

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 700 865**

51 Int. Cl.:

**A61K 38/47** (2006.01)

**A61K 45/06** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.07.2001 E 16178390 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.09.2018 EP 3108895**

54 Título: **Tratamiento de glucogenosis de tipo II**

30 Prioridad:

**18.07.2000 US 219237 P**

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

**19.02.2019**

73 Titular/es:

**DUKE UNIVERSITY (100.0%)  
Erwin Road  
Durham, NC 27710, US**

72 Inventor/es:

**CHEN, YUAN-TSONG**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

**ES 2 700 865 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 glucogenosis de tipo II

**Antecedentes de la invención**

5 La glucogenosis de tipo II (GSD-II) (también conocida como enfermedad de Pompe o deficiencia de maltasa ácida) es un trastorno muscular genético letal causado por una deficiencia de la  $\alpha$ -glucosidasa ácida (GAA), una enzima lisosomal de degradación del glucógeno (Hirschhorn, R., Glycogen storage disease type II: acid  $\alpha$ -glucosidase (acid maltase) deficiency" en Scriver, C. R. et al., (eds) The Metabolic and Molecular Basis of Inherited disease, 7<sup>a</sup> Ed., McGraw-Hill, Nueva York, 1995, pág. 2443-2464). La deficiencia tiene como resultado la acumulación de glucógeno lisosomal en casi todos los tejidos del cuerpo, siendo los más seriamente afectados el músculo cardíaco y el esquelético. Se ha estimado que la incidencia combinada de todas las formas de GSD-II es de 1:40.000 y la enfermedad afecta a todos los grupos sin que haya una predilección étnica (Martiniuk, F. et al., Amer. J. Med. Genet. 79:69-72 (1998); Ausems, M.G.E.M et al., Eur. J. Hum. Genet. 7: 713-716 (1999)).

15 Clínicamente, GSD-II abarca una serie de fenotipos que difieren según la edad de inicio, los órganos afectados y la gravedad clínica, generalmente en correspondencia con la cantidad residual de actividad de GAA. En su presentación más grave (GSD-II infantil, o enfermedad de Pompe, en el que existe menos de un 1% de la actividad de GAA normal), los niños están afectados por una miocardiopatía hipertrófica, debilidad muscular generalizada e hipotonía secundaria a la acumulación masiva de glucógeno en los músculos cardíaco y esquelético (para revisión, véase Hirschhorn, anterior). La enfermedad progresa rápidamente, produciéndose el fallecimiento por insuficiencia cardíaca normalmente al año de vida. Las formas de la enfermedad en la juventud (1-10% de la actividad normal de la GAA) y en de inicio en la edad adulta (10-40% de la actividad normal de la GAA) se caracterizan por ausencia de afectación cardíaca grave, edad de inicio más tardía y progresión más lenta, pero la eventual afectación de los músculos respiratorios o de las extremidades tiene como resultado una morbilidad y mortalidad significativas para los individuos afectados.

25 Se han empleado estrategias de tratamientos con fármacos, manipulaciones de la dieta y trasplantes de médula ósea como medio para el tratamiento de la GSD-II, sin un éxito significativo (Hug, G. et al., Birth Defects Org. Ser. 9: 160-183 (1967); Slonim, A. E., et al., Neurology 33:34 (1983); Watson, J. G. et al., N. Engl. J. Med. 314:385 (1986)). Los primeros intentos para sustituir la enzima tampoco tuvieron éxito (Hug., G. y Schubert, W. K., J. Clin. Invest. 46:1073 (1967); de Barys, T. et al., Birth Defects Orig. Art. Ser 9:184-190 (1973); Williams, J. C y Murray A.K., Enzyme replacement in Pompe disease with an alpha glucosidase low-density lipoprotein complex, Desnick, R.J. (ed), Enzyme Therapy in Genetic Diseases: 2, Nueva York, Alan R., Liss 1980; pág. 415-423)).

35 Un comunicado de prensa de Genzyme de fecha 19 de abril del año 2000 menciona tres estudios clínicos en los que pacientes que sufrían de glucogenosis II (GSD-II) recibieron GAA. Los estudios clínicos estaban en curso o habían finalizado. Los resultados clínicos no fueron revelados. Brady, R.O. et al, Pediatrics 100(6):e111997) dan a conocer una terapia de sustitución enzimática para la enfermedad de Gaucher usando glucocerebrosidasa obtenida a partir de placenta humana en combinación con un régimen inmunosupresor. Sigue habiendo una necesidad de un tratamiento eficaz para la GSD-II.

**Compendio de la invención**

La invención se refiere a las realizaciones como se definen en las reivindicaciones. En particular, la invención se refiere a las siguientes realizaciones:

- 40 1.  $\alpha$ -Glucosidasa ácida humana (GAA) recombinante producida en un cultivo celular de ovario de hámster chino para uso en un método de tratamiento de la glucogenosis de tipo II en un ser humano que es CRIM (material inmunológico de reacción cruzada)-negativo para GAA endógena, donde dicha  $\alpha$ -glucosidasa ácida humana recombinante se administra en combinación con un régimen inmunosupresor o inmunoterapéutico antes de la primera administración de dicha  $\alpha$ -glucosidasa ácida humana recombinante
- 45 2. Uso de  $\alpha$ -glucosidasa ácida (GAA) humana recombinante producida en un cultivo celular de ovario de hámster chino para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la glucogenosis de tipo II en un ser humano que es CRIM (material inmunoreactivo de reacción cruzada)-negativo para GAA endógena, donde dicha  $\alpha$ -glucosidasa ácida endógena se administra en combinación con un régimen inmunosupresor o inmunoterapéutico, y en donde el régimen inmunosupresor o inmunoterapéutico se administra antes de la primera administración de dicha  $\alpha$ -glucosidasa ácida humana recombinante
- 50 3.  $\alpha$ -Glucosidasa ácida (GAA) humana recombinante producida en un cultivo celular de ovario de hámster chino para uso en un método de tratamiento de la glucogenosis de tipo II en un ser humano, donde dicho método de tratamiento comprende determinar si el ser humano que va a ser tratado es CRIM-positivo o CRIM-negativo para GAA endógena,
- 55 en donde a dicho ser humano CRIM-negativo hay que administrarle dicha  $\alpha$ -glucosidasa ácida (GAA) humana recombinante en combinación con un régimen inmunosupresor o inmunoterapéutico, y en donde el régimen

inmunosupresor o inmunoterapéutico es para ser administrado antes de la primera administración de dicha  $\alpha$ -glucosidasa ácida humana recombinante.

4. Uso de una  $\alpha$ -glucosidasa ácida (GAA) humana recombinante producida en un cultivo celular de ovario de hámster chino para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la glucogenosis de tipo II en un ser humano,

donde dicho tratamiento comprende determinar si el ser humano que va a ser tratado es CRIM-positivo o CRIM-negativo para la GAA endógena,

en donde a dicho ser humano CRIM-negativo hay que administrarle dicha  $\alpha$ -glucosidasa ácida (GAA) humana recombinante en combinación con un régimen inmunosupresor o inmunoterapéutico, y en donde el régimen inmunosupresor o inmunoterapéutico es para ser administrado antes de la primera administración de dicha  $\alpha$ -glucosidasa ácida humana recombinante.

5. La  $\alpha$ -glucosidasa ácida humana recombinante producida en un cultivo celular de ovario de hámster chino para uso en el método de curlier de los ítems 1 y 3 o el uso de cualquiera de los ítems 2 y 4, en donde la glucogenosis tipo II es glucogenosis de tipo II infantil, glucogenosis de tipo II juvenil, o glucogenosis de tipo II de inicio en la edad adulta.

6. La  $\alpha$ -glucosidasa ácida humana recombinante producida en un cultivo celular de ovario de hámster chino para uso en el método de cualquiera de los ítems 1, 3 y 5 o el uso de cualquiera de los ítems 2, 4 y 5, en donde la glucogenosis de tipo II es glucogenosis de tipo II infantil.

7. La  $\alpha$ -glucosidasa ácida humana recombinante producida en un cultivo celular de ovario de hámster chino para uso en el método de cualquiera de los ítems 1, 3, 5 y 6 o el uso de cualquiera de los ítems 2, 4, 5, y 6, en donde la  $\alpha$ -glucosidasa ácida humana recombinante se administra a un intervalo regular, preferiblemente mensual, bimensual, semanal, dos veces a la semana o diariamente.

8. La  $\alpha$ -glucosidasa ácida humana recombinante producida en un cultivo celular de ovario de hámster chino para uso en el método de cualquiera de los ítems 1, 3 y 5 a 7 o el uso de cualquiera de los ítems 2 y 4 a 7, en donde la  $\alpha$ -glucosidasa ácida humana recombinante es el precursor de  $\alpha$ -glucosidasa ácida humana.

9. La  $\alpha$ -glucosidasa ácida humana recombinante producida en un cultivo celular de ovario de hámster chino para uso en el método de cualquiera de los ítems 1, 3 y 5 a 8 o el uso de cualquiera de los ítems 2 y 4 a 8, en donde la  $\alpha$ -glucosidasa ácida humana recombinante se administra mediante una ruta seleccionada de intravenosa, intramuscular, intratecal e intraventricular.

La presente invención se refiere a  $\alpha$ -glucosidasa ácida para uso en el tratamiento de la glucogenosis de tipo II (infantil, juvenil o de inicio en la edad adulta) en un individuo, mediante la administración al individuo de una cantidad terapéuticamente eficaz de  $\alpha$ -glucosidasa ácida (p. ej., menos de aproximadamente 15 mg de enzima por kilogramo de peso corporal, preferentemente aproximadamente 1-10 mg de enzima por kilogramo de peso corporal, más preferentemente aproximadamente 10 mg de enzima por kilogramo de peso corporal o aproximadamente 5 mg de enzima por kilogramo de peso corporal) a intervalos regulares (p. ej., mensual, bimensual, semanal, dos veces a la semana, diariamente) de acuerdo con las realizaciones definidas en las reivindicaciones.

La  $\alpha$ -glucosidasa ácida es  $\alpha$ -glucosidasa ácida humana producida en células de ovario de hámster chino, preferentemente  $\alpha$ -glucosidasa ácida humana recombinante, más preferentemente, la forma precursora de  $\alpha$ -glucosidasa ácida humana, e incluso más preferentemente la forma precursora de  $\alpha$ -glucosidasa ácida humana producida en células de ovario de hámster chino. La  $\alpha$ -glucosidasa ácida se administra periódicamente (p. ej., mensualmente, bimensualmente, semanalmente, dos veces a la semana, diariamente). En las formas de realización preferidas, la  $\alpha$ -glucosidasa ácida se administra por vía intravenosa; intramuscular; intratecal; o intraventricular.

La invención proporciona el primer medio eficaz para tratar a un individuo con glucogenosis de tipo II.

### Breve descripción de las figuras

Las Fig. 1A-1C son una serie de representaciones gráficas que representan datos longitudinales (para los primeros 16 meses de edad) sobre el desarrollo motor evaluado mediante la escala motora infantil de Alberta (AIMS) (rombos cerrados) y la valoración de los anticuerpos frente a la  $\alpha$ -glucosidasa ácida humana recombinante (GAARh) (rombos abiertos) en tres pacientes (paciente 1, Fig. 1A; paciente 2, Fig. 1B; paciente 3, Fig. 1C) con enfermedad de Pompe infantil que están recibiendo un tratamiento de sustitución enzimática. La flecha indica cuándo se inició el tratamiento enzimático. Las valoraciones en la escala AIMS en pacientes normales se representan como curvas discontinuas frente a la edad (percentiles 5, 19, 25, 50, 75 y 95, de abajo a arriba).

Las Fig. 2A-2F son una serie de representaciones gráficas que representan las medidas ecocardiográficas bidimensionales longitudinales del volumen (Fig. 2A-2C) y la masa (Fig. 2D-2F) del ventrículo izquierdo en tres pacientes con enfermedad de Pompe infantil que están recibiendo tratamiento de sustitución enzimática (paciente 1, Fig. 2A y 2D; paciente 2, Fig. 2B y 2E; paciente 3, Fig. 2C y 2F). La semana 0 representa las mediciones en el

momento de inicio del tratamiento enzimático. Los rombos abiertos, medición del volumen diastólico final; rombos cerrados, medición del volumen sistólico final.

### Descripción detallada de la invención

5 La presente invención se refiere a  $\alpha$ -glucosidasa ácida para uso en el tratamiento de la glucogenosis de tipo II (GSD-II) en un individuo, mediante la administración de la enzima  $\alpha$ -glucosidasa ácida (GAA) al individuo, así como el uso de la enzima, GAA, en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la glucogenosis de tipo II de acuerdo con las realizaciones que se definen en las reivindicaciones.

10 Como se describe en la presente memoria, los solicitantes han tratado con éxito a niños que padecen GSD-II mediante la administración de GAA a los niños de forma regular; los niños mostraron una mejoría del estado cardíaco, de la función pulmonar y del desarrollo neurológico, así como la reducción de los niveles de glucógeno en el tejido.

15 Como resultado de estas observaciones, es posible ahora, por primera vez, tratar la GSD-II, incluyendo la GSD-II infantil, juvenil y de inicio en la edad adulta. Aunque los resultados descritos en la presente memoria tratan de individuos con la forma más grave de GSD-II (GSD-II infantil), cabe esperar que los procedimientos sean igualmente eficaces en individuos afectados por GSD-II juvenil o de inicio en la edad adulta y pueden, de hecho, ser incluso más eficaces, ya que los individuos con GSD-II juvenil o de inicio en la edad adulta poseen niveles mayores de actividad residual de GAA (1-10% o 10-40% respectivamente), y, por tanto, es probable que sean más tolerantes inmunológicamente a la GAA administrada (p. ej., en general son material inmunorreactivo de reacción cruzada (CRIM) positivos para la GAA endógena, de forma que sus sistemas inmunitarios no perciben la GAA como proteína "extraña" y no desarrollan anticuerpos anti-GAA). La mayor eficacia en dichos individuos se puede ver en el paciente 3, que era CRIM-positivo y que no desarrolló anticuerpos anti-GAA, y que mostró una progresión normal de los hitos del desarrollo, en contraste con el curso variable que se observó en los pacientes CRIM negativos 1 y 2 (que sí desarrollaron anticuerpos anti-GAA).

25 Los términos "tratar" y "tratamiento", tal como se usan en la presente memoria, se refieren a la mejora de uno o más síntomas asociados con la enfermedad, la prevención o retraso del inicio de uno o más síntomas de la enfermedad, y/o la disminución de la gravedad o frecuencia de uno o más síntomas de la enfermedad. Por ejemplo, el tratamiento se puede referir a la mejora del estado cardíaco (p. ej., incremento de los volúmenes diastólico final y/o sistólico final, o la reducción, mejora o prevención de la miocardiopatía progresiva que normalmente se encuentra en la GSD-II) o de la función pulmonar (p. ej., el incremento en la capacidad vital del llanto sobre la capacidad basal, y/o la normalización de la desaturación de oxígeno durante el llanto); la mejora en el desarrollo neurológico y/o las capacidades motoras (p. ej., incremento en la puntuación de la escala AIMS); reducción de los niveles de glucógeno en el tejido del individuo afectado por la enfermedad; o cualquier combinación de estos efectos. En una forma de realización preferida, el tratamiento incluye la mejora del estado cardíaco, en particular la reducción o la prevención de miocardiopatías asociadas con la GSD-II. Los términos "mejorar", "incrementar" o "reducir", tal como se usan en la presente memoria, indican valores relativos a una medición basal, tal como una medición en el mismo individuo antes del inicio del tratamiento descrito en la presente memoria, o una medida en un individuo control (o varios individuos control) en ausencia del tratamiento descrito en la presente memoria. Un individuo control es un individuo afectado por la misma forma de GSD-II (bien infantil, juvenil o de inicio en la edad adulta) que el individuo que se está tratando, que es de más o menos la misma edad que el individuo que se está tratando (para garantizar que todas las etapas de la enfermedad en el individuo tratado y el(los) individuo(s) control son comparables).

45 El individuo que se está tratando es un individuo (feto, niño, adolescente o ser humano adulto) con GSD-II (es decir, GSD-II infantil, GSD-II juvenil o GSD-II de inicio en la edad adulta). El individuo puede tener una actividad residual de GAA, o ninguna actividad mensurable. Por ejemplo, el individuo con GSD-II puede tener una actividad de la GAA que sea inferior a aproximadamente 1% de la actividad normal de la GAA (GSD-II infantil), una actividad de la GAA que sea de aproximadamente 1-10% de la actividad normal de la GAA (GSD-II juvenil) o una actividad de la GAA que sea de aproximadamente 10-40% de la actividad normal de la GAA (GSD-II adulta). El individuo puede ser CRIM positivo o CRIM negativo para la GAA endógena. En una forma de realización preferida, el individuo es CRIM positivo para la GAA endógena. En otra forma de realización preferida, el individuo es un individuo al que se le ha diagnosticado recientemente la enfermedad. El tratamiento precoz (tratamiento que comienza lo antes posible tras el diagnóstico) es importante para minimizar los efectos de la enfermedad y maximizar los beneficios del tratamiento.

55 En los usos según la invención se administra  $\alpha$ -glucosidasa ácida humana (GAA) al individuo. La GAA está en una forma que, cuando se administra, se dirige a tejidos tales como los tejidos afectados por la enfermedad (p. ej., corazón, músculo). En forma de realización preferida, la GAA humana se administra en su forma precursora, ya que el precursor contiene motivos que permiten la captación eficaz de GAA mediada por receptores. Como alternativa, se puede administrar una forma madura de GAA humana que haya sido modificada para que contenga motivos que permitan la captación eficaz de GAA. En una forma de realización particularmente preferida, la GAA es la forma precursora de GAA humana recombinante.

La GAA se puede obtener a partir de diversas fuentes. En una forma de realización particularmente preferida, se ha producido  $\alpha$ -glucosidasa ácida humana recombinante (GAARh) en cultivos de células de ovario de hámster chino

- (CHO) (véase, por ejemplo, Fuller, M. et al., Eur. J. Biochem. 234:903-909 (1995); Van Hove, J. L.K. et al., Proc. Natl. Acad. Sci EE.UU. 93: 65-70 (1996)). La producción de GAA en células CHO parece dar un producto con glicosilación, que permite la captación significativa y eficaz de GAA en los tejidos deseados (corazón y músculo); se supone que esta glicosilación difiere de la de GAA que se produce en la leche de ratones y conejos transgénicos (véase, p. ej., Bijvoet, A.G.A. et al., Hum. Mol. Genet. 7: 1815-1824 (1998); Bijvoet, A.G.A. et al., Hum. Mol. Genet. 8: 2145-2153 (1999)).
- 5 La GAA posee una actividad enzimática específica en el intervalo de aproximadamente 1,0-3,5  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  de proteína, preferentemente en el intervalo de aproximadamente 2-3,5  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  de proteína. En una forma de realización preferida, la GAA posee una actividad enzimática específica de al menos aproximadamente 1,0  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  de proteína; más preferentemente, una actividad enzimática específica de al menos aproximadamente 2,0  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  de proteína; incluso más preferentemente, una actividad enzimática específica de al menos aproximadamente 2,5  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  de proteína; y todavía más preferentemente, una actividad enzimática específica de al menos aproximadamente 2,75  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  de proteína.
- 10 La GAA se puede administrar sola o en composiciones o medicamentos que comprenden la GAA (p. ej., en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la enfermedad) como se ha descrito en la presente memoria descriptiva. Las composiciones se pueden formular con un vehículo o excipiente fisiológicamente aceptable para preparar una composición farmacéutica. El vehículo y la composición pueden ser estériles. La formulación deberá ser apropiada al modo de administración.
- 15 Entre los vehículos farmacéuticamente aceptables adecuados se incluyen, sin limitarse solo a ellos, el agua, soluciones de sales (p. ej., NaCl), solución salina, solución salina amortiguada, alcoholes, glicerol, etanol, goma arábica, aceites vegetales, alcoholes bencílicos, polietilen glicoles, gelatina, hidratos de carbono tales como lactosa, amilosa o almidón, azúcares tales como manitol, sacarosa u otros, dextrosa, estearato de magnesio, talco, ácido silícico, parafina viscosa, aceite de perfume, ésteres de ácidos grasos, hidroximetil celulosa, polivinil pirrolidona, etc., así como combinaciones de los mismos. Las preparaciones farmacéuticas pueden, si se desea, mezclarse con agentes auxiliares, p. ej., lubricantes, conservantes, estabilizantes, agentes humectantes, emulsionantes, sales para influir sobre la presión osmótica, amortiguadores, colorantes, saborizantes y/o sustancias aromáticas y similares, que no reaccionan de forma perjudicial con los compuestos activos. En una forma de realización preferida, se usa un vehículo hidrosoluble adecuado para administración intravenosa.
- 20 Si se desea, la composición o medicamento también puede contener pequeñas cantidades de agentes humectantes o emulsionantes o agentes amortiguadores del pH. La composición puede ser una solución líquida, suspensión, emulsión, comprimido, píldora, cápsula, formulación de liberación controlada o polvo. La composición también se puede formular como un supositorio con aglutinantes y vehículos tradicionales tales como triglicéridos. La formulación oral puede incluir vehículos estándar de calidades farmacéuticas tales como manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, polivinil pirrolidona, sacarina sódica, celulosa, carbonato de magnesio.
- 25 La composición o medicamento se pueden formular de acuerdo con los procedimientos de rutina en forma de una composición farmacéutica adaptada para la administración a seres humanos. Por ejemplo, en una forma de realización preferida, una composición para administración intravenosa típicamente es una solución en amortiguador acuoso isotónico estéril. Cuando sea necesario, la composición puede también incluir un agente solubilizante y un anestésico local para disminuir el dolor en el punto de la inyección. En general, los ingredientes se suministran por separado o mezclados juntos en forma de dosis unitaria, por ejemplo en forma de polvo liofilizado o concentrado sin agua en un recipiente herméticamente sellado, como una ampolla o bolsita que indique la cantidad de agente activo. Cuando la composición se vaya a administrar mediante infusión, se puede dispensar con una botella de infusión que contenga agua estéril de grado farmacéutico, solución salina o dextrosa/agua. Cuando la composición se administra mediante inyección se puede proporcionar una ampolla de agua estéril para inyección o una solución salina de forma que los ingredientes se puedan mezclar antes de su administración.
- 30 La GAA se puede formular en formas neutras o salinas. Entre las sales farmacéuticamente aceptables se incluyen las formadas con los grupos amino libres tales como los derivados de los ácidos clorhídrico, fosfórico, acético, oxálico, tartárico, etc., y los formados con grupos carboxilo libres, tales como los derivados de sodio, potasio, amonio, calcio, hidróxidos férricos, isopropilamina, trietilamina, 2-etilamino, etanol, histidina, procaína, etc.
- 35 La GAA (o composición o medicamento que contiene GAA) se administra a través de una vía adecuada. En una forma de realización, la GAA se administra por vía intravenosa. En otras formas de realización, la GAA se administra mediante administración directa a un tejido diana, tal como corazón o músculo (p. ej., intramuscular), o al sistema nervioso (p. ej., inyección directa en el cerebro, intraventricular; intratecal). Si se desea, se pueden usar más de una vía de forma simultánea.
- 40 La GAA (o composición o medicamento que contiene GAA) se puede administrar sola o junto con otros agentes, tales como antihistamínicos (p. ej., difenidramina) o inmunosupresores u otros agentes inmunoterapéuticos que contrarrestan los anticuerpos anti-GAA. El término "en combinación con" indica que el agente se administra a aproximadamente el mismo tiempo que la GAA (o composición que contiene GAA). Por ejemplo, el agente se puede mezclar en una composición que contenga GAA y, de este modo se puede administrar de forma simultánea a la
- 45

GAA; como alternativa, el agente se puede administrar a la vez, sin mezclar (p. ej., mediante administración combinada del agente en la vía intravenosa por la que también se administra la GAA o viceversa). En otro ejemplo, el agente se puede administrar por separado (p. ej., no mezclado), pero dentro de un periodo de tiempo corto (p. ej., en un plazo de 24 horas) de la administración de la GAA. En una forma de realización preferida, si el individuo es CRIM-negativo para la GAA endógena, la GAA (o composición que contiene GAA) se administra junto con un régimen inmunosupresor o inmunoterapéutico diseñado para reducir las cantidades, o prevenir la producción, de anticuerpos anti-GAA. Por ejemplo, se puede usar un protocolo similar a los usados en pacientes de hemofilia (Nilsson, I. M, et al., N. Engl. J. Med. 318:947-50 (1988)) para reducir los anticuerpos anti-GAA. Tal régimen también se puede usar en individuos CRIM positivos para la GAA endógena pero que presentan, o tienen riesgo de presentar, anticuerpos anti-GAA. En una forma de realización particularmente preferida, el régimen inmunosupresor o inmunoterapéutico comienza antes de la primera administración de GAA, con el fin de minimizar la posibilidad de producción de anticuerpos anti-GAA.

La GAA (o composición o medicamento que contiene GAA) se administra en una cantidad terapéuticamente eficaz (es decir, una cantidad de dosis que, cuando se administra a intervalos regulares, es suficiente para tratar la enfermedad, mejorando los síntomas asociados, previniendo o retrasando el inicio de la enfermedad y/o también disminuyendo la gravedad o la frecuencia de los síntomas de la enfermedad, como se ha descrito anteriormente). La cantidad que será terapéuticamente eficaz en el tratamiento de la enfermedad dependerá de la naturaleza y el grado de los efectos de la enfermedad, y se puede determinar mediante técnicas clínicas convencionales. Además, opcionalmente se pueden emplear ensayos in vitro o in vivo para ayudar a identificar los intervalos de dosis óptimas. La dosis precisa que se ha de emplear también dependerá de la vía de administración, y de la gravedad de la enfermedad, y deberá decidirse según el criterio de un facultativo y de las circunstancias de cada paciente. Las dosis eficaces se pueden extrapolar a partir de las curvas de respuesta-dosis derivadas de sistemas de ensayo in vitro o con modelos animales. En una forma de realización preferida, la cantidad terapéuticamente eficaz es inferior a aproximadamente 15 mg de enzima/kg de peso corporal del individuo, preferentemente en el intervalo de aproximadamente 1-10 mg de enzima/kg de peso corporal, e incluso más preferentemente aproximadamente 10 mg de enzima/kg de peso corporal o aproximadamente 5 mg de enzima/kg de peso corporal. La dosis eficaz para un individuo concreto se puede variar (p. ej., incrementar o disminuir) en el tiempo, dependiendo de las necesidades del individuo. Por ejemplo, en momentos de enfermedad física o estrés, o si aparecen o incrementan los anticuerpos anti-GAA, o si los síntomas de la enfermedad empeoran, la cantidad se puede incrementar.

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

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

La descripción además se refiere a una composición farmacéutica que comprende  $\alpha$ -glucosidasa ácida humana, como se describe en la presente memoria, en un recipiente (p. ej., un vial, frasco, bolsa para administración intravenosa, jeringa, etc.) con una etiqueta que contiene las instrucciones para la administración de la composición para el tratamiento de la glucogenosis de tipo II, mediante los procedimientos descritos en la presente memoria.

La invención se describirá además y de modo más específico por los siguientes ejemplos.

### Ejemplos

Ensayo de fase I/II de uso de  $\alpha$ -glucosidasa ácida recombinante humana

50 Materiales y métodos

Pacientes: los criterios de inclusión fueron niños afectados por GSD-II infantil con una actividad de la GAA prácticamente ausente (<1% de la normal en fibroblastos de piel y/o biopsia de musculo) y de menos de un año de vida. Los criterios de exclusión incluyeron insuficiencia cardiorrespiratoria grave al inicio y/u otras afecciones médicas con probabilidad de disminuir la supervivencia. A causa de la limitada esperanza de vida de la enfermedad tras el diagnóstico, no se usó ningún placebo como control. Los datos control históricos indicaron que virtualmente todos los pacientes morían antes del año de vida (Tabla 1).

Tabla 1 Datos control histórico de la glucogenosis infantil, de tipo II

	Inicio (meses)	Fallecimiento (meses)	Duración del curso de la enfermedad (meses)
Duke University Medical Center (n=30)*			
Promedio ± desviación típica	5,1 ± 1,8	8,6 ± 2,4	3,5 ± 2,3
Intervalo	2,4 – 10,3	3,3 – 12,4	0,0 – 9,0
Slonim et al. (n=10)**			
Promedio ± desviación típica	2,5 ± 1,0	7,2 ± 2,8	4,7 ± 2,4
Intervalo	1,0 – 4,0	4,0 – 12,0	2,0 – 9,0
*Datos del Registro de la enfermedad de Pompe de la Universidad de Duke			
** Datos de Slonim et al., J. Pediatr. 137:283-285 (2000).			

5 Fueron incluidos en el estudio tres niños afectados de GSD-II infantil manifestada por una reducida actividad de  $\alpha$ -glucosidasa ácida inferior al 1% de la normal en fibroblastos cutáneos y/o biopsia muscular. A nivel de la proteína, ninguno de los pacientes 1 y 2 presentaba proteína GAA detectable, mientras que el paciente 3 presentaba niveles reducidos de la proteína GAA detectados por análisis de inmunotransferencia. Los datos clínicos de referencia antes del inicio del tratamiento se resumen en la Tabla 2.

Tabla 2. Datos clínicos de referencia en 3 pacientes con enfermedad de Pompe infantil

Número de paciente/sexo	Origen étnico	Edad inicio GAArh	Estado cardíaco	Función pulmonar	Desarrollo motor (puntuación AIMS)	Actividad GAA en fibroblastos de la piel (% de normal)	Estado en CRIM*	Edad actual
Paciente 1/varón	Caucasiano	4 meses	Cardiomiopatía severa; estado post ataque cardíaco	Límite normal, <<5% compresión bronquio principal izquierdo por una marcada cardiomegalia, desaturación O <sub>2</sub>	normal, <<5%	0,84%	Negativo	29 meses
Paciente 2/varón	Afroamericano	3 meses	Cardiomiopatía moderada	Desaturación O <sub>2</sub> durante el llanto	<5%	0,57%	Negativo	25 meses
Paciente 3/varón	Caucasiano	2½ meses	Cardiomiopatía límite	Normal	<<5 <sup>oh</sup> %	0,69%	Positivo	23 meses

\*CRIM = material inmunorreactivo de reacción cruzada

10 El paciente 1 presentó a los 2 meses de edad una parada cardíaca durante una operación quirúrgica programada de una hernia inguinal. La siguiente evaluación cuando tenía 4 meses de edad demostró la existencia de signos de hipotonía grave, con un desarrollo motor estimado por edad equivalente al de un niño de 3 semanas. También presentaba una profunda miocardiopatía y cardiomegalia grave con compresión del bronquio principal izquierdo dando como resultado atelectasia parcial del pulmón izquierdo, y dificultades para comer y retraso del crecimiento.

15 A los pacientes 2 y 3 se les diagnosticó prenatalmente la enfermedad de Pompe; es importante, el hecho de que los dos habían tenido antes un hermano que había fallecido con síntomas que normalmente se atribuyen a la GSD-II infantil. Ambos pacientes presentaban signos de retraso motor; además el paciente 2 presentaba dificultades para comer, retraso del crecimiento y miocardiopatía grave.

Diseño básico: El estudio se diseñó como un estudio de fase I/II, abierto, de una dosis, para valorar la seguridad y la eficacia de la GAArh, administrada dos veces a la semana a los 3 pacientes con enfermedad de Pompe infantil. El estudio fue aprobado por el consejo de revisión institucional y se obtuvo el consentimiento informado escrito de los padres.

5 El estudio consistió en una Fase de Selección inicial, una Fase de Tratamiento de 13 semanas y una Fase de Seguimiento del Tratamiento. Durante la Fase de Selección, se valoró el estado clínico inicial de los pacientes; además, se determinaron los niveles de GAA y de glicógeno en muestras de biopsia de músculo esquelético. Durante la Fase de Tratamiento, los pacientes recibieron infusiones intravenosas de GAArh (5 mg/kg) dos veces a la semana. Los pacientes fueron controlados atentamente para detectar respuestas adversas a las infusiones de la enzima, así como para detectar el impacto que las administraciones de GAArh tenían en la progresión clínica de la GSD-II infantil. Las valoraciones clínicas generales incluyeron exploraciones físicas de rutina, complementadas con análisis completos de orina, hematológicos y de bioquímica clínica (electrolitos, glucosa, creatinina, BUN, CO<sub>2</sub>, proteína, albúmina, ALT, AST, bilirrubina, fosfatasa alcalina, CK e isozima, ácido úrico). Las valoraciones neurológicas y de la función motora exhaustivas incluyeron pruebas de fuerza muscular manual, prueba del desarrollo de Denver y escala AIMS (Escala motora infantil de Alberta; véase Piper, M.C. y Darrah, J., Motor Assessment of the Developing Infant, WB Sanders Company, Filadelfia, 1994). Se usaron ecocardiografías bidimensionales, en modo M y Doppler para valorar la masa ventricular izquierda, el grosor de la pared y así como las funciones sistólica y diastólica. Además, durante todo el estudio se monitorizaron una variedad de funciones pulmonares (capacidad vital de llanto, tendencia de la oximetría de pulso y medición del dióxido de carbono espiratorio, así como la maniobra de fuerza inspiratoria negativa). Al final de la fase de tratamiento de 13 semanas, se determinaron la actividad de GAA, los niveles de glucógeno y la histopatología de biopsias musculares obtenidas de los músculos cuádriceps del muslo contralateral de las biopsias previas al tratamiento. Las biopsias musculares se tomaron 3 días después de la infusión de GAArh.

25 Fuente de enzima: GAArh purificada del medio de cultivo de células CHO secretoras de GAArh (Van Hove, J. L.K. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 93: 65-70 (1996)) fue proporcionada en forma de solución de grado GMP, estéril e incolora, por Synpaci (Carolina del norte), Inc., 99 Alexander Drive, Suite NW20, Research Triangle Park, Carolina del Norte 27709. La GAArh se purificó principalmente como la proteína precursora de 110 kD con una actividad enzimática específica de 2,77-3,02 µmol/min/mg de proteína.

30 ELISA para anticuerpos anti-GAArh: El ELISA para la detección de anticuerpos anti-GAArh fue un ensayo de tipo sándwich estándar realizado por Phoenix International Life Sciences, Inc. (Saint-Laurel, Quebec). Brevemente, las placas de microtitulación se recubrieron con GAArh a 2,0 µg/ml durante la noche y después se bloquearon con IgG bovina. El suero del paciente, diluido a 1:100 y después diluido en serie a 1:2, reaccionó con la GAArh de la placa. La cantidad de anticuerpo unido se detectó con un anticuerpo secundario anti-humano de cabra conjugado con peroxidasa de rábano y sustrato de tetrametilbencidina midiendo las absorbancias a 450 nm. Se definieron las muestras positivas como las que tenían una absorbancia superior al valor de corte negativo. Esto se definió como dos veces el valor de A450 del control negativo de suero humano normal. La valoración se definió como la dilución del suero que todavía tenía una lectura A450 por encima del valor del punto de corte negativo.

40 Actividad de GAA, contenido en glucógeno y análisis Inmunotransferencia: La actividad de GAA se valoró mediante la medición de la escisión de 4-metil-umbeliferil- $\alpha$ -D-glucósido a pH 4,3 como se ha descrito previamente (Reuser, A.J.J. et al., Am. J. Hum. Genet. 30: 132-143 (1978)). Como patrón interno, de forma similar se analizó la actividad de  $\beta$ -galactosidasa ácida con el derivado de 4-metil-umbeliferil como sustrato (Wenger, D. A y Williams, C., Screening for lysosomal disorders in Hommes, F.A. (ed.), Techniques in diagnostic human biochemical genetics: a laboratory manual, Wiley-Liss, Nueva York, 1991, pág. 587-617). El contenido en glucógeno se determinó mediante tratamiento de extractos tisulares con amiloglucosidasa de *A. niger* y la medición de la glucosa liberada (Van Hove, J. L.K. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 93: 65-70 (1996)). Se realizó un análisis de inmunotransferencia con los anticuerpos producidos en conejos contra GAA de placenta purificada (Van Hove, J. L.K. et al., anterior).

50 Histología: Se montó una muestra de músculo en un portaobjetos con goma de tragacanto y se sometió a congelación rápida en isopentano enfriado mediante nitrógeno líquido. Se obtuvieron secciones de cinco micrómetros y se tiñeron con hematoxilina y eosina, se modificaron con tricromo de Gomori, ATPasa a pH 4,35 y 9,4, nicotinamida deshidrogenasa azul de tetrazolio reductasa, y fosforilasa. Una segunda muestra se sujetó in situ y se introdujo en glutaraldehído al 2,5%. El tejido se procesó sin tinción en bloque con acetato de uranilo con el fin de evitar la pérdida de glucógeno. Se tiñeron las secciones semifinas (0,5 micrómetros) con azul de toluidina y las secciones finas se tiñeron con acetato de uranilo y citrato de plomo y se montaron en una rejilla de cobre para microscopía electrónica.

## 55 Resultados

60 Reacción del paciente al tratamiento: los tres pacientes con enfermedad de Pompe infantil recibieron infusiones intravenosas de GAArh dos veces a la semana durante 21-25 meses. Durante el tratamiento enzimático no se produjeron reacciones alérgicas graves. No obstante, se observaron tres episodios de irritación cutánea, acompañados de fiebre leve y un aumento de la irritabilidad ocurrió en dos de los pacientes (paciente 1 dos episodios, paciente 2 un único episodio). Estos síntomas se resolvieron rápidamente tras la administración

intravenosa de difenhidramina. Tras un segundo episodio de irritación cutánea, el paciente 1 fue medicado previamente con difenhidramina oral inmediatamente antes de todas las siguientes infusiones de GAARh, sin que se produjeran más episodios. El paciente 2 fue medicado previamente de manera similar con difenhidramina oral inmediatamente antes de todas las demás infusiones, sin más episodios. Múltiples parámetros hematológicos, las funciones hepáticas, las funciones renales y los análisis de orina estuvieron todos dentro de los límites normales durante el periodo de tratamiento en todos los pacientes tratados.

En los pacientes 1 y 2 se detectaron anticuerpos anti-GAARh de clase IgG a las 3 semanas del inicio del tratamiento enzimático (Figs.1A-1C). Las valoraciones de anticuerpos anti-GAARh aumentaron a 1:1600 hacia la semana 16 en el paciente 1 (Fig. 1A) y a 1:64000-1:12800 entre las semanas 11-19 en el paciente 2 (Fig. 1B). A medida que aumentaban las valoraciones de anticuerpos anti-GAARh, se observó que las mejoras clínicas (observadas tempranamente durante el tratamiento- véase más adelante) ya no avanzaban. En el paciente 3 no se han observado ni efectos indeseados ni anticuerpos anti-GAARh (Fig. 1C).

Estado cardíaco: Antes del inicio del tratamiento enzimático, los pacientes 1 y 2 presentaban una miocardiopatía hipertrófica grave asociada con un incremento de la masa del ventrículo izquierdo (VI), un engrosamiento concéntrico de la pared ventricular y una disminución del tamaño de la cavidad ventricular (Fig. 2B, la cavidad del paciente 2 estaba casi obliterada al final de la sístole). Todas estas características se suelen observar en el paciente no tratado afectado con la forma infantil de la enfermedad de Pompe. Además, se observó que el paciente 2 presentaba una mayor fracción de eyección del VI (fracción de contracción, 84%) reflejo de una contracción hiperdinámica. Ninguno de los pacientes presentaba, sin embargo, ningún signo de obstrucción del tracto de salida ventricular. Los datos ecocardiográficos longitudinales evaluados en los pacientes durante los primeros 3 meses de tratamiento con GAARh se muestran en las Fig. 2A-2C. Durante el periodo de tratamiento, en ambos pacientes 1 y 2, los volúmenes sistólico final y diastólico final del VI (mediciones 2D) aumentaron de forma progresiva, y hasta casi 2-3 veces al final de los 3 meses de tratamiento en comparación con los medidos durante la fase de previa al tratamiento (Fig. 2A y 2B, respectivamente). Se observaron similares incrementos mediante el análisis de modo M (datos no mostrados). Las mediciones bidimensionales de la masa del VI (Fig. 2D-2F) aumentaron inicialmente a medida que los volúmenes del VI aumentaban, pero después disminuyeron de forma constante durante el tratamiento, hasta un valor que era inferior a la masa del VI antes del tratamiento (reducida hasta el 60-70% de los niveles basales previos al tratamiento). El incremento inicial de la masa muy probablemente se debió a un incremento del volumen del VI, sin que se produjera ningún cambio en el grosor de la pared del VI. Estas mejoras globales en los parámetros cardíacos, se mantuvieron hasta la última evaluación de seguimiento, aunque el paciente 1 requirió una infusión diaria intensiva de enzima durante 10 días cuando la masa del VI aumentó más y la función cardíaca se vio comprometida durante una neumonía viral. Por lo demás, la función ventricular en ambos pacientes había sido normal y permaneció normal hasta el último seguimiento. Por tanto, la morbilidad cardíaca progresiva observada normalmente en la enfermedad de Pompe infantil sin tratar se había evitado claramente.

El paciente 3 presentaba una masa del VI de 64 g/ $\beta^2$  (límite normal superior 65) en la evaluación cardíaca pero por lo demás una evaluación cardíaca basal normal al inicio del tratamiento, y que ha continuado siendo normal (con una masa del VI ahora de 33 g/ $\beta^2$ ) 7 meses después del tratamiento.

Función pulmonar: En los primeros 2 meses de tratamiento, la mejora de la función pulmonar se hizo evidente por los incrementos en la capacidad vital del llanto (mejoras superiores al 28% y 70%, en los pacientes 1 y 2, respectivamente) con respecto a las capacidades basales, y la normalización de la desaturación de O<sub>2</sub> durante el llanto (saturación de O<sub>2</sub> del 70% en el paciente 1 y del 81% en el paciente 2 durante el llanto máximo). En el paciente 1 también se puso de manifiesto una disminución de la fuerza muscular respiratoria antes del tratamiento a través de una maniobra de fuerza inspiratoria negativa (NIFM) de -45 cm H<sub>2</sub>O. Con el tratamiento, la NIFM aumentó a -55 cm H<sub>2</sub>O. Las mejoras iniciales observadas en las funciones pulmonares de ambos pacientes, sin embargo, se mantuvieron constantes durante los siguientes 2-3 meses y después disminuyeron, de forma concomitante con el aumento de los anticuerpos anti-GAARh. Ambos pacientes han pasado después a depender del respirador tras sufrir episodios de neumonía viral que desencadenaron insuficiencia respiratoria.

EL paciente 3 presentó una función pulmonar normal al principio del tratamiento y ha continuado demostrando pruebas de la función pulmonar normales en el último seguimiento.

Evaluación del desarrollo neurológico y motor: Se usó la escala del sistema motor de niños de Alberta (AIMS) para valorar el desarrollo motor en estos niños. Las puntuaciones AIMS para los 3 pacientes comenzaron por debajo del percentil 5 para su edad (Fig. 1A-1C). El paciente 1 permaneció por debajo del percentil 5 pero mostró incrementos dentro de ese intervalo antes de comenzar a disminuir a la semana 13 del tratamiento (Fig. 1A). El paciente 2 subió al percentil 25 en la semana 5, volvió a caer hasta por debajo del percentil 5 tras la semana 7 a pesar de aumentar sus habilidades, después mostró una rápida disminución y pérdida de habilidades entre las semanas 13 y 17 (Fig. 1B). El inicio de las disminuciones clínicas, de nuevo fue concomitante al aumento de los anticuerpos anti-GAARh (Fig. 1A, 1B).

Las valoraciones neurológicas y del desarrollo de Denver administradas de forma concurrente mostraron en el paciente 1, dominios normales de conducta personal-social, de lenguaje, y de desarrollo motor fino con un retraso motor grueso constante pero en progreso hasta la semana 10 cuando se puso de manifiesto un estancamiento y la

posterior regresión. Es importante el hecho de que las capacidades motoras habían mostrado un significativo progreso hasta la semana 10, pero nunca alcanzaron los niveles normales. El paciente 2 mostró un retraso leve del desarrollo en la esfera del desarrollo motor grueso sólo con consecución de habilidades de desarrollo normales en los dominios de desarrollo motor fino, personales-sociales y del lenguaje hasta las semanas 14-16, momento en que se produjo regresión. En la actualidad, ambos pacientes presentan un desarrollo personal-social normal para su edad pero un retraso en todos los demás dominios.

El paciente 3 mostró un incremento constante de la puntuación AIMS, que subiendo por encima del percentil 10 en la semana 11 del tratamiento y por encima del percentil 25 la semana en 20 (fig. 1C) y en el percentil 90 en el último seguimiento. A los 9 meses de edad, se mantenía sentado de forma independiente, gateaba con el vientre recíprocamente para moverse y se mantenía de pie con las manos en alto. Hay que destacar que lleva caminando independiente desde los 12 meses de edad y se ha podido mover entre cuclillas y de pie sin el uso de las manos desde los 14 meses de edad. Actualmente, las valoraciones del desarrollo neurológicas y de Denver en todos los dominios también son normales para su edad.

Actividad muscular de la GAA y contenido de glucógeno: Se realizaron biopsias musculares de referencia 1 semana antes del inicio del tratamiento con GAARh a excepción del paciente 1 al que se le realizó la biopsia en el momento del diagnóstico que fue 2 meses antes del inicio del tratamiento con GAARh. Después de 4 meses de tratamiento con GAARh, se obtuvieron las biopsias musculares de los cuádriceps contralaterales 3 días después de la infusión de enzima (nivel mínimo). Con el tratamiento con GAARh la actividad GAA aumentó 2-3 veces por encima de los valores de referencia previos al tratamiento en los pacientes 1 y 2, y 18 veces en el paciente 3 (Tabla 3).

Tabla 3. Actividad de la  $\alpha$ -glucosidasa ácida muscular y contenido de glucógeno en pacientes con enfermedad de Pompe infantil.

Pacientes afectados por la enfermedad tratados con GAARh		
	Actividad GGA nmoles/h/mg proteína	Contenido glucógeno % peso húmedo
Paciente 1		
Antes de la terapia	0,41	5,90%
Después de la terapia	0,95	7,50%
Paciente 2		
Antes de la terapia	0,67	5,68%
Después de la terapia	1,97	4,43%
Paciente 3		
Antes de la terapia	0,1	5,13%
Después de la terapia	1,84	1,43%
Control	23,92 $\pm$ 8,63	0,94 $\pm$ 0,55% (límite normal superior; 1,5%)

El nivel absoluto de actividad de GAA se aproximó a un 8% de la actividad de la GAA observada en músculos normales. No se observaron cambios apreciables en el contenido de glucógeno muscular en los pacientes 1 y 2, pero los niveles de glucógeno se redujeron a límites dentro del intervalo normal en el paciente 3.

Histología: Las biopsias previas al tratamiento de todos los pacientes mostraron una marcada vacuolización de las fibras musculares en las secciones congeladas. La evaluación de las secciones semifinas demostró que las fibras estaban expandidas por el glucógeno con la formación de depósitos de glucógeno. En algunas fibras se pudieron discernir leves trazas de membranas residuales. La microscopía electrónica confirmó la presencia de glucógeno tanto en los lisosomas expandidos y como en lo que estaban libres en el citoplasma. La biopsia del paciente 3 presentaba más glucógeno restante dentro de los lisosomas que los otros dos pacientes (datos no mostrados).

Las biopsias realizadas 4 meses después del tratamiento en los pacientes 1 y 2 fueron similares a las biopsias realizadas antes del tratamiento en términos de acumulación de glucógeno. Sin embargo, la biopsia posterior al tratamiento del paciente 3 presentaba una marcada disminución en el glucógeno visible y una histología esencialmente normal en la mayoría de las fibras musculares. La microscopía electrónica mostró que muchos lisosomas hinchados restantes carecían de glucógeno. Quedaban algunos depósitos de glucógeno y lisosomas ricos en glucógeno.

**Análisis de inmunotransferencia**

- 5 Para investigar por qué los anticuerpos anti-GAArh se desarrollaban en los pacientes 1 y 2, pero no en el 3, se realizó un análisis de inmunotransferencia específico para la detección de la proteína GAA expresada (pero no funcional) en fibroblastos derivados de cada uno de los pacientes. No se detectó proteína GAA en los fibroblastos de los pacientes 1 y 2, mientras que en el paciente 3 se detectó una forma precursora fácilmente detectable de la proteína GAA (110 kD). Estos patrones se observaron previamente en otros pacientes con GSD-II infantil (Van der Ploeg, A. T. et al., Am. J. Hum. Genet. 44: 787-793 (1989)). Los fibroblastos normales, como cabe esperar, tenían proteína GAA principalmente de 95 kD y de 76 kD.

**Estudios adicionales**

- 10 En un estudio adicional se han incluido tres pacientes más. Los tres son CRIM positivos. Tras el tratamiento (10 mg/kilogramo de peso corporal, infusiones semanales intravenosas de GAArh) durante 3-6 semanas, se ha observado una mejora de la función cardíaca, la fuerza muscular y el desarrollo motor.

## REIVINDICACIONES

- 5 1.  $\alpha$ -Glucosidasa ácida (GAA) humana recombinante producida en un cultivo celular de ovario de hámster chino para uso en un método de tratamiento de la glucogenosis de tipo II en un ser humano que es CRIM-(material inmunológico de reacción cruzada)-negativo para la GAA endógena, en donde dicha  $\alpha$ -glucosidasa ácida humana recombinante se administra en combinación con un régimen inmunosupresor o inmunoterapéutico, y en donde el régimen inmunosupresor o inmunoterapéutico se administra antes de la primera administración de dicha  $\alpha$ -glucosidasa ácida humana recombinante.
- 10 2. Uso de  $\alpha$ -glucosidasa ácida (GAA) humana recombinante producida en un cultivo celular de ovario de hámster chino para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la glucogenosis de tipo II en un ser humano que es CRIM-negativo para la GAA endógena y en donde dicha  $\alpha$ -glucosidasa ácida humana recombinante se administra en combinación con un régimen inmunosupresor o inmunoterapéutico, y en donde el régimen inmunosupresor o inmunoterapéutico se administra antes de la primera administración de dicha  $\alpha$ -glucosidasa ácida humana recombinante.
- 15 3.  $\alpha$ -Glucosidasa ácida (GAA) humana recombinante producida en un cultivo celular de ovario de hámster chino para uso en un método de tratamiento de la glucogenosis de tipo II en un ser humano,
- en donde dicho método de tratamiento comprende determinar si el ser humano que va a ser tratado es CRIM-positivo o CRIM-negativo para la GAA endógena,
- 20 en donde al ser humano CRIM-negativo hay que administrarle dicha  $\alpha$ -glucosidasa ácida (GAA) humana recombinante en combinación con un régimen inmunosupresor o inmunoterapéutico, y en donde el régimen inmunosupresor o inmunoterapéutico hay que administrarlo antes de la primera administración de dicha  $\alpha$ -glucosidasa ácida humana recombinante.
- 25 4. Uso de  $\alpha$ -glucosidasa ácida (GAA) humana recombinante producida en un cultivo celular de ovario de hámster chino para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la glucogenosis de tipo II en un ser humano,
- en donde dicho tratamiento comprende determinar si el ser humano que va a ser tratado es CRIM-positivo o CRIM-negativo para la GAA endógena,
- 30 en donde al ser humano CRIM-negativo hay que administrarle dicha  $\alpha$ -glucosidasa ácida (GAA) humana recombinante en combinación con un régimen inmunosupresor o inmunoterapéutico, y en donde el régimen inmunosupresor o inmunoterapéutico hay que administrarlo antes de la primera administración de dicha  $\alpha$ -glucosidasa ácida humana recombinante.
- 35 5. La  $\alpha$ -glucosidasa ácida humana recombinante producida en un cultivo celular de ovario de hámster chino para uso en el método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 y 3 o el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 2 y 4, en donde la glucogenosis de tipo II es glucogenosis de tipo II infantil, glucogenosis de tipo II juvenil, o glucogenosis de tipo II de inicio en la edad adulta.
6. La  $\alpha$ -glucosidasa ácida humana recombinante producida en un cultivo celular de ovario de hámster chino para uso en el método de una cualquiera de las reivindicaciones 1, 3 y 5 o el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 2, 4 y 5, en donde la glucogenosis de tipo II es glucogenosis de tipo II infantil.
- 40 7. La  $\alpha$ -glucosidasa ácida humana recombinante producida en un cultivo celular de ovario de hámster chino para uso en el método de una cualquiera de las reivindicaciones 1, 3, 5 y 6 o el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 2, 4, 5 y 6, donde  $\alpha$ -glucosidasa ácida humana recombinante se administra en un intervalo regular, preferiblemente mensual, bimensual, semanal, dos veces a la semana o diariamente.
8. La  $\alpha$ -glucosidasa ácida humana recombinante producida en un cultivo celular de ovario de hámster chino para uso en el método de una cualquiera de las reivindicaciones 1, 3 y 5 a 7 o el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 2 y 4 a 7, donde la  $\alpha$ -glucosidasa ácida humana recombinante es la forma precursora de la  $\alpha$ -glucosidasa ácida humana.
- 45 9. La  $\alpha$ -glucosidasa ácida humana recombinante producida en un cultivo celular de ovario de hámster chino para uso en el método de una cualquiera de las reivindicaciones 1, 3 y 5 a 8 o el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 2 y 4 a 8, en donde la  $\alpha$ -glucosidasa ácida humana recombinante se administra mediante una ruta seleccionada de intravenosa, intramuscular, intratecal e intraventricular.

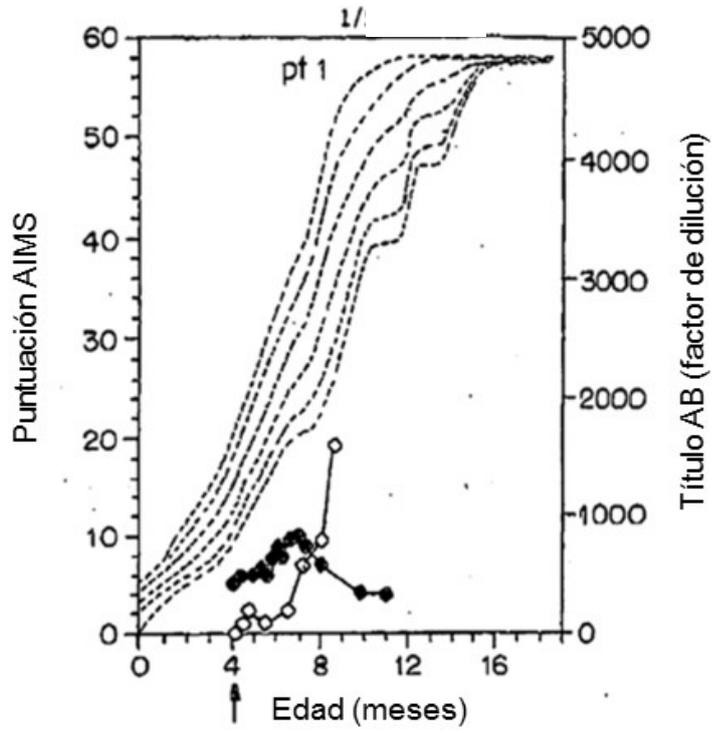


FIG. 1A

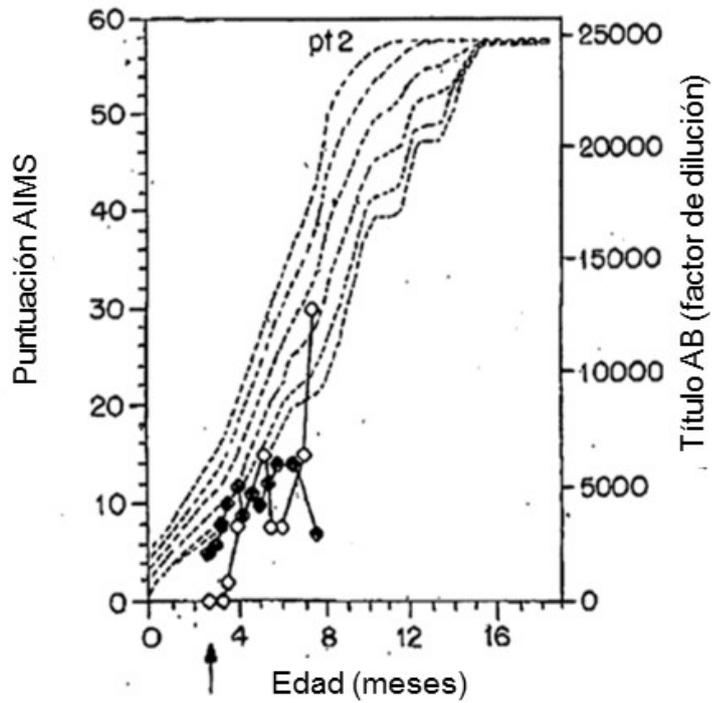


FIG. 1B

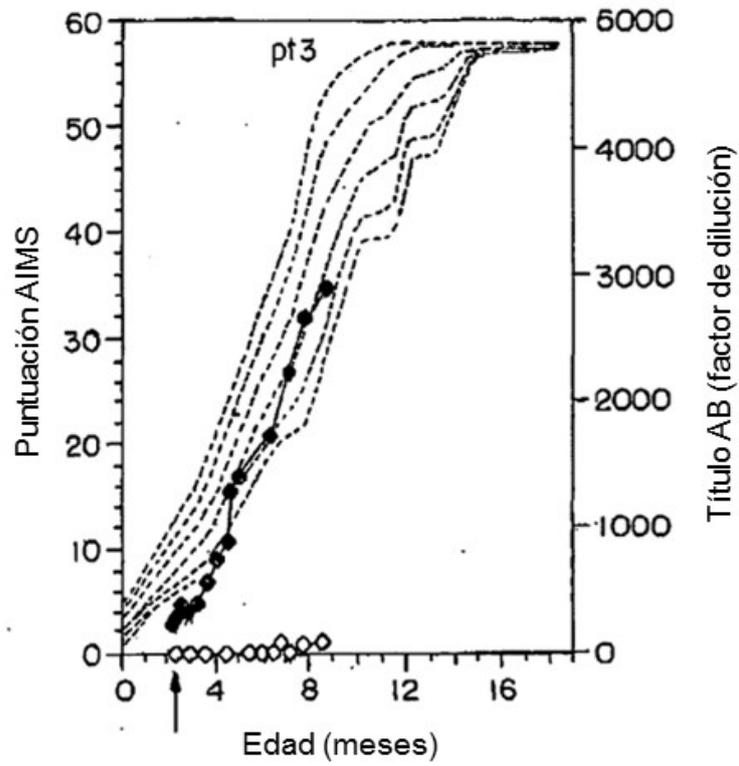


FIG. 1C

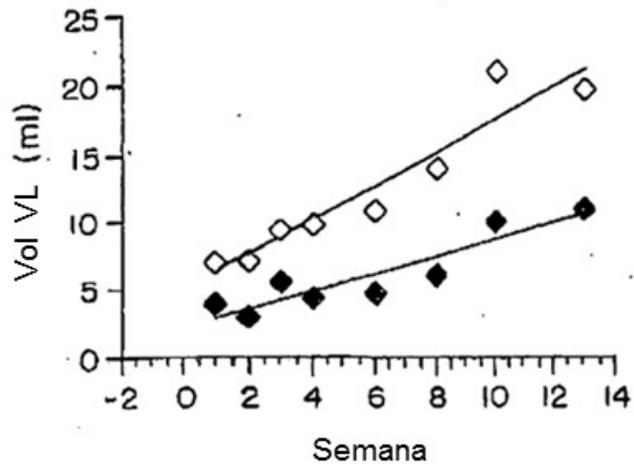


FIG. 2A

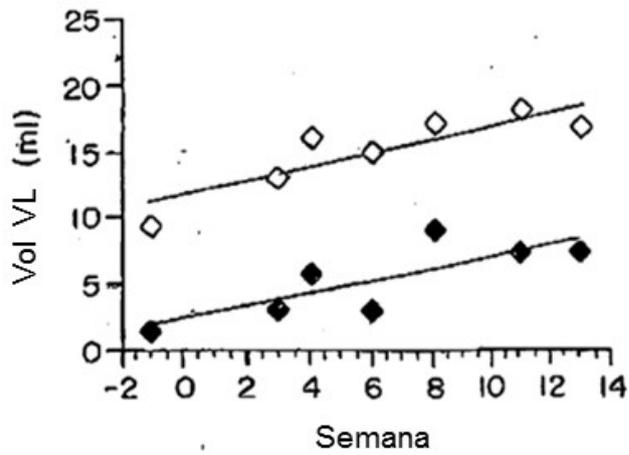


FIG. 2B

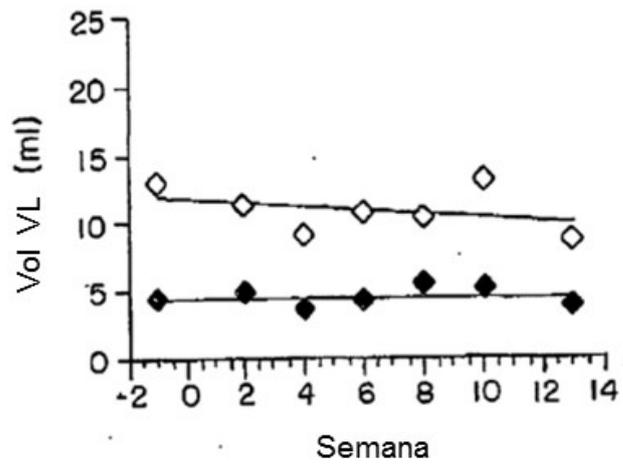


FIG. 2C

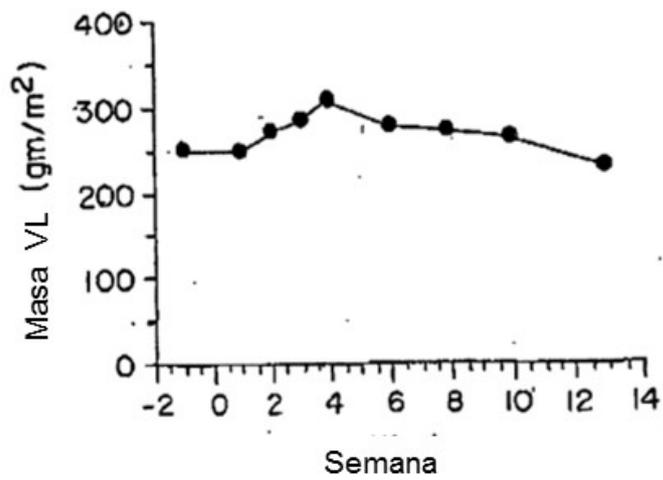


FIG. 2D

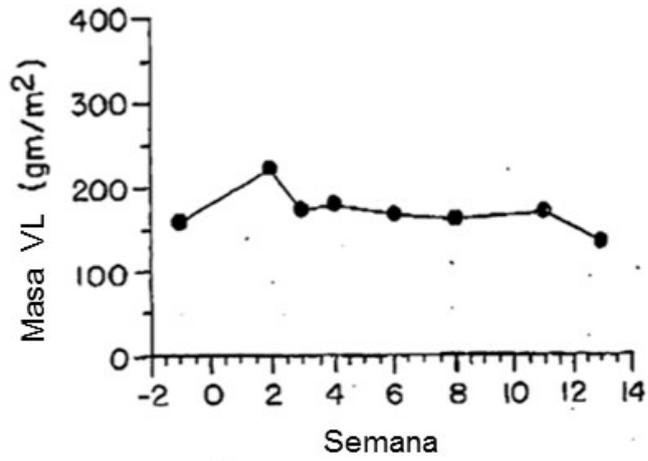


FIG. 2E

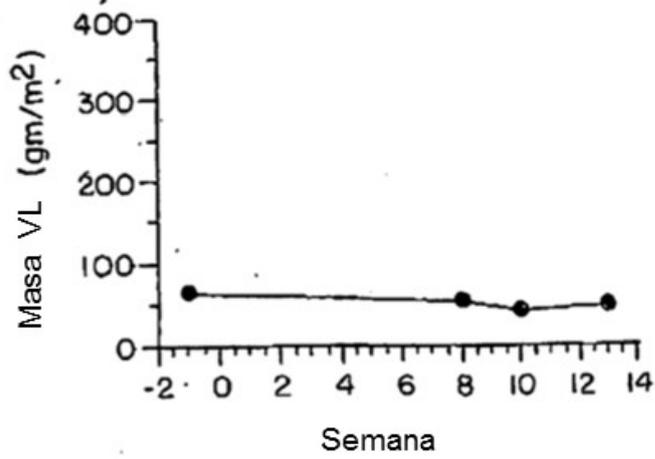


FIG. 2F