

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 017 134**

51 Int. Cl.:

C12N 5/07 (2010.01)

C12N 5/10 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

C12N 9/40 (2006.01)

C12N 15/09 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.09.2015** **E 23191307 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.12.2024** **EP 4273241**

54 Título: **Alfa-glucosidasa ácida altamente potente con hidratos de carbono potenciados**

30 Prioridad:

30.09.2014 US 201462057842 P

30.09.2014 US 201462057847 P

05.02.2015 US 201562112463 P

19.03.2015 US 201562135345 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
12.05.2025

73 Titular/es:

AMICUS THERAPEUTICS, INC. (100.00%)
3675 Market Street
Philadelphia, PA 19104, US

72 Inventor/es:

GOTSCHALL, RUSSELL y
DO, HUNG

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 3 017 134 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Alfa-glucosidasa ácida altamente potente con hidratos de carbono potenciados

5 **ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN****Campo de la invención**

La presente invención implica los campos de la medicina, la genética y la bioquímica de glicoproteínas recombinantes y, específicamente, se refiere a composiciones de alfa-glucosidasa humana recombinante (rhGAA) que tienen un contenido total mayor de glicanos que portan manosa-6-fosfato que seleccionan como diana de manera eficiente CIMPR en células musculares y posteriormente suministran rhGAA a los lisosomas, donde puede romper los niveles anómalamente altos de glucógeno acumulado. La rhGAA de la invención presenta un direccionamiento superior a células musculares y un suministro posterior a lisosomas en comparación con los productos de rhGAA convencionales y presenta otras propiedades farmacocinéticas que la hacen particularmente efectiva para la terapia de reemplazo enzimático de sujetos que tienen la enfermedad de Pompe.

Descripción de la técnica relacionada

Las terapias de reemplazo enzimático existentes para la enfermedad de Pompe usan productos de rhGAA convencionales que tienen un contenido total bajo de glicanos que portan M6P y bis-M6P. Los productos convencionales se conocen bajo los nombres Lumizyme®, Myozyme® y alglucosidasa alfa. "Lumizyme" y "Myozyme" son formas convencionales de rhGAA producidas o comercializadas como productos biológicos por Genzyme y aprobadas por la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos y se describen mediante la referencia al vademécum (2014) o mediante los productos denominados "Lumizyme"® o "Myozyme"® aprobados para su uso en los Estados Unidos por la FDA desde el 1 de octubre de 2014. Alglucosidasa alfa se identifica como el nombre químico [199-arginina,223-histidina]prepro-α-glucosidasa (humana); fórmula molecular, C₄₇₅₈H₇₂₆₂N₁₂₇₄O₁₃₆₉S₃₅; número CAS 420794-05-0. Estos productos se administran a sujetos con la enfermedad de Pompe, también conocida como enfermedad de almacenamiento de glucógeno tipo II (GSD-II, por sus siglas en inglés) o enfermedad por deficiencia de maltasa ácida. La terapia de reemplazo enzimático pretende tratar la enfermedad de Pompe reemplazando la GAA ausente en lisosomas administrando rhGAA, restaurando así la capacidad de la célula de romper el glucógeno lisosomal.

La enfermedad de Pompe es una enfermedad de almacenamiento lisosomal heredada que resulta 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 de o tiene niveles reducidos de alfa-glucosidasa ácida (GAA), la enzima que rompe el glucógeno, y una sustancia que usa el cuerpo como fuente de energía. Esta deficiencia enzimática provoca una acumulación excesiva de glucógeno en los lisosomas, que son orgánulos intracelulares que contienen enzimas que normalmente descomponen el glucógeno y otros desechos o productos de desecho celulares. La acumulación de glucógeno en determinados tejidos de un sujeto que padece la enfermedad de Pompe, especialmente en los músculos, deteriora la capacidad de las células de funcionar normalmente. En la enfermedad de Pompe, el glucógeno no se metaboliza adecuadamente y se acumula progresivamente en los lisosomas, especialmente en las células del músculo esquelético y, en la forma de aparición infantil de la enfermedad, en las células del músculo cardíaco. La acumulación de glucógeno daña las células musculares y nerviosas, así como aquellas en otros tejidos afectados.

Tradicionalmente, dependiendo de la edad de inicio, la enfermedad de Pompe se reconoce clínicamente como una forma infantil temprana o como una forma de aparición tardía. La edad de la aparición tiende a ser paralela a la gravedad de la mutación genética que provoca la enfermedad de Pompe. Las mutaciones genéticas más graves provocan una pérdida completa de actividad GAA manifiesta como enfermedad de aparición prematura durante la infancia. Las mutaciones genéticas que disminuyen la actividad de GAA, pero no la eliminan por completo están asociadas con formas de la enfermedad de Pompe que tienen una aparición y una progresión retardadas. La enfermedad de Pompe de aparición infantil se manifiesta poco después del nacimiento y se caracteriza por debilidad muscular, insuficiencia respiratoria e insuficiencia cardíaca. Sin tratamiento, por lo general es fatal en el espacio de dos años. La enfermedad de Pompe de aparición juvenil y adulta se manifiesta más tarde en la vida y habitualmente progresa más lentamente que la enfermedad de aparición infantil. Esta forma de la enfermedad, si bien generalmente no afecta al corazón, también puede provocar la muerte debido al debilitamiento de los músculos esqueléticos y de los implicados en la respiración.

El tratamiento no paliativo actual de la enfermedad de Pompe implica la terapia de reemplazo enzimático (ERT) que usa GAA humana recombinante (rhGAA) tal como Lumizyme® o Myozyme®. La rhGAA se administra en un intento por reemplazar o suplementar la GAA ausente o defectuosa en un sujeto que tiene la enfermedad de Pompe. Sin embargo, dado que la mayoría de la rhGAA en los productos de rhGAA convencionales no selecciona como diana el tejido muscular, se elimina de manera no productiva tras la administración.

Esto sucede porque las rhGAA convencionales carecen de un contenido total alto de glicanos que portan M6P y bis-M6P que dirijan una molécula de rhGAA al CIMPR en células musculares diana, donde se transporta posteriormente

al interior de los lisosomas de la célula. Esta absorción celular de rhGAA para la terapia de reemplazo enzimático es facilitada por el hidrato de carbono especializado, manosa-6-fosfato (M6P), que se une al receptor de manosa-6-fosfato independiente de catión (CIMPR) presente en las superficies celulares para el suministro posterior de la enzima exógena a los lisosomas.

Hay siete sitios potenciales de glicosilación ligados a N en rhGAA. Dado que cada sitio de glicosilación es heterogéneo en el tipo de oligosacáridos ligados a N (N-glicanos) presentes, la rhGAA consiste en una mezcla compleja de proteínas con N-glicanos que tienen afinidades de unión variables para el receptor de M6P y otros receptores de hidratos de carbono. La rhGAA que contiene N-glicanos con alto contenido de manosa que tienen un grupo M6P (mono-M6P) se une al CIMPR con afinidad baja (~6.000 nM), mientras que la rhGAA que contiene dos grupos M6P en el mismo N-glicano (bis-M6P) se une con afinidad alta (~2 nM). Estructuras representativas para glicanos mono-M6P y bis-M6P, no fosforilados, se muestran mediante la Fig. 1A. El grupo manosa-6-P se muestra mediante la Fig. 1B. Una vez dentro del lisosoma, la rhGAA puede degradar enzimáticamente el glucógeno acumulado. Sin embargo, las rhGAA convencionales tienen niveles totales bajos de glicanos que portan M6P y bis-M6P y, por tanto, seleccionan como diana las células musculares pobremente 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, por lo que carecen de afinidad por el CIMPR. Los glicanos con alto contenido de manosa no fosforilados pueden aclararse también mediante el receptor de manosa, lo que da como resultado un aclaramiento no productivo de la ERT (Fig. 2).

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

La glicosilación de GAA o rhGAA puede modificarse enzimáticamente *in vitro* mediante la fosfotransferasa y las enzimas de descubrimiento descritas por Canfield, et al., patente estadounidense n.º 6.534.300, para generar grupos M6P. La glicosilación enzimática no puede controlarse de manera adecuada y produce rhGAA que tiene propiedades inmunológicas y farmacológicas no deseables. La rhGAA modificada enzimáticamente puede contener solo N-glicanos con alto contenido de manosa que podrían todos potencialmente fosforilarse enzimáticamente *in vitro* con una enzima fosfotransferasa/de descubrimiento y puede contener en promedio 5-6 grupos M6P por GAA. Los patrones de glicosilación producido mediante el tratamiento enzimático *in vitro* de GAA son problemáticos porque los residuos manosa terminales adicionales, particularmente los residuos manosa terminales no fosforilados, afectan negativamente a la farmacocinética de la rhGAA modificada. Cuando un producto modificado enzimáticamente 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 mediante células inmunitarias y reducen la eficacia terapéutica de la rhGAA debido a que menos de la GAA alcanza tejidos seleccionados como diana, tales como miocitos de músculos cardíacos o esqueléticos. Por ejemplo, residuos terminales de manosa no fosforilados son ligandos conocidos para los receptores de manosa en el hígado y el bazo, lo que conduce a un aclaramiento rápido de la rhGAA modificada enzimáticamente y una fijación de objetivo reducida de la rhGAA al tejido diana. Además, el patrón de glicosilación de GAA modificada enzimáticamente que tiene N-glicanos con alto contenido de manosa con residuos manos no fosforilados terminales se asemeja al de glicoproteínas producidas en levaduras, mohos y funcionan aumentando el riesgo de desencadenar respuestas inmunes o alérgicas, tales como reacciones de hipersensibilidad o alérgicas (anafílicas) graves potencialmente mortales, para la rhGAA modificada enzimáticamente.

Como se ha explicado anteriormente, los productos de rhGAA convencionales tales como Lumizyme® tienen niveles bajos de glicanos monofosforilados y glicanos bisfosforilados incluso menores. Con el fin de que una terapia para la enfermedad de Pompe sea eficaz, la rhGAA tiene que suministrarse a los lisosomas en células musculares. La cantidad total baja de grupos de selección como diana de mono-M6P y bis-M6P en rhGAA convencional limita la absorción celular por medio del CIMPR y el suministro lisosomal, haciendo por tanto que la terapia de reemplazo enzimático convencional sea ineficiente. Por ejemplo, aunque los productos de rhGAA convencionales a 20 mg/kg o dosis mayores mejoran algunos aspectos de la enfermedad de Pompe, no son capaces de reducir adecuadamente el glucógeno acumulado en muchos tejidos diana, particularmente músculos esqueléticos para invertir la progresión de la enfermedad.

Debido a la ineficiencia de suministrar terapias de reemplazo enzimático convencionales a los lisosomas, tales terapias están asociadas a menudo con otros problemas, incluyendo la generación de respuestas inmunitarias a GAA. Una gran porción de la GAA en una rhGAA convencional no contiene glicanos que portan mono- o bis-M6P, que direccionan la rhGAA a células musculares. El sistema inmune de un sujeto está expuesto a esta GAA no fosforilada en exceso y puede generar respuestas inmunitarias perjudiciales que reconocen GAA. La inducción de respuestas inmunitarias a la GAA no fosforilada que no entra en los tejidos diana y se suministra a los lisosomas aumenta el riesgo de fallo del tratamiento debido a la inactivación inmunológica de la rhGAA administrada y aumenta el riesgo de que el paciente experimente reacciones autoinmunes o alérgicas perjudiciales al tratamiento con rhGAA. La rhGAA según la invención como se define en las reivindicaciones contiene significativamente menos de esta rhGAA no fosforilada, no direccionada, reduciendo así la exposición del sistema inmune de un paciente a la misma.

Logísticamente, dosis más grandes imponen cargas adicionales al sujeto, así como a los profesionales médicos que tratan al sujeto, tal como el alargamiento del tiempo de infusión necesario para administrar rhGAA por vía intravenosa. Esto se debe a que las rhGAA convencionales contienen un contenido mayor de rhGAA no fosforilada que no selecciona como diana el CIMPR en células musculares. La rhGAA que no se une al CIMPR en células musculares y entonces entra en el lisosoma no degrada enzimáticamente el glicógeno en el mismo. Cuando se administran dosis equivalentes de una rhGAA convencional y la rhGAA según la invención como se define en las reivindicaciones, más rhGAA en la composición según la invención como se define en las reivindicaciones se une a CIMPR en células musculares y entonces se suministra al lisosoma. La rhGAA de la invención como se define en las reivindicaciones proporciona a un doctor la opción de administrar una cantidad menor de rhGAA al tiempo que se suministra lo mismo o más de rhGAA al lisosoma.

Los procesos de fabricación actuales usados para elaborar rhGAA convencional, tal como Myozyme®, Lumizyme® o alglucosidasa alfa, no han aumentado significativamente el contenido de M6P o bis-M6P debido a que el procesamiento de hidratos de carbono celular es complejo de manera natural y extremadamente difícil de manipular. En vista de estas deficiencias de los productos de rhGAA convencionales, los inventores han buscado diligentemente e identificado modos para direccionar eficientemente rhGAA a células musculares y suministrarla al lisosoma, minimizar el aclaramiento no productivo de rhGAA una vez administrada y por tanto direccionar de manera más productiva rhGAA a tejido muscular.

McVie-Wylie A J et al.; Mol Genet Metab; agosto de 2008; 94(4) :448-455; doi: 10.1016/J.ymgme.2008.04.009; desvela la caracterización bioquímica y farmacológica de diferentes preparados de alfa-glucosidasa recombinante evaluados para el tratamiento de enfermedad de Pompe.

BREVE SUMARIO DE LA INVENCION

La presente invención se define en las reivindicaciones.

Referencias en el presente documento a métodos de tratamiento del cuerpo humano o animal mediante cirugía o terapia se deben interpretar como referencias a compuestos, composiciones y medicamentos para su uso en aquellos métodos.

En respuesta a los problemas asociados con el direccionamiento y la administración de formas convencionales de rhGAA y a las dificultades asociadas con la producción de dichas formas bien direccionadas de rhGAA, los inventores han investigado y desarrollado procedimientos para elaborar rhGAA que selecciona como diana más eficientemente el CIMPR y la suministran a lisosomas en tejidos musculares debido a que tiene un contenido mayor de glicano M6P y bis-M6P que las composiciones de rhGAA convencionales. Además, la rhGAA de la invención como se define en las reivindicaciones tiene N-glicanos de tipo complejo bien procesados que minimizan el aclaramiento no productivo de la rhGAA mediante tejidos no diana.

Teniendo en cuenta los problemas asociados con los tratamientos de reemplazo enzimático actuales que usan productos de rhGAA convencionales, tales como Lumizyme®, a través de un estudio y una investigación diligentes, los inventores han desarrollado un método de producción de rhGAA en células CHO que tienen un contenido total significativamente mayor de glicanos mono-M6P y bis-M6P que seleccionan como diana CIMPR en células musculares y entonces suministran la rhGAA a los lisosomas.

La rhGAA producida mediante este método también tiene propiedades farmacocinéticas ventajosas en virtud de su patrón de glicosilación global que aumenta la absorción en el tejido diana y disminuye el aclaramiento no productivo tras la administración a un sujeto que tiene enfermedad de Pompe. Los inventores muestran que la rhGAA de la invención como se define en las reivindicaciones, tal como se ejemplifica mediante la rhGAA designada ATB-200, es más potente en y más eficiente a la hora de seleccionar como diana tejidos musculares esqueléticos que la rhGAA convencional tal como Lumizyme®. La rhGAA según la invención como se define en las reivindicaciones tiene una capacidad superior para seleccionar como diana de manera productiva tejidos musculares en pacientes que tienen la enfermedad de Pompe y reducir el aclaramiento no productivo de rhGAA tal como se ilustra mediante la Fig. 2.

La rhGAA superior según la invención como se define en las reivindicaciones puede completarse adicionalmente o combinarse con chaperonas o conjugarse con otros grupos que seleccionan como diana el CIMPR en tejido muscular, tal como porciones de IGF2 que se unen a este receptor. Los Ejemplos más adelante muestran que la rhGAA de la invención, como se define en las reivindicaciones ejemplificada mediante rhGAA ATB-200, supera el tratamiento de referencia existente para terapia de reemplazo enzimático proporcionando un aclaramiento de glicógeno significativamente mejor en músculo esquelético en comparación con el régimen existente que usa el producto de rhGAA convencional Lumizyme®.

BREVE DESCRIPCION DE LOS DIBUJOS

El presente archivo de solicitud contiene al menos un dibujo realizado en color.

- Fig. 1 La Fig. 1A muestra un glicano con alto contenido de manosa no fosforilada, un glicano mono-M6P y un glicano bis-M6P. La Fig. 1B muestra la estructura química del grupo M6P.
- Fig. 2 La Fig. 2A describe el direccionamiento productivo de rhGAA por medio de glicanos que portan M6P a tejidos diana (por ejemplo, tejidos musculares de un sujeto con enfermedad de Pompe). La Fig. 2B describe el aclaramiento de fármaco no productivo con respecto a tejidos no diana (por ejemplo, hígado y bazo) o mediante la unión de glicanos no M6P a tejidos no diana.
- Fig. 3 La Fig. 3A representa gráficamente un receptor CIMPR (también conocido como receptor de IGF2) y dominios de este receptor. La Fig. 3B es una tabla que muestra la afinidad de unión (nMolar) de glicanos que portan bis- y mono-M6P para CIMPR, la afinidad de unión de glicanos de tipo con alto contenido de manosa a receptores de manosa, y la afinidad de unión de glicano complejo desialado para receptores de asialoglicoproteína. La rhGAA que tiene glicanos que portan M6P y bis-M6P puede unirse de manera productiva a CIMPR en células diana musculares. La rhGAA que tiene glicanos con alto contenido de manosa y glicanos desialilados puede unirse de manera no productiva a células no diana que portan los receptores correspondientes.
- Fig. 4 Las Fig. 4A y 4B, respectivamente, muestran los resultados de cromatografía de afinidad de CIMPR de Lumizyme® y Myozyme®. Las líneas discontinuas se refieren al gradiente de elución de M6P. La elución con M6P desplaza las moléculas de GAA unidas por medio de un glicano que contiene M6P a CIMPR. Como se muestra en la Fig. 4A, el 78 % de la actividad GAA en Lumizyme® se eluyó antes de la adición de M6P. La Fig. 4B muestra que el 73 % de la actividad GAA en Myozyme® se eluyó antes de la adición de M6P. Solo el 22 % o el 27 % de la rhGAA en Lumizyme® o Myozyme, respectivamente, se eluyó con M6P. Estas figuras muestran que la mayoría de la rhGAA en estos dos productos de rhGAA convencionales carecen de los glicanos que tienen M6P necesarios para dirigir CIMPR a los tejidos musculares diana.
- Fig. 5 Un constructo de ADN para transformar células CHO con ADN que codifica rhGAA. Células CHO se transformaron con un constructo de ADN que codifica rhGAA (SEQ ID NO: 4).
- Fig. 6 Las Fig. 6A y 6B muestran los resultados de cromatografía de afinidad de CIMPR de Myozyme y rhGAA ATB-200. Como resulta evidente a partir de la Fig. 6B, aproximadamente el 70 % de la rhGAA en rhGAA ATB-200 contenía M6P.
- Fig. 7 Purificación de rhGAA ATB-200, realización 1 y 2.
- Fig. 8 Perfiles de elución en Polywax de Lumizyme® y rhGAA ATB-200.
- Fig. 9 Sumario de estructuras de N-glicano de Lumizyme® en comparación con tres preparaciones diferentes de ATB200 rhGAA, identificadas como BP-rhGAA, ATB200-1 y ATB200-2.
- Fig. 10 La Fig. 10A compara la afinidad de unión a CIMPR de rhGAA ATB-200 (trazado izquierdo) con la de Lumizyme® (trazado derecho). La Fig. 10B describe el contenido de Bis-M6P de Lumizyme® y rhGAA ATB-200.
- Fig. 11 La Fig. 11A compara la actividad rhGAA de ATB-200 (trazado izquierdo) con la actividad rhGAA de Lumizyme® (trazado derecho) dentro de fibroblastos normales a diversas concentraciones de GAA. La Fig. 11B compara la actividad rhGAA de ATB-200 (trazado izquierdo) con la actividad rhGAA de Lumizyme® (trazado derecho) dentro de fibroblastos de un sujeto que tiene la enfermedad de Pompe a diversas concentraciones de GAA. La Fig. 11C compara ($K_{\text{absorción}}$) de fibroblastos de sujetos normales y sujetos con enfermedad de Pompe.
- Fig. 12 La Fig. 12A muestra la cantidad de glicógeno en relación con proteína en músculo cardíaco tras el contacto con vehículo (control negativo), con 20 mg/ml de alglucosidasa alfa, o con 5, 10 o 20 mg/kg de rhGAA ATB-200. La Fig. 12B muestra la cantidad de glicógeno en relación con proteína en músculo cuádriceps tras el contacto con vehículo (control negativo), con 20 mg/ml de Lumizyme®, o con 5, 10 o 20 mg/kg de rhGAA ATB-200. La Fig. 12C muestra la cantidad de glicógeno en relación con proteína en músculo tríceps tras el contacto con vehículo (control negativo), con 20 mg/ml de Lumizyme®, o con 5, 10 o 20 mg/kg de rhGAA ATB-200. La rhGAA ATB-200 produjo reducciones de glicógeno significativas en músculo cuádriceps y tríceps en comparación con el control negativo y en comparación con Lumizyme®.
- Fig. 13 La estabilidad de rhGAA ATB-200 se mejora en presencia de chaperona AT2221. El primer trazado, izquierdo, en la Fig. 13A muestra el porcentaje de proteína rhGAA ATB-200 desplegada a diversas temperaturas a pH 7,4 (pH de la sangre). El último trazado, derecho, muestra el porcentaje de proteína rhGAA ATB-200 desplegada a diversas temperaturas a pH 5,2 (pH del lisosoma). Los tres trazos intermedios muestran los efectos de 10 µg, 30 µg o 100 µg de chaperona AT2221 sobre el plegado de la proteína. Estos datos muestran que AT2221 impide el desplegamiento de rhGAA ATB-200 al pH de la sangre en comparación con la muestra de control. La mejora de T_m a pH neutro mediante AT2221 se resume en la Figura 13B.

Fig. 14 Esta tabla muestra que la combinación de rhGAA ATB-200 y chaperona AT2221 proporcionó un aclaramiento de glicógeno significativamente mejor en ratones deficientes en GAA que los tratamientos con Lumizyme® y AT2221 o controles de o bien Lumizyme® o bien rhGAA ATB200 sin la chaperona AT2221.

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

Fig. 16 Mejora de la patología de músculo esquelético en ratones tratados con ATB200 + miglustat (AT2221) con respecto a aquellos tratados con ERT sola. Tinción de glicógeno PAS (Fig. 16A) y EM (Fig. 16 B) de tejido muscular de ratones con supresión de GAA tratados con rhGAA convencional o rhGAA ATB-200 y miglustat (AT-2221). Fig. 16C: Evaluación de la proliferación lisosomal mediante el marcador LAMP-1. Fig. 16D Identificación de fibras musculares de tipo I y tipo II.

Fig. 17. Mejora de la patología de músculo esquelético en ratones tratados con ATB-200 + miglustat (AT2221) con respecto a aquellos tratados con ERT sola. Tinción de glicógeno PAS (Fig. 17A) de tejido muscular de ratones con supresión de GAA tratados con rhGAA convencional o rhGAA ATB-200 y miglustat (AT-2221). Fig. 17B; Evaluación de la proliferación lisosomal mediante el marcador LAMP-1.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Definiciones: Las expresiones y los términos utilizados en esta memoria descriptiva tienen generalmente sus significados habituales en la técnica, dentro del contexto de esta invención y en el contexto específico en el que se utiliza cada término o expresión. Ciertos términos se tratan a continuación, o en otras partes de la memoria descriptiva, para proporcionar orientación adicional al profesional en la descripción de las composiciones y métodos de la invención como se definen en las reivindicaciones y cómo hacerlas y usarlas.

El término "GAA" se refiere a α -glucosidasa ácida (GAA) humana, una enzima que cataliza la hidrólisis de enlaces α -1,4- y α -1,6-glicosídicos de glicógeno lisosomal, así como a variantes insercionales, relacionales o de sustitución de la secuencia de aminoácidos de GAA y fragmentos de una secuencia de GAA más larga que ejercen actividad enzimática. El término "rhGAA" se usa para distinguir GAA endógena de GAA sintética o producida de manera recombinante, tal como aquella producida mediante la transformación de células CHO con ADN que codifica GAA. Una secuencia de ADN a modo de ejemplo que codifica GAA es NP_000143.2 (SEQ ID NO: 4). GAA y rhGAA pueden estar presentes en una composición que contiene una mezcla de moléculas de GAA que tienen diferentes patrones de glicosilación, tal como una mezcla de moléculas de rhGAA que portan grupos mono-M6P o bis-M6P en sus glicanos y moléculas de GAA que no portan M6P o bis-M6P. GAA y rhGAA también pueden completarse con otros compuestos, tales como chaperonas, o pueden unirse a otros radicales en un conjugado de GAA o rhGAA, tal como unirse a un radical IGF2 que direcciona el conjugado a CIMPR y posteriormente lo suministra a los lisosomas.

Un "sujeto" o "paciente" es preferiblemente 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, niño, joven o un adulto con enfermedad de Pompe u otro trastorno de almacenamiento o acumulación de glicógeno. Un ejemplo de un individuo que está tratándose es un individuo (feto, neonato, niño, joven, adolescente o humano adulto) que tiene GSD-II (por ejemplo, GSD-II infantil, GSD-II juvenil o GSD-II de aparición adulta). El individuo puede tener actividad GAA residual o ninguna actividad mensurable. Por ejemplo, el individuo que tiene GSD-II puede tener una actividad de GAA inferior al 1 % de la actividad de GAA normal (GSD-II infantil), actividad de GAA que es aproximadamente 1-10 % la actividad de GAA normal (GSD-II juvenil) o actividad de GAA que es aproximadamente 10-40 % la actividad normal de GAA (GSD-II adulto).

Los términos "tratar" y "tratamiento", tal como se utilizan en esta memoria, se refieren a la mejora de uno o más síntomas asociados con la enfermedad, la prevención o el retraso de la aparición de uno o más síntomas de la enfermedad y/o la disminución de la gravedad o frecuencia de uno o más síntomas de la enfermedad. Por ejemplo, tratamiento puede hacer referencia a la mejora del estado cardíaco (por ejemplo, aumento de los volúmenes diastólicos finales y/o sistólicos finales, o reducción, mejora o prevención de la cardiomiopatía progresiva que se encuentra normalmente en GSD-II) o de la función pulmonar (por ejemplo, aumento en la capacidad vital durante el llanto con respecto a la capacidad basal, y/o normalización de la desaturación de oxígeno durante el llanto); mejora en el neurodesarrollo y/o las habilidades motoras (por ejemplo, aumento en la puntuación AIMS); reducción de los niveles de glicógeno en el tejido del individuo afectado por la enfermedad; o cualquier combinación de estos efectos. En una realización preferida, el tratamiento incluye la mejora del estado cardíaco, particularmente en la reducción o prevención de la miocardiopatía asociada a GSD-II.

Los términos "mejorar", "aumentar" o "reducir", como se usan en el presente documento, indican valores que son relativos a la medición de referencia, tal como una medición en el mismo individuo antes del inicio del tratamiento descrito en el presente documento o una medición en un individuo control (o múltiples individuos control) en ausencia del tratamiento descrito en el presente documento. Un individuo control es un individuo aquejado con la misma forma de GSD-II (ya sea de aparición infantil, juvenil o adulta) que el individuo que está tratándose, que tiene

aproximadamente la misma edad que el individuo que está tratándose (para garantizar que las fases de la enfermedad en el individuo tratado y el/los individuo(s) control son comparables).

El término "purificado", tal como se usa en el presente documento, se refiere a material que se ha aislado en condiciones que reducen o eliminan la presencia de materiales no relacionados, es decir, contaminantes, incluyendo materiales nativos a partir de los que se obtiene el material. Por ejemplo, una proteína purificada preferiblemente está sustancialmente libre de otras proteínas o ácidos nucleicos con los que está asociada en una célula; una molécula de ácido nucleico purificada está de preferencia sustancialmente libre de proteínas u otras moléculas de ácido nucleico no relacionadas con las que se puede encontrar dentro de una célula. Tal como se utiliza en esta memoria, la expresión "sustancialmente libre" se utiliza operativamente, en el contexto de las pruebas analíticas del material. Preferiblemente, el material purificado, sustancialmente libre de contaminantes, es al menos 95 % puro; más preferiblemente, al menos 97 % puro, y aún más preferiblemente al menos 99 % puro. La pureza se puede evaluar mediante cromatografía, electroforesis en gel, inmunoensayo, análisis de la composición, ensayo biológico, ensayo enzimático y otros métodos conocidos en la técnica. En una realización específica, purificado significa que el nivel de contaminantes está por debajo de un nivel aceptable para las autoridades reguladoras para la administración segura a un ser humano o un animal no humano. Proteínas recombinantes pueden aislarse o purificarse a partir de células CHO usando métodos conocidos en la técnica, incluyendo mediante separación cromatográfica por tamaño, cromatografía de afinidad o cromatografía de intercambio aniónico.

El término "modificada genéticamente" o "recombinante" se refiere a células, tales como células CHO, que expresan un producto génico particular, tal como rhGAA o rhGAA ATB-200, tras la introducción de un ácido nucleico que comprende una secuencia codificante que codifica el producto génico, junto con elementos reguladores que controlan la expresión de la secuencia codificante. La introducción del ácido nucleico se puede conseguir mediante cualquier método conocido en la técnica, incluyendo la fijación de objetivo de genes y la recombinación homóloga. Como se usa en el presente documento, el término incluye también células que se han modificado mediante ingeniería para expresar o sobreexpresar un gen o producto génico endógeno que no se expresa normalmente por tal célula, por ejemplo, mediante tecnología de activación génica.

"Enfermedad de Pompe" se refiere a una LSD autosomal recesiva caracterizada por una actividad deficiente de alfa glucosidasa ácida (GAA) que altera el metabolismo del glucógeno lisosomal. La deficiencia de enzima conduce a la acumulación de glucógeno lisosomal y da como resultado debilidad muscular esquelética progresiva, función cardíaca reducida, insuficiencia respiratoria y/o deterioro del SNC en las últimas fases de la enfermedad. Las mutaciones genéticas en el gen GAA dan como resultado o bien una expresión menor o bien producen formas mutantes de la enzima con estabilidad y/o actividad biológica alteradas que conducen en última instancia a 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., eds., McGraw-Hill, Nueva York, 7.^a ed., páginas 2443-2464). Las tres formas clínicas reconocidas de la enfermedad de Pompe (infantil, juvenil y adulta) están correlacionadas con el nivel de actividad de α -glucosidasa residual (Reuser A J et al., 1995, Glycogenosis Type II (Acid Maltase Deficiency), Muscle & Nerve Supplement 3, S61-S69). La enfermedad de Pompe infantil (tipo I o A) es la más frecuente y grave, y se caracteriza por retraso del crecimiento, hipotonía generalizada, hipertrofia cardíaca e insuficiencia cardiorrespiratoria en el segundo año de vida. La enfermedad de Pompe juvenil (tipo II o B) es de gravedad intermedia y se caracteriza por un predominio de síntomas musculares sin cardiomegalia. Los individuos juveniles de Pompe fallecen habitualmente antes de cumplir los 20 años debido a una insuficiencia respiratoria. La enfermedad de Pompe del adulto (tipo III o C) se presenta a menudo como una miopatía lentamente progresiva en la adolescencia o hasta la sexta década (Felicja K J et al., 1995, Clinical Variability in Adult-Onset Acid Maltase Deficiency: Report of Affected Sibs and Review of the Literature, Medicine 74, 131-135). En Pompe, se ha demostrado que la α -glucosidasa se modifica extensamente después de la traducción mediante glicosilación, fosforilación y procesamiento proteolítico. La conversión del precursor de 110 kilodaltonios (kDa) a formas maduras de 76 y 70 kDa mediante proteólisis en el lisosoma se requiere para una catálisis de glicógeno óptima. Tal como se utiliza en esta memoria, la expresión "Enfermedad de Pompe" se refiere a todos los tipos de enfermedad de Pompe. Las formulaciones y los regímenes de dosificación descritos en esta solicitud pueden utilizarse para tratar, por ejemplo, la enfermedad de Pompe Tipo I, Tipo II o Tipo III.

Realizaciones no limitantes de la invención

Una composición de rhGAA derivada de células CHO que contiene una cantidad mayor de rhGAA que contiene N-glicanos que portan mono-manosa-6-fosfato (M6P) que la rhGAA convencional o bis-M6P tal como se ejemplifica mediante Lumizyme® (alglucosidasa alfa; CAS 420794-05-0). Una composición de rhGAA a modo de ejemplo según la invención como se define en las reivindicaciones es ATB-200 (denominada en ocasiones ATB-200, ATB-200 o CBP-rhGAA) que se describe en los ejemplos. Se ha mostrado que la rhGAA de la invención como se define en las reivindicaciones (ATB-200) se une al CIMPR con alta afinidad ($K_D \sim 2-4$ nM) y se internaliza eficientemente mediante fibroblastos y mioblastos de músculo esquelético de Pompe ($K_{\text{absorción}} \sim 7-14$ nM). ATB-200 se caracterizó *in vivo* y mostró que tenía una semivida en plasma aparente más corta ($t_{1/2} \sim 45$ min) que la ERT de rhGAA actual ($t_{1/2} \sim 60$ min).

La secuencia de aminoácidos de la rhGAA puede ser idéntica al menos al 70 %, al 75 %, al 80 %, al 85 %, al 95 % o al 99 %, o contener 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más delecciones, sustituciones o adiciones con respecto a la secuencia de aminoácidos descrita por SEQ ID NO: 1, 3 o 4. En algunas realizaciones de la GAA o rhGAA de la invención como se define en las reivindicaciones, tal como en rhGAA ATB- 200, la GAA o rhGAA comprenderá una secuencia de aminoácidos de GAA natural, tal como de SEQ ID NO: 1 o 3. En otras realizaciones no limitantes de las invenciones como se define en las reivindicaciones, la rhGAA comprende un subconjunto de los residuos de aminoácido presentes en una GAA natural, en donde el subconjunto incluye los residuos de aminoácido de la GAA natural que forman el sitio activo para la unión al sustrato y/o la reducción del sustrato. En una realización de la invención como se define en las reivindicaciones, la rhGAA es glucosidasa alfa, que es la enzima α -glucosidasa ácida (GAA) humana, codificada por los más predominantes de nueve haplotipos observados de este gen. La rhGAA de la invención como define en las reivindicaciones, incluyendo rhGAA ATB-200, puede comprender una secuencia de aminoácidos que es idéntica al 90 %, al 95 %, al 96 %, al 97 %, al 98 % o al 99 % a la secuencia de aminoácidos de alfa-glucosidasa humana, tal como la facilitada por el número de registro AHE24104.1 (GI:568760974)(SEQ ID NO: 1) y que se incorpora como referencia con respecto a la patente de EE. UU. n.º 8.592.362 o con respecto a la secuencia de aminoácidos de NP_000143.2 (SEQ ID NO: 4). Una secuencia de nucleótidos y de aminoácidos para GAA se facilita también mediante las SEQ ID NO: 2 y 3, respectivamente. Las variantes de esta secuencia de aminoácidos incluyen también aquellas con 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 o más delecciones, inserciones o sustituciones de aminoácido con respecto a la secuencia de aminoácidos de GAA más adelante. Las secuencias de polinucleótido que codifican GAA y tales GAA humanas variantes también se contemplan y pueden usarse para expresar recombinantemente rhGAA según la invención como se define en las reivindicaciones.

Diversos algoritmos y/o programas de alineación pueden usarse para calcular la identidad entre dos secuencias, incluyendo FASTA o BLAST, que están disponibles como parte del paquete de análisis de secuencias GCG (Universidad de Wisconsin, Madison, Wis.), y pueden usarse con, por ejemplo, ajuste por defecto. Por ejemplo, se contemplan polipéptidos que tienen una identidad de al menos el 70 %, el 85 %, el 90 %, el 95 %, el 98 % o el 99 % con respecto a polipéptidos específicos descritos en el presente documento y que presentan de manera preferible sustancialmente las mismas funciones, así como un polinucleótido que codifica tales polipéptidos. A menos que se indique lo contrario, la 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. BLASTP "Identidades" muestra el número y la fracción de restos totales en los pares de secuencias de alta puntuación que son idénticos; y BLASTP "Positivos" 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 de similitud con las secuencias de aminoácidos descritas aquí, se contemplan y están abarcadas por esta descripción. Las secuencias polinucleotídicas de polipéptidos similares se deducen usando el código genético, y se pueden obtener por medios convencionales, en particular mediante la traducción inversa de su secuencia de aminoácidos usando el código genético.

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

Las moléculas de rhGAA en la composición de rhGAA de la invención como se definen en las reivindicaciones pueden tener 1, 2, 3 o 4 grupos M6P en sus glicanos. Por ejemplo, solo un N-glicano en una molécula rhGAA puede portar M6P (monofosforilado), un único N-glicano puede portar dos grupos M6P (bisfosforilado), o dos N-glicanos diferentes en la misma molécula rhGAA pueden portar grupos M6P individuales. Las moléculas de rhGAA en la composición de rhGAA pueden tener también N-glicanos que no portan ningún grupo M6P. En otra realización de la invención como se define en las reivindicaciones, en promedio los N-glicanos contienen más de 3 moles/mol de M6P y más de 4 moles/mol de ácido siálico. En promedio, al menos aproximadamente el 3, el 4, el 5, el 6, el 7, el 8, el 9 o el 10% de los glicanos totales en la rhGAA puede estar en forma de un glicano mono-M6P, por ejemplo, aproximadamente el 6,25% de los glicanos totales puede portar un único grupo M6P y en promedio, al menos aproximadamente el 0,5, el 1, el 1,5, el 2,0, el 2,5, el 3,0 % de los glicanos totales en la rhGAA está en forma de un glicano bis-M6P y en promedio menos del 25 % de la rhGAA total de la invención como se define en las reivindicaciones no contiene ningún glicano fosforilado que se une a CIMPR.

La composición de rhGAA divulgada en el presente documento puede tener un contenido promedio de N-glicanos que portan M6P que oscila de 0,5 a 7,0 moles/mol de rhGAA o cualquier valor intermedio de subintervalo 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 moles/mol de rhGAA. Como se muestra en los Ejemplos, la rhGAA de la invención como se define en las reivindicaciones puede fraccionarse para proporcionar composiciones de rhGAA con diferentes números promedio de glicanos que portan M6P o que portan bis-M6P en la rhGAA, permitiendo así una personalización adicional del direccionamiento de rhGAA a los lisosomas en tejidos diana seleccionando una fracción particular o combinando selectivamente diferentes fracciones.

Hasta el 60 % de los N-glicanos en la rhGAA pueden estar completamente sializados, por ejemplo, hasta el 10 %, el 20 %, el 30 %, el 40 %, el 50 % o el 60 % de los N-glicanos pueden estar completamente sializados. En algunas realizaciones desde el 4 hasta el 20 % de los N-glicanos totales en la composición de rhGAA están completamente sializados.

En otras realizaciones de la invención como se definen en las reivindicaciones, no más del 5%, del 10%, del 20% o del 30% de los N-glicanos en la rhGAA portan ácido siálico y una Gal terminal. Estos intervalos incluyen todos los valores y subintervalos intermedios, por ejemplo, del 7 al 30 % de los N-glicanos totales en la rhGAA en la composición pueden portar ácido siálico y Gal terminal.

En aún otras realizaciones de la invención como se define en las reivindicaciones, no más del 5, del 10, del 15, del 16, del 17, del 18, del 19 o del 20 % de los N-glicanos en la rhGAA tienen una Gal terminal solo y no contienen ácido siálico. Este intervalo incluye todos los valores y subintervalos intermedios, por ejemplo, desde el 8 hasta el 19 % de los N-glicanos totales en la rhGAA en la composición pueden tener Gal terminal solo y no contienen ácido siálico.

En la invención, del 40, del 45, del 50, del 55 al 60 % de los N-glicanos totales en la rhGAA en la composición son N-glicanos de tipo complejo; o no más del 1, del 2, del 3, del 4, del 5, del 6, del 7 % de los N-glicanos totales en la rhGAA en la composición son N-glicanos de tipo híbrido; no más del 5, del 10 o del 15 % de los N-glicanos de tipo con alto contenido de manosa en la rhGAA en la composición son no fosforilados; al menos el 5 % o el 10 % de los N-glicanos de tipo con alto contenido de manosa en la rhGAA en la composición son mono-M6P fosforilados; y/o al menos el 1 o el 2 % de los N-glicanos de tipo con alto contenido de manosa en la rhGAA en la composición son bis-M6P fosforilados. Estos valores incluyen todos los valores intermedios y subintervalos. Una composición de rhGAA puede cumplir uno o más de los intervalos de contenido descritos anteriormente.

En algunas realizaciones, la composición de rhGAA de la invención como se define en las reivindicaciones portará, en promedio, de 2,0 a 8,0 residuos de ácido siálico por mol de rhGAA. Este intervalo incluye todos los valores y subintervalos intermedios incluyendo 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5 y 8,0 residuos/moles de rhGAA. Los residuos de ácido siálico pueden impedir el aclaramiento no productivo mediante receptores de asialoglicoproteína.

La composición de rhGAA de la invención como se define en las reivindicaciones se produce mediante células CHO, tales como la línea de células CHO GA-ATB-200, o mediante un subcultivo o derivado de un cultivo de células CHO de este tipo. Constructos de ADN, que expresan variantes alélicas de GAA u otras secuencias de aminoácidos de GAA variantes, tales como aquellas que son idénticas al menos al 90%, al 95% o al 99% con respecto a SEQ ID NO: 1, pueden construirse y expresarse en células CHO. Los expertos en la técnica pueden seleccionar vectores alternativos adecuados para transformar células CHO para la producción de tales construcciones de ADN.

Los inventores han descubierto que rhGAA que tienen una capacidad superior para seleccionar como diana el CIMPR y lisosomas celulares, así como patrones de glicosilación que reducen su aclaramiento no productivo *in vivo*, pueden producirse usando células de ovario de hámster chino (CHO). Estas células pueden inducirse para expresar rhGAA con niveles significativamente mayores de M6P y bis-M6P total que los productos de rhGAA convencionales. La GAA humana recombinante producida mediante estas células, por ejemplo, como se ejemplifica mediante ATB-200 rhGAA descrita en los Ejemplos, tiene significativamente más grupos M6P y bis-M6P que seleccionan como diana células musculares que la GAA convencional, tal como Lumizyme®, y se ha mostrado que se une eficientemente a CIMPR y se absorbe eficientemente mediante músculo esquelético y músculo cardíaco. También se ha mostrado que tiene un patrón de glicosilación que proporciona un perfil farmacocinético favorable y reduce el aclaramiento no productivo *in vivo*.

La rhGAA según la invención como se define en las reivindicaciones puede formularse como composición farmacéutica o usarse en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la enfermedad de Pompe u otras afecciones asociadas con una deficiencia de GAA. Las composiciones pueden formularse con un portador o excipiente fisiológicamente aceptable. El portador y la composición pueden ser estériles y por lo demás adaptarse al modo de administración.

Los portadores farmacéuticamente aceptables adecuados incluyen, pero no se limitan a, agua, disoluciones de sal (por ejemplo, NaCl), solución salina, solución salina tamponada, alcoholes, glicerol, etanol, goma arábica, aceites vegetales, alcoholes bencílicos, polietilenglicoles, gelatina, hidratos de carbono, tales como lactosa, amilosa o almidón, azúcares tales como manitol, sacarosa u otros, dextrosa, estearato de magnesio, talco, ácido silícico, ésteres de ácidos grasos, hidroximetilcelulosa, polivinilpirrolidona, etc., así como combinaciones de los mismos. Los preparados farmacéuticos pueden, si se desea, mezclarse con agentes auxiliares, por ejemplo, tensioactivos, tales como polisorbato 80, lubricantes, conservantes, estabilizadores, agentes humectantes, emulsionantes, sales para influir en la presión osmótica, tampones, sustancias colorantes, aromatizantes y/o aromáticas y similares que no reaccionan perjudicialmente con los compuestos activos. En una realización preferida, se usa un portador soluble en agua adecuado para administración intravenosa.

La composición, si se desea, también puede contener pequeñas cantidades de agentes humectantes o emulsionantes, o agentes de tamponamiento del pH. La composición puede ser una disolución líquida, suspensión, emulsión, comprimido, píldora, cápsula, formulación de liberación sostenida o polvo. La composición puede formularse también como supositorio, con aglutinantes y portadores tradicionales, tales como triglicéridos. La formulación oral puede incluir portadores estándar, tales como calidades farmacéuticas de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, polivinilpirrolidona, sacarina sódica, celulosa, carbonato de magnesio, etc. En una realización preferida, la rhGAA se administra mediante infusión IV.

La composición o el medicamento puede formularse según los procedimientos rutinarios como composición farmacéutica adaptada para su administración a seres humanos. Por ejemplo, en una realización preferida, una composición para administración intravenosa es una disolución en tampón acuoso isotónico estéril. Cuando sea necesario, la composición también puede incluir un agente solubilizante y un anestésico local para aliviar el dolor en el lugar de la inyección. En general, los componentes se suministran ya sea por separado o mezclados juntos en forma farmacéutica unitaria, por ejemplo, como un polvo liofilizado seco o concentrado sin agua en un envase herméticamente sellado, tal como una ampolla o sobre que indica la cantidad de agente activo. Cuando la composición se va a administrar por infusión, se puede dispensar con una botella de infusión que contiene agua estéril de grado farmacéutico, disolución salina o dextrosa/agua. Cuando la composición se administra por inyección, se puede proporcionar una ampolla de agua estéril para inyección o disolución salina, de manera que los ingredientes se puedan mezclar antes de la administración.

La rhGAA se puede formular como formas neutras o de sal. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen las formadas con grupos amino libres, tales como las derivadas de ácido clorhídrico, fosfórico, acético, oxálico, tartárico, etc., y las formadas con grupos carboxilo libres, tales como las derivadas de sodio, potasio, amonio, calcio, hidróxidos férricos, isopropilamina, trietilamina, 2-etilaminoetanol, histidina, procaína y similares.

La rhGAA (o una composición o un medicamento que contiene GAA) se administra mediante una vía apropiada. En una realización, la GAA se administra por vía intravenosa. En otras realizaciones, la GAA se administra mediante administración directa a un tejido diana, tal como al músculo cardíaco o esquelético (por ejemplo, intramuscular), o al sistema nervioso (por ejemplo, inyección directa al cerebro; por vía intraventricular; por vía intratecal). Si se desea, se puede usar más de una ruta al mismo tiempo.

La rhGAA (o una composición o un medicamento que contiene GAA) se administra en una cantidad terapéuticamente eficaz (por ejemplo, una cantidad de dosis que, cuando se administra a intervalos regulares, es suficiente para tratar la enfermedad, tal como mejorando síntomas asociados con la enfermedad, previniendo o retardando la aparición de la enfermedad, y/o también disminuyendo la gravedad o la frecuencia de síntomas de la enfermedad, tal como se describió anteriormente). La cantidad que será terapéuticamente eficaz en el tratamiento de la enfermedad dependerá de la naturaleza y extensión de los efectos de la enfermedad, y puede determinarse mediante técnicas clínicas estándar. Además, opcionalmente se pueden emplear ensayos *in vitro* o *in vivo* para ayudar a identificar intervalos de dosificación óptimos. La dosis exacta que se emplee dependerá también de la vía de administración y de la gravedad de la enfermedad, y deberá decidirse según el criterio de un profesional y las circunstancias de cada paciente. Las dosis eficaces se pueden extrapolar de curvas de dosis-respuesta derivadas de sistemas de prueba de modelos *in vitro* o en animales. En una realización preferida, la cantidad terapéuticamente eficaz es igual o menos de 20 mg de enzima/kg de peso corporal del individuo, preferiblemente en el intervalo de aproximadamente 1-10 mg de enzima/kg de peso corporal, e incluso más preferiblemente de aproximadamente 10 mg de enzima/kg de peso corporal o aproximadamente 5 mg de enzima/kg de peso corporal. La dosis eficaz para un individuo particular puede variarse (por ejemplo, aumentarse o disminuirse) a lo largo del tiempo, dependiendo de las necesidades del individuo. Por ejemplo, en momentos de enfermedad física o estrés, o si pasan a estar presentes o aumentan anticuerpos anti-GAA, o si empeoran los síntomas de la enfermedad, la cantidad puede aumentarse.

La cantidad terapéuticamente eficaz de GAA (o composición o medicamento que contiene GAA) se administra a intervalos regulares, dependiendo de la naturaleza y el grado de los efectos de la enfermedad, y en una base continua. La administración a un "intervalo regular", como se usa aquí, indica que la cantidad terapéuticamente eficaz se administra periódicamente (a diferencia de una dosis única). El intervalo se puede determinar mediante técnicas clínicas estándares. En realizaciones preferidas, la GAA se administra mensualmente, bimensualmente; semanalmente; dos veces a la semana; o diariamente. El intervalo de administración para un solo individuo no necesita ser un intervalo fijo, sino que puede variar con el tiempo, dependiendo de las necesidades del individuo. Por ejemplo, en momentos de enfermedad física o estrés, si pasan a estar presentes o aumentan anticuerpos anti-GAA, o si empeoran los síntomas de la enfermedad, puede disminuirse el intervalo entre dosis. En algunas realizaciones, una cantidad terapéuticamente eficaz de 5, 10, 20, 50, 100 o 200 mg de enzima/kg de peso corporal se administra dos veces a la semana, semanalmente o cada dos semanas con o sin una chaperona.

La GAA o rhGAA de la invención como se define en las reivindicaciones puede prepararse para su uso posterior, tal como en una jeringa o vial de dosis unitaria, o en una botella o bolsa para administración intravenosa. Los kits que contienen la GAA o rhGAA, así como excipientes opcionales u otros principios activos, tales como chaperonas u otros fármacos, pueden rodearse con material de envasado e ir acompañados por instrucciones para la reconstitución, la

dilución o la dosificación para tratar a un sujeto que necesita tratamiento, tal como un paciente que tiene enfermedad de Pompe.

La GAA (o una composición o medicamento que contiene GAA) puede administrarse sola, o junto con otros agentes, tales como una chaperona. Puede administrarse rhGAA con diferentes grados de glicosilación con mono-M6P o bis-M6P o administrarse combinaciones de rhGAA con diferentes grados de glicosilación con M6P o bis-M6P.

En algunas realizaciones, la composición de rhGAA de la invención como se define en las reivindicaciones se completará o mezclará con una chaperona, tal como AT-2220 o AT-2221. Las chaperonas, denominadas en ocasiones "chaperonas farmacológicas", son compuestos que cuando se complejan o se administran conjuntamente con rhGAA modifican su farmacocinética y otras propiedades farmacológicas. Las chaperonas representativas ejemplificadas en el presente documento incluyen AT2221 (miglustat, N-butil-desoxinojirimicina) y AT2220 (HCl de duvoglustat, 1-desoxinojirimicina). Dicha complejación o mezclado puede producirse fuera del cuerpo o dentro del cuerpo, por ejemplo, cuando se administran dosis independientes de la rhGAA y chaperona. Por ejemplo, el direccionamiento de rhGAA activa, sus fracciones o derivados de la invención como se define en las reivindicaciones a CIMPR y posteriormente a lisosomas celulares puede mejorarse combinándola con duvoglustat-HCl (AT2220, desoxinojirimicinas, AT2220) o miglustat (AT2221, N-butil-desoxinojirimicina). Los Ejemplos más adelante muestran reducciones de sustrato de glicógeno significativas en músculos esqueléticos clave de ratones con supresión de GAA que reciben la rhGAA bien direccionada de la invención como se define en las reivindicaciones en combinación con una chaperona.

Otro aspecto útil en la invención como se define en las reivindicaciones se refiere a células CHO o sus derivados u otros equivalentes que producen la rhGAA según la invención. Un ejemplo de una línea de células CHO de este tipo es GA-ATB-200 o un subcultivo de la misma que produce una composición de rhGAA tal como se describe en el presente documento. Líneas de células CHO de este tipo pueden contener múltiples copias de un gen, tal como 5, 10, 15 o 20 o más copias, de un polinucleótido que codifica GAA.

La rhGAA con alto contenido de M6P y bis-M6P de la invención como se define en las reivindicaciones, tal como rhGAA ATB-200, puede producirse transformando células CHO (células de ovario de hámster chino) con un constructo de ADN que codifica GAA. Si bien las células CHO se han usado previamente para producir rhGAA, no se apreció que las células CHO transformadas pudieran cultivarse y seleccionarse de una manera que produjeran rhGAA que tiene un alto contenido de glicanos M6P y bis-M6P que se dirigen contra CIMPR.

Sorprendentemente, los inventores descubrieron que era posible transformar líneas de células CHO, seleccionar transformantes que producen rhGAA que contiene un alto contenido de glicanos que portan M6P o bis-M6P que seleccionan como diana el CIMPR, y expresar de manera estable esta rhGAA con alto contenido de M6P. Por tanto, un aspecto relacionado útil de la invención como se define en las reivindicaciones se refiere a un método para elaborar estas líneas de células CHO. Este método implica transformar una célula CHO con ADN que codifica GAA o una variante de GAA, seleccionar una célula CHO que integra de manera estable el ADN que codifica GAA en su(s) cromosoma(s) y que expresa de manera estable GAA, y seleccionar una célula CHO que expresa GAA que tiene un alto contenido de glicanos que portan M6P o bis-M6P, y, opcionalmente, seleccionar una célula CHO que tiene N-glicanos con alto contenido de ácido siálico y/o que tiene N-glicanos con un bajo contenido de manosa alta no fosforilada.

Estas líneas de células CHO pueden usarse para producir rhGAA y composiciones de rhGAA según la invención como se define en las reivindicaciones cultivando la línea de células CHO y recuperar dicha composición del cultivo de células CHO.

La composición de rhGAA de la invención como se define en las reivindicaciones o sus fracciones o derivados se usa ventajosamente para tratar sujetos que tienen una afección, trastorno o enfermedad asociado con GAA lisosomal insuficiente administrando la composición de rhGAA. Un sujeto que necesita tratamiento incluye aquellos que tienen enfermedad de almacenamiento de glicógeno tipo II (enfermedad de Pompe) así como otras afecciones, trastornos o enfermedades que se beneficiarían de la administración de la rhGAA.

Los Ejemplos más adelante muestran que la rhGAA de la invención como se describe en las reivindicaciones (ATB-200) se absorbe mediante células de músculos esqueléticos, se une a CIMPR y elimina e forma eficaz el glicógeno de células de músculos esqueléticos cuando se administra a una dosis significativamente menor que los productos de rhGAA convencionales. Se alcanzó una reducción de hasta el 75 % de glicógeno en mioblasto de músculo esquelético en ratones con supresión de GAA usando un régimen bisemanal de administración intravenosa de ATB-200. Estas reducciones superaron las proporcionadas mediante la misma cantidad de Lumizyme® mostrando que la rhGAA de la invención como se define en las reivindicaciones, que tiene un contenido potenciado de N-glicanos que portan M6P y bis-M6P, proporcionó reducciones superiores en el sustrato de glicógeno. Debido al direccionamiento, la farmacodinámica y la farmacocinética mejorados de la composición de rhGAA de la invención como se define en las reivindicaciones, puede administrarse en una dosis menor que productos de rhGAA convencionales, tales como Lumizyme® o Myozyme®.

Puede usarse para degradar, disminuir o eliminar glicógeno de músculo cardíaco, músculo liso o músculo estriado. Los ejemplos de músculos esqueléticos o estriados sujetos a tratamiento incluyen al menos un músculo seleccionado del grupo que consiste en abductor del dedo meñique (pie), abductor del dedo meñique (mano), abductor del dedo gordo, abductor corto del pulgar, abductor largo del pulgar, aductor corto, aductor del dedo gordo, aductor largo, 5 aductor mayor, aductor del pulgar, ancóneo, músculo articular del codo, músculo articular de la rodilla, aritenoepligótico, aryjordanicus, auricular, bíceps braquial, bíceps femoral, braquial, braquiorradial, buccinadores, bulboesponjoso, constrictor faríngeo inferior, constrictor faríngeo medio, constrictor faríngeo superior, coracobraquial, corrugador superciliar, cremáster, cricotiroides, dartos, transverso profundo del periné, deltoide, depresor del ángulo de la boca, depresor del labio inferior, diafragma, digástrico, digástrico (vista anterior), erector de la columna, erector 10 iliocostal, erector longísimo, extensor radial corto del carpo, extensor radial largo del carpo, extensor ulnar del carpo, extensor del dedo meñique (mano), extensor de los dedos (mano), extensor corte de los dedos (pie), extensor largo de los dedos (pie), extensor largo del dedo gordo, extensor del índice, extensor corto del pulgar, extensor largo del pulgar, oblicuo externo del abdomen, flexor radial del carpo, flexor ulnar del carpo, flexor corto del dedo meñique (pie), flexor corto del dedo meñique (mano), flexor corto de los dedos, flexor largo de los dedos (pie), flexor profundo de los 15 dedos, flexor superficial de los dedos, flexor corto del dedo gordo, flexor largo del dedo gordo, flexor corto del pulgar, flexor largo del pulgar, frontal, gastrocnemio, gemelo inferior, gemelo superior, geniogloso, geniohioideo, glúteo mayor, glúteo medio, glúteo menor, grácil, hiogloso, iliaco, oblicuo inferior, recto inferior, infraespinoso, intercostales externos, intercostales más internos, intercostales internos, oblicuo interno abdominal, interóseos dorsales de la mano, interóseos dorsales del pie, interóseos palmares de la mano, interóseos plantares del pie, interespinosos, 20 intertransversos, músculos intrínsecos de la lengua, isquiocavernoso, cricoaritenoides lateral, pterigoideo lateral, recto lateral, dorsal ancho, elevador del ángulo de la boca, elevador del ano-coxígeo, elevador del ano-iliocoxígeo, elevador del ano-pubocoxígeo, elevador del ano-puborrectal, elevador del ano-pubovaginal, elevador del labio superior, elevador del labio superior y del ala de la nariz, elevador del párpado superior, elevador de la escápula, elevador del velo del paladar, elevadores de las costillas, largo de la cabeza, largo del cuello, lumbricales del pie (4), lumbricales 25 de la mano, masetero, pterigoideo medial, recto medial, mentoniano, de la úvula, milohioideo, nasal, aritenoides oblicuo, oblicuo mayor de la cabeza, oblicuo menor de la cabeza, obturador externo, obturador interno (A), obturador interno (B), omohioideo, oponente del dedo meñique (mano), oponente de pulgar, orbicular del ojo, orbicular de la boca, palatogloso, palatofaríngeo, palmar corto, palmar largo, pectíneo, pectoral mayor, pectoral menor, peroneo corto, peroneo largo, tercer peroneo, piriforme (A), piriforme (B), plantar, platisma, poplíteo, cricoaritenoides posterior, prócer, 30 pronador cuadrado, pronador redondo, psoas mayor, psoas menor, piramidal, cuadrado femoral, cuadrado lumbar, cuadrado plantar, recto del abdomen, recto anterior de la cabeza, recto lateral de la cabeza, recto posterior mayor de la cabeza, recto posterior menor de la cabeza, recto femoral, romboides mayor, romboides menor, risorio, salpingofaríngeo, sartorio, escaleno anterior, escaleno medio, escaleno mínimo, escaleno posterior, semimembranoso, semitendinoso, serrato anterior, serrato posterior inferior, serrato posterior superior, sóleo, esfínter del ano, esfínter de 35 la uretra, esplenio de la cabeza, esplenio del cuello, estapedio, esternocleidomastoideo, esternohioideo, esternotiroides, estilógloso, estilohioideo, estilohioideo (vista anterior), estilofaríngeo, subclavio, subcostal, subescapular, transverso superficial, periné, oblicuo superior, recto superior, supinador, supraespinoso, temporal, temporoparietal, tensor de la fascia lata, tensor del tímpano, tensor del velo del paladar, redondo mayor, redondo menor, tiroaritenoides y vocal, tiroepiglótico, tirohioideo, tibial anterior, tibial posterior, aritenoides transversos, 40 transversoespinoso-multífido, transversoespinoso-rotador, transversoespinoso-semiespinoso, transversos del abdomen, transversos del tórax, trapecio, tríceps, vasto intermedio, vasto lateral, vasto medial, cigomático mayor y cigomático menor.

La composición de GAA de la invención como se define en las reivindicaciones puede administrarse también a, o 45 usarse para tratar, fibra muscular de tipo 1 (contracción lenta) o fibra muscular de tipo 2 (contracción rápida) o sujetos que acumulan glicógeno en tales fibras musculares. El músculo de tipo I, contracción lenta, o "rojo", es denso con capilares y es rico en mitocondrias y mioglobina, dando al tejido muscular su color rojo característico. Puede portar más oxígeno y sostener actividad aerobia usando grasas o hidratos de carbono como combustible. Las fibras de contracción lenta se contraen durante periodos de tiempo prolongados, pero con poca fuerza. Los músculos de tipo II, 50 contracción rápida, tienen tres subtipos principales (IIa, IIx y IIb) que varían tanto en la velocidad de contracción como en la fuerza generada. Las fibras de contracción rápida se contraen rápidamente y de manera potente, pero se fatigan muy rápidamente, sosteniendo solo ráfagas cortas, anaerobias, de actividad antes de que la contracción muscular se vuelva dolorosa. Contribuyen en la mayoría de los casos a la fuerza muscular y tienen un mayor potencial para aumentar en masa. El tipo IIb es músculo anaerobio, glicolítico, "blanco", que es el menos denso en mitocondrias y 55 mioglobina. En los animales pequeños (por ejemplo, roedores), este es el tipo de músculo rápido principal, lo que explica el color pálido de su carne.

La composición de rhGAA de la invención como se define en las reivindicaciones, sus fracciones o derivados pueden administrarse por vía sistémica, por ejemplo, mediante infusión intravenosa (IV), o administrarse directamente a un 60 sitio deseado, tal como a músculo cardíaco o esquelético, tal como cuádriceps, tríceps o diafragma. Puede administrarse a miocitos, tejidos musculares particulares, músculos o grupos musculares. Por ejemplo, un tratamiento de este tipo puede administrar por vía intramuscular la composición de rhGAA directamente al cuádriceps o tríceps o diafragma de un sujeto.

Como se ha mencionado anteriormente, la composición de rhGAA de la invención como se define en las 65 reivindicaciones, sus fracciones o derivados pueden complejarse o mezclarse con una chaperona, tal como AT-2220

(HCl de duvoglustat, 1-desoxinojirimicina) o AT-2221 (miglustat, N-butil-desoxinojirimicina) o sus sales para mejorar la farmacocinética de la administración de rhGAA. La rhGAA y la chaperona pueden administrarse juntas o por separado. Cuando se administran simultáneamente, la GAA en la composición puede precargarse con la chaperona. Alternativamente, la GAA y la chaperona pueden administrarse por separado ya sea al mismo tiempo o en diferentes momentos.

Dosis representativas de AT2221 oscilan de 0,25 a 400 mg/kg, preferiblemente de 0,5-200 mg/kg, y lo más preferiblemente de 2 a 50 mg/kg. Dosis específicas de AT2221 incluyen 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 y 50 mg/kg. Estas dosis pueden combinarse con rhGAA, tal como rhGAA ATB-200, a una relación molar entre AT2221 y rhGAA que oscila de 15:1 a 150: 1. Las relaciones específicas incluyen 15:1, 20:1, 25:1, 50:1, 60: 1, 65:1, 70:1, 75:1, 80:1, 85:1, 90: 1, 100:1, 125:1 y 150:1. rhGAA y AT2221 pueden administrarse conjuntamente en estas cantidades o relaciones molares ya sea simultáneamente, secuencialmente o por separado. Los intervalos anteriores incluyen todos los subintervalos y valores intermedios, tales como todos los valores de número entero entre los puntos de extremo del intervalo.

Dosis representativas de AT2220 oscilan de 0,1 a 120 mg/kg, preferiblemente 0,25 a 60, y lo más preferiblemente de 0,6 a 15 mg/kg. Dosis específicas de AT2220 incluyen 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 y 30 mg/kg. Estas dosis pueden combinarse con rhGAA, tal como rhGAA ATB-200, a una relación molar entre AT2220 y rhGAA que oscila de 15:1 a 150: 1. Relaciones específicas incluyen 15:1, 20: 125:1, 50:1, 60: 1, 65:1, 70:1, 75:1, 80:1, 85:1, 90: 1, 100:1, 125:1 y 150:1. rhGAA y AT2220 pueden administrarse conjuntamente en estas cantidades o relaciones molares ya sea simultáneamente, secuencialmente o por separado. Los intervalos anteriores incluyen todos los subintervalos y valores intermedios, tales como todos los valores de número entero entre los puntos de extremo del intervalo.

La composición de rhGAA de la invención como se define en las reivindicaciones, sus fracciones o derivados pueden usarse también para metabolizar, degradar, eliminar o disminuir de otro modo el glicógeno en tejido, músculo, fibra muscular, células musculares, lisosomas, orgánulos, compartimentos celulares o citoplasma, administrando la composición de rhGAA a un sujeto, opcionalmente junto con una chaperona o un fármaco que reduce las respuestas inmunológicas a rhGAA.

En otra realización de su método de uso, la rhGAA de la invención como se define en las reivindicaciones puede usarse para modular la proliferación lisosomal, la autofagia o la exocitosis en una célula administrando la misma, sus fracciones o derivados a células, tejidos o sujetos que necesiten una modulación de este tipo, opcionalmente en combinación con una chaperona u opcionalmente como conjugado con otro resto de direccionamiento. La autofagia es un mecanismo catabólico que permite que una célula degrade glicógeno u otros componentes celulares innecesarios o disfuncionales a través de las acciones de sus lisosomas. Este método puede implicar también administrar por vía sistémica o local la composición de GAA a un sujeto que necesite tratamiento.

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

EJEMPLOS

Los siguientes Ejemplos no limitantes ejemplifican aspectos de la invención.

Sección I: ATB-200 rhGAA y sus propiedades

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

Para evaluar la capacidad de la rhGAA en Myozyme® y Lumizyme®, los únicos tratamientos actualmente aprobados para la enfermedad de Pompe, estas preparaciones de rhGAA se inyectaron en una columna CIMPR (que se une a rhGAA que tiene grupos M6P) y posteriormente se eluyeron con un gradiente de M6 libre. Las fracciones se recogieron en placas de 96 pocillos, y la actividad de GAA se analizó mediante el sustrato 4MU- α -glucosa. Las cantidades relativas de rhGAA unida y no unida se determinaron en base a la actividad de GAA, y se dieron a conocer como la fracción de enzima total.

La Fig. 5 describe los problemas asociados con las ERT convencionales (Myozyme® y Lumizyme®): el 73 % de la rhGAA en Myozyme® (Fig. 5B) y el 78 % de la rhGAA en Lumizyme® (Fig. 5A) no se unió al CIMPR, véanse los picos más a la izquierda en cada figura. Solo el 27 % de la rhGAA en Myozyme® y el 22 % de la rhGAA en Lumizyme®

contenía M6P que pueden direccionarla de manera productiva al CIMPR en células musculares, véase la Fig. 2 que describe el direccionamiento de fármaco productivo y el aclaramiento de fármaco no productivo.

Una dosis eficaz de Myozyme® y Lumizyme® corresponde a la cantidad de rhGAA que contiene M6P que se dirige al CIMPR en las células musculares. Sin embargo, la mayor parte de la rhGAA en estos dos productos convencionales no se dirige al receptor CIMPR en las células musculares diana. La administración de una rhGAA convencional, en la que la mayor parte de la rhGAA no está dirigida a las células musculares, aumenta el riesgo de reacción alérgica o de inducción de inmunidad a la rhGAA no dirigida.

Preparación de células CHO que producen rhGAA ATB-200 que tiene un alto contenido de N-glicanos que portan mono- o bis-M6P.

Se transfectaron células CHO con ADN que expresa rh-GAA seguido de la selección de transformantes que producen rhGAA. Un constructo de ADN para transformar células CHO con ADN que codifica rh-GAA se muestra en la Fig. 5. Se transfectaron células CHO con ADN que expresa rh-GAA seguido de la selección de transformantes que producen rhGAA.

Después de la transfección, las células DG44 CHO (DHFR-) que contenían un gen GAA integrado de forma estable se seleccionaron con medio deficiente en hipoxantina/timidina (-HT). La amplificación de 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 enzimática de GAA, y se usaron para establecer clones individuales que producían rhGAA. Se generaron clones individuales en placas de medios semisólidos, se seleccionaron mediante el sistema ClonePix, y se transfirieron a placas de 24 pocillos profundos. Se analizó la actividad de la enzima GAA en los clones individuales para identificar los clones que expresaban un alto nivel de GAA. Los medios acondicionados para determinar la actividad de GAA utilizaron un sustrato de 4-MU- α -Glucosidasa. Los clones que producían niveles más altos de GAA, medidos mediante ensayos de la enzima GAA, se evaluaron adicionalmente en cuanto a viabilidad, capacidad de crecimiento, productividad de GAA, estructura de N-glicanos, y expresión estable de proteínas. Utilizando este procedimiento, se aislaron líneas celulares CHO, incluyendo la línea celular CHO GA-ATB-200, que expresan rhGAA con N-glicanos mono-M6P o bis-M6P potenciados.

Purificación de rhGAA ATB-200 rhGAA

Se produjeron múltiples lotes de rhGAA según la invención en matraces de agitación y en biorreactores de perfusión usando la línea celular CHO GA-ATB-200, y se midió la unión a CIMPR. Se observó una unión al receptor CIMPR similar (~70%) a la mostrada en la Fig. 6B y la Fig. 7 para rhGAA ATB-200 purificada de diferentes lotes de producción, lo que indica que rhGAA ATB-200 puede producirse de manera consistente. Como se muestra mediante las Fig. 6A y 6B, las rhGAA de Myozyme® y Lumizyme® presentaban significativamente menos unión a CIMPR que rhGAA ATB-200.

Comparación analítica de ATB-200 con Lumizyme

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

Caracterización de oligosacáridos de rhGAA ATB-200

Se evaluaron glicanos de rhGAA ATB-200 y Lumizyme® purificados mediante MALDI-TOF para determinar las estructuras de glicano individuales encontradas en cada ERT (Fig. 9). Se encontró que las muestras de ATB-200 contenían cantidades ligeramente menores de N-glicanos de tipo con alto contenido de manosa no fosforilados que Lumizyme®. El mayor contenido de glicanos de M6P en ATB-200 que en Lumizyme, direcciona rhGAA ATB-200 a células musculares más efectivamente. El alto porcentaje de estructuras monofosforiladas y bisfosforiladas, determinado por MALDI, concuerda con los perfiles de CIMPR, que ilustraron una unión significativamente mayor de ATB-200 al receptor CIMPR. El análisis de N-glicanos mediante 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 contenido de N-glicano bis-M6P mayor en rhGAA ATB-200 se correlacionaba directamente con una unión de alta afinidad a CIMPR en ensayos de unión en placa de receptor M6P (K_D aproximadamente 2-4 nM) Figura 10A.

Caracterización de la afinidad por CIMPR de ATB-200

Además de tener un mayor porcentaje de rhGAA que puede unirse al CIMPR, es importante entender la calidad de esa interacción. La unión al receptor de Lumizyme® y rhGAA ATB200 se determinó usando un ensayo de unión en

placa a CIMPR. Brevemente, para capturar GAA, se utilizaron placas recubiertas con CIMPR. Se aplicaron concentraciones variables de rhGAA al receptor inmovilizado, y la rhGAA no unida se eliminó por lavado. La cantidad de rhGAA restante se determinó mediante la actividad de GAA. Como se muestra mediante la Fig. 10A, la rhGAA ATB-200 se unió a CIMPR significativamente mejor que Lumizyme.

La Fig. 10B muestra el contenido relativo de glicanos bis-M6P en Lumizyme, una rhGAA convencional, y ATB-200 según la invención. Para Lumizyme®, en promedio, solo el 10% de las moléculas tienen un glicano bisfosforilado. Compárese esto con ATB-200, en la que, en promedio, cada molécula de rhGAA tiene al menos un glicano bisfosforilado.

rhGAA ATB-200 se internalizó más eficientemente mediante fibroblasto que Lumizyme.

La captación celular relativa de las rhGAA ATB-200 y Lumizyme® se comparó utilizando líneas celulares de fibroblastos normales y de Pompe. Las comparaciones incluyeron 5-100 nM de rhGAA ATB-200 según la invención con 10-500 nM de rhGAA convencional Lumizyme®. Después de 16 horas de incubación, la rhGAA externa se inactivó con TRIS base, y las células se lavaron 3 veces con PBS antes de la recolección. La GAA internalizada se midió mediante hidrólisis de 4MU- α -glucósido y se representó gráficamente en relación con la proteína celular total y los resultados aparecen en la Fig. 11.

También se mostró que rhGAA ATB-200 se internaliza de manera eficiente en las células (Figura 11A y 11B), respectivamente, muestran que rhGAA ATB-200 se internaliza en células de fibroblastos tanto normales como de Pompe, y que se internaliza en mayor grado que la rhGAA convencional Lumizyme®. rhGAA ATB-200 satura los receptores celulares a alrededor de 20 nM, mientras que se necesita alrededor de 250 nM de Lumizyme®. La constante de eficiencia de absorción ($K_{\text{absorción}}$) extrapolada a partir de estos resultados es de 2-3 nM para ATB-200 y de 56 nM para Lumizyme® como se muestra mediante la Fig. 11C. Estos resultados sugieren que rhGAA ATB-200 es un tratamiento bien dirigido contra la enfermedad de Pompe.

Sección II: Estudios preclínicos

La rhGAA ATB-200 con glicosilación superior era significativamente mejor que el tratamiento de referencia de ERT para aclaramiento de glicógeno en músculos esqueléticos de ratones con supresión de GAA

Como se ha explicado anteriormente, la terapia de reemplazo enzimático (ERT) usando GAA humana recombinante (rhGAA) es el único tratamiento aprobado disponible para la enfermedad de Pompe. Esta ERT requiere el hidrato de carbono especializado manosa-6-fosfato (M6P) para la absorción celular y el suministro posterior a lisosomas por medio de receptores M6P independientes de catión (CIMPR) de la superficie celular. Sin embargo, la ERT de rhGAA actual contiene bajas cantidades de M6P que limitan el direccionamiento del fármaco y la eficacia en tejidos relevantes para la enfermedad. Los inventores desarrollaron una línea celular de producción y un proceso de fabricación que dan rhGAA (designada como rhGAA ATB-200) con una glicosilación superior y un contenido de M6P mayor que la rhGAA convencional, particularmente la estructura de N-glicano bis-M6P de alta afinidad, para un direccionamiento de fármaco mejorado. rhGAA ATB-200 se une al CI-MPR con alta afinidad ($K_D \sim 2-4$ nM) y se internalizó eficientemente mediante fibroblastos de Pompe y mioblastos de músculo esquelético ($K_{\text{absorción}} \sim 7-14$ nM).

rhGAA ATB-200 aclara el glicógeno significativamente mejor que Lumizyme® en músculo esquelético. Se evaluaron los efectos de administrar Lumizyme® y rhGAA ATB-200 para el aclaramiento de glicógeno en ratones con supresión de GAA. A los animales se les dieron dos administraciones por bolo IV (cada dos semanas); los tejidos se recogieron dos semanas tras la última dosis y se analizaron para la actividad GAA y el contenido de glicógeno (Fig. 12). rhGAA ATB-200 y rhGAA de Lumizyme® eran igualmente efectivas para aclarar glicógeno en el corazón (Fig. 12A). Como se muestra en las Fig. 12B y 12C, rhGAA ATB-200 a 5 mg/kg era equivalente a rhGAA de Lumizyme® a 20 mg/kg para reducir el glicógeno en músculos esqueléticos; ATB-200 dosificada a 10 y 20 mg/kg era significativamente mejor que Lumizyme® para aclarar el glicógeno en músculos esqueléticos.

Fundamento para la administración conjunta de rhGAA ATB-200 con AT2221 (tecnología CHART)

Una chaperona se une a y estabiliza la ERT de rhGAA, aumenta la absorción de enzima activa en tejidos, mejora la tolerabilidad y mitiga potencialmente la inmunogenicidad. Como se muestra anteriormente, la estabilidad proteínica de ERT en condiciones desfavorables se mejoraba sustancialmente usando CHART™. CHART: terapia de reemplazo avanzada con chaperona, véase http://_www.amicusrx.com/chaperone.aspx (accedido por última vez el 22 de septiembre de 2015).

Como se muestra mediante las Fig. 13A y 13B, la estabilidad de ATB-200 se mejoraba significativamente mediante AT2221 (miglustat, N-butil-desoxinojirimicina). El plegado de la proteína de rhGAA se monitorizó a 37 °C mediante desnaturalización térmica en tampones neutros (pH 7,4 - entorno de plasma) o ácidos (pH 5,2 - entorno lisosomal). AT2220 estabilizó la proteína de rhGAA en tampón de pH neutro a lo largo de 24 horas.

Administración conjunta de Myozyme® con AT2221 (miglustat) en comparación con la administración conjunta de rhGAA ATB-200 con miglustat

Ratones con supresión de GAA de doce semanas de edad tratados con Lumizyme® o ATB200, 20 mg/kg IV cada dos semanas 4 inyecciones; miglustat se administró conjuntamente a 10 mg/kg PO, 30 min antes de rhGAA tal como se indica. Los tejidos se recogieron 14 días después de la última dosis de enzima, para medir el glucógeno. La Fig. 14 muestra la reducción relativa de glucógeno en músculo esquelético, cuádriceps y tríceps.

Reducción del glucógeno tisular con rhGAA ATB-200 administrada conjuntamente con chaperona farmacológica AT2221 (miglustat).

Se encontró que la combinación de una chaperona farmacológica y rhGAA ATB-200 potenciaba el aclaramiento de glucógeno *in vivo*. A ratones con supresión de GAA se les dieron dos administraciones por bolo IV de rhGAA a 20 mg/kg cada 2 semanas. La chaperona farmacológica AT2221 se administró por vía oral 30 min antes de rhGAA a dosis de 0, 1, 2 y 10 mg/kg. Los tejidos recogieron dos semanas tras la última dosis de ERT y se analizaron para la actividad GAA, el contenido de glucógeno de glucógeno específico celular y la proliferación al lisosoma.

Como se muestra mediante la Fig. 15, los animales que reciben ATB200 + chaperona AT2221 presentaban un aclaramiento de glucógeno potenciado de músculo cuádriceps. rhGAA ATB-200 (20 mg/kg) redujo el glucógeno más que la misma dosis de Lumizyme® y cuando se combinó rhGAA ATB-200 con 10 mg/kg de AT2220 se alcanzaron niveles casi normales de glucógeno en el músculo.

Como se muestra mediante las Fig. 16A y 16B, a diferencia de la rhGAA convencional, que mostraba una reducción de glucógeno limitada (indicada mediante una señal PAS punteada abundante), rhGAA ATB-200 sola mostró una disminución significativa en las señales PAS. La administración conjunta con 10 mg/kg de miglustat dio como resultado una reducción adicional sustancial en el sustrato. La TEM reveló que la mayoría del glucógeno en los lisosomas era material unido a membrana, electrónicamente denso, lo que corresponde a las señales PAS punteadas. La administración conjunta de rhGAA ATB-200 con miglustat redujo el número, el tamaño y la densidad de lisosomas que contienen sustrato lo que sugiere un suministro direccionado de rhGAA ATB-200 a las células musculares y un suministro posterior a los lisosomas.

A partir del estudio (inyección de 2 bolos IV cada 2 semanas) mostrado anteriormente, los tejidos se procesaron para la proliferación lisosomal usando un marcador LAMP 1, la regulación por incremento es otro sello distintivo de la enfermedad de Pompe. LAMP: proteína de membrana asociada a lisosoma. A partir del estudio (inyección EOW de 2 bolos IV) mostrado anteriormente, se procesó tejido de sóleo para tinción con LAMP 1 en secciones adyacentes y anticuerpo específico de fibras de tipo I (NOQ7.5.4D) en secciones adyacentes (Fig. 16C y 16D). rhGAA ATB-200 da como resultado una reducción de LAMP1 más sustancial en comparación con rhGAA convencional, conduciendo las reducciones a niveles observados en animales WT (Figura 16C).

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

En un estudio independiente y diseñado de manera similar, se examinó el efecto de ATB-200 ± AT2221 a lo largo de un periodo más largo con 4 inyecciones de bolo IV bisemanalmente. En el corazón, el almacenamiento de glucógeno principal en los cardiomiocitos se aclaró fácilmente mediante la administración repetida de o bien rhGAA o bien ATB-200 hasta niveles vistos en animales naturales (WT) (Fig. 17A). Sin embargo, el sustrato en células de músculo liso cardíaco parece aclararse preferiblemente mediante rhGAA ATB-200, lo que sugiere una biodistribución potencialmente más amplia de ATB-200 en comparación con rhGAA (los asteriscos marcan la luz de vasos sanguíneos cardíacos). De manera importante, la administración conjunta con miglustat mejoró adicionalmente la reducción mediada por ATB-200 de la proliferación de LAMP1.

Estos resultados muestran que rhGAA ATB-200, que tiene niveles mayores de M6P y bis-M6P en sus N-glicanos, selecciona como diana eficientemente CIMPR en músculo esquelético. rhGAA ATB-200 también tienen N-glicanos de tipo complejo bien procesados que minimizan el aclaramiento no productivo *in vivo*, tiene propiedades farmacocinéticas favorables para su uso *in vivo* y presenta un buen direccionamiento a tejidos musculares clave *in vivo*. También muestran que rhGAA ATB-200 es mejor que el tratamiento de referencia convencional, Lumizyme, para reducir el glucógeno en tejido muscular y que una combinación de rhGAA ATB-200 y chaperona AT2221 mejora adicionalmente la eliminación de glucógeno de tejidos diana y mejora la patología muscular.

LISTADO DE SECUENCIAS

5	<110> AMICUS THERAPEUTICS GOTSCHALL, Russell Do, Hung
10	<120> ALFA-GLUCOSIDASA ÁCIDA ALTAMENTE POTENTE CON HIDRATOS DE CARBONO POTENCIADOS <130> 442420WO
15	<150> US 62/135.345 <151> 19-03-2015
20	<150> US 62/112.643 <151> 05-02-2015
25	<150> US 62/057.847 <151> 30-09-2014
30	<150> US 62/057.842 <151> 30-09-2014
35	<160> 4 <170> PatentIn versión 3.5
40	<210> 1 <211> 952 <212> PRT
45	<213> Homo sapiens <220>
50	<221> CARACTERÍSTICA_MISC <222> (1)..(952) <223> Secuencia 4 de la patente US 8592362GenBank: AHE24104.1 <400> 1

ES 3 017 134 T3

Met	Gly	Val	Arg	His	Pro	Pro	Cys	Ser	His	Arg	Leu	Leu	Ala	Val	Cys
1				5					10					15	
Ala	Leu	Val	Ser	Leu	Ala	Thr	Ala	Ala	Leu	Leu	Gly	His	Ile	Leu	Leu
			20					25					30		
His	Asp	Phe	Leu	Leu	Val	Pro	Arg	Glu	Leu	Ser	Gly	Ser	Ser	Pro	Val
		35					40					45			
Leu	Glu	Glu	Thr	His	Pro	Ala	His	Gln	Gln	Gly	Ala	Ser	Arg	Pro	Gly
	50					55					60				
Pro	Arg	Asp	Ala	Gln	Ala	His	Pro	Gly	Arg	Pro	Arg	Ala	Val	Pro	Thr
65					70				75					80	
Gln	Cys	Asp	Val	Pro	Pro	Asn	Ser	Arg	Phe	Asp	Cys	Ala	Pro	Asp	Lys
				85					90					95	

ES 3 017 134 T3

Ala	Ile	Thr	Gln	Glu	Gln	Cys	Glu	Ala	Arg	Gly	Cys	Cys	Tyr	Ile	Pro	100	105	110
Ala	Lys	Gln	Gly	Leu	Gln	Gly	Ala	Gln	Met	Gly	Gln	Pro	Trp	Cys	Phe	115	120	125
Phe	Pro	Pro	Ser	Tyr	Pro	Ser	Tyr	Lys	Leu	Glu	Asn	Leu	Ser	Ser	Ser	130	135	140
Glu	Met	Gly	Tyr	Thr	Ala	Thr	Leu	Thr	Arg	Thr	Thr	Pro	Thr	Phe	Phe	145	150	155
Pro	Lys	Asp	Ile	Leu	Thr	Leu	Arg	Leu	Asp	Val	Met	Met	Glu	Thr	Glu	165	170	175
Asn	Arg	Leu	His	Phe	Thr	Ile	Lys	Asp	Pro	Ala	Asn	Arg	Arg	Tyr	Glu	180	185	190
Val	Pro	Leu	Glu	Thr	Pro	Arg	Val	His	Ser	Arg	Ala	Pro	Ser	Pro	Leu	195	200	205
Tyr	Ser	Val	Glu	Phe	Ser	Glu	Glu	Pro	Phe	Gly	Val	Ile	Val	His	Arg	210	215	220
Gln	Leu	Asp	Gly	Arg	Val	Leu	Leu	Asn	Thr	Thr	Val	Ala	Pro	Leu	Phe	225	230	235
Phe	Ala	Asp	Gln	Phe	Leu	Gln	Leu	Ser	Thr	Ser	Leu	Pro	Ser	Gln	Tyr	245	250	255
Ile	Thr	Gly	Leu	Ala	Glu	His	Leu	Ser	Pro	Leu	Met	Leu	Ser	Thr	Ser	260	265	270
Trp	Thr	Arg	Ile	Thr	Leu	Trp	Asn	Arg	Asp	Leu	Ala	Pro	Thr	Pro	Gly	275	280	285
Ala	Asn	Leu	Tyr	Gly	Ser	His	Pro	Phe	Tyr	Leu	Ala	Leu	Glu	Asp	Gly	290	295	300
Gly	Ser	Ala	His	Gly	Val	Phe	Leu	Leu	Asn	Ser	Asn	Ala	Met	Asp	Val	305	310	315
Val	Leu	Gln	Pro	Ser	Pro	Ala	Leu	Ser	Trp	Arg	Ser	Thr	Gly	Gly	Ile	325	330	335
Leu	Asp	Val	Tyr	Ile	Phe	Leu	Gly	Pro	Glu	Pro	Lys	Ser	Val	Val	Gln	340	345	350

ES 3 017 134 T3

Gln Tyr Leu Asp Val Val Gly Tyr Pro Phe Met Pro Pro Tyr Trp Gly
 355 360 365
 Leu Gly Phe His Leu Cys Arg Trp Gly Tyr Ser Ser Thr Ala Ile Thr
 370 375 380
 Arg Gln Val Val Glu Asn Met Thr Arg Ala His Phe Pro Leu Asp Val
 385 390 395 400
 Gln Trp Asn Asp Leu Asp Tyr Met Asp Ser Arg Arg Asp Phe Thr Phe
 405 410 415
 Asn Lys Asp Gly Phe Arg Asp Phe Pro Ala Met Val Gln Glu Leu His
 420 425 430
 Gln Gly Gly Arg Arg Tyr Met Met Ile Val Asp Pro Ala Ile Ser Ser
 435 440 445
 Ser Gly Pro Ala Gly Ser Tyr Arg Pro Tyr Asp Glu Gly Leu Arg Arg
 450 455 460
 Gly Val Phe Ile Thr Asn Glu Thr Gly Gln Pro Leu Ile Gly Lys Val
 465 470 475 480
 Trp Pro Gly Ser Thr Ala Phe Pro Asp Phe Thr Asn Pro Thr Ala Leu
 485 490 495
 Ala Trp Trp Glu Asp Met Val Ala Glu Phe His Asp Gln Val Pro Phe
 500 505 510
 Asp Gly Met Trp Ile Asp Met Asn Glu Pro Ser Asn Phe Ile Arg Gly
 515 520 525
 Ser Glu Asp Gly Cys Pro Asn Asn Glu Leu Glu Asn Pro Pro Tyr Val
 530 535 540
 Pro Gly Val Val Gly Gly Thr Leu Gln Ala Ala Thr Ile Cys Ala Ser
 545 550 555 560
 Ser His Gln Phe Leu Ser Thr His Tyr Asn Leu His Asn Leu Tyr Gly
 565 570 575
 Leu Thr Glu Ala Ile Ala Ser His Arg Ala Leu Val Lys Ala Arg Gly
 580 585 590
 Thr Arg Pro Phe Val Ile Ser Arg Ser Thr Phe Ala Gly His Gly Arg

ES 3 017 134 T3

595	600	605
Tyr Ala Gly His Trp Thr Gly Asp Val Trp Ser Ser Trp Glu Gln Leu 610 615 620		
Ala Ser Ser Val Pro Glu Ile Leu Gln Phe Asn Leu Leu Gly Val Pro 625 630 635 640		
Leu Val Gly Ala Asp Val Cys Gly Phe Leu Gly Asn Thr Ser Glu Glu 645 650 655		
Leu Cys Val Arg Trp Thr Gln Leu Gly Ala Phe Tyr Pro Phe Met Arg 660 665 670		
Asn His Asn Ser Leu Leu Ser Leu Pro Gln Glu Pro Tyr Ser Phe Ser 675 680 685		
Glu Pro Ala Gln Gln Ala Met Arg Lys Ala Leu Thr Leu Arg Tyr Ala 690 695 700		
Leu Leu Pro His Leu Tyr Thr Leu Phe His Gln Ala His Val Ala Gly 705 710 715 720		
Glu Thr Val Ala Arg Pro Leu Phe Leu Glu Phe Pro Lys Asp Ser Ser 725 730 735		
Thr Trp Thr Val Asp His Gln Leu Leu Trp Gly Glu Ala Leu Leu Ile 740 745 750		
Thr Pro Val Leu Gln Ala Gly Lys Ala Glu Val Thr Gly Tyr Phe Pro 755 760 765		
Leu Gly Thr Trp Tyr Asp Leu Gln Thr Val Pro Ile Glu Ala Leu Gly 770 775 780		
Ser Leu Pro Pro Pro Pro Ala Ala Pro Arg Glu Pro Ala Ile His Ser 785 790 795 800		
Glu Gly Gln Trp Val Thr Leu Pro Ala Pro Leu Asp Thr Ile Asn Val 805 810 815		
His Leu Arg Ala Gly Tyr Ile Ile Pro Leu Gln Gly Pro Gly Leu Thr 820 825 830		
Thr Thr Glu Ser Arg Gln Gln Pro Met Ala Leu Ala Val Ala Leu Thr 835 840 845		

ES 3 017 134 T3

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

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

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

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

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

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

Glu Gln Phe Leu Val Ser Trp Cys
945 950

<210> 2

5 <211> 3624

<212> ADN

10 <213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

15 <222> (220)..(3078)

<223> ARNm de GAA de H. sapiens para alfa-glucosidasa lisosomal (maltasa

20 ácida); GenBank: Y00839.1

<400> 2

cagttgggaa agctgaggtt gtcgccgggg ccgcgggtgg aggtcgggga tgaggcagca 60

ggtaggacag tgacctcggt gacgcgaagg accccggcca cctctaggtt ctctctgtcc 120

gcccgttggt cagcgagggg ggctctgggc ctgccgcagc tgacggggaa actgaggcac 180

ggagcggggc tgtaggagct gtccaggcca tctccaacc atg gga gtg agg cac 234
Met Gly Val Arg His
1 5

ccg ccc tgc tcc cac cgg ctc ctg gcc gtc tgc gcc ctc gtg tcc ttg 282
Pro Pro Cys Ser His Arg Leu Leu Ala Val Cys Ala Leu Val Ser Leu
10 15 20

gca acc gct gca ctc ctg ggg cac atc cta ctc cat gat ttc ctg ctg 330
Ala Thr Ala Ala Leu Leu Gly His Ile Leu Leu His Asp Phe Leu Leu
25 30 35

gtt ccc cga gag ctg agt ggc tcc tcc cca gtc ctg gag gag act cac 378
Val Pro Arg Glu Leu Ser Gly Ser Ser Pro Val Leu Glu Glu Thr His
40 45 50

ES 3 017 134 T3

cca gct cac cag cag gga gcc agc aga cca ggg ccc cgg gat gcc cag Pro Ala His Gln Gln Gly Ala Ser Arg Pro Gly Pro Arg Asp Ala Gln 55 60 65	426
gca cac ccc ggc cgt ccc aga gca gtg ccc aca cag tgc gac gtc ccc Ala His Pro Gly Arg Pro Arg Ala Val Pro Thr Gln Cys Asp Val Pro 70 75 80 85	474
ccc aac agc cgc ttc gat tgc gcc cct gac aag gcc atc acc cag gaa Pro Asn Ser Arg Phe Asp Cys Ala Pro Asp Lys Ala Ile Thr Gln Glu 90 95 100	522
cag tgc gag gcc cgc ggc tgc tgc tac atc cct gca aag cag ggg ctg Gln Cys Glu Ala Arg Gly Cys Cys Tyr Ile Pro Ala Lys Gln Gly Leu 105 110 115	570
cag gga gcc cag atg ggg cag ccc tgg tgc ttc ttc cca ccc agc tac Gln Gly Ala Gln Met Gly Gln Pro Trp Cys Phe Phe Pro Pro Ser Tyr 120 125 130	618
ccc agc tac aag ctg gag aac ctg agc tcc tct gaa atg ggc tac acg Pro Ser Tyr Lys Leu Glu Asn Leu Ser Ser Ser Glu Met Gly Tyr Thr 135 140 145	666
gcc acc ctg acc cgt acc acc ccc acc ttc ttc ccc aag gac atc ctg Ala Thr Leu Thr Arg Thr Thr Pro Thr Phe Phe Pro Lys Asp Ile Leu 150 155 160 165	714
acc ctg cgg ctg gac gtg atg atg gag act gag aac cgc ctc cac ttc Thr Leu Arg Leu Asp Val Met Met Glu Thr Glu Asn Arg Leu His Phe 170 175 180	762
acg atc aaa gat cca gct aac agg cgc tac gag gtg ccc ttg gag acc Thr Ile Lys Asp Pro Ala Asn Arg Arg Tyr Glu Val Pro Leu Glu Thr 185 190 195	810
ccg cgt gtc cac agc cgg gca ccc tcc cca ctc tac agc gtg gag ttc Pro Arg Val His Ser Arg Ala Pro Ser Pro Leu Tyr Ser Val Glu Phe 200 205 210	858
tcc gag gag ccc ttc ggg gtg atc gtg cac cgg cag ctg gac ggc cgc Ser Glu Glu Pro Phe Gly Val Ile Val His Arg Gln Leu Asp Gly Arg 215 220 225	906
gtg ctg ctg aac acg acg gtg gcg ccc ctg ttc ttt gcg gac cag ttc Val Leu Leu Asn Thr Thr Val Ala Pro Leu Phe Phe Ala Asp Gln Phe 230 235 240 245	954
ctt cag ctg tcc acc tcg ctg ccc tcg cag tat atc aca ggc ctc gcc Leu Gln Leu Ser Thr Ser Leu Pro Ser Gln Tyr Ile Thr Gly Leu Ala 250 255 260	1002
gag cac ctc agt ccc ctg atg ctc agc acc agc tgg acc agg atc acc Glu His Leu Ser Pro Leu Met Leu Ser Thr Ser Trp Thr Arg Ile Thr 265 270 275	1050
ctg tgg aac cgg gac ctt gcg ccc acg ccc ggt gcg aac ctc tac ggg Leu Trp Asn Arg Asp Leu Ala Pro Thr Pro Gly Ala Asn Leu Tyr Gly 280 285 290	1098
tct cac cct ttc tac ctg gcg ctg gag gac ggc ggg tcg gca cac ggg Ser His Pro Phe Tyr Leu Ala Leu Glu Asp Gly Gly Ser Ala His Gly 295 300 305	1146

ES 3 017 134 T3

gtg ttc ctg cta aac agc aat gcc atg gat gtg gtc ctg cag ccg agc Val Phe Leu Leu Asn Ser Asn Ala Met Asp Val Val Leu Gln Pro Ser 310 315 320 325	1194
cct gcc ctt agc tgg agg tcg aca ggt ggg atc ctg gat gtc tac atc Pro Ala Leu Ser Trp Arg Ser Thr Gly Gly Ile Leu Asp Val Tyr Ile 330 335 340	1242
ttc ctg ggc cca gag ccc aag agc gtg gtg cag cag tac ctg gac gtt Phe Leu Gly Pro Glu Pro Lys Ser Val Val Gln Gln Tyr Leu Asp Val 345 350 355	1290
gtg gga tac ccg ttc atg ccg cca tac tgg ggc ctg ggc ttc cac ctg Val Gly Tyr Pro Phe Met Pro Pro Tyr Trp Gly Leu Gly Phe His Leu 360 365 370	1338
tgc cgc tgg ggc tac tcc tcc acc gct atc acc cgc cag gtg gtg gag Cys Arg Trp Gly Tyr Ser Ser Thr Ala Ile Thr Arg Gln Val Val Glu 375 380 385	1386
aac atg acc agg gcc cac ttc ccc ctg gac gtc caa tgg aac gac ctg Asn Met Thr Arg Ala His Phe Pro Leu Asp Val Gln Trp Asn Asp Leu 390 395 400 405	1434
gac tac atg gac tcc cgg agg gac ttc acg ttc aac aag gat ggc ttc Asp Tyr Met Asp Ser Arg Arg Asp Phe Thr Phe Asn Lys Asp Gly Phe 410 415 420	1482
cgg gac ttc ccg gcc atg gtg cag gag ctg cac cag ggc ggc cgg cgc Arg Asp Phe Pro Ala Met Val Gln Glu Leu His Gln Gly Gly Arg Arg 425 430 435	1530
tac atg atg atc gtg gat cct gcc atc agc agc tcg ggc cct gcc ggg Tyr Met Met Ile Val Asp Pro Ala Ile Ser Ser Ser Gly Pro Ala Gly 440 445 450	1578
agc tac agg ccc tac gac gag ggt ctg cgg agg ggg gtt ttc atc acc Ser Tyr Arg Pro Tyr Asp Glu Gly Leu Arg Arg Gly Val Phe Ile Thr 455 460 465	1626
aac gag acc ggc cag ccg ctg att ggg aag gta tgg ccc ggg tcc act Asn Glu Thr Gly Gln Pro Leu Ile Gly Lys Val Trp Pro Gly Ser Thr 470 475 480 485	1674
gcc ttc ccc gac ttc acc aac ccc aca gcc ctg gcc tgg tgg gag gac Ala Phe Pro Asp Phe Thr Asn Pro Thr Ala Leu Ala Trp Trp Glu Asp 490 495 500	1722
atg gtg gct gag ttc cat gac cag gtg ccc ttc gac ggc atg tgg att Met Val Ala Glu Phe His Asp Gln Val Pro Phe Asp Gly Met Trp Ile 505 510 515	1770
gac atg aac gag cct tcc aac ttc atc aga ggc tct gag gac ggc tgc Asp Met Asn Glu Pro Ser Asn Phe Ile Arg Gly Ser Glu Asp Gly Cys 520 525 530	1818
ccc aac aat gag ctg gag aac cca ccc tac gtg cct ggg gtg gtt ggg Pro Asn Asn Glu Leu Glu Asn Pro Pro Tyr Val Pro Gly Val Val Gly 535 540 545	1866
ggg acc ctc cag gcg gcc acc atc tgt gcc tcc agc cac cag ttt ctc Gly Thr Leu Gln Ala Ala Thr Ile Cys Ala Ser Ser His Gln Phe Leu	1914

ES 3 017 134 T3

550	555	560	565	
tcc aca cac tac aac ctg cac aac ctc tac ggc ctg acc gaa gcc atc				1962
Ser Thr His Tyr Asn Leu His Asn Leu Tyr Gly Leu Thr Glu Ala Ile	570	575	580	
gcc tcc cac agg gcg ctg gtg aag gct cgg ggg aca cgc cca ttt gtg				2010
Ala Ser His Arg Ala Leu Val Lys Ala Arg Gly Thr Arg Pro Phe Val	585	590	595	
atc tcc cgc tgc acc ttt gct ggc cac ggc cga tac gcc ggc cac tgg				2058
Ile Ser Arg Ser Thr Phe Ala Gly His Gly Arg Tyr Ala Gly His Trp	600	605	610	
acg ggg gac gtg tgg agc tcc tgg gag cag ctc gcc tcc tcc gtg cca				2106
Thr Gly Asp Val Trp Ser Ser Trp Glu Gln Leu Ala Ser Ser Val Pro	615	620	625	
gaa atc ctg cag ttt aac ctg ctg ggg gtg cct ctg gtc ggg gcc gac				2154
Glu Ile Leu Gln Phe Asn Leu Leu Gly Val Pro Leu Val Gly Ala Asp	630	635	640	645
gtc tgc ggc ttc ctg ggc aac acc tca gag gag ctg tgt gtg cgc tgg				2202
Val Cys Gly Phe Leu Gly Asn Thr Ser Glu Glu Leu Cys Val Arg Trp	650	655	660	
acc cag ctg ggg gcc ttc tac ccc ttc atg cgg aac cac aac agc ctg				2250
Thr Gln Leu Ala Phe Tyr Pro Phe Met Arg Asn His Asn Ser Leu	665	670	675	
ctc agt ctg ccc cag gag cgg tac agc ttc agc gag cgg gcc cag cag				2298
Leu Ser Leu Pro Gln Glu Pro Tyr Ser Phe Ser Glu Pro Ala Gln Gln	680	685	690	
gcc atg agg aag gcc ctc acc ctg cgc tac gca ctc ctc ccc cac ctc				2346
Ala Met Arg Lys Ala Leu Thr Leu Arg Tyr Ala Leu Leu Pro His Leu	695	700	705	
tac aca ctg ttc cac cag gcc cac gtc ggc ggg gag acc gtg gcc cgg				2394
Tyr Thr Leu Phe His Gln Ala His Val Ala Gly Glu Thr Val Ala Arg	710	715	720	725
ccc ctc ttc ctg gag ttc ccc aag gac tct agc acc tgg act gtg gac				2442
Pro Leu Phe Leu Glu Phe Pro Lys Asp Ser Ser Thr Trp Thr Val Asp	730	735	740	
cac cag ctc ctg tgg ggg gag gcc ctg ctc atc acc cca gtg ctc cag				2490
His Gln Leu Leu Trp Gly Glu Ala Leu Leu Ile Thr Pro Val Leu Gln	745	750	755	
gcc ggg aag gcc gaa gtg act ggc tac ttc ccc ttg ggc aca tgg tac				2538
Ala Gly Lys Ala Glu Val Thr Gly Tyr Phe Pro Leu Gly Thr Trp Tyr	760	765	770	
gac ctg cag acg gtg cca ata gag gcc ctt ggc agc ctc cca ccc cca				2586
Asp Leu Gln Thr Val Pro Ile Glu Ala Leu Gly Ser Leu Pro Pro Pro	775	780	785	
cct gca gct ccc cgt gag cca gcc atc cac agc gag ggg cag tgg gtg				2634
Pro Ala Ala Pro Arg Glu Pro Ala Ile His Ser Glu Gly Gln Trp Val	790	795	800	805
acg ctg cgg gcc ccc ctg gac acc atc aac gtc cac ctc cgg gct ggg				2682

ES 3 017 134 T3

Thr	Leu	Pro	Ala	Pro	Leu	Asp	Thr	Ile	Asn	Val	His	Leu	Arg	Ala	Gly		
				810					815					820			
tac	atc	atc	ccc	ctg	cag	ggc	cct	ggc	ctc	aca	acc	aca	gag	tcc	cgc		2730
Tyr	Ile	Ile	Pro	Leu	Gln	Gly	Pro	Gly	Leu	Thr	Thr	Thr	Glu	Ser	Arg		
			825					830					835				
cag	cag	ccc	atg	gcc	ctg	gct	gtg	gcc	ctg	acc	aag	ggg	gga	gag	gcc		2778
Gln	Gln	Pro	Met	Ala	Leu	Ala	Val	Ala	Leu	Thr	Lys	Gly	Gly	Glu	Ala		
			840					845				850					
cga	ggg	gag	ctg	ttc	tgg	gac	gat	gga	gag	agc	ctg	gaa	gtg	ctg	gag		2826
Arg	Gly	Glu	Leu	Phe	Trp	Asp	Asp	Gly	Glu	Ser	Leu	Glu	Val	Leu	Glu		
	855					860					865						
cga	ggg	gcc	tac	aca	cag	gtc	atc	ttc	ctg	gcc	agg	aat	aac	acg	atc		2874
Arg	Gly	Ala	Tyr	Thr	Gln	Val	Ile	Phe	Leu	Ala	Arg	Asn	Asn	Thr	Ile		
	870				875					880				885			
gtg	aat	gag	ctg	gta	cgt	gtg	acc	agt	gag	gga	gct	ggc	ctg	cag	ctg		2922
Val	Asn	Glu	Leu	Val	Arg	Val	Thr	Ser	Glu	Gly	Ala	Gly	Leu	Gln	Leu		
				890						895				900			
cag	aag	gtg	act	gtc	ctg	ggc	gtg	gcc	acg	gag	ccc	cag	cag	gtc	ctc		2970
Gln	Lys	Val	Thr	Val	Leu	Gly	Val	Ala	Thr	Ala	Pro	Gln	Gln	Val	Leu		
			905					910					915				
tcc	aac	ggg	gtc	cct	gtc	tcc	aac	ttc	acc	tac	agc	ccc	gac	acc	aag		3018
Ser	Asn	Gly	Val	Pro	Val	Ser	Asn	Phe	Thr	Tyr	Ser	Pro	Asp	Thr	Lys		
		920					925					930					
gtc	ctg	gac	atc	tgt	gtc	tgg	ctg	ttg	atg	gga	gag	cag	ttt	ctc	gtc		3066
Val	Leu	Asp	Ile	Cys	Val	Ser	Leu	Leu	Met	Gly	Glu	Gln	Phe	Leu	Val		
		935					940					945					
agc	tgg	tgt	tag	ccggg	cgagg	tgtgttagtc	totccagagg	gaggctggtt									3118
Ser	Trp	Cys															
		950															
ccccagggaa	gcagagcctg	tgtgctgggca	gcagctgtgt	gctggcctgg	gggttgcatg												3178
tgtcacctgg	agctgggcac	taaccattcc	aagccgccgc	atcgcttggt	tccacctcct												3238
gggcccggggc	tctggccccc	aacgtgtcta	ggagagcttt	ctccctagat	cgcactgtgg												3298
gcccggggcct	ggagggctgc	tctgtgttaa	taagattgta	aggtttgccc	tcctcacctg												3358
ttgccggcat	gcgggtagta	ttagccaccc	ccctccatct	gttccagca	ccggagaagg												3418
gggtgctcag	gtggagggtgt	ggggtatgca	cctgagctcc	tgcttcgggc	ctgctgctct												3478
gccccaaagc	gaccgcttcc	cggtgcccc	gagggtgga	tgctgcccgg	tccccagca												3538
agcctgggaa	ctcaggaaaa	ttcacaggac	ttgggagatt	ctaaatctta	agtgcaatta												3598
ttttaataaaa	aggggcattt	ggaatc															3624

<210> 3

5 <211> 952

<212> PRT

<213> Homo sapiens

10

<400> 3

ES 3 017 134 T3

Met	Gly	Val	Arg	His	Pro	Pro	Cys	Ser	His	Arg	Leu	Leu	Ala	Val	Cys	1	5	10	15
Ala	Leu	Val	Ser	Leu	Ala	Thr	Ala	Ala	Leu	Leu	Gly	His	Ile	Leu	Leu	20	25	30	
His	Asp	Phe	Leu	Leu	Val	Pro	Arg	Glu	Leu	Ser	Gly	Ser	Ser	Pro	Val	35	40	45	
Leu	Glu	Glu	Thr	His	Pro	Ala	His	Gln	Gln	Gly	Ala	Ser	Arg	Pro	Gly	50	55	60	
Pro	Arg	Asp	Ala	Gln	Ala	His	Pro	Gly	Arg	Pro	Arg	Ala	Val	Pro	Thr	65	70	75	80
Gln	Cys	Asp	Val	Pro	Pro	Asn	Ser	Arg	Phe	Asp	Cys	Ala	Pro	Asp	Lys	85	90	95	
Ala	Ile	Thr	Gln	Glu	Gln	Cys	Glu	Ala	Arg	Gly	Cys	Cys	Tyr	Ile	Pro	100	105	110	
Ala	Lys	Gln	Gly	Leu	Gln	Gly	Ala	Gln	Met	Gly	Gln	Pro	Trp	Cys	Phe	115	120	125	
Phe	Pro	Pro	Ser	Tyr	Pro	Ser	Tyr	Lys	Leu	Glu	Asn	Leu	Ser	Ser	Ser	130	135	140	
Glu	Met	Gly	Tyr	Thr	Ala	Thr	Leu	Thr	Arg	Thr	Thr	Pro	Thr	Phe	Phe	145	150	155	160
Pro	Lys	Asp	Ile	Leu	Thr	Leu	Arg	Leu	Asp	Val	Met	Met	Glu	Thr	Glu	165	170	175	
Asn	Arg	Leu	His	Phe	Thr	Ile	Lys	Asp	Pro	Ala	Asn	Arg	Arg	Tyr	Glu	180	185	190	
Val	Pro	Leu	Glu	Thr	Pro	Arg	Val	His	Ser	Arg	Ala	Pro	Ser	Pro	Leu	195	200	205	
Tyr	Ser	Val	Glu	Phe	Ser	Glu	Glu	Pro	Phe	Gly	Val	Ile	Val	His	Arg	210	215	220	
Gln	Leu	Asp	Gly	Arg	Val	Leu	Leu	Asn	Thr	Thr	Val	Ala	Pro	Leu	Phe	225	230	235	240
Phe	Ala	Asp	Gln	Phe	Leu	Gln	Leu	Ser	Thr	Ser	Leu	Pro	Ser	Gln	Tyr				

ES 3 017 134 T3

	245		250		255
Ile Thr Gly	Leu Ala Glu His Leu Ser Pro Leu Met Leu Ser Thr Ser				
	260		265		270
Trp Thr Arg	Ile Thr Leu Trp Asn Arg Asp Leu Ala Pro Thr Pro Gly				
	275		280		285
Ala Asn Leu Tyr Gly Ser His Pro Phe Tyr Leu Ala Leu Glu Asp Gly					
	290		295		300
Gly Ser Ala His Gly Val Phe Leu Leu Asn Ser Asn Ala Met Asp Val					
305		310		315	320
Val Leu Gln Pro Ser Pro Ala Leu Ser Trp Arg Ser Thr Gly Gly Ile					
	325		330		335
Leu Asp Val Tyr Ile Phe Leu Gly Pro Glu Pro Lys Ser Val Val Gln					
	340		345		350
Gln Tyr Leu Asp Val Val Gly Tyr Pro Phe Met Pro Pro Tyr Trp Gly					
	355		360		365
Leu Gly Phe His Leu Cys Arg Trp Gly Tyr Ser Ser Thr Ala Ile Thr					
	370		375		380
Arg Gln Val Val Glu Asn Met Thr Arg Ala His Phe Pro Leu Asp Val					
385		390		395	400
Gln Trp Asn Asp Leu Asp Tyr Met Asp Ser Arg Arg Asp Phe Thr Phe					
	405		410		415
Asn Lys Asp Gly Phe Arg Asp Phe Pro Ala Met Val Gln Glu Leu His					
	420		425		430
Gln Gly Gly Arg Arg Tyr Met Met Ile Val Asp Pro Ala Ile Ser Ser					
	435		440		445
Ser Gly Pro Ala Gly Ser Tyr Arg Pro Tyr Asp Glu Gly Leu Arg Arg					
	450		455		460
Gly Val Phe Ile Thr Asn Glu Thr Gly Gln Pro Leu Ile Gly Lys Val					
465		470		475	480
Trp Pro Gly Ser Thr Ala Phe Pro Asp Phe Thr Asn Pro Thr Ala Leu					
	485		490		495

ES 3 017 134 T3

Ala	Trp	Trp	Glu	Asp	Met	Val	Ala	Glu	Phe	His	Asp	Gln	Val	Pro	Phe	500	505	510
Asp	Gly	Met	Trp	Ile	Asp	Met	Asn	Glu	Pro	Ser	Asn	Phe	Ile	Arg	Gly	515	520	525
Ser	Glu	Asp	Gly	Cys	Pro	Asn	Asn	Glu	Leu	Glu	Asn	Pro	Pro	Tyr	Val	530	535	540
Pro	Gly	Val	Val	Gly	Gly	Thr	Leu	Gln	Ala	Ala	Thr	Ile	Cys	Ala	Ser	545	550	555
Ser	His	Gln	Phe	Leu	Ser	Thr	His	Tyr	Asn	Leu	His	Asn	Leu	Tyr	Gly	565	570	575
Leu	Thr	Glu	Ala	Ile	Ala	Ser	His	Arg	Ala	Leu	Val	Lys	Ala	Arg	Gly	580	585	590
Thr	Arg	Pro	Phe	Val	Ile	Ser	Arg	Ser	Thr	Phe	Ala	Gly	His	Gly	Arg	595	600	605
Tyr	Ala	Gly	His	Trp	Thr	Gly	Asp	Val	Trp	Ser	Ser	Trp	Glu	Gln	Leu	610	615	620
Ala	Ser	Ser	Val	Pro	Glu	Ile	Leu	Gln	Phe	Asn	Leu	Leu	Gly	Val	Pro	625	630	635
Leu	Val	Gly	Ala	Asp	Val	Cys	Gly	Phe	Leu	Gly	Asn	Thr	Ser	Glu	Glu	645	650	655
Leu	Cys	Val	Arg	Trp	Thr	Gln	Leu	Gly	Ala	Phe	Tyr	Pro	Phe	Met	Arg	660	665	670
Asn	His	Asn	Ser	Leu	Leu	Ser	Leu	Pro	Gln	Glu	Pro	Tyr	Ser	Phe	Ser	675	680	685
Glu	Pro	Ala	Gln	Gln	Ala	Met	Arg	Lys	Ala	Leu	Thr	Leu	Arg	Tyr	Ala	690	695	700
Leu	Leu	Pro	His	Leu	Tyr	Thr	Leu	Phe	His	Gln	Ala	His	Val	Ala	Gly	705	710	715
Glu	Thr	Val	Ala	Arg	Pro	Leu	Phe	Leu	Glu	Phe	Pro	Lys	Asp	Ser	Ser	725	730	735
Thr	Trp	Thr	Val	Asp	His	Gln	Leu	Leu	Trp	Gly	Glu	Ala	Leu	Leu	Ile	740	745	750

ES 3 017 134 T3

Thr Pro Val Leu Gln Ala Gly Lys Ala Glu Val Thr Gly Tyr Phe Pro
 755 760 765
 Leu Gly Thr Trp Tyr Asp Leu Gln Thr Val Pro Ile Glu Ala Leu Gly
 770 775 780
 Ser Leu Pro Pro Pro Pro Ala Ala Pro Arg Glu Pro Ala Ile His Ser
 785 790 795 800
 Glu Gly Gln Trp Val Thr Leu Pro Ala Pro Leu Asp Thr Ile Asn Val
 805 810 815
 His Leu Arg Ala Gly Tyr Ile Ile Pro Leu Gln Gly Pro Gly Leu Thr
 820 825 830
 Thr Thr Glu Ser Arg Gln Gln Pro Met Ala Leu Ala Val Ala Leu Thr
 835 840 845
 Lys Gly Gly Glu Ala Arg Gly Glu Leu Phe Trp Asp Asp Gly Glu Ser
 850 855 860
 Leu Glu Val Leu Glu Arg Gly Ala Tyr Thr Gln Val Ile Phe Leu Ala
 865 870 875 880
 Arg Asn Asn Thr Ile Val Asn Glu Leu Val Arg Val Thr Ser Glu Gly
 885 890 895
 Ala Gly Leu Gln Leu Gln Lys Val Thr Val Leu Gly Val Ala Thr Ala
 900 905 910
 Pro Gln Gln Val Leu Ser Asn Gly Val Pro Val Ser Asn Phe Thr Tyr
 915 920 925
 Ser Pro Asp Thr Lys Val Leu Asp Ile Cys Val Ser Leu Leu Met Gly
 930 935 940
 Glu Gln Phe Leu Val Ser Trp Cys
 945 950

<210> 4

5 <211> 952

<212> PRT

10 <213> Homo sapiens

<220>

<221> CARACTERÍSTICA_MISC

15 <222> (1)..(952)

<223> Preproteína de alfa-glucosidasa lisosomal [Homo sapiens]; secuencia de referencia de NCBI: NP_000143.2

20 <400> 4

ES 3 017 134 T3

Met Gly Val Arg His Pro Pro Cys Ser His Arg Leu Leu Ala Val Cys
 1 5 10 15
 Ala Leu Val Ser Leu Ala Thr Ala Ala Leu Leu Gly His Ile Leu Leu
 20 25 30
 His Asp Phe Leu Leu Val Pro Arg Glu Leu Ser Gly Ser Ser Pro Val
 35 40 45
 Leu Glu Glu Thr His Pro Ala His Gln Gln Gly Ala Ser Arg Pro Gly
 50 55 60
 Pro Arg Asp Ala Gln Ala His Pro Gly Arg Pro Arg Ala Val Pro Thr
 65 70 75 80
 Gln Cys Asp Val Pro Pro Asn Ser Arg Phe Asp Cys Ala Pro Asp Lys
 85 90 95
 Ala Ile Thr Gln Glu Gln Cys Glu Ala Arg Gly Cys Cys Tyr Ile Pro
 100 105 110
 Ala Lys Gln Gly Leu Gln Gly Ala Gln Met Gly Gln Pro Trp Cys Phe
 115 120 125
 Phe Pro Pro Ser Tyr Pro Ser Tyr Lys Leu Glu Asn Leu Ser Ser Ser
 130 135 140
 Glu Met Gly Tyr Thr Ala Thr Leu Thr Arg Thr Thr Pro Thr Phe Phe
 145 150 155 160
 Pro Lys Asp Ile Leu Thr Leu Arg Leu Asp Val Met Met Glu Thr Glu
 165 170 175
 Asn Arg Leu His Phe Thr Ile Lys Asp Pro Ala Asn Arg Arg Tyr Glu
 180 185 190
 Val Pro Leu Glu Thr Pro His Val His Ser Arg Ala Pro Ser Pro Leu
 195 200 205
 Tyr Ser Val Glu Phe Ser Glu Glu Pro Phe Gly Val Ile Val Arg Arg
 210 215 220
 Gln Leu Asp Gly Arg Val Leu Leu Asn Thr Thr Val Ala Pro Leu Phe
 225 230 235 240

ES 3 017 134 T3

Phe Ala Asp Gln Phe Leu Gln Leu Ser Thr Ser Leu Pro Ser Gln Tyr
 245 250 255
 Ile Thr Gly Leu Ala Glu His Leu Ser Pro Leu Met Leu Ser Thr Ser
 260 265 270
 Trp Thr Arg Ile Thr Leu Trp Asn Arg Asp Leu Ala Pro Thr Pro Gly
 275 280 285
 Ala Asn Leu Tyr Gly Ser His Pro Phe Tyr Leu Ala Leu Glu Asp Gly
 290 295 300
 Gly Ser Ala His Gly Val Phe Leu Leu Asn Ser Asn Ala Met Asp Val
 305 310 315 320
 Val Leu Gln Pro Ser Pro Ala Leu Ser Trp Arg Ser Thr Gly Gly Ile
 325 330 335
 Leu Asp Val Tyr Ile Phe Leu Gly Pro Glu Pro Lys Ser Val Val Gln
 340 345 350
 Gln Tyr Leu Asp Val Val Gly Tyr Pro Phe Met Pro Pro Tyr Trp Gly
 355 360 365
 Leu Gly Phe His Leu Cys Arg Trp Gly Tyr Ser Ser Thr Ala Ile Thr
 370 375 380
 Arg Gln Val Val Glu Asn Met Thr Arg Ala His Phe Pro Leu Asp Val
 385 390 395 400
 Gln Trp Asn Asp Leu Asp Tyr Met Asp Ser Arg Arg Asp Phe Thr Phe
 405 410 415
 Asn Lys Asp Gly Phe Arg Asp Phe Pro Ala Met Val Gln Glu Leu His
 420 425 430
 Gln Gly Gly Arg Arg Tyr Met Met Ile Val Asp Pro Ala Ile Ser Ser
 435 440 445
 Ser Gly Pro Ala Gly Ser Tyr Arg Pro Tyr Asp Glu Gly Leu Arg Arg
 450 455 460
 Gly Val Phe Ile Thr Asn Glu Thr Gly Gln Pro Leu Ile Gly Lys Val
 465 470 475 480
 Trp Pro Gly Ser Thr Ala Phe Pro Asp Phe Thr Asn Pro Thr Ala Leu
 485 490 495

ES 3 017 134 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 3 017 134 T3

740	745	750
Thr Pro Val Leu Gln Ala Gly Lys Ala Glu Val Thr Gly Tyr Phe Pro		
755	760	765
Leu Gly Thr Trp Tyr Asp Leu Gln Thr Val Pro Val Glu Ala Leu Gly		
770	775	780
Ser Leu Pro Pro Pro Pro Ala Ala Pro Arg Glu Pro Ala Ile His Ser		
785	790	795
Glu Gly Gln Trp Val Thr Leu Pro Ala Pro Leu Asp Thr Ile Asn Val		
805	810	815
His Leu Arg Ala Gly Tyr Ile Ile Pro Leu Gln Gly Pro Gly Leu Thr		
820	825	830
Thr Thr Glu Ser Arg Gln Gln Pro Met Ala Leu Ala Val Ala Leu Thr		
835	840	845
Lys Gly Gly Glu Ala Arg Gly Glu Leu Phe Trp Asp Asp Gly Glu Ser		
850	855	860
Leu Glu Val Leu Glu Arg Gly Ala Tyr Thr Gln Val Ile Phe Leu Ala		
865	870	875
Arg Asn Asn Thr Ile Val Asn Glu Leu Val Arg Val Thr Ser Glu Gly		
885	890	895
Ala Gly Leu Gln Leu Gln Lys Val Thr Val Leu Gly Val Ala Thr Ala		
900	905	910
Pro Gln Gln Val Leu Ser Asn Gly Val Pro Val Ser Asn Phe Thr Tyr		
915	920	925
Ser Pro Asp Thr Lys Val Leu Asp Ile Cys Val Ser Leu Leu Met Gly		
930	935	940
Glu Gln Phe Leu Val Ser Trp Cys		
945	950	

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición que comprende alfa-glucosidasa ácida humana recombinante (rhGAA) producida mediante células de ovario de hámster chino (CHO), en donde el 40 %-60 % de los N-glicanos totales en la rhGAA en la composición son N-glicanos de tipo complejo y en promedio los N-glicanos contienen más de 3 moles de manosa-6-fosfato (M6P) por mol de rhGAA.
- 10 2. La composición de la reivindicación 1, en donde la rhGAA en promedio porta 2,0 a 8,0 residuos de ácido siálico por mol de rhGAA.
3. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en donde en promedio los N-glicanos contienen más de 4 moles de ácidos siálico por mol de rhGAA.
- 15 4. La composición de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde en contenido promedio de N-glicanos que portan M6P oscila de 3,0 a 7,0 moles por mol de rhGAA.
- 20 5. La composición de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde al menos 3 %-10 % de los glicanos totales en la rhGAA están en la forma de glicano con manosa-6-fosfato mono-fosforilado (mono-M6P), al menos del 0,5-3,0 % de los glicanos totales en la rhGAA están en forma de un glicano con manosa-6-fosfato bis-fosforilado (bis-M6P), y en promedio menos del 25 % de la rhGAA total no contienen glicano fosforilado que se une a CIMPR.
- 25 6. La composición de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde al menos el 3 % de los glicanos totales en la rhGAA son glicanos bis-M6P.
7. La composición de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde 45- el 55 % de los N-glicanos totales en la rhGAA en la composición son N-glicanos de tipo complejo.
- 30 8. La composición de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el 50 % de los N-glicanos totales en la rhGAA son glicanos de tipo complejo.
9. La composición de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la rhGAA se produce mediante células CHO transformadas con un constructo de ADN que codifica SEQ ID NO: 4.
- 35 10. La composición de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende además una chaperona farmacológica.
11. La composición de la reivindicación 10, en donde la chaperona farmacológica se selecciona del grupo que consiste en 1-desoxinojirimicina o una sal de la misma y N-butil-desoxinojirimicina o una sal de la misma.
- 40 12. La composición de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, para su uso en el tratamiento de enfermedad de Pompe.
- 45 13. La composición para el uso de la reivindicación 12, en donde dicha composición se administra a (a) músculo cardíaco del sujeto, (b) cuádriceps, tríceps u otro músculo esquelético del sujeto, o (c) el diafragma del sujeto.
14. La composición para el uso de la reivindicación 12 o la reivindicación 13, en donde dicha composición se combina con, se administra conjuntamente con, o se administra por separado junto con, una chaperona farmacológica.
- 50 15. La composición para el uso de la reivindicación 14, en donde la chaperona farmacológica se selecciona del grupo que consiste en 1-desoxinojirimicina o una sal de la misma y N-butil-desoxinojirimicina o una sal de la misma.

Fig. 1A

Estructura y afinidad por el receptor para oligosacáridos con alto contenido de manosa y fosforilados

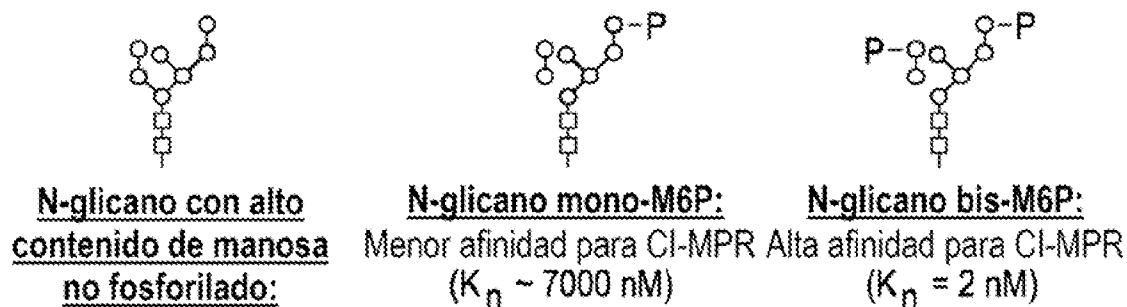
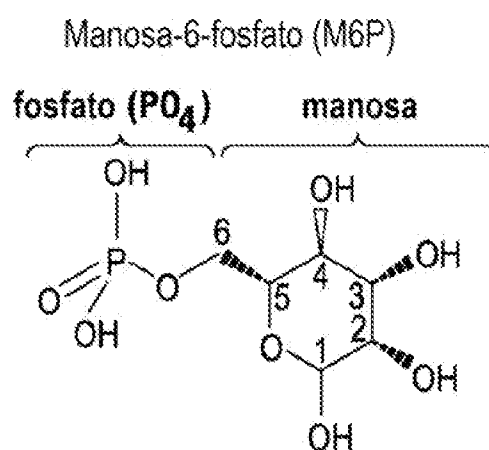


Fig. 1B

Estructura química de manosa-6-fosfato



Comparación de receptores específicos de glicano de direccionamiento productivo y no productivo

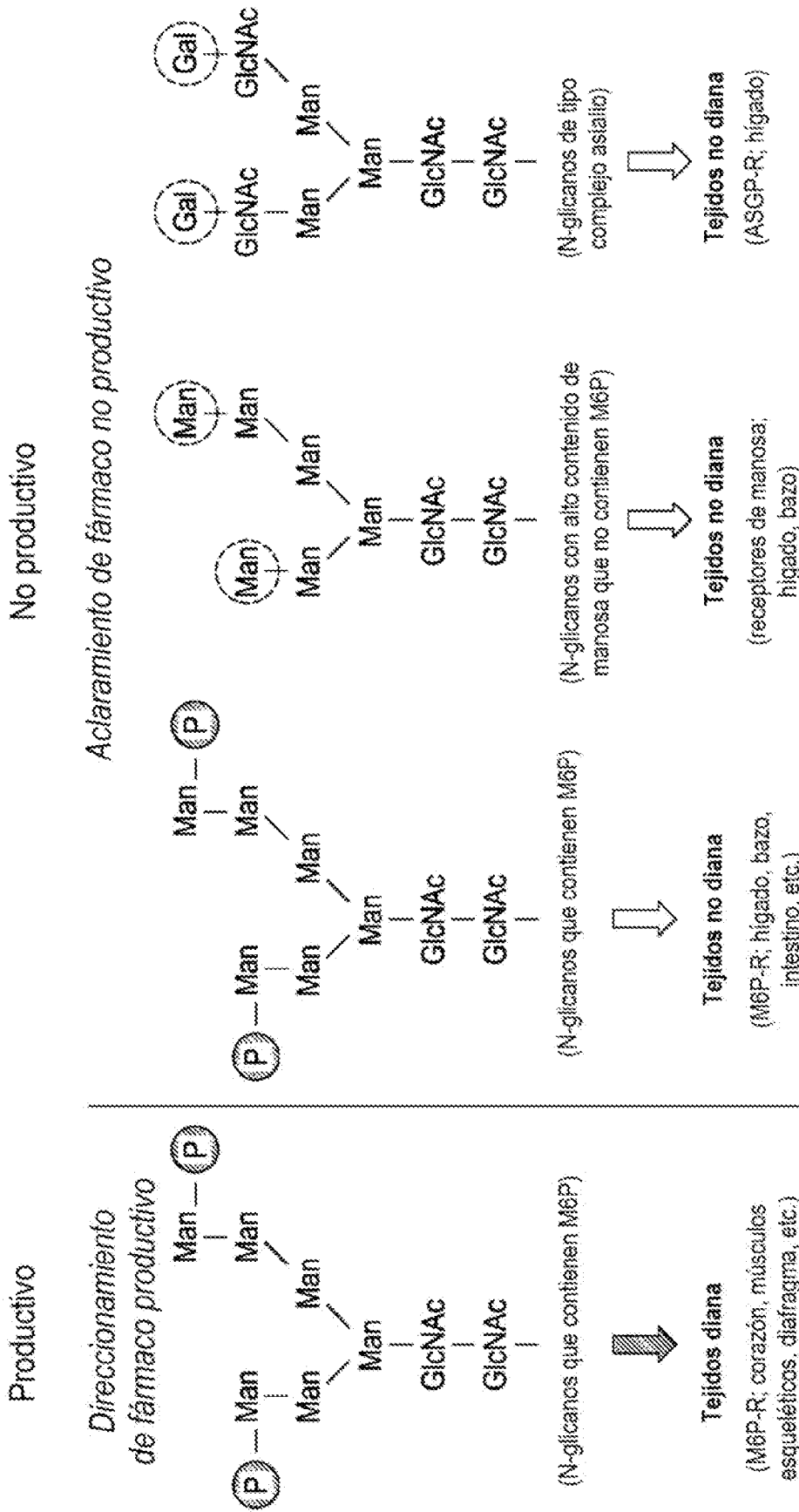


Fig. 2A

Fig. 2B

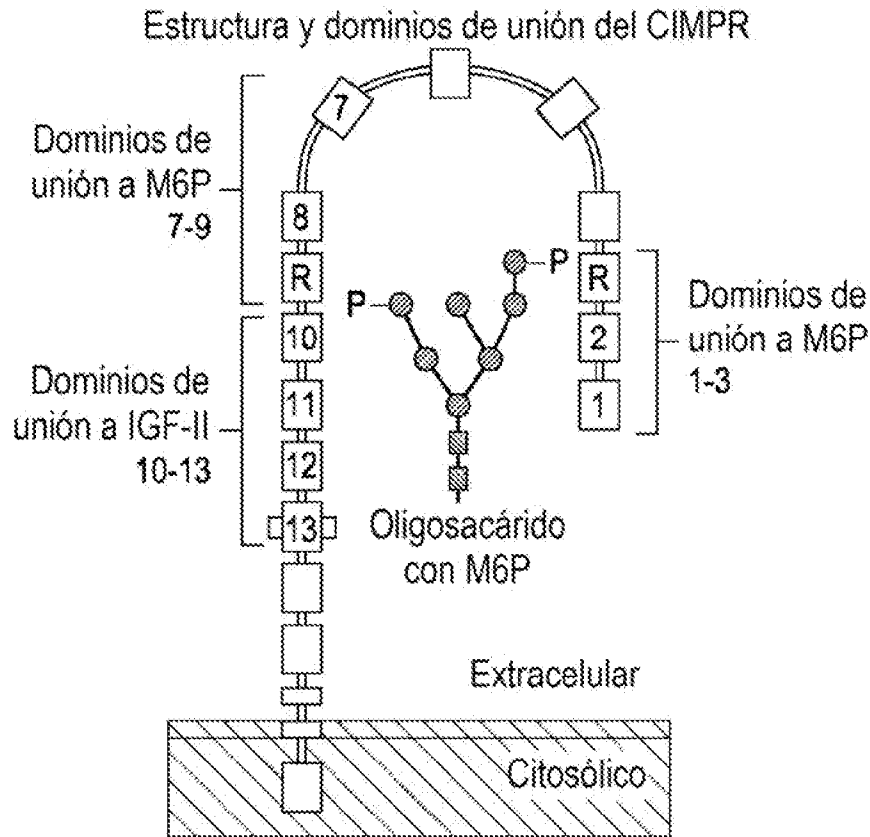


Fig. 3A

Ligandos; afinidad y ubicación *in vivo* de tres receptores de glicoproteína

Ligando	Receptor	Afinidad (nmolar)	Ubicación
Glicano bisfosforilado	CIMPR	2	Todas las células
Glicano monofosforilado		7.000	
Glicano con alto contenido de manosa	Receptor de manosa	20 ^b	Macrófagos Células dendríticas
Glicano complejo desialilado	Receptor de asialoglicoproteína	7 ^c	Hepatocitos

Referencia: ^aTong *et al* 1989; ^bTaylor *et al* 1992; ^cSchwartz *et al* 1981

Fig. 3B

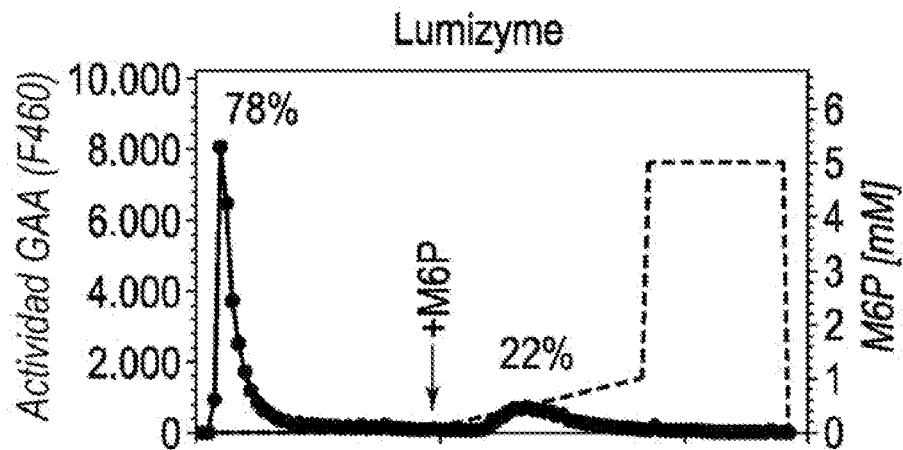


Fig. 4A

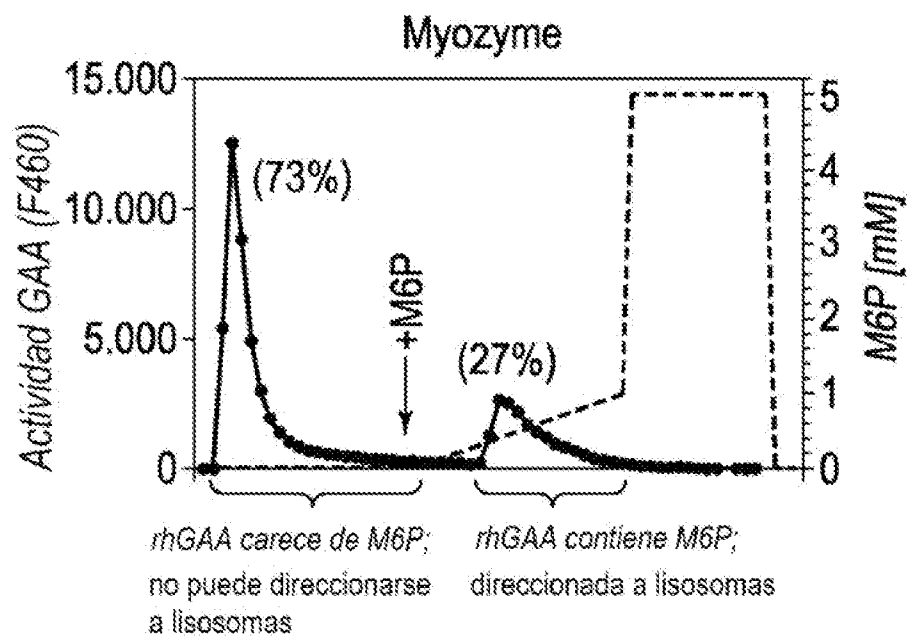


Fig. 4B

Construcción del vector ATB200

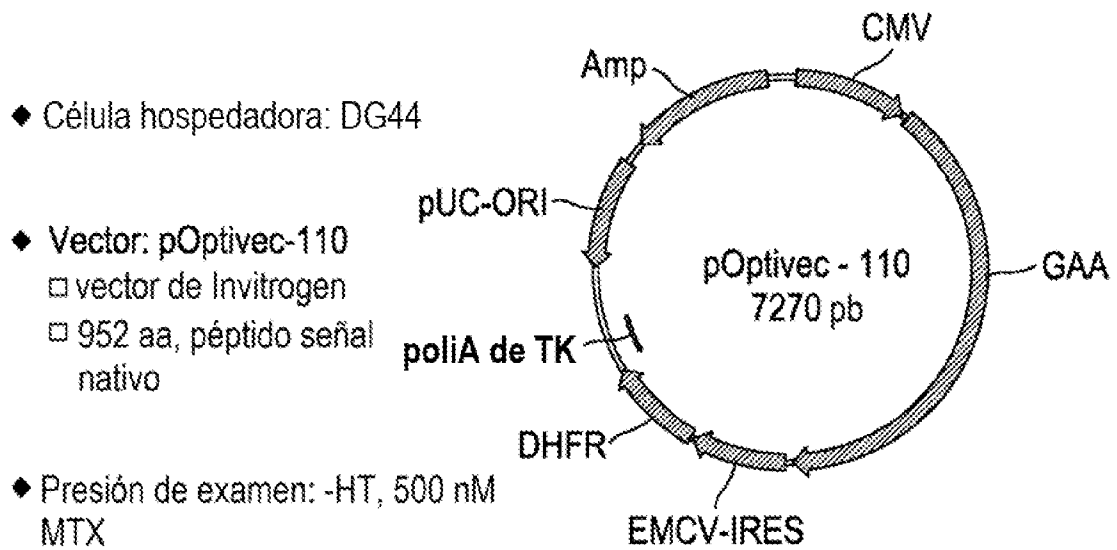


Fig. 5

Perfil de unión a CIMPR de Lumizyme en comparación con el de rhGAA
 ATB-200
 Lumizyme

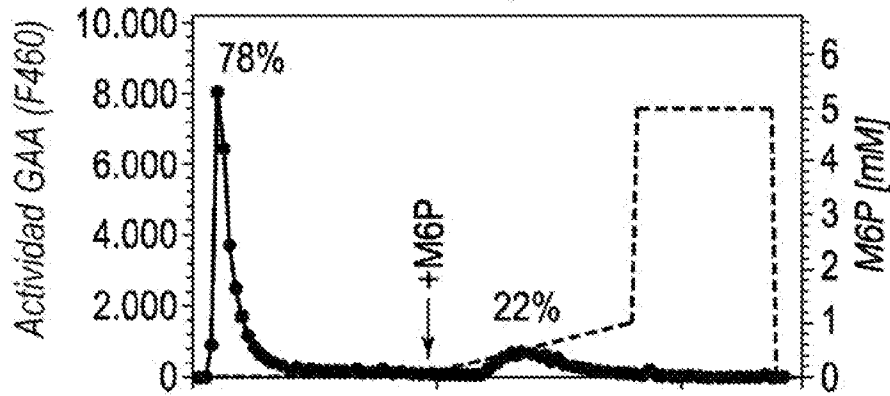


Fig. 6A

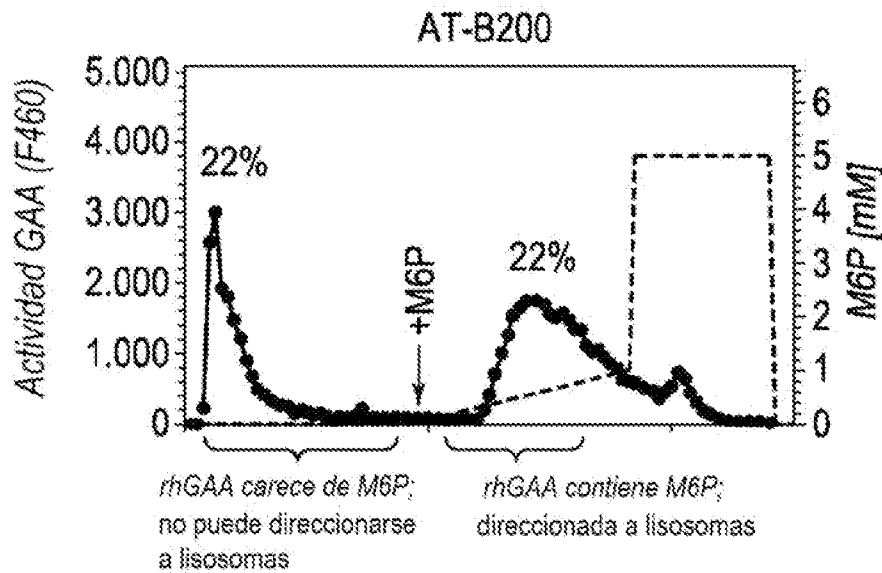


Fig. 6B

Optimización de la fabricación para ATB200

Realización 1

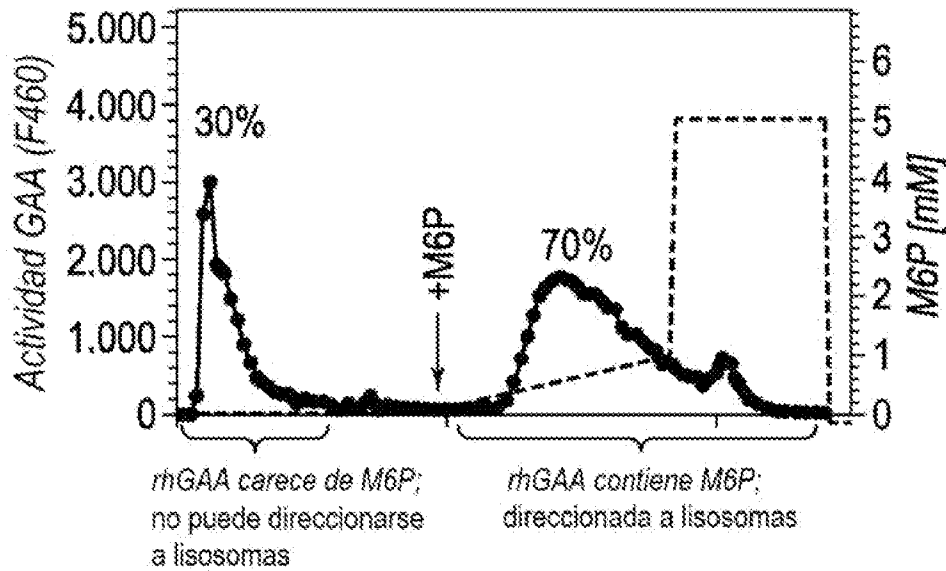


Fig. 7A

Realización 2

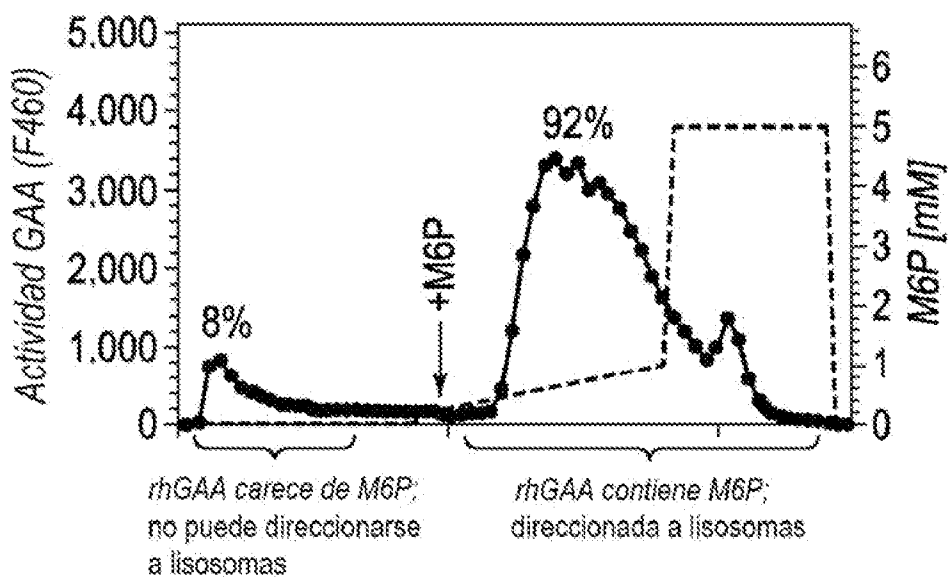
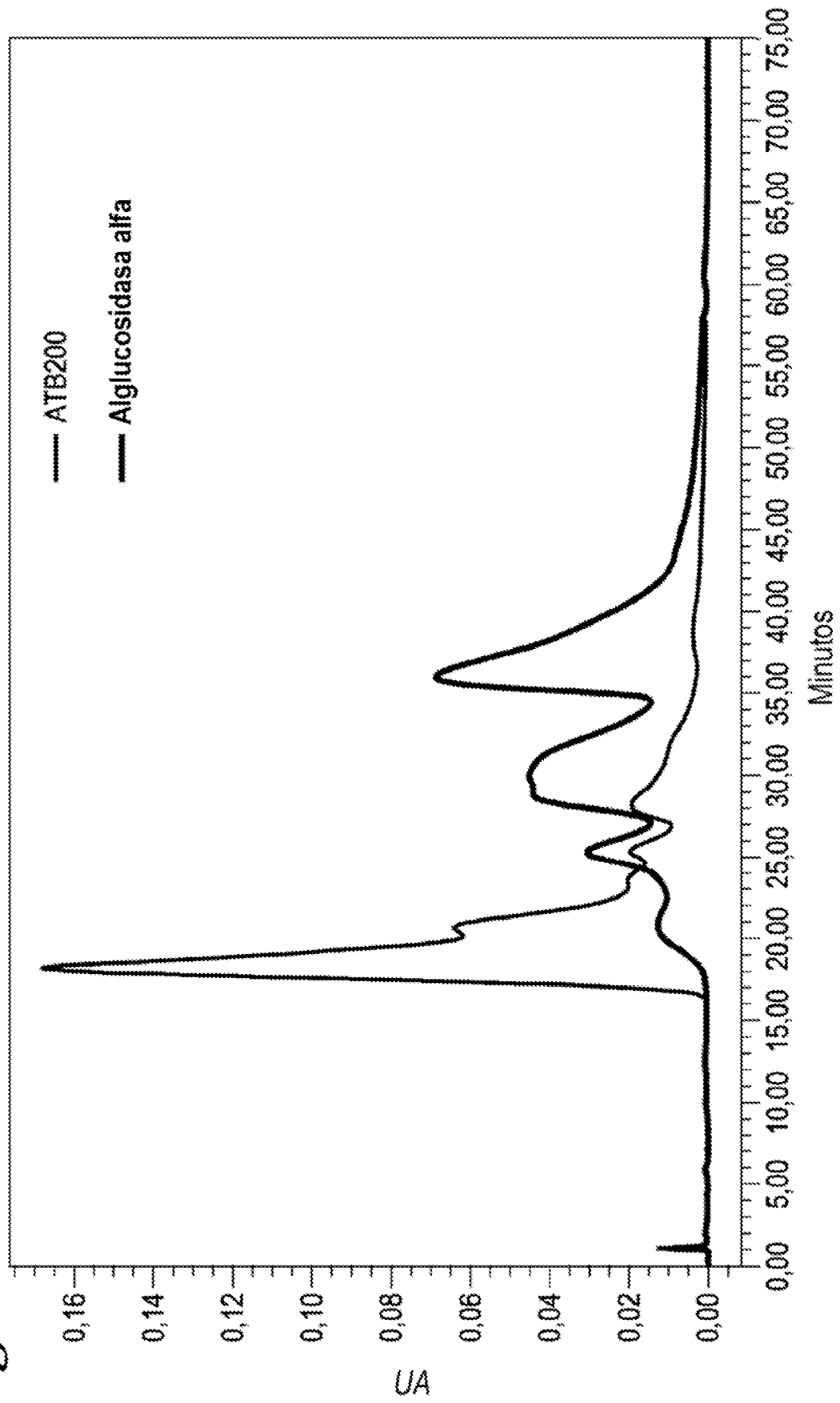


Fig. 7B

Fig. 8

Perfiles de elución en Polywax de alglucosidasa alfa y rhGAA ATB200

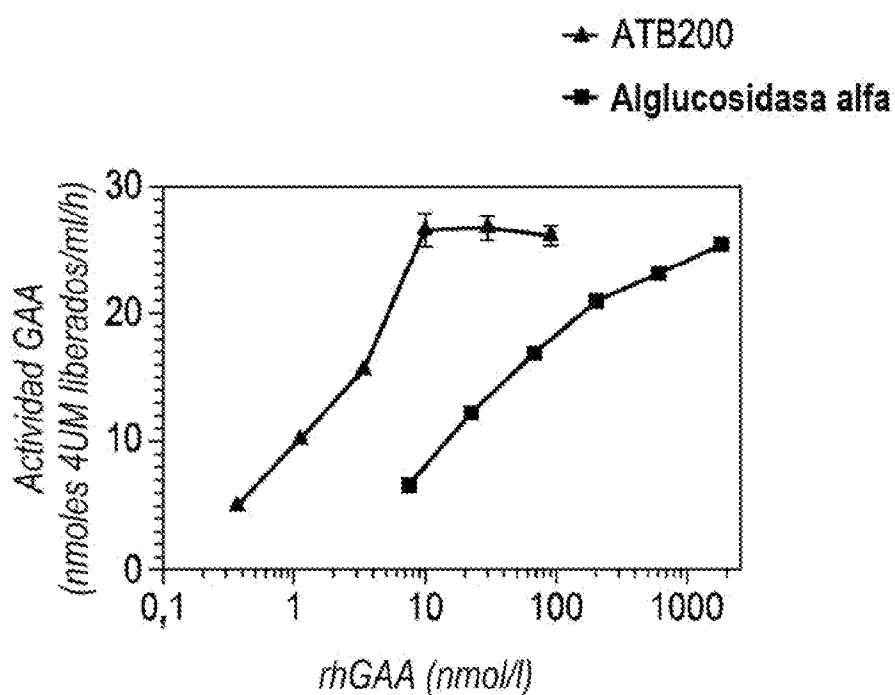


Distribución de N-glicanos en preparados de rhGAA

	Lumizyme	BP-rhGAA*	ATB200	
			1	2
N-glicanos de tipo complejo	70,7%	48,9%	51,0%	47,5%
N-glicanos de tipo híbrido	6,7%	9,7%	4,4%	3,7%
N-glicanos tipo alto cont. manosa.				
No fosforilados	15,8%	23,7%	14,0%	9,9%
Mono-M6P	5,2%	10,4%	13,4%	14,2%
Bis-M6P	1,6%	6,8%	17,2%	24,7%

Fig. 9

Medición de la afinidad de unión a CIMPR

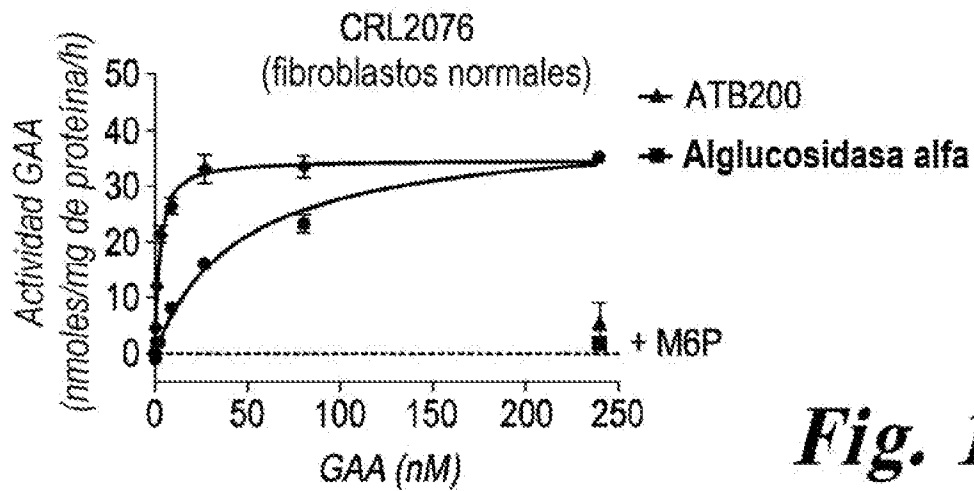
**Fig. 10A**

Comparación de oligosacáridos bisfosforilados

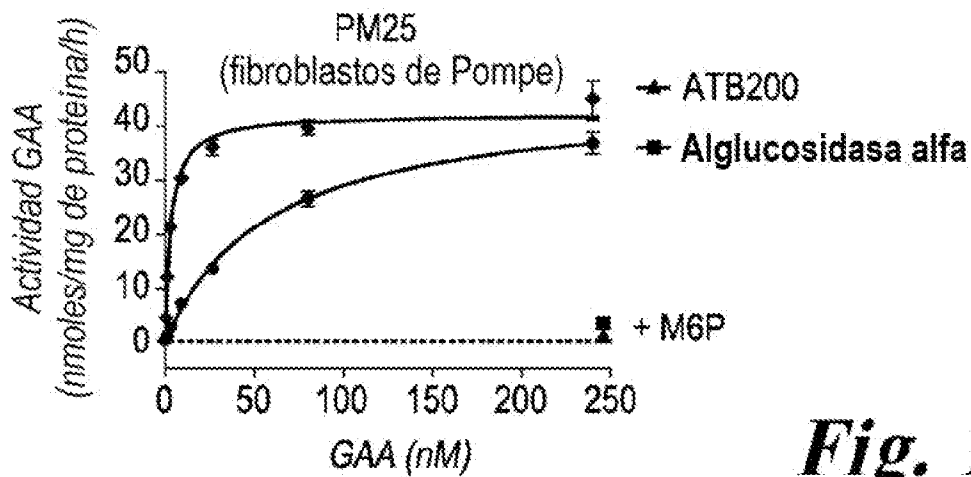
Glicano	Alglucosidasa alfa (moles de bis-glicano/ mol de proteína)	ATB200 (moles de bis-glicano/mol de proteína)
Bis-M6P	0,1	1,3

Fig. 10B

Absorción de CIMPR en fibroblastos normales

**Fig. 11A**

Absorción de CIMPR en fibroblastos de Pompe

**Fig. 11B** $K_{\text{absorción}}$ Comparación en fibroblastos normales y de Pompe

Línea celular	$K_{\text{absorción}}$ (nM)	
	AT200	Lumizyme
normal	2	56
Pompe	3	57

Fig. 11C

Aclaramiento de glicógeno comparativo mediante rhGAA ATB-200 y rhGAA de Lumizyme en corazón, músculos cuádriceps y tríceps

Reducción de glicógeno en el corazón

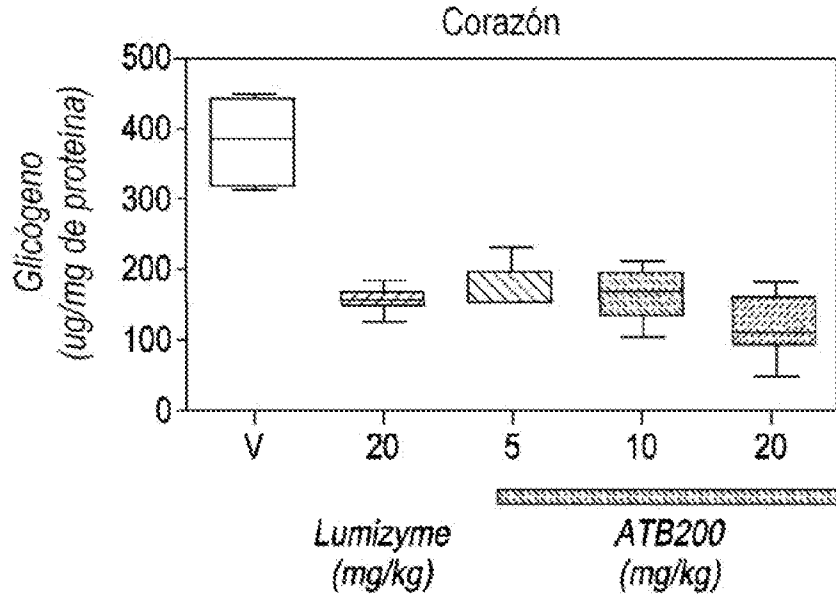


Fig. 12A

Reducción de glicógeno en el cuádriceps

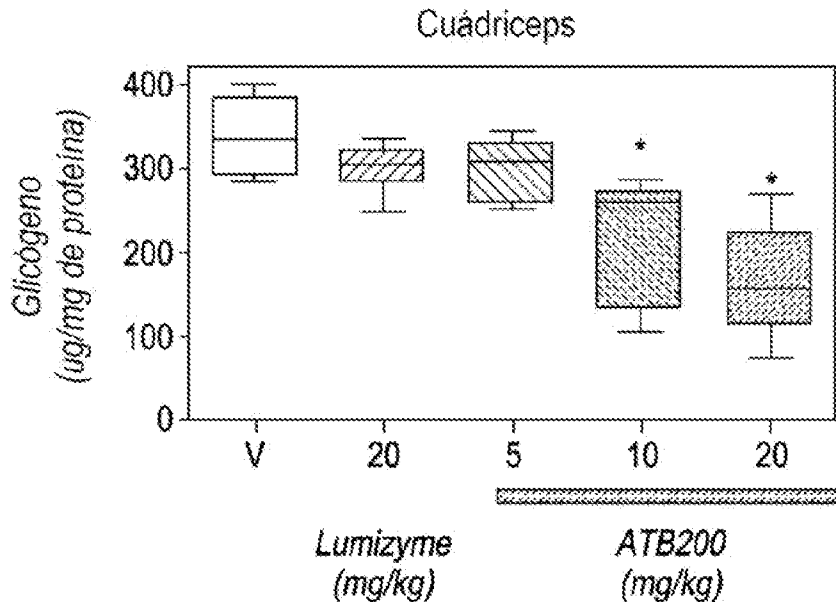


Fig. 12B

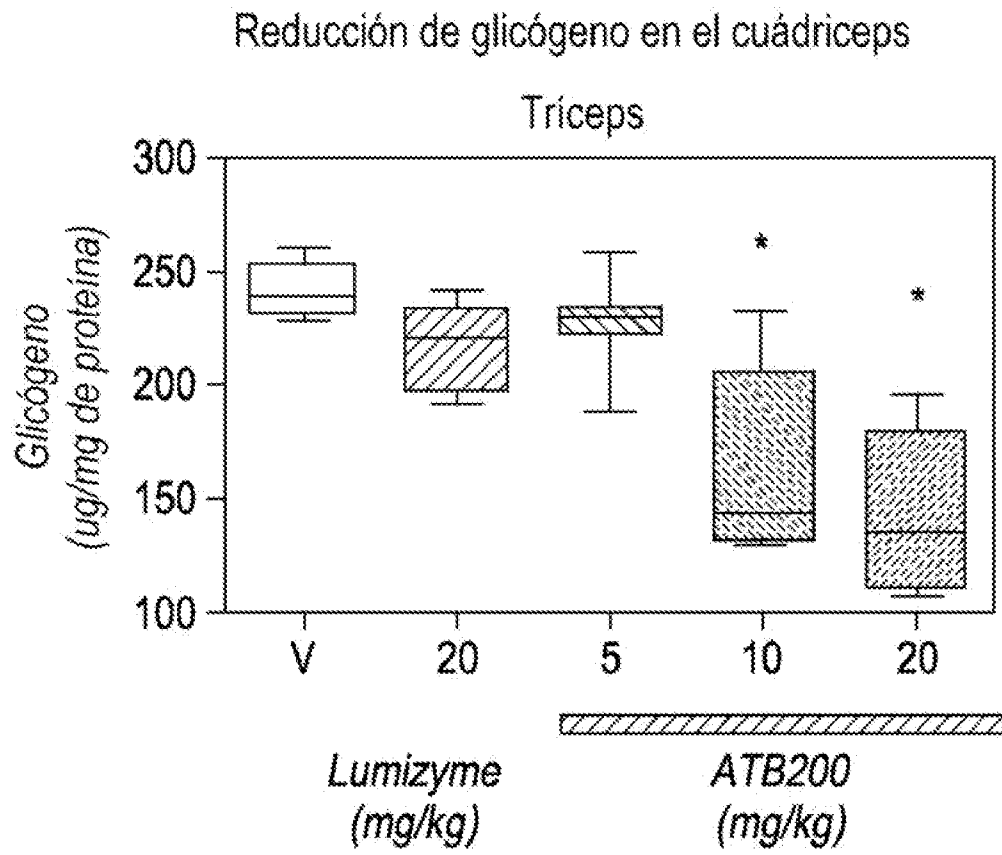
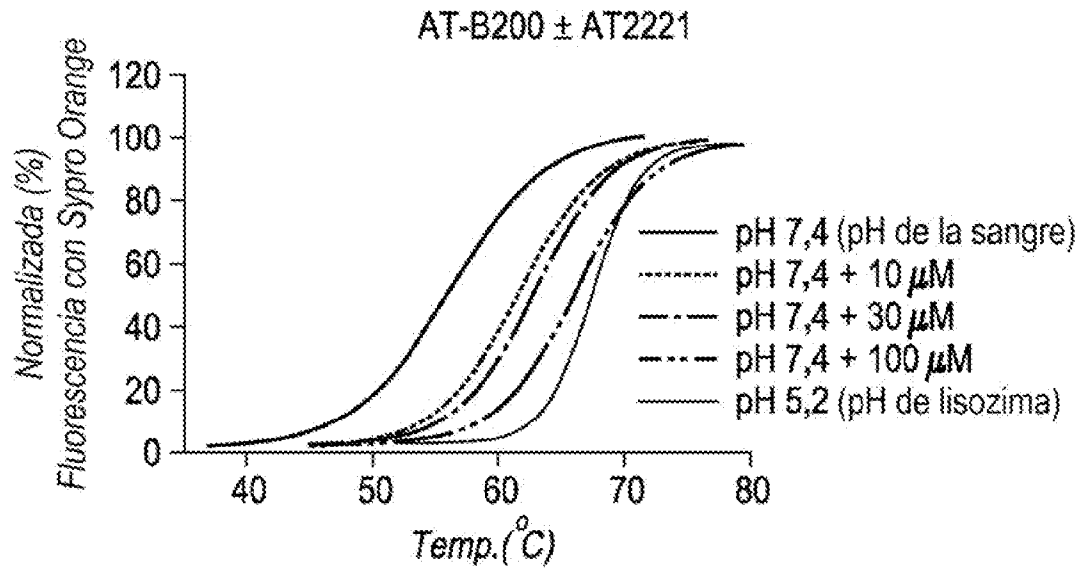


Fig. 12C

Efectos de la temperatura sobre el plegado de rhGAA
ATB-200 en presencia de chaperona AT2221



Resumen de temp. de fusión de ATB200 con cantidades crecientes de AT2221

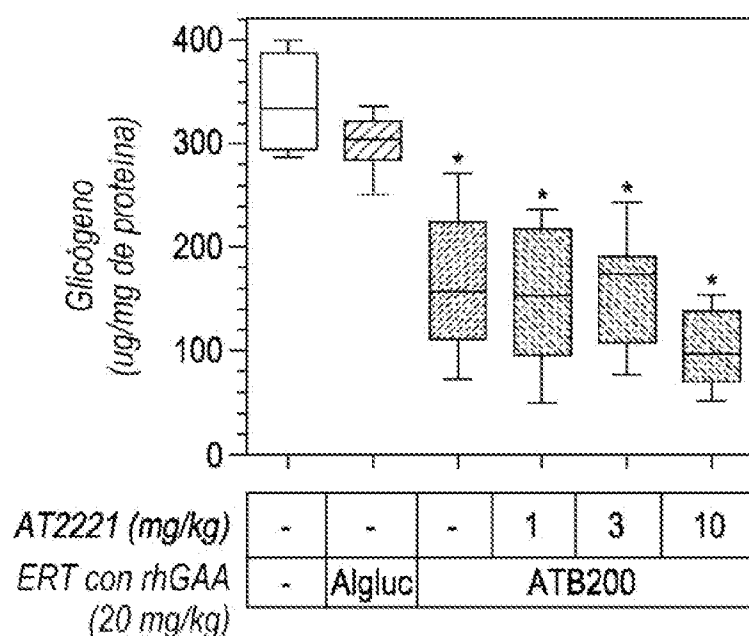
Tampón	T _f (°C) de ATB200
pH 7,4	56,2
pH 7,4 + AT2221 10 mM	61,6
pH 7,4 + AT2221 30 mM	62,9
pH 7,4 + AT2221 100 mM	66,0
pH 5,2	67,3

Fig. 13B

Comparación del % de reducción de glicógeno en ratones con supresión de Gaa tras la administración de Lumizyme o ATB200 (con o sin miglustat)		
Enzima $\pm$ chaperona	Cuádriceps	Tríceps
Lumizyme sola (20 mg/Kg)	14	14
ATB200 sola (20 mg/kg)	74	62
ATB200 + Miglustat (AT2221) (20 mg/kg) + (10 mg/kg)	94	73

Fig. 14

Aclaramiento de glicógeno en músculo cuádriceps mediante rhGAA
ATB-200 y chaperona AT-2221

**Fig. 15**

Tinción de glicógeno PAS y EM de tejido de músculo esquelético de ratones con supresión de GAA tratados con rhGAA convencional o rhGAA ATB-200 y AT2221

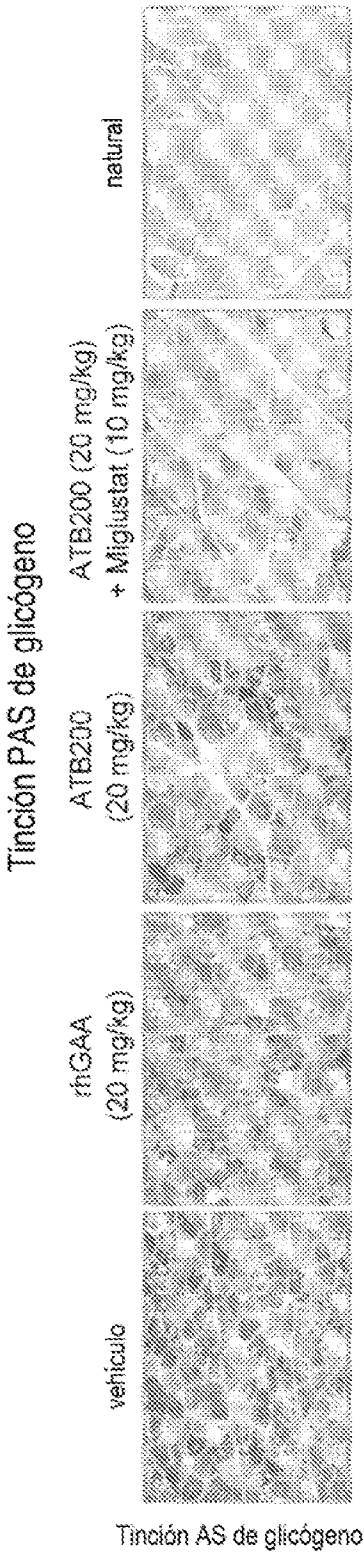


Fig. 16A

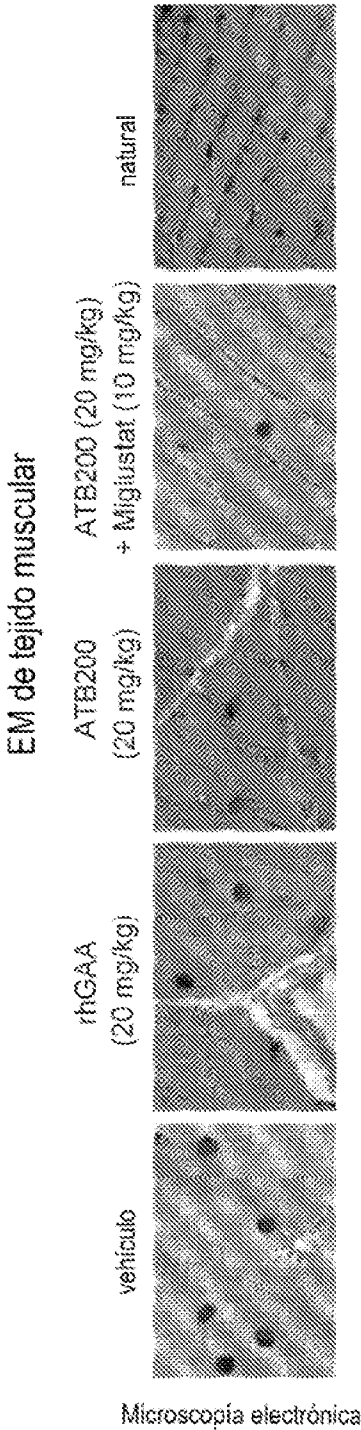


Fig. 16B

Trincón de glicógeno y EM de tejido de músculo esquelético de ratones con supresión de GAA tratados con rhGAA convencional o ATB-200 y AT2221

Evaluación de la proliferación lisosomal mediante marcador LAMP-1

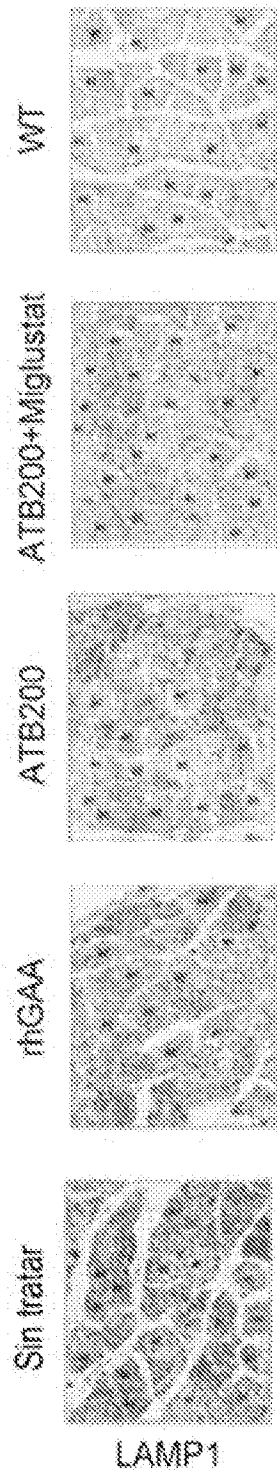


Fig.16C

Identificación de fibras musculares de tipo I y de tipo II

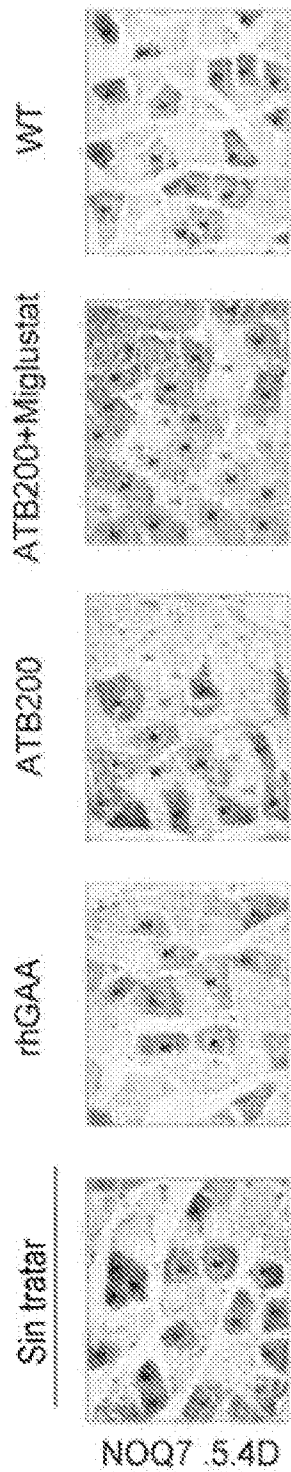


Fig.16D

Tinción de glicógeno PAS y EM de tejido de músculo cardíaco de ratones con supresión de GAA tratados con rhGAA convencional o rhGAA ATB-200 y miglustat (AT-2221)

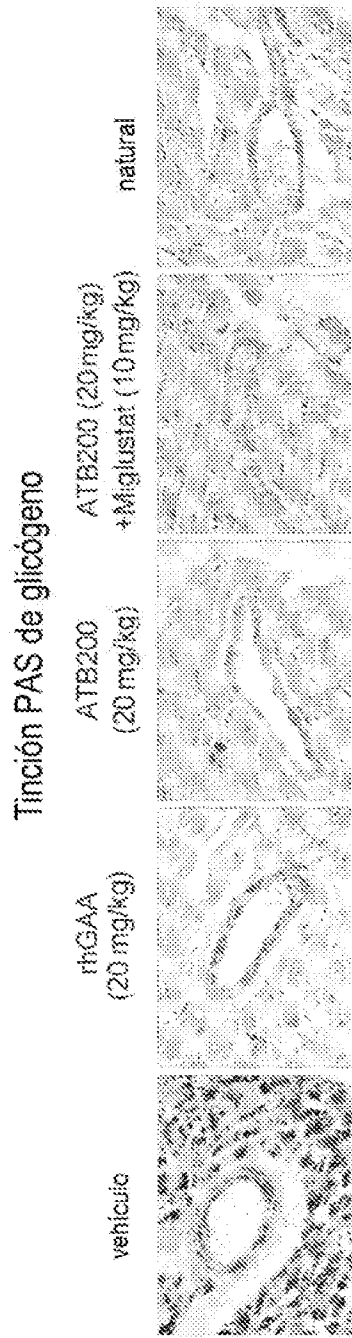


Fig.17A

Evaluación de la proliferación lisosomal por el marcador LAMP-1

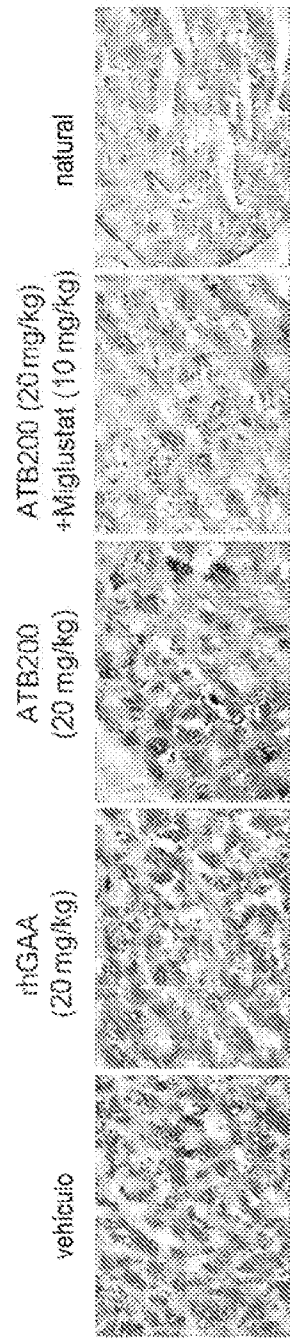


Fig.17B