

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 677 343**

51 Int. Cl.:

**C12N 9/24** (2006.01)

**A01N 37/18** (2006.01)

**A61K 38/43** (2006.01)

**A61P 3/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.12.1999 E 08164825 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.04.2018 EP 2020438**

54 Título: **Tratamiento de la enfermedad de Pompe**

30 Prioridad:

**07.12.1998 US 111291 P**

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

**01.08.2018**

73 Titular/es:

**GENZYME CORPORATION (100.0%)  
50 Binney Street  
Cambridge, MA 02142, US**

72 Inventor/es:

**VAN BREE, JOHANNES, BRENARDUS, MATHIAS,  
MARIE;  
VENNEKER, EDNA, HENRIETTE, GERMAINE y  
MEEKER, DAVID, P.**

74 Agente/Representante:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

**ES 2 677 343 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

Tratamiento de la enfermedad de Pompe

**Campo técnico**

5 La presente invención pertenece al campo de la genética recombinante y la medicina, y se refiere a la terapia de reemplazo enzimático de pacientes con la enfermedad de Pompe.

**Antecedentes de la invención**

Al igual que otras proteínas secretoras, las proteínas lisosomales se sintetizan en el retículo endoplasmático y son transportadas al aparato de Golgi. Sin embargo, a diferencia de la mayoría de las otras proteínas secretoras, las proteínas lisosomales no se destinan a la secreción en los fluidos extracelulares sino en un orgánulo intracelular. Dentro del Golgi, las proteínas lisosomales experimentan un procesamiento especial para dotarlas de lo necesario para alcanzar su destino intracelular. Casi todas las proteínas lisosomales experimentan varias modificaciones postraduccionales, incluidas la glucosilación y fosforilación mediante la posición 6' de un grupo de manosa terminal. Los residuos de manosa fosforilados son reconocidos por receptores específicos en la superficie interna del entramado trans de Golgi. Las proteínas lisosomales se unen mediante estos receptores y de esta manera son separadas de las otras proteínas secretoras. Posteriormente, las pequeñas vesículas de transporte que contienen las proteínas unidas al receptor se separan del entramado trans de Golgi y son direccionadas a su destino intracelular. Remítase de manera general a Kornfeld, *Biochem. Soc. Trans.* 18, 367-374 (1990).

Existen más de treinta enfermedades lisosomales, cada una resultado de una deficiencia de una proteína lisosomal particular, normalmente como resultado de una mutación genética. Remítase, por ejemplo, a Cotran *et al.*, Robbins Pathologic Basis of Disease (4.<sup>a</sup> ed. 1989). La deficiencia en la proteína lisosomal normalmente conlleva una acumulación nociva de un metabolito. Por ejemplo, en los síndromes de Hurler, Hunter, Morquio y Sanfilippo, existe una acumulación de mucopolisacáridos; en los síndromes de Tay-Sachs, Gaucher, Krabbe, Niemann-Pick y Fabry, existe una acumulación de esfingolipidosis; y en la fucosidosis y manosidosis, existe, respectivamente, una acumulación de esfingolipidosis que contienen fucosa y fragmentos de glucoproteínas, y de oligosacáridos que contienen manosa.

La enfermedad de glucogenosis de tipo II (GSD II; enfermedad de Pompe; deficiencia de la maltasa ácida) está provocada por una deficiencia de la enzima lisosomal  $\alpha$ -glucosidasa ácida (maltasa ácida). Se distinguen dos formas clínicas: la infantil de aparición temprana y la juvenil y del adulto de aparición tardía. La GSD II infantil aparece poco después del nacimiento y se presenta con una debilidad muscular progresiva e insuficiencia cardíaca. Esta variante clínica es normalmente letal en los dos primeros años de vida. Los síntomas en los pacientes adultos y juveniles de aparición tardía se presentan en etapas posteriores de la vida y únicamente están implicados los músculos esqueléticos. Los pacientes mueren finalmente debido a la insuficiencia respiratoria. De manera excepcional, los pacientes pueden sobrevivir durante más de seis décadas. Existe una buena correlación entre la gravedad de la enfermedad y la actividad residual de  $\alpha$ -glucosidasa ácida, siendo la actividad un 10-20% de la normal en la forma de la enfermedad de aparición tardía y menos de un 2% en la de aparición temprana (remítase a Hirschhorn, *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease* (Scriver *et al.*, eds., 7.<sup>a</sup> ed., McGraw-Hill, 1995), págs. 2443-2464).

Desde el descubrimiento de las deficiencias de las enzimas lisosomales como la causa principal de las tesarismosis lisosomales (remítase, por ejemplo, a Hers, *Biochem. J.* 86, 11-16 (1963)), se ha intentado tratar a los pacientes que padecían tesarismosis lisosomales mediante la administración (intravenosa) de la enzima ausente, es decir, terapia enzimática. Estos experimentos con terapia de reemplazo enzimática para la enfermedad de Pompe no tuvieron éxito. Se utilizó bien  $\alpha$ -glucosidasa no humana de *Aspergillus niger*, que originó reacciones inmunológicas o bien una forma de la enzima que no es incorporada con eficacia por las células (la forma de captación baja, enzima madura de la placenta humana; remítase a más adelante). Además, la duración del tratamiento y/o la cantidad de enzima administrada fueron insuficientes (3-5). La producción de enzimas lisosomales a partir de fuentes naturales tales como la orina humana y los testículos bovinos es, en teoría, posible pero proporciona rendimientos bajos y la enzima purificada no está necesariamente en una forma que pueda ser incorporada por los tejidos de un paciente receptor.

A pesar de las dificultades e incertidumbres anteriores, la invención proporciona alfa-glucosidasa ácida humana para su uso en métodos para tratar pacientes con la enfermedad de Pompe.

**Compendio de la invención reivindicada**

En la presente se divulgan métodos para tratar a un paciente con la enfermedad de Pompe. Tales métodos conllevan administrar al paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de alfa-glucosidasa ácida humana. La dosificación es preferentemente de al menos 10 mg/kg de peso corporal a la semana. En algunos métodos, la dosificación es de al menos 60 mg/kg de peso corporal a la semana o de al menos 120 mg/kg de peso corporal a la semana. En algunos métodos, tales dosificaciones se administran en una única ocasión a la semana y en otros métodos en tres ocasiones a la semana. En algunos métodos, el tratamiento se continúa durante al menos 24

semanas. La administración es preferentemente intravenosa. La alfa-glucosidasa ácida humana se obtiene preferentemente de la leche de un mamífero transgénico no humano y está preferentemente de manera predominante en una forma de 110 kD.

5 Los métodos se pueden utilizar para tratar pacientes con la enfermedad de Pompe infantil, juvenil o del adulto. En algunos métodos de tratamiento de la enfermedad de Pompe infantil la eficacia está indicada por la supervivencia de un paciente hasta alcanzar al menos un año de edad.

En algunos métodos, se controlan los niveles de la alfa-glucosidasa ácida humana en el paciente recostado. Opcionalmente, se puede administrar una segunda dosificación de la alfa-glucosidasa ácida humana si el nivel de alfa-glucosidasa cae por debajo de un valor umbral en el paciente.

10 En algunos métodos, la alfa-glucosidasa humana se administra por vía intravenosa y la tasa de administración se incrementa durante el periodo de administración. En algunos métodos, la tasa de administración se incrementa en al menos un factor de diez durante el periodo de administración. En algunos métodos, la tasa de administración se incrementa en al menos un factor de diez en un periodo de cinco horas. En algunos métodos, al paciente se le administra una serie de al menos cuatro dosificaciones, cada dosificación con una potencia superior a la dosificación previa. En algunos métodos, las dosificaciones son una primera dosificación de 0.03-3 mg/kg/h, una segunda dosificación de 0.3-12 mg/kg/h, una tercera dosificación de 1-30 mg/kg/h y una cuarta dosificación de 2-60 mg/kg/h. En algunos métodos, las dosificaciones son una primera dosificación de 0.1-1 mg/kg/h, una segunda dosificación de 1-4 mg/kg/h, una tercera dosificación de 3-10 mg/kg/h y una cuarta dosificación de 6-20 mg/kg/h. En algunos métodos, las dosificaciones son una primera dosificación de 0.25-4 mg/kg/h, una segunda dosificación de 0.9-1.4 mg/kg/h, una tercera dosificación de 3.6-5.7 mg/kg/h y una cuarta dosificación de 7.2-11.3 mg/kg/h. En algunos métodos, las dosificaciones son una primera dosificación de 0.3 mg/kg/h, una segunda dosificación de 1 mg/kg/h, una tercera dosificación de 4 mg/kg/h y una cuarta dosificación de 12 mg/kg/h. En algunos métodos, la primera, segunda, tercera y cuarta dosificaciones se administran cada una durante periodos de 15 min a 8 horas.

25 En algunos métodos, la primera, segunda, tercera y cuarta dosificaciones se administran, respectivamente, durante periodos de 1 h, 1 h, 0.5 h y 3 h.

También se divulga en la presente una composición farmacéutica que comprende alfa-glucosidasa ácida humana, albúmina sérica humana y un azúcar en un tampón fisiológicamente aceptable en forma estéril. Algunas composiciones de este tipo comprenden alfa-glucosidasa ácida humana, albúmina sérica humana y glucosa en tampón de fosfato de sodio. Algunas composiciones comprenden alfa-glucosidasa, manitol y sacarosa en una solución acuosa. En algunas composiciones, el azúcar comprende manitol y sacarosa y la concentración de manitol es de un 1-3% p/p de la solución acuosa y la concentración de sacarosa es de un 0.1 a un 1% p/p de la solución acuosa. En algunas composiciones, la concentración de manitol es de un 2% p/p la concentración de sacarosa es de un 0.5% p/p.

35 También se divulga en la presente una composición liofilizada producida liofilizando una composición farmacéutica que comprende glucosidasa ácida humana, manitol y sacarosa en solución acuosa. Se puede preparar una composición de este tipo liofilizando una primera composición que comprende alfa-glucosidasa ácida humana, manitol, sacarosa y una solución acuosa para producir una segunda composición; y reconstituir la composición liofilizada en solución salina para producir una tercera composición. En algunas composiciones de este tipo, hay 5 mg/mL de la alfa-glucosidasa ácida humana tanto en la primera como en la tercera composición, hay 2 mg/mL de manitol en la primera composición, hay 0.5 mg/mL de sacarosa en la primera composición y la solución salina utilizada en el paso de reconstitución es un 0.9% p/p.

45 En función de la divulgación contenida en la presente, la presente invención proporciona alfa-glucosidasa ácida humana en la forma de 100 a 110 kD, para su uso en el tratamiento de la enfermedad de Pompe, donde la alfa-glucosidasa ácida humana se administra por vía intravenosa y donde el tratamiento se continúa durante al menos 24 semanas. La invención y las realizaciones preferidas de esta se exponen en las reivindicaciones adjuntas.

### Breve descripción de los dibujos

Fig. 1: Un transgén que contiene ADNc de  $\alpha$ -glucosidasa ácida. Los exones de  $\alpha$ 1-caseína están representados por recuadros sin relleno; el ADNc de  $\alpha$ -glucosidasa está representado por un recuadro sombreado. El intrón de  $\alpha$ 1-caseína y las secuencias flanqueantes están representados por una línea gruesa. Una línea fina representa el sitio aceptor de IgG. El sitio de iniciación de la transcripción está marcado ( $1^{\text{m}}$ ), el sitio de iniciación de la traducción (ATG), el codón de parada (TAG) y el sitio de poliadenilación (pA).

Fig. 2 (paneles A, B, C): Tres transgenes que contienen ADN genómico de  $\alpha$ -glucosidasa ácida. Las áreas sombreadas oscuras son secuencias de  $\alpha$ 1 caseína, los recuadros sin relleno representan exones de  $\alpha$ -glucosidasa ácida y la línea delgada entre los recuadros sin relleno representa intrones de  $\alpha$ -glucosidasa. Los otros símbolos son los mismos que en la Fig. 1.

Fig. 3 (paneles A, B, C): Construcción de transgenes genómicos. Los exones de  $\alpha$ -glucosidasa están representados por recuadros sin relleno; los intrones de  $\alpha$ -glucosidasa y secuencias no traducidas están indicados por líneas delgadas. Las secuencias del vector pKUN están representadas por líneas gruesas.

Fig. 4. Detección de  $\alpha$ -glucosidasa ácida en leche de ratones transgénicos mediante inmunoelectrotransferencia.

## 5 **Definiciones**

La expresión «identidad sustancial» u «homología sustancial» significa que dos secuencias peptídicas, cuando se alinean de forma óptima, tal como mediante los programas GAP o BESTFIT utilizando pesos del hueco por defecto, comparten al menos un 65 por ciento de identidad secuencial, preferentemente al menos un 80 o 90 por ciento de identidad secuencial, más preferentemente al menos un 95 por ciento de identidad secuencial o más (por ejemplo, 99 por ciento de identidad secuencial). Preferentemente, las posiciones de residuos que no son idénticos difieren por sustituciones conservadoras de aminoácidos.

La expresión «sustancialmente puro» o «aislado» se refiere a una especie objeto que ha sido identificada y separada y/o recuperada a partir de un componente de su entorno natural. Normalmente, la especie objeto es la especie predominante presente (es decir, con un criterio molar es más abundante que cualquier otra especie individual de la composición) y preferentemente una fracción sustancialmente purificada es una composición donde la especie objeto comprende al menos aproximadamente un 50 por ciento (con un criterio molar) de todas las especies macromoleculares presentes. Por lo general, una composición sustancialmente pura comprenderá más de aproximadamente un 80 a un 90 por ciento en peso de todas las especies macromoleculares presentes en la composición. De la manera más preferente, la especie objeto está purificada hasta ser esencialmente homogénea (las especies contaminantes no se pueden detectar en la composición mediante métodos de detección convencionales) donde la composición está constituida esencialmente por derivados de una única especie macromolecular.

Un segmento de ADN está ligado operablemente cuando está en una relación funcional con otro segmento de ADN. Por ejemplo, el ADN para una secuencia señal está ligado operablemente al ADN que codifica un polipéptido si se expresa como una preproteína que participa en la secreción del polipéptido; un promotor o potenciador está ligado operablemente a una secuencia codificante si estimula la transcripción de la secuencia. Por lo general, las secuencias de ADN que están ligadas operablemente están contiguas y en el caso de una secuencia señal tanto contiguas como en fase en lo que se refiere a la lectura. Sin embargo, no es necesario que los potenciadores estén contiguos a las secuencias codificantes cuya transcripción controlan. La unión se logra ligando en sitios de restricción convenientes o en adaptadores o conectores insertados en su lugar.

Un segmento de ADN exógeno es uno extraño respecto a la célula, u homólogo respecto a un segmento de ADN de la célula, pero en una posición no natural en el genoma de la célula hospedadora. Los segmentos de ADN exógenos se expresan para generar polipéptidos exógenos.

En un mamífero transgénico, todas, o sustancialmente todas, las células somáticas y de la línea germinal contienen un transgén introducido en el mamífero o un ascendiente del mamífero en una etapa embrionaria temprana.

### **Descripción detallada**

En la presente se divulgan mamíferos no humanos transgénicos que secretan una proteína lisosomal en su leche. La secreción se logra incorporando un transgén que codifica una proteína lisosomal y secuencias reguladoras capaces de direccionar la expresión del gen a la glándula mamaria. El transgén se expresa, el producto de la expresión se modifica postraduccionalmente en la glándula mamaria y a continuación, se secreta en la leche. La modificación postraduccional puede incluir los pasos de glucosilación y fosforilación para producir una proteína lisosomal que contiene manosa-6-fosfato.

### **A. Genes lisosomales**

En la presente se divulgan mamíferos no humanos transgénicos que expresan segmentos de ADN que contienen cualquiera de los más de 30 genes conocidos que codifican enzimas lisosomales y otros tipos de proteínas lisosomales, incluidas la  $\alpha$ -glucosidasa,  $\alpha$ -L-iduronidasa, iduronato-sulfato sulfatasa, hexosaminidasa A y B, proteína activadora de gangliósidos, arilsulfatasa A y B, iduronato sulfatasa, heparán *N*-sulfatasa, galacto-ceramidasa,  $\alpha$ -galactosilceramidasa A, esfingomielinasa,  $\alpha$ -fucosidasa,  $\alpha$ -manosidasa, aspartilglucosamina amida hidrolasa, lipasa ácida, *N*-acetil- $\alpha$ -D-glucosamino-6-sulfato sulfatasa,  $\alpha$ - y  $\beta$ -galactosidasa,  $\beta$ -glucuronidasa,  $\beta$ -manosidasa, ceramidasa, galacto-cerebrosidasa,  $\alpha$ -*N*-acetilgalactosaminidasa y proteína protectora y otras. También se incluyen mamíferos transgénicos que expresan variantes alélicas, análogas e inducidas de cualquiera de las secuencias génicas de proteínas lisosomales conocidas. Tales variantes normalmente muestran una identidad secuencial sustancial a nivel de aminoácidos con genes de proteínas lisosomales conocidos. Tales variantes se hibridan normalmente con un gen conocido en condiciones rigurosas o presentan reactividad cruzada con anticuerpos para un polipéptido codificado por uno de los genes conocidos.

Están disponibles clones de ADN que contienen secuencias genómicas o de ADNc de muchos de los genes conocidos que codifican proteínas lisosomales. (Scott *et al.*, *Am. J. Hum. Genet.* 47, 802-807 (1990); Wilson *et al.*, *PNAS* 87, 8531-8535 (1990); Stein *et al.*, *J. Biol. Chem.* 264, 1252-1259 (1989); Ginns *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 123, 574-580 (1984); Hoefsloot *et al.*, *EMBO J.* 7, 1697-1704 (1988); Hoefsloot *et al.*, *Biochem. J.* 272, 473-479 (1990); Meyerowitz y Proia, *PNAS* 81, 5394-5398 (1984); Scriver *et al.*, *supra*, parte 12, páginas 2427-2882 y referencias citadas allí). Otros ejemplos de secuencias genómicas y de ADNc se pueden adquirir de GenBank. En la medida en que se requieran secuencias clonadas adicionales de genes lisosomales, estas se pueden obtener a partir de colecciones genómicas o de ADNc (preferentemente humano) utilizando como sondas secuencias de ADN de proteínas lisosomales conocidas o anticuerpos para proteínas lisosomales conocidas.

## 10 B. Conformación de proteínas lisosomales

Las proteínas lisosomales recombinantes se procesan preferentemente para que tengan una estructura similar o idéntica a las proteínas lisosomales de origen natural. Las proteínas lisosomales son glucoproteínas que se sintetizan en ribosomas unidos al retículo endoplasmático (RER, por sus siglas en inglés). Entran en este orgánulo de manera simultánea a la traducción guiadas por un péptido señal N-terminal (Ng *et al.*, *Current Opinion in Cell Biology* 6, 510-516 (1994)). El proceso de N-glucosilación comienza en el RER con la transferencia en bloque del precursor oligosacárido rico en manosa Glc3Man9GlcNAc2 desde un portador dolicólico. La modificación de la cadena de carbohidrato comienza en el RER y continúa en el aparato de Golgi con la eliminación de los tres residuos de glucosa más exteriores por parte de las glucosidasas I y II. La fosforilación es un proceso de dos pasos en el cual en primer lugar la N-acetil-glucosamino-1-fosfato es acoplada a ciertos grupos de manosa por una transferasa específica de proteínas lisosomales y, en segundo lugar, la N-acetil-glucosamina es escindida por una diesterasa (Goldberg *et al.*, *Lysosomes: Their Role in Protein Breakdown* (Academic Press Inc., London, 1987), págs. 163-191). La excisión expone la manosa 6-fosfato como un marcador de reconocimiento y ligando para el receptor de la manosa 6-fosfato que media el transporte de la mayoría de las proteínas lisosomales a los lisosomas (Kornfeld, *Biochem. Soc. Trans.* 18, 367-374 (1992)).

Además de la modificación de la cadena de carbohidrato, la mayoría de las proteínas lisosomales experimentan procesamiento proteolítico, en el cual el primer evento es la eliminación del péptido señal. El péptido señal de la mayoría de las proteínas lisosomales es escindido después de la traslocación por una peptidasa señal después de lo cual las proteínas se vuelven solubles. Se dispone de evidencia que sugiere que el péptido señal de la  $\alpha$ -glucosidasa ácida es escindido después de que la enzima haya abandonado el RER, pero antes de que haya entrado en el lisosoma o la ruta secretora (Wisselaar *et al.*, *J. Biol. Chem.* 268, 2223-2231 (1993)). El procesamiento proteolítico de la  $\alpha$ -glucosidasa ácida es complejo y conlleva una serie de pasos además de la escisión del péptido señal que tienen lugar en diversas ubicaciones subcelulares. Los polipéptidos experimentan escisión tanto en los extremos N como C, y de esta manera aumenta la actividad catalítica específica. Las principales especies reconocidas son un precursor de 110/100 kD, un intermedio de 95 kD y formas maduras de 76 kD y 70 kD. (Hasilik *et al.*, *J. Biol. Chem.* 255, 4937-4945 (1980); Oude Elferink *et al.*, *Eur. J. Biochem.* 139, 489-495 (1984); Reuser *et al.*, *J. Biol. Chem.* 260, 8336-8341 (1985); Hoefsloot *et al.*, *EMBO J.* 7, 1697-1704 (1988)). El procesamiento postraduccional de la  $\alpha$ -glucosidasa ácida humana natural y de formas recombinantes de la  $\alpha$ -glucosidasa ácida humana tal como se expresan en células de mamífero cultivadas como las células COS, células BHK y células CHO es similar (Hoefsloot *et al.*, (1990) *supra*; Wisselaar *et al.*, (1993) *supra*).

El procesamiento auténtico para generar proteínas lisosomales fosforiladas en la posición 6' del grupo manosa se puede estudiar midiendo la captación de un sustrato por parte de las células que portan un receptor para la manosa 6-fosfato. Los sustratos modificados de manera correcta son incorporados más rápidamente que los sustratos no modificados y de una manera conforme a la cual la captación del sustrato modificado puede ser inhibida de manera competitiva por la adición de manosa 6-fosfato.

## 45 C. Diseño del transgén

Los transgenes se diseñan para direccionar la expresión de una proteína lisosomal recombinante a la glándula mamaria de un mamífero no humano transgénico que alberga el transgén. La estrategia básica conlleva ligar operablemente un segmento de ADN exógeno que codifica la proteína con una secuencia señal, un promotor y un potenciador. El segmento de ADN puede ser genómico, minigen (genómico en el que se han omitido uno o más intrones), ADNc, un fragmento YAC, una quimera de dos genes de proteínas lisosomales diferentes o un híbrido de cualquiera de estos. La inclusión de secuencias genómicas por lo general da lugar a niveles más elevados de expresión. Los niveles muy elevados de expresión pueden sobrecargar la capacidad de la glándula mamaria para realizar las modificaciones postraduccionales y la secreción de las proteínas lisosomales. Sin embargo, los datos presentados más adelante indican que ocurre una modificación postraduccional sustancial incluida la formación de grupos de manosa 6-fosfato, a pesar de un nivel de expresión elevado en el rango de mg/mL. La expresión «modificación sustancial» significa que al menos aproximadamente un 10, 25, 50, 75 o 90% de las moléculas secretadas portan al menos un grupo de manosa 6-fosfato. Por lo tanto, por lo general se prefieren los constructos genómicos o constructos híbridos de ADNc-genómicos.

En los constructos genómicos no es necesario mantener todas las secuencias intrónicas. Por ejemplo, se pueden eliminar algunas secuencias intrónicas para obtener un transgén más pequeño que facilite las manipulaciones del

ADN y la posterior microinyección. Remítase a Archibald *et al.*, documento WO 90/05188. La eliminación de algunos intrones también es útil en algunos casos para reducir los niveles de expresión y, de esta manera, garantizar que la modificación postraduccional sea sustancialmente completa. En otros casos, excluir un intrón tal como el intrón uno de la secuencia genómica de la  $\alpha$ -glucosidasa ácida conlleva una expresión más elevada de la enzima madura. También es posible eliminar algunos o todos los exones no codificantes. En algunos transgenes, se mutan nucleótidos seleccionados en las secuencias que codifican proteínas lisosomales para eliminar sitios de escisión proteolítica.

Debido a que el uso previsto de las proteínas lisosomales producidas por mamíferos transgénicos es normalmente la administración a seres humanos, la especie a partir de la cual se obtiene el segmento de ADN que codifica una secuencia de una proteína lisosomal es preferentemente la humana. De manera análoga, si el uso destinado fuera la terapia veterinaria (por ejemplo, en un caballo, perro o gato), es preferible que el segmento de ADN proceda de la misma especie.

El promotor y potenciador proceden de un gen que se expresa exclusivamente o al menos preferentemente en la glándula mamaria (es decir, un gen específico de la glándula mamaria). Los genes preferidos como una fuente del promotor y potenciador incluyen la  $\beta$ -caseína,  $\kappa$ -caseína,  $\alpha$ S1-caseína,  $\alpha$ S2-caseína,  $\beta$ -lactoglobulina, proteína ácida del suero lácteo y  $\alpha$ -lactalbúmina. El promotor y el potenciador se obtienen normalmente, pero no siempre, del mismo gen específico de la glándula mamaria. Este gen procede a veces, pero no necesariamente, de la misma especie de mamíferos que el mamífero en el cual se va a expresar el transgén. También se pueden utilizar secuencias de regulación de la expresión de otras especies tales como las que proceden de genes humanos. La secuencia señal debe ser capaz de dirigir la secreción de la proteína lisosomal desde la glándula mamaria. Las secuencias señal adecuadas se pueden obtener a partir de genes de mamíferos que codifican una proteína secretada. Sorprendentemente, las secuencias señal naturales de las proteínas lisosomales son adecuadas, a pesar de que estas proteínas no son secretas normalmente sino que se dirigen a un orgánulo intracelular. Además de tales secuencias señal, las fuentes preferidas de secuencias señal son la secuencia señal procedente del mismo gen del que se obtienen el promotor y el potenciador. Opcionalmente, se incluyen secuencias reguladoras adicionales en el transgén para optimizar los niveles de expresión. Tales secuencias incluyen regiones flanqueantes 5', regiones transcritas pero no traducidas 5', secuencias intrónicas, regiones transcritas pero no traducidas 3', sitios de poliadenilación y regiones flanqueantes 3'. Tales secuencias se obtienen normalmente a partir del gen específico de la glándula mamaria a partir del cual se obtiene el promotor y potenciador o a partir del gen de una proteína lisosomal que se está expresando. La inclusión de tales secuencias produce un medio genético que simula el de un auténtico gen específico de la glándula mamaria y/o el de un auténtico gen de una proteína lisosomal. Este medio genético da como resultado en algunos casos (por ejemplo,  $\alpha$ S1-caseína bovina) una expresión más elevada del gen transcrito. Como alternativa, las regiones flanqueantes y no traducidas 3' se obtienen a partir de otros genes heterólogos tales como el gen de la  $\beta$ -globina o genes virales. La inclusión de regiones no traducidas 3' y 5' a partir de un gen de una proteína lisosomal u otro gen heterólogo también puede incrementar la estabilidad del transcrito.

En algunos casos, se incluyen aproximadamente 0.5, 1, 5, 10, 15, 20 o 30 kb de la secuencia flanqueante 5' procedente de un gen específico de la mama en combinación con aproximadamente 1, 5, 10, 15, 20 o 30 kb de la secuencia flanqueante 3' procedente del gen de una proteína lisosomal que se está expresando. Si la proteína se expresa a partir de una secuencia de ADNc, es conveniente incluir una secuencia intrónica entre el promotor y la secuencia codificante. La secuencia intrónica es preferentemente una secuencia híbrida formada a partir de una porción 5' procedente de una secuencia intercalada procedente del primer intrón de la región específica de la glándula mamaria a partir de la cual se obtiene el promotor y una porción 3' procedente de una secuencia intercalada de una secuencia intercalada de IgG o gen de una proteína lisosomal. Remítase a DeBoer *et al.*, documento WO 91/08216. Un transgén preferido para expresar una proteína lisosomal comprende un gen de una proteína lisosomal híbrido de ADNc-genómico ligado en 5' a un promotor y potenciador de caseína. El gen híbrido incluye la secuencia señal, región codificante y una región flanqueante 3' procedente del gen de una proteína lisosomal. Opcionalmente, el segmento de ADNc incluye una secuencia intrónica entre la caseína 5' y la región no traducida del gen que codifica la proteína lisosomal. Obviamente, los segmentos correspondientes de ADNc y genómicos también se pueden fusionar en otras ubicaciones dentro del gen siempre que se pueda expresar una proteína contigua a partir de la fusión resultante.

Otros transgenes preferidos tienen un segmento de una proteína lisosomal genómico ligado en 5' a secuencias reguladoras de caseína. El segmento genómico está normalmente contiguo a la región no traducida 5' y la región flanqueante 3' del gen. Por lo tanto, el segmento genómico incluye una porción de la secuencia no traducida 5' de la proteína lisosomal, la secuencia señal, intrones alternantes y exones codificantes, una región no traducida 3' y una región flanqueante 3'. El segmento genómico está ligado mediante la región no traducida 5' a un fragmento de caseína que comprende un promotor y un potenciador y normalmente una región no traducida 5'.

La información de la secuencia de ADN está disponible para todos los genes específicos de la glándula mamaria enumerados anteriormente en al menos uno y a menudo varios organismos. Remítase, por ejemplo, a Richards *et al.*, *J. Biol. Chem.* 256, 526-532 (1981) ( $\alpha$ -lactalbúmina de rata); Campbell *et al.*, *Nucleic Acids Res.* 12, 8685-8697 (1984) (WAP de rata); Jones *et al.*, *J. Biol. Chem.* 260, 7042-7050 (1985) ( $\beta$ -caseína de rata); Yu-Lee y Rosen, *J. Biol. Chem.* 258, 10794-10804 (1983) ( $\gamma$ -caseína de rata); Hall, *Biochem. J.* 242, 735-742 (1987) ( $\alpha$ -lactalbúmina humana); Stewart, *Nucleic Acids Res.* 12, 389 (1984) (ADNc de  $\alpha$ s1 y  $\kappa$  caseína bovinas); Gorodetsky *et al.*, *Gene*

66, 87-96 (1988) ( $\beta$  caseína bovina); Alexander *et al.*, *Eur. J. Biochem.* 178, 395-401 (1988) ( $\kappa$  caseína bovina); Brignon *et al.*, *FEBS Lett.* 188, 48-55 (1977) ( $\alpha$ S2 caseína bovina); Jamieson *et al.*, *Gene* 61, 85-90 (1987), Ivanov *et al.*, *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 369, 425-429 (1988), Alexander *et al.*, *Nucleic Acids Res.* 17, 6739 (1989) ( $\beta$  lactoglobulina bovina); Vilotte *et al.*, *Biochimie* 69, 609-620 (1987) ( $\alpha$ -lactalbúmina bovina). La estructura y función de los diversos genes de proteínas de la leche son objeto de revisión por Mercier y Vilotte, *J. Dairy Sci.* 76, 3079-3098 (1993) (incorporado a modo de referencia en su totalidad a todos los efectos). En la medida en que se puedan requerir datos secuenciales adicionales, las secuencias que flanquean las regiones ya obtenidas se podrían clonar fácilmente utilizando las secuencias existentes como sondas. Las secuencias reguladoras específicas de la glándula mamaria de diferentes organismos se obtienen asimismo cribando colecciones procedentes de tales organismos utilizando secuencias nucleotídicas análogas conocidas o anticuerpos para proteínas análogas como sondas.

Las estrategias generales y transgenes ejemplares que emplean secuencias reguladoras de  $\alpha$ S1-caseína para direccionar la expresión de una proteína recombinante a la glándula mamaria se describen con más detalle en DeBoer *et al.*, documentos WO 91/08216 y WO 93/25567. También se han descrito ejemplos de transgenes que emplean secuencias reguladoras de otros genes específicos de la glándula mamaria. Remítase, por ejemplo, a Simon *et al.*, *Bio/Technology* 6, 179-183 (1988) y el documento WO88/00239 (1988) (secuencia reguladora de la  $\beta$ -lactoglobulina para la expresión en ovejas); Rosen, documento EP 279 582 y Lee *et al.*, *Nucleic Acids Res.* 16, 1027-1041 (1988) (secuencia reguladora de la  $\beta$ -caseína para la expresión en ratones); Gordon, *Biotechnology* 5, 1183 (1987) (secuencia reguladora de WAP para la expresión en ratones); documento WO 88/01648 (1988) y *Eur. J. Biochem.* 186, 43-48 (1989) (secuencia reguladora de la  $\alpha$ -lactalbúmina para la expresión en ratones). La expresión de proteínas lisosomales en la leche a partir de transgenes se puede influenciar mediante la coexpresión o inactivación funcional (es decir, anulación) de genes implicados en la modificación postraduccional y direccionamiento de las proteínas lisosomales. Los datos en los Ejemplos indican que sorprendentemente las glándulas mamarias ya expresan enzimas modificadoras en cantidades suficientes para obtener niveles elevados de ensamblaje y secreción de proteínas que contienen manosa-6-fosfato. Sin embargo, en algunos mamíferos transgénicos que expresan niveles elevados de estas proteínas, a veces es preferible complementar los niveles endógenos de enzimas procesadoras con enzima adicional resultado de la expresión del transgén. Tales transgenes se construyen empleando principios similares a los analizados anteriormente con la secuencia que codifica la enzima procesadora reemplazando la secuencia que codifica la proteína lisosomal en el transgén. De manera general, no es necesario que las enzimas de procesamiento postraduccional se secreten. Por lo tanto, la secuencia señal de secreción ligada a la secuencia que codifica la proteína lisosomal es reemplazada por una secuencia señal que direcciona la enzima procesadora al retículo endoplasmático sin secreción. Por ejemplo, son adecuadas las secuencias señal asociadas de manera natural con estas enzimas.

#### D. Transgénesis

Los transgenes descritos anteriormente se introducen en mamíferos no humanos. Son adecuados la mayoría de los mamíferos no humanos, incluidos roedores tales como ratones y ratas, conejos, óvidos tales como ovejas y cabras, suidos tales como cerdos, y bóvidos tales como ganado y búfalos. Los bóvidos ofrecen la ventaja de grandes producciones de leche, mientras que los ratones ofrecen la ventaja de facilidad de transgénesis y cría. Los conejos ofrecen un término medio de estas ventajas. Un conejo puede producir 100 mL de leche al día con un contenido proteico de aproximadamente un 14% (remítase a Buhler *et al.*, *Bio/Technology* 8, 140 (1990)) y sigue siendo posible manipularlos y criarlos utilizando los mismos principios e instalaciones similares a los ratones. Normalmente no se emplean mamíferos no vivíparos tales como un taquiglósido u ornitorrinco.

En algunos métodos de transgénesis, se introducen los transgenes en el pronúcleo de los oocitos fertilizados. Con algunos animales, tales como ratones y conejos, la fertilización se realiza *in vivo* y los óvulos fertilizados se retiran quirúrgicamente. En otros animales, particularmente bóvidos, es preferible retirar los óvulos de animales vivos o de matadero y fertilizar los óvulos *in vitro*. Remítase a DeBoer *et al.*, documento WO 91/08216. La fertilización *in vitro* permite que un transgén se introduzca en células sustancialmente sincronizadas en una fase óptima del ciclo celular para la integración (no más tarde de la fase S). Los transgenes se introducen normalmente por microinyección. Remítase al documento US 4 873 292. Los oocitos fertilizados se cultivan a continuación *in vitro* hasta que se obtiene un embrión preimplantación que contiene aproximadamente 16-150 células. La etapa de 16-32 células de un embrión se describe como una mórula. Los embriones preimplantación que contienen más de 32 células se denominan blastocitos. Estos embriones muestran el desarrollo de una cavidad blastocélica, normalmente en la etapa de 64 células. Los métodos para cultivar oocitos fertilizados hasta la etapa de preimplantación son descritos por Gordon *et al.*, *Methods Enzymol.* 101, 414 (1984); Hogan *et al.*, *Manipulation of the Mouse Embryo: A Laboratory Manual*, C.S.H.L. N.Y. (1986) (embrión de ratón); y Hammer *et al.*, *Nature* 315, 680 (1985) (embriones de conejos y porcinos); Gandolfi *et al.*, *J. Reprod. Fert.* 81, 23-28 (1987); Rexroad *et al.*, *J. Anim. Sci.* 66, 947-953 (1988) (embriones ovinos) y Eyestone *et al.*, *J. Reprod. Fert.* 85, 715-720 (1989); Camous *et al.*, *J. Reprod. Fert.* 72, 779-785 (1984); y Heyman *et al.*, *Theriogenology* 27, 5968 (1987) (embriones bovinos). A veces, los embriones preimplantación se almacenan congelados durante un periodo a la espera de la implantación. Los embriones preimplantación se transfieren al oviducto de una hembra pseudopreñada lo que da como resultado el nacimiento de un animal transgénico o quimérico dependiendo de la etapa de desarrollo cuando se integra el transgén. Los mamíferos quiméricos se pueden criar para formar verdaderos animales transgénicos de líneas germinales.

Como alternativa, los transgenes se pueden introducir en células madre embrionarias (ES, por sus siglas en inglés). Estas células se obtienen a partir de embriones preimplantación cultivados *in vitro*. Bradley *et al.*, *Nature* 309, 255-258 (1984). Los transgenes se pueden introducir en tales células mediante electroporación o microinyección. Las células ES transformadas se combinan con blastocitos de un animal no humano. Las células ES colonizan el embrión y en algunos embriones forman la línea germinal del animal quimérico resultante. Remítase a Jaenisch, *Science*, 240, 1468-1474 (1988). Como alternativa, las células ES se pueden utilizar como una fuente de núcleos para el trasplante a un oocito fertilizado enucleado lo que da lugar a un mamífero transgénico.

Para la producción de animales transgénicos que contienen dos o más transgenes, los transgenes se pueden introducir simultáneamente utilizando el mismo procedimiento que para un único transgén. Como alternativa, los transgenes se pueden introducir inicialmente en animales independientes y después combinarlos en el mismo genoma apareando los animales. Como alternativa, se produce un primer animal transgénico que contiene uno de los transgenes. A continuación, se introduce un segundo transgén en óvulos fertilizados o células madre embrionarias de ese animal. En algunas realizaciones, los transgenes cuya longitud excedería de otra manera los aproximadamente 50 kb, se construyen como fragmentos solapantes. Tales fragmentos solapantes se introducen en un oocito fertilizado o célula madre embrionaria simultáneamente y experimentan recombinación homóloga *in vivo*. Remítase a Kay *et al.*, documento WO 92/03917.

### E. Características de mamíferos transgénicos

Los mamíferos transgénicos incorporan al menos un transgén en su genoma tal como se ha descrito anteriormente. El transgén direcciona la expresión de un segmento de ADN que codifica una proteína lisosomal al menos predominantemente a la glándula mamaria. Sorprendentemente, las glándulas mamarias son capaces de expresar proteínas requeridas para un auténtico procesamiento postraduccional incluidos los pasos de adición de oligosacáridos y fosforilación. El procesamiento por enzimas en la glándula mamaria da como resultado la fosforilación en la posición 6' de los grupos de manosa.

Se pueden secretar niveles elevados de proteínas lisosomales de al menos 10, 50, 100, 500, 1000, 2000, 5000 o 10 000 µg/mL. Sorprendentemente, los mamíferos transgénicos muestran sustancialmente una salud normal. La expresión secundaria de las proteínas lisosomales en tejidos que no son la glándula mamaria no ocurre en un grado suficiente para provocar efectos perjudiciales. Además, la proteína lisosomal exógena producida en la glándula mamaria se secreta con una eficacia suficiente de manera que no se produce un problema significativo debido a la obstrucción del aparato secretor por los depósitos.

La edad a la cual los mamíferos transgénicos pueden empezar a producir leche varía, obviamente, con la naturaleza del animal. Para los bóvidos transgénicos, la edad es aproximadamente dos años y medio de manera natural o seis meses con estimulación hormonal, mientras que para los ratones transgénicos la edad es aproximadamente 5-6 semanas. Obviamente, únicamente se utilizan los miembros femeninos de una especie para producir leche. Sin embargo, los machos transgénicos también son valiosos para procrear descendientes femeninos. El esperma de los machos transgénicos se puede almacenar congelado para la posterior fertilización *in vitro* y generación de descendencia femenina.

### F. Recuperación de proteínas a partir de la leche

Los mamíferos hembra adultos transgénicos producen leche que contiene concentraciones elevadas de la proteína lisosomal exógena. La proteína se puede purificar a partir de la leche, si se desea, en virtud de sus propiedades físicas y químicas distintivas y procedimientos de purificación estándar tales como la precipitación, cromatografía por afinidad, exclusión molecular o intercambio iónico. Remítase de manera general a Scopes, *Protein Purification* (Springer-Verlag, N.Y., 1982).

La purificación de la  $\alpha$  glucosidasa ácida humana a partir de la leche se puede llevar a cabo desnatando la leche transgénica por centrifugación y separación de la grasa, a lo que sigue la separación de caseínas por centrifugación a velocidad elevada a lo que sigue la filtración a través de lecho o membrana (*dead-end filtration*) (es decir, filtración a través de lecho o membrana utilizando sucesivamente tamaños de filtro descendentes) o filtración de flujo tangencial o separación de las caseínas directamente por filtración de flujo tangencial. La  $\alpha$ -glucosidasa ácida humana se purifica mediante cromatografía, que incluye Q Sepharose FF (u otra matriz de intercambio aniónico), cromatografía de interacción hidrófoba (HIC, por sus siglas en inglés), Sepharose que quela metales o lectinas acopladas a Sepharose (u otras matrices).

Se puede utilizar cromatografía de flujo rápido con Q Sepharose para purificar  $\alpha$ -glucosidasa ácida humana presente en el suero lácteo filtrado o fracción del suero lácteo de la siguiente manera: se equilibró una columna cromatográfica (columna Pharmacia XK-50, altura del lecho de 15 cm; tasa de flujo de 250 cm/h) con Q Sepharose de flujo rápido (QFF; Pharmacia) en tampón de fosfato de sodio 20 mM, pH 7.0 (tampón A); la fracción del suero lácteo con incubación S/D (de aproximadamente 500 a 600 mL) se carga y la columna se lava con 4-6 volúmenes de columna (cv, por sus siglas en inglés) de tampón A (tampón de fosfato de sodio 20 mM, pH 7.0). La fracción con  $\alpha$ -glucosidasa ácida humana se eluye de la columna Q FF con 2-3 cv de tampón A, que contiene NaCl 100 mM.

La fracción que contiene  $\alpha$ -glucosidasa ácida humana de Q FF Sepharose se puede purificar adicionalmente utilizando cromatografía de alta resolución con Fenil Sepharose. Por ejemplo, se añade 1 vol. de sulfato de amonio 1 M al eluido de  $\alpha$ -glucosidasa ácida humana Q FF Sepharose a la vez que se agita continuamente. A continuación se lleva a cabo la cromatografía en columna con Fenil HP (Pharmacia) (columna Pharmacia XK-50, altura del lecho de 15 cm; tasa de flujo de 150 cm/h) a temperatura ambiente equilibrando la columna en sulfato de amonio 0.5 M, tampón de fosfato de sodio 50 mM pH 6.0 (tampón C), cargando el eluido de  $\alpha$ -glucosidasa ácida humana que se ha incubado con sulfato de amonio 0.5 M (de QFF Sepharose), lavando la columna con 2-4 cv de tampón C y eluyendo la  $\alpha$ -glucosidasa ácida humana de la columna Fenil HP con 3-5 cv de tampón D (tampón de fosfato de sodio 50 mM a pH 6.0). Para los expertos en la técnica serán evidentes métodos alternativos y métodos adicionales para purificar aún más la  $\alpha$ -glucosidasa ácida humana. Por ejemplo, remítase a la solicitud de patente del Reino Unido 998 07464.4.

### G. Usos de las proteínas lisosomales recombinantes

Las proteínas lisosomales recombinantes producidas de acuerdo con la divulgación son útiles en los procedimientos terapéuticos de reemplazo enzimático. Un paciente que padece una deficiencia genética o de otro tipo que resulta en una insuficiencia de enzima lisosomal funcional se puede tratar administrando al paciente enzima exógena. Los pacientes que necesitan un tratamiento de este tipo se pueden identificar a partir de los síntomas (por ejemplo, los síntomas del síndrome de Hurler incluyen enanismo, turbidez córnea, hepatosplenomegalia, lesiones valvulares, lesiones arteriales coronarias, deformidades esqueléticas, rigidez articular y retraso mental progresivo). Como alternativa, o además, los pacientes se pueden diagnosticar a partir del análisis bioquímico de una muestra tisular con el fin de revelar una acumulación excesiva de un metabolito característico procesado por una enzima lisosomal particular o mediante un ensayo enzimático que utiliza un sustrato artificial o natural con el fin de revelar la deficiencia de una actividad enzimática lisosomal particular. Para la mayoría de las enfermedades, el diagnóstico se puede realizar midiendo la deficiencia de la enzima particular o por análisis de ADN antes de que se presenten los síntomas o una acumulación excesiva de metabolitos (Scriver *et al.*, *supra*, capítulos sobre tesarismosis lisosomales). Todas las tesarismosis lisosomales son hereditarias. Por lo tanto, en la descendencia de familias con miembros de los que se sabe que padecen enfermedades lisosomales, a veces es recomendable comenzar el tratamiento profiláctico incluso antes de que se pueda realizar un diagnóstico definitivo.

### Composiciones farmacéuticas

En algunos métodos, las enzimas lisosomales se administran en forma purificada junto con un portador farmacéutico en forma de una composición farmacéutica. La forma preferida depende del modo de administración y la aplicación terapéutica previstos. El portador farmacéutico puede ser cualquier sustancia compatible y atóxica adecuada para suministrar los polipéptidos al paciente. Como el portador se puede utilizar agua estéril, alcohol, grasas, ceras y sólidos inertes. También se pueden incorporar adyuvantes farmacéuticamente aceptables, agentes tamponantes, agentes de dispersión y similares a las composiciones farmacéuticas.

La concentración de la enzima en la composición farmacéutica puede variar ampliamente, es decir, desde menos de aproximadamente un 0.1% en peso, siendo normalmente al menos aproximadamente un 1% en peso hasta un 20% en peso o más.

Para la administración oral, el principio activo se puede administrar en formas farmacéuticas sólidas, tales como cápsulas, comprimidos y polvos o en formas farmacéuticas líquidas, tales como elixires, jarabes y suspensiones. El(los) componente(s) activo(s) se puede(n) encapsular en cápsulas de gelatina junto con ingredientes inactivos y portadores en polvo tales como glucosa, lactosa, sacarosa, manitol, almidón, celulosa o derivados de celulosa, estearato de magnesio, ácido esteárico, sacarina sódica, talco, carbonato de magnesio y similares. Son ejemplos de ingredientes inactivos adicionales que se pueden añadir para proporcionar color, sabor, estabilidad, capacidad tamponante o dispersión deseables u otras características conocidas deseables el óxido de hierro rojo, gel de sílice, laurilsulfato de sodio, dióxido de titanio, tinta blanca comestible y similares. Se pueden utilizar diluyentes similares para preparar comprimidos prensados. Tanto los comprimidos como las cápsulas se pueden producir como productos de liberación sostenida para proporcionar una liberación continua de la medicación a lo largo de un periodo de horas. Los comprimidos prensados pueden estar recubiertos con azúcar o recubiertos con películas para enmascarar cualquier sabor desagradable y proteger el comprimido de la atmósfera, o con un recubrimiento entérico para una desintegración selectiva en el tubo gastrointestinal. Las formas farmacéuticas líquidas para la administración oral pueden contener colorantes y saborizantes para aumentar la aceptación por parte del paciente.

Se podría preparar una composición típica para infusión intravenosa para que contuviera de 100 a 500 mL de NaCl al 0.9% o glucosa al 5% estéril complementados opcionalmente con una solución de albúmina al 20% y de 100 a 500 mg de una enzima. Se podrían preparar composiciones farmacéuticas típicas para inyección intramuscular para que contuvieran, por ejemplo, 1 mL de agua tamponada estéril y de 1 a 10 mg de alfa-glucosidasa purificada de la presente divulgación. Los métodos para preparar composiciones que se pueden administrar por vía parenteral son muy conocidos en la técnica y se describen más detalladamente en varios medios, incluido, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Science (15.<sup>a</sup> ed., Mack Publishing, Easton, PA, 1980). Se puede formular AGLU en tampón de fosfato de sodio 10 mM, pH 7.0. Pequeñas cantidades de sulfato de amonio están presentes de manera opcional (<10 mM). La enzima se mantiene normalmente congelada a aproximadamente -70 °C y se descongelan

antes de su uso. Como alternativa, la enzima se puede almacenar fría (por ejemplo, de aproximadamente 4 °C a aproximadamente 8 °C) en solución. En algunas realizaciones, las soluciones de AGLU comprenden un tampón (por ejemplo, fosfato de sodio, fosfato de potasio u otros tampones fisiológicamente aceptables), un carbohidrato simple (por ejemplo, sacarosa, glucosa, maltosa, manitol o similares), proteínas (por ejemplo, albúmina sérica humana) y/o surfactantes (por ejemplo, polisorbato 80 (Tween-80), cremophore-EL, cremophore-R, labrofil y similares).

Se puede almacenar AGLU en forma liofilizada. Para la liofilización, se puede formular AGLU en una solución que contiene manitol y sacarosa en un tampón de fosfato. La concentración de sacarosa debería ser suficiente para prevenir la agregación de AGLU tras la reconstitución. La concentración de manitol debería ser suficiente para reducir significativamente el tiempo que se necesitaría de otra manera para la liofilización. Sin embargo, las concentraciones de manitol y sacarosa deberían ser insuficientes para provocar una hipertonicidad inaceptable tras la reconstitución. Son adecuadas concentraciones de manitol y sacarosa de 1-3 mg/mL y 0.1-1.0 mg/mL, respectivamente. Las concentraciones preferidas son 2 mg/mL de manitol y 0.5 mg/mL de sacarosa. La concentración de AGLU es preferentemente de 5 mg/mL antes de la liofilización y después de la reconstitución. Una solución preferida para la reconstitución es la solución salina preferentemente al 0.9%.

Para AGLU purificada a partir de leche de conejo, se puede tolerar una pequeña cantidad de impurezas (por ejemplo, de hasta aproximadamente un 5%). Las posibles impurezas pueden estar presentes en forma de proteínas del suero lácteo de conejo. Otras impurezas posibles son análogos estructurales (por ejemplo, oligómeros y agregados) y truncamientos de AGLU. Los lotes actuales indican que la AGLU producida en ratones transgénicos tiene una pureza >95%. Las mayores impurezas son proteínas del suero lácteo de conejo, aunque en la electroforesis en gel también se pueden ver bandas de AGLU con diferentes pesos moleculares.

Las soluciones para la infusión se deberían preparar asépticamente en una campana de flujo de aire laminar. Se debería retirar del congelador la cantidad apropiada de AGLU y descongelarla a temperatura ambiente. Las soluciones para infusión se pueden preparar en botellas de infusión de vidrio mezclando la cantidad apropiada de la solución del producto final de tipo AGLU con una cantidad adecuada de una solución que contiene albúmina sérica humana (HSA, por sus siglas en inglés) y glucosa. La concentración final puede ser de un 1% de HSA y un 4% de glucosa para dosis de 25-200 mg y de un 1% de HSA y un 4% de glucosa para dosis de 400-800 mg. La HSA y AGLU se pueden filtrar con un filtro de jeringa de 0.2 µm antes de transferirlas a la botella de infusión que contiene glucosa al 5%. Como alternativa, se puede reconstituir AGLU en solución salina, preferentemente al 0.9% para infusión. Se ha mostrado que las soluciones de AGLU para infusión son estables durante hasta 7 horas a temperatura ambiente. Por lo tanto, la solución de AGLU se infunde preferentemente en las siete horas siguientes a la preparación.

### **Métodos terapéuticos**

En la presente se divulgan métodos eficaces para tratar la enfermedad de Pompe. Estos métodos tienen como premisa en parte la disponibilidad de grandes cantidades de alfa-glucosidasa ácida humana en una forma que es catalíticamente activa y en una forma que pueda ser captada por los tejidos, especialmente el hígado, corazón y músculo (por ejemplo, músculo liso, músculo estriado y músculo cardíaco) de un paciente que esté siendo tratado. Tal alfa-glucosidasa ácida humana se obtiene, por ejemplo, a partir de los animales transgénicos descritos en los Ejemplos. La alfa-glucosidasa está preferentemente de manera predominante (es decir, >50%) en la forma precursora de aproximadamente 100-110 kD. (El peso molecular aparente o movilidad relativa del precursor de 100-110 kD puede variar en cierta medida dependiendo del método de análisis utilizado, pero normalmente está en el intervalo entre 95 kD y 120 kD). Teniendo en cuenta el éxito de los resultados con alfa-glucosidasa ácida humana en los animales transgénicos que se analizan en los Ejemplos, es posible que también se puedan utilizar otras fuentes de alfa-glucosidasa humana, tales como las que son el resultado de los sistemas de expresión celular. Por ejemplo, una manera alternativa de producir  $\alpha$ -glucosidasa ácida humana es transferir el gen de la  $\alpha$ -glucosidasa ácida a una línea celular eucariota estable (por ejemplo, CHO) como un constructo genómico o de ADNc ligado operablemente a un promotor adecuado. Sin embargo, resulta más laborioso producir las grandes cantidades de alfa-glucosidasa ácida humana necesarias para la terapia clínica mediante una estrategia de este tipo.

Las composiciones farmacéuticas de la presente divulgación se administran normalmente por vía intravenosa. En algunas circunstancias también es posible la administración intradérmica, intramuscular u oral. Las composiciones se pueden administrar para el tratamiento profiláctico de individuos que padecen una enfermedad por una deficiencia enzimática lisosomal o que están en riesgo de padecerla. Para las aplicaciones terapéuticas, las composiciones farmacéuticas se administran a un paciente que padece una enfermedad establecida en una cantidad suficiente para reducir la concentración de metabolito acumulado y/o prevenir o detener una acumulación adicional del metabolito. Para los individuos en riesgo de padecer una enfermedad por una deficiencia enzimática lisosomal, las composiciones farmacéuticas se administran de manera profiláctica en una cantidad suficiente para prevenir o inhibir la acumulación del metabolito. Una cantidad adecuada para conseguir esto se define como una «dosis eficaz desde un punto de vista terapéutico» o «desde un punto de vista profiláctico». Las dosificaciones eficaces de este tipo dependerán de la gravedad de la afección y del estado general de salud del paciente.

En los métodos de la presente, la alfa-glucosidasa ácida humana se administra a un paciente normalmente con una dosificación de 10 mg/kg de peso corporal del paciente o más a la semana. A menudo las dosificaciones son

mayores que 10 mg/kg a la semana. Las pautas posológicas pueden variar de 10 mg/kg a la semana a al menos 1000 mg/kg a la semana. Normalmente, las pautas posológicas son de 10 mg/kg a la semana, 15 mg/kg a la semana, 20 mg/kg a la semana, 25 mg/kg a la semana, 30 mg/kg a la semana, 35 mg/kg a la semana, 40 mg/kg a la semana, 45 mg/kg a la semana, 60 mg/kg a la semana, 80 mg/kg a la semana y 120 mg/kg a la semana. En las pautas preferidas, se administran 10 mg/kg, 15 mg/kg, 20 mg/kg, 30 mg/kg o 40 mg/kg una, dos o tres veces a la semana. El tratamiento se prolonga normalmente durante al menos 4 semanas, a veces 24 semanas y a veces durante el resto de vida del paciente. El tratamiento se administra preferentemente i.v. Opcionalmente, los niveles de alfa-glucosidasa humana se controlan tras el tratamiento (por ejemplo, en el plasma o músculo) y se administra una dosificación adicional cuando los niveles detectados caen sustancialmente por debajo (por ejemplo, menos de un 20%) de los valores en personas normales.

En algunos métodos, la alfa-glucosidasa ácida humana se administra con una dosis «elevada» inicialmente (es decir, una «dosis de carga»), seguida por la administración de dosis más bajas (es decir, una «dosis de mantenimiento»). Un ejemplo de una dosis de carga es al menos aproximadamente 40 mg/kg de peso corporal del paciente de 1 a 3 veces a la semana (por ejemplo, durante 1, 2 o 3 semanas). Un ejemplo de una dosis de mantenimiento es de al menos aproximadamente 5 a al menos aproximadamente 10 mg/kg de peso corporal del paciente a la semana, o más, tal como 20 mg/kg a la semana, 30 mg/kg a la semana, 40 mg/kg a la semana.

En algunos métodos, se administra una dosificación con una tasa creciente durante el periodo de dosificación. Esto se puede conseguir incrementando la tasa de flujo de la infusión intravenosa o utilizando un gradiente de concentración creciente de alfa-glucosidasa administrada con una tasa constante. La administración de esta manera reduce el riesgo de reacción inmunógena. En algunas dosificaciones, la tasa de administración medida en unidades de alfa-glucosidasa por unidad de tiempo aumenta en al menos un factor de diez. Normalmente, la infusión intravenosa ocurre a lo largo de un periodo de varias horas (por ejemplo, 1-10 horas y preferentemente 2-8 horas, más preferentemente 3-6 horas) y la tasa de infusión se hace aumentar a intervalos durante el periodo de administración.

Las dosificaciones adecuadas (todas en mg/kg/h) para la infusión con tasas crecientes se muestran a continuación en la tabla 1. La primera columna de la tabla indica periodos de tiempo en la programación posológica. Por ejemplo, la referencia a 0-1 h se refiere a la primera hora de la dosificación. La quinta columna de la tabla muestra el intervalo de dosis que se pueden utilizar en cada periodo de tiempo. La cuarta columna muestra un intervalo incluido más estrecho de las dosificaciones preferidas. La tercera columna indica los valores superior e inferior de las dosificaciones administradas en un ensayo clínico a modo de ejemplo. La segunda columna muestra dosificaciones especialmente preferidas, representando estas la media del intervalo mostrado en la tercera columna de la tabla 1.

Tabla 1

Tiempo	Dosis medias (l)	Valores inferior y superior	Intervalo preferido	Intervalo
0-1 h:	0.3 mg/kg/h	0.25-0.4	0.1-1	0.03-3
1-2 h:	1 mg/kg/h	0.9-1.4	1-4	0.3-12
2-2.5 h:	4 mg/kg/h	3.6-5.7	3-10	1-30
2.5-5.6hr.	12 mg/kg/h	7.2-11.3	6-20	2-60

Los métodos son eficaces en pacientes con la enfermedad de Pompe tanto de aparición temprana (infantil) como de aparición tardía (juvenil y del adulto). En pacientes con la forma infantil de la enfermedad de Pompe los síntomas se vuelven evidentes en los primeros 4 meses de vida. Principalmente, al principio se nota un desarrollo motor deficiente y la incapacidad de prosperar. En el examen clínico, se observa una hipotonía generalizada con atrofia muscular, aumento de la velocidad de respiración con retracción esternal, aumento moderado del hígado y protrusión de la lengua. La ecografía del corazón muestra una cardiomiopatía hipertrófica progresiva, que conlleva en última instancia un rendimiento cardíaco insuficiente. El ECG está caracterizado por una desviación marcada del eje izquierdo, un intervalo PR corto, complejos QRS grandes, ondas T invertidas y depresión de ST. La enfermedad muestra un curso que progresa rápidamente y que conlleva insuficiencia cardiorrespiratoria en el primer año de vida. En el examen histológico de la autopsia se observa almacenamiento de glucógeno lisosomal en varios tejidos y más pronunciado en el corazón y músculo esquelético. El tratamiento con alfa-glucosidasa ácida humana en los métodos de la presente da como resultado una prolongación de la vida de estos pacientes (por ejemplo, superior a 1, 2, 5 años y hasta una longevidad normal). El tratamiento también da como resultado la eliminación o reducción de las características clínicas y bioquímicas de la enfermedad de Pompe tal como se ha realizado anteriormente. El tratamiento se administra poco después del nacimiento o de manera antenatal si se sabe que los padres portan alelos de la alfa-glucosidasa variantes que ponen a su progenie en riesgo.

Los pacientes con la forma del adulto de aparición tardía de la enfermedad de Pompe puede que no experimenten síntomas en las dos primeras décadas de vida. En ese subtipo clínico, están implicados principalmente los músculos esqueléticos con predilección por los de la cintura y extremidades, el tronco y el diafragma. La queja inicial es a menudo la dificultad para subir escaleras. La insuficiencia respiratoria varía considerablemente. Puede dominar el cuadro clínico o que el paciente no la experimente hasta una etapa posterior de su vida. La mayoría de los pacientes fallecen debido a la insuficiencia respiratoria. En los pacientes con subtipo juvenil, los síntomas normalmente se vuelven evidentes en la primera década de vida. Al igual que la enfermedad de Pompe del adulto, la debilidad de los músculos esqueléticos es el principal problema; se pueden observar cardiomegalia, hepatomegalia y macroglosia, pero son raras. En muchos casos, se necesita con urgencia soporte respiratorio durante la noche. Las infecciones pulmonares combinadas con la atrofia de los músculos respiratorios son potencialmente letales y en la mayoría de los casos causan la muerte antes de la tercera década. El tratamiento con los métodos de la presente prolonga la vida de los pacientes con la enfermedad de Pompe juvenil o del adulto de aparición tardía hasta una longevidad normal. El tratamiento también elimina o reduce significativamente los síntomas clínicos o bioquímicos de la enfermedad.

### 15 **Otros usos**

Las proteínas lisosomales producidas en la leche de animales transgénicos tienen varios usos diferentes. Por ejemplo, la  $\alpha$ -glucosidasa, en común con otras  $\alpha$ -amilasas, es una herramienta importante para producir almidón, cerveza y agentes farmacéuticos. Remítase a Vihinen y Mantsala, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 24, 329-401 (1989). Las proteínas lisosomales también son útiles para producir agentes químicos de laboratorio o productos alimentarios. Por ejemplo, la  $\alpha$ -glucosidasa ácida degrada enlaces glucídicos 1,4- y 1,6- $\alpha$  y se puede utilizar para degradar diversos carbohidratos que contienen esos enlaces tales como maltosa, isomaltosa, almidón y glucógeno, para generar glucosa. La  $\alpha$ -glucosidasa ácida también es útil para administrar a pacientes con una deficiencia de maltasa o isomaltasa intestinal. Se evitan los síntomas que de otra manera serían el resultado de la presencia de maltosa no digerida. En tales aplicaciones, la enzima se puede administrar sin un fraccionamiento previo a partir de la leche, como un producto alimentario derivado a partir de tal leche (por ejemplo, helado o queso) o como una composición farmacéutica. Las enzimas lisosomales recombinantes purificadas también son útiles para su inclusión como controles en kits diagnósticos para someter a ensayo cantidades desconocidas de tales enzimas en muestras tisulares.

### Ejemplos

#### 30 **Ejemplo 1: Construcción de transgenes**

##### (a) Constructo de ADNc

La construcción de un vector de expresión que contiene ADNc que codifica la  $\alpha$ -glucosidasa ácida humana comenzó con el plásmido p16,8h1f3 (remítase a DeBoer *et al.* (1991) y (1993), *supra*). Este plásmido incluye las secuencias reguladoras de la  $\alpha$ S1-caseína bovina. El inserto de ADNc de lactoferrina del plásmido progenitor fue intercambiado por el ADNc de la  $\alpha$ -glucosidasa ácida humana (Hoefsloot *et al.* *EMBO J.* 7,1697-1704 (1988)) en el sitio ClaI y Sall del casete de expresión que se muestra en la Fig. 1. Para obtener sitios de restricción compatibles en los extremos del fragmento de ADNc de la  $\alpha$ -glucosidasa, se digirió el plásmido pSHAG2 (id.) que contenía el ADNc completo que codificaba la  $\alpha$ -glucosidasa humana con EcoRI y SphI y el fragmento de ADNc de 3.3 kb se subclonó en pKUN7 $\Delta$ C un derivado de pKUN1 (Konings *et al.*, *Gene* 46, 269-276 (1986)), con un sitio ClaI destruido dentro de las secuencias nucleotídicas del vector y con un policonector recién diseñado: HindIII ClaI EcoRI SphI XhoI EcoRI SfiI SfiI/SmaI NotI EcoRI\*(= sitio destruido). A partir del plásmido pagluCESX resultante, el fragmento de ADNc de 3.3 kb podría ser escindido por ClaI y XhoI. Este fragmento se insertó en el casete de expresión que se muestra en la Fig. 1 en el sitio ClaI y sitio Sall compatible con XhoI. Como resultado, el plásmido de expresión p16,8 $\alpha$ glu está constituido por la secuencia de ADNc que codifica la  $\alpha$ -glucosidasa ácida humana flanqueada por las secuencias de  $\alpha$ S1-caseína bovina tal como se muestra en la Fig. 1. El fragmento de 27.3 kb que contiene el casete de expresión completo se puede escindir mediante escisión con NotI (remítase a la Fig. 1).

##### (b) Constructos genómicos

El constructo c8 $\alpha$ gluex1 contiene el gen de la  $\alpha$ -glucosidasa ácida humana (Hoefsloot *et al.*, *Biochem. J.* 272, 493-497 (1990)); comenzando en el exón 1 adyacente en dirección 3' respecto a su sitio de inicio de la transcripción (remítase a la Fig. 2, panel A). Por lo tanto, el constructo codifica casi una 5' UTR completa del gen de la  $\alpha$ -glucosidasa ácida humana. Este fragmento se fusionó con las secuencias promotoras del gen de  $\alpha$ S1-caseína bovina. El sitio de iniciación de la  $\alpha$ S1-caseína está presente 22 pb en dirección 5' respecto a la unión  $\alpha$ S1-caseína/ $\alpha$ -glucosidasa ácida. El constructo tiene la señal de poliadenilación y las secuencias flanqueantes 3' de la  $\alpha$ -glucosidasa ácida humana. El constructo c8 $\alpha$ gluex2 contiene el promotor de la  $\alpha$ S1-caseína bovina fusionado inmediatamente con el sitio de iniciación de la traducción en el exón 2 del gen de la  $\alpha$ -glucosidasa ácida humana (remítase a la Fig. 2, panel B). Así pues, el sitio de iniciación de la transcripción de la  $\alpha$ S1-caseína y el sitio de iniciación de la traducción de la  $\alpha$ -glucosidasa están separados por 22 pb en este constructo. Por lo tanto, no se conserva la 5' UTR de la  $\alpha$ -glucosidasa. Este constructo también contiene la señal de poliadenilación y las secuencias flanqueantes 3' de la  $\alpha$ -glucosidasa ácida humana tal como se muestra en la Fig. 2, panel B.

El constructo c8,8 $\alpha$ gluex2-20 difiere del constructo c8 $\alpha$ gluex2 únicamente en la región 3'. Se utilizó un sitio SphI en el exón 20 para fusionar la secuencia 3' de la  $\alpha$ S1-caseína bovina con el constructo de  $\alpha$ -glucosidasa ácida humana. La señal de poliadenilación se ubica en esta secuencia 3' de  $\alpha$ S1-caseína (Fig.2, panel C).

### **Métodos para construir constructos genómicos**

- 5 Se aislaron tres fragmentos BglII contiguos que contenían el gen de la  $\alpha$ -glucosidasa ácida humana según Hoefsloot *et al.*, *supra*. Estos fragmentos se ligaron en el sitio BglII de pKUN8 $\Delta$ C, un derivado de pKUN7 $\Delta$ C con un policonector personalizado: HindIII ClaI StuI SstI BglII PvuI NcoI EcoRI SphI XhoI EcoRI\* SmaI/SfiI NotI EcoRI\* (\*= sitio destruido). Esta ligación dio como resultado dos orientaciones de los fragmentos que generaron los plásmidos p7.3 $\alpha$ gluBES, p7.3 $\alpha$ gluBSE, p8.5 $\alpha$ gluBSE, p8.5 $\alpha$ gluBES, p10 $\alpha$ gluBSE y p10 $\alpha$ gluBES.
- 10 Debido a que los sitios NotI únicos en los extremos del casete de expresión se utilizan posteriormente para el aislamiento de los fragmentos utilizados para la microinyección, el sitio NotI intragénico en el intrón 17 de la  $\alpha$ -glucosidasa ácida humana tuvo que ser destruido. Por lo tanto, p10 $\alpha$ gluBES se digirió con ClaI y XhoI; se aisló el fragmento que contenía el extremo 3' de la  $\alpha$ -glucosidasa. Este fragmento se insertó en los sitios ClaI y XhoI de pKUN10 $\Delta$ C, lo que dio como resultado p10 $\alpha$ glu $\Delta$ NV. Previamente, se obtuvo pKUN10 $\Delta$ C (es decir, un derivado de pKUN8 $\Delta$ C) digiriendo pKUN8 $\Delta$ C con NotI, rellenando los extremos adhesivos con Klenow y posteriormente hibridando el plásmido mediante ligación de extremos romos. Finalmente, se digirió p10 $\alpha$ glu $\Delta$ NV con NotI. Estos extremos adhesivos también se rellenaron con Klenow y el fragmento se ligó, lo que dio como resultado el plásmido p10 $\alpha$ glu $\Delta$ NotI.

### **Construcción de c8 $\alpha$ gluex1**

- 20 Ya que se eligió el sitio SstI en el primer exón del gen de la  $\alpha$ -glucosidasa para la fusión de la secuencia de la  $\alpha$ S1-caseína bovina, se digirió p8.5 $\alpha$ gluBSE con BglII a lo que siguió una digestión parcial con SstI. Se aisló el fragmento que contenía el exón 1-3 y se ligó en los sitios BglII y SstI de pKUN8 $\Delta$ C. El plásmido resultante se denominó: p5' $\alpha$ gluex1 (remítase a la Fig. 3, panel A).

- 25 El siguiente paso (Fig. 3, panel B) fue la ligación de la parte 3' a p5' $\alpha$ gluex1. En primer lugar, se digirió p10 $\alpha$ glu $\Delta$ N con BglII y BamHI. Se aisló el fragmento que contenía el exón 16-20. En segundo lugar, se digirió p5' $\alpha$ gluex1 con BglII y para prevenir la autoligación, y se trató con fosforilasa (BAP) para desfosforilar los extremos BglII adhesivos. Ya que los extremos adhesivos BamHI son compatibles con los extremos adhesivos BglII, estos extremos se ligan entre sí. Se seleccionó el plásmido resultante, es decir, p5'3' $\alpha$ gluex1. El plásmido tiene un sitio BglII único disponible para el paso de construcción final (remítase a la Fig. 3, paneles B y C).

- 30 La parte media del gen de la  $\alpha$ -glucosidasa se insertó en el último constructo. Para este paso, se digirió p7.3 $\alpha$ gluBSE con BglII, se aisló el fragmento de 8.5 kb y se ligó en el plásmido p5'3' $\alpha$ gluex1 desfosforilado y digerido con BglII. El plásmido resultante es p $\alpha$ gluex1 (Fig. 3, panel C).

- 35 Las secuencias del promotor de la  $\alpha$ S1-caseína bovina se incorporaron en el siguiente paso mediante una ligación en la que participaron los tres fragmentos. El vector de tipo cósmido pWE15 se digirió con NotI y se desfosforiló. El promotor de la  $\alpha$ S1-caseína bovina se aisló como un fragmento 8 Rb NotI-ClaI (remítase a Boer *et al.*, 1991, *supra*). El fragmento de la  $\alpha$ -glucosidasa ácida humana se aisló a partir de p $\alpha$ gluex1 utilizando las mismas enzimas. Estos tres fragmentos se ligaron y empaquetaron utilizando el kit Stratagene GigapackII en células hospedadoras de *E. coli* 1046. El cósmido resultante c8 $\alpha$ gluex1 se propagó en la cepa DH5 $\alpha$  de *E. coli*. El vector se linealizó con NotI antes de la microinyección.

### **Construcción de c8 $\alpha$ gluex2 y c8,8 $\alpha$ gluex2-20**

- 45 La construcción de los otros dos plásmidos de expresión (Fig. 2, paneles B y C) siguió una estrategia similar a la de c8 $\alpha$ gluex1. El plásmido p5' $\alpha$ gluStuI se obtuvo a partir de p8,5 $\alpha$ gluBSE por digestión del plásmido con StuI, a lo que siguió la autoligación del fragmento aislado que contenía el exón 2-3 más las secuencias vectoriales. Se digirió el plásmido p5' $\alpha$ gluStuI con PglII, a lo que siguió la digestión parcial del fragmento lineal con NcoI lo que dio lugar a varios fragmentos. Se aisló el fragmento de 2.4 kb, que contenía el exón 2 y el 3, y se ligó en los sitios NcoI y BglII del vector pKUN12 $\Delta$ C, lo que dio como resultado p5' $\alpha$ gluex2. Nótese que pKUN12 $\Delta$ C es un derivado de pKUN8 $\Delta$ C que contiene el policonector: ClaI NcoI BglII HindIII EcoRI SphI XhoI SmaI/SfiI NotI.

- 50 Se digirió el plásmido p10 $\alpha$ glu $\Delta$ NotI con BglII y HindIII. Se aisló el fragmento que contenía los exones 16-20 y se ligó en p5' $\alpha$ gluex2 digerido con BglIII y HindIII. El plásmido resultante fue p5'3' $\alpha$ gluex2. El fragmento de la parte central en p5'3' $\alpha$ gluex2 se insertó como para p $\alpha$ gluex1. Para esto, se digirió p7.3 $\alpha$ glu con BglII. Se aisló el fragmento y se ligó en el p5'3' $\alpha$ gluex2 desfosforilado y digerido con BglII. El plásmido resultante, p $\alpha$ gluex2, se utilizó en la construcción de c8 $\alpha$ gluex-20 y c8,8 $\alpha$ gluex2-20 (Fig. 2, paneles B y C).

- 55 Para la construcción del tercer plásmido de expresión c8,8 $\alpha$  gluex2-20 (Fig. 2, panel C), se eliminó la región flanqueante 3' de la  $\alpha$ -glucosidasa. Para conseguir esto, se digirió p $\alpha$ gluex2 con SphI. Se aisló el fragmento que contenía el exón 2-20 y se autoligó lo que dio como resultado p $\alpha$ gluex2-20. Posteriormente, se aisló el fragmento que contenía la región flanqueante 3' del gen de la  $\alpha$ S1-caseína bovina a partir de p16,8 $\alpha$ glu mediante digestión con

SphI y NotI. Este fragmento se insertó en pagluex2-20 utilizando el sitio SphI y el sitio NotI en la secuencia del policonector, lo que dio como resultado pagluex2-20-3 $\alpha$ S1.

El paso final en la generación de c8,8agluex2-20 fue la ligación de tres fragmentos como en el paso final en la construcción que dio lugar a c8agluex1. Ya que el sitio ClaI en pagluex2-20-3' $\alpha$ S1 y pagluex2 pareció no ser susceptible a la escisión debido a metilación, los plásmidos tuvieron que ser propagados en la cepa DAM(-) de *E. coli* ECO343. El pagluex2-20-3' $\alpha$ S1 aislado a partir de esa cepa fue digerido con ClaI y NotI. El fragmento que contenía los exones 2-20 más la región flanqueante 3' de  $\alpha$ S1-caseína se purificó a partir de las secuencias vectoriales. Este fragmento, un fragmento NotI-ClaI de 8 kb que contenía el promotor de  $\alpha$ S1 bovina (remítase a DeBoer (1991) y (1993), *supra*) y pWE 15 desfosforilado y digerido con NotI se ligaron y empaquetaron. El cósmido resultante es c8,8agluex2-20.

El cósmido c8agluex2 (Fig. 2, panel B) se construyó mediante un par de pasos diferentes. En primer lugar, el cósmido c8,8agluex2-20 se digirió con Sall y NotI. Se aisló el fragmento de 10.5 kb que contenía el promotor de  $\alpha$ S1 y los exones 2-6 parte del gen de la  $\alpha$ -glucosidasa ácida. En segundo lugar, se digirió el plásmido pagluex2 con Sall y NotI para obtener el fragmento que contenía la parte 3' del gen de la  $\alpha$ -glucosidasa ácida. Finalmente, el vector de tipo cósmido pWE15 se digirió con NotI y se desfosforiló. Estos tres fragmentos se ligaron y empaquetaron. El cósmido resultante es c8agluex2.

### **Ejemplo 2: Transgénesis**

Los constructos genómicos y de ADNc se linealizaron con NotI y se inyectaron en el pronúcleo de oocitos de ratón fertilizados, los cuales se implantaron a continuación en el útero de ratones hembra pseudopreñadas que hicieron de madre adoptiva. Se analizó la descendencia para detectar la inserción del constructo genómico de ADN genómico o ADNc de la  $\alpha$ -glucosidasa humana mediante transferencia de Southern de ADN aislado a partir de cortes en la cola. Se seleccionaron y criaron los ratones transgénicos.

Los constructos genómicos linealizados con NotI también se inyectaron en el pronúcleo de oocitos de conejo fertilizados, los cuales se implantaron en el útero de conejos hembra pseudopreñadas que hicieron de madre adoptiva. Se analizó la descendencia para detectar la inserción del ADN de la alfa-glucosidasa mediante transferencia de Southern. Se seleccionaron y criaron los conejos transgénicos.

### **Ejemplo 3: Análisis de la $\alpha$ -glucosidasa ácida en la leche de ratones transgénicos**

Se analizó la leche de ratones transgénicos y controles no transgénicos mediante inmunoelectrotransferencia. La sonda fue un anticuerpo de ratón específico para la  $\alpha$ -glucosidasa ácida humana (es decir, no se une a la enzima de ratón). Los transgenes 1672 y 1673 mostraron expresión de la  $\alpha$ -glucosidasa ácida humana en leche (Fig. 4). Se observaron bandas importantes y secundarias a 100-110 kD y 76 kD tal como se esperaba para la  $\alpha$ -glucosidasa. En la leche procedente de ratones no transgénicos, no se observaron bandas.

La actividad de la  $\alpha$ -glucosidasa ácida humana se midió con el sustrato artificial 4-metilumbeliferil- $\alpha$ -D-glucopiranosido en la leche de líneas de ratones transgénicos (remítase a Galiaard, Genetic Metabolic Disease, Early Diagnosis and Prenatal Analysis, Elsevier/Holanda del Norte, Ámsterdam, págs. 809-827 (1980)). Los ratones que contenían el constructo de ADNc (Fig. 1) variaron de 0.2 a 2  $\mu$ mol/mL por h. Las líneas de ratones que contenían el constructo genómico (Fig. 2, panel A) lo expresaron con niveles de 10 a 610  $\mu$ mol/mL por h. Estas figuras son equivalentes a una producción de 1.3 a 11.3 mg/L (constructo de ADNc) y de 0.05 a 3.3 g/L (constructo genómico) en función de una actividad específica estimada de la enzima recombinante de 180  $\mu$ mol/mg (Van der Ploeg *et al.*, *J. Neurol.* 235:392-396 (1988)).

La  $\alpha$ -glucosidasa ácida recombinante se aisló a partir de la leche de ratones transgénicos, mediante cromatografía secuencial de la leche en ConA-Sepharose™ y Sephadex™ G200. Se diluyeron 7 mL de leche hasta 10 mL con 3 mL de tampón Con A constituido por fosfato de sodio 10 mM, pH 6.6 y NaCl 100 mM. A continuación, se añadió una suspensión 1:1 de Con A sepharose en tampón Con A y la leche se dejó durante toda la noche a 4 °C con una agitación moderada. A continuación, se recogieron por centrifugación las microesferas de Con A sepharose y se lavaron 5 veces con tampón Con A, 3 veces con tampón Con A que contenía NaCl 1 M en lugar de 100 mM, una vez con tampón Con A que contenía NaCl 0.5 M en lugar de 100 mM y después se eluyeron en lotes con tampón Con A que contenía NaCl 0.5 M y metil- $\alpha$ -D-manopiranosido 0.1 M. Se midió la actividad de la  $\alpha$ -glucosidasa ácida en las muestras eluidas utilizando el sustrato artificial 4-metilumbeliferil- $\alpha$ -D-glucopiranosido (remítase a la parte anterior). Las fracciones que contenían actividad de  $\alpha$ -glucosidasa ácida se combinaron, concentraron y dializaron contra tampón Sephadex constituido por acetato Na 20 mM, pH 4.5 y NaCl 25 mM, y se aplicaron sobre una columna Sephadex™ 200. Se eluyó la columna con el mismo tampón y las fracciones se sometieron a ensayo para detectar la actividad de la  $\alpha$ -glucosidasa y el contenido proteico. Las fracciones ricas en actividad de la  $\alpha$ -glucosidasa ácida y prácticamente exentas de otras proteínas se combinaron y concentraron. El método tal como se describe es esencialmente el mismo que el publicado por Reuser *et al.*, *Exp. Cell Res.* 155:178-179 (1984). Son posibles varias modificaciones del método respecto a la composición y pH exactos de los sistemas tamponantes y a la elección del número y material de la columna de los pasos de purificación.

La  $\alpha$ -glucosidasa ácida purificada a partir de la leche se estudió a continuación para determinar la fosforilación administrando la enzima a fibroblastos cultivados procedentes de pacientes con GSD II (deficientes en la  $\alpha$ -glucosidasa ácida endógena). En esta prueba, las proteínas que contienen manosa 6-fosfato se unen mediante los receptores de la manosa 6-fosfato a la superficie celular de los fibroblastos y son internalizadas posteriormente. La unión está inhibida por manosa 6-fosfato libre (Reuser *et al.*, *Exp. Cell Res.* 155:178-189 (1984)). En una prueba típica para determinar la fosforilación de la  $\alpha$ -glucosidasa ácida aislada de la leche de ratones transgénicos, se añadió la  $\alpha$ -glucosidasa ácida a 104-106 fibroblastos en 500  $\mu$ L de medio de cultivo (Ham F10, complementado con un 10% de suero bovino fetal y Pipes 3 mM) en una cantidad suficiente para metabolizar 1  $\mu$ mol de 4-metilumbeliferil- $\alpha$ -D-glucopiranosido por hora durante un periodo de tiempo de 20 horas. El experimento se realizó con o sin manosa 6-fosfato 5 mM como competidor, esencialmente tal como describen Reuser *et al.*, *supra* (1984). En estas condiciones, se restituyó la  $\alpha$ -glucosidasa ácida de los fibroblastos de pacientes hasta el nivel medido en fibroblastos de individuos sanos. Esta restitución de la actividad de la  $\alpha$ -glucosidasa ácida endógena mediante  $\alpha$ -glucosidasa ácida aislada de leche de ratón fue tan eficaz como la restitución con  $\alpha$ -glucosidasa ácida purificada de testículos bovinos, orina humana y medio de células CHO transfectadas. La restitución con  $\alpha$ -glucosidasa de la leche estuvo inhibida por manosa 6-fosfato 5 mM tal como se ha observado para  $\alpha$ -glucosidasa de otras fuentes. (Reuser *et al.*, *supra*; Van der Ploeg *et al.*, (1988), *supra*; Van der Ploeg *et al.*, *Ped. Res.* 24:90-94 (1988).

Como una demostración adicional de la autenticidad de la  $\alpha$ -glucosidasa producida en la leche, la secuencia aminoacídica N-terminal de la  $\alpha$ -glucosidasa recombinante producida en la leche de ratones mostró ser la misma que la del precursor de  $\alpha$ -glucosidasa de orina humana tal como lo publicó Hoefsloot *et al.*, *EMBO J.* 7:1697-1704 (1988) que comienza con AHPGRP.

#### **Ejemplo 4: Ensayo en animales de alfa-glucosidasa**

Desde hace poco, se puede disponer de un modelo en ratones inactivados para la enfermedad de Pompe (25). Este modelo se generó mediante una alteración dirigida del gen de la alfa-glucosidasa murina. Los lisosomas que contienen glucógeno se detectan poco después del nacimiento en el hígado, corazón y músculo esquelético. Los síntomas clínicos claros solamente se vuelven evidentes a una edad relativamente tardía (>9 meses), pero el corazón está normalmente agrandado y el electrocardiograma es anómalo.

Se han llevado a cabo experimentos utilizando el modelo en ratones inactivados (KO) con el fin de estudiar el efecto *in vivo* de AGLU purificada a partir de leche de conejos transgénicos. La enzima recombinante en estos experimentos se purificó a partir de leche de los conejos transgénicos esencialmente tal como se ha descrito anteriormente para la purificación a partir de ratones transgénicos.

#### **1. Estudios a corto plazo en un modelo en ratones KO**

Se administraron inyecciones sencillas o múltiples con un intervalo de 6 días a ratones KO mediante la vena de la cola. Dos días después de la última administración enzimática se sacrificaron los animales y los órganos se perfundieron con solución salina tamponada con fosfato (PBS). Se prepararon homogeneizados tisulares para los ensayos de la actividad enzimática de GLU y del contenido de glucógeno tisular, y se obtuvieron cortes ultrafinos de diversos órganos para visualizar la acumulación (mediante microscopía electrónica) del contenido de glucógeno lisosomal. También se determinó la ubicación de la AGLU internalizada utilizando anticuerpos policlonales de conejo contra la  $\alpha$ -glucosidasa madura de placenta humana.

Los resultados mostraron que las dosis únicas de 0.7 y 1.7 mg de AGLU (experimentos C y A, respectivamente) fueron incorporadas de manera eficaz *in vivo* a varios órganos de grupos de dos ratones inactivados cuando se inyectaron por vía intravenosa. El experimento A también mostró que no hubo diferencias en la captación y distribución de AGLU purificada a partir de dos fuentes de leche de conejo independientes.

Se observaron aumentos en la actividad de AGLU en órganos tales como el hígado, bazo, corazón y músculo esquelético, pero no en el cerebro. Dos días después de una única inyección de 1.7 mg de AGLU a dos animales KO, se obtuvieron niveles cercanos o muy superiores a los niveles de actividad alfa-glucosidasa endógena observados en órganos de dos ratones de control normales inyectados con PBS o dos ratones KO heterocigóticos (experimento A). De los órganos estudiados, el hígado y el bazo son, cuantitativamente, los principales órganos implicados en la captación, pero el corazón y los músculos pectorales y femorales también incorporan cantidades significativas de la enzima. La ausencia de un aumento significativo en el tejido cerebral sugiere que AGLU no cruza la barrera hematoencefálica. Los resultados se resumen en la Tabla 2.

ES 2 677 343 T3

Tabla 2: Captación tisular de AGLU y contenido de glucógeno tras el tratamiento a corto plazo en el modelo en ratones KO

Grupo	Hígado		Bazo		Corazón		Músculo pectoral		Músculo femoral		Lengua		Cerebro			
	Act	Glc	Act	Glc	Act	Glc	Act	Glc	Act	Glc	Act	Glc	Act	Glc		
<b>Experimento A animales tratados con una única dosis de 1.7 mg de AGLU (de 2 fuentes)</b>																
fuentes 1 de ratones	674	-	-	-	263	-	-	-	24	-	-	-	0.8	-		
KO tratados	410				17				3.1				0.4			
fuentes 2 de ratones	454	-	-	-	76	-	-	-	12	-	-	-	0.8	-		
KO tratados	604				48				10				0.4			
ratones KO no tratados	3.1	-	-	-	0.2	-	-	-	0.2	-	-	-	0.2	-		
ratones normales	58	-	-	-	23	-	-	-	11	-	-	-	57	-		
no tratados	37				17				8.2				57			
<b>Experimento B animales tratados con 4 dosis de AGLU (1.0, 2.0, 1.0 y 1.4 mg) con una diferencia de 6 días</b>																
ratones KO			1132	70	-	-	24	1259	125	87	-	-	89	-	0.4	163
tratados (13 semanas de edad)			944	13			10	1082	46	116			35		0.2	163
ratones KO tratados (34 semanas de edad)			3375	23	-	-	60	1971	49	90	-	-	207	-	0.7	374
ratones KO			2.0	406	-	-	0.2	3233	1.0	86	-	-	1.0	-	0.2	487
no tratados (13 y 34 semanas de edad)			2.0	147			0.3	1748	1.0	87			1.0		0.2	168
ratones normales no tratados (34 semanas de edad)			35	6	-	-	8.2	0	6.0	1.0	-	-	14	-	18	0

Tabla 2: Captación tisular de AGLU y contenido de glucógeno tras el tratamiento a corto plazo en el modelo en ratones KO (continuación)

Grupo	Hígado		Bazo		Corazón		Músculo pectoral		Músculo femoral		Lengua		Cerebro	
	Act	Glc	Act	Glc	Act	Glc	Act	Glc	Act	Glc	Act	Glc	Act	Glc
<b>Experimento C animales tratados con una única dosis de 0.7 mg</b>														
ratones KO	582	-	462	-	46	-	-	-	5.1	-	-	-	0.4	-
tratados	558		313		50				3.6				0.4	
ratones KO	1.1	-	0.8	-	0.3	-	-	-	0.2	-	-	-	0.2	-
no tratados	1.6		0.7		0.3				0.3				0.2	

Las cifras en la tabla se refieren a animales individuales

Act: actividad de AGLU (nmoles de 4MU por mg de proteína por hora)

5 Glc: contenido de glucógeno ( $\mu\text{g}/\text{mg}$  de proteína)

n.d. no detectado

- datos no disponibles

10 Cuando se inyectaron dos ratones KO 4 veces cada 6 días (experimento B) se observó un marcado descenso del glucógeno celular total tanto en el corazón como en el hígado. No se observaron efectos en los tejidos musculoesqueléticos en lo que se refiere al glucógeno total. Sin embargo, en general la captación de AGLU en estos tejidos fue inferior respecto a otros tejidos estudiados.

15 La microscopía electrónica de transmisión de los ratones KO inyectados 4 veces indicó un marcado descenso en el glucógeno lisosomal tanto en las células hepáticas como en las células del músculo cardíaco. Los efectos observados en el tejido cardíaco están localizados ya que en algunas áreas del corazón no se observó descenso en el glucógeno lisosomal después de estas administraciones a corto plazo.

Los análisis por inmunoelectrotransferencia utilizando anticuerpos policlonales de conejo contra alfa-glucosidasa madura de placenta humana indicaron un procesamiento completo de la AGLU inyectada hacia la enzima madura en todos los órganos estudiados lo que sugiere firmemente captación en los tejidos diana, y localización y procesamiento lisosomales. No se observaron efectos tóxicos en ninguno de los tres experimentos.

20 La tinción inmunohistoquímica de AGLU fue evidente en los lisosomas de hepatocitos utilizando un anticuerpo de conejo policlonal contra la alfa-glucosidasa humana. La presencia de AGLU en los tejidos cardíaco y esquelético es más difícil de visualizar con esta técnica, aparentemente debido a la menor captación.

## 2. Experimentos a largo plazo con el modelo en ratones KO

25 En los experimentos a plazo más largo, se inyectó la enzima en la vena de la cola de grupos de dos o tres ratones KO, una vez a la semana durante periodos de hasta 25 semanas. La dosis inicial fue de 2 mg (68 mg/kg), seguida por 0.5 mg (17 mg/kg)/ratón durante 12 semanas. En dos grupos de ratones, a esto siguieron 4 u 11 semanas adicionales de tratamiento de 2 mg/ratón. Las inyecciones comenzaron cuando los ratones tenían 6-7 meses de edad. A esta edad, se había desarrollado una histopatología clara en el modelo KO. Dos días después de la última administración enzimática se sacrificaron los animales y los órganos se perfundieron con solución salina tamponada con fosfato (PBS). Se prepararon homogeneizados tisulares para los ensayos de la actividad enzimática de AGLU y del contenido de glucógeno tisular, y se obtuvieron cortes de diversos órganos para visualizar (mediante microscopía óptica) la acumulación del contenido de glucógeno lisosomal.

35 Los resultados mostraron que los ratones tratados 13 semanas con 0.5 mg/ratón (Grupo A, 3 animales/Grupo) presentaron una mayor actividad en el hígado y el bazo y menores niveles de glucógeno en el hígado y tal vez en el corazón. Un animal mostró una mayor actividad en los músculos, aunque no hubo un descenso significativo de glucógeno en el músculo.

Los ratones que fueron tratados 14 semanas con 0.5 mg/ratón y después 4 semanas con 2 mg/ratón (Grupo B, 3 animales/Grupo) mostraron resultados similares a los tratados únicamente durante 13 semanas, excepto en que se

midió una mayor actividad en el corazón y los músculos esqueléticos y también se observaron descensos de los niveles de glucógeno en el bazo.

5 Los ratones que se trataron 14 semanas con 0.5 mg/ratón y después 11 semanas con 2 mg/ratón (Grupo C, 2 animales/Grupo) mostraron resultados similares a los otros dos grupos excepto en que los ratones tratados mostraron descensos claros en los niveles de glucógeno en el hígado, bazo, corazón y músculo esquelético. No se pudo detectar actividad, incluso con la dosis más elevada, en el cerebro.

Los resultados de los animales tratados y no tratados en cada Grupo (medias del Grupo) se resumen en la Tabla 3.

Tabla 3: Captación tisular de AGLU y contenido de glucógeno tras el tratamiento a largo plazo en el modelo en ratones KO

Grupo	Hígado		Bazo		Corazón		Músculo pectoral		Músculo cuádriceps		Músculo gastrocnemio		Cerebro			
	Act	Glc	Act	Glc	Act	Glc	Act	Glc	Act	Glc	Act	Glc	Act	Glc		
<b>Grupo A animales tratados con 0.5 mg/ratón/semana durante 13 semanas</b>																
tratados	713	2	463	n.d	3	86	9	81	6	40	14	66	-	-		
no tratados	2	24	1	n.d	1	111	1	66	1	50	1	61	-	-		
<b>Grupo B animales tratados con 0.5 mg/ratón/semana durante 14 semanas y después con 2 mg/ratón/semana durante 4 semanas</b>																
tratados	2705		1	1628		0	59	288	49	120	30	1284	132	-	-	
no tratados	3		11	31		6	1	472	1	113	1	162	1	142	-	-
<b>Grupo C animales tratados con 0.5 mg/ratón/semana durante 14 semanas y después con 2 mg/ratón/semana durante 11 semanas</b>																
tratados	1762		1	1073		2	66	211	99	113	37	18	109	32	1	32
no tratados	2		45	1		21	1	729	1	291	0	104	0	224	0	44

10 Las cifras en la tabla se refieren a la media de 3 animales (Grupos A y B) o la media de 2 animales (Grupo C)

Act: actividad de AGLU (nmoles de 4MU por mg de proteína por hora)

Glc: contenido de glucógeno (µg/mg de proteína)

n.d. no detectado

- datos no disponibles

15 Además, se observó una mejora muy convincente en el estado histopatológico observado en los ratones del Grupo C (tratados durante las primeras 14 semanas con 0.5 mg/ratón y después durante 11 semanas con 2 mg/ratón). Se demostró un retroceso claro de la patología en diversos tejidos, tales como el corazón y músculo pectoral.

Se ha publicado que la enfermedad de Pompe no se produce cuando la actividad de la  $\alpha$ -glucosidasa lisosomal residual es >20% del valor de control promedio (14). Los datos obtenidos con el modelo en ratones KO indican que estos niveles se pueden conseguir perfectamente utilizando la enzima precursora recombinante.

**Ejemplo 5: Ensayo clínico en seres humanos**

5 Se ha llevado a cabo un único estudio de fase I (AGLU1101-01) en 15 voluntarios masculinos sanos. Se administraron dosis de AGLU comprendidas en el intervalo de 25 a 800 mg mediante infusión intravenosa a los voluntarios adultos masculinos sanos. Los sujetos con un historial de alergias e hipersensibilidades fueron excluidos del estudio. Los sujetos se distribuyeron aleatoriamente en grupos de dosis de 5 y cada Grupo de dosis recibió AGLU (4 sujetos) o placebo (1 sujeto) en cada nivel de la dosis. Todos los sujetos recibieron dos dosis del fármaco del estudio, las cuales se administraron con una diferencia de dos semanas. La pauta posológica fue la siguiente:

A

25 mg: Grupo 1, periodo de tratamiento 1

B

50 mg: Grupo 1, periodo de tratamiento 2

15 C

100 mg: Grupo 2, periodo de tratamiento 1

D

200 mg: Grupo 3, periodo de tratamiento 1

E

20 400 mg: Grupo 2, periodo de tratamiento 2

F

800 mg: Grupo 3, periodo de tratamiento 2

P

placebo (1 sujeto por Grupo y periodo de tratamiento)

25 A los sujetos se les administró AGLU o placebo como una infusión en el día 1 de cada periodo de tratamiento. Se administraron las infusiones a lo largo de un periodo de 30 minutos y los sujetos se mantuvieron en una posición semirrecostada durante al menos 2 horas después del cese de la infusión.

30 Se registraron los eventos adversos justo antes del comienzo de la infusión, a los 30 minutos (final de la infusión) y 3, 12, 24, 36 y 48 horas después, así como también en los días 5 y 8 (primer periodo) y los días 5, 8 y 15 (segundo periodo). También se controlaron las señales vitales, ECG y exámenes físicos de manera regular a lo largo del periodo de tratamiento.

Se tomaron muestras de sangre para una gama estándar de pruebas clínicas de laboratorio y análisis farmacocinéticos, Se recogió la orina de los sujetos y se realizaron una gama estándar de análisis de laboratorio (incluida la determinación de AGLU).

35 **(a) Seguridad en laboratorio y eventos adversos**

No hubo cambios significativos desde un punto vista clínico en los parámetros de laboratorio, señales clínicas y medidas de ECG en ninguno de los sujetos en ningún Grupo de dosis. Los resultados del control de eventos adversos en todos los sujetos con todas las dosis se resumen en la Tabla 4.

Tabla 4: Informes de eventos adversos

Dosis (mg)	Eventos adversos
25	Los eventos de los que se informó fueron debilidad muscular, visión anómala y fatiga. Todos los eventos fueron leves y el investigador consideró que no estaban relacionados con el artículo de prueba.

Dosis (mg)	Eventos adversos
50	Los eventos de los que se informó fueron cefaleas, rinitis, epítaxis y parestesia. Todos los eventos fueron leves y el investigador consideró que no estaban relacionados con el artículo de prueba o estaban remotamente relacionados, excepto la parestesia que se clasificó como leve y se consideró que posiblemente estaba relacionada con el artículo de prueba.
100	Los eventos de los que se informó fueron rinitis, cefaleas, fatiga, hematoma y reacción en el sitio de la inyección. Todos los eventos se clasificaron como leves. El investigador consideró que los casos de hematoma, reacción en el sitio de inyección y cefaleas intermitentes posible o probablemente estaban relacionados con el artículo de prueba. Se consideró que los otros eventos no estaban relacionados.
200	Los eventos de los que se informó fueron náuseas, cefaleas, mareos, fatiga, rinitis, fotofobia, anomalías de la visión y euforia. Todos los eventos se clasificaron como de intensidad leve o moderada. Se consideró que siete eventos (incluidos los casos de mareos, náuseas y anomalías en la visión) posible o probablemente estaban relacionados con el artículo de prueba.
400	Los eventos de los que se informó fueron fatiga y parestesia. Se consideró que el informe de fatiga no estaba relacionado con el artículo de prueba y se juzgó que la parestesia probablemente estaba relacionada.
800	Los eventos de los que se informó fueron náuseas, somnolencia, mareos, aumento de la sudoración, astenia, escalofríos y cefaleas intermitentes. Todos los eventos se clasificaron como de intensidad leve o moderada. Se consideró que ocho eventos (incluidos los casos de somnolencia, náuseas y astenia) posiblemente estaban relacionados con el artículo de prueba.

Se lleva a cabo un ensayo sobre la seguridad y eficacia de la  $\alpha$ -glucosidasa ácida recombinante como terapia de reemplazo enzimático en pacientes infantiles y juveniles con enfermedad de glucogenosis de tipo II. Participan cuatro pacientes infantiles y tres pacientes juveniles. A los infantiles se les administra una dosis inicial de 15-20 mg/kg que se ajusta hasta 40 mg/kg y a los juveniles se les administran 10 mg/kg. Se trata a los pacientes durante 24 semanas.

5

Se evalúan los siguientes parámetros en los pacientes.

- Informe de eventos adversos estándar que incluye la sospecha de eventos adversos
- Parámetros de laboratorio incluidas la hematología, química clínica y detección de anticuerpos
- Actividad de  $\alpha$ -glucosidasa en el músculo
- Histopatología del músculo
- ECG de 12 derivaciones
- Estado clínico que incluye un examen neurológico
- Parámetros PK no paramétricos
- Intervenciones para salvar la vida

10

En los pacientes infantiles se evalúan los siguientes parámetros adicionales.

- Grosor de la pared ventricular posterior izquierda e índice de masa ventricular izquierda
- Desarrollo neuromotor
- Supervivencia
- Contenido de glucógeno en el músculo

20

En los pacientes juveniles se evalúan los siguientes parámetros adicionales.

- Función pulmonar
- Pruebas cronometradas/de fuerza muscular y función muscular

- Escala de 9 puntos de PEDI/Rotterdam

Los mismos pacientes se someten después a dosificaciones adicionales de alfa-glucosidasa recibiendo los infantiles 15, 20, 30 o 40 mg/kg y los juveniles: 10 mg/kg durante un periodo adicional de 24 semanas y se evalúan en función de los parámetros indicados anteriormente.

- 5 Se lleva a cabo un ensayo clínico de fase II adicional en ocho pacientes con una edad < 6 meses de edad en los 2 meses posteriores al diagnóstico con una dosificación de 40 mg/kg. Los pacientes se tratan durante 24 semanas y se evalúan en función de los siguientes criterios:

Parámetros de seguridad

Datos de seguridad en laboratorio

- 10 Registro de eventos adversos

Parámetro de eficacia primaria: supervivencia sin intervenciones para salvar la vida (es decir, ventilación mecánica > 24 horas) 6 meses después del diagnóstico en combinación con una función motora normal o ligeramente retrasada (BSID II).

- 15 Eficacia secundaria: Cambios en el desarrollo neuromotor; cambios en el grosor de la pared ventricular posterior izquierda e índice de la masa ventricular izquierda; cambios en el contenido de glucógeno y actividad de  $\alpha$ -glucosidasa ácida en el músculo esquelético.

La eficacia se puede mostrar mediante una supervivencia de un 50% 6 meses después del diagnóstico sin intervenciones para salvar la vida en el grupo de la  $\alpha$ -glucosidasa en comparación con la supervivencia de un 10% en el grupo de control histórico en combinación con una BSID II clasificada como normal o ligeramente retrasada.

- 20 Se realiza un ensayo clínico adicional en los pacientes juveniles. Los pacientes tienen una edad >1 año y <35 años de edad con aparición juvenil de GSD de tipo IIb. A los pacientes se les administran 10 mg/kg o 20 mg/kg durante un periodo de tratamiento de veinticuatro semanas. El tratamiento se monitoriza mediante los siguientes parámetros.

Parámetros de seguridad

Datos de seguridad en laboratorio

Registro de eventos adversos

Eficacia primaria

Parámetros de la función pulmonar (por ejemplo, FVC, tiempo en el ventilador)

Fuerza muscular

Eficacia secundaria

Parámetros de las intervenciones para salvar la vida:

Calidad de vida

Actividad de  $\alpha$ -glucosidasa ácida en el músculo esquelético

Objetivo cuantitativo

Mejora relativa de un 20% en los parámetros de eficacia primaria respecto a la línea base

Preferentemente, todas las medidas cuantitativas referidas a la eficacia son estadísticamente significativas respecto a controles históricos o contemporáneos, preferentemente con  $p < 0.05$ .

25 **Ejemplo 6 Formulaciones farmacéuticas**

La alfa-glucosidasa se formula de la siguiente manera: 5 mg/mL de  $\alpha$ -Glu, fosfato de sodio 15 mM, pH 6.5, 2% (p/p) de manitol y un 0.5% (p/p) de sacarosa. Un vial tubular de 20 cc se rellena con la formulación anterior hasta un volumen final de 10.5 mL y se liofiliza. Para las pruebas, liberación y uso clínico, cada vial se reconstituye con 10.3 mL\* de solución salina estéril (0.9%) para inyección (USP o equivalente) para generar 10.5 mL de una solución de  $\alpha$ -Glu con la concentración de 5 mg/mL que se puede administrar directamente o diluir posteriormente con solución salina estéril hasta una concentración de la dosis diana específica del paciente. El relleno de 10.5 mL (52.5 mg de alfa-glucosidasa total en el vial) incluye el excedente recomendado por USP, que permite la extracción y suministro (o transferencia) de 10 mL (50 mg). El manitol actúa como un agente espesante adecuado que acorta el ciclo de liofilización (respecto a la sacarosa sola). La sacarosa actúa como un crioprotector que da como resultado un aumento no significativo de la agregación tras la reconstitución. La reconstitución de las formulaciones de (solo) manitol ha dado como resultado repetidas veces un ligero aumento de la agregación. Tras la liofilización, la calidad

- 30  
35

de la masa fue aceptable y se redujeron de manera significativa los tiempos de reconstitución posteriores. Se prefiere la solución salina a la HSA/dextrosa para la solución para infusión. Cuando se utiliza solución salina combinada con liofilización en un 2% de manitol/0.5% de sacarosa la solución tiene una tonicidad aceptable para la administración intravenosa. Los viales liofilizados que contienen la formulación con un 2% de manitol/0.5% de sacarosa se reconstituyeron con solución salina estéril al 0.9% (para inyección) para generar 5 mg/mL de  $\alpha$ -Glu.

**Ejemplo 7: Programación de la infusión**

La solución se administra mediante la cánula intravenosa permanente. Los pacientes se controlan atentamente durante el periodo de infusión y se toman las intervenciones clínicas apropiadas en el caso de un evento adverso o sospecha de evento adverso. Se permite un intervalo de 48 horas para cada infusión. Una programación de la infusión en la cual la tasa de infusión aumenta con el tiempo reduce o elimina los eventos adversos.

Las infusiones para los pacientes infantiles se pueden administrar de acuerdo con la siguiente programación:

- 5 cc/h durante 60 minutos
- 10 cc/h durante 60 minutos
- $\geq 40$  cc/h durante 30 minutos
- 15 •  $\geq 80$  cc/h durante el resto de la infusión

Las infusiones para los pacientes juveniles se pueden administrar de acuerdo con la siguiente programación:

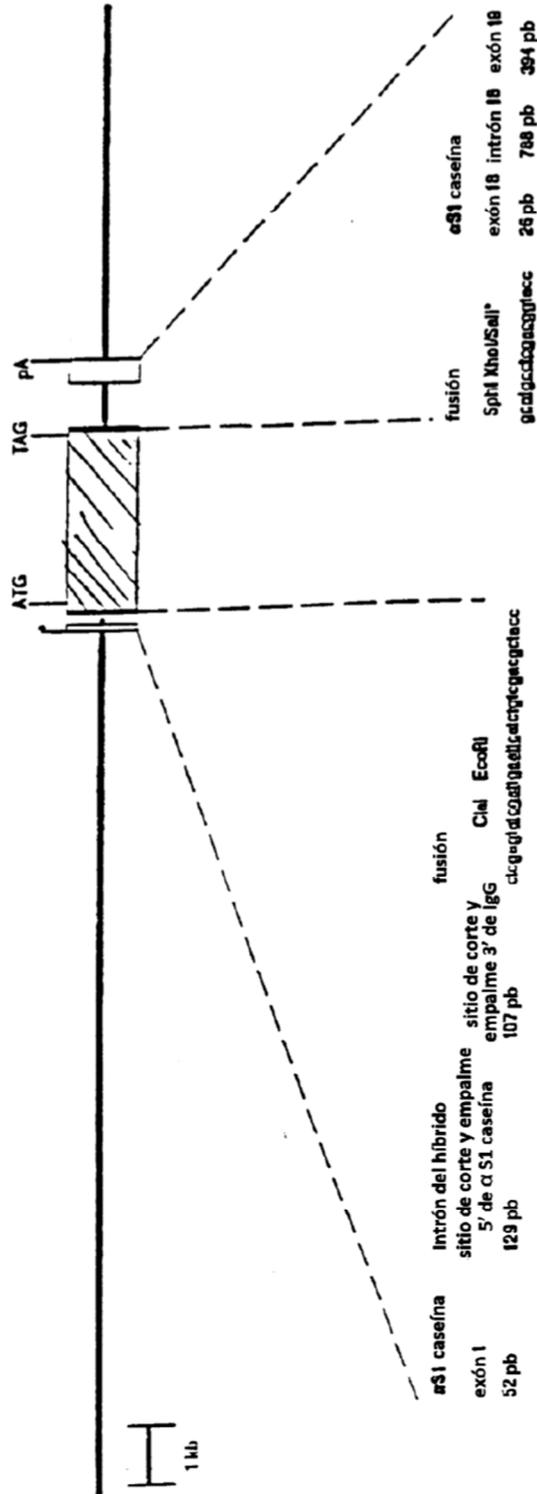
- 0.5 cc/kg/h durante 60 minutos
- 1 cc/kg/h durante 60 minutos
- 5 cc/kg/h durante 30 minutos
- 20 • 7.5 cc/kg h durante el resto de la infusión

Las realizaciones preferidas de la presente invención se discuten a continuación y se denominan realización E1 hasta realización E34.

**REIVINDICACIONES**

1. Alfa-glucosidasa ácida humana en la forma de 100 a 110 kD, para su uso en el tratamiento de la enfermedad de Pompe, donde la alfa-glucosidasa ácida humana se administra por vía intravenosa y donde el tratamiento se continúa durante al menos 24 semanas.
- 5 2. La alfa-glucosidasa ácida humana para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, donde la alfa-glucosidasa ácida humana se va a administrar como un medicamento que está adaptado para proporcionar al menos 10 mg/kg de alfa-glucosidasa ácida humana a la semana.
- 10 3. La alfa-glucosidasa ácida humana para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, donde la alfa-glucosidasa ácida humana se va a administrar como un medicamento que está adaptado para proporcionar al menos 20 mg/kg de alfa-glucosidasa ácida humana a la semana.
4. La alfa-glucosidasa ácida humana para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, donde la enfermedad de Pompe es enfermedad de Pompe infantil.
5. La alfa-glucosidasa ácida humana para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, donde la enfermedad de Pompe es enfermedad de Pompe juvenil.
- 15 6. La alfa-glucosidasa ácida humana para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, donde la enfermedad de Pompe es enfermedad de Pompe del adulto.
7. La alfa-glucosidasa ácida humana para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, donde las dosis de la alfa-glucosidasa ácida humana se van a administrar tres veces a la semana.
- 20 8. La alfa-glucosidasa ácida humana para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, donde las dosis de la alfa-glucosidasa ácida humana se van a administrar una vez a la semana.

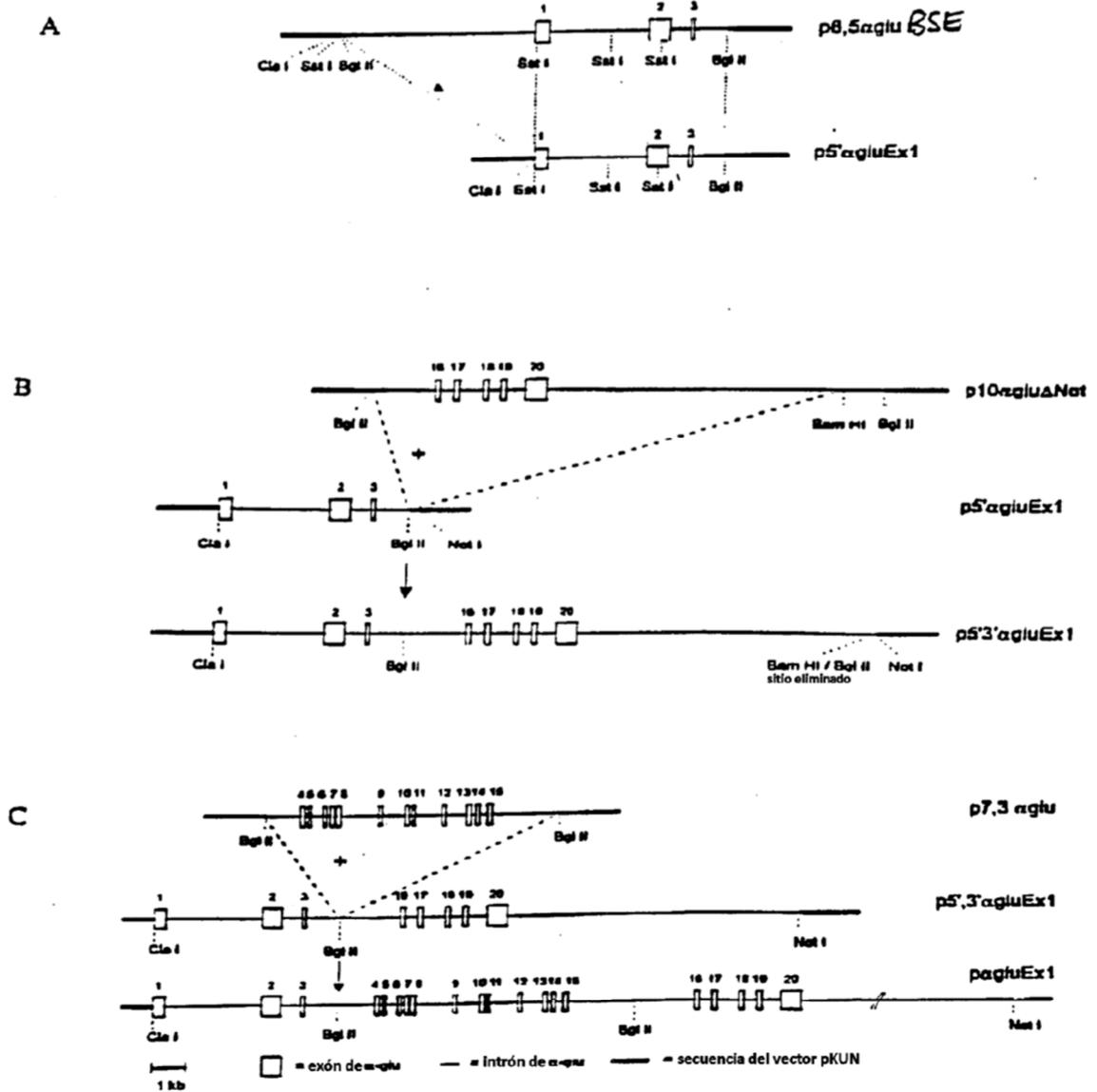
Figura 1.



Los exones de αS1-caseína están representados por los recuadros sin relleno; el ADNc de α-glucosidasa está representado por un recuadro gris. El intrón y secuencias flanqueantes de αS1-caseína están representados por una línea gruesa. Una línea delgada con un recuadro negro representa el sitio aceptor de IgG. Están marcados el sitio de iniciación de la transcripción (ϕ), el sitio de iniciación de la traducción (ATG), el codón de parada (TAG) y el sitio de poliadenilación (pA).



Figura 3.



Los exones de  $\alpha$ -glucosidasa están representados por recuadros sin relleno; los intrones y secuencias no traducidas de  $\alpha$ -glucosidasa están indicados con líneas delgadas. Las secuencias del vector pKUN están representadas por líneas gruesas.

Figura 4.

Detección de  $\alpha$ -glucosidasa ácida en leche de ratones transgénicos mediante inmuno-electrotransferencia.

