

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 965 190**

51 Int. Cl.:

**A61K 38/47** (2006.01)

**A61K 31/445** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.12.2016 E 21174249 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.08.2023 EP 3957320**

54 Título: **Alfa-glucosidasa ácida aumentada para el tratamiento de la enfermedad de Pompe**

30 Prioridad:

**30.12.2015 US 201562272890 P**

**26.02.2016 US 201662300479 P**

**30.03.2016 US 201662315412 P**

**30.09.2016 US 201662402454 P**

**01.12.2016 US 201662428867 P**

**08.12.2016 US 201662431791 P**

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

**11.04.2024**

73 Titular/es:

**AMICUS THERAPEUTICS, INC. (100.0%)**

**3675 Market Street**

**Philadelphia, PA 19104, US**

72 Inventor/es:

**DO, HUNG V.;**

**KHANNA, RICHIE y**

**GOTSCHALL, RUSSELL**

74 Agente/Representante:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

**Observaciones:**

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

**ES 2 965 190 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 aumentada para el tratamiento de la enfermedad de Pompe

**Campo**

5 La presente invención proporciona una combinación de  $\alpha$ -glucosidasa ácida humana recombinante y miglustat para uso en el tratamiento de la enfermedad de Pompe.

**Antecedentes**

10 La enfermedad de Pompe, también conocida como deficiencia de maltasa ácida o glucogenosis tipo II, es uno de diversos trastornos de almacenamiento lisosómico. Los trastornos de almacenamiento lisosómico son un grupo de enfermedades genéticas autosómicas recesivas caracterizadas por la acumulación de glucoesfingolípidos, glucógeno o mucopolisacáridos celulares dentro de los compartimientos intracelulares denominados lisosomas. Los individuos

15 que conducen a un amplio espectro de manifestaciones clínicas, que incluyen la debilidad muscular progresiva y la insuficiencia respiratoria. Los tejidos tales como los músculos cardíacos y esqueléticos se ven particularmente afectados. La enfermedad de Pompe puede variar ampliamente en el grado de deficiencia enzimática, en la gravedad y la edad de aparición, y se han identificado más de 500 mutaciones diferentes en el gen *GAA*, muchas de las cuales causan síntomas de la enfermedad con gravedad variable. La enfermedad se ha clasificado en grandes tipos: aparición temprana o infantil y aparición tardía. La aparición temprana de la enfermedad y la actividad enzimática más baja generalmente se asocian con una evolución clínica más grave. La enfermedad de Pompe infantil es la más grave, causada por la deficiencia completa o casi completa de la  $\alpha$ -glucosidasa ácida y se presenta con síntomas que incluyen la falta grave de tono muscular, debilidad, hígado y corazón agrandados y cardiomiopatía. La lengua puede agrandarse y sobresalir, y puede dificultar la deglución. La mayoría de los niños afectados muere por complicaciones respiratorias o cardíacas antes de los dos años. La enfermedad de Pompe de aparición tardía puede presentarse a cualquier edad después de los 12 meses y se caracteriza por una ausencia de afectación cardíaca y mejor pronóstico a corto plazo.

20 Se estima que la enfermedad de Pompe aparece en aproximadamente 1 de 40.000 nacimientos, y es causada por una mutación en el gen *GAA*, que codifica la enzima  $\alpha$ -glucosidasa lisosómica (EC:3.2.1.20), también comúnmente conocida como  $\alpha$ -glucosidasa ácida. La  $\alpha$ -glucosidasa ácida participa en el metabolismo del glucógeno, un polisacárido ramificado que es la principal forma de almacenamiento de glucosa en animales, al catalizar su hidrólisis en glucosa dentro de los lisosomas. Dado que los individuos con enfermedad de Pompe producen  $\alpha$ -glucosidasa ácida mutante, defectuosa que es inactiva o tiene actividad reducida, la descomposición del glucógeno se produce lentamente o no se produce, y el glucógeno se acumula en los lisosomas de varios tejidos, particularmente en músculos estriados, lo que conduce a un amplio espectro de manifestaciones clínicas, que incluyen la debilidad muscular progresiva y la insuficiencia respiratoria. Los tejidos tales como los músculos cardíacos y esqueléticos se ven particularmente

25 afectados. La enfermedad de Pompe puede variar ampliamente en el grado de deficiencia enzimática, en la gravedad y la edad de aparición, y se han identificado más de 500 mutaciones diferentes en el gen *GAA*, muchas de las cuales causan síntomas de la enfermedad con gravedad variable. La enfermedad se ha clasificado en grandes tipos: aparición temprana o infantil y aparición tardía. La aparición temprana de la enfermedad y la actividad enzimática más baja generalmente se asocian con una evolución clínica más grave. La enfermedad de Pompe infantil es la más grave, causada por la deficiencia completa o casi completa de la  $\alpha$ -glucosidasa ácida y se presenta con síntomas que incluyen la falta grave de tono muscular, debilidad, hígado y corazón agrandados y cardiomiopatía. La lengua puede agrandarse y sobresalir, y puede dificultar la deglución. La mayoría de los niños afectados muere por complicaciones respiratorias o cardíacas antes de los dos años. La enfermedad de Pompe de aparición tardía puede presentarse a cualquier edad después de los 12 meses y se caracteriza por una ausencia de afectación cardíaca y mejor pronóstico a corto plazo.

30 Los síntomas se relacionan con la disfunción progresiva del músculo esquelético e implican debilidad muscular generalizada y deterioro progresivo de los músculos respiratorios en el tronco, las extremidades inferiores proximales y el diafragma. Algunos pacientes adultos carecen de síntomas graves o limitaciones motrices. El pronóstico generalmente depende de la medida en que están afectados los músculos respiratorios. La mayoría de los sujetos con enfermedad de Pompe eventualmente avanza hasta una debilidad física que requiere el uso de una silla de ruedas y ventilación asistida, a menudo se produce la muerte prematura debido a insuficiencia respiratoria.

35 Las opciones de tratamiento recientes para la enfermedad de Pompe incluyen terapia de reemplazo enzimático (ERT, por sus siglas en inglés) con  $\alpha$ -glucosidasa ácida humana recombinante (rhGAA, por sus siglas en inglés). Los productos de rhGAA convencionales se conocen con el nombre alglucosidasa alfa, Myozyme® o Lumizyme®; Genzyme, Inc. La ERT es un tratamiento crónico necesario a lo largo de toda la vida del paciente e implica administrar la enzima de reemplazo mediante infusión intravenosa. La enzima de reemplazo después se transporta en la circulación e ingresa a los lisosomas dentro de las células, donde actúa para descomponer el glucógeno acumulado, compensar la actividad deficiente de la enzima mutante defectuosa endógena y, por lo tanto, aliviar los síntomas de la enfermedad. En sujetos con enfermedad de Pompe infantil, el tratamiento con alglucosidasa alfa ha demostrado que mejora significativamente la supervivencia en comparación con los testigos históricos, y en la enfermedad de

40 Pompe de aparición tardía, la alglucosidasa alfa ha demostrado tener un efecto estadísticamente significativo, aunque modesto, sobre la prueba de marcha de 6 minutos (6MWT, por sus siglas en inglés) y la capacidad vital forzada (FVC, por sus siglas en inglés) en comparación con un placebo.

45 Sin embargo, la mayoría de los sujetos permanece estable o continúa deteriorándose mientras se somete al tratamiento con alglucosidasa alfa. El motivo del aparente efecto no óptimo de la ERT con alglucosidasa alfa no está claro, pero podría deberse en parte a la naturaleza progresiva de la patología muscular subyacente, o al escaso direccionamiento al tejido de la ERT actual. Por ejemplo, la enzima administrada por infusión no es estable a pH neutro, incluido el pH del plasma (aproximadamente pH 7,4), y puede inactivarse de manera irreversible dentro de la circulación. Además, la alglucosidasa alfa administrada por infusión exhibe una captación insuficiente en músculos clave relevantes para la enfermedad, posiblemente debido a la glicosilación inadecuada con residuos manosa-6-fosfato

(M6P). Dichos residuos se unen a receptores de manosa-6-fosfato independientes de catión (CIMPR, por sus siglas en inglés) en la superficie celular, lo que permite que la enzima ingrese a la célula y a los lisosomas dentro. Por lo tanto, pueden ser necesarias dosis elevadas de la enzima para el tratamiento eficaz, de modo que una cantidad adecuada de enzima activa pueda llegar a los lisosomas, lo que vuelve a la terapia costosa y prolongada.

- 5 Además, los pacientes con enfermedad de Pompe a menudo presentan desarrollo de anticuerpos neutralizantes anti- $\alpha$ -glucosidasa ácida humana recombinante, debido a la exposición repetida al tratamiento. Dichas respuestas inmunitarias pueden reducir en gran medida la tolerancia de los pacientes al tratamiento. La ficha técnica del producto en los EE. UU. para alglucosidasa alfa incluye una advertencia en recuadro negro con información sobre el posible riesgo de reacción alérgica. Se han observado reacciones anafilácticas potencialmente mortales, incluido el choque anafiláctico, en sujetos tratados con alglucosidasa alfa.

10 Se encuentra en curso el desarrollo de una ERT de última generación que resuelva estas deficiencias. En una estrategia, las enzimas recombinantes se pueden coadministrar con chaperonas farmacológicas que pueden inducir o estabilizar una conformación adecuada de la enzima, para prevenir o reducir la degradación de la enzima y/o su pliegue incorrecto en una forma inactiva, sea *in vitro* (por ejemplo, durante el almacenamiento antes de la administración) o *in vivo*. Dicha estrategia se describe en las Publicaciones de solicitud de patente internacionales núms. WO 2004/069190, WO 2006/125141, WO 2013/166249 y WO 2014/014938.

15 Se han descrito los resultados de los ensayos clínicos de la coadministración de alglucosidasa alfa con miglustat a pacientes con enfermedad de Pompe. En un ensayo clínico llevado a cabo en 13 sujetos con enfermedad de Pompe (3 con aparición temprana (infantil) y 10 con aparición tardía) en 4 centros de tratamiento en Italia, se administraron 20 a 40 mg/kg de alglucosidasa alfa sola y después coadministrada con 4 dosis de 80 mg de miglustat. Los resultados del estudio mostraron un aumento medio de 6,8 veces en la exposición a la actividad de  $\alpha$ -glucosidasa ácida (medido mediante el parámetro farmacocinético AUC (área debajo de la curva de concentración frente al tiempo)) para la coadministración en comparación con alglucosidasa alfa sola (Parenti, G., G. Y., et al. (2015). "Lysosomal Storage Diseases: Desde Pathophysiology to Terapia". *Annu. Rev. Med.* 66(1): 471-486). Además, un estudio llevado a cabo en la Universidad de Florida evaluó la farmacocinética (PK) del miglustat en plasma cuando se coadministra con la infusión intravenosa de alglucosidasa alfa en sujetos con enfermedad de Pompe (Doerfler, P. A., J. S. Kelley, et al. (2014). "Pharmacological chaperones prevent the precipitation of rhGAA by anti-GAA antibodies during enzyme replacement therapy". *Mol. Genet. Metab.* 111 (2): S38).

20 Sin embargo, permanece la necesidad de mejoras adicionales en la terapia de reemplazo enzimático para el tratamiento de la enfermedad de Pompe. Por ejemplo, sería deseable contar con nuevas enzimas  $\alpha$ -glucosidasa ácida humanas recombinantes que puedan tener una o más ventajas con respecto a las enzimas usadas en la actualidad, incluidas, pero sin limitarse a, mejor captación en tejido, mejor actividad enzimática, mejor estabilidad o inmunogenicidad reducida.

### Compendio

35 La presente invención proporciona una composición que comprende moléculas de  $\alpha$ -glucosidasa ácida humana recombinante (rhGAA) para uso en el tratamiento de la enfermedad de Pompe en combinación con miglustat en un paciente que lo necesita;

en donde el paciente tiene experiencia en terapia de reemplazo enzimático (ERT);

40 en donde la composición se administra por vía intravenosa en una dosis de 5 mg/kg a 20 mg/kg y el miglustat se administra por vía oral en una dosis de 260 mg o 130 mg;

en donde las moléculas de rhGAA se producen en células de ovario de hámster chino (CHO, por sus siglas en inglés), las moléculas de rhGAA comprenden siete sitios de N-glicosilación potenciales, 40 %-60 % de los N-glicanos en las moléculas de rhGAA son N-glicanos de tipo complejo, y al menos 50 % de las moléculas de rhGAA llevan una unidad de bis-manosa-6-fosfato (bis-M6P, por sus siglas en inglés) en el primer sitio de N-glicosilación potencial.

### 45 Breve descripción de los dibujos

Otras características de la presente invención serán evidentes a partir de la descripción escrita que figura a continuación y las figuras adjuntas, en las que:

la Figura 1 es un gráfico que muestra el porcentaje de proteína ATB200 mal plegada en varios valores de pH y en la presencia y ausencia de miglustat con respecto a la temperatura;

50 las Figuras 2A y 2B, respectivamente, muestran los resultados de la cromatografía de afinidad CIMPR de Lumizyme® y Myozyme®. Las líneas punteadas hacen referencia al gradiente de elución de M6P. La elución con M6P desplaza las moléculas de GAA unidas a través de un glicano que contiene M6P a CIMPR. Como se muestra en la

Figura 2A, el 78 % de la actividad de GAA en Lumizyme® se eluyó antes de la adición de M6P. La Figura 2B muestra que el 73 % de la actividad de GAA Myozyme® se eluyó antes de la adición de M6P. Solo 22 % o 27 % de la rhGAA

en Lumizyme® o Myozyme®, respectivamente, se eluyó con M6P. Estas figuras muestran que gran parte de la rhGAA en estos dos productos convencionales de rhGAA carecen de glicanos que tienen M6P necesaria para la captación celular y el direccionamiento lisosómico.

5 La Figura 3 muestra una construcción de ADN para transformar células CHO con ADN que codifica rhGAA. Las células CHO se transformaron con una construcción de ADN que codifica rhGAA.

Las Figuras 4A y 4B, respectivamente, muestran los resultados de la cromatografía de afinidad CIMPR de rhGAA Myozyme® y ATB200. Como se evidencia a partir de la Figura 4B, aproximadamente 70 % de la rhGAA en la rhGAA ATB200 contenía M6P.

10 Las Figuras 5A y 5B muestran los resultados de la cromatografía de afinidad CIMPR de rhGAA ATB200 con y sin captura en una columna de intercambio aniónico (AEX).

La Figura 6 muestra perfiles de elución con Polywax de las rhGAA Lumizyme® y ATB200.

La Figura 7 muestra un resumen de estructuras de N-glicano de Lumizyme® en comparación con tres preparaciones diferentes de rhGAA ATB200, identificadas como BP-rhGAA, ATB200-1 y ATB200-2.

Las Figuras 8A-8H muestran los resultados de un análisis de N-glicosilación específica para un sitio de rhGAA ATB200.

15 La Figura 9A compara la afinidad de unión por CIMPR de la rhGAA ATB200 (marca a la izquierda) con la de Lumizyme® (marca a la derecha).

La Figura 9B compara el contenido de Bis-M6P de las rhGAA Lumizyme® y ATB200.

La Figura 10A compara la actividad de la rhGAA ATB200 (marca a la izquierda) con la actividad de la rhGAA Lumizyme® (marca a la derecha) dentro de fibroblastos normales en varias concentraciones de GAA.

20 La Figura 10B compara la actividad de la rhGAA ATB200 (marca a la izquierda) con la actividad de la rhGAA Lumizyme® (marca a la derecha) dentro de fibroblastos de un sujeto que tiene enfermedad de Pompe en varias concentraciones de GAA.

La Figura 10C compara la ( $K_{\text{captación}}$ ) de fibroblastos de sujetos normales y sujetos con enfermedad de Pompe.

25 La Figura 11 es un gráfico que muestra la bondad de ajuste de un modelo de farmacocinética poblacional (PK) para ATB200;

la Figura 12 es un gráfico que muestra los perfiles de concentración en plasma-tiempo normalizados con respecto a la dosis de miglustat y duvoglustat;

la Figura 13A es un gráfico que muestra la bondad de ajuste de un modelo de PK poblacional para duvoglustat en plasma;

30 la Figura 13B es un gráfico que muestra la bondad de ajuste de un modelo de PK poblacional para duvoglustat en tejido muscular;

la Figura 14 es un gráfico que muestra la bondad de ajuste de un modelo de PK poblacional para miglustat;

la Figura 15 es un gráfico que muestra el perfil de concentración-tiempo previsto que resulta de la infusión de una única dosis intravenosa (IV) de 20 mg/kg de ATB200 en humanos en un período de 4 h;

35 la Figura 16A es un gráfico que muestra la cantidad de glucógeno con respecto a la dosis de  $\alpha$ -glucosidasa ácida humana recombinante en músculo cardíaco de ratón después del contacto con vehículo (testigo negativo), con 20 mg/kg de alglucosidasa alfa (Lumizyme®) o con 5, 10 o 20 mg/kg de ATB200;

40 la Figura 16B es un gráfico que muestra la cantidad de glucógeno con respecto a la dosis de  $\alpha$ -glucosidasa ácida humana recombinante en músculo de cuádriceps de ratón después del contacto con vehículo (testigo negativo), con 20 mg/kg de alglucosidasa alfa (Lumizyme®) o con 5, 10 o 20 mg/kg de ATB200;

la Figura 16C es un gráfico que muestra la cantidad de glucógeno con respecto a la dosis de  $\alpha$ -glucosidasa ácida humana recombinante en músculo de tríceps de ratón después del contacto con vehículo (testigo negativo), con 20 mg/kg de alglucosidasa alfa (Lumizyme®) o con 5, 10 o 20 mg/kg de ATB200;

45 la Figura 17 es un gráfico que representa la relación entre los niveles de glucógeno en ratones tratados con dosis variables de miglustat en presencia de ATB200 y los niveles de glucógeno en ratones tratados con ATB200 sola con respecto a la relación entre el valor de AUC de miglustat y el valor de AUC de ATB200;

la Figura 18 es un gráfico que muestra el perfil de concentración-tiempo previsto de miglustat en plasma después de la dosificación repetida de dosis de 466 mg, 270 mg y 233 mg de miglustat;

- la Figura 19 es un gráfico que muestra el perfil de concentración-tiempo previsto de miglustat en lisosomas de tejido después de la dosificación repetida de dosis de 466 mg, 270 mg y 233 mg de miglustat;
- 5 la Figura 20 es una serie de microfotografías de corazón, diafragma y músculo sóleo de ratones naturales y con Gaa inactivada tratados con vehículo, alglucosidasa alfa y ATB200 en presencia y ausencia de miglustat, que muestra niveles de proteína de membrana asociada a lisosoma (LAMP1, por sus siglas en inglés);
- la Figura 21 es una serie de microfotografías de corazón y músculo sóleo de ratones naturales y con Gaa inactivada tratados con vehículo, alglucosidasa alfa y ATB200 en presencia y ausencia de miglustat, que muestra niveles de glucógeno mediante tinción con reactivo ácido peryódico Schiff (PAS, por sus siglas en inglés);
- 10 la Figura 22 es una serie de microfotografías (1000x) de músculo de cuádriceps de ratones naturales y con Gaa inactivada tratados con vehículo, alglucosidasa alfa y ATB200 en presencia y ausencia de miglustat, teñido con azul de metileno para mostrar las vacuolas (indicadas mediante flechas);
- 15 la Figura 23 es una serie de microfotografías (400x) de músculo de cuádriceps de ratones naturales y con Gaa inactivada tratados con vehículo, alglucosidasa alfa y ATB200 en presencia y ausencia de miglustat, que muestran niveles de los marcadores de autofagia conjugado de proteína 1A/1B asociada a microtúbulo-fosfatidiletanolamina 3 de cadena ligera (LC3A II) y p62, el transportador de glucosa dependiente de insulina GLUT4 y el transportador de glucosa independiente de insulina GLUT1;
- las Figuras 24A-24D son gráficos que muestran los perfiles de concentración-tiempo de la actividad de GAA en plasma en sujetos humanos después de la dosificación de 5, 10 o 20 mg/kg de ATB200, o 20 mg/kg ATB200 y 130 o 260 mg de miglustat;
- 20 las Figuras 25A-25D son gráficos que muestran los perfiles de concentración-tiempo de la proteína total de GAA en plasma en sujetos humanos después de la dosificación de 5, 10 o 20 mg/kg ATB200, 20 mg/kg de ATB200 y 130 mg de miglustat, o 20 mg/kg ATB200 y 260 mg de miglustat;
- la Figura 26 es un gráfico que muestra los perfiles de concentración-tiempo de miglustat en plasma en sujetos humanos después de la dosificación de 130 mg o 260 mg de miglustat;
- 25 la Figura 27 es una serie de microfotografías inmunofluorescentes de los niveles de GAA y LAMP1 en fibroblastos naturales y con Pompe;
- la Figura 28 es una serie de microfotografías de fibras musculares de ratones naturales y con Gaa inactivada que muestran los niveles de distrofina,  $\alpha$ - y  $\beta$ -dístroglicano y disferlina;
- 30 las Figuras 29A y 29B son una serie de microfotografías (200x) de fibras musculares del recto femoral (RF, por sus siglas en inglés) y bazo lateral/bazo medial (VL/ML, por sus siglas en inglés) de ratones naturales y con Gaa inactivada tratados con vehículo, alglucosidasa alfa y ATB200 en presencia y ausencia de miglustat, que muestra señales de IHC de LAMP1;
- 35 las Figuras 30A y 30B son una serie de microfotografías (200x) de fibras musculares de RF y VL/ML de ratones naturales y con Gaa inactivada tratados con vehículo, alglucosidasa alfa y ATB200 en presencia y ausencia de miglustat, que muestra señales de IHC de LC3 II;
- las Figuras 31A y 31B son una serie de microfotografías (200x) de fibras musculares de RF y VL/ML de ratones naturales y con Gaa inactivada tratados con vehículo, alglucosidasa alfa y ATB200 en presencia y ausencia de miglustat, que muestra señales de IHC de disferlina;
- 40 las Figuras 32A-32D son gráficos que muestran niveles de glucógeno en células de cuádriceps, tríceps, gastrocnemio y corazón de ratones naturales y con Gaa inactivada tratados con vehículo, alglucosidasa alfa y ATB200 en presencia y ausencia de miglustat;
- las Figuras 33A y 33B son gráficos que muestran datos de resistencia muscular de agarre y con alambre de ratones naturales y con Gaa inactivada tratados con vehículo, alglucosidasa alfa y ATB200 en presencia y ausencia de miglustat;
- 45 las Figuras 34A-34G son gráficos que muestran niveles de glucógeno en células de cuádriceps, tríceps y corazón de ratones naturales y con Gaa inactivada tratados con vehículo, alglucosidasa alfa y ATB200 en presencia y ausencia de miglustat;
- 50 la Figura 35 es una serie de microfotografías de fibras musculares de VL/ML de ratones naturales y con Gaa inactivada tratados con vehículo, alglucosidasa alfa y ATB200 en presencia y ausencia de miglustat, que muestra señales de IHC de LAMP1, LC3 y disferlina;

la Figura 36 es un gráfico que muestra los perfiles de concentración-tiempo de la actividad de GAA en plasma en ratones con *Gaa* inactivada después de la administración de dos lotes de ATB200 que tienen diferente contenido de ácido siálico;

5 las Figuras 37A-37D son gráficos que muestran niveles de glucógeno en células de cuádriceps, tríceps, gastrocnemio y corazón de ratones naturales y con *Gaa* inactivada tratados con vehículo, alglucosidasa alfa y ATB200;

la Figura 38 es un gráfico que muestra los niveles de alanina aminotransferasa (ALT) en pacientes humanos después de la administración de dosis ascendentes de ATB200 (5, 10 y 20 mg/kg) con posterior coadministración de ATB200 (20 mg/kg) y miglustat (130 y 260 mg);

10 la Figura 39 es un gráfico que muestra los niveles de aspartato aminotransferasa (AST) en pacientes humanos después de la administración de dosis ascendentes de ATB200 (5, 10 y 20 mg/kg) con posterior coadministración de ATB200 (20 mg/kg) y miglustat (130 y 260 mg);

la Figura 40 es un gráfico que muestra los niveles de creatina fosfocinasa (CPK) en pacientes humanos después de la administración de dosis ascendentes de ATB200 (5, 10 y 20 mg/kg) con posterior coadministración de ATB200 (20 mg/kg) y miglustat (130 y 260 mg);

15 la Figura 41 es un gráfico que muestra los niveles promedio de ALT, AST y CPK en pacientes humanos después de la administración de dosis ascendentes de ATB200 (5, 10 y 20 mg/kg) con posterior coadministración de ATB200 (20 mg/kg) y miglustat (130 y 260 mg); y

20 la Figura 42 es una serie de microfotografías (100x y 200x) de fibras musculares de basto lateral (VL) de ratones naturales y con *Gaa* inactivada tratados con vehículo, alglucosidasa alfa y ATB200 en presencia y ausencia de miglustat, que muestra señales de distrofina.

### Definiciones

25 Los términos usados en la presente memoria descriptiva tienen generalmente sus significados habituales en la técnica, dentro del contexto de la presente invención y en el contexto específico en el que se usa cada término. Ciertos términos se describen más adelante, o en otras secciones de la memoria descriptiva, para proporcionar una guía adicional al profesional sanitario.

En la presente memoria descriptiva, excepto cuando el contexto requiera de cualquier otra manera debido al lenguaje expreso o una implicación necesaria, la palabra "comprende", o variaciones tales como "comprenden" o "que comprende/n", se usa con sentido inclusivo, es decir, para especificar la presencia de los rasgos mencionados, pero no impide la presencia o adición de rasgos adicionales en varias realizaciones de la invención.

30 Según se usa en la presente memoria, el término "enfermedad de Pompe", también denominada deficiencia de maltasa ácida, enfermedad de almacenamiento de glucógeno tipo II (GSDII) y glucogenosis tipo II, pretende hacer referencia a un trastorno de almacenamiento lisosómico genético caracterizado por mutaciones en el gen *GAA*, que codifica la enzima  $\alpha$ -glucosidasa ácida humana. El término incluye, pero no se limita a, las formas de aparición temprana y tardía de la enfermedad que incluyen, pero no se limitan a, enfermedad de Pompe de aparición infantil, juvenil y adulta.

35 Según se usa en la presente memoria, se pretende que el término " $\alpha$ -glucosidasa ácida" haga referencia a una enzima lisosómica que hidroliza los enlaces  $\alpha$ -1,4 entre las unidades de D-glucosa de glucógeno, maltosa e isomaltosa. Los nombres alternativos incluyen, pero no se limitan a,  $\alpha$ -glucosidasa lisosómica (EC:3.2.1.20); glucoamilasa; 1,4- $\alpha$ -D-glucano glucohidrolasa; amiloglucosidasa; gamma-amilasa y exo-1,4- $\alpha$ -glucosidasa. La  $\alpha$ -glucosidasa ácida humana está codificada por el gen *GAA* (Ident. de gen del National Centre for Biotechnology Information (NCBI) 2548), que se ha mapeado en el brazo largo del cromosoma 17 (ubicación 17q25.2-q25.3). En la actualidad, se han identificado más de 500 mutaciones en el gen *GAA* humano, muchas de las cuales se asocian con la enfermedad de Pompe. Las mutaciones provocan el pliegue incorrecto o el procesamiento incorrecto de la enzima  $\alpha$ -glucosidasa ácida incluidas T1064C (Leu355Pro) y C2104T (Arg702Cys). Además, las mutaciones en *GAA* que afectan la maduración y el procesamiento de la enzima incluyen Leu405Pro y Met519Thr. El hexapéptido WIDMNE conservado en los residuos aminoácidos 516-521 es necesario para la actividad de la proteína  $\alpha$ -glucosidasa ácida. Según se usan en la presente memoria, se pretende que la abreviatura "GAA" haga referencia a la enzima  $\alpha$ -glucosidasa ácida, mientras que se pretenden que la abreviatura en cursiva "GAA" haga referencia al gen humano que codifica la enzima  $\alpha$ -glucosidasa ácida humana. Se pretende que la abreviatura en cursiva "*Gaa*" haga referencia a genes no humanos que codifican enzimas  $\alpha$ -glucosidasas ácidas no humanas, incluidos, pero sin limitarse a, genes de rata o ratón, y se pretende que la abreviatura "*Gaa*" haga referencia a enzimas  $\alpha$ -glucosidasas ácidas no humanas. Por lo tanto, se pretende que la abreviatura "rhGAA" haga referencia a la enzima  $\alpha$ -glucosidasa ácida humana recombinante.

55 Según se usa en la presente memoria, se pretende que el término "alglucosidasa alfa" haga referencia a una  $\alpha$ -glucosidasa ácida humana recombinante identificada como [199-arginina,223-histidina]prepro- $\alpha$ -glucosidasa (humana); Número de registro de Chemical Abstracts 420794-05-0. La alglucosidasa alfa ha recibido la aprobación para la comercialización en los Estados Unidos de Genzyme, a partir del 1° de octubre de 2014, como los productos Lumizyme® y Myozyme®.

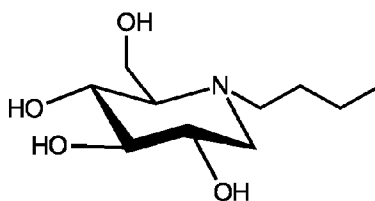
Según se usa en la presente memoria, se pretende que el término "ATB200" haga referencia a una  $\alpha$ -glucosidasa ácida humana recombinante descrita en la solicitud de patente copendiente PCT/US2015/053252.

Según se usa en la presente memoria, se pretende que el término "glicano" haga referencia a una cadena de polisacárido unida covalentemente a un residuo aminoacídico en una proteína o polipéptido. Según se usa en la presente memoria, se pretende que el término "N-glicano" o "glicano enlazado a N" haga referencia a una cadena de polisacárido acoplada a un residuo aminoacídico en una proteína o polipéptido a través de unión covalente a un átomo de nitrógeno en el residuo aminoacídico. Por ejemplo, se puede unir covalentemente un N-glicano al átomo de nitrógeno de la cadena lateral de un residuo asparagina. Los glicanos pueden contener una o varias unidades de monosacárido, y las unidades de monosacárido se pueden enlazar covalentemente para formar una cadena lineal o una cadena ramificada. En al menos una realización, las unidades de N-glicano acopladas a ATB200 pueden comprender una o más unidades de monosacárido, cada una seleccionada independientemente de N-acetilglucosamina, manosa, galactosa o ácido siálico. Las unidades de N-glicano en la proteína se pueden determinar mediante cualquier técnica analítica apropiada, tal como espectrometría de masas. En algunas realizaciones, las unidades de N-glicano se pueden determinar mediante cromatografía de líquidos-espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS, por sus siglas en inglés) al utilizar un instrumento tal como el espectrómetro de masas Thermo Scientific Orbitrap Velos Pro™, el espectrómetro de masas Thermo Scientific Orbitrap Fusion Lumos Tribid™ o el espectrómetro de masas Waters Xevo® G2-XS QTof.

Según se usa en la presente memoria, se pretende que el término "N-glicano con alto contenido de manosa" haga referencia a un N-glicano que tiene una a seis o más unidades de manosa. En al menos una realización, una unidad de N-glicano con alto contenido de manosa puede contener una cadena de bis(N-acetilglucosamina) unida a un residuo asparagina y unidad, además a una cadena de polimannosa ramificada. Según se usan en la presente memoria de manera intercambiable, se pretende que el término "M6P" o "manosa-6-fosfato" haga referencia a una unidad de manosa fosforilada en la 6 posición; es decir, que tiene un grupo fosfato unido al grupo hidroxilo en la posición 6. En al menos una realización, una o más unidades de manosa de una o más unidades de N-glicano están fosforiladas en la posición 6 para formar unidades de manosa-6-fosfato. En al menos una realización, el término "M6P" o "manosa-6-fosfato" se refiere a un fosfodiéster de manosa que tiene N-acetilglucosamina (GlcNAc) como "casquete" en el grupo fosfato, así como a una unidad de manosa que tiene un grupo fosfato expuesto que carece del casquete de GlcNAc. En al menos una realización, los N-glicanos de una proteína pueden tener múltiples grupos M6P, con al menos un grupo M6P que tiene un casquete de GlcNAc y al menos un otro grupo M6P que carece de un casquete de GlcNAc.

Según se usa en la presente memoria, se pretende que el término "N-glicano complejo" haga referencia a un N-glicano que contiene una o más unidades de galactosa y/o ácido siálico. En al menos una realización, un N-glicano complejo puede ser un N-glicano con alto contenido de manosa en el que una o más unidades de manosa están asociadas, además, a una o más unidades de monosacárido, cada una seleccionada independientemente de N-acetilglucosamina, galactosa y ácido siálico.

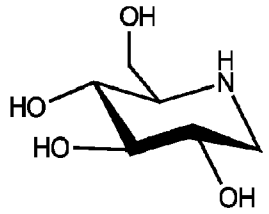
Según se usa en la presente memoria, el compuesto miglustat, también conocido como N-butil-1-desoxinojirimicina o NB-DNJ o (2*R*,3*R*,4*R*,5*S*)-1-butil-2-(hidroximetil)piperidina-3,4,5-triol, es un compuesto que tiene la siguiente fórmula química:



Una formulación de miglustat está disponible comercialmente con el nombre comercial Zavesca® como monoterapia para la enfermedad de Gaucher tipo 1.

Como se describe más adelante, las sales farmacéuticamente aceptables del miglustat también se pueden usar en la presente invención. Cuando se usa una sal del miglustat, la dosificación de la sal se ajustará de forma tal que la dosis del miglustat recibida por el paciente sea equivalente a la cantidad que se habría recibido si se hubiese usado la base libre de miglustat.

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



Según se usa en la presente memoria, se pretende que el término "chaperona farmacológica" o a veces simplemente el término "chaperona" haga referencia a una molécula que se une específicamente a  $\alpha$ -glucosidasa ácida y tiene uno o más de los siguientes efectos:

- 5 • potencia la formación de una conformación molecular estable de la proteína;
- potencia el tráfico apropiado de la proteína desde el retículo endoplasmático a otra ubicación celular, preferiblemente, una ubicación celular natural, para prevenir la degradación asociada con el retículo endoplasmático de la proteína;
- evita la aglomeración de proteínas conformacionalmente inestables o mal plegadas;
- 10 • restaura y/o potencia al menos parcialmente la función, estabilidad y/o actividad natural de la proteína; y/o
- mejora el fenotipo o función de la célula que aloja la  $\alpha$ -glucosidasa ácida.

Por lo tanto, una chaperona farmacológica para  $\alpha$ -glucosidasa ácida es una molécula que se une a  $\alpha$ -glucosidasa ácida, y da como resultado el plegado, el tráfico, la no aglomeración y la actividad apropiados de la  $\alpha$ -glucosidasa ácida. Según se usa en la presente memoria, este término incluye, pero no se limita a, chaperonas específicas para un sitio activo (ASSC, por sus siglas en inglés) que se unen al sitio activo de la enzima, inhibidores o antagonistas, y agonistas. En al menos una realización, la chaperona farmacológica puede ser un inhibidor o antagonista de  $\alpha$ -glucosidasa ácida. Según se usa en la presente memoria, se pretende que el término "antagonista" haga referencia a cualquier molécula que se une a  $\alpha$ -glucosidasa ácida y bloquea, inhibe, reduce o neutraliza parcialmente o completamente una actividad de  $\alpha$ -glucosidasa ácida. En al menos una realización, la chaperona farmacológica es miglustat. Otro ejemplo no limitante de una chaperona farmacológica para  $\alpha$ -glucosidasa ácida es duvoglustat.

Según se usa en la presente memoria, se pretende que el término "sitio activo" haga referencia a una región de una proteína que se asocia con y es necesaria para la actividad biológica específica de la proteína. En al menos una realización, el sitio activo puede ser un sitio que se une a un sustrato u otra pareja de unión y contribuye los residuos aminoácidos que participan directamente en la formación y rotura de uniones químicas. Los sitios activos en la presente invención pueden abarcar sitios catalíticos de enzimas, sitios de unión a antígeno de anticuerpos, dominios de unión a ligando de receptores, dominios de unión de reguladores, o dominios de unión de receptor de proteínas secretadas. Los sitios activos pueden abarcar también la transactivación, la interacción proteína-proteína o dominios de unión a ADN de factores y reguladores de la transcripción.

Según se usa en la presente memoria, se pretende que el término "AUC" haga referencia a un cálculo matemático para evaluar la exposición total del cuerpo con respecto al tiempo a un fármaco dado. En un gráfico donde se representa cómo la concentración en sangre de un fármaco administrado a un sujeto cambia con el tiempo después de la dosificación, la variable de concentración de fármaco se encuentra en el eje y y el tiempo se encuentra en el eje x. El área entre la curva de concentración de fármaco y el eje x durante un intervalo de tiempo designado es el AUC ("área bajo la curva"). Las AUC se usan como una guía para pautas de dosificación y para comparar la biodisponibilidad de la disponibilidad de diferentes fármacos en el cuerpo.

Según se usa en la presente memoria, se pretende que el término " $C_{m\acute{a}x}$ " haga referencia a la concentración máxima en plasma de un fármaco alcanzada después de la administración a un sujeto.

Según se usa en la presente memoria, se pretende que el término "volumen de distribución" o "V" haga referencia al volumen teórico que sería necesario para contener la cantidad total de un fármaco administrado en la misma concentración que se observa en el plasma sanguíneo, y representa el grado en que un fármaco se distribuye en el tejido corporal en lugar del plasma. Los valores más altos de V indican un mayor grado de distribución en el tejido. Se pretende que "volumen de distribución central" o " $V_c$ " hagan referencia al volumen de distribución dentro de la sangre y los tejidos con elevada perfusión de sangre. Se pretende que "volumen de distribución periférico" o " $V_2$ " hagan referencia al volumen de distribución dentro del tejido periférico.

Según se usan de manera intercambiable en la presente memoria, se pretende que los términos "aclaramiento", "aclaramiento sistémico" o "CL" hagan referencia al volumen de plasma del que se aclara completamente un fármaco administrado por unidad tiempo. Se pretende que "aclaramiento periférico" haga referencia al volumen de tejido periférico del que se aclara un fármaco administrado por unidad tiempo.

Según se usan en la presente memoria, se pretende que "dosis terapéuticamente eficaz" y "cantidad eficaz" hagan referencia a una cantidad de  $\alpha$ -glucosidasa ácida y/o de miglustat y/o de una combinación de estos, que es suficiente para provocar una respuesta terapéutica en un sujeto. Una respuesta terapéutica puede ser cualquier respuesta que

un usuario (por ejemplo, un médico clínico) reconocerá como una respuesta eficaz a la terapia, incluidos cualesquiera marcadores clínicos indirectos o síntomas descritos en la presente memoria y conocidos en la técnica. Por lo tanto, en al menos una realización, una respuesta terapéutica puede ser una mejora o inhibición de uno o más síntomas o marcadores de la enfermedad de Pompe tales como los conocidos en la técnica. Los síntomas o marcadores de la enfermedad de Pompe incluyen, pero no se limitan a, actividad tisular disminuida de  $\alpha$ -glucosidasa ácida; cardiomiopatía; cardiomegalia; debilidad muscular progresiva, especialmente en el tronco o extremidades inferiores; hipotonía profunda; macroglosia (y, en algunos casos, protrusión de la lengua); dificultad para deglutir, succionar y/o alimentarse; insuficiencia respiratoria; hepatomegalia (moderada); laxitud de los músculos faciales; arreflexia; intolerancia al ejercicio; disnea de esfuerzo; ortonea; apnea del sueño; cefaleas en la mañana; somnolencia; lordosis y/o escoliosis; reflejos profundos disminuidos; dolor en la parte baja de la espalda; e incapacidad de alcanzar las etapas del desarrollo motor. Cabe señalar que una concentración de miglustat que tiene un efecto inhibitorio sobre la  $\alpha$ -glucosidasa ácida puede constituir una "cantidad eficaz" a los efectos de la presente invención debido a la dilución (y consecuente desplazamiento en la unión debido al cambio en el equilibrio), biodisponibilidad y metabolismo de miglustat después de la administración *in vivo*. Según se usa en la presente memoria, se pretende que el término "terapia de reemplazo enzimático" o "ERT" haga referencia a la introducción de una enzima no natural, purificada en un individuo que tiene una deficiencia de dicha enzima. La proteína administrada se puede obtener de fuentes naturales o mediante expresión recombinante. El término se refiere a también a la introducción de una enzima purificada en un individuo que de cualquier otra manera requiere o se beneficia de la administración de una enzima purificada. En al menos una realización, dicho individuo padece una insuficiencia enzimática. La enzima introducida puede ser una enzima recombinante, purificada producida *in vitro*, o una proteína purificada a partir de tejido o fluido aislado, tal como, por ejemplo, la placenta o leche animal o de plantas.

Según se usa en la presente memoria, se pretende que el término "politerapia" haga referencia a cualquier terapia en donde se administran dos o más terapias individuales simultáneamente o consecutivamente. En al menos una realización, los resultados de la politerapia se potencian en comparación con el efecto de cada terapia cuando se lleva a cabo individualmente. El potenciamiento puede incluir cualquier mejora del efecto de las diversas terapias que puede provocar un resultado ventajoso en comparación con los resultados logrados mediante las terapias cuando se llevan a cabo solas. El efecto o los resultados potenciados pueden incluir un potenciamiento sinérgico, en donde el efecto potenciado es mayor que los efectos aditivos de cada terapia cuando se lleva a cabo por sí sola; un potenciamiento aditivo, en donde el efecto potenciado es sustancialmente igual al efecto aditivo de cada terapia cuando se lleva a cabo por sí sola; o un efecto menor que sinérgico, en donde el efecto potenciado es inferior al efecto aditivo de cada terapia cuando se lleva a cabo por sí sola, pero todavía mejor que el efecto de cada terapia cuando se lleva a cabo por sí sola. El efecto potenciado se puede medir mediante cualquier medio conocido en la técnica por el cual se puede medir la eficacia o el desenlace del tratamiento.

Según se usa en la presente memoria, se pretende que el término "farmacéuticamente aceptable" haga referencia a entidades moleculares y composiciones que son fisiológicamente tolerables y típicamente no producen reacciones adversas cuando se administran a un ser humano. Preferiblemente, según se usa en la presente memoria, el término "farmacéuticamente aceptable" significa que está aprobado por una agencia reguladora del gobierno federal o estatal, o indicado en la farmacopea de los EE. UU. u otra farmacopea generalmente reconocida para su uso en animales y, más particularmente, en seres humanos.

Según se usa en la presente memoria, se pretende que el término "portador" haga referencia a un diluyente, adyuvante, excipiente o vehículo con el cual se administra un compuesto. En la técnica se conocen portadores farmacéuticamente adecuados y, en al menos una realización, se describen en "Remington's Pharmaceutical Sciences" por E. W. Martin, 18a edición, u otras ediciones.

Según se usan en la presente memoria, se pretende que los términos "sujeto" o "paciente" hagan referencia a un ser humano o animal no humano. En al menos una realización, el sujeto es un mamífero. En al menos una realización, el sujeto es un ser humano.

Según se usa en la presente memoria, se pretende que el término "anticuerpo anti-fármaco" haga referencia a un anticuerpo que se une específicamente a un fármaco administrado a un sujeto y generado por el sujeto al menos como parte de una respuesta inmunitaria humoral a la administración del fármaco al sujeto. En al menos una realización, el fármaco es un medicamento de proteína terapéutica. La presencia del anticuerpo anti-fármaco en el sujeto puede causar respuestas inmunitarias que varían de leves a intensas, que incluyen, pero no se limitan a, respuestas inmunitarias potencialmente mortales que incluyen, pero no se limitan a, anafilaxia, síndrome de liberación de citocinas y neutralización reactiva cruzada de proteínas endógenas que median funciones esenciales. Además o alternativamente, la presencia del anticuerpo anti-fármaco en el sujeto puede disminuir la eficacia del fármaco.

Según se usa en la presente memoria, se pretende que el término "anticuerpo neutralizante" haga referencia a un anticuerpo anti-fármaco que actúa para neutralizar la función del fármaco. En al menos una realización, el medicamento de proteína terapéutica es una contraparte de una proteína endógena cuya expresión está reducida o ausente en el sujeto. En al menos una realización, el anticuerpo neutralizante puede actuar para neutralizar la función de la proteína endógena.

Según se usan en la presente memoria, se pretende que los términos "alrededor de" y "aproximadamente" hagan referencia a un grado aceptable de error de la cantidad medida según la naturaleza o precisión de las mediciones. Por ejemplo, el grado de error se puede indicar por el número de cifras significativas proporcionadas por la medición, como se entiende en la técnica, e incluye, pero no se limita a, una variación de  $\pm 1$  en la cifra significativa más precisa obtenida por la medición. Los grados de error típicos ilustrativos se encuentran dentro del 20 por ciento (%), preferiblemente, dentro del 10 % y, más preferiblemente, dentro del 5 % de un valor o intervalo de valores dado. Alternativamente y, particularmente en sistemas biológicos, los términos "alrededor de" y "aproximadamente" pueden significar valores que se encuentran dentro de un orden de magnitud, preferiblemente, dentro de 5 veces y, más preferiblemente, dentro de 2 veces con respecto a un valor dado. Las cantidades numéricas dadas en la presente memoria son aproximadas a menos que se indique de cualquier otra manera, lo que significa que el término "alrededor de" o "aproximadamente" se pueden inferir cuando no se indica de forma expresa.

Se pretende que el término "simultáneamente", según se usa en la presente memoria, signifique al mismo tiempo que o dentro de un período de tiempo razonablemente corto antes o después, como lo entenderán los expertos en la técnica. Por ejemplo, si se administran dos tratamientos simultáneamente entre sí, un tratamiento se puede administrar antes o después del otro tratamiento, para dar el tiempo necesario para prepararse para el último de los dos tratamientos. Por lo tanto, "administración simultánea" de dos tratamientos incluye, pero no se limita a, un tratamiento después del otro en aproximadamente 20 minutos o menos, aproximadamente 20 minutos, aproximadamente 15 minutos, aproximadamente 10 minutos, aproximadamente 5 minutos, aproximadamente 2 minutos, aproximadamente 1 minuto o menos de 1 minuto.

Se pretende que el término "sal farmacéuticamente aceptable", según se usa en la presente memoria, signifique una sal que es, dentro del alcance de la opinión médica válida, adecuada para usarse en contacto con los tejidos de seres humanos y animales inferiores sin toxicidad, irritación, respuesta alérgica indebidas y similares, que corresponde a una relación riesgo/beneficio razonable, generalmente soluble o dispersable en agua o aceite y eficaz para su uso previsto. El término incluye sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables y sales de adición de base farmacéuticamente aceptables. Las listas de sales adecuadas se encuentran en, por ejemplo, S. M. Birge et al., J. Pharm. Sci., 1977, 66, págs. 1-19.

Se pretende que el término "sal de adición de ácido farmacéuticamente aceptable", según se usa en la presente memoria, signifique aquellas sales que retienen la eficacia y las propiedades biológicas de las bases libres y que no son biológicamente indeseables ni de cualquier otra manera, formadas con ácidos inorgánicos que incluyen, pero no se limitan a, ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido sulfámico, ácido nítrico, ácido fosfórico y similares, y ácidos orgánicos que incluyen, pero no se limitan a, ácido acético, ácido trifluoroacético, ácido adípico, ácido ascórbico, ácido aspártico, ácido bencenosulfónico, ácido benzoico, ácido butírico, ácido canfórico, ácido canforsulfónico, ácido ciámico, ácido cítrico, ácido diglucónico, ácido etanosulfónico, ácido glutámico, ácido glicólico, ácido glicerofosfórico, ácido hemisulfúrico, ácido hexanoico, ácido fórmico, ácido fumárico, ácido 2-hidroxietanosulfónico (ácido isetiónico), ácido láctico, ácido hidroximaleico, ácido málico, ácido malónico, ácido mandélico, ácido mesitilensulfónico, ácido metanosulfónico, ácido naftalenosulfónico, ácido nicotínico, ácido 2-naftalenosulfónico, ácido oxálico, ácido pamoico, ácido pectínico, ácido fenilacético, ácido 3-fenilpropiónico, ácido piválico, ácido propiónico, ácido pirúvico, ácido salicílico, ácido esteárico, ácido succínico, ácido sulfanílico, ácido tartárico, ácido p-toluenosulfónico, ácido undecanoico y similares.

Se pretende que el término "sal de adición de base farmacéuticamente aceptable", según se usa en la presente memoria, signifique aquellas sales que retienen la eficacia y las propiedades biológicas de los ácidos libres y que no son biológicamente indeseables ni de cualquier otra manera, formadas con bases inorgánicas que incluyen, pero no se limitan a, amoníaco o el hidróxido, carbonato o bicarbonato de amonio o un catión de metal tal como sodio, potasio, litio, calcio, magnesio, hierro, zinc, cobre, manganeso, aluminio y similares. Las sales derivadas de bases no tóxicas orgánicas farmacéuticamente aceptables incluyen, pero no se limitan a, sales de aminas primarias, secundarias y terciarias, compuestos de amina cuaternaria, aminas sustituidas incluidas aminas sustituidas de origen natural, aminas cíclicas y resinas de intercambio iónico básico, tales como metilamina, dimetilamina, trimetilamina, etilamina, dietilamina, trietilamina, isopropilamina, tripropilamina, tributilamina, etanolamina, dietanolamina, 2-dimetilaminoetanol, 2-dietilaminoetanol, dicitclohexilamina, lisina, arginina, histidina, cafeína, hidrabamina, colina, betaína, etilendiamina, glucosamina, metilglucamina, teobromina, purinas, piperazina, piperidina, N-etilpiperidina, compuestos de tetrametilamonio, compuestos de tetraetilamonio, piridina, N,N-dimetilanilina, N-metilpiperidina, N-metilmorfolina, dicitclohexilamina, dibencilamina, N,N-dibencilfenetilamina, 1-efenamina, N,N'-dibenciletilendiamina, resinas de poliamina y similares.

#### Descripción detallada

La presente invención proporciona una composición que comprende moléculas de  $\alpha$ -glucosidasa ácida humana recombinante (rhGAA) para uso en el tratamiento de la enfermedad de Pompe en combinación con miglustat en un paciente que lo necesita;

en donde el paciente tiene experiencia en terapia de reemplazo enzimático (ERT);

en donde la composición se administra por vía intravenosa en una dosis de 5 mg/kg a 20 mg/kg y el miglustat se administra por vía oral en una dosis de 260 mg o 130 mg;

5 en donde las moléculas de rhGAA se producen en células de ovario de hámster chino (CHO, por sus siglas en inglés), las moléculas de rhGAA comprenden siete sitios de N-glicosilación potenciales, 40 %-60 % de los N-glicanos en las moléculas de rhGAA son N-glicanos de tipo complejo, y al menos 50 % de las moléculas de rhGAA llevan una unidad de bis-manosa-6-fosfato (bis-M6P, por sus siglas en inglés) en el primer sitio de N-glicosilación potencial.

10 En al menos una realización, el miglustat se administra como una forma de dosificación farmacéuticamente aceptable adecuada para administración oral e incluye, pero no se limita a, comprimidos, cápsulas, óvulos, elixires, disoluciones o suspensiones, geles, jarabes, enjuagues bucales o un polvo seco para la reconstitución con agua u otro vehículo adecuado antes del uso, opcionalmente con agentes saborizantes y colorantes para aplicaciones de liberación inmediata, retardada, modificada, sostenida, pulsada o controlada. También se pueden usar composiciones sólidas tales como comprimidos, cápsulas, caramelos, pastillas, píldoras, bolos, polvo, pastas, gránulos, tabletas, grageas o preparaciones de premezcla. En al menos una realización, el miglustat se administra como un comprimido. En al menos una realización, el miglustat se administra como una cápsula.

15 Las composiciones sólidas y líquidas para uso oral se pueden preparar según métodos conocidos en la técnica. Dichas composiciones también pueden contener uno o más portadores y excipientes farmacéuticamente aceptables que pueden estar en forma sólida o líquida. Los comprimidos o cápsulas pueden prepararse mediante medios convencionales con excipientes farmacéuticamente aceptables que incluyen, pero no se limitan a, agentes de unión, cargas, lubricantes, desintegrantes o agentes humectantes. Los excipientes farmacéuticamente aceptables  
20 adecuados se conocen en la técnica e incluyen, pero no se limitan a, almidón pregelatinizado, polivinilpirrolidona, povidona, hidroxipropil metilcelulosa (HPMC, por sus siglas en inglés), hidroxipropil etilcelulosa (HPEC, por sus siglas en inglés), hidroxipropil celulosa (HPC, por sus siglas en inglés), sacarosa, gelatina, acacia, lactosa, celulosa microcristalina, hidrógeno fosfato cálcico, estearato de magnesio, ácido esteárico, behenato de glicerilo, talco, sílice, almidón de maíz, patata o tapioca, glicolato de almidón sódico, lauril sulfato sódico, citrato de sodio, carbonato de calcio, fosfato cálcico dibásico, glicina croscarmelosa sódica y silicatos complejos. Los comprimidos se pueden recubrir mediante métodos conocidos en la técnica. En al menos una realización, el miglustat se administra como una  
25 formulación disponible comercialmente como Zavesca® (Actelion Pharmaceuticals).

30 En al menos una realización, la  $\alpha$ -glucosidasa ácida humana recombinante se expresa células de ovario de hámster chino (CHO) y comprende un contenido mayor de unidades de N-glicano que tienen uno o más residuos manosa-6-fosfato en comparación con un contenido de unidades de N-glicano que tienen uno o más residuos manosa-6-fosfato de alglucosidasa alfa. En al menos una realización, la  $\alpha$ -glucosidasa ácida es una  $\alpha$ -glucosidasa ácida humana recombinante denominada en la presente memoria ATB200, como se describe en la solicitud de patente internacional copendiente

35 PCT/US2015/053252. Se ha demostrado que la ATB200 se une a receptores de manosa-6-fosfato independientes de catión (CIMPR, por sus siglas en inglés) con alta afinidad ( $K_D \sim 2-4$  nM) y se internaliza de manera eficaz en fibroblastos y mioblastos de músculo esquelético con Pompe ( $K_{captación} \sim 7-14$  nM). La ATB200 se caracterizó *in vivo* y exhibió una semivida en plasma aparente más corta ( $t_{1/2} \sim 45$  min) que la alglucosidasa alfa ( $t_{1/2} \sim 60$  min).

40 En al menos una realización, la  $\alpha$ -glucosidasa ácida humana recombinante es una enzima que tiene una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 1, la SEQ ID NO: 2 (o como la codificada por SEQ ID NO: 2), la SEQ ID NO: 3, la SEQ ID NO: 4 o la SEQ ID NO: 5.

SEQ ID NO: 1

Met Gly Val Arg His Pro Pro Cys Ser His Arg Leu Leu Ala Val Cys  
Ala Leu Val Ser Leu Ala Thr Ala Ala Leu Leu Gly His Ile Leu Leu His  
Asp Phe Leu Leu Val Pro Arg Glu Leu Ser Gly Ser Ser Pro Val Leu  
Glu Glu Thr His Pro Ala His Gln Gln Gly Ala Ser Arg Pro Gly Pro Arg  
Asp Ala Gln Ala His Pro Gly Arg Pro Arg Ala Val Pro Thr Gln Cys Asp  
Val Pro Pro Asn Ser Arg Phe Asp Cys Ala Pro Asp Lys Ala Ile Thr  
Gln Glu Gln Cys Glu Ala Arg Gly Cys Cys Tyr Ile Pro Ala Lys Gln Gly  
Leu Gln Gly Ala Gln Met Gly Gln Pro Trp Cys Phe Phe Pro Pro Ser  
Tyr Pro Ser Tyr Lys Leu Glu Asn Leu Ser Ser Ser Glu Met Gly Tyr  
Thr Ala Thr Leu Thr Arg Thr Thr Pro Thr Phe Phe Pro Lys Asp Ile Leu  
Thr Leu Arg Leu Asp Val Met Met Glu Thr Glu Asn Arg Leu His Phe  
Thr Ile Lys Asp Pro Ala Asn Arg Arg Tyr Glu Val Pro Leu Glu Thr Pro

Arg Val His Ser Arg Ala Pro Ser Pro Leu Tyr Ser Val Glu Phe Ser Glu  
 Glu Pro Phe Gly Val Ile Val His Arg Gln Leu Asp Gly Arg Val Leu Leu  
 Asn Thr Thr Val Ala Pro Leu Phe Phe Ala Asp Gln Phe Leu Gln Leu  
 Ser Thr Ser Leu Pro Ser Gln Tyr Ile Thr Gly Leu Ala Glu His Leu Ser  
 Pro Leu Met Leu Ser Thr Ser Trp Thr Arg Ile Thr Leu Trp Asn Arg  
 Asp Leu Ala Pro Thr Pro Gly Ala Asn Leu Tyr Gly Ser His Pro Phe  
 Tyr Leu Ala Leu Glu Asp Gly Gly Ser Ala His Gly Val Phe Leu Leu  
 Asn Ser Asn Ala Met Asp Val Val Leu Gln Pro Ser Pro Ala Leu Ser  
 Trp Arg Ser Thr Gly Gly Ile Leu Asp Val Tyr Ile Phe Leu Gly Pro Glu  
 Pro Lys Ser Val Val Gln Gln Tyr Leu Asp Val Val Gly Tyr Pro Phe Met  
 Pro Pro Tyr Trp Gly Leu Gly Phe His Leu Cys Arg Trp Gly Tyr Ser  
 Ser Thr Ala Ile Thr Arg Gln Val Val Glu Asn Met Thr Arg Ala His Phe  
 Pro Leu Asp Val Gln Trp Asn Asp Leu Asp Tyr Met Asp Ser Arg Arg  
 Asp Phe Thr Phe Asn Lys Asp Gly Phe Arg Asp Phe Pro Ala Met Val  
 Gln Glu Leu His Gln Gly Gly Arg Arg Tyr Met Met Ile Val Asp Pro Ala  
 Ile Ser Ser Ser Gly Pro Ala Gly Ser Tyr Arg Pro Tyr Asp Glu Gly Leu  
 Arg Arg Gly Val Phe Ile Thr Asn Glu Thr Gly Gln Pro Leu Ile Gly Lys  
 Val Trp Pro Gly Ser Thr Ala Phe Pro Asp Phe Thr Asn Pro Thr Ala  
 Leu Ala Trp Trp Glu Asp Met Val Ala Glu Phe His Asp Gln Val Pro  
 Phe Asp Gly Met Trp Ile Asp Met Asn Glu Pro Ser Asn Phe Ile Arg  
 Gly Ser Glu Asp Gly Cys Pro Asn Asn Glu Leu Glu Asn Pro Pro Tyr  
 Val Pro Gly Val Val Gly Gly Thr Leu Gln Ala Ala Thr Ile Cys Ala Ser  
 Ser His Gln Phe Leu Ser Thr His Tyr Asn Leu His Asn Leu Tyr Gly  
 Leu Thr Glu Ala Ile Ala Ser His Arg Ala Leu Val Lys Ala Arg Gly Thr  
 Arg Pro Phe Val Ile Ser Arg Ser Thr Phe Ala Gly His Gly Arg Tyr Ala  
 Gly His Trp Thr Gly Asp Val Trp Ser Ser Trp Glu Gln Leu Ala Ser Ser  
 Val Pro Glu Ile Leu Gln Phe Asn Leu Leu Gly Val Pro Leu Val Gly Ala  
 Asp Val Cys Gly Phe Leu Gly Asn Thr Ser Glu Glu Leu Cys Val Arg  
 Trp Thr Gln Leu Gly Ala Phe Tyr Pro Phe Met Arg Asn His Asn Ser  
 Leu Leu Ser Leu Pro Gln Glu Pro Tyr Ser Phe Ser Glu Pro Ala Gln  
 Gln Ala Met Arg Lys Ala Leu Thr Leu Arg Tyr Ala Leu Leu Pro His  
 Leu Tyr Thr Leu Phe His Gln Ala His Val Ala Gly Glu Thr Val Ala Arg  
 Pro Leu Phe Leu Glu Phe Pro Lys Asp Ser Ser Thr Trp Thr Val Asp  
 His Gln Leu Leu Trp Gly Glu Ala Leu Leu Ile Thr Pro Val Leu Gln Ala  
 Gly Lys Ala Glu Val Thr Gly Tyr Phe Pro Leu Gly Thr Trp Tyr Asp Leu  
 Gln Thr Val Pro Ile Glu Ala Leu Gly Ser Leu Pro Pro Pro Ala Ala  
 Pro Arg Glu Pro Ala Ile His Ser Glu Gly Gln Trp Val Thr Leu Pro Ala  
 Pro Leu Asp Thr Ile Asn Val His Leu Arg Ala Gly Tyr Ile Ile Pro Leu  
 Gln Gly Pro Gly Leu Thr Thr Thr Glu Ser Arg Gln Gln Pro Met Ala  
 Leu Ala Val Ala Leu Thr Lys Gly Gly Glu Ala Arg Gly Glu Leu Phe Trp  
 Asp Asp Gly Glu Ser Leu Glu Val Leu Glu Arg Gly Ala Tyr Thr Gln  
 Val Ile Phe Leu Ala Arg Asn Asn Thr Ile Val Asn Glu Leu Val Arg Val  
 Thr Ser Glu Gly Ala Gly Leu Gln Leu Gln Lys Val Thr Val Leu Gly Val  
 Ala Thr Ala Pro Gln Gln Val Leu Ser Asn Gly Val Pro Val Ser Asn

SEQ ID NO: 2

cagttgggaaagctgaggttgcgcccgggcccgggtggaggtcgggatgagggcagca  
ggtaggacagtgacctcggtagcgcgaaggacccccggccacctctaggttctctcgtcc  
gcccgtgttcagcagggaggctctggcctgcgcagctgacgggaaactgaggcac  
ggagcgggctgttaggagctgtccagccatctccaacctatggagtgaggcaccggccc  
tgctcccaccggctcctggcgtctgcgccctcgtgtccttggcaaccgctgactcctg  
gggacacactactccatgattctcgtcgttccccgagagctgagtggtcctcccca  
gtcctggaggagactcaccagctcaccagcagggagccagcagaccagggccccgggat  
gcccaggcacacccccggcgtcccagagcagtgcccacacagtgcgacgtccccccaac  
agccgctcgtatggccccgacaaggccatcaccaggaaacagtgcgagggccccgggc  
tgctgtacatccctgcaaaagcagggctgcagggagcccagatggggcagccctgggtc  
ttctccaccaccagctaccagctacaagctggagaacctgagctcctctgaaatgggc  
tacacggccaccctgaccgtaccacccccaccttctccccaggacatcctgaccctg  
cggctggacgtgatgatggagactgagaaccgctccacttcacgatcaaatccagct  
aacagggctacaggtgcccctggagacccccgctgtccacagccgggacccgtccca  
ctctacagcgtggagtctcggaggccctcgggggatcgtgaccggcagctgac  
ggccggctgctgtaaacacgacgggtggcggccctgttcttggggaccagtctctcag  
ctgtccacctcgtcctcgcagatacaccagccctgcggagcaccctcagctccctg  
atgctcagcaccagctggaccagatcaccctggaaccgggacctgtgccccagccc  
ggctgcaacctctacgggtctcacccttctaccctggcgtggaggacggcgggtcggca  
cacggggtgttctcgtataaacagcaatgccatggatgtggtcctgcagccgagccctgcc  
cttagctggaggtgcacaggtgggacctggatgtctacatctcctgggcccagagccc  
aagagcgtgggtcagcagctggacgtgtgggatacccgttcagcccactactgg  
ggcctgggctccacctgtccgctgggctactcctccaccgctatcaccggcagggtg  
gtggagaacatgaccagggccactccccctggagctcaatggaacgacctggactac  
atggactccccggaggacttcactcagttcaacaaggatggctccgggactccccggccatg  
gtgcaggagctgcaccagggcggcggcgtacatgatgatcgtggatcctgcccacagc  
agctcgggccccctggggagctacagccctacgacgagggctcgtggaggggggtttc  
atcaccacagagaccggccagccgctgattgggaaggatggcccgggtccactgctctc  
cccgacttcaccaacccccacagccctggcctggtgggagacatggtggctgagttccat  
gaccaggtgcccctgcagcgtatggatgacatgaacgagcctccaacttcacaga  
ggctctgaggacggctgccccacaatgagctggagaaccacccctacgtgctggggtg  
gttggggggaccctccagcggccaccatctgtcctccagccaccagttctctccaca  
cactacacctgcacaacctctacggcctgacogaagccatcgcctcccacagggcgtg  
gtgaaggctcgggggacacgcccattgtgatctccgctcagaccttctggtgcccagggc  
cgatacgcgggcaactggacgggggacgtgtggagctcctgggagcagctcgcctcctcc  
gtgccagaatctcgcagtttaacctgctgggggtgcctcgtggtcggggccgacgtctgc  
ggcttctgggcaaacctcagaggagctgtgtgctgctggaccacagctggtgggctc  
tacccttcactgcggaaccacaacagcctgctcagctgccccagagcagctacagctc  
agcagcgggcccagcagccatgaggaaaggccctaccctgctcagcctacccctcccc  
cacctctacacactgttccaccagggccacgtcggggggagaccgtggccggccccc  
ttcttgagttccccaggactctagcactgactgtggaccaccagctcctgtggggg  
gaggccctgctatcaccaccagtgctccaggccgggaaggccgaagtgactggctacttc  
cccttgggacatggtagacctgcagacgggtccaatagaggcccttggcagcctccca  
ccccacctgcagctccccgtgagccagccatccacagcagggggcagtggtgacgctg  
ccggccccctggacaccatcaacgtccacctccgggctgggtacatcaccctcag  
ggccctggcctcacaaccacagagctcccgccagcagccatggccctggctgtggccctg  
accaaggggtggagaggcccagggggagctgttctgggacgatggagagagcctggaagt  
ctggagcagggggcctacacacaggtcatctcctggccaggaataacacgatcgtgaa  
gagctgttacgtgtgaccagtgaggagctggcctgcagctgcagaagggtgactgtcctg  
ggcgtggccacggcggccccagaggtcctctccaacgggtgcctgtctccaactcacc  
tacagccccgacccaaggtcctggacatctgtctcgtgtgatgggagagcagttt  
ctgtcagctggtgttagccgggaggtgtgttagtctctccagagggagcgtggtcc  
ccaggggaagcagagcctgtgtgctggcagcagctgtgtgctgggctgggggtgcatgtg  
tcacctggagctgggcaactaaccatccaagccggcgcacgtgttccacctcctgg  
gcccgggctctggccccaacgtgtctaggagagctttccctagatgcactgtgggc  
cggggcctggagggtcctctgtttaataagatgtaagggttgcctcctcacctgtt  
gccggcatgcccgtatgaccacccccctccatctgttcccagcaccgggagaagggg  
gtgtcaggtggagggtggtggtatgcacctgagctcctgctcgcgctgctgctgc  
cccacgcgaccgctccccgctgcccagagggtggatgctgcccgtccccgagcaag  
cctgggaactcaggaataaactcagagactgggagattcaaatcttaagtgaattatt  
ttaataaaagggcatttggaaatc

SEQ ID NO: 3

Met Gly Val Arg His Pro Pro Cys Ser His Arg Leu Leu Ala Val Cys  
 Ala Leu Val Ser Leu Ala Thr Ala Ala Leu Leu Gly His Ile Leu Leu His  
 Asp Phe Leu Leu Val Pro Arg Glu Leu Ser Gly Ser Ser Pro Val Leu  
 Glu Glu Thr His Pro Ala His Gln Gln Gly Ala Ser Arg Pro Gly Pro Arg  
 Asp Ala Gln Ala His Pro Gly Arg Pro Arg Ala Val Pro Thr Gln Cys Asp  
 Val Pro Pro Asn Ser Arg Phe Asp Cys Ala Pro Asp Lys Ala Ile Thr  
 Gln Glu Gln Cys Glu Ala Arg Gly Cys Cys Tyr Ile Pro Ala Lys Gln Gly  
 Leu Gln Gly Ala Gln Met Gly Gln Pro Trp Cys Phe Phe Pro Pro Ser  
 Tyr Pro Ser Tyr Lys Leu Glu Asn Leu Ser Ser Ser Glu Met Gly Tyr  
 Thr Ala Thr Leu Thr Arg Thr Thr Pro Thr Phe Phe Pro Lys Asp Ile Leu  
 Thr Leu Arg Leu Asp Val Met Met Glu Thr Glu Asn Arg Leu His Phe  
 Thr Ile Lys Asp Pro Ala Asn Arg Arg Tyr Glu Val Pro Leu Glu Thr Pro  
 Arg Val His Ser Arg Ala Pro Ser Pro Leu Tyr Ser Val Glu Phe Ser Glu  
 Glu Pro Phe Gly Val Ile Val His Arg Gln Leu Asp Gly Arg Val Leu Leu  
 Asn Thr Thr Val Ala Pro Leu Phe Phe Ala Asp Gln Phe Leu Gln Leu  
 Ser Thr Ser Leu Pro Ser Gln Tyr Ile Thr Gly Leu Ala Glu His Leu Ser  
 Pro Leu Met Leu Ser Thr Ser Trp Thr Arg Ile Thr Leu Trp Asn Arg  
 Asp Leu Ala Pro Thr Pro Gly Ala Asn Leu Tyr Gly Ser His Pro Phe  
 Tyr Leu Ala Leu Glu Asp Gly Gly Ser Ala His Gly Val Phe Leu Leu  
 Asn Ser Asn Ala Met Asp Val Val Leu Gln Pro Ser Pro Ala Leu Ser  
 Trp Arg Ser Thr Gly Gly Ile Leu Asp Val Tyr Ile Phe Leu Gly Pro Glu  
 Pro Lys Ser Val Val Gln Gln Tyr Leu Asp Val Val Gly Tyr Pro Phe Met  
 Pro Pro Tyr Trp Gly Leu Gly Phe His Leu Cys Arg Trp Gly Tyr Ser  
 Ser Thr Ala Ile Thr Arg Gln Val Val Glu Asn Met Thr Arg Ala His Phe  
 Pro Leu Asp Val Gln Trp Asn Asp Leu Asp Tyr Met Asp Ser Arg Arg  
 Asp Phe Thr Phe Asn Lys Asp Gly Phe Arg Asp Phe Pro Ala Met Val  
 Gln Glu Leu His Gln Gly Gly Arg Arg Tyr Met Met Ile Val Asp Pro Ala  
 Ile Ser Ser Ser Gly Pro Ala Gly Ser Tyr Arg Pro Tyr Asp Glu Gly Leu  
 Arg Arg Gly Val Phe Ile Thr Asn Glu Thr Gly Gln Pro Leu Ile Gly Lys  
 Val Trp Pro Gly Ser Thr Ala Phe Pro Asp Phe Thr Asn Pro Thr Ala  
 Leu Ala Trp Trp Glu Asp Met Val Ala Glu Phe His Asp Gln Val Pro  
 Phe Asp Gly Met Trp Ile Asp Met Asn Glu Pro Ser Asn Phe Ile Arg  
 Gly Ser Glu Asp Gly Cys Pro Asn Asn Glu Leu Glu Asn Pro Pro Tyr  
 Val Pro Gly Val Val Gly Gly Thr Leu Gln Ala Ala Thr Ile Cys Ala Ser  
 Ser His Gln Phe Leu Ser Thr His Tyr Asn Leu His Asn Leu Tyr Gly  
 Leu Thr Glu Ala Ile Ala Ser His Arg Ala Leu Val Lys Ala Arg Gly Thr  
 Arg Pro Phe Val Ile Ser Arg Ser Thr Phe Ala Gly His Gly Arg Tyr Ala  
 Gly His Trp Thr Gly Asp Val Trp Ser Ser Trp Glu Gln Leu Ala Ser Ser  
 Val Pro Glu Ile Leu Gln Phe Asn Leu Leu Gly Val Pro Leu Val Gly Ala  
 Asp Val Cys Gly Phe Leu Gly Asn Thr Ser Glu Glu Leu Cys Val Arg  
 Trp Thr Gln Leu Gly Ala Phe Tyr Pro Phe Met Arg Asn His Asn Ser  
 Leu Leu Ser Leu Pro Gln Glu Pro Tyr Ser Phe Ser Glu Pro Ala Gln  
 Gln Ala Met Arg Lys Ala Leu Thr Leu Arg Tyr Ala Leu Leu Pro His

Leu Tyr Thr Leu Phe His Gln Ala His Val Ala Gly Glu Thr Val Ala Arg  
 Pro Leu Phe Leu Glu Phe Pro Lys Asp Ser Ser Thr Trp Thr Val Asp  
 His Gln Leu Leu Trp Gly Glu Ala Leu Leu Ile Thr Pro Val Leu Gln Ala  
 Gly Lys Ala Glu Val Thr Gly Tyr Phe Pro Leu Gly Thr Trp Tyr Asp Leu  
 Gln Thr Val Pro Ile Glu Ala Leu Gly Ser Leu Pro Pro Pro Ala Ala  
 Pro Arg Glu Pro Ala Ile His Ser Glu Gly Gln Trp Val Thr Leu Pro Ala  
 Pro Leu Asp Thr Ile Asn Val His Leu Arg Ala Gly Tyr Ile Ile Pro Leu  
 Gln Gly Pro Gly Leu Thr Thr Thr Glu Ser Arg Gln Gln Pro Met Ala  
 Leu Ala Val Ala Leu Thr Lys Gly Gly Glu Ala Arg Gly Glu Leu Phe Trp  
 Asp Asp Gly Glu Ser Leu Glu Val Leu Glu Arg Gly Ala Tyr Thr Gln  
 Val Ile Phe Leu Ala Arg Asn Asn Thr Ile Val Asn Glu Leu Val Arg Val  
 Thr Ser Glu Gly Ala Gly Leu Gln Leu Gln Lys Val Thr Val Leu Gly Val  
 Ala Thr Ala Pro Gln Gln Val Leu Ser Asn Gly Val Pro Val Ser Asn  
 Phe Thr Tyr Ser Pro Asp Thr Lys Val Leu Asp Ile Cys Val Ser Leu  
 Leu Met Gly Glu Gln Phe Leu Val Ser Trp Cys  
 Met Gly Val Arg His Pro Pro Cys Ser His Arg Leu Leu Ala Val Cys

SEQ ID NO: 4

Ala Leu Val Ser Leu Ala Thr Ala Ala Leu Leu Gly His Ile Leu Leu His  
 Asp Phe Leu Leu Val Pro Arg Glu Leu Ser Gly Ser Ser Pro Val Leu  
 Glu Glu Thr His Pro Ala His Gln Gln Gly Ala Ser Arg Pro Gly Pro Arg  
 Asp Ala Gln Ala His Pro Gly Arg Pro Arg Ala Val Pro Thr Gln Cys Asp  
 Val Pro Pro Asn Ser Arg Phe Asp Cys Ala Pro Asp Lys Ala Ile Thr  
 Gln Glu Gln Cys Glu Ala Arg Gly Cys Cys Tyr Ile Pro Ala Lys Gln Gly  
 Leu Gln Gly Ala Gln Met Gly Gln Pro Trp Cys Phe Phe Pro Pro Ser  
 Tyr Pro Ser Tyr Lys Leu Glu Asn Leu Ser Ser Ser Glu Met Gly Tyr  
 Thr Ala Thr Leu Thr Arg Thr Thr Pro Thr Phe Phe Pro Lys Asp Ile Leu  
 Thr Leu Arg Leu Asp Val Met Met Glu Thr Glu Asn Arg Leu His Phe  
 Thr Ile Lys Asp Pro Ala Asn Arg Arg Tyr Glu Val Pro Leu Glu Thr Pro  
 His Val His Ser Arg Ala Pro Ser Pro Leu Tyr Ser Val Glu Phe Ser Glu  
 Glu Pro Phe Gly Val Ile Val Arg Arg Gln Leu Asp Gly Arg Val Leu Leu  
 Asn Thr Thr Val Ala Pro Leu Phe Phe Ala Asp Gln Phe Leu Gln Leu  
 Ser Thr Ser Leu Pro Ser Gln Tyr Ile Thr Gly Leu Ala Glu His Leu Ser  
 Pro Leu Met Leu Ser Thr Ser Trp Thr Arg Ile Thr Leu Trp Asn Arg  
 Asp Leu Ala Pro Thr Pro Gly Ala Asn Leu Tyr Gly Ser His Pro Phe  
 Tyr Leu Ala Leu Glu Asp Gly Gly Ser Ala His Gly Val Phe Leu Leu  
 Asn Ser Asn Ala Met Asp Val Val Leu Gln Pro Ser Pro Ala Leu Ser  
 Trp Arg Ser Thr Gly Gly Ile Leu Asp Val Tyr Ile Phe Leu Gly Pro Glu  
 Pro Lys Ser Val Val Gln Gln Tyr Leu Asp Val Val Gly Tyr Pro Phe Met  
 Pro Pro Tyr Trp Gly Leu Gly Phe His Leu Cys Arg Trp Gly Tyr Ser  
 Ser Thr Ala Ile Thr Arg Gln Val Val Glu Asn Met Thr Arg Ala His Phe  
 Pro Leu Asp Val Gln Trp Asn Asp Leu Asp Tyr Met Asp Ser Arg Arg  
 Asp Phe Thr Phe Asn Lys Asp Gly Phe Arg Asp Phe Pro Ala Met Val  
 Gln Glu Leu His Gln Gly Gly Arg Arg Tyr Met Met Ile Val Asp Pro Ala

Ile Ser Ser Ser Gly Pro Ala Gly Ser Tyr Arg Pro Tyr Asp Glu Gly Leu  
 Arg Arg Gly Val Phe Ile Thr Asn Glu Thr Gly Gln Pro Leu Ile Gly Lys  
 Val Trp Pro Gly Ser Thr Ala Phe Pro Asp Phe Thr Asn Pro Thr Ala  
 Leu Ala Trp Trp Glu Asp Met Val Ala Glu Phe His Asp Gln Val Pro  
 Phe Asp Gly Met Trp Ile Asp Met Asn Glu Pro Ser Asn Phe Ile Arg  
 Gly Ser Glu Asp Gly Cys Pro Asn Asn Glu Leu Glu Asn Pro Pro Tyr  
 Val Pro Gly Val Val Gly Gly Thr Leu Gln Ala Ala Thr Ile Cys Ala Ser  
 Ser His Gln Phe Leu Ser Thr His Tyr Asn Leu His Asn Leu Tyr Gly  
 Leu Thr Glu Ala Ile Ala Ser His Arg Ala Leu Val Lys Ala Arg Gly Thr  
 Arg Pro Phe Val Ile Ser Arg Ser Thr Phe Ala Gly His Gly Arg Tyr Ala  
 Gly His Trp Thr Gly Asp Val Trp Ser Ser Trp Glu Gln Leu Ala Ser Ser  
 Val Pro Glu Ile Leu Gln Phe Asn Leu Leu Gly Val Pro Leu Val Gly Ala  
 Asp Val Cys Gly Phe Leu Gly Asn Thr Ser Glu Glu Leu Cys Val Arg  
 Trp Thr Gln Leu Gly Ala Phe Tyr Pro Phe Met Arg Asn His Asn Ser  
 Leu Leu Ser Leu Pro Gln Glu Pro Tyr Ser Phe Ser Glu Pro Ala Gln  
 Gln Ala Met Arg Lys Ala Leu Thr Leu Arg Tyr Ala Leu Leu Pro His  
 Leu Tyr Thr Leu Phe His Gln Ala His Val Ala Gly Glu Thr Val Ala Arg  
 Pro Leu Phe Leu Glu Phe Pro Lys Asp Ser Ser Thr Trp Thr Val Asp  
 His Gln Leu Leu Trp Gly Glu Ala Leu Leu Ile Thr Pro Val Leu Gln Ala  
 Gly Lys Ala Glu Val Thr Gly Tyr Phe Pro Leu Gly Thr Trp Tyr Asp Leu  
 Gln Thr Val Pro Val Glu Ala Leu Gly Ser Leu Pro Pro Pro Ala Ala  
 Pro Arg Glu Pro Ala Ile His Ser Glu Gly Gln Trp Val Thr Leu Pro Ala  
 Pro Leu Asp Thr Ile Asn Val His Leu Arg Ala Gly Tyr Ile Ile Pro Leu  
 Gln Gly Pro Gly Leu Thr Thr Thr Glu Ser Arg Gln Gln Pro Met Ala  
 Leu Ala Val Ala Leu Thr Lys Gly Gly Glu Ala Arg Gly Glu Leu Phe Trp  
 Asp Asp Gly Glu Ser Leu Glu Val Leu Glu Arg Gly Ala Tyr Thr Gln  
 Val Ile Phe Leu Ala Arg Asn Asn Thr Ile Val Asn Glu Leu Val Arg Val  
 Thr Ser Glu Gly Ala Gly Leu Gln Leu Gln Lys Val Thr Val Leu Gly Val  
 Ala Thr Ala Pro Gln Gln Val Leu Ser Asn Gly Val Pro Val Ser Asn  
 Phe Thr Tyr Ser Pro Asp Thr Lys Val Leu Asp Ile Cys Val Ser Leu  
 Leu Met Gly Glu Gln Phe Leu Val Ser Trp Cys

SEQ ID NO: 5

Gln Gln Gly Ala Ser Arg Pro Gly Pro Arg Asp Ala Gln Ala His Pro Gly  
 Arg Pro Arg Ala Val Pro Thr Gln Cys Asp Val Pro Pro Asn Ser Arg  
 Phe Asp Cys Ala Pro Asp Lys Ala Ile Thr Gln Glu Gln Cys Glu Ala  
 Arg Gly Cys Cys Tyr Ile Pro Ala Lys Gln Gly Leu Gln Gly Ala Gln Met  
 Gly Gln Pro Trp Cys Phe Phe Pro Pro Ser Tyr Pro Ser Tyr Lys Leu  
 Glu Asn Leu Ser Ser Ser Glu Met Gly Tyr Thr Ala Thr Leu Thr Arg  
 Thr Thr Pro Thr Phe Phe Pro Lys Asp Ile Leu Thr Leu Arg Leu Asp  
 Val Met Met Glu Thr Glu Asn Arg Leu His Phe Thr Ile Lys Asp Pro  
 Ala Asn Arg Arg Tyr Glu Val Pro Leu Glu Thr Pro Arg Val His Ser Arg  
 Ala Pro Ser Pro Leu Tyr Ser Val Glu Phe Ser Glu Glu Pro Phe Gly  
 Val Ile Val His Arg Gln Leu Asp Gly Arg Val Leu Leu Asn Thr Thr Val  
 Ala Pro Leu Phe Phe Ala Asp Gln Phe Leu Gln Leu Ser Thr Ser Leu

Pro Ser Gln Tyr Ile Thr Gly Leu Ala Glu His Leu Ser Pro Leu Met Leu  
 Ser Thr Ser Trp Thr Arg Ile Thr Leu Trp Asn Arg Asp Leu Ala Pro Thr  
 Pro Gly Ala Asn Leu Tyr Gly Ser His Pro Phe Tyr Leu Ala Leu Glu  
 Asp Gly Gly Ser Ala His Gly Val Phe Leu Leu Asn Ser Asn Ala Met  
 Asp Val Val Leu Gln Pro Ser Pro Ala Leu Ser Trp Arg Ser Thr Gly Gly  
 Ile Leu Asp Val Tyr Ile Phe Leu Gly Pro Glu Pro Lys Ser Val Val Gln  
 Gln Tyr Leu Asp Val Val Gly Tyr Pro Phe Met Pro Pro Tyr Trp Gly  
 Leu Gly Phe His Leu Cys Arg Trp Gly Tyr Ser Ser Thr Ala Ile Thr Arg  
 Gln Val Val Glu Asn Met Thr Arg Ala His Phe Pro Leu Asp Val Gln  
 Trp Asn Asp Leu Asp Tyr Met Asp Ser Arg Arg Asp Phe Thr Phe Asn  
 Lys Asp Gly Phe Arg Asp Phe Pro Ala Met Val Gln Glu Leu His Gln  
 Gly Gly Arg Arg Tyr Met Met Ile Val Asp Pro Ala Ile Ser Ser Ser Gly  
 Pro Ala Gly Ser Tyr Arg Pro Tyr Asp Glu Gly Leu Arg Arg Gly Val Phe  
 Ile Thr Asn Glu Thr Gly Gln Pro Leu Ile Gly Lys Val Trp Pro Gly Ser  
 Thr Ala Phe Pro Asp Phe Thr Asn Pro Thr Ala Leu Ala Trp Trp Glu  
 Asp Met Val Ala Glu Phe His Asp Gln Val Pro Phe Asp Gly Met Trp  
 Ile Asp Met Asn Glu Pro Ser Asn Phe Ile Arg Gly Ser Glu Asp Gly  
 Cys Pro Asn Asn Glu Leu Glu Asn Pro Pro Tyr Val Pro Gly Val Val  
 Gly Gly Thr Leu Gln Ala Ala Thr Ile Cys Ala Ser Ser His Gln Phe Leu  
 Ser Thr His Tyr Asn Leu His Asn Leu Tyr Gly Leu Thr Glu Ala Ile Ala  
 Ser His Arg Ala Leu Val Lys Ala Arg Gly Thr Arg Pro Phe Val Ile Ser  
 Arg Ser Thr Phe Ala Gly His Gly Arg Tyr Ala Gly His Trp Thr Gly Asp  
 Val Trp Ser Ser Trp Glu Gln Leu Ala Ser Ser Val Pro Glu Ile Leu Gln  
 Phe Asn Leu Leu Gly Val Pro Leu Val Gly Ala Asp Val Cys Gly Phe  
 Leu Gly Asn Thr Ser Glu Glu Leu Cys Val Arg Trp Thr Gln Leu Gly  
 Ala Phe Tyr Pro Phe Met Arg Asn His Asn Ser Leu Leu Ser Leu Pro  
 Gln Glu Pro Tyr Ser Phe Ser Glu Pro Ala Gln Gln Ala Met Arg Lys Ala  
 Leu Thr Leu Arg Tyr Ala Leu Leu Pro His Leu Tyr Thr Leu Phe His  
 Gln Ala His Val Ala Gly Glu Thr Val Ala Arg Pro Leu Phe Leu Glu Phe  
 Pro Lys Asp Ser Ser Thr Trp Thr Val Asp His Gln Leu Leu Trp Gly  
 Glu Ala Leu Leu Ile Thr Pro Val Leu Gln Ala Gly Lys Ala Glu Val Thr  
 Gly Tyr Phe Pro Leu Gly Thr Trp Tyr Asp Leu Gln Thr Val Pro Ile Glu  
 Ala Leu Gly Ser Leu Pro Pro Pro Pro Ala Ala Pro Arg Glu Pro Ala Ile  
 His Ser Glu Gly Gln Trp Val Thr Leu Pro Ala Pro Leu Asp Thr Ile Asn  
 Val His Leu Arg Ala Gly Tyr Ile Ile Pro Leu Gln Gly Pro Gly Leu Thr  
 Thr Thr Glu Ser Arg Gln Gln Pro Met Ala Leu Ala Val Ala Leu Thr Lys  
 Gly Gly Glu Ala Arg Gly Glu Leu Phe Trp Asp Asp Gly Glu Ser Leu  
 Glu Val Leu Glu Arg Gly Ala Tyr Thr Gln Val Ile Phe Leu Ala Arg Asn  
 Asn Thr Ile Val Asn Glu Leu Val Arg Val Thr Ser Glu Gly Ala Gly Leu  
 Gln Leu Gln Lys Val Thr Val Leu Gly Val Ala Thr Ala Pro Gln Gln Val  
 Leu Ser Asn Gly Val Pro Val Ser Asn Phe Thr Tyr Ser Pro Asp Thr  
 Lys Val Leu Asp Ile Cys Val Ser Leu Leu Met Gly Glu Gln Phe Leu  
 Val Ser Trp Cys

En al menos una realización, la  $\alpha$ -glucosidasa ácida humana recombinante tiene una secuencia de aminoácidos de GAA natural como se expone en la SEQ ID NO: 1, como se describe en la patente estadounidense núm. 8.592.362 y tiene el número de acceso a GenBank AHE24104.1 (GI:568760974). En al menos una realización, la  $\alpha$ -glucosidasa ácida humana recombinante tiene una secuencia de aminoácidos de GAA natural como la codificada en la SEQ ID NO: 2, la secuencia de ARNm tiene el número de acceso de GenBank Y00839.1. En al menos una realización, la  $\alpha$ -glucosidasa ácida humana recombinante tiene una secuencia de aminoácidos de GAA natural como se expone en la SEQ ID NO: 3. En al menos una realización, la  $\alpha$ -glucosidasa ácida humana recombinante tiene una secuencia de aminoácidos de GAA como se expone en la SEQ ID NO: 4 y tiene el número de acceso del National Center for Biotechnology Information (NCBI) NP\_000143.2. En al menos una realización, la  $\alpha$ -glucosidasa ácida humana recombinante es glucosidasa alfa, la enzima  $\alpha$ -glucosidasa ácida humana codificada por el más predominante de los nueve haplotipos observados del gen *GAA*.

En al menos una realización, la  $\alpha$ -glucosidasa ácida humana recombinante se expresa inicialmente como la secuencia de 952 aminoácidos de longitud completa de GAA natural como se expone en la SEQ ID NO: 1, y la  $\alpha$ -glucosidasa ácida humana recombinante sufre el procesamiento intracelular que extrae una porción de los aminoácidos, p. ej., los primeros 56 aminoácidos. Por consiguiente, la  $\alpha$ -glucosidasa ácida humana recombinante que es secretada por la célula hospedante puede tener una secuencia de aminoácidos más corta que la  $\alpha$ -glucosidasa ácida humana recombinante que se expresa inicialmente dentro de la célula. En al menos una realización, la proteína más corta puede tener la secuencia de aminoácidos que se expone en la SEQ ID NO: 5, que difiere solo con respecto a la SEQ ID NO: 1 en que los primeros 56 aminoácidos que comprenden el péptido señal y el péptido precursor se han extraído, por lo tanto, da como resultado una proteína que tiene 896 aminoácidos. Son también posibles otras variaciones en el número de aminoácidos, tales como tener 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 o más eliminaciones, sustituciones e/o inserciones con respecto a la secuencia de aminoácidos descrita por la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 5. En algunas realizaciones, el producto de rhGAA incluye una mezcla de moléculas de  $\alpha$ -glucosidasa ácida humana recombinante que tienen diferentes longitudes de aminoácidos.

En al menos una realización, la  $\alpha$ -glucosidasa ácida humana recombinante sufre modificaciones postraducción y/o químicas en uno o más residuos aminoacídicos en la proteína. Por ejemplo, los residuos metionina y triptófano pueden sufrir oxidación. Como otro ejemplo, la glutamina del extremo N puede formar piro-glutamato. Como otro ejemplo, los residuos asparagina pueden sufrir desamidación en ácido aspártico. Como incluso otro ejemplo, los residuos ácido aspártico pueden sufrir isomerización en ácido iso-aspártico. Como incluso otro ejemplo, los residuos cisteína no apareados en la proteína pueden formar uniones disulfuro con glutatión y/o cisteína libre. Por consiguiente, en algunas realizaciones, la enzima se expresa inicialmente con una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 1, la SEQ ID NO: 2 (o como la codificada por SEQ ID NO: 2), la SEQ ID NO: 3, la SEQ ID NO: 4 o la SEQ ID NO: 5, y la enzima sufre una o más de estas modificaciones postraducción y/o químicas. Dichas modificaciones también se encuentran dentro del alcance de la presente descripción.

Las secuencias polinucleotídicas que codifican GAA y dichas GAA humanas variantes también se contemplan y se pueden usar para expresar de manera recombinante rhGAA según la invención. Preferiblemente, no más de 70, 65, 60, 55, 45, 40, 35, 30, 25, 20, 15, 10, o 5 % de las moléculas de  $\alpha$ -glucosidasa ácida humana recombinante totales carecen de una unidad de N-glicano que tiene uno o más residuos manosa-6-fosfato o carece de una capacidad para unirse al receptor de manosa-6-fosfato independiente de catión (CIMPR). Alternativamente, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 99 %, <100 % o más de las moléculas de  $\alpha$ -glucosidasa ácida humana recombinante comprenden al menos una unidad de N-glicano que tiene uno o más residuos manosa-6-fosfato o tienen capacidad para unirse a CIMPR.

Las moléculas de  $\alpha$ -glucosidasa ácida humana recombinante pueden tener 1, 2, 3 o 4 grupos manosa-6-fosfato (M6P) en sus glicanos. Por ejemplo, solo un N-glicano en una molécula de  $\alpha$ -glucosidasa ácida humana recombinante puede tener M6P (monofosforilado), un único N-glicano puede tener dos grupos M6P (bifosforilado), o dos N-glicanos diferentes en la misma molécula de  $\alpha$ -glucosidasa ácida humana recombinante pueden tener cada uno grupos M6P únicos. Las moléculas de  $\alpha$ -glucosidasa ácida humana recombinante también puede tener N-glicanos que no tienen grupos M6P. En otra realización, en promedio los N-glicanos contienen más de 2,5 mol/mol de M6P y más de 4 mol/mol de ácido siálico, de modo que la  $\alpha$ -glucosidasa ácida humana recombinante comprende en promedio al menos 2,5 moles de residuos manosa-6-fosfato por mol de  $\alpha$ -glucosidasa ácida humana recombinante y al menos 4 moles de ácido siálico por mol de  $\alpha$ -glucosidasa ácida humana recombinante. En promedio al menos aproximadamente 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 % de los glicanos totales en la  $\alpha$ -glucosidasa ácida humana recombinante pueden estar en forma de un glicano mono-M6P, por ejemplo, aproximadamente 6,25 % de los glicanos totales pueden tener un único grupo M6P y, en promedio, al menos aproximadamente 0,5, 1, 1,5, 2,0, 2,5, 3,0 % de los glicanos totales en la  $\alpha$ -glucosidasa ácida humana recombinante están en forma de un glicano bis-M6P y, en promedio, menos de 25 % de la  $\alpha$ -glucosidasa ácida humana recombinante total no contiene ningún glicano fosforilado que se une a CIMPR.

La  $\alpha$ -glucosidasa ácida humana recombinante puede tener un contenido promedio de N-glicanos que tienen M6P que varía de 0,5 a 7,0 mol/mol de la  $\alpha$ -glucosidasa ácida humana recombinante o cualquier valor intermedio del subintervalo que incluye 0,5, 1,0, 1,5, 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5 o 7,0 mol/mol de la  $\alpha$ -glucosidasa ácida humana recombinante. La  $\alpha$ -glucosidasa ácida humana recombinante se puede fraccionar para proporcionar preparaciones de  $\alpha$ -glucosidasa ácida humana recombinante con diferentes cantidades promedio de glicanos que tienen M6P o tienen bis-M6P y permitir así la personalización adicional de la  $\alpha$ -glucosidasa ácida humana

recombinante dirigida a los lisosomas en tejidos diana al seleccionar una fracción particular o al combinar selectivamente fracciones diferentes.

Hasta 60 % de los N-glicanos en la  $\alpha$ -glucosidasa ácida humana recombinante pueden estar completamente sialilados, por ejemplo, hasta 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 % o 60 % de los N-glicanos pueden estar completamente sialilados. En algunas realizaciones, de 4 a 20 % de los N-glicanos totales están completamente sialilados. En otras realizaciones, no más de 5 %, 10 %, 20 % o 30 % de los N-glicanos en la  $\alpha$ -glucosidasa ácida humana recombinante tienen ácido siálico y un residuo galactosa terminal (Gal). Este intervalo incluye todos los valores intermedios y subintervalos, por ejemplo, 7 a 30 % de los N-glicanos totales en la  $\alpha$ -glucosidasa ácida humana recombinante pueden tener ácido siálico y galactosa terminal. En incluso otras realizaciones, no más de 5, 10, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 % de los N-glicanos en la  $\alpha$ -glucosidasa ácida humana recombinante tienen solo una galactosa terminal y no contienen ácido siálico. Este intervalo incluye todos los valores intermedios y subintervalos, por ejemplo, de 8 a 19 % de los N-glicanos totales en la  $\alpha$ -glucosidasa ácida humana recombinante en la composición pueden tener solo galactosa terminal y no contienen ácido siálico.

En otras realizaciones de la invención, 40, 45, 50, 55 a 60 % de los N-glicanos totales en la  $\alpha$ -glucosidasa ácida humana recombinante son N-glicanos de tipo complejo; o no más de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 % de los N-glicanos totales en la  $\alpha$ -glucosidasa ácida humana recombinante son N-glicanos de tipo híbrido; no más de 5, 10 o 15 % de los N-glicanos de tipo con alto contenido de manosa en la  $\alpha$ -glucosidasa ácida humana recombinante son no fosforilados; al menos 5 % o 10 % de los N-glicanos de tipo con alto contenido de manosa de la  $\alpha$ -glucosidasa ácida humana recombinante son mono-M6P fosforilados; y/o al menos 1 o 2 % de los N-glicanos de tipo con alto contenido de manosa de la  $\alpha$ -glucosidasa ácida humana recombinante son bis-M6P fosforilados. Estos valores incluyen todos los valores intermedios y subintervalos. Una  $\alpha$ -glucosidasa ácida humana recombinante puede alcanzar uno o más de los intervalos de contenido descritos anteriormente.

En algunas realizaciones, la  $\alpha$ -glucosidasa ácida humana recombinante tendrá, en promedio, 2,0 a 8,0 moles de residuos ácido siálico por mol de  $\alpha$ -glucosidasa ácida humana recombinante. Este intervalo incluye todos los valores intermedios y subintervalos incluidos 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5 y 8,0 mol de residuos/mol de  $\alpha$ -glucosidasa ácida humana recombinante.

Sin desear limitarse a la teoría, se cree que la presencia de unidades de N-glicano que tienen residuos ácido siálico puede evitar el aclaramiento no productivo de la  $\alpha$ -glucosidasa ácida humana recombinante mediante receptores de asialoglicoproteína.

En una o más realizaciones, la rhGAA tiene unidades de M6P y/o ácido siálico en ciertos sitios de N-glicosilación de la proteína lisosómica humana recombinante. Por ejemplo, hay siete posibles sitios de glicosilación enlazados a N en rhGAA. Estos posibles sitios de glicosilación están en las siguientes posiciones de la SEQ ID NO: 5: N84, N177, N334, N414, N596, N826 y N869. De manera similar, para la secuencia de aminoácidos de longitud completa de la SEQ ID NO: 1, estos posibles sitios de glicosilación están en las siguientes posiciones: N140, N233, N390, N470, N652, N882 y N925. Otras variantes de rhGAA pueden tener sitios de glicosilación similares, dependiendo de la ubicación de los residuos asparagina. Generalmente, las secuencias de ASN-X-SER o ASN-X-THR en la secuencia de aminoácidos de la proteína indican sitios de glicosilación, con la excepción de que X no puede ser HIS ni PRO.

En varias realizaciones, la rhGAA tiene un cierto perfil de N-glicosilación. En una o más realizaciones, al menos 20 % de la rhGAA está fosforilada en el primer sitio de N-glicosilación (p. ej., N84 en la SEQ ID NO: 5 y N140 en la SEQ ID NO: 1). Por ejemplo, al menos 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 % o 95 % de la rhGAA puede estar fosforilada en el primer sitio de N-glicosilación. Esta fosforilación puede ser el resultado de unidades de mono-M6P y/o bis-M6P. En algunas realizaciones, al menos 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 % o 95 % de la rhGAA tiene una unidad de mono-M6P en el primer sitio de N-glicosilación. En algunas realizaciones, al menos 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 % o 95 % de la rhGAA tiene una unidad de bis-M6P en el primer sitio de N-glicosilación.

En una o más realizaciones, al menos 20 % de la rhGAA está fosforilada en el segundo sitio de N-glicosilación (p. ej., N177 en la SEQ ID NO: 5 y N223 en la SEQ ID NO: 1). Por ejemplo, al menos 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 % o 95 % de la rhGAA puede estar fosforilada en el segundo sitio de N-glicosilación. Esta fosforilación puede ser el resultado de unidades de mono-M6P y/o bis-M6P. En algunas realizaciones, al menos 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 % o 95 % de la rhGAA tiene una unidad de mono-M6P en el segundo sitio de N-glicosilación. En algunas realizaciones, al menos 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 % o 95 % de la rhGAA tiene una unidad de bis-M6P en el segundo sitio de N-glicosilación. En una o más realizaciones, al menos 5 % de la rhGAA está fosforilada en el tercer sitio de N-glicosilación (p. ej., N334 en la SEQ ID NO: 5 y N390 en la SEQ ID NO: 1). En otras realizaciones, menos de 5 %, 10 %, 15 %, 20 % o 25 % de la rhGAA está fosforilada en el tercer sitio de N-glicosilación. Por ejemplo, el tercer sitio de N-glicosilación puede tener una mezcla de glicanos con alto contenido de manosa no fosforilados, glicanos complejos di, tri y tetra-antenarios y glicanos híbridos como la especie principal. En algunas realizaciones, al menos 3 %, 5 %, 8 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 % o 50 % de la rhGAA está sialilada en el tercer sitio de N-glicosilación.

En una o más realizaciones, al menos 20 % de la rhGAA está fosforilada en el cuarto sitio de N-glicosilación (p. ej., N414 en la SEQ ID NO: 5 y N470 en la SEQ ID NO: 1). Por ejemplo, al menos 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 % o 95 % de la rhGAA puede estar fosforilada en el cuarto sitio de N-glicosilación. Esta fosforilación puede ser el resultado de unidades de mono-M6P y/o bis-M6P. En algunas realizaciones, al menos 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 % o 95 % de la rhGAA tiene una unidad de mono-M6P en el cuarto sitio de N-glicosilación. En algunas realizaciones, al menos 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 % o 95 % de la rhGAA tiene una unidad de bis-M6P en el cuarto sitio de N-glicosilación. En algunas realizaciones, al menos 3 %, 5 %, 8 %, 10 %, 15 %, 20 % o 25 % de la rhGAA está sialilada en el cuarto sitio de N-glicosilación.

En una o más realizaciones, al menos 5 % de la rhGAA está fosforilada en el quinto sitio de N-glicosilación (p. ej., N596 en la SEQ ID NO: 5 y N692 en la SEQ ID NO: 1). En otras realizaciones, menos de 5 %, 10 %, 15 %, 20 % o 25 % de la rhGAA está fosforilada en el quinto sitio de N-glicosilación. Por ejemplo, el quinto sitio de N-glicosilación puede tener glicanos complejos di-antennarios fucosilados como la especie principal. En algunas realizaciones, al menos 3 %, 5 %, 8 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 % o 95 % de la rhGAA está sialilada en el quinto sitio de N-glicosilación.

En una o más realizaciones, al menos 5 % de la rhGAA está fosforilada en el sexto sitio de N-glicosilación (p. ej., N826 en la SEQ ID NO: 5 y N882 en la SEQ ID NO: 1). En otras realizaciones, menos de 5 %, 10 %, 15 %, 20 % o 25 % de la rhGAA está fosforilada en el sexto sitio de N-glicosilación. Por ejemplo, el sexto sitio de N-glicosilación puede tener una mezcla de glicanos complejos di, tri y tetra-antennarios como la especie principal. En algunas realizaciones, al menos 3 %, 5 %, 8 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 % o 95 % de la rhGAA está sialilada en el sexto sitio de N-glicosilación.

En una o más realizaciones, al menos 5 % de la rhGAA está fosforilada en el séptimo sitio de N-glicosilación (p. ej., N869 en la SEQ ID NO: 5 y N925 en la SEQ ID NO: 1). En otras realizaciones, menos de 5 %, 10 %, 15 %, 20 % o 25 % de la rhGAA está fosforilada en el séptimo sitio de N-glicosilación. En algunas realizaciones, menos de 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 % o 65 % de la rhGAA tiene cualquier glicano en el séptimo sitio de N-glicosilación. En algunas realizaciones, al menos 30 %, 35 % o 40 % de la rhGAA tiene un glicano en el séptimo sitio de N-glicosilación.

La  $\alpha$ -glucosidasa ácida humana recombinante se produce preferiblemente en células de ovario de hámster chino (CHO), tales como la línea celular de CHO GA-ATB-200 o ATB-200-001-X5-14, o mediante un subcultivo o derivado de dicho cultivo celular de CHO. Se pueden construir construcciones de ADN, que expresan variantes alélicas de  $\alpha$ -glucosidasa ácida u otras secuencias de aminoácidos de  $\alpha$ -glucosidasa ácida variantes tales como las que son al menos 90 %, 95 %, 98 % o 99 % idénticas a la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 5, y expresarse en células CHO. Estas secuencias de aminoácidos de  $\alpha$ -glucosidasa ácida variantes pueden contener eliminaciones, sustituciones e/o inserciones con respecto a la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 5, tal como tener 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 o más eliminaciones, sustituciones e/o inserciones con respecto a la secuencia de aminoácidos descrita por la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 5. Los expertos en la técnica pueden seleccionar vectores alternativos adecuados para transformar células CHO para la producción de dichas construcciones de ADN.

Se pueden usar varios algoritmos y/o programas de alineación para calcular la identidad entre dos secuencias, incluidos FASTA, o BLAST que están disponibles como parte del paquete de análisis de secuencias GCG (Universidad de Wisconsin, Madison, Wis.), y se pueden usar con, p. ej., la configuración predeterminada. Por ejemplo, se contemplan polipéptidos que tienen al menos 90 %, 95 %, 98 % o 99 % de identidad con respecto a polipéptidos específicos descritos en la presente memoria y que preferiblemente exhiben sustancialmente las mismas funciones, así como un polinucleótido que codifica dichos polipéptidos. A menos que se indique de cualquier otra manera, una puntuación de similitud se basará en el uso de BLOSUM62. Cuando se usa BLASTP, el porcentaje de similitud se basa en la puntuación de positivos de BLASTP y el porcentaje de identidad secuencial se basa en la puntuación de identidades de BLASTP. Las "Identidades" de BLASTP muestran el número y fracción de los residuos totales en los pares de secuencias con puntuaciones altas que son idénticas; y los "Positivos" de BLASTP muestran el número y fracción de residuos para los cuales 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 respecto a las secuencias de aminoácidos descritas en la presente memoria están contempladas y abarcadas en la presente descripción. Las secuencias polinucleotídicas de polipéptidos similares se deducen al usar el código genético y se pueden obtener por medios convencionales, en particular, mediante la traducción inversa de su secuencia de aminoácidos al usar el código genético.

Los inventores descubrieron que se puede producir  $\alpha$ -glucosidasa ácida humana recombinante que tiene capacidad superior para dirigirse a receptores de manosa-6-fosfato independientes de catión (CIMPR) y lisosomas celulares, así como patrones de glicosilación que reducen su aclaramiento no productivo *in vivo* al usar células de ovario de hámster chino (CHO). Estas células se pueden inducir para expresar la  $\alpha$ -glucosidasa ácida humana recombinante con niveles significativamente más altos de unidades de N-glicano que tienen uno o más residuos manosa-6-fosfato que los productos de  $\alpha$ -glucosidasa ácida humana recombinante convencionales tales como  $\alpha$ -glucosidasa alfa. La  $\alpha$ -glucosidasa ácida humana recombinante producida por estas células, por ejemplo, como se ejemplifica mediante ATB200, tiene significativamente más residuos N-glicano con manosa-6-fosfato (mono-M6P) y bis-manosa-6-fosfato

(bis-M6P) que se dirigen a células musculares que la  $\alpha$ -glucosidasa ácida convencional, tal como Lumizyme®. Sin desear limitarse a la teoría, se cree que esta amplia glicosilación permite que las células diana absorban de manera más eficaz la enzima ATB200 y, por lo tanto, se aclare de manera más eficaz de la circulación que otras  $\alpha$ -glucosidasas ácidas humanas recombinantes, tales como, por ejemplo, alglucosidasa alfa, que tiene un contenido de M6P y bis-M6P mucho más bajo. Se ha demostrado que ATB200 se une de manera eficaz a CIMPR y es absorbida de manera eficaz por el músculo esquelético y el músculo cardíaco y tiene un patrón de glicosilación que proporciona un perfil farmacocinético favorable y reduce el aclaramiento no productivo *in vivo*.

También se contempla que la glicosilación única de ATB200 puede contribuir a una reducción de la inmunogenicidad de ATB200 en comparación con, por ejemplo, alglucosidasa alfa. Como lo apreciarán los expertos en la técnica, la glicosilación de proteínas con azúcares de mamífero conservados generalmente potencia la solubilidad del producto y disminuye la aglomeración e inmunogenicidad del producto. La glicosilación altera indirectamente la inmunogenicidad de la proteína al minimizar la aglomeración de la proteína, así como al proteger epítopos proteicos inmunógenos contra el sistema inmunitario (Guidance for Industry - Immunogenicity Assessment for Therapeutic Protein Products [Guía para la industria sobre evaluación de la inmunogenicidad para productos proteicos terapéuticos], Departamento de Salud y Servicios Humanos de los Estados Unidos, Administración de Alimentos y Medicamentos, Centro para la evaluación e investigación de medicamentos y Centro para la evaluación e investigación de productos biológicos, agosto de 2014). Por lo tanto, en al menos una realización, la administración de la  $\alpha$ -glucosidasa ácida humana recombinante no induce anticuerpos anti-fármaco. En al menos una realización, la administración de la  $\alpha$ -glucosidasa ácida humana recombinante induce una incidencia más baja de anticuerpos anti-fármaco en un sujeto que el nivel de anticuerpos anti-fármaco inducido por la administración de alglucosidasa alfa.

Como se describe en la solicitud de patente internacional copendiente PCT/US2015/053252, se pueden usar células tales como células CHO para producir la rhGAA descrita en ella, y esta rhGAA se puede usar en la presente invención. Los ejemplos de dicha línea celular de CHO son GA-ATB-200 o ATB-200-001-X5-14, o un subcultivo de estas que produce una composición de rhGAA, como se describe en ella. Dichas líneas celulares de CHO 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, tal como ATB200 rhGAA, se puede producir al transformar células CHO con una construcción de ADN que codifica GAA. Si bien las células CHO se usaron anteriormente para producir rhGAA, no se apreció que las células CHO transformadas se podrían cultivar y seleccionar de un modo que produciría rhGAA con un contenido alto de glicanos con M6P y bis-M6P que se dirigen a los CIMPR.

De manera sorprendente, se descubrió que es posible transformar líneas celulares de CHO, seleccionar los transformantes que producen rhGAA que contiene un alto contenido de glicanos que tienen M6P o bis-M6P que se dirigen a CIMPR, y expresar de manera estable esta rhGAA con alto contenido de M6P. Por lo tanto, los métodos para producir estas líneas celulares de CHO también se describen en la solicitud de patente internacional copendiente PCT/US2015/053252. 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 tienen 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 contenido bajo no fosforilado alto en manosa. En al menos una realización, la GAA tiene niveles bajos de glicanos complejos con galactosa terminal.

Estas líneas celulares de CHO se pueden usar para producir rhGAA y composiciones de rhGAA al cultivar la línea celular de CHO y recuperar dicha composición del cultivo de células CHO.

La  $\alpha$ -glucosidasa ácida humana recombinante, o una sal farmacéuticamente aceptable de esta, se puede formular según los procedimientos de rutina como una 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 sitio de la inyección. Generalmente, los ingredientes se proporcionan por separado o mezclados entre sí en una forma de dosificación unitaria, por ejemplo, como un polvo liofilizado seco o un concentrado sin agua en un contenedor sellado herméticamente, tal como una ampolla o bolsita, que indique la cantidad de agente activo. Cuando la composición se debe administrar por infusión, se puede dispensar con un frasco de infusión que contiene agua de grado farmacéutico estéril, 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 modo que los ingredientes se puedan mezclar antes de la administración.

La  $\alpha$ -glucosidasa ácida (o una composición o medicamento que contiene  $\alpha$ -glucosidasa ácida humana recombinante) se administra a través de una vía apropiada. En una realización, la  $\alpha$ -glucosidasa ácida humana recombinante se administra por vía intravenosa. En otras realizaciones, la  $\alpha$ -glucosidasa ácida humana recombinante se administra mediante administración directa a un tejido diana, tal como músculo cardíaco o esquelético (p. ej., intramuscular), o al sistema nervioso (p. ej., inyección directa en el cerebro; intraventricular; intratecal). Si se desea, se puede usar más de una vía simultáneamente.

La  $\alpha$ -glucosidasa ácida humana recombinante (o una composición o medicamento que contiene  $\alpha$ -glucosidasa ácida humana recombinante) se administra en una cantidad terapéuticamente eficaz (p. ej., una cantidad de dosificación que, cuando se administra en intervalos regulares, es suficiente para tratar la enfermedad, tal como al aliviar los síntomas asociados con la enfermedad, prevenir o retardar la aparición de la enfermedad, y/o disminuir la gravedad o frecuencia de los síntomas de la enfermedad). La cantidad que será terapéuticamente eficaz para el tratamiento de la enfermedad dependerá de la naturaleza y extensión de los efectos de la enfermedad, y se puede determinar con técnicas clínicas estándares. Además, se pueden emplear, opcionalmente, ensayos *in vitro* o *in vivo* para ayudar a identificar intervalos de dosificación óptimos. La dosis exacta que se va a emplear también dependerá de la vía de administración y la gravedad de la enfermedad, y se decidirá según la opinión de un médico y las circunstancias de cada paciente. Las dosis eficaces se pueden extrapolar a partir de curvas de respuesta a la dosis derivadas de sistemas de evaluación en modelos animales o *in vitro*. En al menos una realización, la  $\alpha$ -glucosidasa ácida humana recombinante se administra mediante infusión intravenosa en una dosis de aproximadamente 5 mg/kg a aproximadamente 30 mg/kg, normalmente de aproximadamente 5 mg/kg a aproximadamente 20 mg/kg. En al menos una realización, la  $\alpha$ -glucosidasa ácida humana recombinante se administra mediante infusión intravenosa en una dosis de aproximadamente 5 mg/kg, aproximadamente 10 mg/kg, aproximadamente 15 mg/kg o aproximadamente 20 mg/kg. En al menos una realización, la  $\alpha$ -glucosidasa ácida humana recombinante se administra mediante infusión intravenosa en una dosis de aproximadamente 20 mg/kg. La dosis eficaz de para un individuo particular se puede variar (p. ej., aumentar o disminuir) con el tiempo, según las necesidades del individuo. Por ejemplo, en momentos de manifestaciones físicas o estrés, o si aparecen o aumentan los anticuerpos anti- $\alpha$ -glucosidasa ácida, o si los síntomas de la enfermedad empeoran, se puede aumentar la cantidad.

La cantidad terapéuticamente eficaz de la  $\alpha$ -glucosidasa ácida (o una composición o medicamento que contiene  $\alpha$ -glucosidasa ácida humana recombinante) se administra en intervalos regulares, dependiendo de la naturaleza y la extensión de los efectos de la enfermedad, y de manera continua. La administración en un "intervalo regular", según se usa en la presente memoria, 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  $\alpha$ -glucosidasa ácida humana recombinante se administra mensualmente, bimensualmente; semanalmente; bisemanalmente; o diariamente. El intervalo de administración para un único individuo no debe hacerse en un intervalo fijo, sino que puede variar con el tiempo, según las necesidades del individuo. Por ejemplo, en momentos de manifestaciones físicas o estrés, si aparecen o aumentan los anticuerpos anti- $\alpha$ -glucosidasa ácida humana recombinante, o si los síntomas de la enfermedad empeoran, se puede disminuir el intervalo entre dosis. En algunas realizaciones, se administra una cantidad terapéuticamente eficaz de 5, 10, 20, 50, 100 o 200 mg de enzima/kg de peso corporal dos veces por semana, semanalmente o cada dos semanas con o sin una chaperona.

La  $\alpha$ -glucosidasa ácida humana recombinante de la invención se puede preparar para uso posterior, tal como en un vial o jeringa de dosificación unitaria, o en un frasco o bolsa para administración intravenosa. Los kits que contienen la  $\alpha$ -glucosidasa ácida humana recombinante, así como excipientes opcionales u otros ingredientes activos, tales como chaperonas u otros fármacos, se pueden envasar en material de envase e ir acompañados por instrucciones para la reconstitución, dilución o dosificación para tratar a un sujeto que necesita el tratamiento, tal como un paciente que tiene la enfermedad de Pompe.

En al menos una realización, el miglustat y la  $\alpha$ -glucosidasa ácida humana recombinante se administran simultáneamente. En al menos una realización, el miglustat y la  $\alpha$ -glucosidasa ácida humana recombinante se administran secuencialmente. En al menos una realización, el miglustat se administra antes de la administración de la  $\alpha$ -glucosidasa ácida humana recombinante. En al menos una realización, el miglustat se administra menos de tres horas antes de la administración de la  $\alpha$ -glucosidasa ácida humana recombinante. En al menos una realización, el miglustat se administra aproximadamente dos horas antes de la administración de la  $\alpha$ -glucosidasa ácida humana recombinante. En al menos una realización, el miglustat se administra menos de dos horas antes de la administración de la  $\alpha$ -glucosidasa ácida humana recombinante. En al menos una realización, el miglustat se administra aproximadamente 1,5 horas antes de la administración de la  $\alpha$ -glucosidasa ácida humana recombinante. En al menos una realización, el miglustat se administra aproximadamente una hora antes de la administración de la  $\alpha$ -glucosidasa ácida humana recombinante. En al menos una realización, el miglustat se administra de aproximadamente 50 minutos a aproximadamente 70 minutos antes de la administración de la  $\alpha$ -glucosidasa ácida humana recombinante. En al menos una realización, el miglustat se administra de aproximadamente 55 minutos a aproximadamente 65 minutos antes de la administración de la  $\alpha$ -glucosidasa ácida humana recombinante. En al menos una realización, el miglustat se administra aproximadamente 30 minutos antes de la administración de la  $\alpha$ -glucosidasa ácida humana recombinante. En al menos una realización, el miglustat se administra de aproximadamente 25 minutos a aproximadamente 35 minutos antes de la administración de la  $\alpha$ -glucosidasa ácida humana recombinante. En al menos una realización, el miglustat se administra de aproximadamente 27 minutos a aproximadamente 33 minutos antes de la administración de la  $\alpha$ -glucosidasa ácida humana recombinante.

En al menos una realización, el miglustat se administra simultáneamente con la administración de la  $\alpha$ -glucosidasa ácida humana recombinante. En al menos una realización, el miglustat se administra en los 20 minutos anteriores o posteriores a la administración de la  $\alpha$ -glucosidasa ácida humana recombinante. En al menos una realización, el miglustat se administra en los 15 minutos anteriores o posteriores a la administración de la  $\alpha$ -glucosidasa ácida humana recombinante. En al menos una realización, el miglustat se administra en los 10 minutos anteriores o posteriores a la administración de la  $\alpha$ -glucosidasa ácida humana recombinante. En al menos una realización, el

miglustat se administra en los 5 minutos anteriores o posteriores a la administración de la  $\alpha$ -glucosidasa ácida humana recombinante.

5 En al menos una realización, el miglustat se administra después de la administración de la  $\alpha$ -glucosidasa ácida humana recombinante. En al menos una realización, el miglustat se administra hasta 2 horas después de la administración de la  $\alpha$ -glucosidasa ácida humana recombinante. En al menos una realización, el miglustat se administra aproximadamente 30 minutos después de la administración de la  $\alpha$ -glucosidasa ácida humana recombinante. En al menos una realización, el miglustat se administra aproximadamente una hora después de la administración de la  $\alpha$ -glucosidasa ácida humana recombinante. En al menos una realización, el miglustat se administra aproximadamente 1,5 horas después de la administración de la  $\alpha$ -glucosidasa ácida humana recombinante. En al menos una realización, el miglustat se administra aproximadamente 2 horas después de la administración de la  $\alpha$ -glucosidasa ácida humana recombinante.

15 Otro aspecto de la invención proporciona un kit para la politerapia de la enfermedad de Pompe en un paciente que lo necesita. El kit incluye una forma de dosificación farmacéuticamente aceptable que comprende miglustat, una forma de dosificación farmacéuticamente aceptable que comprende una  $\alpha$ -glucosidasa ácida humana recombinante como se define en la presente memoria, e instrucciones para administrar la forma de dosificación farmacéuticamente aceptable que comprende miglustat y la forma de dosificación farmacéuticamente aceptable que comprende la recombinante  $\alpha$ -glucosidasa ácida a un paciente que lo necesita. En al menos una realización, la forma de dosificación farmacéuticamente aceptable que comprende miglustat es una forma de dosificación oral como se describe en la presente memoria, que incluye, pero no se limita a, un comprimido o una cápsula. En al menos una realización, la forma de dosificación farmacéuticamente aceptable que comprende una  $\alpha$ -glucosidasa ácida humana recombinante es una disolución estéril adecuada para inyección, como se describe en la presente memoria. En al menos una realización, las instrucciones para administrar las formas de dosificación incluyen instrucciones para administrar la forma de dosificación farmacéuticamente aceptable que comprende miglustat oralmente antes de administrar la forma de dosificación farmacéuticamente aceptable que comprende la  $\alpha$ -glucosidasa ácida humana recombinante por infusión intravenosa, como se describe en la presente memoria.

20 Sin desear limitarse a la teoría, se cree que el miglustat actúa como una chaperona farmacológica para la  $\alpha$ -glucosidasa ácida humana recombinante ATB200 y se une a su sitio activo. Por lo tanto, como se observa en la Figura 1, se ha descubierto que el miglustat disminuye el porcentaje de proteína ATB200 mal plegada y estabiliza la conformación activa de ATB200, previene la desnaturalización e inactivación irreversible en el pH neutro del plasma y permite que sobreviva en condiciones en la circulación suficientemente extensas para alcanzar y ser absorbida por los tejidos. Sin embargo, la unión de miglustat al sitio activo de ATB200 también puede provocar la inhibición de la actividad enzimática de ATB200 al evitar que el sustrato natural, el glucógeno, acceda al sitio activo. Se cree que cuando el miglustat y la  $\alpha$ -glucosidasa ácida humana recombinante se administran a un paciente en las condiciones descritas en la presente memoria, la concentraciones de miglustat y ATB200 dentro del plasma y los tejidos son tales que la ATB200 se estabiliza hasta que puede ser absorbida por los tejidos y dirigida a los lisosomas, pero, debido al rápido aclaramiento del miglustat, la hidrólisis del glucógeno mediante ATB200 dentro de los lisosomas no se inhibe en demasía por la presencia del miglustat, y la enzima conserva suficiente actividad para ser terapéuticamente útil.

Todas las realizaciones descritas anteriormente se pueden combinar. Esto incluye, en particular, realizaciones relacionadas con:

- 40 la naturaleza de la chaperona farmacológica, por ejemplo, miglustat; y el sitio activo para el cual es específica;
- la dosificación, la vía de administración de la chaperona farmacológica (miglustat) y el tipo de composición farmacéutica que incluye la naturaleza del portador y el uso de composiciones disponibles comercialmente;
- 45 la naturaleza del fármaco, p. ej., el medicamento de proteína terapéutica que puede ser una contraparte de una proteína endógena cuya expresión está reducida o ausente en el sujeto, adecuadamente la  $\alpha$ -glucosidasa ácida humana recombinante, por ejemplo, la  $\alpha$ -glucosidasa ácida humana recombinante expresada en células de ovario de hámster chino (CHO) y que comprende un contenido mayor de unidades de N-glicano que tienen uno o más residuos manosa-6-fosfato en comparación con un contenido de unidades de N-glicano que tienen uno o más residuos manosa-6-fosfato de  $\alpha$ -glucosidasa alfa; y adecuadamente que tiene una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 1, la SEQ ID NO: 2 (o como la codificada por la SEQ ID NO: 2), la SEQ ID NO: 3, la SEQ ID NO: 4 o la SEQ ID NO: 5;

50 el número y tipo de unidades de N-glicano en la  $\alpha$ -glucosidasa ácida humana recombinante, p. ej., N-acetilglucosamina, galactosa, ácido siálico o N-glicanos complejos formados a partir de combinaciones de estos) acoplados a la  $\alpha$ -glucosidasa ácida humana recombinante;

55 el grado de fosforilación de unidades de manosa en la  $\alpha$ -glucosidasa ácida humana recombinante para formar manosa-6-fosfato y/o bis-manosa-6-fosfato;

la dosificación y vía de administración (p. ej., administración intravenosa, especialmente, infusión intravenosa, o administración directa al tejido diana) de la enzima de reemplazo ( $\alpha$ -glucosidasa ácida humana recombinante) y el tipo de formulación que incluye portadores y cantidad terapéuticamente eficaz;

el intervalo de dosificación de la chaperona farmacológica (miglustat) y la  $\alpha$ -glucosidasa ácida humana recombinante; la naturaleza de la respuesta terapéutica y los resultados de la politerapia (p. ej., mejores resultados en comparación con el efecto de cada terapia llevada a cabo individualmente);

5 la pauta de administración de la politerapia, p. ej., administración simultánea del miglustat y la  $\alpha$ -glucosidasa ácida humana recombinante o administración secuencial, por ejemplo, en donde el miglustat se administra antes de la  $\alpha$ -glucosidasa ácida humana recombinante o después de la  $\alpha$ -glucosidasa ácida humana recombinante o dentro de un cierto tiempo antes o después de la administración de la  $\alpha$ -glucosidasa ácida humana recombinante; y la naturaleza del paciente en tratamiento (p. ej. mamífero tal como un ser humano) y la afección que padece el individuo (p. ej., insuficiencia enzimática).

10 Cualquiera de las realizaciones de la lista anterior puede combinarse con una o más de las realizaciones en la lista.

## EJEMPLOS

Otros rasgos de la presente invención resultarán evidentes a partir de los siguientes ejemplos no limitantes que ilustran, a modo de ejemplo, los principios de la invención.

### Ejemplo 1: Limitaciones de los productos de rhGAA Myozyme® y Lumizyme® existentes

15 Para evaluar la capacidad de la rhGAA en Myozyme® y Lumizyme®, los únicos tratamientos aprobados en la actualidad para la enfermedad de Pompe, estas preparaciones de rhGAA se inyectaron en una columna de CIMPR (que se une a rhGAA que tienen grupos M6P) y posteriormente se eluyeron con un gradiente de M6 libre. Las fracciones se recogieron en una placa de 96 pocillos y se sometió a ensayo la actividad de GAA mediante el sustrato 4MU- $\alpha$ -glucosa. Las cantidades relativas de rhGAA unida y no unida se determinaron en función de la actividad de GAA y se informaron como la fracción de enzima total.

Las Figuras 2A-B describen los problemas asociados con las ERT convencionales (Myozyme® y Lumizyme®): 73 % de la rhGAA en Myozyme® (Figura 2B) y 78 % de la rhGAA en Lumizyme® (Figura 2A) no se unieron al CIMPR, ver los picos más hacia la izquierda en cada figura. Solo el 27 % de la rhGAA en Myozyme® y el 22 % de la rhGAA en Lumizyme® contenían M6P que puede ser productivo para dirigirlo al CIMPR en las células musculares.

25 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 donde la mayor parte de la rhGAA no se dirige a las células musculares aumenta el riesgo de reacción alérgica o inducción de inmunidad contra la rhGAA a la que no se dirige.

30 Ejemplo 2: Preparación de células CHO que producen la rhGAA ATB200 que tiene alto contenido de N-glicanos que tienen mono o bis-M6P.

Se transfectaron células CHO con ADN que expresa rhGAA con la posterior selección de los transformantes que producen rhGAA. Una construcción de ADN para transformar células CHO con ADN que codifica rhGAA se muestra en la Figura 3. Se transfectaron células CHO con ADN que expresa rhGAA con la posterior selección de los transformantes que producen rhGAA.

Después de la transfección, las células DG44 CHO (DHFR-) que contenían un gen GAA integrado establemente se seleccionaron con medio deficiente para hipoxantina/timidina (-HT)). La amplificación de la expresión de GAA en estas células se indujo mediante tratamiento con metotrexato (MTX, 500 nM). Se identificaron los concentrados celulares que expresaban altas cantidades de GAA mediante ensayos de actividad enzimática de GAA y se usaron para establecer clones individuales productores de rhGAA. Los clones individuales se generaron sobre placas de medios semisólidos, se recogieron mediante el sistema ClonePix y se transfirieron a placas de 24 pocillos profundos. Los clones individuales se sometieron a ensayo para la actividad enzimática de GAA para identificar clones que expresaban un nivel alto de GAA. Los medios acondicionados para determinar la actividad de GAA usaron un sustrato de 4-MU- $\alpha$ -glucopiranosido  $\alpha$ -glucosidasa. Los clones que produjeron los niveles más altos de GAA según se midieron mediante ensayos enzimáticos de GAA se evaluaron adicionalmente para determinar su viabilidad, capacidad de crecimiento, productividad de GAA, estructura de N-glicano y expresión de proteína estable. Las líneas celulares de CHO, incluida la línea celular de CHO GA-ATB-200, que expresan rhGAA con más N-glicanos con mono-M6P o bis-M6P se aislaron al usar este procedimiento.

### Ejemplo 3: Captura y purificación de rhGAA ATB200

50 Se produjeron múltiples lotes de la rhGAA según la invención en matraces de agitación y en biorreactores de perfusión al usar la línea celular de CHO GA-ATB-200 y se midió la unión a CIMPR. Se observó una unión al receptor CIMPR similar (~70 %) a la que se muestra en la Figura 4B y la Figura 5A para la rhGAA ATB200 purificada a partir de diferentes lotes de producción, lo que indica que la rhGAA ATB200 se puede producir de manera consistente. Como

se muestra en las Figuras 2A, 2B, 4A y 4B, las rhGAA Myozyme® y Lumizyme® exhibieron una unión a CIMPR significativamente menor que la rhGAA ATB200.

#### **Ejemplo 4: Comparación analítica de ATB200 con Lumizyme®**

5 Se usó cromatografía de líquidos con intercambio aniónico débil ("WAX") para fraccionar la rhGAA ATB200 según el fosfato terminal. Se generaron perfiles de elución al eluir la ERT con cantidades decrecientes de sal. Los perfiles se monitorearon mediante UV (A280nm). La rhGAA ATB200 se obtuvo de células CHO y se purificó. La Lumizyme® se obtuvo de una fuente comercial. La Lumizyme® exhibió un pico alto en la parte izquierda de su perfil de elución. La rhGAA ATB200 exhibió cuatro picos prominentes que se eluyeron a la derecha de Lumizyme® (Figura 6). Esto confirma que la rhGAA ATB200 estaba fosforilada en mayor medida que la Lumizyme® dado que esta evaluación es por carga terminal en lugar de afinidad por CIMPR.

#### **Ejemplo 5: Caracterización de oligosacáridos de rhGAA ATB200**

15 Se evaluaron los glicanos de rhGAA ATB200 y Lumizyme® purificados mediante MALDI-TOF para determinar las estructuras de glicanos individuales hallados en cada ERT (Figura 7). Se halló que las muestras de ATB200 contienen cantidades menores de N-glicanos de tipo con alto contenido de manosa no fosforilados que Lumizyme®. El contenido más alto de glicanos con M6P en ATB200 que en Lumizyme®, dirige la rhGAA ATB200 a las células musculares de manera más eficaz. El porcentaje alto de estructuras monofosforiladas y bifosforiladas determinado mediante MALDI concuerda con los perfiles de CIMPR que ilustraron una unión significativamente mayor de ATB200 al receptor CIMPR. El análisis de N-glicano a través de espectrometría de masas MALDI-TOF confirmó que en promedio cada molécula de ATB200 contiene al menos una estructura de N-glicano con bis-M6P natural. Este contenido de N-glicano con bis-M6P más alto en la rhGAA ATB200 se correlaciona directamente con la alta afinidad de unión a CIMPR en los ensayos de unión a placa con receptor de M6P (KD aproximadamente 2-4 nM), Figura 9A.

25 La rhGAA ATB200 también se analizó para determinar los perfiles de N-glicanos específicos para un sitio al usar dos técnicas analíticas de LC-MS/MS diferentes. En el primer análisis, la proteína se desnaturizó, se redujo, se alquiló y se digirió antes del análisis de LC-MS/MS. Durante la desnaturalización y reducción de la proteína, se agregaron 200 µg de muestra de proteína, 5 µL 1 mol/L de tris-HCl (concentración final 50mM), 75 µL 8 mol/L de guanidina HCl (concentración final: 6 M), 1 µL 0,5 mol/L de EDTA (concentración final 5 mM), 2 µL 1 mol/L de DTT (concentración final 20 mM) y agua Milli-Q® a un tubo de 1,5 mL hasta proporcionar un volumen total de 100 µL. La muestra se mezcló e incubó a 56 °C durante 30 minutos en un baño seco. Durante la alquilación, la muestra de proteína desnaturizada y reducida se mezcló con 5 µL 1 mol/L de yodoacetamida (IAM, por sus siglas en inglés, concentración final 50 mM), después se incubó a 10-30 °C en la oscuridad durante 30 minutos. Después de la alquilación, se agregaron 400 µL de acetona preenfriada a la muestra y la mezcla se congeló a -80 °C de refrigeración durante 4 horas. La muestra después se centrifugó durante 5 min a 13000 rpm a 4 °C y se retiró el sobrenadante. Se agregaron 400 µL de acetona preenfriada a los gránulos, que después se centrifugaron durante 5 min a 13000 rpm a 4 °C y se retiró el sobrenadante. La muestra después se secó con aire sobre hielo en la oscuridad para retirar el residuo de acetona. Se agregaron 40 µL de urea 8M y 160 µL de NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> 100 mM a la muestra para disolver la proteína. Durante la digestión con tripsina, se agregaron después 50 µg de la proteína con tampón de digestión con tripsina hasta un volumen final de 100 µL, y se agregaron 5 µL 0,5 mg/mL de tripsina (relación entre proteína y enzima de 20/1 p/p). La disolución se mezcló bien y se incubó durante la noche (16 ± 2 horas) a 37 °C. Se agregaron 2,5 µL de TFA al 20 % (concentración final 0,5 %) para desactivar la reacción. La muestra después se analizó al usar el espectrómetro de masas Thermo Scientific Orbitrap Velos Pro™.

35 En el segundo análisis de LC-MS/MS, la muestra de ATB200 se preparó según un procedimiento de desnaturalización, reducción, alquilación y digestión similar, excepto que se usó ácido yodoacético (IAA, por sus siglas en inglés) como el reactivo de alquilación en lugar de IAM, y después se analizó al usar el espectrómetro de masas Thermo Scientific Orbitrap Fusion Lumos Tribid™.

45 En un tercer análisis de LC-MS/MS, la muestra de ATB200 se preparó según un procedimiento de desnaturalización, reducción, alquilación y digestión similar al usar yodoacetamida (IAM) como el reactivo de alquilación y después se analizó al usar el espectrómetro de masas Thermo Scientific Orbitrap Fusion.

50 Los resultados del primer y segundo análisis se muestran en las Figuras 8B-8H y el resultado del tercer análisis se muestra en la Figura 8A. En las Figuras 8B-8H, los resultados del primer análisis se representan mediante la barra izquierda (gris oscura) y los resultados del segundo análisis se representan mediante la barra derecha (gris clara). En las Figuras 8B-8H, la nomenclatura de símbolos para la representación de glicanos está de conformidad con Varki, A., Cummings, R.D., Esko J.D., et al., Essentials of Glycobiology, 2da edición (2009). En las Figuras 8A-8H, los sitios de glicosilación se exponen con respecto a la SEQ ID NO: 5: N84, N177, N334, N414, N596, N826 y N869. Para la secuencia de aminoácidos de longitud completa de la SEQ ID NO: 1, estos posibles sitios de glicosilación están en las siguientes posiciones: N140, N233, N390, N470, N652, N882 y N925.

55 Como puede observarse a partir de las Figuras 8B-8H, los primeros dos análisis proporcionaron resultados similares, aunque hubo alguna variación entre los resultados. Esta variación puede deberse a varios factores, incluido el instrumento usado y la exhaustividad del análisis de N-glicanos. Por ejemplo, si no se identificaron y/o cuantificaron

5 algunas especies de glicanos fosforilados, entonces el número total de glicanos fosforilados puede estar subrepresentado, y el porcentaje de rhGAA que tiene glicanos fosforilados en dicho sitio puede estar subrepresentado. Como ejemplo adicional, si no se identificaron y/o cuantificaron algunas especies de glicanos no fosforilados, entonces el número total de glicanos no fosforilados puede estar subrepresentado, y el porcentaje de rhGAA que tiene glicanos fosforilados en dicho sitio puede estar sobrerepresentado.

10 La Figura 8A muestra la ocupación del sitio de N-glicosilación de ATB200. Como puede observarse a partir de la Figura 8A, el primer, segundo, tercero, cuarto, quinto y sexto sitios de N-glicosilación están en su mayoría ocupados, con aproximadamente 90 % y hasta aproximadamente 100 % de la enzima ATB200 que tiene un glicano detectado en cada sitio potencial. Sin embargo, el séptimo sitio de N-glicosilación potencial está glicosilado aproximadamente la mitad de las veces.

La Figura 8B muestra el perfil de N-glicosilación del primer sitio, N84. Como se puede observar a partir de la Figura 8B, la principal especie de glicanos es glicanos bis-M6P. Tanto el primero como el segundo análisis detectaron que más del 75 % de ATB200 tenía un glicano bis-M6P en el primer sitio.

15 La Figura 8C muestra el perfil de N-glicosilación del segundo sitio, N177. Como se puede observar a partir de la Figura 8C, la principal especie de glicanos es glicanos mono-M6P y glicanos con alto contenido de manosa no fosforilados. Tanto el primero como el segundo análisis detectaron que más del 40 % de ATB200 tenía un glicano mono-M6P en el segundo sitio.

20 La Figura 8D muestra el perfil de N-glicosilación del tercer sitio, N334. Como se puede observar a partir de la Figura 8D, la principal especie de glicanos es glicanos con alto contenido de manosa no fosforilados, glicanos complejos di, tri y tetra-antenarios y glicanos híbridos. Tanto el primero como el segundo análisis detectaron que más del 20 % de ATB200 tenía un residuo ácido siálico en el tercer sitio.

25 La Figura 8E muestra el perfil de N-glicosilación del cuarto sitio, N414. Como se puede observar a partir de la Figura 8E, la principal especie de glicanos es glicanos bis-M6P y mono-M6P. Tanto el primero como el segundo análisis detectaron que más del 40 % de ATB200 tenía un glicano bis-M6P en el cuarto sitio. Tanto el primero como el segundo análisis también detectaron que más del 25 % de ATB200 tenía un glicano mono-M6P en el cuarto sitio.

La Figura 8F muestra el perfil de N-glicosilación del quinto sitio, N596. Como se puede observar a partir de la Figura 8F, la principal especie de glicanos son glicanos complejos di-antenarios fucosilados. Tanto el primero como el segundo análisis detectaron que más del 70 % de ATB200 tenía un residuo ácido siálico en el quinto sitio.

30 La Figura 8G muestra el perfil de N-glicosilación del sexto sitio, N826. Como se puede observar a partir de la Figura 8G, la principal especie de glicanos son glicanos complejos di, tri y tetra-antenarios. Tanto el primero como el segundo análisis detectaron que más del 80 % de ATB200 tenía un residuo ácido siálico en el sexto sitio.

35 La Figura 8H muestra un resumen de la fosforilación en cada uno de los primeros seis sitios de N-glicosilación potenciales. Como se puede observar a partir de la Figura 8H, tanto el primero como el segundo análisis detectaron niveles de fosforilación altos en los sitios primero, segundo y cuarto. Ambos análisis detectaron que más de 80 % de ATB200 estaba mono o difosforilado en el primer sitio, más de 40 % de ATB200 estaba monofosforilado en el segundo sitio, y más de 80 % de ATB200 estaba mono o difosforilado en el cuarto sitio.

**Ejemplo 6: Caracterización de la afinidad por CIMPR de ATB200**

40 Además de tener un mayor porcentaje de rhGAA que se puede unir al CIMPR, es importante entender la calidad de la interacción. Se determinó la unión de Lumizyme® y rhGAA ATB200 al receptor mediante el uso de un ensayo de unión a placa con CIMPR. A grandes rasgos, se usaron placas recubiertas con CIMPR para capturar GAA. Se aplicaron concentraciones variables de rhGAA al receptor inmovilizado y se retiró por lavado la rhGAA no unida. La cantidad de rhGAA restante se determinó mediante actividad de GAA. Como se muestra en la Figura 9A, la rhGAA ATB200 se unió a CIMPR significativamente mejor que Lumizyme®.

45 La Figura 9B muestra el contenido relativo de glicanos bis-M6P en Lumizyme®, una rhGAA convencional, y ATB200 según la invención. Para Lumizyme® hay en promedio solo 10 % de moléculas que tienen un glicano bisfosforilado. En cambio, en ATB200, cada molécula de rhGAA tiene en promedio al menos un glicano bisfosforilado.

**Ejemplo 7: Los fibroblastos internalizan de manera más eficaz rhGAA ATB200 que Lumizyme®**

50 Se comparó la captación celular relativa de rhGAA ATB200 y Lumizyme® al usar líneas celulares de fibroblastos normales y con Pompe. Las comparaciones implicaron 5-100 nM de rhGAA ATB200 según la invención con 10-500 nM de rhGAA convencional Lumizyme®. Después de una incubación de 16 h, la rhGAA externa se inactivó con base TRIS y las células se lavaron 3 veces con PBS antes de recogerse. La GAA internalizada se midió mediante hidrólisis de 4MU- $\alpha$ -Glucósido y se graficó con respecto a la proteína celular total y los resultados aparecen en las Figuras 10A-B.

También se mostró que la rhGAA ATB200 se internaliza de manera eficaz en células (Figura 10A y 10B), respectivamente, muestran que la rhGAA ATB200 se internaliza en fibroblastos normales y con Pompe y que se internaliza en mayor grado que la rhGAA convencional Lumizyme®. La rhGAA ATB200 satura los receptores celulares con aproximadamente 20 nM, mientras que se necesitan aproximadamente 250 nM de Lumizyme®. La constante de eficacia de captación ( $K_{captación}$ ) extrapolada a partir de estos resultados es 2-3 nm para ATB200 y 56 nM para Lumizyme® como se muestra en la Figura 10C. Estos resultados sugieren que la rhGAA ATB200 es un tratamiento bien dirigido para la enfermedad de Pompe.

**Ejemplo 8: Modelado de farmacocinética poblacional (PK) para ATB200 y miglustat**

Los datos farmacocinéticos para la  $\alpha$ -glucosidasa ácida (ATB200), incluidos los tiempos de muestreo, historial de dosificación y concentraciones plasmáticas de  $\alpha$ -glucosidasa ácida, se obtuvieron a partir de ratones, ratas y monos a los que se administró ATB200 por inyección intravenosa. Los datos farmacocinéticos para miglustat y duvoglustat en plasma y tejido se recogieron a partir de seres humanos o a partir de ratones.

El modelado y las simulaciones se llevaron a cabo al usar Phoenix® NLME™ v1.3. Se construyen modelos de PK compartimentales para evaluar la PK de ATB200 en plasma. Los modelos incluyen:

- Descripción de las relaciones entre concentración plasmática y tiempo;
- Un componente de varianza que caracteriza la variabilidad entre animales y dentro de ellos en parámetros del modelo; y
- Un componente que describe la incertidumbre en el conocimiento sobre componentes del modelo fundamentales.

Los modelos de efectos mixtos no lineales (NLME, por sus siglas en inglés) tienen la forma:

$$C_{p_{ij}} = C(D_i, t_j, \theta_i) + \varepsilon_{ij}$$

$$\theta_i = (\theta_{i1}, \dots, \theta_{im})$$

donde  $C_{p_{ij}}$  es la concentración en el tiempo de recolección  $j^{ésimo}$  ( $t_j$ ) para el animal  $i$ ,  $D_i$  representa el historial de dosificación para el animal  $i$ ,  $\theta_i$  es el vector de los parámetros PK para el animal  $i$  y  $\varepsilon_{ij}$  es el error aleatorio asociado con la concentración  $j^{ésima}$  para el animal  $i$ .

La variabilidad interindividual (BSV, por sus siglas en inglés) en los parámetros se modela como una distribución log-normal:

$$\theta_{in} = \theta_{TVN} \exp(\eta_{in})$$

$$(\eta_1, \dots, \eta_m) \sim MVN(0, \Omega)$$

donde  $\theta_{TVN}$  es el valor típico poblacional para el parámetro PK  $n^{ésimo}$  (p. ej., aclaramiento) y  $\eta_{in}$  es el efecto interanimal aleatorio sobre el parámetro  $n^{ésimo}$  para el animal  $i$ . Los efectos aleatorios  $(\eta_1, \dots, \eta_m)$  se distribuyeron normalmente con media 0 y la varianza estimada  $\omega^2$  incluyó la matriz OMEGA ( $\Omega$ ).

Se asume que la PK es independiente en especies y se amplía según una estrategia de Dedrick generalizada que amplía la disposición según la potencia del peso corporal de un animal:

$$CL_{(p)i} = a_{(p)} BW_i^b$$

$$V_{(p)i} = c_{(p)} BW_i^d$$

donde CL = aclaramiento sistémico, V = volumen de distribución, BW = peso corporal, P = periférico, b y d = exponentes alométricos, y a y c = valores típicos para un BW = 1. En este escenario, el exponente b y d se puede comparar con valores más generalizados aceptados en la literatura (b=0,75 y d =1,0). Se usan BW nominales (0,025, 0,25 y 2,5 kg) en los análisis. La concentración inicial de  $\alpha$ -glucosidasa ácida se modela como la  $C_{inicial} = \text{índice de síntesis de } \alpha\text{-glucosidasa ácida} / CL$  y se puede extrapolar a seres humanos, dado que la  $C_{inicial}$  es específica para la especie, independiente de la concentración de ATB200 y conocida en seres humanos con enfermedad de Pompe. Se determina un modelo base al usar Phoenix® FOCE-ELS, para evaluar si un modelo de 1 o 2 compartimientos es mejor para ajustar los datos. También se extrapolan visualmente las fuentes de variabilidad en la PK de  $\alpha$ -glucosidasa ácida y al buscar el efecto de los diversos efectos relacionados con el tipo natural / la especie / la dosis sobre la PK.

Para ATB200, un modelo de dos compartimientos con eliminación lineal caracteriza de manera adecuada los perfiles de concentración-tiempo de la actividad de  $\alpha$ -glucosidasa ácida para todos los niveles de dosis en todas las especies animales. El modelo incluye un componente alométrico teórico que toma en consideración la diferencia en peso corporal entre las especies de animales en el aclaramiento (CL) y el volumen de distribución (Vc). La bondad de ajuste

de un modelo de PK poblacional para ATB200 se muestra en la Figura 11. Los parámetros de PK poblacional para ATB200 en estudios no clínicos se presentan en la Tabla 1.

Tabla 1:

Parámetro de PK	Valores típicos (error estándar relativo (%))	Variabilidad interindividual (%)
Aclaramiento sistémico (CL; L/h)	0,00957 x (BW/0,25) <sup>0,78</sup> (5,1) (3,2)	21,0
Volumen de distribución central (V <sub>c</sub> ; L)	0,0101 x (BW/0,25) <sup>0,83</sup> (4,3) (1,7)	5,3
Aclaramiento periférico (CL <sub>d</sub> ; L/h)	0,000290 x (BW/0,25) <sup>0,78</sup> (43,2)	NC
Volumen de distribución periférico (V <sub>2</sub> ; L)	0,000653 x (BW/0,25) <sup>0,28</sup> (35,6)	NC
Índice endógeno de síntesis de α-glucosidasa ácida (SYNT; mg/h)	Ratón: 0,00401 (8,1)	NC
	Rata: 0,0203 (13,3)	
	Mono: 0,00518 (16,9)	

BW: peso corporal

- 5 Los perfiles de concentración-tiempo de miglustat (200 mg) en pacientes con enfermedad de Pompe se compara con los obtenidos después de la administración de duvoglustat en voluntarios sanos normales (rango de dosis: 50, 100, 250, 600 y 1000 mg). Los perfiles de concentración en plasma-tiempo normalizados con respecto a la dosis de miglustat y duvoglustat se muestran en la Figura 12. Dado que los perfiles de concentración-tiempo de miglustat en pacientes con enfermedad de Pompe son similares a los observados después de la dosificación de duvoglustat en sujetos sanos en 24 h, los datos de PK recogidos para duvoglustat en tejidos periféricos se usaron como un sustituto para el modelo de exposición a miglustat. Se usó un modelo de dos compartimientos con eliminación lineal para caracterizar los perfiles de concentración-tiempo de duvoglustat en tejidos.

La bondad de ajuste del modelo de PK de duvoglustat se muestra en las Figuras 13A y 13B. Los parámetros de PK del modelo final de duvoglustat en plasma y tejido se muestra en la Tabla 2.

Tabla 2:

Parámetro de PK	Valores típicos (CV%)
Volumen de distribución (V; L)	44,5 (7,41)
Aclaramiento sistémico (CL; L/h)	9,44 (6,99)
Constante de velocidad de absorción (K <sub>a</sub> ; 1/h)	1,10 (14,0)
Volumen de distribución periférico (V <sub>2</sub> ; L)	8,68 (19,39)
Aclaramiento de compartimiento central (CL <sub>2</sub> ; L/h)	0,205 (23,7)
Volumen de distribución intercompartimiento (VQ; L)	61,8 (21,2)
Constante de índice de eliminación (Keo)	0,378 (11,1)

Parámetro de PK	Valores típicos (CV%)
Volumen de distribución intercompartimiento dentro del compartimiento central (VQ2; L)	3390
Aclaramiento de compartimiento periférico (CL3; L/h)	88,0 (7,72)
Aclaramiento intercompartimiento aparente (CLQ; L/h)	40,6 (10,6)
Período de latencia (h)	0,176 (30,7)
Error estándar relativo del compartimiento central	0,477 (6,56)
Error estándar relativo del compartimiento periférico	0,368 (8,19)
CV: coeficiente de variabilidad	

Se construye un modelo de PK poblacional de miglustat en función de la dosificación oral en ratones con *Gaa* inactivado (KO). Los parámetros de PK poblacional de miglustat en ratones *Gaa* KO se presentan en la Tabla 3. La bondad de ajuste se muestra en la Figura 14. El modelo tiene un error aditivo residual de 0,475 ng/mL.

Tabla 3:

Parámetro de PK	Valores típicos (BSV%)
Constante de velocidad de absorción ( $K_a$ ; $h^{-1}$ )	2,09 (4,56)
Aclaramiento sistémico (CL; mL/h)	43,3 (9,61)
Volumen de distribución central ( $V_c$ ; mL)	4,55 (45,1)
Aclaramiento periférico ( $CL_d$ ; mL/h)	4,57 (32,1)
Volumen de distribución periférico ( $V_2$ ; mL)	19,6 (23,3)
BSV: Variabilidad interindividual	

5 **Ejemplo 9:** Modelado de parámetros farmacocinéticos (PK) de  $\alpha$ -glucosidasa ácida recombinante (ATB200) en seres humanos

10 Se usaron modelos farmacocinéticos (Ejemplo 8) para llevar a cabo simulaciones y para predecir los perfiles de concentración-tiempo de la  $\alpha$ -glucosidasa ácida en sujetos humanos con enfermedad de Pompe en etapa avanzada después de la dosificación de ATB200. La función alométrica permitió el enlace del peso corporal con el aclaramiento y el volumen de distribución y, por lo tanto, permitió la predicción de los parámetros PK en un sujeto humano típico con un peso corporal de 70 kg. El modelo se personalizó al incluir un índice endógeno de síntesis de  $\alpha$ -glucosidasa ácida en seres humanos (Umapathysivam K, Hopwood JJ, Meikle PJ. Determination of acid alpha-glucosidase activity in blood spots as a diagnostic test for Pompe disease. Clin Chem. (2001) Aug; 47(8): 1378-83).

15 Se prevé que una única dosis IV de 20 mg/kg de ATB200 en seres humanos durante una infusión de 4 h dé como resultado un perfil de concentración-tiempo presentado en la Figura 15. Los parámetros PK en un ser humano típico de 70 kg y los parámetros de exposición resultantes después de una infusión IV de 20 mg/kg de ATB200 en 4 h se presentan en la Tabla 4.

Tabla 4:

Parámetro farmacocinético	Valor previsto
Aclaramiento sistémico (CL; L/h)	0,768
Volumen de distribución central (V <sub>c</sub> ; L)	1,09
Área bajo la curva, extrapolada hasta el infinito (AUC <sub>0-inf</sub> ; mg·h/L)	1822
Concentración máxima (C <sub>máx</sub> ; mg/L)	423
Tiempo en el que se logra la máxima concentración (T <sub>máx</sub> ; h)	4
Semivida (T <sub>1/2</sub> ; h)	2,17

El aclaramiento sistémico (CL) y el volumen de distribución (V) previstos de ATB200 en un paciente típico de 70 kg son 0,768 L/h y 2,41 L, respectivamente.

5 Según la ficha técnica del producto para Lumizyme® (alglucosidasa alfa), el aclaramiento sistémico de α-glucosidasa ácida en la Semana 52 después de la dosificación repetida de Lumizyme® en pacientes con enfermedad de Pompe en etapa avanzada es 601 mL/h (0,601 L/h) y la semivida de Lumizyme® es de 2,4 h. En función del modelo anterior, se espera que el aclaramiento sistémico de ATB200 en sujetos adultos con enfermedad de Pompe sea aproximadamente 28 % más rápido que el informado para Lumizyme®. Además, el AUC previsto en seres humanos después de una dosis de 20 mg/kg de ATB200 se espera que sea aproximadamente 25 % más bajo (AUC<sub>0-inf</sub>: 1822 mg·h/L) que el AUC informado después de una dosis de 20 mg/kg de Lumizyme® (-2700 µg·h/mL).

**Ejemplo 10: Modelos de exposición-respuesta para la reducción de glucógeno**

15 Se administra α-glucosidasa ácida (ATB200) a ratones con *Gaa* inactivado por vía intravenosa en una dosis de 5, 10 y 20 mg/kg, dosis orales crecientes de miglustat (1, 3 y 10 mg/kg) concomitantemente con la dosis intravenosa de 5 o 10 mg/kg de ATB200 o dosis orales crecientes de miglustat (1, 3, 5, 10, 20 y 30 mg/kg) concomitantemente con la dosis intravenosa de 20 mg/kg de ATB200. Los niveles de glucógeno se miden como se describió anteriormente (Khanna, R, Flanagan, JJ, Feng, J, Soska, R, Frascella, M, Pellegrino, LJ et al. (2012). "The pharmacological chaperone AT2220 increases recombinant human acid α-glucosidase uptake and glycogen reduction in a mouse model of Pompe disease. PLoS One 7(7): e40776). Se calculan las relaciones entre los niveles de glucógeno observados después de cada tratamiento con politerapia y los niveles de glucógeno observados después de la monoterapia (relación de glucógeno). Los resultados se proporcionan en la Tabla 5.

Tabla 5:

Tratamientos		Glucógeno (µg/mg de proteína)				Relación (combinación / monoterapia)
ATB200 (mg/kg)	Miglustat (mg/kg)	Monoterapia	Politerapia		Mediana (N)	
		Mediana del estudio núm. 1 (N)	Mediana del estudio núm. 2 (N)	Mediana del estudio núm. 3 (N)		
5	NC	307 (N=7)	NC	NC	307 (N=7)	NC
10	NC	259 (N=7)	NC	NC	259 (N=7)	NC
20	NC	157 (N=7)	NC	195 (N=14)	181 (N=21)	NC

Tratamientos		Glucógeno ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ de proteína)				Relación (combinación / monoterapia)
ATB200 (mg/kg)	Miglustat (mg/kg)	Monoterapia	Politerapia		Mediana (N)	
		Mediana del estudio núm. 1 (N)	Mediana del estudio núm. 2 (N)	Mediana del estudio núm. 3 (N)		
5	1	NC	323 (N=7)	NC	323 (N=7)	1,05
	3	NC	359 (N=6)	NC	359 (N=6)	1,17
	10	NC	352 (N=7)	NC	352 (N=7)	1,15
10	1	NC	273 (N=7)	NC	273 (N=7)	1,05
	3	NC	252 (N=7)	NC	252 (N=7)	0,973
	10	NC	278 (N=7)	NC	278 (N=7)	1,07
20	1	NC	154 (N=7)	NC	154 (N=7)	0,851
	3	NC	175 (N=7)	NC	175 (N=7)	0,967
	5	NC	NC	163 (N=14)	163 (N=14)	0,900
	10	NC	97 (N=6)	145 (N=13)	118 (N=19)	0,652
	20	NC	NC	122 (N=13)	122 (N=13)	0,674
	30	NC	167 (N=6)	175 (N=14)	170 (N=20)	0,939

Además, las Figuras 15A a 15C muestran los efectos de administrar alglucosidasa alfa (Lumizyme®) y ATB200 sobre el aclaramiento del glucógeno en ratones con *Gaa* inactivado. Se da a los animales dos administraciones de bolo IV (cada dos semanas); los tejidos se recogen dos semanas después de la última dosis y se analizan para determinar la actividad de  $\alpha$ -glucosidasa ácida y el contenido de glucógeno.

- 5 Como se observa a partir de los resultados en la Tabla 5, se halló que ATB200 agota el glucógeno en el tejido en ratones con  $\alpha$ -glucosidasa ácida (*Gaa*) inactivada de manera dependiente de la dosis. La dosis de 20 mg/kg de ATB200 eliminó de manera consistente una proporción mayor de glucógeno almacenado en ratones con *Gaa* inactivado que los niveles de dosis de 5 y 10 mg/kg. Sin embargo, como se observa en las Figuras 15A a 15C, la ATB200 que se administró con 5 mg/kg mostró una reducción similar de glucógeno en el corazón y músculos esqueléticos (cuádriceps y tríceps) de ratón a la de Lumizyme® administrado con 20 mg/kg, mientras que la ATB200 dosificada con 10 y 20 mg/kg mostró una reducción significativamente mejor en los niveles de glucógeno en los músculos esqueléticos que Lumizyme®.

Además, las dosis de 10 y 20 mg/kg de miglustat coadministradas con ATB200 con 20 mg/kg dieron como resultado una reducción en los niveles de glucógeno en ratones con *Gaa* inactivado de 118 y 122 µg/mg de proteína, respectivamente. La dosificación de miglustat con 30 mg/kg causó menos reducción de glucógeno. Sin desear limitarse a la teoría, se cree que con mayores concentraciones de miglustat, la inhibición de α-glucosidasa ácida en los lisosomas puede superar los efectos beneficiosos de la chaperona y reducir, por lo tanto, la degradación de glucógeno en el lisosoma.

Se usan modelos farmacocinéticos (Ejemplo 8) para predecir la exposición a α-glucosidasa ácida y miglustat, con ajuste del tiempo a los valores para los niveles de glucógeno lisosómico en el tejido en la Tabla 5. Se derivan relaciones de exposición en estado estacionario (AUC) (exposición promedio en 24 horas) de miglustat/ATB200 para cada combinación de tratamiento evaluada, se grafican con respecto a la relación de glucógeno correspondiente (Tabla 5) y se ajustan según una función matemática. La curva de exposición-respuesta se muestra en la Figura 17.

Como se observa a partir de los resultados en la Figura 17, la coadministración de dosis de 10 y 20 mg/kg de miglustat con una dosis de 20 mg/kg de ATB200 proporciona buena estabilidad de la actividad de α-glucosidasa ácida en plasma, mientras se maximiza la reducción de glucógeno. Se cree que dosis más bajas de miglustat (1, 3 y 5 mg/kg) dan como resultados una estabilización no óptima de la actividad de α-glucosidasa ácida, mientras que se cree que las dosis más altas de miglustat (30 mg/kg) dan como resultado una inhibición excesiva de la actividad de α-glucosidasa dentro de los lisosomas.

En función de los modelos farmacocinéticos (Ejemplo 8), se espera que la relación de AUC de miglustat/ATB200 observada de 0,01 159 (10 mg/kg de miglustat coadministrados con 20 mg/kg de ATB200) corresponda a una dosis de miglustat de aproximadamente 270 mg coadministrada con 20 mg/kg de ATB200 en un ser humano típico de 70 kg. Las relaciones de AUC de 0,01 y 0,02 corresponderían a dosis de miglustat de 233 y 466 mg, respectivamente, coadministradas con 20 mg/kg de ATB200 en un sujeto típico de 70 kg.

**Ejemplo 11: Modelado de las concentraciones de miglustat/duvoglustat en seres humanos**

Se usaron modelos farmacocinéticos (Ejemplo 8) para predecir la extensión de tiempo en que las concentraciones en plasma o tejido de duvoglustat (un sustituto de miglustat) permanecerían por encima de la  $Cl_{50}$  (la concentración que proporciona el 50 % de la inhibición máxima de la actividad de α-glucosidasa ácida) de miglustat en el plasma y el lisosoma. La inhibición de la actividad de α-glucosidasa ácida se determina mediante métodos descritos anteriormente (Flanagan JJ, Rossi B, Tang K, Wu X, Mascioli K, et al. (2009) "The pharmacological chaperone 1-deoxynojirimycin increases the activity and lysosomal trafficking of multiple mutant forms of acid alpha-glucosidase." Hum Mutat 30: 1683-1692). Se determinó el valor de  $Cl_{50}$  de miglustat en el pH del plasma (pH 7,0) como 170 µg/L, mientras que se determinó el valor de  $Cl_{50}$  en el pH del compartimento lisosómico (pH 5,2) como 377 µg/L.

Los resultados de la predicción del modelo se presentan en la Tabla 6. Los perfiles de concentración-tiempo previstos de miglustat en plasma y lisosomas después de la dosificación repetida se muestran en las Figuras 17 y 18, respectivamente.

Tabla 6:

Dosis de miglustat (mg)	Tiempo > $Cl_{50}$ (h)	
	Plasma (pH 7,0)	Lisosoma (pH 5,2)
100	13,1	0
150	15,0	0
200	16,4	1,19
233	17,2	2,96
250	17,5	3,58
270	17,9	4,15
300	18,4	4,92
466	20,7	8,04

Dosis de miglustat (mg)	Tiempo >CI <sub>50</sub> (h)	
	Plasma (pH 7,0)	Lisosoma (pH 5,2)
600	22,0	9,96
699	22,8	11,2

En función de los resultados presentados en la Tabla 6 y las Figuras 17 y 18, se espera que una dosis de 260 mg de miglustat se una y estabilice ATB200 en el plasma hasta 18 horas, mientras que se espera que la inhibición de la actividad de  $\alpha$ -glucosidasa ácida en el lisosoma durante solo 4 horas.

#### **Ejemplo 12: Fisiología y morfología muscular en ratones con Gaa inactivado**

5 Se da a ratones con *Gaa* inactivado dos administraciones por bolo IV de  $\alpha$ -glucosidasa ácida humana recombinante (alglucosidasa alfa o ATB200) con 20 mg/kg cada dos semanas. El miglustat se administra por vía oral en dosificaciones de 10 mg/kg a un subconjunto de animales tratados con ATB200 30 min antes de la administración de ATB200. Los ratones testigo se tratan solo con vehículo. Se recoge tejido del sóleo, cuádriceps y diafragma dos semanas después de la última dosis de  $\alpha$ -glucosidasa ácida humana recombinante. El tejido del sóleo y el diafragma se analizan para determinar los niveles de glucógeno al teñir con reactivo ácido peryódico de Schiff (PAS), y la proliferación de lisosomas, al medir los niveles del marcador proteína de membrana asociada a lisosoma (LAMP1), que aumenta en la enfermedad de Pompe. Las secciones semidelgadas de músculo de cuádriceps embebidas en resina epoxi (Epon) se tiñen con azul de metileno y se observan mediante microscopía electrónica (1000x) para determinar la extensión de la presencia de vacuolas. Las muestras de músculo de cuádriceps se analizan inmunohistoquímicamente para determinar los niveles de los marcadores de autofagia conjugado de proteína 1A/1B asociada a microtúbulo-fosfatidiletanolamina 3 de cadena ligera (LC3A II) y p62, el transportador de glucosa dependiente de insulina GLUT4 y el transportador de glucosa independiente de insulina GLUT1.

En un estudio similar, se da a ratones con *Gaa* inactivado cuatro administraciones por bolo IV de  $\alpha$ -glucosidasa ácida humana recombinante (alglucosidasa alfa o ATB200) con 20 mg/kg cada dos semanas. El miglustat se administra por vía oral en dosificaciones de 10 mg/kg a un subconjunto de animales tratados con ATB200 30 min antes de la administración de ATB200. Los ratones testigo se tratan solo con vehículo. El tejido de músculo cardíaco se recoge dos semanas después de la última dosis de  $\alpha$ -glucosidasa ácida humana recombinante y se analiza para determinar los niveles de glucógeno al teñir con reactivo ácido peryódico de Schiff (PAS), y la proliferación de lisosomas, al medir los niveles de LAMP1.

25 Como se observa en la Figura 20, la administración de ATB200 mostró una reducción en la proliferación de lisosomas en tejido del corazón, diafragma y músculo esquelético (sóleo) en comparación con el tratamiento convencional con alglucosidasa alfa, y la coadministración de miglustat con ATB200 mostró una reducción adicional significativa en la proliferación de lisosomas, próxima a los niveles observados en ratones naturales (WT). Además, como se observa en la Figura 21, la administración de ATB200 mostró una reducción en los niveles de glucógeno punteados en tejido del corazón y músculo esquelético (sóleo) en comparación con el tratamiento convencional con alglucosidasa alfa, y la coadministración de miglustat con ATB200 mostró una reducción adicional significativa, nuevamente próxima a los niveles observados en ratones naturales (WT).

35 Asimismo, como se observa en la Figura 22, la coadministración de miglustat con ATB200 redujo significativamente el número de vacuolas en la fibra muscular en el cuádriceps de ratones con *Gaa* inactivado en comparación con ratones sin tratar y ratones tratados con alglucosidasa alfa. Como se observa en la Figura 23, los niveles de LC3 II y p62 aumentan en ratones con *Gaa* inactivado en comparación con ratones naturales, pero se redujeron significativamente después del tratamiento con ATB200 y miglustat, lo que indica que el aumento en la autofagia asociado con la deficiencia de  $\alpha$ -glucosidasa ácida se reduce después de la coadministración de ATB200 y miglustat. Además, los niveles del transportador de glucosa dependiente de insulina GLUT4 y el transportador de glucosa independiente de insulina GLUT1 aumentan en ratones con *Gaa* inactivado en comparación con ratones naturales, pero nuevamente, se reducen significativamente después del tratamiento con ATB200 y miglustat. Los niveles de GLUT4 y GLUT1 elevados asociados con la deficiencia de  $\alpha$ -glucosidasa ácida pueden contribuir a aumentar la captación de glucosa en las fibras musculares y aumentar la síntesis de glucógeno basalmente y después de la ingesta de alimentos. Por lo tanto, se halló que el tratamiento por combinación con ATB200 y miglustat mejora la morfología y fisiología del músculo esquelético en un modelo de ratón de la enfermedad de Pompe.

#### **Ejemplo 13: Toxicidad de ATB200 coadministrado con miglustat en monos cangrejeros**

Se asignaron monos cangrejeros sin tratamiento de origen camboyano a grupos de dosis como se indican en la Tabla 7. Los animales se aclimataron a la sala del estudio durante 18 (hembras) a 19 (hombres) días. En el día final de la aclimatación, los animales pesaban entre 2,243 kg y 5,413 kg y tenían 2 a 3 años.

Tabla 7:

Grupo	Artículo de prueba	Vía	Nivel de dosis (mg/kg)	Conc. de dosis (mg/mL)	Número de animales (machos/hembras)	Necropsia el Día 99 (machos/hembras)
1	Testigo (tampón de formulación)	Infusión IV	0	0	4/4	4/4
2	Miglustat	NG	25	2,5	4/4	4/4
	ATB200	Infusión IV	50	5		
3	Miglustat	NG	175	17,5	4/4	4/4
	ATB200	Infusión IV	100	10		
4	Miglustat	NG	175	17,5	4/4	4/4
5	ATB200	Infusión IV	100	10	4/4	4/4

NG: nasogástrica

- Se seleccionaron los niveles de dosis de prueba, en función de estudios anteriores en primates no humanos, para proporcionar exposiciones (AUC) semejantes o ligeramente mayores (para el grupo con 25 mg/kg de miglustat y 50 mg/kg de ATB200) o aproximadamente 10 y 3 veces mayores que (para los grupos con 175 mg/kg de miglustat y/o 100 mg/kg de ATB200) las AUC clínicas esperadas en seres humanos a los que se administró una dosis de 260 mg de miglustat y 20 mg/kg de ATB200 como se previeron a partir de los modelos farmacocinéticos del Ejemplo 8 (aproximadamente 20,9 hr·µg/mL y aproximadamente 1822 (hr·µg/mL), respectivamente). En estudios previos en primates no humanos, se halló que una dosis IV de 100 mg/kg de ATB200 dio como resultado un AUC de 5330 hr·µg/mL, y se extrapoló una dosis oral de 175 mg/kg de miglustat para dar como resultado un AUC de 196 (hr·µg/mL).
- La ATB200 se formula en tampón de fosfato de sodio 25 mM, a pH 6 que contiene 2,92 mg/mL de cloruro de sodio, 20 mg/mL de manitol y 0,5 mg/mL de polisorbato 80 (tampón de formulación). El artículo de prueba (ATB200 o miglustat) y el artículo testigo/vehículo (tampón de formulación) se administraron una vez cada dos semanas durante 13 semanas, comenzando el Día 1 y terminando el Día 85. La ATB200 y el artículo testigo/vehículo se administraron mediante una infusión intravenosa (IV) de 2 horas (±10 minutos) con 0 mg/kg (Grupo 1, artículo testigo), 50 mg/kg (Grupo 2) o 100 mg/kg (Grupos 3 y 5). El miglustat se administró nasogástricamente en agua estéril para inyección, USP, con 25 mg/kg (Grupo 2) o 175 mg/kg (Grupos 3 y 4), 30 minutos (±2 minutos) antes del inicio de la infusión de ATB200, cuando se proporciona en combinación. El volumen de dosificación en todos los grupos fue de 10 mL/kg.
- Los parámetros evaluados durante la fase en vida del estudio incluyeron pesos corporales, consumo de alimentos, observaciones clínicas, observaciones clínicas detalladas, exploraciones físicas, electrocardiografía, evaluaciones oftálmicas, patología clínica (hematología, coagulación, química sérica), evaluación de anticuerpo anti-fármaco (ADA), evaluación de ADA neutralizante, análisis de orina y toxicocinética en plasma (TK) para la actividad de miglustat y ATB200 y la proteína total. La necropsia terminal de los animales se llevó a cabo el Día 99 (14 días después de la última administración de dosis). En la necropsia, se registraron observaciones macroscópicas y los pesos de los órganos, y se recogieron tejidos para el examen microscópico.
- Todos los animales sobrevivieron hasta el sacrificio programado y no hubo cambios atribuibles a la administración de ATB200, miglustat o a la coadministración de ATB200 y miglustat durante las exploraciones físicas ni durante la evaluación del consumo de alimentos, las observaciones clínicas, las observaciones clínicas detalladas, los pesos corporales, los parámetros de oftalmología o de ECG. Además, tampoco hubo cambios relacionados con ATB200, miglustat, o ATB200/miglustat en el análisis de orina, la química sérica, los parámetros de hematología ni coagulación, ni durante la evaluación de las observaciones macroscópicas, los pesos de los órganos o la histopatología.

*Anticuerpo anti-fármaco total (ADA) y anticuerpo neutralizante (NAb)*

Los niveles de anticuerpo anti-fármaco total (ADA) y anticuerpo neutralizante (NAb) se miden en el plasma. Se recogieron muestras de sangre (aproximadamente 1,6 mL) en tubos de K<sub>2</sub>EDTA de todos los animales una vez durante la aclimatación, previo a la dosis (antes de la administración de miglustat) y en los Días 1, 85 y 99. Las muestras se mantuvieron sobre hielo húmedo hasta su procesamiento. El plasma se obtuvo mediante centrifugación a 2 °C a 8 °C y se transfirieron alícuotas (aproximadamente 0,2 mL) a viales de polipropileno, y se almacenaron congeladas a -60 °C a -86 °C dentro la hora siguiente a la recolección de la sangre. El análisis de las muestras para ADA se llevó a cabo en muestras recogidas de animales en los Grupos 1, 2, 3, y 5 (las muestras de los que solo recibieron miglustat no se analizaron). El análisis de los anticuerpos neutralizante se llevó a cabo al usar un ensayo enzimático con el sustrato fluorógeno 4-metilumbeliferil- $\alpha$ -D-glucopiranosido (4MU-Glc).

10 Todos los animales en los Grupos de dosis de ATB200 (Grupos 2, 3, y 5) fueron positivos para el anticuerpo anti-fármaco (ADA) en los Días 85 y 99 (100 % de incidencia). Los valores variaron de 25600 a 409600 el Día 85 y de 51200 a 819200 el Día 99. No hubo ninguna tendencia obvia de aumento de los valores con el aumento del nivel de dosis de ATB200. Cinco de 8 animales fueron positivos para el anticuerpo neutralizante (NAb) en el Grupo 2 (50 mg/kg de ATB200 en combinación con 25 mg/kg de miglustat) en los Días 85 y 99. Dos de 8 fueron positivos para NAb el Día 85 en el Grupo 3 (100 mg/kg de ATB200 en combinación con 175 mg/kg de miglustat) y 4 de 8 fueron positivos el Día 99. Dos de 8 fueron positivos para NAb el Día 85 en el Grupo 5 (100 mg/kg de ATB200 en monoterapia) y 3 de 8 fueron positivos el Día 99. No hubo ningún efecto obvio de ADA en la exposición a ATB200 u otros parámetros de TK.

#### *Toxicocinética de ATB200*

20 La toxicocinética de ATB200 se midió en muestras de sangre recogidas en tubos de K<sub>2</sub>EDTA de animales en los Días 1 y 85 en los siguientes puntos de tiempo:

25 Para los Grupos 1, 2, 3 y 5: Previo a la dosis (antes de la administración de miglustat); 1 hora desde el inicio de la infusión; 2 horas desde el inicio de la infusión; 2,5 horas desde el inicio de la infusión; 3 horas desde el inicio de la infusión; 4 horas desde el inicio de la infusión; 6 horas desde el inicio de la infusión; 12 horas desde el inicio de la infusión; 26 horas desde el inicio de la infusión; 168 horas desde el inicio de la infusión; y 336 horas desde el inicio de la infusión (recogidas antes de la dosificación el Día 15); y

30 Para el Grupo 4: Previo a la dosis (antes de la administración de miglustat); 1,5 horas posadministración de miglustat; 2,5 horas posadministración de miglustat; 3,5 horas posadministración de miglustat; 4,5 horas posadministración de miglustat; 6,5 horas posadministración de miglustat; 12,5 horas posadministración de miglustat; 26,5 horas posadministración de miglustat; 168,5 horas posadministración de miglustat; y 336,5 horas posadministración de miglustat (recogidas antes de la dosificación el Día 15).

35 El plasma se obtuvo mediante centrifugación a 2 °C a 8 °C y se transfirieron alícuotas (aproximadamente 0,1 mL) a viales de polipropileno, y se almacenaron congeladas a -60 °C a -86 °C. El análisis de la actividad de  $\alpha$ -glucosidasa ácida con ATB200 y la proteína total de ATB200 se llevó a cabo en las muestras 2 horas posdosis de los animales del Grupo 1 y de todas las muestras recogidas de los animales en los Grupos 2, 3 y 5. La proteína ATB200 total se midió mediante cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS). Se usaron dos péptidos característicos (TTPTFFPK y VTSEGAGLQLQK) como medida de ATB200. Los resultados de estos dos péptidos fueron consistentes, lo que indica que ATB200 estuvo presente en las muestras de plasma analizadas. La actividad de  $\alpha$ -glucosidasa ácida se sometió a ensayo al usar el sustrato fluorógeno 4-metilumbeliferil- $\alpha$ -D-glucopiranosido (4MU-Glc).

40 El análisis de los datos de toxicocinética (TK) se llevó a cabo en conjuntos de datos auditados/verificados (concentración y tiempo) de animales en los Grupos 2, 3 y 5 al usar el programa informático WinNonlin Phoenix, versión 6.1 (Pharsight Corporation). Se usó análisis no compartimental de los datos de concentración en plasma de sujetos individuales para estimar los parámetros TK para la actividad de  $\alpha$ -glucosidasa ácida y la proteína ATB200 total (en función de los dos péptidos característicos TTPTFFPK y VTSEGAGLQLQK) después de la infusión IV. El nivel de dosis se ingresó como la dosis de ATB200 real en mg, calculado en función del volumen de dosis, el peso corporal y la concentración de dosis media de cada animal individual. El tiempo de inicio de cada dosificación (inicio de la infusión para ATB200) se fijó en cero para todos los perfiles en el régimen de dosificación. Se usaron tiempos de recolección de muestra nominales para todos los análisis. Las áreas bajo las curvas de concentración plasmática y tiempo (AUC<sub>0-t</sub>) generadas para ATB200 (conjuntos de datos de ensayo de proteína total y actividad) se estimaron mediante la regla trapezoidal semilogarítmica. La regresión usada para estimar  $\lambda_z$  se basó en datos de concentración ponderados uniformemente. Los siguientes parámetros se calcularon para cada conjunto de datos de ATB200 (generado a partir de los dos péptidos característicos en el ensayo de ATB200 total y a partir del ensayo de actividad de ATB200):

- $R^2$  -el cuadrado del coeficiente de correlación para la regresión lineal usada para estimar  $\lambda_{z\alpha}$ . Usado cuando se usa un número fijo de puntos para definir la fase terminal (o rango de tiempo específico) del perfil de concentración con respecto al tiempo;
- $R^2$  adj - el cuadrado del coeficiente de correlación para la regresión lineal usada para estimar  $\lambda_z$ , ajustado según el número de puntos usados en la estimación de  $\lambda_{z\beta}$ . Usado cuando el número de puntos usado para definir la fase terminal del perfil de concentración con respecto al tiempo puede ser variable;

ES 2 965 190 T3

- Núm. de puntos  $\lambda_z$  - número de puntos para el análisis de regresión lineal usado para estimar  $\lambda_z$ ;
- $\lambda_{z\alpha}$  - constante de índice de eliminación para los primeros tres puntos de tiempo después de  $t_{m\acute{a}x}$ ;
- $\lambda_{z\beta}$  - constante de índice de eliminación terminal;
- $t_{1/2\alpha}$  - semivida basada en los primeros tres puntos de tiempo después de  $t_{m\acute{a}x}$ ;
- 5 •  $t_{1/2\beta}$  - semivida de eliminación terminal basada en  $\lambda_z$  ( $0,693/\lambda_z$ );
- $t_{m\acute{a}x}$  - tiempo de concentración máxima del analito en plasma;
- $C_{m\acute{a}x}$  - concentración máxima observada del analito en plasma;
- $AUC_{0-t}$  - Área bajo la curva de concentración plasmática y tiempo (AUC) medida desde el tiempo 0 (predosis) hasta el punto de tiempo con la última concentración medible;
- 10 •  $AUC_{0-\infty}$  - AUC extrapolada hasta el tiempo infinito;
- $AUC_{ext}$  - porción de AUC extrapolada hasta el tiempo infinito presentada como % del  $AUC_{0-\infty}$  total;
- $CL_T$  - aclaramiento total (basado en  $\lambda_{z\beta}$ ); basado en una dosis total en mg del peso corporal real;
- $CL_T/F$  - aclaramiento total (basado en  $\lambda_{z\beta}$ ); basado en una dosis total en mg del peso corporal real dividido entre la fracción biodisponible;
- 15 •  $V_{ss}$  - volumen de distribución aparente en equilibrio;
- $V_z$  - volumen de distribución basado en la fase terminal (basado en  $\lambda_{z\beta}$ ); basado en una dosis total en mg del peso corporal real;
- $V_z/F$  - volumen de distribución basado en la fase terminal (basado en  $\lambda_{z\beta}$ ); basado en una dosis total en mg del peso corporal real dividido entre la fracción biodisponible; y
- 20 • Relaciones de acumulación -  $AR_{C_{m\acute{a}x}}$  = Relación de  $C_{m\acute{a}x}$  el Día 85 al Día 1;  $AR_{AUC}$  = Relación de  $AUC_{0-t}$  el Día 85 al Día 1

Las concentraciones de ATB200 y los parámetros de TK fueron similares entre machos y hembras. Las concentraciones en plasma después de una infusión IV de 2 horas de 50 mg/kg de ATB200 en combinación con 25 mg/kg de miglustat se midieron entre 12 y 26 horas posdosis. En el nivel de dosis de 100 mg/kg (con o sin 175 mg/kg de miglustat), las concentraciones de ATB200 se midieron en 26 a 168 horas posdosis. Los parámetros de toxicocinética para una única dosis (Día 1) se muestran en la Tabla 8.

Tabla 8:

Grupo	Tratamiento	Parámetro	Unidades	Ensayo de proteína total		Ensayo de actividad
				TTPTFFPK	VTSEGAGLQLQK	ATB200
2	50 mg/kg de ATB200 + 25 mg/kg de miglustat	$t_{m\acute{a}x}$	h	2,00	2,00	2,06
		$C_{m\acute{a}x}$	$\mu\text{g/mL}$	890	900	495
		$AUC_{0-t}$	$\text{hr}\cdot\mu\text{g/mL}$	3060	3080	1700
		$t_{1/2\alpha}$	h	1,69	1,69	2,01
		$t_{1/2\beta}$	h	1,70	1,71	1,92
		$CL_T$	L/h	0,058	0,058	0,106
		$V_{ss}$	L	0,145	0,144	0,266
3	100 mg/kg de ATB200 + 175 mg/kg de miglustat	$t_{m\acute{a}x}$	h	2,00	2,00	2,25
		$C_{m\acute{a}x}$	$\mu\text{g/mL}$	1960	1980	1150
		$AUC_{0-t}$	$\text{hr}\cdot\mu\text{g/mL}$	10400	10400	6130
		$t_{1/2\alpha}$	h	2,77	2,77	3,07

Grupo	Tratamiento	Parámetro	Unidades	Ensayo de proteína total		Ensayo de actividad
				TTPTFFPK	VTSEGAGLQLQK	de ATB200
5	100 mg/kg de ATB200 monoterapia	$t_{1/2\beta}$	h	2,72	2,70	2,54
		$CL_T$	L/h	0,034	0,034	0,057
		$V_{ss}$	L	0,140	0,140	0,231
		$V_z$	L	0,133	0,133	0,210
		$t_{m\acute{a}x}$	h	1,88	1,88	1,94
		$C_{m\acute{a}x}$	$\mu\text{g/mL}$	1690	1670	1270
		$AUC_{0-t}$	$\text{hr}\cdot\mu\text{g/mL}$	5490	5410	3230
		$t_{1/2\alpha}$	h	1,56	1,55	1,28
		$t_{1/2\beta}$	h	11,1	6,29	1,71
		$CL_T$	L/h	0,105	0,105	0,140
		$V_{ss}$	L	0,171	0,149	0,168
		$V_z$	L	0,729	0,401	0,383

Los parámetros de toxicocinética para la dosificación repetida (Día 85) se muestran en la Tabla 9.

Tabla 9:

Grupo	Tratamiento	Parámetro	Unidades	Ensayo de proteína total		Ensayo de actividad
				TTPTFFPK	VTSEGAGLQLQK	de ATB200
2	50 mg/kg de ATB200 + 25 mg/kg de miglustat	$t_{m\acute{a}x}$	h	2,00	2,00	2,13
		$C_{m\acute{a}x}$	$\mu\text{g/mL}$	927	921	586
		$AUC_{0-t}$	$\text{hr}\cdot\mu\text{g/mL}$	3700	3700	2390
		$t_{1/2\alpha}$	h	1,98	1,95	2,35
		$t_{1/2\beta}$	h	2,38	2,40	2,31
		$CL_T$	L/h	0,049	0,049	0,076
		$V_{ss}$	L	0,147	0,147	0,223
		$V_z$	L	0,168	0,168	0,254

Grupo	Tratamiento	Parámetro	Unidades	Ensayo de proteína total		Ensayo de actividad de
				TTPTFFPK	VTSEGAGLQLQK	ATB200
3	100 mg/kg de ATB200 + 175 mg/kg de miglustat	$t_{m\acute{a}x}$	h	2,13	2,19	2,06
		$C_{m\acute{a}x}$	$\mu\text{g/mL}$	2270	2270	1600
		$AUC_{0-t}$	$\text{hr}\cdot\mu\text{g/mL}$	13900	13800	9240
		$t_{1/2\alpha}$	h	3,62	3,72	3,34
		$t_{1/2\beta}$	h	4,83	4,83	2,90
		$CL_T$	L/h	0,027	0,027	0,040
		$V_{ss}$	L	0,140	0,140	0,186
5	100 mg/kg de ATB200 monoterapia	$t_{m\acute{a}x}$	h	2,13	2,13	2,00
		$C_{m\acute{a}x}$	$\mu\text{g/mL}$	2020	2010	1510
		$AUC_{0-t}$	$\text{hr}\cdot\mu\text{g/mL}$	7830	7790	4890
		$t_{1/2\alpha}$	h	1,93	1,88	1,44
		$t_{1/2\beta}$	h	6,62	2,63	2,03
		$CL_T$	L/h	0,045	0,045	0,070
		$V_{ss}$	L	0,143	0,127	0,159
	$V_z$	L	0,396	0,170	0,205	

El tiempo hasta la concentración plasmática máxima de ATB200 ( $t_{m\acute{a}x}$ ) fue aproximadamente 2 horas posdosis en los tres grupos de dosis. El Día 1 y el Día 85 las concentraciones en plasma de ATB200 y los parámetros TK, según se midieron con el ensayo de proteína ATB200 total, fueron consistentes entre los dos péptidos característicos evaluados, TTPTFFPK y VTSEGAGLQLQK. La exposición, según se midió mediante  $C_{m\acute{a}x}$  y  $AUC_{0-t}$ , fue relativamente más baja cuando se midió mediante el ensayo de actividad de  $\alpha$ -glucosidasa ácida. Esto es esperable, dado que el ensayo de proteína total mide la concentración de la enzima activa e inactiva, mientras que el ensayo de actividad de  $\alpha$ -glucosidasa ácida mide la concentración de la enzima activa solamente. La exposición a ATB200 aumentó con la dosis entre los niveles de dosis de 50 y 100 mg/kg. La  $t_{1/2\alpha}$  inicial media el Día 1 (machos y hembras combinadas) basada en los primeros tres puntos de tiempo después de la  $t_{m\acute{a}x}$  varió de 1,28 a 3,07 horas. La semivida terminal media el Día 1 ( $t_{1/2\beta}$ ) varió de 1,70 a 11,1 horas (los valores de  $t_{1/2\beta}$  más prolongados tuvieron la influencia de los animales que tenían concentraciones medibles hasta 168 horas posdosis). Se observó un intervalo de valores similares después de la dosis del Día 85. Se observó escasa a nula acumulación con la administración repetida, una vez cada dos semanas. La adición de 175 mg/kg de miglustat a la dosis de 100 mg/kg de ATB200 preció disminuir el aclaramiento de ATB200 y aumentar la exposición en plasma aproximadamente 2 veces, con respecto a la monoterapia con 100 mg/kg de ATB200.

Dado que no se identificaron cambios adversos relacionados con el artículo de prueba, el nivel sin efecto adverso observado (NOAEL, por sus siglas en inglés) para ATB200 en monos cangrejeros cuando se proporciona una vez cada dos semanas durante 13 semanas mediante una infusión de 2 horas, con o sin administración con miglustat, fue de 100 mg/kg/infusión, la dosificación más alta evaluada. En este nivel de dosis, la  $AUC_{0-t}$  y la  $C_{m\acute{a}x}$  (proteína total) medias promediadas por sexo el Día 85 fueron 7830 (TTPTFFPK) y 7790 (VTSEGAGLQLQK)  $\text{hr}\cdot\mu\text{g/mL}$  y 2020

(TTPTFFPK) o 2010 (VTSEGAGLQLQK)  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente, para ATB200 sola y 13900 (TTPTFFPK) o 13800 (VTSEGAGLQLQK) ( $\text{hr}\cdot\mu\text{g/mL}$ ) y 2270 (ambos péptidos) ( $\mu\text{g/mL}$ ), respectivamente, en combinación con 175 mg/kg de Miglustat.

*Toxicocinética de miglustat*

5 La toxicocinética de miglustat se midió en muestras de sangre recogidas en tubos de  $\text{K}_2\text{EDTA}$  de animales en los Días 1 y 85 en los siguientes puntos de tiempo:

10 Para los Grupos 1, 2, 3 y 5: Previo a la dosis (antes de la administración de miglustat); 15 minutos después de la administración de miglustat; 0 hora (antes del inicio de la infusión); 0,5 horas desde el inicio de la infusión; 1 hora desde el inicio de la infusión; 2 horas desde el inicio de la infusión; 4 horas desde el inicio de la infusión; 6 horas desde el inicio de la infusión; 12 horas desde el inicio de la infusión; 26 horas desde el inicio de la infusión; 50 horas desde el inicio de la infusión; y 74 horas desde el inicio de la infusión; y

15 Para el Grupo 4: Previo a la dosis (antes de la administración de miglustat); 15 minutos posadministración de miglustat; 30 minutos posadministración de miglustat; 1 hora posadministración de miglustat; 1,5 horas posadministración de miglustat; 2,5 horas posadministración de miglustat; 4,5 horas posadministración de miglustat; 6,5 horas posadministración de miglustat; 12,5 horas posadministración de miglustat; 26,5 horas posadministración de miglustat; 50,5 horas posadministración de miglustat; y 74,5 horas posadministración de miglustat.

20 El plasma se obtuvo mediante centrifugación a  $2^\circ\text{C}$  a  $8^\circ\text{C}$  y se transfirieron alícuotas (aproximadamente 0,2 mL) a viales de polipropileno, y se almacenaron congeladas a  $-60^\circ\text{C}$  a  $-86^\circ\text{C}$ . El análisis de la concentración de miglustat se llevó a cabo al usar un método de LC-MS/MS análogo al descrito para el análisis de la concentración de duvoglustat por Richie Khanna, Allan C. Powe Jr., Yi Lun, Rebecca Soska, Jessie Feng, Rohini Dhulipala, Michelle Frascella, Anadina Garcia, Lee J. Pellegrino, Su Xu, Nastry Brignol, Matthew J. Toth, Hung V. Do, David J. Lockhart, Brandon A. Wustman, Kenneth J. Valenzano. "The Pharmacological Chaperone AT2220 Increases the Specific Activity and Lysosomal Delivery of Mutant Acid Alpha-Glucosidase, and Promotes Glycogen Reduction in Transgenic Mouse Model of Pompe Disease". PLOS ONE (1° de julio de 2014) 9(7): e102092.

25 El análisis de los datos de toxicocinética (TK) para miglustat se llevó a cabo en conjuntos de datos auditados/verificados (concentración y tiempo) de animales en los Grupos 2, 3 y 4 al usar el programa informático WinNonlin Phoenix®, versión 6.1 (Pharsight Corporation). Se usó análisis no compartimental de los datos de concentración en plasma individuales para estimar los parámetros TK. Los parámetros TK para miglustat se estimaron mediante la regla trapezoidal semilogarítmica. La regresión usada para estimar  $\lambda_z$  se basó en datos de concentración ponderados uniformemente. Se calcularon los siguientes parámetros:

- $R^2$  adj - el cuadrado del coeficiente de correlación para la regresión lineal usada para estimar  $\lambda_z$ , ajustado según el número de puntos usados en la estimación de  $\lambda_z$ . Usado cuando el número de puntos usado para definir la fase terminal del perfil de concentración con respecto al tiempo puede ser variable;
- Núm. de puntos  $\lambda_z$  - número de puntos para el análisis de regresión lineal usado para estimar  $\lambda_z$ ;
- 35 •  $\lambda_z$  - la constante de índice de eliminación terminal;
- $t_{1/2}$  - semivida de eliminación terminal basada en  $\lambda_z$  ( $0,693/\lambda_z$ );
- $t_{\text{máx}}$  - tiempo de concentración máxima del analito en plasma;
- $C_{\text{máx}}$  - concentración máxima observada del analito en plasma;
- $\text{AUC}_{0-t}$  - Área bajo la curva de concentración plasmática y tiempo (AUC) medida desde el tiempo 0 (predosis) hasta el punto de tiempo con la última concentración medible;
- 40 •  $\text{AUC}_{0-\infty}$  - AUC extrapolada hasta el tiempo infinito;
- $\text{AUC}_{\text{ext}}$  - porción de AUC extrapolada hasta el tiempo infinito presentada como % del  $\text{AUC}_{0-\infty}$  total;
- $\text{CL}_T/F$  - aclaramiento total dividido entre la fracción biodisponible basado en la dosis total en mg de peso corporal real;
- 45 •  $V_z/F$  - volumen de distribución basado en la fase terminal dividido entre la fracción biodisponible basado en la dosis total en mg de peso corporal real;
- Relaciones de acumulación -  $\text{AR}_{C_{\text{máx}}} = \text{Relación de } C_{\text{máx}} \text{ el Día 85 al Día 1}$ ; y  $\text{AR}_{\text{AUC}} = \text{Relación de } \text{AUC}_{0-t} \text{ el Día 85 al Día 1}$

50 No hubo un efecto consistente del sexo sobre los parámetros TK para miglustat. Las concentraciones en plasma de miglustat después de una administración nasogástrica (NG) de 25 mg/kg en combinación con 50 mg/kg de ATB200, o una administración NG de 175 mg/kg (con o sin 100 mg/kg de ATB200), fueron mediables hasta 74,5 horas (el último punto de tiempo medido). Los parámetros de toxicocinética para una única dosis (Día 1) y para la dosificación repetida (Día 85) se muestran en la Tabla 10.

Tabla 10:

Grupo	Tratamiento	Parámetro	Unidades	Ensayo de miglustat	
				Día 1	Día 85
2	50 mg/kg de ATB200 + 25 mg/kg de miglustat	$t_{m\acute{a}x}$	h	2,06	2,88
		$C_{m\acute{a}x}$	ng/mL	7430	7510
		$AUC_{0-t}$	hr·ng/mL	47300	49100
		$t_{1/2}$	h	7,44	8,23
		$CL_T/F$	L/h	1,92	1,99
		$V_z/F$	L	20,5	23,3
3	100 mg/kg de ATB200 + 175 mg/kg de miglustat	$t_{m\acute{a}x}$	h	2,69	3,56
		$C_{m\acute{a}x}$	ng/mL	20400	22000
		$AUC_{0-t}$	hr·ng/mL	182000	216000
		$t_{1/2}$	h	6,85	7,86
		$CL_T/F$	L/h	3,22	3,62
		$V_z/F$	L	32,3	39,1
4	175 mg/kg de miglustat monoterapia	$t_{m\acute{a}x}$	h	3,00	4,13
		$C_{m\acute{a}x}$	ng/mL	16400	14700
		$AUC_{0-t}$	hr·ng/mL	173000	204000
		$t_{1/2}$	h	6,86	6,66
		$CL_T/F$	L/h	3,67	3,49
		$V_z/F$	L	35,9	33,8

La  $t_{m\acute{a}x}$  varió de aproximadamente 2 a 4 horas posdosis. La exposición a miglustat aumentó con la dosis entre los niveles de dosis de 25 y 175 mg/kg. La  $t_{1/2}$  media (machos y hembras combinados) fue consistente en los Días 1 y 85 y varió de 6,66 a 8,23 horas. Se observó escasa a nula acumulación con la administración NG repetida una vez cada dos semanas. No hubo ningún efecto observable de la coadministración con ATB200 sobre la exposición global de miglustat (es decir,  $AUC_{0-t}$ ) ni sobre los parámetros TK.

Dado que no se identificaron cambios adversos relacionados con el artículo de prueba, el nivel sin efecto adverso observado (NOAEL) para miglustat en monos cangrejeros cuando se proporciona una vez cada dos semanas durante 13 semanas nasogástricamente, con o sin administración con ATB200, fue de 175 mg/kg/dosis, la dosificación más alta evaluada. En este nivel de dosis, la  $AUC_{0-t}$  y la  $C_{m\acute{a}x}$  medias promediadas por sexo el Día 85 fueron 204000 hr·ng/mL y 14700 ng/mL, respectivamente, para miglustat solo y 216000 hr·ng/mL y 22000 ng/mL, respectivamente, en combinación con 100 mg/kg de ATB200.

**Ejemplo 14:** Protocolo para el estudio clínico de  $\alpha$ -glucosidasa ácida recombinante (ATB200) administrada sola y coadministrada con miglustat

*Diseño del estudio:*

Este es un estudio abierto, con secuencia fija, de dosis ascendente, realizado por primera vez en seres humanos para evaluar la seguridad, tolerabilidad y farmacocinética (PK) de la  $\alpha$ -glucosidasa ácida recombinante (ATB200, polvo liofilizado reconstituido con agua estéril para inyección y diluido con cloruro de sodio al 0,9 % para inyección) intravenosa (IV) sola y cuando se coadministra con miglustat oral (cápsulas de gelatina duras, 65 mg). El estudio se llevará a cabo en 2 fases. En la Fase 1, se evaluarán la seguridad, tolerabilidad y PK después de dosis ascendentes únicas secuenciales de ATB200, administradas cada 2 semanas como una infusión intravenosa durante aproximadamente 4 horas, en 3 períodos de dosificación con 5, 10 y 20 mg/kg. En la Fase 2, se evaluarán la seguridad, tolerabilidad y PK después de combinaciones de dosis ascendentes únicas y múltiples: 20 mg/kg de ATB200 coadministrados cada 2 semanas con 130 mg de miglustat (dos cápsulas de 65 mg), tomadas por vía oral 1 hora antes de una infusión intravenosa durante aproximadamente 4 horas de ATB200, durante 3 dosis y posteriormente 20 mg/kg de ATB200 coadministrados con 260 mg de miglustat (cuatro cápsulas de 65 mg), tomadas por vía oral 1 hora antes de una infusión intravenosa durante aproximadamente 4 horas de ATB200, durante 3 dosis.

En la Fase 1 se inscribirán doce sujetos con experiencia en terapia de reemplazo enzimático (ERT) con enfermedad de Pompe (aproximadamente 6 ambulatorios y 6 no ambulatorios). Estos mismos sujetos continuarán el estudio en la Fase 2. Al menos 4 sujetos ambulatorios se inscribirán y dosificarán antes de que se inscriban los sujetos no ambulatorios. Los sujetos con experiencia en ERT (ambulatorios) se definen como aquellos que se han sometido a ERT durante 2 a 6 años antes de la inscripción, son capaces de caminar al menos 200 metros en la prueba de marcha de seis minutos (6MWT) y tienen una FVC de 30-80 % del valor normal previsto. Los sujetos con experiencia en ERT (no ambulatorios) se definen como aquellos que son completamente dependientes de una silla de ruedas, incapaces de caminar sin asistencia y que se han sometido a ERT durante  $\geq 2$  años antes de la inscripción. La asignación del tratamiento se muestra en la Tabla 11.

Tabla 11:

Número de sujetos	Población: Con experiencia en ERT	Fase 1			Fase 2	
		Dosis única en período 1	Dosis única en período 2	Dosis única en período 3	Coadministración con dosis múltiple en período 4	Coadministración con dosis múltiple en período 5
12	~6 ambulatorios, ~6 no ambulatorios	5 mg/kg de ATB200	10 mg/kg de ATB200	20 mg/kg de ATB200	20 mg/kg de ATB200 + 130 mg de miglustat	20 mg/kg de ATB200 + 260 mg de miglustat

ERT= Terapia de reemplazo enzimático.

Se solicitará a los sujetos que ayunen al menos 2 horas antes y 2 horas después de la administración de miglustat oral. La infusión IV de ATB200 debe comenzar 1 hora después de la administración oral de miglustat.

*Procedimientos del estudio*

El estudio consiste en la Selección, el Inicio, la Fase 1 (3 períodos, secuencia fija, dosis única ascendente de ATB200 sola), y la Fase 2 (2 períodos, secuencia fija, múltiples dosis de 20 mg/kg de ATB200 coadministradas con múltiples dosis ascendentes de miglustat).

*Selección:*

Todos los sujetos proporcionarán un consentimiento informado y se someterán a la revisión de los criterios de elegibilidad. Las evaluaciones de todos los sujetos incluyen antecedentes médicos que incluyen reacciones asociadas a la infusión (IAR, por sus siglas en inglés) previas y antecedentes de caídas; revisión de medicamentos anteriores y concomitantes y terapias sin fármacos; constantes vitales (frecuencia cardíaca [HR, por sus siglas en inglés], frecuencia respiratoria [RR, por sus siglas en inglés], presión sanguínea [BP, por sus siglas en inglés] y temperatura); altura; peso; exploración física exhaustiva (PE, por sus siglas en inglés); electrocardiograma de 12 derivaciones (ECG); evaluaciones en laboratorio de la seguridad clínica (química sérica, hematología y análisis de orina); prueba de embarazo por orina; muestra de orina para hexosa tetrasacárido (Hex4); y genotipificación de GAA (para sujetos que no pudieron proporcionar el informe de genotipificación de GAA en la selección). También se obtendrá una muestra de sangre para la evaluación exploratoria de la inmunogenicidad (anticuerpos totales y neutralizantes, citocinas exploratorias/otros biomarcadores de activación del sistema inmunitario, reactividad cruzada con  $\alpha$ -glucosidasa alfa e inmunoglobulina E [IgE]) si es necesario. Un sujeto que cumple todos los criterios de inclusión y ninguno de los criterios de exclusión se asignará a la Fase 1 como se describe en la Tabla 11.

*Inicio:*

La evaluación de seguridad para todos los sujetos incluye la revisión de los criterios de elegibilidad; antecedentes médicos que incluyen reacciones asociadas a la infusión (IAR) previas y antecedentes de caídas, consulta sobre eventos adversos (AE, por sus siglas en inglés) y AE graves (SAE, por sus siglas en inglés), revisión de medicamentos anteriores y concomitantes y terapias sin fármacos; constantes vitales (HR, RR, BP y temperatura); peso; PE breve; ECG; escala de actividad específica de Pompe con modelo de Rasch (R-PAct); escala de discapacidad de Róterdam; y escala de intensidad de la fatiga; evaluaciones en laboratorio de la seguridad clínica (química sérica, hematología y análisis de orina); prueba de embarazo por orina; evaluaciones farmacodinámicas (PD) (Hex4 y creatinina fosfoquinasa [CPK]); evaluaciones de inmunogenicidad (anticuerpos totales y neutralizantes, reactividad cruzada con alglucosidasa alfa, citocinas exploratorias/otros biomarcadores de activación del sistema inmunitario, reactividad cruzada con alglucosidasa alfa, e IgE si es necesario); pruebas de función pulmonar (PFT, por sus siglas en inglés); pruebas de función motriz; y pruebas de resistencia muscular para todos los sujetos.

*Fase 1, Períodos 1, 2 y 3:*

Esta fase incluirá:

- 15 • Seguridad: revisión de AE, incluidos eventos adversos graves (SAE) e IAR; revisión de los medicamentos concomitantes y terapias sin fármacos; constantes vitales (HR, RR, BP, y temperatura); PE breve; ECG; evaluaciones en laboratorio de la seguridad clínica (química sérica, hematología y análisis de orina); y prueba de embarazo con orina
- PD: Hex4 en orina y CPK en suero
- 20 • Inmunológica: muestras de sangre para determinar los valores de anticuerpo anti- $\alpha$ -glucosidasa ácida recombinante (valores de anticuerpo anti- $\alpha$ -glucosidasa ácida recombinante totales y neutralizantes y reactividad cruzada del anticuerpo con alglucosidasa alfa) y muestras de sangre para la medición de citocinas proinflamatorias y otros biomarcadores de la activación del sistema inmunitario. Si es necesario, también se harán mediciones de IgE.
- Farmacocinética de 24 horas en serie (PK): Durante el Período 1 (Vista 3, Día 1), el Período 2 (Vista 4, Día 15) y el Período 3 (Vista 5, Día 29), se tomarán muestras de sangre para determinar los niveles de actividad de  $\alpha$ -glucosidasa ácida en plasma y las concentraciones de proteína total  $\alpha$ -glucosidasa ácida para todos los sujetos.

*Fase 2, Períodos 4 y 5:*

- 30 • Seguridad: revisión de AE, incluidos SAE e IAR; revisión de los medicamentos concomitantes y terapias sin fármacos; constantes vitales (HR, RR, BP, y temperatura); peso; PE; ECG; evaluaciones en laboratorio de la seguridad clínica (química sérica, hematología y análisis de orina); y prueba de embarazo con orina
- PD: Hex4 en orina y CPK en suero
- Inmunológica: muestras de sangre para determinar los valores de anticuerpo anti- $\alpha$ -glucosidasa ácida recombinante (valores de anticuerpo anti- $\alpha$ -glucosidasa ácida recombinante totales y neutralizantes y reactividad cruzada del anticuerpo con alglucosidasa alfa) y muestras de sangre para la medición de citocinas proinflamatorias y otros biomarcadores de la activación del sistema inmunitario. Si es necesario, también se harán mediciones de IgE.
- 35 • PK de 24 horas en serie: Durante el Período 4 (Vista 6, Día 43 y Visita 8, Día 71) y el Período 5 (Vista 9, Día 85 y Visita 11, Día 113), se tomarán muestras de sangre para determinar los niveles de actividad de  $\alpha$ -glucosidasa ácida en plasma, las concentraciones de proteína total  $\alpha$ -glucosidasa ácida y las concentraciones de miglustat para todos los sujetos.

*Fin de la fase farmacocinética:*

- 40 • Seguridad: revisión de AE, incluidos SAE e IAR; revisión de los medicamentos concomitantes y terapias sin fármacos; constantes vitales (HR, RR, BP, y temperatura); peso; PE; ECG; evaluaciones en laboratorio de la seguridad clínica (química sérica, hematología y análisis de orina); y prueba de embarazo con orina
- PD: Hex4 en orina y CPK en suero
- 45 • Inmunológica: muestras de sangre para determinar los valores de anticuerpo anti- $\alpha$ -glucosidasa ácida recombinante (valores de anticuerpo anti- $\alpha$ -glucosidasa ácida recombinante totales y neutralizantes y reactividad cruzada del anticuerpo con alglucosidasa alfa) y muestras de sangre para la medición de citocinas proinflamatorias y otros biomarcadores de la activación del sistema inmunitario. Si es necesario, también se harán mediciones de IgE.

Los sujetos que abandonen prematuramente el estudio vendrán a una Visita de Interrupción Temprana y se someterán a todas las evaluaciones previstas para la visita de Fin de PK. No se administrará ningún fármaco del estudio. Si cualquiera de los sujetos de vigilancia abandona prematuramente el estudio, dicho sujeto será sustituido por el siguiente sujeto ambulatorio inscrito en el estudio (p. ej., si el Sujeto 1 abandona, el Sujeto 3 [ambulatorio] sustituirá a dicho sujeto como sujeto de vigilancia). Se ofrecerá a los sujetos que completen este estudio y/u otros sujetos que reúnan las condiciones la oportunidad de participar en una un estudio de extensión a largo plazo y se continuará la evaluación de la seguridad y tolerabilidad de ATB200 coadministrada con miglustat. Además, se llevarán a cabo evaluaciones funcionales relevantes para la enfermedad de Pompe en el estudio de extensión en intervalos regulares.

*Monitorización de la seguridad*

El monitor médico y los investigadores monitorizarán la seguridad de manera continua y un Comité de Coordinación de la Seguridad (SSC, por sus siglas en inglés) lo hará de manera periódica.

*Dosificación de vigilancia*

5 Los primeros 2 sujetos ambulatorios en este estudio serán los sujetos de vigilancia para el estudio y serán los primeros 2 sujetos dosificados en cada período del estudio (Períodos 1 a 5). En caso de que un sujeto de vigilancia abandone prematuramente el estudio, será sustituido por otro sujeto ambulatorio. Nota: Al menos 4 sujetos ambulatorios se dosificarán con 5 mg/kg de ATB200 antes de dosificar a cualesquiera sujetos no ambulatorios.

En la Fase 1 (Períodos 1, 2 y 3), se dosificará a los sujetos con dosis únicas ascendentes de ATB200 (5 mg/kg [Período 1], 10 mg/kg [Período 2] y 20 mg/kg [Período 3]).

10 Después de la dosificación de los 2 sujetos de vigilancia para cada período del estudio en la Fase 1, el monitor médico y los investigadores llevarán a cabo una evaluación de los datos de seguridad disponibles (PE, constantes vitales, AE, reacciones a la infusión, ECG, y las pruebas de laboratorio disponibles localmente llevadas a cabo) dentro de las 24 a 48 horas siguientes. El SSC se reunirá para una revisión de la seguridad formal cuando los datos de seguridad del laboratorio central estén disponibles para ambos sujetos de vigilancia en cada nivel de dosis. Si el SSC determina que  
15 no hay cuestiones de seguridad que impidan la dosificación en la dosis asignada para dicho período, se inscribirá a 10 sujetos adicionales y se dosificarán. El SSC también se reunirá para una revisión de seguridad cuando estén disponibles los datos de seguridad (incluidos los datos de seguridad del laboratorio central) para todos los sujetos en los 3 niveles de dosis de la Fase 1.

20 En la Fase 2 (Períodos 4 y 5), los 2 sujetos de vigilancia se dosificarán y se evaluará la seguridad después de la primera dosis como para cada período en la Fase 1. Si el SSC determina que no hay cuestiones de seguridad que impidan la dosificación adicional con 20 mg/kg de ATB200 coadministrados con 130 mg de miglustat (Período 4) o 20 mg/kg de ATB200 coadministrados con 260 mg de miglustat (Período 5), 10 sujetos adicionales recibirán 3 dosis bisemanalmente en la dosis asignada para dicho período. El SSC se volverá a reunir cuando todos los datos de seguridad (incluidos datos de seguridad del laboratorio central) estén disponibles para todos los sujetos en el final de  
25 la Fase 2. El SSC también se reunirá ad hoc en caso de un SAE o una cuestión de seguridad identificada.

El SSC puede recomendar cualquiera de las siguientes revisiones:

- Continuar el estudio sin modificaciones
- Continuar el estudio con modificaciones (enmienda)
- Detener la dosificación temporalmente
- 30 • Detener la dosificación permanentemente

Si en la opinión del SSC no hay AE ni cuestiones de seguridad en los sujetos de vigilancia que podrían impedir la continuación de la dosificación del estudio, la dosificación proseguirá para todos los sujetos restantes en dicho nivel de dosis. El monitor médico y los investigadores del estudio continuarán monitorizando la seguridad de los sujetos estrechamente y el SSC lo hará en intervalos periódicos.

35 *Número de sujetos (planificado):*

En la Fase 1 se inscribirán doce sujetos adultos con experiencia en ERT con enfermedad de Pompe (aproximadamente 6 ambulatorios y 6 no ambulatorios). Estos mismos sujetos continuarán el estudio en la Fase 2.

*Criterios de diagnóstico y elegibilidad:*

40 En la visita de Selección, se evaluará a sujetos adultos con experiencia en ERT con enfermedad de Pompe al usar los criterios de elegibilidad señalados más adelante. Cada sujeto debe satisfacer todos los criterios de inclusión y ninguno de los criterios de exclusión. No se admite la exención de los criterios de inclusión/exclusión.

*Criterios de inclusión*

Sujetos con experiencia en ERT (**ambulatorios**)

1. Sujetos de sexo masculino y femenino de entre 18 y 65 años, inclusive;
- 45 2. El sujeto debe proporcionar un consentimiento informado firmado antes de cualesquiera procedimientos relacionados con el estudio;
3. Los sujetos con posibilidad de procrear deben acordar usar métodos de anticoncepción médicamente aceptados durante el estudio y durante 30 días después de la última coadministración de ATB200 + miglustat;
- 50 4. El sujeto tiene un diagnóstico de enfermedad de Pompe basado en una deficiencia documentada de actividad de la enzima  $\alpha$ -glucosidasa ácida o por genotipificación de GAA;

- 5. El sujeto ha recibido ERT con alglucosidasa alfa durante los últimos 2-6 años;
- 6. El sujeto recibe en la actualidad alglucosidasa alfa en una frecuencia de una vez cada dos semanas;
- 7. El sujeto ha recibido y completado las últimas dos infusiones sin un evento adverso relacionada con el fármaco que provoca la suspensión de la dosis;
- 5 8. El sujeto debe poder caminar 200-500 metros en la 6MWT; y
- 9. La capacidad vital forzada (FVC) de pie debe ser 30 % a 80 % del valor normal previsto.

**Sujetos con experiencia en ERT (no ambulatorios)**

- 10. Sujetos de sexo masculino y femenino de entre 18 y 65 años, inclusive;
- 10 11. El sujeto debe proporcionar un consentimiento informado firmado antes de cualesquiera procedimientos relacionados con el estudio;
- 12. Los sujetos con posibilidad de procrear deben acordar usar métodos de anticoncepción médicamente aceptados durante el estudio y durante 30 días después de la última coadministración de ATB200 + miglustat;
- 13. El sujeto tiene un diagnóstico de enfermedad de Pompe basado en una deficiencia documentada de actividad de la enzima  $\alpha$ -glucosidasa ácida o por genotipificación de *GAA*;
- 15 14. El sujeto ha recibido ERT con alglucosidasa alfa durante  $\geq 2$  años;
- 15. El sujeto recibe en la actualidad alglucosidasa alfa en una frecuencia de una vez cada dos semanas;
- 16. El sujeto ha recibido y completado las últimas dos infusiones sin un evento adverso relacionada con el fármaco que provoca la suspensión de la dosis; y
- 17. El sujeto debe ser completamente dependiente de una silla de ruedas e incapaz de caminar sin asistencia.

20 *Crterios de exclusión*

**Sujetos con experiencia en ERT (ambulatorios)**

- 1. El sujeto ha recibido cualquier terapia en investigación para la enfermedad de Pompe distinta de alglucosidasa alfa dentro de los 30 días previos a la Visita inicial o prevé hacerlo durante el estudio;
- 25 2. El sujeto ha recibido tratamiento con medicamentos prohibidos (miglitol (p. ej., Glyset®); miglustat (p. ej., Zavesca®); acarbosa (p. ej., Precose®, Glucobay®); voglibosa (p. ej., Volix®, Vocab® y Volibo®); albuterol y clenbuterol; o cualquier fármaco en investigación/experimental) dentro de los 30 días previos a la Visita inicial;
- 3. El sujeto, si es de sexo femenino, está embarazada o en lactancia en la selección;
- 4. El sujeto, sea de sexo masculino o femenino, planea concebir una criatura durante el estudio;
- 5. El sujeto requiere respiración asistida invasiva;
- 30 6. El sujeto usa respiración asistida no invasiva  $\geq 6$  horas al día mientras está despierto;
- 7. El sujeto tiene una afección o circunstancia médica o de cualquier otro tipo extenuante que puede, en opinión del investigador, plantear un riesgo de seguridad indebido al sujeto o comprometer su capacidad de satisfacer los requisitos del protocolo;
- 8. El sujeto tiene antecedentes de anafilaxia a la alglucosidasa alfa;
- 35 9. El sujeto tiene antecedentes de valores de anticuerpo anti- $\alpha$ -glucosidasa ácida recombinante elevados de manera prolongada;
- 10. El sujeto tiene antecedentes de alergia o sensibilidad al miglustat u otras iminoazúcares;
- 11. El sujeto tiene antecedentes conocidos de enfermedad autoinmunitaria que incluye lupus, tiroiditis autoinmunitaria, esclerodermia o artritis reumatoide; y
- 40 12. El sujeto tiene antecedentes conocidos de asma bronquial.

**Sujetos con experiencia en ERT (no ambulatorios)**

13. El sujeto ha recibido cualquier terapia en investigación para la enfermedad de Pompe distinta de alglucosidasa alfa dentro de los 30 días previos a la Visita inicial o prevé hacerlo durante el estudio;
14. El sujeto ha recibido tratamiento con medicamentos prohibidos (miglitol (p. ej., Glyset®); miglustat (p. ej., Zavesca®); acarbosa (p. ej., Precose®, Glucobay®); voglibosa (p. ej., Volix®, Vocab® y Volibo®); albuterol y clenbuterol; o cualquier fármaco en investigación/experimental) dentro de los 30 días previos a la Visita inicial;
15. El sujeto, si es de sexo femenino, está embarazada o en lactancia en la selección;
16. El sujeto, sea de sexo masculino o femenino, planea concebir una criatura durante el estudio;
17. El sujeto tiene una afección o circunstancia médica o de cualquier otro tipo extenuante que puede, en opinión del investigador, plantear un riesgo de seguridad indebido al sujeto o comprometer su capacidad de satisfacer los requisitos del protocolo;
18. El sujeto tiene antecedentes de anafilaxia a la alglucosidasa alfa;
19. El sujeto tiene antecedentes de valores de anticuerpo anti- $\alpha$ -glucosidasa ácida recombinante elevados de manera prolongada;
20. El sujeto tiene antecedentes de alergia o sensibilidad al miglustat u otras iminoazúcares;
21. El sujeto tiene antecedentes conocidos de enfermedad autoinmunitaria que incluye lupus, tiroiditis autoinmunitaria, esclerodermia o artritis reumatoide; y
22. El sujeto tiene antecedentes conocidos de asma bronquial.

*Producto en investigación, dosificación y modo de administración:*

Fase 1 (consiste en 3 períodos de dosificación separados por 2 semanas)

- Período 1: una infusión IV de dosis única de 5 mg/kg de ATB200;
- Período 2: una infusión IV de dosis única de 10 mg/kg de ATB200 a todos los sujetos que hayan completado el Período 1; y
- Período 3: una infusión IV de dosis única de 20 mg/kg de ATB200 a todos los sujetos que hayan completado el Período 2.

Fase 2 (consiste en 2 períodos de dosificación, cada uno comprende 3 dosis del fármaco del estudio, separados por 2 semanas)

- Período 4: Se administrarán 130 mg de miglustat oralmente 1 hora antes de una infusión IV de dosis única de 20 mg/kg de ATB200 a todos los sujetos que hayan completado el Período 3 (repetido cada 2 semanas para un total de 3 administraciones); y
- Período 5: Se administrarán 260 mg de miglustat oralmente 1 hora antes de una infusión IV de dosis única de 20 mg/kg de ATB200 a todos los sujetos con experiencia en ERT que hayan completado el Período 4 (repetido cada 2 semanas para un total de 3 administraciones).

**Nota:** Se pide a los sujetos que ayunen al menos 2 horas antes y 2 horas después de la administración de miglustat oral.

**Duración total de estudio:** Hasta 22 semanas (período de selección de hasta 4 semanas, posteriormente aproximadamente 18 semanas de tratamiento del estudio [Fases 1 y 2])

**Duración de la observación PK con dosis única (Fase 1, Períodos 1, 2 y 3):** 6 semanas

**Duración de la observación PK con múltiples dosis (Fase 2, Períodos 4 y 5):** 12 semanas

**Duración de la observación de seguridad, tolerabilidad e inmunogenicidad (Períodos 1, 2, 3, 4 y 5):** 18 semanas

*Criterios de evaluación:*

*Primarios:*

Evaluaciones de seguridad:

- PE
- Constantes vitales, incluida temperatura corporal, RR, HR y BP
- AE, incluidas IAR
- ECG de 12 derivaciones

- Evaluación en laboratorio de la seguridad clínica: química sérica, hematología y análisis de orina PK de ATB200 y miglustat en plasma:
- Niveles de actividad de  $\alpha$ -glucosidasa ácida en plasma y concentraciones de proteína total  $\alpha$ -glucosidasa ácida
- 5 Parámetros PK: concentración plasmática máxima observada ( $C_{m\acute{a}x}$ ), tiempo hasta alcanzar la concentración plasmática máxima observada ( $t_{m\acute{a}x}$ ), área debajo de la curva de concentración plasmática del fármaco y el tiempo desde el Tiempo 0 hasta tiempo de la última concentración medible ( $AUC_{0-t}$ ), área debajo de la curva de concentración plasmática del fármaco y el tiempo desde el Tiempo 0 extrapolada hasta el infinito ( $AUC_{0-\infty}$ ), semivida ( $t_{1/2}$ ) y aclaramiento total después de la administración IV ( $CL_T$ )
- 10 • Relaciones de  $C_{m\acute{a}x}$  y  $AUC_{0-\infty}$  de actividad de  $\alpha$ -glucosidasa ácida en plasma y proteína total  $\alpha$ -glucosidasa ácida para todos los regímenes de dosificación
- Parámetros PK de miglustat en plasma:  $C_{m\acute{a}x}$ ,  $t_{m\acute{a}x}$ ,  $AUC_{0-t}$ ,  $AUC_{0-\infty}$  y  $t_{1/2}$ , aclaramiento total aparente del fármaco después de la administración oral ( $CL_T/F$ ), y volumen de distribución en fase terminal después de la administración oral ( $V_z/F$ ) para cada nivel de dosis
- Relaciones de  $C_{m\acute{a}x}$  y  $AUC_{0-\infty}$  de miglustat en plasma para cada nivel de dosis

15 *Evaluaciones funcionales (llevadas a cabo en el Inicio)*

Para sujetos ambulatorios

- Pruebas de función motriz
- Prueba de marcha de seis minutos (6MWT)
- Prueba de marcha de 10 metros
- 20 • Puntuación para marcha, escaleras, Gower y silla
- Levantarse de una silla sin posabrazos ("timed up and go", TUG)
- Prueba de resistencia muscular (criterios de investigación médica [MRC] y dinamómetro en mano) para las extremidades superiores e inferiores
- PFT (FVC, MIP, MEP y SNIP)

25 Para sujetos no ambulatorios

- Prueba de resistencia muscular - Solo extremidades superiores
- MRC y dinamómetro en mano llevadas a cabo solo en las extremidades superiores
- Pruebas de función pulmonar (PFT) (capacidad vital forzada [FVC], presión de inhalación máxima [MIP], presión de exhalación máxima [MEP] y presión de inhalación nasal al aspirar [SNIP])

30 *Resultados comunicados por los pacientes (llevados a cabo en el Inicio)*

- Escala de intensidad de fatiga
- Escala de discapacidad de Róterdam
- Actividad específica para Pompe sobre modelo de Rasch (R-PAct)

*Exploración*

- 35 • Valores de anticuerpo anti-ATB200 (totales y neutralizantes)
- Reactividad cruzada de anticuerpos anti- $\alpha$ -glucosidasa ácida recombinante con  $\alpha$ -glucosidasa alfa
- Activación de citocinas proinflamatorias y otros biomarcadores del sistema inmunitario
- Marcadores de PD (Hex4 y CPK)

*Métodos de análisis:*

40 *Métodos estadísticos:*

Se proporcionará estadística descriptiva de los parámetros PK. Se proporcionará estadística resumida para todas las variables que no son parámetros PK. Evaluación de la proporcionalidad de la dosis sobre las relaciones de actividad de  $\alpha$ -glucosidasa ácida y la exposición a proteína total  $\alpha$ -glucosidasa ácida ( $C_{m\acute{a}x}$ ,  $AUC_{0-t}$  y  $AUC_{0-\infty}$ ) con 5, 10 y 20 mg/kg de ATB200 solos. Análisis de varianza (ANOVA) sobre las relaciones de actividad de  $\alpha$ -glucosidasa ácida y la exposición a proteína total  $\alpha$ -glucosidasa ácida ( $C_{m\acute{a}x}$ ,  $AUC_{0-t}$  y  $AUC_{0-\infty}$ ) con 20 mg/kg de ATB200 solos frente a 20 mg/kg de ATB200 + 130 mg de miglustat, y frente a 20 mg/kg de ATB200 + 260 mg de miglustat dentro de cada población y de manera global. ANOVA sobre las relaciones de actividad de  $\alpha$ -glucosidasa ácida y la exposición a proteína total  $\alpha$ -glucosidasa ácida ( $C_{m\acute{a}x}$ ,  $AUC_{0-t}$  y  $AUC_{0-\infty}$ ) entre sujetos ambulatorios y no ambulatorios con 20 mg/kg de ATB200 + 130 mg de miglustat y 20 mg/kg de ATB200 + 260 mg de miglustat. Evaluación de proporcionalidad de la dosis sobre las relaciones de exposición ( $C_{m\acute{a}x}$ ,  $AUC_{0-t}$  y  $AUC_{0-\infty}$ ) entre 130 mg y 260 mg de miglustat dentro de cada población de sujeto y de manera global. Se evaluará efecto de los resultados de inmunogenicidad sobre la PK, la PD y la seguridad.

*Análisis provisionales:*

## ES 2 965 190 T3

Se llevará cabo un análisis provisional cuando al menos 50 % (n=6) de los sujetos haya completado la Fase 2 del estudio. Se pueden llevar a cabo hasta 2 análisis provisionales adicionales en el estudio.

### *Resultados PK iniciales:*

5 El resumen PK de la actividad de GAA y la proteína total GAA para sujetos se muestra en las Tablas 12 y 13, respectivamente.

En las Tablas 12-15 y las Figuras 24-26, las mediciones de dosis única (DU) se tomaron después de una única administración de miglustat y ATB200, y las mediciones de dosis múltiples (DM) se tomaron después de la tercera administración bisemanal de miglustat y ATB200.

Tabla 12.

Dosis	ct <sub>50</sub> <sup>a</sup> (h)	βt <sub>50</sub> <sup>a</sup> (h)	t <sub>max</sub> <sup>b</sup> (h)	C <sub>max</sub> <sup>c</sup> (ug/mL)	AUC <sub>0-∞</sub> <sup>f</sup> (hr*ug/mL)	AUC <sub>0-∞</sub> <sup>e</sup> (hr*ug/mL)	AUC <sub>0-∞</sub> /D <sup>c</sup> (hr*ug/mL/mg)	CLT <sup>d</sup> (L/h)	V <sub>ss</sub> <sup>a</sup> (L)
mg/kg de ATE200 + mg de miglustat									
5	1,06 (9,7)	3,15 (5,3)	3,5 (3,5 - 4,0)	53,7 (20,4)	193 (22,5)	193 (22,5)	0,444 (15,4)	2,27 (15,9)	5,61 (21,2)
10	1,26 (22,2)	2,73 (18,2)	3,75 (3,5 - 4,5)	115 (38,3)	447 (30,7)	448 (30,6)	0,523 (17,5)	1,93 (15,0)	5,39 (21,2)
20	1,38 (25,7)	2,16 (10,2)	4,0 (3,5 - 4,0)	256 (30,4)	1020 (37,4)	1021 (37,4)	0,596 (30,1)	1,76 (37,5)	5,01 (28,0)
20 + 130 dosis única	1,84 (16,0)	2,49 (9,9)	4,5 (4,0 - 5,0)	234 (36,0)	1209 (29,9)	1211 (29,9)	0,707 (23,7)	1,45 (25,8)	5,32 (24,8)
20 + 130 dosis múltiple	1,90 (7,5)	2,53 (11,9)	4,0 (3,5 - 5,0)	230 (20,2)	1180 (19,1)	1183 (19,0)	0,690 (15,1)	1,46 (14,4)	5,55 (14,2)
20 + 260 dosis única	2,39 (11,5)	2,70 (10,8)	4,0 (4,0-4,5)	228 (26,0)	1251 (17,4)	1256 (17,2)	0,733 (15,8)	1,38 (17,3)	5,71 (20,2)

<sup>a</sup>Media aritmética (CV%)  
<sup>b</sup>Mediana (min-max)  
<sup>c</sup>Media geométrica (CV%)

Tabla 13.

Dosis	$t_{1/2}^a$ (h)	$t_{1/2}^a$ (h)	$t_{max}^b$ (h)	$C_{max}^c$ ( $\mu$ g/mL)	AUC <sub>0-<math>t</math></sub> <sup>d</sup> (hr $\cdot$ $\mu$ g/mL)	AUC <sub>0-<math>\infty</math></sub> <sup>e</sup> (hr $\cdot$ $\mu$ g/mL)	AUC <sub>0-<math>\infty</math></sub> / $D^f$ (hr $\cdot$ $\mu$ g/mL/mg)	CL <sub>T</sub> <sup>f</sup> (L/h)	$V_{ss}^g$ (L)
mg/kg de ATE200 + mg de miglustat									
5	1,02 (3,0)	1,83 (13,8)	4,0 (3,5 - 4,0)	61,1 (20,0)	215 (17,1)	218 (17,0)	0,511 (7,3)	1,97 (7,7)	4,57 (6,8)
10	1,36 (5,3)	1,99 (56,9)	4,0	143 (19,5)	589 (16,6)	594 (16,6)	0,694 (12,3)	1,45 (13,4)	3,98 (14,5)
20	1,65 (12,3)	2,62 (18,5)	4,0	338 (11,1)	1547 (12,1)	1549 (12,1)	0,904 (12,8)	1,11 (14,4)	3,48 (11,6)
20 + 130 dosis única	1,79 (10,7)	2,63 (6,6)	4,0	322 (18,2)	1676 (14,9)	1680 (14,8)	0,980 (15,0)	1,03 (17,6)	3,78 (12,2)
20 + 130 dosis múltiple	1,99 (10,2)	2,47 (4,2)	4,0 (3,5 - 5,0)	355 (16,5)	1800 (12,7)	1804 (12,7)	1,05 (12,9)	0,96 (13,7)	3,78 (10,8)
20 + 260 dosis única	2,35 (13,9)	2,73 (10,4)	4,0	350 (14,2)	1945 (15,1)	1963 (15,0)	1,14 (15,8)	0,89 (15,7)	3,63 (16,3)

<sup>a</sup>Media aritmética (CV%)  
<sup>b</sup>Mediana (min-max)  
<sup>c</sup>Media geométrica (CV%)

5 La Figura 24A muestra los perfiles de concentración-tiempo de la actividad de GAA en plasma media después de dosis de 5 mg/kg, 10 mg/kg y 20 mg/kg de ATB200. La Figura 24B también proporciona los perfiles de concentración-tiempo de la actividad de GAA en plasma media después de dosis de 5 mg/kg, 10 mg/kg y 20 mg/kg de ATB200, pero la actividad de GAA en plasma se exhibe en una escala logarítmica. Como puede observarse a partir de las Figuras 24A-24B y la Tabla 12, ATB200 demostró exposiciones ligeramente mayores que las proporcionales a la dosis para la actividad de GAA en plasma.

La Figura 24C muestra los perfiles de concentración-tiempo de la actividad de GAA en plasma media después de dosis de 20 mg/kg de ATB200 solos, así como 20 mg/kg de ATB200 y 130 o 260 mg de miglustat.

10 La Figura 24D también proporciona la actividad de GAA en plasma media después de dosis de 20 mg/kg de ATB200 solos, con 130 mg de miglustat o 260 mg de miglustat, pero la actividad de GAA en plasma se exhibe en una escala logarítmica.

15 La Figura 25A muestra los perfiles de concentración-tiempo de la proteína total GAA en plasma media después de dosis de 5 mg/kg, 10 mg/kg y 20 mg/kg de ATB200. La Figura 25B también proporciona los perfiles de concentración-tiempo de proteína total GAA en plasma media después de dosis de 5 mg/kg, 10 mg/kg y 20 mg/kg de ATB200, pero la proteína total GAA en plasma se exhibe en una escala logarítmica. Como puede observarse a partir de las Figuras 25A-25B y la Tabla 13, ATB200 demostró exposiciones ligeramente mayores que las proporcionales a la dosis para la proteína total GAA en plasma.

20 La Figura 25C muestra los perfiles de concentración-tiempo de la proteína total GAA en plasma media después de dosis de 20 mg/kg de ATB200 solos, 20 mg/kg de ATB200 y 130 mg de miglustat, y 20 mg/kg de ATB200 y 260 mg de miglustat. La Figura 25D también proporciona la proteína total GAA en plasma media después de dosis de 20 mg/kg de ATB200 solos, con 130 mg de miglustat o 260 mg de miglustat, pero la proteína total GAA en plasma se exhibe en una escala logarítmica.

25 Como se muestra en la Tabla 13, la coadministración de miglustat aumentó la semivida en plasma de la proteína total GAA en aproximadamente 30 % con respecto a ATB200 administrada sola. El volumen de distribución varió de 3,5 a 5,7 L para todos los tratamientos, lo que sugiere que la glicosilación de ATB200 posibilita la distribución eficaz de ATB200 a los tejidos.

El resumen de PK para miglustat se muestra en la Tabla 14.

Tabla 14

Dosis	$t_{1/2}$ <sup>a</sup> (h)	$t_{max}$ <sup>b</sup> (h)	$C_{max}$ <sup>c</sup> ( $\mu$ g/mL)	$C_{max}/BW$ <sup>c</sup> (ng/mL/kg)	$AUC_{0-6}$ <sup>c</sup> (hr $\cdot$ ug/mL)	$AUC_{0-\infty}$ <sup>c</sup> (hr $\cdot$ ug/mL)	$AUC_{0-\infty}/BW$ <sup>c</sup> (hr $\cdot$ ng/mL/kg)	$V_d/F$ <sup>a</sup> (L)	$CL/F$ <sup>a</sup> (L/h)
mg									
130 dosis única	4,5 (37,0)	2,75 (1,5-3,5)	1647 (22,1)	19,2 (23,9)	12620 (13,1)	13157 (13,1)	154 (28,7)	65,4 (41,9)	9,93 (13,7)
130 dosis múltiple	5,6 (12,5)	3,0 (1,5 - 3,5)	1393 (36,0)	16,3 (36,4)	11477 (18,0)	12181 (16,4)	142 (28,9)	88,1 (26,1)	10,8 (16,2)
260 dosis única	5,5 (25,9)	2,75 (1,0 - 5,0)	3552 (30,2)	41,5 (33,6)	26631 (25,1)	28050 (22,9)	325 (30,6)	79,2 (55,3)	9,61 (27,6)
<sup>a</sup> Media aritmética (CV%)									
<sup>b</sup> Mediana (mín-máx)									
<sup>c</sup> Media geométrica (CV%)									

La Figura 26 muestra el perfil de concentración-tiempo de miglustat en plasma en sujetos humanos después de la dosificación de 130 mg o 260 mg de miglustat.

5 Como puede observarse a partir de la Tabla 14 y la Figura 26, el miglustat en plasma, administrado por vía oral 1 hora antes de la infusión de ATB200, alcanzó las concentraciones máximas a las 2 horas durante la infusión y demostró cinética proporcional a la dosis.

Se llevó a cabo un análisis en varias porciones de las curvas de concentración en plasma para la actividad de GAA y la proteína total para determinar AUC parciales. La Tabla 15 proporciona un resumen de AUC parciales desde 0- $t_{m\acute{a}x}$ ,  $t_{m\acute{a}x}$ -6h,  $t_{m\acute{a}x}$ -10h,  $t_{m\acute{a}x}$ -12h y  $t_{m\acute{a}x}$ -24h para la actividad de GAA y proteína total.

Tabla 15:

Analito	Tratamiento	Media aritmética de pAUC (ng*hr/mL) en el tiempo posdosis (N=4)				
		0- $t_{m\acute{a}x}$	$t_{m\acute{a}x}$ -6h	$t_{m\acute{a}x}$ -10h	$t_{m\acute{a}x}$ -12h	$t_{m\acute{a}x}$ -24h
Actividad de GAA	20 mg/kg	428	382	606	630	654
Actividad de GAA	20 mg/kg + 130 mg dosis única	456	415	722	770	832
Actividad de GAA	20 mg/kg + 130 mg dosis múltiple	423	392	689	737	796
Actividad de GAA	20 mg/kg + 260 mg dosis única	423	536	924	996	1094
Proteína total	20 mg/kg	621	603	943	981	1040
Proteína total	20 mg/kg + 130 mg dosis única	565	614	1041	1106	1189
Proteína total	20 mg/kg + 130 mg dosis múltiple	630	612	1079	1154	1244
Proteína total	20 mg/kg + 260 mg dosis única	679	824	1411	1518	1665

10 Como puede observarse a partir de la Tabla 15, los aumentos en el porcentaje medio de la actividad de GAA de  $pAUC_{t_{m\acute{a}x}-24h}$  para 20 mg/kg más miglustat con respecto a 20 mg/kg de ATB200 solos fueron 21,4 %, 17,8 %, 40,2 %, para 130 mg DU, 130 mg DM y 260 mg DU, respectivamente.

15 De manera similar, los aumentos en el porcentaje medio de proteína total GAA de  $pAUC_{t_{m\acute{a}x}-24h}$  para 20 mg/kg más miglustat con respecto a 20 mg/kg de ATB200 solos fueron 12,5 %, 16,4 %, 37,5 %, para 130 mg DU, 130 mg DM y 260 mg DU, respectivamente.

Por lo tanto, el análisis de AUC parcial demuestra que la coadministración de miglustat aumenta significativamente la AUC parcial de fase terminal ( $t_{m\acute{a}x}-24h$ ) de ATB200 en aproximadamente 15 % para dosis de 130 mg de miglustat y aproximadamente 40 % para 260 mg de miglustat.

*Resultados de biomarcadores iniciales:*

20 Se monitorizaron los niveles de alanina aminotransferasa (ALT), aspartato aminotransferasa (AST) y creatina fosfocinasa (CPK) en pacientes humanos que pasaron de Lumizyme® a ATB200. Los pacientes recibieron dosis ascendentes de ATB200 (5, 10 y 20 mg/kg) con posterior coadministración de ATB200 (20 mg/kg) y miglustat (130 y 260 mg). Niveles altos de la enzima CPK pueden indicar lesión o estrés del tejido muscular, corazón o cerebro. ALT y AST elevadas son marcadores de daño hepático y muscular en la enfermedad de Pompe, respectivamente. El análisis inicial de los niveles de ALT, AST y CPK se muestra en las Figuras 38-41. Como puede observarse a partir de las Figuras 38-41, dos pacientes mostraron una tendencia temprana hacia la mejora en los tres biomarcadores y dos

pacientes permanecieron estables. Un paciente tuvo reducciones de 44 %, 28 % y 34 % en CPK, AST y ALT respectivamente. Otro paciente tuvo reducciones de 31 %, 22 % y 11 % en CPK, AST y ALT respectivamente.

Hasta el momento, no ha habido eventos adversos graves (SAE). Los AE fueron generalmente leves y transitorios. No hubo reacciones asociadas a la infusión hasta la fecha después de 100+ infusiones en todos los pacientes inscritos.

5 Todos los pacientes tuvieron anticuerpos anti-rhGAA en el inicio que permanecieron generalmente estables. Las citocinas permanecieron bajas y estables durante las infusiones.

#### **Ejemplo 15: Niveles de GAA y LAMP1 en fibroblastos naturales y con Pompe**

10 Se utilizó microscopía con inmunofluorescencia para detectar los niveles de GAA y LAMP1 en fibroblastos naturales y fibroblastos con Pompe con una mutación de empalme común. Como se muestra en la Figura 27, la GAA está en distintos compartimientos lisosómicos en los fibroblastos naturales. La Figura 27 también muestra una señal de GAA abundante en los fibroblastos con Pompe, y que ambas señales de GAA y LAMP1 en los fibroblastos con Pompe parecen estar localizadas en el ER y el Golgi, en lugar de los lisosomas distales. Esto es un indicio del tráfico alterado de proteína GAA en fibroblastos con Pompe.

#### **Ejemplo 16: Mejora de la disfunción celular y la función muscular en ratones con Gaa inactivado**

15 Se ha mostrado que la alteración del catabolismo de glucógeno lisosómico debido a la deficiencia de GAA causa disfunción celular sustancial como se evidencia por la autofagia pronunciada, persistente y la proliferación y acumulación de compartimientos intracelulares unidos a la membrana llenos de glucógeno acumulado (N. Raben et al.). Nuestros datos inmunohistológicos indican que el tráfico de proteínas está significativamente alterado para muchas proteínas, incluidas varias proteínas esenciales que son vitales para la estabilidad de la membrana muscular  
20 tales como distrofina,  $\alpha$ - y  $\beta$ -dystroglicano, varios sarcoglicanos y otros que comprenden el complejo de distrofina glicoproteína, así como proteínas que participan en la reparación muscular tales como disferlina. Estas proteínas musculares esenciales requieren un tráfico de proteínas adecuado hacia la membrana celular muscular cuando funcionan. Como se muestra en la Figura 28, nuestros datos inmunohistológicos relevan que una fracción considerable de estas proteínas musculares esenciales tiene una ubicación intracelular en músculos del modelo de  
25 ratón con *Gaa* inactivado (KO) de la enfermedad de Pompe. Estos datos sugieren que el tráfico alterado de estas proteínas musculares esenciales puede inducir una pseudodistrofia muscular que, en última instancia, conduce a la debilidad muscular y a la incapacidad de su reparación. Se evaluaron alglucosidasa alfa (Myozyme®) y ATB200 con y sin 10 mg/kg de miglustat en ratones *Gaa* KO con dosis de ERT equivalente (20 mg/kg) a través de una pauta de dosificación cada dos semanas. Después de 2 administraciones, la alglucosidasa alfa redujo modestamente el  
30 glucógeno lisosómico acumulados en músculos esqueléticos (Figuras 32A-32C) y tuvo efectos insignificantes hacia la reducción de la autofagia (Figuras 30A-30B) o la proliferación lisosómica (Figuras 29A-29B) en comparación con ratones tratados con vehículo. En cambio, se observó un aclaramiento de glucógeno lisosómico sustancialmente mejor con ATB200/miglustat en condiciones idénticas (Figuras 32A-32D). ATB200/miglustat también pareció mejorar la fisiología muscular global como se evidenció por niveles de LC3 II reducidos (Figuras 30A-30B), un biomarcador de  
35 autofagia ya establecido, y por el aclaramiento de vesículas intracelulares acumuladas teñidas con LAMP1 (Figuras 29A-29B), una proteína de membrana integral lisosómica residente conocida y disferlina (Figuras 31A-31B), una proteína de superficie celular conocida que participa en la reparación muscular. Además, ATB200/miglustat mejoró significativamente la arquitectura muscular que se asemejó a las fibras musculares de ratones naturales.

40 Además, las Figuras 29-32 muestran que dos lotes diferentes de ATB200 (procesos de fabricación de última generación y anterior) produjeron resultados semejantes. En las Figuras 32A-32D, \* indica estadísticamente significativo en comparación con Myozyme® solo.

#### **Ejemplo 17: Función muscular en ratones con Gaa inactivado**

45 En estudios a más largo plazo de 12 administraciones bisemanales, 20 mg/kg de ATB200 más 10 mg/kg de miglustat aumentaron progresivamente la resistencia muscular funcional en ratones *Gaa* KO con respecto al inicio según se midió por pruebas de resistencia de agarre y alambre ("wire hang") (Figuras 33A-33B). Se observó que los ratones tratados con alglucosidasa alfa (Lumizyme®) que recibieron la misma dosis de ERT (20 mg/kg) empeoraron en condiciones idénticas a lo largo de la mayor parte del estudio (Figuras 33A-33B). Al igual que en el estudio a más corto  
50 plazo, ATB200/miglustat tuvieron un aclaramiento de glucógeno sustancialmente mejor después de 3 meses (Figuras 34A-34C) y 6 meses (Figuras 34D-G) de tratamiento que la alglucosidasa alfa. ATB200/miglustat también redujeron la autofagia y la acumulación intracelular de LAMP1 y disferlina después de 3 meses de tratamiento (Figura 35) en comparación con alglucosidasa alfa. En la Figura 33A, \* indica estadísticamente significativo en comparación con Lumizyme® solo ( $p < 0,05$ , prueba de la t bilateral). En las Figuras 34A-34G, \* indica estadísticamente significativo en comparación con Lumizyme® solo ( $p < 0,05$ , comparación múltiple al usar el método de Dunnett en análisis ANOVA unidireccional). Tomados juntos, estos datos indican que ATB200/miglustat se dirigió de manera eficaz a los músculos  
55 para revertir la disfunción celular y mejorar la función muscular. De manera importante, las mejoras aparentes en la arquitectura muscular y la autofagia y acumulación intracelular reducidas de LAMP1 y disferlina pueden ser buenos sustitutos para la fisiología muscular mejorada que se correlacionan con mejoras en la resistencia muscular funcional. Estos resultados sugieren que monitorizar la autofagia y estas proteínas musculares esenciales puede ser un método

racional, práctico para evaluar la eficacia de los tratamientos terapéuticos para la enfermedad de Pompe en ratones *Gaa* KO que pueden ser biomarcadores útiles de biopsias musculares en estudios clínicos.

5 La Figura 40 muestra que 6 meses de administración de ATB200 con o sin miglustat bajaron la acumulación intracelular de distrofina en ratones *Gaa* KO. Hubo una reducción mayor de la acumulación de distrofina para ATB200 ± miglustat que con Lumizyme®.

**Ejemplo 18: Efecto del contenido de ácido siálico en ATB200 en ratones con *Gaa* inactivado**

Se evaluaron dos lotes de ATB200 con diferente contenido de ácido siálico para determinar la farmacocinética y eficacia en ratones *Gaa* KO. La Tabla 16 proporciona un resumen de las características para los dos lotes.

Tabla 16:

Característica	Lote A	Lote B
Ácido siálico	4,0 mol/mol de proteína	5,4 mol/mol de proteína
Contenido de M6P	3,3 mol/mol de proteína	2,9 mol/mol de proteína
Actividad específica	115831 (nmol 4mu/mg de proteína/h)	120929 (nmol 4mu/mg de proteína/h)
Unión a CIMPR	K <sub>d</sub> =2,7 nM	K <sub>d</sub> =2,9 nM

10 Como puede observarse a partir de la Tabla 16, el Lote B tenía un contenido de ácido siálico más alto que el Lote A, pero un contenido ligeramente menor de M6P que el Lote A.

La Figura 36 muestra los perfiles de concentración-tiempo de la actividad de GAA en plasma en ratones *Gaa* KO después una única dosificación en bolo IV de ATB200. La semivida de los Lotes A y B se proporcionan en la Tabla 17 a continuación.

15

Tabla 17:

Semivida (h)	Media ± EEM
Lote A	0,50 ± 0,02
Lote B	0,60 ± 0,03

Como puede observarse a partir de la Tabla 17, el Lote B tuvo una semivida más baja que el Lote A. Si bien la disminución en la semivida fue modesta, esta disminución en la semivida fue estadísticamente significativa (p<0,05 en prueba de la t bilateral).

20 En un estudio relacionado, se administraron en la vena de la cola inyecciones de bolo IV de ATB200 (Lote A y B) y Lumizyme® a ratones *Gaa* KO cada dos semanas para un total de 2 inyecciones. Los niveles de glucógeno en tejidos se midieron 14 días después de la última administración. Como se muestra en la Figuras 37A-37D, el Lote B fue generalmente más eficaz para reducir el glucógeno que el Lote A en dosis similares. Tanto el Lote A como el Lote B fueron superiores que Lumizyme® para reducir el glucógeno. En las Figuras 37A-37D, \* indica estadísticamente significativo en comparación con Lumizyme® (p<0,05, prueba de la t) y ^ indica comparación estadísticamente significativa del Lote A y el Lote B a la misma dosis (p<0,05, prueba de la t).

25 Se pretende que las realizaciones descritas en la presente memoria sean ilustrativas de las presentes composiciones y métodos, y no se pretende que limiten el alcance de la presente invención. Se pretende que se incluyan diversas modificaciones y cambios en consonancia con la descripción en su totalidad y que son evidentes sin inconvenientes para el experto en la técnica. Las reivindicaciones adjuntas no deberían limitarse mediante las realizaciones específicas establecidas en los ejemplos, sino que deberían interpretarse de la manera más amplia en consonancia con la descripción en su totalidad.

30 A lo largo de toda esta solicitud se citan patentes, solicitudes de patentes, publicaciones, descripciones de productos, números de acceso a GenBank y protocolos.

## REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende moléculas de  $\alpha$ -glucosidasa ácida humana recombinante (rhGAA) para uso en el tratamiento de la enfermedad de Pompe en combinación con miglustat en un paciente que lo necesita;  
en donde el paciente tiene experiencia en terapia de reemplazo enzimático (ERT);
- 5 en donde la composición se administra por vía intravenosa en una dosis de 5 mg/kg a 20 mg/kg y el miglustat se administra por vía oral en una dosis de 260 mg o 130 mg;  
en donde las moléculas de rhGAA se producen en células de ovario de hámster chino (CHO, por sus siglas en inglés), las moléculas de rhGAA comprenden siete sitios de N-glicosilación potenciales, 40 %-60 % de los N-glicanos en las moléculas de rhGAA son N-glicanos de tipo complejo, y al menos 50 % de las moléculas de rhGAA llevan una unidad de bis-manosa-6-fosfato (bis-M6P, por sus siglas en inglés) en el primer sitio de N-glicosilación potencial.
- 10 2. La composición para su uso según la reivindicación 1, en donde las moléculas de rhGAA tienen cuando se expresan  
(i) una secuencia al menos 95 % idéntica a la SEQ ID NO: 4; o  
(ii) la secuencia de la SEQ ID NO: 4, en donde las moléculas de rhGAA sufren una modificación después de la traducción para eliminar los primeros 56 aminoácidos.
- 15 3. La composición para su uso según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde al menos 55 % de las moléculas de rhGAA tienen una unidad de bis-MP6 en el primer sitio de N-glicosilación potencial.
4. La composición para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde al menos 70 % de las moléculas de rhGAA están fosforiladas en el primer sitio de N-glicosilación potencial.
- 20 5. La composición para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde al menos 40 % de las moléculas de rhGAA tienen una unidad de mono-manosa-6-fosfato (mono-M6P) en el segundo sitio de N-glicosilación potencial.
6. La composición para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde al menos 40 % de las moléculas de rhGAA tienen una unidad de bis-M6P en el cuarto sitio de N-glicosilación potencial.
- 25 7. La composición para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde al menos 25 % de las moléculas de rhGAA tienen una unidad de mono-M6P en el cuarto sitio de N-glicosilación potencial.
8. La composición para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en donde la composición se administra en una dosis de 20 mg/kg mediante infusión intravenosa en aproximadamente cuatro horas cada 2 semanas, en donde el miglustat se administra una hora antes de la infusión intravenosa de la composición, y en donde el paciente ayuna durante al menos dos horas antes y al menos dos horas después de la administración oral de miglustat.
- 30 9. La composición para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en donde la composición se administra por vía intravenosa en una dosis de 5 mg/kg, 10 mg/kg o 20 mg/kg.
10. La composición para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en donde la composición se administra por vía intravenosa en una dosis de 20 mg/kg y el miglustat se administra por vía oral en una dosis de 260 mg.
- 35 11. La composición para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en donde el paciente es ambulatorio.
12. La composición para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en donde el paciente no es ambulatorio.
13. La composición para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-12, en donde el paciente ha recibido previamente ERT con  $\alpha$ -glucosidasa alfa.
- 40 14. La composición para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-13, en donde el paciente no es ambulatorio y ha recibido ERT con  $\alpha$ -glucosidasa alfa durante al menos 2 años previamente.
15. La composición para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-13, en donde el paciente es ambulatorio y ha recibido ERT con  $\alpha$ -glucosidasa alfa durante los 2-6 años previos.
16. La composición para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-15, en donde las moléculas de rhGAA tienen una secuencia al menos 95 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a la SEQ ID NO: 5.

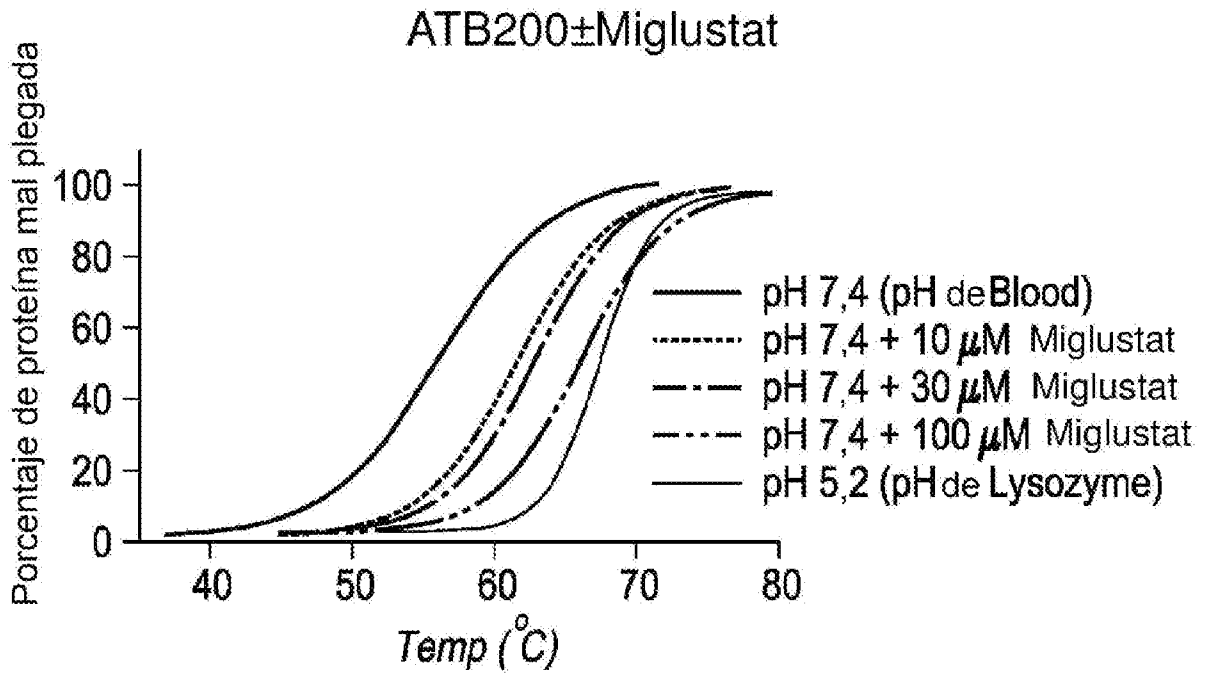


FIG. 1

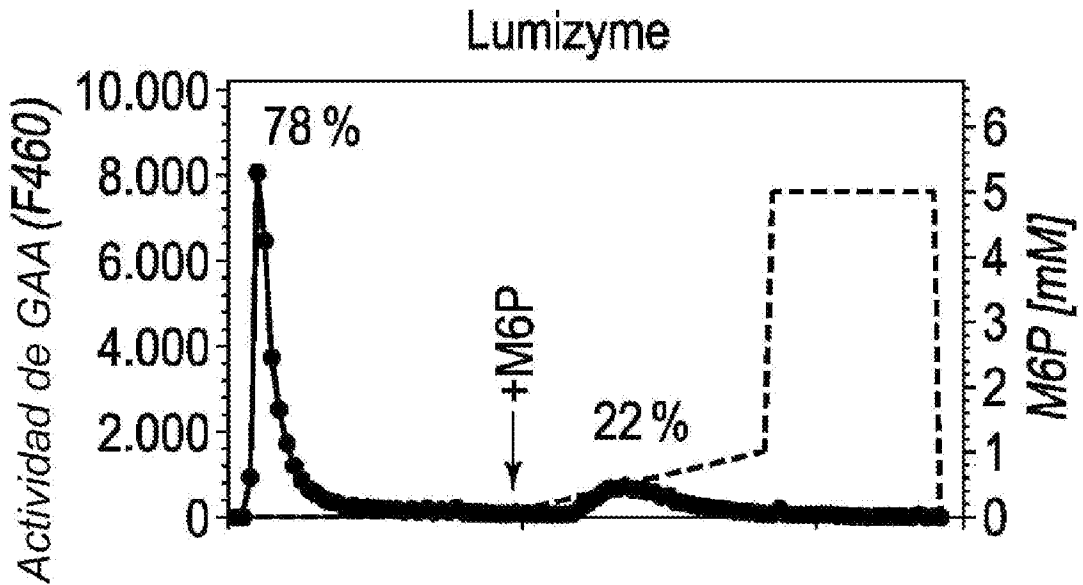


FIG. 2A

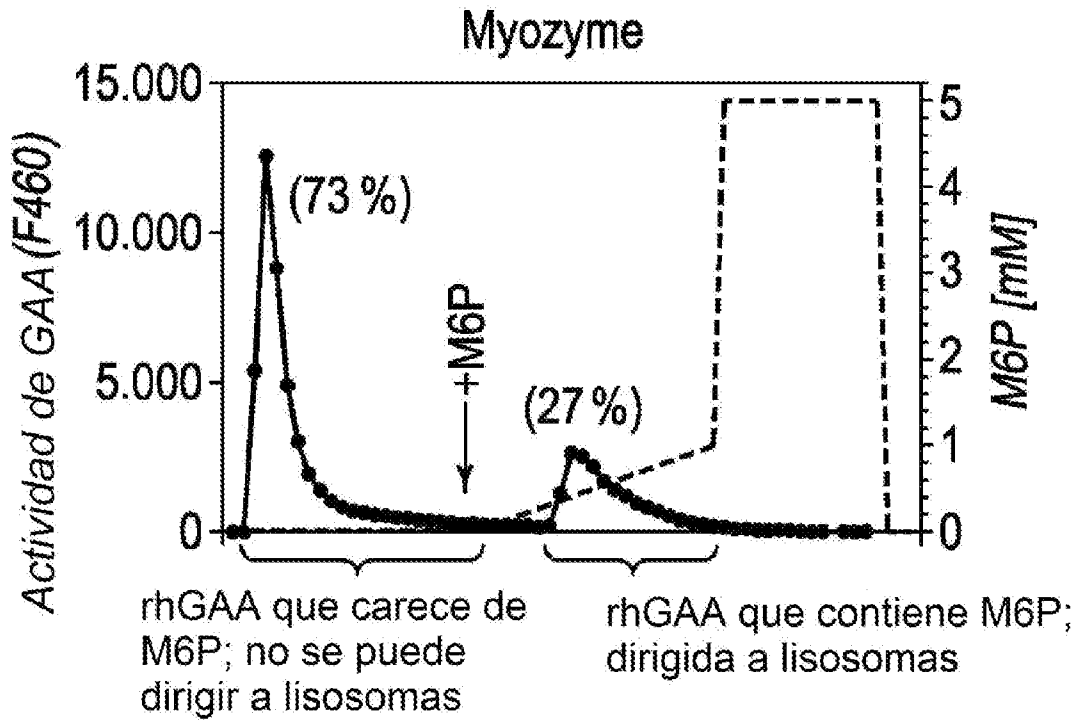


FIG. 2B

Construcción de vector de ATB200

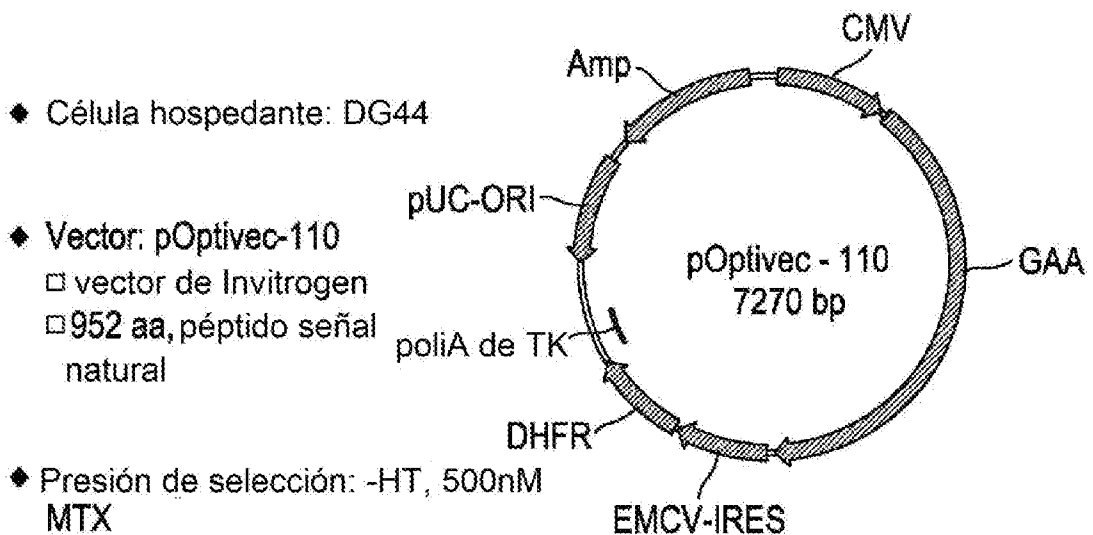


FIG. 3

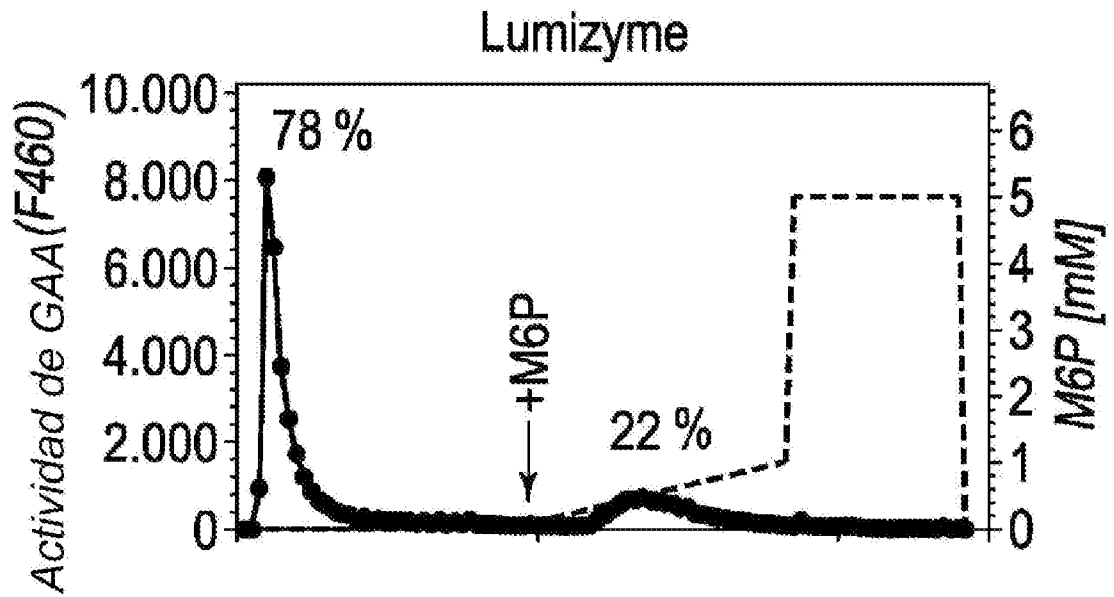


FIG. 4A

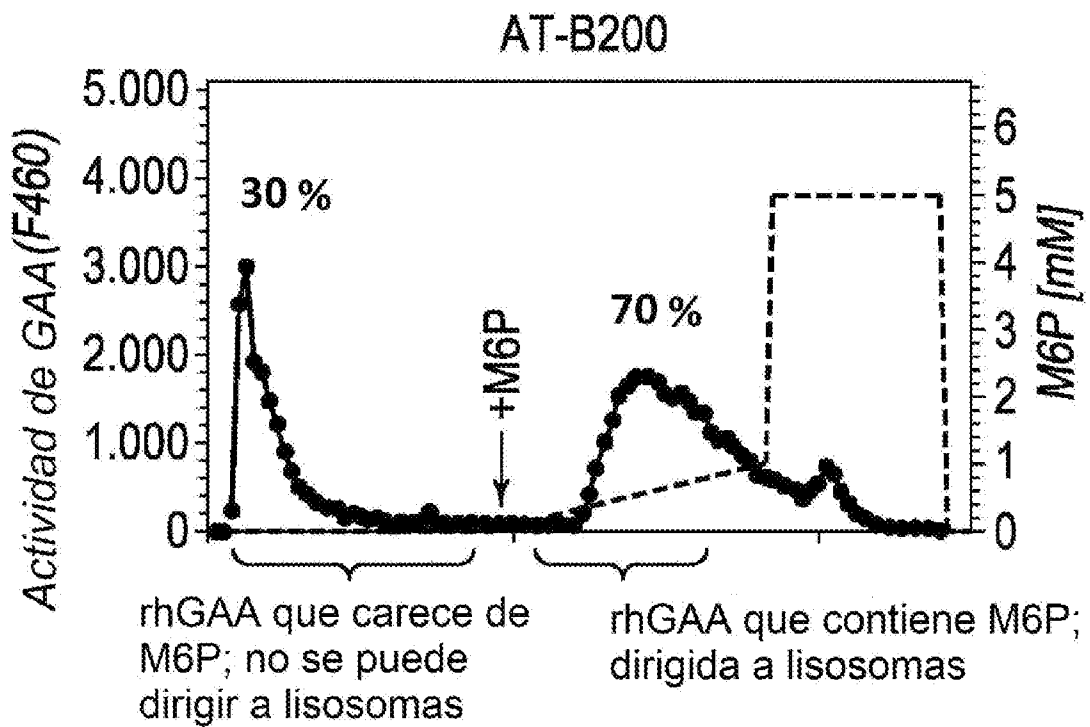


FIG. 4B

Realización 1

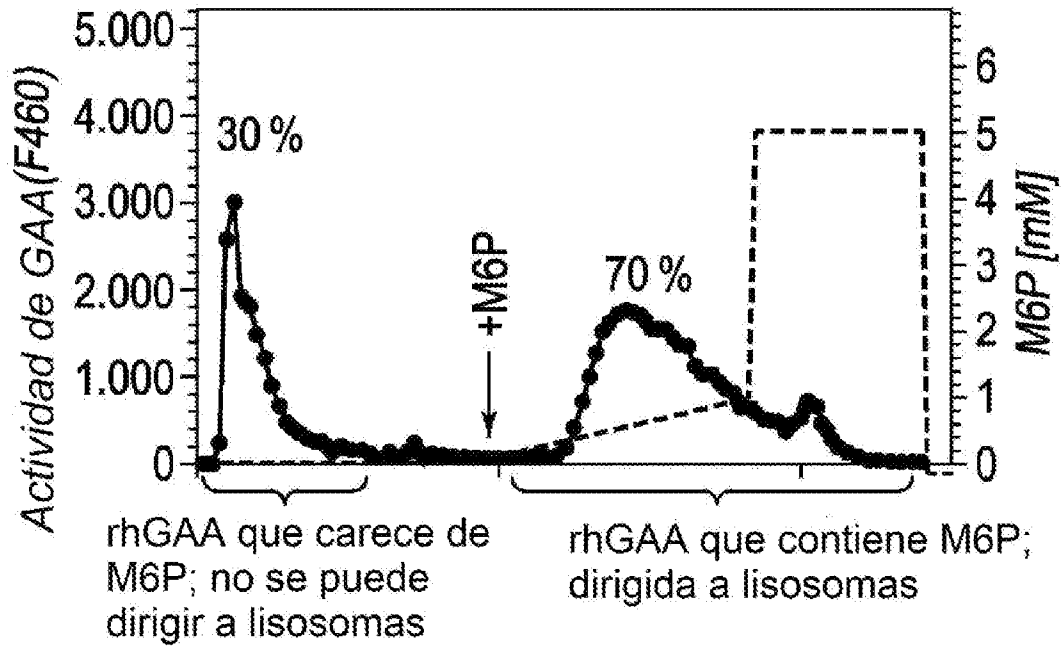


FIG. 5A

Realización 2

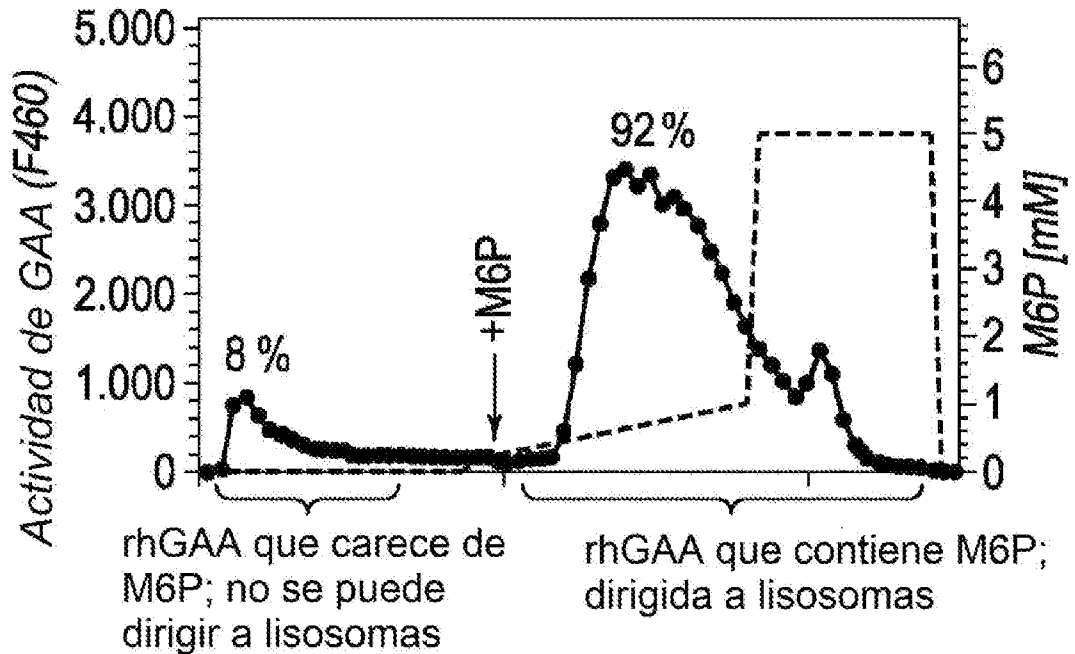


FIG. 5B

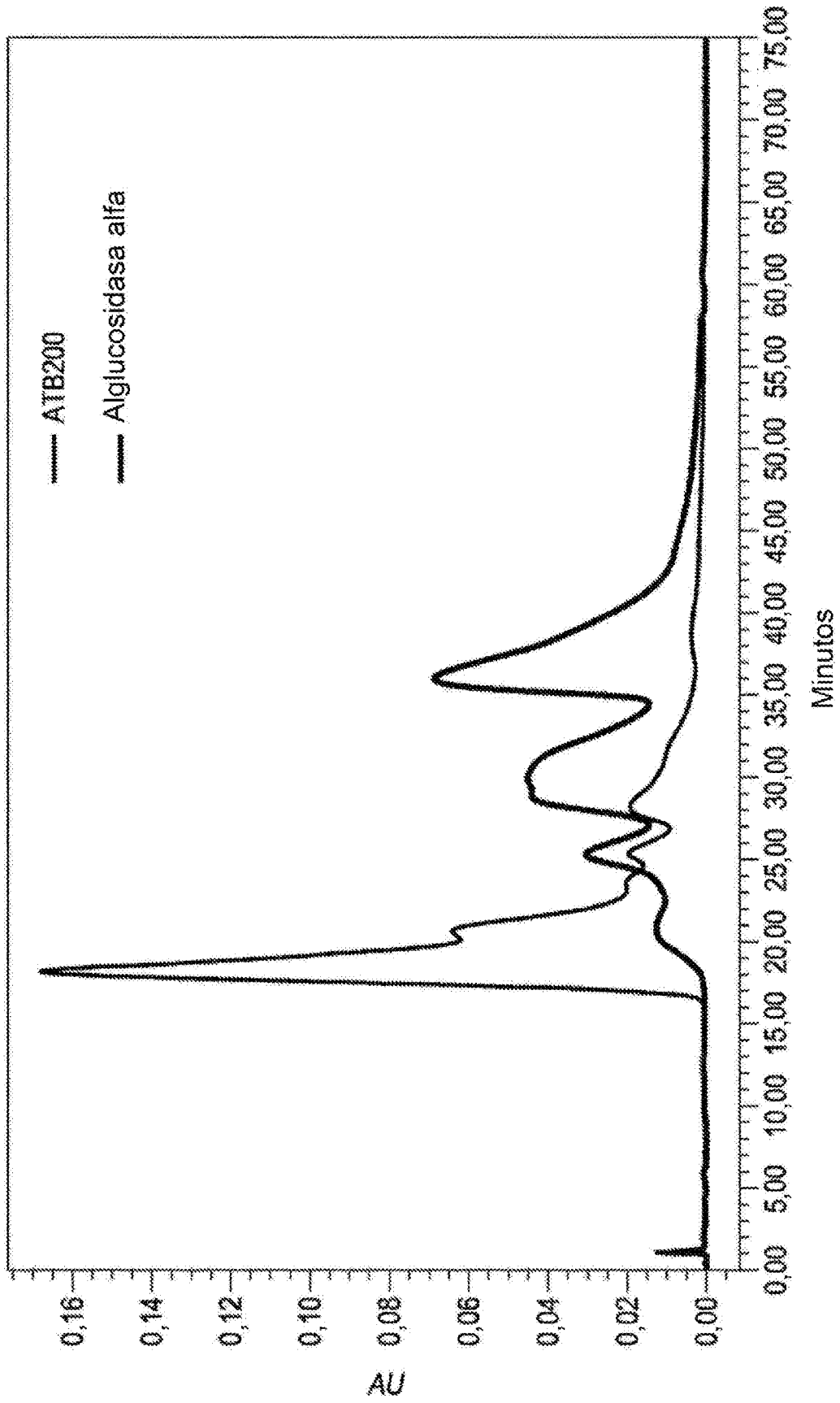


FIG. 6

Distribución de N-glicanos en preparaciones de rhGAA

	Lumizyme	BP-rhGAA*	ATB200
		1	2
N-Glicanos de tipo complejo	70,7%	48,9%	47,5%
N-Glicanos de tipo híbrido	6,7%	9,7%	3,7%
N-Glicanos con alto contenido de manosa:			
No fosforilados	15,8%	23,7%	9,9%
Mono-M6P	5,2%	10,4%	14,2%
Bis-M6P	1,6%	6,8%	24,7%

FIG. 7

### Ocupación de sitio de N-glicosilación de ATB200

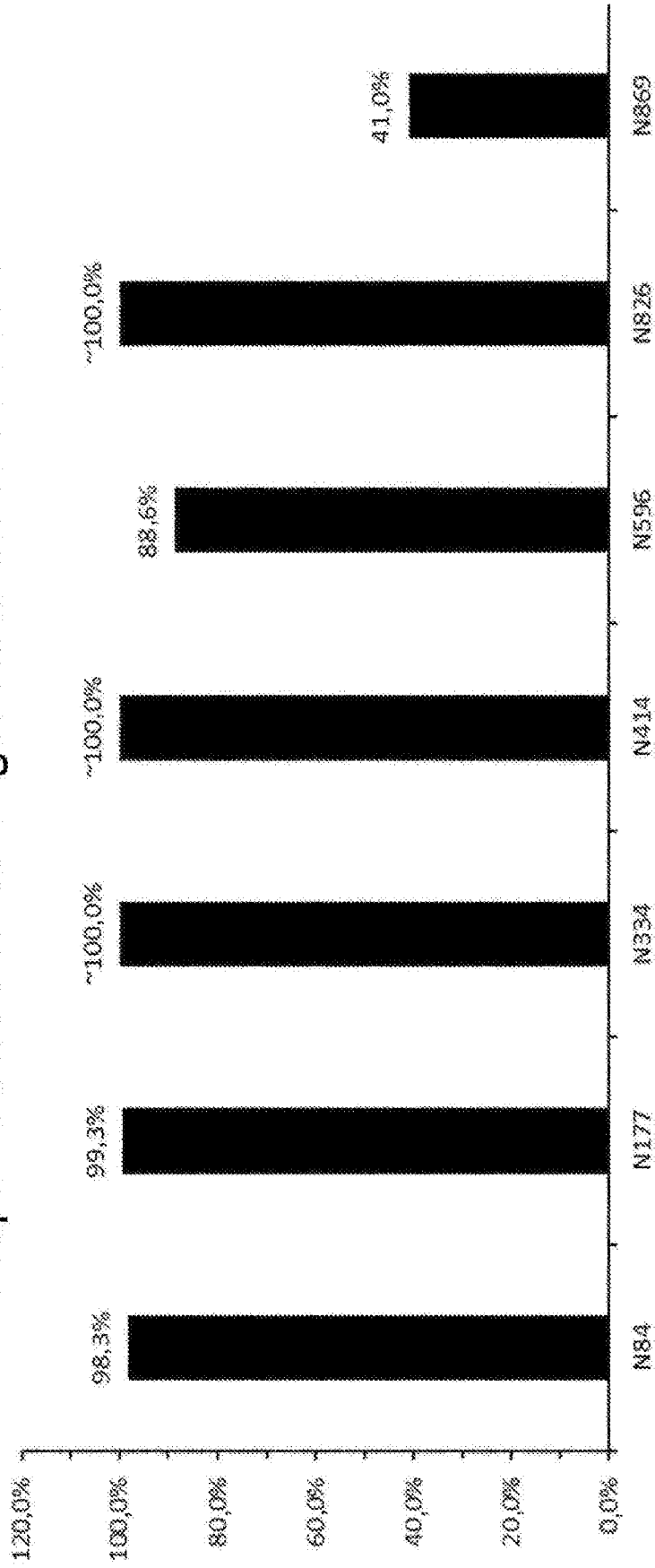


FIG. 8A

Perfil de N-Glicosilación de M84

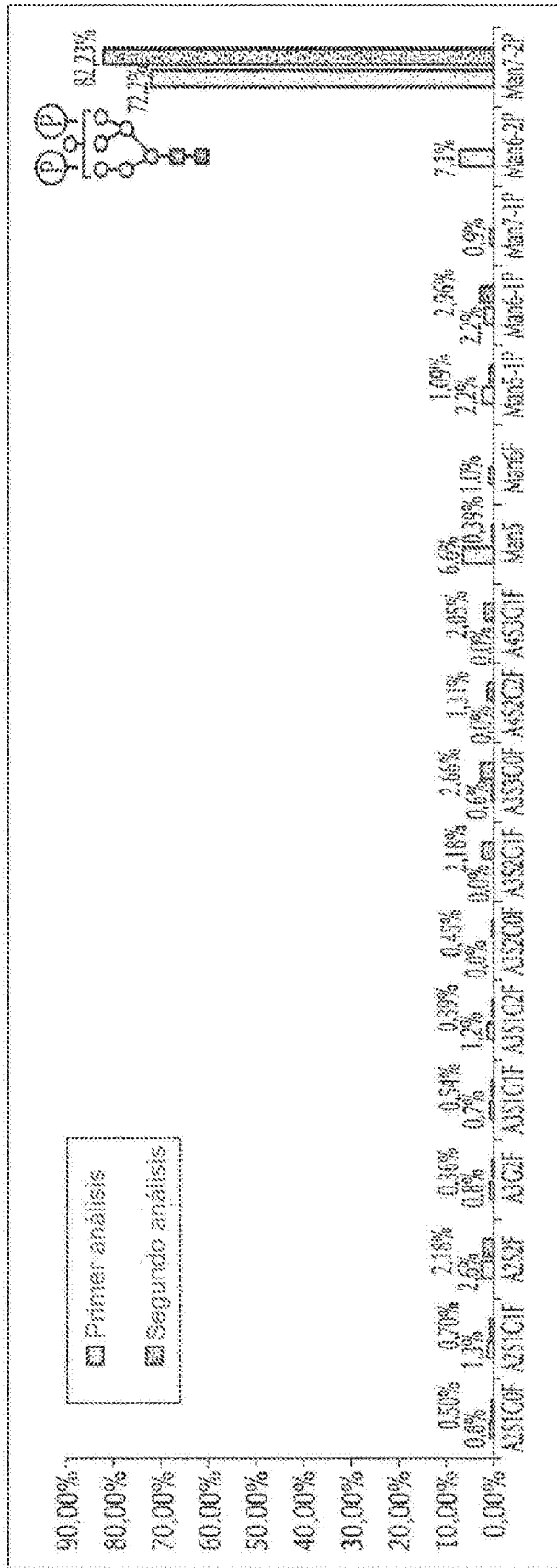


FIG. 8B

Perfil de N-Glicosilación de M177

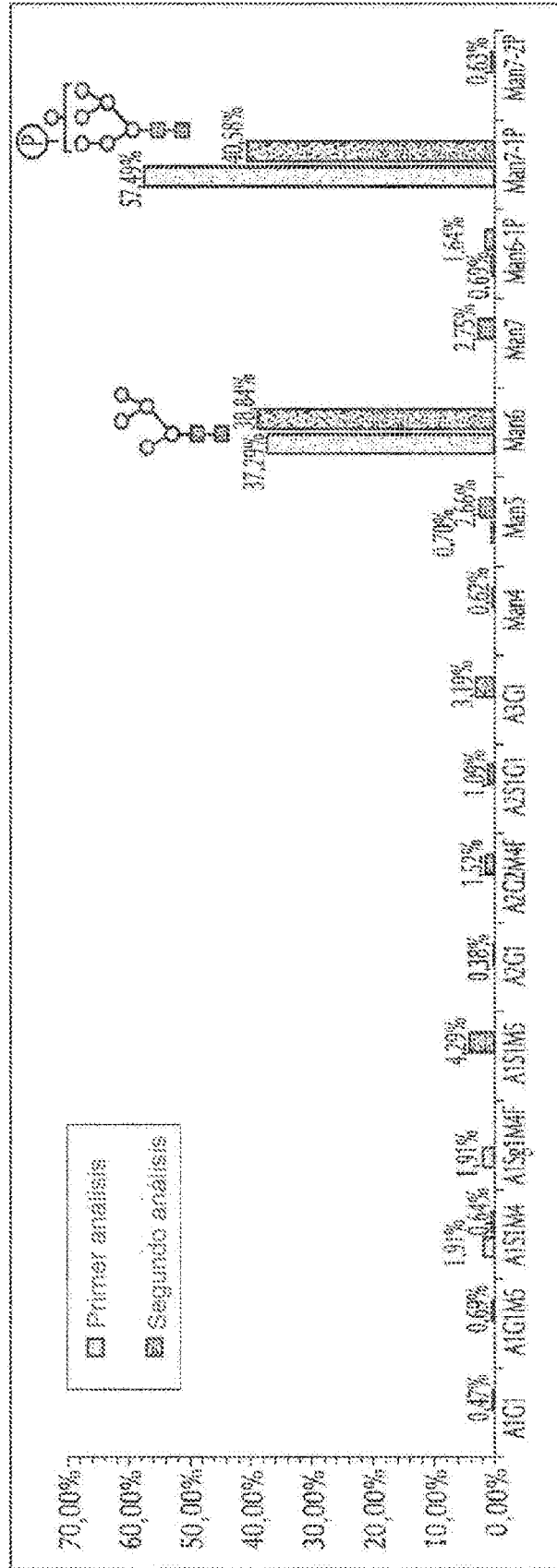


FIG. 8C

Perfil de N-Glicosilación de N324

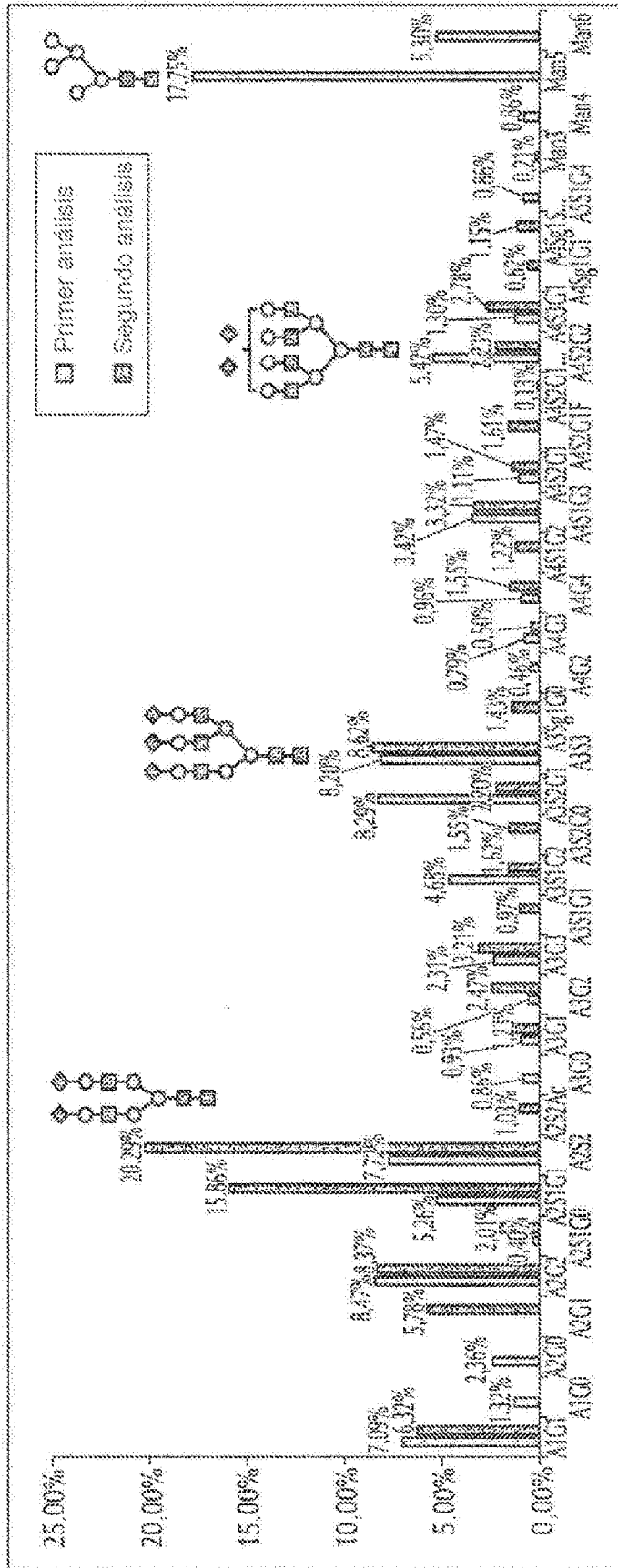


FIG. 8D

Perfil de N-Glicosilación de N414

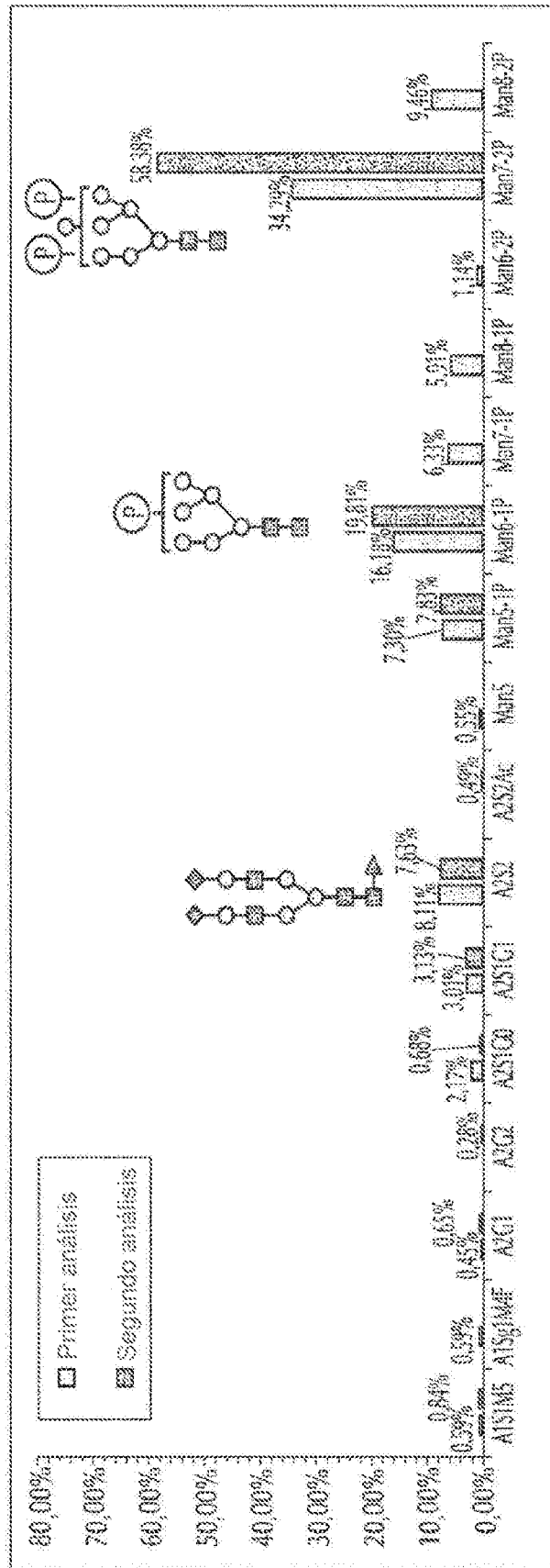


FIG. 8E

Perfil de N-Glicosilación de N596

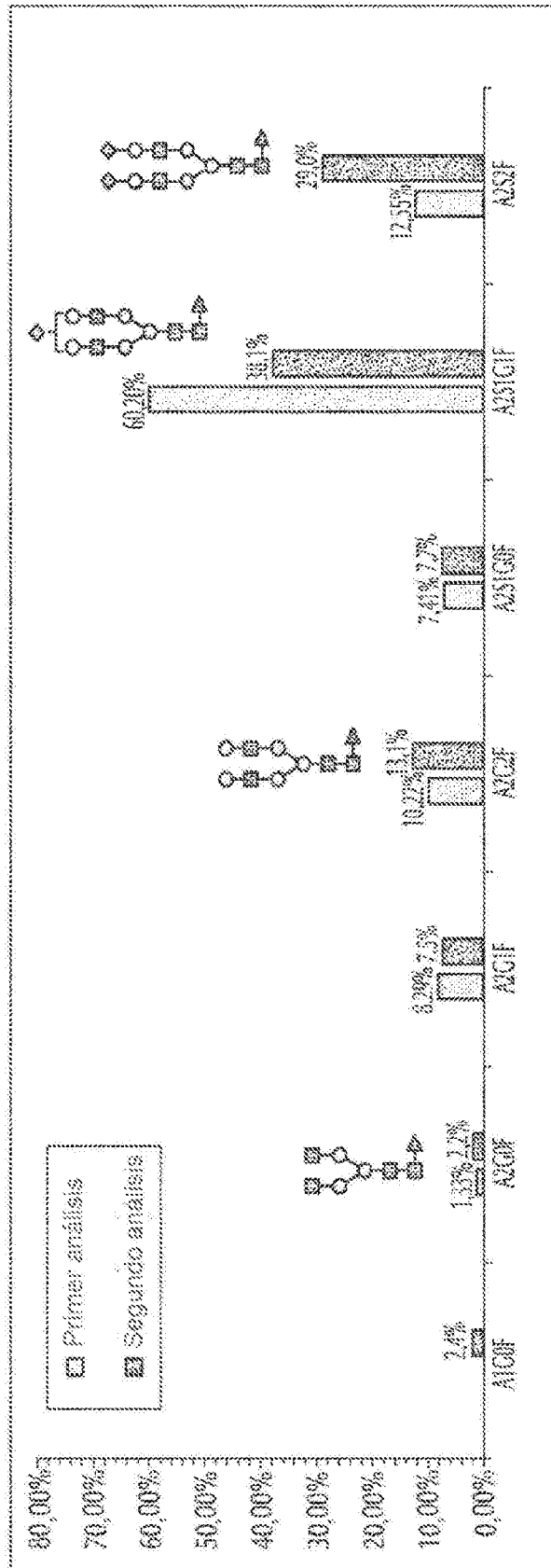


FIG. 8F

Perfil de N-Glicosilación de N626

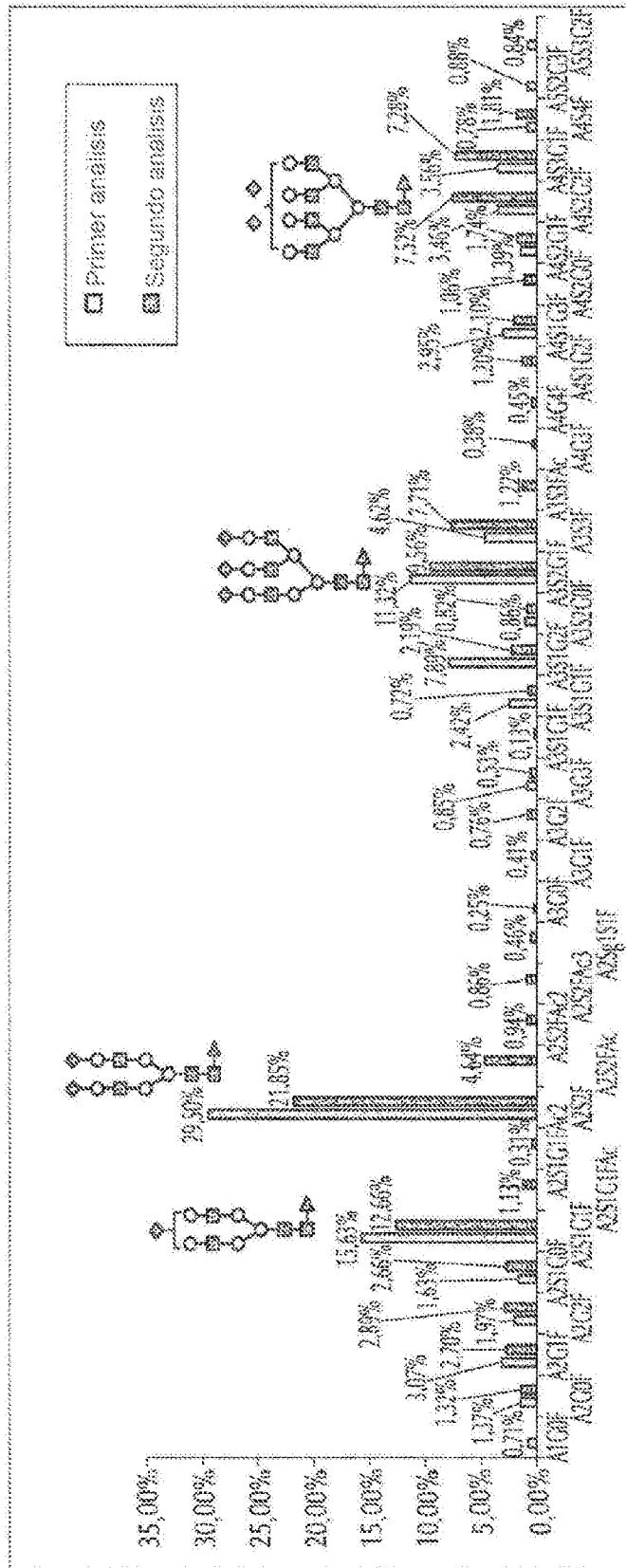


FIG. 8G

Porcentaje relativo de Bis-MGP y Mono-MGP en cada sitio de N-Glicosilación

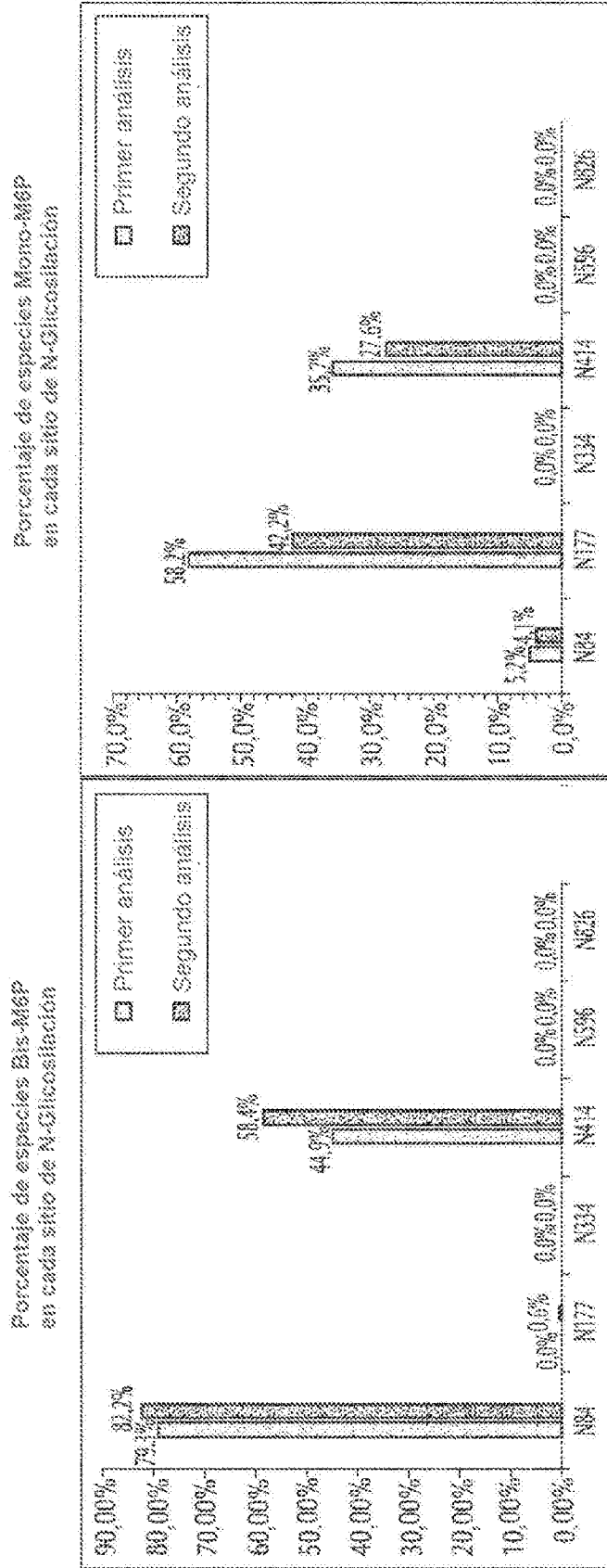


FIG. 8H

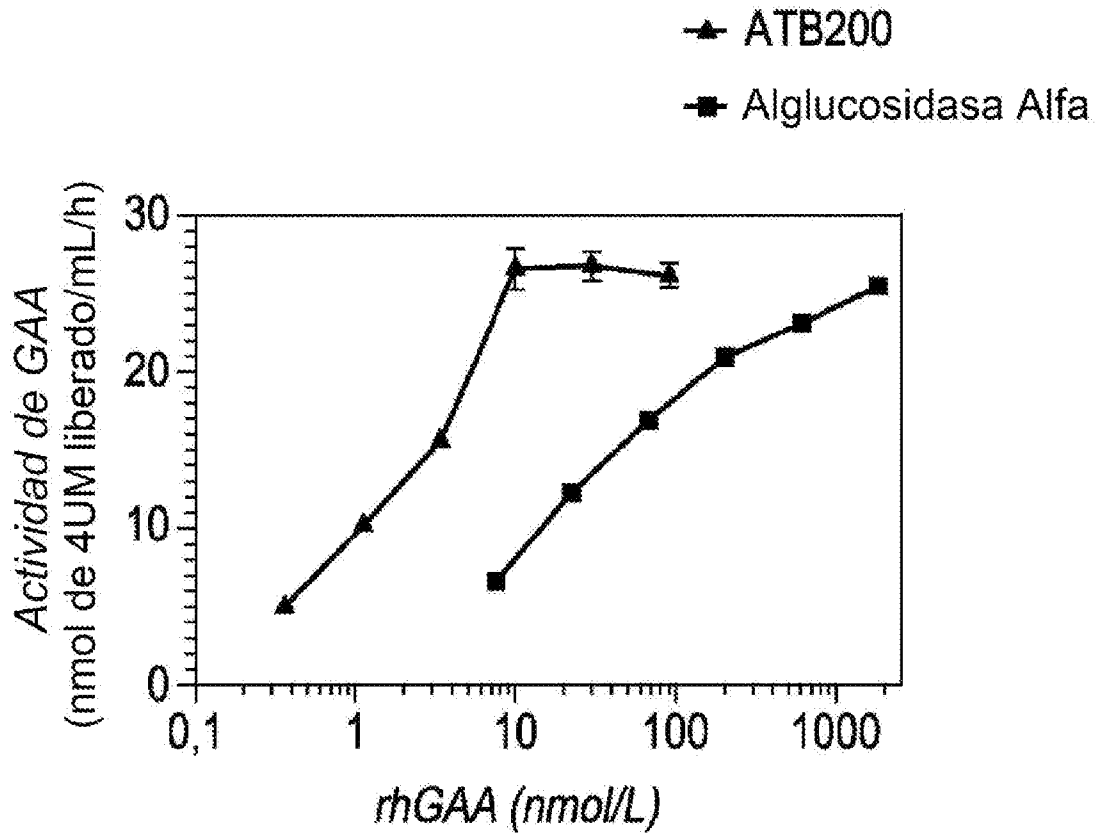


FIG. 9A

Glicano	Alglucosidasa Alfa (mol de bis-glicano/mol de proteína)	ATB200 (mol de bis-glicano/mol de proteína)
<b>Bis-M6P</b>	0,1	1,3

FIG. 9B

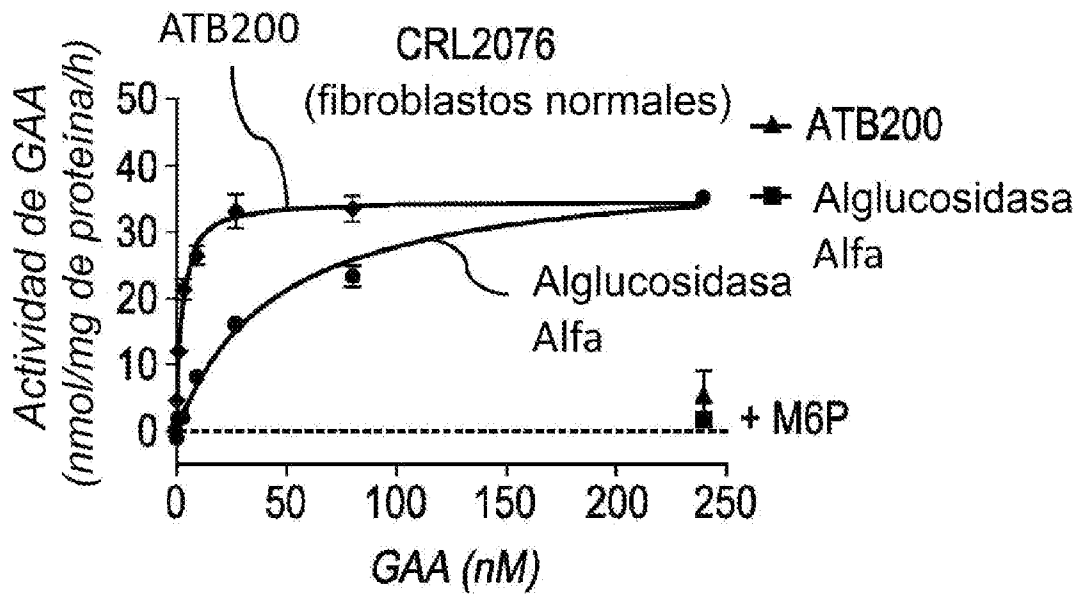


FIG. 10A

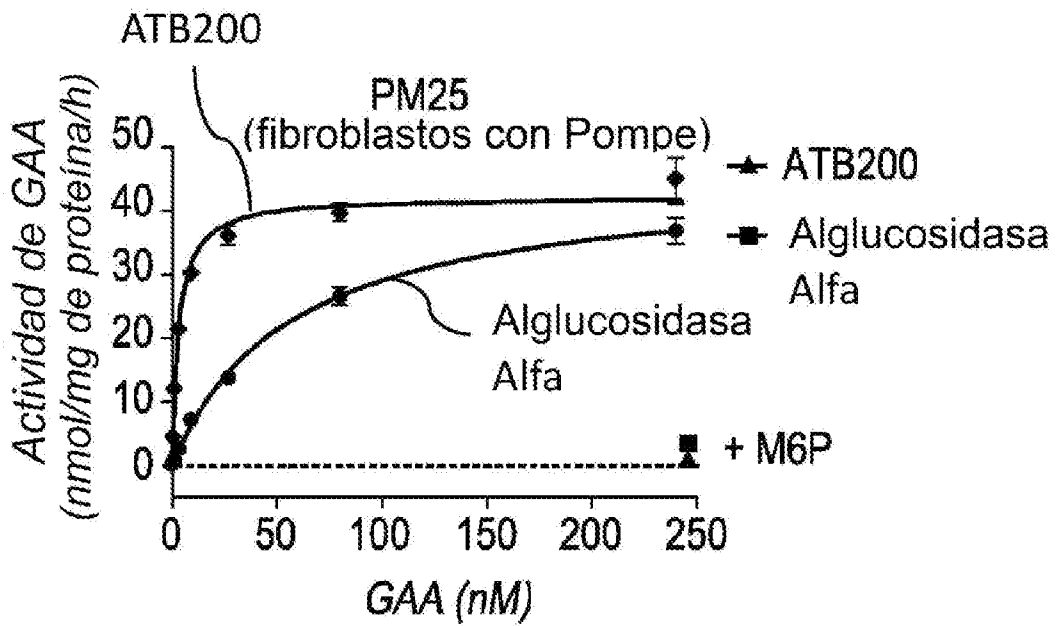


FIG. 10B

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

FIG. 10C

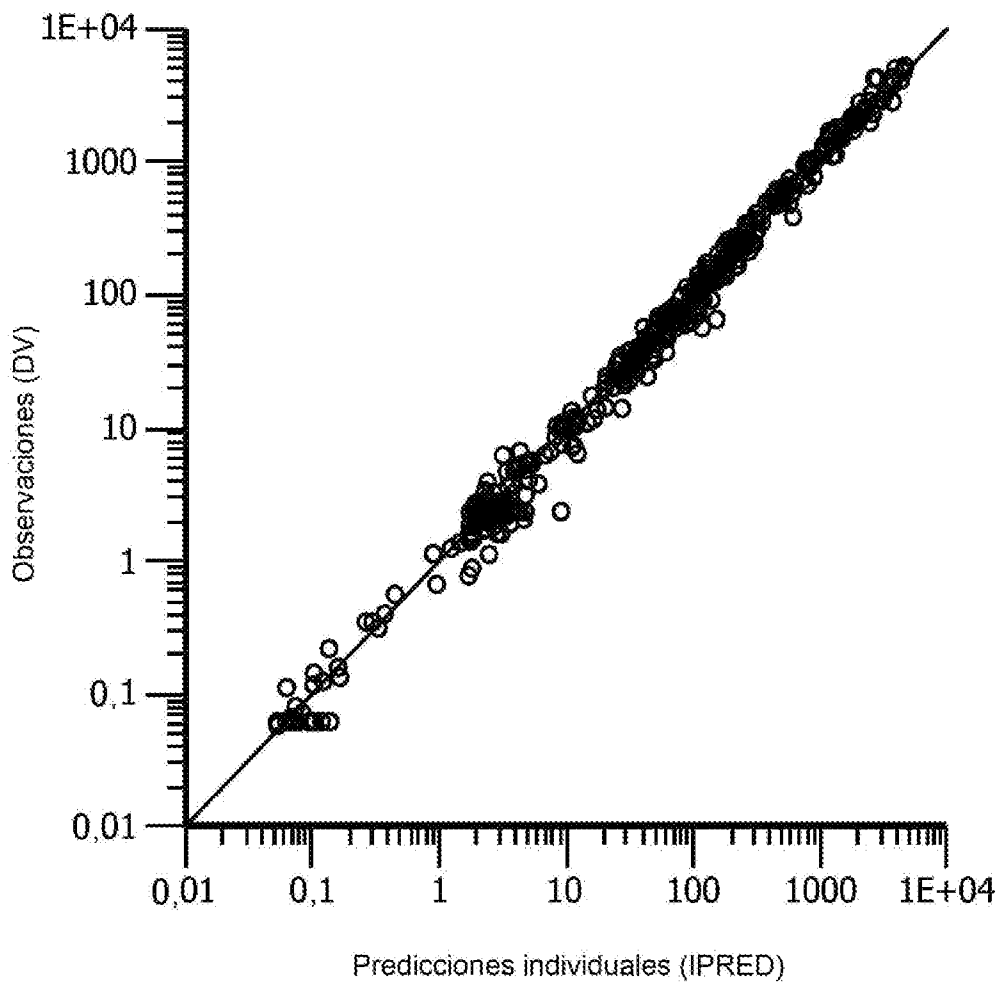


FIG. 11

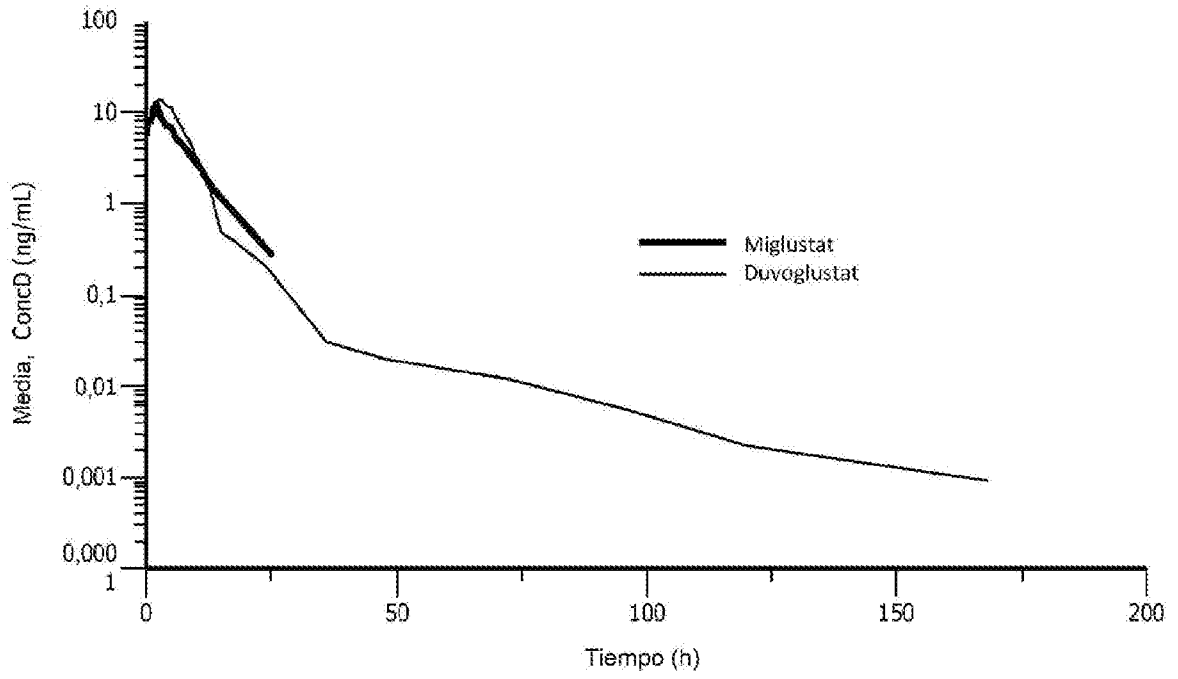


FIG. 12

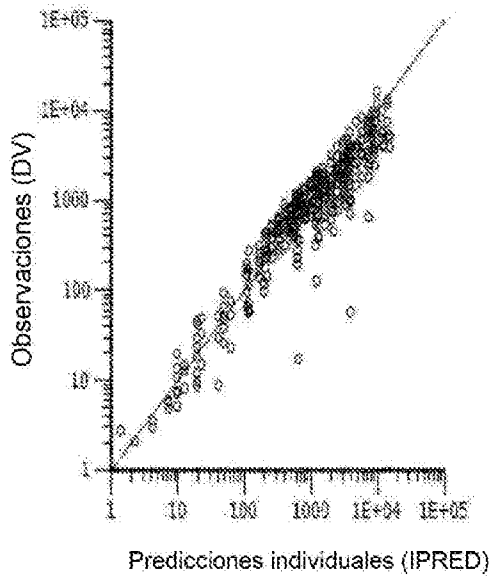


FIG. 13A

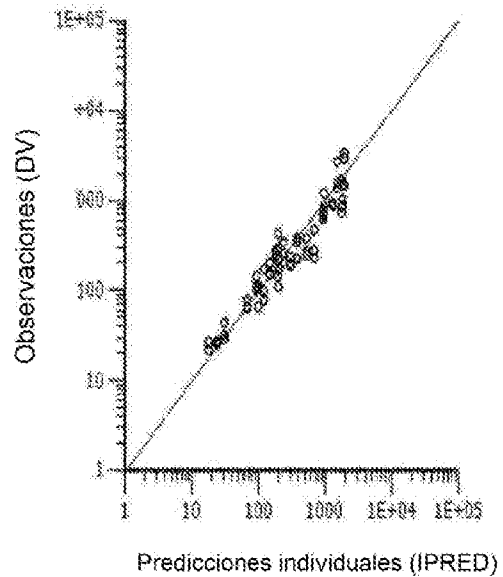


FIG. 13B

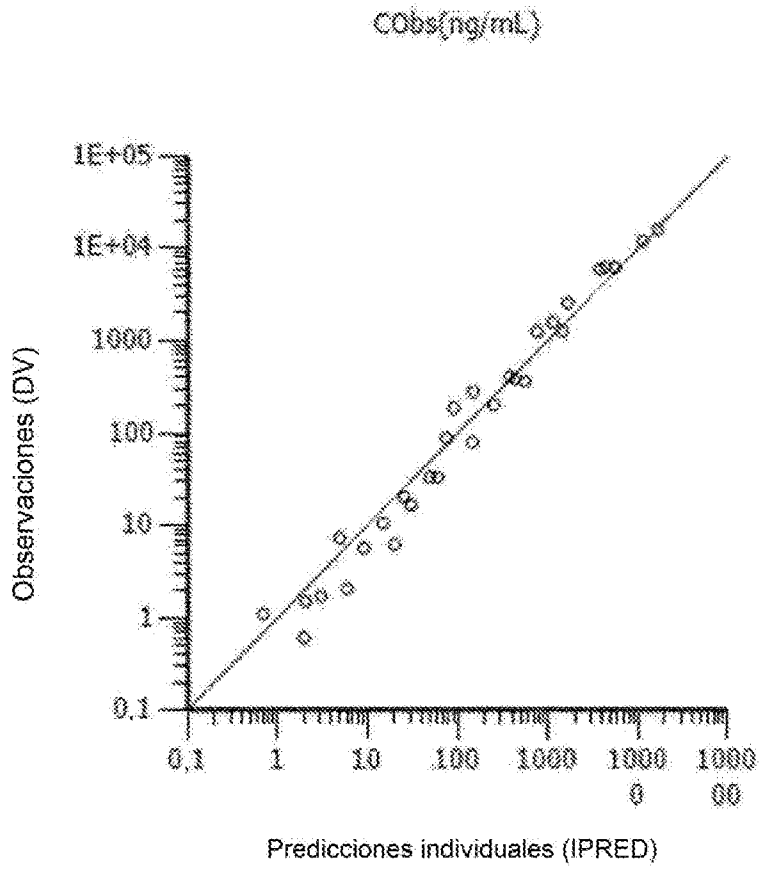


FIG. 14

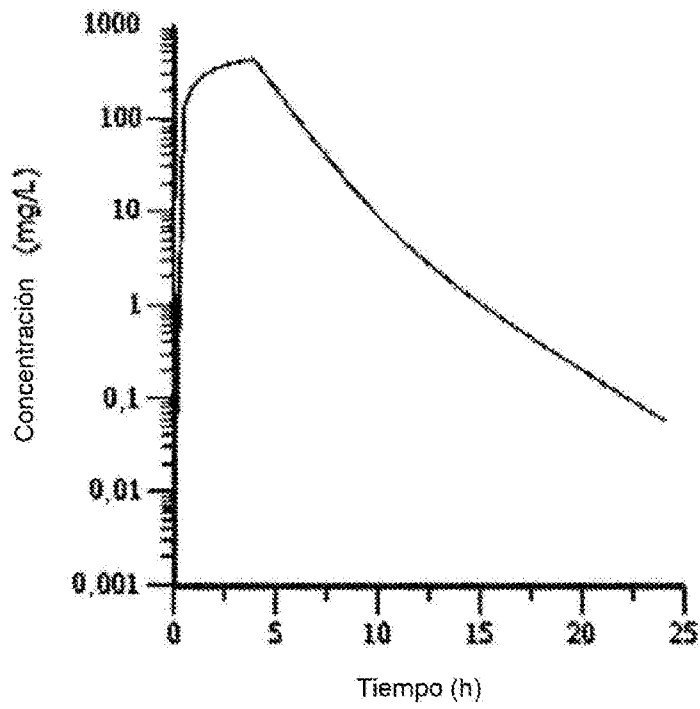


FIG. 15

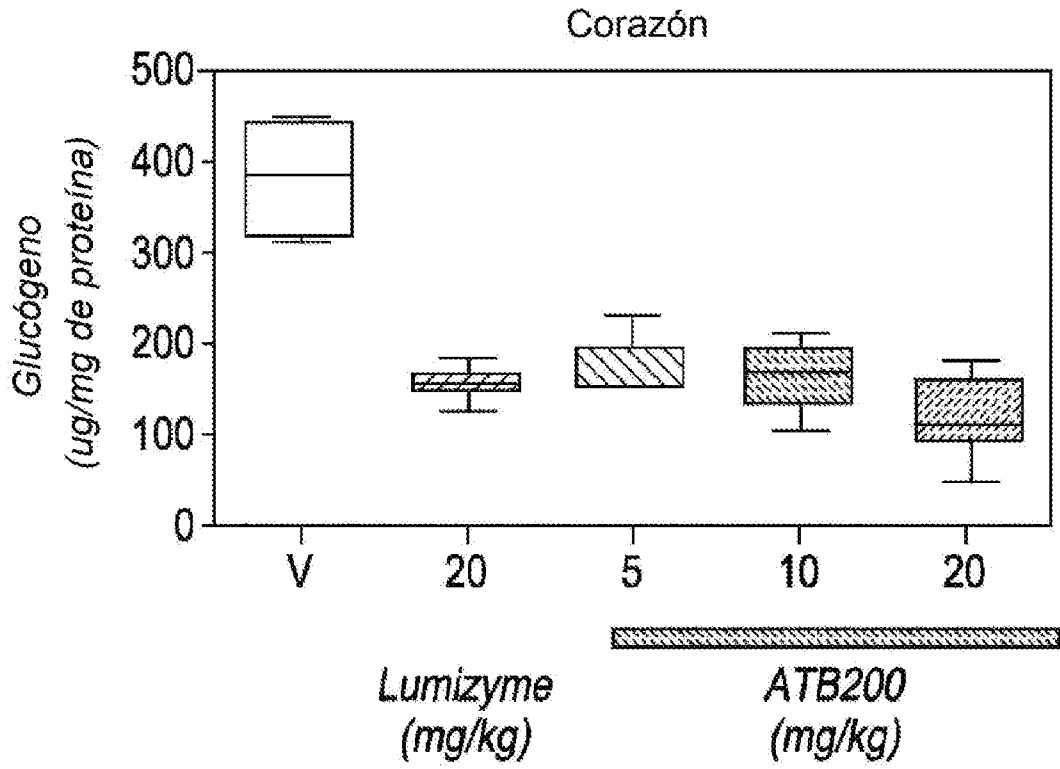


FIG. 16A

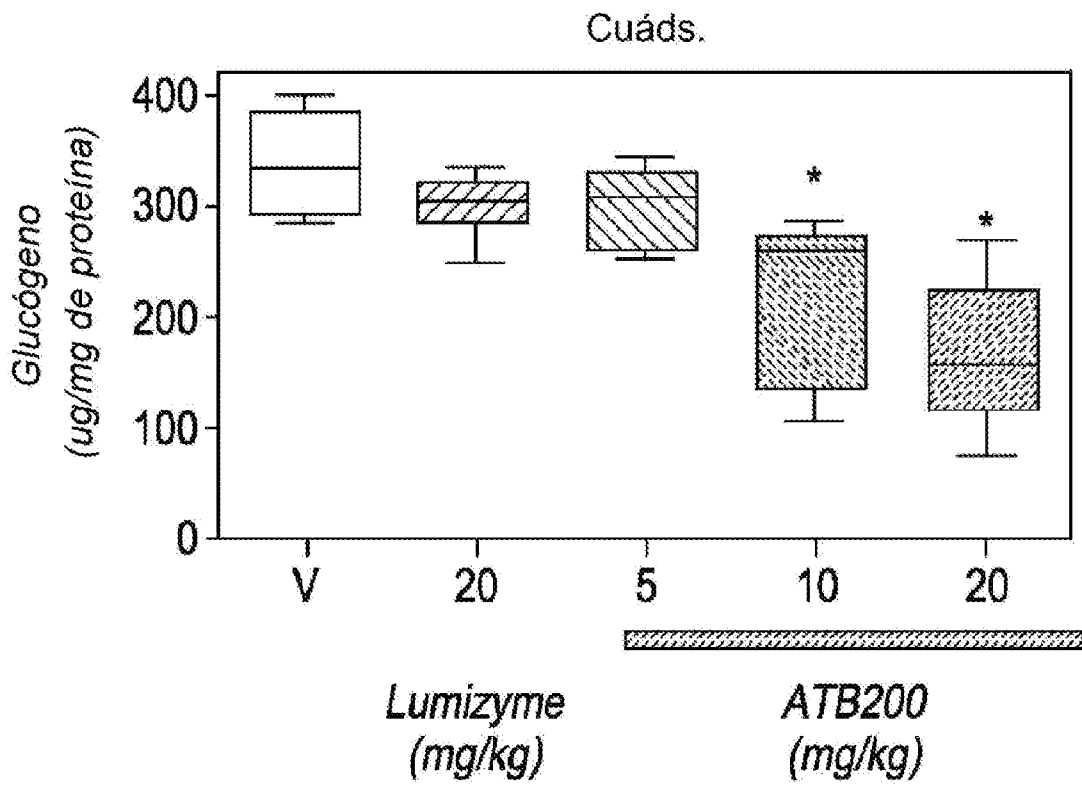
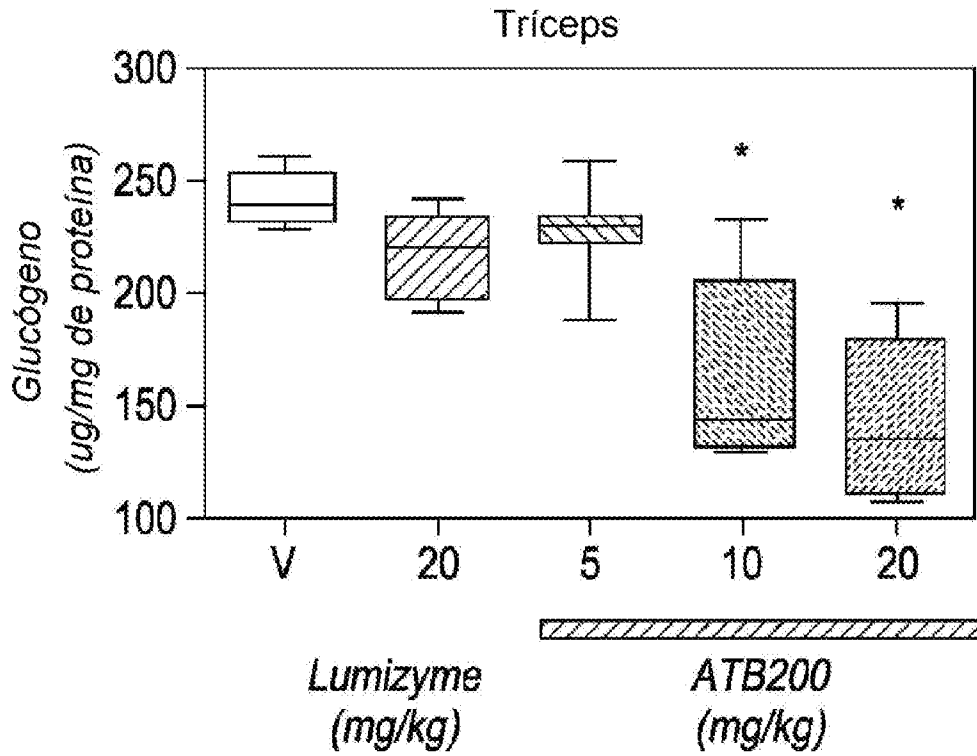
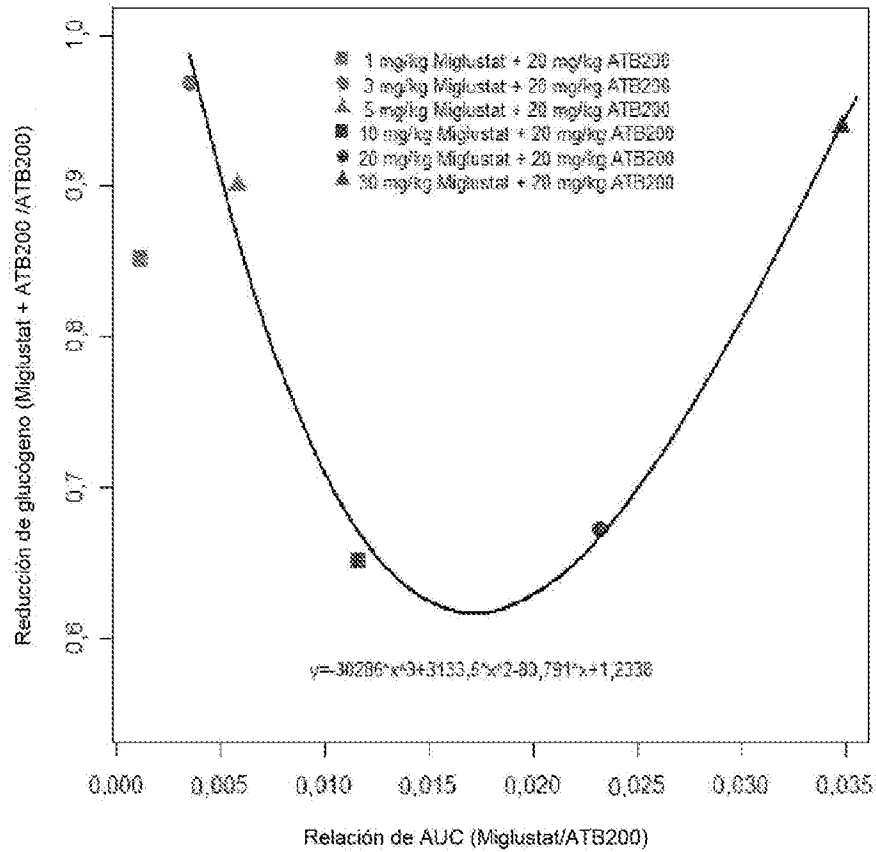


FIG. 16B



**FIG. 16C**



**FIG. 17**

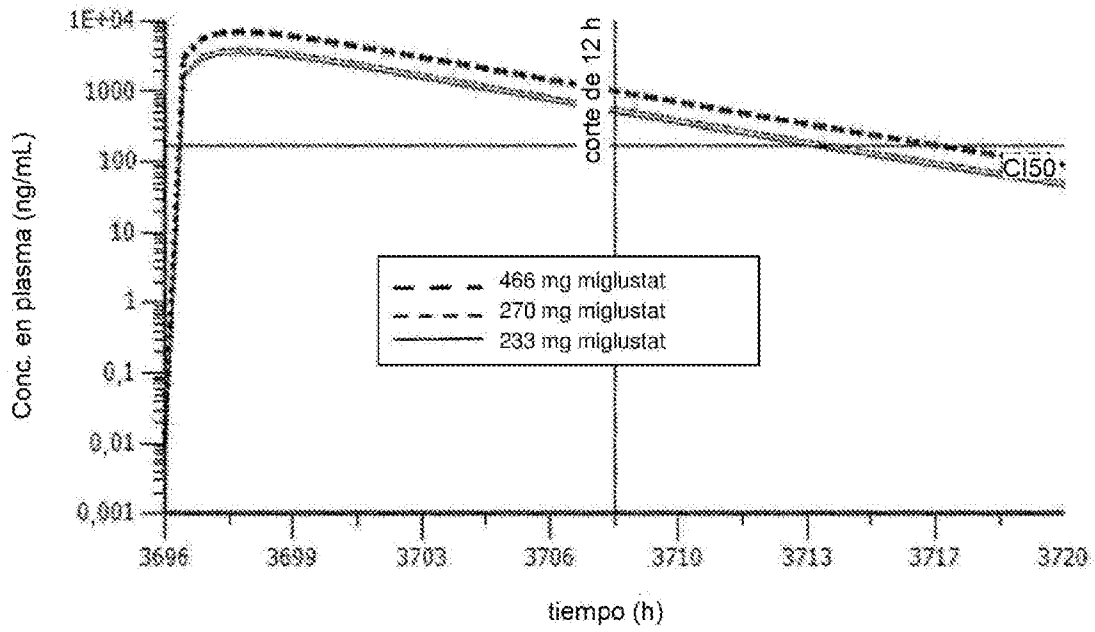


FIG. 18

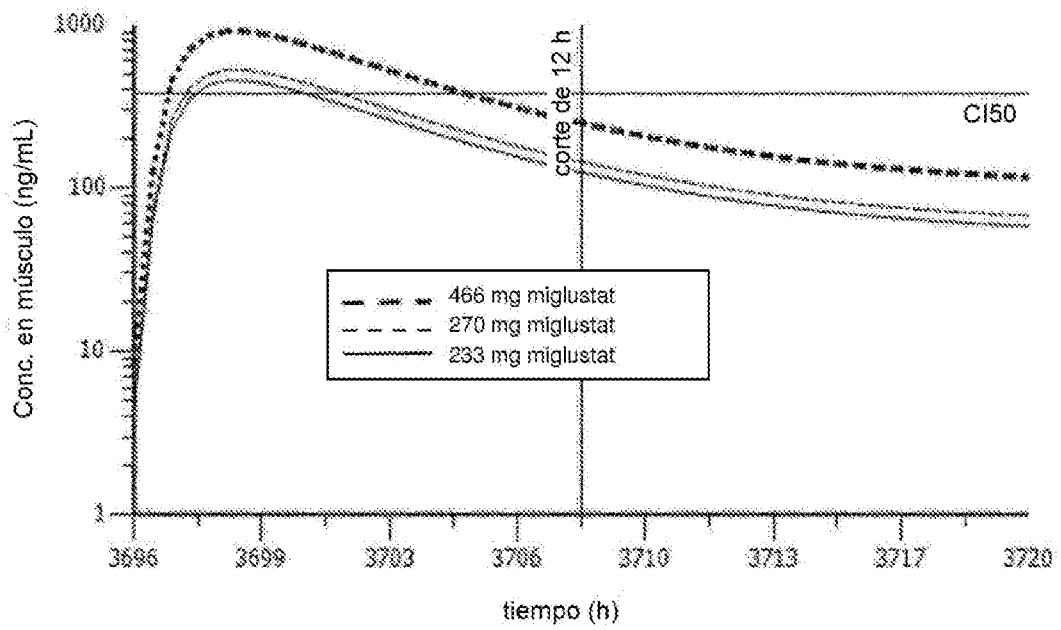


FIG. 19

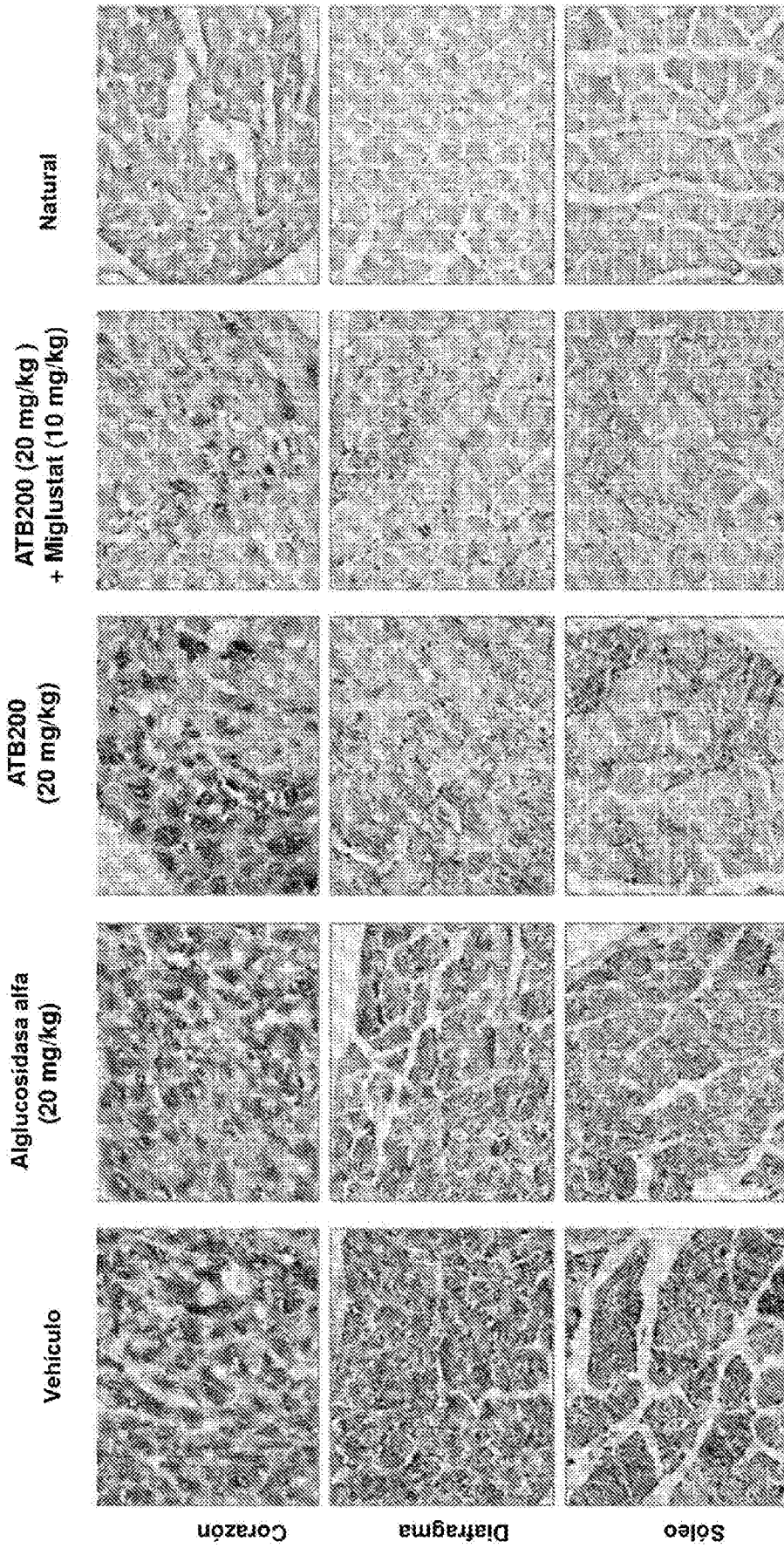


FIG. 20

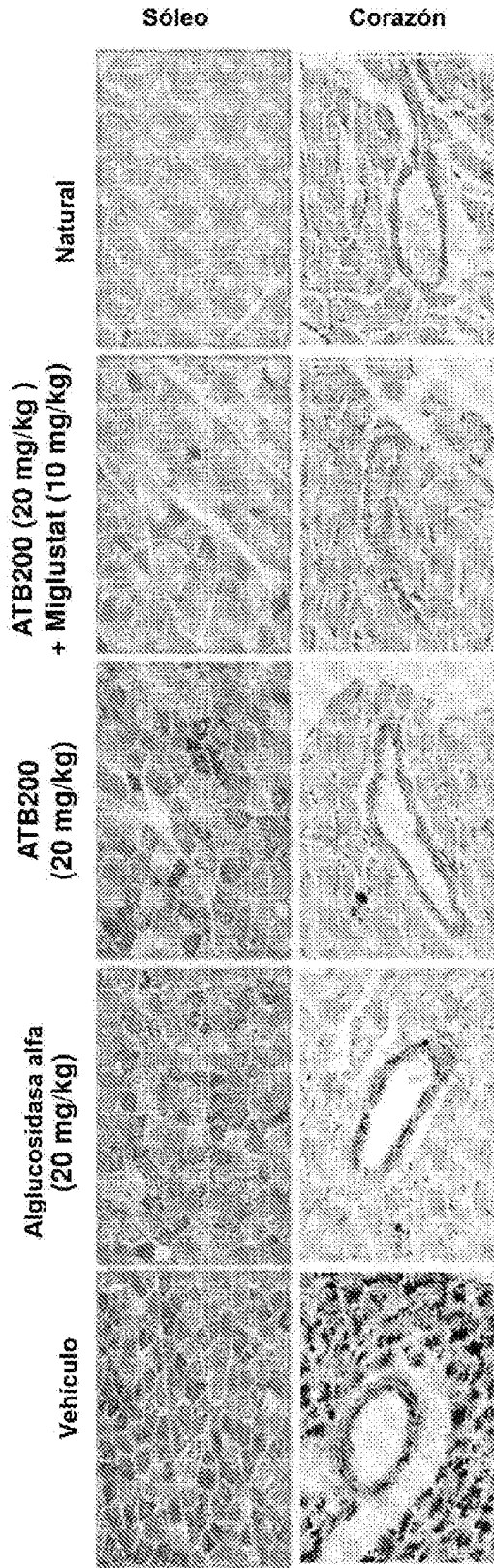


FIG. 21

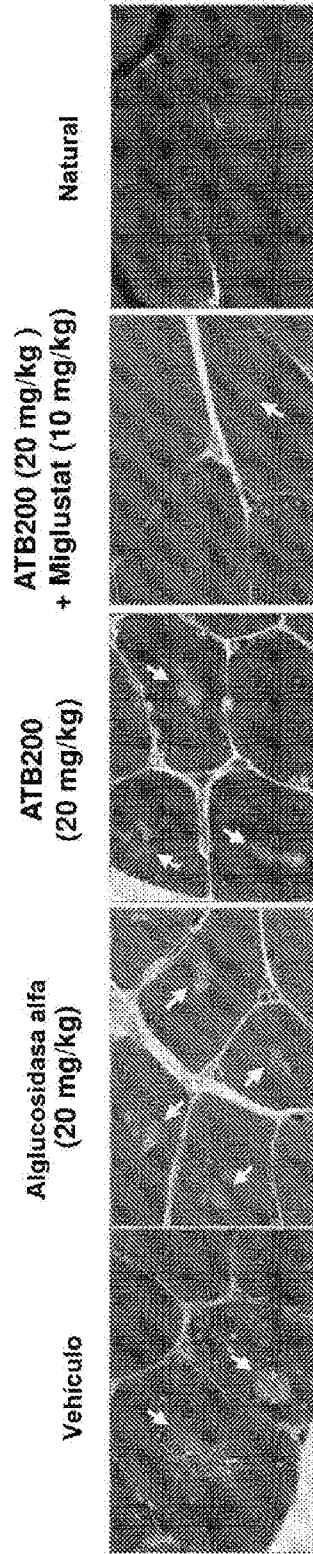


FIG. 22

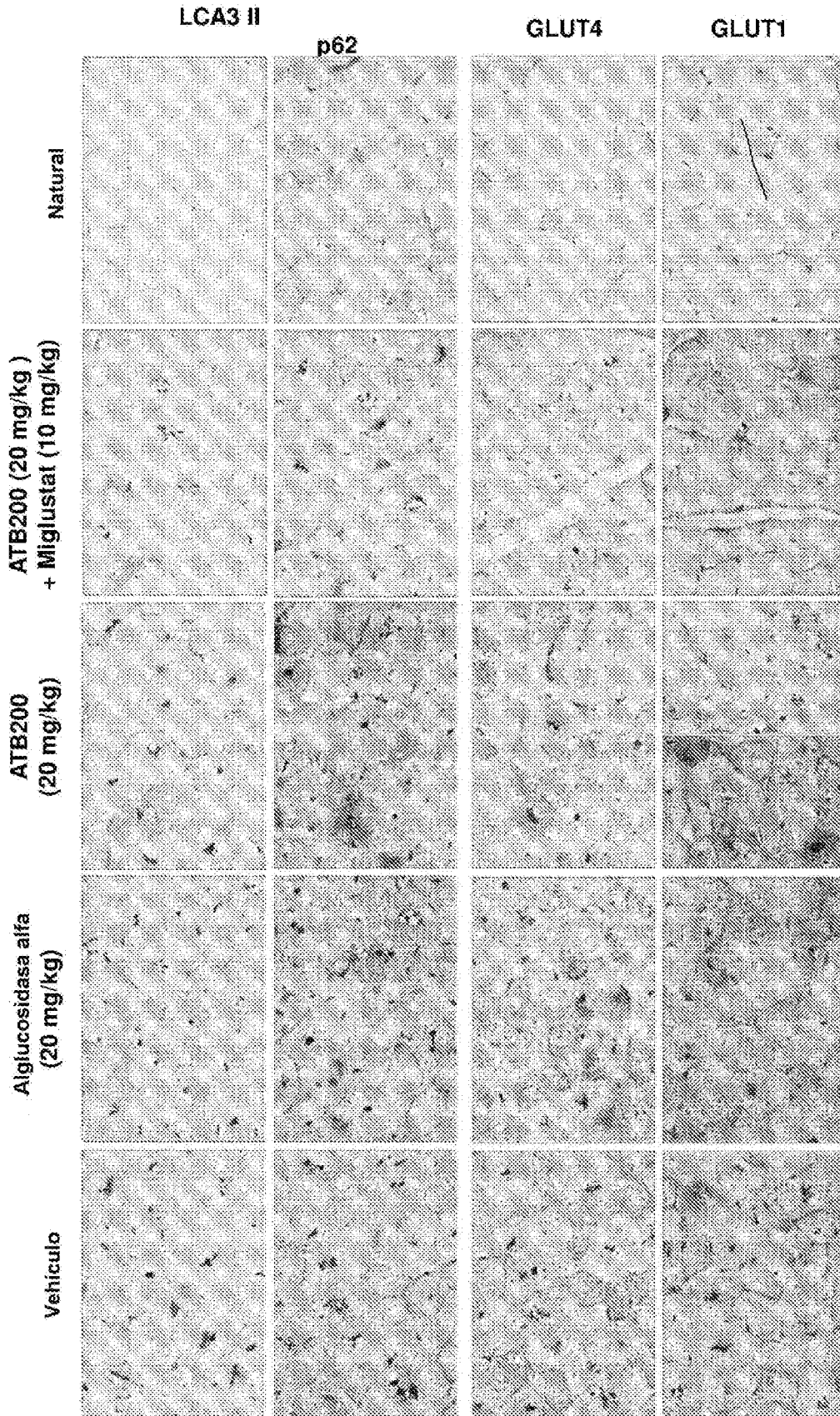


FIG. 23

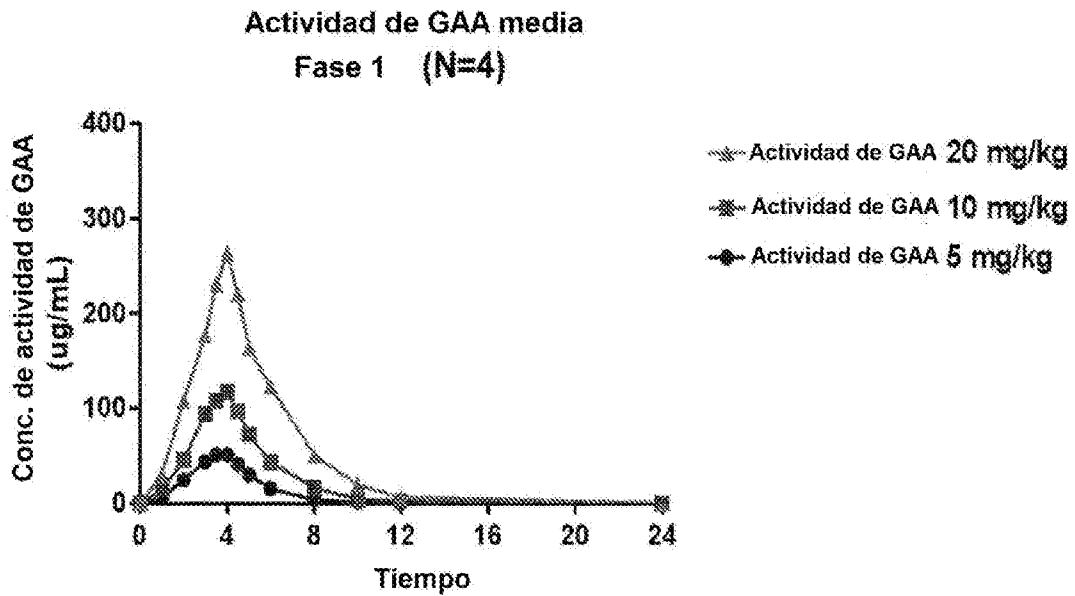


FIG. 24A

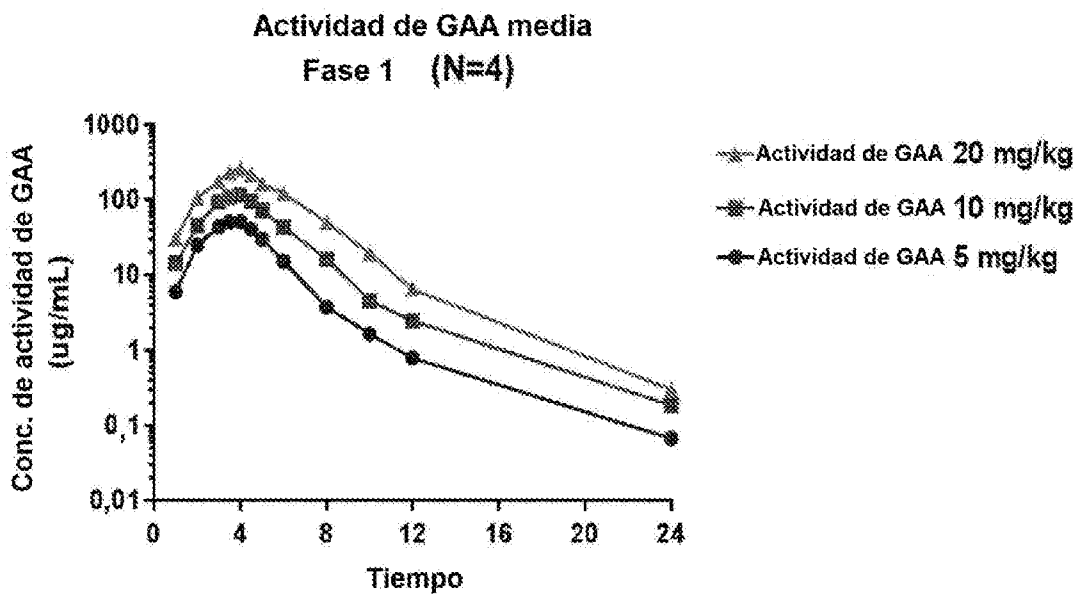


FIG. 24B

Actividad de GAA media (DU) para 20 mg/kg solos frente a 20 mg/kg + 130 mg o 260 mg de Miglustat

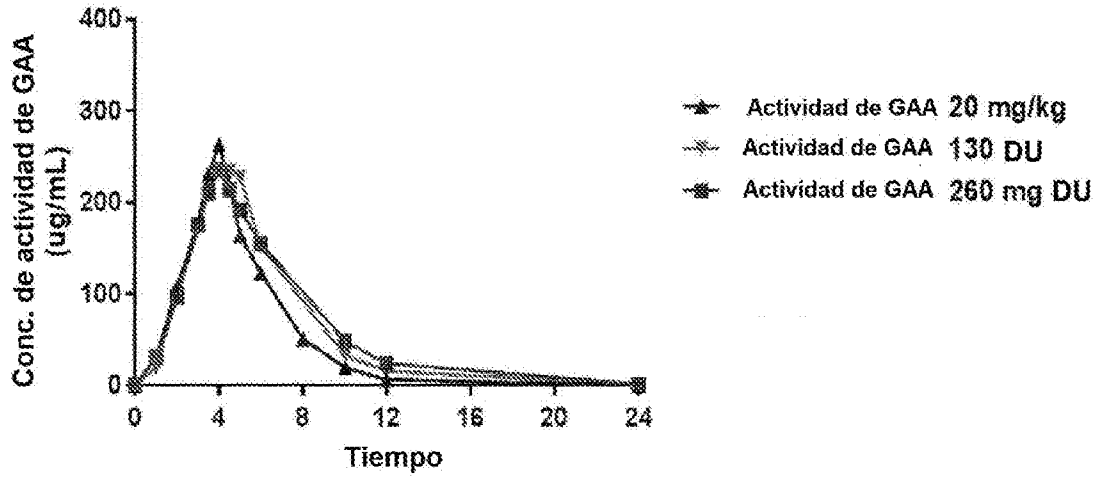


FIG. 24C

Actividad de GAA media (DU) para 20 mg/kg solos frente a 20 mg/kg + 130 mg o 260 mg de Miglustat

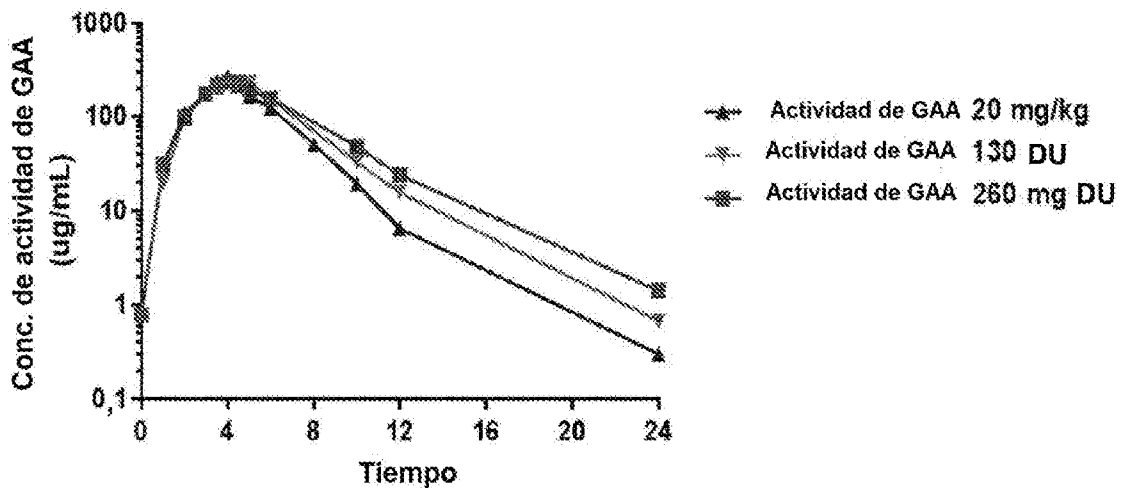


FIG. 24D

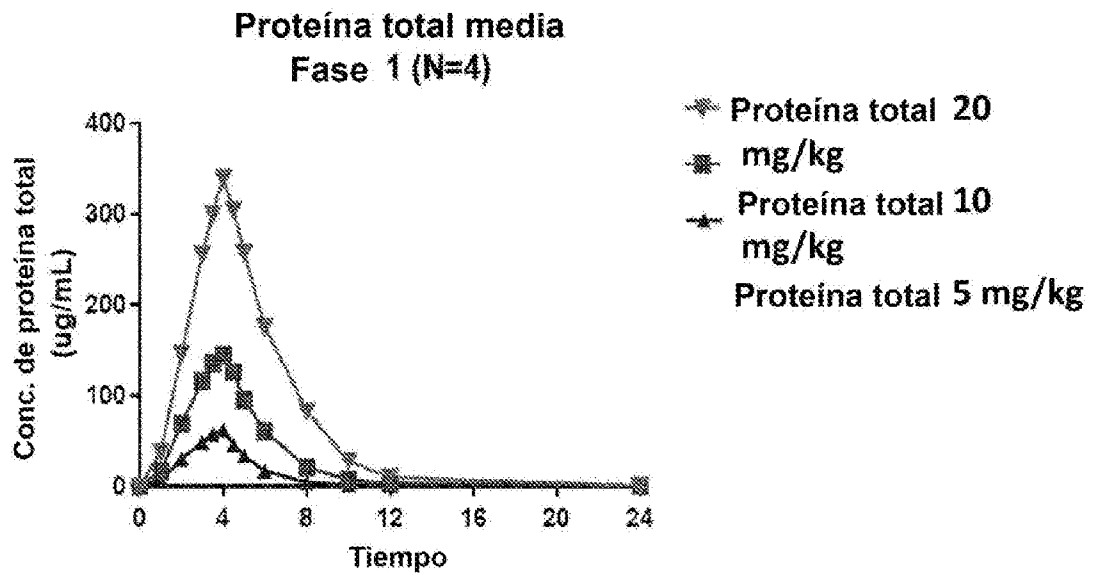


FIG. 25A

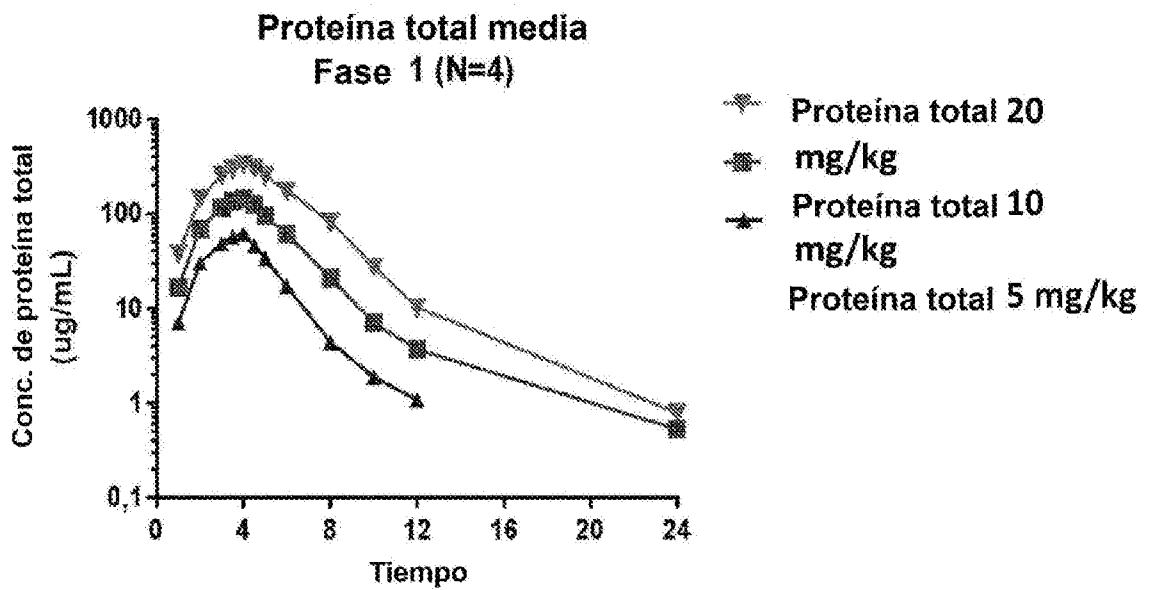


FIG. 25B

Proteína total media para 20 mg/kg solos frente a  
20 mg/kg + 130 mg o 260 mg de Miglustat

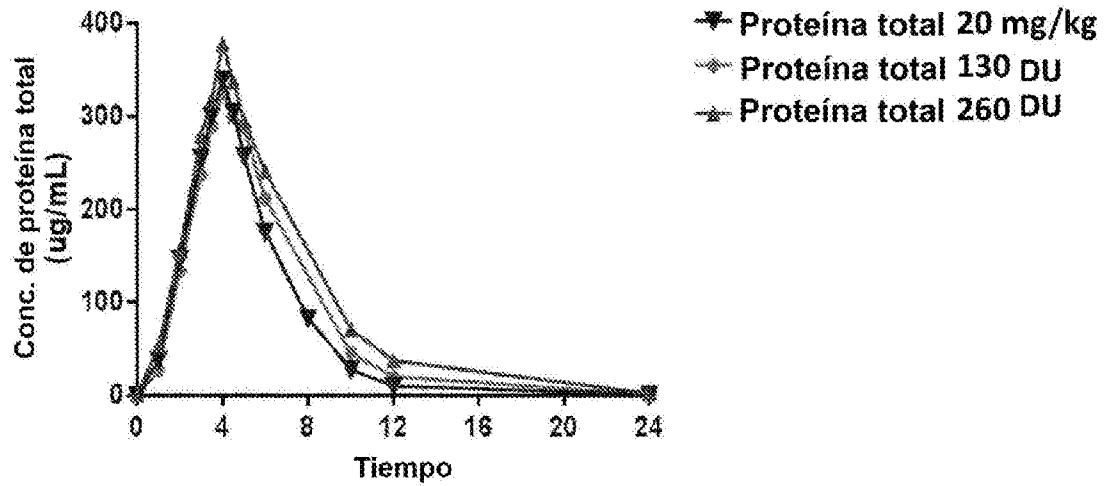


FIG. 25C

Proteína total media para 20 mg/kg solos frente  
a 20 mg/kg + 130 mg o 260 mg de Miglustat

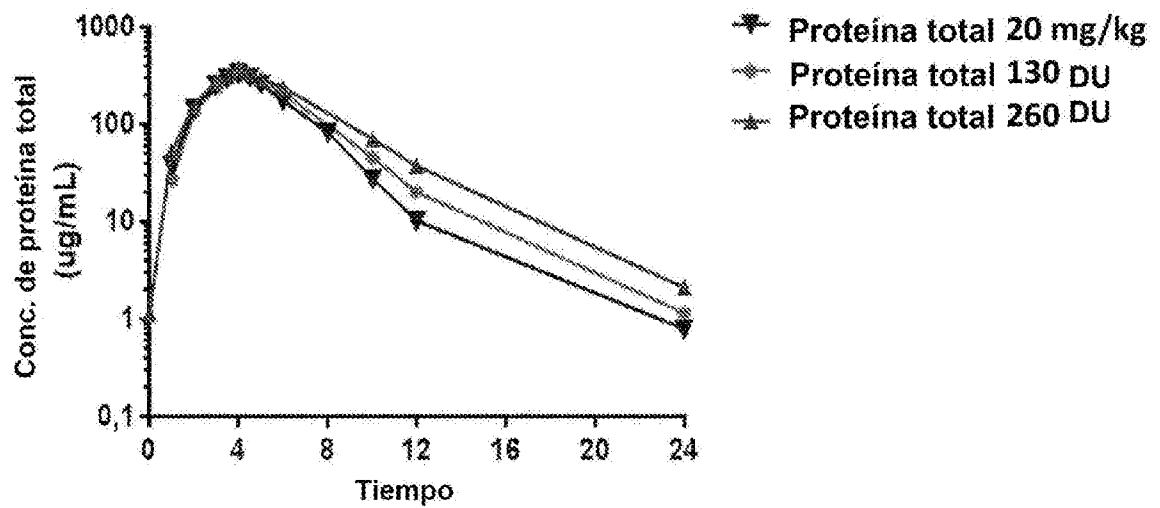


FIG. 25D

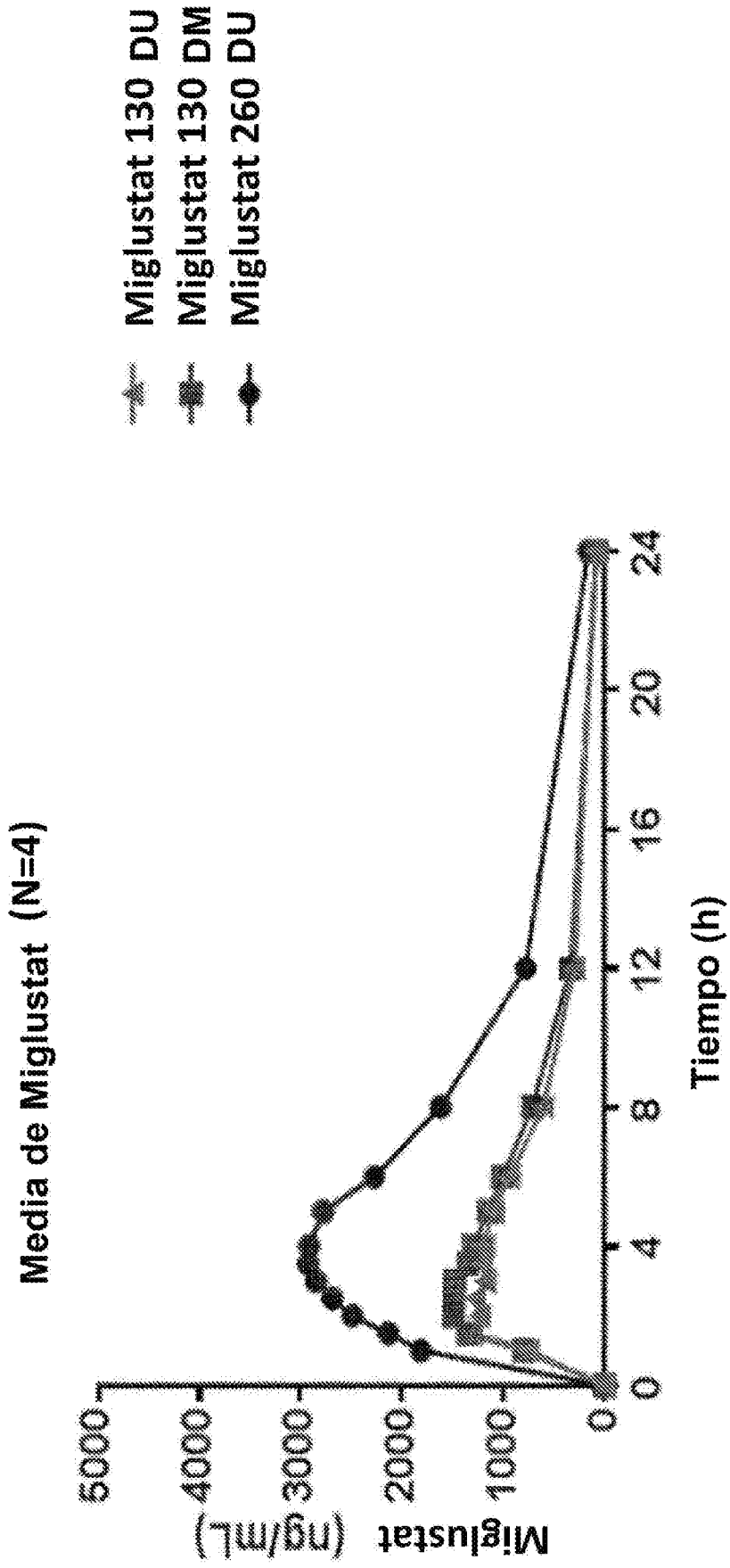


FIG. 26

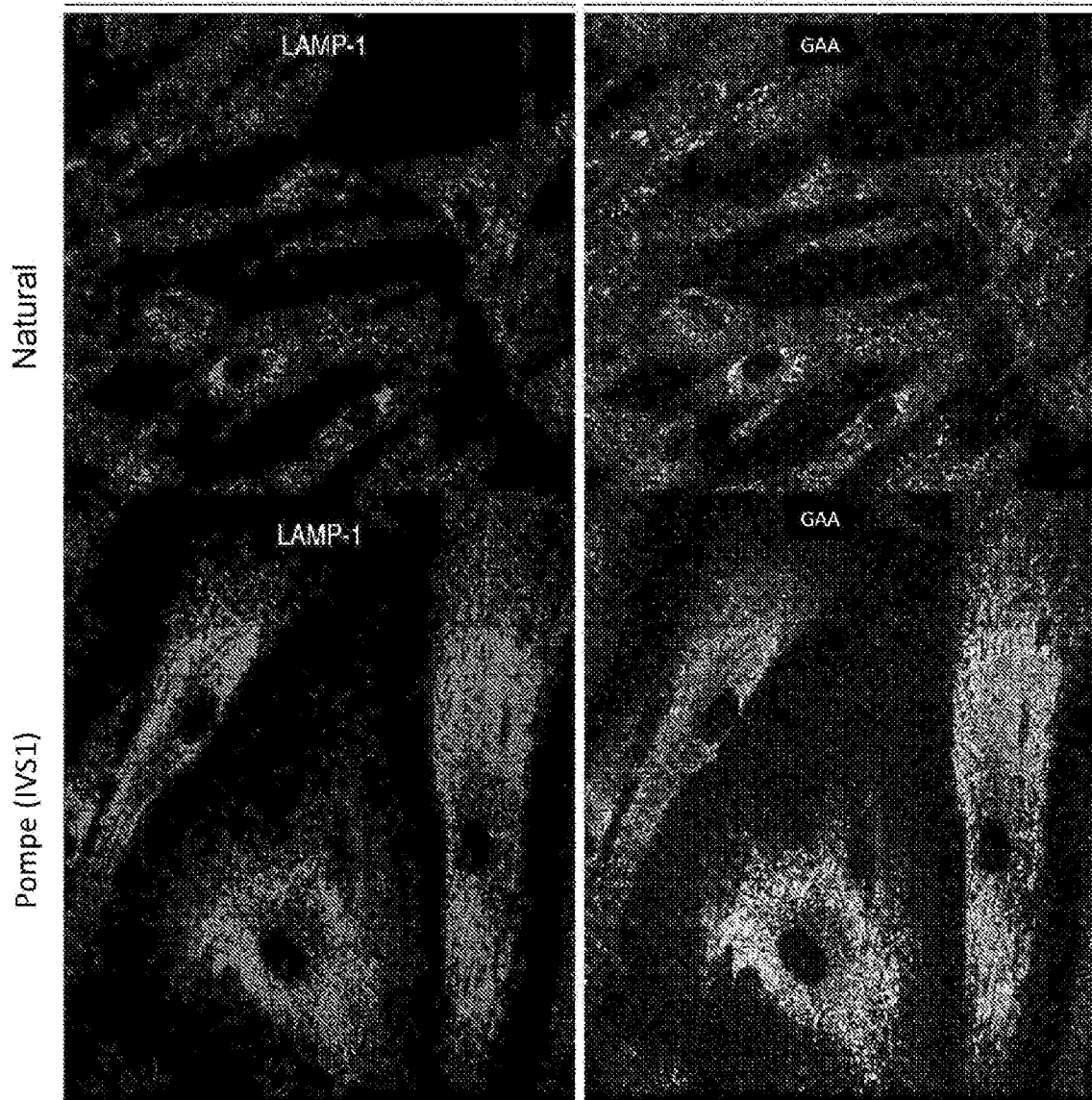


FIG. 27

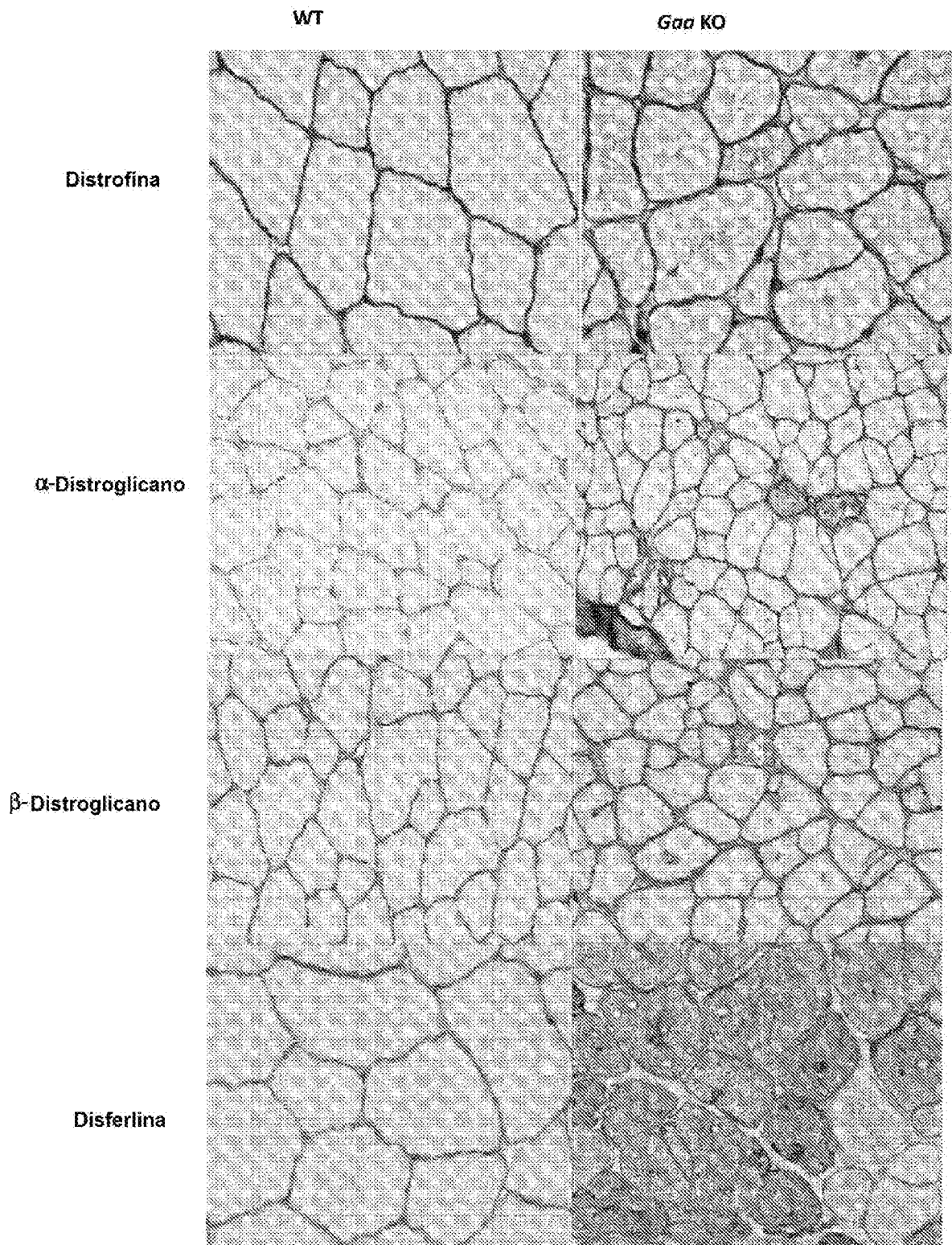


FIG. 28

IHC de LAMP1

Ampliación = 200x

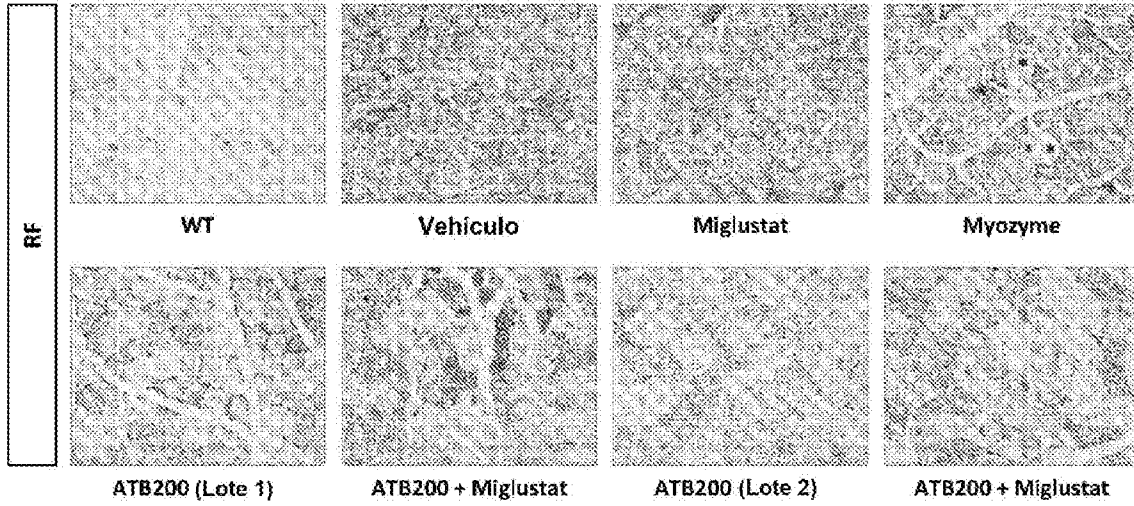


FIG. 29A

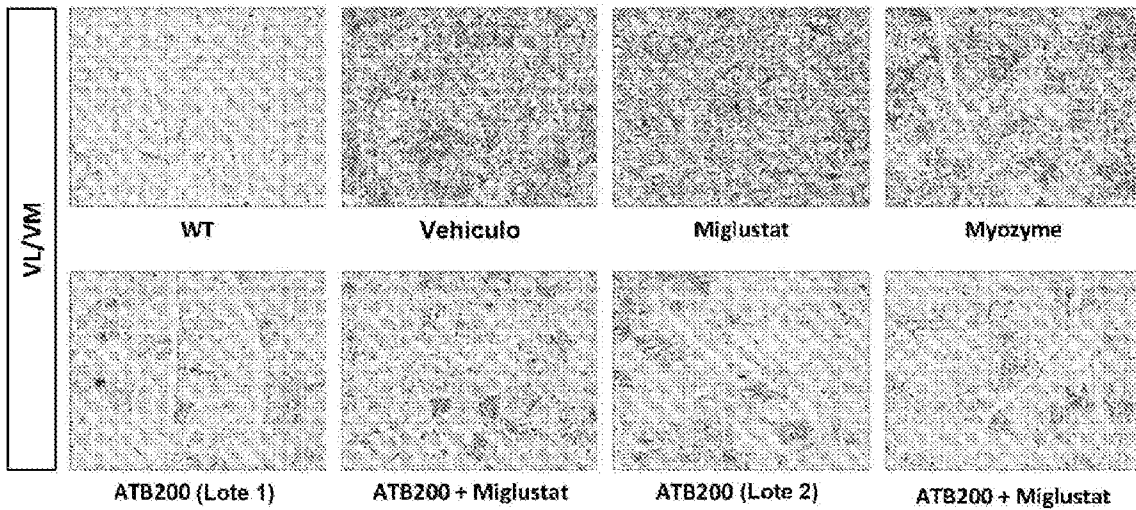


FIG. 29B

IHC de LC3 II

Ampliación = 200x

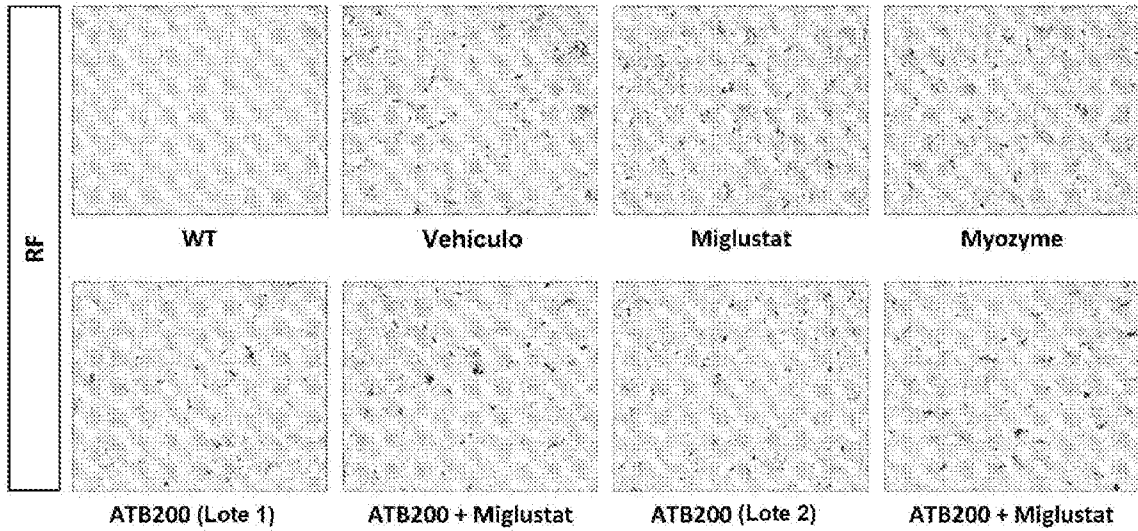


FIG. 30A

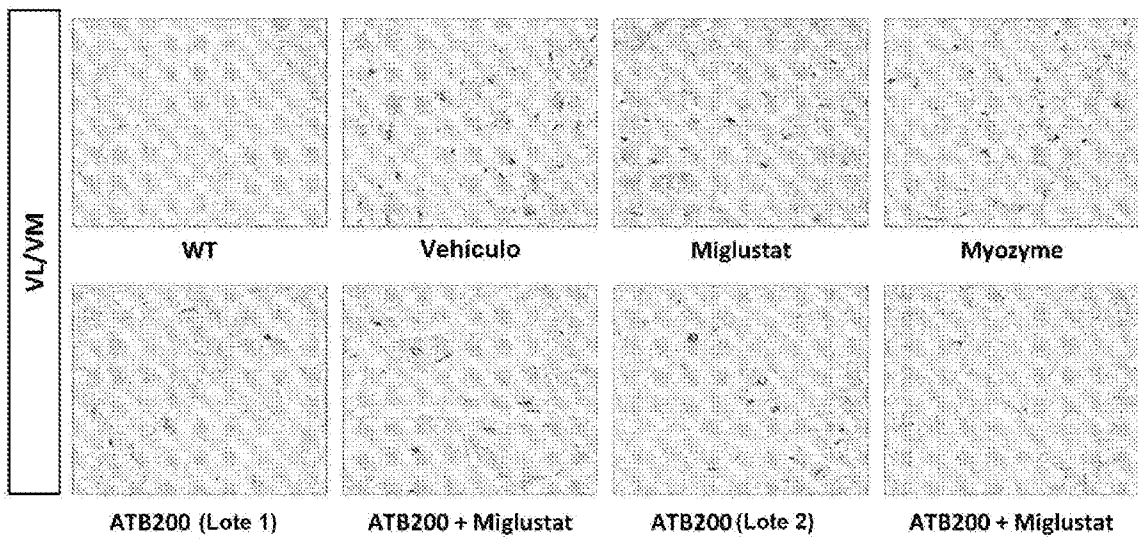


FIG. 30B

IHC de Disferlina

Ampliación = 200x

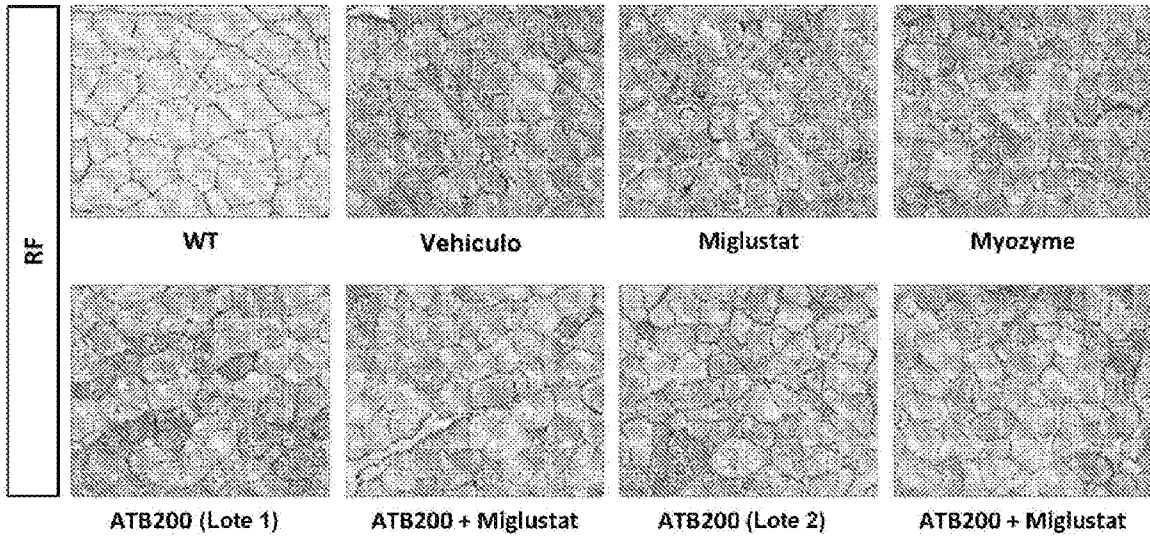


FIG. 31A

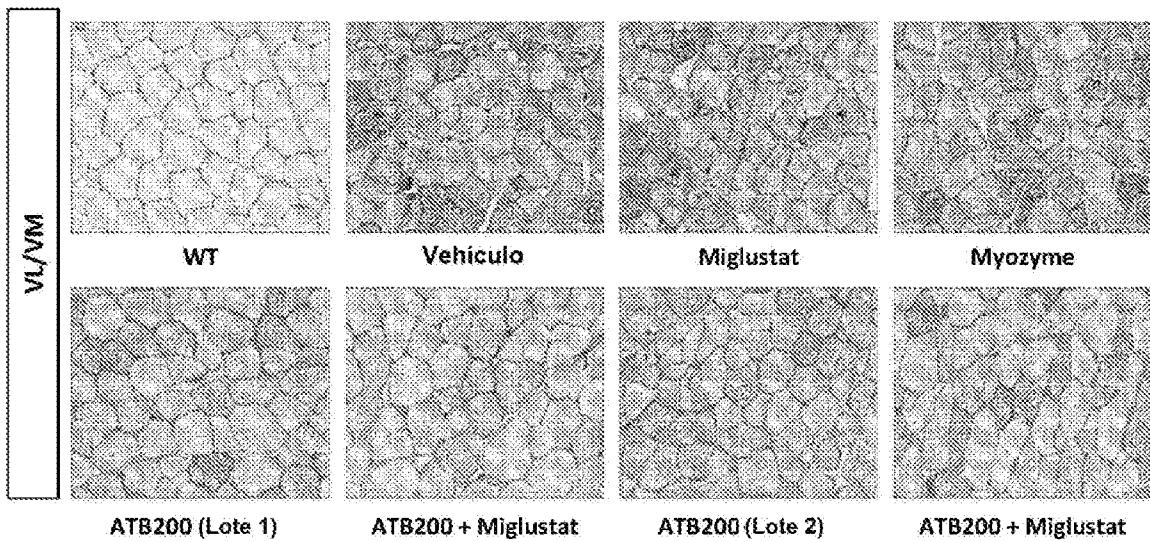


FIG. 31B

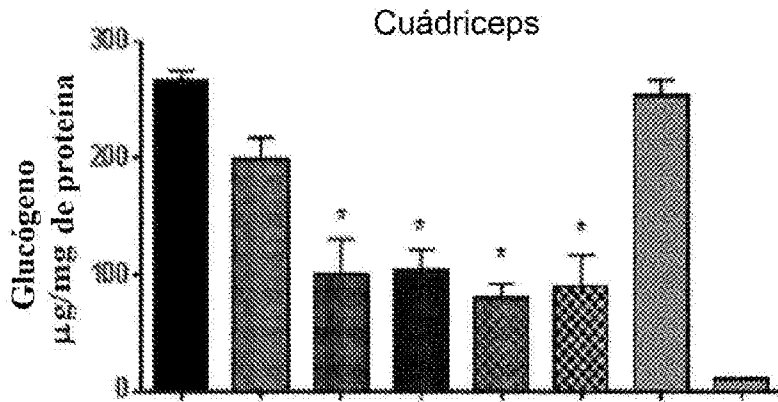


FIG. 32A

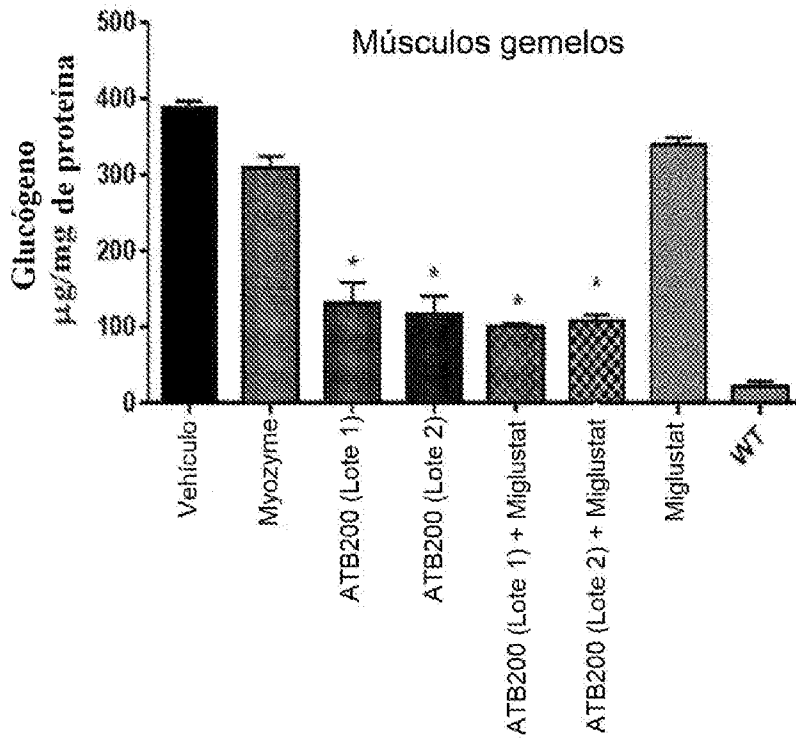


FIG. 32B

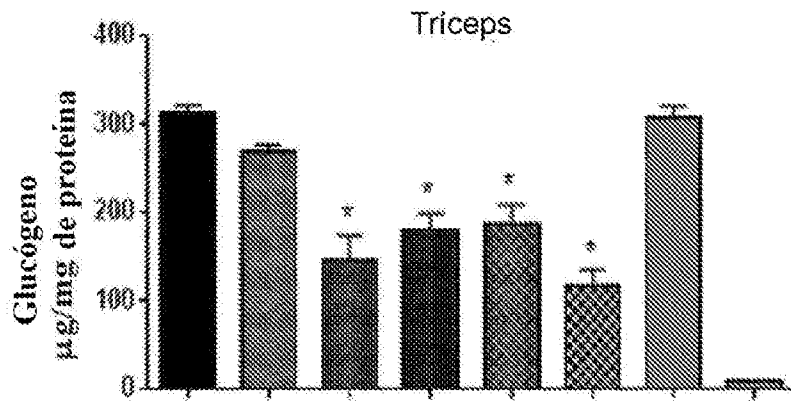


FIG. 32C

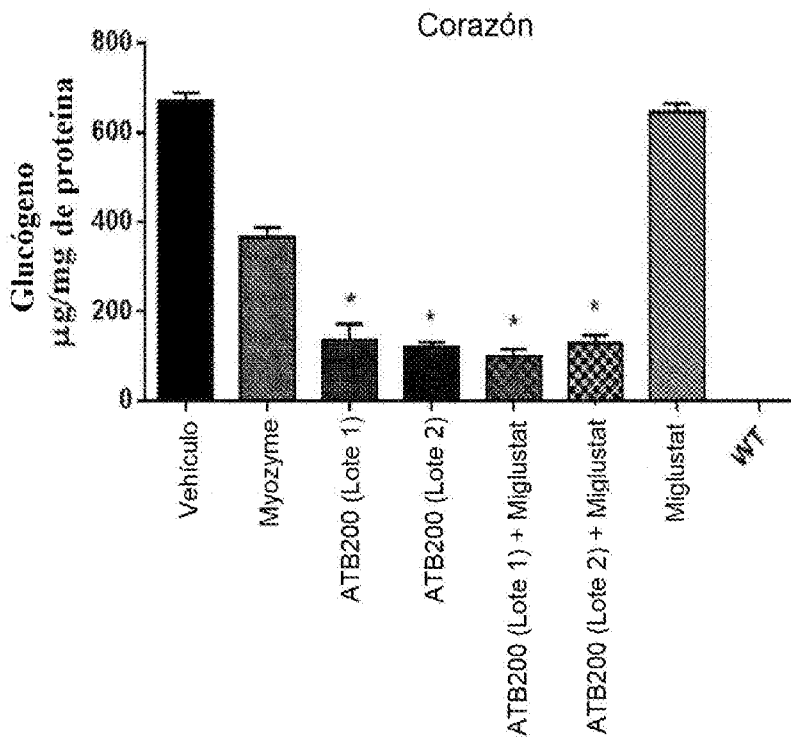
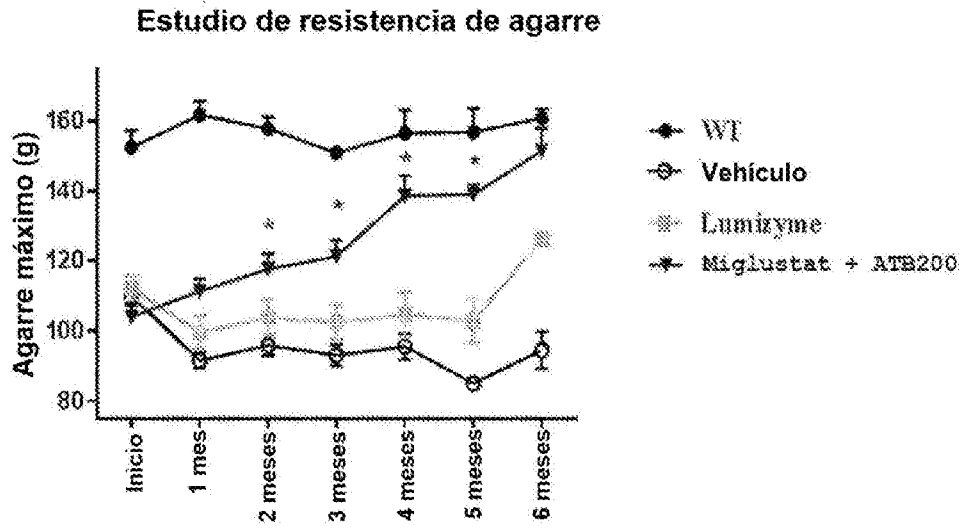
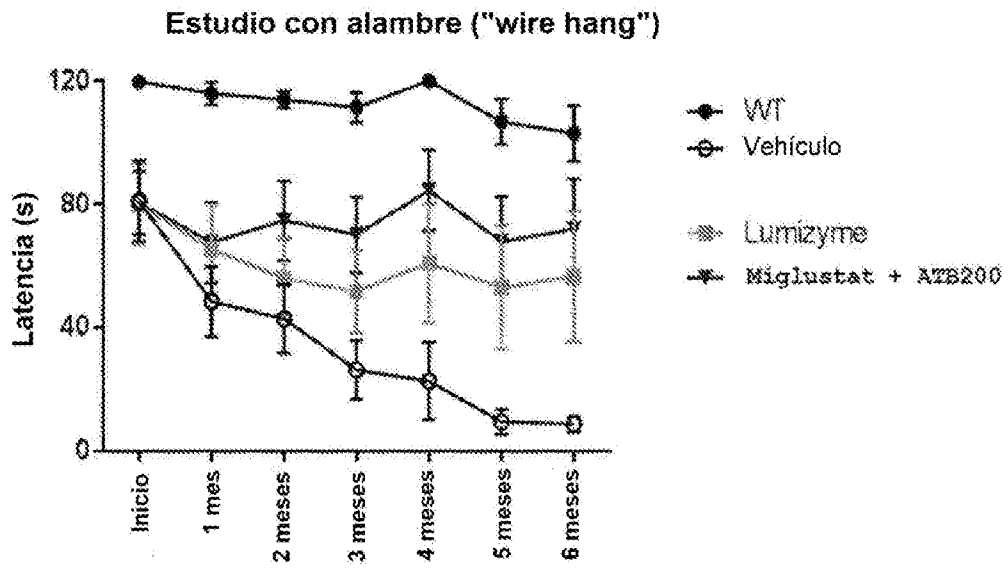


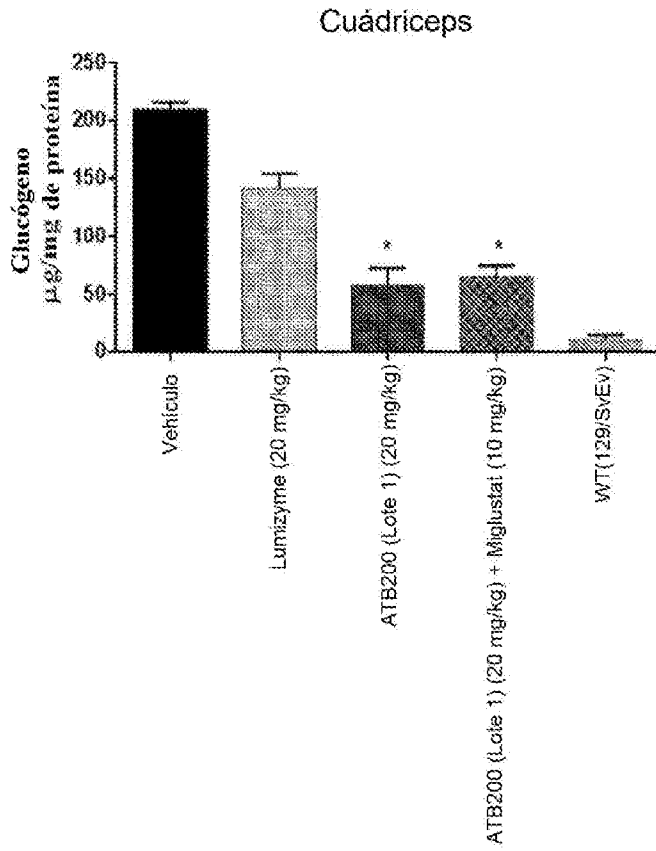
FIG. 32D



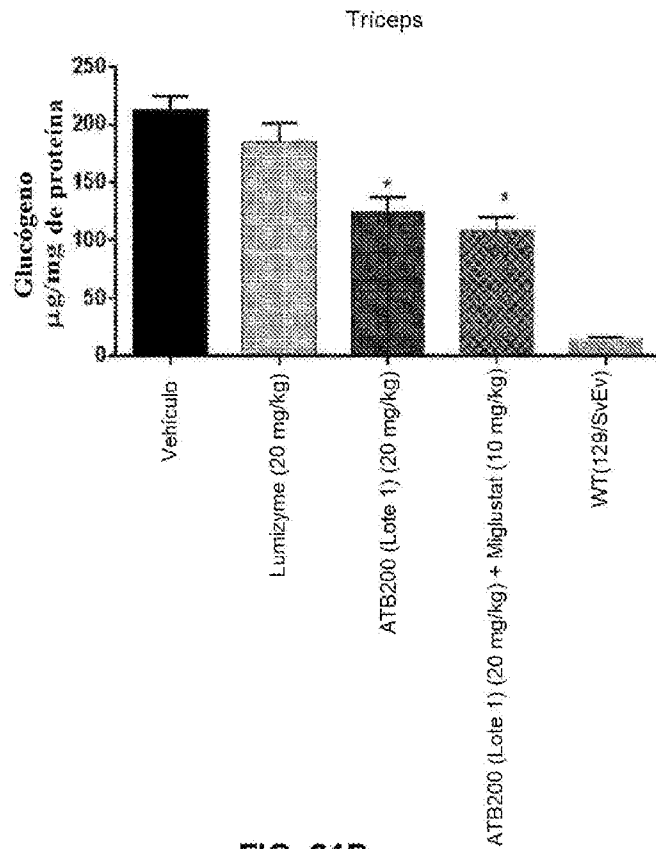
**FIG. 33A**



**FIG. 33B**



**FIG. 34A**



**FIG. 34B**

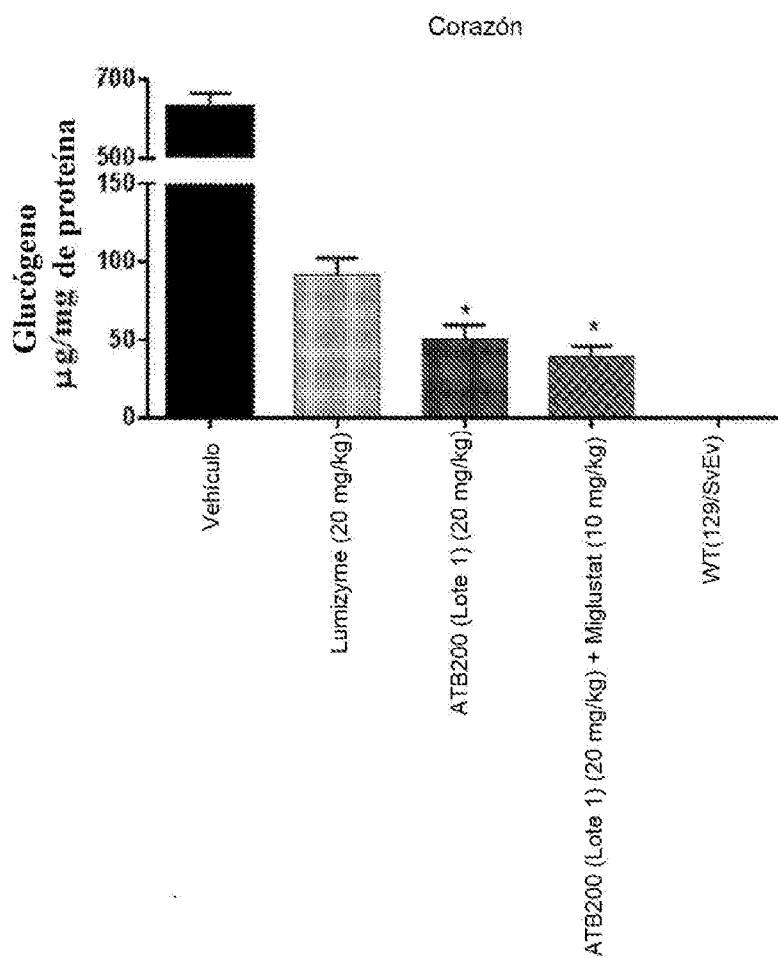
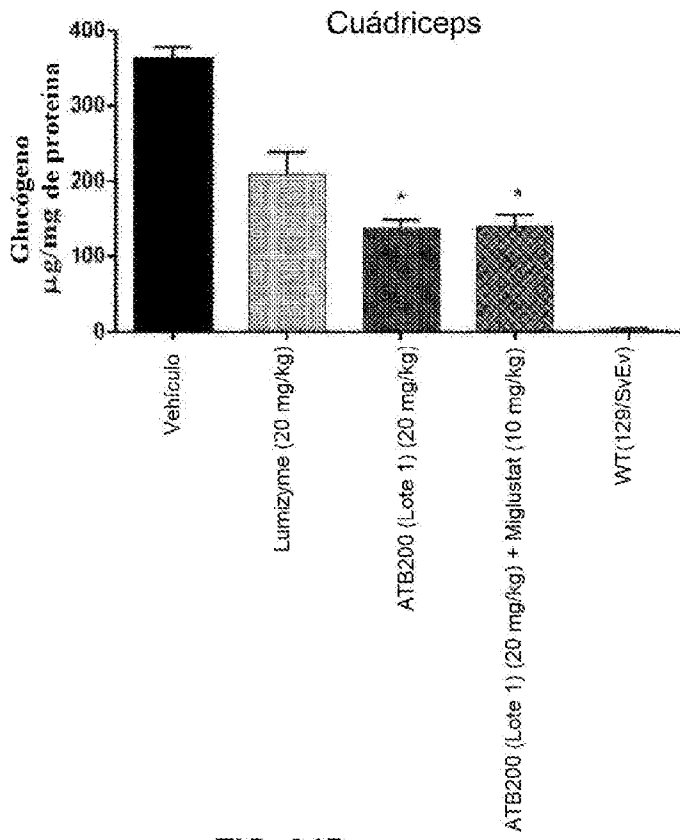
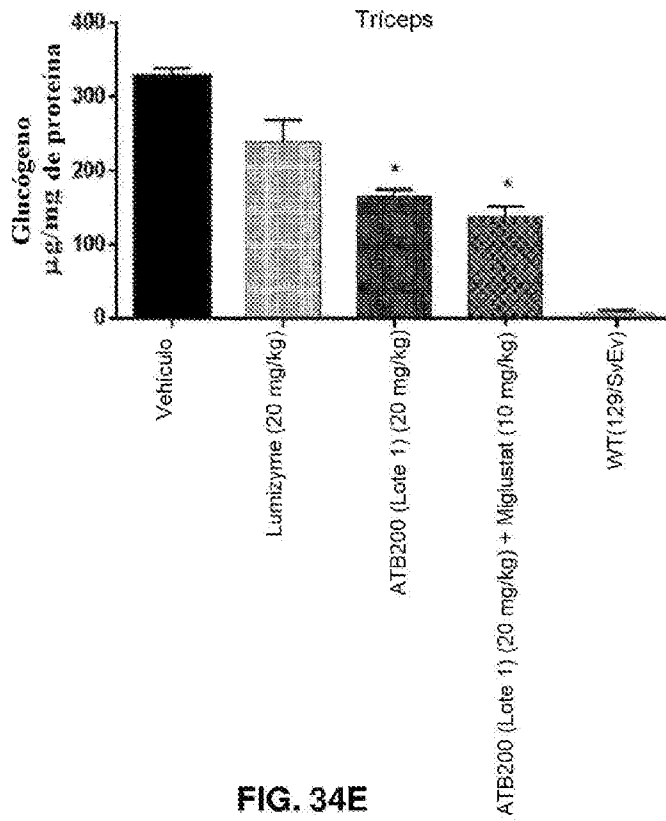


FIG. 34C



**FIG. 34D**



**FIG. 34E**

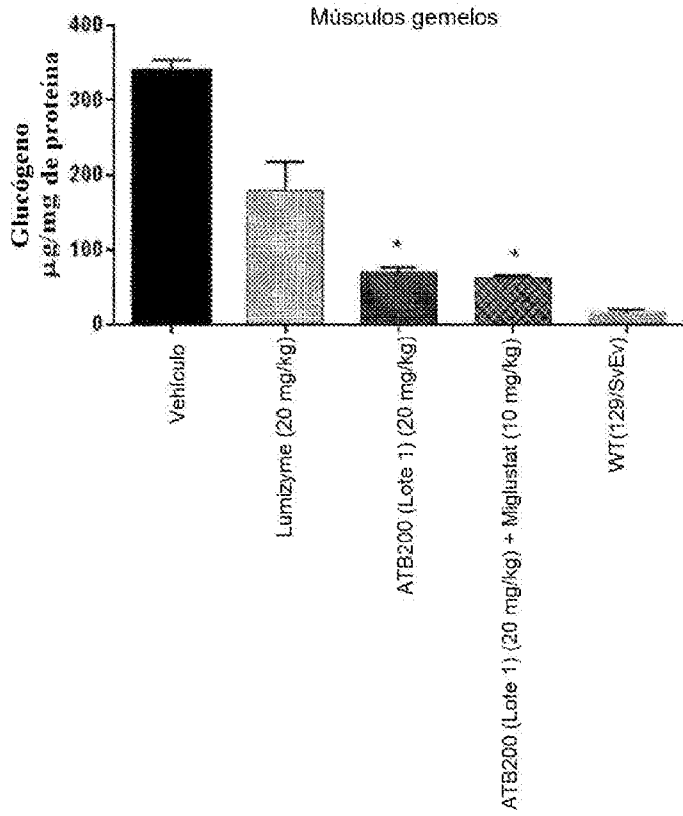


FIG. 34F

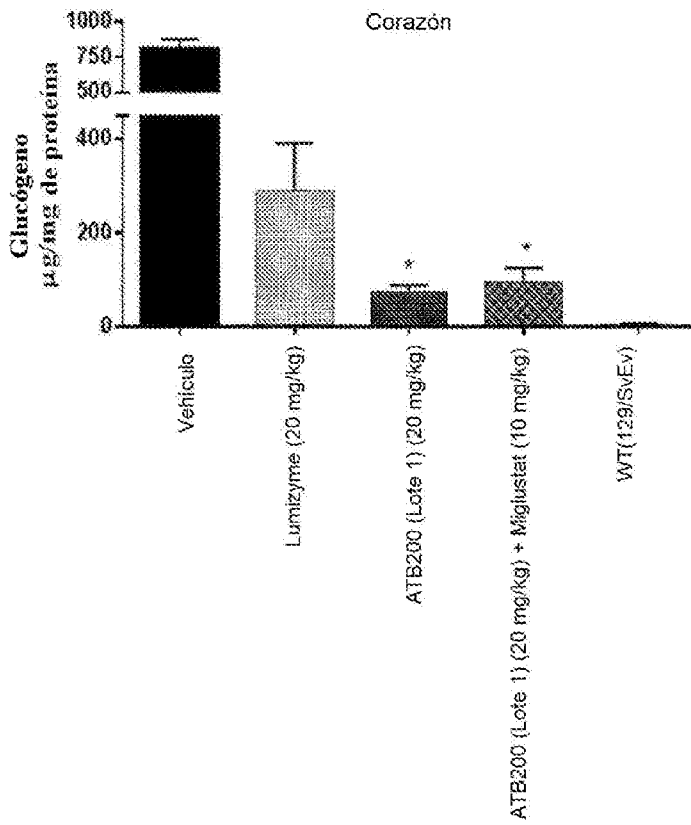


FIG. 34G

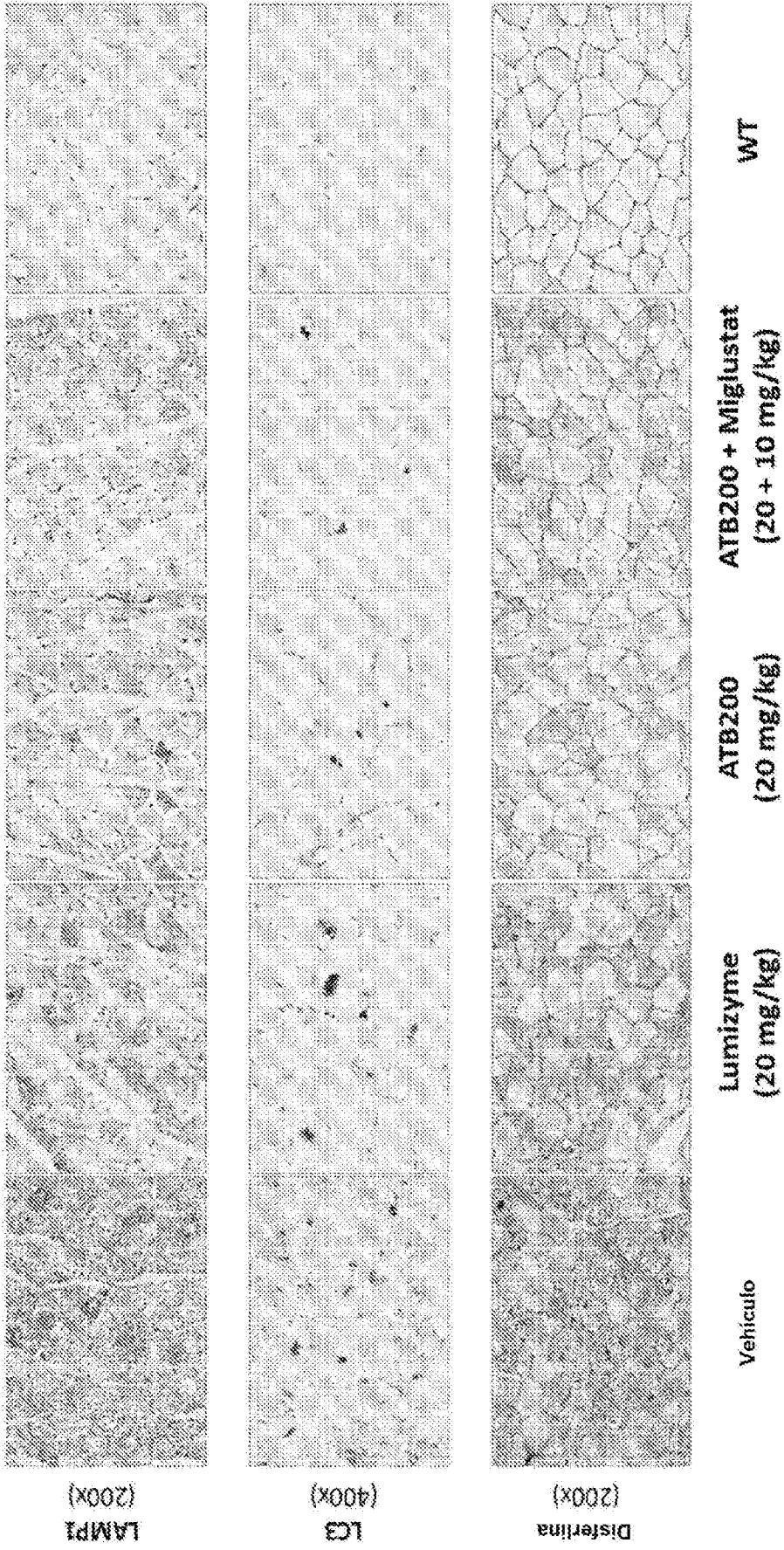


FIG. 35

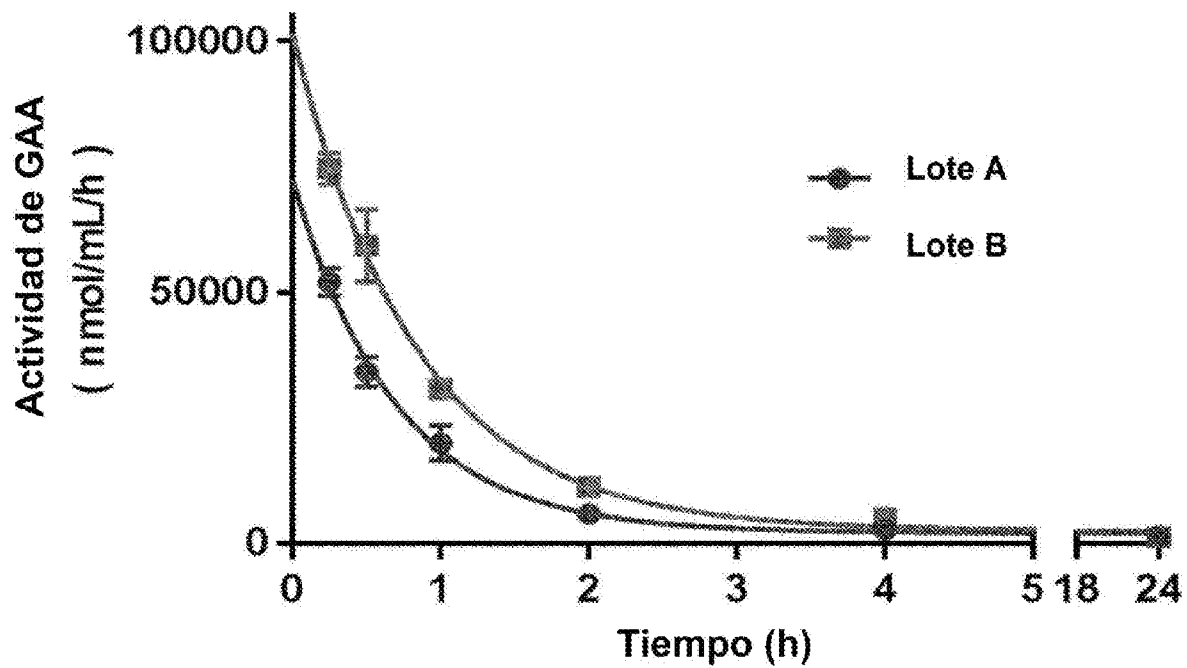
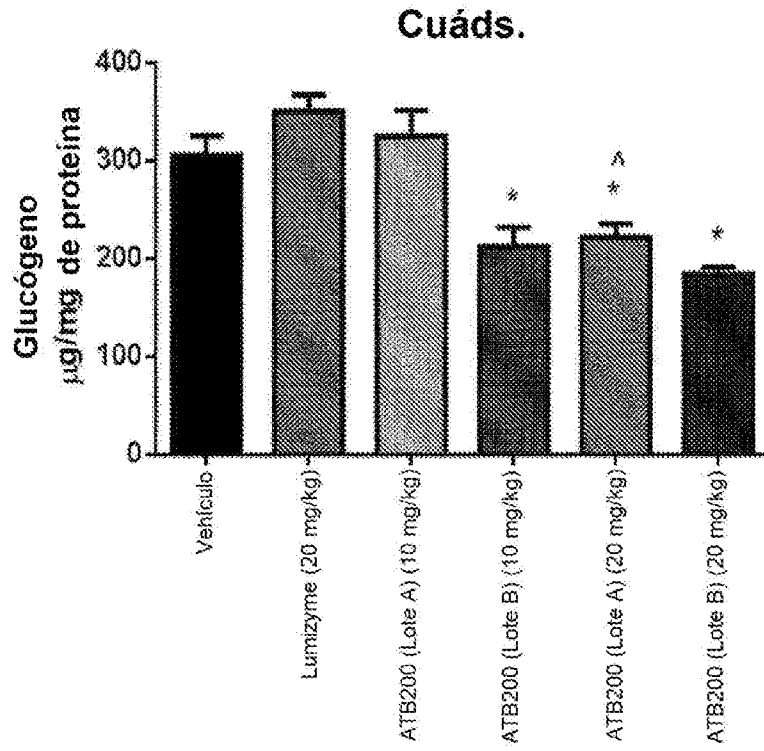
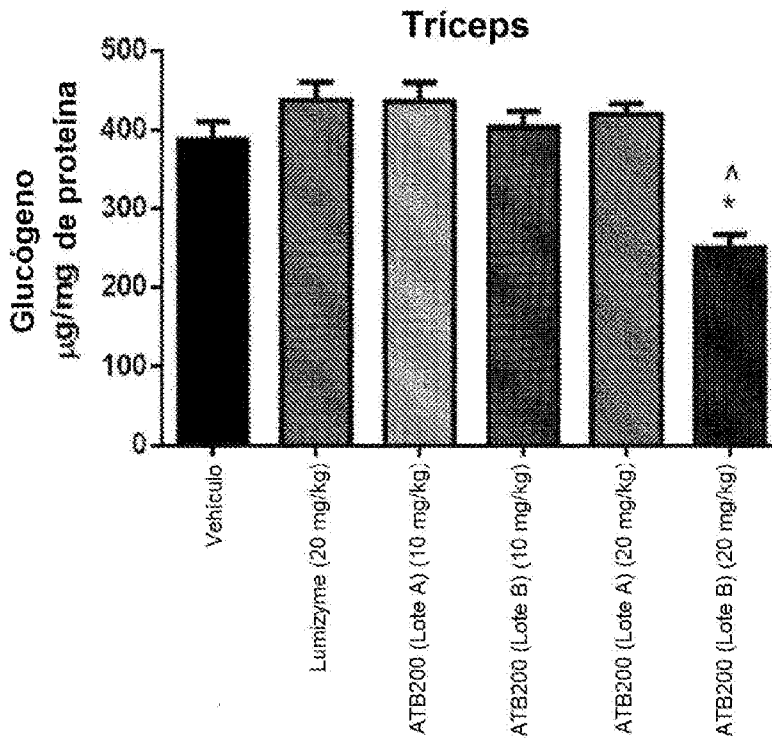


FIG. 36



**FIG. 37A**



**FIG. 37B**

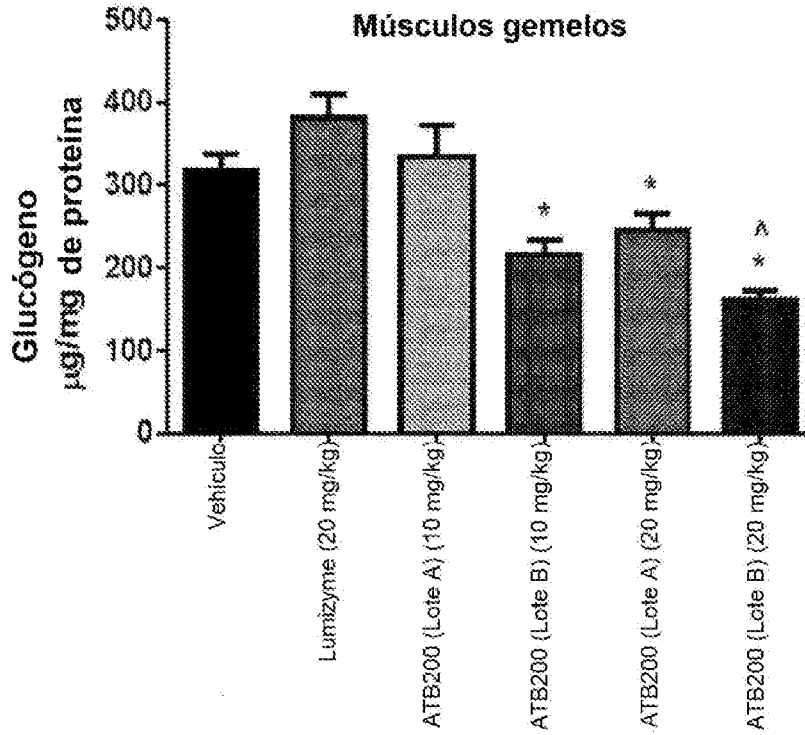


FIG. 37C

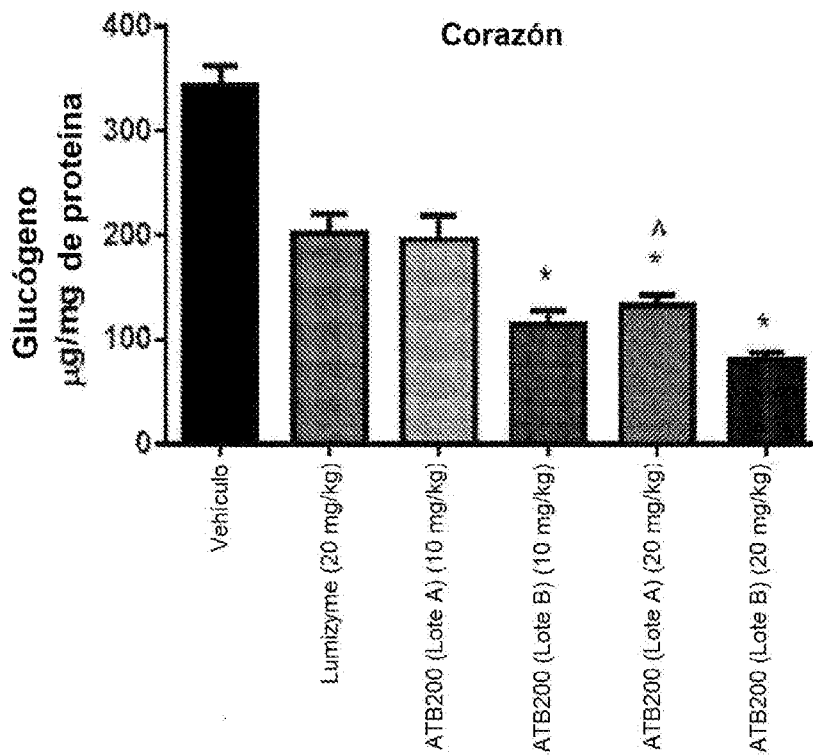


FIG. 37D

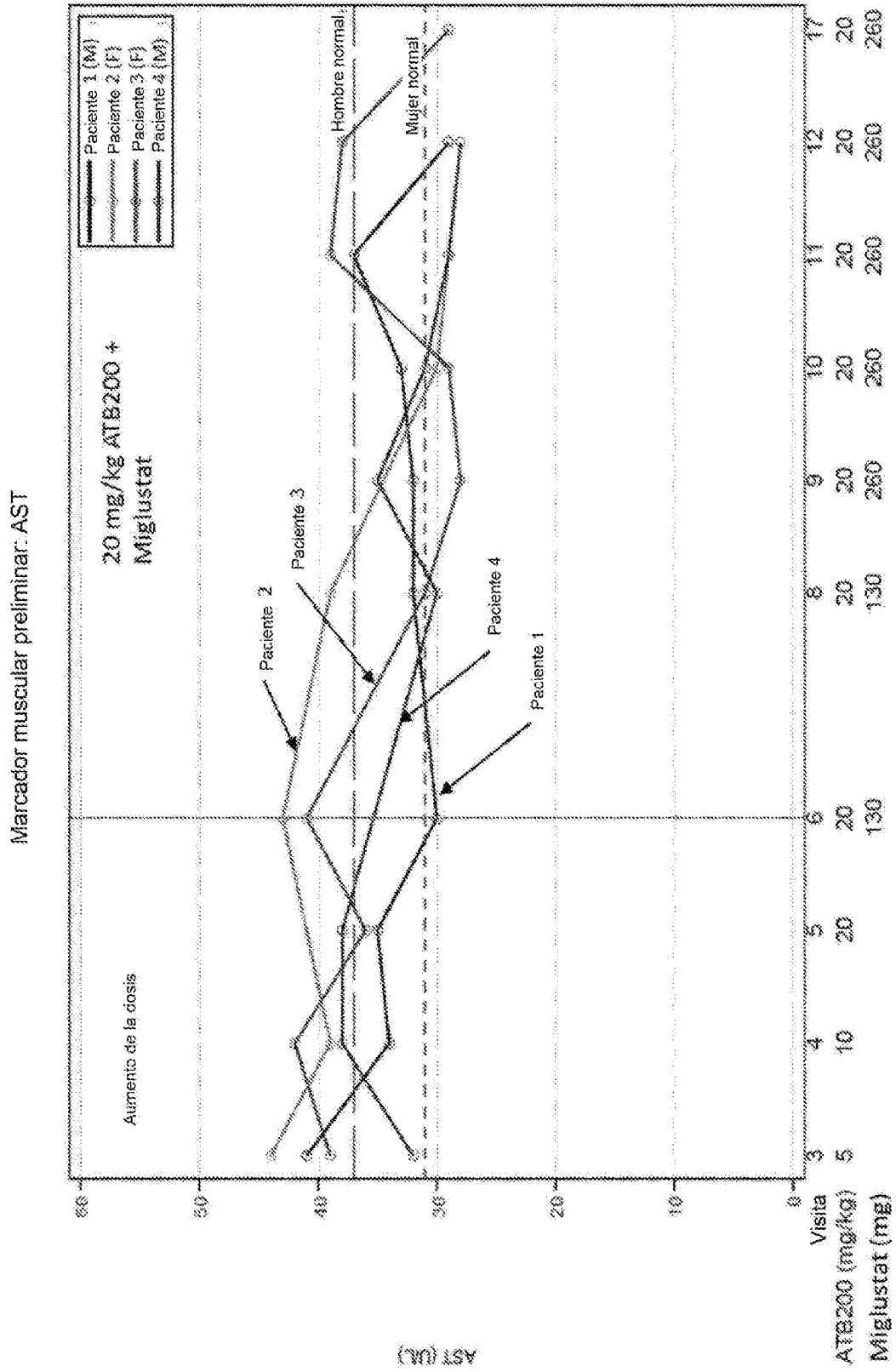


FIG. 38

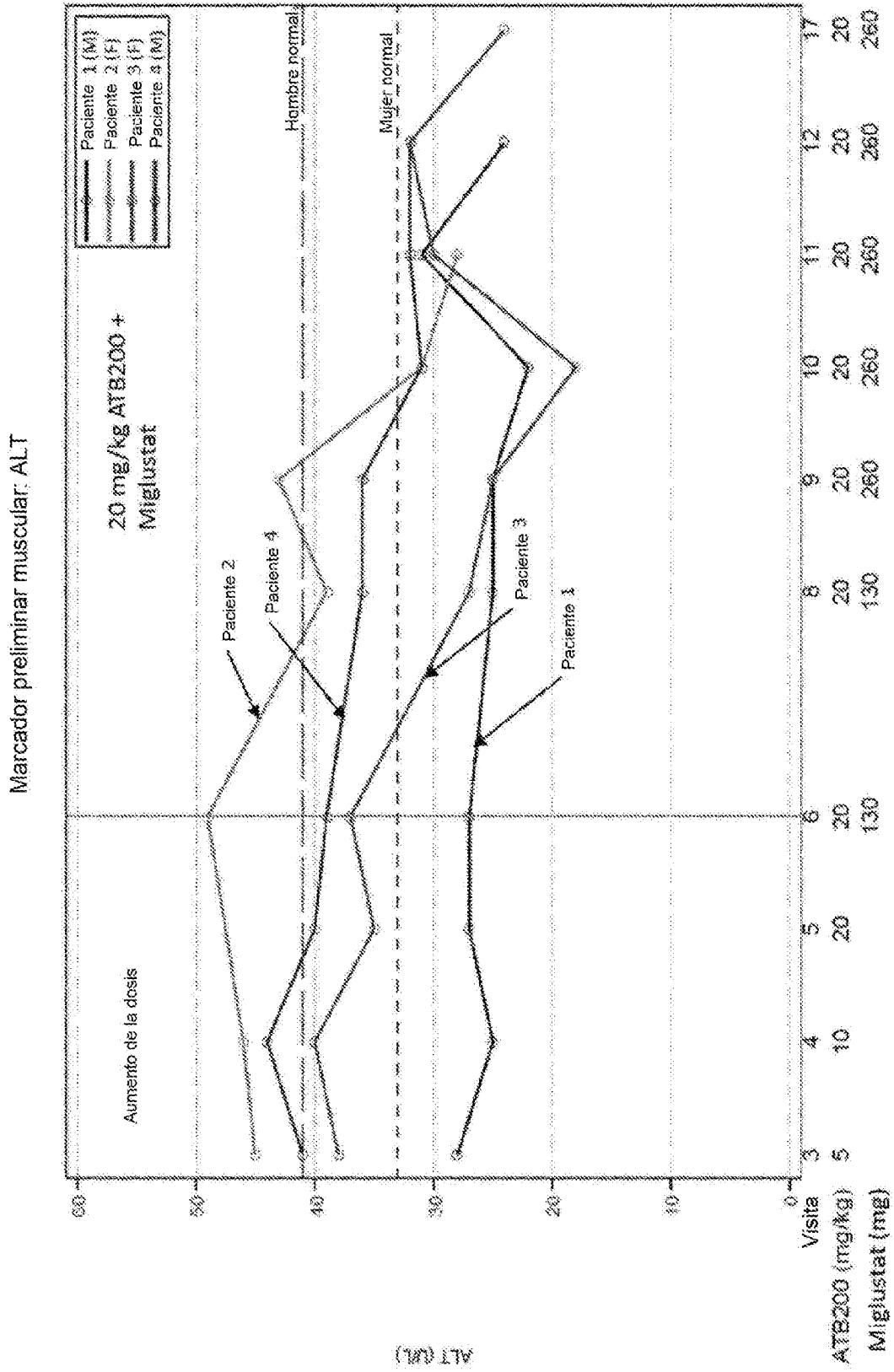


FIG. 39

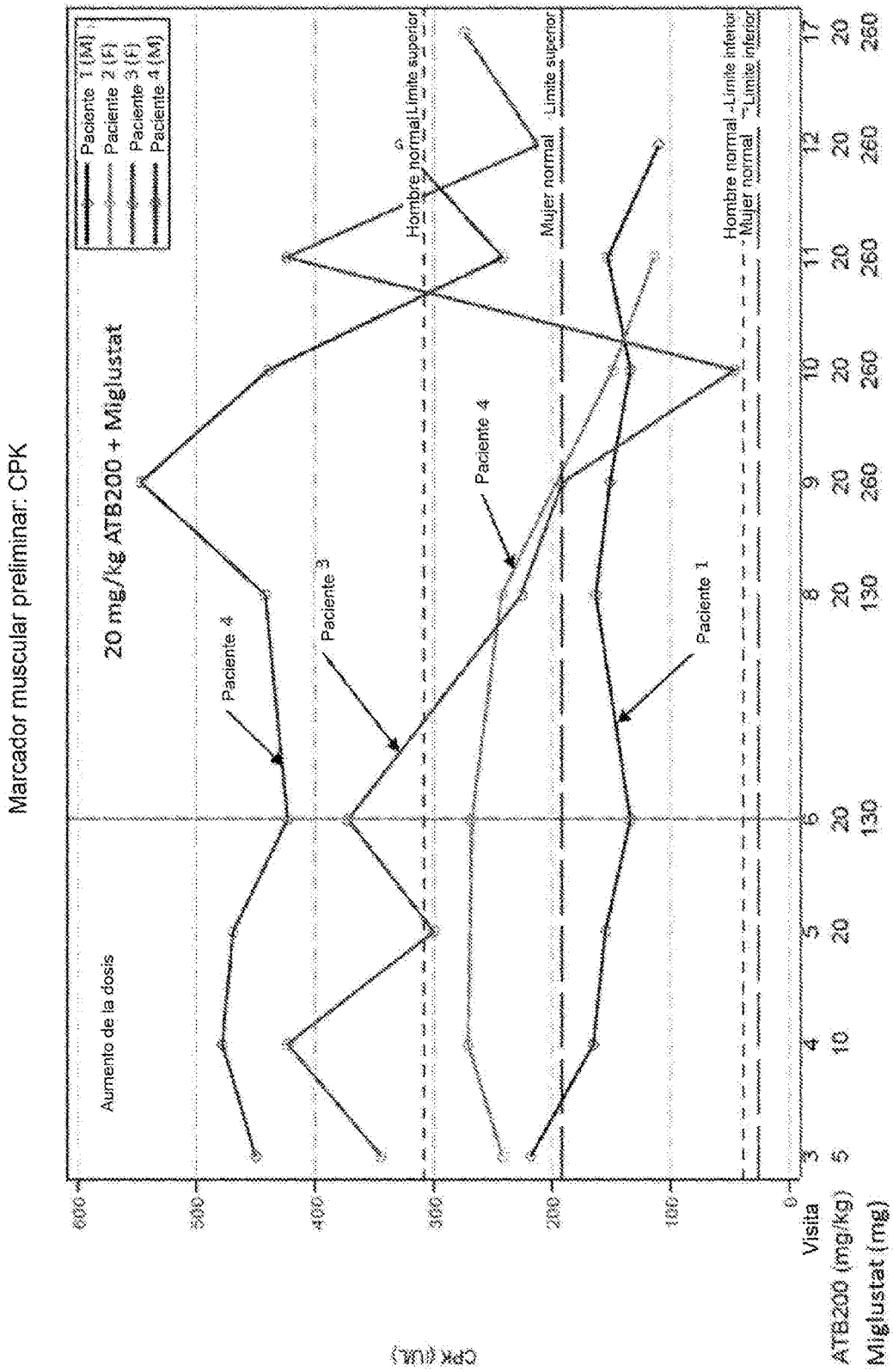


FIG. 40

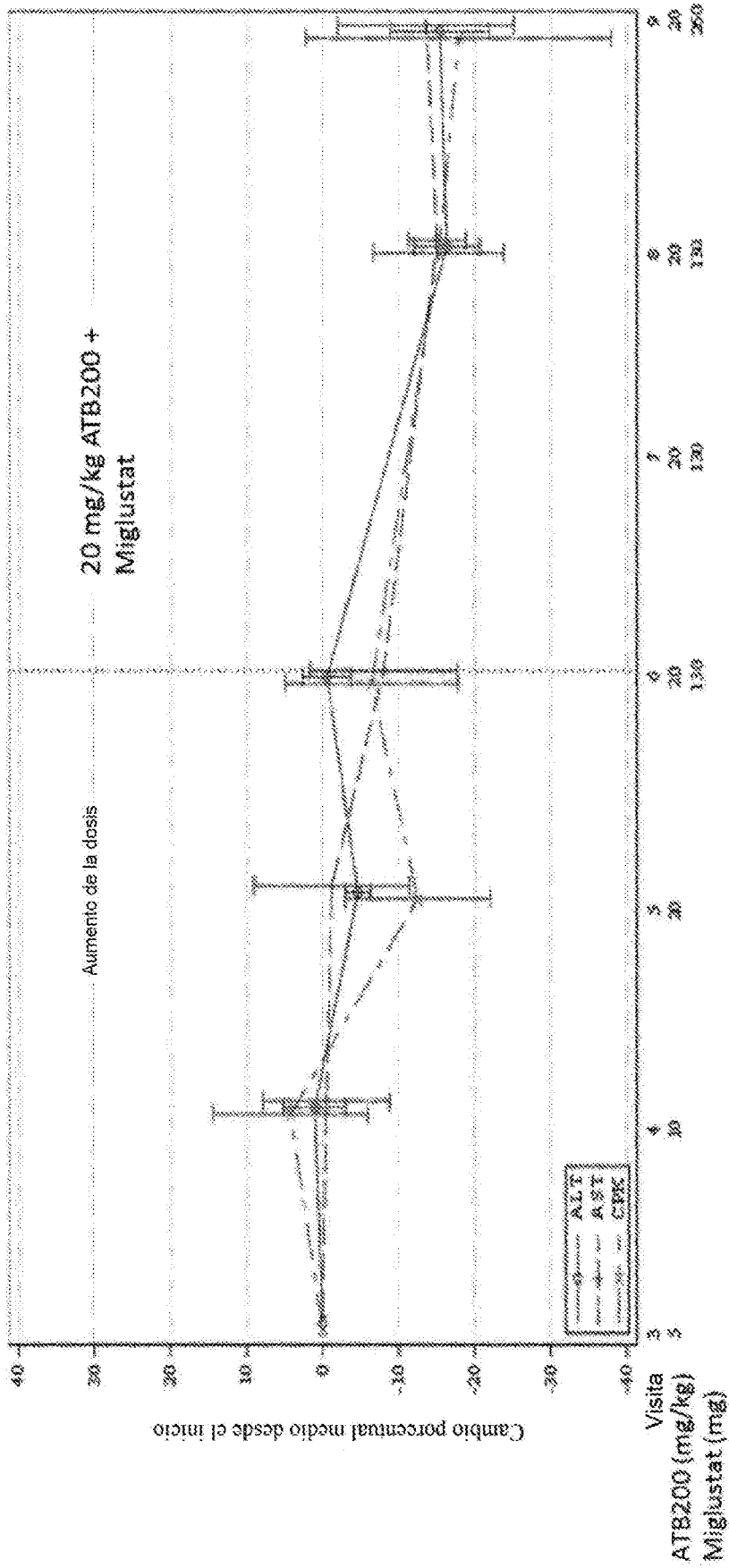


FIG. 41

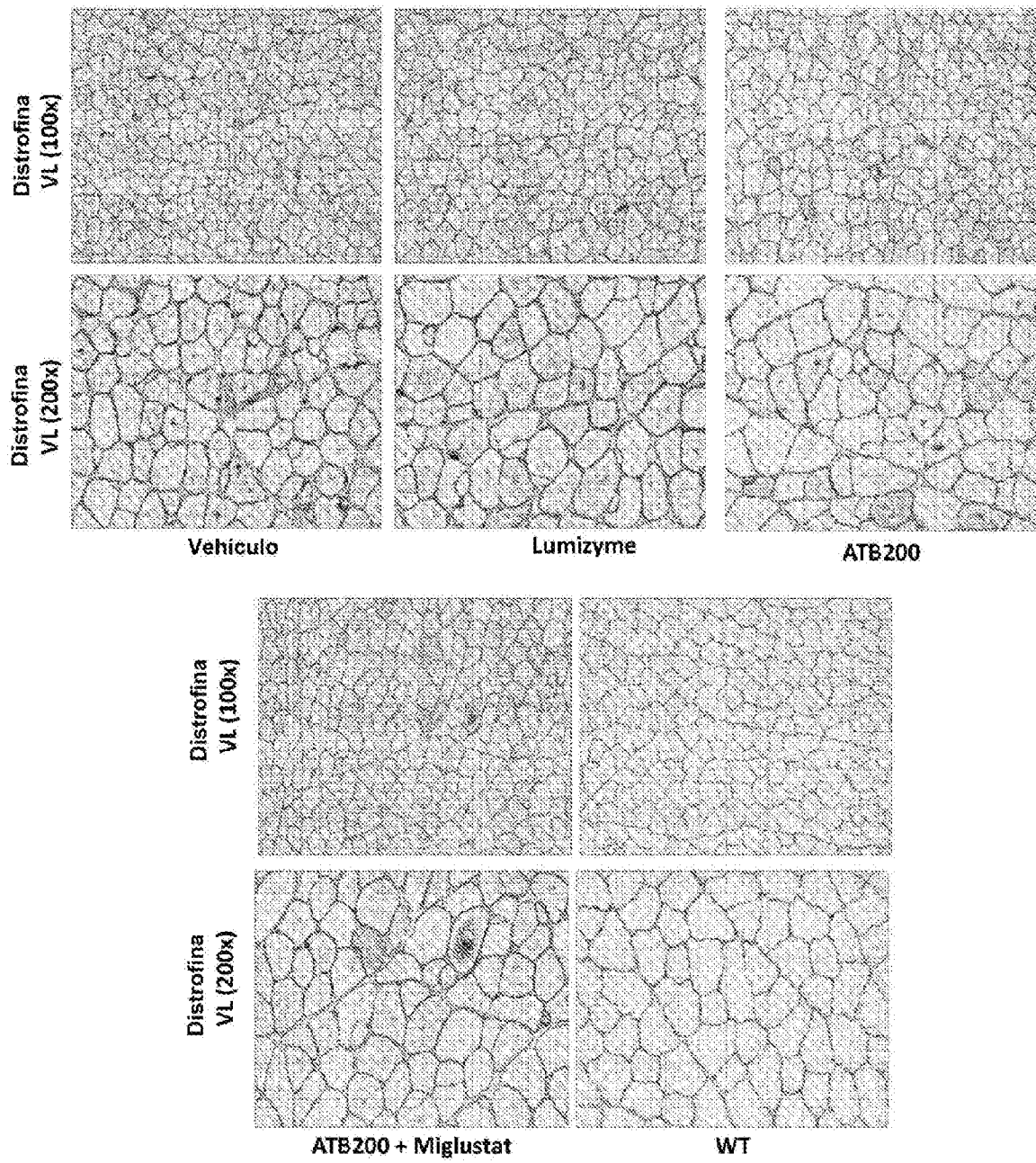


FIG. 42