

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 535 461**

51 Int. Cl.:

A61K 38/47 (2006.01)

A61P 1/16 (2006.01)

A61P 21/00 (2006.01)

A61P 3/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.07.2009 E 09794820 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.01.2015 EP 2318037**

54 Título: **Método de tratamiento de la enfermedad por almacenamiento de glucógeno**

30 Prioridad:

08.07.2008 US 129612 P

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

11.05.2015

73 Titular/es:

**DUKE UNIVERSITY (100.0%)
P.O. Box 90083
Durham, NC 27708-0083 , US**

72 Inventor/es:

**CHEN, YUAN-TSONG;
KISHNANI, PRIYA y
SUN, BAODONG**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 535 461 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

Método de tratamiento de la enfermedad por almacenamiento de glucógeno

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere, en general, a la enfermedad por almacenamiento de glucógeno y, en particular, a compuestos y composiciones adecuados para su uso en el tratamiento de la enfermedad por almacenamiento de glucógeno de tipo III.

10

Antecedentes

La enzima desramificante de glucógeno (GDE) es una enzima multifuncional que actúa como 1,4- α -D-glucano: 1,4- α -D-glucano 4- α -D-glicosiltransferasa (E. C 2.4.1.25) y amilo-1,6-glucosidasa (E. C 3.2.1.33) en la degradación del glucógeno. Se cree que las dos actividades de la enzima desramificante residen en sitios separados en una única cadena de polipéptido con una masa molecular de 174 kDa. El dominio de la estructura-función no se ha estudiado en detalle (Chen y Burchell, "Glycogen storage disease". en: *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, C. R. Scriver *et al*, eds., VII Edición, McGraw-Hill/Nueva York, pág. 935-965 (1995); Bates *et al.*, *FEBS Lett.* 58:181-185 (1975); Gillard *et al.*, *Biochemistry* 16:3978-3987 (1977); Capítulo 71 Kishnani P. S., Koeberl D., Chen Y. T. "Glycogen Storage Diseases", en *The Online Metabolic & Molecular Bases of Inherited Disease*, Valle D., Beaudet A. L., Vogelstein B., Kinzler K. W., Antonarakis S. E., Ballabio A., Scriver C. R., Sly W. S., Childs B., Editores (2008)). La forma predominante de ADNc que codifica el desramificante humano tiene una región de codificación de 4.596 pb y una región no traducida 3' de 2.371 pb (Yang *et al.*, *J. Biol. Chem.* 267: 9294-9299 (1992)). Existen ARNm de desramificante con especificidad tisular. Estas isoformas difieren en la región no traducida 5', y se cree que se generan mediante la transcripción de ARN diferencial, y el corte y empalme de un solo gen de desramificante (Bao *et al.*, *Gene* 197: 389-398 (1997)). El gen humano se ubica en el cromosoma 1p21 (Yang-Feng *et al.*, *Genomics* 13: 931-934 (1992)). Se ha determinado la estructura genómica del gen GDE humano, y consiste en 35 exones que abarcan ~85 kb de ADN.

La enzima desramificante, junto con la fosforilasa, es responsable de la degradación completa del glucógeno. El hígado y el músculo son los dos principales órganos más activos en el metabolismo del glucógeno. La función primaria del glucógeno en estos órganos es diferente. En el músculo, el glucógeno proporciona un almacén local de combustible para el consumo de energía a corto plazo. En el hígado, mantiene la homeostasis de la glucosa.

La deficiencia genética de la enzima desramificante del glucógeno (enfermedad por almacenamiento de glucógeno de tipo III, GSD-III) provoca una glucogenosis incompleta que produce la acumulación de glucógeno con la cadena exterior anormalmente corta en varios órganos. Los órganos comúnmente afectados en la GSD-III son el hígado, el músculo esquelético y el corazón. La enfermedad se caracteriza por hepatomegalia, hipoglucemia, baja estatura, miopatía variable y cardiomiopatía. Los pacientes con esta enfermedad varían notablemente, tanto clínica como enzimáticamente (Markowitz *et al.*, *Gastroenterology* 105:1882-1885 (1993); Shen *et al.*, *J. Clin. Invest.* 98:352-357 (1996); Telente *et al.*, *Annals. Intern. Med.* 120:218-226 (1994)). La mayoría de los pacientes tienen enfermedad que afecta tanto al hígado como al músculo (tipo IIIa), algunos pacientes (~15 % de todos los pacientes con GSD-III) solo tienen afectación hepática (tipo IIIb) y, en casos raros, hay una pérdida selectiva de una sola de las dos actividades GDE (glucosidasa, (tipo IIIc) o transferasa (tipo IIId)). Los síntomas hepáticos en la GSD-III pueden mejorar con la edad y pueden desaparecer después de la pubertad. Se ha observado cirrosis hepática manifiesta en algunos pacientes, y algunos han desarrollado carcinoma hepatocelular. La debilidad muscular, aunque mínima durante la infancia, puede llegar a ser predominante en adultos a principios de la tercera o cuarta década. Estos pacientes tienen debilidad proximal lentamente progresiva y atrofia muscular distal, y algunos pacientes acaban en silla de ruedas. Incluso dentro del subgrupo de pacientes que desarrollan miopatía/cardiomiopatía, hay variabilidad clínica. Algunos pacientes tienen cardiomiopatía asintomática, algunos tienen cardiomiopatía sintomática temprana que les conduce a la muerte, y algunos solo tienen afectado el músculo y no presentan afectación cardíaca aparente. Un hallazgo frecuente es el electrocardiograma anormal (ECG) con hipertrofia ventricular, y no se correlaciona con la gravedad clínica. Los niveles normales de creatina quinasa en suero no descartan la deficiencia de la enzima muscular. Los subtipos bioquímicos no predicen la gravedad clínica.

No parece haber ninguna correlación entre la cantidad de proteína desramificante y la gravedad clínica (Yang *et al.*, *Am. J. Hum. Genet.* 41:A28 (1992)). Para predecir con exactitud, en el diagnóstico inicial, si se pueden producir miopatía o cardiomiopatía, se ha de determinar si la actividad de la enzima desramificante es deficiente en el músculo (Chen y Burchell, "Glycogen storage disease. In: *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*", C. R. Scriver *et al.*, eds., VII Edición, McGraw-Hill/Nueva York, pág. 935-965 (1995)). Parece que la enfermedad muscular no se desarrollará en pacientes con actividad GDE retenida en el músculo (Coleman *et al.*, *Annals of Internal Medicine* 116: 896-900 (1992)).

El fenotipo variable se explica, en parte, por las diferencias en la expresión específica del tejido de la enzima defectuosa. Como se ha indicado anteriormente, en el tipo de IIIa, la enzima es deficiente tanto en el hígado como en el músculo, y, en IIIb, hay deficiencia de la enzima solo en el hígado. A diferencia de la fosforilasa, que tiene

isoenzimas específicas del tejido codificadas por genes diferentes, a nivel de proteínas y a nivel molecular, parece que no hay isoenzimas GDE específicas del tejido en diferentes tejidos. Hasta ahora, no se ha comprendido cómo, en la GSD-III, un solo gen GDE, que normalmente se expresa en todos los tejidos, puede cambiar la expresión en diferentes tejidos (Chen y Burchell, "Glycogen storage disease". En: *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, C. R. Scriver *et al.*, eds., VII Edición McGraw-Hill/Nueva York, pág. 935-965 (1995)). Dos mutaciones (17delAG y G6X), ambas ubicadas en el exón 3 del codón de aminoácido 6, se encuentran exclusivamente en la GSD-IIIb (Shen *et al.*, *J. Clin. Invest.* 98: 352-357 (1996)), lo que sugiere que el exón 3 es importante para controlar la expresión específica del tejido del gen GDE.

La histología del hígado en estos pacientes se caracteriza por una distensión universal de los hepatocitos por el glucógeno y la presencia de septos fibrosos. Estudios de microscopía de electrones sobre muestras musculares han demostrado la presencia de glucógeno acumulado debajo del sarcolema y entre las miofibrillas; el glucógeno en exceso no solo se dispersa en el citoplasma, sino que también se observa en los lisosomas (Cornelio *et al.*, *Arch. Neurol.* 41:1027-1032 (1984), Miranda *et al.*, *Ann. Neurol.* 9:283-288 (1981)).

Se desconoce la biología estructural detallada de GDE, aunque se han propuesto varios dominios funcionales de la enzima desramificante del glucógeno a partir de estudios enzimológicos y la comparación de secuencias a otras enzimas con función catalítica similar (Yang *et al.*, *J. Biol. Chem.* 267:9294-9299 (1992); Liu *et al.*, *Archives of Biochemistry and Biophysics* 306:232-239 (1993); Liu *et al.*, *Biochemistry* 34:7056-7061 (1995), Jespersen *et al.*, *Journal of Protein Chemistry* 12(6):791-805 (1993)). Una región del extremo COOH de la enzima desramificante podría ser un candidato para el sitio de unión al glucógeno ((Yang *et al.*, *J. Biol. Chem.* 267:9294-9299 (1992)), y 4 regiones de la mitad N-terminal de la enzima portan homología de secuencia con los sitios catalíticos identificados o propuestos en otras enzimas amilolíticas (Liu *et al.*, *Archives of Biochemistry and Biophysics* 306:232-239 (1993), Jespersen *et al.*, *Journal of Protein Chemistry* 12(6):791-805 (1993)). Se ha identificado el aspartato de la posición 549 como el nucleófilo catalítico en el sitio transferasa de la enzima desramificante del glucógeno de músculo de conejo (Braun *et al.*, *Biochemistry* 35:5458-5463 (1996)).

Actualmente no existe ningún tratamiento eficaz contra la enfermedad. La hipoglucemia se puede controlar con comidas frecuentes con alto contenido de hidratos de carbono con suplementos de almidón de maíz o alimentación por goteo gástrico nocturno. Los pacientes con miopatía han recibido dietas altas en proteínas durante el día más infusión enteral durante la noche. En algunos pacientes, se ha documentado la mejoría transitoria de los síntomas, pero no hay datos a largo plazo que demuestren que la dieta rica en proteínas prevenga o trate la miopatía progresiva (Chen y Burchell, "Glycogen storage disease". en: *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, C. R. Scriver *et al.*, eds., VII Edición McGraw-Hill/Nueva York, pág. 935-965 (1995)). La miopatía y/o cardiomiopatía progresiva es una causa importante de morbilidad en adultos, y se han publicado casos de pacientes con cirrosis hepática progresiva y carcinoma hepático. Aunque la administración de terapia génica de un gen normal, funcional, en el órgano enfermo podría, en última instancia, curar la enfermedad, actualmente, no se cuenta con un vehículo de administración de genes ideal que sea fiable. No existe un modelo animal vivo para esta enfermedad. Se han publicado casos de perros afectados con GSD-III (Gregory *et al.*, *J. Vet. Intern. Med.* 21(1):40-46 (2007)) y, actualmente, se está estableciendo una colonia de cría.

La terapia de reemplazo enzimático ha sido eficaz en las enfermedades en las que las enzimas/proteínas responsables ejercen sus funciones en los fluidos extracelulares, tales como la deficiencia de adenosina desaminasa, la hemofilia y la deficiencia de la α 1-antitripsina, o en una ubicación lisosomal, tales como una enfermedad por almacenamiento lisosomal. No se ha examinado el reemplazo enzimático en enfermedades en las que la enzima defectuosa está presente en el citosol (tal como la enzima desramificante en GSD-III), presumiblemente debido a la falta de un mecanismo de captación celular eficaz y específico que proporcione enzima exógena a través de la membrana plasmática en el citoplasma. Los lisosomas pueden fusionarse con la membrana plasmática y administrar su contenido, sin embargo, el uso de lisosomas se ve comprometido por la falta de tropismo específico del órgano y la eliminación por el sistema reticuloendotelial (Mumtaz *et al.*, *Glycobiology* 1(5):505-510 (1991)). Para un tratamiento eficaz contra la GSD-III, la enzima debería ser capaz de dirigirse a los músculos y al corazón, así como al hígado.

Normalmente, el glucógeno citoplasmático es digerido por la fosforilasa y la enzima desramificante. El glucógeno en exceso absorbido por los lisosomas mediante autofagia puede ser digerido por la α -glucosidasa ácida lisosomal (GAA). La deficiencia de actividad de la enzima desramificante genera la acumulación masiva de glucógeno con ramificaciones exteriores anormalmente cortas. El exceso de glucógeno en la GSD-III no solo reside en el citoplasma, sino también en los lisosomas (citoplasma > lisosoma) (Cornelio *et al.*, *Arch. Neurol.* 41: 1027-1032 (1984), Miranda *et al.*, *Ann. Neurol.* 9: 283-288 (1981)). Esto sugiere que la actividad GAA "normal" en la GSD-III puede no ser suficiente para digerir todo el exceso de glucógeno. La GAA es una 1,4- α -D-glucosidasa exógena lisosomal que hidroliza los enlaces tanto α -1,4 como α -1,6 del glucógeno y puede digerir completamente el glucógeno con y sin ramificaciones exteriores anormalmente cortas (Onodera *et al.*, *J. Biochem.* 116:7-11 (1994)). Así pues, la GAA actúa sobre el glucógeno con ramificaciones exteriores anormalmente cortas, como el que se acumula en la GSD-III. Como este glucógeno de la GSD-III se acumula tanto en el citoplasma como en los lisosomas, el suministro de más GAA puede ayudar a digerir el glucógeno lisosomal y, por tanto, también el glucógeno citoplasmático. Se postula que, como los lisosomas se eliminan del glucógeno, el glucógeno del

citoplasma se mezcla en ellos disminuyendo así la cantidad total de glucógeno acumulada en los pacientes con GSD-III.

La deficiencia de GAA provoca la enfermedad de Pompe (enfermedad por almacenamiento de glucógeno de tipo II), una miopatía metabólica fatal con acumulación de glucógeno en el lisosoma y el citoplasma (lisosoma > citoplasma) (Hirschhorn, "Glycogen Storage Disease Type II: Acid α -glucosidase (Acid Maltase) Deficiency". En: *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, C. R. Scriver *et al.*, eds., VII edición McGraw-Hill/Nueva York, pág. 2443-2464 (1995)). La terapia de reemplazo enzimático con GAA humana recombinante precursora rica en manosa-6-fosfato (man-6-P) da lugar a la endocitosis eficaz mediada por el receptor de man-6-P de la enzima seguida de la reducción del glucógeno tanto lisosomal como citoplasmático en los fibroblastos (Van Hove *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93:65-70 (1996)). *In vivo*, esta enzima se dirige al corazón y al músculo, así como al hígado y al bazo después de la inyección intravenosa en animales y en pacientes humanos con la enfermedad de Pompe. La rápida eliminación del glucógeno en los fibroblastos de Pompe cuando se cultivan en un medio exento de glucosa sugiere una movilización inmediata del glucógeno desde el compartimento tanto lisosomal como citoplasmático (Van Hove *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93:65-70 (1996), DiMauro *et al.*, *Pediatr. Res.* 7:739-744 (1973)). Se contempla que el glucógeno citoplasmático se mezcla de manera continua a través de los lisosomas mediante autofagia para la degradación.

La presente invención procede, al menos en parte, del conocimiento de que la GAA administrada puede reducir el glucógeno lisosomal en los pacientes con GSD-III y, en última instancia, también reduce el glucógeno citoplasmático. Algunas de las GAA administradas también pueden ir directamente al citosol y reducir el glucógeno. La invención proporciona el tratamiento de la GSD-III basándose en el uso de la GAA.

Sumario de la invención

La presente invención se refiere, en general, a la GSD. Más concretamente, un primer aspecto de la invención proporciona α -glucosidasa ácida humana para su uso en el tratamiento de la enfermedad por almacenamiento de glucógeno de tipo III en un individuo, mediante la administración al individuo de una cantidad terapéuticamente eficaz en un intervalo regular, preferentemente mensual, quincenal, semanal, de dos veces a la semana o diario.

Un segundo aspecto de la invención proporciona el uso de una cantidad terapéuticamente eficaz de α -glucosidasa ácida humana para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la enfermedad por almacenamiento de glucógeno de tipo III en un individuo, preparándose preferentemente dicho medicamento para su administración a un intervalo regular que sea mensual, quincenal, semanal, de dos veces a la semana o diario.

Breve descripción de las figuras

Figura 1. Aspecto observado bajo microscopio óptico de la biopsia de músculo esquelético de un paciente con GSD-IIIa. El glucógeno de tinción púrpura está presente como lagunas citoplasmáticas dentro de los miocitos. El glucógeno no está unido a la membrana dentro de los lisosomas, sino que fluye libremente en el citoplasma.

Figura 2. Glucógeno citoplasmático que forma lagunas dentro de los miocitos bajo EM en un paciente con GSD-III.

Figura 3. Se observó glucógeno lisosomal dentro de los miocitos de un paciente con GSD-III.

Figuras 4A y 4B. Patrón de acumulación de glucógeno en las células musculares obtenidas de un sujeto normal y 3 pacientes con GSD-III. Los cultivos se recogieron por duplicado en los tiempos indicados. La actividad GAA celular (Fig. 4A) y el contenido de glucógeno (Fig. 4B) se determinaron por duplicado para cada cultivo (media + DE).

Figuras 5A y 5B. Agotamiento del glucógeno en las células musculares no tratadas por privación de glucosa. Se analizaron la actividad GAA (Fig. 5A) y el contenido de glucógeno (Fig. 5B) en las células musculares GSD-III después del cultivo de 48 horas (desde el día 13 al día 15) en medio de diferenciación con o sin glucosa. (*, valor $p < 0,01$; **, $p < 0,001$).

Figuras 6A y 6B. Absorción de rhGAA y reducción de glucógeno en las células musculares GSD-III después del tratamiento de 48 horas (desde el día 13 al día 15) con 100 μ g de rhGAA. Las células musculares de sujetos normales se trataron desde el día 7 hasta el día 10. (*, valor $p < 0,05$; **, $p < 0,005$; ***, $p < 0,001$).

Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere al tratamiento de la GSD-III mediante la administración de GAA a un individuo que padece la enfermedad. La invención también se refiere al uso de la enzima GAA en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la GSD-III. Como se describe en el presente documento, los pacientes que sufren de, por ejemplo, GSD-III se pueden tratar mediante la administración de GAA de manera regular. Cabe

esperar que los pacientes tratados de este modo demuestren una mejora de la hipoglucemia, hepatomegalia, función hepática, función cardíaca y/o fuerza muscular, así como una reducción de los niveles de glucógeno tisular.

La invención hace posible el tratamiento de la GSD-III, incluyendo la GSD de tipo IIIa, de tipo IIIb, de tipo IIIc o de tipo III d.

Los términos “tratar” y “tratamiento”, como se usan en el presente documento, se refieren a la mejora de uno o más síntomas asociados con la enfermedad, la prevención o el retraso del inicio de uno o más síntomas de la enfermedad y/ la disminución de la gravedad o la frecuencia de uno o más síntomas de la enfermedad. Por ejemplo, el tratamiento se puede referir a la mejora de la hipoglucemia, del retraso del crecimiento, de la hepatomegalia y de la función hepática (por ejemplo, la reducción de SGOT, SGPT); del estado cardíaco (por ejemplo, reducción, mejora o prevención de la cardiomiopatía progresiva, arritmia y otras manifestaciones cardíacas que se puede encontrar, por ejemplo, en la GSD-III), de la miopatía (por ejemplo, tolerancia al ejercicio), de la reducción de los niveles de glucógeno en el tejido (por ejemplo, hígado y músculo) del individuo afectado por la enfermedad, o cualquier combinación de estos efectos. Además, el tratamiento puede prevenir complicaciones a largo plazo tales como cirrosis hepática, carcinoma hepatocelular debido a la eliminación del glucógeno con una estructura anómala. En una realización preferida, el tratamiento incluye la mejora de los síntomas hepáticos, en particular, en la reducción o prevención de la hipoglucemia asociada con la GSD-III), hepatomegalia y la función hepática anómala. Los términos “mejorar”, “prevenir” o “reducir”, como se usan en el presente documento, indican valores relativos a una medición de referencia, tal como una medición en el mismo individuo antes del inicio del tratamiento descrito en el presente documento o una medición en un individuo de control (o múltiples individuos de control) en ausencia del tratamiento descrito en el presente documento. Un individuo de control es un individuo afectado por la misma forma de la enfermedad GSD-III que el individuo que se está tratando, que tiene aproximadamente la misma edad que el individuo que se está tratando (para garantizar que las etapas de la enfermedad en el individuo tratado y el/los individuo/s de control sean comparables).

El individuo que se está tratando puede ser un individuo (bebé, niño, adolescente o ser humano adulto) que tenga GSD-III. El individuo puede tener una actividad de GDE residual o ninguna actividad mensurable. En otra realización preferida, el individuo es un individuo a quien se ha diagnosticado recientemente la enfermedad. El tratamiento precoz (tratamiento que comienza lo antes posible tras el diagnóstico) es importante para reducir al mínimo los efectos de la enfermedad y aumentar al máximo los beneficios del tratamiento.

De acuerdo con la invención, se administra GAA (preferentemente, GAA humana) al individuo. La GAA está en una forma que, cuando se administra, se dirige a tejidos tales como los tejidos afectados por la enfermedad (por ejemplo, hígado, corazón o músculo). En una realización preferida, la GAA humana se administra en su forma precursora, ya que el precursor contiene motivos que permiten la captación eficaz de GAA mediada por los receptores. Como alternativa, se puede administrar una forma madura de GAA humana que se haya modificado para que contenga motivos que permitan la captación eficaz de GAA en las células. En una realización particularmente preferida, la GAA es la forma precursora de GAA humana recombinante.

La GAA se puede obtener a partir de varias fuentes. En una realización particularmente preferida, se usa α -glucosidasa ácida humana recombinante (rhGAA) producida en cultivos de células de ovario de hámster chino (CHO) (véase, por ejemplo, Fuller, M. *et al.*, *Eur. J. Biochem.* 234:903 909 (1995); Van Hove, J. L. K. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 93:65 70 (1996) y el documento USP 7.056.712). La producción de GAA en células CHO genera un producto que tiene glucosilación que permite la captación significativa y eficaz de GAA en tejidos tales como el corazón y el músculo. De acuerdo con la invención, se puede usar MYOZYME (α -alglucosidasa) Genzyme Corp.) u otra GAA humana recombinante.

La GAA tiene una actividad enzimática específica en el intervalo de aproximadamente 1,0-8,0 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína, preferentemente en el intervalo de aproximadamente 4,0-8,0 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína. En una realización preferida, la GAA tiene una actividad enzimática específica de al menos aproximadamente 1,0 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína; más preferentemente, una actividad enzimática específica de al menos aproximadamente 4,0 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína; incluso más preferentemente, una actividad enzimática específica de al menos aproximadamente 6,0 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína; y todavía más preferentemente, una actividad enzimática específica de al menos aproximadamente 8,0 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína.

La GAA se puede administrar sola, o en composiciones o medicamentos que comprendan la GAA como se ha descrito en el presente documento. Las composiciones se pueden formular con un vehículo o excipiente fisiológicamente aceptable para preparar una composición farmacéutica. El vehículo y la composición pueden ser estériles. La formulación deberá ser apropiada para el modo de administración.

Los vehículos farmacéuticamente aceptables adecuados incluyen, pero sin limitación, agua, soluciones salinas (por ejemplo, NaCl), solución salina, solución salina tamponada, alcoholes, glicerol, etanol, goma arábiga, aceites vegetales, alcoholes bencílicos, polietilenglicoles, gelatina, hidratos de carbono tales como lactosa, amilosa o almidón, azúcares tales como manitol, sacarosa u otros, dextrosa, estearato de magnesio, talco, ácido silícico,

parafina viscosa, aceite perfumado, ésteres de ácidos grasos, hidroximetilcelulosa, polivinilpirrolidona, etc., así como combinaciones de los mismos. Si se desea, las preparaciones farmacéuticas se pueden mezclar con agentes auxiliares, por ejemplo, lubricantes, conservantes, estabilizantes, agentes humectantes, emulsionantes, sales para influir en la presión osmótica, tampones, colorantes, saborizantes y/o sustancias aromáticas y similares, que no reaccionan de forma perjudicial con los compuestos activos. En una realización preferida, se usa un vehículo hidrosoluble adecuado para la administración intravenosa.

Si se desea, la composición o el medicamento también puede contener pequeñas cantidades de agentes humectantes o emulsionantes, o agentes tampón del pH. La composición puede ser una solución líquida, suspensión, emulsión, comprimido, píldora, cápsula, formulación de liberación sostenida o polvo. La composición también se puede formular como un supositorio con aglutinantes y vehículos tradicionales tales como triglicéridos. La formulación oral puede incluir vehículos convencionales tales como calidades farmacéuticas de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, polivinilpirrolidona, sacarina sódica, celulosa, carbonato de magnesio, etc.

La composición o el medicamento se pueden formular de acuerdo con los procedimientos habituales en forma de una composición farmacéutica adaptada para la administración a seres humanos. Por ejemplo, en una realización preferida, una composición para administración intravenosa normalmente es una solución en tampón acuoso isotónico estéril. Cuando sea necesario, la composición también puede incluir un agente solubilizante y un anestésico local para reducir el dolor en el punto de la inyección. En general, los ingredientes se suministran por separado o mezclados entre sí en una forma de dosificación unitaria, por ejemplo, en forma de polvo liofilizado seco o concentrado exento de agua en un recipiente herméticamente sellado, tal como una ampolla o un sello que indique la cantidad de agente activo. Cuando la composición se vaya a administrar mediante infusión, se puede dispensar con una botella de infusión que contenga agua estéril de calidad farmacéutica, solución salina o dextrosa/agua. Cuando la composición se administra mediante inyección, se puede proporcionar una ampolla de agua estéril para inyección o solución salina de manera que los ingredientes se puedan mezclar antes de su administración.

La GAA se puede formular en formas neutras o salinas. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen las formadas con grupos amino libres tales como los derivados de los ácidos clorhídrico, fosfórico, acético, oxálico, tartárico, etc. y las formadas con grupos carboxilo libres, tales como los derivados de hidróxidos sódico, potásico, de amonio, cálcico, férrico, isopropilamina, trietilamina, 2-etilamino, etanol, histidina, procaína, etc.

La GAA (o composición o medicamento que contiene GAA) se administra a través de una vía adecuada. En una realización, la GAA se administra por vía intravenosa. En otras realizaciones, la GAA se administra mediante administración directa a un tejido diana, tal como corazón o músculo (por ejemplo, intramuscular). En otra realización más, la GAA se administra oralmente. Si se desea, se pueden usar simultáneamente más de una vía.

La GAA (o composición o medicamento que contiene GAA) se puede administrar sola o junto con otros agentes, tales como antihistamínicos (por ejemplo, difenidramina) o inmunosupresores u otros agentes inmunoterapéuticos que contrarrestan los anticuerpos anti-GAA. Las posibles estrategias de inmunomodulación incluyen la inducción de la tolerancia preventiva bien con el inicio de la terapia o la modulación de la tolerancia tras el desarrollo de anticuerpos inhibidores. La expresión "junto con" indica que el agente se administra a aproximadamente el mismo tiempo que la GAA (o la composición que contiene GAA). Por ejemplo, el agente se puede mezclar en una composición que contenga GAA y, de este modo, se puede administrar de forma simultánea a la GAA. Como alternativa, el agente se puede administrar a la vez, sin mezclar (por ejemplo, mediante la administración del agente "a costas" en la vía intravenosa mediante la que también se administra la GAA o viceversa). En otro ejemplo, el agente se puede administrar por separado (por ejemplo, sin mezclar), pero en un marco de tiempo corto (por ejemplo, en un plazo de 24 horas) de la administración de la GAA. En una realización, la GAA (o composición que contiene GAA) se administra en combinación con un régimen inmunosupresor o inmunoterapéutico diseñado para reducir las cantidades de, o prevenir la producción de anticuerpos anti-GAA. Por ejemplo, se puede usar un protocolo similar a los usados en pacientes de hemofilia (Nilsson, I. M. *et al.*, *N. Engl. J. Med.* 318:947-50 (1988)) para reducir los anticuerpos anti-GAA. En una realización particularmente preferida, el régimen inmunosupresor o inmunoterapéutico se comienza antes de la primera administración de GAA, con el fin de minimizar la posibilidad de producción de anticuerpos anti-GAA. Como ejemplo, es posible el uso de Rituximab, que elimina los linfocitos B maduros que expresan CD20, el metotrexato, que actúa tanto en linfocitos B como T, o diferentes combinaciones de dichos agentes (Mendehlson *et al.*, *N. Engl. J. Med.* 360(2): 194-195 (2009))

La GAA (o composición o medicamento que contiene GAA) se administra en una cantidad terapéuticamente eficaz (es decir, una cantidad de dosis que, cuando se administra, por ejemplo, a intervalos regulares, es suficiente para tratar la enfermedad, tal como mejorando los síntomas asociados con la enfermedad, previniendo o retrasando el inicio de la enfermedad y/o también disminuyendo la gravedad o la frecuencia de los síntomas de la enfermedad, como se ha descrito anteriormente). La cantidad que será terapéuticamente eficaz en el tratamiento de la enfermedad dependerá de la naturaleza y del grado de los efectos de la enfermedad, y se puede determinar mediante técnicas clínicas convencionales. Además, opcionalmente, se pueden emplear ensayos *in vitro* o *in vivo* para ayudar a identificar los intervalos de dosis óptimas. La dosis exacta por emplear también puede depender de la vía de administración y de la gravedad de la enfermedad, y se deberá decidir de acuerdo con el juicio de un facultativo y de las circunstancias de cada paciente. Las dosis eficaces se pueden extrapolar a partir de las curvas

de dosis-respuesta derivadas de sistemas de análisis *in vitro* o de modelos animales. En una realización preferida, la cantidad terapéuticamente eficaz es inferior a aproximadamente 40 mg de enzima/kg de peso corporal del individuo, preferentemente en el intervalo de aproximadamente 1-40 mg de enzima/kg de peso corporal, e incluso más preferentemente aproximadamente 20 mg de enzima/kg de peso corporal o aproximadamente 10 mg de enzima/kg de peso corporal. La dosis eficaz para un individuo concreto se puede variar (por ejemplo, aumentar o reducir) en el tiempo, dependiendo de las necesidades del individuo. Por ejemplo, en momentos de enfermedad física o estrés, o si aparecen o aumentan los anticuerpos anti-GAA, o si los síntomas de la enfermedad empeoran, se puede aumentar la cantidad.

La cantidad terapéuticamente eficaz de GAA (o composición o medicamento que contiene GAA) se administra a intervalos regulares, en función de la naturaleza y del grado de los efectos de la enfermedad, y de forma continua. La administración a un "intervalo regular", como se usa en el presente documento, indica que la cantidad terapéuticamente eficaz se administra periódicamente (a diferencia de la dosis de una vez). El intervalo se puede determinar mediante técnicas clínicas convencionales. En realizaciones preferidas, la GAA se administra mensualmente, quincenalmente, semanalmente; dos veces a la semana o diariamente. El intervalo de administración para un único individuo no tiene que ser un intervalo fijo, sino que se puede variar con el tiempo, en función de las necesidades del individuo. Por ejemplo, en momentos de enfermedad física o estrés, si aparecen o aumentan los anticuerpos anti-GAA, o si los síntomas de la enfermedad empeoran, se puede reducir el intervalo entre dosis.

En una realización preferida, se administra quincenalmente una cantidad terapéuticamente eficaz de 20 mg de enzima/kg de peso corporal. En otra realización preferida, se administra semanalmente una cantidad terapéuticamente eficaz de 10 mg de enzima/kg de peso corporal o se administran dos veces a la semana 5 mg de enzima/kg de peso corporal

La invención se refiere además a una composición farmacéutica que comprende GAA humana, como se describe en el presente documento, en un recipiente (por ejemplo, un vial, frasco, bolsa para la administración intravenosa, jeringa, etc.) con una etiqueta que contiene instrucciones para la administración de la composición para el tratamiento de la GSD-III, tal como mediante los métodos descritos en el presente documento.

En los ejemplos que se presentan a continuación, se describen con mayor detalle ciertos aspectos de la invención (véase también el documento USP 7.056.712).

Ejemplo 1

La GAA es una 1,4- α -D-glucosidasa exógena lisosomal que hidroliza los enlaces tanto α -1,4 como α -1,6 del glucógeno. Se ha desarrollado un sistema altamente eficaz para la producción de GAA humana que se dirige al corazón y al músculo, y corrige la acumulación de glucógeno en pacientes con la enfermedad de Pompe. El exceso de glucógeno en la GSD-III no solo reside en el citoplasma, sino también en el lisosoma (Cornelio *et al.*, *Arch. Neurol.* 41:1027-1032 (1984); Miranda *et al.*, *Ann. Neurol.* 9:283-288 (1981)). Esto sugiere que el exceso de glucógeno citoplasmático se mezcla con mayor eficacia en los lisosomas que se pueden eliminar mediante la actividad "normal" de GAA en las células GSD-III. Se planteó la hipótesis de que el glucógeno citoplasmático se mezcla de manera continua a través de los lisosomas mediante autofagia para la degradación, y que la GAA administrada puede reducir el glucógeno lisosomal en la GSD-III y, en última instancia, también reduce el glucógeno citoplasmático.

Fuente de la enzima

Se pueden cultivar células CHO productoras de alto nivel de GAA en cultivo expandido y purificarse la enzima recombinante. Semanalmente, se obtienen cantidades en el orden de los miligramos de GAA purificada como parte de un proyecto en curso sobre el desarrollo de la terapia de reemplazo enzimático para la enfermedad de Pompe. Son adecuadas MYOZYME (Genzyme Corp.) u otra rhGAA (preferentemente producida por CHO) para su uso en la presente invención.

Fuente de tejido

Se pueden obtener muestras de músculo de pacientes con GSD-IIIa cuya enfermedad se haya diagnosticado previamente mediante la demostración de deficiencia en la actividad desramificante en el hígado y el músculo. Se puede realizar la biopsia muscular con aguja de los pacientes diagnosticados. Cabe esperar el estudio de al menos 3 pacientes con un diagnóstico confirmado de GSD-IIIa. La biopsia muscular con aguja puede obtener de 50 a 70 mg de tejidos suficientes para el análisis. El procedimiento es menos invasivo que una biopsia abierta. Actualmente, hay disponibles fibroblastos cutáneos de 9 pacientes con GSD-IIIa. Hay disponible un protocolo aprobado por IRB que hace posible la obtención de tejido muscular y cutáneo de pacientes con GSD III.

Cultivo celular

Se pueden usar fibroblastos cutáneos y células musculares cultivados para ensayar la viabilidad del uso de GAA para tratar la GSD-III. La atención se centrará particularmente en los pacientes de IIIa que tienen, además de hepatomegalia, miopatía progresiva (debilidad muscular creciente según la prueba de la fuerza muscular en 6 meses a 1 año de seguimiento y/o quejas clínicas de una reducción de la fuerza muscular) y la cardiomiopatía (aumento de la masa del ventrículo izquierdo en un período de 6 a 12 meses de seguimiento), y también los pacientes con enfermedad hepática progresiva. La deficiencia de la enzima desramificante y la acumulación de glucógeno están presentes en los fibroblastos cutáneos y las células musculares cultivados en cultivo de pacientes de GSD-III (Miranda *et al.*, *Ann. Neurol.* 9:283-288 (1981), DiMauro *et al.*, *Pediatr. Res.* 7:739-744 (1973), Yang *et al.*, *Am. J. Hum. Genet.* 47:735-739 (1990), Brown, "Diagnosis of glycogen storage disease", en: Wapnir P. A., (ed), "Congenital Metabolic Disease Diagnosis and Treatment", Dekker, Nueva York, pág. 227-250 (1985)). Las células musculares cultivadas también reflejan resultados de biopsia muscular en los que se observa glucógeno tanto citoplasmático como lisosomal (Cornelio *et al.*, *Arch. Neurol.* 41:1027-1032 (1984), Miranda *et al.*, *Ann. Neurol.* 9:283-288 (1981)). Por lo tanto, los fibroblastos cutáneos y los cultivos musculares se pueden usar para comprender mejor la patogénesis de la enfermedad y evaluar las metodologías terapéuticas. Es posible establecer cultivos musculares a partir de muestras de biopsia muscular usando un protocolo similar al aislamiento de mioblastos de codorniz (Konigsberg, "Methods in Enzymology" 45:51 1-527 (1979)). Se pueden volver a sembrar los cultivos primarios para realizar la selección contra los fibroblastos. Si la muestra de biopsia es demasiado pequeña, se puede realizar un método de aislamiento de mioblastos más eficaz usando el clasificador de células activadas por fluorescencia (Webster, "Experimental Cell Research" 174: 252-265 (1988)). Se puede permitir la diferenciación de los mioblastos en miotubos cambiando el medio a suero de caballo al 2 %. Para realizar los experimentos, se usarán células musculares en la etapa apropiada.

Efecto sobre el glucógeno con el tratamiento de GAA

Las concentraciones de glucógeno en los fibroblastos cutáneos varían con la confluencia y el número de pasos de las células (DiMauro *et al.*, *Pediatr. Res.* 7:739-744 (1973)). Los experimentos se pueden realizar cerca de la confluencia, y cada paciente puede servir como su propio control mediante ensayos simultáneos por duplicado con y sin tratamiento con GAA. Se pueden ensayar la respuesta a la dosis (de 500 a 5.000 nmol/h/ml de GAA) y el curso temporal (de 1 a 10 días) del efecto de la reducción del glucógeno. Se puede medir el contenido de glucógeno en los homogeneizados celulares totales y también individualmente en el citosol y las fracciones lisosomales en bruto (van der Ploeg *et al.*, *J. Neurol. Sci.* 79: 327-336 (1987)). Se puede realizar el examen electromicroscópico en busca de pruebas de la eliminación tanto en el citoplasma y como en los lisosomas.

Para evitar el oscurecimiento de los resultados por parte de la síntesis continua de glucógeno que se produce en las células cultivadas en presencia de glucosa en el medio, se pueden desplazar las células a medio exento de glucosa 24 horas después del tratamiento con GAA. La privación de glucosa produjo más del 80 % de caída del glucógeno en las células normales, pero solo una reducción del 30 % en las células GSD-III (Yang *et al.*, *Am. J. Hum. Genet.* 47:735-739 (1990), Brown, "Diagnosis of glycogen storage disease", en: Wapnir P. A., (ed), "Congenital Metabolic Disease Diagnosis and Treatment", Dekker, Nueva York, pág. 227-250 (1985)). Por lo tanto, persisten niveles suficientemente altos de glucógeno que permiten una evaluación precisa del tratamiento con GAA. El glucógeno persistente en las células GSD-III tiene ramificante exterior corto que se puede evaluar usando glucosa-1-fosfato formada a partir de polisacárido endógeno por la fosforilasa (Yang *et al.*, *Am. J. Hum. Genet.* 47:735-739 (1990)).

El siguiente Ejemplo 2 incluye una descripción de los estudios que se han realizado.

Ejemplo 2

Se han establecido cultivos primarios de músculo esquelético humano de pacientes con GSD-IIIa como un modelo *in vitro* para evaluar la eficacia de rhGAA para el tratamiento de la GSD-III. Se aislaron mioblastos de tres pacientes con GSD-IIIa y de un voluntario sano. Se examinó la histopatología de estas biopsias musculares por microscopía óptica y electrónica (ME) para confirmar la acumulación anómala del glucógeno en estos pacientes con GSD-IIIa. El aspecto bajo el microscopio óptico de las biopsias de músculo esquelético de pacientes con GSD-IIIa mostró la acumulación de abundante glucógeno en las lagunas citoplasmáticas (Fig. 1). Bajo ME, la gran mayoría del glucógeno se encontró libre en el citoplasma junto con una pequeña cantidad de glucógeno unido a la membrana (Fig. 2 y 3).

Se indujo la diferenciación de los mioblastos en miotubos maduros (miogénesis) mediante la incubación de las células musculares en medio de diferenciación bajo en suero (DMEM bajo en glucosa (GIBCO) que contenía suero de caballo Hyclone H1 al 2 % (Sigma), 0,5 mg/ml de fetuína, 0,5 mg/ml de BSA, 0,025 mg/ml de gentamicina y 0,125 µg/ml de anfotericina B (Clonetics). El glucógeno se almacenó en las células musculares GSD-III completamente diferenciadas al suministrar suficiente glucosa en el medio (Fig. 4). Se observó la glucogenosis incompleta en las células GSD-III, pero no en las células de control normales tras la privación de glucosa de 48 horas (Fig. 5), lo que indica la falta de actividad de la enzima desramificante en los pacientes con GSD-III. Se trataron los miotubos GSD-III completamente diferenciados durante 48 horas mediante la adición de 100 µg de

rhGAA (es decir, MYOZYME (Genzyme)) en el medio de cultivo. Se analizaron la actividad de la enzima GAA y el contenido de glucógeno bioquímica e histológicamente en estas células. El tratamiento con GAARh redujo significativamente el nivel de glucógeno en un 48 %, 35 % y 17 %, respectivamente, en las tres células musculares de pacientes con GSD-IIIa (Fig. 6). Estos datos sugieren el papel de la GAA en la eliminación del glucógeno en condiciones en las que el defecto primario produce la acumulación de glucógeno citoplasmático.

REIVINDICACIONES

- 5 1. α -Glucosidasa ácida humana para su uso en el tratamiento de la enfermedad por almacenamiento de glucógeno de tipo III en un individuo mediante la administración al individuo en una cantidad terapéuticamente eficaz a un intervalo regular, preferentemente mensualmente, quincenalmente, semanalmente, dos veces a la semana o diariamente.
- 10 2. α -Glucosidasa ácida humana para su uso según lo reivindicado en la reivindicación 1, en donde la cantidad terapéuticamente eficaz de α -glucosidasa ácida humana es inferior a aproximadamente 40 mg de α -glucosidasa ácida por kilogramo de peso corporal del individuo.
- 15 3. α -Glucosidasa ácida humana para su uso según lo reivindicado en la reivindicación 1, en donde la α -glucosidasa ácida humana es α -glucosidasa ácida humana recombinante o un precursor de α -glucosidasa ácida humana recombinante, siendo preferentemente dicha α -glucosidasa ácida humana recombinante producida en células de ovario de hámster chino.
- 20 4. α -Glucosidasa ácida humana para su uso según lo reivindicado en la reivindicación 1, en donde la α -glucosidasa ácida humana es para la administración por una vía seleccionada del grupo que consiste en: intravenosamente, intramuscularmente, intratecalmente e intraventricularmente.
- 25 5. α -Glucosidasa ácida humana para su uso según lo reivindicado en la reivindicación 1, en donde la α -glucosidasa ácida humana es para la administración en combinación con, o posteriormente a, la administración de un inmunosupresor.
- 30 6. Uso de una cantidad terapéuticamente eficaz de α -glucosidasa ácida humana para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la enfermedad por almacenamiento de glucógeno de tipo III en un individuo siendo dicho medicamento preparado preferentemente para su administración a un intervalo regular, que sea mensualmente, quincenalmente, semanalmente, dos veces a la semana o diariamente.
- 35 7. El uso de la reivindicación 6, en el que la cantidad terapéuticamente eficaz de α -glucosidasa ácida humana es inferior a aproximadamente 40 mg de α -glucosidasa ácida por kilogramo de peso corporal del individuo.
- 40 8. El uso de la reivindicación 6, en el que la α -glucosidasa ácida humana es α -glucosidasa ácida humana recombinante o precursor de α -glucosidasa ácida humana recombinante, siendo preferentemente dicha α -glucosidasa ácida humana recombinante producida en células de ovario de hámster chino.
9. El uso de la reivindicación 6, en el que el medicamento se prepara para su administración por una vía seleccionada del grupo que consiste en intravenosamente, intramuscularmente, intratecalmente e intraventricularmente.
10. El uso de la reivindicación 6, en el que el medicamento comprende además un inmunosupresor.



Figura 1. Aspecto observado bajo microscopio óptico de la biopsia de músculo esquelético de un paciente con GSD IIIa (MG). El glucógeno de tinción púrpura está presente como lagunas citoplasmáticas en los miocitos. El glucógeno no está unido a la membrana en los lisosomas, sino que fluye libremente en el citoplasma.



Figura 2. Glucógeno citoplasmático que forma lagunas en miocito bajo EM (paciente MG)

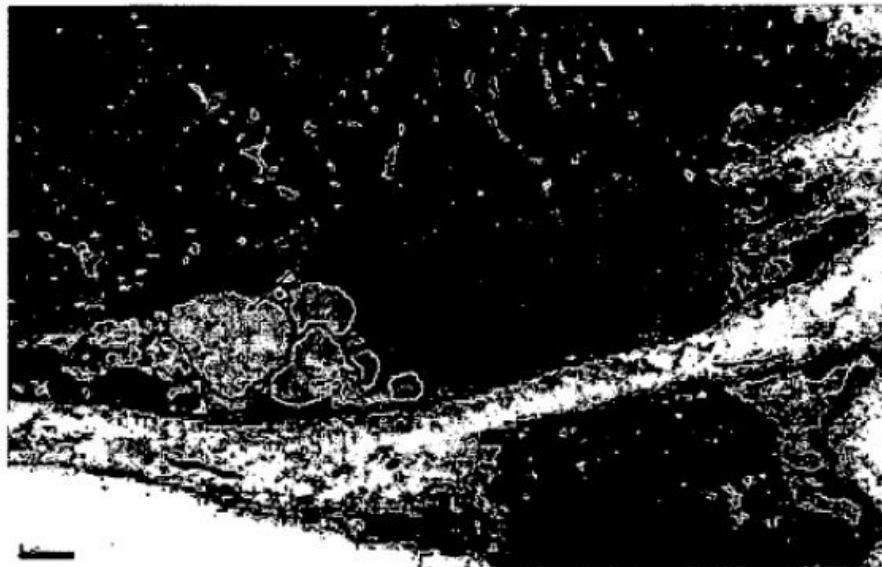


Figura 3. Se observó glucógeno lisosomal en miocito (Paciente MG)

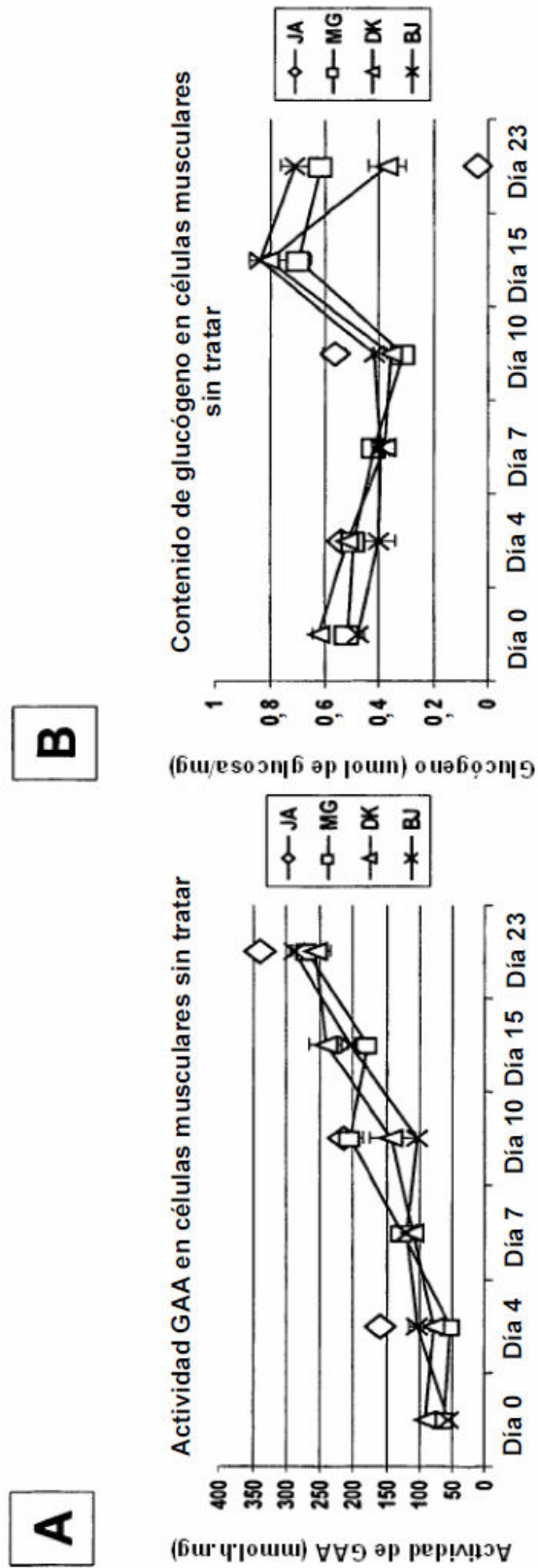
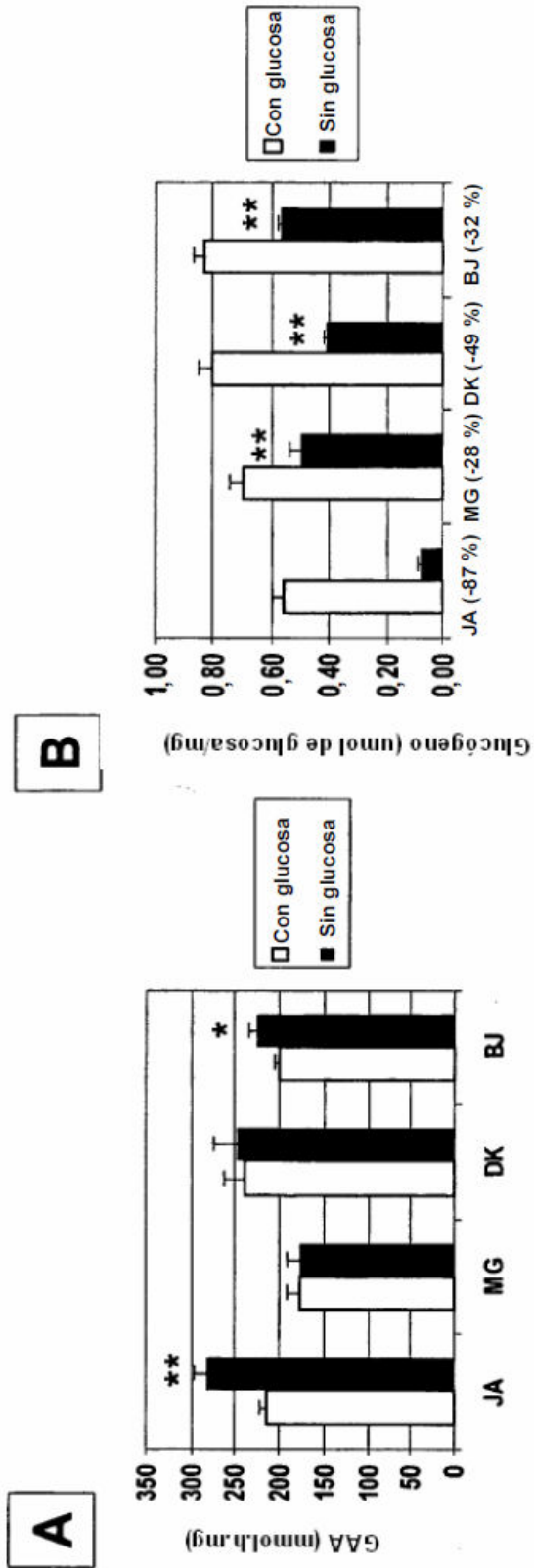


Figura 4. Patrón de acumulación de glucógeno en las células musculares obtenidas de un sujeto normal y 3 pacientes con GSD-III. Los cultivos se recogieron por duplicado en los tiempos indicados. La actividad GAA celular (A) y el contenido de glucógeno (B) se determinaron por duplicado para cada cultivo (media + DE).



Figuras 5. Agotamiento del glucógeno en las células musculares no tratadas por privación de glucosa. Se analizaron la actividad GAA (A) y el contenido de glucógeno (B) en células musculares con GSD-III después del cultivo de 48 horas (desde el día 13 al día 15) en medio de diferenciación con o sin glucosa. (*, valor $p < 0,01$; **, $p < 0,001$).

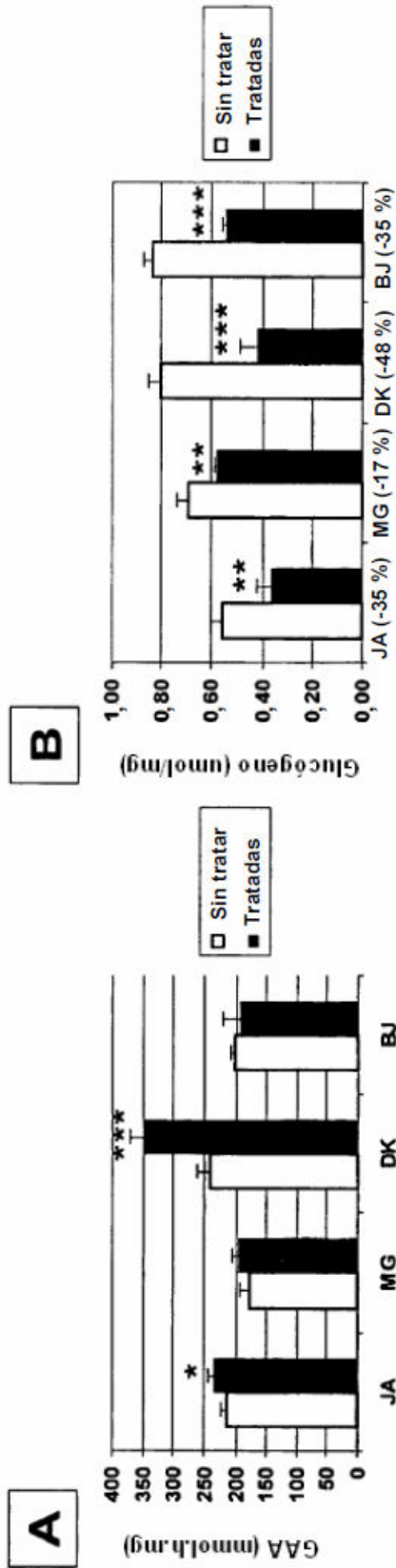


Figura 6. Absorción de rhGAA y reducción de glucógeno en células musculares GSD-III después del tratamiento de 48 horas (desde el día 13 al día 15) con 100 µg de rhGAA. Las células musculares normales de JA se trataron desde el día 7 hasta el día 10. (*, p < 0,05; **, p < 0,005; ***, p < 0,001).