siguientes con respecto al estado de ERT:
 - 30 a. Con experiencia con ERT, se define como que han recibido ERT de referencia (alglucosidasa alfa) a la dosis y la pauta recomendadas (es decir, dosis de 20 mg/kg cada 2 semanas) durante ≥ 24 meses

Específicamente para Australia, con experiencia con ERT, se define como que han recibido ERT de referencia (alglucosidasa alfa) a la dosis y la pauta recomendadas, a una dosis de 20 mg/kg basada en el peso corporal magro o ideal cada 2 semanas

- 5 b. Sin tratamiento previo con ERT, se define como que nunca han recibido un tratamiento con ERT en investigación o disponible en el mercado
6. El sujeto tenía una FVC en sedestación ≥ 30 % del valor predicho para adultos sanos (National Health and Nutrition Examination Survey III) en el momento del cribado.
- 10 7. El sujeto realizó dos 6MWT en el momento del cribado que fueron válidas, según lo determinó el evaluador clínico, y que cumplieron todos los siguientes criterios:
 - a. ambos valores de cribado de 6MWD fueron ≥ 75 metros
 - 15 b. ambos valores de cribado de 6MWD fueron ≤ 90 % del valor predicho para adultos sanos
 - c. el valor inferior de 6MWD estaba dentro del 20 % del valor superior de 6MWD
- Criterios de exclusión:
- 20 1. El sujeto había recibido cualquier terapia en investigación o tratamiento farmacológico para la enfermedad de Pompe, distinto de la alglucosidasa alfa, en los 30 días o 5 semividas de la terapia o tratamiento, lo que fuera más largo, antes del Día 1 o se preveía que lo hiciera durante el estudio.
2. El sujeto había recibido terapia génica para la enfermedad de Pompe.
- 25 3. El sujeto estaba tomando cualquiera de los siguientes medicamentos prohibidos en los 30 días anteriores al Día 1:
 - miglitol
 - miglustat
 - acarbosa
 - 30 • voglibosa
4. El sujeto requirió el uso de apoyo ventilatorio invasivo o no invasivo durante > 6 horas al día mientras estaba despierto.

5. El sujeto tenía una hipersensibilidad a cualquiera de los excipientes de ATB200, alglucosidasa alfa o miglustat.
6. El sujeto tenía una enfermedad o cualquier otra circunstancia atenuante que, en opinión del investigador o del monitor médico, suponía un riesgo indebido para la seguridad del sujeto o comprometía su capacidad para cumplir los requisitos del protocolo o repercutía negativamente en ellos. Esto incluía la depresión clínica (diagnosticada por un psiquiatra u otro profesional de la salud mental) con síntomas no controlados o mal controlados.
7. El sujeto, que si es mujer, estaba embarazada o en período de lactancia en el momento del cribado.
8. El sujeto, tanto hombre como mujer, estaba planificando concebir un hijo durante el estudio.
9. El sujeto se negó a someterse a ensayos genéticos.

Producto en investigación, dosis y modo de administración

Los sujetos se aleatorizaron con una relación de aleatorización de al menos 2:1 para recibir ATB200/miglustat o alglucosidasa alfa/placebo. La Tabla 13 a continuación resume el tratamiento de los sujetos inscritos.

Tabla 13. Asignación y pauta de tratamiento

Asignación de tratamiento	Tratamiento	Pauta
ATB200/miglustat	miglustat ^a	Sujetos ≥ 50 kg: 260 mg (4 × cápsulas orales de 65 mg) 1 hora antes de la infusión de ATB200 cada 2 semanas Sujetos de ≥ 40 kg a < 50 kg: 195 mg (3 × cápsulas orales de 65 mg) 1 hora antes de la infusión de ATB200 cada 2 semanas
	ATB200	Infusión IV de 20 mg/kg durante 4 horas cada 2 semanas

10

15

^a Nota: Los sujetos debían ayunar al menos 2 horas antes y 2 horas después de la administración de miglustat o placebo.

Evaluación de datos y consideraciones estadísticas

20

25

- 30

- cambio con respecto al valor basal hasta la Semana 52 en la puntuación total para el PROMIS – función física
 - cambio con respecto al valor basal hasta la Semana 52 en la puntuación total para el PROMIS – fatiga
 - 5 • cambio con respecto al valor basal hasta la Semana 52 en la puntuación total de GSGC
- Otros criterios de valoración de eficacia secundarios fueron los siguientes:
- cambio con respecto al valor basal hasta la Semana 52 en las siguientes variables relacionadas con la función motora:
 - 10 – tiempo para completar la caminata de 10 metros (es decir, evaluación de la marcha) del ensayo de GSGC
 - tiempo para completar la subida de 4 escalones del ensayo de GSGC
 - 15 – tiempo para completar la maniobra de Gower del ensayo de GSGC
 - tiempo para levantarse de una silla como parte del ensayo de GSGC
 - tiempo para completar el ensayo de TUG
 - cambio con respecto al valor basal hasta la Semana 52 en las siguientes variables relacionadas con la fuerza muscular:
 - 20 – puntuación del ensayo muscular manual para las extremidades superiores
 - puntuación total del ensayo muscular manual
 - valor cuantitativo del ensayo muscular (kg) para las extremidades superiores
 - 25 – valor cuantitativo del ensayo muscular (kg) para las extremidades inferiores
 - valor total del ensayo muscular cuantitativo (kg)
 - cambio con respecto al valor basal hasta la Semana 52 en las siguientes variables de las mediciones de los resultados informados por los pacientes:
 - 30 – puntuación total para el PROMIS - disnea

- puntuación total para el PROMIS - extremidad superior
 - puntuación total de la escala R-PAct
 - estado de salud EQ-5D-5L
- 5
- valor real del estado funcional del sujeto (mejora, estable o declive) en relación con los efectos del fármaco de estudio en las siguientes áreas de la vida en la Semana 52, medido por la Impresión Global de Cambio del Sujeto
- 10
- bienestar físico global
 - esfuerzo respiratorio
 - fuerza muscular
 - función muscular
 - capacidad de movimiento
 - actividades de la vida diaria
- 15
- nivel de energía
 - nivel de dolor muscular
- valor real del estado funcional del sujeto (mejora, estable o declive) en la Semana 52, medido por la Impresión Global de Cambio del Médico
 - cambio con respecto al valor basal hasta la Semana 52 en las siguientes mediciones de la función pulmonar, como se indica a continuación:
- 20
- FVC en sedestación (% predicho)
 - MIP (cmH₂O)
 - PIM (% predicho)
- 25
- MEP (cmH₂O)
 - MEP (% predicho)
 - SNIP (cmH₂O)
- Los criterios de valoración farmacodinámicos fueron los siguientes:
- 30
- cambio con respecto al valor basal hasta la Semana 52 en el nivel sérico de CK
 - cambio con respecto al valor basal hasta la Semana 52 en el nivel de Hex4 en orina

Para los sujetos con experiencia con ERT, se recogieron los criterios de valoración farmacocinéticos de un análisis PK poblacional del nivel de proteína GAA total y de la concentración de miglustat. Se calcularon los parámetros PK para la concentración plasmática total de proteína GAA y miglustat en los sujetos sin tratamiento previo con ERT.

El perfil de seguridad de ATB200/miglustat se caracterizó usando la incidencia de acontecimientos adversos emergentes del tratamiento (TEAE), acontecimientos adversos graves (SAE) y acontecimientos adversos que provocaron la interrupción del fármaco de estudio, la frecuencia y gravedad de las IAR inmediatas y tardías, y cualquier anomalía observada en otras evaluaciones de seguridad. También se evaluó la repercusión de la inmunogenicidad contra ATB200 y alglucosidasa alfa sobre la seguridad y la eficacia.

Los métodos estadísticos incluyeron las siguientes consideraciones sobre la aleatorización de muestras, el cálculo de tamaño de muestra, los análisis de eficacia y los análisis de seguridad.

Aleatorización. Se identificaron los dos factores siguientes como variables de estratificación del diseño: 1. 6MWD basal (de 75 a < 150 metros, de 150 a < 400 metros, $\geq$ 400 metros); y 2. Estado de ERT (con experiencia con ERT, sin tratamiento previo con ERT). Estos dos factores formaban seis combinaciones factoriales (es decir, niveles, estratos). Se usó un procedimiento centralizado de aleatorización en bloques para equilibrar los factores de riesgo mencionados, 1) reducir el sesgo y aumentar la precisión de la inferencia estadística, y 2) permitir diversos análisis de subconjuntos planificados y no planificados. El esquema de aleatorización por bloques se realizó para cada uno de los 6 estratos. La relación de aleatorización es de 2:1 entre ATB200/miglustat y alglucosidasa alfa/placebo, fija.

Cálculo del tamaño de muestra. Se determinó que un ensayo t de 2 grupos con un nivel de significación bilateral de 0.05 y un esquema de aleatorización 2:1 (66 sujetos en el grupo de ATB200/miglustat y 33 sujetos en el grupo alglucosidasa alfa/placebo, para un tamaño de muestra total de 99 sujetos) tenía aproximadamente un 90 % de potencia para detectar un tamaño de efecto

estandarizado de 0.7 entre los 2 grupos en un ensayo de superioridad. Este cálculo se ha realizado usando Nquery 8©®. Suponiendo una tasa de abandono del 10 %, el tamaño de la muestra sería de aproximadamente 110 sujetos.

5 Análisis de eficacia. El criterio de valoración primario de eficacia (es decir, el cambio con respecto al valor basal hasta la Semana 52 en 6MWD) se analizó usando un modelo paramétrico de análisis de covarianza (ANCOVA) para comparar entre el nuevo tratamiento y el control. Este modelo normalmente se ajustaría para la 6MWD basal (como una covariable continua) y los 2 factores utilizados para estratificar la aleatorización: Estado de ERT (sin tratamiento
10 previo con ERT frente con experiencia con ERT) y 6MWD basal (de 75 a < 150 metros, de 150 a < 400 metros, $\geq$ 400 metros). Sin embargo, la 6MWD basal no pudo utilizarse dos veces en el modelo (como variable continua y como variable categórica) debido a la alta correlación biserial puntual esperada entre ellas. Por lo tanto, la variable continua de 6MWD permaneció en el modelo, pero se eliminó
15 la 6MWD categórica. Después, el modelo ANCOVA tenía términos para el tratamiento, la 6MWD basal (continua) y el estado de ERT (categórico).

Adicionalmente, se examinaron las potenciales interacciones tratamiento-covariable (es decir, tratamiento por estado de ERT y tratamiento por 6MWD basal continua). Si un término de interacción era estadísticamente significativo
20 (por ejemplo, $p < 0.10$, bilateral), y había una interpretación biológica lógica, entonces el término de interacción podría añadirse potencialmente en el modelo ANCOVA final que se usaría para el análisis del criterio de valoración primario. Después, se analizaron los datos basándose en el modelo ANCOVA y se proporcionaron todas las estimaciones pertinentes (por ejemplo, las medias de
25 MC para cada grupo de tratamiento, la diferencia de medias de MC, los intervalos de confianza (IC) del 95 % para la diferencia de medias de MC y el valor de p para la comparación entre los 2 grupos de tratamiento).

Para respaldar la interpretación del beneficio clínico, se definió una respuesta compuesta a nivel de sujeto basada en la totalidad de los datos de
30 resultados de tratamiento. Los sujetos se clasificaron mediante una variable de respuesta ordinal que consistía en una mejora significativa, una mejora

moderada o una mejora minoritaria/nula basándose en los resultados del tratamiento.

Los criterios de valoración secundarios clave se analizaron de acuerdo con el orden jerárquico, usando el procedimiento de ensayos cerrados por etapas para controlar la tasa de error de tipo I. Los criterios de valoración secundarios clave y otros criterios de valoración secundarios se analizaron por separado con un método similar utilizado para el análisis de criterios de valoración primarios.

Análisis de seguridad. Los datos de seguridad se resumieron usando recuentos y porcentajes para los datos categóricos y estadísticas descriptivas (media, desviación estándar, mediana, mínimo, máximo) para los datos continuos.

- Resultados de eficacia del ensayo ATB200-03

En la población global, el tratamiento con ATB200/miglustat mostró una mejora en la 6MWD y una estabilización en el porcentaje predicho de FVC, con respecto al valor basal en la semana 52 (Fig. 23A) y a lo largo del tiempo (Fig. 23B). En comparación con alglucosidasa alfa/placebo, el tratamiento con ATB200/miglustat mostró una mejora superior en la 6MWD en la población global en la semana 52 (Fig. 23A). Además, como se muestra en la Fig. 23A, el tratamiento con ATB200/miglustat mostró una mejora clínicamente significativa en el porcentaje predicho de FVC en la población global en la semana 52, en comparación con alglucosidasa alfa/placebo.

En la población con experiencia con ERT, el tratamiento con ATB200/miglustat mostró una mejora en la 6MWD y una estabilización en el porcentaje predicho de FVC, con respecto al valor basal en la semana 52 (Fig. 24). En comparación con alglucosidasa alfa/placebo, el tratamiento con ATB200/miglustat mostró mejoras a lo largo del tiempo en la 6MWD y estabilización a lo largo del tiempo en el porcentaje predicho de FVC en la población con experiencia con ERT (Fig. 25). Además, como se muestra en la Fig. 24, el tratamiento con ATB200/miglustat mostró una mejora clínicamente significativa tanto en la 6MWD como del porcentaje predicho de FVC en la población con experiencia con ERT en la semana 52, en comparación con alglucosidasa alfa/placebo.

Como se muestra en las Fig. 26A y 26B, en la población más pequeña sin tratamiento previo con ERT (n=27), el tratamiento con ATB200/miglustat mostró una mejora en la 6MWD y una estabilización del porcentaje predicho de FVC, con respecto al valor basal en la semana 52 (Fig. 26A) y a lo largo del tiempo (Fig. 26B). La variabilidad entre los dos grupos de tratamiento fue mayor y no se observó ninguna mejora clínicamente significativa en la 6MWD ni del porcentaje predicho de FVC (Fig. 26A).

Como se muestra en la Fig. 28, en la población global con experiencia con ERT, el menor MMT favoreció numéricamente el tratamiento con ATB200/miglustat, en comparación con alglucosidasa alfa/placebo.

El cambio medio (DE) en la puntuación de extremidades inferiores de MMT con respecto al valor basal hasta la Semana 52 mostró una mejora numérica de 1.6 (3.78) en los sujetos tratados con la coadministración de cipaglucosidasa alfa y miglustat en comparación con 0.9 (2.58) en aquellos tratados con alglucosidasa alfa y placebo (p=0.191).

Como se muestra en la Fig. 29, en las poblaciones global y con experiencia con ERT, el tratamiento con ATB200/miglustat mostró una mejora clínicamente significativa en GSGC en la semana 52, en comparación con alglucosidasa alfa/placebo.

El cambio medio en la puntuación de GSGC total con respecto al valor basal hasta la Semana 52 mostró una mejora de -0.53 (2.5) en los sujetos tratados con la coadministración de cipaglucosidasa alfa y miglustat en comparación con 0.77 (1.8) en aquellos tratados con alglucosidasa alfa y placebo (p=0.009).

Como se muestra en la Fig. 30, en las poblaciones global y con experiencia con ERT, el PROMIS de función física favoreció numéricamente el tratamiento con ATB200/miglustat, en comparación con alglucosidasa alfa/placebo.

Como se muestra en la Fig. 31, en la población global y con experiencia con ERT, el PROMIS de fatiga mejoró de forma similar entre los dos grupos de tratamiento.

Resultados de biomarcadores del ensayo ATB200-03

En la población global y con experiencia con ERT, el tratamiento con ATB200/miglustat mostró una mejora de los biomarcadores del daño muscular (CK) y del sustrato de la enfermedad (Hex4) a lo largo del tiempo (Fig. 32 y 33). Además, como se muestra en las Fig. 32 y 33, en las poblaciones global y con experiencia con ERT, las reducciones en CK y Hex4 en orina fueron significativamente mayores con el tratamiento con ATB200/miglustat en la semana 52, en comparación con alglucosidasa alfa/placebo.

En los pacientes con experiencia con ERT, la concentración de Glc4 urinaria media basal fue de 4.6 mmol/mol y 7.2 mmol/mol en el tratamiento con ATB200/miglustat y alglucosidasa alfa con placebo, respectivamente. En la Semana 52, la concentración de Glc4 urinaria media fue de 2.9 mmol/mol y 9.1 mmol/mol en el grupo de tratamiento con ATB200/miglustat y alglucosidasa alfa con placebo, respectivamente.

Como se resume en la Fig. 34, en las poblaciones global y con experiencia con ERT, los criterios de valoración de la función motora, la función pulmonar, la fuerza muscular, los resultados informados por los pacientes (PRO) y los biomarcadores favorecieron sistemáticamente al tratamiento con ATB200/miglustat frente a alglucosidasa alfa/placebo. Además, de los 17 criterios de valoración de eficacia y biomarcadores evaluados, 16 favorecieron al tratamiento con ATB200/miglustat frente a alglucosidasa alfa/placebo.

Resultados de seguridad del ensayo ATB200-03

Como se muestra en la Fig. 35, el perfil de seguridad global del grupo de tratamiento con ATB200/miglustat fue similar al del grupo de alglucosidasa alfa/placebo.

Las Fig. 36 – Fig. 40 describen aspectos adicionales del Ensayo ATB200-03.

Ejemplo 10: Resultados de los ensayos clínicos de fase 3 PROPEL

AT-GAA mostró mejoras clínicamente significativas tanto en medidas musculoesqueléticas como respiratorias en la enfermedad de Pompe de inicio tardío en comparación con el tratamiento de referencia en el estudio pivotal de fase 3 PROPEL. PROPEL también se denomina "ATB200-03", véase el Ejemplo 9.

Los pacientes que cambiaron a AT-GAA desde la ERT de referencia aprobada (alglucosidasa alfa) caminaron en promedio 17 metros más ($p=0.046$).

Los pacientes que cambiaron a AT-GAA también mostraron una mejora del porcentaje predicho de capacidad vital forzada (FVC), la medida más importante de la función respiratoria en la enfermedad de Pompe, en comparación con un declive en los pacientes tratados con alglucosidasa alfa (Dif. de FVC 4.1 %; $p=0.006$).

AT-GAA mostró una diferencia nominalmente significativa desde el punto de vista estadístico y clínicamente significativa de superioridad en el primer criterio de valoración secundario clave de la FVC en comparación con los pacientes tratados con alglucosidasa alfa (Dif. de FVC 3.0 %; $p=0.023$).

En la población de estudio combinada de pacientes con cambio de ERT y sin tratamiento previo con ERT, AT-GAA superó a alglucosidasa alfa en 14 metros (21 m frente a 7 m) en el criterio de valoración primario y no fue estadísticamente significativa para la superioridad ($p=0.072$).

Las mejoras en los dos biomarcadores importantes de la enfermedad de Pompe (Hex-4 y CK) para la población de estudio combinada favorecieron significativamente a la AT-GAA en comparación con la alglucosidasa alfa ($p<0.001$).

PROPEL fue un estudio global aleatorizado, con doble ocultación, de 52 semanas de duración diseñado para evaluar la eficacia, seguridad y tolerabilidad de AT-GAA en comparación con el tratamiento de referencia actual, la alglucosidasa alfa, una terapia de reemplazo enzimático (ERT). En el estudio participaron 123 pacientes adultos con enfermedad de Pompe que aún tenían capacidad para caminar y respirar sin ventilación mecánica, y se realizó en 62 centros clínicos de 24 países de los 5 continentes. Fue el mayor estudio clínico controlado jamás realizado sobre un trastorno lisosómico.

Los pacientes incluidos en PROPEL se asignaron aleatoriamente 2:1, de manera que por cada dos pacientes asignados aleatoriamente para ser tratados con AT-GAA, uno fue asignado aleatoriamente para ser tratado con alglucosidasa alfa. De los pacientes con enfermedad de Pompe inscritos en PROPEL, el 77 % estaba en tratamiento con alglucosidasa alfa ($n=95$).

inmediatamente antes de la inscripción y el 23 % nunca había sido tratado con ninguna ERT (n=28). 117 pacientes completaron el estudio PROPEL y los 117 se han inscrito voluntariamente en el estudio de extensión a largo plazo y ahora están siendo tratados únicamente con AT-GAA para su enfermedad de Pompe.

5 **Análisis preespecificados de la distancia caminada en 6 minutos (6MWD) y del porcentaje predicho de capacidad vital forzada (FVC) en la población de estudio combinada de cambio de ERT y sin tratamiento previo con ERT:**

10 El criterio de valoración principal del estudio fue el cambio medio en la distancia caminada en 6 minutos en comparación con las mediciones basales a las 52 semanas en las poblaciones de estudio combinadas de pacientes con cambio de ERT y sin tratamiento previo con ERT. En esta población combinada, los pacientes que tomaron AT-GAA (n=85) caminaron en promedio 21 metros más a las 52 semanas en comparación con los 7 metros de aquellos tratados con alglucosidasa alfa (n=37) (Tabla 14). Se evaluó la superioridad de este
15 criterio de valoración primario en la población combinada y, aunque numéricamente fue superior, no se alcanzó significación estadística para la superioridad en esta población combinada para el brazo de AT-GAA en comparación con el brazo de alglucosidasa alfa (p=0.072).

20 Según la jerarquía del plan de análisis estadístico, el primer criterio de valoración secundario clave del estudio fue el cambio medio en el porcentaje predicho de FVC a las 52 semanas en toda la población combinada. En esta población combinada, los pacientes que tomaban AT-GAA demostraron una diferencia nominalmente significativa desde el punto de vista estadístico y
25 clínicamente significativa para la superioridad sobre aquellos tratados con alglucosidasa alfa. AT-GAA ralentizó significativamente la velocidad de declive respiratorio de los pacientes después de 52 semanas. Los pacientes tratados con AT-GAA mostraron un descenso absoluto del 0.9 % en el porcentaje predicho de FVC en comparación con un descenso absoluto del 4.0 % en el
30 brazo de alglucosidasa alfa (p=0.023) (Tabla 15). El porcentaje predicho de FVC es la medida más importante de la función muscular respiratoria en la enfermedad de Pompe y fue la base de la aprobación de la alglucosidasa alfa.

Tabla 14. 6MWD (m) en la población de estudio global de cambio de ERT y sin tratamiento previo con ERT

Tratamiento	Referencia	CFBL en la semana 52	Diferencia	Valor de P
AT-GAA (n=85)	357.9 (111.8)	+20.8 (4.6)	+13.6 (8.3)	p=0.072
Alglucosidasa alfa (n=37)	351.0 (121.3)	+7.2 (6.6)		

Tabla 15. FVC (% predicho) en la población de estudio global con cambio de ERT y sin tratamiento previo con ERT

Tratamiento	Referencia	CFBL en la semana 52	Diferencia	Valor de P
AT-GAA (n=85)	70.7 (19.6)	-0.9 (0.7)	+3.0 (1.2)	p=0.023
Alglucosidasa alfa (n=37)	69.7 (21.5)	-4.0 (0.8)		

Análisis preespecificados de la distancia caminada en 6 minutos (6MWD) y del porcentaje predicho de capacidad vital forzada (FVC) en la población de estudio de cambio de ERT (n=95):

Los pacientes con cambio de PROPEL entraron en el estudio habiendo sido tratados con alglucosidasa alfa durante un mínimo de dos años. Más de dos tercios (67 %+) de esos pacientes habían estado en tratamiento con ERT durante más de cinco años antes de entrar en el estudio PROPEL (media de 7.4 años).

Un análisis preespecificado de los pacientes que cambiaron desde alfa a alglucosidasa sobre la distancia caminada en 6 minutos mostró que después de 52 semanas desde el cambio, los pacientes tratados con AT-GAA (n=65) caminaron 16.9 metros más que su valor basal, en comparación con 0.0 metros para los pacientes que se aleatorizaron para permanecer con alfa a alglucosidasa (n=30) (p=0.046) (Tabla 16).

Un análisis preespecificado de los pacientes que cambiaron desde alfa a alglucosidasa sobre el porcentaje predicho de FVC mostró que los pacientes tratados con AT-GAA estabilizaron y mejoraron ligeramente su función

respiratoria en esta importante medida, mientras que los pacientes que permanecieron con alfa a alglucosidasa siguieron experimentando un declive significativo de la función muscular respiratoria. Los pacientes con AT-GAA mostraron un aumento absoluto del 0.1 % en el porcentaje predicho de FVC, mientras que los pacientes con alglucosidasa alfa mostraron un descenso absoluto del 4.0 % a lo largo del año ($p=0.006$) (Tabla 17).

Tabla 16. 6MWD (m) en la población de estudio de cambio de ERT

Tratamiento	Referencia	CFBL en la semana 52	Diferencia	Valor de P
AT-GAA (n=65)	346.9 (110.2)	+16.9 (5.0)	+16.9 (8.8)	p=0.046
Alglucosidasa alfa (n=30)	334.6 (114.0)	0.0 (7.2)		

Tabla 17. FVC (% predicho) en la población de estudio de cambio de ERT

Tratamiento	Referencia	CFBL en la semana 52	Diferencia	Valor de P
AT-GAA (n=65)	67.9 (19.1)	+0.1 (0.7)	+4.1 (1.2)	p=0.006
Alglucosidasa alfa (n=30)	67.5 (21.0)	-4.0 (0.9)		

Análisis preespecificados de la distancia caminada en 6 minutos (6MWD) y del porcentaje predicho de capacidad vital forzada (FVC) en la población sin tratamiento previo con ERT (n=28):

Un análisis preespecificado de los pacientes no tratados previamente con ninguna ERT sobre la distancia caminada en 6 minutos mostró que después de 52 semanas los pacientes tratados con AT-GAA (n=20) caminaban 33 metros más que su valor basal. Los pacientes tratados con alglucosidasa alfa (n=7) caminaron 38 metros más que su valor basal. La diferencia entre los dos grupos no fue estadísticamente significativa ($p=0.60$) (Tabla 18).

Un análisis preespecificado de los pacientes nunca tratados previamente con ninguna ERT mostró descensos similares en el porcentaje predicho de capacidad vital forzada (FVC) a las 52 semanas de -4.1 % para los pacientes

tratados con AT-GAA y de -3.6 % para los tratados con alglucosidasa alfa (Tabla 19). La diferencia entre los dos grupos no fue estadísticamente significativa ($p=0.57$).

Tabla 18. 6MWD (m) en la población sin tratamiento previo con ERT

5	Tratamiento	Referencia	CFBL en la semana 52	Diferencia	Valor de P
	AT-GAA (n=20)	393.6 (112.4)	+33.4 (10.9)	-4.9 (19.7)	p=0.60
10	Alglucosidasa alfa (n=7)	420.9 (135.7)	+38.3 (11.1)		

Tabla 19. FVC (% predicho) en la población sin tratamiento previo con ERT

	Tratamiento	Referencia	CFBL en la semana 52	Diferencia	Valor de P
	AT-GAA (n=20)	80.2 (18.7)	-4.1 (1.5)	-0.5 (2.7)	p=0.57
15	Alglucosidasa alfa (n=7)	79.1 (22.6)	-3.6 (1.8)		

Nota: Un paciente del brazo de alglucosidasa alfa se excluyó del análisis del estudio debido al uso de un esteroide anabólico similar en investigación que afectó a su rendimiento basal.

20 **Análisis preespecificados de otros criterios de valoración de biomarcadores y secundarios clave en la población de estudio global de cambio de ERT y sin tratamiento previo con ERT:**

Criterios de valoración secundarios clave musculoesqueléticos y otros:

25 **SGC (Marcha, Escalera, Gower, Silla):** GSGC es un criterio de valoración importante y comúnmente utilizado en la enfermedad de Pompe para medir la fuerza, la coordinación y la movilidad. Los pacientes tratados con AT-GAA demostraron mejoras estadísticamente significativas en las puntuaciones de esta importante evaluación, en comparación con un empeoramiento para los
30 pacientes tratados con alglucosidasa alfa en la población global ($p<0.05$).

MMT inferior (Ensayo muscular manual), PROMIS de Función física:
En ambas de estas medidas validadas de la fuerza muscular y los resultados

informados por los pacientes, los pacientes tratados con AT-GAA mejoraron numéricamente más que los tratados con alglucosidasa alfa, aunque los resultados no fueron estadísticamente significativos.

PROMIS de Fatiga: La fatiga medida con esta escala favoreció ligeramente a los pacientes tratados con AT-GAA frente a los tratados con alglucosidasa alfa.

Biomarcadores de los efectos del tratamiento sobre la enfermedad:

Hex-4 en orina: En el caso de la población de estudio combinada de pacientes con cambio de ERT y pacientes sin tratamiento previo con a ERT, los pacientes que recibieron AT-GAA mostraron mejoras sustanciales en este biomarcador, con una reducción media de Hex-4 del - 31.5 % después de 52 semanas en comparación con un aumento del +11.0 % (es decir, empeoramiento) en Hex-4 en los pacientes tratados con alglucosidasa alfa ($p < 0.001$). Hex-4 en orina es un biomarcador común en la enfermedad de Pompe y se usa como medida indirecta del grado de aclaramiento del glucógeno esquelético en pacientes con enfermedad de Pompe que reciben ERT. El glucógeno es el sustrato que se acumula en los lisosomas de los músculos de los pacientes con enfermedad de Pompe.

CK (Creatina cinasa): Después de 52 semanas, los pacientes tratados con AT-GAA también mostraron mejoras sustanciales en este biomarcador, con una reducción media del -22.4 % en la CK en comparación con un aumento (es decir, empeoramiento) del +15.6 % en los pacientes tratados con alglucosidasa alfa. ($p < 0.001$). La CK es una enzima que se escapa de las células musculares dañadas y está elevada en los pacientes con enfermedad de Pompe.

La AT-GAA demostró un perfil de seguridad similar al de la alglucosidasa alfa. Dos pacientes que recibieron AT-GAA (2.4 %) interrumpieron el tratamiento debido a un acontecimiento adverso, en comparación con uno (2.6 %) para la alglucosidasa alfa no relacionado con el tratamiento. Se notificaron reacciones asociadas a la inyección (IAR) en el 25 % de los participantes con AT-GAA y en el 26 % de los pacientes con alglucosidasa alfa.

Análisis de subgrupos *a posteriori*:

Categorías de 6MWD y FVC basales: Población sin tratamiento previo con ERT (n=27): tres pacientes tenían una 6MWD basal de <300 m y tres tenían una FVC basal de <55 %; no se realizaron análisis de CFBL en estos subgrupos debido al reducido número de pacientes. 6MWD basal ≥ 300 m: tanto el grupo de cipaglicosidasa alfa/miglustat (AT-GAA) (n=18) como el de alglucosidasa alfa/placebo (n=6) tuvieron mejoras similares a lo largo del tiempo (CFBL medio [EE] hasta la semana 52: +34.4 [12.1] m y +30.8 [9.6] m, respectivamente). FVC basal ≥ 55 %: tanto el grupo de cipaglicosidasa alfa/miglustat (n=19) como el de alglucosidasa alfa/placebo (n=5) decayeron a lo largo del tiempo (media [EE] de FVC hasta la semana 52: -3.7 [1.5] % y -3.3 [2.6] %, respectivamente). Los resultados favorecieron de forma consistente a cipaglicosidasa alfa/miglustat en la población global y en la población con experiencia con ERT en pacientes con DM6 basal <300 m y ≥ 300 m, y FVC <55 % y ≥ 55 %, como se muestra en la Fig. 41A y la Fig. 41B.

En la población de estudio global, incluyendo los pacientes sin tratamiento previo con ERT y los pacientes con experiencia con ERT, cipaglicosidasa alfa/miglustat mostró tendencias positivas o mejoras clínicamente significativas de las funciones motoras y respiratorias en comparación con el tratamiento aprobado con ERT, independientemente de las evaluaciones basales de 6MWD y % de FVC, y en los análisis de subgrupos preespecificados y *a posteriori*.

Cipaglicosidasa alfa/miglustat demostró un perfil de seguridad similar al de alglucosidasa alfa/placebo (Fig. 42).

Acerca de AT-GAA

AT-GAA es una terapia en investigación de dos componentes que consiste en cipaglicosidasa alfa (ATB200), una enzima alfa-glucosidasa ácida humana recombinante (rhGAA) única con estructuras de hidratos de carbono optimizadas, en particular glicanos de manosa-6 fosfato bisfosforilada (bis-M6P), para potenciar la captación en las células, administrada conjuntamente con miglustat (AT2221), un estabilizador de la cipaglicosidasa alfa. En estudios preclínicos, la AT-GAA se asoció a un aumento de los niveles de la forma

lisosómica madura de GAA y una reducción de los niveles de glucógeno en el músculo, el alivio del defecto autofágico y mejoras en la fuerza muscular.

Acerca de la enfermedad de Pompe

La enfermedad de Pompe es un trastorno lisosómico hereditario provocado por la deficiencia de la enzima alfa-glucosidasa ácida (GAA). Los niveles reducidos o ausentes de GAA conducen a la acumulación de glucógeno en las células, lo que se cree que da como resultado las manifestaciones clínicas de la enfermedad de Pompe. La enfermedad puede ser debilitante y se caracteriza por una grave debilidad muscular que empeora a lo largo del tiempo. La enfermedad de Pompe abarca desde una forma infantil rápidamente mortal con importantes repercusiones en la función cardíaca hasta una forma de inicio tardío y progresión más lenta que afecta principalmente al músculo esquelético. Se calcula que la enfermedad de Pompe afecta aproximadamente a entre 5,000 y 10,000 personas en todo el mundo.

Ejemplo 11: Resultados de un estudio abierto de Fase I/II (ATB200-02)

ATB200-02 (NCT02675465) es un ensayo clínico abierto de fase I/II cuyo objetivo es evaluar la seguridad, tolerabilidad, farmacocinética, farmacodinámica y eficacia de cipaglucosidasa alfa/miglustat en adultos con enfermedad de Pompe. Cipaglucosidasa alfa/miglustat es una terapia en investigación de dos componentes para la enfermedad de Pompe de inicio tardío (LOPD) que comprende cipaglucosidasa alfa intravenosa, una rhGAA, administrada conjuntamente con miglustat oral, un estabilizador enzimático.

La FIG. 43 muestra el diseño del estudio para el estudio de Fase I/II ATB200-02. El estudio se realiza en 16 centros de 5 países. En el estudio ATB200-02 se inscribieron cuatro cohortes de pacientes con enfermedad de Pompe:

- Cohorte 1: Con experiencia con ERT, de 18-65 años, con 2-6 años de ERT previa con alglucosidasa alfa 20 mg/kg cada 2 semanas (n=11)
- Cohorte 2: Con experiencia con ERT no ambulatorios, de 18-65 años, con ≥ 2 años de ERT previa con alglucosidasa alfa 20 mg/kg cada 2 semanas (n=6)
- Cohorte 3: Sin tratamiento previo con ERT, de 18-65 años (n=6)

Cohorte 4: Con experiencia con ERT, de 18-75 años, con ≥ 7 años de ERT previa con alglucosidasa alfa 20 mg/kg cada 2 semanas (n=6)

Los pacientes ambulatorios elegibles tenían una distancia caminada en 6 minutos (6MWD) de al menos 200 m (cohortes 1 y 3) o 75 m (cohorte 4) y una
5 capacidad vital forzada (FVC) vertical del 30-80 % del valor normal predicho.

Se evaluaron a intervalos regulares el cambio con respecto al valor basal (CFBL) en 6MWD, % predicho de FVC en sedestación, ensayo muscular manual (MMT) y biomarcadores: tetrasacárido de glucosa en orina (Hex4) y creatina
10 cinasa sérica (CK). En el presente documento se proporcionan datos de hasta 36 meses de seguimiento en pacientes con experiencia con ERT y sin tratamiento previo con ERT. La FIG. 44 muestra un resumen de los criterios de valoración y cohortes informados. La FIG. 45 muestra las características basales y la disposición de los pacientes. Debido al calendario escalonado de inscripción de pacientes, el número de pacientes con datos actualmente disponibles
15 disminuye en los puntos temporales posteriores de este estudio en curso.

Los pacientes con experiencia con ERT mostraron mejoras medias duraderas con respecto al valor basal en 6MWD hasta los 48 meses. Después de 12, 24, 36 y 48 meses de seguimiento, la 6MWD mejoró numéricamente con respecto al valor basal en 13/16, 9/13, 6/12 y 6/9 pacientes con experiencia con
20 ERT, respectivamente (FIG. 46A). Los aumentos medios fueron de 33 metros (m) en el mes 12, 25 m en el mes 24, 9 m en el mes 36 y 20 m en el mes 48.

En los pacientes con experiencia con ERT, el cambio con respecto al valor basal (CFBL) en la FVC fue generalmente estable hasta los 48 meses de seguimiento. Después de 12, 24, 36 y 48 meses de seguimiento, la FVC mejoró
25 (>3 %) o se mantuvo estable (± 3 %) con respecto al valor basal en 7/16, 8/13, 4/10 y 4/6 pacientes, respectivamente (FIG. 47A). Los cambios medios fueron del -1.2 % en el mes 12, +1.0 % en el mes 24, -0.3 % en el mes 36 y +1.0 % en el mes 48.

En los pacientes con experiencia con ERT, el cambio medio en la
30 puntuación de extremidades inferiores de MMT mejoró numéricamente con respecto al valor basal y las mejoras se mantuvieron hasta los 48 meses de

seguimiento (FIG. 48A). Los aumentos medios fueron de 3.1 puntos en el mes 12, 2.1 puntos en el mes 24, 2.5 puntos en el mes 36 y 3.5 puntos en el mes 48.

Los pacientes sin tratamiento previo con ERT mostraron mejoras medias duraderas con respecto al valor basal en la 6MWD hasta los 48 meses. Después
5 de 12, 24, 36 y 48 meses de seguimiento, la 6MWD mejoró numéricamente con respecto al valor basal en 6/6, 6/6, 4/5 y 4/4 pacientes sin tratamiento previo con ERT, respectivamente (FIG. 46B). Los aumentos medios fueron de 57 m en el mes 12, 54 m en el mes 24, 43 m en el mes 36 y 52 en el mes 48.

En los pacientes sin tratamiento previo con ERT, el CFBL medio en la FVC
10 mejoró numéricamente con respecto al valor basal hasta los 48 meses de seguimiento. Después de 12, 24, 36 y 48 meses de seguimiento, la FVC mejoró ($>3\%$) o se mantuvo estable ($\pm 3\%$) con respecto al valor basal en 4/6, 5/6, 5/5 y 4/4 pacientes, respectivamente (FIG. 47B). Como se indica con el asterisco en la FIG. 47B, un paciente de la cohorte sin tratamiento previo con ERT
15 experimentó un gran descenso en el % predicho de FVC en el mes 21, que volvió a los niveles anteriores en la siguiente visita (mes 24). Los cambios medios fueron del 3.2 % en el mes 12, del 4.7 % en el mes 24, del 6.2 % en el mes 36 y del 8.3 % en el mes 48.

En los pacientes sin tratamiento previo con ERT, el cambio medio en la
20 puntuación de extremidades inferiores de MMT mejoró numéricamente con respecto al valor basal y las mejoras se mantuvieron hasta los 48 meses de seguimiento (FIG. 48B). Los aumentos medios fueron de 2.8 puntos en el mes 12, 3.0 puntos en el mes 24, 3.3 puntos en el mes 36 y 1.0 puntos en el mes 48.

Durante los 48 meses de seguimiento, la cipaglucosidasa alfa/miglustat
25 se asoció en general a reducciones medias con respecto al valor basal en Hex4 en orina, con mayores reducciones en los pacientes sin tratamiento previo con ERT. Después de 12, 24, 36 y 48 meses de seguimiento, los niveles de Hex4 disminuyeron numéricamente con respecto al valor basal en 16/16, 11/14, 11/12 y 6/9 pacientes con experiencia con ERT, y en 5/6, 5/6, 4/5 y 4/5 pacientes sin
30 tratamiento previo con ERT, respectivamente (FIG. 49A).

Durante los 48 meses de seguimiento, la cipaglucosidasa alfa/miglustat se asoció a niveles estables o a reducciones medias con respecto al valor basal

en la CK plasmática, con mayores reducciones en los pacientes sin tratamiento previo con ERT. Después de 12, 24, 36 y 48 meses de seguimiento, los niveles de CK disminuyeron numéricamente con respecto al valor basal en 13/15, 14/15, 9/11 y 8/9 pacientes con experiencia con ERT, y en 6/6, 6/6, 5/5 y 4/5 pacientes sin tratamiento previo con ERT, respectivamente (FIG. 49B).

La FIG. 50 muestra un resumen de los acontecimientos adversos emergentes del tratamiento (TEAE) con fecha de inicio en o después de la primera dosis del fármaco de estudio en el estudio ATB200-02. La duración media (DE) del tratamiento fue de 37.2 (14.48), 19.9 (4.13) y 36.9 (12.14) meses en las cohortes 1 (ERT previa 2-6 años), 4 (ERT previa ≥ 7 años) y 3 (sin tratamiento previo con ERT), respectivamente. Los EAET más frecuentes incluyeron caída, nasofaringitis, artralgia, cefalea y diarrea; la mayoría de los EAET fueron de gravedad leve o moderada y no condujeron a la retirada del estudio.

Los resultados de hasta 48 meses de seguimiento en pacientes ambulatorios del estudio ATB200-02 de cipaglucosidasa alfa más miglustat indican lo siguiente. Los pacientes con experiencia con ERT tuvieron mejoras medias duraderas con respecto al valor basal en la función motora que se mantuvieron hasta los 48 meses de seguimiento, mientras que la función respiratoria se mantuvo estable y se mantuvo durante el mismo período: una mejora con respecto al declive esperado en muchos pacientes que reciben ERT a largo plazo. Los pacientes sin tratamiento previo con ERT mostraron mejoras medias duraderas con respecto al valor basal en la función motora y respiratoria que se mantuvieron hasta los 48 meses de seguimiento. Los niveles medios de dos biomarcadores, Hex4 y CK, se mantuvieron estables o disminuyeron con respecto al valor basal hasta los 48 meses de seguimiento, siendo los descensos más notables en la cohorte sin tratamiento previo con ERT. El perfil de seguridad de cipaglucosidasa alfa más miglustat fue similar al notificado para alglucosidasa alfa.

La FIG. 55 muestra un resumen de los criterios de valoración y cohortes notificado para la Cohorte 2 (pacientes con experiencia con ERT no

ambulatorios). La FIG. 56 muestra las características basales y la disposición de los pacientes para la Cohorte 2.

Para estos pacientes con experiencia con ERT no ambulatorios, el cambio con respecto al valor basal (CFBL) en la FVC mejoró numéricamente con respecto al valor basal y/o se mantuvo estable hasta los 48 meses de seguimiento (FIG. 57). Los cambios medios fueron de +2.5 % en el mes 12, +2.0 % en el mes 24, -2.0 % en el mes 36 y -1.0 % en el mes 48.

En estos pacientes con experiencia con ERT no ambulatorios, el cambio medio en la puntuación total de MMT (cuerpo superior) mejoró numéricamente con respecto al valor basal y/o se mantuvo estable hasta los 36 meses de seguimiento (FIG. 57). Los cambios medios fueron de +1.3 puntos en el mes 12, +2.0 puntos en el mes 24 y -0.8 puntos en el mes 36.

Durante 48 meses de seguimiento en estos pacientes con experiencia con ERT no ambulatorios, la cipaglucosidasa alfa/miglustat se asoció en general a reducciones medias con respecto al valor basal en Hex4 en orina y CK en plasma (FIG. 57). Después de 12, 24, 36 y 48 meses de seguimiento, los niveles de Hex4 disminuyeron numéricamente con respecto al valor basal con reducciones medias del -15.6 %, -34.1 %, -36.5 % y -4.0 %, respectivamente. Después de 12, 24, 36 y 48 meses de seguimiento, los niveles de CK en plasma disminuyeron numéricamente con respecto al valor basal con reducciones medias del -20.8 %, -25.3 %, -27 % y -23.7 %, respectivamente.

La FIG. 58 muestra un resumen de los acontecimientos adversos emergentes del tratamiento (TEAE) con fecha de inicio en o después de la primera dosis del fármaco de estudio o de la Cohorte 2 (en pacientes con experiencia con ERT no ambulatorios) en el estudio ATB200-02. La duración media (DE) del tratamiento fue de 46.3 (22.86) meses. Los EAET más frecuentes incluyeron nasofaringitis y diarrea (ambos en 3 pacientes); la mayoría de los EAET fueron de gravedad leve o moderada y no condujeron a la retirada del estudio.

Los resultados de hasta 48 meses de seguimiento en pacientes con experiencia con ERT no ambulatorios del estudio ATB200-02 de cipaglucosidasa alfa más miglustat indican lo siguiente. Estos pacientes tuvieron mejoras medias

duraderas con respecto al valor basal y/o estabilización en la función motora y la función pulmonar que se mantuvieron hasta 48 meses de seguimiento: una mejora con respecto al declive esperado en muchos pacientes que reciben ERT a largo plazo. Los niveles medios de dos biomarcadores, Hex4 y CK, se mantuvieron estables o disminuyeron con respecto al valor basal hasta los 48 meses de seguimiento. En general, la cipaglucosidasa alfa más miglustat fue bien tolerada en este grupo de pacientes.

Ejemplo 12: Efectos a largo plazo de la ERT en pacientes con enfermedad de Pompe

La FIG. 51 muestra una comparación de los efectos a largo plazo de cipaglucosidasa alfa/miglustat y avalglucosidasa alfa sobre el cambio con respecto al valor basal para la 6MWD y el porcentaje predicho de FVC (sedestación) en sujetos con experiencia con ERT. La FIG. 52 muestra una comparación de los efectos a largo plazo de cipaglucosidasa alfa/miglustat y avalglucosidasa alfa sobre el cambio con respecto al valor basal para la 6MWD y el porcentaje predicho de FVC (sedestación) en sujetos sin tratamiento previo con ERT. La comparación muestra que los pacientes con experiencia con ERT que cambian de alglucosidasa alfa a avalglucosidasa alfa siguen experimentando una pérdida progresiva de la función motora evaluada mediante 6MWD, similar a la progresión mostrada anteriormente para los pacientes que permanecen con alglucosidasa alfa a largo plazo, mientras que los pacientes que cambian de alglucosidasa alfa a cipaglucosidasa alfa/miglustat experimentan un cambio categórico que muestra ganancias progresivas en la función motora evaluada mediante 6MWD. Se observan tendencias similares para la FVC, en la que los pacientes que cambian a avalglucosidasa alfa experimentan una pérdida progresiva de la función pulmonar evaluada mediante FVC, mientras que los pacientes que cambian de alglucosidasa alfa a cipaglucosidasa alfa/miglustat experimentan una estabilidad de la función pulmonar evaluada mediante FVC.

Las FIG. 53A – FIG. 53B muestran el porcentaje predicho del ensayo de caminata de 6 minutos (6MWT) durante el tratamiento con ERT con alglucosidasa alfa. La FIG. 53B muestra los datos vueltos a representar de la FIG. 53A sólo a partir del año 2 en adelante. La FIG. 54 muestra el porcentaje

predicho de FVC durante el tratamiento con ERT con alglucosidasa alfa. Los datos del año 2 en adelante muestran el declive esperado en pacientes con experiencia con ERT que permanecen con alglucosidasa alfa.

**Ejemplo 13: Comparación de Alglucosidasa Alfa (Alglu),
5 Avalglucosidasa Alfa (Aval) y Cipaglucosidasa Alfa + Miglustat (Cipa+mig)**

A falta de ensayos directos que comparen Aval con Cipa+mig, una comparación indirecta de tratamientos (ITC, por sus siglas en inglés) es un enfoque adecuado para comprender mejor la diferenciación clínica de los tres tratamientos para la LOPD. Las agencias de evaluación de tecnologías sanitarias
10 (HTA) solicitan ampliamente las ITC como respaldo de la evaluación económica comparativa de la salud.

Se realizó una ITC que proporcionó estimaciones del efecto relativo en la población diana de interés (es decir, una población de LOPD que incluía una mezcla de sujetos sin tratamiento previo con ERT y con experiencia con ERT,
15 como en el ensayo pivotal de Fase III que comparaba Cipa+mig con Alglu [PROPEL]).

Se realizó una revisión sistemática de la bibliografía (SLR) para identificar estudios clínicos relevantes publicados de ERT en LOPD. Los resultados evaluados fueron el cambio con respecto al valor basal en la distancia caminada
20 en 6 minutos (6MWD) (m) y en la capacidad vital forzada (FVC; % predicho) en la semana 52, reconocidos por los médicos, las agencias de HTA y los pagadores como criterios de valoración clave del ensayo de LOPD. Se extrajeron de los estudios incluidos los resultados agregados sobre el cambio en la 6MWD y la FVC con respecto al valor basal a lo largo del tiempo y las características
25 basales (edad, género, etnia, duración de la ERT previa, 6MWD basal y FVC basal).

Se realizó una metarregresión en red multinivel (ML-NMR, por sus siglas en inglés), que es una extensión de los metanálisis en red (NMA, por sus siglas en inglés) convencionales que tienen en cuenta el efecto de las covariables a
30 nivel de estudio, y que puede aplicarse a cualquier red conectada con cualquier mezcla de datos a nivel de paciente (IPD, por sus siglas en inglés) individuales y datos agregados. ML-NMR es un método aceptado por el National Institute for

Health and Care Excellence (NICE) en respaldo del análisis coste-eficacia. Los resultados de los estudios de un solo brazo se emparejaron con los brazos de comparación adecuados de los estudios comparativos para permitir su inclusión en la red. Se calcularon las diferencias medias de tratamiento con intervalos de credibilidad (ICr) del 95 % asociados para los cambios en la 6MWD y la FVC con respecto al valor basal en la semana 52.

Se evaluó un escenario de caso base en el que todas las covariables se ajustaron a la población diana del ensayo PROPEL. Para estudiar la repercusión de la duración de la ERT previa sobre los efectos relativos, se varió el valor de la duración de la ERT, manteniendo los valores de las covariables restantes como en el escenario del caso base. Se realizó un análisis de sensibilidad excluyendo de la red todas las pruebas de un solo brazo emparejadas para evaluar su repercusión en los resultados.

Se aplicaron modelos ML-NMR tanto de efectos fijos (FE, por sus siglas en inglés) como de efectos aleatorios (RE, por sus siglas en inglés) y se usó el criterio de información de desviación (DIC, por sus siglas en inglés) para evaluar la bondad de ajuste de los modelos e identificar el modelo adecuado (modelo FE o RE) para los datos. Los modelos se implementaron en un marco bayesiano usando Stan con ayuda del paquete multinma de R.

El SLR identificó siete estudios clínicos cuyas características basales se muestran en la Figura 59. Estos estudios incluyen, pero sin limitación, tres ensayos clínicos aleatorizados (LOTS: Alglu frente a placebo; COMET: Aval frente a Alglu; PROPEL: Cipa+mig frente a Alglu). Cada uno de ellos comparte 6MWD y FVC como criterios de valoración primarios o secundarios clave (véanse las Figuras 60 y 61), pero difieren en sus poblaciones de ensayo (PROPEL es el único ensayo controlado aleatorizado [RCT, por sus siglas en inglés] que incluyó tanto sujetos sin tratamiento previo con ERT como sujetos con experiencia con ERT). Los resultados de eficacia de los estudios incluidos se muestran en la Figura 60.

Para ambos extremos, la red es la misma y se muestra en la Figura 61. Las pruebas de los estudios de un solo brazo LOTS OLE, NEO-1/-EXT, COMET OLE y ATB200-02 se incluyeron en la red, como se muestra en los recuadros

azules, comparando los resultados de un solo brazo con los resultados de los comparadores adecuados de los ensayos directos.

En el escenario del caso base, las covariables se ajustaron a las características basales de la población diana (es decir, el ensayo PROPEL; véase la Tabla 20), y el tiempo se fijó en 52 semanas.

Tabla 20: Ajuste de covariables del escenario del caso base

Edad (años)	% de hombres	% de blancos	Duración de la ERT (años)	6MWD (m)	FVC (% predicho)
46.95	45.08	84.43	5.744	355.8	70.42

Basándose en el DIC, se eligió un modelo de RE para la 6MWD y un modelo de FE para la FVC. Para ambos criterios de valoración (Figuras 62 y 63): Cipa+mig mostró un efecto favorable estadísticamente significativo frente a Alglu y Aval; y Cipa+mig mostró un efecto numéricamente favorable frente a placebo.

Nótese que los IC_r del 95 % de las estimaciones del efecto relativo frente a placebo son en general mucho más amplios que aquellos frente a Alglu o frente a Aval. Esto refleja la mayor incertidumbre de esas estimaciones, puesto que los datos sobre placebo sólo estaban disponibles para los sujetos sin tratamiento previo con ERT y la duración previa del tratamiento con ERT del escenario del caso base es relativamente larga (5.7 años).

En la Figura 64 (6MWD) y la Figura 65 (FVC) se muestran las estimaciones del efecto relativo para diferentes duraciones previas de ERT (duración de ERT previa = 0 años [es decir, pacientes sin tratamiento previo], 2.5 años, 5 años y 9.2 años).

Se eligieron modelos de RE tanto para la 6MWD como para la FVC basados en el DIC. Las Figuras 66 y 67 proporcionan una visión general de las estimaciones del efecto relativo con IC_r del 95 % para el escenario del caso base usando el análisis de sensibilidad y muestran:

- La inclusión de pruebas de un solo brazo emparejadas en la red para el análisis principal reduce la incertidumbre de las estimaciones de efecto relativo

- Cipa+mig: estadísticamente favorable frente a Alglu; numéricamente desfavorable frente a Aval; numéricamente favorable frente a placebo (6MWT y FVC)
- Aval: numéricamente favorable frente a Alglu y placebo (6MWT y FVC)
- 5 • Alglu: numéricamente favorable frente a placebo

En conclusión, la comparación por ML-NMR presentada en el presente documento demostró que Cipa+mig era estadísticamente significativamente favorable frente a Alglu y Aval para 6MWD y FVC en el escenario del caso base del análisis principal. Cipa+mig también fue estadísticamente más favorable que
10 Alglu y Aval en para 6MWD y FVC para diferentes duraciones de ERT, con una excepción: para FVC, Cipa+mig sólo fue numéricamente favorable frente a Aval en el contexto de ausencia de tratamiento previo con ERT.

El análisis de sensibilidad (que sólo incluye datos de RCT) demuestra que la inclusión de pruebas de un solo brazo emparejadas en la red para el análisis
15 principal reduce la incertidumbre de las estimaciones de efecto relativo. En conjunto, estos resultados apuntan a que Cipa+mig tiene potencialmente un perfil clínico diferenciado frente a las otras ERT, particularmente en el caso de personas con algún nivel de tratamiento previo con ERT. Se prevén análisis adicionales para cometer a ensayo y mejorar los hallazgos, cuando se publiquen
20 datos adicionales a más largo plazo.

Ejemplo 14: Comparación a largo plazo de Cipaglucosidasa Alfa + Miglustat (Cipa+mig) y Alglucosidasa Alfa (Alglu)

El estudio de Fase III con doble ocultación PROPEL (NCT03729362; ATB200-03) descrito en los Ejemplos 9 y 10 anteriores comparó la terapia en
25 investigación de dos componentes cipaglucosidasa alfa/miglustat (cipa/mig) con alglucosidasa alfa/placebo (alglu) en adultos con enfermedad de Pompe de inicio tardío (LOPD) durante 52 semanas. La extensión abierta en curso (OLE, por sus siglas en inglés) de PROPEL (NCT04138277; ATB200-07) evalúa la seguridad y eficacia a largo plazo de cipa/mig. Los resultados incluyen la distancia caminada
30 en 6 minutos (6MWD), la capacidad vital forzada (FVC), los niveles de creatina cinasa (CK) y hexosa tetrasacárido (Hex4) y la seguridad. Los datos se expresan como cambio con respecto al valor basal de PROPEL hasta la semana 52 de

OLE (104 semanas después del valor basal de PROPEL). En la OLE (N=119; 91 pacientes con experiencia con terapia de reemplazo enzimático [ERT] y 28 sin tratamiento previo con ERT), 82/85 (96.5 %) pacientes tratados previamente con cipa/mig continuaron con cipa/mig y 37/38 (97.4 %) cambiaron de algu a cipa/mig; el 90.8 % de los pacientes permanecieron en el estudio de OLE hasta la semana 52. El cambio medio en el % predicho de 6MWD fue de +3.1(desviación estándar 8.07) para cipa/mig-cipa/mig y -0.5(7.76) para algu-cipa/mig en pacientes con experiencia con ERT y +8.6(8.57) para cipa/mig-cipa/mig y +8.9(11.65) para algu-cipa/mig en pacientes sin tratamiento previo con ERT. El cambio medio en el % predicho de FVC fue de -0.6(7.50) para cipa/mig-cipa/mig y de -3.8(6.23) para algu-cipa/mig en pacientes con experiencia con ERT y de -4.8(6.48) y -3.1(6.66) en pacientes sin tratamiento previo con ERT. La reducción media de la CK (U/l) en los pacientes con experiencia con ERT y sin tratamiento previo con ERT fue de -132.1(215.74) y -216.9(243.66) para cipa/mig-cipa/mig y de -161.0(269.52) y -218.6(316.47) para algu-cipa/mig, respectivamente. La reducción media de Hex4 (mmol/mol) para los pacientes con experiencia con ERT y sin tratamiento previo con ERT fue de -1.9(3.22) y -2.9(2.45) para cipa/mig-cipa/mig y de -2.6(3.75) y -2.9(2.22) para algu-cipa/mig, respectivamente. Durante el PROPEL hasta la semana 52 de la OLE, se produjeron acontecimientos adversos emergentes del tratamiento en 84 (98.8 %) pacientes con cipa/mig-cipa/mig y 36 (97.3 %) pacientes con algu-cipa/mig. Tres pacientes suspendieron la OLE debido a reacciones asociadas a la infusión (urticaria, urticaria e hipotensión y anafilaxia, respectivamente). No se identificaron nuevas señales de seguridad. Los datos demuestran que el tratamiento con cipa/mig hasta 104 semanas se asoció a un efecto duradero y fue bien tolerado, lo que respalda los beneficios a largo plazo del tratamiento para pacientes con LOPD.

Ejemplo 15: Ensayo ATB200-08: Seguridad, farmacocinética, eficacia, farmacodinámica e inmunogenicidad en sujetos pediátricos con PIO

El ensayo ATB200-08 tiene como objetivo evaluar la seguridad y tolerabilidad de la coadministración de cipaglucosidasa alfa/miglustat en sujetos

con experiencia con ERT con enfermedad de Pompe de inicio infantil (IOPD) de 6 meses a < 18 años de edad y en sujetos sin tratamiento previo con ERT de 0 y < 12 meses de edad. Además, el estudio ATB200-08 tiene como objetivo:

- evaluar la eficacia de la coadministración de cipaglicosidasa alfa/miglustat en
5 sujetos con experiencia con ERT con IOPD de 6 meses a < 18 años de edad y en sujetos sin tratamiento previo con ERT con IOPD de 0 a < 12 meses de edad;
- caracterizar la farmacocinética (PK) de la cipaglicosidasa alfa y el
10 miglustat y evaluar la pauta posológica en sujetos con experiencia con ERT con IOPD de 6 meses a < 18 años de edad y en sujetos sin tratamiento previo con ERT con IOPD de 0 a < 12 meses de edad para la coadministración de cipaglicosidasa alfa/miglustat
- evaluar el efecto de la coadministración de cipaglicosidasa
15 alfa/miglustat sobre los marcadores farmacodinámicos (PD) en sujetos con experiencia con ERT con IOPD de 6 meses a < 18 años de edad y en sujetos sin tratamiento previo con ERT con IOPD de 0 a < 12 meses de edad medidos mediante tetrasacárido de hexosa (Hex4) y creatina cinasa (CK) en orina
- evaluar el efecto de los anticuerpos anti-rhGAA sobre la exposición, la
20 seguridad y la eficacia de la cipaglicosidasa alfa en sujetos con experiencia con ERT con IOPD de 6 meses a < 18 años de edad y en sujetos sin tratamiento previo con ERT con IOPD de 0 a < 12 meses de edad
- evaluar el efecto de la coadministración de cipaglicosidasa
25 alfa/miglustat sobre el crecimiento en sujetos con experiencia con ERT con IOPD de 6 meses a < 18 años de edad y en sujetos sin tratamiento previo con ERT con IOPD de 0 a < 12 meses de edad.

30 Éste es un estudio de Fase 3, abierto y multicéntrico, para evaluar la seguridad, la eficacia, la farmacocinética (PK), la farmacodinámica (PD) y la inmunogenicidad del tratamiento con cipaglicosidasa alfa/miglustat en sujetos

pediátricos con IOPD con experiencia con ERT y sin tratamiento previo con ERT. Estos sujetos se inscribirán en 1 de 2 cohortes:

- 5 • La cohorte 1 se tratará con cipaglucoasidasa alfa/miglustat semanalmente e incluirá aproximadamente 16 sujetos ambulatorios con experiencia con ERT que presentan un declive clínico (como se describe a continuación), de 6 meses a < 18 años de edad.
- 10 • La cohorte 2 será tratada con cipaglucoasidasa alfa/miglustat semanalmente e incluirá aproximadamente 16 sujetos sin tratamiento previo con ERT de 0 a < 12 meses de edad, incluyendo al menos 6 sujetos de 0 y < 6 meses.

15 Los sujetos pueden ser positivos o negativos para material inmunitario con reactividad cruzada (CRIM). Todos los sujetos negativos para CRIM recibirán, o habrán recibido, inmunoterapia antes o simultáneamente con el tratamiento. Los sujetos positivos para CRIM pueden recibir inmunoterapia de acuerdo con las normas de la institución a discreción del investigador. El investigador determinará el tipo, la dosis y la pauta de la inmunoterapia de acuerdo con las normas convencionales de la institución.

El estudio se realizará en 2 Fases:

- 20 • La Fase 1 consistirá en un período de tratamiento de 104 semanas con cipaglucoasidasa alfa/miglustat.
- La Fase 2 consistirá en un período de tratamiento de extensión a largo plazo. Esta fase durará hasta que se apruebe o hasta que el patrocinador ponga fin al estudio.

25 Las visitas de infusión se programarán cada semana durante todo el estudio. Se programarán visitas de estudio que incluirán evaluaciones de eficacia, seguridad adicional y otras evaluaciones, y podrán durar hasta 4 días. Todas las evaluaciones y procedimientos del estudio (a excepción de la recogida de muestras PK y los electrocardiogramas [ECG] posteriores a la dosis) se realizan antes de la administración del fármaco de estudio.

30 Todos los sujetos se someterán a los siguientes procedimientos de estudio/evaluaciones:

- Las evaluaciones de seguridad se realizarán durante las Fases 1 y 2 e incluirán el control de acontecimientos adversos (AE), ensayos clínicos de laboratorio (química, hematología y análisis de orina), signos vitales, exploraciones físicas, ECG de 12 derivaciones y ecocardiogramas.
- 5
- Se recogerán muestras de sangre escasas para la determinación de los niveles totales de proteína α -glucosidasa ácida humana (GAA) y las concentraciones de miglustat en plasma para un análisis PK poblacional el Día 1, la Semana 26, la Semana 52, la Semana 78 y la Semana 104 para las Cohortes 1 y 2 durante la Fase 1 de acuerdo con un calendario
- 10
- que ha de determinarse basándose en modelos y simulaciones.
 - Se recogerán muestras para la detección de anticuerpos anti- α -glucosidasa ácida humana (GAA) totales, reactivos cruzados y neutralizantes.
 - Las evaluaciones de eficacia se realizarán durante las Fases 1 y 2 e
- 15
- incluirán lo siguiente:

20

25

30

Evaluaciones de eficacia	Edad (años) en el momento de la Evaluación			
	de 0 a < 2	de 2 a < 4	de 4 a < 12	de 12 a < 18
Función motora				
5 Escala motora infantil de Alberta (AIMS)	S (desde el nacimiento hasta caminar independientemente o 18 meses)	N	N	N
Medida de la función motora gruesa-88 (GMFM-88) (puntuación total)	S (≥ 5 meses)	S	S	S
10 Ensayo de caminata de 6 minutos (6MWT) (solamente sujetos ambulatorios)	N	N	S (≥ 5 años)	S
Ensayo <i>Timed up and go</i> (TUG) (solamente sujetos ambulatorios)	N	N	S	S
Ensayo muscular manual (MMT) (los sujetos no ambulatorios realizarán ensayos de fuerza muscular para los miembros superiores solamente)	N	N	S	S
15 Uso de dispositivo de asistencia o nuevo dispositivo de asistencia para deambulación (solamente sujetos ambulatorios)	S	S	S	S

20

25

30

5	Función respiratoria			
	Ensayos de función pulmonar (FVC sentado)	N	N	S (≥ 5 años)
	Ventilación (no invasiva [CPAP/BiPAP] o invasiva; horas por día)	S	S	S
10	Independencia del ventilador (para sujetos no dependientes de ventilador solamente)	S	S	S
	Función cardíaca			
	Ecocardiograma ^a	S	S	S
	Electrocardiograma ^b	S	S	S
	Otras evaluaciones			
	Hex4 urinaria	S	S	S
	CK	S	S	S
	Supervivencia global	S	S	S
	Impresión global del Médico sobre la gravedad (PGIS)	S	S	S
	Impresión global del sujeto o cuidador sobre la gravedad (SGIS)	S por el cuidador	S por el cuidador	S por el cuidador o el sujeto
15	Función de la extremidad inferior pediátrica por Calidad de vida en trastornos neurológicos (NeuroQOL) - Movilidad	N/A	N/A	S por el cuidador o el sujeto
	Instrumento EuroQol 5 Dimensiones Juventud 5 Niveles (EQ-5D-Y-5L [de 4 a 16 años] o EQ-5D-5L [de 17 a 18 años])	N/A	N/A	S por el cuidador o el sujeto
	Medidas de crecimiento: altura/longitud, peso y circunferencia de la cabeza (≤ 2 años)	S	S	S

Abreviaturas (en todos los casos hacen referencia a sus siglas en inglés): BiPAP = presión positiva bifásica en las vías respiratorias; CK = creatinina cinasa; CPAP = presión positiva continua en las vías respiratorias; ECG = electrocardiograma; FVC = capacidad vital forzada; Hex4 = tetrasacárido de hexosa; N = no; N/A = no aplicable; S = sí

a Los parámetros ecocardiográficos que han de recogerse incluyen, pero sin limitación, el índice de masa ventricular izquierda (LVMI, por sus siglas en inglés), la fracción de eyección ventricular izquierda, el acortamiento fraccional, el diámetro interno ventricular izquierdo al final de la diástole y al final de la

sístole, el acortamiento fraccional de la pared media ventricular izquierda y el grosor de la pared ventricular izquierda. b Los parámetros ECG recogidos incluyen, pero sin limitación, la frecuencia cardíaca media ECG, el intervalo PR, la duración del QRS, el intervalo QT, el intervalo QTcB, el intervalo QTcF y el intervalo RR.

Diagnóstico y criterios principales para la inclusión:

Cohorte 1 (con experiencia con ERT, de 6 meses a < 18 años):

Criterios de inclusión

Los sujetos deben cumplir todos los siguientes criterios que han de considerarse para la inscripción en el estudio:

1. Sujetos hombres o mujeres que tienen de 6 meses a < 18 años de edad el Día 1.
2. El progenitor del sujeto o su representante legal está dispuesto y es capaz de proporcionar consentimiento informado por escrito y autorización para la participación en el estudio y para el uso y divulgación de información médica personal o información médica relacionada con la investigación.
3. El sujeto debe tener documentación de todo lo siguiente antes de iniciar el fármaco de estudio:
 - a. Variantes de α -glucosidasa ácida humana (GAA) que codifica genes bialélicos
 - b. Estado de CRIM
 - c. Actividad de la enzima GAA cuantificable nula o baja
4. El sujeto debe haber tenido miocardiopatía hipertrófica en el momento del diagnóstico, definida como:
 - > 1 desviación estándar por encima del LVMI medio específico de edad para sujetos diagnosticados mediante cribado neonatal o cribado de hermanos
 - > 2 desviaciones estándar por encima del LVMI medio específico de edad para sujetos diagnosticados mediante evaluación clínica
5. El sujeto debe haber recibido ERT durante al menos 6 meses inmediatamente antes de la inscripción. En el caso de los sujetos cuya dosis de

ERT se ha modificado, estos deberán haber seguido la dosis y la pauta modificadas durante al menos 3 meses antes de su inscripción.

6. El sujeto debe haber experimentado un declive clínico basado en los criterios especificados en el protocolo (véase a continuación) con la dosis y la frecuencia de rhGAA aprobadas actuales.

7. Si son susceptibles de reproducirse y sexualmente activos, los sujetos mujeres y hombres deben aceptar usar un método anticonceptivo altamente eficaz durante toda la duración del estudio y durante al menos 90 días después de su última dosis de cipaglucosidasa alfa/miglustat.

8. Para sujetos de ≥ 12 a < 18 años de edad, el sujeto debe realizar un ensayo de caminata de 6 minutos (6MWT) (≥ 75 metros) en el cribado que sea válido, según lo determine el evaluador clínico; los sujetos de ≥ 5 y < 12 años de edad deben realizar un 6MWT (≥ 40 metros) en el cribado que sea válido, según lo determine el evaluador clínico. Los sujetos de 18 meses a < 5 años de edad deben ser ambulatorios y, en opinión del investigador, deben tener probabilidades de ser capaces de realizar 6MWT (≥ 40 metros) cuando cumplan 5 años.

Criterios para el declive clínico para la inclusión de sujetos en la Cohorte 1:

El declive clínico se definirá para un sujeto que esté con la dosis y la frecuencia de rhGAA aprobadas actuales para cualquiera de los siguientes casos:

- Disminución de la distancia caminada en 6 minutos (6MWD) (10 %) o de la capacidad vital forzada (FVC) en sedestación (10 %) entre la visita de cribado y una evaluación previa realizada al menos 3 meses antes como parte de la atención clínica habitual
- Regresión en hitos o habilidades motoras (por ejemplo, pérdida de la capacidad para sentarse sin apoyo, pérdida de la capacidad para mantenerse de pie sin apoyo, pérdida de la capacidad para gatear con las manos y las rodillas, pérdida de la capacidad para caminar sin asistencia, pérdida de la capacidad para mantenerse de pie solo, pérdida de la capacidad para caminar solo), según la evaluación del investigador

- Aumento de la puntuación z del LVMI de más de 1.0, calculada a partir del ecocardiograma realizado en el cribado, en comparación con una evaluación previa realizada al menos 3 meses antes
- Nuevo uso de un dispositivo de asistencia para la deambulaci3n

5 **Criterios de exclusi3n**

Los sujetos que cumplan cualquiera de los siguientes criterios quedar3n excluidos de participar en el estudio:

1. El sujeto requiere ventilaci3n invasiva (por ejemplo, traqueotomía).
2. El sujeto requiere asistencia respiratoria durante ≥ 16 horas al día (incluyendo apoyo con ventilador no invasivo) de forma continua durante ≥ 14 días en ausencia de una enfermedad reversible aguda, excluyendo la ventilaci3n perioperatoria.
3. El sujeto recibió cualquier fármaco en investigaci3n o cualquier producto biológico en investigaci3n para la enfermedad de Pompe en los 30 días o 5 semividas del tratamiento o terapia, lo que sea más largo, antes del cribado.
4. El sujeto es negativo para CRIM y no ha recibido inmunomodulaci3n profiláctica.
5. El sujeto tiene títulos de anticuerpos altos y sostenidos frente contra ERT previos, definidos para el tratamiento de referencia local.
6. El sujeto ha recibido cualquier terapia génica en los últimos 3 años.
7. El sujeto presenta alguna enfermedad o afecci3n intercurrente en el cribado o en el momento basal del estudio que pueda impedirle al sujeto cumplir los requisitos del protocolo o que sugiera al investigador y/o al monitor médico que el sujeto potencial puede correr un riesgo inaceptable al participar en este estudio.
8. El sujeto tiene antecedentes de enfermedades o afecciones que afectan a la funci3n motora, tales como, pero sin limitaci3n, el síndrome de Guillain Barre, parálisis cerebral, etc.
9. El sujeto tiene una hipersensibilidad a cualquiera de los excipientes en la cipaglicosidasa alfa, rhGAA aprobada o miglustat.
10. La mujer está embarazada (o tiene intenci3n de quedarse embarazada) o está en período de lactancia en el momento del cribado.

11. En opinión del investigador, es improbable o imposible que el progenitor o representante legal autorizado cumpla con los requisitos del estudio.

Cohorte 2 (sin tratamiento previo con ERT, de 0 a < 12 meses):

Criterios de inclusión

5 Los sujetos deben cumplir todos los siguientes criterios que han de considerarse para la inscripción en el estudio:

1. Sujetos hombres o mujeres que tienen de 0 a < 12 meses de edad el Día 1.

2. El progenitor del sujeto o su representante legal está dispuesto y es capaz de proporcionar consentimiento informado por escrito y autorización para la participación en el estudio y para el uso y divulgación de información médica personal o información médica relacionada con la investigación.

3. El sujeto debe tener documentación de todo lo siguiente antes del inicio del fármaco de estudio:

15 a. Variantes de GAA bialélicas

b. Estado de CRIM

c. Actividad de la enzima GAA cuantificable nula o baja

4. El sujeto debe haber tenido miocardiopatía hipertrófica en el momento del diagnóstico, definida como:

20 • > 1 desviación estándar por encima del LVMI medio específico de edad para sujetos diagnosticados mediante cribado neonatal o cribado de hermanos

• > 2 desviaciones estándar por encima del LVMI medio específico de edad para sujetos diagnosticados mediante evaluación clínica

25 5. El sujeto no ha recibido tratamiento previo con ERT (no ha recibido tratamiento previo con ERT).

Criterios de exclusión

Los sujetos que cumplan cualquiera de los siguientes criterios quedarán excluidos de participar en el estudio:

30 1. El sujeto requiere ventilación invasiva (por ejemplo, traqueotomía).

2. El sujeto requiere asistencia respiratoria durante ≥ 16 horas al día (incluyendo apoyo con ventilador no invasivo) de forma continua durante ≥ 14

días en ausencia de una enfermedad reversible aguda, excluyendo la ventilación perioperatoria.

3. El sujeto recibió cualquier fármaco en investigación o cualquier producto biológico en investigación para la enfermedad de Pompe en los 30 días
5 o 5 semividas del tratamiento o terapia, lo que sea más largo, antes del cribado.

4. El sujeto es negativo para CRIM y no recibirá inmunomodulación profiláctica.

5. El sujeto ha recibido cualquier terapia génica en algún momento.

6. El sujeto presenta alguna enfermedad o afección intercurrente en el
10 cribado o en el momento basal del estudio que pueda impedirle al sujeto cumplir los requisitos del protocolo o que sugiera al investigador y/o al monitor médico que el sujeto potencial puede correr un riesgo inaceptable al participar en este estudio.

7. El sujeto tiene antecedentes de enfermedades o afecciones que afectan
15 a la función motora, tales como, pero sin limitación, el síndrome de Guillain Barre, parálisis cerebral, etc.

8. El sujeto tiene una hipersensibilidad a cualquiera de los excipientes en la cipaglicosidasa alfa, rhGAA aprobada o miglustat.

9. En opinión del investigador, es improbable o imposible que el progenitor
20 o representante legal autorizado cumpla con los requisitos del estudio.

La dosis de cipaglicosidasa alfa de 30 mg/kg que se está evaluando en este protocolo se determinó a partir de modelos PK poblacionales y análisis de simulación que incluyeron datos agrupados de 96 adultos y 11 sujetos pediátricos que recibieron dosis de 20, 25 y 30 mg/kg, incluyendo 3 pacientes
25 pediátricos con IOPD del Programa de Acceso Ampliado (EAP, por sus siglas en inglés) (de 1 a 3 años de edad) al nivel de dosis de 30 mg/kg. El nivel de dosis de 30 mg/kg en combinación con el efecto adicional del miglustat proporcionó exposiciones que se encuentran bien dentro del margen de seguridad y los múltiplos de exposición establecidos por el nivel sin efecto adverso observado
30 (NOAEL, por sus siglas en inglés) en toxicología juvenil de 150 mg/kg. El nivel de dosis de cipaglicosidasa alfa de 30 mg/kg en combinación con miglustat

generalmente se ha tolerado bien en 3 pacientes pediátricos con IOPD en el EAP.

Las exposiciones sistémicas estimadas a partir de los niveles plasmáticos totales reales de proteína GAA a dosis de 20 mg/kg, 25 mg/kg y 30 mg/kg o exposiciones simuladas de 30 mg/kg derivadas de exposiciones plasmáticas totales reales de proteína GAA a dosis más bajas se presentan en la Tabla 4 para adultos y para 3 sujetos pediátricos con IOPD en el programa de EAP. Como se muestra en la Tabla 21 a continuación, se observan aumentos relacionados con la dosis de cipaglucosidasa alfa en exposiciones sistémicas para los 3 sujetos pediátricos. La relación de exposición para cipaglucosidasa alfa 30 mg/kg en los 3 niños con respecto a los adultos que recibieron cipaglucosidasa alfa 20 mg/kg se aproxima a la unidad o es inferior a los niveles observados en adultos.

Tabla 21: Niveles de exposición estimados en 3 sujetos con IOPD a cipaglucosidasa 30 mg/kg

Sujeto	Peso corpora l (kg)	Dosis de Cipaglucosidas e Alfa + Miglustat	ABC (µg·h/ml)/Relació n con respecto al % de Adulto	Cmáx (µg/ml)/Relació n con respecto a % de Adulto
20 Adulto a	≥ 50	20 mg/kg + 260 mg	1444 (1035 – 1949)	295 (228 – 366)
Sujeto Aa	14.0	20 mg/kg + 80 mg	1076/74.5	217/73.6
25 Sujeto Aa	14.8	25 mg/kg + 80 mg	1170/81.0	250/84.7
Sujeto Ab	14.8	30 mg/kg + 80 mg	1504/104	308/104
Sujeto Ba	16.4	20 mg/kg + 80 mg	779/53.9	190/64.4
30 Sujeto Ba	18.2	25 mg/kg + 80 mg	1081/74.9	255/86.4

5	Sujeto Bb	18.2	30 mg/kg 80 mg	+	1368/94.7	314/106
	Sujeto Ca	8.73	20 mg/kg 30 mg	+	516/35.7	121/41.0
	Sujeto Ca	9.87	25 mg/kg 35 mg	+	728/50.4	167/56.6
	Sujeto Ca	11.7	30 mg/kg 80 mg	+	997/69.0	223/75.6

- Abreviaturas (en todos los casos hacen referencia a sus siglas en inglés): ABC = área bajo la curva; Cmáx = concentración máxima observada; GAA = α -glucosidasa ácida humana; LOPD = enfermedad de Pompe de inicio tardío
- un ABC y una Cmáx estimadas a partir de concentraciones plasmáticas totales de proteína GAA observadas realmente; el resumen para adultos se basa en un N de 93 sujetos con LOPD, mediana (percentiles 10 y 90)
- b ABC y Cmáx simuladas a partir de concentraciones plasmáticas totales de proteína GAA observadas a dosis más bajas; datos reales pendientes

Esta frecuencia de dosificación se basa en el aclaramiento sistémico de la cipaglicosidasa alfa y el miglustat, y en la agudeza/gravedad de la enfermedad en la IOPD, así como en observaciones realizadas en 3 pacientes con IOPD inscritos en el EAP (pacientes con experiencia con ERT y con declive clínico). Estos pacientes iniciaron el tratamiento con pautas de administración cada dos semanas, y la frecuencia se ha aumentado a administraciones semanales sin evidencia de acumulación de ninguno de los fármacos y con un perfil de seguridad bien tolerado. En una publicación reciente de un estudio de cohortes observacional multicéntrico (Maartje, Huidekper et al., 2022) se encuentra respaldo adicional para una pauta posológica semanal, que demostró que la supervivencia de los pacientes con IOPD mejoró significativamente con una dosis semanal de 40 mg/kg en comparación con una dosis quincenal de 20 o 40 mg/kg.

A dosis fijas en miligramos, las dosis de miglustat se administrarán basándose en valores de corte de peso corporal obtenidos a partir de modelos y simulaciones que se ajustan a las exposiciones de adultos con un peso ≥ 50 kg

a partir de la administración de una dosis de 260 mg. El miglustat se administrará aproximadamente 1 hora antes del inicio de la infusión IV de cipaglicosidasa alfa, que se administrará durante aproximadamente 4 horas. Los sujetos deben ayunar al menos 2 horas antes y 2 horas después de la administración oral de miglustat, con la excepción de los lactantes (de 0 a < 2 años), que pueden recibir Pedialyte® o una solución oral similar a base de dextrosa y electrolitos.

Puesto que se espera que los sujetos aumenten de peso a medida que crecen, pueden realizarse ajustes de la dosis de miglustat basándose en los cambios en la categoría de peso, pero sólo después de que se confirme el aumento de peso en 2 visitas de infusión consecutivas.

En este estudio se evaluará una frecuencia semanal de administración de 30 mg/kg de cipaglicosidasa alfa y miglustat. Se ha administrado una dosis semanal de 30 mg/kg de cipaglicosidasa alfa y miglustat en sujetos pediátricos con IOPD a partir del EAP. La disposición PK en estos sujetos indicó que ambos fármacos se aclaraban sin acumulación a partir de la dosificación semanal. La justificación de la dosificación semanal en ambas cohortes se basa en la evidencia que respalda una mejora de la supervivencia para pacientes con IOPD que reciben una dosificación semanal de ERT de referencia en comparación con una dosificación cada dos semanas (Ditters, Huidekper et al., 2021). Además, los sujetos con IOPD con experiencia con ERT en la Cohorte 1 se encontrarán en declive clínico y se espera que estén pasando de una pauta semanal de tratamiento de referencia, por lo que la transición a una dosis cada dos semanas podría reducir la probabilidad de estabilizar o mejorar el estado clínico de estos sujetos.

Criterios de evaluación:

Fase 1 (desde el momento basal hasta la Semana 104)

Seguridad

El criterio de valoración principal es la proporción de sujetos con reacciones asociadas a la infusión (IAR).

Los criterios de valoración de seguridad adicionales desde el momento basal hasta la Semana 104 son los siguientes:

- incidencia de acontecimientos adversos emergentes del tratamiento (TEAE), incluyendo acontecimientos adversos graves emergentes del tratamiento (TESAE, por sus siglas en inglés), reacciones anafilácticas y TEAE que conducirán a la interrupción del fármaco de estudio
- 5 • cambios en resultados de los ensayos clínicos de laboratorio
- cambios en signos vitales
- cambios en resultados del ECG de 12 derivaciones
- cambios en parámetros del ecocardiograma (distintos de LVMI)

Eficacia

- 10 La eficacia se evaluará mediante los criterios de valoración compuestos e individuales adecuados para cada edad como se indica a continuación:

Cohorte 1 solamente: Un criterio de valoración de eficacia compuesto evaluará la proporción de sujetos en la Semana 104 que experimentan cualquiera de los siguientes acontecimientos de declive clínico con respecto a la

15 inclusión en el estudio:

- muerte debida a complicaciones de la enfermedad de Pompe
- nueva dependencia de ventilador invasivo en ausencia de enfermedad intercurrente
- aumento en la puntuación z de LVMI con respecto al valor basal de más
- 20 de 1.0 calculado a partir del ecocardiograma más reciente
- % de disminución de FVC en sedestación predicho ≥ 15 % con respecto al valor basal en ausencia de enfermedad intercurrente
- nuevo uso de un dispositivo de asistencia para la deambulaci3n

Cohorte 2 solamente:

- 25 • la proporción de sujetos que están vivos y sin ventilación invasiva en la Semana 104
- la proporción de sujetos en la Semana 104 que experimentan una disminución en la puntuación z de LVMI con respecto al valor basal superior a 1.0 calculada a partir del ecocardiograma más reciente

Ambas cohortes:

Función motora:

- cambio desde el momento basal hasta la Semana 104 en la puntuación total para la Escala Motora Infantil de Alberta (AIMS) (< 18 meses)
- 5 • cambio desde el momento basal hasta la Semana 104 en la puntuación total para los puntos de la Medida de la Función Motora Gruesa-88 (GMFM-88) (≥ 5 meses)
- cambio desde el momento basal hasta la Semana 104 en la puntuación total para *Timed Up and Go* (TUG) (≥ 4 años)
- 10 • cambio desde el momento basal hasta la Semana 104 en la función ambulatoria, medida mediante 6MWT (≥ 5 años)
- cambio desde el momento basal hasta la Semana 104 en las siguientes variables relacionadas con la fuerza muscular (≥ 4 años):
 - puntuación del ensayo muscular manual (MMT) para las extremidades inferiores y superiores y el cuello
 - 15 – Puntuación total de MMT
- tiempo para usar un dispositivo de asistencia o un nuevo dispositivo de asistencia para la deambulaci3n
- Funci3n pulmonar:
- 20 • cambio desde el momento basal hasta la Semana 104 en el % de FVC en sedestaci3n predicho (≥ 5 a3os)
- cambio desde el momento basal hasta la Semana 104 en horas por d3a con ventilaci3n no invasiva
- tiempo desde el nacimiento hasta la muerte o el uso de ventilaci3n invasiva (por ejemplo, traqueotom3a) o asistencia respiratoria durante ≥ 16 horas al d3a (incluyendo el apoyo ventilatorio no invasivo) de forma continua durante ≥ 14 d3as en ausencia de una enfermedad aguda reversible, excluyendo la ventilaci3n perioperatoria
- 25 Card3aca:
- 30 • cambio desde el momento basal hasta la Semana 104 en LVMI y puntuaci3n z de LVMI

Otras medidas:

- supervivencia final
 - gravedad de la enfermedad del sujeto (mejora, estable o declive) en la Semana 104, medida por la Impresión global del médico de la gravedad (PGIS)
 - gravedad de la enfermedad del sujeto (mejora, estable o declive) en la Semana 104, medida por la impresión global del sujeto de la gravedad (SGIS) notificada por el sujeto o el cuidador
 - cambio desde el momento basal hasta la Semana 104 en las siguientes variables de las medidas de los resultados informados por los pacientes (PRO):
 - puntuación para la evaluación de la Calidad de vida en trastornos neurológicos (NeuroQoL) de la función de las extremidades inferiores
 - puntuación para la evaluación de la Calidad de vida por Instrumento EuroQol 5 Dimensiones Juventud 5 Niveles (EQ-5D-Y-5L [de 4 a 16 años] o Instrumento EuroQol 5 Dimensiones 5 Niveles (EQ-5D-5L [de 17 a 18 años])
 - cambio desde el momento basal hasta la Semana 104 en la proporción de sujetos que requieren el uso continuo de presión positiva en las vías respiratorias (CPAP)/presión positiva bifásica en las vías respiratorias (BiPAP)
 - cambio desde el momento basal hasta la Semana 104 en el peso corporal, la altura/longitud y el perímetro craneal (< 2 años de edad) (tanto el valor absoluto como el percentil para los 3 parámetros)
- Farmacocinética
- Los parámetros farmacocinéticos incluyen el aclaramiento (CL) y el volumen de distribución (V), estimados a partir de las concentraciones totales de proteína GAA y las concentraciones de miglustat en plasma. Otros parámetros PK derivarán de la siguiente manera:
- ABC: área bajo la curva de concentración de fármaco en plasma frente al tiempo

- C_{máx}: concentración máxima observada obtenida directamente a partir del perfil de concentración

Inmunogenicidad

- anticuerpos anti-rhGAA (totales, neutralizantes y con reactividad cruzada)

Farmacodinámica

- cambio desde el momento basal hasta la Semana 104 en el nivel de CK en suero
- cambio desde el momento basal hasta la Semana 104 en el nivel de Hex4 en orina

Fase 2 (desde el momento basal hasta el final del estudio)

Los criterios de valoración con respecto a la seguridad, la eficacia, la PK y la PD (opcional) para la Fase 2 serán similares a los de la Fase 1.

Ejemplo 16: Tratamiento de un paciente pediátrico con IOPD con ATB200/AT2221

Se presentó un paciente masculino de 6 meses con enfermedad de Pompe infantil grave. El paciente se sometió a un examen físico completo, a la medición de la actividad de la enzima GAA, a ensayos genéticos del gen GAA y a una biopsia muscular para establecer el diagnóstico.

El paciente recibió terapia de reemplazo enzimático con dosis altas de Myozyme después del diagnóstico. El paciente respondió muy mal a la terapia. Debido al rápido avance de la enfermedad de Pompe y a la respuesta inadecuada a la terapia, la supervivencia del paciente corría peligro. Para el paciente, surgió la oportunidad de recibir el nuevo ERT ATB200/AT2221 a través de un uso compasivo/Programa de acceso ampliado (EAP).

Diagnóstico enzimático de la alfa-glucosidasa ácida

En el contexto del diagnóstico metabólico, la actividad de la alfa-glucosidasa ácida se determinó en fibroblastos y linfocitos a pH 4 y 7. Para confirmar los resultados, se realizaron diagnósticos adicionales con sangre seca con una medición de la actividad de la alfa-glucosidasa a un pH de 3.8 y 7. Se evaluaron indicadores adicionales, tales como la actividad de la GAA con y sin inhibidor, así como la relación de la actividad a pH 3.8 y pH 7.0.

Análisis genético

Se aisló ADN de sangre con EDTA. El gen que codifica la alfa-glucosidasa ácida se ubica en el cromosoma 17q25.2-q25.3. En primer lugar, se usó la reacción en cadena de la polimerasa para amplificar los 19 exones codificantes de proteínas, incluyendo las regiones intrónicas adyacentes. Posteriormente, se realizó la secuenciación del ADN y, para la detección de supresiones y duplicaciones, se realizó una amplificación de productos dependientes de ligadura múltiple. Debido a los antecedentes familiares negativos y a la transmisión autosómica recesiva de la enfermedad de Pompe, se asumió que las mutaciones del paciente se ubicaban en dos cromosomas distintos. Por lo tanto, se realizaron ensayos genéticos de los progenitores. Posteriormente, las mutaciones identificadas se compararon con las mutaciones conocidas por provocar enfermedades en la Base de Datos de Mutaciones Genéticas Humanas.

Biopsia muscular

Durante el primer año de vida se realizó una biopsia muscular del músculo pectoral. El material obtenido se examinó mediante microscopía electrónica e histoquímica enzimática. En la muestra del paciente se aplicaron tinciones de PAS, al aceite rojo, tricrómica, de NADH, de ATPasa y de fosfatasa ácida.

Metodología de Glc4

El paciente índice se somete a mediciones periódicas de los niveles de Glc4 en orina desde el cambio del ERT al ATB200. Los niveles de Glc4 se determinaron mediante un método establecido por la Universidad de Duke. El análisis de Glc4 se estandariza como un derivado de butil-4-aminobenzoato usando [¹³C₆] Glc4 como patrón interno (IS, por sus siglas en inglés). La medición se realiza mediante cromatografía de líquidos de ultra rendimiento-espectrometría de masas en tándem (UPLC-MS/MS). Los valores de Glc4 después se normalizan con creatinina.

Tratamiento clínico

El paciente presentó IOPD a los 6 meses e inicialmente se le administró la dosis convencional de Myozyme (20 mg/kg/quincenalmente). Debido a la respuesta inadecuada al tratamiento, la dosis se duplicó sólo un mes después

del inicio de la terapia en forma de una administración semanal de Myozyme. Con esta dosis de 20 mg/kg/semanal, el paciente mostró ligeras mejoras motoras. Pero la situación cardiológica se deterioró progresivamente.

Por lo tanto, sólo tres meses después del inicio de la terapia, la dosis se
 5 duplicó nuevamente a 40 mg/kg/semanal, por lo que el paciente recibió un total de cuatro veces la dosis convencional. Con la intensificación del ERT y la terapia cardíaca, el estado del paciente se estabilizó inicialmente. Sin embargo, durante los meses siguientes, el estado general del paciente se deterioró progresivamente y se produjo una descompensación, especialmente
 10 respiratoria.

A pesar de la dosis cuádruple de ERT y la ausencia de ADA debido a la inmunomodulación, la respuesta del paciente a la terapia fue muy deficiente por razones inexplicables. En ese momento, se asumió que el curso clínico del paciente podría ser mortal.

15 El paciente pasó de Myozyme a ATB200/AT2221 después de ocho meses de respuesta insuficiente a la terapia con Myozyme. El paciente tenía 14.5 meses de edad en el momento del cambio de terapia. La nueva terapia (a través del EAP) se inició con la administración oral de 30 mg de premedicación AT2221 (Miglustat) una hora antes de la administración de enzima. Se administró
 20 ATB200 en un intervalo quincenal a una dosis de 20 mg/kg. En el curso adicional del tratamiento, se ajustó y se optimizó repetidamente la dosis de premedicación y ERT (véase la Tabla 22). Algunas dosis reales de la Tabla 22 (por ejemplo, 37 mg/kg y 34.5 mg/kg a los 32 y 38 meses, respectivamente) variaban con respecto a la dosis diana (por ejemplo, 30 mg/kg) para evitar el desperdicio de
 25 material sobrante en los viales.

Tabla 22: Plan de dosificación para ERT

Edad	Terapia	Dosificación de GAA (mg/kg)	Dosificación de Miglustat (mg)	Intervalo
30 6 meses Febrero de 2019	Myozyme	20		cada 2 semanas

5	7 meses	Myozyme	20		Semanalmente
	9 meses	Myozyme	40		Semanalmente
	14 meses	ATB200/AT2221	20	30	cada 2 semanas
	16 meses	ATB200/AT2221	25	30	cada 2 semanas
	18 meses	ATB200/AT2221	25	35	cada 2 semanas
10	19 meses	ATB200/AT2221	30	40	Semanalmente
	24 meses	ATB200/AT2221	30	60	Semanalmente
	31 meses	ATB200/AT2221	30	80	Semanalmente
	32 meses	ATB200/AT2221	37	80	Semanalmente
	38 meses	ATB200/AT2221	34.5	115	Semanalmente

Resultados

15 Los progenitores del paciente notificaron un progreso motor poco después de la primera administración de ATB200/AT2221. El paciente desarrolló un aumento de las expresiones faciales y la fuerza muscular, lo que dio como resultado nuevas habilidades motoras.

20 ATB200/AT2221 mejoró significativamente la situación cardíaca y respiratoria. Los parámetros de insuficiencia cardíaca, tales como NT-proBNP, volvieron al intervalo normal (Fig. 68). La función cardíaca mostró una mejora significativa (FS 30-43 %, Fig. 69). Con el tiempo, la terapia cardiológica de apoyo podría reducirse y, por último, suspenderse por completo.

25 Después de tres meses con ATB200/AT2221, el paciente ya no necesitaba oxígeno durante el día, excepto en el contexto de infecciones. El paciente desarrolló durante el curso una infección pulmonar que requirió ventilación invasiva en algunos momentos. Debido a la necesidad de ventilación mecánica, se analizó la posibilidad de realizar una traqueotomía. Por último, se decidió que se realizaría en primer lugar la intensificación del ERT debido a la
30 buena respuesta del paciente a la terapia hasta ese momento. Posteriormente, se administraron ATB200 30 mg/kg semanalmente durante cinco meses después del inicio de la terapia.

Después de cambiar a la administración semanal de enzima, los médicos y los progenitores observaron una mejoría clínica. Solo dos días después de la primera administración semanal de ATB200, el paciente recuperó la voz.

El estado respiratorio del paciente mejoró de forma constante con la nueva
5 terapia, por lo que no necesitó ventilación no invasiva ni siquiera por la noche siete meses después del cambio del ERT. Después de 14 meses con ATB200/AT2221, el paciente ya no necesitaba oxígeno por la noche.

Además, pudo observarse un desarrollo motor constantemente positivo. El paciente muestra ahora una mejora significativa en el control de la cabeza y
10 la estabilidad del tronco. Los objetivos motores a largo plazo incluyen un desarrollo adicional del control de la cabeza y la capacidad de girarse independientemente hacia los lados.

El paciente ha recuperado recientemente la capacidad de sentarse con las piernas cruzadas durante un breve período de tiempo. La fuerza muscular
15 del paciente es ahora suficiente para moverse independientemente en la silla de ruedas. La comunicación con el paciente también ha mejorado mucho, ya que ha aprendido algunas palabras y signos. Gracias a la mejora de sus habilidades motoras, el paciente puede jugar y disfruta, por ejemplo, apilando bloques de construcción o haciendo rompecabezas.

La Medida de la Función Motora Gruesa 66 (GMFM 66) se usa para
20 cuantificar las habilidades motoras de un paciente. La GMFM 66 es un ensayo estandarizado a nivel mundial, desarrollado y validado para niños con parálisis cerebral, para medir el desarrollo de la función motora gruesa a lo largo del tiempo. Durante el ensayo se examinan 66 puntos y es posible una puntuación
25 de 0 a 100 puntos. Hasta ahora, la GMFM 66 se ha realizado tres veces al paciente, con intervalos de seis meses, y se han conseguido las siguientes puntuaciones de ensayo (Fig. 70):

16.5 meses de terapia con ATB200: 17.0 puntos
24 meses de terapia con ATB200: 24.0 puntos
30 28 meses de terapia con ATB200: 29.3 puntos

En el contexto de los ajustes de dosis, la eficacia del tratamiento, según el EAP, fue mayor con la terapia de dosis altas de ERT. Con la ERT a dosis

elevadas se observó una estabilización respiratoria y cardiológica más rápida, así como una mejora motora especialmente notable. La respuesta al tratamiento del paciente mejoró a dosis superiores a las dosis convencionales recomendadas en el EAP. El paciente no desarrolló ningún efecto secundario
5 relacionado con el tratamiento, ni siquiera a dosis más altas del ERT.

Análisis de Glc4

En el paciente, se ha determinado regularmente la Glc4 en orina desde el cambio a ATB200 a los 14 meses de edad. Al inicio de la terapia con ATB200, el valor de Glc4 en orina estaba significativamente elevado. Los niveles de Glc4 se
10 mantuvieron relativamente constantes con la administración quincenal de una dosis de 20 mg/kg.

Se observó un aumento de los niveles de Glc4 con el aumento de la dosis a 25 mg/kg/quincenalmente y también, de forma más notable, con el cambio a una administración semanal de 30 mg/kg a los 19 meses de edad (13 meses de
15 tratamiento). Los valores se mantuvieron en un nivel relativamente alto hasta los 32 meses de edad (26 meses de tratamiento). Desde entonces, se observa una disminución de los valores hasta el nivel inicial al comienzo de la terapia (Fig. 71).

Pueden encontrarse detalles adicionales sobre el tratamiento de este
20 paciente en Fiege et al., "Improved Enzyme Replacement Therapy with Cipaglucosidase Alfa/Miglustat in Infantile Pompe Disease", Pharmaceuticals 2023; 16(9): N.º 1199, que por la presente se incorpora por referencia en su totalidad.

Ejemplo 17: Tratamiento de un paciente pediátrico con IOPD con 25 ATB200/AT2221

El paciente, hombre, primogénito de padres no emparentados de ascendencia africana (Burkina Faso), nació a las 37 semanas tras un parto de emergencia debido a insuficiencia cardíaca fetal. Al nacer, fue reanimado e ingresado en la UCIN para recibir asistencia respiratoria invasiva y apoyo
30 circulatorio.

La ecocardiografía mostró una miocardiopatía hipertrófica (MCH, LVMI 232 g/m² según el método de Simpson) con disfunción sistólica y diastólica

biventricular grave (fracción de eyección EF 30 %). El ECG mostró un intervalo PR corto (0.07 segundos). Además, el paciente presentaba hipotonía grave, CPK en suero elevada (1063 U/l) y BNP (9169 U/l, nv 0-100).

5 A los 3 días de vida, un cribado neonatal ampliado dio positivo para la enfermedad de Pompe (actividad de GAA en DBS 0.40 uM/l, nv>3). uGlc4 estaba elevada (71.2 mmol/mol de creatinina, nv <16.3). El diagnóstico se confirmó mediante análisis molecular de GAA (heterocigoto compuesto c.2560C>T (p.Arg854*) + supresión de los exones 4-8) y el ensayo de Transferencia Western de GAA en linfocitos mostró un estado de CRIM negativo.

10 A los 5 días de vida, el paciente fue tratado con alglucosidasa alfa (Myozyme®). Al mismo tiempo, se inició un protocolo de inmunomodulación con rituximab, inmunoglobulinas ev y metotrexato. Además, se inició una terapia adecuada para la insuficiencia cardíaca (betabloqueantes, diuréticos, inhibidores de la ECA).

15 El paciente mejoró progresivamente y, a los 2 meses de edad, fue dado de alta de la UCIN. A 1 año, la masa cardíaca (LVMI 116.6 g/m²) y la función (EF 50 %) mejoraron y, al mismo tiempo, se registraron mejoras en la función motora y los biomarcadores (uGlc4 20.2 mmol/mol de crea, nv <7.7, CPK 1877 u/l).

20 Desgraciadamente, el paciente desarrolló posteriormente un título alto de anticuerpos anti-ERT (1:102,400), seguido de un empeoramiento clínico y bioquímico (retraso psicomotor, CPK en suero elevada, máximo 6,795 U/l, uGlc4 elevada, máximo 50 mmol/mol de creatinina). La masa cardíaca aumentó (LVMI 229 g/m²), al igual que los niveles de BNP (237 U/l), mientras que la FE se
25 mantuvo estable (50 %).

El paciente fue sometido a un nuevo ciclo de inmunomodulación con bortezomib, rituximab, sirolimus e inmunoglobulinas ev, con una reducción del título de anticuerpos a 1:6,400 después de 1 año, pero con una mejoría clínica y bioquímica sólo parcial. En particular, mostró persistencia del retraso psicomotor,
30 CMH (LVMI 118 g/m², EF 48 %), aumento de uGlc4 (35 mmol/mol de crea) y CPK (4,728 U/l).

A los 2.5 años de vida, comenzó un uso compasivo/terapia de EAP que combinaba un nuevo ERT (cipaglucosidasa 30 mg/kg/semana) con un estabilizador enzimático (115 mg de miglustat) (Programa ATB200-15, Amicus Therapeutics), con beneficios clínicos.

5 Después de 3 meses, el paciente podía caminar independientemente, los biomarcadores se redujeron (CPK 2,989 U/l, uGlc4 32.6 mmol/mol de crea), la masa cardíaca (LVMI 82 g/m²) y la función (EF 67 %) mejoraron. Sin embargo, una ecocardiografía mostró cavidades profundas y grandes y una hipertrabeculación marcada, especialmente en el ápice.

10 Después de 1 año de la nueva terapia (3.5 años de edad), una nueva ecocardiografía cumplió los criterios de miocardio no compactado (NC/C 2.6) con masa (LVMI 64 g/m²) y función (EF 75 %) normales. La MRI cinética confirmó el diagnóstico de miocardio no compactado, biventricular, evidente tanto en el eje largo (Fig. 72A) como en el eje corto, con una relación NC/C de 8.4/4.1 en los
15 segmentos mediales del ventrículo izquierdo (Fig. 72B) con un máximo de NC/C de 11.4/2 en el ápice (Fig. 72C). Los biomarcadores de la enfermedad se mantuvieron estables (CPK 2557 U/l, uGlc4 30.4 mmol/mol de creatinina) y el paciente no tenía síntomas cardíacos.

Se describen detalles adicionales sobre el tratamiento de este paciente en
20 Gragnaniello et al., "Unusual Evolution of Hypertrophic Cardiomyopathy in Non-Compaction Myocardium in a Pompe Disease Patient", Journal of Clinical Medicine 2023, 12, 2365, que por la presente se incorpora por referencia en su totalidad.

25 **Ejemplo 18: Tratamiento de una paciente pediátrica taiwanesa con IOPD**

Una recién nacida presentó inicialmente resultados anormales en el cribado neonatal para la enfermedad de Pompe. La madre recibió exámenes prenatales regulares con resultados normales. No había antecedentes familiares de enfermedades genéticas.

30 Debido a un cribado neonatal anormal de GAA, se detectó la siguiente mutación heterocigótica c.[1935C>A;1726G>A] (p.[D645E; G576S])/c.2024_2026del (p.N675del) y se remitió a la paciente para estudios

adicionales. La radiografía de tórax (CXR) mostró cardiomegalia con una relación cardiorádica (C/T) de 0.6. Las enzimas cardíacas fueron las siguientes: creatina cinasa (CK) 880 U/l y péptido natriurético de tipo B N-terminal (NT-pro BNP) 10169 pg/ml. La ecocardiografía reveló una miocardiopatía hipertrófica, sin
 5 obstrucción del tracto de salida del ventrículo derecho ni del tracto de salida del ventrículo izquierdo. Se observó bradicardia intermitente y su EKG mostró bradicardia sinusal con hipertrofia biventricular y un intervalo PR corto.

La terapia de reemplazo enzimático con Myozyme 40 mg/kg/c.2.s. se proporcionó por primera vez poco después del nacimiento durante 6 meses.
 10 Aproximadamente a los 3 años de edad, comenzó a usar ATB200 y AT2221 a través del programa de acceso ampliado (EAP).

Datos de laboratorio de diagnóstico

Actividad de la enzima GAA (Sangre completa)

Recién nacida

15 Actividad de nGAA: 0.32 (umol/l de Sc/h) (12.22 ± 5.88)

Relación GAN/nGAA: 147.20 (<20)

Inhibición de acarboxa: 91.33 % (<70)

Actividad de la enzima GAA (linfocito)

Recién nacido: a-Glucosidasa: 0.84 nmol/mg de Prot/h

20 a-Glucosidasa (+ Inhibidor) : 0.11 nmol/mg de Prot/h

Gen GAA: Heterocigoto compuesto GAA c.[1935C>A;1726G>A] (p.[D645E; G576S])/c.2024_2026del (p.N675del).

Notas sobre el estado de seguimiento

25 A los 3 meses de edad, la paciente se desarrollaba bien. Lloraba mucho, igual que sus 2 hermanos mayores. Sus sonidos respiratorios aumentaron de forma continua y no se había atragantado. Tenía buena actividad, hipotonía troncal y control positivo de la cabeza. Era capaz de agarrar con toda la palma de la mano, tenía buena capacidad para mover las piernas de forma bilateral y podía mantenerse la posición prona durante un breve período de tiempo. Sin
 30 embargo, no era buena para dar pasos, no tenía retracción subcostal, presentaba espasticidad en las extremidades superiores y no le gustaba la posición prona.

A los 7 meses de edad, su tratamiento quincenal con Myozyme se aumentó a 50 mg/kg durante 10 meses. A los 8 meses de edad, la paciente había sido tratada con Terapia de reemplazo enzimático (ERT) cada dos semanas desde su nacimiento. Sin embargo, después de estar con ERT durante 4 meses, desarrolló una erupción cutánea, disnea, tos y una tez pálida. Los síntomas pudieron aliviarse al proporcionar difenhidramina y solumedrol. Después de 7 meses con ERT, se observó tos poco después de iniciar la infusión, por lo que se sugirió una infusión más lenta. Tras el seguimiento, fue ingresada para completar la ERT con una velocidad de infusión más baja y Myozyme diluido.

A la edad de 1 año y 3 meses, necesitaba ayuda para mantenerse de pie, pero podía intercambiar objetos entre ambas manos, aplaudir, agarrar un bolígrafo y pronunciar "mamá", "阿嬷", "monmon" y saludar con la mano para decir adiós. A 1A4M de edad, la paciente comenzó a aprender a caminar.

A 1A de edad, la paciente presentaba niveles de CK de 1213 U/l, que aumentaron a 2722 U/l 5 meses después, cuando el paciente tenía 1A5M. A 1A6M, la paciente se debilitó progresivamente y desarrolló ptosis bilateral. Sin embargo, siguió aprendiendo a caminar. Debido a estos resultados clínicos cada vez más debilitantes, se recomendó aumentar la dosis de ERT a 50 mg/kg/C.2.S. Cuando la paciente tenía 1A6M de edad, su tratamiento quincenal con Myozyme se aumentó a 60 mg/kg durante 5 meses. A 1A7M de edad, la paciente era capaz de subir escaleras y seguía siendo capaz de intercambiar objetos entre ambas manos, dar palmadas y agarrar un bolígrafo.

A 1A8M de edad, la paciente comenzó la inmunoterapia debido a su debilidad. Un mes más tarde, a 1A9M de edad, la paciente tenía buena actividad y no tenía diarrea. Sus niveles de CK se redujeron en un mes de 3143 U/l a 1A9M de edad a 2550 U/l a 1A10M de edad. Debido a la progresión de su debilidad, su dosis de ERT aumentó a 60 mg/kg/C.2.S., como se recomendó, y se la mantuvo en observación continua para detectar el desarrollo de una alergia.

El tratamiento con Myozyme de la paciente se cambió a una dosis semanal de 30 mg/kg durante 3 meses cuando la paciente tenía 1A11M. A esta edad, la paciente presentaba niveles de CK de 2665 U/l. Dos meses después, sus niveles de CK bajaron a 2397 U/l. A 2A0M de edad, la paciente tenía una

actividad normal y caminaba rápidamente. Su pecho presentaba sonidos respiratorios claros, suaves e hiperactivos, y el examen cardíaco no reveló ningún murmullo. Debido a su debilidad continua, siguiendo las recomendaciones, su tratamiento se cambió a una dosis de ERT de 40 mg/kg/C.S. y se observó a la paciente para detectar el desarrollo de reacciones asociadas a la infusión. Cuando la paciente cumplió 2A2M, su tratamiento semanal con Myozyme aumentó a 40 mg/kg durante 10 meses.

A 2A10M de edad, la paciente presentaba niveles de CK de 1878 U/l. Debido a las pruebas de retención de CO₂ tras el análisis de gases en sangre, se recomendó ventilación no invasiva domiciliaria (BiPAP). A la edad de 3 años, sus niveles de CK se redujeron a 1444 U/l y la paciente comenzó a usar una terapia que consistía en 328 mg de ATB200 (20 mg/kg) y 80 mg de ATB2221 c.2.s. a través del programa de acceso ampliado (EAP) continuando al mismo tiempo con su uso de premedicación. Al inicio del tratamiento con ATB200/AT2221, no presentó erupciones cutáneas, disnea, tos ni palidez. La madre de la paciente observó que, al inicio de la infusión de ATB200, la paciente tendía a caerse con frecuencia y que su actividad era inferior a la que tenía antes de la infusión. Desde el inicio del tratamiento con ATB200/AT221, cuando la paciente tenía 3 años, el número de anticuerpos anti-rhGAA se redujo 1 vez después de 1 mes de tratamiento. Este nivel se mantuvo estable después de otro mes de tratamiento, cuando la paciente cumplió 3A2M. Después de 2 meses de tratamiento con ATB200/AT2221, los niveles de CK de la paciente, que ahora tenía 3A2M, aumentaron a 1717 U/l. Siguiendo las recomendaciones, se la mantuvo en observación y se le proporcionó un patrocinador con el que planificar un ajuste de la dosis de infusión en caso necesario.

Cuando la paciente tenía 3A3M, sus niveles de CK habían seguido disminuyendo en comparación con el mes anterior, hasta alcanzar 1674 U/l. A 3A4M, la paciente había estado en tratamiento con ATB200/AT2221 durante 17 semanas. Se había adaptado a una dosis semanal desde los 3A3M, después de 13 semanas de dosis quincenales, debido a que se caía con frecuencia, en particular antes de las infusiones. Mantuvo su peso entre 17.8 kg y 18.3kg y tenía una buena actividad. También podía caminar independientemente con una

ortesis de tobillo y pie. La madre de la paciente mencionó que se caía menos y que su actividad era mejor después de cambiar la pauta posológica a infusiones semanales. En ese momento, no había desarrollado ninguna erupción cutánea, disnea, tos ni palidez.

5 A 3A5M de edad, después de 2 meses con la dosis anterior, se aumentó el tratamiento semanal proporcionado al paciente a 25 mg/kg de ATB200 y 80 mg de AT2221. A esta edad, sus niveles de CK habían seguido reduciéndose en comparación con el mes anterior, hasta 992 U/l, y sus niveles de NT-proBNP eran de 231.9 pg/ml. A 3A7M, sus niveles de CK y NT-proBNP se mantuvieron
10 estables después de un mes adicional de tratamiento (CK: 1687 U/l; NT-proBNP: 33.24 pg/ml). La dosis se aumentó de nuevo después de 2 meses a un tratamiento semanal de 30 mg/kg de ATB2000 y 80 mg de AT2221 en la paciente cuando tenía 3A7M. Durante este tiempo, mantuvo su peso entre 18.3 kg y 18.8 kg. Su patrocinador accedió a ajustar la dosis de infusión a 25 mg/kg desde
15 3A5M (semana 21). Después de ajustar la dosis a 25 mg c.s., la madre de la paciente publicó un aumento en el habla y la actividad, pero la paciente aún presentaba debilidad y tendencia a caerse antes de las infusiones posteriores. En general, observó que esta condición era similar al rendimiento previo de la paciente cuando tomaba Myozyme 40 mg c.s.

20 Después de revisar los datos PK y bioquímicos de la paciente, así como su mal estado clínico, la dosis de cipaglucosidasa alfa se cambió de 25 mg/kg a 30 mg/kg c.s. comenzando a la edad de 3A7M. A 3A8M de edad, los niveles de CK y NT-proBNP de la paciente se mantuvieron estables, pero disminuyeron un mes más tarde, a 3A9M, ya que la paciente había estado tomando
25 ATB200/AT2221 durante 9 meses. En la Tabla 23 pueden encontrarse datos demográficos, hematológicos y bioquímicos para la paciente. Mantuvo su peso entre 18.8 kg y 19.1 kg. La madre de la paciente notificó que se encuentra en mejores condiciones, incluyendo menos caídas y mayor fuerza muscular, así como menos ptosis. En ese momento, no había desarrollado ninguna erupción
30 cutánea, disnea, tos ni palidez.

A 3A11M de edad, sus niveles de CK mejoraron con respecto a los meses anteriores. A 4A de edad, la paciente había estado usando ATB200/AT2221

durante un año y su nivel de CK había mejorado adicionalmente, mientras que su nivel de NT-proBNP se mantuvo estable. En la Tabla 23 pueden encontrarse datos demográficos, hematológicos y bioquímicos para la paciente. Su peso se mantuvo entre 19.1 kg y 19.5 kg. En ese momento, no había desarrollado ninguna erupción cutánea, disnea, tos ni palidez. La paciente no pudo cooperar con el uso de ventilación no invasiva durante la noche. Comenzó a caminar rápidamente, podía contar del 1 al 10 y sus maestros informaron que su rendimiento era bueno. Comenzó un programa de rehabilitación y podía comer sin atragantarse.

Los niveles de Glu4 en orina de la paciente aumentaron entre la edad de 4A y 4A2M. Entre la edad de 4A2M y 4A3M, sus niveles de CK mejoraron y sus niveles de NT-proBNP se mantuvieron estables. A 4A3M la paciente había estado usando ATB200/AT2221 durante 64 semanas. En la Tabla 23 pueden encontrarse datos demográficos, hematológicos y bioquímicos para la paciente. Su pauta posológica se mantuvo a 130 mg de AT2221 y ATB200 30 mg/kg c.s. desde 4A3M. Cuando la paciente usaba una ortesis de tobillo y pie, caminaba con paso firme y rápido. Presentaba hipotonía, hipernasalidad y muy buena fuerza en los músculos de la parte inferior de las piernas. Tenía buen agarre de mano y palma. En ese momento, la paciente no había desarrollado ninguna erupción cutánea, disnea, tos ni palidez.

Los niveles de Glu4 en orina de la paciente se mantuvieron estables entre los 4A2M y los 4A4M años. Entre los 4A3M y los 4A4M de edad, sus niveles de CK y NT-proBNP se mantuvieron estables. Los datos demográficos, hematológicos y bioquímicos de la paciente pueden encontrarse en la Tabla 23. A 4A6M de edad, la paciente había estado usando ATB200 durante 78 semanas y había continuado con dosis de 130 mg de AT2221 y ATB200 30 mg/kg c.s. desde 4A3M. Continuó luchando con el uso de ventilación no invasiva durante toda la noche. Cuando caminaba con una ortesis de tobillo y pie, lo hacía con paso firme y rápido. Presentaba hipotonía, hipernasalidad y muy buena fuerza en los músculos de la parte inferior de las piernas. Tenía buen agarre de mano y palma. En ese momento, la paciente no había desarrollado ninguna erupción cutánea, disnea, tos ni palidez.

Después de 52 semanas del tratamiento, la paciente a 4A7M de edad, mostró un ABC y $C_{\text{máx}}$ para ATB200 que estaban dentro del percentil 10-90 del adulto. Para AT2221, el ABC está por debajo del percentil 10 del adulto y la $C_{\text{máx}}$ estaba dentro del percentil 10-90 del adulto.

- 5 Los datos demográficos, hematológicos y bioquímicos de la paciente durante el tiempo que estuvo en tratamiento con Myozyme o ATB200/AT2221 se proporcionan en la Tabla 23.

Tabla 23: Datos demográficos, hematológicos y bioquímicos de la paciente taiwanesa.

	<u>Edad</u>	<u>PC</u> (kg)	<u>CK</u> (U/l)	<u>Pro-BNP</u> (pg/ml)	<u>LVE F</u> (%, 2D)	<u>LVMI</u> (g/m ² , 2D)	<u>Glc4</u> (mmol/mol de CRE)	<u>Dosis</u> <u>Myozyme (M) o</u> <u>ATB200 (A)</u>
10								
15	~1 semana	3.5	880	10169		147 (Mod o M)	41.88	dosis doble 40 mg/kg c.2.s. (M)
	0A1M	4	431-689	545.6-1590			17.45	dosis doble 40 mg/kg c.2.s. (M)
20	0A2M	5.2	148	160.7		69.3 (Mod o M)	21.13	dosis doble 40 mg/kg c.2.s. (M)
	0A3M	6	102	249.2			30.06	dosis doble 40 mg/kg c.2.s. (M)
25	0A4M	6.5-6.7	123		71.1 (Mod o M)	69.1 (Mod o M)	14.29	dosis doble 40 mg/kg c.2.s. (M)
30	0A6M	7.7			71.1 (Mod o M)	76.1 (Mod o M)		dosis doble 40 mg/kg c.2.s. (M)

5	0A7M	7.8	262				29.2	50 mg/kg c.2.s. (M)
	0A8M	8.1	303				13.62	50 mg/kg c.2.s. (M)
	0A9M	8	437			82.9 (Mod o M)	16.63	50 mg/kg c.2.s. (M)
10	1A0M	8.4	1213			81.5 (Mod o M)	8.01	50 mg/kg c.2.s. (M)
	1A1M	9.1	1079					50 mg/kg c.2.s. (M)
	1A2M	8.2	1167					50 mg/kg c.2.s. (M)
15	1A3M	9.6	1474 - 2217					50 mg/kg c.2.s. (M)
	1A5M	10	2514 - 2722				45.13	50 mg/kg c.2.s. (M)
	1A6M	10	1792		70.5	26.2	64.02	60 mg/kg c.2.s. (M)
25	1A7M	10.2	3139				32.46	60 mg/kg c.2.s. (M)
	1A8M	10.8	2502 - 2528				24.9	60 mg/kg c.2.s.(M)
	1A9M	11	3143 - 3625				25.22	60 mg/kg c.2.s. (M)
30	1A10 M	11.2	2550				36.85	60 mg/kg c.2.s. (M)

5	1A11 M	11.9	2665				33.78	60 mg/kg c.2.s. (M)
	2A	12.5	2397 - 2656		61	65.9	42.83	*30 mg/kg c.s. (M) (5/9/2019-23/12) *40 mg/kg c.s. (M) (24/10/2019- 14/10/2020)
	2A6M	14	2603					*30 mg/kg c.s. (M) (5/9/2019-23/12) *40 mg/kg c.s. (M) (24/10/2019- 14/10/2020)
10								
15	2A9M				72.2	45.9		*30 mg/kg c.s. (M) (5/9/2019-23/12) *40 mg/kg c.s. (M) (24/10/2019- 14/10/2020)
20	2A10 M		1817	401. 5			59.85	*30 mg/kg c.s. (M) (5/9/2019-23/12) *40 mg/kg c.s. (M) (24/10/2019- 14/10/2020)
25	3A	16.4	1393 - 1444		41	42	32.58	cambiar a ATB200 20 mg/kg c.2.s.
	3A1M	16.7	1762				25.49	ATB200 20 mg/kg c.2.s.
30	3A2M	17.8	1717	151. 5			39.18	ATB200 20 mg/kg c.2.s.
	3A3M	18.2	1674		61.1	38	50.74	Cambiar ATB200 a 20 mg/kg C.S.

5	3A4M	18.3	1834	36.3			41.53	ATB200 20 mg/kg C.S.
	3A5M	18.3	1524	231. 9			34.85	Cambiar ATB200 a 25 mg/kg C.S.
	3A6M	18.8	922	33.2 4	60.3	43.6	47.66	ATB200 25 mg/kg C.S.
	3A7M	18.8	1687				45.88	ATB200 25 mg/kg C.S.
	3A8M	18.8	1661	180. 6			36.19	Cambiar ATB200 a 30 mg/kg C.S.
10	3A9M	19.1	1574	42	60.3	50.93	38.75	ATB200 30 mg/kg C.S.
15	3A10 M	19.1	1082				25.44	ATB200 30 mg/kg C.S.
	3A11 M	19.1	1304				24.37	ATB200 30 mg/kg C.S.
	4A0M	19.5	1027	42.3 8	50	50.8	25.26	ATB200 30 mg/kg C.S.
20	4A1M	19.5	1277					Cambiar AT2221 a 115 mg C.S.
	4A2M	19.5	1187	44.2 9				AT2221 115 mg C.S.
	4A3M	20.5	1120	45.5 2				ATB200 20 mg/kg, AT2221 130 mg
25	4A4M	20.5	1283				29.08	ATB200 20 mg/kg, AT2221 130 mg
	4A5M	20.5	766					ATB200 20 mg/kg, AT2221 130 mg
30	4A6M	20.6	1146	29.2 5	57	39.1		ATB200 30 mg/kg, AT2221 130 mg

Ejemplo 19: Tratamiento con ATB200/ATB2221 en una paciente pediátrica con IOPD que recibe pretratamiento de inmunomodulación

A 3.5M de edad, la paciente CRIM+ que dio positivo en el cribado para la enfermedad de Pompe es homocigota para la mutación c.1075C>A, p.Gly359Arg. A 3.5M de edad, comenzó un tratamiento quincenal con
5 alglucosidasa alfa (Myozyme®) a una dosis de 25 mg/kg.

A los 2 años de vida, se inició un protocolo de inmunomodulación con rituximab (375 mg/m²) e IVIG (0.5 g/kg). Cuando la paciente tenía 4A3M se añadió metotrexato (375 mg/m², i.v.) al protocolo de inmunomodulación que
10 incluía rituximab e IVIG, y la paciente permaneció con este tratamiento durante 3 años. Después de 1 año de descanso, la paciente tenía 8A y comenzó el mismo protocolo de inmunomodulación (metotrexato, rituximab e IVIG) como segunda ronda de tratamiento de inmunomodulación.

A 9A1M de edad, la paciente comenzó un tratamiento de ventilación no
15 invasiva. También tuvo dos episodios paroxísticos, probablemente convulsiones epilépticas, que se controlaron bien con levetiracetam.

A 10A4M de edad, el paciente comenzó un tratamiento quincenal con ATB200 (20 mg/kg i.v.) y AT2221 (195 mg) a través del programa de acceso ampliado (EAP). Tres meses después, la dosis de AT2221 se ajustó a 130 mg
20 v.o. y el tratamiento de la paciente ahora de 10A7M cambió a administración semanal. La paciente a 11A de edad comenzó la premedicación con ibuprofeno y metilprednisolona antes del tratamiento semanal con ATB200/AT2221, así como un protocolo de inmunomodulación mensual único de rituximab e IVIG.

Datos farmacocinéticos

A 10A7M de edad, se extrajo sangre de la paciente para recoger datos
25 farmacocinéticos (PK) para su tratamiento, que incluía la administración semanal de ATB200 20 mg/kg y 130 mg de AT2221. Al inicio de su tratamiento, cuando tenía 10A7M, la paciente mostraba un ABC y una C_{máx} para ATB200 que eran ambas inferiores al percentil 10 del adulto. Para AT2221, el ABC era inferior al
30 percentil 10 del adulto y la C_{máx} estaba dentro del percentil 10-90 del adulto.

Niveles de Hex4 en orina

Al inicio del tratamiento, cuando la paciente tenía 10A4M, presentaba niveles de Hex4 en orina de 145.55 nmol/mol de creatinina. Después de tres meses de tratamiento, cuando tenía 10A7M, sus niveles de Hex4 en orina se
 5 redujeron a más de la mitad, hasta 59.21 nmol/mol de creatinina.

Mediciones de la escala motora

Al inicio del tratamiento con ATB200/AT2221, cuando la paciente tenía 10A4M, su puntuación global de la Medida de la Función Motora Gruesa-88 (GMFM-88) era de aproximadamente 8, que aumentó de forma constante
 10 durante los 7 meses de tratamiento hasta una puntuación de aproximadamente 15 cuando cumplió 10A11M de edad.

Al inicio de su tratamiento, cuando tenía 10A4M, la paciente se evaluó para GMFM. La paciente obtuvo una puntuación de 14 en su capacidad para completar las acciones de tumbarse y rodar. Después de 7 meses de
 15 tratamiento, su puntuación para tumbarse y rodar aumentó un 47 %, hasta 24, cuando tenía 10A11M de edad.

Al inicio del tratamiento, la paciente de 10A4M recibió una puntuación de 10 por su capacidad para sentarse. Después de 7 meses de tratamiento, su puntuación para sedestación aumentó un 28 %, hasta 17, cuando la paciente
 20 tenía 10A11M de edad.

A 10A4M de edad, la paciente podía mantener los brazos en posición antigravitatoria mientras permanecía tumbada durante aproximadamente 70 segundos al inicio del tratamiento con ATB200/AT2221. Este tiempo aumentó a 900 segundos después de 1A1M del tratamiento cuando la paciente tenía
 25 11A5M. Este valor se mantuvo en 900 segundos después de 1A4M de tratamiento (paciente a 11A8M de edad). La paciente no podía mantener las piernas en posición antigravitatoria (Mingazzini, 45 grados).

Al contabilizar la respiración mientras los brazos de la paciente permanecían en posición antigravitatoria mientras estaba tumbada, la paciente
 30 podía respirar durante 0 segundos después de 6 meses de tratamiento con TB200/AT2221 cuando tenía 10A10M. A 11A4M de edad, este tiempo aumentó a 25 segundos después de 1A de tratamiento, y adicionalmente aumentó a

aproximadamente 34 segundos después de 1A4M de tratamiento con ATB200/AT2221 cuando la paciente tenía 11A8M de edad.

Al inicio del tratamiento con ATB200/AT2221, la paciente a 10A4M no podía montar una bicicleta estática. Después de 9 meses de tratamiento, la
 5 paciente a 11A1M de edad era capaz de montar una bicicleta estática durante 15 minutos. Después de 10 meses de tratamiento, a 11A2M de edad, era capaz de montar una bicicleta estática durante 20 minutos. Su capacidad para montar una bicicleta estática durante 20 minutos se mantuvo después de recibir tratamiento durante 1A4M cuando tenía 11A8M de edad.

10 *Ventilación*

Después de 5 meses de tratamiento con ATB200/AT2221, la paciente a 10A9M requería ventilación no invasiva (NIV) durante 19 horas al día. Su tiempo con NIV se redujo a 13 horas después de 11 meses de tratamiento, cuando la
 15 paciente tenía 11A3M y se mantuvo a 13 horas después del tratamiento con 1A5M cuando la paciente tenía 11A9M.

Después de 11 meses de tratamiento, la paciente a 11A3M era capaz de realizar mediciones espirométricas que antes no podía realizar.

Parámetros de seguimiento

Los progenitores de la paciente explicaron que se había estabilizado y que
 20 su estado general había mejorado con la pauta posológica semanal. Tenía ecografías cardíacas estables y no presentaba alteraciones en los resultados de laboratorio. También logró permanecer en la escuela durante 5 horas sin NIV.

Ejemplo 20: Tratamiento con ATB200/ATB2221 en una paciente pediátrica croata con IOPD

25 A 3M de edad la paciente CRIM- dio positivo en el cribado para la enfermedad de Pompe como que tenía las mutaciones L552P y q757X. A 4M de edad, fue tratada con ERT (alglucosidasa alfa) a 20 mg/kg quincenalmente.

A 12A6M, la paciente comenzó el tratamiento con ATB200 (25 mg/kg) y AT2221 (175 mg) quincenalmente a través del programa de acceso ampliado
 30 (EAP). Su pauta más reciente había sido un tratamiento semanal con ATB200 (25 mg/kg i.v.) y AT2221 (195 mg v.o.), al que cambió cuando tenía 13 años. No había recibido premedicación ni terapia de inmunomodulación y no había

presentado ningún acontecimiento adverso relacionado con el tratamiento. Tampoco necesita ventilación no invasiva (NIV).

Datos farmacocinéticos

Se tomaron muestras de sangre al inicio de su tratamiento con
5 ATB200/AT2221, cuando tenía 12A6M, para recoger datos farmacocinéticos (PK) para su tratamiento, que incluían la administración semanal de ATB200 25 mg/kg y 125 mg de AT2221. En la primera administración, la paciente a 12A6M de edad mostró un ABC y una $C_{\text{máx}}$ tanto para ATB200 como para AT2221 que estaban cada uno dentro del percentil 10-90 del adulto.

10 *Niveles de Hex4 en orina*

Al inicio del tratamiento, la paciente a 12A6M presentaban niveles de Hex4 en orina de 98.18 nmol/mol de creatinina. Después de 1 mes de tratamiento quincenal, a 12A7M de edad, sus niveles de Hex4 en orina se redujeron un 37 % a 61.96 nmol/mol de creatinina. Después de 2 meses de tratamiento quincenal,
15 sus niveles de Hex4 en orina habían aumentado con respecto al punto temporal de 1 mes, pero seguían siendo un 17 % inferiores a sus niveles al inicio del tratamiento, a 12A6M de edad.

Mediciones de la escala motora

A 12A4M, la paciente recibió una puntuación global de Medida de la
20 Función Motora Gruesa-88 (GMFM-88) de 40 dos meses antes del tratamiento quincenal con ATB200/AT2221. Dos meses después de iniciar el tratamiento quincenal (a la edad de 12A6M), la puntuación de GMFM-88 de la paciente a 12A6M de edad, aumentó a aproximadamente 55-58, donde se mantuvo estable después de 6 meses de tratamiento quincenal y 8 meses de tratamiento
25 semanal, cuando la paciente tenía 13A8M.

Dos meses antes de su tratamiento con ATB200/AT2221, la paciente a 12A4M se evaluó para GMFM. La paciente obtuvo una puntuación de 51 en su capacidad para completar las acciones de tumbarse y rodar. Cuando comenzó el tratamiento quincenal, así como 6 meses después, seguido de 8 meses de
30 tratamiento semanal, su puntuación de GMFM para este criterio de valoración se mantuvo en 51 cuando la paciente tenía entre 12A6M y 13A8M de edad.

Dos meses antes del inicio del tratamiento, la paciente a 12A4M de edad recibió una puntuación de 60 por su capacidad para sentarse. Al inicio del tratamiento quincenal, tenía una puntuación de 60 en su capacidad para sentarse, y se mantuvo en ese nivel. Después de 4 meses de tratamiento quincenal, su puntuación se redujo un 15 %, hasta 51, cuando tenía 12A10M. Su puntuación de sedestación se mantuvo en 51 después de 6 meses de tratamiento quincenal, seguido de 8 meses de tratamiento semanal cuando cumplió 13A8M de edad.

Al inicio del tratamiento quincenal, la paciente a 12A6M de edad se evaluó para GMFM. Recibió una puntuación de 31 por su capacidad para gatear y arrodillarse. Después de 4 meses de tratamiento quincenal, esta puntuación aumentó a 35 cuando la paciente tenía 12A10M. Después de 6 meses de tratamiento quincenal y 8 meses de tratamiento semanal, su puntuación para gatear y arrodillarse aumentó a 39 cuando la paciente tenía 13A8M.

A 12A9M de edad, el tiempo que la paciente podía mantener los brazos en posición antigravitatoria mientras estaba tumbada era de aproximadamente 2 minutos después de 3 meses de tratamiento con ATB200/AT2221 quincenalmente. Después de 4 meses de tratamiento quincenal, la paciente a 12A10M de edad podía mantener los brazos en una posición antigravitatoria durante 3.5 minutos. Después de 5 meses de tratamiento quincenal, la paciente a 12A11M de edad podía mantener los brazos en una posición antigravitatoria durante 2 minutos y 40 segundos. Después de 6 meses de tratamiento quincenal seguido de 4 meses de tratamiento semanal, la paciente a 13A4M de edad podía mantener los brazos levantados durante 3 minutos y 17 segundos. Después de 6 meses de tratamiento quincenal seguido de 5 meses de tratamiento semanal, la paciente a 13A5M podía mantener los brazos levantados durante 1 minuto y 40 segundos. Después de 6 meses de tratamiento quincenal seguido de 6 meses de tratamiento semanal, la paciente a 13A6M de edad podía mantener los brazos levantados durante 5 minutos y 25 segundos. El tiempo que la paciente a 13A9M de edad el tiempo podía mantener los brazos levantados después de 6 meses de tratamiento quincenal seguido de 9 meses de tratamiento semanal era de 3 minutos y 20 segundos.

Después de 3 meses de tratamiento quincenal, la paciente a 12A9M podía mantener las piernas en una posición antigravitatoria (Mingazzini, 45 grados) durante 10 segundos. La paciente podía aumentar este tiempo a 14 segundos después de 4 meses de tratamiento quincenal cuando tenía 12A10M. Después de 5 meses de tratamiento quincenal, la paciente a 12A11M de edad podía mantener las piernas levantadas durante 28 segundos. Después de 6 meses de tratamiento quincenal seguido de 2 meses de tratamiento semanal, la paciente a 13A2M podía mantener las piernas levantadas durante 3 minutos y 20 segundos. El tiempo que la paciente a 13A4M podía mantener las piernas en posición antigravitatoria después de 6 meses de tratamiento quincenal seguido de 4 meses de tratamiento semanal era de 5 minutos y 50 segundos. En esta ocasión, el tiempo se elevó a 14 minutos y 10 segundos después de 6 meses de tratamiento quincenal seguido de 5 meses de tratamiento semanal en la paciente que en ese momento tenía 13A5M de edad. Después de 6 meses de tratamiento quincenal seguido de 7 meses de tratamiento semanal durante 1A1M de tratamiento, el tiempo que la paciente a 13A7M de edad pudo mantener sus piernas en el aire era de 22 minutos y 30 segundos. Después de 6 meses de tratamiento quincenal seguido de 9 meses de tratamiento semanal, esta vez se redujo a 15 minutos y 50 segundos en la paciente a 13A9M de edad.

Al contabilizar la respiración mientras los brazos de la paciente permanecían en posición antigravitatoria mientras estaba tumbada, la paciente a 12A9M podía respirar durante 10 segundos después de 3 meses de tratamiento con ATB200/AT2221 quincenalmente. Esto se duplicó a 20 segundos después de 4 meses de tratamiento quincenal en la paciente que tenía 12A10M, y adicionalmente aumentó a 32 segundos después de 5 meses de tratamiento quincenal con ATB200/AT2221 cuando tenía 12A11M. Después de 6 meses de tratamiento quincenal seguido de 2 meses de tratamiento semanal, la paciente a 13A2M podía respirar durante 48 segundos. Después de 6 meses de tratamiento quincenal seguido de 4 meses de tratamiento semanal, la cantidad de tiempo que la paciente a 13A4M de edad podía respirar se redujo a 35 segundos. Sin embargo, después de 6 meses de tratamiento quincenal seguido de 6 meses de tratamiento semanal, la paciente a 13A6M podía respirar

durante 1 minuto y 30 segundos. Este tiempo se redujo a 40 segundos después de 6 meses de tratamiento quincenal y 9 meses de tratamiento semanal en la paciente que tenía 13A9M de edad.

Después de 4 meses de tratamiento quincenal con ATB200/AT2221, la paciente a 12A10M era capaz de montar una bicicleta estática durante 6 minutos. Después de 5 meses de tratamiento quincenal, el tiempo que la paciente pasaba montando una bicicleta estática aumentó a 10 minutos en la paciente a 12A11M de edad. El tiempo que la paciente a 13A2M pudo montar en bicicleta después de 6 meses de tratamiento quincenal seguido de 2 meses de tratamiento semanal aumentó a 22 minutos. Se produjo otro pico de tiempo después de 6 meses de tratamiento quincenal seguido de 4 meses de tratamiento semanal de 25 minutos para la paciente a 13A4M de edad. Después de 6 meses de tratamiento quincenal y 8 meses de tratamiento semanal, la paciente a 13A8M podía montar una bicicleta estática durante 27 minutos.

15 *Parámetros de seguimiento*

Los progenitores de la paciente explicaron que se había estabilizado y que su estado general había mejorado mientras seguía la pauta posológica semanal. Sus ecografías cardíacas eran estables y no tenían alteraciones en los resultados de laboratorio. Sus observaciones personales y las de sus padres divulgaron que tiene mucha más energía durante el día con la dosis semanal.

Ejemplo 21: Tratamiento con ATB200/ATB2221 en una paciente pediátrica estadounidense con IOPD

Una paciente de 7M de edad CRIM+ dio positivo en el cribado para la enfermedad de Pompe como que tenía las siguientes mutaciones: alelo 1 c.1396delG, alelo 2 c.1705dupT. A 8M de edad, inició un tratamiento con alglucosidasa alfa (Myozyme®) a 20 mg/kg. A 3A9M, el paciente cambió de terapia con ERT a Lumizyme a 40 mg/kg (950 mg) semanalmente.

A 12A de edad, el paciente comenzó el tratamiento con ATB200 (25 mg/kg) y AT2221 (195 mg) quincenalmente a través del programa de acceso ampliado (EAP). Comenzó con infusiones en su domicilio a 13A3M de edad. A partir de enero de 2022, a la edad de 13A6M, la paciente completó 39 dosis. Se

sigue analizando la posibilidad de ajustar la dosis quincenal a una pauta semanal.

Datos farmacocinéticos

Se realizó un muestreo de sangre de la paciente a 12A de edad para
 5 recopilar datos farmacocinéticos (PK) para su tratamiento, que incluía la
 administración de ATB200 25 mg/kg y 195 mg de AT2221 quincenalmente. En
 el momento basal del tratamiento, la paciente a 12A de edad mostró un ABC y
 una $C_{\text{máx}}$ para ATB200 que eran ambas inferiores al percentil 10 del adulto. Para
 AT2221, el ABC y la $C_{\text{máx}}$ estaban por encima del percentil 90 del adulto.

10 **Ejemplo 22: Tratamiento con ATB200/ATB2221 en un paciente pediátrico masculino con IOPD atípica**

Un paciente masculino de 2A10M de 47 kg dio positivo en el cribado para
 la IOPD atípica que tenía la mutación:
 c.1781G>A(p.R594H)/c.1935C>A(p.D645E). A 3Y1M de edad, inició un
 15 tratamiento quincenal con alglucosidasa alfa (Myozyme®) a 20 mg/kg.

A 7A6M de edad, cambió a una administración semanal de Myozyme,
 continuando con la misma dosis (20 mg/kg). La dosis de Myozyme administrada
 al paciente se redujo a 18.5 mg/kg semanales cuando tenía 8A5M de edad.
 Cuando el paciente tenía la edad de 9A4M, su tratamiento con Myozyme se
 20 redujo de nuevo a 16.3 mg/kg para un tratamiento semanal. Cuatro meses
 después, cuando el paciente tenía 9A8M, su tratamiento semanal con Myozyme
 aumentó a una dosis de 20 mg/kg.

A 11A5M de edad, el paciente comenzó el tratamiento con ATB200
 (20 mg/kg) y AT2221 (195 mg) quincenalmente.

25 Al inicio del tratamiento con ATB200/AT2221, y con poca frecuencia
 durante el año siguiente, se midieron los niveles de títulos de anticuerpos anti-
 rhGAA en el paciente. Estos niveles aumentaron en general a lo largo del año.
 En la Tabla 24 se proporcionan niveles exactos de títulos de anticuerpos anti-
 rhGAA.

Tabla 24: Niveles de títulos de anticuerpos anti-rhGAA para el paciente masculino con IOPD atípica.

	Edad del paciente	Tiempo de tratamiento con ATB200/AT2221	Niveles de títulos de Ab anti-rhGAA
5	11A5M	1 día	102400
	11A6M	4 semanas	102400
	11A6M	6 semanas	102400
	11A8M	3 meses	204800
	11A11M	6 meses	406900
10	12A5M	12 meses	3276800

A 12A5M de edad, el paciente ha estado recibiendo ATB200 (20 mg/kg) y AT2221 (195 mg) quincenalmente durante 1 año. En ese momento, el paciente pesaba 46.5 kg. En ese momento, se tomaron los niveles de PK tanto de ATB200 como de AT2221 del paciente. Los niveles de ABC y $C_{\text{máx}}$ para ATB200 están dentro del percentil 10-90 del adulto y cerca de la mediana del adulto. El ABC para AT2221 estaba por debajo del percentil 10 del adulto pero la $C_{\text{máx}}$ para AT2221 estaba justo dentro del percentil 10 del adulto mínimo. En la Tabla 25 se proporcionan niveles de ABC y $C_{\text{máx}}$ de ATB200 y AT2221 para el paciente.

Tabla 25: Niveles de ABC y $C_{\text{máx}}$ para ATB200 y AT2221 después de 1 año de tratamiento en el paciente masculino con IPOD atípica.

	Sujeto	ABC de ATB200 ($\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{ml}$)	$C_{\text{máx}}$ de ATB200 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	ABC de AT2221 ($\text{ng}\cdot\text{h}/\text{ml}$)	$C_{\text{máx}}$ de AT2221 (ng/ml)
25	Paciente con IOPD atípica	1257	245	14501	1811
	Adulto (mediana)	1415	294	20475	2377
	Adulto (percentil 10-90)	1001-1924	223-363	16097-24628	1801-3132

Ejemplo 23: Formulaciones líquidas de miglustat

Se prepararon cuatro formulaciones diferentes de solución oral de miglustat 40 mg/ml. Los participantes en el estudio en seres humanos se aleatorizaron a uno de los tres grupos de ensayo. Se fabricaron dos lotes de

prototipos (Prototipo 1 y Prototipo 4) usando los mismos excipientes con diferentes concentraciones de dihidrato de citrato de sodio y monohidrato de ácido cítrico. Los 2 lotes de prototipos restantes (Prototipo 2 y Prototipo 3) contenían excipientes adicionales tales como hipromelosa y aroma de bayas mixtas.

Las formulaciones para los lotes de prototipos a escala de laboratorio se esbozan en la Tabla 26.

Tabla 26: Formulaciones líquidas de miglustat

10	Componen te	Funcionali dad	Prototipo 1		Prototipo 2		Prototipo 3		Prototipo 4	
			mg/ ml	% (p/ v)	mg/ ml	% (p/ v)	mg/ ml	% (p/ v)	mg/ ml	% (p/ v)
15	Miglustat	Sustancia farmacológi ca	40	4.0 0	40	4.0 0	40	4.0 0	40	4.0 0
	Citrato de sodio USP/Ph. Eur. (Dihidrato)	Agente tamponante	6.52 4	0.6 5	6.52 4	0.6 5	6.52 4	0.6 5	8.38 8	0.8 4
25	Ácido cítrico Monohidra to USP/Ph. Eur.	Agente tamponante	2.69 3	0.2 7	2.69 3	0.2 7	2.69 3	0.2 7	3.46 3	0.3 5
	Hipromelos a USP/EP/J P	Agente espesante	---	---	15	1.5	15	1.5	---	---

5	Sucralosa NF/Ph. Eur.	Edulcorante	2	0.2 0	2	0.2 0	2	0.2 0	2	0.2 0
	Sorbato de potasio NF	Conservante	2	0.2 0	2	0.2 0	2	0.2 0	2	0.2 0
	Aroma (Bayas mixtas)	Aroma	---	---	---	---	2	0.2 0	---	---
10	Agua purificada USP/Ph. Eur.	Vehículo	c.s.p .	---	c.s.p .	---	c.s.p .	---	c.s.p .	---
15	Ácido clorhídrico	Modificador del pH	Para un ajuste del pH a 5.0 ± 0.5							
	Hidróxido de sodio	Modificador del pH	Para un ajuste del pH a 5.0 ± 0.5							

20 *Resultados PK de soluciones orales de 4 formulaciones de prototipos con respecto al contenido de las cápsulas sometidas a ensayo en conejos*

25 Se realizaron estudios previos para la selección de formulaciones de prototipos pediátricas en el conejo para la selección y el avance a su uso en seres humanos. Dos grupos de 8 conejos machos recibieron AT221 (65 mg) por vía oral mediante sonda gástrica en ayunas, con un intervalo de reposo farmacológico de 4 días entre dosis. Al grupo 1 se le administraron cápsulas del prototipo 1 o del prototipo 2, mientras que al grupo 2 se le administraron cápsulas del prototipo 3 o del prototipo 4. Se tomaron muestras de sangre de cada animal del estudio para determinar las concentraciones plasmáticas de miglustat en diversos puntos temporales: Predosis (tiempo 0), 0.5 horas (h), 1 h, 2 h, 3 h, 4 h, 6 h, 10 h y 24 h después de la dosis. Al analizar la concentración (media y DE) de miglustat en los conejos durante 24 horas, los datos de los presentes inventores sugieren que los prototipos 3 y 4 son más similares a la cápsula que

los prototipos 1 y 2. Esto se muestra en la FIG. 73 y como datos transformados logarítmicamente en la FIG. 74. Como se esboza en la Tabla 27, aunque la velocidad de absorción entre los prototipos 1 y 2 era similar, ninguno de los prototipos era bioequivalente a la $C_{\text{máx}}$ o el ABC de la cápsula después de 1 hora de exposición. Como se muestra también en la Tabla 27, la velocidad de absorción entre los prototipos 3 y 4 era similar entre las formulaciones y ambos prototipos eran bioequivalentes a la $C_{\text{máx}}$ o el ABC de la cápsula después de 1 hora de exposición, especialmente el prototipo 4.

Tabla 27: Evaluación de la formulación de prototipo pediátrica de miglustat en conejos

<u>Tratamiento</u>	<u>$C_{\text{máx}}$ (ng/ml)</u>	<u>ABC_{0-t} (ng*h/ml)</u>	<u>$ABC_{0-\infty}$ (ng*h/ml)</u>
Cápsula (Grupo 1)	7574 (21.4)	19589 (9.6)	19898 (9.3)
Prototipo 1	9769 (27.4)	23043 (14.2)	23497 (13.9)
Prototipo 2	7902 (29.2)	22538 (18.1)	22918 (17.7)
Cápsula (Grupo 2)	9254 (23)	22656 (15.9)	23102 (16.8)
Prototipo 3	9702 (22.8)	23829 (17.8)	24258 (17.7)
Prototipo 4	9525 (22.5)	23263 (16.3)	23845 (18)

Los datos de estabilidad para la solución oral de AT2221 (40 mg/ml) se esbozan en la Tabla 28. Se encontró una estabilidad aceptable en los 4 prototipos, con una estabilidad aparentemente mayor en los prototipos 3 y 4.

Tabla 28: Datos de estabilidad de la formulación de solución oral de miglustat

Solución oral de AT2221, 40 mg/ml					
	T₀	1M		3M	
	Ensayo	Ensayo	Ensayo	Ensayo	Ensayo
Prototipo		25 °C/HR del 60 %	40 °C/HR del 75 %	25 °C/HR del 60 %	40 °C/HR del 75 %
N.º 1 (Citrato Na 35 nM)	91.2	92.9	93.1	88.4	87.9
N.º 2 (espesante)	89.9	91.2	92.2	86.9	85.7
N.º 3	93.1	88.9	89.1	90	89.3

5 formulaciones líquidas

10 recibieron una dosis de 260 mg de miglustat con prototipos 3 y 4, respectivamente ($40 \text{ mg/ml} \times 65 \text{ ml} = 260 \text{ mg}$). Los participantes recibieron la dosis los días 1, 4 y 7, con un período de reposo farmacológico de 72 horas. Se tomaron muestras de sangre periódicamente.

15 y concentraciones de media $\pm$ DE transformadas logarítmicamente de miglustat (ng/ml) en seres humanos para los prototipos 3 o 4 para la dosis de 260 mg; en la Fig. 76 se muestran datos para la dosis de 1040 mg. En la Fig. 77 se muestra un diagrama de resumen de PK de proporcionalidad de dosis para la comparación de la concentración media de miglustat (ng/ml) durante 72 horas

20 en seres humanos después de la administración del prototipo 3 o 4 a una dosis de 260 mg o 1040 mg. En la Tabla 29 se muestran datos PK. En la Tabla 30 se muestra un análisis de ANOVA entre la cápsula y las formulaciones de prototipos 3 o 4 para la dosis de 260 mg. Se demuestra que ambas dosis de los prototipos 3 y 4 tienen perfiles PK similares a los de la dosis de la cápsula de referencia.

25 $C_{m\acute{a}x}$, ABC_{0-t} y $ABC_{0-\infty}$ muestran todas bioequivalencia entre dosis de los prototipos 3 y 4 y la dosis de cápsula de referencia. Basándose en los resultados de ANOVA, el prototipo 3 muestra una mejor bioequivalencia con respecto a la dosis de la cápsula de referencia.

Tabla 29: Datos de resumen de PK

[illegible]

5	Cápsula	2947 (26.6)	2.8 (1 - 4)	26610 (18.8)	26763 (18.7)	9.8 (18.6)	9.9 (19.6)	141 (32.2)
	Prototipo 3	3081 (27.4)	2 (1 - 4)	26252 (19.8)	26401 (19.7)	9.6 (20.9)	10 (20.5)	140 (31.7)
	Prototipo 4	2971 (30.2)	2 (1 - 4)	25421 (22.5)	25566 (22.4)	10.1 (15.8)	10.4 (24.9)	140 (31.7)
10	Resumen de PK de 1040 mg							
15	Prototipo 3	9824 (22.5)	3 (2.5 - 4)	91264 (11.4)	92271 (10.6)	10.7 (25.2)	11.3 (10.7)	176 (33.6)
	Prototipo 4	10329 (41.3)	2.5 (2.5 - 4)	92187 (17.5)	92846 (17.2)	10 (22.4)	11.3 (16.6)	165 (32.9)
	Relación de resumen de PK de 1040 mg frente a 260 mg							
20	Prototipo 3	3.6		3.7	3.7			
	Prototipo 4	3.8		3.8	3.8			

Tabla 30: Resultados de ANOVA de 260 mg

25	<u>Parámetro</u> <u>PK</u>	<u>GeoLSM</u> <u>de ref</u> <u>(Cápsula)</u>	<u>Prototipo</u>	<u>GeoLSM</u> <u>de ensayo</u>	<u>Estimación</u> <u>de puntos</u> <u>(% de</u> <u>relación de</u> <u>ref)</u>	<u>IC del</u> <u>90 %</u>
	C_{máx}	2947	3	3041	103.2	(98, 108.7)
30	C_{máx}	2947	4	2971	100.8	(95.8, 106.1)
	ABC_{0-t}	26610	3	26020	97.8	(95.1, 100.5)
	ABC_{0-t}	26610	4	25421	95.5	(93, 98.2)

ABC_{0-∞}	26763	3	26166	97.8	(95.2, 100.5)
ABC_{0-∞}	26763	4	25566	95.5	(93, 98.1)

- Se hace constar que con relación a esta fecha, el mejor método conocido por la solicitante para llevar a la práctica la citada invención, es el que resulta claro de la presente descripción de la invención.

10

15

20

25

30