

DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES

SOLICITUD FASE NACIONAL - PCT

1 Título de la Invención(200 caracteres o espacios máximos)

TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES MIOPÁTICAS Y NEURODEGENERATIVAS POR AGREGACIÓN DE PROTEÍNA MEDIANTE ADMINISTRACIÓN PARENTERAL DE TREHALOSA

2 Datos del Solicitante / Titular

Nombre:	BIO BLAST PHARMA LTD.	Dirección Electrónica:	tobos@tobos.com.co
Dirección:	35 Ahad Ha ´am Street, Jiminy Entrance 4th Floor, 6520206 Tel Aviv, Israel.	Domicilio/País de constitución:	ISRAEL - TEL AVIV - TEL AVIV-YAFO
Identificación: ☐ CEDULA DE CIUDADANIA ☒ EMPRESA EXTRANJERA ☐ PASAPORTE Número: 1036482-			

3 Solicitantes

Apellidos - Nombres o Razón Social	Tipo	Identificación
1. BIO BLAST PHARMA LTD.	EE	1036482

4 Datos del Inventor

Nombre:		Dalia MEGIDDO	Dirección Electrónica:	tobos@tobos.com.co
Dirección:		M.P. Judean Hills, 9080400 Nataf, Israel.	Domicilio/País de constitución:	ISRAEL - JERUSALEM CORRIDOR - NATAF
Identificación: ☒ CEDULA DE CIUDADANIA ☐ EMPRESA EXTRANJERA ☐ PASAPORTE ☐ CEDULA DE EXTRANJERIA ☐ NIT Número: 1021596-				
5	Inventor(es)			
Apellidos - Nombres		Domicilio		
1. MEGIDDO Dalia		ISRAEL		
6	Datos Inventor(es)			
País de Residencia		Departamento/Estado	Ciudad	Dirección
1. ISRAEL		JERUSALEM CORRIDOR	NATAF	M.P. Judean Hills, 9080400 Nataf, Israel.
7	Datos del Representante Legal / Apoderado			
Nombre:		ANDREA TOBOS MATEUS	Dirección Electrónica:	tobos@tobos.com.co
Dirección:		Calle 151 No. 18 A 34 Oficina 409	Domicilio/País de constitución:	COLOMBIA - BOGOTA D.C. - BOGOTA D.C.
Identificación:				

☒ CEDULA DE CIUDADANIA
☐ EMPRESA EXTRANJERA
☐ PASAPORTE

☐ CEDULA DE EXTRANJERIA
☐ NIT

Número:

52223325-

Presentación de Poder

Año de Radicación

Número de Radicación

8

Datos Solicitud: PCT / WO

Número Solicitud:

PCT/IL2014/050411

Fecha Solicitud:

07/05/2014

Número Publicacion:

WO/2014/181333

Fecha Publicacion:

13/11/2014

9

Declaraciones de prioridad

☒ SI ☐ NO

	(33) País de origen	Codigo del país	(31) No. Solicitud	(32) Fecha
1.	ESTADOS UNIDOS DE AMERICA	US	61/820,278	07/05/2014

10

Reivindicaciones

Número reivindicaciones:

59

Pago Reivindicaciones:

No

11

Reducción de tasas.

Declaro que carezco de medios económicos para presentar la solicitud de patente.

☐ SI ☒ NO

Nota: En caso de ser persona natural y carecer de medios económicos, y por lo tanto, aplique la reducción de tasas a que se refiere la resolución vigente en tarifas, debe firmar la presente solicitud bajo la gravedad de juramento.

- ☐ Micro, pequeñas y medianas empresas
☐ Universidades públicas o privadas
☐ Entidades sin ánimo de lucro

Debe aportar los documentos que se indican en el numeral 17 de anexos

12

Documentos Anexos

- ☒ Reivindicaciones
☒ Descripción
☒ Dibujos y/o Figuras
☒ Resumen
☐ Certificado Depósito Material Biológico
☐ Uso de Conocimiento tradicional

- ☐ Listado de secuencias
- ☐ Artes finales 12 x 12 cm
- ☒ Poderes, si fuere el caso
- ☐ Copia de la primera solicitud si se reivindica prioridad
- ☐ Traducción simple de la primera solicitud, si se reivindica prioridad
- ☒ Otros Anexos

REIVINDICACIONES

1. Un método para tratar o aliviar una enfermedad asociada a la agregación anormal de proteínas y/o formación
5 de cuerpos de inclusión en miocitos, neuronas y otras células o compartimientos extracelulares, o por lo menos un síntoma asociado a los mismos, en un sujeto humano en necesidad del mismo que comprende la administración parenteral a dicho sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva de trehalosa o
10 una formulación farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de trehalosa.

2. El método de conformidad con la reivindicación 1, en donde dicha enfermedad es cualquiera del trastorno de agregación de polialanina, trastorno de agregación de
15 poliglutamina y una tautopatía.

3. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 y 2, en donde dicha enfermedad es cualquiera de la distrofia muscular oculofaríngea (OPMD), ataxia espinocerebelosa (SCA), la ataxia de Friedreich, la
20 atrofia muscular espinal y bulbar (SBMA), enfermedad de Huntington, enfermedad de Parkinson, la enfermedad de Alzheimer y esclerosis lateral amiotrófica (ALS, por sus siglas en inglés), la dentato-rubro-palido-luisiana (DRPLA), Enfermedad de pick, la degeneración Corticobasal (CBD),

parálisis supranuclear progresiva (PSP) y Demencia Frontotemporal y parkinsonismo vinculado al cromosoma 17 (FTDP-17).

4. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde dicha formulación farmacéutica es una solución inyectable para administración parenteral.

5. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde dicha formulación farmacéutica comprende trehalosa como único ingrediente activo, y opcionalmente comprende además al menos un aditivo, portador, excipiente o diluyente farmacéuticamente aceptable.

6. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la concentración de trehalosa en dicha formulación está entre alrededor de 0.1% (p/v) a alrededor de 50% (p/v).

7. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la concentración de trehalosa en dicha formulación es alrededor de 10 % (p/v).

8. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la formulación farmacéutica que comprende trehalosa tiene una osmolalidad de desde alrededor de 280 a alrededor de 330 mOsm/Kg.

9. El método de conformidad con cualquiera de las

reivindicaciones 1 a 8, en donde dicha administración es de cualquier administración intravenosa, intramuscular e intraperitoneal.

10. El método de conformidad con cualquiera de las
5 reivindicaciones anteriores, en donde dicha formulación farmacéutica comprende menos de 0.74 unidades de endotoxina por ml de solución.

11. El método de conformidad con cualquiera de las
10 reivindicaciones anteriores, en donde dicha cantidad terapéuticamente efectiva de trehalosa es de alrededor de 1 gramo a alrededor de 100 gramos para cada única inyección y no más de 1 gramo/kg de peso corporal de dicho sujeto por día.

12. El método de conformidad con cualquiera de las
15 reivindicaciones 1 a 11, en donde dicha cantidad terapéuticamente efectiva de trehalosa o formulación farmacéutica que comprende la misma se administra crónicamente.

13. El método de conformidad con cualquiera de las
20 reivindicaciones 1 a 12, en donde dicha cantidad terapéuticamente efectiva de trehalosa o formulación farmacéutica que comprende la misma se administra en una frecuencia de entre una vez diario a una vez por mes.

14. El método de conformidad con la reivindicación 13,

en donde dicha cantidad terapéuticamente efectiva de trehalosa o trehalosa comprendida en dicha formulación farmacéutica es administrada una vez diariamente desde alrededor de 10 mg/kg/día a alrededor de 1 gramo/kg/día de trehalosa.

15. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en donde dicha cantidad terapéuticamente efectiva de trehalosa o trehalosa comprendida en dicha formulación farmacéutica se administra en una sola administración de inyección una vez a la semana.

16. El método de conformidad con la reivindicación 13 o la reivindicación 15, en donde dicha cantidad terapéuticamente efectiva de trehalosa o formulación farmacéutica que comprende la misma se administra por vía intravenosa en una dosis única de aproximadamente 5 a aproximadamente 35 gramos de trehalosa, que puede administrarse una vez diario, una vez cada dos días, dos veces a la semana, una vez por semana, una vez cada dos semanas, una vez cada tres semanas o una vez al mes.

17. El método de conformidad con la reivindicación 13 o la reivindicación 15, en donde dicha cantidad terapéuticamente efectiva de trehalosa o trehalosa comprendida en dicha formulación farmacéutica se administra en una dosis única de 5, 8, 15, 30, 40 ó 50 gramos de

trehalosa.

18. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17, en donde dicha formulación farmacéutica es una solución inyectable y en donde la tasa de admimistración es de manera que el nivel máximo de endotoxina es menor que 5 unidades de endotoxina por kilogramo de peso corporal por hora.

19. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18, en donde la administración de dicha cantidad terapéuticamente efectiva de trehalosa comprendida en dicha formulación farmacéutica está adaptada para la administración intravenosa, se completa dentro de alrededor de 75 a alrededor de 120 minutos, específicamente dentro de menos de 90 minutos.

20. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 12 a 19, en donde dicha administración comprende un régimen de dosis de dosis iguales, o dosis que aumenta gradualmente, o dosis que disminuyen gradualmente de trehalosa o una formulación farmacéutica que comprende la misma.

21. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en donde dicha cantidad terapéuticamente efectiva de trehalosa o formulación farmacéutica que comprende la misma se administra

periódicamente.

22. Trehalosa o una formulación farmacéutica que comprende la misma, para uso en un método para tratar o aliviar una enfermedad asociada a la agregación anormal de proteínas y/o formación de cuerpos de inclusión en miocitos, neuronas y otras células o compartimientos extracelulares, o por lo menos un síntoma asociado a los mismos, en un sujeto humano en necesidad del mismo que dicho método comprende la administración parenteral a dicho sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva de trehalosa o una formulación farmacéutica que comprende la misma.

23. Trehalosa o una formulación farmacéutica que comprende la misma para su uso tal como se define en la reivindicación 22, en donde dicha enfermedad es cualquiera del trastorno de agregación de polialanina, trastornos de agregación de poliglutamina y una tautopatía.

24. Trehalosa o una formulación farmacéutica que comprende la misma para uso como se define en cualquiera de las reivindicaciones 22 o reivindicación 23, en donde dicha enfermedad es cualquiera de la distrofia muscular oculofaríngea (OPMD), ataxia espinocerebelosa (SCA), la ataxia de Friedreich, la atrofia muscular espinal y bulbar (SBMA), enfermedad de Huntington, enfermedad de Parkinson, la enfermedad de Alzheimer y esclerosis lateral amiotrófica

(ALS, por sus siglas en inglés), la dentato-rubro-palido-luisiana (DRPLA), Enfermedad de pick, la degeneración Corticobasal (CBD), parálisis supranuclear progresiva (PSP) y Demencia Frontotemporal y parkinsonismo vinculado al cromosoma 17 (FTDP-17).

25. Trehalosa o una formulación farmacéutica que comprende la misma para uso tal como se define en cualquiera de las reivindicaciones 22 a 24, en donde dicha formulación farmacéutica es una solución inyectable para administración parenteral.

26. Trehalosa o una formulación farmacéutica que comprende la misma para uso tal como se define en cualquiera de las reivindicaciones 22 a 25, en donde dicha formulación farmacéutica comprende trehalosa como único ingrediente activo, y opcionalmente comprende además al menos un aditivo, portador, excipiente o diluyente farmacéuticamente aceptable.

27. Trehalosa o una formulación farmacéutica que comprende la misma para uso tal como se define en cualquiera de las reivindicaciones 22 a 26, en donde la concentración de trehalosa en dicha formulación es entre aproximadamente 0.1% (p/v) a aproximadamente 50% (p/v).

28. Trehalosa o una formulación farmacéutica que comprende la misma para uso tal como se define en cualquiera de las reivindicaciones 22 a 27, en donde la concentración de

trehalosa en dicha formulación es aproximadamente 10 % (p/v).

29. Trehalosa o una formulación farmacéutica que comprende la misma para uso tal como se define en cualquiera de las reivindicaciones 22 a 28, en donde la formulación
5 farmacéutica que comprende trehalosa tiene una osmolaridad de alrededor de 280 - 330 mOsm/Kg.

30. Trehalosa o una formulación farmacéutica que comprende la misma para uso tal como se define en cualquiera de las reivindicaciones 22 a 29, en donde dicha
10 administración es cualquiera de la administración intravenosa, intramuscular e intraperitoneal.

31. Trehalosa o una formulación farmacéutica que comprende la misma para uso tal como se define en cualquiera de las reivindicaciones 22 a 30, en donde dicha formulación
15 farmacéutica comprende menos de 0.74 de unidades de endotoxina por ml de solución.

32. Trehalosa o una formulación farmacéutica que comprende la misma para uso como se define en cualquiera de las reivindicaciones 22 a 31, en donde dicha cantidad
20 terapéuticamente efectiva de trehalosa es de alrededor de 1 gramo a alrededor de 100 gramos para cada única inyección y no más de 1 gramo/kg de peso corporal de dicho sujeto por día.

33. Trehalosa o una formulación farmacéutica que

comprende la misma para uso tal como se define en cualquiera de las reivindicaciones 22 a 32, en donde dicha cantidad terapéuticamente efectiva de trehalosa o formulación farmacéutica que comprende la misma es administrada crónicamente.

34. Trehalosa o una formulación farmacéutica que comprende la misma para uso tal como se define en cualquiera de las reivindicaciones 22 a 33, en donde dicha cantidad terapéuticamente efectiva de trehalosa o formulación farmacéutica que comprende la misma es administrada en una frecuencia de entre una vez diariamente a una vez por mes.

35. Trehalosa o una formulación farmacéutica que comprende la misma para uso como se define en la reivindicación 34, en donde dicha cantidad terapéuticamente efectiva de trehalosa o trehalosa comprendida en dicha formulación farmacéutica es administrada una vez diariamente desde alrededor de 10 mg/kg/día a alrededor de 1 gramo/kg/día de trehalosa.

36. Trehalosa o una formulación farmacéutica que comprende la misma para uso tal como se define en cualquiera de las reivindicaciones 22 a 33, en donde dicha cantidad terapéuticamente efectiva de trehalosa o trehalosa comprendida en dicha formulación farmacéutica se administra en una única administración de inyección una vez por semana.

37. Trehalosa o una formulación farmacéutica que comprende la misma para uso como se define en la reivindicación 34 o la reivindicación 36, en donde dicha cantidad terapéuticamente efectiva de trehalosa o trehalosa
5 comprendida en dicha formulación farmacéutica se administra por vía intravenosa en una dosis única de aproximadamente 5 a aproximadamente 35 gramos de trehalosa, una vez diario, una vez cada dos días, dos veces a la semana, una vez por semana, una vez cada dos semanas , una vez cada tres semanas o una
10 vez al mes.

38. Trehalosa o una formulación farmacéutica que comprende la misma para uso como se define en la reivindicación 34 o la reivindicación 36, en donde dicha cantidad terapéuticamente efectiva de trehalosa o trehalosa
15 comprendida en dicha formulación farmacéutica se administra en una dosis única de 5, 8, 15, 30, 40 ó 50 gramos de trehalosa.

39. Trehalosa o una formulación farmacéutica que comprende la misma para uso como se define en la reivindicación 22 o la reivindicación 38, en donde dicha cantidad terapéuticamente efectiva de trehalosa o una
20 formulación farmacéutica que comprende la misma para una solución inyectable y en donde la tasa de administración es de manera que el nivel máximo de endotoxina es menor que 5

unidades de endotoxina por kilogramo de peso corporal por hora.

40. Trehalosa o una formulación farmacéutica que comprende la misma para uso como se define en la reivindicación 22 o la reivindicación 39, en donde dicha cantidad terapéuticamente efectiva de trehalosa o una formulación farmacéutica que comprende la misma es adaptada para administración intravenosa y en donde dicha administración está completa dentro desde alrededor de 75 a alrededor de 120 minutos, específicamente dentro de menos de 90 minutos.

41. Trehalosa o una formulación farmacéutica que comprende la misma para uso como se define en cualquiera de las reivindicaciones 33 a 40, en donde dicha administración comprende un régimen de dosis de dosis iguales, o dosis que aumenta gradualmente, o dosis que disminuyen gradualmente de trehalosa o una formulación farmacéutica que comprende la misma.

42. Trehalosa o una formulación farmacéutica que comprende la misma para uso tal como se define en cualquiera de las reivindicaciones 22 a 32, en donde dicha cantidad terapéuticamente efectiva de trehalosa o formulación farmacéutica que comprende la misma es administrada periódicamente.

43. Una formulación farmacéutica acuosa que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de trehalosa como ingrediente activo único, en donde la formulación tiene un pH de alrededor de 4.5 a 7.0 y que contiene menos de 0.74 unidades de endotoxina por ml y en donde dicha formulación farmacéutica está adaptada para la administración parenteral.

44. La formulación farmacéutica acuosa de conformidad con la reivindicación 43, adaptada para administración intravenosa, intramuscular o intraperitoneal.

45. La formulación farmacéutica acuosa de conformidad con la reivindicación 43 o la reivindicación 44, que comprende opcionalmente además al menos un aditivo, portador, excipiente o diluyentes farmacéuticamente aceptable.

46. La formulación farmacéutica acuosa de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 43 a 45, en donde la concentración de la trehalosa está entre aproximadamente 0.1% (p/v) a aproximadamente 50% (p/v).

47. La formulación farmacéutica acuosa de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 43 a 46, en donde la concentración de la trehalosa es aproximadamente 10 % (p/v).

48. La formulación farmacéutica acuosa de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 43 a 47, en donde la formulación tiene una osmolalidad de alrededor de 280-330 mOsm/kg.

49. La formulación farmacéutica acuosa de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 43 a 48, en donde la formulación es administrada a una frecuencia de entre una vez diario a una vez al mes.

5 50. La formulación farmacéutica acuosa de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 43 a 47, en donde dicha cantidad terapéuticamente efectiva de trehalosa es de alrededor de 1 gramo a alrededor de 100 gramos para cada inyección diaria y no más de 1 gramo/kg de peso corporal de
10 dicho sujeto por día.

51. La formulación farmacéutica acuosa de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 43 a 50, en donde la formulación farmacéutica es administrada una vez diariamente desde alrededor de 10 mg/kg/día a alrededor de 1 gramo/kg/día
15 de trehalosa.

52. La formulación farmacéutica acuosa de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 43 a 51, en donde la formulación se administra a una frecuencia de entre una vez al día a una vez al mes en una dosis de alrededor de 5 a
20 alrededor de 35 gramos de trehalosa comprendida en la misma.

53. La formulación farmacéutica acuosa de conformidad con la reivindicación 52, para administración una vez al día, una vez cada dos días, dos veces a la semana, una vez por semana, una vez cada dos semanas, una vez cada tres semanas o

una vez al mes.

54. La formulación farmacéutica acuosa de conformidad con la reivindicación 53, en donde la dosis es de 5, 8, 15, 30, 40 ó 50 gramos.

5 55. La formulación farmacéutica acuosa de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 43 a 54, en donde la tasa de administración es de manera que el nivel máximo de endotoxina es menor que 5 unidades de endotoxina por kilogramo de peso corporal por hora.

10 56. La formulación farmacéutica acuosa de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 43 a 55, en donde la formulación es adaptada para la administración intravenosa y en donde dicha administración se termina dentro de alrededor 75 a alrededor de 120 minutos, específicamente dentro de
15 menos de 90 minutos.

57. La formulación farmacéutica acuosa de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 43 a 56, para el tratamiento de una enfermedad asociada con la agregación anormal de proteína o formación de cuerpos de inclusión en
20 miocitos, neuronas y otras células o compartimentos extracelulares o para aliviar un signo o síntoma asociado con la misma en un sujeto humano en necesidad de la misma.

58. La formulación farmacéutica acuosa de conformidad con la reivindicación 57, en donde dicha enfermedad es

cualquiera de la distrofia muscular oculofaríngea (OPMD),
ataxia espinocerebelosa (SCA), la ataxia de Friedreich, la
atrofia muscular espinal y bulbar (SBMA), enfermedad de
Huntington, enfermedad de Parkinson, la enfermedad de
5 Alzheimer y esclerosis lateral amiotrófica (ALS, por sus
siglas en inglés), la dentato-rubro-palido-luisiana (DRPLA) ,
Enfermedad de pick, la degeneración Corticobasal (CBD),
parálisis supranuclear progresiva (PSP) y Demencia
Frontotemporal y parkinsonismo vinculado al cromosoma 17
10 (FTDP-17).

59. Un equipo que comprende:

(a) trealosa o un derivado activo de la misma
farmacéuticamente aceptable;

(b) al menos un aditivo, portador, excipiente y
15 diluyente farmacéuticamente aceptable;

(c) los medios para la preparación de una solución
acuosa inyectable de trehalosa mezclando dicha trehalosa con
al menos uno de dichos aditivo, portador, excipiente y
diluyente;

20 (d) los medios para administrar por vía parenteral
dicha solución inyectable a un paciente en necesidad;

(e) Instrucciones de uso.

VIII-2-1	DECLARACIÓN: DERECHO A SOLICITAR Y OBTENER UNA PATENTE Declaración sobre el derecho del solicitante, a la fecha de la presentación internacional, para solicitar y para que se le otorgue una patente (Reglas 4.17(ii) y 51bis.1(a)(ii)), en un caso en que la declaración en virtud del Regla 4.17 (iv) no sea apropiada: Nombre (APELLIDO, Nombre)	En relación con esta solicitud internacional, BIO BLAST PHARMA LTD. tiene derecho a solicitar y a que se le conceda una patente en virtud de lo siguiente:
VIII-2-1 (iv)		una cesión de MEGIDDO, Dalia a BIO BLAST PHARMA LTD., de fecha 06 de mayo de 2013 (06.05.2013)

VIII-2-1	Declaration: Entitlement to apply for and be granted a patent Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to apply for and be granted a patent (Rules 4.17(ii) and 51bis.1(a)(ii)), in a case where the declaration under Rule 4.17(iv) is not appropriate: Name (LAST, First)	In relation to this international application BIO BLAST PHARMA LTD. is entitled to apply for and be granted a patent by virtue of the following:
VIII-2-1(i v)		an assignment from MEGIDDO, Dalia to BIO BLAST PHARMA LTD., dated 06 May 2013 (06.05.2013)



(51) International Patent Classification:
A61K 31/7016 (2006.01)

(21) International Application Number:
PCT/IL2014/050411

(22) International Filing Date:
7 May 2014 (07.05.2014)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
61/820,278 7 May 2013 (07.05.2013) US

(71) Applicant: **BIO BLAST PHARMA LTD.** [IL/IL]; 35
Ahad Ha 'am Street, Jiminy Entrance 4th Floor, 6520206
Tel Aviv (IL).

(72) Inventor: **MEGIDDO, Dalia**; M.P. Judean Hills, 9080400
Nataf, Israel (IL).

(74) Agent: **HACKMEY, Michal**; Reinhold Cohn & Partners,
P.O. Box 13239, 6113102 Tel-Aviv, Israel (IL).

(81) Designated States (*unless otherwise indicated, for every
kind of national protection available*): AE, AG, AL, AM,
AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY,
BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM,
DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT,
HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR,

KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME,
MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ,
OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA,
SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM,
TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM,
ZW.

(84) Designated States (*unless otherwise indicated, for every
kind of regional protection available*): ARIPO (BW, GH,
GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ,
UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ,
TM), European (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK,
EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV,
MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM,
TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW,
KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Declarations under Rule 4.17:

- *as to applicant's entitlement to apply for and be granted a
patent (Rule 4.17(ii))*
- *as to the applicant's entitlement to claim the priority of the
earlier application (Rule 4.17(iii))*
- *of inventorship (Rule 4.17(iv))*

Published:

- *without international search report and to be republished
upon receipt of that report (Rule 48.2(g))*

(54) Title: TREATMENT OF PROTEIN AGGREGATION MYOPATHIC AND NEURODEGENERATIVE DISEASES BY PARENTERAL ADMINISTRATION OF TREHALOSE

(57) Abstract: Disclosed is a method of treatment of a disease associated with abnormal protein aggregation comprising parenterally administering pharmaceutical formulations comprising trehalose. Also disclosed is an injectable aqueous pharmaceutical formulation comprising a therapeutically effective amount of trehalose.



**TREATMENT OF PROTEIN AGGREGATION MYOPATHIC AND
NEURODEGENERATIVE DISEASES BY
PARENTERAL ADMINISTRATION OF TREHALOSE**

TECHNOLOGICAL FIELD

The presently disclosed subject matter relates to use of trehalose in the treatment of myopathies, neurodegenerative disorders or tauopathies associated abnormal protein aggregation.

BACKGROUND ART

References considered to be relevant as background to the presently disclosed subject matter are listed below:

- [1] Brunet, G. et al., 1990 Dystrophie musculaire oculo-pharyngée. Recensement des familles françaises et études généalogiques. *Rev Neurol* 4:429-434.
- [2] Blumen, S.C. et al., 1997 Epidemiology and inheritance of oculopharyngeal muscular dystrophy in Israel. *Neuromuscul Disord* 7:S38-40.
- [3] Becher, M.W. et al., 2001 Oculopharyngeal Muscular Dystrophy in Hispanics New Mexicans. *JAMA*. 286(19):2437-40.
- [4] Grewal, R.J. et al., 1999 Mutation Analysis of Oculopharyngeal Muscular Dystrophy in Hispanic American Families. *Arch Neurol* 56(11):1378-1381.
- [5] Yamamoto, A. *et al.*, 2000. Reversal of neuropathology and motor dysfunction in a conditional model of Huntington's disease. *Cell* 101:57-66.
- [6] Meyer-Luchmann, M. *et al.*, 2008. Rapid appearance and local toxicity of amyloid-beta plaques in a mouse model of Alzheimer's disease. *Nature* 451:720-724.
- [7] Spires-Jones, T.L. *et al.*, 2009. Passive immunotherapy rapidly increases structural plasticity in a mouse model of Alzheimer disease. *Neurobiol Dis* 33:213-220.
- [8] McClellan, A.J. & Frydman, J. 2001. Molecular chaperones and the art of recognizing a lost cause. *Nat Cell Biol* 3:E51-E53.
- [9] Winklhofer, K.F. *et al.*, 2001. Geldanamycin restores a defective heat shock response *in vivo*. *J Biol Chem* 276:45160-45167.
- [10] Tanaka, M. *et al.*, 2004. Trehalose alleviates polyglutamine-mediated pathology in a mouse model of Huntington disease. *Nat Med* 10:148-154.

- [11] Davies, J.E. *et al.*, 2006. Trehalose reduces aggregate formation and delays pathology in a transgenic mouse model of oculopharyngeal muscular dystrophy. *Hum Mol Genet* 15:23-31.
- [12] WHO Food Additives
(<http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v46je05.htm>).
- [13] Berg, N.O. *et al.*, 1963. Correlation between morphological alterations and enzyme activities in the mucosa of the small intestine. *Scand J Gastroenterol* 8:703-712.
- [14] Hore, P. & Messer, M. 1968. Studies on disaccharidase activities in the small intestine of domestic cats and other carnivorous mammals. *Comp Biochem Physiol* 24:717-725.
- [15] <http://www.tga.gov.au/pdf/euguide/ich822602006.pdf>.
- [16] Langer R 1990. New methods of drug delivery. *Science* 28;249:1527-1533.
- [17] Oral Trehalose Therapy to Reverse Arterial Aging in Middle-Aged and Older Adults. <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01575288>.

Acknowledgement of the above references herein is not to be inferred as meaning that these are in any way relevant to the patentability of the presently disclosed subject matter.

BACKGROUND

Several groups of diseases resulting from trinucleotide repeat mutations are known. These diseases are characterized by abnormal stretches of amino acids in specific proteins encoded by a mutated gene. The mutant protein aggregates in cells causing typical cytotoxic cellular inclusion bodies.

Disorders identified as protein codon reiteration disorders contain expansions of a homopolymeric stretch of amino acids, specifically polyglutamine (poly Q) or polyalanine (poly A). At least eight neurodegenerative disorders have been associated with polyglutamine expansions, including Huntington's disease (HD), spinal and bulbar muscular atrophy (SBMA), dentatorubral and pallidolusian atrophy (DRPLA), and several forms of spinocerebellar ataxia (SCA). Polyalanine expansions are associated with several rare and severe congenital abnormalities, but also with oculopharyngeal muscular dystrophy (OPMD). Additional conditions associated with polyalanine expansions expansion may include dystrophic disorders.

One such disease is Oculopharyngeal Muscular Dystrophy (OPMD), a rare inherited myopathy characterized by ptosis, severe dysphagia and proximal limb weakness. Its estimated prevalence is 1:100,000 and the largest clusters reported were in families of French-Canadians origin in Canada and in the US (prevalence 1:1000), Bukhara Jews in Israel (prevalence 1:600) and Hispanics in New Mexico, Arizona Colorado and California [1-4]. OPMD is inherited, in most cases, as an autosomal dominant trait with complete penetrance. The disease is equally prevalent among both genders. The gene associated with the disease encodes the binding protein nuclear 1 protein (PABPN 1), a nuclear protein involved in pre-mRNA polyadenylation, transcription regulation, and mRNA nucleocytoplasmic transport. The mutation causing OPMD results in production of an abnormal poly (A) PABPN 1.

The disease is most often diagnosed in the fifth-sixth decades of life and progresses throughout the patient's life. By the age of 70, the majority of patients suffer from all or some of the following symptoms: severe dysphagia, ptosis, tongue atrophy and weakness, lower and upper limb proximal weakness, dysphonia, limitation in upward gaze and facial muscle weakness. As ptosis becomes more pronounced patients adapt the "astronomer posture" tilting of the head and upward gaze - further aggravating the dysphagia. The dysphagia starts with difficulty in swallowing solid food and progresses to liquids as well. As the dysphagia becomes more severe, patients become malnourished, cachectic, dehydrated and suffer from repeated aspiration pneumonia. OPMD does not seem to shorten life expectancy but is associated with severe debilitation and reduced quality of life.

There is no medical treatment or potential cure for OPMD. Current therapeutic strategies are confined to surgical interventions aimed at alleviating ptosis. Repeated cricopharyngeal dilatations are frequently used to relieve dysphagia. Myotomy of the upper esophageal sphincter muscles has also been employed. These procedures may provide only temporary relief and do not affect the progression of the disease that eventually leads to severe difficulty in swallowing, recurrent aspiration with increasing risk of aspiration pneumonia and severe weight loss which are the most common causes of mortality in OPMD patients.

Accordingly, there is an urgent need for compositions and therapeutic methods for alleviating the signs and symptoms of oculopharyngeal muscular dystrophy.

Although there are controversies regarding the specific role of protein aggregates in mechanisms underlying cell degeneration, a widely accepted view is that protein aggregates, the aggregation process and/or early oligomeric species are toxic and pivotal to degenerative pathology. An important piece of evidence was provided by studies showing the

neurodegenerative process can be shut down and even reversed if caught in an early stage [5]. Furthermore, newer studies have shown that turnover of many culprit proteins is rapid rather than slow [6, 7] and that inclusion formation is reversible as well as ensuing neurotransmitter and, most importantly, behavioral abnormalities.

One of the new therapeutic strategies is to enhance the native cellular defense mechanisms against misfolded and aggregated proteins, for example using molecular chaperones which facilitate normal folding and refolding of abnormal conformations back to the native state [8]. Drugs such as geldanamycin can modulate and enhance chaperone levels [9]. Geldanamycin, however, has substantial toxicity and does not penetrate well the blood-brain barrier. It is also possible to stimulate proteasome activity, although this approach might have the danger of altering the turnover of molecules normally regulated by proteasome degradation. In addition, oral administration of the disaccharide trehalose, a disaccharide known for its protein stabilizing effect, has been shown in HD mouse model to reduce polyglutamine aggregates, improve motor dysfunction and extend survival [10]. More recently, these findings have been reproduced upon oral administration of trehalose in a mouse model of OPMD [11].

Trehalose, a glucose disaccharide (α -G-glucopyranosyl α -D-glucopyranoside), is found in many plants, fungi, bacteria, insects and other invertebrates, where it serves as a natural excipient. Due to its unique physical and biochemical properties demonstrated in its ability to sustain and preserve a wide array of biological molecules, trehalose has found its use in several food and cosmetic products and most notably in therapeutic products. Trehalose is an approved ingredient in all major markets designated as GRAS food ingredient by the FDA [12].

Currently a clinical study is being conducted in the US which examines the effect of large amounts of orally-administered trehalose in the prevention of arterial aging. In this study, the researchers compare the effect of Trehalose or Maltose or a combination of the two drugs on a bio marker associated with arterial aging [17].

GENERAL DESCRIPTION

In one of its aspects the presently disclosed subject matter provides a method for treating or alleviating a disease associated with abnormal protein aggregation and/or inclusion bodies formation in myocytes, neurons and other cells or extracellular compartments, or at least one symptom associated therewith, in a human subject in need thereof comprising

parenterally administering to said subject a therapeutically effective amount of trehalose or a pharmaceutical formulation comprising a therapeutically effective amount of trehalose.

In the above and other embodiments the disease in accordance with the presently disclosed subject matter is any one of poly-alanine aggregation disorder, poly-glutamine aggregation disorder and a tauopathy, for example any one of oculopharengal muscular dystrophy (OPMD), spinocerebellar ataxias (SCA), Friedreich's ataxia, spinal and bulbar muscular atrophy (SBMA), Huntington's disease, Parkinson's disease, Alzheimer's disease and amyotrophic lateral sclerosis (ALS), dentatorubral-pallidoluytian atrophy (DRPLA), Pick's disease, Corticobasal degeneration (CBD), Progressive supranuclear palsy (PSP) and Frontotemporal dementia and parkinsonism linked to chromosome 17 (FTDP-17).

In the above and other embodiments the pharmaceutical formulation in accordance with the presently disclosed subject matter is an injectable solution for parenteral administration, in particular for intravenous, intramuscular and intraperitoneal administration.

In some embodiments the pharmaceutical formulation in accordance with the presently disclosed subject matter comprises trehalose as sole active ingredient, and optionally further comprises at least one pharmaceutically acceptable additive, carrier, excipient or diluent.

In all embodiments the concentration of trehalose in the formulation in accordance with the presently disclosed subject matter is between about 0.1 % (w/v) to about 50 % (w/v), in particular about 10 % (w/v).

In some embodiments the pharmaceutical formulation comprising trehalose in accordance with the presently disclosed subject matter has an osmolality of from about 280 to about 330 mOsm/Kg.

In the above and other embodiments the pharmaceutical formulation in accordance with the presently disclosed subject matter comprises less than 0.74 endotoxin units per ml solution.

The therapeutically effective amount of trehalose in accordance with the presently disclosed subject matter is from about 1 gram to about 100 gram for each single injection and no more than about 1 gram/kg body weight of said subject per day.

In other embodiments the therapeutically effective amount of trehalose or trehalose comprised in said pharmaceutical formulation is administered once daily at from about 10 mg/kg/day to about 1 gram/kg/day of trehalose.

In further embodiments the therapeutically effective amount of trehalose or trehalose comprised in said pharmaceutical formulation in accordance with the presently disclosed subject matter is administered at a single dose of 5, 8, 15, 30, 40 or 50 grams of trehalose.

The therapeutically effective amount of trehalose or pharmaceutical formulation comprising thereof according to the present disclosure may be administered chronically or periodically.

In the above and other embodiments the therapeutically effective amount of trehalose or pharmaceutical formulation comprising thereof according to the present disclosure is administered at a frequency of between once daily to once per month.

In further embodiments the therapeutically effective amount of trehalose or trehalose comprised in said pharmaceutical formulation according to the present disclosure is administered at a single injection administration once a week.

In still further embodiments the therapeutically effective amount of trehalose or pharmaceutical formulation comprising the same in accordance with the presently disclosed subject matter is intravenously administered at a single dose of from about 5 to about 35 grams of trehalose, which may be administered once daily, once every other day, twice a week, once a week, once every two weeks, once every three weeks or once a month.

In the above and other embodiments the pharmaceutical formulation in accordance with the presently disclosed subject matter is an injectable solution and wherein the rate of administration is such that the maximum endotoxin level is less than 5 endotoxin units per kilogram of body weight per hour.

In some embodiments administration of the therapeutically effective amount of trehalose comprised in said pharmaceutical formulation as herein defined, which is adapted for intravenous administration, is completed within from about 75 to about 120 minutes, specifically within less than 90 minutes.

In other embodiments administration in accordance with the presently disclosed subject matter comprises a dosing regimen of equal doses, or gradually increasing doses, or gradually decreasing doses of trehalose or pharmaceutical formulation comprising the same.

In another one of its aspects the presently disclosed subject matter provides trehalose or a pharmaceutical formulation comprising same, for use in a method for treating or alleviating a disease associated with abnormal protein aggregation and/or inclusion bodies formation in myocytes, neurons and other cells or extracellular compartments or at least one symptom associated therewith, in a human subject in need thereof, said method comprising

parenterally administering to said subject a therapeutically effective amount of trehalose or a pharmaceutical formulation comprising the same.

In a further aspect the presently disclosed subject matter provides an aqueous pharmaceutical formulation comprising a therapeutically effective amount of trehalose as a sole active ingredient, wherein the formulation has a pH about 4.5 to 7.0 and contains less than 0.74 endotoxin units per ml and wherein said pharmaceutical formulation is adapted for parenteral administration.

The presently disclosed subject matter further provides a kit comprising:

- (a) pharmaceutically acceptable trehalose or active derivative thereof;
- (b) at least one pharmaceutically acceptable additive, carrier, excipient and diluent;
- (c) means for preparing an injectable aqueous solution of the trehalose by mixing said trehalose with at least one of said additive, carrier, excipient and diluent;
- (d) means for parenterally administering said injectable solution to a patient in need;
- (e) instructions for use.

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

In order to better understand the subject matter that is disclosed herein and to exemplify how it may be carried out in practice, embodiments will now be described, by way of non-limiting example only, with reference to the accompanying drawings, in which:

Fig. 1 Mean plasma concentration of trehalose after i.v. or p.o. administration.

A graph showing the fluctuations in the plasma concentration of trehalose administered intravenously (iv) or orally (po) to rats, during 8 hours post administration.

Fig. 2 Plasma and muscle concentrations of trehalose after intravenous administration

A bar graph showing the fluctuations in plasma and muscle concentrations of trehalose administered intravenously (1 g/kg) to rats, during 72 hours post administration.

DETAILED DESCRIPTION OF EMBODIMENTS

The presently disclosed subject matter is based on the surprising finding that upon parenteral, e.g. intravenous administration of an aqueous formulation comprising trehalose,

therapeutically effective amounts of trehalose reached the plasma and accumulated in muscle of the tested animals as compared to plasma and muscle levels of trehalose obtained following oral administration of such formulations.

Trehalose is known for its ability to sustain and preserve a wide array of biological molecules. Trehalose has been used in a variety of research applications and is contained in several commercially available therapeutic products, including Herceptin, Avastin, Lucentis, and Advate, where it serves mainly as a lyoprotectant. Although trehalose is widely used as an excipient/additive together with another active ingredient, its use as a therapeutically active ingredient *per se* is rather exceptional.

Trehalose is capable of inhibiting intra-cellular aggregation of abnormal proteins associated with neurodegenerative diseases and myopathies. The leading example is the aggregation-suppressing effect of trehalose on the mutant huntingtin, a polyglutamine protein causing Huntington's disease (HD). Oral administration of trehalose to transgenic HD mice (0.2%-5% trehalose in drinking water consumed spontaneously in the course of 5-9 weeks) led to inhibition of formation of intra-nuclear huntingtin aggregates in the brain and liver and, more importantly led to improvement of HD-related motor symptoms.

Interestingly, therapeutic use of trehalose, especially in the context of neuronal and muscular diseases, is significantly precluded by the fact that trehalose is hydrolyzed by the intrinsic enzyme trehalase at the epithelial brush border in the small intestine [13, 14], due to which only a small fraction of any enterally administered dose reaches blood stream, neuronal or muscle tissues. The present disclosure aims at introducing a novel therapeutic regime using parenteral administration of trehalose, thereby achieving higher bioavailability and therapeutic efficacy in the treatment of myopathic and neurodegenerative diseases associated with abnormal protein aggregation, specifically polyalanine polyglutamine and tauopathies, disorders, and OPMD in particular.

Thus the presently disclosed subject matter provides a method for treating or alleviating a disease associated with abnormal protein aggregation and/or inclusion bodies formation in myocytes, neurons and other cells or extracellular compartments, or at least one symptom associated therewith, in a human subject in need thereof comprising parenterally administering to said subject a therapeutically effective amount of trehalose or a pharmaceutical formulation comprising a therapeutically effective amount of trehalose.

As herein defined the term "*disease associated with abnormal protein aggregation and/or inclusion bodies formation in myocytes, neurons and other cells or extracellular compartments*" refers to any disease associated with protein aggregation or protein

misfolding, where the common underlying biological feature of these diseases being the aggregation of certain peptides and proteins, thereby generating a cascade of pathological events, including the secondary aggregation of various other proteins and the consequent failure of protein homeostasis to preserve normal biological function.

The term "*treating or alleviating*" as herein defined refers to achieving a therapeutic effect, ameliorating, relieving or reducing the severity and/or frequency of at least one sign or symptom associated with diseases as herein defined, elimination of signs or symptoms and/or underlying cause, prevention of the occurrence of symptoms and/or their underlying cause (e.g., prophylactic therapy), improvement or remediation of damage and eliminating or reducing the extent of protein aggregation.

Symptoms associated with the diseases as herein defined include, but are not limited to, drooping eyelids (a condition known as "ptosis"), difficulty in swallowing (called "dysphagia"), muscle fatigue, movement/motion disorders and cognitive disorders to name but few.

In particular, where the disease to be treated is OPMD, the formulations and methods described herein are useful in the treatment of the signs and symptoms of OPMD. Signs and symptoms of OPMD include severe dysphagia, ptosis, tongue atrophy and weakness, lower and upper limb proximal weakness, dysphonia, limitation in upward gaze and facial muscle weakness.

As known in the art, ample diseases and disorders are defined as "*disease associated with abnormal protein aggregation and/or inclusion bodies formation in myocytes, neurons and other cells or extracellular compartments*". For example, the presently disclosed subject matter provides a method for treating or alleviating a disease associated with abnormal protein aggregation which is a neurodegenerative disorder, a poly-glutamine or a poly-alanine aggregation disorder, a protein codon reiteration disorder, a myopathy, and a tauopathy, to name but few.

The term "*neurodegenerative disorder*" as herein defined refers to hereditary or sporadic conditions characterized by progressive nervous system dysfunction, specifically disorders of this group that are associated with formation of abnormal protein aggregates, also known as inclusion bodies formation. Examples for a neurodegenerative disorder which is associated with abnormal protein aggregation are Amyotrophic lateral sclerosis (ALS), Alzheimer's disease, Parkinson's disease and others.

The terms "*poly-glutamine*", "*poly-alanine aggregation disorder*" or "*protein codon reiteration disorder*" as herein defined refer to disorders associated with formation of

intracellular polyglutamine or polyalanine aggregates, preferably referring to oculopharyngeal muscular dystrophy (OPMD), Huntington's disease (HD), spinal and bulbar muscular atrophy (SBMA), dentatorubral-pallidoluysian atrophy (DRPLA) and spinocerebellar ataxia (SCA).

The term "*myopathy*" as herein defined refers to inherited or acquired degenerative disease involving atrophy of the muscle fibers, in the context of present disclosure particularly referring to OPMD.

The term "*tauopathy*" as herein defined refers to neurodegenerative diseases associated with tau-pathology, prototypic intracellular aggregation of tau microfilaments, in the context of present disclosure particularly referring to Pick's disease, corticobasal degeneration (CBD), progressive supranuclear palsy (PSP) and frontotemporal dementia and parkinsonism linked to chromosome 17 (FTDP-17).

Tauopathies are known as diseases caused by mutations leading to misfolding of Tau microtubule-associated protein that binds and stabilizes microtubules in neuronal cells. Tau pathology is a prominent feature of the sporadic Alzheimer's disease (AD), but is also seen in a variety of other related neurodegenerative diseases, such as Pick's disease, Corticobasal degeneration (CBD), Progressive supranuclear palsy (PSP) and Frontotemporal dementia and parkinsonism linked to chromosome 17 (FTDP-17). More than 30 different inherited mutations or nucleotide substitutions in the FTDP-17 gene on chromosome 17q21 have been related to neurodegenerative disease manifesting a prototypic intracellular aggregation of tau microfilaments. Tau mutation and by analogy tau dysfunction in inherited and in sporadic diseases may be pathogenic through mechanisms involving both loss of function (decreased microtubules stabilization) and toxic gain of function (increased fibril formation).

Thus in the above and other embodiments the disease is any one of poly-alanine aggregation disorder, poly-glutamine aggregation disorder and a tauopathy.

In the above and other embodiments the disease is as herein defined is any one of oculopharyngeal muscular dystrophy (OPMD), spinocerebellar ataxias (SCA), Friedreich's ataxia, spinal and bulbar muscular atrophy (SBMA), Huntington's disease, Parkinson's disease, Alzheimer's disease and amyotrophic lateral sclerosis (ALS), dentatorubral-pallidoluysian atrophy (DRPLA), Pick's disease, Corticobasal degeneration (CBD), Progressive supranuclear palsy (PSP) and Frontotemporal dementia and parkinsonism linked to chromosome 17 (FTDP-17).

In some embodiments the disease is as herein defined is oculopharyngeal muscular dystrophy (OPMD).

As indicated above, OPMD is caused by inherited abnormal expansions of polyalanine in the poly A binding protein nuclear 1 protein (PABPN1) leading to PABPN1 misfolding and formation of tubule-filamentous inclusions/aggregates in nuclei of the affected muscle cells. Oral administration of trehalose to transgenic OPMD mice (2% trehalose in drinking water consumed spontaneously during 4-6 months) was shown to significantly reduce aggregation formation and toxicity of the mutant PABPN1 in myocytes. Overall, oral trehalose was shown to delay the OPMD onset, attenuate the disease phenotype, decrease polyalanine protein aggregate formation and decrease cell death, thus suggesting that trehalose may be a potent anti-aggregation therapy for OPMD and other protein codon reiteration disorders.

As indicated in the accompanying Examples, the inventors have shown that trehalose can be successfully delivered to muscle, which is the target organ in treatment of various diseases and disorders as herein defined, for example but not limited to OPMD.

Huntington's disease and OPMD share a common genetic basis as both are caused by inherited trinucleotide expansion mutations in a disease causative gene. The HD gene (HTT), located on chromosome 4p16, contains repetitive trinucleotide sequences (CAG)_n encoding for a polyglutamine (poly Q) stretch. While the normal HTT gene variants contain 7-35 repeats, HD-related variants are above that range and the extent of repeat expansions is correlated to the severity and earlier onset of HD symptoms (the effect termed anticipation). Analogous (CAG)_n repeat expansions mutations were associated with other polyglutamine disorders, such as SBMA, DRPLA and several ataxias belonging to the group of SCA. Similarly, the OPMD-related gene, PABPN1 on chromosome 14q11 contains trinucleotide repeats (CGC)_n encoding polyalanine (poly A), wherein (CGC)₆ repeats is the normal threshold above which OPMD is anticipated with an increased number of repeats.

Thus in other embodiments the disease is as herein defined is Huntington's disease.

In view of the apparent lack of medical therapy for HD, OPMD and other related disorders apart from medications that lessen some motor and psychiatric symptoms, therapies that directly interfere with the disease-causing mechanisms are sorely needed.

In some embodiments the disease is as herein defined is spinocerebellar ataxia (SCA). As known in the art there are many types of spinocerebellar ataxia, with the most common Spinocerebellar ataxia including Friedreich's ataxia, SCA 1,3,8, and more. Many SCAs fall under the category of polyglutamine diseases, which are caused when a disease-associated protein (i.e., ataxin-1, ataxin-3, etc.) contains a glutamine repeat beyond a certain threshold.

In other embodiments disease is as herein defined is spinal and bulbar muscular atrophy (SBMA). The disease SBMA, also known as spinobulbar muscular atrophy, bulbo-

spinal atrophy, X-linked bulbospinal neuropathy (XBSN), X-linked spinal muscular atrophy type 1 (SMA1), and Kennedy's disease (KD), as known in the art, is a debilitating neurodegenerative disease resulting in muscle cramps and progressive weakness due to degeneration of motor neurons in the brain stem and spinal cord.

In further embodiments disease is as herein defined is Huntington's disease, Parkinson's disease, Alzheimer's disease or amyotrophic lateral sclerosis (ALS).

Huntington's disease (HD) is a neurodegenerative genetic disorder that affects muscle coordination and leads to cognitive decline and psychiatric problems; Parkinson's disease is a degenerative disorder of the central nervous system; Alzheimer's disease (AD) is manifested by short term memory loss, confusion, irritability, aggression, mood swings, trouble with language, and long-term memory loss; and amyotrophic lateral sclerosis (ALS, also referred to as motor neuronal disease or Lou Gehrig's disease) is a neurodegenerative disease characterized by rapidly progressive weakness due to muscle atrophy and muscle spasticity, difficulty in speaking (dysarthria), swallowing (dysphagia), and breathing (dyspnea).

As indicated above, the presently disclosed subject matter provides a method for treating or alleviating a disease as herein defined in a human subject in need thereof comprising parenterally administering to said subject a therapeutically effective amount of trehalose or a pharmaceutical formulation comprising same.

In the above reports of trehalose as a therapeutic agent for diseases associated with protein aggregation, there is need for exceedingly high and continuous oral intake of trehalose in order to achieve the desired therapeutic effect in neuronal or muscle tissue, due to its degradation in the intestines.

The instant disclosure is directed to a therapeutic regimen using trehalose that is administered to a subject in need by parenteral administration.

Thus in some embodiments the pharmaceutical formulation as herein defined is an injectable solution for parenteral administration.

The term "*subject in need thereof*" refers to a subject suffering from a disease as herein defined, for example but not limited to HD or OPMD or another polyglutamine or polyalanine aggregation disorder.

The therapeutically effective amount of trehalose can be from about 10 mg to about 1,000 mg/Kg body weight per day. The trehalose can be comprised as active ingredient in a pharmaceutical formulation suitable for parenteral administration. Administration can be based on a daily regime as a single dose or multiple doses by a single parenteral administration or as multiple doses by multiple parenteral administrations, respectively.

Alternatively or additionally, administration can be periodic, for example every other day, three times weekly, twice weekly, once weekly, or once monthly, and frequency of administration can be varied according to the patient condition.

The term parenterally as herein defined refers to a route of administration where the desired effect is systemic and the active agent (herein defined as trehalose), is administered by routes other than the digestive tract, for example intravenous, intramuscular and intraperitoneal administration.

As indicated above, trehalose is known in the art as a lyoprotectant. As such the safety and toxicity of trehalose has been extensively investigated, and the substance was found to be safe when administered both orally and intravenously, in doses that are substantially higher than the intended therapeutic dose.

As shown in the Examples below, a pharmaceutical formulation comprising trehalose as sole active ingredient was parenterally administered resulting in relatively high plasma and muscle levels.

Thus, in some embodiments the pharmaceutical formulation as herein defined comprises trehalose as sole active ingredient, and optionally further comprises at least one pharmaceutically acceptable additive, carrier, excipient or diluent.

In other words, in the presently disclosed subject matter trehalose is the only active agent or ingredient. Notwithstanding the above, trehalose or a pharmaceutically formulation comprising same may be used in combination with other therapies or treatments for treating or alleviating a disease associated with abnormal protein aggregation.

The term "*trehalose*" as herein defined refers to a disaccharide glucose α -D-glucopyranosyl α -D-glucopyranoside. The term trehalose also refers to any active derivative of trehalose, for example hydrides and salts thereof.

Trehalose is a naturally occurring disaccharide comprised of a 1,1 linkage of two D-glucose molecules. It is a non-reducing sugar that is not easily hydrolyzed by acid. Its molecular formula is $C_{12}H_{22}O_{11}$ and its molecular weight is 342.31 Dalton. Other names used to describe the α, α form, the isomer commonly referred to as 'trehalose', are α, α -Trehalose, α - δ -glucopyranosyl, α - δ -glucopyranoside, mushroom sugar, mycose.

As indicated above, trehalose is well known for its protein-stabilizing properties. It is used extensively in many applications as a stabilizer of frozen food, in freeze-drying of biological systems and cells, as a stabilizer of therapeutic parenteral proteins and as an excipient in tablets and IV solutions. Trehalose is recognized as a GRAS (Generally Regarded as Safe) food ingredient by the FDA and is listed on the USP-NF (United States

Pharmacopoeia National Formulary), EP (European Pharmacopoeia) and JP (Japanese Pharmacopoeia).

Like all disaccharides, trehalose is metabolized at the epithelial brush border to two D-glucose molecules. Less than 0.5% of ingested trehalose is absorbed into the blood stream where it is further metabolized by liver and kidney by trehalase. Oral trehalose in amounts exceeding 40- 50 gram per day causes diarrhea and bloating. Thus in order to achieve therapeutic amounts of trehalose in the muscle cells it was necessary to circumvent the massive metabolism in the gastrointestinal tract (GI) tract. Therefore the inventors developed an intravenous (IV) solution of trehalose.

The term "*formulation*" as herein defined refers to a composition comprising trehalose as active ingredient and optionally further comprising additional active ingredient such as anti-inflammatory agent, and at least one pharmaceutically acceptable additive, carrier, excipient or diluents as well known in the art. This formulation may further comprise a trehalase (a glycoside hydrolase enzyme catalyzing the conversion of trehalose to glucose found in the intestine, kidney and liver) inhibitor, i.e. competitive or other inhibitor of the trehalase enzyme.

Particular pharmaceutical formulations are suitable for parenteral administration, specifically injectable solutions, wherein the concentration of trehalose in said formulation is between about 0.1 % (weight/volume) to about 50 % (weight/volume), more specifically wherein the concentration of trehalose in the formulation as herein defined is, but is not limited to, about 8%, 9%, 10 %, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 20% or 25% (weight/volume).

When referring to trehalose, the term trehalose encompasses not only the specified molecular entity but also its pharmaceutically acceptable, pharmacologically active analogs, including, but not limited to, salts, polymorphs, esters, amides, prodrugs, adducts, conjugates, active metabolites, and the like.

Thus the active agent, trehalose, may be administered in the form of the compound *per se* as well as in the form of a salt, polymorph, ester, amide, prodrug, derivative, or the like, provided the salt, polymorph, ester, amide, prodrug or derivative is suitable pharmacologically. Salts, esters, amides, prodrugs and other derivatives of the active agents may be prepared using standard procedures known to those skilled in the art of synthetic organic chemistry and described, for example, by J. March, Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms and Structure, 4th Ed. (New York: Wiley-Interscience, 1992). For any active agents that may exist in enantiomeric forms, the active agent may be incorporated into the present formulations either as the racemate or in enantiomerically pure form.

Salts are compounds that ionize in aqueous solutions and may be employed, for example, to adjust the tonicity of the solution. If the active agent is present in the form of a salt, additional salts may be added to the composition in order, for example, to effect ion exchange with the active agent. Salts suitable for use with the compositions described herein are known in the art and include, for example, lithium, sodium, potassium, calcium, and magnesium salts having appropriate counterions that may be selected from chloride, bromide, iodide, carbonate, phosphate, nitrate, silicate, sulfate, phosphite, nitrite, sulfite, and the like.

Buffers are compounds or solutions that are employed to aid in maintaining the concentration of an analyte within a desired range. For example, pharmaceutically acceptable pH buffers are used to maintain the acidity or basicity of a solution within a pharmaceutically acceptable range. Buffers for use in the compositions disclosed herein may be any known or hereafter discovered buffer.

Excipients are inactive ingredients that may be employed in the compositions described herein for a variety of reasons. A wide range of excipients are described in the literature (e.g., Rowe et al., Handbook of Pharmaceutical Excipients, McGraw Hill, 2006).

Additives and diluents are well known in the art.

In some specific embodiments the pH of the formulation is about 4.5 to 7.0, the osmolality of the formulation is about 280-330 mOsm/kg, the formulation contains less than 1.0, 0.9, 0.8, 0.7, 0.6, 0.5, 0.4, 0.3, 0.2, 0.1 or less endotoxin units per mL and the aqueous formulation is about 50%, 40%, 30%, 20%, 10%, 5% or less trehalose (w/v).

Thus the presently disclosed trehalose delivery systems, for example formulations comprising trehalose as sole active ingredient, can generally comprise a buffering agent (pH adjusting additives), an agent which adjusts the osmolality thereof, and optionally, one or more pharmaceutically acceptable carriers, excipients and/or additives as known in the art. Supplementary pharmaceutically acceptable active ingredients can also be incorporated into the formulations.

For formulations as herein defined administered as aqueous or other solvent-based dosage forms (e.g., for parenteral administration), a variety of liquid carriers may be used, in particular water or saline. Aqueous solutions may include salts, buffers, and the like. The carrier can be solvent or dispersion medium suitable for parenterally-administrable compositions containing, for example, water, saline, ethanol, polyol (for example, glycerol, propylene glycol, and liquid polyethylene glycol, and the like), suitable mixtures thereof, and vegetable oils. The proper fluidity can be maintained, for example, by the use of a coating,

such as lecithin, by the maintenance of the required particle size in the case of dispersion and by the use of surfactants. Water is an essential additive (or carrier).

Thus as used herein the term "*pharmaceutically acceptable carrier*" includes any and all solvents, dispersion media, coatings, antibacterial and antifungal agents and the like. The use of such media and agents for pharmaceutical active substances is well known in the art. Except as any conventional media or agent is incompatible with the active ingredient, its use in the therapeutic composition is contemplated. It is contemplated that the active agent can be delivered by any acceptable parenteral route and in any pharmaceutically acceptable dosage form.

For purposes of parenteral administration, formulations in suitable oil such as sesame or peanut oil or in aqueous propylene glycol can be employed, as well as sterile aqueous solutions of the corresponding water-soluble salts. Such aqueous formulations may be suitably buffered, if necessary, and the liquid diluent first rendered isotonic with sufficient saline or glucose. These aqueous formulations are especially suitable for intravenous, intramuscular, subcutaneous and intraperitoneal injection purposes. In this connection, the sterile aqueous media employed are all readily obtainable by standard techniques well-known to those skilled in the art.

Methods of preparing various pharmaceutical formulations with a certain amount of active ingredient are known, or will be apparent in light of this disclosure, to those skilled in this art.

As described in the accompanying Examples, the inventors have prepared a specific injectable, aqueous formulation comprising trehalose, that is currently used in an on-going study in OPMD patients, as described below in Example 6 (and may be used for treatment of other diseases associated with abnormal protein aggregation).

Given the fact that over 99.5% of the trehalose is not absorbed into the blood stream, and that oral amounts of trehalose higher than 50 g a day in humans frequently cause diarrhea, bloating and discomfort as indicated above, the most effective way to ensure that adequate amounts of trehalose indeed reach the muscle cells is to circumvent the extensive gut metabolism and administer trehalose by an intravenous (IV) solution.

The disclosed injectable solution of trehalose can be intravenously administered to OPMD patients at a single administration (injection) during about 75 to 120 minutes, for example 90 minutes, every day, every other day, twice a week, once a week, once in 10 days, once every two weeks or once a month, for a defined number of administrations as will be determined by the attending physician.

Based on well-known pharmacokinetic profile of trehalose, initial once a week, 24-week IV therapy will enable trehalose to enter the muscle cells and potentially exert its therapeutic effect, previously demonstrated in animal models. The amounts to be administered in the weekly injection are based on known safety studies as well as the rate of metabolism and clearance from the blood so as to enable trehalose to reach muscle cells before it is cleared from the blood.

The doses are calculated based on the expected plasma and tissue distribution of trehalose, effective concentration of trehalose in diseased cells and known safety doses in multiple animal studies.

Following initial treatment, once weekly administration can be chronic, at set time points, for spells of several or scores of weeks, for example additional consecutive 48 weeks, thus a total of 72 weeks of treatment, or administration can be periodic.

In some embodiments, the osmolality of the disclosed aqueous trehalose injectable pharmaceutical formulation is from about 280 to about 330 mOsm/Kg.

As indicated above, the inventors have shown successful delivery of trehalose to plasma and muscle by parenteral, specifically IV administration. Thus in some embodiments administration of trehalose or a pharmaceutical formulation comprising same may be in any one of intravenous, intramuscular and intraperitoneal administration.

In one embodiment, the purified trehalose is substantially free of contaminants resulting from its enzymatic preparation process, such as organic solvents used in the process (e.g., ammonium, acetonitrile, acetamide or alcohols), TFA, ether or other contaminants. In this context "*substantially*" free of contaminants means that the contaminant content of any residual peptide originating from the enzymatic preparation process at the end of the purification process is preferably less than 0.5%, less than 0.3%, less than 0.25%, less than 0.1 %, less than 0.05%, less than 0.04%, less than 0.03%, less than 0.02%, less than 0.01 %, less than 0.005%, less than 0.003%, or less than 0.001 % of the total weight of the trehalose. The content of contaminants can be determined by conventional methods such as gas chromatography.

In specific embodiments, the residual solvents in the purified trehalose are less than the limits set in the ICH guidelines, e.g., IMPURITIES: GUIDELINE FOR RESIDUAL SOLVENTS Q3C(R5) (available at: <http://www.tga.gov.au/pdf/euguide/ich822602006.pdf>) [15]). For example, the purified trehalose contains <5000 ppm ethanol (e.g., <140 ppm), and/or <3000 ppm methanol.

Endotoxins (also known as lipopolysaccharides (LPS) and lipoglycans) are large molecules consisting of a lipid and a polysaccharide composed of O-antigen, outer core and inner core joined by a covalent bond; they are found in the outer membrane of Gram-negative bacteria, and elicit strong immune responses in animals. Endotoxins are well-known contaminants in substances purified by using bacterial systems and their removal is thus crucial for safety of using therapeutic formulations comprising such substances.

As shown in the accompanying Examples, the presently disclosed formulation comprises less than 5 endotoxin units per kilogram of body weight of a patient administered with the formulation, per hour of administration.

Thus in some embodiments the pharmaceutical formulation as herein defined comprises less than 0.74 endotoxin units per ml solution.

Therapeutically effective amount as herein defined will depend on a number of factors and will vary from subject to subject and may be determined by considerations well known to a skilled person in the field of the invention (e.g. a skilled physician). Such factors include the severity of the symptoms, the patient's age, weight and general condition, and the judgment of the prescribing physician.

Generally, by the term "*therapeutically effective amount*" it is meant a nontoxic but sufficient amount of trehalose to provide the desired effect, namely the treating or alleviating a disease associated with abnormal protein aggregation and/or inclusion bodies formation in myocytes, neurons and other cells or extracellular compartments.

The term "*therapeutically effective amount or pharmaceutical composition comprising thereof*" is to be understood as the amount of trehalose comprised in the administered formulation. The amount of the formulation itself may vary according to the concentration of the trehalose comprised therein (namely, such that the concentration of trehalose in said formulation is between about 0.1 % (w/v) to about 50 % (w/v) and such that the maximum endotoxin level in the administered formulation is less than 5 endotoxin units per kilogram of body weight per hour).

Therapeutically effective amount of trehalose refers to an amount of from about 1 gram to about 100 gram for each daily injection and no more than 1 g/kg body weight of said subject per day of a treated human subject. Amount may considerably vary. Thus the range can be from each of 10, 20, 50, 75, 100, 150, 200, 300 mg/Kg body weight per day up to each of 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950 and 1000 mg/Kg body weight per day.

Thus in other embodiments, therapeutically effective amount of trehalose as herein defined is from about 1 gram to about 100 gram for each single injection and no more than about 1 gram/kg body weight of said subject per day.

The terms "*injection*" and "*infusion*" are used interchangeably and refer to parenteral administration of the formulation as herein defined.

The therapeutically effective amount of trehalose or pharmaceutical composition comprising thereof is administered parenterally, and can be administered as a single dose or multiple doses, which may be identical or different, by a single administration per day, or multiple doses can be parenterally administered by multiple daily or weekly or monthly or more prolonged administrations.

A therapeutically effective amount of trehalose or pharmaceutical composition according to the above, administered IV, IP or IM, as a single dose or multiple doses, which may be identical or different, by a single administration per day, or optionally as multiple doses, which may be identical or different, by multiple administrations per day, or further optionally in a dosing regimen of equal doses, or gradually increasing doses, or gradually decreasing doses, or further chronically or periodically.

Optimal dosing schedules may be calculated from measurements of drug accumulation in the body of the patient. Optimal doss can be determined by dosing methodologies and repetition rates. In general, dosage is calculated according to body weight, and may be given once or more daily, weekly, monthly or yearly, or even once every few years. Persons of ordinary skill in the art can readily estimate repetition rates for dosing based on measured residence times and concentrations of the combined composition of the invention in bodily fluids or tissues. Following successful treatment, it may be desirable to have the patient undergo maintenance therapy to prevent the recurrence of the disease state, wherein the combined composition of the invention is administered in maintenance doses, once or more daily.

In some embodiments the therapeutically effective amount of trehalose or pharmaceutical formulation comprising same as herein defined is administered chronically.

The term "*chronically*" as herein defined refers to a constant regime of administration occurring at a predetermined frequency. Thus administration may be based for example on a daily, weekly or monthly regime as a single parenteral dose or multiple parenteral, specifically intravenous doses.

In some embodiments the frequency as herein defined is of between once daily to once per month, namely said therapeutically effective amount of trehalose or pharmaceutical

formulation comprising thereof is administered at a frequency of between once daily to once per month.

In other embodiments the frequency as herein defined is every day (daily), namely seven times per week or six, five, four or three times per week, twice or once per week, once in every two weeks, once in every three weeks or once per month.

In specific embodiment the frequency as herein defined is once per week. In other embodiments the therapeutically effective amount of trehalose or trehalose comprised in said pharmaceutical formulation is administered at a single injection administration once a week.

In the above and other embodiments the therapeutically effective amount of trehalose or trehalose comprised in said pharmaceutical formulation is administered once daily at from about 10 mg/kg/day to about 1 gram/kg/day of trehalose.

As indicated in the accompanying Examples, in an ongoing clinical study an aqueous injectable pharmaceutical formulation comprising trehalose is administered intravenously at a weekly dosing of 8, 15 or 30 gram per subject.

Thus in the above and other embodiments the therapeutically effective amount of trehalose or pharmaceutical formulation comprising the same is intravenously administered at a single dose of from about 5 to about 35 grams of trehalose, which may be administered once daily, once every other day, twice a week, once a week, once every two weeks, once every three weeks or once a month.

In further embodiments the therapeutically effective amount of trehalose or trehalose comprised in said pharmaceutical formulation is administered at a single dose of 5, 8, 15, 30, 40 or 50 grams of trehalose.

In other embodiments the therapeutically effective amount of trehalose or a pharmaceutical formulation comprising the same is adapted for an injectable solution and wherein the rate of administration is such that the maximum endotoxin level is less than 5 endotoxin units per kilogram of body weight per hour.

By the term "*rate of administration*" it is meant the rate of infusion (or dosing rate).

In further embodiments the therapeutically effective amount of trehalose or a pharmaceutical formulation comprising the same is adapted for intravenous administration and said administration is completed within less than about 75 to 120 minutes, for example but not limited to within 90 minutes. The period of administration will also depend on the volume/amount of the disclosed injectable trehalose formulation to be administered.

Thus in some embodiments administration of the therapeutically effective amount of trehalose comprised in said pharmaceutical formulation adapted for intravenous

administration is completed within from about 75 to about 120 minutes, specifically within less than 90 minutes.

In still further embodiments the administration of trehalose or a pharmaceutical formulation comprising the same comprises a dosing regimen of equal doses, or gradually increasing doses, or gradually decreasing doses of trehalose or pharmaceutical formulation comprising the same.

In some embodiments the therapeutically effective amount of trehalose or pharmaceutical formulation comprising thereof is administered periodically.

By the term "*periodically*" it is meant that the administration of trehalose may be conducted at consecutive chronic administration regimens as herein defined which may be separated in time by periods of "no treatment" (or "drug holiday", i.e. when the patient as herein defined stops taking the active agent for a certain period of time) according to the patient condition.

Determining the efficaciousness of the treatment as herein defined may be performed by any method known to a person skilled in the art. For example, when the disease to be treated is OPMD, efficaciousness of the treatment may be performed in association with any known method for diagnosing or treating OPMD. Alleviation of one or more signs or symptoms of OPMD indicates that the compound confers a clinical benefit.

Thus in some embodiments the disease according to the presently disclosed subject matter is OPMD and in such case efficaciousness of treatment as herein defined may be performed by monitoring patient's weight; performing a "*drinking test*", in which the patient is requested to drink 80 ml of ice-cold water, and the time which this volume has been fully consumed (in seconds) will be recorded; and by fiberoptic endoscopic evaluation of swallowing (FEES), which is a useful supplementary tool for studying dysphagia. The FEES procedure involves introducing a flexible fiberoptic endoscope transnasally to the patient's hypopharynx where the clinician can clearly view laryngeal and pharyngeal structures. The patient is then led through various tasks (e.g. food and liquid boluses) to evaluate the sensory and motor status of the pharyngeal and laryngeal mechanism. Information obtained from this examination includes ability to protect the airway, ability to sustain airway protection for a period of several seconds, ability to initiate a prompt swallow without spillage of material into the hypopharynx, timing and direction of movement of the bolus through the hypopharynx, ability to clear the bolus during the swallow, presence of pooling and residue of material in the hypopharynx, timing of bolus flow and airway protection, sensitivity of the pharyngeal/laryngeal structures and the effect of anatomy on the swallow.

Additional tests for evaluating efficaciousness of treatment of OPMD include the SWAL-QOL test (a 44 item tool that asks patients to rate several factors about 10 quality-of-life concepts related to swallowing on a 5 point scale) that was developed for measuring objectively a patient's perspective of swallowing and the muscle strength assessment (assessment of weakness of the proximal muscles, including "stair climb" test, "30 second sit-to-stand" test, "30 second weight arm raise" test, etc.).

The term "*subject in need thereof*" as herein defined is a subject suffering from a disease or disorder as herein defined, namely a disease associated with abnormal protein aggregation and/or inclusion bodies formation in myocytes, neurons and other cells or extracellular compartments.

In certain embodiments, the present disclosure provides a formulation comprising trehalose or a physiologically acceptable derivative thereof wherein trehalose (or derivative thereof) or at least a portion of the trehalose or derivative thereof is formulated for sustained and/or controlled release and a portion of the trehalose or derivative thereof is formulated for immediate release when administered to a subject.

In certain embodiments, effective serum levels of the active ingredient trehalose or derivative thereof are achieved within from about 10 to about 20 or 30 or 40 or 50 or 60 minutes following trehalose administration. In certain embodiments, effective serum levels of the active ingredient are achieved within from about 5 to about 20 or 30 or 40 or 50 or 60 minutes following trehalose administration. In certain embodiments, effective serum levels of the active ingredient are achieved within from about 20 to about 20 or 30 or 40 or 50 or 60 minutes following trehalose administration. In certain embodiments, effective serum levels of the active ingredient are achieved within about 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50 or 60 minutes following trehalose administration.

The present inventors have developed innovative approaches for the administration of trehalose based on parenteral routes. These approaches provide for a rational design of delivery systems (e.g. formulations) with desired properties based on the meticulous selection of the carrier, e.g. appropriate surfactants/co-surfactants composition or micro/nano particles (such as liposomes or nano-liposomes) or polymer entrapping the active ingredients, or other additives or excipients, for the delivery system of interest.

The parenteral ways include subcutaneous and transdermal (diffusion through the intact skin) administration. In certain embodiments, the formulations of the invention are administered by invasive modes of treatment such as by intravenous, intramuscular and like administration.

Another way of administration can make use of red blood cells loaded with high quantities of trehalose, which are known in the art. It is currently known that loading red blood cells with high amounts of trehalose enhances their viability. Such red blood cells, highly loaded with trehalose can serve as a vehicle for intravenous delivery of trehalose to a subject in need, in accordance with the present disclosure.

Administration of trehalose for medical uses requires safe and efficient delivery systems. The present disclosure provides delivery systems (e.g. formulations for parenteral administration) for safe delivery of a variety of substances due to their special physico-chemical features. The delivery systems significantly enhance efficiency and quality of trehalose absorption based on its unique physicochemical features, which enables lower concentrations or amounts of active substance to be delivered to a subject in a biologically active form. The present delivery systems provide for the direct access of the active substance to the tissues and thus provide immediate or near-immediate effects of trehalose to the subject in need thereof.

Accordingly, in certain embodiments, the present invention provides a pharmaceutical delivery system for the improved administration of trehalose or physiologically active derivative thereof, comprising as the active ingredient said trehalose or physiologically active derivative thereof in a suitable carrier for fast restoration of relief of symptoms of the disease of the treated subject.

In certain embodiments, the drug delivery systems may provide the active substance in a controlled release mode. In certain embodiments, the drug delivery systems of the invention may further comprises at least one additional pharmaceutically active agent.

The presently disclosed delivery systems can generally comprise a buffering agent, an agent which adjusts the osmolality thereof, and optionally, one or more pharmaceutically acceptable carriers, excipients and/or additives as known in the art. Supplementary pharmaceutically acceptable active ingredients can also be incorporated into the compositions. The carrier can be solvent or dispersion medium suitable for parenterally-administrable compositions containing, for example, water, ethanol, polyol (for example, glycerol, propylene glycol, and liquid polyethylene glycol, and the like), suitable mixtures thereof, and vegetable oils. The proper fluidity can be maintained, for example, by the use of a coating, such as lecithin, by the maintenance of the required particle size in the case of dispersion and by the use of surfactants.

As indicated above, the present trehalose delivery system can be administered in controlled-, sustained- or delayed-release formulations. Any controlled or sustained release

method known to those of ordinary skill in the art may be used with the formulations and methods of the presently disclosed subject matter such as those described in *Langer 1990* [16]. Such method comprises administering a sustained-release composition or a coated implantable medical device so that a therapeutically effective dose of the composition of the invention is continuously delivered to a subject of such a method. Sustained release may also be achieved using a patch designed and formulated for the purpose. Controlled or sustained-release compositions include formulation in lipophilic depots (e.g., fatty acids, waxes, oils). Also comprehended by the invention are particulate compositions coated with polymers (e.g., poloxamers or poloxamines). Sustained release formulae or devices, or any topical formulations, may additionally contain compositions to stabilize the composition or permeate physiological barrier such as skin or mucous membrane. Exemplary additional components may include any physiologically acceptable detergent, or solvent such as, for example, dimethylsulfoxide (DMSO).

In certain embodiments, the trehalose in the present compositions can be formulated for sustained or controlled release over a period of at least 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 or 12 hours. In certain embodiments, the trehalose in the present compositions can be formulated for sustained or controlled release over a period of about 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 or 12 hours. In certain embodiments, the trehalose in the present compositions can be formulated for sustained or controlled release over a period of between about 0.5 or 1 or 2 or 3 or 4 hours and about 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 or 12 hours. In certain embodiments, the trehalose in the present compositions can be formulated for sustained or controlled release over a period of between about 5 or 6 or 7 or 8 hours and about 9, 10, 11 or 12 hours.

In certain embodiments, the trehalose in the present compositions can be in immediate, fast or burst release form.

In certain embodiments, the trehalose in the present compositions can be formulated to release up to 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 99, 99.5 or 100% of the total trehalose in about 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 or 8 hours. In certain embodiments, the trehalose in the present compositions can be formulated to release not less than 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 99, 99.5 or 100% of the total trehalose in about 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 or 8 hours.

In certain embodiments, the trehalose in the present compositions can be in a combination of sustained or slow release and immediate or fast or burst release forms. In certain embodiments, the relative proportion of sustained or slow release trehalose to immediate or fast release trehalose is, e.g., 1 to 99, 5 to 95, 10 to 90, 15 to 85, 20 to 80, 25 to

75, 30 to 70, 35 to 65, 40 to 60, 45 to 55, 50 to 50, 55 to 45, 60 to 40, 65 to 35, 70 to 30, 75 to 25, 80 to 20, 85 to 15, 90 to 10, 95 to 5, or 99 to 1.

In certain embodiments, a polymeric material is used to sustain or control release of trehalose. In certain embodiments, the type of polymeric material and the amount of which is used, have a strong influence on the rate of release of trehalose from the present compositions and delivery systems. Examples of polymers include both hydrophobic and hydrophilic polymers. Examples of hydrophobic polymers include, but are not limited to, ethyl cellulose and other cellulose derivatives, fats such as glycerol palmito-stearate, beeswax, glycowax, castorwax, carnaubawax, glycerol monostearate or stearyl alcohol, hydrophobic polyacrylamide derivatives and hydrophobic methacrylic acid derivatives, as well as mixtures of these polymers. Hydrophilic polymers include, but are not limited to, hydrophilic cellulose derivatives such as methyl cellulose, hydroxypropylmethyl cellulose, hydroxyethylcellulose, hydroxypropyl cellulose, carboxymethyl cellulose, sodium carboxymethylcellulose and hydroxyethyl methylcellulose polyvinyl alcohol, polyethylene, polypropylene, polystyrene, polyacrylamide, ethylene vinyl acetate copolymer, polyacrylate, polyurethane, polyvinylpyrrolidone, polymethylmethacrylate, polyvinyl acetate, polyhydroxyethyl methacrylate, as well as mixtures of these polymers. Furthermore, any mixture of one or more hydrophobic polymer and one or more hydrophilic polymer could optionally be used.

The trehalose contained in the present compositions and delivery systems can be entrapped in liposomes, micro- and nano-particles.

In certain embodiments, a polymeric material to be used in the present compositions and delivery systems is microcrystalline cellulose such as "Avicel PH 101" manufactured by FMC BioPolymer's. Alternatively, a polymeric material to be used in the present compositions and delivery systems is hydroxypropyl methylcellulose such as "Metholose" produced by Shin-Etsu Chemical Co. In certain embodiments, a polymeric material to be used in the present compositions and delivery systems is ethyl cellulose such as "Ethocel™" manufactured by The Dow Chemical Company. In certain embodiments, a polymeric material to be used in the present compositions and delivery systems is an acrylic polymer such as "Eudragit RS™" produced by Rohm GmbH. In certain embodiments, a polymeric material to be used in the present compositions and delivery systems is a colloidal silicone dioxide such as "Aerosil™" manufactured by Degussa. In certain embodiments, a polymeric material to be used in the present compositions and delivery systems is a Poly (Vinyl Acetate) such as "Kollicoat SR" manufactured by BASF. In certain embodiments, a polymeric material to be

used in the present compositions and delivery systems is an ethyl acetate and vinyl acetate solution such as "Duro-Tak" manufactured by Delasco Dermatologic Lab & Supply, Inc.

In certain embodiments, delivery systems of the invention comprise delivery devices. In certain embodiments, the compositions of the invention are delivered by an osmotic process at a controlled rate such as by an osmotic pump. The system may be constructed by coating an osmotically active agent with a rate controlling semipermeable membrane. This membrane may contain an orifice of critical size through which agent is delivered. The dosage form after coming into contact with aqueous fluids, imbibes water at a rate determined by the fluid permeability of the membrane and osmotic pressure of the core formulation. This osmotic imbibitions of water result in formation of a saturated solution of active material within the core, which is dispensed at controlled rate from the delivery orifice in the membrane.

In certain embodiments, the compositions of the invention are delivered using biodegradable microparticles. In certain embodiment, the system to prepare microparticles consists of an organic phase comprised of a volatile solvent with dissolved polymer and the material to be encapsulated, emulsified in an aqueous phase. In certain embodiments, the biodegradable polymers that can be used for the microparticle matrix, comprises polylactic acid (PLA) or the copolymer of lactic and glycolic acid (PLAGA). The PLAGA polymer degrades hydrolytically over time to its monomeric components, which are easily removed from the body through natural life processes.

The preparation may also contain an absorption enhancer and other optional components. Examples of absorption enhancers include, but are not limited to, are cyclodextrins, phospholipids, chitosan, DMSO, Tween, Brij, glycocholate, saponin, fusidate and energy based enhancing absorption equipment.

Optional components present in the dosage forms include, but are not limited to, diluents, binders, lubricants, surfactants, coloring agents, flavors, buffering agents, preservatives, stabilizing agents and the like.

Diluents, also termed "fillers" include, for example, dicalcium phosphate dihydrate, calcium sulfate, lactose, cellulose, kaolin, mannitol, sodium chloride, dry starch, hydrolyzed starches, silicon dioxide, colloidal silica, titanium oxide, alumina, talc, microcrystalline cellulose, and powdered sugar. For administration in liquid form, the diluents include, for example, ethanol, sorbitol, glycerol, water and the like.

Binders are used to impart cohesive qualities to the formulation. Suitable binder materials include, but are not limited to, starch (including corn starch and pregelatinized starch), gelatin, sugars (including sucrose, glucose, dextrose, lactose and sorbitol),

polyethylene glycol, waxes, natural and synthetic gums, e.g., acacia, tragacanth, sodium alginate, celluloses, and Veegum, and synthetic polymers such as polymethacrylates and polyvinylpyrrolidone.

Lubricants are used to facilitate manufacture; examples of suitable lubricants include, for example, magnesium stearate, calcium stearate, stearic acid, glyceryl behenate, and polyethylene glycol.

Surfactants may be anionic, cationic, amphoteric or nonionic surface active agents, with anionic surfactants preferred. Suitable anionic surfactants include, but are not limited to, those containing carboxylate, sulfonate and sulfate ions, associated with cations such as sodium, potassium and ammonium ions. Particularly preferred surfactants include, but are not limited to: long alkyl chain sulfonates and alkyl aryl sulfonates such as sodium dodecylbenzene sulfonate; dialkyl sodium sulfosuccinates, such as sodium bis-(2-ethylhexyl)-sulfosuccinate; and alkyl sulfates such as sodium lauryl sulfate.

Stabilizing agents such as antioxidants, include, but are not limited to, propyl gallate, sodium ascorbate, citric acid, calcium metabisulphite, hydroquinone, and 7-hydroxycoumarin.

If desired, the present compositions may also contain minor amounts of nontoxic auxiliary substances such as wetting or emulsifying agents, preservatives, and the like.

As mentioned, any of the compositions of the invention may be used alone or in combination with one or more additional therapeutic agents, for the treatment of the disease from which the treated subject suffers. The amount of both the compound and the additional therapeutic agent that may be combined with the carrier materials to produce a composition or delivery system will vary depending upon the host treated and the particular mode of administration. In some embodiments, the compositions of this invention should be formulated so that a dosage of between 0.01-1 g/kg body weight/day of trehalose can be administered. The dose of the trehalose depends on the condition and the illness of the patient, and the desired daily dose. In human therapy, the daily dose can be 10-3000 mg, for example, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 75, 100, 200, 300, 400, 500, 600 700, 800, 900 or 1000 mg. These amounts are administered in doses which can be divided into 2-3 smaller doses for each day.

In certain embodiments, the active ingredients in the present compositions and delivery systems can act synergistically in combination with each other and can further act synergistically in the presence of an additional therapeutic agent. Therefore, the amount of compound(s) and additional therapeutic agent(s) in such compositions will be less than that required in a monotherapy utilizing only that therapeutic agent.

Toxicity and therapeutic efficacy of the formulations described herein can be determined by standard pharmaceutical procedures in cell cultures or experimental animals, e.g., procedures used for determining the maximum tolerated dose (MTD), the ED₅₀, which is the effective dose to achieve 50% of maximal response, and the therapeutic index (TI), which is the ratio of the MTD to the ED₅₀. Obviously, formulations with high TIs are the most preferred formulations herein, and preferred dosage regimens are those that maintain plasma levels of the trehalose at or above a minimum concentration to maintain the desired therapeutic effect. Dosage will, of course, also depend on a number of factors, the site of intended delivery, the route of administration, and other pertinent factors known to the prescribing physician.

As indicated above, trehalose or any of the formulations comprising thereof as herein defined may be used alone or in combination with one or more additional therapeutic agents for the treatment of the diseases from which the treated subjects suffer. The amount of both the compound and the additional therapeutic agent that may be combined with trehalose or any of the formulations comprising thereof as herein defined will vary upon the subject treated and the particular diseases and mode of administration.

In certain embodiments, the active ingredients in the present compositions and delivery systems can act synergistically in combination with each other and can further act synergistically in the presence of an additional therapeutic agent. Therefore, the amount of compound(s) and additional therapeutic agent(s) in such compositions will be less than that required in a monotherapy utilizing only that therapeutic agent.

In another one of its aspects the presently disclosed subject matter provides Trehalose or a pharmaceutical formulation comprising same, for use in a method for treating or alleviating a disease associated with abnormal protein aggregation and/or inclusion bodies formation in myocytes, neurons and other cells or extracellular compartments or at least one symptom associated therewith, in a human subject in need thereof, said method comprising parenterally administering to said subject a therapeutically effective amount of trehalose or a pharmaceutical formulation comprising the same.

In yet another one of its aspects the presently disclosed subject matter provides an aqueous pharmaceutical formulation comprising a therapeutically effective amount of trehalose as a sole active ingredient, wherein the formulation has a pH about 4.5 to 7.0 and contains less than 0.74 endotoxin units per ml and wherein said pharmaceutical formulation is adapted for parenteral administration.

In some embodiments the aqueous pharmaceutical formulation as herein defined may be adapted for intravenous, intramuscular or intraperitoneal administration.

In other embodiments the aqueous pharmaceutical formulation as herein defined is adapted for intravenous, intramuscular or intraperitoneal administration.

As indicated above the aqueous pharmaceutical formulation as herein defined optionally further comprises at least one pharmaceutically acceptable additive, carrier, excipient or diluents.

In further embodiments the aqueous pharmaceutical formulation as herein defined is wherein the concentration of the trehalose is between about 0.1 % (w/v) to about 50 % (w/v). In further specific embodiments the aqueous pharmaceutical formulation as herein defined is wherein the concentration of the trehalose is about 10 % (w/v).

In some embodiments the aqueous pharmaceutical formulation as herein defined is wherein the formulation has an osmolality of about 280-330 mOsm/kg.

In other embodiments the aqueous pharmaceutical formulation as herein defined is wherein the formulation is administered at a frequency between once daily to once per month.

The aqueous pharmaceutical formulation as herein defined may be where said therapeutically effective amount of trehalose is from about 1 gram to about 100 gram for each daily injection and no more than about 1 gram/kg body weight of said subject per day.

In other embodiments the aqueous pharmaceutical formulation as herein defined is wherein the formulation is administered once daily at from about 10 mg/kg/day to about 1 gram/kg/day of trehalose.

In still further embodiments the aqueous pharmaceutical formulation as herein defined is wherein the formulation is administered at a frequency of between once daily to once per month at a dose of about 5 to about 35 grams of trehalose.

In further specific embodiments the aqueous pharmaceutical formulation as herein defined is for administration once daily, once every other day, twice a week, once a week, once every two weeks, once every three weeks or once a month.

In still further specific embodiments the aqueous pharmaceutical formulation as herein defined is wherein the dose is 5, 8, 15, 30, 40 or 50 grams.

In yet further embodiments the aqueous pharmaceutical formulation as herein defined is wherein the rate of administration is such that the maximum endotoxin level is less than 5 endotoxin units per kilogram of body weight per hour.

The aqueous pharmaceutical formulation of the presently disclosed subject matter may be where the formulation is adapted for intravenous administration and wherein said

administration is completed within from about 75 to about 120 minutes, specifically within less than 90 minutes.

In some embodiments the aqueous pharmaceutical formulation as herein defined is for treating a disease associated with abnormal protein aggregation and/or inclusion bodies formation in myocytes, neurons and other cells or extracellular compartments or for alleviating a sign or symptom associated therewith in a human subject in need thereof.

The presently disclosed subject matter further provides a kit comprising:

- (a) pharmaceutically acceptable trehalose or active derivative thereof;
- (b) at least one pharmaceutically acceptable additive, carrier, excipient and diluent;
- (c) means for preparing an injectable aqueous solution of the trehalose by mixing said trehalose with at least one of said additive, carrier, excipient and diluent;
- (d) means for parenterally administering said injectable solution to a patient in need;
- (d) instructions for use.

Injectable aqueous solution of the trehalose may be prepared by any method well known in the art, for example as recited herein in the accompanying Examples. Parenterally administering the injectable solution as herein defined is well known in the art of the skilled physician.

The term "*about*" as used herein indicates values that may deviate up to 1%, more specifically 5%, more specifically 10%, more specifically 15%, and in some cases up to 20% higher or lower than the value referred to, the deviation range including integer values, and, if applicable, non-integer values as well, constituting a continuous range.

The invention will be further described in the following examples, which do not limit the scope of the invention described in the claims.

Various embodiments and aspects of the present invention as delineated hereinabove and as claimed in the claims section below find experimental support in the following examples.

Disclosed and described, it is to be understood that this invention is not limited to the particular examples, methods steps, and compositions disclosed herein as such methods steps and compositions may vary somewhat. It is also to be understood that the terminology used herein is used for the purpose of describing particular embodiments only and not intended to be limiting since the scope of the present invention will be limited only by the appended claims and equivalents thereof.

It must be noted that, as used in this specification and the appended claims, the singular forms “a”, “an” and “the” include plural referents unless the content clearly dictates otherwise.

The following examples are representative of techniques employed by the inventors in carrying out aspects of the present invention. It should be appreciated that while these techniques are exemplary of preferred embodiments for the practice of the invention, those of skill in the art, in light of the present disclosure, will recognize that numerous modifications can be made without departing from the spirit and intended scope of the invention.

EXAMPLES

Without further elaboration, it is believed that one skilled in the art can, using the preceding description, utilize the present invention to its fullest extent. The following preferred specific embodiments are, therefore, to be construed as merely illustrative, and not limitative of the claimed invention in any way.

Standard molecular biology protocols known in the art not specifically described herein are generally followed essentially as in Sambrook & Russell, 2001.

Standard medicinal chemistry methods known in the art not specifically described herein are generally followed essentially in the series “Comprehensive Medicinal Chemistry” by various authors and editors, published by Pergamon Press.

Example 1 Trehalose

Trehalose dihydrate was obtained from two different commercial sources (Hayashibara and Pfanstiehl). The samples were kept at room temperature until analysis, and were analyzed by accepted methods to verify specifics. The results are presented in Table 1 below.

Test	Required Specifications	Sample Pfanstiehl
Assay	97.0-102.0% w/w on anhydrous basis	99.4% (conforms)
Related substances	Maltotriose $\leq 0.5\%$ w/w	Conforms
	Any peak eluting before trehalose $\leq 0.5\%$ w/w	Conforms
	Glucose $\leq 0.5\%$ w/w	Conforms
	Any peak eluting after trehalose $\leq 0.5\%$ w/w	Conforms

Table 1 Analysis of trehalose dihydrate

As shown in Table 1 above, the tested trehalose dihydrate preparations conform with the accepted practice concerning use of trehalose in pharmaceutical compositions, namely comprise 97.0-102.0% w/w active ingredient (trehalose), with any peak eluting before trehalose at a concentration of less than 0.5% w/w, glucose at less than 0.5% w/w and with any peak eluting after trehalose at less than 0.5% w/w.

The trehalose used was commercially available trehalose dihydrate, comprising 97.0-102.0% w/w active ingredient (trehalose), with glucose at less than 0.5% w/w and other contaminants at less than 1%.

Example 2 Preparation of trehalose solution for IV injection

A formulation comprising trehalose was prepared under sterile conditions by dissolving trehalose dihydrate in water and the resulting clear and colorless liquid was analyzed to identify any impurities or contaminants.

Test	Specification	Result
Appearance of container ATP007	Clear glass 30R vial with grey rubber stopper, aluminium seal and white flip off lid	Clear glass 30R vial with grey rubber stopper, aluminium seal and white flip off lid.
Appearance of contents ATP007	Clear colourless liquid essentially free from visible particulate matter	Clear colourless liquid essentially free from visible particulate matter
P537 Identity ATP1323	Retention time of the P537 peak ± 5 % of standard	Retention time of the P537 peak is within ± 5 % of the P537 standard peak
P537 Content Assay ATP1323	90.0% to 110.0% label claim	99.8%
P537 Related Substances (% label claim) ATP1323	Report individual impurities ≥ 0.05 % label claim Report total impurities Maltotriose and other polysaccharides eluting before P537: $\leq 0.5\%$ Glucose and peaks eluting after P537 $\leq 0.5\%$ Total impurities 2.0%	Maltotriose: None detected Unknown RRT0.90: 0.1 % Glucose: None detected Total Impurities: 0.1 %
pH ATP164	4.5 to 7.0	6.2
Osmolality ATP841	280-330 mOsm/kg	289 mOsm/kg
Particulate matter USP <788>, Ph. Eur 2.9.19	Particulates $\geq 10 \mu\text{m}$: NMT 6000 Particulates $\geq 25 \mu\text{m}$: NMT 600	$\geq 10 \mu\text{m}$: 7 $\geq 25 \mu\text{m}$: 0
Extractable Volume USP <1>, Ph. Eur 2.9.17	Not less than 30 ml	32 ml
Endotoxins USP <85>, Ph. Eur 2.6.14	< 0.24 EU/ml	Point 1 tray 1: <0.1 EU/ml Point 4 tray 31: <0.1 EU/ml Point 8 tray 72: <0.1 EU/ml
Sterility USP <71>, Ph. Eur 2.6.1	Complies	No growth

Table 2 Analysis of trehalose formulation

The formulation was sterile and comprised 10% trehalose, with total impurities at a concentration of 0.1 %, pH of 6.2 and an osmolality of 289 mOsm/kg and endotoxins at less than 0.1 EU/ml.

Example 3 Preclinical pharmacokinetic studies

The plasma and muscle concentrations of trehalose in male Sprague-Dawley (SD) rats was determined after intravenous bolus (IV) and oral gavage (PO) administration.

All applicable portions of the study confirmed to the following regulations and guidelines regarding animal care and welfare: AAALAC International and NIH guidelines as reported in the “Guide for the Care and Use of Laboratory Animals,” National Research Council ILAR, Revised 1996.

The study included 42 SD rats (male, 250 to 350 grams in weight, the Shanghai SLAC Laboratory Animal Co. Ltd.). Animals were administered with a volume of 5 ml/kg trehalose formulation (trehalose dihydrate in sterilized water at 200 mg/mL) to achieve a nominal dose of 1 gr/kg, intravenously or orally.

Blood samples were collected after each dose administration and processed for plasma. Muscle samples (hind leg muscle) were collected and homogenized. The concentrations of trehalose in plasma and muscle homogenate samples were analyzed by qualified bioanalytical LC/MS/MS methods.

Pharmacokinetics data analysis

Plasma concentration data of trehalose was subjected to a non compartmental pharmacokinetic analysis using WinNonlin software program (version 6.3, Pharsight, Mountain View, CA). Zero-time intercept concentration (C_0), volume of distribution (V_{dss}), Clearance (Cl), peak plasma concentrations (C_{max}) and the corresponding peak times (T_{max}), terminal half-life ($T_{1/2}$), mean residence time (MRT) from time zero to the last time point (MRT_{0-last}), MRT from time zero to infinity (MRT_{0-inf}), the area under the plasma concentration-time curve (AUC) from time zero to the last time point (AUC_{0-last}) and AUC from time zero extrapolated to infinity (AUC_{0-inf}) were calculated using the linear/log trapezoidal rule. Nominal sampling times were used to calculate all pharmacokinetic parameters since there was not any deviation larger than 5% between the actual and nominal sampling times.

The values of muscle to plasma concentration and AUC ratio (M/P ratio) were both calculated.

Trehalose concentration in plasma and muscle

Pharmacokinetic parameters of trehalose in the plasma and muscle following single intravenous or oral administration of trehalose dihydrate solution (200 mg trehalose dihydrate per 1 mL sterilized water) at 1000 mg/kg to male SD rats are presented in Table 3 below.

Individual and mean plasma concentrations of trehalose following intravenous or oral administration of trehalose dihydrate solution (200 mg trehalose dihydrate per 1 mL sterilized water) at 1000 mg/kg to male SD rats are presented in Table 3 and shown graphically in Figure 1.

Individual and mean muscle concentrations of trehalose following single intravenous or oral administration of trehalose dihydrate solution (200 mg trehalose dihydrate per 1 mL sterilized water) at 1000 mg/kg to male SD rats are presented in Table 3 as well. Plasma and muscle concentrations comparison for trehalose following single intravenous or oral administration of trehalose dihydrate at 1000 mg/kg to male SD rats are shown graphically in Figures 2 to 3.

Following a single intravenous dose of trehalose solution (200 mg trehalose dihydrate per 1 mL sterilized water) at 1000 mg/kg to male fasted SD rats in tested groups 1 to 5, trehalose showed a total clearance (CI) of 17.2 mL/min/kg (approximately 31.3% of rat liver blood flow (=55mL/min/kg)), with the averaged elimination half life ($T_{1/2}$) of 2.07 hours. The C_0 was 1,370,000 ng/mL.

The volume distribution (V_{dss}) was at 0.685 L/kg. The mean plasma exposure AUC_{0-last} (48hr) was 778,000 ng·hr/mL.

With an oral administration of trehalose dihydrate solution (200 mg trehalose dihydrate per 1 mL sterilized water) to male SD rats in tested groups 6 to 10, trehalose maximum plasma concentration (C_{max} = 4,280 ng/mL) was attained at 0.5 hour post dose (T_{max}). The AUC_{0-last} (3hr) was 4,520 ng/mL·hr. The absolute bioavailability of trehalose was estimated to be as low as 0.601%.

The pharmacokinetic properties of trehalose demonstrated a rapid absorption with a time to reach peak plasma concentrations, but the absolute oral bioavailability was very low, which noted that the compound may undergo a significant presystemic metabolism.

Following a single intravenous dose of trehalose dihydrate solution (200 mg trehalose dihydrate per 1 mL sterilized water) at 1000 mg/kg to male SD rats in tested groups 1 to 5, the C_{max} of trehalose in muscle was 3730 ng/mL, which was observed at 8 hours (T_{max}) post dose. The muscle exposure AUC_{0-last} (48hr) was 107,000 ng·hr/mL with the elimination half life

33.8 hours. The PK parameters of muscle samples in drug treated oral group (Groups 6 to 10) could not be calculated because they were below LLOQ

The mean ratios of muscle trehalose concentration to plasma concentration ranged from 2.88 to 3.76 in male SD rats following intravenous administration. Muscle to plasma concentration ratios for trehalose upon oral administration were below LLOQ and not calculable.

Conclusions

Following intravenous or oral administrations of trehalose dihydrate solution in sterilized water at 1000 mg/kg to male SD rats, trehalose in plasma and muscle tissue were determined. Plasma glucose was also monitored for each sample from study animals of drug treated groups. The following conclusions can be made:

First, following IV administration, the total clearance (Cl) of trehalose was 17.2 mL/min/kg, accounting for approximately 31.3% of liver blood flow, a moderate value of hepatic extraction ratio. The V_{dss} and $T_{1/2}$ were 0.685 L/kg and 2.07 hours respectively. The mean plasma exposure AUC_{0-last} was 778,000 ng·hr/mL.

Following oral administration, trehalose demonstrated a rapid absorption with T_{max} observed at 0.50 hours post dose, but the absolute oral bioavailability was as low as 0.601%, suggesting presystemic metabolism may play an important role. $T_{1/2}$ of trehalose was markedly shortened in oral administration rats in comparison to the intravenous group.

Following IV administration, the mean ratios of muscle trehalose concentration to plasma concentration ranged from 2.88 to 3.76 in male SD rats.

Finally, it was observed that trehalose dihydrate was well tolerated by the rats at the given dosage.

Matrix	Plasma		Muscle	
Group ID	IV	PO	IV	PO
C ₀ (ng/mL)	1370000	---	---	ND
C _{max} (ng/mL or ng/g)	---	4280	3730	ND
T _{max} (h)	---	0.500	8.00	ND
T _{1/2} (h)	2.07	0.740	33.8	ND
CI (mL/min/kg)	17.2	---	---	ND
V _{dss} (L/kg)	0.685	---	---	ND
AUC _{0-last} (ng·h/mL or ng·h/g)	778000	4520	107000	ND
AUC _{0-inf} (ng·h/mL or ng·h/g)	781000	4870	183000	ND
MRT _{0-last} (h)	0.618	1.04	21.1	ND
MRT _{0-inf} (h)	0.666	1.26	52.6	ND
AUC _{0-inf} /AUC _{0-last} (%)	100	108	171	ND
^c Bioavailability (%)	---	0.601	---	---
^d AUC ratio	---	---	0.234	ND

Abbreviations: ND = Not determined; c: Bioavailability (%) was calculated with mean AUC_{0-inf} and nominal dose; d: AUC Ratio = Muscle AUC_{0-inf} / Plasma AUC_{0-inf}; AUC_(0-inf) > 120 % of AUC_(0-last).

Table 3 Pharmacokinetic parameters

Thus, as demonstrated in Table 3, the trehalose in the IV administered formulation showed T_{1/2} of 2.07 hour in plasmas, over two-fold higher than the plasma T_{1/2} obtained for trehalose in the orally administered formulation (0.740 hours). In addition, the muscle T_{1/2} obtained for the trehalose in the IV administered formulation was 33.8 hours. The AUC values obtained for plasma and muscle when the formulation was administered IV were also significantly higher than the respective AUC values of formulation administered orally.

In addition, as demonstrated in Figure 1, the mean plasma concentration of the trehalose in the IV administered formulation is higher than the mean plasma concentration of the trehalose in the orally administered formulation at each of the tested time points.

Interestingly, Figure 2, which demonstrates plasma versus muscle concentrations of trehalose for a trehalose formulation administered intravenously, shows that muscle concentrations are higher than plasma concentrations of trehalose. Plasma and muscle concentrations of trehalose were undetectable for a trehalose formulation administered orally.

Example 4 Determination of endotoxin level

It is accepted that the maximal allowed level of endotoxin in formulations administered intravenously is 5 endotoxin units (EU) per kg body mass per hour (5 EU/kg/hr). In order to determine the theoretical maximum endotoxin level IV per kg body mass/hour (K) in trehalose formulation (solution of trehalose dihydrate in sterilized water), the following calculations were made:

Endotoxin contribution	15 gr trehalose formulation	30 gr trehalose formulation
2.4 EU/gr (trehalose)	36	72
0.5 EU/ml (solvent)	75 (in 150 ml)	150 (in 300 ml)
Total EU in formulation	111	222
Assuming 75 min infusion	88.8 EU/hr	177.6 EU/hr
K for 60 kg body weight	1.5	3.0
K for 50 kg body weight	1.8	3.6
K for 40 kg body weight	2.2	4.4

Table 4 Calculation of maximal endotoxin levels in trehalose formulations

As indicated in Table 4 above, endotoxin level per ml in trehalose formulations prepared with standard solvents (e.g. water, saline, etc.) is 0.74 EU/ml. Assuming a moderate infusion rate of 75 minutes, for a body weight of 60, 50 and 40 kg the endotoxin level in trehalose 10% (w/v) formulations is 1.5, 1.8 and 2.2 EU/kg/hr, respectively, for a formulation comprising 15 gr trehalose and 3.0, 3.6 and 4.4 EU/kg/hr, respectively, for a formulation comprising 30 gr trehalose.

Accordingly, under the maximum rate planned, the endotoxin level for a body weight of 60, 50 and 40 kg will be 2, 2.4 and 3 EU/kg/hr, respectively, for a formulation comprising 15 gr trehalose (in 150 ml solvent) and 4, 4.8 and 6 EU/kg/hr, respectively, for a formulation comprising 30 gr trehalose (in 300 ml solvent).

Example 5 Safety studies

The safety and tolerability of trehalose has been extensively investigated, as detailed below. Trehalose median lethal dose (LD₅₀) was examined in mice, rats and dogs. Neither species showed any signs of toxicity and no deaths occurred after oral and intravenous administration. The results are summarized in Table 5 below:

SPECIES	ROUTE	LD50 (mg/kg bw)
Mouse	Oral	> 5000
Mouse	Intravenous	> 1000
Rat	Oral	> 16000
Rat	Oral	> 5000
Rat	Intravenous	> 1000
Dog	Oral	> 5000
Dog	Intravenous	> 1000

Table 5 LD50 of trehalose in animals

In addition, trehalose is recognized as a safe food ingredient as well as a GRAS material used in the pharmaceutical industry as an excipient for oral, intraocular and IV drug formulations. In several studies, healthy volunteers were given oral doses of trehalose ranging from 10 to 60 gr. Apart from mild abdominal symptoms (e.g. flatulence, distension, borborygmus and occasional diarrhea) no other safety issues were reported [18].

Trehalose has been used as a protein stabilizer in several commercially available protein drugs for over a decade and its safety has repeatedly been established in patient populations at advanced stages of malignant diseases, hemophilia and related clotting disorders. These drugs are approved for use for several years, and are sometimes given to patients as frequently as every 8 hours through 2-3 weeks intervals.

Example 6 Treatment of OPMD patients with trehalose

The potential benefit of trehalose in ameliorating the symptoms of OPMD or slowing the deterioration of OPMD patients, is currently examined in a clinical study in human patients.

The study is a randomized, double-blind, dose escalation and parallel-group dose-controlled study of treatment of patients with Oculopharyngeal Muscular Dystrophy (OPMD) IV with trehalose aqueous injectable solution is carried out in three medical centers.

Exploratory Phase

Screening Period (Week -4/Day -28 to Week 0/Day 0)

Screening assessments are conducted over two visits within 28 days prior to the start of therapy, as specified in the Schedule of Assessments.

Treatment Period 1 (Week 1 to Week 24)

All eligible patients receive study treatment once a week.

Initially, all eligible patients receive intravenously one dose of trehalose (8g) in a 10% (w/v) injectable aqueous solution per week (80 ml solution). This is followed by intravenous administration of a further single trehalose dose (15g) in a 10% (w/v) injectable aqueous solution during the following week. Following determination of safety, at the next visit on subsequent week, patients are randomized at a 1:1 ratio (double-blind) to receive either 15g or 30g of trehalose (in an aqueous 10% (w/v) solution) for 24 weeks. The first 4 infusions are done at the clinic under professional direction. Patients return to the clinic once a month for drug infusion and study assessments, as indicated in the Schedule of Procedures; all other weekly infusions may be done in the patient's home or in the clinic.

Pivotal Phase

Treatment Period 2 (Week 25 to Week 72)

Patients continue weekly IV infusions of trehalose aqueous injectable solution.

Follow-up Period (4 weeks post-dose)

Patients are seen at a post-treatment follow-up visit, 4 weeks after the final dose of 24th week.

Study Population

Up to 15 adult patients with OPMD are enrolled into the study at each of the three study centers. A minimum of 42 patients are enrolled in total. A control group receiving no treatment may be added.

Inclusion criteria

1. Males and females
2. 18 - 80 years (inclusive) of age
3. Genetically diagnosed with OPMD
4. Moderate dysphagia (abnormal drinking test at screening and on the first dosing day, before drug administration)
5. Patients must be ambulatory, and capable of performing the muscle functional and strength assessments
6. Patients who provide written informed consent to participate in the study
7. Body Mass Index (BMI) $<30 \text{ kg/m}^2$
8. Female patients of child-bearing potential must have a negative serum pregnancy test at screening
9. Male and females must agree to use acceptable birth control

Exclusion criteria

1. Diabetes mellitus Type 1 or 2
2. Other major diseases, e.g. renal failure (creatinine clearance $<60 \text{ ml/min}$), liver failure and chronic liver diseases (e.g. hepatitis B or C), HIV carriers, tuberculosis, SLE, rheumatoid polyarthritis, sarcoidosis, collagenosis.
3. Uncontrolled heart disease, e.g., CHF.
4. Other neuromuscular diseases.
5. Other disorders associated with esophageal dysphagia: e.g. gastroesophageal reflux (GERD), esophageal stricture due to mechanical or chemical trauma, infection (e.g. esophageal moniliasis), drug-induced dysphagia (e.g. bisphosphonates), esophageal rings and webs, spastic motility disorders of the esophagus.
6. History of malignancy.
7. History of neck irradiation.
8. Pregnant or currently lactating women.
9. Obesity ($\text{BMI} \geq 30$) and associated morbidity.
10. Prior pharyngeal myotomy.
11. Weight loss of more than 10% in the last 12 months.
12. Known hypersensitivity to any ingredients in the injection.

Investigational Product Route and Dosage Form

A 10% (w/v) IV solution of trehalose is administered in a single injection, once a week for 72 weeks. The solution is delivered over approximately from about 70 to about 120 minutes.

Initial dose per injection in Week 1 is 8g trehalose. Second week dose is 15g, and dose at weeks 3 to week 72 is 15 or 30 g.

Safety and tolerability

The primary safety endpoint is the frequency, severity, and duration of adverse events (AEs), including clinically significant laboratory abnormalities after administration of the trehalose injectable solution.

Safety is evaluated on the basis of AEs and concomitant medications; physical examination; vital signs (prior to, every 30 minutes during, and 30 minutes following administration). Test include complete blood count (CBC) with differential, electrolytes (Na, K, Cl), BUN, creatinine, glucose, liver function tests (ALT, AST, total bilirubin, direct bilirubin, alkaline phosphatase, and serum albumin), and dipstick urinalysis.

Efficacy Outcomes/Disease Markers Evaluation

The following disease markers are assessed at specified times:

- Penetration Aspiration Score (using Videofluoroscopy)
- SWAL-QOL
- Muscle timed functional and strength assessments

Changes compared to baseline will be measured for each patient, and the total change in scores for the treatment groups in each pre-determined efficacy endpoint is statistically analyzed.

Additional assessments may be of weight and drinking.

Percutaneous Core Needle Biopsy (PCNB) is performed to obtain muscle fiber for histology.

Pharmacokinetics

The pharmacokinetic of trehalose are assessed in patients at the dose of 15 g or 30 g trehalose. Trehalose blood concentration is measured pre-dose (up to 60 minutes before drug administration); and every 30 minutes after dosing is initiated, for 5 hours or until glucose levels return to normal, whichever occurs first.

While the invention has been described in conjunction with the detailed description thereof, the foregoing description is intended to illustrate and not limit the scope of the invention, which is defined by the scope of the appended claims. Other aspects, advantages, and modifications are within the scope of the following claims.

CLAIMS

1. A method for treating or alleviating a disease associated with abnormal protein aggregation and/or inclusion bodies formation in myocytes, neurons and other cells or extracellular compartments, or at least one symptom associated therewith, in a human subject in need thereof comprising parenterally administering to said subject a therapeutically effective amount of trehalose or a pharmaceutical formulation comprising a therapeutically effective amount of trehalose.
2. The method of claim 1, wherein said disease is any one of poly-alanine aggregation disorder, poly-glutamine aggregation disorder and a tauopathy.
3. The method of any one of claims 1 and 2, wherein said disease is any one of oculopharengeal muscular dystrophy (OPMD), spinocerebellar ataxias (SCA), Friedreich's ataxia, spinal and bulbar muscular atrophy (SBMA), Huntington's disease, Parkinson's disease, Alzheimer's disease and amyotrophic lateral sclerosis (ALS), dentatorubral-pallidoluysian atrophy (DRPLA), Pick's disease, Corticobasal degeneration (CBD), Progressive supranuclear palsy (PSP) and Frontotemporal dementia and parkinsonism linked to chromosome 17 (FTDP-17).
4. The method of any one of claims 1 to 3, wherein said pharmaceutical formulation is an injectable solution for parenteral administration.
5. The method of any one of claims 1 to 4, wherein said pharmaceutical formulation comprises trehalose as sole active ingredient, and optionally further comprises at least one pharmaceutically acceptable additive, carrier, excipient or diluent.
6. The method of any one of the preceding claims, wherein the concentration of trehalose in said formulation is between about 0.1 % (w/v) to about 50 % (w/v).
7. The method of any one of the preceding claims, wherein the concentration of trehalose in said formulation is about 10 % (w/v).

8. The method of any one of the preceding claims, wherein the pharmaceutical formulation comprising trehalose has an osmolality of from about 280 to about 330 mOsm/Kg.
9. The method of any one of claims 1 to 8, wherein said administration is any one of intravenous, intramuscular and intraperitoneal administration.
10. The method of any one of the preceding claims, wherein said pharmaceutical formulation comprises less than 0.74 endotoxin units per ml solution.
11. The method of any one of the preceding claims, wherein said therapeutically effective amount of trehalose is from about 1 gram to about 100 gram for each single injection and no more than about 1 gram/kg body weight of said subject per day.
12. The method of any one of claims 1 to 11, wherein said therapeutically effective amount of trehalose or pharmaceutical formulation comprising thereof is administered chronically.
13. The method of any one of claims 1 to 12, wherein said therapeutically effective amount of trehalose or pharmaceutical formulation comprising thereof is administered at a frequency of between once daily to once per month.
14. The method of claim 13, wherein said therapeutically effective amount of trehalose or trehalose comprised in said pharmaceutical formulation is administered once daily at from about 10 mg/kg/day to about 1 gram/kg/day of trehalose.
15. The method of any one of claims 1 to 12, wherein said therapeutically effective amount of trehalose or trehalose comprised in said pharmaceutical formulation is administered at a single injection administration once a week.
16. The method of claim 13 or claim 15, wherein said therapeutically effective amount of trehalose or pharmaceutical formulation comprising the same is intravenously administered at a single dose of from about 5 to about 35 grams of trehalose, which may be administered once

daily, once every other day, twice a week, once a week, once every two weeks, once every three weeks or once a month.

17. The method of claim 13 or claim 15, wherein said therapeutically effective amount of trehalose or trehalose comprised in said pharmaceutical formulation is administered at a single dose of 5, 8, 15, 30, 40 or 50 grams of trehalose.

18. The method of any one of claims 1 to 17, wherein said pharmaceutical formulation is an injectable solution and wherein the rate of administration is such that the maximum endotoxin level is less than 5 endotoxin units per kilogram of body weight per hour.

19. The method of any one of claims 1 to 18, wherein administration of said therapeutically effective amount of trehalose comprised in said pharmaceutical formulation adapted for intravenous administration is completed within from about 75 to about 120 minutes, specifically within less than 90 minutes.

20. The method of any one of claims 12 to 19, wherein said administration comprises a dosing regimen of equal doses, or gradually increasing doses, or gradually decreasing doses of trehalose or pharmaceutical formulation comprising the same.

21. The method of any one of claims 1 to 11, wherein said therapeutically effective amount of trehalose or pharmaceutical formulation comprising thereof is administered periodically.

22. Trehalose or a pharmaceutical formulation comprising same, for use in a method for treating or alleviating a disease associated with abnormal protein aggregation and/or inclusion bodies formation in myocytes, neurons and other cells or extracellular compartments or at least one symptom associated therewith, in a human subject in need thereof, said method comprising parenterally administering to said subject a therapeutically effective amount of trehalose or a pharmaceutical formulation comprising the same.

23. Trehalose or a pharmaceutical formulation comprising same for use as defined in claim 22, wherein said disease is any one of poly-alanine aggregation disorder, poly-glutamine aggregation disorder and a tauopathy.

24. Trehalose or a pharmaceutical formulation comprising same for use as defined in any one of claims 22 or claim 23, wherein said disease is any one of oculopharengeal muscular dystrophy (OPMD), spinocerebellar ataxia (SCA), Friedreich's ataxia, spinal and bulbar muscular atrophy (SBMA), Huntington's disease, Parkinson's disease, Alzheimer's disease, amyotrophic lateral sclerosis (ALS), dentatorubral-pallidoluysian atrophy (DRPLA), Pick's disease, Corticobasal degeneration (CBD), Progressive supranuclear palsy (PSP) and Frontotemporal dementia and parkinsonism linked to chromosome 17 (FTDP-17).

25. Trehalose or a pharmaceutical formulation comprising same for use as defined in any one of claims 22 to 24, wherein said pharmaceutical formulation is an injectable solution for parenteral administration.

26. Trehalose or a pharmaceutical formulation comprising same for use as defined in any one of claims 22 to 25, wherein said pharmaceutical formulation comprises trehalose as sole active ingredient, and optionally further comprises at least one pharmaceutically acceptable additive, carrier, excipient or diluent.

27. Trehalose or a pharmaceutical formulation comprising same for use as defined in any one of claims 22 to 26, wherein the concentration of trehalose in said formulation is between about 0.1 % (w/v) to about 50 % (w/v).

28. Trehalose or a pharmaceutical formulation comprising same for use as defined in any one of claims 22 to 27, wherein the concentration of trehalose in said formulation is about 10 % (w/v).

29. Trehalose or a pharmaceutical formulation comprising same for use as defined in any one of claims 22 to 28, wherein the pharmaceutical formulation comprising trehalose has an osmolality of about 280 - 330 mOsm/Kg.

30. Trehalose or a pharmaceutical formulation comprising same for use as defined in any one of claims 22 to 29, wherein said administration is any one of intravenous, intramuscular and intraperitoneal administration.

31. Trehalose or a pharmaceutical formulation comprising same for use as defined in any one of claims 22 to 30, wherein said pharmaceutical formulation comprises less than 0.74 endotoxin units per ml solution.

32. Trehalose or a pharmaceutical formulation comprising same for use as defined in any one of claims 22 to 31, wherein said therapeutically effective amount of trehalose is from about 1 gram to about 100 gram for each single injection and no more than about 1 gram/Kg body weight of said subject per day.

33. Trehalose or a pharmaceutical formulation comprising same for use as defined in any one of claims 22 to 32, wherein said therapeutically effective amount of trehalose or pharmaceutical formulation comprising same is administered chronically.

34. Trehalose or a pharmaceutical formulation comprising same for use as defined in any one of claims 22 to 33, wherein said therapeutically effective amount of trehalose or pharmaceutical formulation comprising same is administered at a frequency of between once daily to once per month.

35. Trehalose or a pharmaceutical formulation comprising same for use as defined in claim 34, wherein said therapeutically effective amount of trehalose or trehalosed comprised in said pharmaceutical formulation is administered once daily at from about 10 mg/kg/day to about 1 gram/kg/day of trehalose.

36. Trehalose or a pharmaceutical formulation comprising same for use as defined in any one of claims 22 to 33, wherein said therapeutically effective amount of trehalose or trehalosed comprised in said pharmaceutical formulation is administered at a single injection administration once a week.

37. Trehalose or a pharmaceutical formulation comprising same for use as defined in claim 34 or claim 36, wherein said therapeutically effective amount of trehalose or trehalose comprised in said pharmaceutical formulation is intravenously administered at a single dose of from about 5 to about 35 grams of trehalose, once daily, once every other day, twice a week, once a week, once every two weeks, once every three weeks or once a month.

38. Trehalose or a pharmaceutical formulation comprising same for use as defined in claim 34 or claim 36, wherein said therapeutically effective amount of trehalose or trehalose comprised in said pharmaceutical formulation is administered at a single dose of 5, 8, 15, 30, 40 or 50 grams of trehalose.

39. Trehalose or a pharmaceutical formulation comprising same for use as defined in any one of claims 22 to 38, wherein said therapeutically effective amount of trehalose or a pharmaceutical formulation comprising the same is an injectable solution and wherein the rate of administration is such that the maximum endotoxin level is less than 5 endotoxin units per kilogram of body weight per hour.

40. Trehalose or a pharmaceutical formulation comprising same for use as defined in any one of claims 22 to 39, wherein said therapeutically effective amount of trehalose or a pharmaceutical formulation comprising the same is adapted for intravenous administration and wherein said administration is completed within from about 75 to about 120 minutes, specifically within less than 90 minutes.

41. Trehalose or a pharmaceutical composition comprising same for use as defined in any one of claims 33 to 40, wherein said administration comprises a dosing regimen of equal doses, or gradually increasing doses, or gradually decreasing doses of trehalose or pharmaceutical formulation comprising the same.

42. Trehalose or a pharmaceutical formulation comprising same for use as defined in any one of claims 22 to 32, wherein said therapeutically effective amount of trehalose or pharmaceutical formulation comprising thereof is administered periodically.

43. An aqueous pharmaceutical formulation comprising a therapeutically effective amount of trehalose as a sole active ingredient, wherein the formulation has a pH about 4.5 to 7.0 and contains less than 0.74 endotoxin units per ml and wherein said pharmaceutical formulation is adapted for parenteral administration.

44. The aqueous pharmaceutical formulation of claim 43, adapted for intravenous, intramuscular or intraperitoneal administration.

45. The aqueous pharmaceutical formulation of claim 43 or claim 44, optionally further comprising at least one pharmaceutically acceptable additive, carrier, excipient or diluents.
46. The aqueous pharmaceutical formulation of any one of claims 43 to 45, wherein the concentration of the trehalose is between about 0.1 % (w/v) to about 50 % (w/v).
47. The aqueous pharmaceutical formulation of any one of claims 43 to 46, wherein the concentration of the trehalose is about 10 % (w/v).
48. The aqueous pharmaceutical formulation of any one of claims 43 to 47, wherein the formulation has an osmolality of about 280-330 mOsm/kg.
49. The aqueous pharmaceutical formulation of any one of claims 43 to 48, wherein the formulation is administered at a frequency between once daily to once per month.
50. The aqueous pharmaceutical formulation of any one of claims 43 to 47, wherein said therapeutically effective amount of trehalose is from about 1 gram to about 100 gram for each daily injection and no more than about 1 gram/kg body weight of said subject per day.
51. The aqueous pharmaceutical formulation of any one of claims 43 to 50, wherein the formulation is administered once daily at from about 10 mg/kg/day to about 1 gram/kg/day of trehalose.
52. The aqueous pharmaceutical formulation of any one of claims 43 to 51, wherein the formulation is administered at a frequency of between once daily to once per month at a dose of about 5 to about 35 grams of trehalose comprised therein.
53. The aqueous pharmaceutical formulation of claim 52, for administration once daily, once every other day, twice a week, once a week, once every two weeks, once every three weeks or once a month.
54. The aqueous pharmaceutical formulation of claim 53, wherein the dose is 5, 8, 15, 30, 40 or 50 grams.

55. The aqueous pharmaceutical formulation of any one of claims 43 to 54, wherein the rate of administration is such that the maximum endotoxin level is less than 5 endotoxin units per kilogram of body weight per hour.

56. The aqueous pharmaceutical formulation of any one of claims 43 to 55, wherein the formulation is adapted for intravenous administration and wherein said administration is completed within from about 75 to about 120 minutes, specifically within less than 90 minutes.

57. The aqueous pharmaceutical formulation of any one of claims 43 to 56, for treating a disease associated with abnormal protein aggregation and/or inclusion bodies formation in myocytes, neurons and other cells or extracellular compartments or for alleviating a sign or symptom associated therewith in a human subject in need thereof.

58. The aqueous pharmaceutical formulation of claim 57, wherein said disease is any one of oculopharengeal muscular dystrophy (OPMD), spinocerebellar ataxia (SCA), Friedreich's ataxia, spinal and bulbar muscular atrophy (SBMA), Huntington's disease, Parkinson's disease, Alzheimer's disease, amyotrophic lateral sclerosis (ALS), dentatorubral-pallidoluysian atrophy (DRPLA), Pick's disease, Corticobasal degeneration (CBD), Progressive supranuclear palsy (PSP) and Frontotemporal dementia and parkinsonism linked to chromosome 17 (FTDP-17).

59. A kit comprising:

- (a) pharmaceutically acceptable trehalose or active derivative thereof;
- (b) at least one pharmaceutically acceptable additive, carrier, excipient and diluent;
- (c) means for preparing an injectable aqueous solution of the trehalose by mixing said trehalose with at least one of said additive, carrier, excipient and diluent;
- (d) means for parenterally administering said injectable solution to a patient in need;
- (e) instructions for use.

1/2

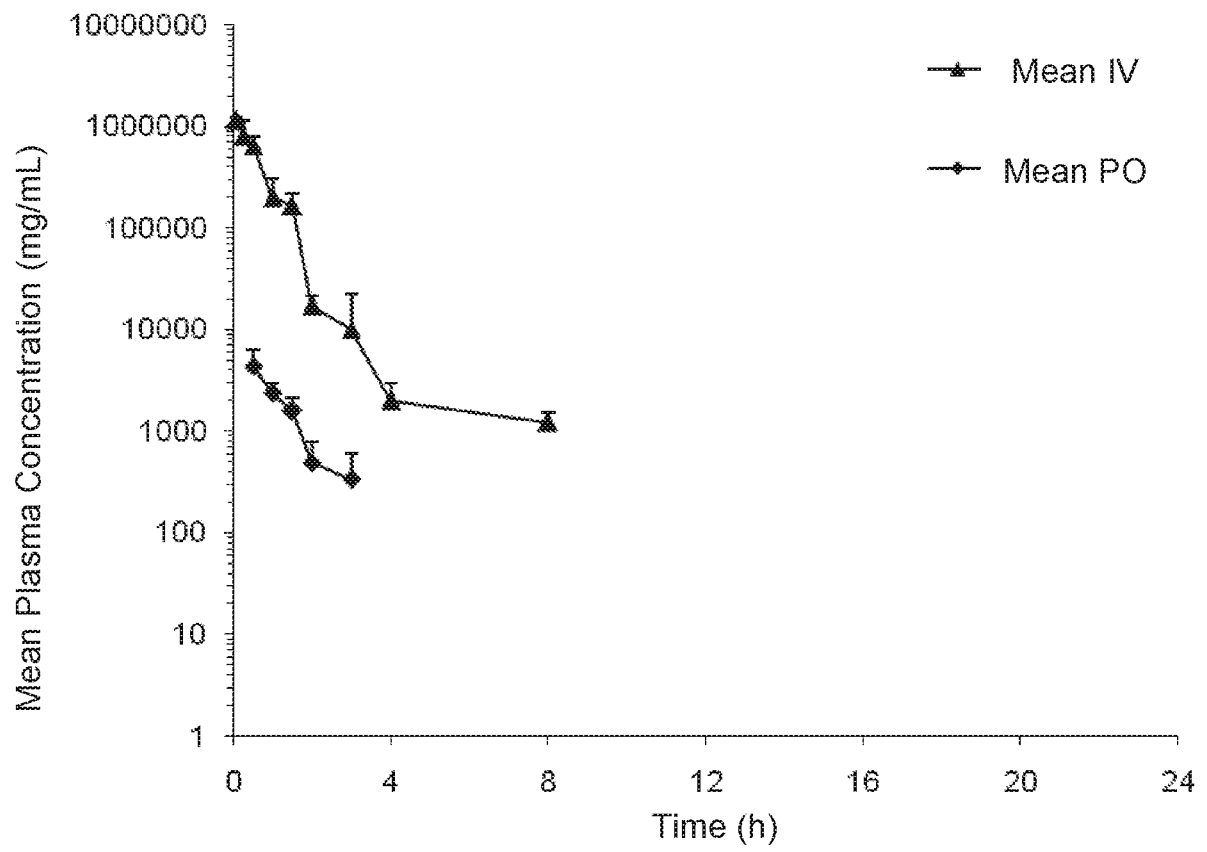


Fig. 1

2/2

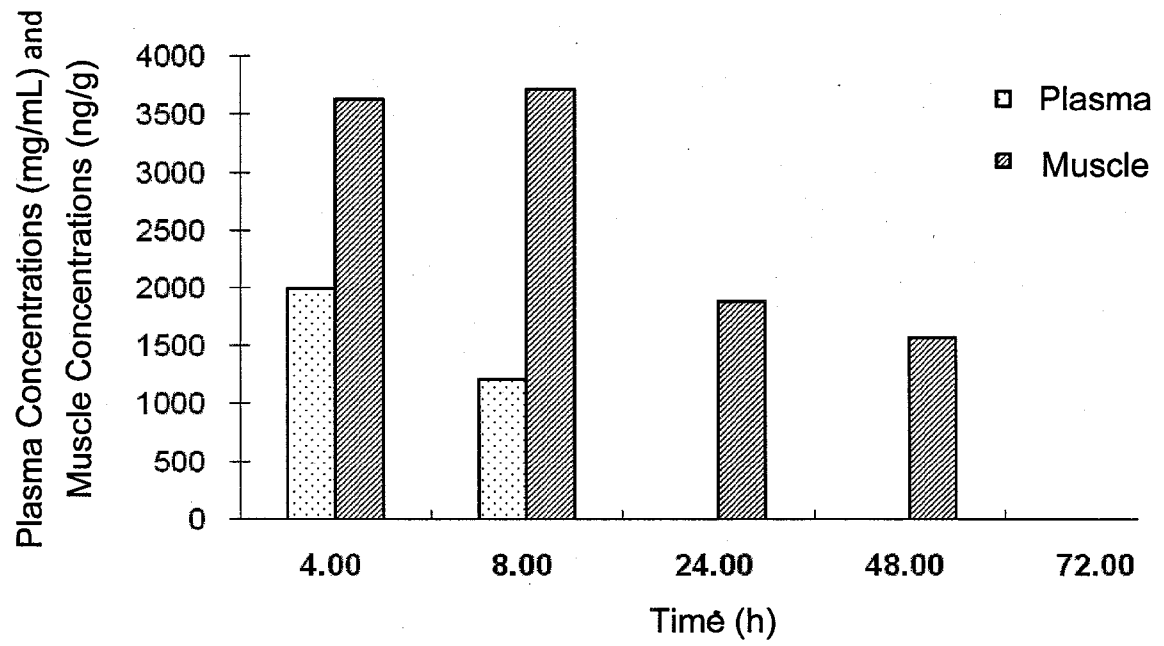


Fig. 2



Espacio reservado para el adhesivo de radicación

**FORMULARIO PARA OTORGAR PODER A ABOGADO
EN LOS TRÁMITES DE PROPIEDAD INDUSTRIAL**

1. Datos del otorgante

☐ Persona Natural ☒ Persona Jurídica

BIO BLAST PHARMA LTD.

Nombre o denominación / Razón Social completa (En caso de que haya más de un solicitante, relaciónese en hoja adjunta)

Tipo de empresa ☐ Micro ☐ Pequeña ☐ Mediana ☒ OtraDocumento de identificación: ☐ C.C. ☐ C.E. ☐ NIT ☒ Otro Número

Nacionalidad/País de constitución	Dirección del Titular	
Israel	37 Menachem Begin Street Rubinstein Tower, 15th floor 6522042 Tel Aviv, Israel	
Dirección Electrónica	No. Fax	Número telefónico
tobos@tobos.com.co	812 3335	812 3335

2. Datos del apoderado

TOBOS MATEUS, ANDREA 52.223.325 148648
Apellidos y Nombre Documento de Identificación T.P. (sólo abogados profesionales)

Nacionalidad/País de constitución	Dirección del Titular	
COLOMBIANA	Carrera 7C No. 138-19 Oficina 901 Bogotá, D.C. Colombia	
Dirección Electrónica	Número de Fax	Número telefónico
andrea.tobos@tobos.com.co	8 123335	8 123335

☒ Autorizo expresamente a la Superintendencia de Industria y Comercio para que todas las comunicaciones sean enviadas a través de la dirección de correo electrónico: andrea.tobos@tobos.com.co

Mediante el presente documento, la persona indicada en el punto 1 de este documento nombra a la persona que se identifica en el punto 2 como apoderado para las actuaciones que se relacionan a continuación:

3. Actuaciones en cuestión

Este poder concierne:

☒ Todas las solicitudes de signos distintivos y de nuevas creaciones; y registros o patentes actuales y futuros del otorgante; inscripción de fusiones, conversiones o divisiones, cambios de nombre, traspasos, cambios de domicilio y de dirección; inscripción de contratos de prenda, inscripción de licencias de uso,

embargos, renovaciones y otros actos que afecten o limiten los mencionados derechos de propiedad industrial; presentación y tramitación de oposiciones y acciones de cancelación relacionadas con trámites de propiedad industrial, a cuyo efecto la faculta para presentar solicitudes, peticiones y demandas, interponer recursos, reclamos, pagar impuestos y tasas, recibir, transigir y desistir, incluyendo facultades para entrar en acuerdos amigables, conciliaciones y transacciones, y en general, a dar ante las autoridades competentes todos los pasos necesarios para la debida protección de nuestra (mi) propiedad industrial; asimismo, se concede a la mencionada mandataria poder suficiente para recibir notificaciones a nombre de la compañía, sustituir el presente poder y revocar dichas sustituciones.

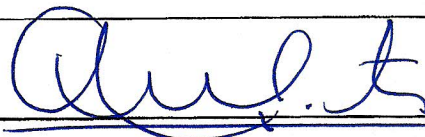
☒ Confiero expresamente al apoderado todas las facultades legales para que represente mi(s) interés(es) en la(s) actuación(es) señalada(s) en el punto 3 de este documento, incluyendo:

☒ Desistir de la(s) solicitud(es) y de las demás actuaciones

☒ Renunciar a los derechos del registro de signos distintivos o de nuevas creaciones

☐ El apoderado no está facultado para actuar como representante en los siguientes asuntos:

Nota: Si el espacio no es suficiente, por favor relacione las actuaciones siguiendo las instrucciones antes dadas en la hoja anexa.

5. Firma	
☒ <u>D. Megiddo</u>	
FIRMA DEL PODERDANTE	FIRMA DEL APODERADO
☒ <u>Dalia Megiddo</u>	ANDREA TOBOS MATEUS
NOMBRE DEL PODERDANTE	T.P. 148648
☒ <u>Israel Passport Number 050694348</u>	C.C. 52.223.325
DOCUMENTO DE IDENTIFICACIÓN	
☒ <u>2015</u>	
FECHA DE FIRMA	

Instrucciones:

Firmar en el punto 5 sobre la línea de "firma del poderdante" y en la versión en Inglés en el punto 5 sobre la línea de "signature of the grantor". Incluir el nombre de la persona que firma.

No requiere ningún tipo de legalización o presentación personal.

Se divulga un método para tratar una enfermedad asociada con agregación anormal de proteína que comprende formulaciones farmacéuticas de administración parenteral que
5 comprende trehalosa. También se divulga una formulación farmacéutica acuosa inyectable que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de trehalosa.

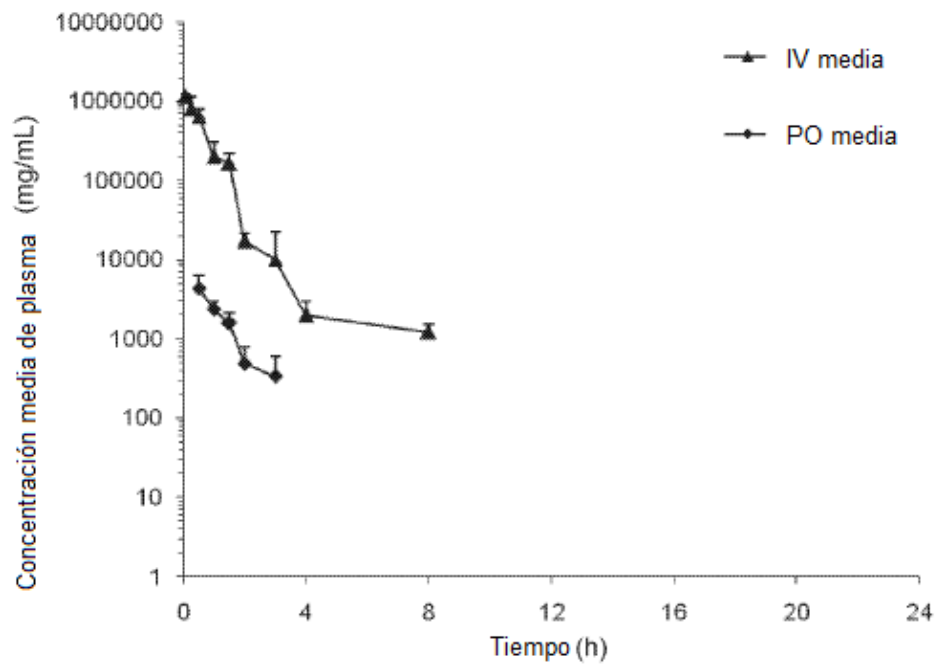


Fig. 1

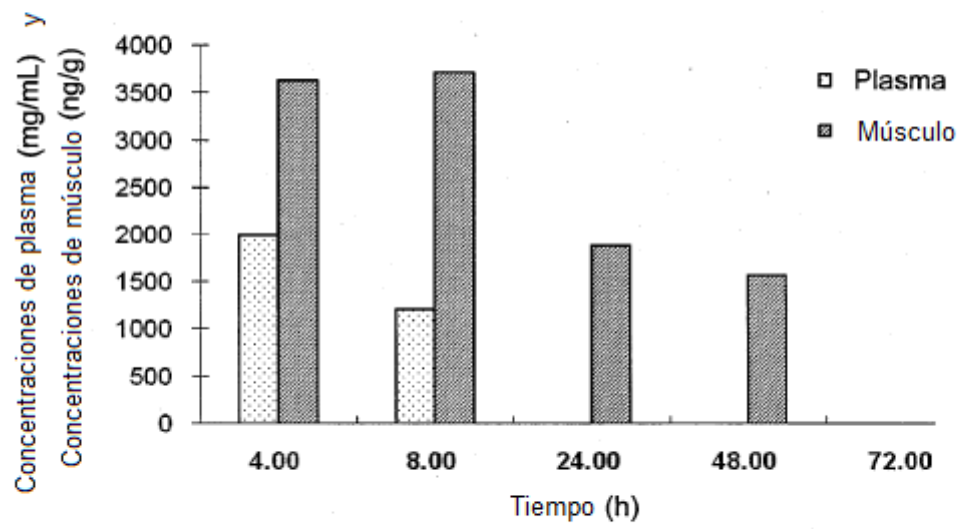


Fig. 2

**TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES MIOPÁTICAS Y NEURODEGENERATIVAS
POR AGREGACIÓN DE PROTEÍNA MEDIANTE ADMINISTRACIÓN PARENTERAL
DE TREHALOSA**

5

CAMPO TÉCNICO

El tema actualmente divulgado se refiere al uso de la trehalosa en el tratamiento de miopatías, trastornos neurodegenerativos o tauopatías asociados a la agregación de proteína anormal.

TÉCNICA PREVIA

Las referencias consideradas relevantes como antecedentes para el tema actualmente presentado se mencionan a continuación:

[1] Brunet, G. et al., 1990 *Dystrophie musculaire oculo-pharyngée. Recensement des familles françaises et études généalogiques. Rev Neurol* 4:429-434.

[2] Blumen, S.C. et al., 1997 *Epidemiology and inheritance of oculopharyngeal muscular dystrophy in Israel. Neuromuscul Disord* 7:S38 - 40.

[3] Becher, M.W. et al., 2001 *Occulopharyngeal Muscular*

Dystrophy in Hispanics New Mexicans. JAMA. 286(19):2437-40.

[4] Grewal, R.J. et al., 1999 Mutation Analysis of Oculopharyngeal Muscular Dystrophy in Hispanic American Families. *Arch Neurol* 56(11):1378-1381.

5 [5] Yamamoto, A. et al., 2000. Reversal of neuropathology and motor dysfunction in a conditional model of Huntington's disease. *Cell* 101:57-66.

[6] Meyer-Luehmann, M. et al., 2008. Rapid appearance and local toxicity of amyloid-beta plaques in a mouse model
10 of Alzheimer's disease. *Nature* 451:720-724.

[7] Spires-Jones, T.L. et al., 2009. Passive immunotherapy rapidly increases structural plasticity in a mouse model of Alzheimer disease. *Neurobiol Dis* 33:213-220.

[8] McClellan, A.J. y Frydman, J. 2001. Molecular
15 chaperones and the art of recognizing a lost cause. *Nat Cell Biol* 3:E51-E53.

[9] Winklhofer, K.F. et al., 2001. Geldanamycin restores a defective heat shock response in vivo. *J Biol Chem* 276:45160-45167.

20 [10] Tanaka, M. et al., 2004. Trehalose alleviates polyglutamine-mediated pathology in a mouse model of Huntington disease. *Nat Med* 10:148-154.

[11] Davies, J.E. et al., 2006. Trehalose reduces aggregate formation and delays pathology in a transgenic

mouse model of oculopharengeal muscular dystrophy. *Hum Mol Genet* 15:23-31.

[12]WHO Food Additives

(<http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v46je05.>

5 [htm](#)).

[13]Berg, N.O. et al., 1963. Correlation between morphological alterations and enzyme activities in the mucosa of the small intestine. *Scand J Gastroenterol* 8:703-712.

[14]Hore, P. & Messer, M. 1968. Studies on
10 disaccharidase activities in the small intestine of domestic cats and other carnivorous mammals. *Comp Biochem Physiol* 24:717-725.

[15]<http://www.tga.gov.au/pdf/euguide/ich822602006.pdf>.

[16]Langer R 1990. New methods of drug delivery.
15 *Science* 28;249:1527-1533.

[17]Oral Trehalose Therapy to Reverse Arterial Aging in Middle-Aged and Older Adults.
<http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01575288>.

20 El reconocimiento de las referencias anteriores en el presente documento no debe ser inferido como que significan que estos están en cualquier forma relevantes a la patentabilidad del tema actualmente descrito.

ANTECEDENTES

Varios grupos de enfermedades resultantes de mutaciones repetidas de trinucleótidos son conocidas. Estas enfermedades se caracterizan por tramos anormales de aminoácidos en proteínas específicas codificadas por un gen mutado. Los agregados de la proteína mutante en las células que causan típicos cuerpos de inclusión celular citotóxicos.

Los trastornos identificados como trastornos de reiteración del codón de proteína que contienen expansiones de un tramo homopolimérico de aminoácidos, específicamente poliglutamina (poli Q) o polialanina (poli A). Por lo menos ocho trastornos neurodegenerativos se han asociado con expansiones de poliglutamina, incluyendo la enfermedad de Huntington (HD, por sus siglas en inglés), atrofia muscular espinal y bulbar (SBMA, por sus siglas en inglés), atrofia dentato-rubro-palido-luisiana (DRPLA) y varias formas de ataxia espinocerebelosa (SCA, por sus siglas en inglés). Las expansiones de polialanina están asociadas con varias anomalías congénitas raras y severas, pero también con la distrofia muscular de oculofaringea (OPMD, por sus siglas en inglés). Condiciones asociadas adicionales con la expansión de expansiones de polialanina pueden incluir trastornos distróficos.

Una de dichas enfermedades es la Distrofia Muscular de Oculofaringea (OPMD), una miopatía hereditaria rara caracterizada por ptosis, disfagia severa y debilidad proximal de extremidades. Su prevalencia estimada es de 1:100.000 y los grupos más grandes reportados estaban en familias de origen Francocanadienses en Canadá y en Estados Unidos (prevalencia 1:1000), los judíos de Bukhara en Israel (prevalencia 1:600) y los hispanos en Nuevo México, Arizona, Colorado y California [1-4]. La OPMD se hereda, en la mayoría de los casos, como un rasgo autosómico dominante con penetrancia completa. La enfermedad es igualmente frecuente entre ambos sexos. El gen asociado con la enfermedad codifica la proteína de unión la proteína nuclear 1 (PABPN 1), una proteína nuclear implicada en la poliadenilación del pre-mARN, regulación de la transcripción y transporte nucleocitoplásmico de mARN. La mutación que causa la OPMD resulta en la producción de un poli (A) PABPN 1 anormal.

La enfermedad se diagnostica más a menudo en las quinta-sexta décadas de la vida y progresa a lo largo de la vida del paciente. Por la edad de los 70, la mayoría de los pacientes padecen todos o algunos de los siguientes síntomas: disfagia grave, ptosis, atrofia y debilidad de la lengua, debilidad proximal de extremidades superior e inferior, disfonía, limitación en la mirada hacia arriba y debilidad

muscular facial. Mientras que la ptosis se vuelve más pronunciada, los pacientes adaptan la "postura del astrónomo" inclinación de la cabeza y la mirada hacia arriba - agravando más la disfagia. La disfagia empieza con dificultad para
5 deglutir comida sólida y también progresa a líquidos. Mientras que la disfagia se vuelve más severa, los pacientes se vuelven desnutridos, caquécticos, deshidratados y sufren de neumonía repetidas por aspiración. La OPMD no parece acortar la esperanza de vida pero se asocia con debilidad
10 severa y disminución de la calidad de vida.

No existe tratamiento médico o curación potencial para la OPMD. Las estrategias terapéuticas actuales se limitan a intervenciones quirúrgicas destinadas a aliviar la ptosis. Se utilizan frecuentemente dilataciones cricofaríngea para
15 aliviar la disfagia. La miotomía de la parte superior de los músculos del esfínter del esófago también ha sido empleada. Estos procedimientos pueden proporcionar solamente alivio temporal y no afectan la progresión de la enfermedad que eventualmente lleva a dificultad severa en deglutir,
20 aspiración recurrente con el aumento de riesgo de neumonía por aspiración y pérdida de peso severa que son las causas más comunes de mortalidad en los pacientes con OPMD.

Por consiguiente, hay una necesidad urgente de composiciones y métodos terapéuticos para aliviar los signos

y síntomas de la distrofia muscular oculofaríngea.

Aunque existen controversias respecto al papel específico de los agregados de proteína en los mecanismos subyacentes a la degeneración celular, una opinión
5 ampliamente aceptada es que los agregados de proteína, el proceso de agregación y/o especies oligoméricas tempranas son tóxicos y son fundamentales para la patología degenerativa. Una importante pieza de evidencia fue proporcionada por los estudios que muestran que el proceso degenerativo se puede
10 suprimir e incluso revertir si se detecta en una etapa temprana [5]. Además, estudios más recientes han demostrado que la rotación de muchas proteínas culpables es más rápido que lento [6, 7] y que la formación de inclusión es reversible así como el neurotransmisor resultante y, lo más
15 importante, anormalidades del comportamiento.

Una de las nuevas estrategias terapéuticas es mejorar los mecanismos de defensa celulares nativos contra las proteínas agregadas y mal plegadas, por ejemplo utilizando chaperonas moleculares que facilitan el plegamiento normal y
20 replegamiento de las conformaciones anormales de nuevo al estado nativo [8]. Los fármacos tales como geldanamicina pueden modular y mejorar los niveles de chaperonas [9]. La geldanamicina, sin embargo, tiene toxicidad substancial y no penetra bien la barrera hematoencefálica. También es posible

estimular la actividad del proteasoma, aunque este enfoque puede tener el peligro de alterar la rotación de las moléculas normalmente reguladas por la degradación proteasomal. Además, la administración oral del disacárido trehalosa, un disacárido conocido por su efecto estabilizador de proteína, ha demostrado en modelo de ratón HD reducir los agregados de poliglutamina, mejorar la disfunción motora y prolongar la supervivencia [10]. Más recientemente, se han reproducido estos resultados tras la administración oral de la trehalosa en un modelo murino de OPMD [11].

La trehalosa, un disacárido de glucosa (α -G-glucopiranosil α -D-glucopiranososa), se encuentra en muchas plantas, hongos, bacterias, insectos y otros invertebrados, donde sirve como un excipiente natural. Debido a sus únicas propiedades físicas y bioquímicas demostradas en su capacidad para mantener y preservar una gran variedad de moléculas biológicas, la trehalosa ha encontrado su uso en varios productos alimenticios y cosméticos y más en particular en productos terapéuticos. La trehalose es un ingrediente aprobado en todos los mercados principales designado como ingrediente alimentario GRAS por la FDA [12].

Actualmente se está realizando un estudio clínico en los Estados Unidos que examina el efecto de grandes cantidades de trehalosa administrados por vía oral en la

prevención del envejecimiento arterial. En este estudio, los investigadores comparan el efecto de la trehalosa o maltosa o una combinación de los dos fármacos en un biomarcador asociado al envejecimiento arterial [17].

5

DESCRIPCIÓN GENERAL

En uno de sus aspectos el tema divulgado actualmente proporciona un método para tratar o aliviar una enfermedad asociada a la agregación anormal de proteínas y/o formación de cuerpos de inclusión en miocitos, neuronas y otras células o compartimientos extracelulares, o por lo menos un síntoma asociado a los mismos, en un sujeto humano en necesidad del mismo que comprende la administración parenteral a dicho sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva de trehalosa o una formulación farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de trehalosa.

En lo anterior y en otras modalidades la enfermedad de acuerdo con el tema actualmente divulgado es cualquiera del trastorno de agregación de polialanina, trastorno de agregación de poliglutamina y una tautopatía, por ejemplo cualquiera de la distrofia muscular oculofaríngea (OPMD), ataxia espinocerebelosa (SCA), la ataxia de Friedreich, la atrofia muscular espinal y bulbar (SBMA), enfermedad de

Huntington, enfermedad de Parkinson, la enfermedad de Alzheimer y esclerosis lateral amiotrófica (ALS, por sus siglas en inglés), la dentato-rubro-palido-luisiana (DRPLA) , Enfermedad de pick, la degeneración Corticobasal (CBD),
5 parálisis supranuclear progresiva (PSP) y Demencia Frontotemporal y parkinsonismo vinculado al cromosoma 17 (FTDP-17) .

En lo anterior y otras modalidades la formulación farmacéutica de acuerdo con el tema actualmente divulgado es
10 una solución inyectable para administración parenteral, particularmente para administración intravenosa, intramuscular e intraperitoneal.

En algunas modalidades la formulación farmacéutica de acuerdo con el tema actualmente divulgado comprende trehalosa
15 como único ingrediente activo, y opcionalmente comprende además al menos un aditivo, portador, excipiente o diluyente farmacéuticamente aceptable.

En todas las modalidades la concentración de trehalosa en la formulación de acuerdo con el tema actualmente
20 divulgado está entre aproximadamente 0.1% (p/v) a aproximadamente 50% (p/v), en particular alrededor del 10% (p/v) .

En algunas modalidades de la formulación farmacéutica que comprende trehalosa de acuerdo con el tema actualmente

divulgado tiene una osmolalidad de desde alrededor de 280 a alrededor de 330 mOsm/Kg.

En lo anterior y otras modalidades la formulación farmacéutica de acuerdo con el tema actualmente divulgado que
5 comprende menor del 0.74 de unidades de endotoxina por ml de solución.

La cantidad terapéuticamente efectiva de trehalosa de acuerdo con el tema actualmente divulgada es desde aproximadamente 1 gramo a aproximadamente 100 gramos para
10 cada inyección individual y no más de aproximadamente 1 gramo/kg de peso corporal de dicho tema por día.

En otras modalidades la cantidad terapéuticamente efectiva de trehalosa o trehalosa comprendida en dicha formulación farmacéutica es administrada una vez diariamente
15 desde alrededor de 10 mg/kg/día a alrededor de 1 gramo/kg/día de trehalosa.

En otras modalidades la cantidad terapéuticamente efectiva de trehalosa o trehalosa comprendida en dicha formulación farmacéutica de acuerdo con el tema actualmente
20 divulgado se administra en una dosis única de 5, 8, 15, 30, 40 ó 50 gramos de trehalosa.

La cantidad terapéuticamente efectiva de trehalosa o la formulación farmacéutica que comprende el mismo de acuerdo a la presente divulgación puede administrarse crónicamente o

periódicamente.

En lo anterior y otras modalidades la cantidad terapéuticamente efectiva de trehalosa o formulación farmacéutica que comprende del mismo de acuerdo a la presente
5 divulgación se administra a una frecuencia de entre una vez diario a una vez al mes.

En otras modalidades la cantidad terapéuticamente efectiva de trehalosa o trehalosa comprendida en dicha formulación farmacéutica de acuerdo con la presente
10 divulgación se administra en una sola administración de inyección una vez a la semana.

En todavía modalidades adicionales la cantidad terapéuticamente efectiva de trehalosa o formulación farmacéutica que comprende la misma de acuerdo al tema
15 actualmente divulgado se administra por vía intravenosa en una dosis única de aproximadamente 5 a aproximadamente 35 gramos de trehalosa, que puede administrarse una vez diario, una vez cada dos días, dos veces a la semana, una vez por semana, una vez cada dos semanas , una vez cada tres semanas
20 o una vez al mes.

En lo anterior y otras modalidades de la formulación farmacéutica de acuerdo al tema actualmente divulgado es una solución inyectable y en donde la tasa de administración es de manera que el nivel máximo de endotoxina es menor que 5

unidades de endotoxina por kilogramo de peso corporal por hora.

En algunas modalidades la administración de la cantidad terapéuticamente efectiva de trehalosa comprendida en dicha formulación farmacéutica como se define en el presente, que
5 está adaptado para la administración intravenosa, se completa dentro de alrededor de 75 a alrededor de 120 minutos, específicamente dentro de menos de 90 minutos.

En otras modalidades la administración de acuerdo al
10 tema actualmente divulgado comprende un régimen de dosis de dosis iguales, o dosis que aumenta gradualmente, o dosis que disminuyen gradualmente de trehalosa o una formulación farmacéutica que comprende la misma.

En otro de sus aspectos el tema actualmente divulgado
15 proporciona trehalosa o una formulación farmacéutica que comprende la misma, para uso en un método para tratar o aliviar una enfermedad asociada a la agregación anormal de proteínas y/o formación de cuerpos de inclusión en miocitos, neuronas y otras células o compartimientos extracelulares, o
20 por lo menos un síntoma asociado a los mismos, en un sujeto humano en necesidad del mismo que dicho método comprende la administración parenteral a dicho sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva de trehalosa o una formulación farmacéutica que comprende la misma.

En un aspecto adicional el tema actualmente divulgado proporciona una formulación farmacéutica acuosa que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de trehalosa como ingrediente activo único, en donde la formulación tiene un pH de alrededor de 4.5 a 7.0 y que contiene menos de 0.74 unidades de endotoxina por ml y en donde dicha formulación farmacéutica está adaptada para la administración parenteral.

El tema actualmente divulgado proporciona además un kit que comprende:

- 10 (a) trehalosa o un derivado activo de la misma farmacéuticamente aceptable;
- (b) al menos un aditivo, portador, excipiente y diluyente farmacéuticamente aceptable;
- (c) los medios para la preparación de una solución acuosa inyectable de trehalosa mezclando dicha trehalosa con al menos uno de dichos aditivo, portador, excipiente y diluyente;
- 15 (d) los medios para administrar por vía parenteral dicha solución inyectable a un paciente en necesidad;
- 20 (e) Instrucciones de uso.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Para poder entender mejor el tema que se describe en el

presente documento y para ejemplificar como se puede llevar a cabo en la práctica, las modalidades se describirán ahora a modo de ejemplo no limitante sólo, con referencia a los dibujos que se acompañan, en los cuales:

5

La Fig. 1 la concentración de plasma media de trehalosa después de administración i.v. o p.o.

Un gráfico que muestra las fluctuaciones en la concentración de plasma de la trehalosa administrada por vía intravenosa (iv) o por vía oral (po) a ratas, durante 8 horas después de la administración.

10

La Fig. 2 Concentraciones de plasma y músculo de la trehalosa después de la administración intravenosa

15

Un gráfico de barras que muestra las fluctuaciones en las concentraciones de plasma y músculo de la trehalosa administrada por vía intravenosa (1 g/kg) a ratas, durante 72 horas después de la administración.

20

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LAS MODALIDADES

El tema actualmente divulgado se basa en el hallazgo sorprendente que después de la administración parenteral, por ejemplo, administración intravenosa de una formulación acuosa

que comprende trehalosa, las cantidades terapéuticamente eficaces de trehalosa alcanzaron el plasma y se acumuló en el músculo de los animales probados en comparación con los niveles de trehalosa en el plasma y los músculos obtenidos después de la administración oral de tales formulaciones.

La trehalosa es conocida por su capacidad para mantener y preservar una gran variedad de moléculas biológicas. La trehalosa se ha utilizado en una variedad de aplicaciones de investigación y está contenida en varios productos terapéuticos disponibles comercialmente, incluyendo Herceptin, Avastin, Lucentis y Advate, donde sirve principalmente como un lioprotector. Aunque la trehalosa es ampliamente utilizada como un excipiente/aditivo junto con otro ingrediente activo, su uso como un ingrediente activo terapéutico *per se* es bastante excepcional.

La trehalosa es capaz de inhibir la agregación intracelular de proteínas anormales asociadas con miopatías y enfermedades neurodegenerativas. El ejemplo principal es el efecto de supresión de agregación de la trehalosa en la huntingtina mutada, una proteína poliglutamina que causa la enfermedad de Huntington (HD). La administración oral de la trehalosa a ratones HD transgénicos (0.2-5% de trehalosa en el agua potable consumida espontáneamente en el curso de 5-9 semanas) condujo a la inhibición de la formación de agregados

de huntingtina intra nuclear en el cerebro e hígado y, lo más importante condujo a la mejora de los síntomas motores relacionados con HD.

Curiosamente, el uso terapéutico de la trehalosa, especialmente en el contexto de enfermedades neuronales y musculares, está impedido significativamente por el hecho de que la trehalosa es hidrolizada por la trehalasa enzima intrínseca en el borde del cepillo epitelial en el intestino delgado [13, 14], debido a que sólo una pequeña fracción de cualquier dosis administrada por vía enteral alcanza el torrente sanguíneo, neuronal o los tejidos musculares. La presente divulgación tiene como objetivo introducir un nuevo régimen terapéutico mediante la administración parenteral de la trehalosa, consiguiendo así mayor biodisponibilidad y eficacia terapéutica en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas y miopáticas asociadas con la agregación anormal de proteínas, específicamente del polialanina poliglutamina y tauopatías, trastornos y OPMD en particular.

Así el tema divulgado actualmente proporciona un método para tratar o aliviar una enfermedad asociada a la agregación anormal de proteínas y/o formación de cuerpos de inclusión en miocitos, neuronas y otras células o compartimientos extracelulares, o por lo menos un síntoma asociado a los mismos, en un sujeto humano en necesidad del

mismo que comprende la administración parenteral a dicho sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva de trehalosa o una formulación farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de trehalosa.

5 Tal como se define en este documento el término "enfermedad asociada con agregación anormal de proteínas y/o formación de cuerpos de inclusión en miocitos, neuronas y otras células o compartimentos extracelulares" se refiere a cualquier enfermedad asociada a la agregación de proteína o
10 mal plegamiento de proteínas, donde la característica biológica subyacente común de estas enfermedades es la agregación de ciertos péptidos y proteínas, generando así una cascada de eventos patológicos, incluyendo la agregación secundaria de varias otras proteínas y la consecuente falta
15 de homeostasis de proteínas para preservar la función biológica normal.

 El término "tratar o aliviar" como aquí se define se refiere a lograr un efecto terapéutico, mejorar, aliviar o reducir la severidad y/o frecuencia de al menos un signo o
20 síntoma asociado con enfermedades como aquí se definen, eliminación de signos o síntomas y/o causas subyacentes, prevención de la aparición de síntomas y/o su causa subyacente (p. ej., terapia profiláctica), mejora o reparación de daños y eliminar o reducir el alcance de la

agregación de la proteína.

Los síntomas asociados con las enfermedades como se definen en el presente documento incluyen, pero no están limitados a, los párpados caídos (una condición conocida como "ptosis"), dificultad para deglutir (llamado "disfagia"), fatiga muscular, trastornos del movimiento y trastornos cognitivos por nombrar algunos.

En particular, donde la enfermedad a tratar es la OPMD, las formulaciones y métodos descritos en este documento son útiles en el tratamiento de los signos y síntomas de la OPMD. Los signos y síntomas de la OPMD incluyen disfagia severa, ptosis, atrofia de la lengua y debilidad, debilidad proximal de extremidades inferiores y superiores, disfonía, limitación en la mirada hacia arriba y debilidad muscular facial.

Como se conoce en la materia, los trastornos y enfermedades amplios se definen como "enfermedad asociada con la agregación anormal de proteína y/o formación de cuerpos de inclusión en miocitos, neuronas y otras células o compartimentos extracelulares". Por ejemplo, el tema actualmente divulgado proporciona un método para tratar o aliviar una enfermedad asociada a la agregación anormal de proteína que es un trastorno neurodegenerativo, un trastorno de agregación de poliglutamina o de polialanina, un trastorno de reiteración del codón de proteína, una miopatía y una

tautopatía, por nombrar algunos.

El término "trastorno neurodegenerativo" como se define en el presente se refiere a condiciones hereditarias o esporádicas, caracterizadas por la disfunción progresiva del sistema nervioso, específicamente los trastornos de este grupo que se asocian con la formación de agregados anormales de proteína, también conocidos como formación de cuerpos de inclusión. Ejemplos para un trastorno neurodegenerativo que se asocia con la agregación anormal de proteínas son esclerosis lateral amiotrófica (ELA), enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson y otros.

Los términos "poliglutamina", "trastorno de agregación de polialanina" o "trastorno de reiteración del codón de proteína" como se definen en el presente se refieren a trastornos asociados con la formación de agregados intracelulares de poliglutaminas o polialaninas, refiriéndose preferentemente a la distrofia muscular oculofaríngea (OPMD), enfermedad de Huntington (EH), atrofia muscular espinal y bulbar (SBMA), atrofia dentato-rubro-palido-luisiana (DRPLA) y la ataxia espinocerebelosa (SCA).

El término "Miopatía" como se define en el presente documento se refiere a una enfermedad degenerativa hereditaria o adquirida, que implica atrofia de las fibras musculares, en el contexto de la presente divulgación

especialmente refiriéndose a la OPMD.

El término "tauopatía" como se define en el presente se refiere a las enfermedades neurodegenerativas asociadas con la patología tau, agregación intracelular prototípica de microfilamentos tau, en el contexto de la presente divulgación especialmente refiriéndose a la enfermedad de Pick, la degeneración corticobasal (CBD), parálisis supranuclear progresiva (PSP) y demencia frontotemporal y parkinsonismo vinculado al cromosoma 17 (FTDP-17).

Las tauopatías se conocen como enfermedades causadas por las mutaciones que llevan al mal plegamiento de la proteína asociada a microtúbulos Tau que une y estabiliza los microtúbulos en células neuronales. La patología Tau es una característica prominente de la enfermedad de Alzheimer (AD) esporádica, pero también se observa en una variedad de otras enfermedades neurodegenerativas relacionadas, tales como la enfermedad de Pick, la degeneración Corticobasal (CBD), parálisis supranuclear progresiva (PSP) y la Demencia Frontotemporal y parkinsonismo vinculado al cromosoma 17 (FTDP-17). Más de 30 diferentes substituciones de nucleótido o mutaciones heredadas en el gen FTDP-17 en el cromosoma 17q21 se han relacionado con enfermedades neurodegenerativas que manifiesta una agregación intracelular prototípica de los microfilamentos tau. La mutación de Tau y por la analogía de

la disfunción de tau en las enfermedades heredadas y esporádicas puede ser patogénica a través de mecanismos que implican tanto la pérdida de la función (estabilización disminuida de microtúbulos) y ganancia tóxica de función (formación fibrilar aumentada).

Así en lo anterior y otras modalidades la enfermedad es cualquiera del trastorno de agregación de polialanina, trastorno de agregación de poliglutamina y una tautopatía.

En lo anterior y en otras modalidades como se define en el presente es cualquiera de la distrofia muscular oculofaríngea (OPMD), ataxia espinocerebelosa (SCA), la ataxia de Friedreich, la atrofia muscular espinal y bulbar (SBMA), enfermedad de Huntington, enfermedad de Parkinson, la enfermedad de Alzheimer y esclerosis lateral amiotrófica (ALS, por sus siglas en inglés), la dentato-rubro-palido-luisiana (DRPLA) , Enfermedad de pick, la degeneración Corticobasal (CBD), parálisis supranuclear progresiva (PSP) y Demencia Frontotemporal y parkinsonismo vinculado al cromosoma 17 (FTDP-17).

En algunas modalidades la enfermedad como se define en el presente es distrofia muscular oculofaríngea (OPMD).

Como se indicó anteriormente, la OPMD es causada por expansiones anormales heredadas de la polialanina en la proteína nuclear 1 de unión a poli A (PABPN1) llevando al mal

plegamiento de PABPN1 y la formación de inclusiones túbulo-filamentosas/agregados en los núcleos de las células musculares afectadas. La administración oral de la trehalosa a ratones transgénicos con OPMD (2% de trehalosa en agua potable consumido espontáneamente durante 4-6 meses) demostró que reduce significativamente la formación de agregación y toxicidad del mutante PABPN1 en miocitos. En general, la trehalosa demostró retrasar la aparición de la OPMD, atenuar el fenotipo de la enfermedad, disminuir la formación de agregados de la proteína de polialanina y disminuir la muerte celular, sugiriendo así que la trehalosa puede ser una terapia potente anti-agregación para la OPMD y otros trastornos de reiteración del codón de proteína.

Como se indica en los ejemplos adjuntos, los inventores han demostrado que la trehalosa puede ser entregado con éxito al músculo, que es el órgano objetivo en el tratamiento de diversas enfermedades y trastornos como se definen en el presente, por ejemplo pero no limitado a la OPMD.

La enfermedad de Huntington y la OPMD comparten una base genética común que ambos son causados por mutaciones de expansión del trinucleótido heredada en un gen causante de la enfermedad. El gen HD (HTT), localizado en el cromosoma 4p16, contiene secuencias repetitivas de trinucleótido (CAG)_n que codifica para un tramo (poli Q) de poliglutamina. Mientras

que las variantes normales del gen HTT contienen 7-35 repeticiones, las variantes relacionadas con HD están por encima de ese rango y el alcance de las expansiones de repetición está correlacionado con la severidad y la aparición temprana de los síntomas de HD (el efecto llamado anticipación). Las mutaciones por expansiones de repetición de (CAG)_n análogo fueron asociadas con otros trastornos de poliglutamina, tal como SBMA, DRPLA y diferentes ataxias pertenecientes al grupo de SCA. Asimismo, el gen relacionado con la OPMD, la PABPN1 en el cromosoma 14q11 contiene repeticiones de trinucleótido (CGC)_n que codifica la polialanina (poli A), en donde (CGC)₆ repite el umbral normal por encima del cual la OPMD es anticipada con un número de repeticiones aumentadas.

Así en otras modalidades la enfermedad como se define aquí es la enfermedad de Huntington.

En vista de lo aparente la falta de terapia médica para HD, OPMD y otros trastorno relacionados además de los medicamentos que disminuyen algunos síntomas motores y psiquiátricos, las terapias que directamente interfieren con los mecanismos que causan la enfermedad son urgentemente necesarios.

En algunas modalidades la enfermedad como se define en el presente es ataxia espinocerebelosa (SCA). Como se conoce

en la técnica hay muchos tipos de ataxia espinocerebelosa, con la ataxia espinocerebelosa más común incluyendo la la ataxia de Friedreich, SCA 1,3,8 y más. Muchas SCAs entran en la categoría de enfermedades de poliglutaminas, que son
5 causadas cuando una proteína asociada a la enfermedad (es decir, ataxina-1, ataxina-3, etc.) contiene una repetición de glutamina más allá de cierto umbral.

En otras modalidades la enfermedad como se define en el presente es la atrofia muscular espinal y bulbar (SBMA). La
10 enfermedad SBMA, también conocida como atrofia muscular espinobulbar, atrofia del bulbo espinal, neuropatía bulboespinal ligada al X (XBSN), atrofia muscular espinal ligada al X tipo 1 (SMAX1) y la enfermedad de Kennedy (KD), como se conoce en la materia, es una enfermedad
15 neurodegenerativa debilitante que da lugar a calambres musculares y debilidad progresiva debido a la degeneración de las neuronas motoras en el tronco del encéfalo y la médula espinal.

En otras modalidades la enfermedad como se define en el presente es la enfermedad de Huntington, enfermedad de
20 Parkinson, enfermedad de Alzheimer o esclerosis lateral amiotrófica (ELA).

La Enfermedad de Huntington (EH) es un trastorno genético neurodegenerativo que afecta la coordinación

muscular y conduce al deterioro cognitivo y problemas
psiquiátricos; la enfermedad de Parkinson es un trastorno
degenerativo del sistema nervioso central; la enfermedad de
Alzheimer (AD) se manifiesta por pérdida de la memoria a
5 corto plazo , confusión, irritabilidad, agresión, cambios de
humor, problemas con el lenguaje y la pérdida de la memoria a
largo plazo ; y la esclerosis lateral amiotrófica (ELA,
también conocida como enfermedad neuronal motora o enfermedad
de Lou Gehrig) es una enfermedad neurodegenerativa
10 caracterizada por debilidad rápidamente progresiva debido a
la atrofia muscular y espasticidad muscular, dificultad en el
habla (disartria), deglución (disfagia) y respiración
(disnea).

Como se indicó anteriormente, el tema actualmente
15 divulgado proporciona un método para tratar o aliviar una
enfermedad como se define en el presente en un sujeto humano
en necesidad del mismo que comprende la administración
parenteral a dicho sujeto una cantidad terapéuticamente
efectiva de trehalosa o una formulación farmacéutica que
20 comprende la misma.

En los informes anteriores de la trehalosa como un
agente terapéutico para enfermedades asociadas a la
agregación de proteína, hay necesidad de ingesta oral
continua y excesivamente alta de trehalosa para conseguir el

efecto terapéutico deseado en tejido neuronal o muscular, debido a su degradación en el intestino.

La divulgación instantánea está dirigida a un régimen terapéutico utilizando trehalosa que es administrada a un sujeto en necesidad por administración parenteral.

Así en algunas modalidades la formulación farmacéutica como se define en el presente es una solución inyectable para administración parenteral.

El término "sujeto en necesidad del mismo" se refiere a un sujeto que padece una enfermedad como se define en el presente, por ejemplo pero no limitado a HD o OPMD u otro trastorno de agregación de poliglutamina o polialanina.

La cantidad terapéuticamente efectiva de trehalosa puede ser desde unos 10 mg a unos 1,000 mg/Kg de peso corporal por día. La trehalosa puede ser compuesta como un ingrediente activo en una formulación farmacéutica adecuada para administración parenteral. La administración puede basarse en un régimen diario como una dosis única o dosis múltiple por una sola administración parenteral o como dosis múltiple por múltiples administraciones parenterales, respectivamente. Alternativamente o adicionalmente, la administración puede ser periódica, por ejemplo cada dos días, tres veces por semana, dos veces por semana, una vez por semana o una vez mensual, y la frecuencia de

administración puede variar de acuerdo con la condición del paciente.

El término parenteral como se define en el presente se refiere a una vía de administración donde el efecto deseado es sistémico y el agente activo (definido en el presente como trehalosa), se administra por vías que no sea el tracto digestivo, por ejemplo administración intravenosa, intramuscular e intraperitoneal.

Como se indicó anteriormente, la trehalosa es conocida en la materia como un lioprotector. Como tal la seguridad y la toxicidad de la trehalosa ha sido ampliamente investigada, y la sustancia fue encontrada segura cuando se administra tanto por vía oral y por vía intravenosa, en dosis que son substancialmente más altas que la dosis terapéutica prevista.

Como se muestra en los ejemplos siguientes, una formulación farmacéutica que comprende trehalosa como único ingrediente activo se administró por vía parenteral lo que resulta en niveles relativamente altos de plasma y de músculo.

Así, en algunas modalidades la formulación farmacéutica como se define en el presente comprende trehalosa como único ingrediente activo, y opcionalmente comprende además al menos un aditivo, portador, excipiente o diluyente farmacéuticamente aceptable.

En otras palabras, en el tema actualmente divulgado la trehalosa es el único agente o ingrediente activo. A pesar de lo anterior, la trehalosa o una formulación farmacéuticamente que comprende la misma puede utilizarse en combinación con
5 otros tratamientos o terapias para tratar o aliviar una enfermedad asociada a la agregación anormal de proteínas.

El término "trehalosa" como se define en el presente se refiere a un disacárido de glucosa α -G-glucopeiranosil α -D-glucopeiranososa. El término trehalosa también se refiere a
10 cualquier derivado activo de la trehalosa, por ejemplo los hidruros y sales del mismo.

La trehalosa es un disacárido de origen natural compuesto de una vinculación 1,1 de dos moléculas de D-glucosa. Es un azúcar no reductor que no se hidroliza
15 fácilmente por el ácido. Su fórmula molecular es $C_{12}H_{22}O_{11}$ y su peso molecular es 342.31 Dalton. Otros nombres usados para describir la α , α forma el isómero comúnmente referido como 'trehalosa', son α , α -trehalosa, α - δ -glucopeiranosil, α - δ -glucopeiranososa, azúcar seta, micosis.

20 Como se indicó anteriormente, la trehalosa es conocida por sus propiedades de estabilización de proteína. Se utiliza extensivamente en muchas aplicaciones como un estabilizador de alimentos congelados, en la liofilización de células y sistemas biológicos, como un estabilizador de las proteínas

parenterales terapéuticas y como un excipiente en tabletas y soluciones IV. La trehalosa es reconocida como un ingrediente alimentario GRAS (generalmente considerado como seguro) por la FDA y se encuentra en la USP-NF (formulario nacional de la farmacopea de los Estados Unidos), EP (Farmacopea Europea) y JP (Farmacopea japonesa).

Como todos los disacáridos, la trehalosa es metabolizada en el borde en el cepillo epitelial a dos moléculas de D-glucosa. Menos del 0.5% de trehalosa ingerido es absorbido en el torrente sanguíneo donde se metaboliza además por el hígado y el riñón por la trehalasa. La trehalosa oral en cantidades superiores a 40 - 50 gramos por día produce diarrea y distensión abdominal. Por lo tanto con el fin de lograr cantidades terapéuticas de trehalosa en las células musculares fue necesario eludir el metabolismo masivo en la zona del tracto gastrointestinal (GI). Por lo tanto los inventores desarrollaron una solución intravenosa (IV) de la trehalosa.

El término "formulación" como se define en el presente se refiere a una composición que comprende trehalosa como ingrediente activo y opcionalmente comprende además ingrediente activo adicional tal como un agente antiinflamatorio y por lo menos un aditivo , portador, excipiente o diluyentes farmacéuticamente aceptables como se

conocen en la materia. Esta formulación puede comprender además un inhibidor de trehalasa (una enzima hidrolasa glucósida que cataliza la conversión de la trehalosa a glucosa en el intestino, el riñón y el hígado), es decir, 5 competitivo u otro inhibidor de la enzima trehalasa.

Las formulaciones farmacéuticas particulares son convenientes para la administración parenteral, específicamente soluciones inyectables, en donde la concentración de trehalosa en dicha formulación está entre 10 0.1% (peso/volumen) a alrededor de 50% (peso/volumen), más específicamente en donde la concentración de trehalosa en la formulación como se define en el presente es, pero no está limitada a aproximadamente el 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 20% ó 25% (peso/volumen).

15 Cuando nos referimos a trehalosa, el término trehalosa abarca no sólo la entidad molecular específica, pero también sus análogos farmacológicamente activos farmacéuticamente aceptables, incluyendo pero no limitado a, sales, polimorfos, ésteres, amidas, profármacos, aductos, conjugados, 20 metabolitos activos y similares.

Así el agente activo, trehalosa, puede administrarse en forma del compuesto *per se* así como en la forma de una sal, polimorfo, éster, amida, profármaco, derivado o similares, siempre y cuando la sal, polimorfo, éster, amida, profármaco

o derivado sea farmacológicamente adecuado. Las sales, ésteres, amidas, profármacos y otros derivados de los agentes activos pueden ser preparados utilizando procedimientos estándar conocidos para los expertos en la materia de química orgánica sintética y descrito, por ejemplo, por *J. March, Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms and Structure, 4ta Ed. (New York: Wiley-Interscience, 1992)*. Para cualquier agente activo que puede existir en formas enantioméricas, el agente activo puede ser incorporado en las formulaciones actuales como el racemato o en forma enantioméricamente pura.

Las sales son compuestos que se ionizan en soluciones acuosas y pueden emplearse, por ejemplo, para ajustar la tonicidad de la solución. Si el agente activo está presente en forma de una sal, sales adicionales pueden añadirse a la composición con el fin de, por ejemplo, efectuar intercambio iónico con el agente activo. Las sales adecuadas para utilizarse con las composiciones descritas en el presente son conocidas en la materia e incluyen, por ejemplo, sales de litio, sodio, potasio, calcio y magnesio que tienen contraiones que se pueden seleccionar desde cloruro, bromuro, yoduro, carbonato, fosfato, nitrato, silicato, sulfato, fosfito, nitrito, sulfito, y similares.

Los tampones son compuestos o soluciones que se emplean

para ayudar en el mantenimiento de la concentración de un analito en un rango deseado. Por ejemplo, se utilizan los tampones de pH farmacéuticamente aceptables para mantener la acidez o basicidad de una solución dentro de un rango farmacéuticamente aceptable. Los tampones para uso en las composiciones divulgadas en el presente pueden ser cualquier tampón conocido o descubierto en lo sucesivo.

Los excipientes son ingredientes inactivos que pueden ser empleados en las composiciones descritas en el presente por una variedad de razones. Una amplia gama de excipientes se describen en la literatura (por ejemplo, *Rowe et al., Handbook of Pharmaceutical Excipients, McGraw Hill, 2006*).

Los aditivos y diluyentes son bien conocidos en la materia.

En algunas modalidades específicas el pH de la formulación es de alrededor de 4.5 a 7.0, la osmolalidad de la fórmula es de alrededor de 280-330 mOsm/kg, la formulación contiene menos de 1.0, 0.9, 0.8, 0.7, 0.6, 0.5, 0.4, 0.3, 0.2, 0.1 o menos unidades de endotoxina por mL y la formulación acuosa es alrededor de 50%, 40%, 30%, 20%, 10%, 5% o menos de trehalosa (p/v).

Así los sistemas de administración de trehalosa actualmente divulgados, por ejemplo las formulaciones que comprenden trehalosa como único ingrediente activo, pueden

comprender generalmente un agente de tamponamiento (aditivos de ajuste de pH), un agente que ajusta la osmolalidad del mismo, y opcionalmente, uno o más portadores, excipientes y/o aditivos farmacéuticamente aceptables como se conoce en la materia. Los ingredientes activos complementarios farmacéuticamente aceptables también pueden ser incorporados en las formulaciones.

Para las formulaciones como se definen en el presente administradas como acuosas u otras formas de dosificación basadas en el disolvente (p. ej, para administración parenteral), se puede utilizar una variedad de portadores líquidos, en particular agua o solución salina. Las soluciones acuosas pueden incluir sales, tampones y similares. El portador puede ser disolvente o medio de dispersión adecuado para composiciones que se administran por vía parenteral que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido y similares), mezclas convenientes de los mismos y aceites vegetales. Se puede mantener la fluidez adecuada, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento, tales como la lecitina, por el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de la dispersión y por el uso de surfactantes. El agua es un aditivo esencial (o portador).

Así como se utiliza en el presente el término "portador farmacéuticamente aceptable" incluye ninguno y todos los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos y similares. El uso de tales medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas es conocido en la materia. Salvo cualquier medio o agente convencional sea incompatible con el ingrediente activo, se contempla su uso en la composición farmacéutica. Se contempla que el agente activo puede entregarse por cualquier vía parenteral aceptable y en cualquier forma de dosificación farmacéuticamente aceptable.

Para propósitos de administración parenteral, se pueden emplear formulaciones en aceite adecuado tal como aceite de sésamo o maní o en propilenglicol acuoso, así como soluciones acuosas estériles de las sales solubles en agua correspondientes. Dichas formulaciones acuosas pueden ser convenientemente tamponadas, si es necesario y el diluyente líquido primero prestó isotónica con suficiente solución salina o glucosa. Estas formulaciones acuosas son especialmente convenientes para los propósitos de inyección intravenosa, intramuscular, subcutánea e intraperitoneal. En este sentido, el medio acuoso estéril empleado son fácilmente obtenibles por técnicas estándar bien conocidos por los expertos en la materia.

Los métodos para preparar diferentes formulaciones farmacéuticas con una cierta cantidad de ingrediente activo son conocidos, o serán evidentes a la luz de esta divulgación, para los expertos en la materia.

5 Como se describe en los ejemplos adjuntos, los inventores han preparado una formulación acuosa, inyectable específica que comprende trehalosa, que actualmente es utilizada en un estudio en pacientes con OPMD, como se describe a continuación en el Ejemplo 6 (y puede ser
10 utilizado para el tratamiento de otras enfermedades asociadas a la agregación anormal de proteínas).

 Dado el hecho de que más del 99.5% de la trehalosa no se absorbe en el torrente sanguíneo, y que las cantidades orales de trehalosa superiores a 50 g al día en seres humanos
15 con frecuencia provocan diarrea, distensión abdominal y molestias como se indicó anteriormente, la forma más efectiva para asegurar que las cantidades adecuadas de trehalosa sin duda lleguen a las células musculares es eludir el metabolismo intestinal extenso y administrar trehalosa
20 mediante una solución intravenosa (IV).

 La solución inyectable divulgada de trehalosa puede administrarse por vía intravenosa a pacientes con OPMD en una sola administración (inyección) durante cerca de 75 a 120 minutos, por ejemplo 90 minutos, cada día, cada dos días, dos

veces a la semana, una vez por semana, una vez en 10 días, una vez cada dos semanas o una vez al mes, para un número definido de administraciones, como será determinado por el médico tratante.

5 Basado en un conocido perfil farmacocinético de trehalosa, inicial una vez por semana, terapia IV 24 semanas permitirá que la trehalosa entre en las células musculares y potencialmente ejerzca su efecto terapéutico, previamente demostrado en modelos animales. Las cantidades a administrar
10 en la inyección semanal se basan en estudios de seguridad conocidos como la velocidad de metabolismo y separación de la sangre así como para permitir que la trehalosa llegue a las células musculares antes de que se elimine de la sangre.

Las dosis se calculan basándose en la distribución
15 esperada de trehalosa en el tejido y plasma, la concentración efectiva de trehalosa en las células enfermas y las dosis seguras conocidas en múltiples estudios con animales.

Después del tratamiento inicial, la administración una vez a la semana puede ser crónica, en puntos de tiempo, para
20 períodos de varios o decenas de semanas, por ejemplo 48 semanas consecutivas adicionales, por lo tanto un total de 72 semanas de tratamiento, o la administración puede ser periódica.

En algunas modalidades, la osmolalidad de la

formulación farmacéutica inyectable de trehalosa acuosa divulgada es de unos 280 a cerca de 330 mOsm/Kg.

Como se indicó anteriormente, los inventores han demostrado una administración exitosa de trehalosa al plasma y músculo por administración parenteral, específicamente la administración IV. Así en algunas modalidades la administración de trehalosa o una formulación farmacéutica que comprende la misma puede ser en cualquiera de la administración intravenosa, intramuscular e intraperitoneal.

En una modalidad, la trehalosa purificada es substancialmente libre de contaminantes resultantes de su proceso de preparación enzimático, tales como disolventes orgánicos utilizados en el proceso (p. ej., amonio, acetonitrilo, acetamida o alcoholes), TFA, éter u otros contaminantes. En este contexto "substancialmente" libre de contaminantes significa que el contenido contaminante de cualquier péptido residual procedente del proceso de preparación enzimático al final del proceso de purificación es preferiblemente menor que 0.5%, menor que 0.3%, menor que 0.25%, menor que 0.1%, menor que 0.05%, menor que 0.04%, menor que 0.03%, menor que 0.02%, menor que 0.01%, menor que 0.005%, menor que 0.003%, o menor que 0.001% del peso total de la trehalosa. El contenido de contaminantes puede determinarse por los métodos convencionales tales como

cromatografía de gases.

En modalidades específicas, los disolventes residuales de la trehalosa purificada son inferiores a los límites establecidos en los lineamientos de ICH, por ejemplo,

5 IMPUREZAS: LINEAMIENTOS PARA DISOLVENTES RESIDUALES Q3C(R5) (disponible en: <http://www.tga.gov.au/pdf/euguide/ich822602006.pdf>) [15]).

Por ejemplo, la trehalosa purificada contiene <5000 ppm DE etanol (p. ej., <140 ppm), y/o <3000 ppm de metanol.

10 Las endotoxinas (también conocidas como lipopolisacáridos (LPS) y lipoglicanos) son moléculas grandes que consisten de un lípido y un polisacárido compuesto de O-antígeno, núcleo externo y núcleo interno unido por un enlace covalente; se encuentran en la membrana externa de bacterias
15 Gram-negativas y provocan fuertes respuestas inmunitarias en los animales. Las endotoxinas son contaminantes bien conocidos en sustancias purificadas utilizando sistemas bacterianos y su eliminación por lo tanto es crucial para la seguridad del uso de formulaciones terapéuticas que comprende
20 dichas sustancias.

Como se muestra en los ejemplos adjuntos, la formulación actualmente divulgada comprende menos de 5 unidades de endotoxina por kilogramo de peso corporal de un paciente administrado con la formulación, por hora de

administración.

Así en algunas modalidades la formulación farmacéutica como se define en el presente comprende menos de 0.74 unidades de endotoxina por ml de solución.

5 La cantidad terapéuticamente efectiva como se define en el presente dependerá de varios factores y variará de sujeto a sujeto y puede ser determinada por consideraciones bien conocidas para una persona experta en el campo de la invención (por ejemplo, un médico especializado). Dichos
10 factores incluyen la severidad de los síntomas, edad , peso y estado general del paciente y el juicio del médico tratante.

Generalmente, por el término "cantidad terapéuticamente efectiva" significa una cantidad suficiente pero no tóxica de trehalosa para proporcionar el efecto deseado, es decir, el
15 tratamiento o alivio de una enfermedad asociada con la agregación anormal de proteína y/o formación de cuerpos de inclusión en miocitos, neuronas y otras células o compartimentos extracelulares.

El término "cantidad terapéuticamente efectiva o
20 composición farmacéutica que comprende la misma" debe ser entendido como la cantidad de trehalosa en la formulación administrada. La cantidad de la formulación en sí puede variar de acuerdo a la concentración de la trehalosa comprendida en el mismo (es decir, de manera que la

concentración de trehalosa en dicha formulación está entre
alrededor de 0.1% (p/v) a alrededor de 50% (p/v) y de manera
que el nivel máximo de endotoxina en la formulación
administrada es menos de 5 unidades de endotoxina por
5 kilogramo de peso corporal por hora).

La cantidad terapéuticamente efectiva de trehalosa se
refiere a una cantidad de desde alrededor 1 gramo a alrededor
de 100 gramos para cada inyección diaria y no más de 1 g/kg
de peso corporal de dicho sujeto por día de un sujeto humano
10 tratado. La cantidad puede variar considerablemente. Así el
rango puede ser desde cada uno de 10, 20, 50, 75, 100, 150,
200, 300 mg/Kg de peso corporal por día hasta cada uno de
400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950 y
1000 mg/Kg de peso corporal por día.

15 Así en otras modalidades, la cantidad terapéuticamnete
efectiva de trehalosa como se define en el presente es desde
aproximadamente 1 gramo a aproximadamente 100 gramos para
cada inyección individual y no más de aproximadamente 1
gramo/kg de peso corporal de dicho tema por día.

20 Los términos "inyección" e "infusión" se usan
indistintamente y se refieren a la administración parenteral
de la formulación como se define en el presente.

La cantidad terapéuticamente efectiva de trehalosa o
composición farmacéutica que comprende la misma es

administrada por vía parenteral y puede ser administrada como una dosis única o dosis múltiples, que pueden ser idénticas o diferentes, por una sola administración al día, o dosis múltiples pueden administrarse por vía parenteral por múltiples administraciones diarias o semanales o mensuales o más prolongadas.

Una cantidad terapéuticamente efectiva de trehalosa o composición farmacéutica de acuerdo a lo anterior, administrado IV, IP o IM, como dosis única o dosis múltiples, que pueden ser idénticas o diferentes, por una sola administración por día u opcionalmente como dosis múltiples, que pueden ser idénticas o diferentes, por múltiples administraciones por día u opcionalmente además en un régimen de dosificación de dosis iguales, o dosis que aumentan gradualmente, o dosis que disminuyen gradualmente o además crónicamente o periódicamente.

Los esquemas de dosificación óptimos pueden calcularse de las mediciones de la acumulación de fármaco en el cuerpo del paciente. Se puede administrar dosis óptimas mediante metodologías de dosificación y tasas de repetición. En general, la dosificación se calcula según el peso corporal y pueden ser dado una vez o más diariamente, semanalmente, mensualmente o anualmente o incluso una vez cada pocos años. Las personas con conocimiento ordinario en la materia puede

estimar fácilmente las tasas de repetición para la dosificación basada en la composición combinada de la invención en fluidos o tejidos corporales. Después del tratamiento exitoso, puede ser deseable que el paciente se
5 someta a terapia de mantenimiento para evitar la reaparición del estado de la enfermedad, en donde la composición combinada de la invención se administra en dosis de mantenimiento, una vez o más diariamente.

En algunas modalidades la cantidad terapéuticamente
10 efectiva de trehalosa o formulación farmacéutica que comprende la misma tal como se define en este documento se administra crónicamente.

El término "crónicamente" como se define en el presente se refiere a un régimen constante de administración que
15 ocurre en una frecuencia predeterminada. Así la administración puede basarse por ejemplo en un régimen diario, semanal o mensual como una dosis parenteral única o múltiples dosis parenterales, dosis intravenosas específicamente.

20 En algunas modalidades la frecuencia como se define en el presente es de entre una vez diariamente a una vez al mes, es decir, dicha cantidad terapéuticamente efectiva de trehalosa o formulación farmacéutica que comprende la misma se administra a una frecuencia de entre una vez al día a una

vez al mes.

En otras modalidades la frecuencia como se define en el presente es diariamente (a diario), es decir, siete veces por semana o seis, cinco, cuatro o tres veces por semana, dos
5 veces o una vez por semana, una vez cada dos semanas, una vez cada tres semanas o una vez al mes.

En una modalidad específica la frecuencia como se define en el presente es una vez por semana. En otras modalidades la cantidad terapéuticamente efectiva de
10 trehalosa o trehalosa comprendida en dicha formulación farmacéutica se administra en una sola administración de inyección una vez a la semana.

En lo anterior y otras modalidades la cantidad terapéuticamente efectiva de trehalosa o trehalosa
15 comprendida en dicha formulación farmacéutica es administrada una vez diariamente desde alrededor de 10 mg/kg/día a alrededor de 1 gramo/kg/día de trehalosa.

Como se indica en los Ejemplos adjuntos, en un estudio clínico en curso una formulación farmacéutica inyectable
20 acuosa que comprende trehalosa es administrada por vía intravenosa en una dosificación semanal de 8, 15 o 30 gramos por cada sujeto.

Así en lo anterior y otras modalidades la cantidad terapéuticamente efectiva de trehalosa o formulación

farmacéutica que comprende la misma se administra por vía intravenosa en una dosis única de aproximadamente 5 a aproximadamente 35 gramos de trehalosa, que puede administrarse una vez diario, una vez cada dos días, dos veces a la semana, una vez por semana, una vez cada dos semanas , una vez cada tres semanas o una vez al mes.

En otras modalidades la cantidad terapéuticamente efectiva de trehalosa o trehalosa comprendida en dicha formulación farmacéutica se administra en una dosis única de 5, 8, 15, 30, 40 ó 50 gramos de trehalosa.

En otra modalidades la cantidad terapéuticamente efectiva de trehalosa o una formulación farmacéutica que comprende la misma es adaptada para una solución inyectable y en donde la tasa de administración es de manera que el nivel máximo de endotoxina es menor que 5 unidades de endotoxina por kilogramo de peso corporal por hora.

Se entiende, por el término "tasa de administración" la tasa de infusión (o tasa de dosificación).

En modalidades adicionales la cantidad terapéuticamente efectiva de trehalosa o una formulación farmacéutica que comprende la misma está adaptado para la administración intravenosa y dicha administración es completada dentro de menos de 75 a 120 minutos, por ejemplo pero no limitado a dentro de 90 minutos. El período de administración dependerá

también del volumen/cantidad de la formulación de trahalosa inyectable divulgada para ser administrada.

Así en algunas modalidades la administración de la cantidad terapéuticamente efectiva de trehalosa comprendida en dicha formulación farmacéutica está adaptada para la administración intravenosa, se completa dentro de alrededor de 75 a alrededor de 120 minutos, específicamente dentro de menos de 90 minutos.

En aún otras modalidades la administración de trehalosa o una formulación farmacéutica que comprende la misma comprende un régimen de dosis de dosis iguales, o dosis que aumenta gradualmente, o dosis que disminuyen gradualmente de trehalosa o una formulación farmacéutica que comprende la misma.

En algunas modalidades la cantidad terapéuticamente efectiva de trehalosa o formulación farmacéutica que comprende la misma se administra periódicamente.

Por el término "periódicamente" se entiende que la administración de la trehalosa puede llevarse a cabo en los regímenes de administración crónica consecutiva como se define en el presente que pueden ser separados en tiempo por períodos de "no tratamiento" (o "vacaciones de fármacos", es decir, cuando el paciente como se define en presente deja de tomar el agente activo durante un determinado período de

tiempo) según la condición del paciente.

Determinar la eficacia del tratamiento como se define en el presente se puede realizar por cualquier método conocido a una persona experta en la materia. Por ejemplo, cuando la enfermedad a tratar es la OPMD, la eficacia del tratamiento se puede realizar en asociación con cualquier método conocido para diagnosticar o tratar la OPMD. El alivio de uno o más signos o síntomas de OPMD indica que el compuesto confiere un beneficio clínico.

En algunas modalidades la enfermedad según el tema actualmente divulgado es OPMD así y en tal caso la eficacia del tratamiento como se define en el presente se puede realizar mediante el control de peso del paciente; realizar una "prueba de ingestión", en el que se le solicita al paciente beber 80 ml de agua helada, y se registrará el tiempo en que este volumen ha sido completamente consumido (en segundos); y por evaluación endoscópica con fibra óptica de la deglución (FEES, por sus siglas en inglés), que es una útil herramienta complementaria para el estudio de la disfagia. El procedimiento FEES implica introducir un endoscopio flexible de fibra óptica transnasalmente a la hipofaringe del paciente donde el médico puede ver claramente las estructuras laríngeas y faríngeas. El paciente se llevó a través de diversas tareas (por ejemplo, bolos de líquidos y

alimentos) para evaluar el estado sensorial y motor del mecanismo faríngeo y laríngeo. La información obtenida de este examen incluye la capacidad de proteger las vías respiratorias, la capacidad para sustentar la protección de la vía aérea por un período de varios segundos, capacidad para iniciar una rápida deglución sin derramamiento de material en la hipofaringe, tiempo y dirección de movimiento del bolo a través de la hipofaringe, capacidad para eliminar el bolo durante la deglución, presencia de agrupación y residuos de material en la hipofaringe , tiempos de protección del flujo del bolo y de las vías respiratorias, sensibilidad de las estructuras de la faringe/laringe y el efecto de la anatomía en la deglución.

Pruebas adicionales para evaluar la eficacia del tratamiento de OPMD incluyen la prueba SWAL-QOL (una herramienta de 44 artículos que se le pide a los pacientes calificar diferentes factores acerca de 10 conceptos de calidad de vida relacionados a la deglución en una escala de 5 puntos) que fue desarrollada para medir objetivamente la perspectiva de un paciente de la evaluación de deglución y fuerza muscular (evaluación de la debilidad de los músculos proximales, incluyendo la prueba de "subir escaleras", prueba "sentado a parado en 30 segundo", prueba "levantar el brazo con peso en 30 segundos", etc.).

El término "sujeto en necesidad del mismo" como se define en el presente es un sujeto que padece una enfermedad o trastorno como se define en el presente, es decir una enfermedad asociada con agregación anormal de proteína y/o
5 formación de cuerpos de inclusión en miocitos, neuronas y otras células o compartimientos extracelulares.

En algunas modalidades, la presente divulgación proporciona una formulación que comprende trehalosa o un derivado fisiológicamente aceptable del mismo en donde la
10 trehalosa (o un derivado de la misma) o por lo menos una porción de la trehalosa o derivado de la misma es formulada para una liberación sostenida y/o controlada y una porción de la trehalosa o derivado de la misma es formulada para liberación inmediata cuando se administra a un sujeto.

15 En algunas modalidades, los niveles séricos efectivos del ingrediente activo trehalosa o derivado del mismo se logran dentro de unos 10 a unos 20 ó 30 ó 40 ó 50 ó 60 minutos tras la administración de trehalosa. En algunas modalidades, los niveles séricos efectivos del ingrediente
20 activo se logran dentro de unos 5 a unos 20 ó 30 ó 40 ó 50 ó 60 minutos tras la administración de trehalosa. En algunas modalidades, los niveles séricos efectivos del ingrediente activo se logran dentro de unos 20 a unos 20 ó 30 ó 40 ó 50 ó 60 minutos tras la administración de trehalosa. En algunas

modalidades, los niveles séricos efectivos del ingrediente activo se logran de unos 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50 ó 60 minutos tras la administración de trehalosa.

Los presentes inventores han desarrollado enfoques innovadores para la administración de trehalosa basado en vías parenterales. Estos enfoques proporcionan un diseño racional de sistemas de suministro (por ejemplo, formulaciones) con propiedades deseadas basadas en la meticulosa selección del portador, por ejemplo, una composición adecuada de surfactantes/co-surfactantes o partículas micro/nano (tal como liposomas o nano-liposomas) o polímero que atrapa los ingredientes activos, u otros aditivos o excipientes, para el sistema de suministro de interés.

Las formas parenterales incluyen administración (difusión a través de la piel intacta) subcutánea y transdérmica. En algunas modalidades, las formulaciones de la invención son administradas por modos invasivos de tratamiento tal como por administración intravenosa, intramuscular y similar.

Otra forma de administración puede hacer uso de glóbulos rojos cargados con altas cantidades de trehalosa, que son conocidas en la materia. Actualmente se sabe que cargar los glóbulos rojos con altas cantidades de trehalosa

refuerza su viabilidad. Dichos glóbulos rojos, altamente cargados con trhalosa puede servir como un vehículo para el suministro intravenoso de trhalosa a un sujeto en necesidad, de acuerdo con la presente divulgación.

5 La administración de trehalosa para usos médicos requiere sistemas de suministro seguros y eficientes. La presente divulgación proporciona sistemas de suministro (por ejemplo, formulaciones para administración parenteral) para el suministro segura de una variedad de sustancias debido a
10 sus características físico-químicas especiales. Los sistemas de suministro mejoran considerablemente la eficiencia y la calidad de absorción de la trehalosa basada en sus características fisicoquímicas únicas, que permite concentraciones o cantidades más bajas de sustancia activa
15 para ser entregado a un sujeto en una forma biológicamente activa. Los presentes sistemas de suministro proporcionan el acceso directo de la sustancia activa a los tejidos y así proporcionan efectos inmediatos o casi inmediatos de trehalosa al sujeto en necesidad de la misma.

20 En consecuencia, en algunas modalidades, la presente invención proporciona un sistema de suministro farmacéutico para la administración mejorada de trehalosa o derivado fisiológicamente activo de la misma, que comprende como el ingrediente activo dicha trehalosa o derivado

fisiológicamente activo de la misma en un portador adecuado para la rápida restauración del alivio de los síntomas de la enfermedad del sujeto tratado.

En algunas modalidades, los sistemas de suministro de fármaco pueden proporcionar la sustancia activa en un modo de liberación controlada. En algunas modalidades, los sistemas de suministro de fármaco de la invención puede comprender además al menos un agente farmacéuticamente activo adicional.

Los sistemas de administración actualmente divulgados, pueden comprender generalmente un agente de tamponamiento, un agente que ajusta la osmolalidad del mismo, y opcionalmente, uno o más portadores, excipientes y/o aditivos farmacéuticamente aceptables como se conoce en la materia. Los ingredientes activos complementarios farmacéuticamente aceptables también pueden ser incorporados en las composiciones. El portador puede ser disolvente o medio de dispersión adecuado para composiciones que se administran por vía parenteral que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido y similares), mezclas convenientes de los mismos y aceites vegetales. Se puede mantener la fluidez adecuada, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento, tales como la lecitina, por el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de la dispersión

y por el uso de surfactantes.

Como se indicó anteriormente, el sistema de suministro de trehalosa actual se puede administrar en formulaciones de liberación controlada, sostenida o retardada. Puede utilizarse cualquier método de liberación controlada o sostenida, conocido por los expertos de conocimiento ordinario con las formulaciones y métodos del tema actualmente divulgado tal como los descritos en Langer 1990 [16]. Dicho método comprende administrar una composición de liberación sostenida o un dispositivo médico implantable revestido de manera que una dosis terapéuticamente efectiva de la composición de la invención se suministra continuamente a un sujeto de tal método. La liberación sostenida puede lograrse también usando un parche diseñado y formulado para dicho propósito. Las composiciones de liberación sostenida o controladas incluyen formulación en depósitos lipofílicos (p. ej., ácidos grasos, ceras, aceites). También se comprenden por la invención composiciones particuladas recubiertas con polímeros (p. ej., poloxámeros o poloxaminas). Las fórmulas o dispositivos de liberación sostenida, o cualquier formulación tópica, puede adicionalmente contener composiciones para estabilizar la composición o penetrar la barrera fisiológica tal como la piel o las membranas mucosas. Componentes adicionales ejemplares pueden incluir cualquier detergente, o

disolvente fisiológicamente aceptable tal como por ejemplo, dimetilsulfóxido (DMSO).

En algunas modalidades, la trehalosa en las presentes composiciones puede formularse para la liberación sostenida o controlada durante un periodo de al menos 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 ó 12 horas. En algunas modalidades, la trehalosa en las presentes composiciones puede formularse para la liberación sostenida o controlada durante un periodo de alrededor 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 ó 12 horas. En algunas modalidades, la trehalosa en las presentes composiciones puede formularse para la liberación sostenida o controlada durante un periodo de entre alrededor 0.5, ó 1, ó 2, ó 3, ó 4, horas y alrededor de 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 ó 12 horas. En algunas modalidades, la trehalosa en las presentes composiciones puede formularse para la liberación sostenida o controlada durante un periodo de entre alrededor 5, 6, 7, ó 8, horas y alrededor de 9, 10, 11 ó 12 horas.

En algunas modalidades, la trehalosa en las presentes composiciones puede ser de forma de liberación inmediata, rápida de forma de explosión.

En algunas modalidades, la trehalosa en las presentes composiciones se pueden formular para liberar hasta 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 99, 99.5 ó 100% de la trehalosa total en

aproximadamente 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 horas. En algunas modalidades, la trehalosa en las presentes composiciones se pueden formular para liberar no menos de 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 99, 99.5 ó 100% de la trehalosa total en aproximadamente 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 horas.

En algunas modalidades, la trehalosa en las presentes composiciones puede ser en una combinación de libreación lenta o sostenida o de forma de liberación inmediata, rápida de forma de explosión. En algunas modalidades, la proporción relativa de la liberación sostenida o lenta de trehalosa a liberación inmediata o rápida de trehalosa es, por ejemplo, 1 a 99, 5 a 95, 10 a 90, 15 a 85, 20 a 80, 25 a 75, 30 a 70, 35 a 65, 40 a 60, 45 a 55, 50 a 50, 55 a 45, 60 y 40, 65 y 35 , 70 a 30, 75 y 25, 80 y 20, 85 a 15, 90 a 10, 95 5 ó 99 a 1.

En ciertas modalidades, un material polimérico se utiliza para mantener o controlar la liberación de la trehalosa. En algunas modalidades, el tipo de material polimérico y la cantidad que se utiliza, tiene una fuerte influencia sobre la tasa de liberación de trehalosa de las presentes composiciones y sistemas de suministro. Ejemplos de polímeros incluyen polímeros tanto hidrofóbicos como hidrofílicos. Ejemplos de polímeros hidrofóbicos incluyen, pero no se limitan a, etilcelulosa y otros derivados de

celulosa, las grasas tales como palmitoestearato de glicerol, cera de abejas, glicocera, cera de ricino, cera de carnaúba, monoestearato de glicerol o alcohol estearilo, derivados de poliacrilamida hidrofóbica y derivados del ácido metacrílico hidrofóbico, así como mezclas de estos polímeros. Los polímeros hidrofílicos incluyen, pero no se limitan a, derivados de la celulosa hidrofílica tal como metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, hidroxietilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, carboximetilcelulosa, carboximetilcelulosa de sodio y alcohol de polivinilo de metilcelulosa hidroxietil, polietileno, polipropileno, poliestireno, poliacrilamida, copolímero de etileno de acetato de vinilo, poliacrilato, poliuretano, polivinilpirrolidona, polimetilmetacrilato, acetato de polivinilo, polihidroxietilo metacrilato, así como mezclas de estos polímeros. Además, cualquier mezcla de uno o más polímeros hidrofóbicos y uno o más polímeros hidrofílicos podrían ser opcionalmente utilizados.

La trehalosa contenida en las presentes composiciones y sistemas de suministro puede ser atrapada en liposomas, micro- y nano-partículas.

En algunas modalidades, un material polimérico para ser utilizado en los sistemas de suministro y presentes composiciones es celulosa microcristalina tal como "Avicel PH

101" fabricado por *FMC BioPolymer*. Alternativamente, un material polimérico para ser utilizado en las presentes composiciones y sistemas de suministro es hidroxipropilmetilcelulosa como "Metolosa" producido por *Shin-Etsu Chemical Co.* En algunas modalidades, un material polimérico para ser utilizado en los sistemas de suministro y presentes composiciones es etilcelulosa tal como "Ethocel™" fabricado por *Dow Chemical Company*. En algunas modalidades, un material polimérico para ser utilizado en los sistemas de suministro y presentes composiciones es polímero acrílico tal como "Eudragit RS™" fabricado por *Rohm GmbH*. En algunas modalidades, un material polimérico para ser utilizado en los sistemas de suministro y presentes composiciones es dióxido de silicio coloidal tal como "Aerosil™" fabricado por *Degussa*. En algunas modalidades, un material polimérico para ser utilizado en los sistemas de suministro y presentes composiciones es Poli(vinilacetato) tal como "Kollicoat SR" fabricado por *BASF*. En algunas modalidades, un material polimérico para ser utilizado en la presentes composiciones y sistemas de suministro es una solución de acetato de etilo y acetato de vinilo tal como "Duro-Tak" fabricado por *Delasco Dermatologic Lab & Supply, Inc.*

En algunas modalidades, los sistemas de suministro de la invención comprenden dispositivos de suministro. En

algunas modalidades, las composiciones de la invención son suministradas por un proceso osmótico a una velocidad controlada como una bomba osmótica. El sistema puede construirse recubriendo un agente osmóticamente activo con una tasa de control de la membrana semipermeable. Esta membrana puede contener un orificio de tamaño crítico a través del cual el agente se suministra. La forma de dosificación después de entrar en contacto con líquidos acuosos, embebe agua a una velocidad determinada por la permeabilidad del fluido de la membrana y la presión osmótica de la formulación base. Estas imbibiciones osmóticas de agua dan como resultado la formación de una solución saturada de material activo en el núcleo, que se dispensa en una velocidad controlada desde el orificio de suministro en la membrana.

En algunas modalidades, las composiciones de la invención se suministran utilizando micropartículas biodegradables. En cierta modalidad, el sistema para preparar micropartículas consiste de una fase orgánica compuesta por un disolvente volátil con polímero disuelto y el material a ser encapsulado, emulsionado en una fase acuosa. En algunas modalidades, los polímeros biodegradables que pueden utilizarse para la matriz de micropartículas, comprende ácido poliláctico (PLA) o el copolímero de ácido láctico y

glicólico (PLAGA). El polímero PLAGA degrada hidrolíticamente con el tiempo sus componentes monoméricos, que se eliminan fácilmente del cuerpo a través de procesos de la vida natural.

5 La preparación también puede contener un estimulador de absorción y otros componentes opcionales. Ejemplos de estimuladores de absorción incluyen, pero no se limitan a, ciclodextrinas, fosfolípidos, quitosano, DMSO, *Tween*, *Brij*, glicocolato, saponina, fusidato y energía basado en estimular
10 el equipo de absorción.

 Componentes opcionales presentes en las formas de dosificación incluyen, pero no se limitan a, diluyentes, aglutinantes, lubricantes, surfactantes, agentes colorantes, sabores, agentes de tamponamiento, conservantes, agentes
15 estabilizadores y similares.

 Los diluyentes, también llamados "llenadores" incluyen, por ejemplo, fosfato dicálcico dihidrato, sulfato de calcio, lactosa, celulosa, caolín, manitol, cloruro de sodio, almidón seco, almidón hidrolizado, dióxido de silicio, sílice
20 coloidal, óxido de titanio, alúmina, talco, celulosa microcristalina y azúcar en polvo. Para la administración en forma líquida, los diluyentes incluyen, por ejemplo, etanol, sorbitol, glicerol, agua y similares.

 Los aglutinantes se utilizan para impartir cualidades

cohesivas a la formulación. Materiales de aglutinación adecuados incluyen, pero no se limitan a, almidón (incluyendo almidón de maíz y almidón pregelatinizado), gelatina, azúcares (incluyendo sucrosa, glucosa, dextrosa, lactosa y sorbitol), polietilenglicol, ceras, gomas naturales y sintéticas, por ejemplo, acacia, tragacanto, alginato sódico, celulosas y *Veegum* y polímeros sintéticos tales como polimetacrilatos y polivinilpirrolidona.

Los lubricantes se utilizan para facilitar la fabricación; ejemplos de lubricantes adecuados incluyen, por ejemplo, estearato de magnesio, estearato de calcio, ácido esteárico, behenato de glicerilo y polietilenglicol.

Los surfactantes pueden ser agentes activos de superficie aniónica, catiónica, anfotérica o no iónica. Los surfactantes aniónicos adecuados incluyen pero no se limitan a, aquellos que contienen carboxilato, sulfonato e iones de sulfato, asociados con cationes tales como iones de sodio, potasio y amonio. Los surfactantes particularmente preferidos incluyen, pero no se limitan a: sulfonatos de alquilo de cadena larga y sulfonatos arilalquilo tales como sulfonato dodecilbenceno de sodio; sulfosuccinatos de sodio dialquilo, tal como sodio bis-(2-etilhexil)-sulfosuccinato; y sulfatos de alquilo tal como lauril sulfato de sodio.

Los agentes estabilizadores tales como antioxidantes,

incluyen, pero no se limitan a, galato de propilo, ascorbato de sodio, ácido cítrico, metabisulfito de calcio, hidroquinona y 7-hidroxycumarina.

Si lo desea, las presentes composiciones también pueden
5 contener cantidades menores de sustancias auxiliares no tóxicas tales agentes emulsionantes o de hidratantes, conservantes y similares.

Como se mencionó, ninguna de las composiciones de la invención puede utilizarse solo o en combinación con uno o
10 más agentes terapéuticos adicionales, para el tratamiento de la enfermedad que padece el sujeto tratado. La cantidad de ambos el compuesto y el agente terapéutico adicional que puede ser combinado con los materiales portadores para producir una composición o sistema de suministro variarán
15 dependiendo del anfitrión tratado y el modo particular de la administración. En algunas modalidades, las composiciones de esta invención deben ser formuladas de manera que una dosificación de entre 0.01-1 g/kg peso corporal/día de trehalosa puede ser administrada. La dosis de la trehalosa
20 depende de la condición y la enfermedad del paciente y la dosis diaria deseada. En la terapia humana, la dosis diaria puede ser 10-3000 mg, por ejemplo, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 75, 100, 200, 300, 400, 500, 600 700, 800, 900 ó 1000 mg. Estas cantidades se administran en dosis que se pueden

dividir en 2-3 dosis más pequeñas para cada día.

En algunas modalidades, los ingredientes activos en los sistemas de suministro y presentes composiciones pueden actuar sinérgicamente en combinación entre sí y pueden actuar además sinérgicamente en presencia de un agente terapéutico adicional. Por lo tanto, la cantidad de compuesto(s) y agentes terapéuticos adicionales en tales composiciones será menor que la requerida en monoterapia utilizando a solo ese agente terapéutico.

La toxicidad y eficacia terapéutica de las formulaciones descritas pueden determinarse por procedimientos farmacéuticos estándar en cultivos celulares o en animales de experimentación, por ejemplo, procedimientos utilizados para determinar la máxima dosis tolerada (MTD, por sus sigla en inglés), el ED_{50} , que es la dosis efectiva para alcanzar el 50% de la máxima respuesta y el índice terapéutico (TI, por sus siglas en ingles), que es la relación de la MTD al ED_{50} . Obviamente, las formulaciones con altos TIs son las formulaciones preferidas en el presente, y los regímenes de dosificación preferidos son aquellos que mantienen los niveles plasmáticos de la trehalosa en o por encima de una concentración mínima para mantener el efecto terapéutico deseado. La dosificación también dependerá, por supuesto, de una serie de factores, el sitio previsto de

suministro, la vía de administración y otros factores pertinentes, conocidos por el médico tratante.

Como se indicó anteriormente, la trehalosa o cualquiera de las formulaciones que comprende la misma como se define en el presente puede utilizarse solo o en combinación con uno o más agentes terapéuticos adicionales para el tratamiento de las enfermedades que sufren los sujetos tratados. La cantidad de ambos compuestos y el agente terapéutico adicional que se puede combinar con trehalosa o cualquiera de las formulaciones que comprenden la misma como se define en el presente variará sobre el sujeto tratado y las enfermedades y modo de administración particular.

En algunas modalidades, los ingredientes activos en los sistemas de suministro y presentes composiciones pueden actuar sinérgicamente en combinación entre sí y pueden actuar además sinérgicamente en presencia de un agente terapéutico adicional. Por lo tanto, la cantidad de compuesto(s) y agentes terapéuticos adicionales en tales composiciones será menor que la requerida en monoterapia utilizando a solo ese agente terapéutico.

En otro de sus aspectos el tema actualmente divulgado proporciona trehalosa o una formulación farmacéutica que comprende la misma, para uso en un método para tratar o aliviar una enfermedad asociada a la agregación anormal de

proteínas y/o formación de cuerpos de inclusión en miocitos, neuronas y otras células o compartimientos extracelulares, o por lo menos un síntoma asociado a los mismos, en un sujeto humano en necesidad del mismo que dicho método comprende la
5 administración parenteral a dicho sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva de trehalosa o una formulación farmacéutica que comprende la misma.

En todavía uno de sus aspectos el tema actualmente divulgado proporciona una formulación farmacéutica acuosa que
10 comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de trehalosa como ingrediente activo único, en donde la formulación tiene un pH de alrededor de 4.5 a 7.0 y que contiene menos de 0.74 unidades de endotoxina por ml y en donde dicha formulación farmacéutica está adaptada para la administración parenteral.

15 En algunas modalidades la formulación farmacéutica acuosa como se define en el presente se puede adaptar para administración intravenosa, intramuscular o intraperitoneal.

En otras modalidades la formulación farmacéutica acuosa como se define en el presente se adapta para administración
20 intravenosa, intramuscular o intraperitoneal.

Como se indicó anteriormente la formulación farmacéutica acuosa como se define en el presente documento comprende además al menos un aditivo, portador, excipiente o diluyentes farmacéuticamente aceptable.

En modalidades adicionales la formulación farmacéutica acuosa como se define en el presente es en donde la concentración de la trehalosa está entre aproximadamente 0.1% (p/v) a aproximadamente 50% (p/v). En modalidades adicionales específicas la formulación farmacéutica acuosa como se define en el presente es en donde la concentración de la trehalosa es aproximadamente 10 % (p/v).

En algunas modalidades la formulación farmacéutica acuosa como se define en el presente es en donde la formulación tiene una osmolalidad de alrededor de 280-330 mOsm/kg.

En otras modalidades la formulación farmacéutica acuosa como se define en el presente es en donde la formulación se administra a una frecuencia de entre una vez al día a una vez al mes.

La formulación farmacéutica acuosa como se define en el presente puede ser donde la cantidad terapéuticamente efectiva de trehalosa es de alrededor de 1 gramo a alrededor de 100 gramos para cada inyección diaria y no más de 1 gramo/kg de peso corporal de dicho sujeto por día.

En otras modalidades la formulación farmacéutica acuosa como se define en el presente es en donde la formulación farmacéutica es administrada una vez diariamente desde alrededor de 10 mg/kg/día a alrededor de 1 gramo/kg/día de

trehalosa.

En todavía modalidades adicionales la formulación farmacéutica acuosa como se define en el presente es en donde la formulación se administra a una frecuencia de entre una
5 vez al día a una vez al mes en una dosis de alrededor de 5 a alrededor de 35 gramos de trehalosa.

En otras modalidades específicas la formulación farmacéutica acuosa como se define en el presente es para administración una vez al día, una vez cada dos días, dos
10 veces a la semana, una vez por semana, una vez cada dos semanas, una vez cada tres semanas o una vez al mes.

En todavía modalidades adicionales específicas la formulación farmacéutica acuosa como se define en el presente es en donde la dosis es de 5, 8, 15, 30, 40 ó 50 gramos.

15 En aún modalidades adicionales de la formulación farmacéutica acuosa como se define en el presente en donde la tasa de administración es de manera que el nivel máximo de endotoxina es menor que 5 unidades de endotoxina por kilogramo de peso corporal por hora.

20 La formulación farmacéutica acuosa del tema actualmente divulgado puede ser donde la formulación es adaptada para la administración intravenosa y en donde dicha administración se termina dentro de alrededor 75 a alrededor de 120 minutos, específicamente dentro de menos de 90 minutos.

En algunas modalidades la formulación farmacéutica acuosa como se define en el presente es para el tratamiento de una enfermedad asociada con la agregación anormal de proteína o formación de cuerpos de inclusión en miocitos, neuronas y otras células o compartimentos extracelulares o para aliviar un signo o síntoma asociado con la misma en un sujeto humano en necesidad de la misma.

El tema actualmente divulgado proporciona además un kit que comprende:

(a) trehalosa o un derivado activo de la misma farmacéuticamente aceptable;

(b) al menos un aditivo, portador, excipiente y diluyente farmacéuticamente aceptable;

(c) los medios para la preparación de una solución acuosa inyectable de trehalosa mezclando dicha trehalosa con al menos uno de dichos aditivo, portador, excipiente y diluyente;

(d) los medios para administrar por vía parenteral dicha solución inyectable a un paciente en necesidad;

(e) Instrucciones de uso.

La solución acuosa inyectable de la trehalosa puede prepararse por cualquier método conocido en la materia, por ejemplo, como se indica en este documento en los Ejemplos adjuntos. Administrar por vía parenteral la solución

inyectable como se define en el presente es bien conocida en la materia o el médico experto.

El término "aproximadamente" en este documento indica los valores que pueden desviarse hasta un 1%, concretamente el 5%, concretamente el 10%, concretamente el 15% y en algunos casos hasta un 20% mayor o menor que el valor que se refiere, el rango de desviación incluyendo valores enteros y, si procede, valores no enteros, constituyendo un rango continuo.

La invención se describirá adicionalmente en los siguientes ejemplos, que no limitan el alcance de la invención descrita en las reivindicaciones.

Diversos aspectos y modalidades de la presente invención como se delinea anteriormente y como se reivindica en la sección de reivindicaciones más adelante encuentra apoyo experimental en los siguientes ejemplos.

Divulgada y descrita, se entenderá que esta materia actualmente descrita no se limita a los ejemplos específicos, pasos del método y composiciones divulgadas en el presente documento ya que tales pasos y composiciones del método pueden variar. También debe entenderse que la terminología utilizada en el presente documento se utiliza con la finalidad de sólo describir modalidades específicas y no pretende ser limitante ya que el alcance de la invención se limitará solo

mediante las reivindicaciones adjuntas y equivalentes de las mismas.

Como se utiliza en el presente documento y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un," "una",
5 "uno", "el" y "la" incluyen referencias plurales a menos que el contexto dicte claramente lo contrario.

Los siguientes ejemplos son representativos de técnicas empleadas por los inventores para llevar a cabo aspectos de la presente invención. Cabe señalar que mientras estas
10 técnicas son ejemplares de modalidades para la práctica de la materia actualmente descrita, aquellos expertos en la materia, en la luz de la presente descripción, reconocerán que varias modificaciones se pueden hacer sin alejarse del alcance previsto de la materia actualmente descrita.

15

EJEMPLOS

Sin mayor elaboración, se cree que un experto en la materia puede, utilizando la descripción anterior, utilizar la presente invención en toda su extensión. Las siguientes
20 modalidades específicas deben, por lo tanto, interpretarse como meramente ilustrativas y no limitativas de la invención reivindicada de ninguna manera.

Los protocolos de biología molecular estándar conocidos en el arte no específicamente descritos generalmente se

siguen esencialmente en Sambrook y Russell, 2001.

Los métodos estándar de química medicinal conocidos en la materia no se describen específicamente en el presente que siguen esencialmente en la serie "*Comprehensive Medicinal Chemistry*" por varios autores y editores, publicado por Pergamon Press.

Ejemplo 1 Trehalosa

La trehalosa dihidrato se obtuvo desde dos diferentes fuentes comerciales (*Hayashibara y Pfanstiehl*). Las muestras se mantuvieron a temperatura ambiente hasta su análisis y se analizaron por métodos aceptados para verificar detalles. Los resultados se muestran en la Tabla 1 a continuación.

Prueba	Especificaciones requeridas	Muestra <i>Pfanstiehl</i>
Ensayo	97.0-102.0% p/p en base anhidra	99.4% (cumple)
Sustancias relacionadas	Maltotriosa $\leq 0.5\%$ p/p	Cumple
	Cualquier máximo que eluye antes de trehalosa $\leq 0.5\%$ p/p	Cumple
	Glucosa $\leq 0.5\%$ p/p	Cumple
	Cualquier máximo que eluye después de trehalosa $\leq 0.5\%$ p/p	Cumple

Tabla 1 Análisis de trehalosa dihidrato

Como se muestra en la Tabla 1 anterior, las preparaciones de trehalosa dihidrato probadas cumplen la práctica aceptada respecto al uso de la trehalosa en composiciones farmacéuticas, es decir, comprenden 97.0-102.0% p/p de ingrediente activo (trehalosa), con cualquier máximo que eluye antes de trehalosa en una concentración de menos de 0.5% p/p, glucosa en menos de 0.5% p/p y con cualquier máximo que eluye después de trehalosa de menos de 0.5% p/p.

La trehalosa utilizada fue trehalosa dihidrato comercialmente disponible, que comprende 97.0-102.0% p/p de ingrediente activo (trehalosa), con glucosa a menos de 0.5% p/p y otros contaminantes en menos del 1%.

Ejemplo 2 Preparación de solución de trehalosa para inyección IV

Una formulación que comprende trehalosa se preparó bajo condiciones estériles disolviendo trehalosa dihidrato en el agua y el líquido sin color y claro resultante se analizó para identificar cualquier impureza o contaminante.

Prueba	Especificaciones	Resultados
Apariencia del envase ATP007	Vidrio claro 30R, frasco con tapón de caucho gris, sello de aluminio y tapa blanca para retirar	Vidrio claro 30R, frasco con tapón de caucho gris, sello de aluminio y tapa blanca para retirar
Apariencia del contenido ATP007	Líquido claro incoloro esencialmente libre de material particulado visible	Líquido claro incoloro esencialmente libre de material particulado visible
P537 Identidad ATP1323	Tiempo de retención de la P537 máximo $\pm$ 5% del estándar	Tiempo de retención de la P537 el máximo está dentro del $\pm$ 5% del máximo estándar de P537
P537 Ensayo de contenido ATP1323	90.0% a 110% reclamo de etiqueta	99.8%
P537 Sustancias relacionadas (% de reclamo de etiqueta) ATP1323	Informe de impurezas individuales $\approx$ 0.05 % de reclamo de etiqueta Informe de impurezas totales Maltotriosa y otros polisacáridos que eluyen antes de P537: $\approx$ 0.5% Glucosa y máximos que eluyen después de P537 $\approx$ 0.5% 2.0% de impurezas totales	Maltotriosa: No se detectó RRT0.90 desconocido: 0.1 % Glucosa: No se detectó Impurezas totales: 0.1 %
pH ATP164	4.5 a 7.0	6.2
Osmolalidad de ATP841	280-330 mOsm/kg	289 mOsm/kg
Material particulado USP <788>, Ph. Eur 2.9.19	Partículas $\approx$ 10 μ m: NMT 6000 Partículas $\approx$ 25 μ m: NMT 600	$\approx$ 10 μ m: 7 $\approx$ 25 μ m: 0
Volumen extraíble USP <1>, Ph. Eur 2.9.17	No menos de 30 ml	32 ml

5

Prueba	Especificaciones	Resultados
Endotoxinas USP <85>, Ph. Eur 2.6.14	< 0.24 EU/ml	Punto 1 bandeja 1: <0.1 EU/ml Punto 4 bandeja 31: <0.1 EU/ml Punto 8 bandeja 72: <0.1 EU/ml
Estéril USP <71>, Ph. Eur 2.6.1	Cumple	Sin crecimiento

□

10

Tabla 2 Análisis de la formulación de trehalosa

La formulación fue estéril y comprende 10% de trehalosa, con impurezas totales en una concentración de 0.1%, pH de 6.2 y una osmolalidad de 289 mOsm/kg y endotoxinas en menos de 0.1 UE/ml.

15

Ejemplo 3 Estudios farmacocinéticos preclínicos

20

Las concentraciones de plasma y músculo de trehalosa en ratas macho *Sprague-Dawley* (SD) se determinó después de la administración oral por sonda nasogástrica (PO) y bolo intravenoso (IV).

Todas las porciones aplicables del estudio confirmado a las siguientes normas y lineamientos referentes al cuidado y el bienestar de los animales: International AAALAC y lineamientos NIH directrices como se informó en la "Guide for

the Care and Use of Laboratory Animals," National Research Council ILAR, Revisado 1996.

El estudio incluyó 42 ratas SD (macho, 250 a 350 gramos en peso, *the Shanghai SLAC Laboratory Animal Co. Ltd.*). Los
5 animales fueron administrados con un volumen de 5 ml/kg de formulación de trehalosa (trehalosa dihidrato en agua esterilizada en 200 mg/mL) para lograr una dosis nominal de 1 gr/kg, por vía intravenosa o por vía oral.

Las muestras de sangre fueron recolectadas después de
10 la administración de cada dosis y procesadas por plasma. Las muestras de músculo (músculo de la pata trasera) fueron recolectadas y homogeneizadas. Las concentraciones de trehalosa en las muestras homogeneizadas de plasma y músculo fueron analizadas por métodos de LC/MS/MS bioanalíticos
15 calificados.

Análisis de datos farmacocinéticos

Los datos de concentración de plasma de la trehalosa se sometió a un análisis farmacocinéticos no compartimentales
20 utilizando el programa de *software WinNonlin* (versión 6.3, *Pharsight, Mountain View, CA*). Concentración de intercepto de tiempo cero (C0), volumen de distribución (Vdss), Separación (Cl), máximas concentraciones plasmáticas (Cmax) y los máximos tiempos correspondientes (Tmax), vida media terminal

($T_{1/2}$), significa tiempo de residencia (MRT) desde tiempo
cero hasta el último punto de tiempo (MRT_0 -último), MRT desde
tiempo cero a infinito (MRT_0 -inf), el área bajo la curva de
concentración-tiempo de plasma (AUC) desde tiempo cero hasta
5 el último punto de tiempo (AUC_0 -último) y AUC desde tiempo
cero extrapolada al infinito (AUC_0 -inf) se calcularon
utilizando la regla trapezoidal lineal/log. Los tiempos de
muestreo nominal fueron utilizados para calcular todos los
parámetros farmacocinéticos puesto que no había ninguna
10 desviación mayor que 5% entre los tiempos de muestreo real y
nominal.

Se calcularon tanto los valores del músculo a la
concentración plasmática y proporción de AUC (proporción
M/P).

15

La concentración de trehalosa en plasma y músculo

Los parámetros farmacocinéticos de la trehalosa en el
plasma y el músculo después de la única administración oral o
intravenosa de la solución de trehalosa dihidrato (200 mg de
20 trehalosa dihidrato por 1 mL de agua esterilizada) en 1000
mg/kg a ratas SD macho se presentan en la Tabla 3 a
continuación.

Las concentraciones de plasma medias e individuales de
la trehalosa después de la administración oral o intravenosa

de la solución de trehalosa dihidrato (200 mg de trehalosa dihidrato por 1 mL de agua esterilizada) en 1000 mg/kg a ratas SD macho se presentan en la Tabla 3 y mostradas gráficamente en la Figura 1.

5 Las concentraciones de músculo medias e individuales de la trehalosa después de la única administración oral o intravenosa de la solución de trehalosa dihidrato (200 mg de trehalosa dihidrato por 1 mL de agua esterilizada) en 1000 mg/kg a ratas SD macho también se presentan en la Tabla 3.

10 Las comparación de concentraciones de plasma y músculo de trehalosa tras la única administración oral o intravenosa de trehalosa dihidrato en 1000 mg/kg a ratas SD macho son mostradas gráficamente en las Figuras 2 a 3.

Tras una única dosis intravenosa única de solución de trehalosa (200 mg de trehalosa dihidrato por 1 mL de agua esterilizada) 1000 mg/kg a ratas SD macho en ayunas en grupos de prueba de 1 a 5, la trehalosa mostró una separación total (CI, por sus siglas en inglés) de 17.2 mL/min/kg (aproximadamente 31.3% del flujo sanguíneo del hígado de la rata (= 55mL/min/kg)), con la vida media de eliminación promedio ($T_{1/2}$) de 2.07 horas. El C_0 era 1,370,000 ng/mL.

La distribución de volumen (V_{dss}) era a 0.685 L/kg. La exposición de plasma media $AUC_{0-último}$ (48 horas) fue 778,000 ng·hr/mL.

Con una administración oral de solución de dihidrato de trehalosa (200 mg de trehalosa dihidrato por 1 mL de agua esterilizada) a ratas SD macho grupos probados de 6 a 10, la concentración máxima plasmática de trehalosa ($C_{\max}$ = 4,280 ng/mL) se alcanza con dosis posteriores de 0.5 horas ($T_{\max}$). El $AUC_{0-\text{último}}$ (3hr) fue 4,520 ng/mL•hr. La biodisponibilidad absoluta de la trehalosa fue estimada para ser tan baja como 0.601 %.

Las propiedades farmacocinéticas de la trehalosa demostraron una rápida absorción con un tiempo para alcanzar las concentraciones plasmáticas máximas, pero la biodisponibilidad oral absoluta es muy baja, que observó que el compuesto puede sufrir un metabolismo presistémico importante.

Después de una única dosis intravenosa de solución de trehalosa dihidrato (200 mg de trehalosa dihidrato por 1 mL de agua esterilizada) a 1000 mg/kg a ratas SD macho en grupos probados 1 a 5, la $C_{\max}$ de la trehalosa en músculo fue 3730 ng/mL, que se observó en 8 horas ($T_{\max}$) después de la dosis. La exposición del músculo $AUC_{0-\text{último}}$ (48 horas) fue 107,000 ng•hr/mL con la vida media de eliminación 33.8 horas. Los parámetros PK de las muestras del músculo en el grupo oral tratado con fármaco (Grupos de 6 a 10) no podrían calcularse porque estaban debajo de LLOQ

Las proporciones medias de concentración de trhalosa en el músculo a la concentración de plasma varió desde 2.88 y 3.76 en ratas SD macho tras la administración intravenosa. Las proporciones de concentración de músculo a plasma para la trehalosa sobre la administración oral estuvieron debajo de LLOQ y no se calcularon.

Conclusiones

Después de las administraciones intravenosa u oral de solución de trehalosa dihidrato en agua esterilizada en 1000 mg/kg a ratas SD macho, se determinaron la trehalosa en plasma y tejido muscular. También se monitoreó la glucosa en el plasma para cada muestra del estudio de animales de los grupos tratados con fármaco. Se pueden hacer las siguientes conclusiones:

En primer lugar, después de la administración IV, la separación total (Cl) de la trehalosa fue 17.2 mL/min/kg, representando aproximadamente el 31.3% del flujo sanguíneo hepático, un valor moderado de la proporción de extracción hepática. Los V_{dss} y $T_{1/2}$ fueron 0.685 L/kg y 2.07 horas respectivamente. La exposición media de plasma $AUC_{0-última}$ era 778,000 ng·hr/mL.

Después de la administración oral, la trehalosa demostró una absorción rápida con T_{max} observado en 0.50 horas

después de la dosis, pero la biodisponibilidad oral absoluta fue tan baja como 0.601% , sugiriendo que el metabolismo presistémico puede desempeñar un papel importante. $T_{1/2}$ de la trehalosa fue acortado notablemente en administración oral en ratas en comparación con el grupo de intravenoso.

Después de la administración IV, las proporciones medias de la concentración de trehalosa de músculo a la concentración plasmática osciló entre 2.88 y 3.76 en ratas SD macho.

Por último, se observó que la trehalosa dihidrato fue bien tolerada por las ratas a la dosis dada.

Matriz	Plasma		Músculo	
Grupo ID	IV	PO	IV	PO
C_0 (ng/ml)	1370000	---	---	ND
C_{max} (ng/mL o ng/g)	---	4280	3730	ND
T_{max} (h)	---	0.500	8.00	ND
$T_{1/2}$ (h)	2.07	0.740	33.8	ND
Cl (mL/min/kg)	17.2	---	---	ND
V_{dss} (L/kg)	0.685	---	---	ND
$AUC_{0-ultimo}$ (ng·h/mL o ng·h/g)	778000	4520	107000	ND
AUC_{0-inf} (ng·h/mL o ng·h/g)	781000	4870	183000	ND
$MRT_{0-ultimo}$ (h)	0.618	1.04	21.1	ND
MRT_{0-inf} (h)	0.666	1.26	52.6	ND
$AUC_{0-inf}/AUC_{0-ultimo}$ (%)	100	108	171	ND
$^{\circ}$ Biodisponibilidad (%)	---	0.601	---	---
Proporción $^{\circ}$ AUC	---	---	0.234	ND

Abreviaturas: ND = no determinado; c: Biodisponibilidad

(%) se calculó con AUC_{0-inf} media y dosis nominal; d: Proporción de AUC = Músculo AUC_{0-inf} /Plasma AUC_{0-inf} ; $AUC(0-inf) > 120\%$ de $AUC(0-último)$.

Tabla 3 Parámetros farmacocinéticos

5

Así, como se demuestra en la Tabla 3, la trehalosa en la formulación administrada por IV mostró $T_{1/2}$ de 2.07 horas en plasmas, sobre dos veces superior a la del plasma que $T_{1/2}$ obtuvo de trehalosa en la formulación administrada por vía oral (0.740 horas). Además, el músculo $T_{1/2}$ obtuvo de la trehalosa en la formulación administrada por IV fue 33.8 horas. Los valores AUC obtenidos para plasma y músculo cuando la formulación se administró por IV también fueron significativamente mayores que los respectivos valores AUC de la formulación administrada por vía oral.

10

15

Además, como se demostró en la Figura 1, la concentración media plasmática de la trehalosa en la formulación administrada por IV es mayor que la concentración media plasmática de la trehalosa en la formulación administrada oralmente en cada uno de los puntos de tiempo probados.

20

Curiosamente, la Figura 2, que demuestra las concentraciones de plasma contra las musculares de la trehalosa para una formulación de trehalosa administrada por

vía intravenosa, muestra que las concentraciones del músculo son mayores que las concentraciones plasmáticas de trehalosa. Las concentraciones de plasma y el músculo de la trehalosa eran imperceptibles para una formulación de trehalosa administrada por vía oral.

Ejemplo 4 Determinación del nivel de endotoxinas

Se acepta que el máximo nivel permitido de endotoxina en formulaciones administradas por vía intravenosa es de 5 unidades de endotoxinas (EU) por kg de masa corporal por hora (5 EU/kg/hr). Con el fin de determinar el nivel máximo de endotoxina teórica por IV por kg de masa corporal/hora (K) en la formulación de trehalosa (la solución de trehalosa dihidrato en agua esterilizada), se realizaron los siguientes cálculos:

Contribución de la endotoxina	15 gr de la formulación de trehalosa	30 gr de la formulación de trehalosa
2.4 EU/gr (trehalosa)	36	72
0.5 EU/ml (disolvente)	75 (en 150 ml)	150 (en 300 ml)
EU total en la formulación	111	222
Suponiendo que la infusión es de 75 min.	88.8 EU/hr	177.6 EU/hr
K para 60 kg de peso corporal	1.5	3.0
K para 50 kg de peso corporal	1.8	3.6
K para 40 kg de peso corporal	2.2	4.4

Tabla 4 Cálculo de los niveles máximos de endotoxina en formulaciones de trehalosa

Como se indica en la Tabla 4 anterior, el nivel de endotoxina por ml en formulaciones de trehalosa preparadas con disolventes estándar (por ejemplo, agua, solución salina, etc.) es 0.74 UE/ml. Suponiendo una tasa de infusión moderada de 75 minutos, para un peso corporal de 60, 50 y 40 kg el nivel de endotoxina en formulaciones de 10% (p/v) de trehalosa es 1.5, 1.8 y 2.2 EU/kg/hr, respectivamente, para una formulación que comprende 15 gr de trehalosa y 3.0, 3.6 y 4.4 EU/kg/hr, respectivamente, para una formulación que comprende 30gr de trehalosa .

En consecuencia, debajo de la tasa máxima prevista, el nivel de endotoxina para un peso corporal de 60, 50 y 40 kg será 2, 2.4 y 3 EU/kg/hr, respectivamente, para una formulación que comprende 15 gr de trehalosa(en 150 ml de disolvente) y 4, 4.8 y 6 EU/kg/hr, respectivamente, para una formulación que comprende 30 gr de trehalosa (en 300 ml de disolvente).

Ejemplo 5 Estudios de seguridad

La seguridad y la tolerabilidad de la trehalosa se ha investigado extensivamente, como se detalla a continuación.

La dosis letal media (DL₅₀) fue examinada en ratones, ratas y perros. Ninguna especie mostró signos de toxicidad y no ocurrieron muertes después de la administración oral e intravenosa. Los resultados se sintetizan en la Tabla 5.

5

ESPECIES	VÍA	LD50 (mg/kg bw)
Ratón	Oral	>5000
Ratón	Intravenoso	>1000
Rata	Oral	>16000
Rata	Oral	>5000
Rata	Intravenoso	>1000
Perro	Oral	>5000
Perro	Intravenoso	>1000

10

Tabla 5 LD50 de la trehalosa en animales

15

Además, la trehalosa es reconocida como un ingrediente alimentario seguro y como un material GRAS utilizado en la industria farmacéutica como un excipiente para formulaciones de fármaco oral, intraocular e IV. En varios estudios, voluntarios sanos recibieron dosis orales de trehalosa que van desde 10 a 60 gr. Aparte de leves síntomas abdominales (p. ej, flatulencia, distensión, borborigmos y diarrea ocasional) no se informaron otros problemas de seguridad [18].

20

Se ha utilizado la trehalose como un estabilizador de

la proteína en varias fármacos de proteína disponible comercialmente durante más de una década y su seguridad se ha establecido repetidamente en poblaciones de pacientes en etapas avanzadas de enfermedades malignas, hemofilia y trastornos afines de la coagulación. Estos medicamentos están aprobados para su uso por varios años y a veces se dan a los pacientes tan frecuentemente como cada 8 horas con intervalos de 2-3 semanas.

Ejemplo 6 Tratamiento de pacientes con OPMD con trehalosa

El beneficio potencial de la trehalosa en aliviar los síntomas de la la OPMD o alentar el deterioro de los pacientes con OPMD, actualmente es examinado en un estudio clínico en pacientes humanos.

El estudio es una escalada de dosis aleatorizada, doble ciego, y estudio controlado de dosis de grupos paralelo del tratamiento de pacientes con distrofia muscular oculofaríngea (OPMD) por IV con solución inyectable acuosa se lleva a cabo en tres centros médicos.

FASE EXPLORATORIA.

Periodo de selección (semana -4/Día -28 a la Semana

0/Día 0)

Se llevan a cabo evaluaciones de selección en dos visitas dentro de 28 días antes del inicio de la terapia, tal como se especifica en el calendario de evaluaciones.

5

Período de tratamiento 1 (Semana 1 a la Semana 24)

Todos los pacientes aptos reciben el tratamiento de estudio una vez por semana.

10 Inicialmente, todos los pacientes aptos reciben por vía intravenosa una dosis de trehalosa (8g) en 10% (p/v) de una solución acuosa inyectable por semana (80 ml de solución). Esto es seguido por la administración intravenosa de una única dosis de trehalosa adicional (15g) en 10% (p/v) de una solución acuosa inyectable durante la semana siguiente. Tras
15 la determinación de la seguridad, en la próxima visita en la semana posterior, los pacientes son aleatorizados en una proporción de 1:1 (doble ciego) para recibir ya sea 15g o 30g de trehalosa (en una solución acuosa al 10% (p/v)) durante 24 semanas. Las 4 primeras infusiones se realizan en la clínica
20 bajo dirección profesional. Los pacientes regresan a la clínica una vez al mes para las infusiones del fármaco y las evaluaciones del estudio, como se indica en el calendario de procedimientos; todas las otras infusiones semanales pueden hacerse en el domicilio del paciente o en la clínica.

Fase fundamental

Período de tratamiento 2 (semana 25 a la Semana 72)

Los pacientes continúan con infusiones IV semanales de
5 solución inyectable acuosa de trehalosa.

Período de seguimiento (4 semanas después de la dosis)

Los pacientes son vistos en una visita de seguimiento
después del tratamiento, 4 semanas después de la dosis final
10 de la semana 24.

Población de Estudio

Hasta 15 pacientes adultos con OPMD están inscritos en
el estudio de cada uno de los tres centros de estudio. Están
15 inscritos un mínimo de 42 pacientes en total. Se puede añadir
un grupo de control sin tratamiento.

Criterios de inclusión

Hombres y Mujeres

20 18 - 80 años (inclusivo) de edad

Diagnosticados genéticamente con OPDM

Disfagia moderada (prueba de ingestión anormal en la
selección y en el primer día de dosificación, antes de la
administración de fármaco)

Los pacientes deben ser ambulatorios y capaces de realizar las evaluaciones de fuerza y funcional muscular.

Los pacientes que proporcionan consentimiento informado por escrito para participar en el estudio

5 Índice de masa corporal (IMC) $<30 \text{ kg/m}^2$

Los pacientes femeninos de embarazo potencial deben tener una prueba de embarazo de suero negativo en la selección

10 Los hombres y mujeres deben aceptar utilizar control de la natalidad

Criterios de exclusión

Diabetes mellitus tipo 1 ó 2

15 Otras enfermedades graves, p. ej. falla renal (separación de creatinina $<60 \text{ ml/min}$), insuficiencia hepática y hepatopatía crónica (hepatitis B o C), portadores de VIH, tuberculosis, SLE, poliartritis reumatoide, sarcoidosis, colagenosis.

Cardiopatía incontrolada, por ejemplo, CHF.

20 Otras enfermedades neuromusculares

Otros trastornos asociados con disfagia esofágica: p. ej. reflujo gastroesofágico (GERD), estenosis esofágica debido a trauma mecánico o químico, infección (p. ej. moniliasis esofágica), disfagia inducida por fármacos (p.

ej., los bifosfonatos), anillos y redes esofágicos, trastornos de la motilidad espástica del esófago.

Historia de la malignidad.

Historia de irradiación de cuello.

5 Mujeres embarazadas o lactantes actualmente.

Obesidad ($IMC \geq 30$) y la morbilidad asociada.

Miotomía anterior faríngeo.

Pérdida de peso de más del 10% en los últimos 12 meses.

10 Hipersensibilidad conocida a cualquier componente de la inyección.

Forma de dosificación y vía de administración de investigación

15 10% (p/v) de una solución IV de trehalosa se administra en una sola inyección, una vez por semana durante 72 semanas. La solución es suministrada aproximadamente desde alrededor de 70 a unos 120 minutos.

20 Dosis inicial por inyección en la Semana 1 son 8 g de trehalosa. Dosis de la segunda semana es de 15g y dosis en las semana 3 a la semana 72 es de 15 ó 30 g.

Seguridad y tolerabilidad

El punto final de seguridad primario es la frecuencia, severidad y duración de los eventos adversos (AEs),

incluyendo anormalidades de laboratorio clínicamente significativas tras la administración de la solución inyectable de trehalosa.

La seguridad es evaluada sobre la base de AEs y medicaciones concomitantes; examen físico; signos vitales (antes de, cada 30 minutos durante, y 30 minutos después de la administración). La prueba incluye conteo sanguíneo completo (CBC) con diferencial, electrolitos (Na, K, Cl), BUN, creatinina, glucosa, pruebas de función hepática (ALT, AST, bilirrubina total, bilirrubina directa, fosfatasa alcalina y albúmina sérica) y análisis de orina de varilla.

Evaluación de marcadores de enfermedad/resultados de eficacia

Los siguientes marcadores de enfermedad se evalúan en momentos específicos:

Puntuación de aspiración de penetración (mediante videofluoroscopia)

SWAL-QOL

Evaluaciones cronometradas de fuerza y funcionalidad muscular

Se medirán los cambios en comparación con la referencia para cada paciente, y el cambio total en las puntuaciones de

los grupos de tratamiento en cada extremo de eficacia predeterminado es analizado estadísticamente.

Evaluaciones adicionales pueden ser de peso e ingesta.

Biopsia de aguja de núcleo percutánea (PCNB) se realiza
5 para obtener la fibra del músculo para histología.

Farmacocinética

La farmacocinética de la trehalosa se evalúa en
pacientes con la dosis de 15 g o 30 g de trehalosa. La
10 concentración sanguínea de trehalosa se mide antes de la
dosis (hasta 60 minutos antes de la administración de
fármaco); y cada 30 minutos después de que se inicia la
dosificación, por 5 horas o hasta que los niveles de glucos
vuelvan a la normalidad, cualquiera que ocurra primero.

15 Mientras que la invención se ha descrito junto con la
descripción detallada del mismo, la descripción anterior
pretende ilustrar y no limitar el alcance de la invención,
que se define por el alcance de las reivindicaciones
anexas. Otros aspectos, ventajas, y modificaciones están
20 dentro del alcance de las siguientes reivindicaciones.