

FORMULACIONES QUE COMPRENDEN GLUCOCEREBROSIDASA E **ISOFLAGOMINA**

REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS

- 5 La presente solicitud reivindica prioridad sobre la solicitud provisional de Estados Unidos N.º 62/577.429, presentada el 26 de octubre de 2017, cuya divulgación se incorpora en el presente documento como referencia en su totalidad.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

- 10 La glucocerebrosidasa (GCB) es un fármaco proteico que se puede usar para tratar la enfermedad de Gaucher, un trastorno de almacenamiento lisosomal autosómico recesivo caracterizado por una deficiencia de (GCB).

- La enfermedad de Gaucher es un trastorno autosómico recesivo causado por mutaciones en el gen de GBA, que da como resultado una deficiencia de la
15 enzima lisosomal beta-glucocerebrosidasa. La glucocerebrosidasa cataliza la conversión del esfingolípido glucocerebrósido en glucosa y ceramida. La deficiencia enzimática provoca una acumulación de glucocerebrósido principalmente en el compartimento lisosomal de macrófagos, dando lugar a células espumosas o "células de Gaucher". En la enfermedad de Gaucher, varias
20 formas de GCB mutante tienen una actividad reducida, escasa o nula de escisión de glucosilceramida, dependiendo del aminoácido o aminoácidos mutados. La gravedad de este trastorno se correlaciona con los niveles relativos de actividad enzimática residual y el grado resultante de acumulación del sustrato.

- 25 La GCB es una enzima lisosomal que hidroliza el glucolípido glucocerebrósido que se forma después de la degradación de los glucoesfingolípidos en las membranas de los glóbulos blancos y los glóbulos rojos. La deficiencia de esta enzima hace que el glucocerebrósido se acumule en grandes cantidades en los lisosomas de las células fagocíticas localizadas en el
30 hígado, el bazo y la médula ósea de los pacientes de Gaucher. La acumulación de estas moléculas provoca una serie de manifestaciones clínicas que incluyen esplenomegalia, hepatomegalia, trastorno esquelético, trombocitopenia y anemia. (Beutler et al. "Enfermedad de Gaucher" Las bases metabólicas y moleculares de la enfermedad hereditaria (McGraw-Hill, Inc, Nueva York, 1995, pág. 2625-2639.)

- 35 La velaglucerasa alfa es una forma de GCB usada para tratar la enfermedad de Gaucher. VPRIV es una formulación que contiene velaglucerasa alfa. La velaglucerasa alfa cataliza la hidrólisis de glucocerebrósido, reduciendo la

cantidad de glucocerebrósido acumulado. En ensayos clínicos, el VPRIV redujo el tamaño del bazo y el hígado y mejoró la anemia y la trombocitopenia.

El VPRIV y la velaglucerasa alfa y otros productos farmacológicos similares que contienen una proteína se almacenan en forma líquida o liofilizada, es decir, secados por congelación. Un producto farmacológico liofilizado se reconstituye a menudo añadiendo un diluyente de administración adecuado justo antes del uso por el paciente. Puede haber una reducción en la cantidad de velaglucerasa alfa o GCB en forma líquida o liofilizada como resultado de inestabilidades físicas, incluyendo desnaturalización y agregación, así como inestabilidades químicas, incluyendo, por ejemplo, hidrólisis, desamidación y oxidación.

Existe la necesidad de formulaciones mejoradas con estabilidad mejorada de GCB, VPRIV o velaglucerasa alfa, especialmente aquellas que son adecuadas para administración subcutánea (SC). GCB tiene un límite de solubilidad de menos de 30 mg/ml a temperatura ambiente durante 24 horas. Un volumen conveniente para un producto de inyección SC es típicamente de 2,5 ml o menos. Esto requiere tener una formulación que pueda concentrarse a un nivel suficientemente alto para administrar una dosis terapéuticamente adecuada. Además, las formulaciones tendrían, idealmente, una estabilidad de almacenamiento adecuada a temperatura ambiente o en condiciones de refrigeración.

También existe la necesidad de formulaciones para administración de SC que tengan una biodisponibilidad mejorada de GCB, VPRIV o velaglucerasa alfa. La formulación actual de VPRIV, que se administra por vía intravenosa (IV), proporciona aproximadamente el 1 % de la biodisponibilidad en suero. Es poco probable que la administración subcutánea (SC) proporcione la exposición tisular equivalente a la de una administración IV. GCB tiene una semivida en suero de menos de 15 minutos como fármaco administrado por vía intravenosa. Una mejor estabilidad del suero permitiría que más GCB administrado por SC se dispersara fuera del compartimiento de SC y en la circulación sistémica. La estabilidad del suero mejorada también permitiría el mantenimiento de altas concentraciones de GCB circulantes, permitiendo así que los monocitos, macrófagos e histiocitos residentes en el tejido capten más GCB.

SUMARIO DE LA INVENCION

En un aspecto, se proporciona una composición que comprende una glucocerebrosidasa (GCB) y una isofagomina (IFG) en una relación molar de 1:1 o al menos aproximadamente 1:>1 (por ejemplo, 1:x, donde x es mayor que 1). En algunas realizaciones, el GCB es velaglucerasa alfa. La velaglucerasa alfa es una

enzima producida de forma recombinante con la misma secuencia de aminoácidos que el GCB humano natural producido en una línea celular humana, y es una forma especialmente adecuada de GCB para practicar la invención. En algunas realizaciones, el pH de la composición es de aproximadamente 6,0. En
5 algunas realizaciones, el pH de la composición es de aproximadamente 6,5. En algunas realizaciones, el pH de la composición es de aproximadamente 7,0. En algunas realizaciones, la relación molar de GCB a IFG es de aproximadamente 1:1 a aproximadamente 1:30. En algunas realizaciones, la relación molar de GCB a IFG es de aproximadamente 1:1 a aproximadamente 1:10. En algunas
10 realizaciones, la relación molar de GCB a IFG es de aproximadamente 1:1 a aproximadamente 1:5. En algunas realizaciones, la relación molar de GCB a IFG es de aproximadamente 1:1 a aproximadamente 1:10. En algunas realizaciones, la relación molar de GCB a IFG es de aproximadamente 1:2,5 a aproximadamente 1:10. En algunas realizaciones, la relación molar de GCB a IFG es de
15 aproximadamente 1:2,5 a aproximadamente 1:5. En algunas realizaciones, la relación molar de GCB a IFG es de aproximadamente 1:10 a aproximadamente 1:30. En algunas realizaciones, la relación molar de GCB a IFG es de aproximadamente 1:30 a aproximadamente 1:100. En algunas realizaciones, la relación molar de GCB a IFG es de aproximadamente 1:2,5 a aproximadamente
20 1:3,5. En algunas realizaciones, la relación molar de GCB a IFG es de aproximadamente 1:3,0. En algunas realizaciones, la relación molar de GCB a IFG es 1:3,0, que es especialmente adecuada para la práctica de la invención.

En algunas realizaciones, la composición está a una temperatura de al menos 20 °C. En algunas realizaciones, la composición está a una temperatura de
25 0 °C a 20 °C. En algunas realizaciones, la composición está a una temperatura de menos de 0 °C. En algunas realizaciones, la composición es una solución acuosa. En algunas realizaciones, la composición es un liofilizado.

En algunas realizaciones, la composición comprende además un excipiente farmacéuticamente aceptable, una sal farmacéuticamente aceptable, o tanto un
30 excipiente farmacéuticamente aceptable como una sal farmacéuticamente aceptable.

En algunas realizaciones, la IFG es tartrato de isofagomina (IFGT). En algunas realizaciones, el tartrato de isofagomina es D-tartrato de isofagomina. El IFGT, y en particular el D-tartrato de isofagomina, son sales especialmente
35 adecuadas de IFG para la práctica de la invención. El tartrato de isofagomina puede aumentar ventajosamente la actividad de GCB en el suero por encima del límite superior que normalmente se logra con una dosis subcutánea de 2,5 mg/kg.

En consecuencia, el GCB co-formulado con IFGT puede proporcionar biodisponibilidad en suero que permite la administración subcutánea, en particular cuando se encuentra en una relación molar de al menos 1:3,0 de GCB: IFGT. La formulación conjunta de IFTG también aumenta la actividad enzimática global de GCB. En algunas realizaciones, la IFG es distinto de tartrato de isofagomina. En algunas realizaciones, la composición es un líquido. En algunas realizaciones, la composición comprende además un antioxidante. En algunas realizaciones, la composición comprende además un hidrato de carbono. En algunas realizaciones, la composición comprende además un tensioactivo. En algunas realizaciones, la composición comprende 45-120 mg/ml de velaglucerasa alfa y 0,2 a 1,8 mg/ml de D-tartrato de isofagomina. En algunas realizaciones, la composición comprende 60 mg/ml de velaglucerasa alfa y 0,9 mg/ml de D-tartrato de isofagomina.

En algunas realizaciones, la composición comprende además citrato o fosfato y polisorbato 20 (por ejemplo, citrato sódico 50 mM o fosfato sódico y polisorbato 20 al 0,01 %). En algunas realizaciones, la composición comprende además citrato sódico 5-20 mM y polisorbato-20 al 0,01 %. En algunas realizaciones, la composición comprende además citrato sódico 10 mM y polisorbato-20 al 0,01 %. En algunas realizaciones, la composición comprende además fosfato sódico 5-20 mM y polisorbato-20 al 0,01 %. En algunas realizaciones, la composición comprende además fosfato sódico 10 mM y polisorbato-20 al 0,01 %. En algunas realizaciones, la composición comprende además citrato sódico 5-20 mM y polisorbato-20 al 0,01 % (p/v). En algunas realizaciones, la composición comprende además citrato sódico 10 mM y polisorbato-20 al 0,01 % (p/v). En algunas realizaciones, la composición comprende además fosfato sódico 5-20 mM y polisorbato-20 al 0,01 % (p/v). En algunas realizaciones, la composición comprende además fosfato sódico 10 mM y polisorbato-20 al 0,01 % (p/v). En algunas realizaciones, la composición comprende además citrato sódico 5-20 mM y polisorbato-20 al 0,01 % (v/v). En algunas realizaciones, la composición comprende además citrato sódico 10 mM y polisorbato-20 al 0,01 % (v/v). En algunas realizaciones, la composición comprende además fosfato sódico 5-20 mM y polisorbato-20 al 0,01 % (v/v). En algunas realizaciones, la composición comprende además fosfato sódico 10 mM y polisorbato-20 al 0,01 % (v/v). En algunas realizaciones, la composición está a aproximadamente pH 6,0. En algunas realizaciones, la composición está a pH 6,0.

En otro aspecto se proporciona un recipiente que comprende cualquiera de las composiciones descritas en el presente documento. En algunas realizaciones,

el contenedor se selecciona del grupo que consiste en una jeringa precargada, un vial o una ampolla.

En otro aspecto se proporciona un método para preparar cualquiera de las composiciones descritas en el presente documento. El método comprende

5 disolver la IFG (por ejemplo, en agua), ajustar el pH a aproximadamente 6,0 y añadir la GCB para producir la composición. En algunas realizaciones, el método comprende además la liofilización de IFG antes de añadir GCB. En algunas realizaciones, el método comprende además añadir polisorbato 20 al 0,01 %. En algunas realizaciones, el método comprende además añadir polisorbato 20 al 0,01

10 % (p/v). En algunas realizaciones, el método comprende además añadir polisorbato 20 al 0,01 % (v/v). En algunas realizaciones, el método comprende además filtrar la composición a través de una membrana de 0,22 µm. En algunas realizaciones, la IFG está presente en una cantidad suficiente para mantener la estabilidad de GCB en la composición. En algunas realizaciones, la IFG está

15 presente en una cantidad suficiente para mantener la estabilidad de GCB en la composición durante al menos tres días a 0-50 °C. En algunas realizaciones, la IFG está presente en una cantidad suficiente para mantener la estabilidad de GCB en la composición durante al menos 6 meses a 0-40 °C.

En otro aspecto, se proporciona un método para tratar un trastorno

20 relacionado con una disfunción en una ruta de GCasa que comprende administrar cualquiera de las composiciones descritas en el presente documento. En algunas realizaciones, el método es eficaz para tratar el trastorno. En algunas realizaciones, la composición se administra por vía intravenosa o subcutánea. En algunas realizaciones, la composición se administra por vía subcutánea, por

25 ejemplo, por inyección subcutánea, que es especialmente adecuada para la práctica de la invención. En algunas realizaciones, la composición se administra dos veces a la semana, una vez a la semana, con menos frecuencia que una vez a la semana, o una vez cada dos semanas. Normalmente, las composiciones descritas en el presente documento se administran por vía subcutánea mediante

30 inyección una o dos veces a la semana o una vez cada dos semanas. Las composiciones descritas en el presente documento (en particular, las formulaciones con IFGT) administradas por vía subcutánea pueden proporcionar una exposición al suero significativamente mayor en comparación con las dosis intravenosas comparables de GCB solo. Una mayor biodisponibilidad sérica

35 permite, ventajosamente, una reducción en el número de inyecciones subcutáneas que deben administrarse a un sujeto. Por ejemplo, se deben administrar menos inyecciones por tratamiento para lograr una cantidad

terapéuticamente eficaz y/o el intervalo de tiempo entre inyecciones subcutáneas puede extenderse.

En otro aspecto, las composiciones descritas en el presente documento son para uso en terapia. En una realización, las composiciones descritas en el presente documento son para uso en un método para tratar un trastorno relacionado con una disfunción en una ruta de GCasa como se devela en el presente documento. En otra realización, las composiciones descritas en el presente documento son para uso en la fabricación de un medicamento para tratar un trastorno relacionado con una disfunción en una ruta de GCasa, por ejemplo, por los métodos desvelados en el presente documento. En algunas realizaciones, la composición se administra por vía intravenosa o subcutánea. En algunas realizaciones, la composición se administra por vía subcutánea, por ejemplo, mediante inyección subcutánea. En algunas realizaciones, la composición se administra dos veces a la semana, una vez a la semana, con menos frecuencia que una vez a la semana, o una vez cada dos semanas. Normalmente, las composiciones descritas en el presente documento se administran por vía subcutánea mediante inyección una o dos veces a la semana o una vez cada dos semanas.

En algunas realizaciones, el trastorno comprende un defecto en la actividad de la GCasa. En algunas realizaciones, el defecto en la actividad de GCasa comprende una actividad enzimática disminuida. En algunas realizaciones, el trastorno comprende alteración de la regulación de alfa-sinucleína. En algunas realizaciones, el trastorno es una enfermedad de almacenamiento lisosomal, por ejemplo, enfermedad de Gaucher, enfermedad de Fabry, enfermedad de Pompe, mucopolisacaridosis o atrofia de sistemas múltiples. Las composiciones descritas en el presente documento son especialmente adecuadas para tratar la enfermedad de Gaucher. Por supuesto, también se conocen muchos otros implantes, sistemas de administración y módulos similares. En algunas realizaciones, el trastorno es un trastorno neurodegenerativo, por ejemplo, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer o demencia con cuerpos de Lewy.

En otro aspecto, se proporciona un método para tratar una disfunción en una ruta de GCasa que comprende administrar a un sujeto que lo necesite cualquiera de las composiciones descritas en el presente documento. En algunas realizaciones, el sujeto es un ser humano..

En otro aspecto, se proporciona un método para tratar una disfunción en una ruta de GCasa que comprende administrar a un sujeto una composición que

comprende de 0,5 a 5,0 mg/kg de GCB e IFG, por ejemplo, donde IFG está en al menos aproximadamente 1, 1,25, 1,5, 2, 2,5, 3, 4 o 5 veces el exceso molar al GCB, donde la composición se administra por vía subcutánea. En otro aspecto, se proporciona una composición que comprende de 0,5 a 5,0 mg/kg de GCB e IFG, por ejemplo donde la IFG está en al menos aproximadamente 1, 1,25, 1,5, 2, 2,5, 3, 4 o 5 veces el exceso molar al GCB, para su uso en un método para tratar una disfunción en una ruta de GCasa, donde la composición se administra por vía subcutánea. En otro aspecto, se proporciona el uso de una composición que comprende de 0,5 a 5,0 mg/kg de GCB e IFG, por ejemplo, donde la IFG está en al menos aproximadamente 1, 1,25, 1,5, 2, 2,5, 3, 4 o 5 veces el exceso molar a GCB, en la fabricación de un medicamento para un método para tratar una disfunción en una ruta de GCasa. En algunas realizaciones, la IFG en la composición se administra en una cantidad que no aumenta la actividad de GCB en suero endógena. En algunas realizaciones, la composición comprende de 0,8 a 4,0 mg/kg de GCB. En algunas realizaciones, la composición comprende de 1,0 a 3,0 mg/kg de GCB. En algunas realizaciones, la composición comprende de 1,2 a 2,0 mg/kg de GCB. En algunas realizaciones, la composición comprende 1,5 mg/kg de GCB. En algunas realizaciones, la composición comprende de 1,5 mg/kg de GCB. En algunas realizaciones, la composición comprende de 2,0 a 5,0 mg/kg de GCB. En algunas realizaciones, la composición comprende de 2,25 a 4,5 mg/kg de GCB. En algunas realizaciones, la composición comprende de 2,25 a 3,75 mg/kg de GCB. En algunas realizaciones, la composición comprende de 3,5 a 5,0 mg/kg de GCB. En algunas realizaciones, la IFG está en una relación molar de 1 a 5 o de 1 a 10 veces el exceso molar respecto a GCB. En algunas realizaciones, la IFG está en una relación molar de 2 a 10 veces de GCB. En algunas realizaciones, la IFG está en una relación molar de 10 a 30 veces respecto a GCB. En algunas realizaciones, la IFG está en una relación molar de 30 a 100 veces respecto a GCB. En algunas realizaciones, la IFG está en una relación molar de 2,5 a 3,5 veces respecto a GCB. En algunas realizaciones, la IFG está en una relación molar de 3 veces respecto a GCB. En algunas realizaciones, la exposición, actividad o biodisponibilidad de GCB aumenta, por ejemplo, en relación con la exposición, actividad o biodisponibilidad de una cantidad equivalente de GCB solo, administrado IV. En algunas realizaciones, la exposición, actividad o biodisponibilidad de GCB en el bazo aumenta. En algunas realizaciones, la exposición, actividad o biodisponibilidad de GCB en el hígado aumenta. En algunas realizaciones, la exposición, actividad o biodisponibilidad de GCB en el suero aumenta.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

El archivo de patente o solicitud contiene al menos un dibujo realizado a color. La Oficina proporcionará copias de esta patente o publicación de solicitud de patente con dibujos a color previa solicitud y pago de la tarifa necesaria.

5 La figura 1 es un diagrama de flujo que ilustra un proceso para preparar una formulación de glucocerebrosidasa (GCB) e isofagomina (IFG).

Las figuras 2A y 2B ilustran la prueba de SDS-PAGE de muestras de GCB el primer día después de añadir IFG (2A) y dos semanas después de añadir IFG (2B). No se realizó ningún ajuste de pH de IFG.

10 La figura 3 muestra los tubos Eppendorf que contienen soluciones liofilizadas de tartrato de isofagomina con pH ajustado (IFGT).

Las figuras 4A y 4B ilustran la prueba de SDS-PAGE de muestras de GCB el mismo día en que se añadió IFG (4A) y después de tres días de almacenamiento (4B). La IFG se ajustó a pH.

15 La figura 5 ilustra los resultados de un ensayo de cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) de IFGT ajustado por pH añadido a GCB.

Las figuras 6A y 6B ilustran los resultados de un ensayo de cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) de IFG ajustado por pH añadido a GCB.

20 Las figuras 7A-7D ilustran los resultados de los estudios de resonancia de plasmón superficial de la unión de IFG a GCB.

Las figuras 8 ilustran los resultados de un ensayo de fluorimetría de exploración nano-diferencial (nano-DSF) que evalúa los cambios en la temperatura de fusión de GCB con diferentes relaciones molares de IFG que varían de 1:3 a 1:100 de GCB:IFG.

25 Las figuras 9A-9C ilustran los resultados de las reacciones de actividad enzimática realizadas en la velaglucerasa alfa preincubada con IFGT. La figura 9A muestra una curva de inhibición con sustrato sintético pNP-GPS colorimétrico. La figura 9B muestra una curva de inhibición con sustrato de 4MU-GPS fluorométrico sintético. La figura 9C muestra la inhibición con el sustrato glucoesfingolípido C12-GluCer natural.

30 La figura 10A muestra el aspecto de las muestras de GCB/IFGT almacenadas durante tres semanas a 40 °C. La figura 10B muestra el análisis de SDS-PAGE de las muestras de GCB/IFGT almacenadas a las tres semanas. Las soluciones de los Grupos 1-3 (G1, G2, G3) aparecen claras. La solución del Grupo 4 (G4) aparece turbia.

La figura 11 muestra los controles negativos y positivos para el análisis inmunohistoquímico (IHC) de GCB de un estudio farmacocinético de GCB

intravenoso y GCB subcutáneo con IFG en el mono cynomolgus.

La figura 12 muestra la tinción de GCB en el hígado a un aumento de 2X en varios puntos de tiempo después de la inyección subcutánea de GCB (paneles superiores) e inyección intravenosa de GCB (paneles inferiores).

5 La figura 13 muestra la tinción de GCB en el hígado a un aumento de 20X en diversos puntos de tiempo después de la inyección subcutánea de GCB (paneles superiores) e inyección intravenosa de GCB (paneles inferiores).

La figura 14 muestra la tinción de GCB en el bazo a un aumento de 2X en diversos puntos de tiempo después de la inyección subcutánea de GCB (paneles superiores) e inyección intravenosa de GCB (paneles inferiores).

La figura 15 muestra la tinción de GCB en el bazo a un aumento de 20X en diversos puntos de tiempo después de la inyección subcutánea de GCB (paneles superiores) e inyección intravenosa de GCB (paneles inferiores).

Las figuras 16A y 16B muestran los resultados de un ensayo de proteína velaglucerasa alfa y niveles de actividad enzimática en homogeneizados de hígado y bazo después de la administración de velaglucerasa alfa (16A) y velaglucerasa alfa con IFGT en una relación molar de 1:3 (16B).

La figura 16C muestra los resultados de un ensayo de los niveles de actividad sérica de GCB en monos cinomolgos después de la administración subcutánea de velaglucerasa alfa con IFGT.

Las figuras 17A y 17B muestran los resultados de un ensayo ELISA de ECL de biodisponibilidad en suero de GCB (17A) y un ensayo de actividad GCB (17B) después de la administración subcutánea de 4 mg/kg de velaglucerasa alfa e IFG a diferentes relaciones molares que varían de (1:3 a 1:100).

25 Las Figuras 18A y 18B muestran los resultados de un ensayo ELISA de ECL del perfil de contenido de GCB en el hígado (18A) y el bazo (18B) después de la administración intravenosa de 10 mg/kg de velaglucerasa alfa o la administración subcutánea de 4 mg/kg de velaglucerasa alfa e IFG en una relación molar de 1:100.

30 Las Figuras 19A y 19B muestran los resultados de un ensayo ELISA de ECL del contenido de CBG en el hígado (19A) y el bazo (19B) después de la administración subcutánea d 4 mg/kg de velaglucerasa alfa e IFG en una relación molar de 1:3.

35 Las figuras 20A y 20B muestran los resultados de un ensayo ELISA de ECL de biodisponibilidad en suero de GCB (20A) y un ensayo de actividad GCB (20B) después de la administración subcutánea de 1,5 mg/kg de velaglucerasa alfa e IFG en diferentes relaciones molares que varían de (1:1 a 1:30).

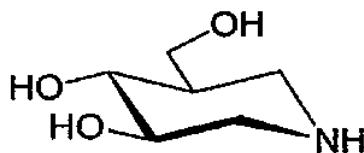
La Figura 21 muestra los resultados de un ensayo de actividad de VPRIV en suero humano incubado a 37 °C sin IFG, IFG 3 nM, IFG 10 nM, IFG 30 nM, IFG 100 nM, IFG 300 nM e IFG 1000 nM.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

5 Visión general

Las composiciones que comprenden glucocerebrosidasa (GCB) pueden beneficiarse de una mayor estabilidad, como cuando las composiciones son líquidas. Los tres grupos tiol libres expuestos en la GCB pueden sufrir reacciones que conducen a una reducción de la estabilidad, por ejemplo, mediante la agregación de moléculas de GCB. Por ejemplo, en un tampón a un pH de 6, típicamente el 1-2 % de la proteína se ha agregado en un mes de almacenamiento y aproximadamente el 15 % se ha agregado después de 6 meses de almacenamiento. Si bien no desean estar limitados estrictamente por teoría o mecanismo alguno, la estabilidad de la proteína está influenciada por varios factores.

La adición de isofagomina (IFG), por ejemplo, tartrato de isofagomina (IFGT), mejora la estabilidad de la GCB *in vitro*, particularmente cuando la IFG, por ejemplo, IFGT, se ajusta a un pH de 6,0 antes de añadirse a la GCB. La IFG tiene la siguiente estructura:



20

Sin desear quedar ligado a teoría alguna, la IFG puede interaccionar con los aminoácidos que se encuentran cerca del sitio activo para bloquear la GCB en una conformación que proporciona una estabilidad mejorada. Véase Shen, J.S. et al., Biochem. Biophys. Res. Comm., 2008, 369:1071-1075. La IFG también puede evitar que la GCB se agregue porque IFG puede asociarse con GCB para hacer que la GCB sea más compacta y térmicamente más estable.

Los presentes inventores han demostrado que la relación molar de IFG a GCB es crítica para estabilizar la GCB en composiciones líquidas. Como se describe con más detalle a lo largo de la presente solicitud, las composiciones con una relación molar de al menos 1:2,5 (GCB: IFG) (es decir, 1:x (donde x es al menos 2,5) pueden tener sustancialmente menos agregación y degradación de GCB. Puede haber sustancialmente más agregación y degradación de GCB con relaciones molares inferiores a 1:2,5.

Los presentes inventores también han demostrado que las composiciones

con una relación molar de IFG/IFGT a GCB de al menos 1:2,5 (GCB:IFG) tienen biodisponibilidad, actividad, exposición tisular y exposición sistémica mejoradas de GCB cuando se administran por vía subcutánea. La biodisponibilidad mejorada puede detectarse mediante uno o más de tinción tisular aumentada de GCB en el hígado, tinción tisular aumentada de GCB en el bazo, una concentración incrementada de GCB en suero, una actividad de GCB incrementada en suero. La exposición sistémica mejorada puede analizarse midiendo la concentración de proteínas de GCB o la actividad enzimática de GCB en suero. La adición de IFG, por ejemplo IFGT, a GCB en una relación molar de al menos 1:2,5 (GCB:IFG) puede permitir que la biodisponibilidad, la actividad, la exposición tisular o la exposición sistémica de GCB en una formulación subcutánea sean similares a, o mayores que, la biodisponibilidad de GCB, actividad, exposición tisular o exposición sistémica en una formulación intravenosa, particularmente una formulación sin IFG.

15 **Definiciones**

El término "sujeto" se refiere a cualquier mamífero, incluyendo, pero sin limitaciones, cualquier animal clasificado como tal, incluyendo seres humanos, primates no humanos, primates, babuinos, chimpancés, monos, roedores (por ejemplo, ratones, ratas), conejos, gatos, perros, caballos, vacas, ovejas, cabras, cerdos, etc. El término "sujeto" se puede usar indistintamente con el término "paciente".

El término "aislado" se refiere a una molécula que está sustancialmente libre de su entorno natural. Por ejemplo, una proteína aislada está sustancialmente libre de material celular u otras proteínas de la fuente celular o tisular de la que deriva. Las preparaciones que comprenden proteínas aisladas son lo suficientemente puras para ser administradas como una composición terapéutica, o tienen una pureza de al menos 70 % a 80 % (p/p), más preferiblemente de al menos 80 % a 90 % (p/p), incluso más preferiblemente de 90 a 95 %; y, lo más preferiblemente, de al menos 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 %, 99,8 % o 100 % (p/p).

Como se usa en el presente documento, el término "aproximadamente" se refiere a hasta +/- 10 % del valor calificado por este término. Por ejemplo, aproximadamente 50 mM se refiere a 50 mM +/- 5 mM; aproximadamente el 4 % se refiere al 4 % +/- 0,4 %.

Las frases "administración parenteral", "administrado por vía parenteral" y "administrar por vía parenteral" como se usan en el presente documento se refieren a modos de administración distintos a la administración enteral y tópica,

5 generalmente mediante inyección, e incluyen, sin limitaciones, inyección e
infusión intravenosa (IV), intramuscular, intraarterial, intratecal, intracapsular,
intraorbital, intracardiaca, intradérmica, intraperitoneal, transtraqueal, subcutánea
(SC), subcuticular, intraarticular, subcapsular, subaracnoidea, intraespinal,
epidural e intraesternal.

10 Las expresiones "dosis terapéuticamente eficaz" y "cantidad
terapéuticamente eficaz" se refieren a la cantidad de un compuesto que da como
resultado la prevención de los síntomas, por ejemplo, prevención del 80 %, 85 %,
90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de los síntomas, por ejemplo, los síntomas
15 de la enfermedad de Gaucher en un sujeto diagnosticado con enfermedad de
Gaucher), retraso en la aparición de los síntomas o mejoría de los síntomas de la
enfermedad de Gaucher. Una cantidad terapéuticamente eficaz será, por ejemplo,
suficiente para tratar, prevenir, reducir la gravedad, retrasar la aparición y/o
reducir el riesgo de aparición de uno o más síntomas de un trastorno asociado
20 con la enfermedad de Gaucher. La cantidad eficaz puede determinarse por
métodos bien conocidos en la técnica y como se describe en secciones
posteriores de esta descripción.

25 Los términos "tratamiento" y "método terapéutico" se refieren al tratamiento
de un trastorno existente y/o medidas profilácticas/preventivas. Aquellos que
necesitan tratamiento pueden incluir personas que ya tienen un trastorno médico
en particular, así como aquellos que corren el riesgo de padecerlo, o quienes
finalmente pueden adquirir el trastorno. La necesidad de tratamiento se evalúa,
por ejemplo, mediante la presencia de uno o más factores de riesgo asociados
con el desarrollo de un trastorno, la presencia o progresión de un trastorno, o la
probable receptividad al tratamiento de un sujeto que tiene el trastorno. El
tratamiento puede incluir ralentizar o revertir la progresión de un trastorno.

30 El término "tratar" se refiere a administrar una terapia en una cantidad,
manera y/o modo eficaz para mejorar o prevenir una afección, síntoma o
parámetro asociado con un trastorno (por ejemplo, un trastorno descrito en el
presente documento) o para prevenir la aparición, la progresión o exacerbación
del trastorno, ya sea en un grado estadísticamente significativo o en un grado
detectable para un experto en la técnica. Por consiguiente, el tratamiento puede
lograr beneficios terapéuticos y/o profilácticos. Una cantidad, manera o modo
eficaz puede variar según el sujeto y puede adaptarse al sujeto. En ciertas
35 realizaciones, el tratamiento de un trastorno relacionado con una disfunción en
una ruta de la GCasa (por ejemplo, la enfermedad de Gaucher), es un tratamiento
que da como resultado uno o más de un aumento en la concentración de

hemoglobina, un aumento en el nivel de plaquetas, una disminución en el volumen del hígado, una disminución en el volumen del bazo, o un cambio en un parámetro esquelético (por ejemplo, un aumento en la densidad mineral ósea), por ejemplo, en un sujeto que no ha sido tratado por la disfunción en una ruta de la GCasa. En ciertas realizaciones, el tratamiento de un trastorno relacionado con una disfunción en una ruta de la GCasa (por ejemplo, la enfermedad de Gaucher), es un tratamiento que da como resultado uno o más de un aumento en la concentración de hemoglobina, un aumento en el nivel de plaquetas, una disminución en el volumen del hígado, una disminución en el volumen del bazo o un cambio en un parámetro esquelético (por ejemplo, un aumento en la densidad mineral ósea), o el mantenimiento de uno o más de estos parámetros, por ejemplo, en un sujeto que ha sido tratado por la disfunción en una ruta de la GCasa.

El término "combinación" se refiere al uso de los dos o más agentes o terapias para tratar al mismo paciente, donde el uso o la acción de los agentes o terapias se superponen en el tiempo. Los agentes o terapias pueden administrarse al mismo tiempo (por ejemplo, como una formulación única que se administra a un paciente o como dos formulaciones separadas administradas simultáneamente) o secuencialmente en cualquier orden.

Los términos "liberación sostenida", "administración de liberación sostenida" y "administración de fármaco de liberación sostenida" como se usan en el presente documento significan que una única administración de fármaco mantiene la concentración eficaz del fármaco en la sangre durante un largo período, por ejemplo, 12 horas o más. Por ejemplo, la vía de administración general de los polipéptidos es la inyección subcutánea, intramuscular o intravenosa (IV).

El término "sales" abarca sales de adición de ácidos libres o bases libres. La expresión "sal farmacéuticamente aceptable" se refiere a sales que poseen perfiles de toxicidad dentro de un intervalo que ofrece utilidad en aplicaciones farmacéuticas. Las sales que no son sales farmacéuticamente aceptables aún pueden ser útiles en la síntesis, purificación o formulación debido a propiedades tales como alta cristalinidad.

El término "unidad" con respecto a GCB, velaglucerasa o velaglucerasa alfa se refiere a la cantidad de estos que se requiere para convertir un micromol de p-nitrofenil beta-D-glucopiranosido en p-nitrofenol, o 4-metilumbelliferona beta-D-glucopiranosido en 4-metilumbelliferona, por minuto a 37 °C.

Glucocerebrosidasa

La velaglucerasa es una β -glucocerebrosidasa humana producida por la

activación del gen en una línea celular humana, tal como mediante recombinación dirigida con un promotor que activa el gen de la β -glucocerebrosidasa endógena en la línea celular humana seleccionada. La velaglucerasa se secreta como una glucoproteína monomérica de aproximadamente 63 kDa. La velaglucerasa está
5 compuesta por 497 aminoácidos con una secuencia idéntica a la proteína humana natural. Véase Zimran et al., Blood Cells Mol Dis, 2007, 39: 115-118.

La glucosilación de la velaglucerasa alfa se puede alterar mediante el uso de kifunensina, un inhibidor de la manosidasa I, durante el cultivo celular para producir una proteína secretada que contiene principalmente glicanos de tipo alto
10 en manosa con 6-9 unidades de manosa por glucano, como se describe con más detalle en el documento WO 2013/130963.

La imiglucerasa (Cerezyme®) es otra forma de β -glucocerebrosidasa humana recombinante. La imiglucerasa se produce de forma recombinante en células de ovario de hámster chino (CHO).

15 La taliglucerasa alfa (Elelyso® o Uplyso®) es una glucocerebrosidasa recombinante (prGCB) expresada en células vegetales. La glucocerebrosidasa recombinante vegetal se puede obtener por los métodos descritos al menos en las publicaciones de patente de Estados Unidos n.º 2009/0208477 y 2008/0038232 y en las publicaciones de PCT números WO 2004/096978 y WO 2008/132743.

20 Cualquiera de las GCB recombinantes se puede producir utilizando biorreactores y métodos de síntesis a escala de producción conocidos en la técnica. Se puede usar cualquier número de sistemas de purificación a escala de producción.

Isofagomina

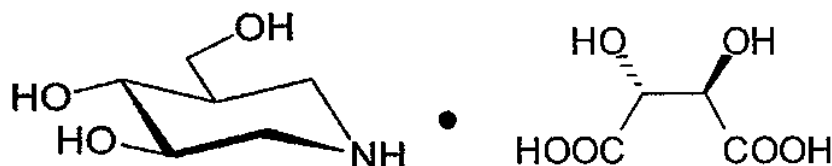
25 Se pueden usar varias formas alternativas de isofagomina. Estas incluyen cualquiera de tartrato de isofagomina, isofagomina HCl, base libre de isofagomina y citrato de isofagomina. En algunas realizaciones, la isofagomina comprende uno o más de isofagomina HCl, base libre de isofagomina y citrato de isofagomina. En algunas realizaciones, la isofagomina comprende tartrato de isofagomina.

30 El isofagomina HCl se describe en las patentes de Estados Unidos n.º 5.844.102 y 7.501.439. El isofagomina HCl es un sólido de color amarillo con un bajo punto de fusión. La base libre de isofagomina se puede preparar convirtiendo el clorhidrato de isofagomina a la forma de base libre.

En cualquiera de los aspectos y realizaciones descritos en el presente
35 documento, la isofagomina puede no estar en forma de tartrato de isofagomina o la composición de GCB/IFG puede no comprender tartrato de isofagomina.

Tartrato de isofagomina

El tartrato de isofagomina (IFGT) es una forma específica de isofagomina (IFG) que se puede usar en las diversas realizaciones desveladas en el presente documento y es especialmente adecuado para la práctica de la invención. El IFGT tiene la siguiente fórmula:



5

IFGT tiene características mejoradas en comparación con IFG, que incluyen una capacidad de fabricación sintética mejorada. Por ejemplo, fue más fácil purificar IFGT en disolventes tales como agua y etanol. IFGT tiene mayor estabilidad que otras formas de sal de isofagomina conocidas. IFGT también es particularmente adecuado para la producción a escala industrial, por ejemplo, la producción de más de 1 kg de producto.

Una composición que comprende GCB e IFG en ocasiones se denomina a lo largo de la presente solicitud composición de GCB/IFG. Una composición que comprende GCB e IFGT en ocasiones se denomina a lo largo de la presente solicitud composición de GCB/IFGT.

15

Relaciones molares de GCB a IFG/IFGT

En diversas realizaciones, la composición comprende una glucocerebrosidasa (GCB) y una isofagomina (IFG), por ejemplo, tartrato de isofagomina (IFGT), en una relación molar de al menos aproximadamente 1:1, 1:1,5, 1:2, o 1:2,5 (GCB:IFG). La relación molar de GCB a IFG, por ejemplo, de GCB a IFGT, puede ser 1:1, 1:1,5, 1:2, 1:2,5, 1:2,6, 1:2,7, 1:2,8, 1:2,9, 1:3,0, 1:3,1, 1:3,2, 1:3,3, 1:3,4, 1:3,5, 1:3,6, 1:3,7, 1:3,8, 1:3,9, 1:4,0, 1:4,1, 1:4,2, 1:4,3, 1:4,4, 1:4,5, 1:4,6, 1:4,7, 1:4,8, 1:4,9, 1:5,0, 1:5,1, 1:5,2, 1:5,3, 1:5,4, 1:5,5, 1:5,6, 1:5,7, 1:5,8, 1:5,9, 1:6,0, 1:6,1, 1:6,2, 1:6,3, 1:6,4, 1:6,5, 1:6,6, 1:6,7, 1:6,8, 1:6,9, 1:7,0, 1:7,1, 1:7,2, 1:7,3, 1:7,4, 1:7,5, 1:7,6, 1:7,7, 1:7,8, 1:7,9, 1:8,0, 1:8,1, 1:8,2, 1:8,3, 1:8,4, 1:8,5, 1:8,6, 1:8,7, 1:8,8, 1:8,9, 1:9,0, 1:9,1, 1:9,2, 1:9,3, 1:9,4, 1:9,5, 1:9,6, 1:9,7, 1:9,8, 1:9,9, 1:10,0, 1:10,1, 1:10,2, 1:10,3, 1:10,4, 1:10,5, 1:10,6, 1:10,7, 1:10,8, 1:10,9, 1:11,0, 1:11,1, 1:11,2, 1:11,3, 1:11,4, 1:11,5, 1:11,6, 1:11,7, 1:11,8, 1:11,9, 1:12,0, 1:12,1, 1:12,2, 1:12,3, 1:12,4, 1:12,5, 1:12,6, 1:12,7, 1:12,8, 1:12,9, 1:13,0, 1:13,1, 1:13,2, 1:13,3, 1:13,4, 1:13,5, 1:13,6, 1:13,7, 1:13,8, 1:13,9, 1:14,0, 1:14,1, 1:14,2, 1:14,3, 1:14,4, 1:14,5, 1:14,6, 1:14,7, 1:14,8, 1:14,9, 1:15,0, 1:15,1, 1:15,2, 1:15,3, 1:15,4, 1:15,5, 1:15,6, 1:15,7, 1:15,8, 1:15,9, 1:16,0, 1:16,1, 1:16,2, 1:16,3, 1:16,4, 1:16,5, 1:16,6, 1:16,7, 1:16,8, 1:16,9, 1:17,0, 1:17,1, 1:17,2, 1:17,3, 1:17,4, 1:17,5, 1:17,6, 1:17,7, 1:17,8, 1:17,9, 1:18,0, 1:18,1, 1:18,2, 1:18,3,

30

1:18,4, 1:18,5, 1:18,6, 1:18,7, 1:18,8, 1:18,9, 1:19,0, 1:19,1, 1:19,2, 1:19,3, 1:19,4,
1:19,5, 1:19,6, 1:19,7, 1:19,8, 1:19,9, 1:20,0, 1:20,1, 1:20,2, 1:20,3, 1:20,4, 1:20,5,
1:20,6, 1:20,7, 1:20,8, 1:20,9, 1:21,0, 1:21,1, 1:21,2, 1:21,3, 1:21,4, 1:21,5, 1:21,6,
1:21,7, 1:21,8, 1:21,9, 1:22,0, 1:22,1, 1:22,2, 1:22,3, 1:22,4, 1:22,5, 1:22,6, 1:22,7,
5 1:22,8, 1:22,9, 1:23,0, 1:23,1, 1:23,2, 1:23,3, 1:23,4, 1:23,5, 1:23,6, 1:23,7, 1:23,8,
1:23,9, 1:23,9, 1:24,0, 1:24,1, 1:24,2, 1:24,3, 1:24,4, 1:24,5, 1:24,6, 1:24,7, 1:24,8,
1:24,9, 1:25,0, 1:25,1, 1:25,2, 1:25,3, 1:25,4, 1:25,5, 1:25,6, 1:25,7, 1:25,8, 1:25,9,
1:26,0, 1:26,1, 1:26,2, 1:26,3, 1:26,4, 1:26,5, 1:26,6, 1:26,7, 1:26,8, 1:26,9, 1:27,0,
1:27,1, 1:27,2, 1:27,3, 1:27,4, 1:27,5, 1:27,6, 1:27,7, 1:27,8, 1:27,9, 1:28,0, 1:28,1,
10 1:28,2, 1:28,3, 1:28,4, 1:28,5, 1:28,6, 1:28,7, 1:28,8, 1:28,9, 1:29,0, 1:29,1, 1:29,2,
1:29,3, 1:29,4, 1:29,5, 1:29,6, 1:29,7, 1:29,8, 1:29,9 o 1:30,0.

La relación molar de GCB a IFG, por ejemplo, GCB a IFGT, puede ser de
1:2,5 a 1:3,5, de 1:2,6 a 1:3,4, de 1:2,7 a 1:3,5, de 1:2,7 a 1:3,4, de 1:2,5 a 1:3,3,
de 1:2,8 a 1:3,5, de 1:2,8 a 1:3,3, de 1:2,7 a 1:3,2, de 1:2,6 a 1:3,1, de 1:2,5 a
15 1:3,0, de 1:2,9 a 1:3,3, de 1:2,8 a 1:3,2, de 1:2,7 a 1:3,1, de 1:2,6 a 1:3,0, de 1:2,5
a 1:2,9, de 1:3,0 a 1:3,4, o de 1:3,1 a 1:3,5,

La relación molar de GCB a IFG, por ejemplo, DE GCB a IFGT, puede ser de
1:7 a 1:33, de 1:8 a 1:32, de 1:9 a 1:33, de 1:7 a 1:31, de 1:9 a 1:31, de 1:8 a
1:30, de 1:7 a 1:29, de 1:10 a 1:32, de 1:11 a 1:33, de 1:7 a 1:29, de 1:10 a 1:30,
20 de 1:9 a 1:29, de 1:8 a 1:28, de 1:7 a 1:27, de 1:11 a 1:31, de 1:12 a 1:32, de 1:13
a 1:33, de 1:11 a 1:29, de 1:10 a 1:28, de 1:9 a 1:27, de 1:8 a 1:26, de 1:7 a 1:25,
de 1:12 a 1:30, de 1:13 a 1:31, de 1:14 a 1:32, de 1:15 a 1:33, de 1:13 a 1:29, de
1:12 a 1:28, de 1:11 a 1:27, de 1:10 a 1:26, de 1:9 a 1:25, de 1:8 a 1:24, de 1:7 a
1:23, de 1:14 a 1:30, de 1:15 a 1:31, de 1:16 a 1:32, de 1:17 a 1:33, de 1:14 a
25 1:28, de 1:13 a 1:27, de 1:12 a 1:26, de 1:11 a 1:25, de 1:10 a 1:24, de 1:9 a 1:23,
de 1:8 a 1:22, de 1:7 a 1:21, de 1:15 a 1:29, de 1:16 a 1:30, de 1:17 a 1:31, de
1:18 a 1:32, de 1:19 a 1:33, de 1:15 a 1:27, de 1:14 a 1:26, de 1:13 a 1:25, de
1:12 a 1:24, de 1:11 a 1:23, de 1:10 a 1:22, de 1:9 a 1:21, de 1:8 a 1:20, de 1:7 a
1:19, de 1:16 a 1:28, de 1:17 a 1:29, de 1:18 a 1:30, de 1:19 a 1:31, de 1:20 a
30 1:32 o de 1:21 a 1:33.

La relación molar de GCB a IFG, por ejemplo, GCB a IFGT, puede ser de
1:16 a 1:26, de 1:15 a 1:25, de 1:14 a 1:24, de 1:13 a 1:23, de 1:12 a 1:22, de
1:11 a 1:31, de 1:10 a 1:30, de 1:9 a 1:29, de 1:8 a 1:28, de 1:7 a 1:27, de 1:17 a
1:27, de 1:18 a 1:28, de 1:19 a 1:29, de 1:20 a 1:30, de 1:21 a 1:31, de 1:22 a
35 1:32, de 1:23 a 1:33, de 1:17 a 1:25, de 1:14 a 1:24, de 1:13 a 1:23, de 1:12 a
1:22, de 1:11 a 1:21, de 1:10 a 1:20, de 1:9 a 1:19, de 1:18 a 1:26, de 1:19 a 1:27,
de 1:20 a 1:28, de 1:21 a 1:29, de 1:22 a 1:30, de 1:23 a 1:31, de 1:18 a 1:24, de

1:17 a 1:23, de 1:16 a 1:22, de 1:15 a 1:21, de 1:14 a 1:20, de 1:13 a 1:19, de 1:12 a 1:18, de 1:11 a 1:17, de 1:19 a 1:25, de 1:20 a 1:26, de 1:21 a 1:27, de 1:22 a 1:28, de 1:23 a 1:29, de 1:24 a 1:30, de 1:19 a 1:23, de 1:17 a 1:21, de 1:15 a 1:19, de 1:13 a 1:17, de 1:11 a 1:15, de 1:9 a 1:13, de 1:7 a 1:11, de 1:21 a 1:25, de 1:23 a 1:27, de 1:25 a 1:29, de 1:27 a 1:31, de 1:29 a 1:33, de 1:20 a 1:23, de 1:18 a 1:21, de 1:16 a 1:19, de 1:14 a 1:17, de 1:12 a 1:15, de 1:10 a 1:13, de 1:8 a 1:11, de 1:22 a 1:25, de 1:24 a 1:27, de 1:26 a 1:29, de 1:28 a 1:31 o de 1:30 a 1:33.

La relación molar de GCB a IFG, por ejemplo, GCB a IFGT, puede ser de 1:31, 1:32, 1:33, 1:34, 1:35, 1:36, 1:37, 1:38, 1:39, 1:40, 1:41, 1:42, 1:43, 1:44, 1:45, 1:46, 1:47, 1:48, 1:49, 1:50, 1:51, 1:52, 1:53, 1:54, 1:55, 1:56, 1:57, 1:58, 1:35, 1:59, 1:60, 1:61, 1:62, 1:63, 1:64, 1:65, 1:66, 1:67, 1:68, 1:69, 1:70, 1:71, 1:72, 1:73, 1:74, 1:75, 1:76, 1:77, 1:78, 1:79, 1:80, 1:81, 1:82, 1:83, 1:84, 1:85, 1:86, 1:87, 1:88, 1:89, 1:90, 1:91, 1:92, 1:93, 1:94, 1:95, 1:96, 1:97, 1:98, 1:99 o 1:100.

La relación molar de GCB a IFG, por ejemplo, GCB a IFGT, puede ser de 1:30 a 1:100, de 1:30 a 1:80, de 1:40 a 1:90, de 1:50 a 1:100, de 1:30 a 1:60, de 1:40 a 1:70, de 1:50 a 1:80, de 1:60 a 1:90, de 1:70 a 1:100, de 1:30 a 1:50, de 1:40 a 1:60, de 1:50 a 1:70, de 1:60 a 1:80, de 1:70 a 1:90, de 1:80 a 1:100, de 1:30 a 1:40, de 1:40 a 1:50, de 1:50 a 1:60, de 1:60 a 1:70, de 1:70 a 1:80, de 1:80 a 1:90 o de 1:90 a 1:100.

En otras varias realizaciones descritas en el presente documento, la composición comprende una glucocerebrosidasa (GCB) y un tartrato de isofagomina (IFGT) en una relación molar de al menos aproximadamente 1:2,5.

En otras varias realizaciones descritas en el presente documento, la composición comprende una glucocerebrosidasa (GCB) y un citrato de isofagomina (IFGT) en una relación molar de al menos aproximadamente 1:2,5.

En otras varias realizaciones descritas en el presente documento, la composición comprende una glucocerebrosidasa (GCB) y un isofagomina HCl en una relación molar de al menos aproximadamente 1:2,5.

En otras varias realizaciones descritas en el presente documento, la composición comprende una glucocerebrosidasa (GCB) y una base libre de isofagomina en una relación molar de al menos aproximadamente 1:2,5.

En otras varias realizaciones descritas en el presente documento, la composición comprende una glucocerebrosidasa (GCB) y una isofagomina que no comprende IFGT en una relación molar de al menos aproximadamente 1:2,5.

Concentración de GCB

La concentración de GCB en cualquiera de las composiciones puede ser de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 40 mg/ml, de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 10 mg/ml, de aproximadamente 5 a aproximadamente 15 mg/ml, de aproximadamente 10 a aproximadamente 20 mg/ml de aproximadamente 15 a aproximadamente 25 mg/ml, de aproximadamente 20 a aproximadamente 30 mg/ml, de aproximadamente 25 a aproximadamente 35 mg/ml, de aproximadamente 30 a aproximadamente 40 mg/ml, de aproximadamente 2 a aproximadamente 8 mg/ml de aproximadamente 5 a aproximadamente 11 mg/ml, de aproximadamente 8 a aproximadamente 14 mg/ml, de aproximadamente 11 a aproximadamente 17 mg/ml, de aproximadamente 14 a aproximadamente 20 mg/ml, de aproximadamente 17 a aproximadamente 23 mg/ml de aproximadamente 20 a aproximadamente 26 mg/ml, de aproximadamente 23 a aproximadamente 29 mg/ml, de aproximadamente 26 a aproximadamente 32 mg/ml, de aproximadamente 29 a aproximadamente 35 mg/ml, de aproximadamente 32 a aproximadamente 38 mg/ml de aproximadamente 2 a aproximadamente 5 mg/ml, de aproximadamente 5 a aproximadamente 8 mg/ml, de aproximadamente 8 a aproximadamente 11 mg/ml, de aproximadamente 11 a aproximadamente 14 mg/ml, de aproximadamente 14 a aproximadamente 17 mg/ml De aproximadamente 17 a aproximadamente 20 mg/ml, de aproximadamente 20 a aproximadamente 23 mg/ml, de aproximadamente 23 a aproximadamente 26 mg/ml, de aproximadamente 26 a aproximadamente 29 mg/ml, de aproximadamente 29 a aproximadamente 32 mg/ml, de aproximadamente 32 a aproximadamente 35 mg/ml, de aproximadamente 35 a aproximadamente 38 mg/ml, aproximadamente 0,5 mg/ml, aproximadamente 1 mg/ml, aproximadamente 2 mg/ml, aproximadamente 3 mg/ml, aproximadamente 4 mg/ml, aproximadamente 5 mg/ml, aproximadamente 6 mg/ml, aproximadamente 7 mg/ml, aproximadamente 8 mg/ml, aproximadamente 9 mg/ml, aproximadamente 10 mg/ml, aproximadamente 11 mg/ml, aproximadamente 12 mg/ml, aproximadamente 13 mg/ml, aproximadamente 14 mg/ml, aproximadamente 15 mg/ml, aproximadamente 16 mg/ml, aproximadamente 17 mg/ml, aproximadamente 18 mg/ml, aproximadamente 19 mg/ml, aproximadamente 20 mg/ml, aproximadamente 21 mg/ml, aproximadamente 22 mg/ml, aproximadamente 23 mg/ml, aproximadamente 24 mg/ml, aproximadamente 25 mg/ml, aproximadamente 26 mg/ml, aproximadamente 27 mg/ml, aproximadamente 28 mg/ml, aproximadamente 29 mg/ml, aproximadamente 30 mg/ml, aproximadamente 31 mg/ml, aproximadamente 32 mg/ml, aproximadamente 33

mg/ml, aproximadamente 34 mg/ml, aproximadamente 35 mg/ml, aproximadamente 36 mg/ml, aproximadamente 37 mg/ml, aproximadamente 38 mg/ml, aproximadamente 39 mg/ml o aproximadamente 40 mg/ml.

- La concentración de GCB puede ser de 50 unidades/ml a 200 unidades/ml,
- 5 70 unidades/ml a 160 unidades/ml, 80 unidades/ml a 175 unidades/ml, 90 unidades/ml a 190 unidades/ml, 60 unidades/ml a 145 unidades/ml, 50 unidades/ml a 130 unidades/ml, 80 unidades/ml a 140 unidades/ml, 70 unidades/ml a 120 unidades/ml, 60 unidades/ml a 100 unidades/ml, 50 unidades/ml a 85 unidades/ml, 90 unidades/ml a 160 unidades/ml, 100 unidades/ml a 180 unidades/ml, 120 unidades/ml a 200 unidades/ml, 90 unidades/ml a 125 unidades/ml, 80 unidades/ml a 105 unidades/ml, 70 unidades/ml a 100 unidades/ml, 60 unidades/ml a 90 unidades/ml, 50 unidades/ml a 80 unidades/ml, 100 unidades/ml a 140 unidades/ml, 115 unidades/ml a 160 unidades/ml, 130 unidades/ml a 180 unidades/ml, 145 unidades/ml a 200 unidades/ml, 100 unidades/ml a 115 unidades/ml, 90 unidades/ml a 105 unidades/ml, 80 unidades/ml a 95 unidades/ml, 70 unidades/ml a 85 unidades/ml, 60 unidades/ml a 75 unidades/ml, 50 unidades/ml a 65 unidades/ml, 110 unidades/ml a 125 unidades/ml, 120 unidades/ml a 135 unidades/ml, 130 unidades/ml a 145 unidades/ml, 140 unidades/ml a 160 unidades/ml, 160 unidades/ml a 180 unidades/ml, 1 80 unidades/ml a 200 unidades/ml, aproximadamente 50 unidades/ml, aproximadamente 60 unidades/ml, aproximadamente 70 unidades/ml, aproximadamente 80 unidades/ml, aproximadamente 90 unidades/ml, aproximadamente 100 unidades/ml, aproximadamente 110 unidades/ml, aproximadamente 120 unidades/ml,
- 25 aproximadamente 130 unidades/ml, aproximadamente 140 unidades/ml, aproximadamente 150 unidades/ml, aproximadamente 160 unidades/ml, aproximadamente 170 unidades/ml, aproximadamente 180 unidades/ml, aproximadamente 190 unidades/ml, aproximadamente 200 unidades/ml, 50 unidades/ml, 60 unidades/ml, 70 unidades/ml, 80 unidades/ml, 90 unidades/ml,
- 30 100 unidades/ml, 110 unidades/ml, 120 unidades/ml, 130 unidades/ml, 140 unidades/ml, 150 unidades/ml, 160 unidades/ml, 170 unidades/ml, 180 unidades/ml, 190 unidades/ml o 200 unidades/ml.

Composiciones Farmacéuticas

- Una composición farmacéutica puede incluir una "cantidad terapéuticamente eficaz" de una composición de GCB/IFG, por ejemplo, de GCB/IFGT, descrita en el presente documento. Dichas cantidades eficaces pueden determinarse basándose en el efecto de la composición administrada. Una cantidad

- terapéuticamente eficaz de una composición de GCB/IFG, por ejemplo, GCB/IFGT, también puede variar según factores tales como el estado de la enfermedad, la edad, el sexo y el peso del individuo, y la capacidad de la composición para provocar una respuesta deseada en el individuo, por ejemplo, la
- 5 mejora de al menos un síntoma de una afección o trastorno, por ejemplo, una deficiencia de glucocerebrosidasa, por ejemplo, la enfermedad de Gaucher. Una cantidad terapéuticamente eficaz es también una donde cualquier efecto tóxico o perjudicial de la composición se ve compensado por los efectos terapéuticamente beneficiosos.
- 10 La composición de GCB/IFG puede estar libre de IFGT.
- Una composición farmacéutica de la invención se puede formular para que sea compatible con su vía de administración prevista. Por ejemplo, una composición de GCB/IFG, por ejemplo, GCB/IFGT, puede administrarse mediante un modo parenteral, por ejemplo, inyección intravenosa, subcutánea,
- 15 intraperitoneal o intramuscular. En diversas realizaciones, la vía de administración es intravenosa. En diversas realizaciones, la vía de administración es subcutánea. Las soluciones o suspensiones utilizadas para la aplicación parenteral pueden incluir los siguientes componentes: un diluyente estéril, tal como agua para inyección, solución salina, aceites fijos, polietilenglicoles, glicerina, propilenglicol u
- 20 otros disolventes sintéticos; agentes antibacterianos tales como alcohol bencílico o metilparabenos; antioxidantes tales como ácido ascórbico o bisulfito de sodio; agentes quelantes tales como ácido etilendiaminotetraacético; tampones tales como acetatos, citratos o fosfatos y agentes para el ajuste de la tonicidad, tal como cloruro de sodio o dextrosa. El pH de las composiciones farmacéuticas se
- 25 puede ajustar con ácidos o bases, tales como ácido clorhídrico o hidróxido de sodio. La preparación parenteral se puede introducir en ampollas, jeringuillas desechables o viales multidosis de vidrio o de plástico.

pH

- El pH puede influir en la estabilidad de la GCB en las diversas
- 30 composiciones de GCB/IFG y GCB/IFGT descritas en el presente documento. El pH puede afectar a la conformación y/o la agregación y/o la degradación y/o la reactividad de la GCB. Por ejemplo, a un pH más alto, el oxígeno puede ser más reactivo. El pH es, preferiblemente, inferior a 7,0, más preferiblemente en el intervalo de aproximadamente 4,5 a aproximadamente 6,5, más preferiblemente
- 35 de aproximadamente 5,0 a aproximadamente 6,0, y más preferiblemente de aproximadamente 5,5 a aproximadamente 5,8, más preferiblemente de aproximadamente 5,7. Con la GCB, la agregación puede alcanzar niveles

indeseables a un pH superior a 7,0 y la degradación (por ejemplo, la fragmentación) puede alcanzar niveles indeseables a un pH inferior a 4,5 o 5,0, o a un pH superior a 6,5 o 7,0.

Se puede analizar un pH candidato proporcionando una composición de prueba de GCB/IFG, por ejemplo, de GCB/IFGT, ajustando la composición a un pH candidato y purgando la composición de oxígeno. La estabilidad de la GCB en la composición al pH candidato puede medirse, por ejemplo, como un porcentaje de agregación o degradación, en un momento predeterminado. La estabilidad medida puede compararse con uno o más patrones. Por ejemplo, un patrón adecuado sería una composición similar a la de las composiciones de prueba, excepto que el pH de la composición no está ajustado. Las estabilidades de las composiciones de pH ajustado y de pH no ajustado pueden compararse. Una composición de GCB/IFG, por ejemplo, de GCB/IFGT, puede ser más adecuada si la GCB es más estable que la de una composición patrón comparativa. La idoneidad se puede demostrar mediante el tratamiento de prueba que aumenta la estabilidad en comparación con este patrón. Por ejemplo, si la composición patrón de GCB/IFG comparativa tiene un pH de 5,5, pero se observa una mayor estabilidad de GCB cuando la composición de GCB/IFG tiene un pH de 6,3, entonces la composición a pH de 6,3 es más adecuada porque GCB es más estable a pH 6,3 que a pH 5,5.

Los tampones que se pueden usar para ajustar el pH de una composición proteica incluyen histidina, citrato, fosfato, glicina, succinato, acetato, glutamato, Tris, tartrato, aspartato, maleato y lactato.

Ensayos de estabilidad de GCB

La estabilidad de la proteína puede medirse midiendo la agregación de proteínas o la degradación de proteínas. La agregación de proteínas se puede determinar por varios métodos que incluyen, por ejemplo, cromatografía de exclusión por tamaño (SEC), PAGE no desnaturizante u otros métodos para determinar el tamaño, etc. La degradación de proteínas se puede determinar, por ejemplo, mediante HPLC de fase inversa, PAGE no desnaturizante, cromatografía de intercambio iónico, mapeo de péptidos o métodos similares.

La estabilidad, como se usa en el presente documento, incluye parámetros tales como la estructura de la proteína (por ejemplo, minimizar o prevenir cambios en la estructura de la proteína, por ejemplo, la agregación de proteínas o la degradación de proteínas (por ejemplo, fragmentación)) y/o una actividad biológica de la proteína, por ejemplo, la capacidad para convertir el sustrato en producto.

La estabilidad de la GCB se puede medir, por ejemplo, midiendo la agregación de proteínas, la degradación de proteínas o los niveles de una actividad biológica de GCB. La agregación de la GCB se puede determinar mediante varios métodos, incluyendo cromatografía de exclusión por tamaño, PAGE no desnaturalizante y otros métodos para determinar el tamaño. Por ejemplo, la composición puede tener menos de 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 o 50 % de aumento en la cantidad de agregación de proteínas GCB (por ejemplo, según lo medido por cromatografía de exclusión por tamaño) en comparación con la cantidad de agregación de proteínas que había en la composición antes del almacenamiento (por ejemplo, el almacenamiento a una temperatura de 2-8 °C durante un período de hasta 3, 6, 9, 12 o 24 meses (o más)).

La degradación de proteínas se puede determinar por varios métodos, incluyendo HPLC de fase inversa, PAGE no desnaturalizante, cromatografía de intercambio iónico, mapeo de péptidos o métodos similares. Como ejemplo, la composición puede tener menos de 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 o 50 % de aumento en la cantidad de degradación de GCB (por ejemplo, según lo medido por HPLC de fase inversa.) en comparación con la cantidad de degradación de GCB que había en la composición antes del almacenamiento (por ejemplo, el almacenamiento a una temperatura de 2-8 °C durante un período de hasta 3, 6, 9, 12 o 24 meses (o más)). La actividad biológica de GCB se puede medir, por ejemplo, mediante ensayos *in vitro* o *in vivo*, por ejemplo, ELISA (por ejemplo, para medir la unión o la actividad enzimática) y otros ensayos enzimáticos (por ejemplo, ensayos espectrofotométricos, fluorimétricos, calorimétricos, quimioluminiscentes, radiométricos, o cromatográficos), ensayos de quinasa, etc. Como ejemplo, la composición puede tener menos de 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 o 50 % de disminución en la actividad biológica de GCB (por ejemplo, actividad enzimática, por ejemplo, según lo medido mediante un ensayo *in vitro*) en comparación con la cantidad de actividad biológica que había en la composición antes del almacenamiento (por ejemplo, almacenamiento a una temperatura de 2-8 °C durante un período de hasta 3, 6, 9, 12 o 24 meses (o más)).

Antioxidantes y estabilizantes

Las composiciones de GCB/IFG y GCB/IFGT descritas en el presente documento pueden comprender además un antioxidante. Un antioxidante adecuado es cisteína. La cisteína puede estar presente desde 0,030 % a 0,100 %, 0,050 % a 0,080 %, 0,040 % a 0,070 %, 0,030 % a 0,060 %, 0,060 % a 0,090 %, 0,070 % a 0,100 %, 0,065 % a 0,080 %, 0,060 % a 0,075 %, 0,055 % a 0,070 %, 0,045 % a 0,060 %, 0,040 % a 0,055 %, 0,035 % a 0,050 %, 0,030 % a 0,045 %, 0,025 % a 0,040 %, 0,020 % a 0,035 %, 0,015 % a 0,030 %, 0,010 % a 0,025 %, 0,005 % a 0,015 %, 0,001 % a 0,005 % o 0,001 % a 0,005 %.

0,050 % a 0,065 %, 0,070 % a 0,085 %, 0,075 % a 0,090 %, aproximadamente 0,065 %, aproximadamente 0,070 %, aproximadamente 0,075 %, aproximadamente 0,080 %, 0,065 %, 0,070 %, 0,075 %, o 0,080 %. Sin desear quedar ligado a teoría alguna, la cisteína puede estabilizar aún más la GCB.

- 5 Las composiciones de GCB/IFG y GCB/IFGT descritas en el presente documento pueden comprender además un carbohidrato tal como sacarosa o trehalosa. Los carbohidratos, por ejemplo sacarosa o trehalosa, pueden estar presentes del 12 % al 19 %, del 13 % al 18 %, del 14 % al 17 %, del 12 % al 15 %, del 13 % al 16 %, del 15 % al 17 %, aproximadamente del 16 %, o 16 %. Sin
10 desear quedar ligado a teoría alguna, la sacarosa o la trehalosa pueden estabilizar aún más la GCB al disminuir la disponibilidad de los grupos tiol (-SH).

- Las composiciones de GCB/IFG y GCB/IFGT de la presente invención pueden comprender además un detergente. El detergente puede ser polisorbato 20 (que es especialmente adecuado para poner en práctica la invención) o
15 cualquier número de compuestos basados en poloxámeros.

- En ciertas realizaciones, la estabilidad de GCB es al menos un 5-80 % mayor (por ejemplo, al menos aproximadamente un 5 %, al menos aproximadamente un 10 %, al menos aproximadamente un 15 %, al menos aproximadamente un 20 %, al menos aproximadamente un 25 %, a al menos
20 aproximadamente el 30 %, al menos aproximadamente el 35 %, al menos aproximadamente el 40 %, al menos aproximadamente el 45 %, al menos aproximadamente el 50 %, al menos aproximadamente el 55 %, al menos aproximadamente el 60 %, al menos aproximadamente el 65 %, al menos aproximadamente 70 %, al menos aproximadamente 75 %, o al menos
25 aproximadamente 80 % mayor), en condiciones preseleccionadas, que la estabilidad de GCB en una composición que difiere en la falta de carbohidratos (sacarosa o trehalosa), el antioxidante, o tanto el hidrato de carbono como el antioxidante.

- Las composiciones de GCB/IFG y GCB/IFGT pueden purgarse de oxígeno
30 antes del almacenamiento en un recipiente. Además, el recipiente es idealmente hermético a los gases para evitar la entrada de oxígeno. La GCB en las composiciones descritas en el presente documento, por ejemplo, composiciones líquidas que contienen GCB, puede tener una estabilidad prolongada. Por ejemplo, en condiciones preseleccionadas, por ejemplo, al almacenar en un
35 recipiente hermético a los gases, a una temperatura de 2-8 °C durante un período de hasta 3, 6, 9, 12 o 24 meses (o en algunas realizaciones más largo), la GCB en la composición retendrá al menos 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 99, o

100 % de la estabilidad que tenía antes del almacenamiento.

Se puede probar una concentración de proteína adecuada proporcionando una composición que contenga 0,075 % de cisteína, 16 % de sacarosa, ajustando el pH a 5,7, ajustando la GCB a una concentración candidata y purgando la
5 composición de O₂. La estabilidad de GCB en la composición de GCB/IFG, por ejemplo, GCB/IFGT, a la concentración candidata, medida, por ejemplo, como porcentaje de agregación o degradación, a un tiempo predeterminado, se compara con uno o más patrones.. Se comparan las estabilidades de la GCB a cada concentración. La idoneidad puede mostrarse por la concentración
10 candidata que tiene efectos comparables o mejores sobre la estabilidad que una concentración descrita en el presente documento.

La estabilidad de GCB puede medirse por cualquiera de los métodos descritos a lo largo de la presente solicitud, por ejemplo, midiendo la agregación de proteínas o la degradación de proteínas. La agregación de proteínas se puede
15 determinar, por ejemplo, por cromatografía de exclusión por tamaño, PAGE no desnaturizante u otros métodos para determinar el tamaño, etc. La degradación de proteínas se puede determinar, por ejemplo, por HPLC de fase inversa, PAGE no desnaturizante, cromatografía de intercambio iónico, SEC, SEC HPLC, mapeo de péptidos o métodos similares.

20 **Tensioactivos**

Las composiciones de GCB/IFG y GCB/IFGT descritas en el presente documento pueden comprender además uno o más tensioactivos.. Sin desear quedar ligado a teoría alguna, los tensioactivos pueden aumentar la estabilidad de la proteína, por ejemplo, al proporcionar una interfaz aire/líquido que puede
25 reducir la degradación de la proteína durante la agitación o durante el envío. Se puede seleccionar un tensioactivo que aumente la estabilidad de la proteína, por ejemplo, al no causar degradación de proteínas, en una composición líquida particular. Un tensioactivo de ejemplo es poloxámero 188 o Pluronic F68. El tensioactivo puede estar presente en una cantidad entre aproximadamente 0,005
30 % y aproximadamente 5 %, por ejemplo, entre aproximadamente 0,01 % y aproximadamente 1 %, por ejemplo, aproximadamente 0,025 % y aproximadamente 0,5 %, por ejemplo, aproximadamente 0,03 % y aproximadamente 0,25 %, por ejemplo, de aproximadamente 0,04 a aproximadamente 0,1 %, por ejemplo, de aproximadamente 0,05 % a
35 aproximadamente 0,075 %, por ejemplo, 0,05 %. Un tensioactivo ideal es aquel que no está modificado ni escindido por GCB.

Por ejemplo, un tensioactivo candidato se puede probar proporcionando una

composición que contiene 2 mg/ml de GCB, una cantidad de IFG, cisteína al 0,075 %, sacarosa al 16 %, ajustando a continuación el pH a 5,7, añadiendo después el tensioactivo candidato y purgando la composición de O₂. La estabilidad de la composición de GCB/IFG que contiene el tensioactivo candidato se mide, por ejemplo, como un porcentaje de agregación o degradación, en un momento predeterminado en comparación con uno o más patrones. Por ejemplo, un patrón adecuado sería una composición similar a las condiciones de prueba, excepto que no se añade un tensioactivo a la composición. Las estabilidades de las composiciones tratadas (que contienen el tensioactivo) y no tratadas (que carecen de un tensioactivo) se pueden comparar en condiciones que simulen escenarios del "mundo real", por ejemplo, almacenamiento y envío. Un patrón puede ser una composición similar a la composición de prueba, excepto que se usa otro tensioactivo en lugar del poloxámero 188. Por tanto, el poloxámero 188 sería un patrón para la base de comparación. La idoneidad puede mostrarse por la concentración candidata que tiene efectos comparables o mejores sobre la estabilidad que un tensioactivo descrito en el presente documento. Si se determina que el tensioactivo candidato es adecuado (por ejemplo, aumenta la estabilidad de la composición en comparación con uno de los estándares), la concentración del tensioactivo candidato se puede refinar. Por ejemplo, la concentración puede aumentarse o disminuirse en un intervalo de valores y compararse con el patrón y con las otras concentraciones que se están probando para determinar qué concentración causa el mayor aumento en la estabilidad.

Como alternativa, se usa una combinación de dos o más tensioactivos en las composiciones descritas en el presente documento. La idoneidad de la combinación se puede probar como se ha descrito anteriormente comparando la estabilidad de una composición de GCB/IFG con la combinación de prueba de tensioactivos con la estabilidad de una composición de GCB/IFG con poloxámero 188.

La estabilidad de la proteína se puede medir, por ejemplo, midiendo la agregación de proteínas o la degradación de proteínas. La agregación de proteínas se puede determinar, por ejemplo, mediante cromatografía de exclusión por tamaño, PAGE no desnaturizante u otros métodos para determinar el tamaño, etc. La degradación de proteínas se puede determinar, por ejemplo, por HPLC de fase inversa, PAGE no desnaturizante, cromatografía de intercambio iónico, mapeo de péptidos, o métodos similares.

Sal farmacéuticamente aceptable

La composición farmacéutica puede comprender además una sal o una sal

farmacéuticamente aceptable.

Las sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables adecuadas pueden prepararse a partir de un ácido inorgánico o a partir de un ácido orgánico. Los ejemplos de ácidos inorgánicos incluyen los ácidos clorhídrico, bromhídrico, yodhídrico, nítrico, carbónico, sulfúrico y fosfórico. Los ácidos orgánicos apropiados pueden seleccionarse de clases de ácidos orgánicos alifáticos, cicloalifáticos, aromáticos, aralifáticos, heterocíclicos, carboxílicos y sulfónicos, cuyos ejemplos incluyen ácido fórmico, acético, propiónico, succínico, glicólico, glucónico, láctico, málico, tartárico, cítrico, ascórbico glucurónico, maleico, fumárico, pirúvico, aspártico, glutámico, benzoico, antranílico, 4-hidroxibenzoico, fenilacético, mandélico, embónico (pamoico), metanosulfónico, etanosulfónico, bencenosulfónico, pantoténico, trifluorometanosulfónico, 2-hidroxietanosulfónico, p-toluenosulfónico, sulfanílico, ciclohexilaminosulfónico, esteárico, algínico, beta-hidroxibutírico, salicílico, galactárico, oxálico, malónico y galacturónico. Los ejemplos de sales de adición de ácido farmacéuticamente inaceptables incluyen, por ejemplo, percloratos y tetrafluoroboratos. Todas estas sales de adición de ácido pueden prepararse a partir de isofagomina o GCB haciendo reaccionar, por ejemplo, el ácido apropiado con el compuesto.

Las sales de adición de base farmacéuticamente aceptables adecuadas de isofagomina incluyen, por ejemplo, sales metálicas, incluyendo sales de metales alcalinos, de metales alcalinotérreos y de metales de transición, tales como, por ejemplo, sales de calcio, magnesio, potasio, sodio y cinc. Las sales de adición de bases farmacéuticamente aceptables también incluyen sales orgánicas hechas de aminas básicas, tales como, por ejemplo, N, N'-dibenciletilendiamina, cloroprocaína, colina, dietanolamina, etilendiamina, meglumina (N-metilglucamina) y procaína. Los ejemplos de sales de adición de bases farmacéuticamente inaceptables incluyen sales de litio y sales de cianato. Todas estas sales de adición de bases pueden prepararse a partir de isofagomina haciendo reaccionar, por ejemplo, la base apropiada con el compuesto.

30 Vehículos farmacéuticos

Las composiciones farmacéuticas que contienen GCB pueden incluir uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables. Tal como se usa en el presente documento, el lenguaje "vehículo farmacéuticamente aceptable" pretende incluir todos y cada uno de los disolventes, excipientes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes retardadores isotónicos y de adsorción, y similares, compatibles con la administración farmacéutica. La formulación farmacéutica es una técnica bien establecida y se

describe adicionalmente, por ejemplo, en Gennaro (ed.), Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20ª ed., Lippincott, Williams & Wilkins (2000) (ISBN: 0683306472); Ansel et al., Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, 7ª edición, Lippincott Williams & Wilkins Publishers (1999) (ISBN: 0683305727); y Kibbe (ed.), Handbook of Pharmaceutical Excipients American Pharmaceutical Association, 3rd ed. (2000) (ISBN: 091733096X). Excepto en la medida en que cualquier medio o agente convencional sea incompatible con el compuesto activo, tales medios pueden usarse en las composiciones de la invención. También pueden incorporarse compuestos activos complementarios en las composiciones.

Las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento pueden incluir además vehículos que protegen el compuesto contra la eliminación rápida del cuerpo, tal como una formulación de liberación controlada, que incluye implantes y sistemas de administración microencapsulados. Se pueden usar polímeros biodegradables, biocompatibles, tales como acetato de etilvinilo, polianhidridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres y ácido poliláctico. Los métodos para la preparación de tales formulaciones serán evidentes para los expertos en la técnica. Las suspensiones liposomales (que incluyen liposomas dirigidos a células infectadas con anticuerpos monoclonales para antígenos virales) también pueden usarse como vehículos farmacéuticamente aceptables. Éstos se pueden preparar de acuerdo con procedimientos conocidos para el experto en la técnica, por ejemplo como se describe en la patente de EE.UU. n.º 4.522.811.

Para la administración IV, los vehículos adecuados incluyen solución salina fisiológica, agua bacteriostática, CREMOPHOR EL™ (BASF, Parsippany, N.J.) o solución salina tamponada con fosfato (PBS). En todos los casos, la composición debe ser estéril y debe ser fluida de modo que se pueda introducir con facilidad en las jeringuillas. La composición debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento y preservarse contra la acción contaminante de microorganismos tales como bacterias y hongos. El vehículo puede ser un disolvente o medio de dispersión que contenga, por ejemplo, agua, etanol, un poliol (por ejemplo glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido, y similares) y mezclas adecuadas de los mismos. La fluidez adecuada se puede mantener, por ejemplo, mediante el uso de materiales de recubrimiento, tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersiones y mediante el uso de tensioactivos. La prevención de la acción de los microorganismos se puede lograr mediante diversos agentes antibacterianos y

antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido ascórbico, timerosal y similares. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol, cloruro sódico en la composición. La estabilidad prolongada de las composiciones inyectables se
5 puede lograr incluyendo un agente que retrasa la adsorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio, seroalbúmina humana y gelatina.

Las soluciones inyectables estériles se pueden preparar incorporando GCB/IFG en un disolvente apropiado con uno o una combinación de los ingredientes enumerados anteriormente, según se requiera, seguido de
10 esterilización por filtro. En general, las dispersiones se preparan mediante la incorporación del compuesto activo en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos de los enumerados en lo que antecede. En el caso de polvos estériles para la composición de soluciones inyectables estériles, los métodos preferidos de composición son secado al vacío
15 y secado por congelación, por ejemplo, liofilización, que produce un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente adicional deseado de un filtro previamente esterilizado. solución de los mismos.

Los compuestos activos (por ejemplo, las composiciones de GCB descritas en el presente documento) se pueden preparar con vehículos que protegerán el
20 compuesto contra la eliminación rápida del cuerpo, como una formulación de liberación controlada, que incluye implantes y sistemas de administración microencapsulados. Se pueden usar polímeros biodegradables, biocompatibles, tales como acetato de etilenvinilo, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, polioctoésteres y ácido poliláctico. Los métodos para la preparación de tales
25 formulaciones serán evidentes para los expertos en la técnica. Los materiales también pueden obtenerse comercialmente de Alza Corporation y Nova Pharmaceuticals, Inc. Las suspensiones liposomales (que incluyen liposomas dirigidos a células infectadas con anticuerpos monoclonales contra antígenos virales) también pueden usarse como vehículos farmacéuticamente aceptables.
30 Éstos se pueden preparar de acuerdo con procedimientos conocidos para el experto en la técnica, por ejemplo como se describe en la patente de EE.UU. n.º 4.522.811.

Embalaje y liberación

Las composiciones de GCB/IFG y GCB/IFGT descritas en este documento
35 pueden administrarse con varios dispositivos médicos. Por ejemplo, una composición descrita en el presente documento puede administrarse con un dispositivo de inyección hipodérmica sin aguja, como los dispositivos desvelados

en las patentes de Estados Unidos números 5.399.163, 5.383.851, 5.312.335, 5.064.413, 4.941.880, 4.790.824 o 4.596.556. Ejemplos de implantes y módulos bien conocidos útiles en la presente invención incluyen: la patente de Estados Unidos n.º 4.487.603, que desvela una bomba de microinfusión implantable para dispensar medicación a una velocidad controlada; la patente de Estados Unidos n.º 4.486.194, que desvela un dispositivo terapéutico para administrar medicamentos a través de la piel; la patente de Estados Unidos n.º 4.447.233, que desvela una bomba de infusión de medicación para liberar medicación a una velocidad de infusión concreta; la patente de Estados Unidos n.º 4.447.224, que desvela un aparato de infusión implantable de flujo variable para la liberación continua del fármaco; la patente de Estados Unidos n.º 4.439.196, que desvela un sistema osmótico de liberación de fármaco que tiene compartimentos de múltiples cámaras; y la patente de Estados Unidos n.º 4.475.196, que desvela un sistema osmótico de liberación de fármaco. Por supuesto, también se conocen muchos otros implantes, sistemas de administración y módulos similares.

Las composiciones de GCB/IFG y GCB/IFGT descritas en el presente documento pueden envasarse en una jeringa de dos cámaras. Por ejemplo, las composiciones de GCB/IFG y GCB/IFGT en forma liofilizada se pueden colocar en una primera cámara de jeringa y un líquido puede estar presente en una segunda cámara de jeringa (véase, por ejemplo, la solicitud publicada de Estados Unidos número 2004-0249339).

Las composiciones de GCB/IFG y GCB/IFGT descritas en el presente documento pueden envasarse en una jeringa sin agujas (véase, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos n.º 6.406.455 y 6.939.324). Brevemente, como ejemplo, el dispositivo de inyección incluye: una cámara de gas que contiene un gas o una fuente de gas; un puerto que puede permitir la liberación de gas desde la cámara de gas; un émbolo, que al liberar el gas de la cámara de gas, puede causar el movimiento de al menos un primer pistón; un primer pistón; un segundo pistón; una primera cámara, por ejemplo, una cámara útil para almacenar y mezclar fármacos; un alojamiento del pistón, donde están dispuestos el primer pistón, el segundo pistón y la primera cámara; un miembro de desplazamiento que puede, independientemente de la potencia motriz del gas de la cámara de gas, causar el movimiento de uno o ambos del primer y segundo pistones (el miembro de desplazamiento puede ser el émbolo o un miembro separado); un orificio adecuado para inyección sin aguja en comunicación con la primera cámara; donde el primer y segundo pistón están dispuestos de manera deslizable dentro del alojamiento del pistón, y el miembro de desplazamiento, la fuente de

- gas y el émbolo están dispuestos de manera tal que: en una primera posición de los pistones, una segunda cámara, por ejemplo, un depósito de fluido, se define dentro del alojamiento del pistón por el primer pistón, el alojamiento del pistón y el segundo pistón, el miembro de desplazamiento puede mover uno o ambos
- 5 pistones a una segunda posición donde el primer pistón está en una posición tal que la segunda cámara, que puede ser un depósito de fluido, está en comunicación con la primera cámara, que puede ser una cámara de almacenamiento y mezcla de medicamentos, y el segundo pistón se mueve en la dirección del primer pistón, disminuyendo así el volumen de la segunda cámara y
- 10 permitiendo la transferencia del líquido de la segunda cámara a la primera cámara, el émbolo, al liberar el gas de la cámara de gas, hace que el primer pistón se mueva para disminuir el volumen de la primera cámara permitiendo que una sustancia sea expulsada a través del orificio y desde la cámara y, por ejemplo, a un sujeto.
- 15 La jeringa sin aguja puede incluir módulos separados para un primer componente, por ejemplo, un componente seco o líquido, y un segundo componente, por ejemplo, un componente líquido. Los módulos pueden proporcionarse como dos componentes separados y ensamblarse, por ejemplo, por el sujeto que administrará el componente a sí mismo o por otra persona, por
- 20 ejemplo, por un individuo que proporciona o brinda atención médica. Juntos, los módulos pueden formar todo o parte del alojamiento del pistón de los dispositivos descritos en el presente documento. Los dispositivos se pueden usar para proporcionar cualquier primer y segundo componente donde sea deseable almacenar o proporcionar los componentes por separado y combinarlos antes de
- 25 administrarlos a un sujeto.

Métodos de tratamiento

- Cualquiera de las formulaciones de GCB/IFG y GCB/IFGT descritas en el presente documento puede administrarse a un paciente. Las formulaciones de GCB/IFG y GCB/IFGT descritas en el presente documento son para uso en
- 30 métodos de tratamiento un trastorno relacionado con una disfunción en una ruta de la GCasa, en particular la enfermedad de Gaucher. Las composiciones también se usan en la fabricación de un medicamento para tratar tales trastornos mediante los métodos de tratamiento descritos en el presente documento.

- La dosis puede ser de aproximadamente 60 unidades/kg, o 60 unidades/kg,
- 35 administradas cada dos semanas. La dosis puede ser de aproximadamente 30 unidades/kg o 30 unidades/kg, administradas cada semana. Como alternativa, la dosis puede variar de 30 a 80 unidades/kg administradas cada dos semanas, de

40 a 70 unidades/kg administradas cada dos semanas, de 50 a 80 unidades/kg administradas cada dos semanas, de 45 a 65 unidades/kg administradas cada dos semanas, de 40 a 60 unidades/kg administradas cada dos semanas, de 35 a 55 unidades/kg administradas cada dos semanas, de 30 a 50 unidades/kg administradas cada dos semanas, de 45 a 65 unidades/kg administradas cada dos semanas, de 50 a 70 unidades/kg administradas cada dos semanas, de 55 a 75 unidades/kg administradas cada dos semanas, de 60 a 80 unidades/kg administradas cada dos semanas, de 55 a 65 unidades/kg administradas cada dos semanas, de 45 a 55 unidades/kg administradas cada dos semanas, de 35 a 45 unidades/kg administradas cada dos semanas, o de 65 a 75 unidades/kg administradas cada dos semanas. Como alternativa, la dosis puede variar de 15 a 40 unidades/kg administradas cada semana, de 20 a 35 unidades/kg administradas cada semana, de 25 a 40 unidades/kg administradas cada semana, de 22,5 a 32,5 unidades/kg administradas cada semana, de 20 a 30 unidades/kg administradas cada semana, de 17,5 a 22,5 unidades/kg administradas cada semana, de 15 a 25 unidades/kg administradas cada semana, de 22,5 a 32,5 unidades/kg administradas cada semana, de 25 a 35 unidades/kg administrados cada semana, de 22,5 a 37,5 unidades/kg administrados cada semana, de 30 a 40 unidades/kg administrados cada semana, de 27,5 a 32,5 unidades/kg administrados cada semana, de 22,5 a 27,5 unidades/kg administrados cada semana, de 17,5 a 22,5 unidades/kg administradas cada semana, o de 32,5 a 37,5 unidades/kg administradas cada semana. Normalmente, la dosis es de 15-60 unidades/kg administradas cada dos semanas, en particular de 60 unidades/kg administradas cada dos semanas. Los ajustes de dosis se pueden realizar de forma individual en función del logro y el mantenimiento de los objetivos terapéuticos.

La dosis puede ser de aproximadamente 1,5 mg/kg, o 1,5 mg/kg, administrada cada dos semanas. La dosis puede ser de aproximadamente 0,75 mg/kg o 0,75 mg/kg, administrada cada semana. Como alternativa, la dosis puede variar de 0,75 a 2,0 mg/kg administrada cada dos semanas, de 1,0 a 1,75 mg/kg administrados cada dos semanas, de 1,25 a 2,0 mg/kg administrados cada otra semana, de 1,125 a 1,625 mg/kg administrados cada dos semanas, de 1,0 a 1,5 mg/kg administrados cada dos semanas, de 0,875 a 1,375 mg/kg administrados cada dos semanas, de 0,75 a 1,25 mg/kg administrados cada dos semanas, de 1,215 a 1,625 mg/kg administrados cada dos semanas, de 1,25 a 1,75 mg/kg administrados cada dos semanas, de 1,375 a 1,875 mg/kg administrados cada dos semanas, de 1,5 a 2,0 mg/kg administrados cada dos semanas, de 1,375 a

1,625 mg/kg administrados cada dos semanas, de 1,125 a 1,375 mg/kg administrados cada dos semanas, de 0,875 a 1,125 mg/kg administrados cada dos semanas, o de 1,625 a 1,875 mg/kg administrados cada dos semanas. Como alternativa, la dosis puede variar de 0,375 a 1,0 mg/kg administrada cada semana, de 0,5 a 0,875 mg/kg administrada cada semana, de 0,625 a 1,0 mg/kg administrada cada semana, de 0,5625 a 0,8125 mg/kg administrada cada semana, de 0,5 a 0,75 mg/kg administrados cada semana, de 0,4375 a 0,5625 mg/kg administrados cada semana, de 0,375 a 0,625 mg/kg administrados cada semana, de 0,5625 a 0,8125 mg/kg administrados cada semana, de 0,625 a 0,875 mg/kg administrados cada semana, de 0,5625 a 0,9375 mg/kg administrados cada semana, de 0,75 a 1,0 mg/kg administrados cada semana, de 0,6875 a 0,8125 mg/kg administrados cada semana, de 0,5625 a 0,6875 mg/kg administrados cada semana, de 0,4375 a 0,5625 mg/kg administrados cada semana, o de 0,8125 a 0,9375 mg/kg administrados cada semana. Normalmente, la dosis es de 15 mg/kg, administrados cada dos semanas, en particular por administración subcutánea. Los ajustes de dosis se pueden realizar de forma individual en función del logro y el mantenimiento de los objetivos terapéuticos.

Cualquiera de las formulaciones de GCB/IFG y GCB/IFGT descritas en el presente documento puede administrarse a un paciente. La dosis puede ser de aproximadamente 90 a 180 unidades/kg, administrados cada dos semanas. La dosis puede ser de aproximadamente 90 unidades/kg o 90 unidades/kg, administradas cada semana. Como alternativa, la dosis puede variar de 90 a 150 unidades/kg administradas cada dos semanas, de 110 a 160 unidades/kg administradas cada dos semanas, de 120 a 180 unidades/kg administradas cada dos semanas, de 120 a 150 unidades/kg administradas cada dos semanas, de 90 a 120 unidades/kg administradas cada dos semanas, de 100 a 130 unidades/kg administradas cada dos semanas, de 110 a 140 unidades/kg administradas cada dos semanas, de 120 a 150 unidades/kg administradas cada dos semanas, de 130 a 160 unidades/kg administradas cada dos semanas, de 140 a 170 unidades/kg administradas cada dos semanas, o de 150 a 180 unidades/kg administradas cada dos semanas. Como alternativa, la dosis puede variar de 90 a 110 unidades/kg administradas cada dos semanas, de 100 a 120 unidades/kg administradas cada dos semanas, de 110 a 130 unidades/kg administradas cada dos semanas, de 120 a 140 unidades/kg administradas cada dos semanas, de 130 a 150 unidades/kg administradas cada dos semanas, de 140 a 160 unidades/kg administradas cada dos semanas, de 150 a 170 unidades/kg administradas cada dos semanas, o de 160 a 180 unidades/kg administradas

cada dos semanas.

La dosis puede ser de aproximadamente 2,25 a 4,5 mg/kg, administrados cada dos semanas. Como alternativa, la dosis puede variar de 2,25 a 3,75 mg/kg administrados cada dos semanas, de 2,75 a 4,0 mg/kg administrados cada dos semanas, de 3,0 a 4,5 mg/kg administrados cada dos semanas, de 3,0 a 3,75 mg/kg administrados cada dos semanas, de 2,25 a 3,0 mg/kg administrados cada dos semanas, de 2,5 a 3,25 mg/kg administrados cada dos semanas, de 2,75 a 3,5 mg/kg administrados cada dos semanas, de 3,0 a 3,75 mg/kg administrados cada dos semanas semana, de 3,25 a 4,0 mg/kg administrados cada dos semanas, de 3,5 a 4,25 mg/kg administrados cada dos semanas o de 3,75 a 4,5 mg/kg administrados cada dos semanas. Como alternativa, la dosis puede variar de 2,25 a 2,75 mg/kg administrados cada dos semanas, de 2,5 a 3,0 mg/kg administrados cada dos semanas, de 2,75 a 3,25 mg/kg administrados cada dos semanas, de 3,0 a 3,5 mg/kg administrados cada dos semanas, de 3,25 a 3,75 mg/kg administrados cada dos semanas, de 3,5 a 4,0 mg/kg administrados cada dos semanas, de 3,75 a 4,25 mg/kg administrados cada dos semanas, o de 4,0 a 4,5 mg/kg administrados cada dos semanas.

La administración de las composiciones de GCB/IFG y GCB/IFGT se puede realizar para tratar un trastorno relacionado con una disfunción en la ruta de la GCasa, como las enfermedades de almacenamiento lisosomal. Las enfermedades de almacenamiento lisosomal de ejemplo incluyen enfermedad de Gaucher, enfermedad de Fabry, enfermedad de Pompe, mucopolisacaridosis y atrofia de sistemas múltiples. Las composiciones descritas en el presente documento son especialmente adecuadas para tratar la enfermedad de Gaucher. Por supuesto, también se conocen muchos otros implantes, sistemas de administración y módulos similares. El trastorno puede ser un trastorno neurodegenerativo, por ejemplo, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer o demencia con cuerpos de Lewy. Como alternativa, el trastorno puede implicar la alteración de la regulación de alfa-sinucleína.

En el tratamiento del trastorno, las composiciones de GCB/IFG y GCB/IFGT pueden administrarse por vía intravenosa o subcutánea. La administración subcutánea incluye la inyección subcutánea, que es especialmente adecuada para la práctica de la invención. Se pueden usar diversos esquemas de dosificación para administrar las composiciones. Por ejemplo, la composición puede administrarse una vez a la semana, una vez cada dos semanas, una vez al mes. La composición se puede administrar cada tres días, cada cuatro días, cada cinco días, cada seis días, cada ocho días, cada nueve días, cada 10 días, cada

11 días, cada 12 días, cada 13 días, cada 15 días, o cada 16 días, por ejemplo. La frecuencia de administración se puede cambiar a lo largo de un curso de tratamiento debido a diversos factores. Normalmente, las composiciones descritas en el presente documento se administran por vía subcutánea mediante inyección una o dos veces a la semana o una vez cada dos semanas.

5 Cuando las composiciones descritas en el presente documento se describen por administración subcutánea, se debe tener cuidado de minimizar las molestias del paciente durante la administración. Por lo tanto, por lo general, el volumen total administrado al paciente por inyección no excede los 5 ml. Más típicamente, el volumen administrado por vía subcutánea será inferior a 2,5 ml por inyección. Si se requieren múltiples inyecciones subcutáneas para lograr una dosis terapéuticamente efectiva, estas pueden administrarse en diferentes sitios. Como alternativa, el intervalo de tratamiento puede reducirse. Los ajustes de dosis se pueden realizar de forma individual en función del logro y el mantenimiento de los objetivos terapéuticos.

15 EJEMPLOS

La presente invención también se describe y demuestra por medio de los siguientes ejemplos. Sin embargo, el uso de estos y otros ejemplos en cualquier parte de la especificación es solo ilustrativo y de ninguna manera limita el alcance y el significado de la invención o de cualquier término ejemplificado. Del mismo modo, la invención no se limita a ninguna realización preferida particular descrita en el presente documento. De hecho, muchas modificaciones y variaciones de la invención pueden ser evidentes para los expertos en la materia al leer esta especificación, y tales variaciones pueden realizarse sin apartarse de la invención en espíritu o en alcance. Por lo tanto, la invención solo estará limitada por los términos de las reivindicaciones adjuntas junto con el alcance completo de los equivalentes a los que tienen derecho dichas reivindicaciones.

25 Ejemplo 1: Concentración de GCB

La GCB (5 ml de 10 mg/ml) se descongeló después del almacenamiento a -80 °C. La GCB se concentró luego por filtración centrífuga a 3800 rpm, 4 °C durante 30 minutos. La GCB se diluyó luego 50 veces y la concentración se midió a A280. Se obtuvo una concentración de 100 mg/ml de GCB. Luego, se añadió polisorbato 20 al 1 % a una concentración final de 0,1 %. A algo de la solución, se añadieron 20 mg de isofagomina con pH ajustado.

35 Se realizó filtración a través de una membrana de 0,22 um. Un proceso específico se muestra en la Figura 1.

Ejemplo 2: La adición de IFG sin ajuste de pH desestabiliza la GCB.

Se utilizó SDS-PAGE para analizar diversas muestras de GCB, como se muestra a continuación. Las muestras se desnaturalizaron a 37 °C durante 15 minutos. La SDS-PAGE se ejecutó en un gel de 8-16 % Novex™ Tris-glicina. Se utilizó ditiotretiol 50 mM como agente reductor. Algunas de las muestras han añadido isofagomina que no tenía el pH ajustado. Los resultados del primer día se muestran en la Figura 2A:

- Calle 1:** Marcadores de peso molecular
 - Calle 2:** 0,5 % de control de ensayo (60 ng de GCB)
 - Calle 3:** 1 % de control de ensayo (120 ng de GCB)
 - Calle 4:** 12 µg de referencia de GCB, reducida
 - Calle 5:** 12 µg de GCB (4 °C), día 1, no reducida
 - Calle 6:** 12 µg de GCB (4 °C) Día 1, reducida
 - Calle 7:** 12 µg de GCB (4 °C), día 1 con 12 µg de isofagomina, no reducida
 - Calle 8:** 12 µg de GCB (4 °C), día 1 con 12 µg de isofagomina, reducida
 - Calle 9:** 12 µg de GCB (-80 °C), día 1, no reducida
 - Calle 10:** 12 µg de GCB (-80 °C) Día 1, reducida
 - Calle 11:** 12 µg de GCB (-80 °C), día 1 con 12 µg isofagomina, no reducida.
 - Calle 12:** 12 µg de GCB (-80 °C), día 1 con 12 µg de isofagomina, reducida
- Los resultados después de dos semanas se muestran en la Figura 2B:
- Calle 1:** Marcadores de peso molecular
 - Calle 2:** 0,5 % de control de ensayo (60 ng de GCB)
 - Calle 3:** 1 % de control de ensayo (120 ng de GCB)
 - Calle 4:** 12 µg de referencia de GCB, reducida
 - Calle 5:** 12 µg de GCB (4°C) Semana 2, no reducido
 - Calle 6:** 12 µg de GCB (4°C) Semana 2, reducido
 - Calle 7:** 12 µg de GCB (4 °C) Semana 2 con 12 µg de isofagomina, no reducida
 - Calle 8:** 12 µg de GCB (4 °C) Semana 2 con 12 µg de isofagomina, reducida.
 - Calle 9:** 12 µg de GCB (-80 °C) Semana 2, no reducido
 - Calle 10:** 12 µg de GCB (-80 °C) Semana 2, reducido
 - Calle 11:** 12 µg de GCB (-80 °C) Semana 2 con 12 µg de isofagomina, no reducida
 - Calle 12:** 12 µg de GCB (-80 °C) Semana 2 con 12 µg de isofagomina, reducida.

El propio procedimiento de concentración puede haber inducido la

oligomerización de GCB relacionada con la cisteína, como lo muestran las bandas débiles de entre 150 kDa y 200 kDa en las calles 4-12 que pueden comprender aproximadamente el 0,5 % de la proteína total. Se vieron sustancialmente más fragmentos de GCB cuando se añadió isofagomina a GCB a 4 °C que cuando se

5 añadió isofagomina a GCB a -80 °C, como lo muestran varias bandas débiles con tamaños de menos de 50 kDa en las calles 7 y 8 de la Figura 2A. La aparición de las bandas débiles puede deberse a la desestabilización de GCB por isofagomina ácida.

La adición de isofagomina produjo fragmentos de GCB a 4 °C pero no a -80 °C. Véanse las calles 5-8 de las Figuras 2A y 2B.

10

Ejemplo 3: ajuste de pH de IFGT y posterior lipofilización

Cuando la IFGT se disuelve en agua, se obtiene una solución ácida. En particular, cuando se disolvieron 103 mg de tartrato de isofagomina en 5 ml de agua, el pH de la solución es de 3,25. El pH se ajustó a 6,0 mediante la adición de

15 15 µl de hidróxido de sodio 10 M a la solución.

Se añadieron partes alícuotas de 500 µl de la solución de IFGT a pH ajustado a los tubos Eppendorf de 2 ml. Las soluciones que contenían el tubo Eppendorf se congelaron en hielo seco durante una hora, se cubrieron con parafilm que se pinchó con una aguja y se liofilizó durante la noche. Los tubos

20 Eppendorf con los liofilizados se muestran en la Figura 3.

Ejemplo 4: Adición de GCB a IFG de pH ajustado

Antes de añadir GCB al IFGT ajustado a pH 6,0, el pH de una solución GCB también se ajustó a 6,0 con citrato sódico. En particular, 100 mg/ml de GCB en citrato sódico 50 mM produce una solución con pH 6,0. Cuando se añadió IFGT

25 100 mM/ml (a pH 6,0) a 100 mg/ml de GCB en citrato sódico 50 mM, el pH era 6,0.

Ejemplo 5: La adición de IFG sin ajuste de pH no desestabiliza la GCB.

Se usó SDS-PAGE para analizar diversas muestras de GCB preparadas el mismo día (día 0) y después de tres días de almacenamiento (día 3), como se muestra a continuación, que incluyen GCB añadida a isofagomina con pH ajustado. Las muestras se desnaturalizaron a 37 °C durante 15 minutos. La SDS-PAGE se ejecutó en un gel de 8-16 % Novex™ Tris-glicina. Se utilizó ditiotretiol 50 mM como agente reductor. Algunas de las muestras han añadido isofagomina, que sin pH ajustado.

30

35 **Calle 1:** Marcadores de peso molecular

Calle 2: 0,5 % de control de ensayo (60 ng de GCB)

Calle 3: 1 % de control de ensayo (120 ng de GCB)

Calle 4: 12 µg de referencia de GCB, no reducida

Calle 5: 12 µg de GCB a partir de una concentración de 100 mg/ml, no reducida

Calle 6: 12 µg de GCB a partir de una concentración de 100 mg/ml, reducida

5 **Calle 7:** 12 µg de GCB a partir de una concentración de 100 mg/ml con 12 µg de isofagomina con ajuste de pH, no reducida

Calle 8: 12 µg de GCB a partir de una concentración de 100 mg/ml con 12 µg de isofagomina con ajuste de pH, reducida

10 La SEC HPLC se realizó en las muestras del día 3 para confirmar la estabilidad. Los parámetros incluían Gibco DPBS con adición de cloruro sódico 400 mM como fase móvil, una velocidad de flujo de 0,8 ml/min, Sepax Zenix-C SEC-150. 3 µm, 150 A, 7.8 x 300 mm como la columna SEC y una temperatura de columna de 25 °C.

15 Los resultados se muestran en la Figura 4A para el Día 0 y en la Figura 4B para el Día 3. La banda de GCB se vio en las calles 4-8. No se observaron bandas más pequeñas con tamaños de menos de 50 kDa ni el día 0 ni el día 3. El ajuste del pH de la isofagomina a 6,0, que es similar al de GCB, puede minimizar la desestabilización de GCB.

Ejemplo 6: Análisis de IFGT con pH ajustado sobre la estabilidad GCB

20 La GCB se concentró hasta 100 mg/ml. 100 mg/ml de tartrato de isofagomina (IFGT) se ajustaron a pH a 6,0. El IFGT se mezcló a continuación con GCB. Cuando no se realizó el ajuste del pH de IFGT, el GCB/IFGT no fue estable y se observó recorte de proteínas por SDS-PAGE.

25 Cuando se realizó el ajuste del pH, la GCB en la solución se mantuvo estable durante al menos tres días según lo medido por SEC. La fase móvil fue Gibco DPBS con adición de cloruro sódico 400 mM, la velocidad de flujo fue de 0,8 ml/min, la columna SEC fue Sepax Zenic-C SEC-150, 3 µm, 150 A, 7,8 x 300 mm. La temperatura de la columna era de 25°C. Se analizaron cuatro muestras por SEC, como se muestra en la Figura 5. La GCB en tampón DS, una referencia
30 de GCB con 98,8 % de pureza y GCB con 98,7 % de pureza se usaron como patrones. La GCB con isofagomina neutralizada (pH ajustado a 6,0) que se almacenó durante tres días también se analizó en SEC y se mostró estable.

Ejemplo 7: Análisis por cromatografía de exclusión por tamaño de IFG de pH ajustado sobre la estabilidad de GCB

35 Se realizó un ensayo de separación SEC en al menos las siguientes muestras enumeradas en la Tabla 1 a continuación:

Tabla 1:

Nombre de la muestra	Descripción
GR (referencia de GCB)	GCB diluida hasta 2,04 mg/ml
G4	4 °C Muestra de GCB diluida hasta 2,01 mg/ml
GI4	4 °C Muestra de GCB/IFG diluida hasta 1,81 mg/ml
G80	-80 °C Muestra de GCB diluida hasta 1,90 mg/ml
GI80	-80 °C Muestra de GCB/IFG °C diluida hasta 1,81 mg/ml

Los siguientes parámetros se usaron para la SEC: Gibco DPBS con adición
5 de cloruro sódico 400 mM se usó como la fase móvil. La velocidad de flujo fue de 0,8 ml/min. La columna SEC fue Sepax Zenix-C SEC-150. 3 µm, 150 Å, 7,8 x 300 mm. La temperatura de la columna fue de 25 °C.

Los resultados se muestran en las Figuras 6A y 6B. Los fragmentos de
péptidos observados con SDS-PAGE aparecen en un pico que eluye a
10 aproximadamente 10 minutos y 30 segundos a 10 minutos y 45 segundos. La muestra a -80 °C con isofagomina y GCB tiene menos de un pico asociado con los fragmentos peptídicos que cualquiera de las muestras a 4 °C o incluso la muestra GCB a -80 °C.

Ejemplo 8: Efecto de las concentraciones de GCB y IFG sobre la viscosidad

15 Se prepararon varias formulaciones de (a) GCB y (b) GCB mezclada con isofagomina (GCB/IFG). Las formulaciones de GCB incluían 10 mg/ml de GCB, 25 mg/ml de GCB, 50 mg/ml de GCB, 75 mg/ml de GCB y 100 mg/ml de GCB. Las formulaciones de GCB/IFG incluyeron 10 mg/ml de GCB con 5 mg/ml de tartrato de IFG, 25 mg/ml de GCB con 12,5 mg/ml de tartrato de IFG, 50 mg/ml de GCB
20 con 25 mg/ml de tartrato de IFG, 75 mg/ml de GCB con 37.5 mg/ml de tartrato de IFG, y 100 mg/ml de GCB con 50 mg/ml de tartrato de IFG. La viscosidad y la velocidad de corte de cada formulación se midieron en un viscosímetro (m-VROC de RheoSense, San Ramon, CA, EE. UU.). Se necesitan muestras de
25 resultados de viscosidad con la pendiente de ajuste de R cuadrado > 0,98. Los resultados se muestran en las Tablas siguientes.

Tabla 2:

Muestra	Viscosidad (cP)	Velocidad de corte (1/s)	Ajuste de pendiente cuadrado de R
100 mg/ml de GCB	4,952	119,4	0,9973
75 mg/ml de GCB	2,455	621,4	0,9998
50 mg/ml de GCB	1,722	953,6	0,9999
25 mg/ml de GCB	1,312	1192,4	0,9994
10 mg/ml de GCB	1,074	1192,4	0,9999

Tabla 3:

5

Muestra	Viscosidad (cP)	Velocidad de corte (1/s)	Ajuste de pendiente cuadrado de R
100 mg/ml e GCB + 50 mg/ml de IFGT	4,969	579,2	0,9896
75 mg/ml e GCB + 37,5 mg/ml de IFGT	2,911	95,2	0,96
50 mg/ml e GCB + 25 mg/ml de IFGT	1,565	953,6	0,9998
25 mg/ml e GCB + 12,5 mg/ml de IFGT	1,224	477,7	0,999
10 mg/ml e GCB + 5 mg/ml de IFGT	1,064	1192,4	0,9998

La viscosidad se correlaciona con la concentración de GCB. La formulación con 100 mg/ml de GCB y 50 mg/ml de tartrato de IFG tiene una viscosidad de aproximadamente 5 cP, que es susceptible de inyección subcutánea.

10 **Ejemplo 9: Unión de IFG a GCB a pH 7,4 y pH 5,0 medido por Biacore**

Se realizaron experimentos para caracterizar la afinidad de unión de GCB e

isofagomina y la cinética a pH 7,4 y 5,0 por resonancia de plasmón superficial (SPR). Este pH puede ilustrar cómo la GCB y la isofagomina se unen entre sí en diferentes entornos, tales como los compartimentos de plasma, citoplasma y lisosoma, que tienen diferentes valores de pH.

5 Todos los experimentos de SPR se realizaron en un Biacore S-200 mediante un método de cinética de un solo ciclo. Para los experimentos a pH 7,4, se diluyeron 2 mg/ml de GCB en el tampón de acetato de GE a pH 5,0 hasta la concentración final de 100 µg/ml. El tampón de carrera de inmovilización era HEPES 10 mM, EDTA 5 mM, P-20 al 0,01 %, pH 7,4. Este tampón se usó
10 directamente en el ensayo de unión posteriormente.

 Para los experimentos a pH 5,0, se diluyeron 2 mg/ml de GCB en el tampón de acetato de GE a pH 5,0 hasta la concentración final de 100 µg/ml. El tampón de carrera de inmovilización fue fosfato sódico 20 mM, cloruro de potasio 2,7 mM, cloruro de sodio 137 mM, tartrato 5 mM, P-20 al 0,01 %, pH 5,0. Se añadió
15 tartrato al tampón de carrera para eliminar el efecto de soluto introducido por el tartrato de isofagomina. La GCB se inmovilizó en un chip CM5 utilizando un procedimiento de acoplamiento de imina normal. El nivel de inmovilización de la diana fue de 4000 UR.

 Para los experimentos de Biacore a pH 7,4, el intervalo de concentración fue
20 de 0,39 -100 nM. El total fue de 9 puntos con dilución en serie de 2 veces. Para los experimentos de Biacore a pH 5,0, el intervalo de concentración fue de 0,39 -100 nM. El total fue de 9 puntos con dilución en serie de 2 veces.

 Las condiciones para el ensayo de unión fueron las siguientes: caudal de 30 µl/min, tiempo de asociación de 120 s, tiempo de disociación de 600 s y cloruro de
25 magnesio 3 M como reactivo de regeneración. Las concentraciones de isofagomina que variaron inicialmente de 0,3 µM hasta 100 µM se hicieron fluir sobre la velaglucerasa alfa inmovilizada en modo de ciclo único, sin regeneración de la superficie.

 Para cada uno de los estudios de pH 5,0 y pH 7,4, se realizaron dos carreras.
30 Los datos obtenidos se muestran en las siguientes tablas y en las Figuras 7A-7D. Las líneas negras representan los datos reales y las líneas rojas representan el ajuste del modelo.

Tabla 4:
 Primera carrera a pH 5,0

ka (1/Ms)	kd (1/s)	K _D (M)	Rmax (UR)	tc	Chi ² (UR ²)	Valor U
1,25 x 10 ⁴	0,00314	2,51 x 10 ⁻⁷	26,73	8,51 x 10 ⁵	0,138	1

5 Tabla 5:
 Segunda carrera a pH 5,0

ka (1/Ms)	kd (1/s)	K _D (M)	Rmax (UR)	tc	Chi ² (UR ²)	Valor U
9883	0,001954	1,98 x 10 ⁻⁷	24,39	1,70 x 10 ¹⁰	0,339	1

Tabla 6:
 Primera carrera a pH 7,4:

10

ka (1/Ms)	kd (1/s)	K _D (M)	Rmax (UR)	tc	Chi ² (UR ²)	Valor U
2,42 x 10 ⁵	0,002274	9,40 x 10 ⁻⁹	12,1	1,08 x 10 ⁹	0,105	1

Tabla 7:
 Segunda carrera a pH 7,4:

ka (1/Ms)	kd (1/s)	K _D (M)	Rmax (UR)	tc	Chi ² (UR ²)	Valor U
2,80 x 10 ⁵	0,001785	6,38 x 10 ⁻⁹	10,86	6,90 x 10 ⁹	0,178	2

15

La K_D de la unión de GCB/IFG a pH 5,0 es 198-251 nM. La K_D de la unión de GCB/IFG a pH 7,4 es de 6,4 a 9,4 nM.

Ejemplo 10: Isofagomina aumenta la temperatura de fusión de la velaglucerasa alfa

20

La estabilidad térmica de la velaglucerasa sola o en combinación con diferentes proporciones de isofagomina se evaluó mediante fluorimetría de barrido nano-diferencial (nano-DSF) (Figura 8). Las muestras se prepararon inicialmente

a la relación molar de isofagomina indicada a una concentración de velaglucerasa alfa de 40 mg/ml. Antes de cargar en el aparato nano-DSF, las muestras se diluyeron hasta concentraciones de velaglucerasa alfa de 2 mg/ml. Las condiciones de muestra enumeradas en la Figura 8 son las siguientes:

- 5 Ctr: sin D-tartrato de isofagomina (IFGT)
- Muestra 1: 100x relación molar de IFGT
- Muestra 2: 30x relación molar de IFGT
- Muestra 3: 10x relación molar de IFGT
- Muestra 4: 3x relación molar de IFGT
- 10 Muestra 5: sin IFGT
- Muestra 7: 100x relación molar de clorhidrato de isofagomina
- Muestra 8: 100 x relación molar de acetato de isofagomina

Las reacciones de unión de isofagomina a velaglucerasa alfa también se llevaron a cabo durante 1 hora a 37 °C. Las reacciones enzimáticas de pasaron durante 1 ha 37 °C. El tartrato de isofagomina se preincubó con velaglucerasa alfa durante aproximadamente 10 minutos.

Las concentraciones de ensayo para el tartrato de isofagomina son las indicadas en los gráficos que se muestran en las Figuras 9A-9C. Las concentraciones finales de ensayo para la velaglucerasa alfa fueron ~ 1 nM a pH 5,0 y ~ 10 nM a pH 7,4. La Figura 9A muestra una curva de inhibición de la actividad con sustrato sintético colorimétrico pNP-GPS. La Figura 9B muestra una curva de inhibición de la actividad con sustrato 4MU-GPS fluorométrico sintético. La Figura 9C muestra la inhibición de la actividad con el sustrato glucoesfingolípido C12-GluCer natural. La reacción de escisión de C12-GluCer se evaluó midiendo la producción de glucosa con un kit de ensayo de glucosa oxidasa.

Ejemplo 11: Estudio de estabilidad de tres semanas

Se prepararon cuatro mezclas diferentes de GCB y D-tartrato de isofagomina como se muestra en la Tabla 8 a continuación.

30 Tabla 8:

Nombre de la mezcla	Concentración de GCB (mg/ml)	Concentración de D-tartrato de IFG (mg/ml)	Relación molar de GCB a IFGT
Grupo 1	15	2,25	1:30
Grupo 2	15	0,75	1:10
Grupo 3	15	0,225	1:3

Grupo 4	15	0,075	1:1

En el punto de tiempo inicial y después del almacenamiento durante tres semanas a 40 ° C, se analizaron la actividad específica y la pureza medida por cada una de SEC, rpHPLC y SDS-PAGE. Mediante SEC se pueden detectar especies solubles de alto peso molecular, mientras que la rpHPLC proporciona información sobre la estabilidad química de la GCB, tal como la resistencia a la oxidación. Con SDS-PAGE se puede detectar el recorte y la agregación de proteínas. Para la actividad específica, las actividades del patrón de referencia fueron 16 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ (día 0) y 18 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ (semana 3). Se observó una variabilidad significativa día a día con los ensayos de actividad basados en fluorescencia. Todas las muestras de estabilidad tuvieron una actividad ligeramente mayor que la del patrón de referencia.

También se realizó una inspección visual. Las imágenes de las muestras se muestran en la Figura 10A. Los datos se muestran en las tablas siguientes. En los resultados de SDS-PAGE que se muestran en la Figura 10B, las siguientes calles corresponden a las muestras anteriores:

Calle 1: Marcadores de peso molecular

Calle 2: 12 μg de referencia GCB, no reducida

Calle 3: 12 μg de GCB del Grupo 1, no reducida

Calle 4: 12 μg de GCB del Grupo 2, no reducida

Calle 5: 12 μg GCB del Grupo 3, no reducida

Calle 6: 12 μg de GCB del Grupo 4, no reducida

Tabla 9:

Nombre de la mezcla	Actividad específica ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$) Día 0	Actividad específica ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$) Semana 3
Grupo 1, relación molar 1:30 de GCB a IFG	21	28
Grupo 2, relación molar 1:10 de GCB a IFG	20	22
Grupo 3, relación molar 1:3 de GCB a	25	28

IFG		
Grupo 4, relación molar 1:1 de GCB a IFG	22	22

Tabla 10:

Nombre de la mezcla	Pureza SEC (%) Día 0	Pureza SEC (%) Semana 3
Grupo 1, relación molar 1:30 de GCB a IFG	99,6	99,4
Grupo 2, relación molar 1:10 de GCB a IFG	99,5	99,3
Grupo 3, relación molar 1:3 de GCB a IFG	99,5	99,2
Grupo 4, relación molar 1:1 de GCB a IFG	99,5	98,8

5

Tabla 11:

Nombre de la mezcla	Pureza rpHPLC (%) Día 0	Pureza rpHPLC (%) Semana 3
Grupo 1, relación molar 1:30 de GCB a IFG	97,4	96,8
Grupo 2, relación molar 1:10 de GCB a IFG	97,4	98,3
Grupo 3, relación molar 1:3 de GCB a	97,4	98,1

IFG		
Grupo 4, relación molar 1:1 de GCB a IFG	97,3	98,3

Tabla 12:

Nombre de la mezcla	Pureza SDS-PAGE (%) el día 0	Pureza SDS-PAGE (%) la semana 3
Grupo 1, relación molar 1:30 de GCB a IFG	> 98	> 98
Grupo 2, relación molar 1:10 de GCB a IFG	> 98	> 98
Grupo 3, relación molar 1:3 de GCB a IFG	> 98	> 98
Grupo 4, relación molar 1:1 de GCB a IFG	> 98	Agregados observados

La relación molar de 1:1 de GCB a IFG fue demasiado baja para proporcionar estabilidad durante tres semanas a 40 °C. Se observaron agregados en el ensayo SDS-PAGE y la solución apareció turbia a las tres semanas. Sin embargo, a relaciones molares de 1:3 de GCB a IFG y superiores a las tres semanas, la pureza fue de al menos el 98 % en SDS-PAGE y las soluciones aparecían transparentes.

10 Ejemplo 12: Estudio farmacocinético de GCB intravenosa y GCB subcutánea con IFG en el mono Cynomolgus

En dos grupos de monos cynomolgus se analizó la farmacocinética de GCB. En el Grupo 1, la GCB se administró una vez por inyección intravenosa. En el Grupo 2, se administró una formulación de GCB con IFG una vez mediante inyección subcutánea. Se recogieron tres muestras de hígado y bazo 1 hora, 2 horas, 8 horas y 24 horas después de la dosis. En la Tabla 13 a continuación se

muestran detalles adicionales del diseño del estudio:

Tabla 13:

Número de grupo y origen	Artículo de dosis y de ensayo	Concentración (mg/ml)	Volumen de dosis (ml/kg)	ROA/TOA
1 (12 machos, origen PNN)	10 mg/kg de GCB	10	1	Inyección IV una vez al día 1 (T=0)
2 (12 machos, origen PNN)	10 mg/kg GCB and 5 mg/kg de tartrato de isofagomina formulados juntos (relación molar 100x IFG)	100 (GCB) 50 (tartrato de isofagomina)	0,1	Inyección SC una vez el día 1 (T=0)

5 Las recolecciones en hígado y bazo se realizaron 1, 2, 8 y 24 horas (n = 3) después de la dosis.

A continuación, se realizó el análisis histológico en todas las muestras. Se procesaron un 10 % de NBF de hígado y bazo para el bloqueo de parafina. Se prepararon secciones de 5 micrómetros para IHC de GCB (anticuerpo primario TK36-anti-huGCB de ratón a 1:10.000) y tinción con hematoxilina eosina.

La Figura 11 muestra los controles negativos y positivos para la tinción con IHC de GCB en tejidos de mono en hígado y bazo. Se observó una tinción insignificante en ausencia del anticuerpo IHC de GCB (paneles superiores). En presencia del anticuerpo para IHC de GCB se observó una leve tinción de fondo en el hígado no tratado (panel inferior izquierdo). Se observó tinción oscura en el hígado y el bazo tratados en presencia del anticuerpo para IHC de GCB (paneles medio inferior y derecho inferior). En particular, el hígado mostró tinción positiva para GCB en células de Kupffer, endotelio y hepatocitos y el bazo mostró tinción positiva para endotelio y macrófagos.

La biodistribución de GCB en el hígado se estudió después de la administración de GCB mediante inyección intravenosa y de GCB con IFG mediante inyección subcutánea. En el hígado de un mono tratado con inyección subcutánea, se observó GCB fuerte en el punto de tiempo de 8 horas. Se observó

una fuerte tinción de GCB en el punto de una hora y dos horas en el hígado de un mono tratado mediante inyección intravenosa. Los resultados se muestran en la Figura 12 (aumento 2x) y la Figura 13 (aumento 20x).

- 5 Se observaron resultados similares en el bazo, como se muestra en la Figura 14 (aumento 2x) y la Figura 15 (aumento 20x). Estos datos sugieren que la administración subcutánea de GCB con IFG puede proporcionar una exposición tisular de GCB comparable a la de la administración IV de GCB.

Ejemplo 13: Correlación de la actividad de velaglucerasa alfa con el nivel de proteína en el hígado y el bazo

- 10 La proteína velaglucerasa alfa y los niveles de actividad enzimática se evaluaron en homogeneizados de hígado y bazo después de la administración de la dosis IV en monos cynomolgus. Los tejidos se recogieron en puntos de tiempo predeterminados después de la dosificación (0,5-24 horas). Los datos se muestran en las Figuras 16A y 16B. En particular, la Figura 16A muestra los resultados de la dosificación IV con velaglucerasa alfa solo en un intervalo de 2 a 10 mg/kg. La Figura 16B muestra los resultados de la dosificación SC con velaglucerasa alfa en un intervalo de 1,5 - 10 mg/kg formulado con una cantidad correspondiente de isofagomina (0,0075 - 5 mg/kg), de manera que la relación molar de velaglucerasa alfa a isofagomina es 1:3.

- 20 **Ejemplo 14: Niveles de actividad de GCB en suero en monos cynomolgus después de la administración subcutánea de tartrato de isofagomina**

- Los niveles de actividad sérica de GCB se analizaron en monos cynomolgus después de la administración subcutánea (SC) de velaglucerasa alfa con tartrato de isofagomina. Los datos se muestran en la Figura 16C. La actividad sérica de GCB endógena se determinó a partir del vehículo y los animales antes de la dosis (n = 39) tratados con GCB y oscilaron entre 4 y 14 ng/ml o 0,07-0,5 nmol 4 UM/min/ml. El tartrato de isofagomina puede aumentar la actividad de GCB en el suero por encima del límite superior de lo normal con una dosis SC de 2,5 mg/kg. Este aumento en la actividad sérica se debe, probablemente, a los procesos de degradación de GCB nativos que se producen continuamente en el suero. La dosis de tartrato de isofagomina incorporada en Vela-3xIFGT (0,0225 mg/kg) no aumentaría la actividad de GCB en suero endógena, según los datos de la dosis más alta de 0,025 mg/kg.

- 30 **Ejemplo 15: IFG proporciona una mejora de 25x en la exposición en suero de velaglucerasa Alfa SC**

Velaglucerasa alfa e IFG en una relación molar de 1:3 administrada por vía subcutánea a monos cinomolgos en una dosis de 4 mg/kg pudo proporcionar una

mejora de más de 25 veces en la exposición en suero en comparación con una dosis intravenosa de 4 mg/kg de velaglucerasa alfa. Las relaciones de IFG de un exceso molar de 3 a 100 veces sobre la velaglucerasa alfa promovieron aumentos similares en la exposición en suero. El aumento en la biodisponibilidad sérica determinado a partir del ensayo ELISA de ECL se corroboró con el ensayo de actividad de GCB (sustrato 4MU-GPS). Los resultados se muestran en las Figuras 17A y 17B. La adición de 0,07 mg/kg de IFGT a 4 mg/kg de GCB aumentó sustancialmente la cantidad de GCB en suero (16A), así como la actividad enzimática global de GCB (16B). Por lo tanto, los datos demuestran que cuando GCB se formula juntamente con IFG, por ejemplo, IFGT, particularmente en una relación molar de al menos 1:3 (GCB:IFG, por ejemplo, GCB:IFGT), puede proporcionarse biodisponibilidad en suero que permite la administración SC.

Ejemplo 16: Biodistribución tisular superior de VPRIV subcutánea con IFGT en una relación molar de 1:100 en comparación con la dosificación intravenosa de VPRIV sola

Velaglucerasa alfa e IFG en una relación molar de 1:100 administrada por vía subcutánea a monos cinomolgos a una dosis de 4 mg/kg pudo proporcionar captación tisular de velaglucerasa superior a la de una dosis IV de 10 mg/kg de velaglucerasa alfa. La dosis de infusión IV de referencia de VPRIV es de 1,5 mg/kg. En algunas realizaciones, se puede usar una dosis subcutánea diana de aproximadamente 1,5 mg/kg. Se homogeneizaron aproximadamente 250 mg de tejido en 1 ml de tampón de lisis HEPES/Triton X-100. El contenido de velaglucerasa alfa en los tejidos se midió utilizando el ensayo ELISA ECL y se normalizó hasta el contenido total de proteínas según se determinó a partir de un ensayo BCA. Los resultados se muestran en las Figuras 18A y 18B. El perfil de exposición de la CGB presente en el hígado (18A) y el bazo (18B) tras la administración subcutánea de una relación molar de 1:100 de CGB:IFG fue superior al de la administración intravenosa de GCB durante el curso de 5 días (120 horas).

Ejemplo 17: Comparabilidad de la biodistribución tisular de VPRIV subcutánea con IFGT en una relación molar de 1:3 en comparación con una dosis intravenosa de VPRIV sola

Velaglucerasa alfa e IFG en una relación molar de 1:3 administradas por vía subcutánea a monos cinomolgos a una dosis clínica diana de 1,5 mg/kg pudo proporcionar captación tisular de velaglucerasa superior a la de una dosis IV de 2 mg/kg de velaglucerasa alfa sola. La dosis de infusión IV de referencia de VPRIV es de 1,5 mg/kg. Se homogeneizaron aproximadamente 250 mg de tejido en 1ml

de tampón de lisis HEPES/Triton X-100. El contenido de velaglucerasa alfa en los tejidos se midió utilizando el ensayo ELISA ECL y se normalizó hasta el contenido total de proteínas según se determinó a partir de un ensayo BCA. Los resultados se muestran en las Figuras 19A y 19B. La cantidad de GCB presente en el hígado después de la administración subcutánea de una relación molar 1:3 de GCB:IFG fue comparable a la de la administración intravenosa de GCB a los puntos de tiempo de 8 horas y 24 horas. De forma similar, la exposición tisular de GCB en el bazo tras la administración subcutánea de una relación molar 1:3 de GCB:IFG fue comparable a la de la administración intravenosa de GCB a los puntos de tiempo de 8 horas y 24 horas.

De forma similar, la exposición tisular de GCB en el bazo tras la administración subcutánea de una relación molar 1:3 de GCB:IFG fue comparable a la de la administración intravenosa de GCB a los puntos de tiempo de 8 horas y 24 horas. Por tanto, la adición de IGH, por ejemplo IFGT, a una formulación de GCB puede permitir la administración subcutánea de formulaciones que contienen GCB.

Ejemplo 18: Las relaciones de isofagomina tan bajas como 1:1 proporcionan exposiciones séricas similares a las relaciones molares de isofagomina más altas

Velaglucerasa alfa e IFG en una relación molar de 1:1 administrada por vía subcutánea a monos cinomolgos en una dosis de 1,5 mg/kg fue capaz de proporcionar exposiciones séricas de GCB similares a las mayores relaciones de isofagomina. No se observaron diferencias obvias en las exposiciones séricas de GCB para relaciones molares entre 1:1 y 1:100. El aumento en la biodisponibilidad sérica determinado a partir del ensayo ELISA de ECL se corroboró con el ensayo de actividad de GCB (sustrato 4MU-GPS). Los resultados se muestran en las Figuras 20A y 20B.

Los artículos de prueba para la dosificación se prepararon como formulaciones congeladas para la instalación animal antes de la dosificación. Los artículos de prueba se descongelaron aproximadamente de 1 a 3 horas antes de la dosificación. Por lo tanto, los datos demuestran que si los riesgos de almacenamiento a temperatura ambiente pueden evitarse mediante el almacenamiento a temperatura fría (por ejemplo, congelados), cuando GCB se formula juntamente con IFG, por ejemplo, IFGT, particularmente en una relación molar de al menos 1:1 (GCB:IFG, por ejemplo GCB:IFGT), puede proporcionar suficiente biodisponibilidad en suero que permita la administración SC.

Ejemplo 19: Isofagomina protege a VPRIV contra la desnaturalización

térmica a 37 °C en suero humano

El suero que contenía VPRIV 10 nM (una forma de GCB) se analizó para determinar si IFG podía estabilizar la GCB. Se añadió IFG a VPRIV de tal manera que IFG tenía las siguientes concentraciones de IFG en suero: 1 nM, 3 nM, 10 nM, 30 nM, 100 nM, 300 nM y 1000 nM. Se usó un control negativo sin IFG añadida.

La actividad de la enzima se midió utilizando la escisión del sustrato de 4-metilumbeliferona b-D-glucopiranósido. La actividad disminuyó del 100 % a aproximadamente 40 % en 60 minutos con el control negativo, IFG 1 nM e IFG 10 nM. Véase la Figura 21. Sin embargo, la adición de concentraciones de 30 nM (relación molar 3x) y mayores evitó la mayor parte de la pérdida de actividad. La IFG puede ser eficaz para proteger a la GCB contra la desnaturalización por calor en suero. La protección de GCB mediada por IFG e IFGT contra la degradación térmica puede aumentar la biodisponibilidad de GCB, mejorar la persistencia de GCB en suero y permitir una mayor duración de los procesos de captación de GCB celulares y tisulares.

La presente invención no debe quedar limitada en su alcance por las realizaciones descritas en el presente documento. De hecho, diversas modificaciones de la invención, además de las descritas en el presente documento, serán evidentes para los expertos en la técnica a partir de la descripción anterior y las figuras adjuntas. También se pretende que dichas modificaciones entren dentro del ámbito de las reivindicaciones adjuntas. Además, debe entenderse que todos los valores son aproximados y se proporcionan para su descripción.

Todas las publicaciones, solicitudes de patente, patentes y otras referencias mencionadas en la presente memoria descriptiva se incorporan por referencia en su totalidad. En el caso de conflicto, la presente especificación, incluyendo definiciones, controles. Además, los materiales, procedimientos y ejemplos son únicamente ilustrativos y no están destinados a ser limitantes.