

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202091032** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2020.07.17

(51) Int. Cl. *A61K 31/445* (2006.01)
A61K 9/00 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2018.10.25

(54) СОСТАВЫ, СОДЕРЖАЩИЕ ГЛЮКОЦЕРЕБРОЗИДАЗУ И ИЗОФАГОМИН

(31) 62/577,429

(32) 2017.10.26

(33) US

(86) PCT/US2018/057575

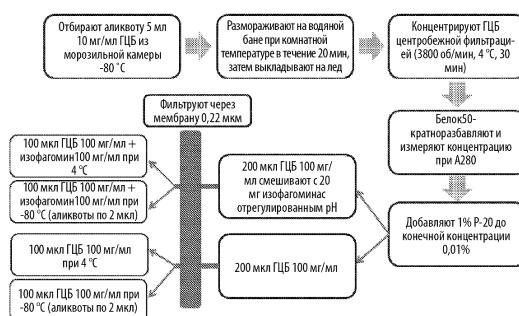
(87) WO 2019/084309 2019.05.02

(71) Заявитель:
**ШАЙР ХЬЮМАН ДЖЕНЕТИК
ТЕРАПИЗ, ИНК. (US)**

(72) Изобретатель:
**Парк Юнг Хее, Чэнь Нэнси, Ху Дзун,
Мейяппан Мутхураман, Миллер
Томас Аллен (US)**

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(57) Изобретение представляет композицию глюкоцереброзидазы, такой как велаглюцераза альфа, и изофагомина в молярном соотношении по меньшей мере приблизительно 1:2,5. Также предоставлено применение композиции для лечения расстройства, связанного с дисфункцией в пути GСазы. Нарушение может представлять собой лизосомальную болезнь накопления, такую как болезнь Гоше, болезнь Фабри, болезнь Помпе, мукополисахаридозы или множественная системная атрофия. Расстройство также может представлять собой нейродегенеративное расстройство, такое как болезнь Паркинсона, болезнь Альцгеймера или деменция с тельцами Леви. Композиция может содержать от 0,5 до 5,0 мг/кг глюкоцереброзидазы и изофагомин по меньшей мере примерно в 3-кратном молярном избытке по отношению к глюкоцереброзидазе. Композицию можно вводить внутривенно или подкожно.



A1

202091032

202091032

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-562445EA/060

СОСТАВЫ, СОДЕРЖАЩИЕ ГЛЮКОЦЕРЕБРОЗИДАЗУ И ИЗОФАГОМИН ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

[0001] Настоящая заявка испрашивает приоритет предварительной заявки США № 62/577,429, поданной 26 октября 2017, раскрытие которой включено в настоящую заявку посредством ссылки во всей своей полноте.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0002] Глюкоцереброзидаза (GCB) представляет собой белковое лекарственное средство, которое может быть применено для лечения болезни Гоше, аутосомно-рецессивной лизосомальной болезни накопления, характеризующейся дефицитом GCB.

[0003] Болезнь Гоше представляет собой аутосомно-рецессивное заболевание, вызванное мутациями в гене GBA, которое приводит к дефициту лизосомального фермента бета-глюкоцереброзидазы. Глюкоцереброзидаза катализирует превращение сфинголипидного глюкоцереброзида в глюкозу и церамид. Дефицит ферментов вызывает накопление глюкоцереброзида прежде всего в лизосомальном компартменте макрофагов, приводя к образованию пенистых клеток или "клеток Гоше". При болезни Гоше различные формы мутантной GCB имеют пониженную, незначительную или нулевую активность расщепления глюкозилцерамидов в зависимости от мутированной аминокислоты или аминокислот. Тяжесть этого расстройства коррелирует с относительными уровнями остаточной активности фермента и конечной степенью накопления субстрата.

[0004] GCB представляет собой лизосомальный фермент, который гидролизует гликолипид глюкоцереброзид, который образуется после расщепления гликофосфинголипидов в мембранах лейкоцитов и эритроцитов. Дефицит этого фермента вызывает накопление глюкоцереброзида в больших количествах в лизосомах фагоцитарных клеток, расположенных в печени, селезенке и костном мозге пациентов с болезнью Гоше. Накопление этих молекул вызывает ряд клинических проявлений, включая спленомегалию, гепатомегалию, нарушение скелета, тромбоцитопению и анемию. (Beutler с соавт. "Gaucher disease" The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease (McGraw-Hill, Inc, New York, 1995, pp. 2625-2639).

[0005] Велаглюцераза альфа представляет собой форму GCB, используемую для лечения болезни Гоше. VPRIV представляет собой препарат, содержащий велаглюцеразу альфа. Велаглюцераза альфа катализирует гидролиз глюкоцереброзида, уменьшая количество накопленного глюкоцереброзида. В клинических исследованиях VPRIV уменьшал размеры селезенки и печени, снижал анемию и тромбоцитопению.

[0006] VPRIV и велаглюцеразу альфа и другие подобные лекарственные продукты, которые содержат белок, хранят в жидком или лиофилизированном, то есть сублимированном виде. Лиофилизированный лекарственный продукт часто восстанавливают путем добавления подходящего разбавителя для введения

непосредственно перед применением у пациента. Может происходить снижение количества велаглюцеразы альфа или GCB в жидкой или лиофилизированной форме в результате физической нестабильности, включая денатурацию и агрегацию, а также химической нестабильности, включая, например, гидролиз, дезамидирование и окисление.

[0007] Существует потребность в улучшенных составах с улучшенной стабильностью GCB, VPRIV или велаглюцеразы альфа, особенно тех, которые подходят для подкожного (ПК) введения. GCB имеет предел растворимости менее 30 мг/мл при комнатной температуре в течение 24 часов. Удобный объем для ПК инъекционного продукта обычно составляет 2,5 мл или менее. Это требует наличия состава, который может быть сконцентрирован до достаточно высокого уровня для введения терапевтически адекватной дозы. Кроме того, составы в идеале должны иметь соответствующую стабильность при хранении при комнатной температуре или в условиях охлаждения.

[0008] Также существует потребность в составах для ПК введения, которые бы улучшали биодоступность GCB, VPRIV или велаглюцеразы альфа. Имеющийся на данный момент состав VPRIV, который вводят внутривенно (ВВ), обеспечивает приблизительно 1% биодоступности в сыворотке. Подкожное (ПК) введение вряд ли обеспечит такое же воздействие на ткани, как при ВВ введении. GCB имеет время полужизни в сыворотке менее 15 минут в качестве ВВ вводимого лекарственного средства. Повышенная стабильность в сыворотке позволила бы большему количеству GCB, вводимой ПК, распространяться из ПК пространства в системную циркуляцию. Повышенная стабильность в сыворотке также позволила бы поддерживать высокие концентрации циркулирующей GCB, что позволило бы поглощать больше GCB моноцитами, макрофагами и тканевыми гистиоцитами.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0009] В одном аспекте представлена композиция, содержащая глюкоцереброзидазу (GCB) и изофагомин (IFG) в молярном соотношении 1:1 или по меньшей мере примерно 1:>1 (например, 1:x, где x больше, чем 1) В некоторых вариантах осуществления GCB представляет собой велаглюцеразу альфа. Велаглюцераза альфа представляет собой рекомбинантно продуцируемый фермент с той же аминокислотной последовательностью, что и природный человеческий GCB, продуцируемый в клеточной линии человека, и является особенно подходящей формой GCB для практического применения изобретения. В некоторых вариантах осуществления pH композиции составляет примерно 6,0. В некоторых вариантах осуществления pH композиции составляет примерно 6,5. В некоторых вариантах осуществления pH композиции составляет примерно 7,0. В некоторых вариантах молярное отношение GCB к IFG составляет от примерно 1:1 до примерно 1:30. В некоторых вариантах молярное отношение GCB к IFG составляет от примерно 1:1 до примерно 1:10. В некоторых вариантах осуществления молярное отношение GCB к IFG составляет от примерно 1:1 до примерно 1:5. В некоторых вариантах осуществления молярное отношение GCB к IFG

составляет от примерно 1:2 до примерно 1:10. В некоторых вариантах осуществления молярное отношение GCB к IFG составляет от примерно 1:2,5 до примерно 1:10. В некоторых вариантах осуществления молярное отношение GCB к IFG составляет от примерно 1:2,5 до примерно 1:5. В некоторых вариантах осуществления молярное отношение GCB к IFG составляет от примерно 1:10 до примерно 1:30. В некоторых вариантах осуществления молярное отношение GCB к IFG составляет от примерно 1:30 до примерно 1:100. В некоторых вариантах осуществления молярное отношение GCB к IFG составляет от примерно 1:2,5 до примерно 1:3,5. В некоторых вариантах осуществления молярное отношение GCB к IFG составляет примерно 1:3,0. В некоторых вариантах осуществления молярное отношение GCB к IFG составляет 1:3,0, что особенно подходит для практического применения изобретения.

[0010] В некоторых вариантах композиция находится при температуре по меньшей мере 20°C. В некоторых вариантах композиция находится при температуре от 0°C до 20°C. В некоторых вариантах композиция находится при температуре менее 0°C. В некоторых вариантах композиция представляет собой водный раствор. В некоторых вариантах композиция представляет собой лиофилизат.

[0011] В некоторых вариантах композиция дополнительно содержит фармацевтически приемлемый эксципиент, фармацевтически приемлемую соль или как фармацевтически приемлемый эксципиент, так и фармацевтически приемлемую соль.

[0012] В некоторых вариантах осуществления IFG представляет собой изофагомина тартрат (IFGT). В некоторых вариантах осуществления тартрат изофагомина представляет собой изофагомина D-тартрат. IFGT и, в частности, изофагомина D-тартрат, являются особенно подходящими солями IFG для практического применения изобретения. Изофагомина тартрат может эффективно увеличивать активность GCB в сыворотке выше верхнего предела, обычно достигаемого подкожной дозой 2,5 мг/кг. Соответственно, GCB, комбинированный с IFGT, может обеспечить биодоступность в сыворотке, которая делает возможным подкожное введение, в частности, при молярном соотношении по меньшей мере 1:3,0 GCB:IFGT. Комбинирование с IFGT также увеличивает общую активность фермента GCB. В некоторых вариантах осуществления IFG является отличным от изофагомина тартрата. В некоторых вариантах композиция представляет собой жидкость. В некоторых вариантах осуществления композиция дополнительно содержит антиоксидант. В некоторых вариантах осуществления композиция дополнительно содержит углеводов. В некоторых вариантах осуществления композиция дополнительно содержит поверхностно-активное вещество. В некоторых вариантах осуществления композиция содержит 45-120 мг/мл велаглуцеразы альфа и 0,2-1,8 мг/мл изофагомина D-тартрата. В некоторых вариантах осуществления композиция содержит 60 мг/мл велаглуцеразы альфа и 0,9 мг/мл изофагомина D-тартрата.

[0013] В некоторых вариантах осуществления композиция дополнительно содержит цитрат или фосфат и полисорбат 20 (например, 50 mM цитрата натрия или фосфата натрия и 0,01% полисорбата 20). В некоторых вариантах осуществления

композиция дополнительно содержит 5-20 мМ цитрата натрия и 0,01% полисорбата 20. В некоторых вариантах осуществления композиция дополнительно содержит 10 мМ цитрата натрия и 0,01% полисорбата 20. В некоторых вариантах осуществления композиция дополнительно содержит 5-20 мМ фосфата натрия и 0,01% полисорбата 20. В некоторых вариантах осуществления композиция дополнительно содержит 10 мМ фосфата натрия и 0,01% полисорбата-20. В некоторых вариантах осуществления композиция дополнительно содержит 5-20 мМ цитрата натрия и 0,01% (масс./об.) полисорбата 20. В некоторых вариантах осуществления композиция дополнительно содержит 10 мМ цитрата натрия и 0,01% (масс./об.) полисорбата 20. В некоторых вариантах осуществления композиция дополнительно содержит 5-20 мМ фосфата натрия и 0,01% (масс./об.) полисорбата 20. В некоторых вариантах осуществления композиция дополнительно содержит 10 мМ фосфата натрия и 0,01% (масс./об.) полисорбата 20. В некоторых вариантах осуществления композиция дополнительно содержит 5-20 мМ цитрата натрия и 0,01% (об./об.) полисорбата 20. В некоторых вариантах осуществления композиция дополнительно содержит 10 мМ цитрата натрия и 0,01% (об./об.) полисорбата 20. В некоторых вариантах осуществления композиция дополнительно содержит 5-20 мМ фосфата натрия и 0,01% (об./об.) полисорбата 20. В некоторых вариантах осуществления композиция дополнительно содержит 10 мМ фосфата натрия и 0,01% (об./об.) полисорбата 20. В некоторых вариантах осуществления композиция имеет рН примерно 6,0. В некоторых вариантах осуществления композиция имеет рН 6,0.

[0014] В другом аспекте предоставлен контейнер, содержащий любую из композиций, описанных в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления контейнер выбирают из группы, состоящей из предварительно заполненного шприца, флакона или ампулы.

[0015] В другом аспекте предоставлен способ получения любой из композиций, описанных в настоящем документе. Способ включает растворение IFG (например, в воде), доведение рН до примерно 6,0 и добавление GCB с получением композиции. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает лиофилизацию IFG перед добавлением GCB. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает добавление полисорбата 20 до 0,01%. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает добавление полисорбата 20 до 0,01% (масс./об.). В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает добавление полисорбата 20 до 0,01% (об./об.). В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает фильтрацию композиции через мембрану 0,22 мкм. В некоторых вариантах осуществления IFG присутствует в количестве, достаточном для поддержания стабильности GCB в композиции. В некоторых вариантах осуществления IFG присутствует в количестве, достаточном для поддержания стабильности GCB в композиции в течение по меньшей мере трех дней при 0-50°C. В некоторых вариантах осуществления IFG присутствует в количестве, достаточном для поддержания стабильности GCB в композиции в течение по меньшей мере 6 месяцев при 0-40°C.

[0016] В другом аспекте предоставлен способ лечения расстройства, связанного с дифункцией в пути GСазы, включающий введение любой из композиций, описанных в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления способ эффективен для лечения расстройства. В некоторых вариантах осуществления композицию вводят внутривенно или подкожно. В некоторых вариантах осуществления композицию вводят подкожно, например, путем подкожной инъекции, что особенно подходит для практического применения изобретения. В некоторых вариантах осуществления композицию вводят два раза в неделю, один раз в неделю, реже, чем один раз в неделю или один раз каждые две недели. Как правило, композиции, описанные в настоящем документе, вводят подкожно путем инъекции либо один, либо два раза в неделю, либо один раз каждые две недели. Композиции, описанные в настоящем документе (в частности, композиции с IFGT), вводимые подкожно, могут обеспечить значительно большее воздействие в сыворотке по сравнению с сопоставимыми внутривенными дозами GСВ в монотерапии. Большая биодоступность в сыворотке эффективно позволяет уменьшить количество подкожных инъекций, которые необходимо вводить субъекту. Например, для достижения терапевтически эффективного количества меньшее количество инъекций необходимо вводить на курс лечения, и/или временной интервал между подкожными инъекциями может быть увеличен.

[0017] В другом аспекте композиции, описанные в настоящем документе, предназначены для применения в терапии. В одном варианте осуществления композиции, описанные в настоящем документе, предназначены для применения в способе лечения расстройства, связанного с дифункцией в пути GСазы, как раскрыто в настоящем документе. В другом варианте осуществления композиции, описанные в настоящем документе, предназначены для применения в изготовлении лекарственного средства для лечения расстройства, связанного с дифункцией в пути GСазы, например, способами, раскрытыми в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления композицию вводят внутривенно или подкожно. В некоторых вариантах осуществления композицию вводят подкожно, например, путем подкожной инъекции. В некоторых вариантах осуществления композицию вводят два раза в неделю, один раз в неделю, реже, чем один раз в неделю или один раз каждые две недели. Как правило, композиции, описанные в настоящем документе, вводят подкожно путем инъекции либо один, либо два раза в неделю, либо один раз каждые две недели.

[0018] В некоторых вариантах осуществления расстройство включает дефект в активности GСазы. В некоторых вариантах дефект в активности GСазы включает сниженную ферментативную активность. В некоторых вариантах осуществления расстройство включает дисрегуляцию альфа-синуклеина. В некоторых вариантах осуществления расстройство представляет собой лизосомальную болезнь накопления, например, болезнь Гоше, болезнь Фабри, болезнь Помпе, мукополисахаридозы или множественную системную атрофию. Композиции, описанные в настоящем документе, являются особенно подходящими для лечения болезни Гоше. В некоторых вариантах

осуществления расстройство представляет собой нейродегенеративное расстройство, например, болезнь Паркинсона, болезнь Альцгеймера или деменцию с тельцами Леви.

[0019] В другом аспекте предоставлен способ лечения дисфункции в пути GСазы, включающий введение субъекту, нуждающемуся в этом, любой из композиций, описанных в настоящем документе. В некоторых вариантах субъектом представляет собой человека.

[0020] В другом аспекте предоставлен способ лечения дисфункции в пути GСазы, включающий введение субъекту композиции, содержащей от 0,5 до 5,0 мг/кг GCB и IFG, например, в которой IFG находится по меньшей мере примерно в 1, 1,25, 1,5, 2, 2,5, 3, 4 или 5-кратном молярном избытке по отношению к GCB, причем композицию вводят подкожно. В другом аспекте предоставлена композиция, содержащая от 0,5 до 5,0 мг/кг GCB и IFG, например, в которой IFG находится по меньшей мере примерно в 1, 1,25, 1,5, 2, 2,5, 3, 4 или 5-кратном молярном избытке по отношению к GCB, для применения в способе лечения дисфункции в пути GСазы, причем композицию вводят подкожно. В другом аспекте предоставляют применение композиции, содержащей от 0,5 до 5,0 мг/кг GCB и IFG, например, в которой IFG находится по меньшей мере примерно в 1, 1,25, 1,5, 2, 2,5, 3, 4 или 5-кратном молярном избытке по отношению к GCB, в изготовлении лекарственного средства для способа лечения дисфункции в пути GСазы. В некоторых вариантах осуществления IFG в композиции вводят в количестве, которое не увеличивает эндогенную активность GCB в сыворотке. В некоторых вариантах осуществления композиция содержит от 0,8 до 4,0 мг/кг GCB. В некоторых вариантах осуществления композиция содержит от 1,0 до 3,0 мг/кг GCB. В некоторых вариантах осуществления композиция содержит от 1,2 до 2,0 мг/кг GCB. В некоторых вариантах осуществления композиция содержит примерно 1,5 мг/кг GCB. В некоторых вариантах осуществления композиция содержит 1,5 мг/кг GCB. В некоторых вариантах осуществления композиция содержит от 2,0 до 5,0 мг/кг GCB. В некоторых вариантах осуществления композиция содержит от 2,25 до 4,5 мг/кг GCB. В некоторых вариантах осуществления композиция содержит от 2,25 до 3,75 мг/кг GCB. В некоторых вариантах осуществления композиция содержит от 3,5 до 5,0 мг/кг GCB. В некоторых вариантах осуществления IFG находится в 1-5 или 1-10-кратном молярном отношении к GCB. В некоторых вариантах осуществления IFG находится в 2-10-кратном молярном отношении к GCB. В некоторых вариантах осуществления IFG находится в 10-30-кратном молярном отношении к GCB. В некоторых вариантах осуществления IFG находится в 30-100-кратном молярном отношении к GCB. В некоторых вариантах осуществления IFG находится в 2,5-3,5-кратном молярном отношении к GCB. В некоторых вариантах осуществления IFG находится в 3-кратном молярном отношении к GCB. В некоторых вариантах осуществления воздействие, активность или биодоступность GCB увеличивается, например, относительно воздействия, активности или биодоступности эквивалентного количества GCB в монотерапии, вводимой внутривенно. В некоторых вариантах осуществления воздействие, активность или биодоступность GCB в селезенке

повышается. В некоторых вариантах осуществления воздействие, активность или биодоступность GCB в печени повышается. В некоторых вариантах осуществления воздействие, активность или биодоступность GCB в сыворотке повышается.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

Фигура 1 представляет собой блок-схему, иллюстрирующую процесс получения композиции глюкоцеребозидазы (GCB) и изофагомина (IFG).

Фигуры 2А и 2В иллюстрируют тестирование образцов GCB с помощью ДСН-ПААГ-электрофореза в первый день после добавления IFG (2А) и через две недели после добавления IFG (2В). Регулировку pH IFG не проводили.

Фигура 3 демонстрирует пробирки фирмы Эппендорф, содержащие лиофилизированные растворы тартрата изофагомина (IFGT) с отрегулированным pH.

Фигуры 4А и 4В иллюстрируют тестирование образцов GCB с помощью ДСН-ПААГ-электрофореза в тот же день, когда добавляли IFG (4А) и после трех дней хранения (4В). pH IFG был отрегулирован.

Фигура 5 иллюстрирует результаты анализа IFGT с отрегулированным pH, добавленного к GCB, с помощью эксклюзионной хроматографии по размеру (SEC).

Фигуры 6А и 6В иллюстрируют результаты анализа IFG с отрегулированным pH, добавленного к GCB, с помощью эксклюзионной хроматографии по размеру (SEC).

Фигуры 7А-7Д иллюстрируют результаты исследований поверхностного плазмонного резонанса связывания IFG с GCB.

Фигура 8 иллюстрирует результаты анализа нанодифференциальной сканирующей флуориметрией (нано-DSF), оценивающей изменения температуры плавления GCB с различными молярными соотношениями IFG в диапазоне от 1:3 до 1:100 GCB:IFG.

Фигуры 9А-9С иллюстрируют результаты реакций ферментативной активности, проводимых с велаглюцеразой альфа, предварительно инкубированной с IFGT. Фигуре 9А демонстрирует кривую ингибирования с помощью синтетического колориметрического субстрата pNP-GPS. Фигура 9В демонстрирует кривую ингибирования с помощью синтетического флуориметрического субстрата 4MU-GPS. Фигура 9С демонстрирует ингибирование с помощью природного гликофинголипидного субстрата C12-GluCer.

Фигура 10А показан внешний вид образцов GCB/IFGT, хранящихся в течение трех недель при 40°C. Фигура 10В демонстрирует анализ образцов GCB/IFGT, хранившихся в течение трех недель, с помощью ДСН-ПААГ-электрофореза. Растворы групп 1-3 (G1, G2, G3) выглядят прозрачными. Раствор группы 4 (G4) выглядит мутным.

Фигура 11 демонстрирует отрицательные и положительные контроли для иммуногистохимического анализа GCB (ИНС) из фармакокинетического исследования внутривенного GCB и подкожного GCB с IFG у яванского макака.

Фигура 12 демонстрирует окрашивание GCB в печени при 2-кратном увеличении в различные моменты времени после подкожной инъекции GCB (верхние панели) и внутривенной инъекции GCB (нижние панели).

Фигура 13 демонстрирует окрашивание GCB в печени при 20-кратном увеличении

в различные моменты времени после подкожной инъекции GCB (верхние панели) и внутривенной инъекции GCB (нижние панели).

Фигура 14 демонстрирует окрашивание GCB в селезенке при 2-кратном увеличении в различные моменты времени после подкожной инъекции GCB (верхние панели) и внутривенной инъекции GCB (нижние панели).

Фигура 15 демонстрирует окрашивание GCB в селезенке при 20-кратном увеличении в различные моменты времени после подкожной инъекции GCB (верхние панели) и внутривенной инъекции GCB (нижние панели).

Фигуры 16A и 16B демонстрируют результаты анализа уровней активности белка и фермента велаглюцеразы альфа в гомогенатах печени и селезенки после введения велаглюцеразы альфа (16A) и велаглюцеразы альфа с IFGT в молярном соотношении 1:3 (16B).

Фигура 16C демонстрирует результаты анализа уровней GCB в сыворотке крови у яванских макаков после подкожного введения велаглюцеразы альфа с IFGT.

Фигуры 17A и 17B демонстрируют результаты ЭХЛ ИФА-анализа (ECL ELISA) биодоступности GCB (17A) в сыворотке и анализа активности GCB (17B) после подкожного введения 4 мг/кг велаглюцеразы альфа и IFG при разных молярных соотношениях в диапазоне от 1:3 до 1:100.

Фигуры 18A и 18B демонстрируют результаты ЭХЛ ИФА-анализа (ECL ELISA) профиля содержания GCB в печени (18A) и селезенке (18B) после внутривенного введения 10 мг/кг велаглюцеразы альфа или подкожного введения 4 мг/кг велаглюцеразы альфа и IFG в молярном соотношении 1:100.

Фигуры 19A и 19B демонстрируют результаты ЭХЛ ИФА-анализа (ECL ELISA) содержания GCB в печени (19A) и селезенке (19B) после подкожного введения 4 мг/кг велаглюцеразы альфа и IFG в молярном соотношении 1:3.

Фигуры 20A и 20B демонстрируют результаты ЭХЛ ИФА-анализа (ECL ELISA) биодоступности GCB (20A) в сыворотке и анализа активности GCB (20B) после подкожного введения 1,5 мг/кг велаглюцеразы альфа и IFG при различных молярных соотношениях в диапазоне от 1:1 до 1:30.

Фигура 21 демонстрирует результаты анализа активности VPRIV в сыворотке человека, инкубированной при 37°C без IFG, с 3 нМ IFG, с 10 нМ IFG, с 30 нМ IFG, со 100 нМ IFG, с 300 нМ IFG и с 1000 нМ IFG.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

Обзор

[0021] Композиции, содержащие глюкоцереброзидазу (GCB), могут выигрывать от повышенной стабильности, в частности, когда композиции представляют собой жидкости. Три незащищенные свободные тиольные группы в GCB могут подвергаться реакциям, которые приводят к снижению стабильности, например, путем агрегации молекул GCB. Например, в буфере при pH 6 обычно 1-2% белка агрегируется за один месяц хранения и около 15% агрегируется после 6 месяцев хранения. Не желая быть строго связанными

теорией или механизмом, стабильность белка зависит от ряда факторов.

[0022] Добавление изофагомина (IFG), например тартрата изофагомина (IFGT), улучшает стабильность GCB *in vitro*, особенно когда IFG, например IFGT, доводят до pH 6,0 перед добавлением в GCB. IFG имеет следующую структуру:

[0023] Не желая быть связанными теорией, IFG может взаимодействовать с аминокислотными остатками рядом с активным сайтом, чтобы фиксировать GCB в конформации, которая обеспечивает повышенную стабильность. См. Shen, J.S. с соавт., *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 2008, 369: 1071-1075. IFG также может препятствовать агрегации GCB, поскольку IFG может связываться с GCB, чтобы сделать GCB более компактным и термически более стабильным.

[0024] Авторы настоящего изобретения показали, что молярное отношение IFG к GCB является критическим для стабилизации GCB в жидких композициях. Как более подробно описано в настоящей заявке, композиции с молярным отношением по меньшей мере 1:2,5 (GCB:IFG) (т.е. 1:x (где x составляет по меньшей мере 2,5)) могут иметь существенно меньшую агрегацию и деградацию GCB. Может иметь место значительно большая агрегация и деградация GCB с молярными соотношениями, существенно ниже 1:2,5.

[0025] Авторы настоящего изобретения также показали, что композиции с молярным отношением IFG/IFGT к GCB по меньшей мере 1:2,5 (GCB:IFG) имеют улучшенную биодоступность, активность, воздействие на ткани и системное воздействие GCB при подкожном введении. Улучшенная биодоступность может быть обнаружена одним или несколькими из повышенного окрашивания ткани GCB в печени, повышенного окрашивания ткани GCB в селезенке, повышенной концентрации GCB в сыворотке и повышенной активности GCB в сыворотке. Улучшенное системное воздействие может быть проанализировано путем измерения концентрации белка GCB или активности фермента GCB в сыворотке. Добавление IFG, например, IFGT, к GCB в молярном соотношении по меньшей мере 1:2,5 (GCB: IFG) может сделать возможным, чтобы биодоступность, активность, воздействие на ткани или системное воздействие GCB в составе для подкожного введения были равными или были больше, чем биодоступность, активность, воздействие на ткани или системное воздействие GCB в составе для внутривенного введения, особенно в составе без IFG.

Определения

[0026] Термин "субъект" относится к любому млекопитающему, включая, но не ограничиваясь этим, любое животное, классифицированное как таковое, включая людей, нечеловекообразных приматов, приматов, бабуинов, шимпанзе, обезьян, грызунов (например, мышей, крыс), кроликов, кошек, собак, лошадей, коров, овец, коз, свиней и т.д. Термин "субъект" может быть использовано взаимозаменяемо с термином "пациент".

[0027] Термин "выделенный" относится к молекуле, которая по существу не содержит ее естественную среду. Например, выделенный белок по существу не содержит клеточного материала или других белков из клеточного или тканевого источника, из

которого он получен. Препараты, содержащие выделенный белок, являются достаточно чистыми для введения в качестве терапевтической композиции или чистыми по меньшей мере на 70-80% (масс./масс.), более предпочтительно чистыми по меньшей мере на 80-90% (масс./масс.), еще более предпочтительно чистоты на 90-95%; и наиболее предпочтительно чистоты по меньшей мере на 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5%, 99,8% или 100% (масс./масс.).

[0028] В контексте настоящего документа термин "примерно" относится к до +/- 10% значения, квалифицируемого этим термином. Например, примерно 50 мМ относится к 50 мМ +/- 5 мМ; примерно 4% относится к 4% +/- 0,4%.

[0029] В контексте настоящего документа фразы "парентеральное введение", "вводимый парентерально" и "вводить парентерально" относятся к способам введения, отличным от энтерального и местного введения, обычно путем инъекции, и включают, но не ограничиваясь этим, внутривенное (ВВ), внутримышечные, внутриаартериальные, интратекальные, интракапсулярные, интраорбитальные, интракардиальные, интрадермальные, внутрибрюшинные, транстрахеальные, подкожные (ПК), субкутикулярные, внутрисуставные, субкапсулярные, субарахноидальные, интраспинальные, эпидуральные и интрасеральные инъекции и инфузии.

[0030] Термины "терапевтически эффективная доза" и "терапевтически эффективное количество" относятся к такому количеству соединения, которое приводит к предотвращению симптомов, например, к предотвращению на 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% симптомов, например, симптомов болезни Гоше у субъекта, у которого диагностирована болезнь Гоше, задержке появления симптомов или облегчение симптомов болезни Гоше. Терапевтически эффективное количество будет, например, достаточным для лечения, предотвращения, снижения тяжести, задержки начала и/или снижения риска возникновения одного или нескольких симптомов расстройства, связанного с болезнью Гоше. Эффективное количество может быть определено способами, хорошо известными в данной области техники, и как описано в последующих разделах настоящего описания.

[0031] Термины "лечение" и "терапевтическая методика" относятся к лечению существующего расстройства и/или профилактическим/предотвращающим мерам. К числу тех, кто нуждается в лечении, могут относиться лица, уже имеющие определенное медицинское расстройство, а также лица, которым грозит риск получения или которые в конечном итоге могут приобрести заболевание. Необходимость лечения оценивается, например, по наличию одного или нескольких факторов риска, связанных с развитием расстройства, наличием или прогрессированием расстройства или предполагаемой восприимчивостью к лечению субъекта, имеющего расстройство. Лечение может включать замедление или обращение прогрессирования расстройства.

[0032] Термин "лечение" относится к введению препарата в количестве, порядке и/или режиме, эффективном для облегчения или предотвращения состояния, симптома или параметра, связанного с расстройством (например, расстройством, описанным в

настоящем документе), или для предотвращения начала, прогрессирования или обострения расстройства, либо в статистически значимой степени, либо в степени, определяемой специалистом в данной области техники. Соответственно, лечение может достигать терапевтических и/или профилактических преимуществ. Эффективное количество, порядок или режим могут варьироваться в зависимости от субъекта и могут быть адаптированы к субъекту. В некоторых вариантах осуществления лечение расстройства, связанного с дисфункцией в пути GСазы (например, болезнь Гоше), представляет собой лечение, которое приводит к одному или нескольким из следующих: увеличение концентрации гемоглобина, повышение уровня тромбоцитов, уменьшение объема печени, уменьшение объема селезенки или изменение параметра скелета (например, увеличение минеральной плотности костной ткани), например, у субъекта, которого не лечили от дисфункции в пути GСазы. В некоторых вариантах осуществления лечение расстройства, связанного с дисфункцией в пути GСазы (например, болезнь Гоше), представляет собой лечение, которое приводит к одному или нескольким из следующих: увеличение концентрации гемоглобина, повышение уровня тромбоцитов, уменьшение объема печени, уменьшение объема селезенки или изменение параметра скелета (например, увеличение минеральной плотности костной ткани), или поддержание одного или нескольких из этих параметров, например, у субъекта, которого лечили от дисфункции в пути GСазы.

[0033] Термин "комбинация" относится к применению двух или более агентов или препаратов для лечения одного и того же пациента, причем применение или действие агентов или методов лечения совпадают во времени. Агенты или препараты можно вводить одновременно (например, в виде одной композиции, которую вводят пациенту, или в виде двух отдельных композиций, вводимых одновременно) или последовательно в любом порядке.

[0034] Термины "замедленное высвобождение", "доставка с замедленным высвобождением" и "доставка лекарственного средства с замедленным высвобождением", в контексте настоящего документа, означают, что однократное введение лекарственного средства поддерживает эффективную концентрацию лекарственного средства в крови в течение длительного периода, например, 12 часов или дольше. Например, общий путь введения полипептидов представляет собой подкожную, внутримышечную или внутривенную (ВВ) инъекцию.

[0035] Термин "соли" охватывает соли присоединения свободных кислот или свободных оснований. Термин "фармацевтически приемлемая соль" относится к солям, которые обладают профилями токсичности в пределах диапазона, который обеспечивает полезность в фармацевтических применениях. Соли, которые не являются фармацевтически приемлемыми солями, могут все еще быть полезными в синтезе, очистке или приготовлении лекарственных форм из-за таких свойств, как высокая кристалличность.

[0036] Термин "единица" в отношении GСВ, велаглуцеразы или велаглуцеразы

альфа относится к их количеству, которое требуется для превращения одного микромоля п-нитрофенил бета-D-глюкопиранозиды в п-нитрофенол или 4-метилумбеллиферон бета-D-глюкопиранозиды в 4-метилумбеллиферон в минуту при 37°C.

Глюкоцереброзидаза

[0037] Велаглюцераза представляет собой β -глюкоцереброзидазу человека, продуцируемую активацией гена в клеточной линии человека, например, путем направленной рекомбинации с промотором, что активирует ген эндогенной β -глюкоцереброзидазы в выбранной клеточной линии человека. Велаглюцераза секретируется в виде мономерного гликопротеина приблизительно 63 кДа. Велаглюцераза состоит из 497 аминокислот с последовательностью, идентичной природному белку человека. См. Zimran с соавт., Blood Cells Mol. Dis., 2007, 39: 115-118.

[0038] Гликозилирование велаглюцеразы альфа может быть изменено путем использования кифунензина, ингибитора маннозидазы I, в процессе культивирования клеток для того, чтобы продуцировать секретируемый белок, содержащий в основном гликаны типа с высоким содержанием маннозы, имеющие 6-9 единиц маннозы на гликан, как описано в более подробно в WO 2013/130963.

[0039] Имиглюцераза (Церезим®) представляет собой другую форму рекомбинантной человеческой β -глюкоцереброзидазы. Имиглюцераза рекомбинантно продуцируется в клетках яичника китайского хомячка (CHO).

[0040] Талиглюцераза альфа (Элелисо® или Аплисо®) представляет собой рекомбинантную глюкоцереброзидазу (prGCB), экспрессируемую в растительных клетках. Растительная рекомбинантная глюкоцереброзидаза может быть получена способами, описанными по меньшей мере в патентных публикациях США №№ 2009/0208477 и 2008/0038232 и публикациях PCT №№ WO 2004/096978 и WO 2008/132743.

[0041] Любая из рекомбинантных GCB может быть продуцирована с использованием биореакторов и способов синтеза в промышленном масштабе, известных в данной области техники. Может быть использовано любое количество систем очистки в промышленном масштабе.

Изофагомин

[0042] Могут быть использованы различные альтернативные формы изофагомина. Они включают любой из изофагомина тартрата, изофагомина HCl, свободного основания изофагомина и изофагомина цитрата. В некоторых вариантах осуществления изофагомин содержит один или несколько из изофагомина HCl, свободного основания изофагомина и изофагомина цитрата. В некоторых вариантах осуществления изофагомин включает изофагомина тартрат.

[0043] Изофагомин HCl описан в патентах США №№ 5,844,102 и 7,501,439. Изофагомин HCl представляет собой твердое вещество желтого цвета с низкой температурой плавления. Свободное основание изофагомина может быть получено путем превращения изофагомина HCl в форму свободного основания.

[0044] В любом из аспектов и вариантов осуществления, описанных в настоящем документе, изофагомин может не быть в форме изофагомина тартрата, или композиция GCB/IFG может не содержать изофагомина тартрат.

Изофагомина тартрат

[0045] Изофагомина тартрат (IFGT) представляет собой особую форму изофагомина (IFG), которая может использоваться в различных вариантах осуществления, раскрытых в настоящем документе, и особенно подходит для практического применения изобретения. IFGT имеет следующую формулу:

[0046] IFGT имеет улучшенные характеристики по сравнению с IFG, которые включают улучшенную синтетическую технологичность. Например, может быть легче очистить IFGT в растворителях, таких как вода и этанол. IFGT обладает большей стабильностью, чем другие известные солевые формы изофагомина. IFGT также особенно подходит для производства в промышленных масштабах, например, для производства более 1 кг продукта.

[0047] Композиция, содержащая GCB и IFG, иногда упоминается в настоящей заявке как композиция GCB/IFG. Композиция, содержащая GCB и IFGT, иногда упоминается в настоящей заявке как композиция GCB/IFGT.

Молярные отношения GCB к IFG/IFGT

[0048] В различных вариантах осуществления композиция содержит глюкоцеребозидазу (GCB) и изофагомин (IFG), например, изофагомина тартрат (IFGT), в молярном соотношении по меньшей мере примерно 1:1, 1:1,5, 1:2, или 1:2,5 (GCB:IFG). Молярное отношение GCB к IFG, например, GCB к IFGT, может составлять 1:1, 1:1,5, 1:2, 1:2,5, 1:2,6, 1:2,7, 1:2,8, 1:2,9, 1:3,0, 1:3,1, 1:3,2, 1:3,3, 1:3,4, 1:3,5, 1:3,6, 1:3,7, 1:3,8, 1:3,9, 1:4,0, 1:4,1, 1:4,2, 1:4,3, 1:4,4, 1:4,5, 1:4,6, 1:4,7, 1:4,8, 1:4,9, 1:5,0, 1:5,1, 1:5,2, 1:5,3, 1:5,4, 1:5,5, 1:5,6, 1:5,7, 1:5,8, 1:5,9, 1:6,0, 1:6,1, 1:6,2, 1:6,3, 1:6,4, 1:6,5, 1:6,6, 1:6,7, 1:6,8, 1:6,9, 1:7,0, 1:7,1, 1:7,2, 1:7,3, 1:7,4, 1:7,5, 1:7,6, 1:7,7, 1:7,8, 1:7,9, 1:8,0, 1:8,1, 1:8,2, 1:8,3, 1:8,4, 1:8,5, 1:8,6, 1:8,7, 1:8,8, 1:8,9, 1:9,0, 1:9,1, 1:9,2, 1:9,3, 1:9,4, 1:9,5, 1:9,6, 1:9,7, 1:9,8, 1:9,9, 1:10,0, 1:10,1, 1:10,2, 1:10,3, 1:10,4, 1:10,5, 1:10,6, 1:10,7, 1:10,8, 1:10,9, 1:11,0, 1:11,1, 1:11,2, 1:11,3, 1:11,4, 1:11,5, 1:11,6, 1:11,7, 1:11,8, 1:11,9, 1:12,0, 1:12,1, 1:12,2, 1:12,3, 1:12,4, 1:12,5, 1:12,6, 1:12,7, 1:12,8, 1:12,9, 1:13,0, 1:13,1, 1:13,2, 1:13,3, 1:13,4, 1:13,5, 1:13,6, 1:13,7, 1:13,8, 1:13,9, 1:14,0, 1:14,1, 1:14,2, 1:14,3, 1:14,4, 1:14,5, 1:14,6, 1:14,7, 1:14,8, 1:14,9, 1:15,0, 1:15,1, 1:15,2, 1:15,3, 1:15,4, 1:15,5, 1:15,6, 1:15,7, 1:15,8, 1:15,9, 1:16,0, 1:16,1, 1:16,2, 1:16,3, 1:16,4, 1:16,5, 1:16,6, 1:16,7, 1:16,8, 1:16,9, 1:17,0, 1:17,1, 1:17,2, 1:17,3, 1:17,4, 1:17,5, 1:17,6, 1:17,7, 1:17,8, 1:17,9, 1:18,0, 1:18,1, 1:18,2, 1:18,3, 1:18,4, 1:18,5, 1:18,6, 1:18,7, 1:18,8, 1:18,9, 1:19,0, 1:19,1, 1:19,2, 1:19,3, 1:19,4, 1:19,5, 1:19,6, 1:19,7, 1:19,8, 1:19,9, 1:20,0, 1:20,1, 1:20,2, 1:20,3, 1:20,4, 1:20,5, 1:20,6, 1:20,7, 1:20,8, 1:20,9, 1:21,0, 1:21,1, 1:21,2, 1:21,3, 1:21,4, 1:21,5, 1:21,6, 1:21,7, 1:21,8, 1:21,9, 1:22,0, 1:22,1, 1:22,2, 1:22,3, 1:22,4, 1:22,5, 1:22,6, 1:22,7, 1:22,8, 1:22,9, 1:23,0, 1:23,1, 1:23,2, 1:23,3, 1:23,4, 1:23,5, 1:23,6, 1:23,7, 1:23,8, 1:23,9, 1:24,0, 1:24,1, 1:24,2, 1:24,3, 1:24,4, 1:24,5, 1:24,6, 1:24,7, 1:24,8, 1:24,9, 1:25,0, 1:25,1, 1:25,2, 1:25,3, 1:25,4,

1:25,5, 1:25,6, 1:25,7, 1:25,8, 1:25,9, 1:26,0, 1:26,1, 1:26,2, 1:26,3, 1:26,4, 1:26,5, 1:26,6, 1:26,7, 1:26,8, 1:26,9, 1:27,0, 1:27,1, 1:27,2, 1:27,3, 1:27,4, 1:27,5, 1:27,6, 1:27,7, 1:27,8, 1:27,9, 1:28,0, 1:28,1, 1:28,2, 1:28,3, 1:28,4, 1:28,5, 1:28,6, 1:28,7, 1:28,8, 1:28,9, 1:29,0, 1:29,1, 1:29,2, 1:29,3, 1:29,4, 1:29,5, 1:29,6, 1:29,7, 1:29,8, 1:29,9 или 1:30,0.

[0049] Молярное отношение GCB к IPG, например, GCB к IFGT, может составлять от 1:2,5 до 1:3,5, от 1:2,6 до 1:3,4, от 1:2,7 до 1:3,5, от 1:2,7 до 1:3,4, от 1:2,5 до 1:3,3, от 1:2,8 до 1:3,5, от 1:2,8 до 1:3,3, от 1:2,7 до 1:3,2, от 1:2,6 до 1:3,1, от 1:2,5 до 1:3,0, от 1:2,9 до 1:3,3, от 1:2,8 до 1:3,2, от 1:2,7 до 1:3,1, от 1:2,6 до 1:3,0, от 1:2,5 до 1:2,9, от 1:3,0 до 1:3,4 или от 1:3,1 до 1:3,5.

[0050] Молярное отношение GCB к IFG, например, GCB к IFGT, может составлять от 1:7 до 1:33, от 1:8 до 1:32, от 1:9 до 1:33, от 1:7 до 1:31, от 1:9 до 1:31, от 1:8 до 1:30, от 1:7 до 1:29, от 1:10 до 1:32, от 1:11 до 1:33, от 1:7 до 1:29, от 1:10 до 1:30, от 1:9 до 1:29, от 1:8 до 1:28, от 1:7 до 1:27, от 1:11 до 1:31, от 1:12 до 1:32, от 1:13 до 1:33, от 1:11 до 1:29, от 1:10 до 1:28, от 1:9 до 1:27, от 1:8 до 1:26, от 1:7 до 1:25, от 1:12 до 1:30, от 1:13 до 1:31, от 1:14 до 1:32, от 1:15 до 1:33, от 1:13 до 1:29, от 1:12 до 1:28, от 1:11 до 1:27, от 1:10 до 1:26, от 1:9 до 1:25, от 1:8 до 1:24, от 1:7 до 1:23, от 1:14 до 1:30, от 1:15 до 1:31, от 1:16 до 1:32, от 1:17 до 1:33, от 1:14 до 1:28, от 1:13 до 1:27, от 1:12 до 1:26, от 1:11 до 1:25, от 1:10 до 1:24, от 1:9 до 1:23, от 1:8 до 1:22, от 1:7 до 1:21, от 1:15 до 1:29, от 1:16 до 1:30, от 1:17 до 1:31, от 1:18 до 1:32, от 1:19 до 1:33, от 1:15 до 1:27, от 1:14 до 1:26, от 1:13 до 1:25, от 1:12 до 1:24, от 1:11 до 1:23, от 1:10 до 1:22, от 1:9 до 1:21, от 1:8 до 1:20, от 1:7 до 1:19, от 1:16 до 1:28, от 1:17 до 1:29, от 1:18 до 1:30, от 1:19 до 1:31, от 1:20 до 1:32 или от 1:21 до 1:33.

[0051] Молярное отношение GCB к IFG, например, GCB к IFGT, может составлять от 1:16 до 1:26, от 1:15 до 1:25, от 1:14 до 1:24, от 1:13 до 1:23, от 1:12 до 1:22, от 1:11 до 1:31, от 1:10 до 1:30, от 1:9 до 1:29, от 1:8 до 1:28, от 1:7 до 1:27, от 1:17 до 1:27, от 1:18 до 1:28, от 1:19 до 1:29, от 1:20 до 1:30, от 1:21 до 1:31, от 1:22 до 1:32, от 1:23 до 1:33, от 1:17 до 1:25, от 1:14 до 1:24, от 1:13 до 1:23, от 1:12 до 1:22, от 1:11 до 1:21, от 1:10 до 1:20, от 1:9 до 1:19, от 1:18 до 1:26, от 1:19 до 1:27, от 1:20 до 1:28, от 1:21 до 1:29, от 1:22 до 1:30, от 1:23 до 1:31, от 1:18 до 1:24, от 1:17 до 1:23, от 1:16 до 1:22, от 1:15 до 1:21, от 1:14 до 1:20, от 1:13 до 1:19, от 1:12 до 1:18, от 1:11 до 1:17, от 1:19 до 1:25, от 1:20 до 1:26, от 1:21 до 1:27, от 1:22 до 1:28, от 1:23 до 1:29, от 1:24 до 1:30, от 1:19 до 1:23, от 1:17 до 1:21, от 1:15 до 1:19, от 1:13 до 1:17, от 1:11 до 1:15, от 1:9 до 1:13, от 1:7 до 1:11, от 1:21 до 1:25, от 1:23 до 1:27, от 1:25 до 1:29, от 1:27 до 1:31, от 1:29 до 1:33, от 1:20 до 1:23, от 1:18 до 1:21, от 1:16 до 1:19, от 1:14 до 1:17, от 1:12 до 1:15, от 1:10 до 1:13, от 1:8 до 1:11, от 1:22 до 1:25, от 1:24 до 1:27, от 1:26 до 1:29, от 1:28 до 1:31 или от 1:30 до 1:33.

[0052] Молярное отношение GCB к IFG, например, GCB к IFGT, может составлять 1:31, 1:32, 1:33, 1:34, 1:35, 1:36, 1:37, 1:38, 1:39, 1:40, 1:41, 1:42, 1:43, 1:44, 1:45, 1:46, 1:47, 1:48, 1:49, 1:50, 1:51, 1:52, 1:53, 1:54, 1:55, 1:56, 1:57, 1:58, 1:59, 1:60, 1:61, 1:62, 1:63, 1:64, 1:65, 1:66, 1:67, 1:68, 1:69, 1:70, 1:71, 1:72, 1:73, 1:74, 1:75, 1:76, 1:77, 1:78, 1:79, 1:80, 1:81, 1:82, 1:83, 1:84, 1:85, 1:86, 1:87, 1:88, 1:89, 1:90, 1:91, 1:92, 1:93, 1:94, 1:95, 1:96, 1:97,

1:98, 1:99 или 1:100.

[0053] Молярное отношение GCB к IFG, например, GCB к IFGT, может составлять от 1:30 до 1:100, от 1:30 до 1:80, от 1:40 до 1:90, от 1:50 до 1:100, от 1:30 до 1:60, от 1:40 до 1:70, от 1:50 до 1:80, от 1:60 до 1:90, от 1:70 до 1:100, от 1:30 до 1:50, от 1:40 до 1:60, от 1:50 до 1:70, от 1:60 до 1:80, от 1:70 до 1:90, от 1:80 до 1:100, от 1:30 до 1:40, от 1:40 до 1:50, от 1:50 до 1:60, от 1:60 до 1:70, от 1:70 до 1:80, от 1:80 до 1:90, или от 1:90 до 1:100.

[0054] В других различных вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, композиция содержит глюкоцереброзидазу (GCB) и изофагомина тартрат (IFGT) в молярном соотношении по меньшей мере примерно 1:2,5.

[0055] В других различных вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, композиция содержит глюкоцереброзидазу (GCB) и изофагомина цитрат в молярном соотношении по меньшей мере примерно 1:2,5.

[0056] В других различных вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, композиция содержит глюкоцереброзидазу (GCB) и изофагомин HCl в молярном соотношении по меньшей мере примерно 1:2,5.

[0057] В других различных вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, композиция содержит глюкоцереброзидазу (GCB) и свободное основание изофагомина в молярном соотношении по меньшей мере примерно 1:2,5.

[0058] В других различных вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, композиция содержит глюкоцереброзидазу (GCB) и изофагомин, который не содержит IFGT, в молярном соотношении по меньшей мере примерно 1:2,5.

Концентрация GCB

[0059] Концентрация GCB в любой из композиций может составлять от примерно 0,1 до примерно 40 мг/мл, от примерно 0,5 до примерно 10 мг/мл, от примерно 5 до примерно 15 мг/мл, от примерно 10 до примерно 20 мг/мл, от примерно 15 до примерно 25 мг/мл, от примерно 20 до примерно 30 мг/мл, от примерно 25 до примерно 35 мг/мл, от примерно 30 до примерно 40 мг/мл, от примерно 2 до примерно 8 мг/мл, от примерно 5 до примерно 11 мг/мл, от примерно 8 до примерно 14 мг/мл, от примерно 11 до примерно 17 мг/мл, от примерно 14 до примерно 20 мг/мл, от примерно 17 до примерно 23 мг/мл, от примерно 20 до примерно 26 мг/мл, от примерно 23 до примерно 29 мг/мл, от примерно 26 до примерно 32 мг/мл, от примерно 29 до примерно 35 мг/мл, от примерно 32 до примерно 38 мг/мл, от примерно 2 до примерно 5 мг/мл, от примерно 5 до примерно 8 мг/мл, от примерно 8 до примерно 11 мг/мл, от примерно 11 до примерно 14 мг/мл, от примерно 14 до примерно 17 мг/мл, от примерно 17 до примерно 20 мг/мл, от примерно 20 до примерно 23 мг/мл, от примерно 23 до примерно 26 мг/мл, от примерно 26 до примерно 29 мг/мл, от примерно 29 до примерно 32 мг/мл, от примерно 32 до примерно 35 мг/мл, от примерно 35 до примерно 38 мг/мл, примерно 0,5 мг/мл, примерно 1 мг/мл, примерно 2 мг/мл, примерно 3 мг/мл, примерно 4 мг/мл, примерно 5 мг/мл, примерно 6 мг/мл, примерно 7 мг/мл, примерно 8 мг/мл, примерно 9 мг/мл, примерно 10 мг/мл, примерно 11 мг/мл, примерно 12 мг/мл, примерно 13 мг/мл, примерно 14 мг/мл, примерно 15 мг/мл, примерно

16 мг/мл, примерно 17 мг/мл, примерно 18 мг/мл, примерно 19 мг/мл, примерно 20 мг/мл, примерно 21 мг/мл, примерно 22 мг/мл, примерно 23 мг/мл, примерно 24 мг/мл, примерно 25 мг/мл, примерно 26 мг/мл, примерно 27 мг/мл, примерно 28 мг/мл, примерно 29 мг/мл, примерно 30 мг/мл, примерно 31 мг/мл, примерно 32 мг/мл, примерно 33 мг/мл, примерно 34 мг/мл, примерно 35 мг/мл, примерно 36 мг/мл, примерно 37 мг/мл, примерно 38 мг/мл, примерно 39 мг/мл или примерно 40 мг/мл.

[0060] Концентрация GCB может составлять от 50 единиц/мл до 200 единиц/мл, от 70 единиц/мл до 160 единиц/мл, от 80 единиц/мл до 175 единиц/мл, от 90 единиц/мл до 190 единиц/мл, от 60 единиц/мл до 145 единиц/мл, от 50 единиц/мл до 130 единиц/мл, от 80 единиц/мл до 140 единиц/мл, от 70 единиц/мл до 120 единиц/мл, от 60 единиц/мл до 100 единиц/мл, от 50 единиц/мл до 85 единиц/мл, от 90 единиц/мл до 160 единиц/мл, от 100 единиц/мл до 180 единиц/мл, от 120 единиц/мл до 200 единиц/мл, от 90 единиц/мл до 125 единиц/мл, от 80 единиц/мл до 105 единиц/мл, от 70 единиц/мл до 100 единиц/мл, от 60 единиц/мл до 90 единиц/мл, от 50 единиц/мл до 80 единиц/мл, от 100 единиц/мл до 140 единиц/мл, от 115 единиц/мл до 160 единиц/мл, от 130 единиц/мл до 180 единиц/мл, от 145 единиц/мл до 200 единиц/мл, от 100 единиц/мл до 115 единиц/мл, от 90 единиц/мл до 105 единиц/мл, от 80 единиц/мл до 95 единиц/мл, от 70 единиц/мл до 85 единиц/мл, от 60 единиц/мл до 75 единиц/мл, от 50 единиц/мл до 65 единиц/мл, от 110 единиц/мл до 125 единиц/мл, от 120 единиц/мл до 135 единиц/мл, от 130 единиц/мл до 145 единиц/мл, от 140 единиц/мл до 160 единиц/мл, от 160 единиц/мл до 180 единиц/мл, от 180 единиц/мл до 200 единиц/мл, примерно 50 единиц/мл, примерно 60 единиц/мл, примерно 70 единиц/мл, примерно 80 единиц/мл, примерно 90 единиц/мл, примерно 100 единиц/мл, примерно 110 единиц/мл, примерно 120 единиц/мл, примерно 130 единиц/мл, примерно 140 единиц/мл, примерно 150 единиц/мл, примерно 160 единиц/мл, примерно 170 единиц/мл, примерно 180 единиц/мл, примерно 190 единиц/мл, примерно 200 единиц/мл, 50 единиц/мл, 60 единиц/мл, 70 единиц/мл, 80 единиц/мл, 90 единиц/мл, 100 единиц/мл, 110 единиц/мл, 120 единиц/мл, 130 единиц/мл, 140 единиц/мл, 150 единиц/мл, 160 единиц/мл, 170 единиц/мл, 180 единиц/мл, 190 единиц/мл или 200 единиц/мл.

Фармацевтические композиции

[0061] Фармацевтическая композиция может содержать "терапевтически эффективное количество" композиции GCB/IFG, например, GCB/IFGT, описанной в настоящем документе. Такие эффективные количества могут быть определены на основании эффекта от введенной композиции. Терапевтически эффективное количество композиции GCB/IFG, например, GCB/IFGT, также может варьироваться в зависимости от таких факторов, как болезненное состояние, возраст, пол и масса тела индивидуума, а также способность композиции вызывать желаемый ответ у индивидуума, например, облегчение по меньшей мере одного симптома состояния или расстройства, например, дефицита глюкоцереброзидазы, например, болезни Гоше. Терапевтически эффективное количество также представляет собой количество, при котором любые токсические или вредные действия композиции перевешиваются терапевтически полезными эффектами.

[0062] Композиция GCB/IFG может не содержать IFGT.

[0063] Фармацевтическая композиция по изобретению может быть составлена так, чтобы она была совместима с предполагаемым путем введения. Например, композицию GCB/IFG, например GCB/IFGT, можно вводить парентеральным способом, например, внутривенной, подкожной, внутривентриальной или внутримышечной инъекцией. В различных вариантах путь введения является внутривенным. В различных вариантах путь введения является подкожным. Растворы или суспензии, используемые для парентерального применения, могут содержать следующие компоненты: стерильный разбавитель, такой как вода для инъекций, физиологический раствор, нелетучие масла, полиэтиленгликоли, глицерин, пропиленгликоль или другие синтетические растворители; антибактериальные агенты, такие как бензиловый спирт или метилпарабены; антиоксиданты, такие как аскорбиновая кислота или бисульфит натрия; хелатообразующие агенты, такие как этилендиаминтетрауксусная кислота; буферы, такие как ацетаты, цитраты или фосфаты, и средства, регулирующие тоничность, такие как хлорид натрия или декстроза. pH фармацевтических композиций можно регулировать кислотами или основаниями, такими как соляная кислота или гидроксид натрия. Парентеральный препарат может быть заключен в ампулы, шприцы одноразового применения или многодозовые флаконы, сделанные из стекла или пластика.

pH

[0064] pH может оказывать влияние на стабильность GCB в различных композициях GCB/IFG и GCB/IFGT, описанных в настоящем документе. pH может влиять на конформацию и/или агрегацию и/или деградацию и/или реакционную способность GCB. Например, при более высоком pH кислород может быть более реакционноспособным. pH предпочтительно составляет менее 7,0, более предпочтительно в диапазоне от примерно 4,5 до примерно 6,5, более предпочтительно от примерно 5,0 до примерно 6,0 и более предпочтительно от примерно 5,5 до примерно 5,8, более предпочтительно примерно 5,7. При использовании GCB агрегация может достигать нежелательных уровней при pH выше 7,0, а деградация (например, фрагментация) может достигать нежелательных уровней при pH ниже 4,5 или 5,0 или при pH выше 6,5 или 7,0.

[0065] Потенциально пригодный уровень pH можно проверить путем проведения испытания композиции GCB/IFG, например, GCB/IFGT, доведения композиции до потенциально пригодного pH и продувки композиции кислородом. Стабильность GCB в композиции при потенциально пригодном pH может быть измерена, например, в виде процентной агрегации или деградации в заранее установленное время. Измеренную стабильность можно сравнить с одним или несколькими стандартами. Например, подходящим стандартом может быть композиция, аналогичная тестируемым композициям, за исключением того, что pH композиции не регулируется. Затем можно сравнить стабильность композиций с отрегулированным pH и с неотрегулированным pH. Композиция GCB/IFG, например GCB/IFGT, может быть более пригодной, если GCB более стабильна, чем GCB сравнительной стандартной композиции. Пригодность может

быть продемонстрирована тестируемой обработкой, увеличивающей стабильность по сравнению с этим стандартом. Например, если сравнительная стандартная композиция GCB/IFG имеет pH 5,5, но повышенная стабильность GCB наблюдается, когда композиция GCB/IFG имеет pH 6,3, то композиция с pH 6,3 является более пригодной, поскольку GCB более стабильна при pH 6,3, чем при pH 5,5.

[0066] Буферы, которые можно использовать для регулирования pH белковой композиции, включают гистидин, цитрат, фосфат, глицин, сукцинат, ацетат, глутамат, Трис, тартрат, аспартат, малеат и лактат.

Анализ стабильности GCB

[0067] Стабильность белка может быть измерена путем измерения агрегации белка или деградации белка. Агрегацию белка можно определить различными методами, которые включают, например, эксклюзионную хроматографию по размеру (SEC), неденатурирующий ПААГ-электрофорез или другие методы определения размера и т.д. Деградацию белка можно определить, например, с помощью обращенно-фазовой ВЭЖХ, неденатурирующего ПААГ-электрофореза, ионообменной хроматографии, пептидного картирования или подобных способов.

[0068] Стабильность, в контексте настоящего документа, включает такие параметры, как структура белка (например, минимизация или предотвращение изменений в структуре белка, например, агрегации белка или деградации белка (например, фрагментация)) и/или биологическая активность белка, например, способность конвертировать субстрат в продукт.

[0069] Стабильность GCB может быть измерена, например, путем измерения агрегации белка, деградации белка или уровней биологической активности GCB. Агрегация GCB может быть определена различными методами, включая эксклюзионную хроматографию по размеру, неденатурирующий ПААГ-электрофорез и другие методы определения размера. В качестве примера, композиция может иметь менее чем на 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 или 50% увеличение количества агрегации белка GCB (например, как измерено с помощью эксклюзионной хроматографии по размеру) по сравнению с количеством агрегации белка, которое было в композиции перед хранением (например, хранением при температуре 2-8°C в течение периода времени до 3, 6, 9, 12 или 24 месяцев (или дольше)).

[0070] Деградация белка может быть определена различными методами, включая обращенно-фазовую ВЭЖХ, неденатурирующий ПААГ-электрофорез, ионообменную хроматографию, пептидное картирование или подобные методы. В качестве примера, композиция может иметь менее чем на 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 или 50% увеличение степени деградации GCB (например, как измерено обращенно-фазовой ВЭЖХ) по сравнению с количеством деградации GCB, которое было в композиции перед хранением (например, хранением при температуре 2-8°C в течение периода времени до 3, 6, 9, 12 или 24 месяцев (или дольше)). Биологическая активность GCB может быть измерена, например, с помощью анализов *in vitro* или *in vivo*, например, ИФА (ELISA)

(например, для измерения связывающей или ферментативной активности) и других ферментативных анализов (например, спектрофотометрических, флуориметрических, калориметрических, хемилюминесцентных, радиометрических или хроматографических анализов), киназных анализов и так далее. В качестве примера, композиция может иметь менее чем на 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 или 50% снижение биологической активности GCB (например, ферментативной активности, например, как измерено анализом *in vitro*) по сравнению с количеством биологической активности, которая была у композиции перед хранением (например, хранением при температуре 2-8°C в течение периода времени до 3, 6, 9, 12 или 24 месяцев (или дольше)).

Антиоксиданты и стабилизаторы

[0071] Композиции GCB/IFG и GCB/IFGT, описанные в настоящем документе, могут дополнительно содержать антиоксидант. Одним подходящим антиоксидантом является цистеин. Цистеин может присутствовать в количестве от 0,030% до 0,100%, от 0,050% до 0,080%, от 0,040% до 0,070%, от 0,030% до 0,060%, от 0,060% до 0,090%, от 0,070% до 0,100%, от 0,065% до 0,080%, 0,060% до 0,075%, от 0,055% до 0,070%, от 0,050% до 0,065%, от 0,070% до 0,085%, от 0,075% до 0,090%, примерно 0,065%, примерно 0,070%, примерно 0,075%, примерно 0,080%, 0,065%, 0,070%, 0,075% или 0,080%. Не желая быть связанными теорией, цистеин может дополнительно стабилизировать GCB.

[0072] Композиции GCB/IFG и GCB/IFGT, описанные в настоящем документе, могут дополнительно содержать углевод, такой как сахароза или трегалоза. Углеводы, например сахароза или трегалоза, могут присутствовать в количестве от 12% до 19%, от 13% до 18%, от 14% до 17%, от 12% до 15%, от 13% до 16%, от 15% до 17%, примерно 16% или 16%. Не желая быть связанными какой-либо теорией, сахароза или трегалоза могут дополнительно стабилизировать GCB, уменьшая доступность тиольных (-SH) групп.

[0073] Композиции GCB/IFG и GCB/IFGT в настоящем документе могут дополнительно содержать детергент. Детергент может представлять собой полисорбат 20 (который особенно подходит для практического применения изобретения) или любое количество соединений на основе полоксамера.

[0074] В некоторых вариантах стабильность GCB является по меньшей мере на 5-80% больше (например, по меньшей мере примерно на 5%, по меньшей мере примерно на 10%, по меньшей мере примерно на 15%, по меньшей мере примерно на 20%, по меньшей мере примерно на 25%, по меньшей мере примерно на 30%, по меньшей мере примерно на 35%, по меньшей мере примерно на 40%, по меньшей мере примерно на 45%, по меньшей мере примерно на 50%, по меньшей мере примерно на 55%, по меньшей мере примерно на 60%, по меньшей мере примерно на 65%, по меньшей мере примерно на 70%, по меньшей мере примерно на 75% или по меньшей мере примерно на 80% больше) в предварительно выбранных условиях, чем стабильность GCB в композиции, которая отличается отсутствием углевода (сахарозы или трегалозы), антиоксиданта или как углевода, так и

антиоксиданта.

[0075] Композиции GCB/IFG и GCB/IFGT могут быть продукты от кислорода перед хранением в контейнере. Кроме того, контейнер в идеале является газонепроницаемым, чтобы предотвратить проникновение кислорода. GCB в композициях, описанных в настоящем документе, например, в жидких композициях, содержащих GCB, может обладать пролонгированной стабильностью. Например, в предварительно выбранных условиях, например, при хранении в газонепроницаемом контейнере, при температуре 2-8°C в течение периода времени до 3, 6, 9, 12 или 24 месяцев (или в некоторых вариантах осуществления дольше), GCB в композиции сохранит по меньшей мере на 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 99 или 100% стабильность, которую она имела до хранения.

[0076] Пригодную концентрацию белка можно проверить путем предоставления композиции, содержащей 0,075% цистеина, 16% сахарозы, доведения pH до 5,7, доведения GCB до потенциально пригодной концентрации, и продувки композиции от O₂. Стабильность GCB в композиции GCB/IFG, например, GCB/IFGT, в потенциально пригодной концентрации, измеренная, например, в виде процентной агрегации или деградации, в предварительно определенное время, сравнивается с одним или несколькими стандартами. Стабильность GCB в каждой концентрации сравнивают. Пригодность может быть продемонстрирована потенциально пригодной концентрацией, имеющей сравнимые или лучшие воздействия на стабильность, чем концентрация, описанная в настоящем документе.

[0077] Стабильность GCB может быть измерена любым из способов, описанных в настоящей заявке, например, путем измерения агрегации или деградации белка. Агрегация белка может быть определена, например, с помощью эксклюзионной хроматографии по размеру, неденатурирующего ПААГ-электрофореза или других способов определения размера и т.д. Деградация белка может быть определена, например, с помощью обращенно-фазовой ВЭЖХ, неденатурирующего ПААГ-электрофореза, ионообменной хроматографии, эксклюзионной хроматографии (SEC), эксклюзионной ВЭЖХ, пептидного картирования или подобных способов.

Поверхностно-активное вещество

[0078] Композиции GCB/IFG и GCB/IFGT, описанные в настоящем документе, могут дополнительно содержать одно или несколько поверхностно-активных веществ. Не желая быть связанными какой-либо теорией, поверхностно-активные вещества могут повышать стабильность белка, например, путем обеспечения границы раздела воздух/жидкость, которая может уменьшить деградацию белка при встряхивании или во время транспортировки. Может быть выбрано поверхностно-активное вещество, которое повышает стабильность белка, например, не вызывая деградации белка, в конкретной жидкой композиции. Типичным поверхностно-активным веществом является полоксамер 188 или Плуроник F68. Поверхностно-активное вещество может присутствовать в количестве от примерно 0,005% до примерно 5%, например, от примерно 0,01% до примерно 1%, например, от примерно 0,025% до примерно 0,5%, например, от примерно

0,03% до примерно 0,25%, например, от примерно 0,04 до примерно 0,1%, например, от примерно 0,05% до примерно 0,075%, например, 0,05%. Идеальным поверхностно-активным веществом является тот, который не модифицируется и не расщепляется GCB.

[0079] Например, потенциально пригодное поверхностно-активное вещество может быть проверено путем предоставления композиции, содержащей 2 мг/мл GCB, количества IFG, 0,075% цистеина, 16% сахарозы, затем доведения pH до 5,7, затем добавления потенциально пригодного поверхностно-активного вещества, и продувки композиции от O₂. Стабильность композиции GCB/IFG, содержащей потенциально пригодное поверхностно-активное вещество, измеряют, например, в виде процентной агрегации или деградации в заранее определенное время по сравнению с одним или несколькими стандартами. Например, подходящим стандартом может быть композиция, аналогичная условиям испытания, за исключением того, что поверхностно-активное вещество не добавляется в композицию. Стабильность обработанных (содержащих поверхностно-активное вещество) и необработанных (без поверхностно-активного вещества) композиций можно сравнивать в условиях, имитирующих сценарии "реального мира", например, хранение и доставка. Стандарт может представлять собой композицию, подобную тестируемой композиции, за исключением того, что вместо полоксамера 188 используется другое поверхностно-активное вещество. Полоксамер 188 будет тогда стандартом для сравнения. Пригодность может быть продемонстрирована потенциально пригодным поверхностно-активным веществом, имеющим сравнимое или лучшее влияние на стабильность, чем поверхностно-активное вещество, описанное в настоящем документе. Если определено, что потенциально пригодное поверхностно-активное вещество является пригодным (например, оно увеличивает стабильность композиции по сравнению с одним из стандартов), концентрация потенциально пригодного поверхностно-активного вещества может быть уточнена. Например, концентрацию можно увеличивать или уменьшать в диапазоне значений и сравнивать со стандартом и с другими тестируемыми концентрациями, чтобы определить, какая концентрация вызывает наибольшее увеличение стабильности.

[0080] Альтернативно, комбинация двух или более поверхностно-активных веществ используется в композициях, описанных в настоящем документе. Пригодность комбинации можно проверить, как описано выше, сравнивая стабильность композиции GCB/IFG с тестируемой комбинацией поверхностно-активных веществ со стабильностью композиции GCB/IFG с полоксамером 188,

[0081] Стабильность белка можно измерить, например, путем измерения агрегации или деградации белка. Агрегация белка может быть определена, например, с помощью эксклюзионной хроматографии по размеру, неденатурирующего ПААГ-электрофореза или других способов определения размера и т.д. Деградация белка может быть определена, например, с помощью обращенно-фазовой ВЭЖХ, неденатурирующего ПААГ-электрофореза, ионообменной хроматографии, пептидного картирования или подобных способов.

Фармацевтически приемлемая соль

[0082] Фармацевтическая композиция может дополнительно содержать соль или фармацевтически приемлемую соль.

[0083] Подходящие фармацевтически приемлемые кислотно-аддитивные соли могут быть получены из неорганической кислоты или из органической кислоты. Примеры неорганических кислот включают хлористоводородную, бромистоводородную, иодистоводородную, азотную, угольную, серную и фосфорную кислоты. Подходящие органические кислоты могут быть выбраны из алифатических, циклоалифатических, ароматических, арилифатических, гетероциклических, карбоновых и сульфоновых классов органических кислот, примеры которых включают муравьиную, уксусную, пропионовую, янтарную, гликолевую, глюконовую, молочную, яблочную, винную, лимонную, аскорбиновую, глюкуроновую, малеиновую, фумаровую, пировиноградную, аспарагиновую, глутаминовую, бензойную, антралиловую, 4-гидроксibenзойную, фенилуксусную, миндальную, эмбоновую (памовую), метансульфоновую, этансульфоновую, бензолсульфоновую, пантотеновую, трифторметансульфоновую, 2-гидроксиэтансульфоновую, п-толуолсульфоновую, сульфаниловую, циклогексиламиносульфоновую, стеариновую, альгиновую, бета-гидроксимасляную, салициловую, галактаровую, щавелевую, малоновую и галактуроновую кислоты. Примеры фармацевтически неприемлемых кислотно-аддитивных солей включают, например, перхлораты и тетрафторбораты. Все эти кислотно-аддитивные соли могут быть получены из изофагомина или GCB путем взаимодействия, например, подходящей кислоты с соединением.

[0084] Подходящие фармацевтически приемлемые основно-аддитивные соли изофагомина включают, например, соли металлов, включая соли щелочных металлов, щелочноземельных металлов и переходных металлов, такие как, например, соли кальция, магния, калия, натрия и цинка. Фармацевтически приемлемые основно-аддитивные соли также включают органические соли, полученные из основных аминов, таких как, например, N,N'-дибензилэтилендиамин, хлорпрокаин, холин, диэтаноламин, этилендиамин, меглюмин (N-метилглюкамин) и прокаин. Примеры фармацевтически неприемлемых основно-аддитивных солей включают соли лития и соли цианата. Все эти основно-аддитивные соли могут быть получены из изофагомина путем взаимодействия, например, подходящего основания с соединением.

Фармацевтические носители

[0085] Фармацевтические композиции, содержащие GCB, могут содержать один или несколько фармацевтически приемлемых носителей. В контексте настоящего документа термин "фармацевтически приемлемый носитель" предназначен для включения любых растворителей, эксципиентов, дисперсионных сред, покрытий, антибактериальных и противогрибковых агентов, изотонических и задерживающих адсорбцию агентов и тому подобного, совместимых с фармацевтическим введением. Технология получения лекарственного средства представляет собой хорошо известный процесс и дополнительно

описана, например, в Gennaro (ред.), Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20-е изд., Lippincott, Williams & Wilkins (2000) (ISBN: 0683306472); Ansel с соавт., Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, 7-е изд., Lippincott Williams & Wilkins Publishers (1999) (ISBN: 0683305727); и Kibbe (ред.), Handbook of Pharmaceutical Excipients American Pharmaceutical Association, 3-е изд. (2000) (ISBN:091733096X). За исключением случаев, когда какая-либо обычная среда или агент несовместимы с активным соединением, такая среда может быть использована в композициях по изобретению. Дополнительные активные соединения также могут быть включены в композиции.

[0086] Фармацевтические композиции, описанные в настоящем документе, могут дополнительно содержать носители, которые защищают соединение от быстрого выведения из организма, такие как состав с контролируемым высвобождением, включая имплантаты и микрокапсулированные системы доставки. Могут быть использованы биоразлагаемые биосовместимые полимеры, такие как этиленвинилацетат, полиангидриды, полигликолевая кислота, коллаген, полиортоэфиры и полимолочная кислота. Способы получения таких составов будут очевидны для специалистов в данной области техники. Липосомные суспензии (включая липосомы, нацеленные на инфицированные клетки с моноклональными антителами к вирусным антигенам) также можно использовать в качестве фармацевтически приемлемых носителей. Они могут быть получены в соответствии со способами, известными специалистам в данной области техники, например, как описано в патенте США № 4,522,811.

[0087] Для ВВ введения подходящие носители включают физиологический раствор, бактериостатическую воду, КРЕМОФОР EL™ (BASF, Парсипанни, Нью-Джерси) или фосфатно-солевой буферный раствор (ФСБ). Во всех случаях композиция должна быть стерильной и должна быть жидкой до такой степени, чтобы ее можно было легко вводить через шприц. Композиция должна быть стабильной в условиях производства и хранения и должна быть защищена от загрязняющего действия микроорганизмов, таких как бактерии и грибы. Носитель может представлять собой растворитель или дисперсионную среду, содержащую, например, воду, этанол, полиол (например, глицерин, пропиленгликоль и жидкий полиэтиленгликоль, и тому подобное) и их подходящие смеси. Надлежащая текучесть может поддерживаться, например, путем использования покрытия, такого как лецитин, путем поддержания требуемого размера частиц в случае дисперсии и путем использования поверхностно-активных веществ. Предотвращение действия микроорганизмов может быть достигнуто с помощью различных антибактериальных и противогрибковых агентов, например, парабенов, хлорбутанола, фенола, аскорбиновой кислоты, тимеросала и тому подобного. Во многих случаях будет предпочтительно включать в композицию изотонические агенты, например, сахара, полиспирты, такие как маннит, сорбит, хлорид натрия. Длительная стабильность инъектируемых композиций может быть достигнута включением агента, задерживающего адсорбцию, например, моностеарата алюминия, человеческого сывороточного альбумина

и желатина.

[0088] Стерильные растворы для инъекций могут быть приготовлены путем включения GCB/IFG в подходящий растворитель с одним или комбинацией ингредиентов, перечисленных выше, по мере необходимости, с последующей стерилизацией фильтрацией. Как правило, дисперсии готовят путем включения активного соединения в стерильный носитель, который содержит основную дисперсионную среду и необходимые другие ингредиенты из перечисленных выше. В случае стерильных порошков для образования стерильных растворов для инъекций предпочтительными способами получения композиции являются вакуумная сушка и сублимация, например, лиофилизация, которая дает порошок активного ингредиента плюс любой дополнительный желаемый ингредиент из предварительно стерильно отфильтрованного их раствора.

[0089] Активные соединения (например, композиции GCB, описанные в настоящем документе) могут быть обработаны носителями, которые будут защищать соединение от быстрого выведения из организма, такими как состав с контролируемым высвобождением, включая имплантаты и микрокапсулированные системы доставки. Могут быть использованы биоразлагаемые биосовместимые полимеры, такие как этиленвинилацетат, полиангидриды, полигликолевая кислота, коллаген, полиортоэфир и полимолочная кислота. Способы получения таких составов будут очевидны для специалистов в данной области техники. Материалы также могут быть получены коммерчески от Alza Corporation и Nova Pharmaceuticals, Inc. Липосомные суспензии (включая липосомы, нацеленные на инфицированные клетки с моноклональными антителами к вирусным антигенам) также могут быть использованы в качестве фармацевтически приемлемых носителей. Они могут быть получены в соответствии со способами, известными специалистам в данной области техники, например, как описано в патенте США № 4,522,811.

Упаковка и доставка

[0090] Композиции GCB/IFG и GCB/IFGT, описанные в настоящем документе, могут быть введены с помощью различных медицинских устройств. Например, описанная в настоящем документе композиция может быть введена с помощью безыгольного устройства для подкожных инъекций, такого как устройства, раскрытые в патентах США №№ 5,399,163, 5,383,851, 5,312,335, 5,064,413, 4,941,880, 4,790,824 или 4,596,556. Примеры хорошо известных имплантатов и модулей, используемых в изобретении, включают: патент США № 4,487,603, в котором раскрыт имплантируемый микроинфузионный насос для дозирования лекарственного средства с контролируемой скоростью; патент США № 4,486,194, в котором раскрыто терапевтическое устройство для введения лекарственных средств через кожу; патент США № 4,447,233, в котором раскрыт насос для инфузии лекарственного средства для доставки лекарственного средства с точной скоростью инфузии; патент США № 4,447,224, в котором раскрыт имплантируемый инфузионный прибор с регулируемым потоком для непрерывной

доставки лекарственного средства; патент США № 4,439,196, в котором раскрыта осмотическая система доставки лекарственного средства, имеющая многокамерные отделения; и патент США № 4,475,196, в котором раскрыта осмотическая система доставки лекарственного средства. Конечно, также известны многие другие такие имплантаты, системы доставки и модули.

[0091] Описанные в настоящем документе композиции GCB/IFG и GCB/IFGT могут быть упакованы в двухкамерный шприц. Например, композиции GCB/IFG и GCB/IFGT в лиофилизированной форме могут быть помещены в первую камеру шприца, а жидкость может присутствовать во второй камере шприца (см., например, опубликованную заявку США № 2004-0249339).

[0092] Описанные в настоящем документе композиции GCB/IFG и GCB/IFGT могут быть упакованы в безыгольный шприц (см., например, патенты США №№ 6,406,455 и 6,939,324). Вкратце, в качестве одного примера, инъекционное устройство включает в себя: газовую камеру, содержащую газ или источник газа; отверстие, которое может обеспечить выпуск газа из газовой камеры: плунжер, который при выпуске газа из газовой камеры может привести в движение по меньшей мере первый поршень; первый поршень; второй поршень; первую камеру, например, камеру для хранения и смешивания лекарственных средств; корпус поршня, в котором расположены первый поршень, второй поршень и первая камера; перемещающий элемент, который, независимо от движущей силы газа из газовой камеры, может вызывать движение одного или обоих из первого и второго поршней (перемещающий элемент может представлять собой плунжер или отдельный элемент); выходное отверстие, подходящее для безыгольной инъекции, в сообщении первой камерой; при этом первый и второй поршни расположены с возможностью скольжения внутри корпуса поршня, а перемещающий элемент, источник газа и плунжер расположены так, что: в первом положении поршней вторая камера, например, резервуар для жидкости, в корпусе поршня определяется первым поршнем, корпусом поршня и вторым поршнем, перемещающий элемент может перемещать один или оба поршня во второе положение, в котором первый поршень находится в таком положении, что вторая камера, которая может представлять собой резервуар для жидкости, сообщается с первой камерой, которая может представлять собой камеру для хранения и смешивания лекарственных средств, и второй поршень перемещается в направлении первого поршня, тем самым уменьшая объем второй камеры и обеспечивая передачу жидкости из второй камеры в первую камеру, плунжер после выпуска газа из газовой камеры заставляет первый поршень двигаться так, чтобы уменьшить объем первой камеры, обеспечивая выталкивание вещества через выходное отверстие и из камеры, например, к субъекту.

[0093] Безыгольный шприц может включать отдельные модули для первого компонента, например, сухого или жидкого компонента, и второго компонента, например, жидкого компонента. Модули могут быть предоставлены в виде двух отдельных компонентов и собраны, например, субъектом, который будет вводить компонент самому

себе или самой себе, или другим человеком, например, человеком, который предоставляет или оказывает медицинскую помощь. Вместе модули могут образовывать весь корпус или часть корпуса поршня устройств, описанных в настоящем документе. Устройства могут применяться для предоставления любого из первого и второго компонентов, где желательно хранить или предоставлять компоненты отдельно и объединять их перед введением субъекту.

Способы лечения

[0094] Любой из составов GCB/IFG и GCB/IFGT, описанных в настоящем документе, может быть введен пациенту. Композиции GCB/IFG и GCB/IFGT, описанные в настоящем документе, предназначены для применения в способах лечения расстройства, связанного с дисфункцией в пути GCазы, в частности болезни Гоше. Композиции также применяют в производстве лекарственного средства для лечения таких расстройств способами лечения, описанными в настоящем документе.

[0095] Доза может составлять примерно 60 единиц/кг или 60 единиц/кг, вводимых один раз в две недели. Доза может составлять примерно 30 единиц/кг или 30 единиц/кг, вводимых каждую неделю. Альтернативно, доза может составлять от 30 до 80 единиц/кг, вводимых один раз в две недели, от 40 до 70 единиц/кг, вводимых один раз в две недели, от 50 до 80 единиц/кг, вводимых один раз в две недели, от 45 до 65 единиц/кг, вводимых один раз в две недели, от 40 до 60 единиц/кг, вводимых один раз в две недели, от 35 до 55 единиц/кг, вводимых один раз в две недели, от 30 до 50 единиц/кг, вводимых один раз в две недели, от 45 до 65 единиц/кг, вводимых один раз в две недели, от 50 до 70 единиц/кг, вводимых один раз в две недели, от 55 до 75 единиц/кг, вводимых один раз в две недели, от 60 до 80 единиц/кг, вводимых один раз в две недели, от 55 до 65 единиц/кг, вводимых один раз в две недели, от 45 до 55 единиц/кг, вводимых один раз в две недели, от 35 до 45 единиц/кг, вводимых один раз в две недели, или от 65 до 75 единиц/кг, вводимых один раз в две недели. Альтернативно, доза может составлять от 15 до 40 единиц/кг, вводимых каждую неделю, от 20 до 35 единиц/кг, вводимых каждую неделю, от 25 до 40 единиц/кг, вводимых каждую неделю, от 22,5 до 32,5 единиц/кг, вводимых каждую неделю, от 20 до 30 единиц/кг, вводимых каждую неделю, от 17,5 до 22,5 единиц/кг, вводимых каждую неделю, от 15 до 25 единиц/кг, вводимых каждую неделю, от 22,5 до 32,5 единиц/кг, вводимых каждую неделю, от 25 до 35 единиц/кг, вводимых каждую неделю, от 22,5 до 37,5 единиц/кг, вводимых каждую неделю, от 30 до 40 единиц/кг, вводимых каждую неделю, от 27,5 до 32,5 единиц/кг, вводимых каждую неделю, от 22,5 до 27,5 единиц/кг, вводимых каждую неделю, от 17,5 до 22,5 единиц/кг, вводимых каждую неделю, или от 32,5 до 37,5 единиц/кг, вводимых каждую неделю. Как правило, доза составляет 15-60 единиц/кг, вводимых один раз в две недели, в частности 60 единиц/кг, вводимых один раз в две недели. Корректировки дозы могут быть сделаны на индивидуальной основе, исходя из достижения и поддержания терапевтических целей.

[0096] Доза может составлять примерно 1,5 мг/кг или 1,5 мг/кг, вводимых один раз в две недели. Доза может составлять примерно 0,75 мг/кг или 0,75 мг/кг, вводимых

каждую неделю. Альтернативно, доза может составлять от 0,75 до 2,0 мг/кг, вводимых один раз в две недели, от 1,0 до 1,75 мг/кг, вводимых один раз в две недели, от 1,25 до 2,0 мг/кг, вводимых один раз в две недели, от 1,125 до 1,625 мг/кг, вводимых один раз в две недели, от 1,0 до 1,5 мг/кг, вводимых один раз в две недели, от 0,875 до 1,375 мг/кг, вводимых один раз в две недели, от 0,75 до 1,25 мг/кг, вводимых один раз в две недели, от 1,215 до 1,625 мг/кг, вводимых один раз в две недели, от 1,25 до 1,75 мг/кг, вводимых один раз в две недели, от 1,375 до 1,875 мг/кг, вводимых один раз в две недели, от 1,5 до 2,0 мг/кг, вводимых один раз в две недели, от 1,375 до 1,625 мг/кг, вводимых один раз в две недели, от 1,125 до 1,375 мг/кг, вводимых один раз в две недели, от 0,875 до 1,125 мг/кг, вводимых один раз в две недели, или от 1,625 до 1,875 мг/кг, вводимых один раз в две недели. Альтернативно, доза может составлять от 0,375 до 1,0 мг/кг, вводимых каждую неделю, от 0,5 до 0,875 мг/кг, вводимых каждую неделю, от 0,625 до 1,0 мг/кг, вводимых каждую неделю, от 0,5625 до 0,8125 мг/кг, вводимых каждую неделю, от 0,5 до 0,75 мг/кг, вводимых каждую неделю, от 0,4375 до 0,5625 мг/кг, вводимых каждую неделю, от 0,375 до 0,625 мг/кг, вводимых каждую неделю, от 0,5625 до 0,8125 мг/кг, вводимых каждую неделю, от 0,625 до 0,875 мг/кг, вводимых каждую неделю, от 0,5625 до 0,9375 мг/кг, вводимых каждую неделю, от 0,75 до 1,0 мг/кг, вводимых каждую неделю, от 0,6875 до 0,8125 мг/кг, вводимых каждую неделю, от 0,5625 до 0,6875 мг/кг, вводимых каждую неделю, от 0,4375 до 0,5625 мг/кг, вводимых каждую неделю, или от 0,8125 до 0,9375 мг/кг, вводимых каждую неделю. Как правило, доза составляет 15 мг/кг, вводимых один раз в две недели, в частности путем подкожного введения. Корректировки дозы могут быть сделаны на индивидуальной основе, исходя из достижения и поддержания терапевтических целей.

[0097] Любая из композиций GCB/IFG и GCB/IFGT, описанных в настоящем документе, может быть введена пациенту. Доза может составлять примерно от 90 до 180 единиц/кг, вводимых один раз в две недели. Доза может составлять примерно 90 единиц/кг или 90 единиц/кг, вводимых каждую неделю. Альтернативно, доза может составлять от 90 до 150 единиц/кг, вводимых один раз в две недели, от 110 до 160 единиц/кг, вводимых один раз в две недели, от 120 до 180 единиц/кг, вводимых один раз в две недели, от 120 до 150 единиц/кг, вводимых один раз в две недели, от 90 до 120 единиц/кг, вводимых один раз в две недели, от 100 до 130 единиц/кг, вводимых один раз в две недели, от 110 до 140 единиц/кг, вводимых один раз в две недели, от 120 до 150 единиц/кг, вводимых один раз в две недели, от 130 до 160 единиц/кг, вводимых один раз в две недели, от 140 до 170 единиц/кг, вводимых один раз в две недели, или от 150 до 180 единиц/кг, вводимых один раз в две недели. Альтернативно, доза может составлять от 90 до 110 единиц/кг, вводимых один раз в две недели, от 100 до 120 единиц/кг, вводимых один раз в две недели, от 110 до 130 единиц/кг, вводимых один раз в две недели, от 120 до 140 единиц/кг, вводимых один раз в две недели, от 130 до 150 единиц/кг, вводимых один раз в две недели, от 140 до 160 единиц/кг, вводимых один раз в две недели, от 150 до 170 единиц/кг, вводимых один раз в две недели, или от 160 до 180 единиц/кг, вводимых один

раз в две недели.

[0098] Доза может составлять примерно от 2,25 до 4,5 мг/кг, вводимых один раз в две недели. Альтернативно, доза может составлять от 2,25 до 3,75 мг/кг, вводимых один раз в две недели, от 2,75 до 4,0 мг/кг, вводимых один раз в две недели, от 3,0 до 4,5 мг/кг, вводимых один раз в две недели, от 3,0 до 3,75 мг/кг, вводимых один раз в две недели, от 2,25 до 3,0 мг/кг, вводимых один раз в две недели, от 2,5 до 3,25 мг/кг, вводимых один раз в две недели, от 2,75 до 3,5 мг/кг, вводимых один раз в две недели, от 3,0 до 3,75 мг/кг, вводимых один раз в две недели, от 3,25 до 4,0 мг/кг, вводимых один раз в две недели, от 3,5 до 4,25 мг/кг, вводимых один раз в две недели, или от 3,75 до 4,5 мг/кг, вводимых один раз в две недели. Альтернативно, доза может составлять от 2,25 до 2,75 мг/кг, вводимых один раз в две недели, от 2,5 до 3,0 мг/кг, вводимых один раз в две недели, от 2,75 до 3,25 мг/кг, вводимых один раз в две недели, от 3,0 до 3,5 мг/кг, вводимых один раз в две недели, от 3,25 до 3,75 мг/кг, вводимых один раз в две недели, от 3,5 до 4,0 мг/кг, вводимых один раз в две недели, от 3,75 до 4,25 мг/кг, вводимых один раз в две недели, или от 4,0 до 4,5 мг/кг, вводимых один раз в две недели.

[0099] Введение композиций GCB/IFG и GCB/IFGT может быть предпринято для лечения расстройства, связанного с дисфункцией в пути GСазы, такого как лизосомальные болезни накопления. Типичные лизосомные болезни накопления включают болезнь Гоше, болезнь Фабри, болезнь Помпе, мукополисахаридозы и множественную системную атрофию. Композиции, описанные в настоящем документе, являются особенно пригодными для лечения болезни Гоше. Нарушение может представлять собой нейродегенеративное нарушение, например болезнь Паркинсона, болезнь Альцгеймера или деменцию с тельцами Леви. Альтернативно, расстройство может включать дисрегуляцию альфа-синуклеина.

[00100] При лечении расстройства композиции GCB/IFG и GCB/IFGT могут быть введены внутривенно или подкожно. Подкожное введение включает подкожную инъекцию, которая особенно подходит для осуществления изобретения. Различные схемы дозирования могут быть использованы для введения композиций. Например, композиция может быть введена один раз в неделю, один раз каждые две недели или один раз в месяц. Композиция может быть введена, например, каждые три дня, каждые четыре дня, каждые пять дней, каждые шесть дней, каждые восемь дней, каждые девять дней, каждые 10 дней, каждые 11 дней, каждые 12 дней, каждые 13 дней, каждые 15 дней или каждые 16 дней. Частота введения может изменяться на протяжении всего курса лечения из-за различных факторов. Как правило, композиции, описанные в настоящем документе, вводят подкожно путем инъекции либо один, либо два раза в неделю, либо один раз в две недели.

[00101] В тех случаях, когда композиции, описанные в настоящем документе, описаны подкожным введением, следует соблюдать осторожность, чтобы минимизировать дискомфорт пациента во время введения. Следовательно, обычно общий объем, вводимый пациенту за одну инъекцию, не превышает 5 мл. Чаще всего подкожно вводимый объем будет менее 2,5 мл за одну инъекцию. Если для достижения

терапевтически эффективной дозы требуется несколько подкожных инъекций, их можно вводить в разных местах. Альтернативно, интервал лечения может быть уменьшен. Корректировки дозы могут быть сделаны на индивидуальной основе, исходя из достижения и поддержания терапевтических целей.

ПРИМЕРЫ

[00102] Настоящее изобретение также описано и продемонстрировано с помощью следующих примеров. Однако использование этих и других примеров в любом месте описания является только иллюстративным и никоим образом не ограничивает объем и значение изобретения или любого приведенного в качестве примера термина. Аналогично, изобретение не ограничено какими-либо конкретными предпочтительными вариантами осуществления, описанными в настоящем документе. Действительно, многие модификации и вариации изобретения могут быть очевидны для специалистов в данной области техники после прочтения этого описания, и такие вариации могут быть сделаны без отклонения от сущности или объема изобретения. Следовательно, изобретение должно быть ограничено только условиями прилагаемой формулы изобретения вместе с полным объемом эквивалентов, на которые имеют право эти пункты формулы изобретения.

Пример 1: Концентрация GCB

[00103] GCB (5 мл, 10 мг/мл) оттаивали после хранения при -80°C . Затем GCB концентрировали центробежной фильтрацией при 3800 об/мин, 4°C в течение 30 минут. Затем GCB $50\times$ разбавляли, и концентрацию измеряли при $\lambda 280$. Концентрация GCB составляла 100 мг/мл. Затем добавляли 1% полисорбат 20 до конечной концентрации 0,1%. К некоторому раствору добавляли 20 мг изофагомина с отрегулированным pH.

[00104] Выполняли фильтрацию через мембрану 0,22 мкм. Конкретный процесс показан на фигуре 1.

Пример 2: Добавление IFG с неотрегулированным pH дестабилизирует GCB

[00105] ДСН-ПААГ-электрофорез использовали для анализа различных образцов GCB, как показано ниже. Образцы денатурировали при 37°C в течение 15 минут. ДСН-ПААГ-электрофорез проводили в готовом 8-16% Трис-глициновом геле Novex™. В качестве восстановителя использовали 50 мМ дитиотретиол. В некоторые образцы добавляли изофагомин, pH которого не регулировали. Результаты первого дня показаны на фигуре 2A:

Дорожка 1: маркеры молекулярной массы

Дорожка 2: контроль анализа 0,5% (60 нг GCB)

Дорожка 3: контроль анализа 1% (120 нг GCB)

Дорожка 4: стандартный образец 12 мкг GCB, в восстанавливающих условиях

Дорожка 5: 12 мкг GCB (4°C), день 1, в невосстанавливающих условиях

Дорожка 6: 12 мкг GCB (4°C), день 1, в восстанавливающих условиях

Дорожка 7: 12 мкг GCB (4°C), день 1 с 12 мкг изофагомина, в невосстанавливающих условиях

Дорожка 8: 12 мкг GCB (4°C), день 1 с 12 мкг изофагомина, в восстанавливающих условиях

условиях

Дорожка 9: 12 мкг GCB (-80°C), день 1, в невосстанавливающих условиях

Дорожка 10: 12 мкг GCB (-80°C), день 1, в восстанавливающих условиях

Дорожка 11: 12 мкг GCB (-80°C), день 1 с 12 мкг изофагомина, в невосстанавливающих условиях

Дорожка 12: 12 мкг GCB (-80°C), день 1 с 12 мкг изофагомина, в восстанавливающих условиях

[00106] Результаты через две недели показаны на Фигуре 2В:

Дорожка 1: маркеры молекулярной массы

Дорожка 2: контроль анализа 0,5% (60 нг GCB)

Дорожка 3: контроль анализа 3% (120 нг GCB)

Дорожка 4: стандартный образец 12 мкг GCB, в восстанавливающих условиях

Дорожка 5: 12 мкг GCB (4°C), неделя 2, в невосстанавливающих условиях

Дорожка 6: 12 мкг GCB (4°C), неделя 2, в восстанавливающих условиях

Дорожка 7: 12 мкг GCB (4°C), неделя 2 с 12 мкг изофагомина, в невосстанавливающих условиях

Дорожка 8: 12 мкг GCB (4°C), неделя 2 с 12 мкг изофагомина, в восстанавливающих условиях

Дорожка 9: 12 мкг GCB (-80°C), неделя 2, в невосстанавливающих условиях

Дорожка 10: 12 мкг GCB (-80°C), неделя 2, в восстанавливающих условиях

Дорожка 11: 12 мкг GCB (-80°C), неделя 2 с 12 мкг изофагомина, в невосстанавливающих условиях

Дорожка 12: 12 мкг GCB (-80°C), неделя 2 с 12 мкг изофагомина, в восстанавливающих условиях.

[00107] Сама процедура концентрирования может вызывать связанную с цистеином олигомеризацию GCB, как показано слабыми полосами от 150 кДа до 200 кДа на дорожках 4-12, которая может охватывать около 0,5% от общего белка. При добавлении изофагомина к GCB при 4°C наблюдалось заметно больше фрагментов GCB, чем при добавлении изофагомина к GCB при -80°C, как показано несколькими слабыми полосами в зоне размеров менее 50 кДа на дорожках 7 и 8 на фигуре 2А. Появление слабых полос может быть связано с дестабилизацией GCB кислотным изофагомином.

[00108] Добавление изофагомина давало фрагменты GCB при 4°C, но не при -80°C. См. дорожки 5-8 на фигурах 2А и 2В.

Пример 3: Регулирование pH IFGT и последующая лиофилизация

[00109] Когда IFGT растворяется в воде, образуется кислый раствор. В частности, когда 103 мг тартрата изофагомина растворяли в 5 мл воды, pH раствора составлял 3,25. pH доводили до 6,0, добавляя к раствору 15 мкМ 10 М гидроксида натрия.

[00110] 500 мкл раствора IFGT с отрегулированным pH добавляли в пробирки фирмы Эппендорф объемом 2 мл. Пробирки фирмы Эппендорф, содержащие растворы, замораживали на сухом льду в течение часа, покрывали парафильмом, который протыкали

иглой и лиофилизировали в течение ночи. Пробирки фирмы Эппендорф с лиофилизатами показаны на фигуре 3.

Пример 4: Добавление GCB к IFG отрегулированным pH

[00111] Перед добавлением GCB к IFGT pH, доведенным до 6,0, pH раствора GCB также доводили до 6,0 с помощью цитрата натрия. В частности, 100 мг/мл GCB в 50 мМ цитрате натрия дают раствор с pH 6,0. Когда 100 мМ/мл IFGT (при pH 6,0) добавляли к 100 мг/мл GCB в 50 мМ цитрате натрия, pH составлял 6,0.

Пример 5: Добавление IFG с отрегулированным pH не дестабилизирует GCB

[00112] ДСН-ПААГ-электрофорез использовали для анализа различных образцов GCB, полученных в тот же день (день 0) и после трех дней хранения (день 3), как показано ниже, которые содержат GCB, добавленный к изофагомину с отрегулированным pH. Образцы денатурировали при 37°C в течение 15 минут. ДСН-ПААГ-электрофорез проводили в готовом 8-16% Трис-глициновом геле Novex™. В качестве восстановителя использовали 50 мМ дитиотретиол. В некоторые образцы добавляли изофагомин, pH которого не регулировали.

Дорожка 1: маркеры молекулярной массы

Дорожка 2: контроль анализа 0,5% (60 нг GCB)

Дорожка 3: контроль анализа 1% (120 нг GCB)

Дорожка 4: стандартный образец 12 мкг GCB, в невосстанавливающих условиях

Дорожка 5: 12 мкг GCB из концентрации 100 мг/мл, в невосстанавливающих условиях

Дорожка 6: 12 мкг GCB из концентрации 100 мг/мл, в восстанавливающих условиях

Дорожка 7: 12 мкг GCB из концентрации 100 мг/мл с 12 мкг изофагомина с отрегулированным pH, в невосстанавливающих условиях

Дорожка 8: 12 мкг GCB с концентрацией 100 мг/мл с 12 мкг изофагомина с отрегулированным pH, в восстанавливающих условиях.

[00113] Эксклюзионную ВЭЖХ проводили на образцах в день 3 для подтверждения стабильности. Параметры включали DPBS (фосфатно-солевой буфер Дюльбекко) от Gibco с добавлением 400 мМ хлорида натрия в качестве подвижной фазы, скорость потока 0,8 мл/мин, Serax Zenix-C SEC-150, 3 мкм, 150 Å, 7,8 × 300 мм в качестве колонки эксклюзионной хроматографии (SEC) и температура колонки 25°C.

[00114] Результаты показаны на фигуре 4А для дня 0 и на фигуре 4В для дня 3. Полоса GCB наблюдалась на дорожках 4-8. Никаких более мелких полос, имеющих размеры менее 50 кДа, не наблюдалось ни в день 0, ни в день 3. Доведение pH изофагомта до 6,0, который аналогичен pH для GCB, может минимизировать дестабилизацию GCB.

Пример 6: Анализ влияния IFGT с отрегулированным pH на стабильность GCB

[00115] GCB концентрировали до 100 мг/мл. pH 100 мг/мл тартрата изофагомина

(IFGT) доводили до 6,0. IFGT затем смешивали с GCB. Когда регулирование pH не проводили, GCB/IFGT не была стабильной, и с помощью ДСН-ПААГ-электрофореза наблюдали клиппирование белка.

[00116] Когда производили корректировку pH, GCB в растворе был стабилен в течение по меньшей мере трех дней, как измерено с помощью эксклюзионной хроматографии (SEC). Подвижная фаза представляла собой DPBS (фосфатно-солевой буфер Дюльбекко) от Gibco с добавлением 400 mM хлорида натрия, скорость потока составляла 0,8 мл/мин, колонка эксклюзионной хроматографии (SEC) представляла собой Sepax Zenix-C SEC-150, 3 мкм, 150 Å, 7,8 × 300 мм. Температура колонки составляла 25°C. Четыре образца анализировали с помощью эксклюзионной хроматографии (SEC), как показано на фигуре 5. GCB в буфере DS, стандартный образец GCB с чистотой 98,8% и GCB с чистотой 98,7% использовали в качестве стандартов. GCB с нейтрализованным изофагомином (pH доводили до 6,0), которую хранили в течение трех дней, также была проанализирована на SEC и оказалась стабильной.

Пример 7. Анализ влияния IFG с отрегулированным pH на стабильность GCB с помощью эксклюзионной хроматографии по размеру

[00117] Анализ SEC-разделения проводили по меньшей мере на следующих образцах, перечисленных в таблице 1 ниже:

Таблица 1:

Название образца	Описание
GR (стандартный образец GCB)	GCB, разбавленная до 2,04 мг/мл
G4	4°C образец GCB, разбавленный до 2,01 мг/мл
GI4	4°C образец GCB/IFG, разбавленный до 1,81 мг/мл
G80	-80°C образец GCB, разбавленный до 1,90 мг/мл
GI80	-80°C образец GCB/IFG, разбавленный до 1,81 мг/мл

[00118] Для SEC использовали следующие параметры: в качестве подвижной фазы использовали DPBS (фосфатно-солевой буфер Дюльбекко) от Gibco с добавлением 400 mM хлорида натрия. Скорость потока составляла 0,8 мл/мин. Колонка SEC представляла собой Sepax Zenix-C SEC-150, 3 мкм, 150 Å, 7,8 × 300 мм. Температура колонки составляла 25°C.

[00119] Результаты показаны на фигурах 6А и 6В. Пептидные фрагменты, наблюдаемые с помощью ДСН-ПААГ-электрофореза, появляются в пике, элюирующемся примерно от 10 минут и 30 секунд до 10 минут и 45 секунд. Образец при -80°C как с изофагомином, так и с GCB имеет меньший пик, связанный с пептидными фрагментами, чем образец при 4°C или даже образец GCB при -80°C.

Пример 8: Влияние концентраций GCB и IFG на вязкость

[00120] Получали различные составы (a) GCB и (b) GCB в смеси с изофагомином (GCB/IFG). Составы GCB содержали 10 мг/мл GCB, 25 мг/мл GCB, 50 мг/мл GCB, 75

мг/мл GCB и 100 мг/мл GCB. Составы GCB/IFG содержали 10 мг/мл GCB с 5 мг/мл IFG тартрата, 25 мг/мл GCB с 12,5 мг/мл IFG тартрата, 50 мг/мл GCB с 25 мг/мл IFG тартрата, 75 мг/мл GCB с 37,5 мг/мл IFG тартрата и 100 мг/мл GCB с 50 мг/мл IFG тартрата. Вязкость и скорость сдвига каждого состава измеряли на вискозиметре (m-VROC от RheoSense, Сан-Рамон, Калифорния, США). Для каждого измерения требуются образцы размером примерно 200 мкл. Представлены результаты вязкости с коэффициентом детерминации R-квадрат >0,98. Результаты показаны в следующих таблицах:

Таблица 2:

Образец	Вязкость (сП)	Скорость сдвига (1/с)	Коэффициент детерминации R-квадрат
100 мг/мл GCB	4,952	119,4	0,9973
75 мг/мл GCB	2,455	621,4	0,9998
50 мг/мл GCB	1,722	953,6	0,9999
25 мг/мл GCB	1,312	1192,4	0,9994
10 мг/мл GCB	1,074	1192,4	0,9999

Таблица 3:

Образец	Вязкость (сП)	Скорость сдвига (1/с)	Коэффициент детерминации R-квадрат
100 мг/мл GCB+50 мг/мл IFG тартрата	4,969	579,2	0,9896
75 мг/мл GCB+37,5 мг/мл IFG тартрата	2,911	95,2	0,96
50 мг/мл GCB+25 мг/мл IFG тартрата	1,565	953,6	0,9998
25 мг/мл GCB+12,5 мг/мл IFG тартрата	1,224	477,7	0,999
10 мг/мл GCB+5 мг/мл IFG тартрата	1,064	1192,4	0,9998

[00121] Вязкость коррелирует с концентрацией GCB. Состав с 100 мг/мл GCB и 50 мг/мл IFG тартрата имеет вязкость приблизительно 5 сП, которая поддается подкожной инъекции.

Пример 9: Связывание IFG с GCB при pH 7,4 и pH 5,0, измеренное с помощью Biacore

[00122] Эксперименты проводили для характеристики аффинности и кинетики

связывания GCB и изофагомина при pH 7,4 и 5,0 с помощью поверхностного плазмонного резонанса (SPR). Эти значения pH могут иллюстрировать, как GCB и изофагомин связываются друг с другом в различных средах, таких как компартменты плазмы, цитоплазмы и лизосом, которые имеют различные значения pH.

[00123] Все эксперименты SPR выполняли на Biacore S-200 методом кинетики одного цикла. Для экспериментов при pH 7,4 2 мг/мл GCB разбавляли в ацетатном буфере GE с pH 5,0 до конечной концентрации 100 мкг/мл. Подвижный буфер для иммобилизации представлял собой 10 mM HEPES, 5 mM ЭДТА, 0,01% P-20, pH 7,4. Этот буфер впоследствии использовали непосредственно в анализе связывания.

[00124] Для экспериментов при pH 5,0 2 мг/мл ГЦБ разбавляли в ацетатном GE буфере pH 5,0 до конечной концентрации 100 мкг/мл. Рабочий буфер для иммобилизации представлял собой 20 ммоль фосфата натрия, 2,7 ммоль хлорида калия, 137 ммоль хлорида натрия, 5 ммоль тартрата, 0,01% P-20, pH 5,0. Тартрат добавляли в рабочий буфер, чтобы устранить эффект растворенного вещества, введенный тартратом изофагомина. ГЦБ иммобилизовали на чипе CM5 с использованием обычной процедуры присоединения имина. Целевой уровень иммобилизации 4000 RU.

[00125] Для экспериментов Biacore при pH 7,4, диапазон концентраций составлял 0,39 -100 нмоль. Всего было 9 точек с 2-кратным серийным разведением. Для экспериментов Biacore при pH 5,0, диапазон концентраций составлял 0,39 -100 нмоль. Всего было 9 точек с 2-кратным серийным разведением.

[00126] Условия для анализа связывания были следующими: скорость потока 30 мкл/мин, время ассоциации 120 с, время диссоциации 600 с и 3 моль хлорид магния в качестве реагента для регенерации. Концентрации изофагомина в диапазоне от 0,3 до 100 мкмоль пропускали через иммобилизованную альфа-велаглюцеразу в режиме одного цикла без регенерации поверхности.

[00127] Для каждого из исследований pH 5,0 и pH 7,4, были выполнены два повтора. Полученные данные представлены в следующих таблицах и на ФИГ. 7А-7D. Черные линии представляют собой фактические данные и красные линии представляют подбор модели.

Таблица 4:

Первое исследование при pH 5,0

ka (1/Мс)	kd (1/с)	K _D (моль)	R _{макс} (RU)	t _c	Chi ² (RU ²)	значение U
1,25 x 10 ⁴	0,00314	2,51 x 10 ⁻⁷	26,73	8,51 x 10 ⁵	0,138	1

Таблица 5:

Второе исследование при pH 5,0

ka (1/Мс)	kd (1/с)	K _D (моль)	R _{макс} (RU)	t _c	Chi ² (RU ²)	значение U
9883	0,001954	1,98 x 10 ⁻⁷	24,39	1,70 x 10 ¹⁰	0,339	1

Таблица 6:

Первое исследование при pH 7,4

ka (1/Мс)	kd (1/с)	K _D (моль)	R _{макс} (RU)	tc	Chi ² (RU ²)	значение U
2,42 x 10 ⁵	0,002274	9,40 x 10 ⁻⁹	12,1	1,08 x 10 ⁹	0,105	1

Таблица 7:

Второе исследование при pH 7,4:

ka (1/Мс)	kd (1/с)	K _D (моль)	R _{макс} (RU)	tc	Chi ² (RU ²)	значение U
2,80 x 10 ⁵	0,001785	6,38 x 10 ⁻⁹	10,86	6,90 x 10 ⁹	0,178	2

[00128] K_D связывания ГЦБ/ИФМ при pH 5,0 составляет 198-251 нмоль. K_D связывания ГЦБ/ИФМ при pH 7,4 составляет 6,4-9,4 нмоль.

Пример 10: Повышение изофагомином температуры плавления альфа-велаглюцеразы

[00129] Термостабильность велаглюцеразы отдельно или в комбинации с различными соотношениями изофагомина оценивали с использованием нанодифференциальной сканирующей флуориметрии (нано-ДСФ) (ФИГ. 8). Образцы первоначально получали при указанном молярном соотношении изофагомина при концентрации альфа-велаглюцеразы 40 мг/мл. Перед загрузкой в аппарат нано-ДСФ образцы разбавляли до концентраций альфа-велаглюцеразы 2 мг/мл. Условия образца, перечисленные на ФИГ. 8, следующие:

Контроль: D-тарtrat изофагомина (ИФМТ) отсутствует

Образец 1: 100х молярное соотношение ИФМТ

Образец 2: 30х молярное соотношение ИФМТ

Образец 3: 10х молярное соотношение ИФМТ

Образец 4: 3х молярное соотношение ИФМТ

Образец 5: ИФМТ отсутствует

Образец 7: 100х молярное соотношение гидрохлорида изофагомина

Образец 8: 100х молярное соотношение ацетата изофагомина

[00130] Связывание изофагомина с альфа-велаглюцеразой также определяли с помощью анализа активности фермента ГЦБ. Ферментативные реакции проводили в течение 1 часа при 37 °С. Тарtrat изофагомина предварительно инкубировали с альфа-велаглюцеразой в течение около 10 минут.

[00131] Концентрации анализа для тарtrата изофагомина являются такими, как показано на графиках на ФИГ. 9А-9С. Конечные концентрации для анализа альфа-велаглюцеразы составляли ~1 нмоль при pH 5,0 и ~10 нмоль при pH 7,4. На ФИГ. 9А показана кривая ингибирования активности с синтетическим колориметрическим субстратом pNP-GPS. На ФИГ. 9В показана кривая ингибирования активности с синтетическим флуорометрическим субстратом 4MU-GPS. На ФИГ. 9С показано

ингибирование активности природным гликофинголипидным субстратом C12-GluCer. Реакцию расщепления C12-GluCer оценивали путем измерения продукции глюкозы с помощью набора для анализа глюкозооксидазы.

Пример 11: Исследование стабильности через три недели

[00132] Четыре различных смеси ГЦБ и D-тартрата изофагомина получали, как показано в Таблице 8 ниже.

Таблица 8:

Название смеси	Концентрация ГЦБ (мг/мл)	Концентрация ИФМ D-тартрата (мг/мл)	Молярное соотношение ГЦБ к ИФМТ
Группа 1	15	2,25	1:30
Группа 2	15	0,75	1:10
Группа 3	15	0,225	1:3
Группа 4	15	0,075	1:1

[00133] В начальный момент времени и после хранения в течение трех недель при 40 °C, удельная активность и чистоты, измеренной каждым из ЭХР, офВЭЖХ и ДСН-ЭПАГ были проанализированы. ЭХР может обнаруживать растворимые высокомолекулярные частицы, тогда как офВЭЖХ предоставляет информацию о химической стабильности ГЦБ, такой как устойчивость к окислению. ДСН-ЭПАГ может обнаружить отсечение и агрегацию белка. Для специфической активности, активности эталонного стандарта составляли 16 мкмоль/мин/мг (день 0) и 18 мкмоль/мин/мг (неделя 3). Значительная ежедневная изменчивость наблюдалась при анализе активности на основе флуоресценции. Все образцы стабильности имели немного более высокую активность, чем эталонный стандарт.

[00134] Также был проведен визуальный осмотр. Изображения образцов показаны на ФИГ. 10А. Данные представлены в таблицах ниже. В результатах ДСН-ЭПАГ, показанных на ФИГ. 10В, следующие полосы соответствуют вышеуказанным образцам:

Полоска 1: Маркеры молекулярной массы

Полоска 2: 12 мкг эталонной ГЦБ, не восстановленная

Полоска 3: 12 мкг ГЦБ Группы 1, не восстановленная

Полоска 4: 12 мкг ГЦБ Группы 2, не восстановленная

Полоска 5: 12 мкг ГЦБ Группы 3, не восстановленная

Полоска 6: 12 мкг ГЦБ Группы 4, не восстановленная

Таблица 9:

Название смеси	Специфическая активность (мкмоль/мин/мг) в день 0	Специфическая активность (мкмоль/мин/мг) на 3 неделе
Группа 1, молярное соотношение ГЦБ к	21	28

ИФМ 1:30		
Группа 2, молярное соотношение ГЦБ к ИФМ 1:10	20	22
Группа 3, молярное соотношение ГЦБ к ИФМ 1:3	25	28
Группа 4, молярное соотношение ГЦБ к ИФМ 1:1	22	22

Таблица 10:

Название смеси	Чистота ЭХР (%) в день 0	Чистота ЭХР (%) на 3 неделе
Группа 1, молярное соотношение ГЦБ к ИФМ 1:30	99,6	99,4
Группа 2, молярное соотношение ГЦБ к ИФМ 1:10	99,5	99,3
Группа 3, молярное соотношение ГЦБ к ИФМ 1:3	99,5	99,2
Группа 4, молярное соотношение ГЦБ к ИФМ 1:1	99,5	98,8

Таблица 11:

Название смеси	Чистота офВЭЖХ (%) в день 0	Чистота офВЭЖХ (%) на 3 неделе
Группа 1, молярное соотношение ГЦБ к ИФМ 1:30	97,4	96,8
Группа 2, молярное соотношение ГЦБ к ИФМ 1:10	97,4	98,3
Группа 3, молярное соотношение ГЦБ к ИФМ 1:3	97,4	98,1
Группа 4, молярное соотношение ГЦБ к	97,3	98,3

ИФМ 1:1		
---------	--	--

Таблица 12:

Название смеси	ДСН-ЭПАГ чистота (%) в день 0	ДСН-ЭПАГ чистота (%) на 3 неделе
Группа 1, молярное соотношение ГЦБ к ИФМ 1:30	>98	>98
Группа 2, молярное соотношение ГЦБ к ИФМ 1:10	>98	>98
Группа 3, молярное соотношение ГЦБ к ИФМ 1:3	>98	>98
Группа 4, молярное соотношение ГЦБ к ИФМ 1:1	>98	Наблюдаются агрегаты

[00135] Молярное соотношение ГЦБ к ИФМ 1:1 было слишком низким для обеспечения стабильности в течение трех недель при 40 °С. В анализе ДСН-ЭПАГ были видны агрегаты, и через три недели раствор казался мутным. Однако при молярном соотношении ГЦБ к ИФМ 1:3 и выше через три недели чистота составляла по меньшей мере 98% в ДСН-ЭПАГ и растворы казались прозрачными.

Пример 12: Фармакокинетическое исследование внутривенного введения ГЦБ и подкожного введения ГЦБ с ИФМ у яванских макак

[00136] Две группы яванских макак были протестированы на фармакокинетику ГЦБ. В Группе 1, ГЦБ вводили один раз путем внутривенной инъекции. В Группе 2, композицию ГЦБ с ИФМ вводили один раз путем подкожной инъекции. Три образца из печени и селезенки отбирали через каждые 1 час, 2 часа, 8 часов и 24 часа после введения дозы. Дополнительные детали плана исследования приведены в Таблице 13 ниже:

Таблица 13:

Номер группы и происхождение	Испытуемый образец и доза	Концентрация (мг/мл)	Объем дозы (мл/кг)	ROA/TOA
1 (12 мужчин, PNN происхождения)	10 мг/мл ГЦБ	10	1	ВВ инъекция один раз в день 1 (T=0)
2 (12 мужчин,	10 мг/кг ГЦБ и 5 мг/кг	100 (ГЦБ) 50 (изофагомина	0,1	ПК инъекция один раз в день

PNN происхожден ия)	изофагомина тартрата образованы вместе (молярное соотношение ИФМ 100х)	тартрата)		1 (T=0)
---------------------------	---	-----------	--	---------

[00137] Отборы образцов в печени и селезенке проводили через 1, 2, 8 и 24 часа (n=3) после введения дозы.

[00138] Затем был проведен гистологический анализ всех образцов. Фиксированные 10%-ным NBF печень и селезенку обрабатывали для парафиновой блокады. Срезы толщиной 5 микрон получили для ИГХ ГЦБ (первичное антитело ТК36-мыши анти-чГЦБ в соотношении 1:10000) и окрашивании гемотоксилином и эозином.

[00139] На ФИГ. 11 показан отрицательный и положительный контроль для ИГХ ГЦБ окрашивания на тканях обезьян в печени и селезенке. Незначительное окрашивание было видно в отсутствии антитела ИГХ ГЦБ (верхние панели). В присутствии антитела ИГХ ГЦБ, слабое окрашивание фона наблюдалось в необработанной печени (нижняя левая панель). Темное окрашивание наблюдалось в обработанной печени и селезенке в присутствии антитела ИГХ ГЦБ (нижняя средняя и нижняя правые панели). В частности, печень показала положительное окрашивание в клетках Купфера, эндотелия и гепатоците для ГЦБ, и селезенка показала положительное окрашивание эндотелия и макрофагов.

[00140] Биораспределение ГЦБ в печени изучали после доставки ГЦБ путем внутривенной инъекции и ГЦБ с ИФМ путем подкожной инъекции. В печени обезьяны, обработанной путем подкожной инъекции, сильная ГЦБ была замечена в момент времени 8 часов. Сильное окрашивание ГЦБ наблюдали в моменты времени один и два часа в печени обезьяны, получавшей внутривенную инъекцию. Результаты показаны на ФИГ. 12 (2-кратное увеличение) и ФИГ. 13 (20-кратное увеличение).

[00141] Аналогичные результаты наблюдались в селезенке, как показано на ФИГ. 14 (2-кратное увеличение) и ФИГ. 15 (20-кратное увеличение). Эти данные свидетельствуют о том, что подкожное введение ГЦБ с ИФМ может обеспечить сравнимое воздействие ГЦБ на ткани, что и внутривенное введения ГЦБ.

Пример 13: Корреляция активности альфа-велаглюцеразы с уровнем белка в печени и селезенке

[00142] Уровни активности белка и фермента альфа-велаглюцеразы оценивали в гомогенатах печени и селезенки после внутривенного введения дозы у яванских макаков. Ткани отбирали в заранее определенные моменты времени после введения дозы (0,5-24 часа). Результаты показаны на ФИГ. 16А и 16В. В частности, на ФИГ. 16А показаны результаты внутривенного введения альфа-велаглюцеразы только в диапазоне 2-10 мг/кг. На ФИГ. 16В показаны результаты ПК введения альфа-велаглюцеразы в диапазоне 1,5-10 мг/кг, объединенной с соответствующим количеством изофагомина (0,0075-5 мг/кг), так

что молярное соотношение альфа-велаглюцеразы к изофагомину составляет 1:3.

Пример 14: Уровни активности ГЦБ в сыворотке у яванских макак после подкожного введения тартрата изофагомина

[00143] Уровни активности ГЦБ в сыворотке крови анализировали у яванских макак после подкожного (ПК) введения альфа-велаглюцеразы с тартратом изофагомина. Данные показаны на ФИГ. 16С. Эндогенную активность ГЦБ в сыворотке определяли у животных-носителей и животных, получавших предварительную дозу ($n=39$), обработанных ГЦБ, и в диапазоне 4-14 нг/мл или 0,07-0,25 нмоль 4 МЕ/мин/мл. Тартрат изофагомина может увеличивать активность ГЦБ в сыворотке выше верхнего предела нормы при ПК дозе 2,5 мг/кг. Это увеличение активности сыворотки, вероятно, связано с предотвращением процессов разложения нативной ГЦБ, постоянно происходящих в сыворотке. Доза тартрата изофагомина, включенная в Vela-3хИФМТ (0,0225 мг/кг), не будет увеличивать активность эндогенной ГЦБ в сыворотке, основываясь на данных более высокой дозы 0,025 мг/кг.

Пример 15: ИФМ обеспечивает > 25-кратное усиление подкожного воздействия сыворотки альфа-велаглюцеразы

[00144] Альфа-велаглюцераза и ИФМ в молярном соотношении 1:3, вводимые подкожно яванским макакам в дозе 4 мг/кг, были способны обеспечить более чем 25-кратное улучшение воздействия сыворотки по сравнению с дозой внутривенного введения альфа-велаглюцеразы 4 мг/кг. Соотношения ИФМ от 3-кратного до 100-кратного молярного избытка по сравнению с альфа-велаглюцеразой способствовали аналогичному увеличению воздействия сыворотки. Увеличение биодоступности в сыворотке, определенное из анализа ECL ELISA, было подтверждено анализом активности ГЦБ (субстрат 4MU-GPS). Результаты показаны на ФИГ. 17А и 17В. Добавление 0,07 мг/кг ИФМТ к 4 мг/кг ГЦБ существенно увеличивало количество ГЦБ в сыворотке (16А), а также общую ферментативную активность ГЦБ (16В). Таким образом, данные демонстрируют, что когда ГЦБ объединена с ИФМ, например, ИФМТ, особенно в молярном соотношении по меньшей мере 1:3 (ГЦБ:ИФМ, например, ГЦБ:ИФМТ), она может обеспечивать биодоступность сыворотки, которая позволяет ПК введение.

Пример 16: Превосходное биораспределение в тканях при подкожном введении VPRIV с ИФМ в молярном соотношении 1:100 по сравнению с внутривенным введением только VPRIV

[00145] Альфа-велаглюцераза и ИФМ в молярном соотношении 1:100, вводимые подкожно яванским макакам в дозе 4 мг/кг, были способны обеспечить поглощение тканью альфа-велаглюцеразы, которое превышала дозу внутривенного введения альфа-велаглюцеразы 10 мг/кг. Стандарт лечения ВВ-инфузионной дозировкой VPRIV составляет 1,5 мг/кг. В некоторых вариантах реализации может быть использована целевая подкожная доза около 1,5 мг/кг. Около 250 мг ткани гомогенизировали в 1 мл буфера для лизиса NEPES/Triton X-100. Содержание альфа-велаглюцеразы в тканях измеряли с помощью анализа ECL ELISA и нормализовали до общего содержания белка,

как определено с помощью анализа БХА. Результаты показаны на ФИГ. 18А и 18В. Профиль воздействия ГЦБ, присутствующей в печени (18А) и селезенке (18В) после подкожного введения молярного соотношения ГЦБ: ИФМ 1:100, был выше, чем при внутривенном введении ГЦБ в течение 5 дней (120 часов).

Пример 17: Сравнение биораспределения в тканях при подкожном введении VPRIV с ИФМ в молярном соотношении 1:3 с внутривенным введением только VPRIV

[00146] Альфа-велаглюцераза и ИФМ в молярном соотношении 1:3, вводимые подкожно яванским макакам при целевой клинической дозе 1,5 мг/кг, были способны обеспечить поглощение тканью альфа-велаглюцеразы, сравнимое с таковым для дозы 2 мг/кг при внутривенном введении альфа-велаглюцеразы. Стандарт лечения ВВ-инфузионной дозировкой VPRIV составляет 1,5 мг/кг. Около 250 мг ткани гомогенизировали в 1 мл буфера для лизиса HEPES/Triton X-100. Содержание альфа-велаглюцеразы в тканях измеряли с помощью анализа ECL ELISA и нормализовали до общего содержания белка, как определено с помощью анализа БХА. Результаты показаны на ФИГ. 19А и 19В. Количество ГЦБ, присутствующей в печени после подкожного введения молярного соотношения ГЦБ:ИФМ 1:3, сравнимо с таковым при внутривенном введении ГЦБ в моменты времени 8 и 24 часа. Точно так же воздействие ГЦБ на ткани в селезенке после подкожного введения молярного соотношения ГЦБ:ИФМ 1:3 сравнимо с таковым при внутривенном введении ГЦБ в моменты времени 8 и 24 часа.

[00147] Точно так же воздействие ГЦБ на ткани в селезенке после подкожного введения молярного соотношения ГЦБ:ИФМ 1:3 сравнимо с таковым при внутривенном введении ГЦБ в моменты времени 8 и 24 часа. Таким образом, добавление ИФМ, например, ИФМТ, к композиции ГЦБ позволяет подкожное введение композиций, содержащих ГЦБ.

Пример 18: Соотношение изофагомина всего лишь 1:1, обеспечивает такое же воздействие на сыворотку, что и более высокое молярное соотношение изофагомина

[00148] Альфа-велаглюцераза и ИФМ в молярном соотношении 1:1, вводимые подкожно яванским макакам в дозе 1,5 мг/кг, способны обеспечить такое же воздействие ГЦБ в сыворотке, как и более высокие соотношения изофагомина. Для молярных соотношений между 1:1 и 1:100 не наблюдалось явных различий в воздействии ГЦБ на сыворотку. Увеличение биодоступности в сыворотке, определенное из анализа ECL ELISA, подтверждено анализом активности ГЦБ (субстрат 4MU-GPS). Результаты показаны на ФИГ. 20А и 20В.

[00149] Испытуемые образцы для введения получали в виде замороженных композиций, в виварии перед введением. Испытуемые образцы размораживали от около 1 до 3-х часов перед введением. Таким образом, данные показывают, что если обязательства по хранению при комнатной температуре можно обойти путем хранения при низких температурах (например, в замороженном виде), то, когда ГЦБ смешана с ИФМ, например, ИФМТ, особенно в молярном соотношении по меньшей мере 1:1 (ГЦБ:ИФМ,

например, ГЦБ:ИФМТ), она может обеспечить достаточную биодоступность сыворотки, которая позволяет применять подкожное введение.

Пример 19: Изофагомин защищает VPRIV от термической денатурации при 37°C в сыворотке человека

[00150] Тестировали сыворотку, которая содержала 10 нмоль VPRIV (форма ГЦБ), чтобы определить, может ли ИФМ стабилизировать ГЦБ. ИФМ добавляли к VPRIV таким образом, чтобы ИФМ имел следующие концентрации ИФМ в сыворотке: 1 нмоль, 3 нмоль, 10 нмоль, 30 нмоль, 100 нмоль, 300 нмоль и 1000 нмоль. Использовали отрицательный контроль без добавления ИФМ.

[00151] Активность фермента измеряли путем расщепления субстрата 4-метилумбеллиферон b-D-глюкопиранозида. Активность снизилась со 100% до около 40% в течение 60 минут с отрицательным контролем, 1 нмоль ИФМ и 10 нмоль ИФМ. См. ФИГ. 21. Однако добавление концентраций 30 нмоль (3-кратное молярное соотношение) и выше предотвращало большую часть потери активности. ИФМ может быть эффективным для защиты ГЦБ от тепловой денатурации в сыворотке. ИФМ- и ИФМТ-обеспечиваемая защита ГЦБ от термического разложения может повысить биодоступность ГЦБ, повысить устойчивость ГЦБ в сыворотке и обеспечить более длительную продолжительность процессов поглощения ГЦБ клетками и тканями.

* * *

[00152] Настоящее изобретение не должно быть ограничено в объеме конкретными вариантами реализации, описанными в данной заявке. Действительно, различные модификации настоящего изобретения, дополнительно к описанным в данной заявке, станут очевидны специалистам в данной области из предшествующего описания и сопроводительных фигур. Предполагают, что такие модификации входят в объем прилагаемой формулы изобретения. Далее следует понимать, что все значения являются приблизительными и предназначены для описания.

[00153] Все публикации, патентные заявки, патенты и другие ссылки, упомянутые в данном документе, включены посредством ссылки во всей их полноте. В случае возникновения противоречий, настоящая заявка, включая определения, имеет преимущественную силу. Кроме того, материалы, способы и примеры приведены только для иллюстрации и не предназначены для ограничения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Композиция, содержащая глюкоцереброзидазу (ГЦБ) и изофагомин (ИФМ) в молярном соотношении по меньшей мере около 1:2,5.
2. Композиция по п. 1, отличающаяся тем, что ГЦБ представляет собой альфа-велаглюцеразу.
3. Композиция по п. 1 или 2, отличающаяся тем, что рН композиции составляет около 6,0, около 6,5 или около 7,0.
4. Композиция по любому из пп. 1-3, отличающаяся тем, что молярное соотношение ГЦБ к ИФМ составляет от около 1:2,5 до около 1:30.
5. Композиция по любому из пп. 1-3, отличающаяся тем, что молярное соотношение ГЦБ к ИФМ составляет от около 1:2,5 до около 1:10.
6. Композиция по любому из пп. 1-3, отличающаяся тем, что молярное соотношение ГЦБ к ИФМ составляет от около 1:10 до около 1:30.
7. Композиция по любому из пп. 1-3, отличающаяся тем, что молярное соотношение ГЦБ к ИФМ составляет от около 1:2,5 до около 1:3,5.
8. Композиция по любому из пп. 1-3, отличающаяся тем, что молярное соотношение ГЦБ к ИФМ составляет около 1:3,0.
9. Композиция по любому из пп. 1-3, отличающаяся тем, что молярное соотношение ГЦБ к ИФМ составляет 1:3,0.
10. Композиция по любому из пп. 1-9, отличающаяся тем, что температура композиции составляет по меньшей мере 20°C.
11. Композиция по любому из пп. 1-9, отличающаяся тем, что температура композиции составляет от 0°C до 20°C.
12. Композиция по любому из пп. 1-9, отличающаяся тем, что температура композиции составляет менее 0 °C.
13. Композиция по любому из пп. 8-12, отличающаяся тем, что композиция представляет собой водный раствор.
14. Композиция по любому из пп. 1-9 и 12, отличающаяся тем, что композиция представляет собой лиофилизат.
15. Композиция по любому из пп. 1-14, дополнительно содержащая фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество, фармацевтически приемлемую соль или как фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество, так и фармацевтически приемлемую соль.
16. Композиция по любому из пп. 1-15, отличающаяся тем, что ИФМ представляет собой тартрат изофагомина.
17. Композиция по п. 16, отличающаяся тем, что ИФМ представляет собой D-тартрат изофагомина.
18. Композиция по любому из пп. 1-13 и 15-17, отличающаяся тем, что композиция представляет собой жидкость.
19. Композиция по любому из пп. 1-18, дополнительно содержащая антиоксидант.

20. Композиция по любому из пп. 1-19, дополнительно содержащая углевод.
21. Композиция по любому из пп. 1-20, дополнительно содержащая поверхностно-активное вещество.
22. Композиция по любому из пп. 1-21, отличающаяся тем, что композиция содержит 45-120 мг/мл ГЦБ и от 0,2 до 1,8 мг/мл изофагомина.
23. Композиция по п. 22, отличающаяся тем, что композиция содержит 60 мг/мл ГЦБ и 0,9 мг/мл изофагомина.
24. Композиция по п. 22 или п. 23, отличающаяся тем, что композиция дополнительно содержит 50 ммоль цитрата натрия или фосфата натрия и 0,01% полисорбат-20.
25. Композиция по п. 24, отличающаяся тем, что композиция содержит 5-20 ммоль цитрата натрия и 0,01% полисорбат-20.
26. Композиция по п. 25, отличающаяся тем, что композиция содержит 10 ммоль цитрата натрия и 0,01% полисорбата-20.
27. Композиция по п. 24, отличающаяся тем, что композиция содержит 5-20 ммоль фосфата натрия и 0,01% полисорбата-20.
28. Композиция по п. 27, отличающаяся тем, что композиция содержит 10 ммоль фосфата натрия и 0,01% полисорбата-20.
29. Композиция по любому из пп. 22-28, отличающаяся тем, что рН композиции составляет около 6,0.
30. Композиция по любому из пп. 22-28, отличающаяся тем, что рН композиции составляет 6,0.
31. Контейнер, содержащий композицию по любому из пп. 1-30.
32. Контейнер по п. 31, отличающийся тем, что контейнер выбран из группы, состоящей из предварительно заполненного шприца, флакона или ампулы.
33. Способ получения композиции по любому из пп. 1-30, включающий растворение ИФМ в воде, доведение рН до около 6,0 и добавление ГЦБ с получением композиции.
34. Способ по п. 33, дополнительно включающий лиофилизацию ИФМ перед добавлением ГЦБ.
35. Способ по п. 33 или п. 34, дополнительно включающий добавление 0,01% полисорбата 20.
36. Способ по любому из пп. 33-35, дополнительно включающий фильтрование композиции через мембрану с размером пор 0,22 мкм.
37. Способ по любому из пп. 33-36, отличающийся тем, что ИФМ присутствует в количестве, достаточном для поддержания стабильности ГЦБ в композиции.
38. Способ по любому из пп. 33-36, отличающийся тем, что ИФМ присутствует в количестве, достаточном для поддержания стабильности ГЦБ в композиции в течение по меньшей мере трех дней при 0-50 °С.
39. Способ по любому из пп. 33-36, отличающийся тем, что ИФМ присутствует в

количестве, достаточном для поддержания стабильности ГЦБ в композиции в течение по меньшей мере 6 месяцев при 0-40 °С.

40. Композиция по любому из пп. 1-30, для применения в терапии.

41. Способ лечения расстройства, связанного с дисфункцией пути ГЦазы, включающий введение композиции по любому из пп. 1-11, 13 и 15-30 пациенту, нуждающемуся в этом.

42. Способ по п. 41, отличающийся тем, что способ является эффективным для лечения расстройства.

43. Способ по п. 41 ил п. 42, отличающийся тем, что композицию вводят внутривенно или подкожно.

44. Способ по п. 43, отличающийся тем, что композицию вводят подкожно.

45. Способ по п. 44, отличающийся тем, что подкожное введение осуществляют подкожной инъекцией.

46. Способ по любому из пп. 41-45, отличающийся тем, что композицию вводят дважды в неделю.

47. Способ по любому из пп. 41-45, отличающийся тем, что композицию вводят один раз в неделю.

48. Способ по любому из пп. 41-45, отличающийся тем, что композицию вводят менее чем один раз в неделю.

49. Способ по любому из пп. 41-45, отличающийся тем, что композицию вводят один раз в две недели.

50. Способ по любому из пп. 41-49, отличающийся тем, что указанное расстройство включает дефект в активности ГЦазы.

51. Способ по п. 50, отличающийся тем, что указанный дефект в активности ГЦазы включает сниженную ферментативную активность.

52. Способ по любому из пп. 41-49, отличающийся тем, что указанное расстройство включает дисрегуляцию альфа-синуклеина. 53. Способ по любому из пп. 41-52, отличающийся тем, что указанное расстройство представляет собой лизосомную болезнь накопления.

54. Способ по п. 53, отличающийся тем, что указанная лизосомная болезнь накопления выбрана из болезни Гоше, болезни Фабри, болезни Помпе, мукополисахаридоза и множественной системной атрофии. 55. Способ по любому из пп. 41-54, отличающийся тем, что указанное расстройство представляет собой нейродегенеративное расстройство.

56. Способ по п. 55, отличающийся тем, что нейродегенеративное расстройство выбрано из болезни Паркинсона, болезни Альцгеймера и деменции с тельцами Леви.

57. Способ лечения расстройства, связанного с дисфункцией пути ГЦазы, включающий введение композиции по любому из пп. 1-11, 13 и 15-30 субъекту, нуждающемуся в этом.

58. Способ по п. 57, отличающийся тем, что субъект является человеком.

59. Способ лечения дисфункции пути ГЦазы, включающий введение субъекту композиции, содержащей от 0,5 до 5,0 мг/кг ГЦБ, и ИФМ в по меньшей мере около 3-кратном молярном избытке по отношению к ГЦБ, в котором композицию вводят подкожно.

60. Способ по п. 59, отличающийся тем, что композиция содержит от 0,8 до 4,0 мг/кг ГЦБ.

61. Способ по п. 60, отличающийся тем, что композиция содержит от 1 до 3,0 мг/кг ГЦБ.

62. Способ по п. 60, отличающийся тем, что композиция содержит от 1,2 до 2,0 мг/кг ГЦБ.

63. Способ по п. 60, отличающийся тем, что композиция содержит около 1,5 мг/кг ГЦБ.

64. Способ по п. 60, отличающийся тем, что композиция содержит 1,5 мг/кг ГЦБ.

65. Способ по п. 59, отличающийся тем, что композиция содержит от 2,0 до 5,0 мг/кг ГЦБ.

66. Способ по п. 59, отличающийся тем, что композиция содержит от 2,25 до 4,5 мг/кг ГЦБ.

67. Способ по п. 59, отличающийся тем, что композиция содержит от 2,25 до 3,75 мг/кг ГЦБ.

68. Способ по п. 59, отличающийся тем, что композиция содержит от 3,5 до 5,0 мг/кг ГЦБ.

69. Способ по любому из пп. 60-68, отличающийся тем, что ИФМ находится в от 3 до 10-кратном молярном соотношении к ГЦБ.

70. Способ по любому из пп. 60-68, отличающийся тем, что ИФМ находится в от 10 до 30-кратном молярном соотношении к ГЦБ.

71. Способ по любому из пп. 60-68, отличающийся тем, что ИФМ находится в от 30 до 100-кратном молярном соотношении к ГЦБ.

72. Способ по любому из пп. 60-68, отличающийся тем, что ИФМ находится в 3-кратном молярном соотношении к ГЦБ.

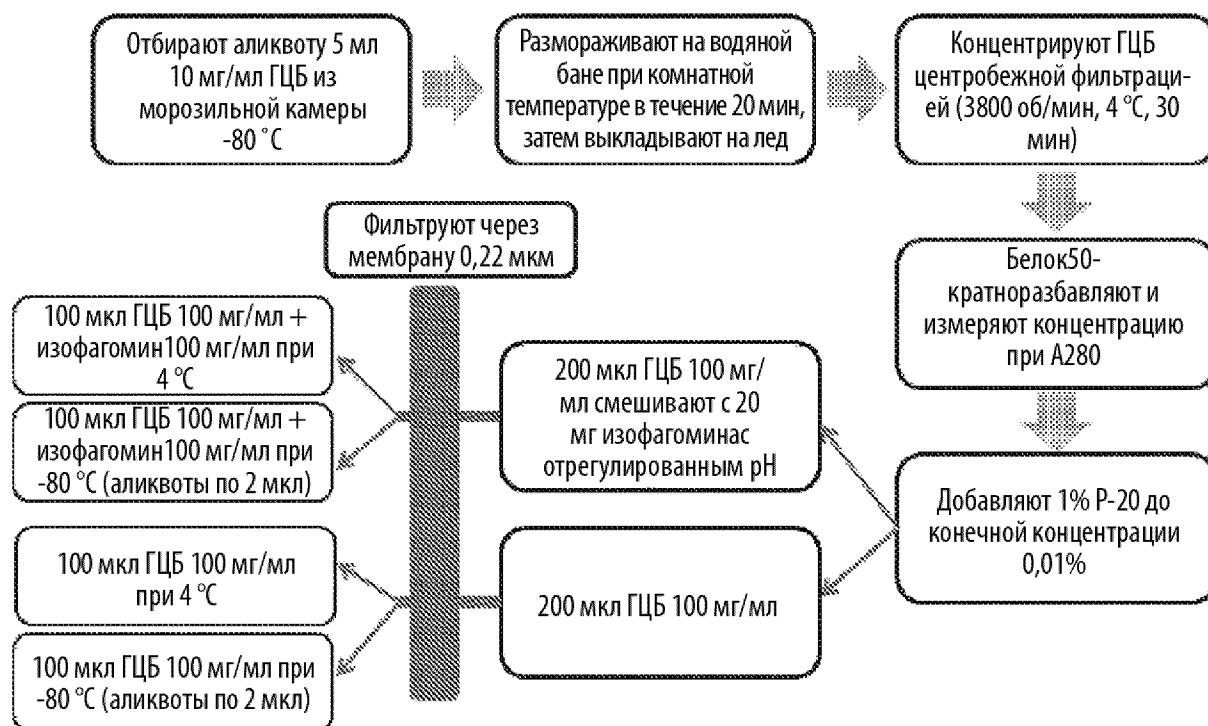
73. Способ по любому из пп. 41-72, отличающийся тем, что воздействие, активность или биодоступность ГЦБ в селезенке увеличивается.

74. Способ по любому из пп. 41-73, отличающийся тем, что воздействие, активность или биодоступность ГЦБ в печени увеличивается.

75. Способ по любому из пп. 41-74, отличающийся тем, что воздействие, активность или биодоступность ГЦБ в сыворотке увеличивается.

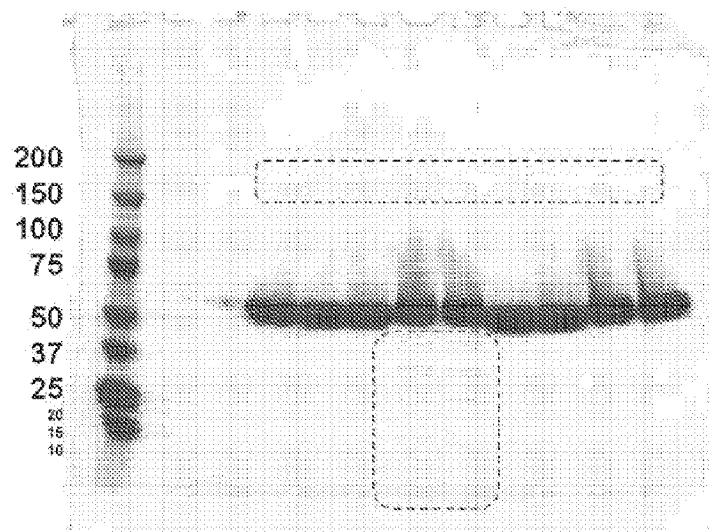
76. Композиция по любому из пп. 1-11, 13 и 15-30 для применения в способе по любому из пп. 41-75.

77. Применение композиции по любому из пп. 1-11, 13 и 15-30 при получении лекарственного средства для способа по любому из пп. 41-76.



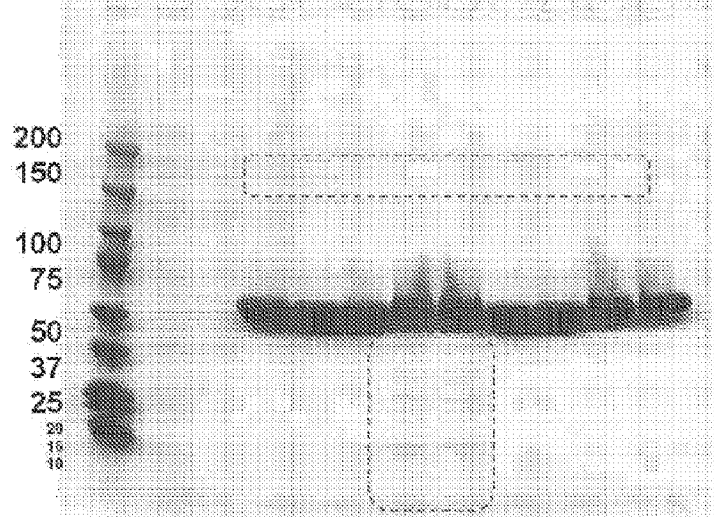
Фиг. 1

(кДа) 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12



Фиг. 2А

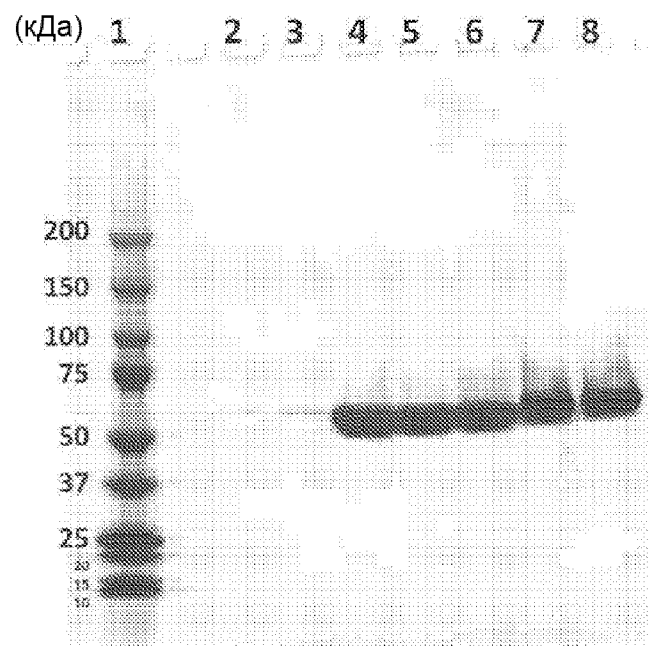
(кДа) 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12



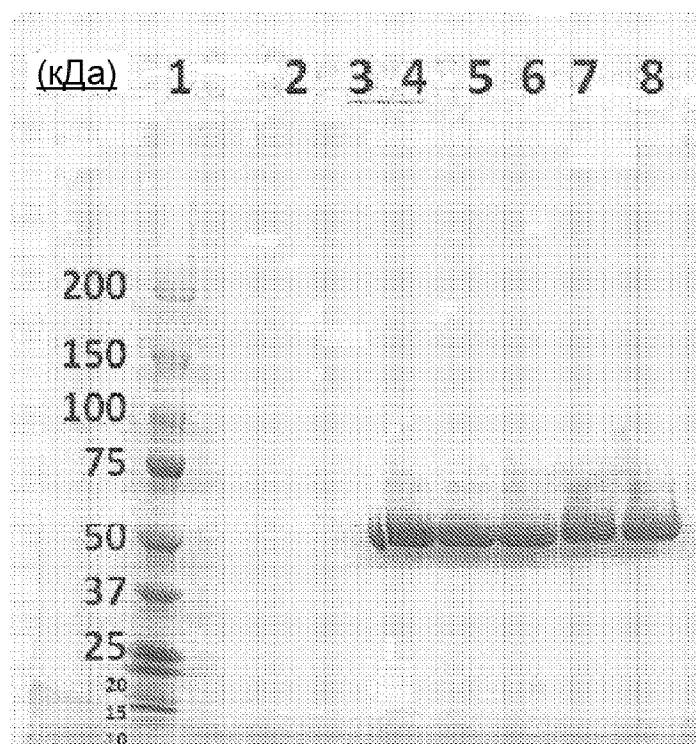
Фиг. 2В



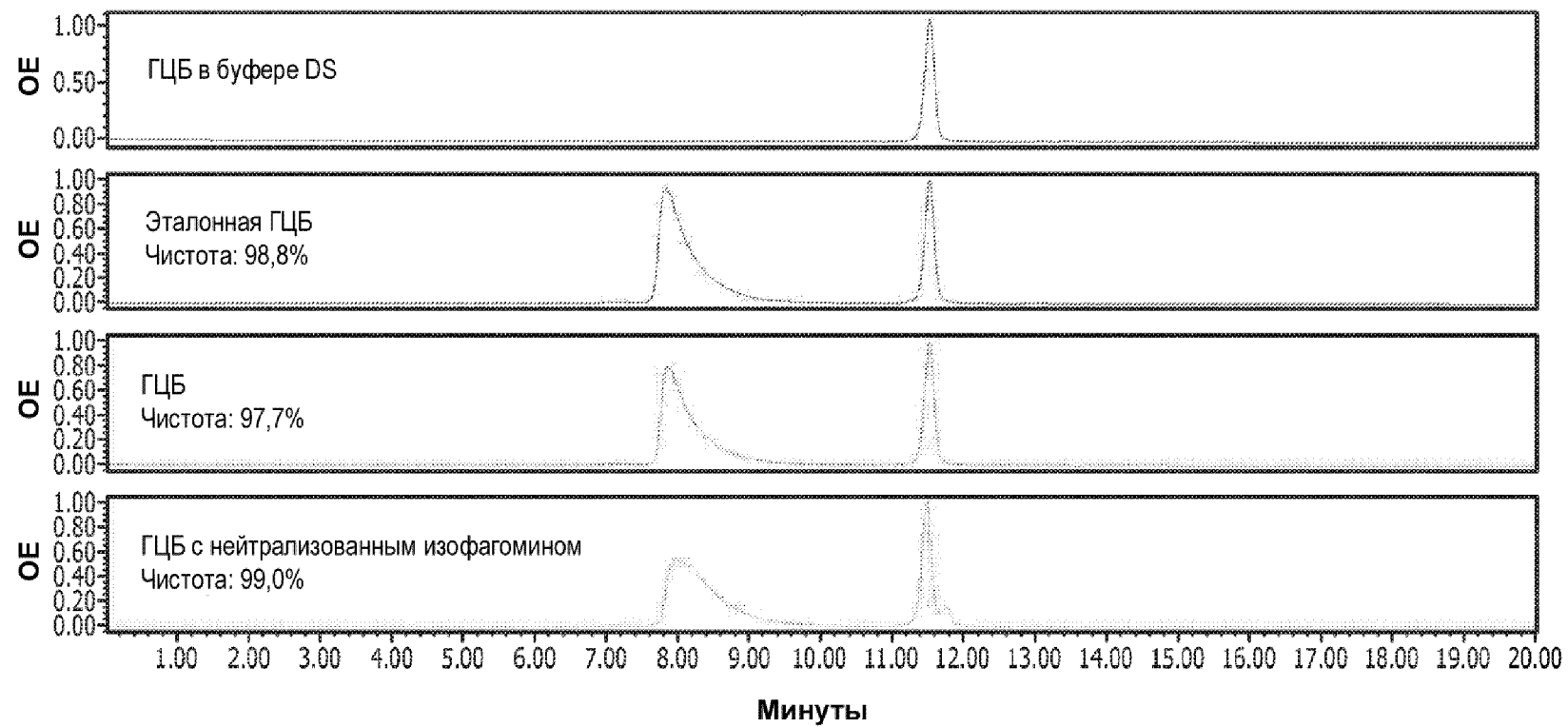
Фиг. 3



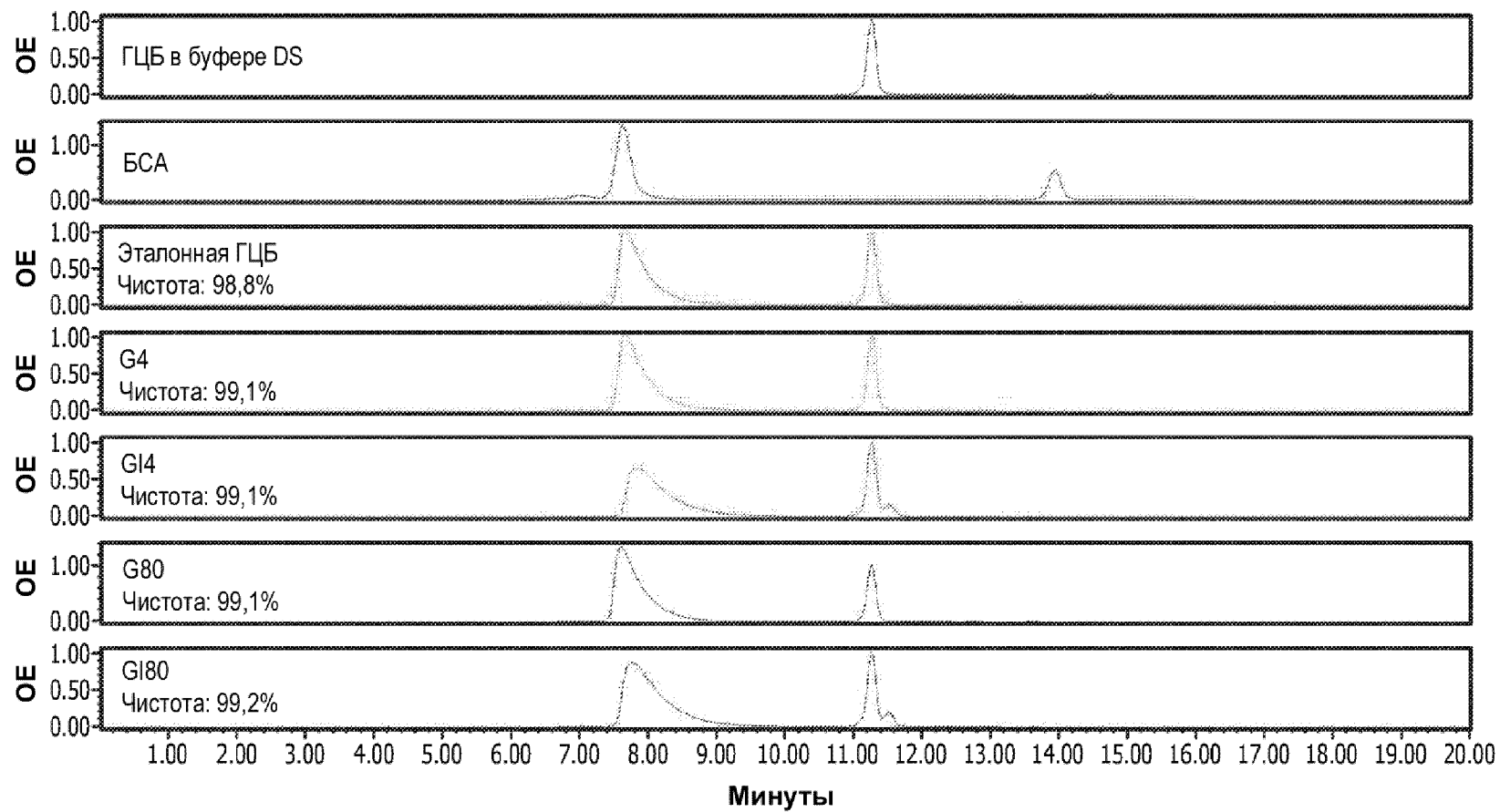
Фиг. 4А



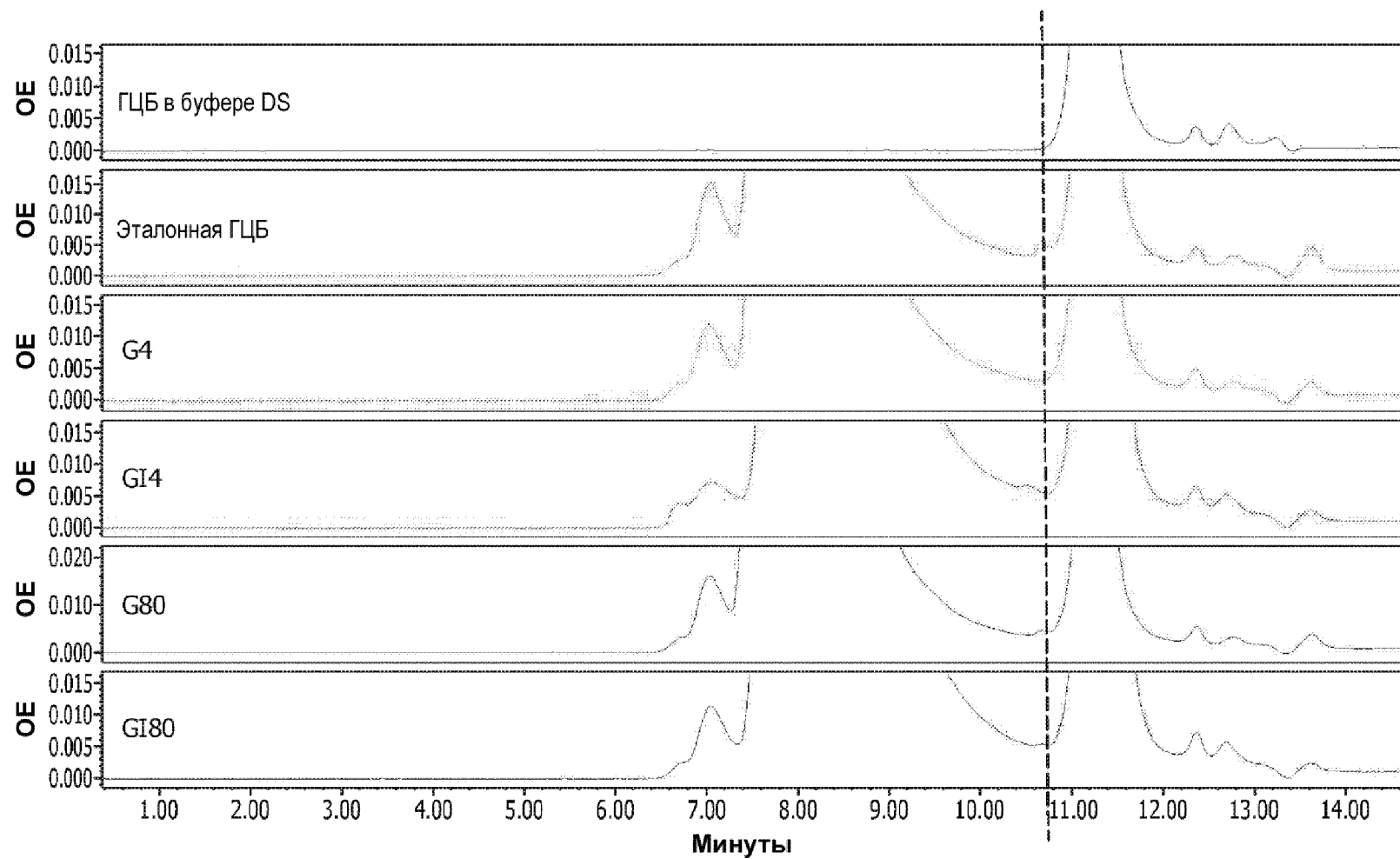
Фиг. 4В



Фиг. 5



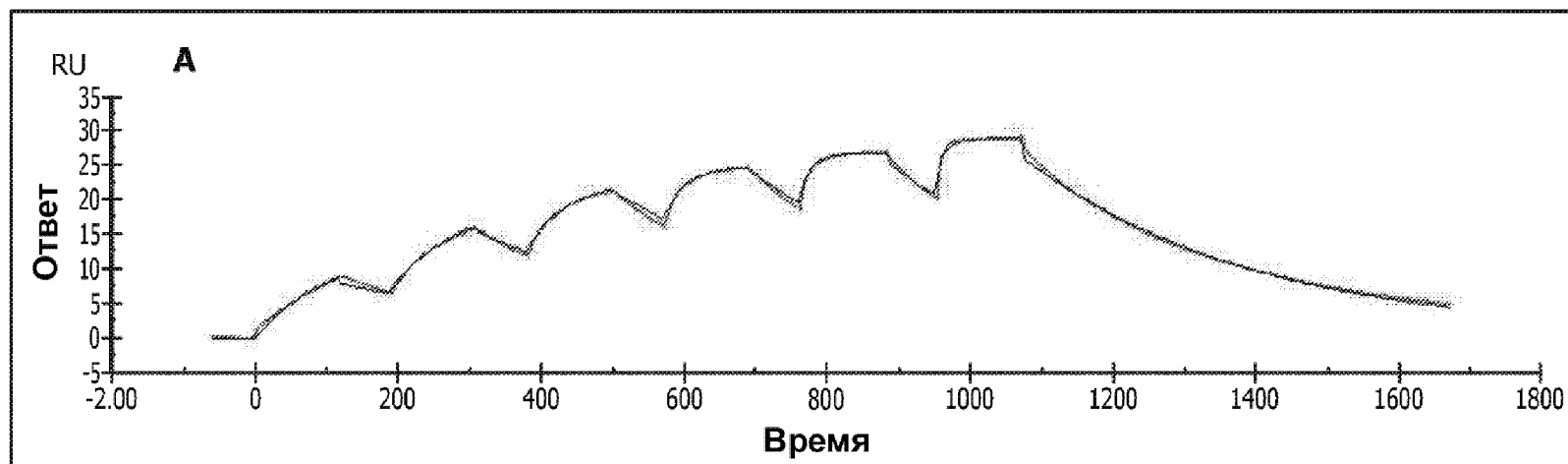
Фиг. 6А



Фиг. 6В

pH 5.0

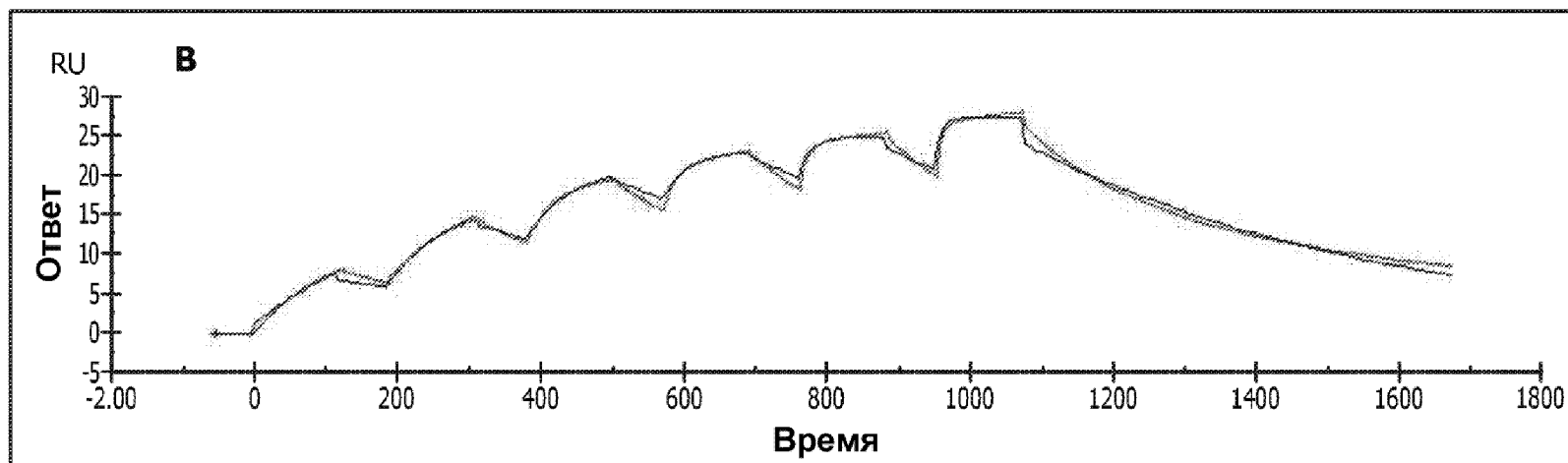
Первое измерение ($K_d = 251$ нмоль)



Фиг. 7А

pH 5.0

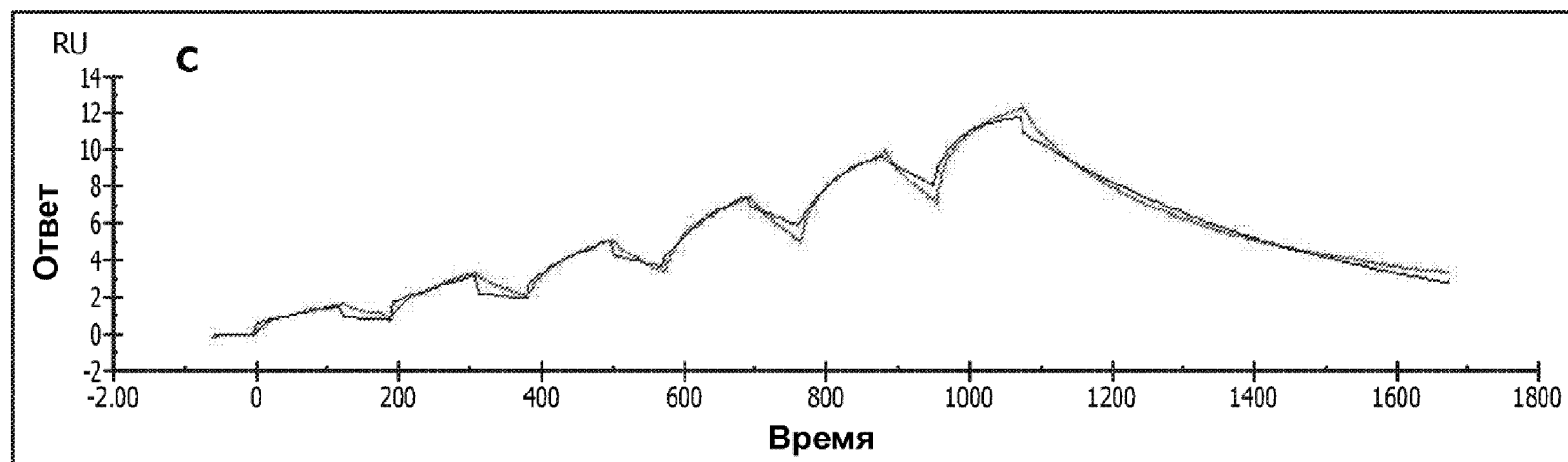
Второе измерение ($K_d = 198$ нмоль)



Фиг. 7В

pH 7.4

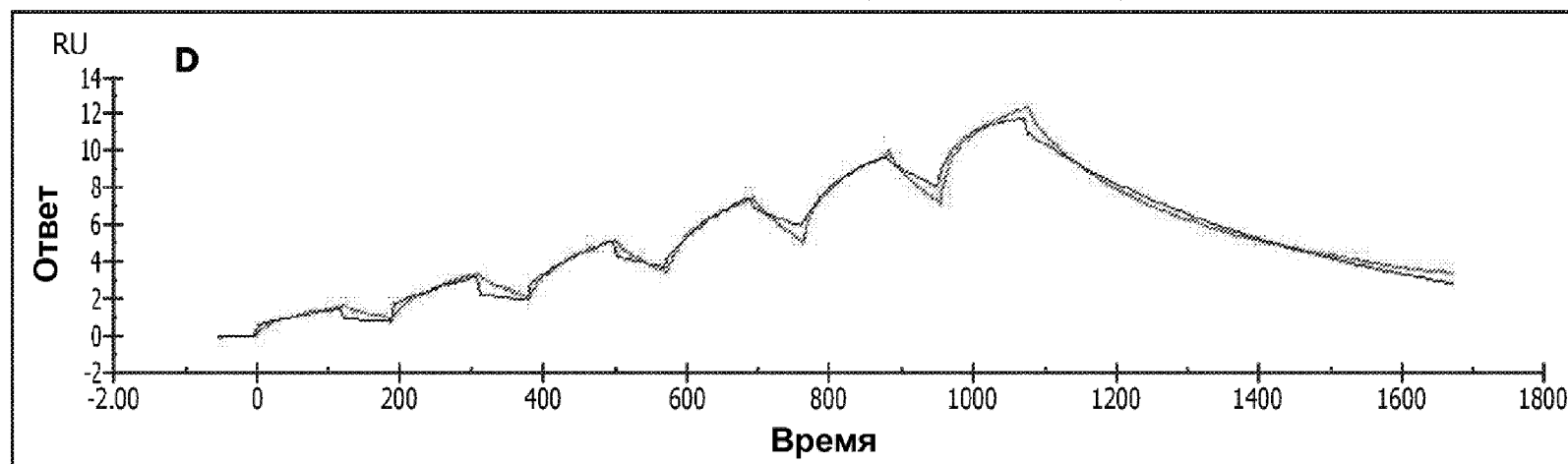
Первое измерение ($K_d = 9,4$ нмоль)



Фиг. 7С

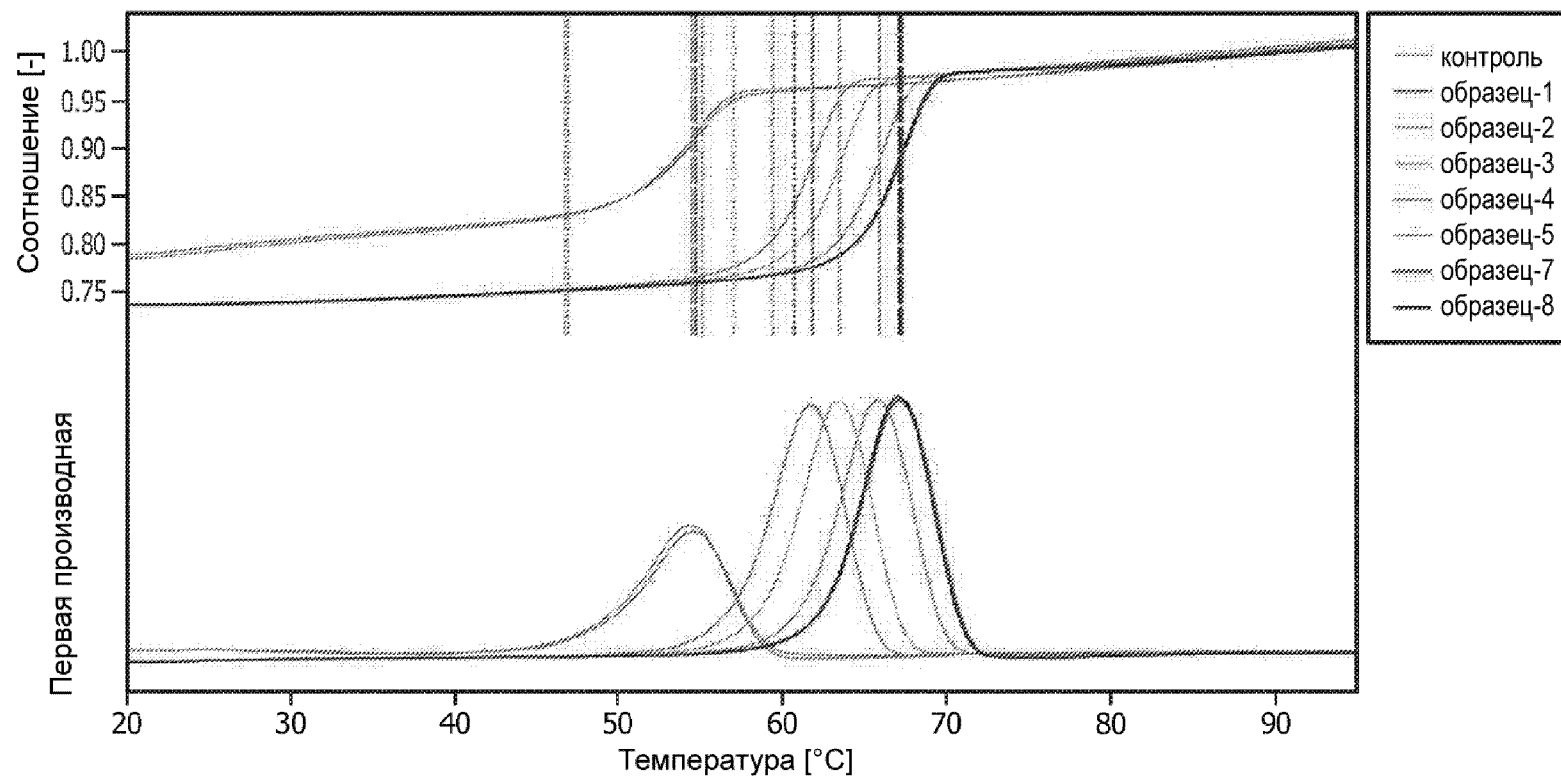
pH 7.4

Второе измерение ($K_d = 6,9$ нмоль)

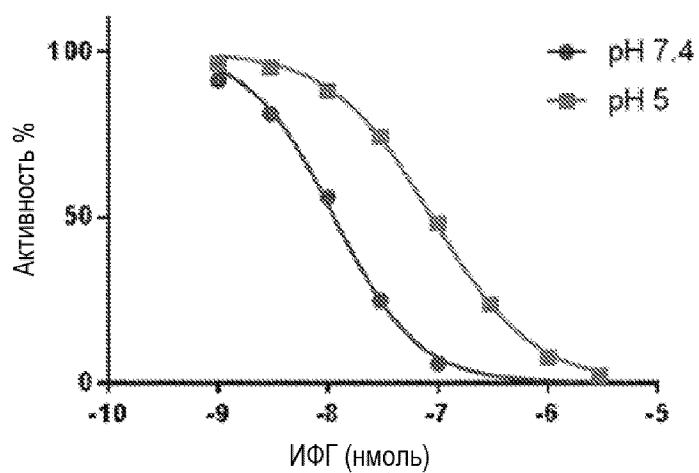


Фиг. 7D

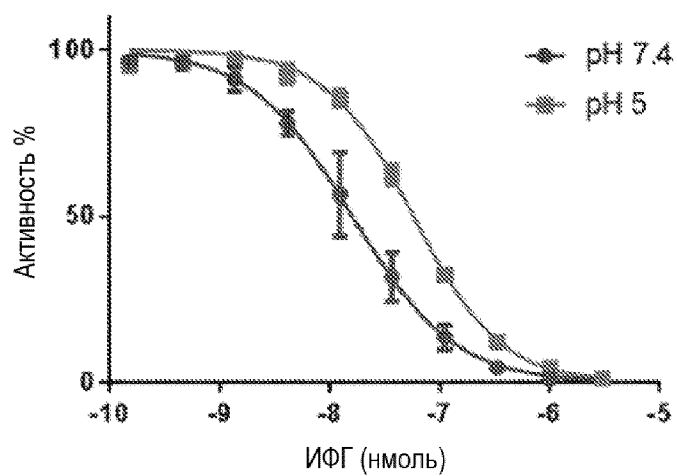
Титрование ГЦБ-ИФГ 9 мая 2017



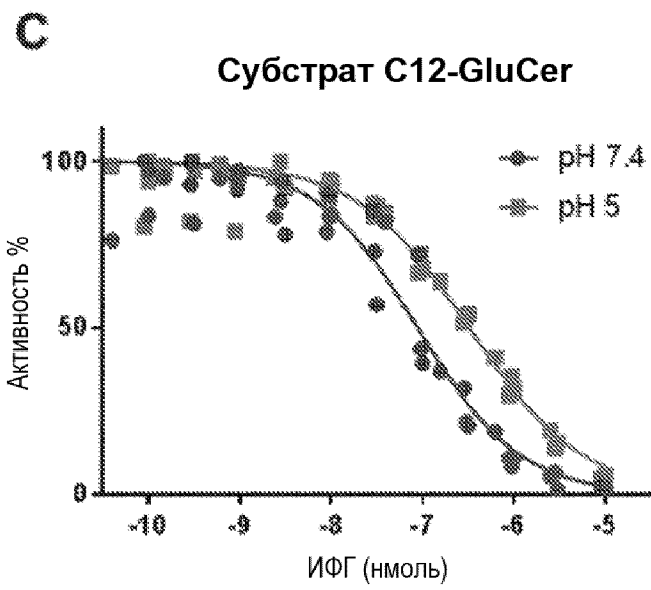
Фиг. 8

A**Субстрат pNP-GPS**

Фиг. 9А

В**Субстрат 4MU-GPS**

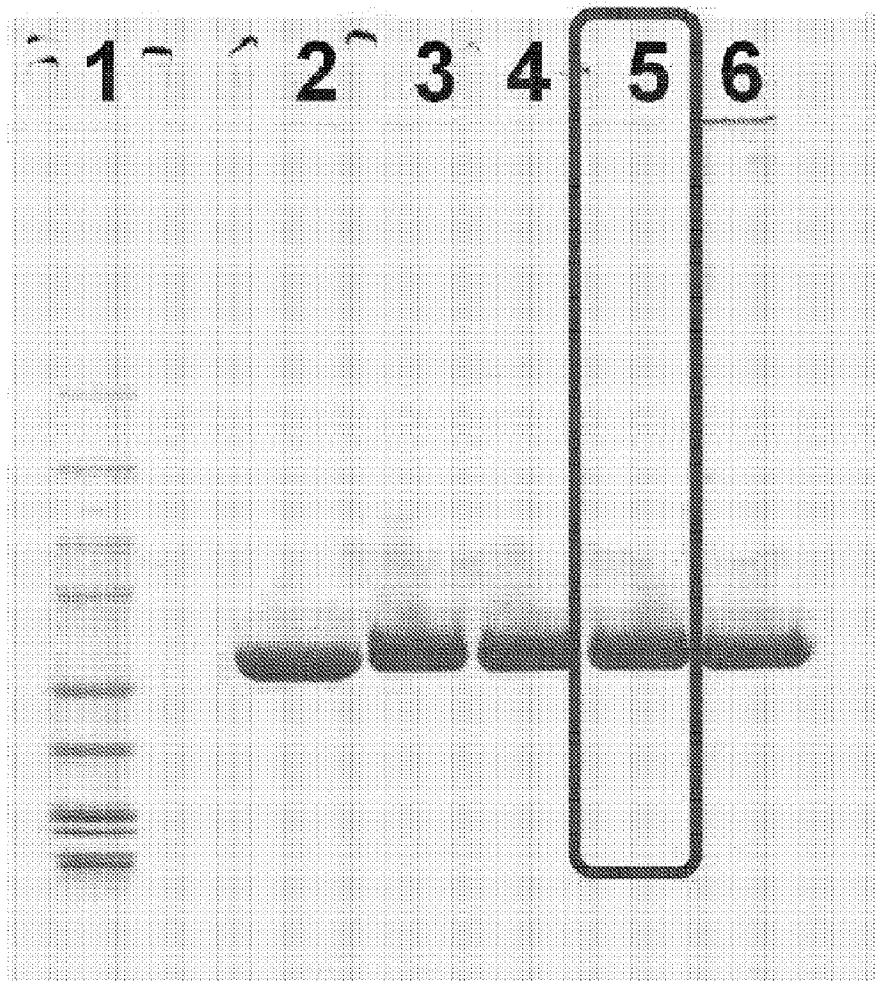
Фиг. 9В



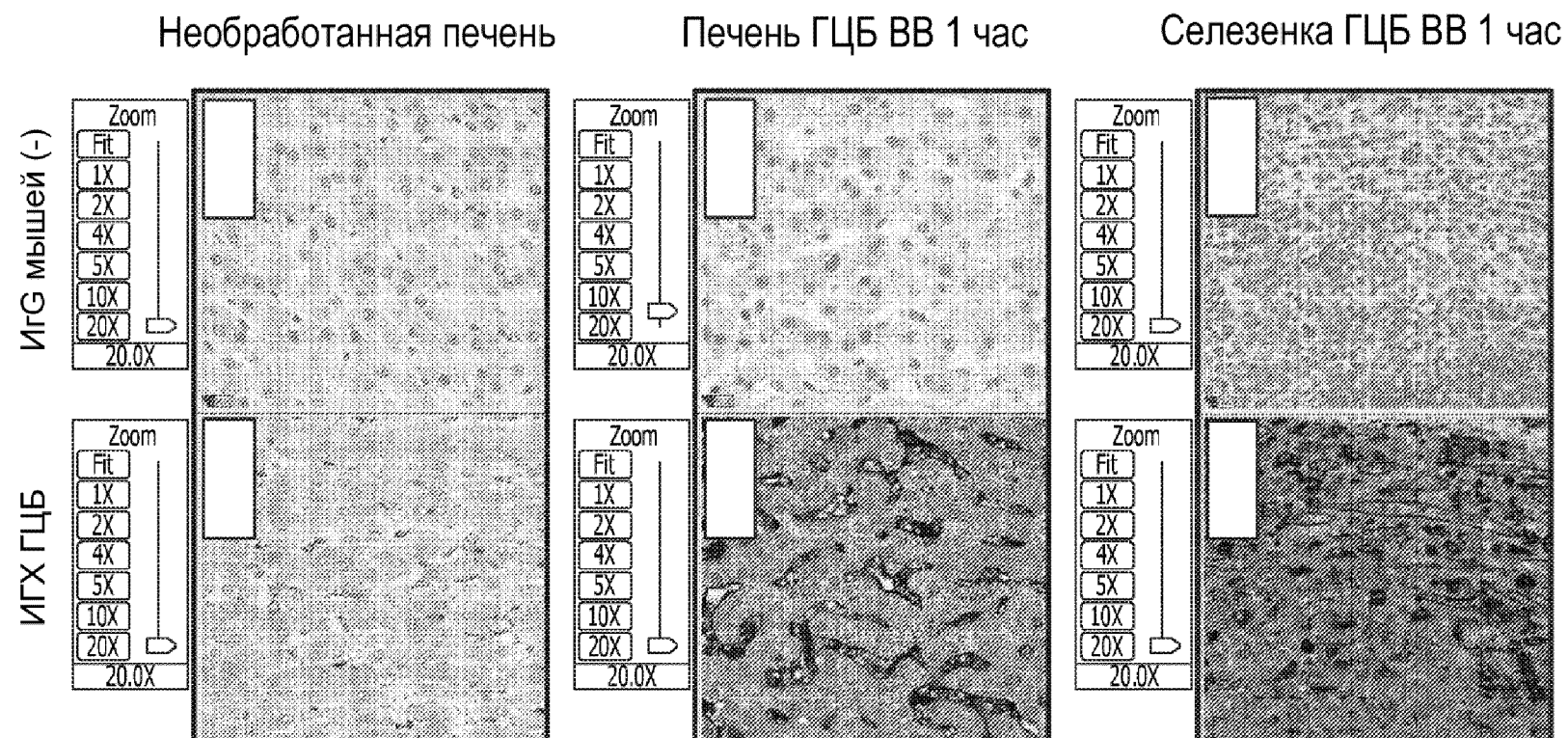
Фиг. 9С



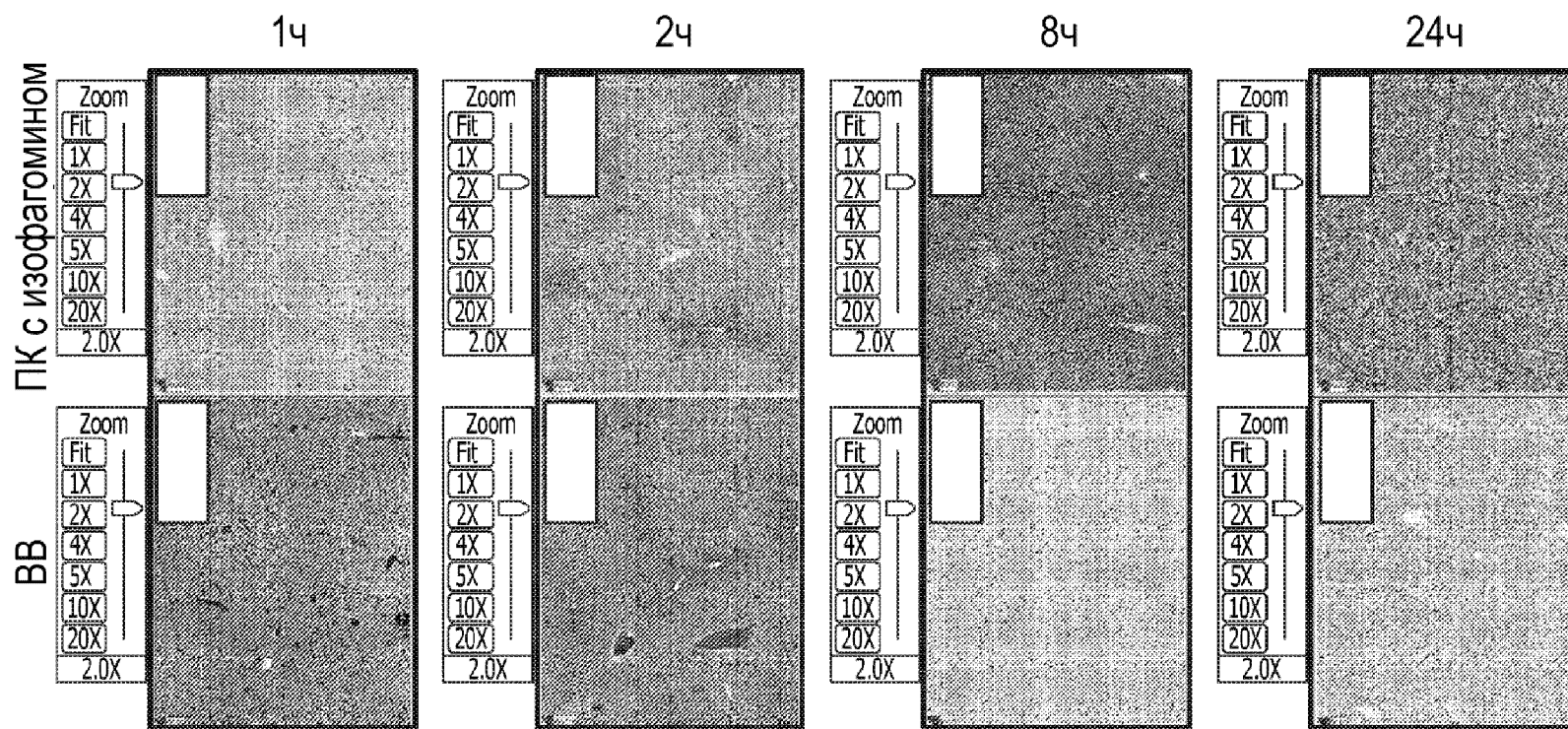
Фиг. 10А



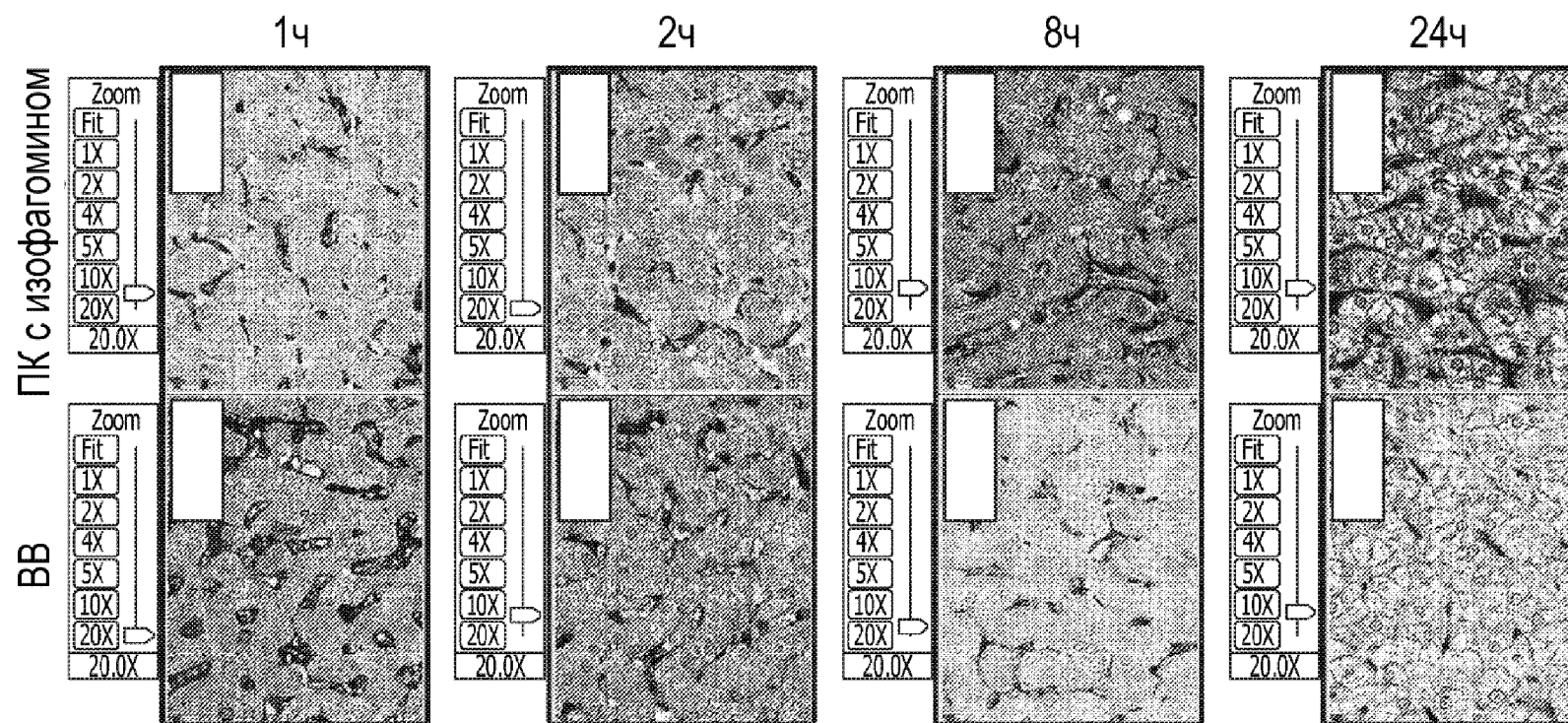
Фиг. 10В



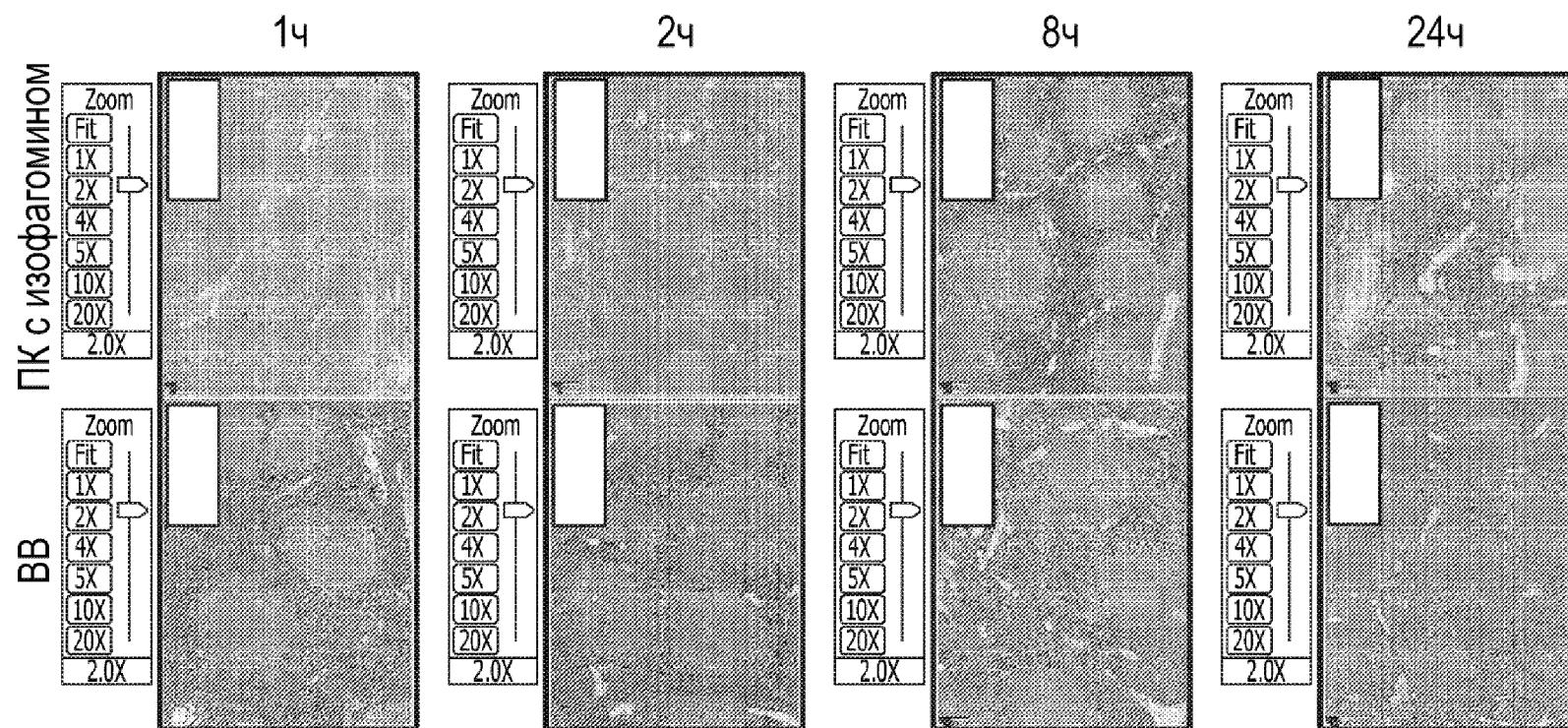
Фиг. 11



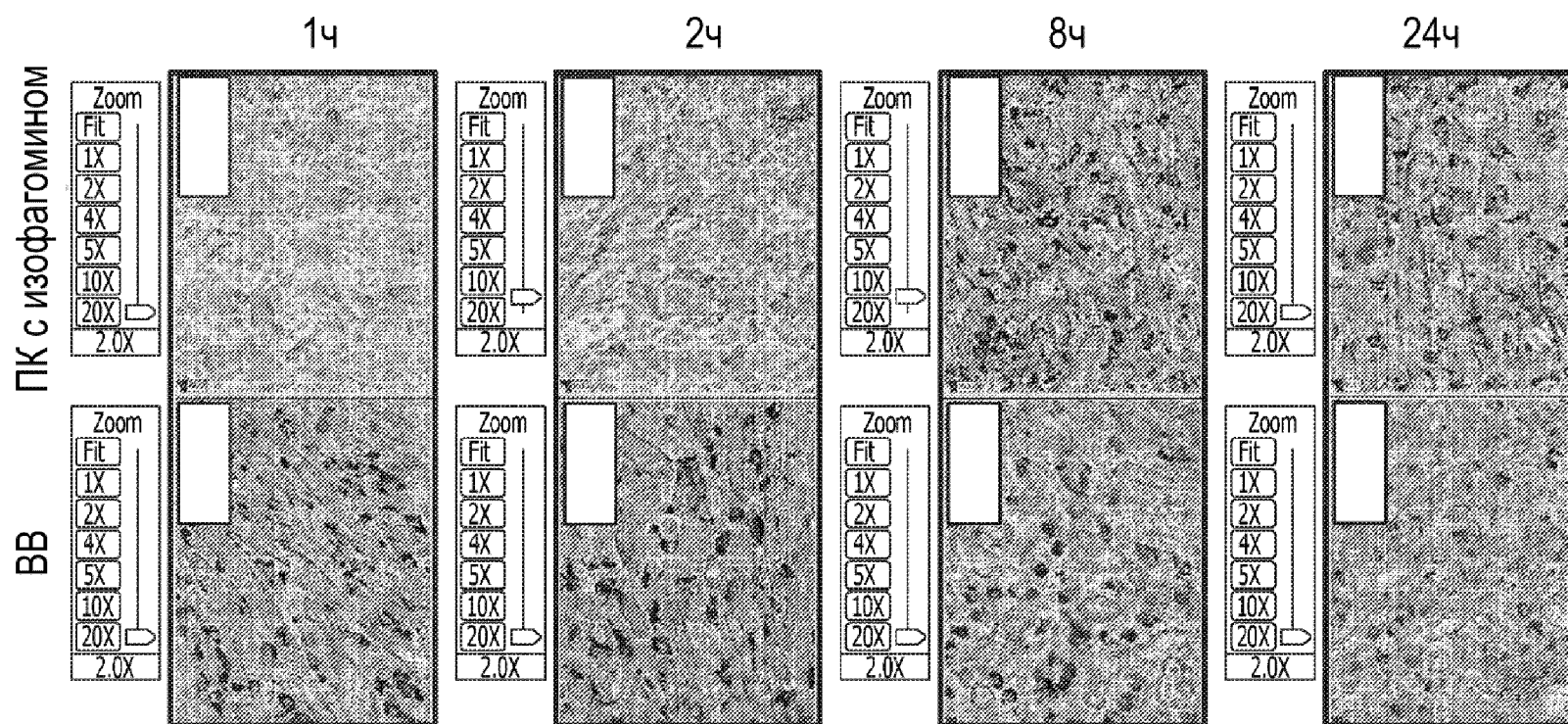
Фиг. 12



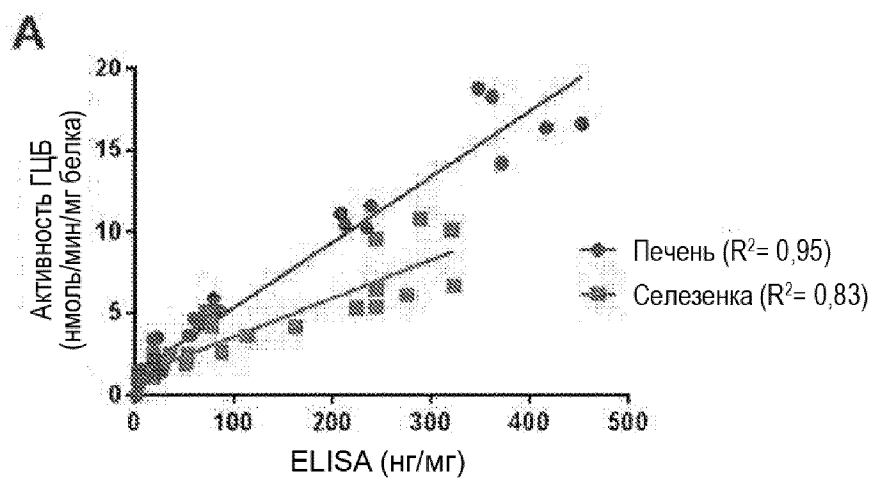
Фиг. 13



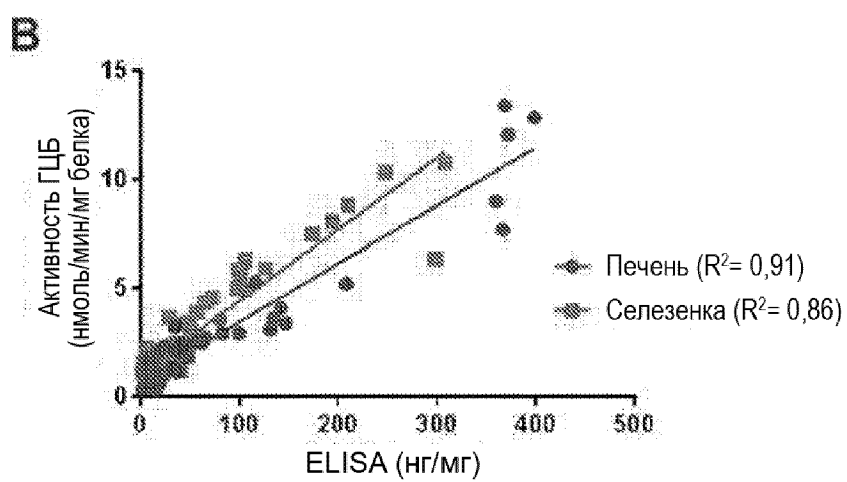
Фиг. 14



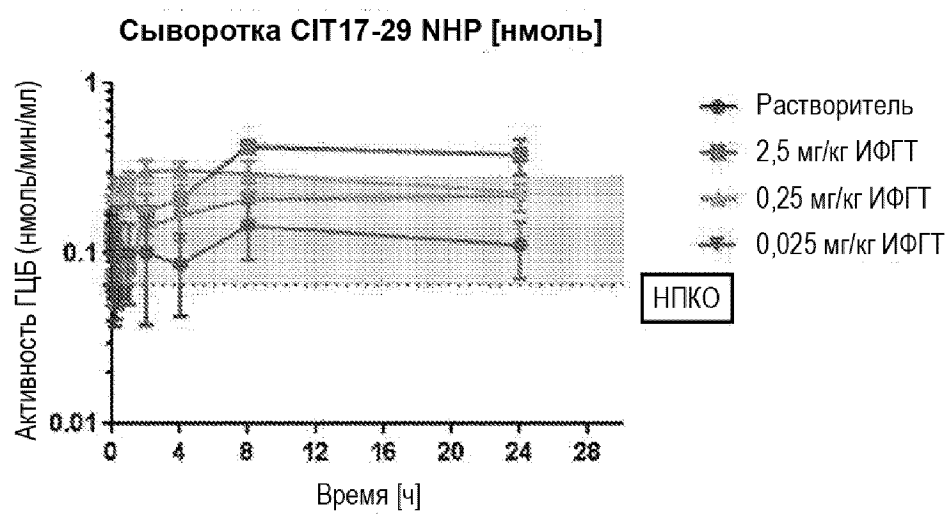
Фиг. 15



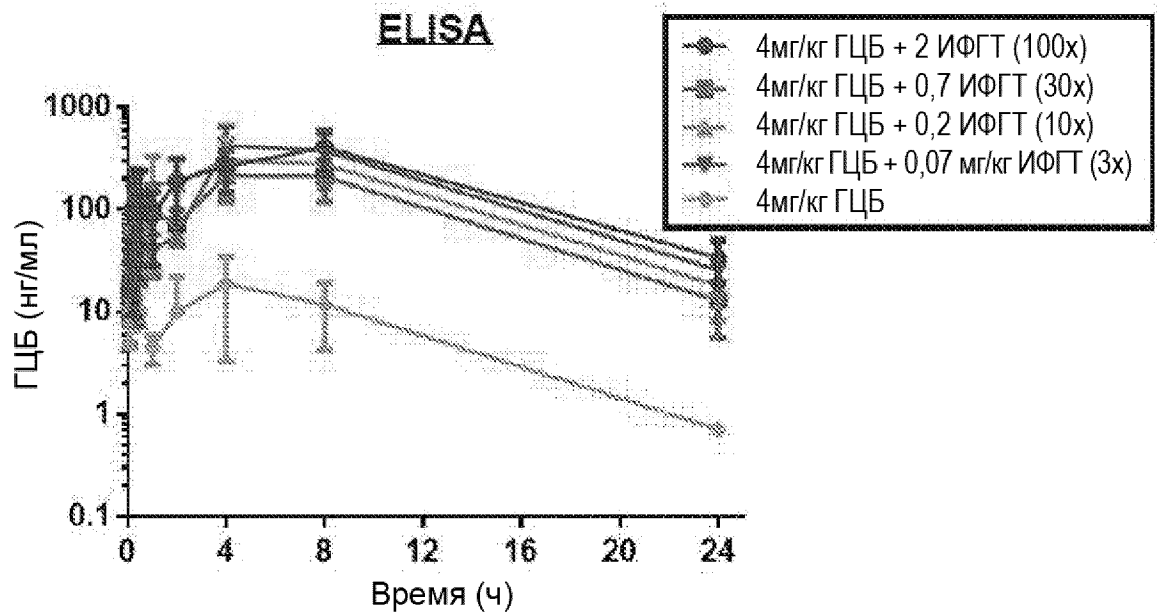
Фиг. 16А



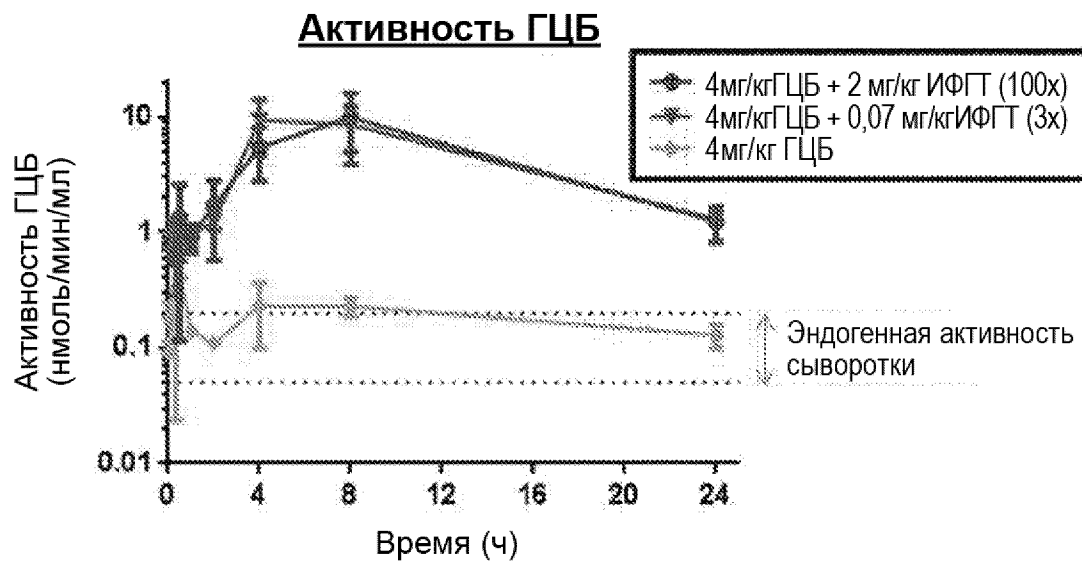
Фиг. 16В



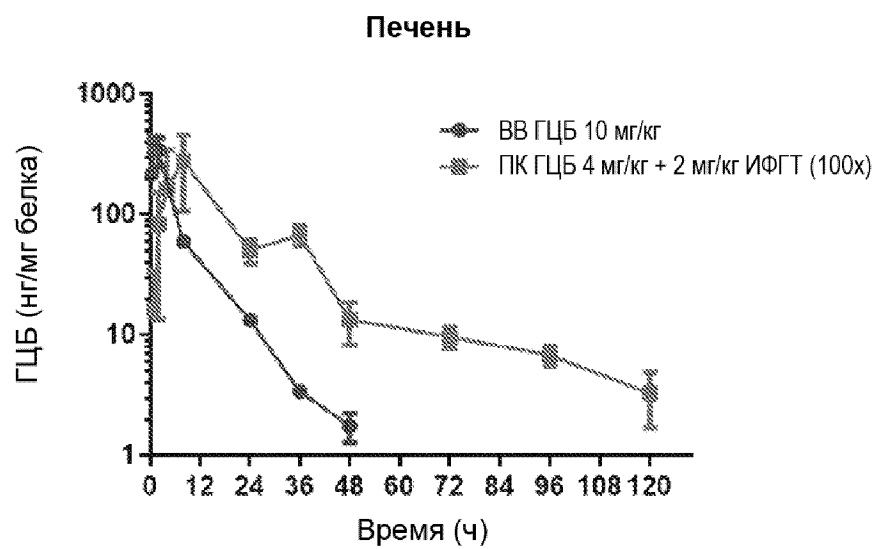
Фиг. 16С



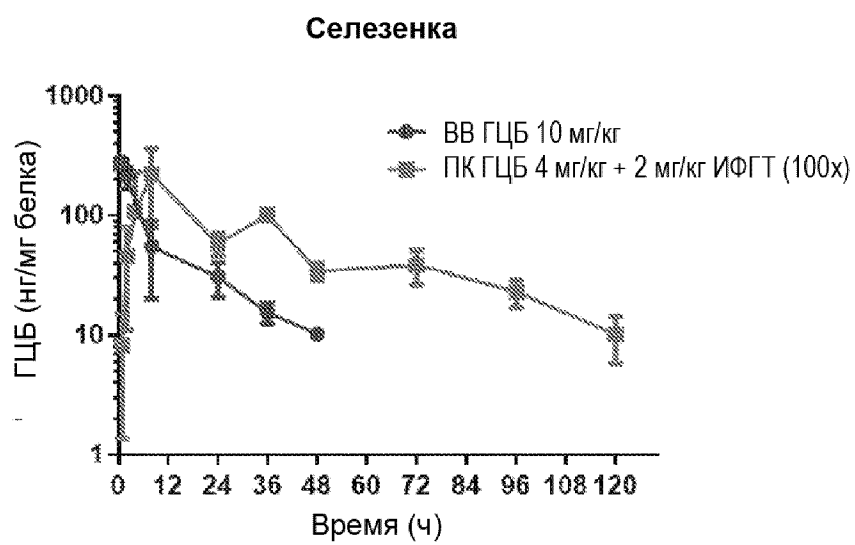
Фиг. 17А



Фиг. 17В

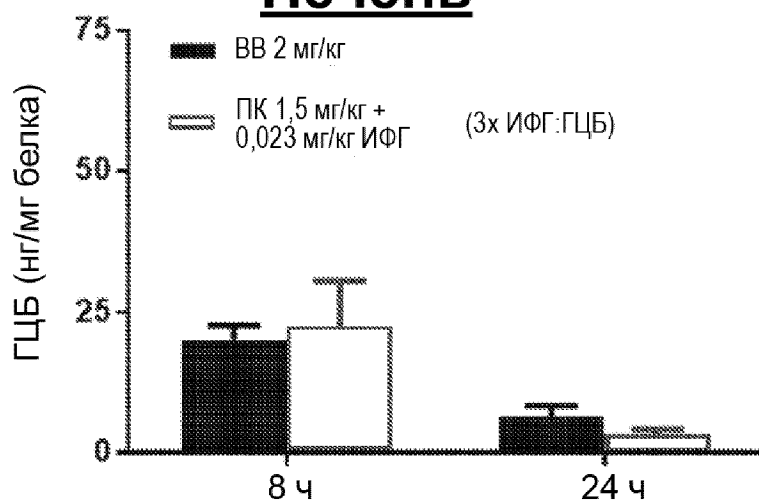


Фиг. 18А



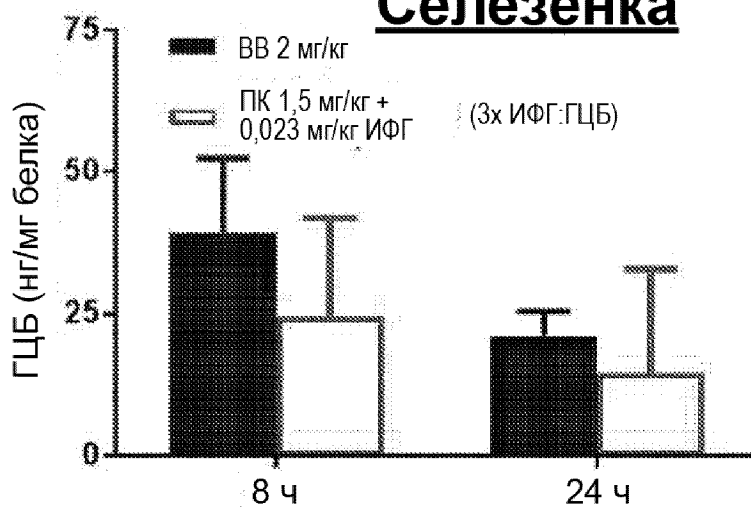
Фиг. 18В

Печень

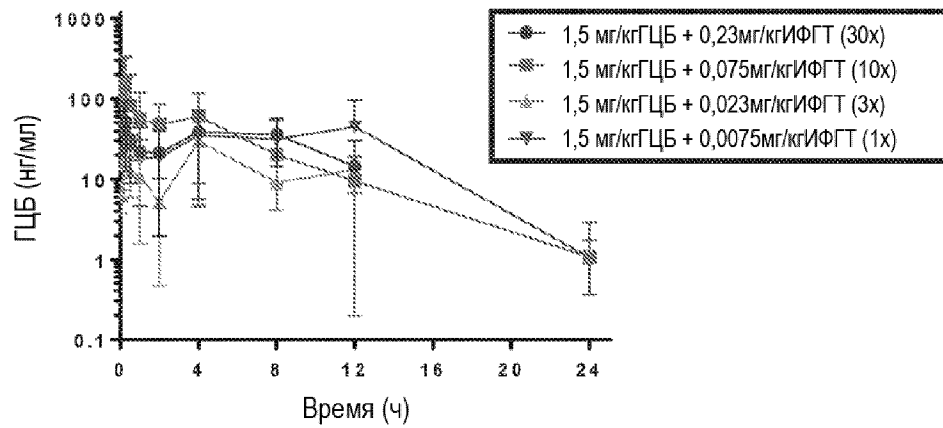


Фиг. 19А

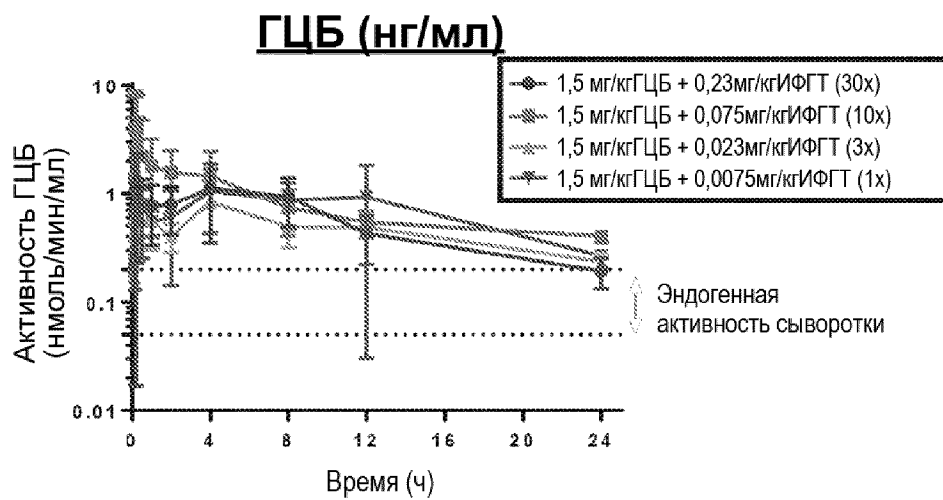
Селезенка



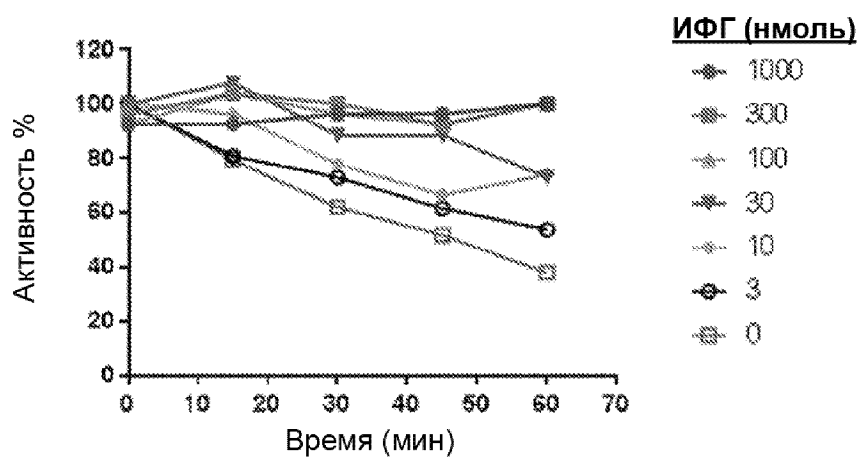
Фиг. 19В

ELISA

Фиг. 20А



Фиг. 20В



Фиг. 21