

TRADUZIONE DEL TESTO DEL BREVETTO EUROPEO N. 2796457

DAL TITOLO:

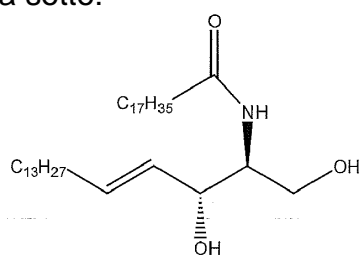
“GENZ 112638 PER TRATTARE LA MALATTIA DI GAUCHER O FABRY IN TERAPIA DI COMBINAZIONE”

*** **

Descrizione

STATO DELL'ARTE

I glicosfingolipidi (GSL) sono una classe di composti presenti in natura che presenta una moltitudine di funzioni biologiche, inclusa la capacità di favorire la crescita cellulare, il differenziamento cellulare, l'adesione tra cellule o tra cellule e proteine della matrice, il legame di microrganismi e virus a cellule e la metastasi di cellule tumorali. I GSL derivano dalla glucosilceramide (GlcCer), che è prodotta da ceramide e UDP-glucosio grazie all'enzima UDP-glucosio: *N*-acilsfingosina glucosiltransferasi (GlcCer sintasi). La struttura della ceramide è mostrata sotto:

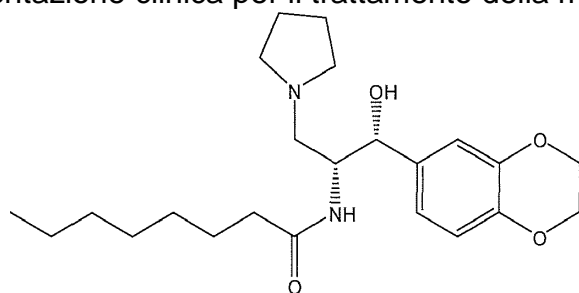


Ceramide

L'accumulo di GSL è stato correlato a una serie di malattie, incluse le malattie di Tay-Sachs, Gaucher e Fabry (si veda, per esempio, il brevetto US no. 6,051,598). I GSL sono stati correlati anche ad alcuni tumori. Per esempio, è stato trovato che alcuni GSL sono

presenti solamente in tumori o sono in concentrazioni elevate in modo abnorme in tumori; esercitano marcate azioni inibitorie o stimolanti sulla crescita tumorale quando aggiunti a cellule tumorali in terreni di coltura; e inibiscono il sistema di difesa immunitaria normale dell'organismo quando diffuse da tumori nel fluido extracellulare circostante. La composizione di GLS in un tumore varia al crescere della malignità del tumore e anticorpi per alcuni GLS inibiscono la crescita di tumori.

I composti che inibiscono la GlcCer sintasi possono ridurre le concentrazioni di GLS e sono stati riportati essere utili per trattare un soggetto con una delle malattie sopra citate. Una serie di potenti inibitori di GlcCer, chiamati nella presente "composti simili ad ammino ceramide" sono divulgati nei brevetti US no. 6,051,598, 5,952,370, 5,945,442, 5,916,911 e 6,030,995. Il composto di Formula (I), mostrato sotto, è un inibitore della GlcCer sintasi attualmente in fase di sperimentazione clinica per il trattamento della malattia di Gaucher:



(I).

Vi è una necessità di forme in sale di questo farmaco candidato che siano cristalline e possiedano altrimenti proprietà fisiche che siano assoggettabili alla produzione su larga scala. Vi è inoltre una necessità di formulazioni farmaceutiche in cui questo farmaco candidato sia

stabile ed efficacemente rilasciato al paziente, così come di metodi di trattamento migliorati che utilizzano questo composto.

McEachern K *et al*, *Molecular Genetics and Metabolism*, 91(3), **2007**, 259-267 riferisce un inibitore di glucosilceramide sintasi per terapia di inibizione del substrato della malattia di Gaucher.

WO 2006/053043 riguarda metodi di trattamento di un soggetto diabetico comprendenti la somministrazione di un inibitore di glucosilceramide sintasi al soggetto.

US 2003/050299 riguarda la sintesi di inibitori di UDP-glucosio N-acilsfingosina glucosiltransferasi.

SOMMARIO DELL'INVENZIONE

È stato trovato che il sale Emitartrato del composto di Formula (I) (in seguito "Formula (I) Emitartrato") può essere cristallizzato in condizioni ben definite per fornire alcune forme cristalline non igroscopiche. Formula (I) Emitartrato presenta diverse proprietà vantaggiose rispetto ad altri sali di Formula (I). Come descritto ulteriormente nell'Esempio 1, molti sali di Formula (I), inclusi citrato, malato, fumarico, metilsolfonico, e acetico, non si sono potuti ottenere in forma solida. Sebbene il sale di Formula (I) cloridrato e tartrato 1:1 siano stati ottenuti in forma solida, nessuno dei due era cristallino ed entrambi erano idroscopici per formulazione. Formula (I) Emitartrato è più semplice da formulare e sintetizzare rispetto alla base libera e ad altri sali. Formula (I) Emitartrato è inoltre cristallino, non idroscopico, solubile in acqua e scorre meglio rispetto alla corrispondente base

libera (in seguito “Formula (I) Base Libera”) e altri sali. Pertanto, queste proprietà vantaggiose rendono Formula (I) Emitartrato assoggettabile alla produzione su larga scala come farmaco candidato.

È stato trovato inoltre che granuli stabili per formulazioni in capsula di Formula (I) Emitartrato possono essere preparati usando rapporti definiti di un riempitivo insolubile in acqua, un riempitivo solubile in acqua e Formula (I) Emitartrato. In base a questa scoperta, vengono divulgate formulazioni farmaceutiche stabili di Formula (I) Emitartrato.

È stato trovato inoltre che il composto di Formula (I) o suoi sali farmaceuticamente accettabili (incluso Formula (I) Emitartrato) sono metabolizzati dal fegato, principalmente da enzimi del citocromo P450. In base a questa scoperta, vengono divulgati metodi di trattamento con il composto di Formula (I) o suoi sali farmaceuticamente accettabili (incluso Formula (I) Emitartrato) che riducono le potenziali interazioni farmaco/farmaco.

È stato trovato inoltre che topi Gaucher trattati con glucocerebrosidasi ricombinante e quindi con Formula (I) Emitartrato hanno mostrato livelli di GL1 inferiori in organi viscerali e un numero ridotto di cellule di Gaucher nel fegato rispetto al trattamento con glucocerebrosidasi da sola o Formula (I) Emitartrato da solo. In base a questa scoperta, vengono divulgate anche terapie di combinazione con il composto di Formula (I) o suoi sali farmaceuticamente accettabili (incluso Formula (I) Emitartrato).

Viene descritto nella presente il sale Emitartrato del composto rappresentato dalla Formula (I). Come indicato sopra, il sale Emitartrato del composto rappresentato dalla Formula (I) è chiamato nella presente "Formula (I) Emitartrato." Il composto rappresentato dalla Formula (I) è chiamato nella presente "Formula (I) Base libera."

È altresì descritta nella presente una composizione farmaceutica comprendente un trasportatore o diluente farmaceuticamente accettabile e Formula (I) Emitartrato.

È altresì descritto nella presente un metodo di inibizione di glucosilceramide sintasi o di riduzione delle concentrazioni di glicosfingolipidi in un soggetto che ne necessiti mediante somministrazione al soggetto di una quantità efficace di Formula (I) Emitartrato.

È altresì descritto nella presente l'uso di Formula (I) Emitartrato per la produzione di un medicamento per inibire la glucosilceramide sintasi o ridurre le concentrazioni di glicosfingolipidi in un soggetto che ne necessiti.

È altresì descritto nella presente l'uso di Formula (I) Emitartrato per inibire la glucosilceramide sintasi o ridurre le concentrazioni di glicosfingolipidi in un soggetto che ne necessiti.

In un aspetto, la presente invenzione fornisce un primo agente terapeutico per uso in un metodo di trattamento di un soggetto con malattia di Gaucher. Il metodo comprende la somministrazione al soggetto di una quantità efficace del primo agente terapeutico in

combinazione con una quantità efficace di un secondo agente terapeutico. Il primo agente terapeutico è rappresentato dalla Formula (I) o un suo sale farmaceuticamente accettabile; e il secondo agente terapeutico è efficace per il trattamento della malattia di Gaucher.

In un altro aspetto, la presente invenzione fornisce un primo agente terapeutico per uso in un metodo di trattamento di un soggetto con malattia di Fabry. Il metodo comprende la somministrazione al soggetto di una quantità efficace del primo agente terapeutico in combinazione con una quantità efficace di un secondo agente terapeutico. Il primo agente terapeutico è rappresentato dalla Formula (I) o un suo sale farmaceuticamente accettabile; e il secondo agente terapeutico è efficace per il trattamento della malattia di Fabry.

È altresì descritta nella presente una composizione farmaceutica comprendente: il sale Emitartrato di un composto rappresentato dalla Formula (I); almeno un riempitivo solubile in acqua; almeno un riempitivo insolubile in acqua; almeno un legante; e almeno un lubrificante.

È altresì descritto nella presente un metodo di trattamento di un soggetto con malattia di Fabry. Il metodo comprende le fasi di:

a) somministrazione al soggetto di una quantità efficace di un composto di Formula (I), o un suo sale farmaceuticamente accettabile;

b) analisi del soggetto per determinare se il soggetto è un metabolizzatore P450 scarso, intermedio o forte/ultrarapido;

c) se il soggetto è un metabolizzatore P450 intermedio o forte/ultra rapido,

determinazione di una quantità efficace tarata del composto; e

d) somministrazione al soggetto di una quantità efficace tarata del composto di Formula (I) se il soggetto è un metabolizzatore P450 intermedio o forte/ultra rapido e somministrazione al soggetto di una quantità efficace del composto di Formula (I) se il soggetto è uno scarso metabolizzatore P450.

È altresì descritto nella presente un metodo di trattamento di un soggetto con malattia di Gaucher. Il metodo comprende le fasi di:

a) somministrazione al soggetto di una quantità efficace di un composto di Formula (I), o un suo sale farmaceuticamente accettabile;

b) analisi del soggetto per determinare se il soggetto è un metabolizzatore P450 scarso, intermedio o forte/ultrarapido;

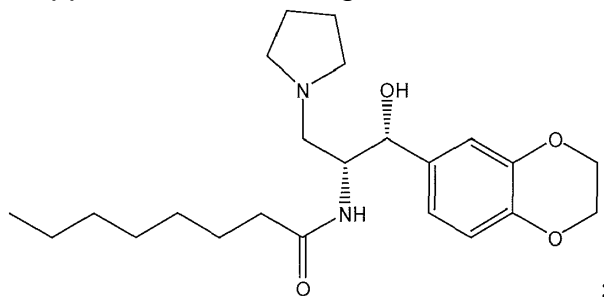
c) se il soggetto è un metabolizzatore P450 intermedio o forte/ultra rapido,

determinazione di una quantità efficace tarata del composto; e

d) somministrazione al soggetto di una quantità efficace tarata del composto di Formula (I) se il soggetto è un metabolizzatore P450 intermedio o forte/ultra rapido e somministrazione al soggetto di una quantità efficace del composto di Formula (I) se il soggetto è uno scarso metabolizzatore P450.

È altresì descritto nella presente un metodo di trattamento di un soggetto con malattia di Fabry. Il metodo comprende le fasi di:

a) somministrazione al soggetto di una quantità efficace di un composto rappresentato dalla seguente formula strutturale:



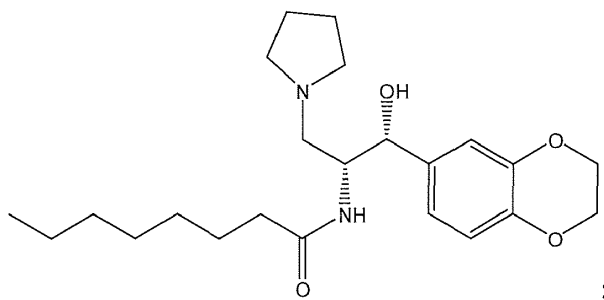
o un suo sale farmaceuticamente accettabile;

b) valutazione nel soggetto dei livelli plasmatici minimi del composto; e

c) adeguamento della quantità di composto somministrata al soggetto affinché i livelli plasmatici minimi del composto siano almeno di 5 ng/ml. In alternativa, i livelli plasmatici minimi e la C_{max} del composto nel soggetto sono valutati in fase b) e in fase c) la quantità di composto somministrato al soggetto viene adeguata affinché i livelli plasmatici minimi del composto nel soggetto siano almeno di 5 ng/ml e la C_{max} del composto nel soggetto sia inferiore a 100 ng/ml.

È altresì descritto nella presente un metodo di trattamento di un soggetto con malattia di Gaucher. Il metodo comprende le fasi di:

a) somministrazione al soggetto di una quantità efficace di un composto rappresentato dalla seguente formula strutturale:



o un suo sale farmaceuticamente accettabile;

b) valutazione nel soggetto dei livelli plasmatici minimi del composto; e

c) adeguamento della quantità di composto somministrata al soggetto affinché i livelli plasmatici minimi del composto nel soggetto siano almeno di 5 ng/ml. In alternativa, i livelli plasmatici minimi e la C_{max} del composto nel soggetto sono valutati in fase b) e in fase c) la quantità di composto somministrato al soggetto viene adeguata affinché i livelli plasmatici minimi del composto nel soggetto siano almeno di 5 ng/ml e la C_{max} del composto nel soggetto sia inferiore a 100 ng/ml.

BREVE DESCRIZIONE DEI DISEGNI

La FIG. 1 mostra il profilo sperimentale XRPD (temperatura ambiente) per Formula (I) Emitartrato.

La FIG. 2 è un grafico dell'efficacia della terapia di riduzione di enzima e di substrato nel ridurre i livelli di glucosilceramide nel fegato di topi Gaucher. I livelli epatici di GL1 sono stati misurati in topi Gaucher non trattati di 3 mesi di età (A) e in seguito a 2 settimane di trattamento con glucocerebrosidasi ricombinante (B). I topi trattati con glucocerebrosidasi ricombinante sono stati analizzati 10 settimane dopo

senza ulteriore trattamento (C) o dopo terapia con Formula (I) Emitartrato (D) a 150 mg/kg di mangime. Sono inoltre mostrati i livelli di GL1 nel fegato di topi trattati Formula (I) Emitartrato da solo per l'intero periodo di studio (E) e in controlli di età corrispondente non trattati (F). I dati sono espressi come medie \pm errore standard della media (SEM) (n = 5). La significatività statistica è stata determinata usando il test t non appaiato.

La FIG. 3 è un grafico dell'efficacia della terapia di riduzione di enzima e di substrato nel ridurre i livelli di glucosilceramide nella milza di topi Gaucher. I livelli nella milza di GL1 sono stati misurati in topi Gaucher non trattati di 3 mesi di età (A) e in seguito a 2 settimane di trattamento con glucocerebrosidasi ricombinante (B). I topi trattati con glucocerebrosidasi ricombinante sono stati analizzati 10 settimane dopo senza ulteriore trattamento (C) o dopo terapia con Formula (I) Emitartrato (D). Sono inoltre mostrati i livelli di GL1 nella milza di topi trattati Formula (I) Emitartrato da solo per l'intero periodo di studio (E) e in controlli di età corrispondente non trattati (F). I dati sono espressi come medie \pm errore standard della media (SEM) (n = 5). La significatività statistica è stata determinata usando il test t non appaiato.

La FIG. 4 è un grafico dell'efficacia della terapia di riduzione di enzima e di substrato nel ridurre i livelli di glucosilceramide nel polmone di topi Gaucher. I livelli polmonari di GL1 sono stati misurati in topi Gaucher non trattati di 3 mesi di età (A) e in seguito a 2 settimane di trattamento con glucocerebrosidasi ricombinante (B). I topi trattati con

glucocerebrosidasi ricombinante sono stati analizzati 10 settimane dopo senza ulteriore trattamento (C) o dopo terapia con Formula (I) Emitartrato (D). Sono inoltre mostrati i livelli di GL1 nel polmone di topi trattati Formula (I) Emitartrato da solo per l'intero per periodo di studio (E) e in controlli di età corrispondente non trattati (F). I dati sono espressi come medie \pm errore standard della media (SEM) (n = 5). La significatività statistica è stata determinata usando il test t non appaiato.

La FIG. 5 è un grafico che mostra la quantificazione del grado di colorazione di CD68 nel fegato. Il grado di colorazione positiva per CD68 su sezioni di fegato è stato quantificato usando il software MetaMorph. Sono mostrati i livelli in fegato Gaucher di 3 mesi non trattato (A) o in seguito a trattamento con glucocerebrosidasi (B). Sono inoltre illustrati i topi trattati con enzima e quindi analizzati 10 settimane dopo senza ulteriore intervento terapeutico (C) o dopo terapia con Formula (I) Emitartrato (D). È inoltre mostrato il grado di colorazione nel fegato di topi Gaucher trattati Formula (I) Emitartrato da solo (E) e in topi controllo di età corrispondente non trattati (F). I dati sono stati confrontati da un'analisi di dieci immagini 400x per sezione da ciascuno dei topi. La significatività statistica è stata determinata usando il test t non appaiato.

La FIG. 6 è un grafico che mostra l'efficacia di Formula (I) Emitartrato in topi D409V/null giovani. Formula (I) Emitartrato è stato somministrato a topi D409V/null di 10 settimane giornalmente mediante sonda orale a una dose di 75 o 150 mg/kg per 10 settimane. I livelli di

glucosilceramide in fegato, polmone, sistema vascolare e milza sono stati valutati al termine dello studio mediante HP-TLC. I dati sono presentati come percentuale di GL-1 in topi controllo non trattati di età corrispondente. Le linee tratteggiate indicano i livelli di glucosilceramide osservati in topi selvatici normali. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ rispetto al controllo non trattato (t test non appaiato a due code). I dati sono rappresentati come medie \pm errore standard della media (SEM) $n = 5$ per 75 mg/kg; $n = 6$ per 150 mg/kg).

La FIG. 7 mostra l'effetto di terapia con Formula (I) Emitartrato sull'accumulo di GL-3 in fegato, cuore, rene, milza, cervello e sangue di topi Fabry.

La FIG. 8 mostra un grafico dell'effetto della terapia con Formula (I) Emitartrato sulla comparsa e la progressione di neuropatia periferica in topi Fabry.

La FIG. 9 mostra grafici di misurazioni di alcuni marcatori della funzione renale in topi Fabry trattati con Formula (I) Emitartrato.

La FIG. 10 mostra una sequenza cronologica di studi di ERT e SRT di popolazioni di topi che ricevevano diverse terapie farmacologiche: A) Fabrazyme due volte al mese, niente Formula (I) Emitartrato; B) Fabrazyme due volte al mese e Formula (I) Emitartrato nel cibo; C) Fabrazyme somministrato all'inizio dello studio e al mese quattro dello studio e Formula (I) Emitartrato nel cibo; D) niente Fabrazyme, Formula (I) Emitartrato nel cibo; ed E) nessuna terapia farmacologica.

La FIG. 11 mostra grafici di livelli di GL-3 nel sangue in ng/mL di sangue in sei popolazioni (n=?) di topi (A-E Fabry-Rag; e F selvatico); le popolazioni di topi hanno ricevuto le seguenti terapie: A) Fabrazyme due volte al mese, niente Formula (I) Emitartrato; B) Fabrazyme due volte al mese e Formula (I) Emitartrato nel cibo; C) Fabrazyme somministrato all'inizio dello studio e al mese quattro dello studio e Formula (I) Emitartrato nel cibo; D) niente Fabrazyme, Formula (I) Emitartrato nel cibo; E) nessuna terapia farmacologica; e F) nessuna terapia farmacologica.

La FIG. 12 mostra grafici di livelli di GL-3 in fegato e rene di topi Fabry-Rag; le popolazioni di topi (n=?) hanno ricevuto le seguenti terapie: A) Fabrazyme due volte al mese, niente Formula (I) Emitartrato; B) Fabrazyme due volte al mese e Formula (I) Emitartrato nel cibo; C) Fabrazyme somministrato all'inizio dello studio e al mese quattro dello studio e Formula (I) Emitartrato nel cibo; D) niente Fabrazyme, Formula (I) Emitartrato nel cibo; e E) nessuna terapia farmacologica

La FIG. 13 mostra grafici di livelli nell'urina di GL-3 in topi Fabry-Rag; le popolazioni di topi (n=?) hanno ricevuto le seguenti terapie: A) Fabrazyme due volte al mese, niente Formula (I) Emitartrato; B) Fabrazyme due volte al mese e Formula (I) Emitartrato nel cibo; C) Fabrazyme somministrato all'inizio dello studio e al mese quattro dello studio e Formula (I) Emitartrato nel cibo; D) niente

Fabrazyme, Formula (I) Emitartrato nel cibo; e E) nessuna terapia farmacologica.

FIG. 14 è a grafico che mostra la latenza in secondi della sensibilità al calore di topi Fabry-Rag che ricevevano le seguenti terapie: Fabrazyme due volte al mese, niente Formula (I) Emitartrato; Fabrazyme due volte al mese e Formula (I) Emitartrato nel cibo; Fabrazyme somministrato all'inizio dello studio e al mese quattro dello studio e Formula (I) Emitartrato nel cibo; niente Fabrazyme, Formula (I) Emitartrato nel cibo; nessuna terapia farmacologica; topi selvatici; e non trattati a tre mesi.

La Figura 15 è un grafico che mostra la quantità totale di area di degradazione di una traccia HPLC di varie miscele comprendenti Formula (I) Emitartrato, Lattosio Monoidrato di grado per incapsulamento e Avicel PH 301 (Cellulosa microcristallina) dopo essere stati esposti a 85°C per 3 giorni. L'area di degradazione della traccia HPLC è il rapporto dell'area totale dei picchi corrispondenti alla degradazione rispetto all'area totale dei picchi corrispondenti a Formula (I) Emitartrato e ai prodotti di degradazione.

DESCRIZIONE DETTAGLIATA DELL'INVENZIONE

La presente domanda descrive forme cristalline peculiari di Formula (I) Emitartrato e nuove composizioni farmaceutiche di Formula (I) Emitartrato comprendenti le forme cristalline di Formula (I) Emitartrato descritte nella presente. La presente domanda descrive anche metodi di inibizione di glucosilceramide sintasi o di riduzione

delle concentrazioni di glicosfingolipidi in un soggetto che ne necessiti. Inoltre, la presente domanda descrive metodi per preparare specifiche forme cristalline di Formula (I) Emitartrato. La presente domanda descrive anche formulazioni farmaceutiche stabili di Formula (I) Emitartrato, terapie di combinazione con il composto di Formula (I) o suoi sali farmaceuticamente accettabili (incluso Formula (I) Emitartrato) e metodi di trattamento con il composto di Formula (I) o suoi sali farmaceuticamente accettabili (incluso Formula (I) Emitartrato) che minimizzano il rischio di interazioni farmaco/farmaco.

Forme cristalline di Formula (I) Emitartrato

In una forma di realizzazione particolare, almeno una particolare percentuale in peso di Formula (I) Emitartrato è cristallina. Particolari percentuali in peso includono 70%, 72%, 75%, 77%, 80%, 82%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5%, 99,9%, o una percentuale tra 70% e 100%.

In un'altra forma di realizzazione particolare, almeno una particolare percentuale in peso di Formula (I) Emitartrato è una singola forma cristallina di Formula (I) Emitartrato. Particolari percentuali in peso includono 70%, 72%, 75%, 77%, 80%, 82%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5%, 99,9%, o una percentuale tra 70% e 100%.

Come usato nella presente, "cristallina" si riferisce a un solido avente una struttura in cristallo in cui le singole molecole hanno una

configurazione chimica altamente omogenea regolare bloccata all'interno. Formula (I) Emitartrato cristallino può essere cristalli di una singola forma cristallina di Formula (I) Emitartrato, o una miscela di cristalli di diverse singole forme cristalline. Una singola forma cristallina significa Formula (I) Emitartrato come singolo cristallo o una pluralità di cristalli in cui ciascun cristallo ha la stessa forma di cristallo.

Quando una particolare percentuale in peso di Formula (I) Emitartrato è una singola forma cristallina, il resto di Formula (I) Emitartrato è una certa combinazione di Formula (I) Emitartrato amorfo, e/o una o più altre forme cristalline di Formula (I) Emitartrato, esclusa la singola forma cristallina. Quando la Formula (I) Emitartrato cristallina è definita come una percentuale specifica di una particolare forma cristallina di Formula (I) Emitartrato, il restante è costituito da forma amorfa e/o forme cristalline diverse dall'una o più forme particolari che sono specificate. Esempi di una singola forma cristallina includono la Forma A di Formula (I) Emitartrato caratterizzata da una o più proprietà come discusso nella presente.

Poiché l'acido tartarico ha due gruppi di acido carbossilico esso può formare sali con rapporti molari differenti del composto rappresentato dalla Formula (I) rispetto al tartrato (la base coniugata di acido tartarico). Per esempio, il sale in cui vi è un rapporto molare circa uno a uno di tartrato rispetto a Formula (I) è Formula (I) Tartrato (1 tartrato: 1 Formula (I)); e il sale in cui vi è un rapporto molare circa

uno a due rapporto molare di tartrato rispetto a Formula (I) è Formula (I) Emitartrato (1 tartrato: 2 Formula (I)).

Il sale Emitartrato può esistere in varie forme stereoisomeriche. Gli stereoisomeri sono composti che differiscono solamente per la loro disposizione spaziale. Gli enantiomeri sono coppie di stereoisomeri le cui immagini speculari non sono sovrapponibili, nella maggior parte dei casi perché contengono un atomo di carbonio sostituito in modo asimmetrico che agisce da centro chirale. I diastereomeri sono stereoisomeri che non sono correlati come immagini speculari, nella maggior parte dei casi perché contengono due o più atomi di carbonio sostituiti in modo asimmetrico.

Quando viene indicata la stereochimica (come per esempio in acido L-(+)-tartarico) o viene raffigurata tramite struttura (come per esempio in Formula (I)), lo stereoisomero indicato o raffigurato è puro almeno al 60%, 70%, 80%, 90%, 99% o 99,9% in peso rispetto agli altri stereoisomeri. Quando viene indicato un singolo enantiomero (come per esempio in acido L-(+)-tartarico) o viene raffigurato tramite struttura (come per esempio in Formula (I)), l'enantiomero indicato o raffigurato è otticamente puro almeno al 80%, 90%, 99% o 99,9%. La percentuale di purezza ottica in peso è il rapporto del peso dell'enantiomero rispetto al peso dell'enantiomero più il peso del suo isomero ottico.

“Racemato” o “miscela racemica” significa un composto di quantità equimolari di due enantiomeri, in cui tali miscele non mostrano attività ottica; vale a dire non ruotano il piano di luce polarizzata.

L'acido tartarico ha tre stereoisomeri: acido L-(+)-tartarico o acido destrotartarico e il suo enantiomero, acido levotartarico o acido D-(-)-tartarico, e la forma achirale, acido mesotartarico. L'indicazione L o D non indica la capacità dell'acido di ruotare il piano di luce polarizzata.

Per preparare Formula (I) Emitartrato può essere usato qualsiasi degli stereoisomeri di acido tartarico. Per esempio, l'Emitartrato può essere formato da solo uno dei suoi stereoisomeri, o da una loro combinazione. Il sale Emitartrato è selezionato da D-Emitartrato, L- Emitartrato, acido emimesotartarico o D,L-Emitartrato racemico. In una specifica forma di realizzazione, il sale Emitartrato è L-Emitartrato. "L-Emitartrato" significa che il sale Emitartrato è formato da acido L-tartarico. D,L-Emitartrato racemico significa che sono stati usati sia D-tartrato sia L-tartrato nella preparazione di Formula (I) Emitartrato. La quantità di D-tartrato in D,L-Emitartrato racemico può essere maggiore, uguale o inferiore alla quantità di L-tartrato presente.

"Levorotatorio" significa che la luce polarizzata viene fatta ruotare a sinistra quando passa attraverso un composto asimmetrico. Il prefisso per indicare levorotatorio è "L".

"Destrotatorio" significa che la luce polarizzata viene fatta ruotare a destra quando passa attraverso un composto asimmetrico. Il prefisso per indicare destrotatorio è "D".

Preparazione di Formula (I) Emitartrato

Formula (I) Emitartrato può essere preparato miscelando Formula (I) con acido L-tartarico in un solvente adatto. La precipitazione

di Formula (I) Emitartrato può essere assistita dall'aggiunta di un germe di cristallizzazione. I solventi che possono essere usati sono metanolo, acqua, etanolo, acetone, etil acetato, o loro combinazioni.

Le particolari forme solide di Formula (I) Emitartrato possono essere preparate, per esempio, mediante lenta evaporazione, lento raffreddamento e precipitazione con antisolvente. I solventi che possono essere usati in questi metodi includono acqua, eptano, esano, toluene, diclorometano, etanolo, alcol isopropilico, acetonitrile, etil acetato, metanolo, acetone, metil butil etere terziario (chiamato "TBME" nella presente), p-diossano, e tetraidrofurano (chiamato "THF" nella presente).

Le forme solide di Formula (I) Emitartrato possono essere preparate mediante evaporazione di solvente da una soluzione di Formula (I) Emitartrato in un solvente o una miscela di solventi. Miscele di solventi adatte includono metanolo, etanolo, acetone, acqua, etil acetato e diclorometano. Miscele di solventi preferite includono etanolo, metanolo, acqua e acetone.

Le forme solide di Formula (I) Emitartrato possono essere preparate attraverso lento raffreddamento di una soluzione riscaldata di Formula (I) Emitartrato in un solvente. Solventi adatti includono etanolo, metanolo, acqua, acetone, e etil acetato.

Le forme solide di Formula (I) Emitartrato possono essere preparate raffreddamento rapido di una soluzione riscaldata di Formula (I) Emitartrato in un solvente, ponendo la soluzione in un bagnetto di

raffreddamento. Solventi adatti includono etanolo, metanolo, acetone, acqua, etil acetato o miscele di questi solventi.

Le forme solide di Formula (I) Emitartrato possono essere preparate aggiungendo una soluzione di Formula (I) Emitartrato in un solvente come descritto sopra a un antisolvente a una data temperatura. Più in particolare, l'antisolvente è etil acetato, acetone, acetonitrile, toluene, THF, TBME, p-diossano, isopropanolo, o eptano. Particolare miscele di solvente/antisolvente includono metanolo/etil acetato, metanolo/acetone, metanolo /esano, metanolo/eptano, metanolo/acetonitrile, metanolo/toluene, metanolo/THF, metanolo/TBME, metanolo/p-diossano, etanolo/etil acetato, etanolo/esano, etanolo/eptano, etanolo, acetone, etanolo/acetonitrile, etanolo/toluene, etanolo/TBME, etanolo/THF, acqua/THF, acqua/isopropanolo, acqua/acetonitrile, acqua/acetone, diclorometano/eptano, diclorometano/acetone, diclorometano/etil acetato, diclorometano/acetonitrile, diclorometano/toluene, diclorometano/THF, diclorometano/TBME, diclorometano/p-diossano, e diclorometano/isopropanolo.

Miscela di solvente/antisolvente preferite includono metanolo/etil acetato, metanolo/acetone, metanolo/TBME, e acqua/acetone.

Come usato nella presente, "antisolvente" si riferisce a un solvente in cui Formula (I) Emitartrato ha scarsa solubilità e che

causala precipitazione dell'Emitartrato dalla soluzione sotto forma di polvere fine o cristalli.

Ulteriori metodi per generare forme solide di Formula (I) Emitartrato includono la precipitazione del solido da etil acetato/acetone e facoltativamente l'essiccamento del solido formato a temperatura ambiente. In un altro metodo, il solido può quindi essere ricristallizzato da acetone con o senza l'aggiunta di un germe di cristallizzazione. In alternativa, Formula (I) Emitartrato può essere precipitato dai solventi etil acetato/acetone e ricristallizzato da etil acetato. In alternativa, Formula (I) Emitartrato può quindi essere ricristallizzato da isopropanolo. In alternativa, Formula (I) Emitartrato può essere preparato usando solamente acetone senza ulteriore ricristallizzazione. In alternativa, Formula (I) Emitartrato può essere precipitato da acetone in seguito a un breve reflusso, senza ulteriore ricristallizzazione.

In alternativa, Formula (I) Emitartrato può quindi essere ricristallizzato da metanolo/acetone con o senza l'aggiunta di un germe di cristallizzazione. In alternativa, Formula (I) Emitartrato può quindi essere ricristallizzato da acqua/acetone con o senza l'aggiunta di un germe di cristallizzazione.

Caratterizzazione di Forme cristalline di Formula (I) Emitartrato

In una forma di realizzazione particolare, la forma cristallina di Formula (I) Emitartrato, Forma di cristallo A, è caratterizzata da uno, due, tre, quattro o cinque picchi XRPD principali agli angoli 2θ di $5,1^\circ$, $6,6^\circ$, $10,7^\circ$, $11,0^\circ$, $15,9^\circ$, e $21,7^\circ$. In una ancora più forma di

realizzazione particolare, la forma cristallina è caratterizzata da XRPD picchi agli angoli 2θ di $5,1^\circ$, $6,6^\circ$, $10,7^\circ$, $11,0^\circ$, $13,3^\circ$, $15,1^\circ$, $15,9^\circ$, $16,5^\circ$, $17,6^\circ$, $18,6^\circ$, $18,7^\circ$, $19,0^\circ$, $20,2^\circ$, $21,7^\circ$ e $23,5^\circ$. Resta inteso che un angolo 2θ specificato significa il valore specificato $\pm 0,2^\circ$.

Come usato nella presente, "picco XRPD principale " si riferisce a un picco XRPD con un'intensità relativamaggiore del 25%. L'intensità relativa è calcolata come rapporto dell'intensità del picco del picco di interesse rispetto all'intensità del picco più grande.

Metodi di Trattamento Usando Formula (I) Emitartrato

Come usato nella presente, un soggetto è un mammifero, preferibilmente un paziente umano, ma può essere anche un animale che necessita di trattamento veterinario, come un animale da compagnia (ad esempio cani, gatti e simili), un animale da fattoria (ad esempio mucche, pecore, maiali, cavalli e simili) o un animale da laboratorio (ad esempio ratti, topi, cavie, e simili). Soggetto e paziente vengono usati in modo intercambiabile.

Viene divulgato nella presente un metodo di rallentamento, ad esempio, inibizione o riduzione dell'attività di glucosilceramide sintasi o di riduzione delle concentrazioni di glicosfingolipidi in un soggetto che ne necessita mediante somministrazione al soggetto di una quantità efficace di Formula (I) sale Emitartrato, incluse sue forme cristalline, come descritto sopra.

Un soggetto che necessita di trattamento è un soggetto con una condizione o malattia che trae beneficio dall'inibizione della

glucosilceramide sintasi o dalla riduzione delle concentrazioni di glicosfingolipidi nelle cellule, in particolare nel lisosoma o nella membrana delle cellule. È stato mostrato che gli inibitori di glucosilceramide sintasi sono utili per trattare malattie da accumulo lisosomiale come malattia di Tay-Sachs, di Gaucher o di Fabry (si vedano, per esempio, i brevetti US no. 6,569,889; 6,255,336; 5,916,911; 5,302,609; 6,660,749; 6,610,703; 5,472,969; 5,525,616).

Esempi di condizioni o malattie includono malattia del rene policistico e glomerulopatia membranosa (si vedano le domande provvisorie di brevetto US 61/130,401 e 61/102,541), Glomerulonefrite e Glomerulosclerosi (si veda la domanda provvisoria di brevetto US 61/137,214) lupus (si veda PCT/US2009/001773) diabete, incluso diabete di tipo 2 (si veda WO 2006/053043); trattamento di disturbi che interessano la crescita e la divisione cellulare, incluso il cancro, malattie vascolari, aterosclerosi, e ipertrofia renale in pazienti diabetici (si vedano i brevetti US no. 6,916,802 e 5,849,326); inibizione della crescita di cellule epiteliali arteriose (si vedano i brevetti US no. 6,916,802 e 5,849,326); trattamento di pazienti affetti da infezioni (si veda M. *et al.*, "Epithelial Glucosphingolipid Expression as a Determinant of Bacterial Adherence and Cytokine Production," *Infect. and Immun.*, 62:4404-4410 (1994); prevenzione della generazione di anticorpi nei confronti del tumore da parte dell'ospite, vale a dire, paziente, (si veda Inokuchi, J. *et al.*, "Antitumor Activity in Mice of an Inhibitor of Glycosphingolipid Biosynthesis," *Cancer Lett.*, 38:23-30(1987); e trattamento di tumori (si

vedano Hakomori, S. "New Directions in Cancer Therapy Based on Aberrant Expression of Glycosphingolipids: Anti-adhesion and Ortho-Signalling Therapy," *Cancer Cells* 3:461-470 (1991), Inokuchi, J. *et al.*, "Inhibition of Experimental Metastasis of Murine Lewis Long Carcinoma by an Inhibitor of Glucosylceramide Synthase and its Possible Mechanism of Action," *Cancer Res.*, 50:6731-6737 (1990) e Ziche, M. *et al.*, "Angiogenesis Can Be Stimulated or Repressed in In Vivo by a Change in GM3 :GD3 Ganglioside Ratio," *Lab. Invest.*, 67:711-715 (1992).

Formula (I) Emitartrato può essere usato anche per una preparazione simile a vaccini per il cancro (si vedano, per esempio, i brevetti US no. 6,569,889; 6,255,336; 5,916,911; 5,302,609; 6,660,749; 6,610,703; 5,472,969; 5,525,616).

Il composto di Formula (I) o un suo sale farmaceuticamente accettabile (incluso il suo sale Emitartrato) può essere usato nei metodi divulgati come monoterapia, vale a dire, come unico ingrediente farmaceuticamente attivo somministrato per trattare l'indicazione.

Secondo la presente invenzione, il composto di Formula (I) o un suo sale farmaceuticamente accettabile (incluso il suo sale Emitartrato) è per uso nei metodi divulgati come terapia di combinazione con altri farmaci terapeutamente attivi nell'arte per trattare le malattie o indicazioni desiderate. "Co-terapia" o "combinazione" o "terapia di combinazione" o "co-somministrato" sono usati in modo intercambiabile nella presente e significano che il composto di Formula

(I) o suo sale farmaceuticamente accettabile (incluso il sale Emitartrato) è somministrato prima, dopo, o in concomitanza con uno o più altri agenti terapeutici. La terapia di combinazione è usata per trattare la malattia di Gaucher o la malattia di Fabry. Il composto di Formula (I) o suo sale farmaceuticamente accettabile (incluso il sale Emitartrato) può essere co-somministrato simultaneamente (ad esempio, in concomitanza) come formulazioni separate o come formulazione combinata. In alternativa, gli agenti possono essere somministrati in sequenza, come composizioni separate, all'interno di un intervallo di tempo appropriato determinato dal clinico esperto (ad esempio, un tempo sufficiente a permettere una sovrapposizione degli effetti farmaceutici delle terapie). Il composto di Formula (I) o suo sale farmaceuticamente accettabile (incluso il sale Emitartrato) e uno o più altri agenti terapeutici possono essere somministrati in una singola dose o in dosi multiple, in un ordine o schema adatto a ottenere un effetto terapeutico desiderato.

Agenti terapeutici efficaci per il trattamento della malattia di Gaucher che possono essere usati in una forma di realizzazione della presente invenzione includono glucocerebrosidasi, analoghi di glucocerebrosidasi, inibitori di glucosilceramide sintasi e chaperon molecolari che legano una glucocerebrosidasi e ripristinano la sua corretta conformazione. Glucocerebrosidasi o suoi analoghi possono derivare dall'uomo o da mammiferi. In alternativa, glucocerebrosidasi e suoi analoghi possono essere ottenuti per via ricombinante. Analoghi di

glucocerebrosidasi includono forme troncate dell'enzima e/o enzimi con sostituzioni amminoacidiche relativamente alla sequenza amminoacidica nativa dell'enzima nativo, a condizione che l'attività biologica sia mantenuta. Esempi di analoghi di glucocerebrosidasi includono Imiglucerasi (venduto con il nome commerciale Cerezyme[®]) da Genzyme Corporation), Taliglucerasi Alfa (da immettere nel mercato con il nome commerciale Uplyso[®] e sviluppato da Protalix Bioterapeutics, Inc.) e Velaglucerasi Alfa (sviluppato da Shire PLC), che sono analoghi di β -glucocerebrosidasi umana prodotti con DNA ricombinante. Esempi di chaperon molecolari includono isofagomina (in sviluppo con il nome commerciale Plicera[™] da Amicus Therapeutics, Cranbury, NJ). L'isofagomina è nota anche come afegostat tartrato e contiene la forma in sale tartrato di isofagomina come suo principio attivo. Esempi di inibitori di glucocerebrosidasi includono miglustat (sviluppato con il nome commerciale di Zavesca[™] da Actelion Pharmaceuticals Ltd. Allschwil, Svizzera).

Gli agenti terapeutici efficaci per il trattamento della malattia di Fabry che possono essere usati in una forma di realizzazione della presente invenzione includono α galattosidasi A, analoghi di α galattosidasi A e chaperon molecolari che legano una α galattosidasi A e ripristinano la sua corretta conformazione. α Galattosidasi A o suoi analoghi possono derivare dall'uomo o da mammiferi. In alternativa, α galattosidasi A e suoi analoghi possono essere ottenuti per via ricombinante. Analoghi di α Galattosidasi A includono forme troncate

dell'enzima e/o enzimi con sostituzioni amminoacidiche relativamente alla sequenza amminoacidica nativa dell'enzima nativo, a condizione che l'attività biologica sia mantenuta. Esempi di analoghi di α Galattosidasi A includono Agalsidasi beta (una α -galattosidasi ricombinante umana venduta con il nome commerciale Fabrazyme[®] come medicinale liofilizzato da Genzyme Corporation) e Agalsidasi alfa (una proteina ricombinante venduta con il nome commerciale Replagal[®] da Shire PLC). Esempi di chaperon molecolari includono migalastat (sviluppato con il nome commerciale Amigal[™] da Amicus Therapeutics, Cranbury, NJ come farmaco contenente migalastat cloridrato come suo principio attivo).

In una forma di realizzazione, la terapia di combinazione per il trattamento della malattia di Gaucher o di Fabry è realizzata in due stadi. In un primo stadio, un farmaco efficace per il trattamento della malattia di Gaucher o della malattia di Fabry (tipicamente, glucocerebrosidasi o un suo analogo per malattia di Gaucher e galattosidasi A o un suo analogo per la malattia di Fabry) è usato per stabilizzare il soggetto. Per esempio, nella malattia di Gaucher (o malattia di Fabry), uno di questi farmaci è usato per ridurre il carico dell'accumulo di GL-1 negli organi viscerali come nel fegato, milza, polmone e/o rene. Una volta che questo è stato realizzato, il composto di Formula (I) o un suo sale farmaceuticamente accettabile (incluso il sale Emitartrato) viene usato nel secondo stadio come terapia utile di mantenimento. Il primo stadio dura tipicamente fino a una, due, tre o

quattro settimane o fino a uno, due, tre, quattro, sei, nove o dodici mesi, o fino a che la conta piastrinica del soggetto non è uguale o superiore a 100.000 mm³; la concentrazione di emoglobina non è uguale o superiore a 11 g/dl (femmina) o 12 g/dl (maschio); e/o il volume della milza del soggetto non è inferiore o uguale a 10 multipli del normale e i volumi del fegato non sono inferiori o uguali a 1,5 multipli del normale. La somministrazione del primo stadio viene tipicamente interrotta una volta che terapia con il composto di Formula (I) viene avviata.

Come usato nella presente, una "quantità efficace" si riferisce a una quantità efficace ad alleviare i sintomi esistenti del soggetto sotto trattamento con effetti collaterali inaccettabilissimi nel soggetto. L'esatta formulazione, via di somministrazione e dosaggio sono scelti dal singolo medico alla luce delle condizioni del paziente. La quantità di dosaggio e l'intervallo di dosaggio possono essere adeguati per fornire livelli plasmatici del composto attivo che siano sufficienti a mantenere gli effetti terapeutici desiderati. Oltre alle condizioni del paziente e alla modalità di somministrazione, la dose somministrata dipenderà dalla severità dei sintomi del paziente e dall'età e dal peso del paziente. Una quantità efficace determinerà tipicamente livelli plasmatici minimi del composto superiori almeno a 5 ng/ml. Se i livelli plasmatici minimi sono inferiori a 5 ng/ml dopo la somministrazione di una quantità efficace del composto, la dose che viene somministrata a quel soggetto viene cambiata in una "quantità efficace tarata" affinché i livelli minimi del composto siano almeno di 5 ng/ml. In alternativa, se livelli plasmatici

minimi del composto sono inferiori a 5 ng/ml e/o la C_{max} è sopra 100 ng/ml dopo somministrazione di una quantità efficace del composto, la dose che viene somministrata al soggetto viene cambiata in una "quantità efficace tarata" affinché i livelli plasmatici minimi del composto siano almeno di 5 ng/ml e la C_{max} sia sotto 100 ng/ml. Quantità efficaci possono variare da 0,1 a 500 mg/al giorno. In alternativa, la quantità efficace varia da 50-300 mg/giorno. In un'altra alternativa, la quantità efficace varia da 100-300 mg/giorno. Il composto della presente domanda può essere somministrato in modo continuo o a intervalli di tempo specifici. Per esempio, il composto della presente domanda può essere somministrato 1, 2, 3, o 4 volte al giorno, come, ad esempio, una formulazione giornaliera o bigiornaliera. Possono essere impiegati saggi disponibili in commercio per determinare gli intervalli di dosaggio e/o i programmi di dosaggio ottimali per la somministrazione.

In un caso, una quantità efficace per il composto di Formula (I) o un suo sale farmaceuticamente accettabile (incluso il sale Emitartrato descritto sopra) è (come monoterapia o co-terapia) una dose giornaliera da 25 milligrammi a 300 milligrammi (in alternativa da 25 milligrammi a 150 milligrammi; in un'altra alternativa da 50 milligrammi a 300 milligrammi; e in un'altra alternativa da 100 milligrammi a 300 milligrammi), come 25, 50, 100, 200 o 300 milligrammi al giorno. In un caso specifico, una quantità efficace del composto di Formula (I) o di un suo sale farmaceuticamente accettabile (incluso Formula (I) Emitartrato) è (come monoterapia o co-terapia) una dose bigiornaliera

di 50 milligrammi (per un totale di 100 milligrammi al giorno), 100 milligrammi (per un totale di 200 milligrammi al giorno) o 150 milligrammi (per un totale di 300 milligrammi al giorno). In un caso alternativo, una quantità efficace per il composto di Formula (I) o di un suo sale farmaceuticamente accettabile (incluso Formula (I) Emitrato) è (come monoterapia o co-terapia) somministrata come dose somministrata una volta al giorno di 100 milligrammi/giorno, 200 milligrammi/giorno o 300 milligrammi/giorno.

Una quantità efficace può essere determinata assumendo che il soggetto sia uno "scarso metabolizzatore P450" e quindi valutando i livelli plasmatici minimi e/o la C_{max} . La quantità somministrata al soggetto viene quindi cambiata in una quantità efficace tarata, come descritto sotto, se i livelli plasmatici minimi sono inferiori a 5 ng/ml; o i livelli minimi del composto sono inferiori a 5 ng/ml e/o la C_{max} è sopra 100 ng/ml; o se viene determinato che il soggetto è un metabolizzatore P450 intermedio o forte/ultrarapido. Una quantità efficace per scarsi metabolizzatori P450 è (come monoterapia o co-terapia) comunemente tra 100-200 milligrammi al giorno, per esempio 100 o 200 milligrammi, come dose somministrata una volta al giorno o dose bigiornaliera.

Tipicamente, le composizioni farmaceutiche descritte nella presente possono essere somministrate prima o dopo un pasto, o con un pasto. Come usato nella presente, "prima" o "dopo" un pasto è tipicamente entro due ore, preferibilmente entro un'ora, più

preferibilmente entro trenta minuti, il più preferibilmente entro dieci minuti rispettivamente dall'inizio o dalla fine di un pasto.

È stato trovato attualmente che il composto di Formula (I), e suoi sali farmaceuticamente accettabili (incluso Formula (I) Emitartrato), viene metabolizzato dal fegato, principalmente da enzimi del citocromo P450. I citocromi P450 ("CYP") sono i principali enzimi epatici che metabolizzano xenobiotici. Esistono undici citocromi P450 che metabolizzano xenobiotici espressi in un tipico fegato umano (vale a dire, CYP1A2, CYP2A6, CYP2B6, CYP2C8/9/18/19, CYP2D6, CYP2E1 e CYP3A4/5). È stato trovato attualmente anche che CYP2D6 e CYP3A4 sono le principali isoforme di citocromo P450 che sono responsabili della detossificazione del composto di Formula (I) e dei suoi sali farmaceuticamente attivi, come Formula (I) Emitartrato. Il livello di attività degli enzimi P450 è diverso a seconda dell'individuo. Per esempio, gli individui possono essere classificati come metabolizzatori P450 scarsi, intermedi e forti/ultra rapidi. Poiché livelli inferiori di attività di P450 in un individuo possono dare origine a interazioni farmaco/farmaco ("DDI"), un'altra forma di realizzazione dell'invenzione è per determinare se il soggetto è un metabolizzatore P450 scarso, intermedio e forte/ultra rapido. Se il soggetto è un metabolizzatore intermedio o forte/ultra rapido, allora la dose somministrata a quel soggetto dovrebbe essere aumentata ad una "dose efficace tarata", vale a dire, la quantità che determina livelli plasmatici minimi del composto almeno di 5 ng/ml; o la quantità che determina livelli minimi

del composto o almeno di 5 ng/ml e a C_{max} del composto sotto 100 ng/ml. La dose può essere aumentata in modo incrementale e il soggetto può essere analizzato nuovamente una volta, due volte, tre, quattro o quante volte necessario per ottenere una dose efficace tarata.

Per il gene CYP 2D6 esistono quattro fenotipi predetti:

Uno "scarso metabolizzatore P450" reca due alleli mutanti, che determinano la completa perdita dell'attività enzimatica.

Un "metabolizzatore P450 intermedio" possiede un allele ad attività ridotta e un allele inattivo.

Un "metabolizzatore P450 forte" possiede almeno uno e non più di due alleli funzionali normali.

Un "metabolizzatore P450 ultra rapido" reca copie multiple (3-13) di alleli funzionali e produce attività enzimatica in eccesso.

Un soggetto è tipicamente valutato come metabolizzatore P450 scarso, intermedio o forte/ultra rapido tramite genotipaggio o monitorando i livelli plasmatici minimi di un farmaco che è metabolizzato da un enzima del P450 come CYP2D6 o CYP3A4. Comunemente, i livelli plasmatici minimi e/o la C_{max} del composto di Formula (I) o un suo sale farmaceuticamente accettabile, incluso Formula (I) Emitartrato, sono monitorati nel soggetto per fino a una, due, tre o quattro settimane, o fino a uno, due, tre, sei, nove o dodici mesi o più dopo l'inizio del trattamento con il composto. Gli adeguamenti rispetto alla dose vengono effettuati, secondo necessità,

per mantenere i livelli entro i limiti descritti, vale a dire, un livello plasmatico minimo di o sopra i 5 ng/ml

Soggetti possono diventare scarsi metabolizzatori P450 in conseguenza del trattamento con alcuni farmaci che sono inibitori di enzimi del P450. Esempi di tali farmaci includono paroxetina, fluoxetina, quinidina, o ketoconazolo. In alternativa, un soggetto è uno scarso metabolizzatore P450 in conseguenza di una scarsa espressione di un enzima del P450. In tali casi, la scarsa espressione può essere valutata determinando l'espressione di enzimi del P450 nel soggetto, vale a dire, mediante genotipaggio il soggetto per l'enzima del P450. Per esempio, l'espressione di CYP2D6 è comunemente valutata mediante PCR (McElroy et.al. "CYP2D6 Genotyping as an Alternative to Phenotyping for Determination of Metabolic Status in a Clinical Trial Setting", AAPS PharmSci (2000) 2(4): articolo 33 (<http://www.pharmsci.org/>)) o mediante test farmacogenomico basato su microarray (Background Information, Roche Diagnostics "The CYP450 Gene Family and Drug Metabolism", Hoffmann La Roche Ltd.). Pertanto, il soggetto utilmente genotipato per l'espressione di P450 (ad esempio, CYP2D6) prima dell'inizio del trattamento e trattato con una quantità efficace tarata, ove necessario. Nel caso di genotipaggio prima dell'inizio del trattamento, è comunque consigliabile monitorare i livelli plasmatici minimi e la C_{max} del composto e adeguare la dose secondo necessità.

Quantità efficaci per migalastat, Agalsidasi β , imiglucerasi, isofagomina e miglustat sono come descritte sull'etichetta dei farmaci o come realizzate nei test clinici di ciascun farmaco.

Il composto di Formula (I) può reagire con acidi farmaceuticamente accettabili per formare un sale farmaceuticamente accettabile. Esempi di acidi farmaceuticamente accettabili includevano acidi inorganici come acido cloridrico, acido bromidrico, acido iodidrico, acido solforico, acido fosforico, e simili, e acidi organici come acido p-toluensolfonico, acido metansolfonico, acido ossalico, acido p-bromofenil-solfonico, acido carbonico, acido succinico, acido citrico, acido benzoico, acido acetico, e simili. Esempi di tali sali includono il solfato, piosolfato, bisolfato, solfito, bisolfito, fosfato, monoidrogenfosfato, diidrogenfosfato, metafosfato, pirofosfato, cloruro, bromuro, ioduro, acetato, propionato, decanoato, caprilato, acrilato, formato, isobutirrato, caproato, eptanoato, propiolato, ossalato, malonato, succinato, suberato, sebacato, fumarato, maleato, butin-1,4-dioato, esin-1,6-dioato, benzoato, clorobenzoato, metilbenzoato, dinitrobenzoato, idrossibenzoato, metossibenzoato, ftalato, solfonato, xilensolfonato, fenilacetato, fenilpropionato, fenilbutirrato, citrato, lattato, gamma-idrossibutirrato, glicolato, tartrato, metansolfonato, propansolfonato, naftalen-1-solfonato, naftalene-2-solfonato, mandelato, e simili.

Composizioni farmaceutiche incluso Formula (I) Emitartrato

Formulazioni e modi di somministrazione adatti per il composto di Formula (I) o un suo sale farmaceuticamente accettabile (incluso il suo sale Emitartrato) includono quelle descritte nel brevetto US no. 7,253,185. Una formulazione preferita per Formula (I) Emitartrato è descritta nei seguenti paragrafi.

Viene descritta nella presente una composizione farmaceutica comprendente Formula (I) Emitartrato, almeno un riempitivo solubile in acqua, almeno un riempitivo insolubile in acqua, almeno un legante, e almeno un lubrificante. Riempitivi solubili in acqua adatti possono includere, per esempio, lattosio anidro, lattosio monoidrato, mannitolo, cloruro di sodio, zucchero in polvere, sorbitolo, saccarosio, inositolo e amido pregelatinizzato. Riempitivi insolubili in acqua adatti possono includere, per esempio, cellulosa microcristallina, fosfato di calcio e amido. Leganti adatti possono includere, per esempio, amido pregelatinizzato, sodio carbossimetil cellulosa, idrossipropil cellulosa, idrossipropil metil cellulosa, polivinil pirrolidone, copolividone, gelatina, gomme naturali, pasta di amido, saccarosio, sciroppo di mais, polietilen glicoli e sodio alginato. Lubrificanti adatti possono includere, per esempio, olio vegetale idrogenato, calcio stearato, e gliceril beenato. In un caso della composizione farmaceutica, il riempitivo solubile in acqua è selezionato dal gruppo che consiste in lattosio anidro, lattosio monoidrato, mannitolo, cloruro di sodio, zucchero in polvere, sorbitolo, saccarosio, inositolo e amido pregelatinizzato; il riempitivo insolubile in acqua è selezionato dal gruppo che consiste in cellulosa

microcristallina, fosfato di calcio e amido, il legante è selezionato dal gruppo che consiste in amido pregelatinizzato, sodio carbossimetil cellulosa, idrossipropil cellulosa, idrossipropil metil cellulosa, polivinil pirrolidone, copolividone, gelatina, gomme naturali, pasta di amido, saccarosio, sciroppo di mais, polietilen glicoli e sodio alginato; e il lubrificante è selezionato dal gruppo che consiste in olio vegetale idrogenato, calcio stearato, e gliceril beenato.

La formula farmaceutica comprende tra l'8% in peso al 32% in peso, tra l'8% in peso al 24% in peso, tra il 12% in peso al 20% in peso o tra il 14% in peso al 18% in peso del riempitivo insolubile in acqua in base a solidi anidri.

La formula farmaceutica comprende tra il 26% in peso al 50% in peso, tra il 30% in peso al 46% in peso, tra il 34% in peso al 46% in peso o tra il 38% in peso al 44% in peso del riempitivo solubile in acqua in base a solidi anidri.

La composizione farmaceutica comprende tra il 30% in peso e 45% in peso, tra il 35% in peso e il 40% in peso e dal 36% in peso al 39% in peso di Formula (I) Emitartrato in base a solidi anidri.

La formulazione farmaceutica comprende tipicamente tra il 2% in peso e il 6% in peso di legante in base a solidi anidri.

La formulazione farmaceutica comprende tipicamente tra lo 0,1% in peso e il 2% in peso di legante in base a solidi anidri.

In un caso specifico, la formula farmaceutica comprende tra l'8% in peso al 32% in peso di riempitivo insolubile in acqua, tra il 26% in

peso al 50% in peso di riempitivo solubile in acqua, tra il 30% in peso e il 45% in peso di Formula (I) Emitartrato, tra il 2% in peso e il 6% in peso di legante e tra lo 0,1% in peso e il 2% in peso di legante, tutti in base a solidi anidri. Più specificamente, il riempitivo solubile in acqua è lattosio monoidrato; e il riempitivo insolubile in acqua è cellulosa microcristallina. Ancora più specificamente il riempitivo solubile in acqua è lattosio monoidrato; il riempitivo insolubile in acqua è cellulosa microcristallina; il legante è idrossipropil metilcellulosa; e il lubrificante è gliceril beenato.

In un caso specifico, la formula farmaceutica comprende tra l'8% in peso al 32% in peso di riempitivo insolubile in acqua, tra il 26% in peso al 50% in peso di riempitivo solubile in acqua, tra il 35% in peso e il 40% in peso di Formula (I) Emitartrato, tra il 2% in peso e il 6% in peso di legante e tra lo 0,1% in peso e il 2% in peso di legante, tutti in base a solidi anidri. Più specificamente, il riempitivo solubile in acqua è lattosio monoidrato; e il riempitivo insolubile in acqua è cellulosa microcristallina. Ancora più specificamente il riempitivo solubile in acqua è lattosio monoidrato; il riempitivo insolubile in acqua è cellulosa microcristallina; il legante è idrossipropil metilcellulosa; e il lubrificante è gliceril beenato.

In un altro caso specifico, la formula farmaceutica comprende tra il 8% in peso al 24% in peso di riempitivo insolubile in acqua, tra il 30% in peso al 46% in peso di riempitivo solubile in acqua, tra il 35% in peso e il 40% in peso di Formula (I) Emitartrato, tra il 2% in peso e il 6%

in peso di legante e tra lo 0,1% in peso e il 2% in peso di legante, tutti in base a solidi anidri. Più specificamente, il riempitivo solubile in acqua è lattosio monoidrato; e il riempitivo insolubile in acqua è cellulosa microcristallina. Ancora più specificamente il riempitivo solubile in acqua è lattosio monoidrato; il riempitivo insolubile in acqua è cellulosa microcristallina; il legante è idrossipropil metilcellulosa; e il lubrificante è gliceril beenato.

In un altro caso specifico, la formula farmaceutica comprende tra il 12% in peso al 20% in peso di riempitivo insolubile in acqua, tra il 34% in peso al 46% in peso di riempitivo solubile in acqua, tra il 35% in peso e il 40% in peso di Formula (I) Emitartrato, tra il 2% in peso e il 6% in peso di legante e tra lo 0,1% in peso e il 2% in peso di legante, tutti in base a solidi anidri. Più specificamente, il riempitivo solubile in acqua è lattosio monoidrato; e il riempitivo insolubile in acqua è cellulosa microcristallina. Ancora più specificamente il riempitivo solubile in acqua è lattosio monoidrato; il riempitivo insolubile in acqua è cellulosa microcristallina; il legante è idrossipropil metilcellulosa; e il lubrificante è gliceril beenato.

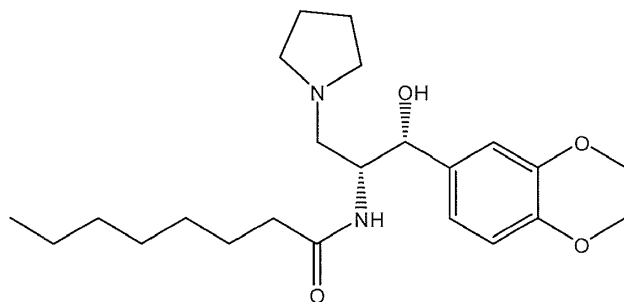
In un altro caso specifico, la formula farmaceutica comprende tra il 14% in peso al 18% in peso di riempitivo insolubile in acqua, tra il 38% in peso al 44% in peso di riempitivo solubile in acqua, tra il 35% in peso e il 40% in peso di Formula (I) Emitartrato, tra il 2% in peso e il 6% in peso di legante e tra lo 0,1% in peso e il 2% in peso di legante, tutti in base a solidi anidri. Più specificamente, il riempitivo solubile in acqua è

lattosio monoidrato; e il riempitivo insolubile in acqua è cellulosa microcristallina. Ancora più specificamente il riempitivo solubile in acqua è lattosio monoidrato; il riempitivo insolubile in acqua è cellulosa microcristallina; il legante è idrossipropil metilcellulosa; e il lubrificante è gliceril beenato.

In un altro caso specifico, la formula farmaceutica comprende tra il 14% in peso al 18% in peso di riempitivo insolubile in acqua, tra il 38% in peso al 44% in peso di riempitivo solubile in acqua, tra il 36% in peso e il 39% in peso di Formula (I) Emitartrato, tra il 2% in peso e il 6% in peso di legante e tra 0,1% in peso e 2% in peso di legante, tutti in base a solidi anidri. Più specificamente, il riempitivo solubile in acqua è lattosio monoidrato; e il riempitivo insolubile in acqua è cellulosa microcristallina. Ancora più specificamente il riempitivo solubile in acqua è lattosio monoidrato; il riempitivo insolubile in acqua è cellulosa microcristallina; il legante è idrossipropil metilcellulosa; e il lubrificante è gliceril beenato.

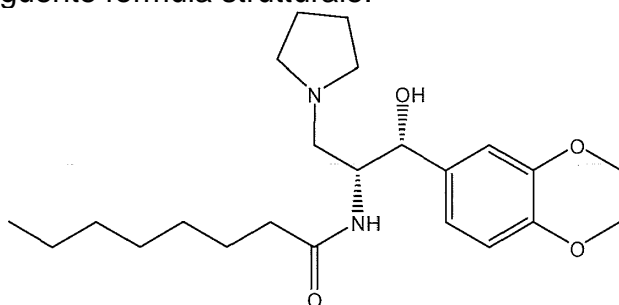
Alcuni aspetti della presente divulgazione includono quelli come descrittine nei seguenti paragrafi numerati.

Paragrafo 1. Il sale Emitartrato di un composto rappresentato dalla seguente formula strutturale:



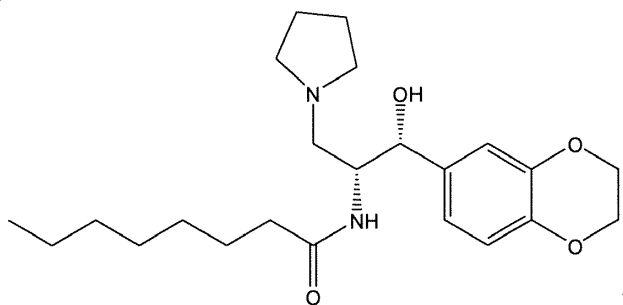
in cui il sale è un sale amorfo.

Paragrafo 2. Il sale Emitartrato di un composto rappresentato dalla seguente formula strutturale:



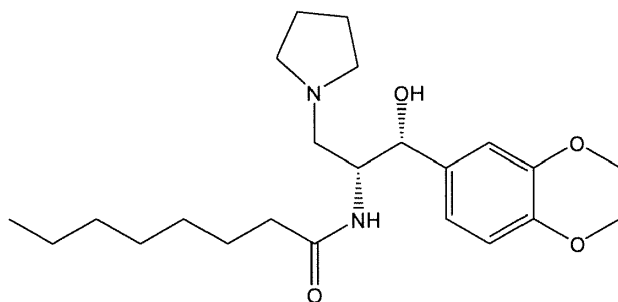
in cui almeno il 70% in peso del sale è cristallino.

Paragrafo 3. Il sale Emitartrato di un composto rappresentato dalla seguente formula strutturale:



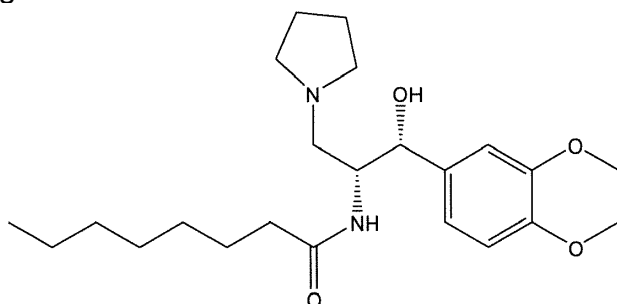
in cui almeno il 70% in peso del sale è in una singola forma cristallina.

Paragrafo 4. Il sale Emitartrato di un composto rappresentato dalla seguente formula strutturale:



in cui almeno il 99% in peso del sale è cristallino.

Paragrafo 5. Il sale Emitartrato di un composto rappresentato dalla seguente formula strutturale:



in cui almeno il 99% in peso del sale è in una singola forma cristallina.

Paragrafo 6. Il sale Emitartrato di uno qualsiasi dei Paragrafi 1-5, in cui il sale Emitartrato è selezionato da D-Emitartrato, L-Emitartrato, acido emimesotartarico o D,L-Emitartrato racemico.

Paragrafo 7. Il sale Emitartrato sale Emitartrato di uno qualsiasi dei Paragrafi 1-5, in cui il sale Emitartrato è L-Emitartrato.

Paragrafo 8. Il sale dei Paragrafi 3 o 5, in cui almeno il 70% in peso del sale è la singola forma cristallina Forma A.

Paragrafo 9. Il sale dei Paragrafi 3 o 5, in cui la singola forma cristallina è caratterizzata da almeno un picco principale di diffrazione di raggi x di polveri agli angoli 2θ di $5,1^\circ$, $6,6^\circ$, $10,7^\circ$, $11,0^\circ$, $15,9^\circ$, e $21,7^\circ$.

Paragrafo 10. Il sale dei Paragrafi 3 o 5, in cui la singola forma cristallina è caratterizzata da almeno due picchi principali di diffrazione di raggi x di polveri agli angoli 2θ di $5,1^\circ$, $6,6^\circ$, $10,7^\circ$, $11,0^\circ$, $15,9^\circ$, e $21,7^\circ$.

Paragrafo 11. Il sale dei Paragrafi 3 o 5, in cui la singola forma cristallina è caratterizzata da almeno tre picchi principali di diffrazione di raggi x di polveri agli angoli 2θ di $5,1^\circ$, $6,6^\circ$, $10,7^\circ$, $11,0^\circ$, $15,9^\circ$, e $21,7^\circ$.

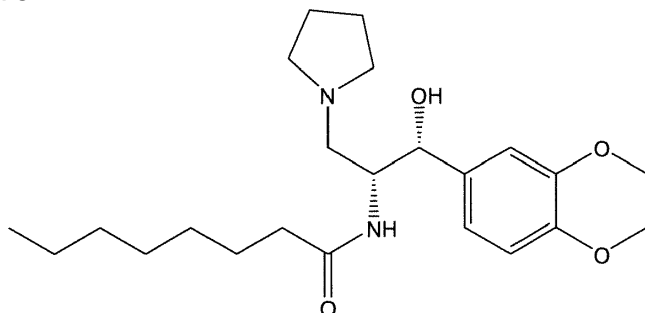
Paragrafo 12. Il sale dei Paragrafi 3 o 5, in cui la singola forma cristallina è caratterizzata da almeno quattro picchi principali di diffrazione di raggi x di polveri agli angoli 2θ di $5,1^\circ$, $6,6^\circ$, $10,7^\circ$, $11,0^\circ$, $15,9^\circ$, e $21,7^\circ$.

Paragrafo 13. Il sale dei Paragrafi 3 o 5, in cui la singola forma cristallina è caratterizzata da picchi principali di diffrazione di raggi x di polveri agli angoli 2θ di $5,1^\circ$, $6,6^\circ$, $10,7^\circ$, $11,0^\circ$, $15,9^\circ$, e $21,7^\circ$.

Paragrafo 14. Il sale dei Paragrafi 3 o 5, in cui la singola forma cristallina è caratterizzata da diffrazione di raggi x di polveri picchi agli angoli 2θ di $5,1^\circ$, $6,6^\circ$, $10,7^\circ$, $11,0^\circ$, $13,3^\circ$, $15,1^\circ$, $15,9^\circ$, $16,5^\circ$, $17,6^\circ$, $18,6^\circ$, $18,7^\circ$, $19,0^\circ$, $20,2^\circ$, $21,7^\circ$ e $23,5^\circ$,

Paragrafo 15. Il sale dei Paragrafi 3 o 5, in cui la singola forma cristallina è caratterizzata da profilo di diffrazione di raggi x di polveri di FIG. 1.

Paragrafo 16. Una composizione farmaceutica comprendente il sale Emitartrato di un composto rappresentato dalla seguente formula strutturale:



e un trasportatore o diluente farmaceuticamente accettabile.

Paragrafo 17. La composizione farmaceutica del Paragrafo 16, in cui il sale è un sale amorfo.

Paragrafo 18. La composizione farmaceutica del Paragrafo 16, in cui almeno il 70% in peso del sale è cristallino.

Paragrafo 19. La composizione farmaceutica del Paragrafo 16, in cui almeno il 70% in peso del sale è in a singola forma cristallina.

Paragrafo 20. La composizione farmaceutica del Paragrafo 16, in cui almeno il 99% in peso del sale è cristallino.

Paragrafo 21. La composizione farmaceutica del Paragrafo 16, in cui almeno il 99% in peso del sale è in a singola forma cristallina.

Paragrafo 22. La composizione farmaceutica del Paragrafo 16, in cui il sale Emitartrato è selezionato da D-Emitartrato, L- Emitartrato, acido emimesotartarico o D,L-Emitartrato racemico.

Paragrafo 23. La composizione farmaceutica del Paragrafo 16, in cui il sale Emitartrato è L-Emitartrato.

Paragrafo 24. La composizione farmaceutica del Paragrafo 19 o 21, in cui almeno il 70% in peso del sale è la singola forma cristallina Forma A.

Paragrafo 25. La composizione farmaceutica del Paragrafo 19 o 21, in cui la singola forma cristallina è caratterizzata da almeno un picco principale di diffrazione di raggi x di polveri agli angoli 2θ di $5,1^\circ$, $6,6^\circ$, $10,7^\circ$, $11,0^\circ$, $15,9^\circ$, e $21,7^\circ$.

Paragrafo 26. La composizione farmaceutica del Paragrafo 19 o 21, in cui la singola forma cristallina è caratterizzata da almeno due picchi principali di diffrazione di raggi x di polveri agli angoli 2θ di $5,1^\circ$, $6,6^\circ$, $10,7^\circ$, $11,0^\circ$, $15,9^\circ$, e $21,7^\circ$.

Paragrafo 27. La composizione farmaceutica del Paragrafo 19 o 21, in cui la singola forma cristallina è caratterizzata da almeno tre picchi principali di diffrazione di raggi x di polveri agli angoli 2θ di $5,1^\circ$, $6,6^\circ$, $10,7^\circ$, $11,0^\circ$, $15,9^\circ$, e $21,7^\circ$.

Paragrafo 28. La composizione farmaceutica del Paragrafo 19 o 21, in cui la singola forma cristallina è caratterizzata da almeno quattro picchi principali di diffrazione di raggi x di polveri agli angoli 2θ di $5,1^\circ$, $6,6^\circ$, $10,7^\circ$, $11,0^\circ$, $15,9^\circ$, e $21,7^\circ$.

Paragrafo 29. La composizione farmaceutica del Paragrafo 19 o 21, in cui la singola forma cristallina è caratterizzata da picchi principali di diffrazione di raggi x di polveri agli angoli 2θ di $5,1^\circ$, $6,6^\circ$, $10,7^\circ$, $11,0^\circ$, $15,9^\circ$, e $21,7^\circ$.

Paragrafo 30. La composizione farmaceutica del Paragrafo 19 o 21, in cui la singola forma cristallina è caratterizzata da diffrazione di raggi x di polveri picchi agli angoli 2θ di 5,1°, 6,6°, 10,7°, 11,0°, 13,3°, 15,1°, 15,9°, 16,5°, 17,6°, 18,6°, 18,7°, 19,0°, 20,2°, 21,7° e 23,5°.

Paragrafo 31. La composizione farmaceutica del Paragrafo 19 o 21, in cui la singola forma cristallina è caratterizzata da profilo di diffrazione di raggi x di polveri di FIG. 1.

Paragrafo 32. Un metodo di trattamento di un soggetto con malattia di Gaucher, comprendente la somministrazione al soggetto di una quantità efficace del sale Emitartrato di uno qualsiasi dei Paragrafi 1-Paragrafo 15.

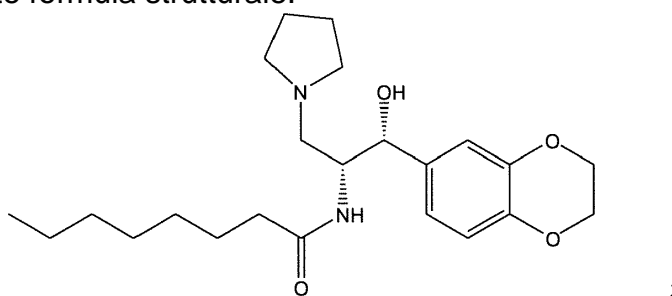
Paragrafo 33. Un metodo di trattamento di un soggetto con malattia di Fabry, comprendente la somministrazione al soggetto di una quantità efficace del sale Emitartrato di uno qualsiasi dei Paragrafi 1-Paragrafo 15.

Paragrafo 34. Un metodo di inibizione di glucosilceramide sintasi o di riduzione delle concentrazioni di glicosfingolipidi in un soggetto che ne necessita mediante somministrazione al soggetto di una quantità efficace del sale Emitartrato di uno qualsiasi dei Paragrafi 1-Paragrafo 15.

Paragrafo 35. Il metodo del Paragrafo 32, 33 o 34, comprendente la somministrazione del sale Emitartrato a una dose giornaliera da 25 milligrammi a 200 milligrammi.

Paragrafo 36. Il metodo del Paragrafo 32, 33 o 34, comprendente la somministrazione del sale Emitartrato a una dose bigiornaliera di 50 milligrammi.

Paragrafo 37. Un metodo di trattamento di un soggetto con malattia di Gaucher, comprendente la somministrazione al soggetto di una quantità efficace di un primo composto rappresentato dalla seguente formula strutturale:



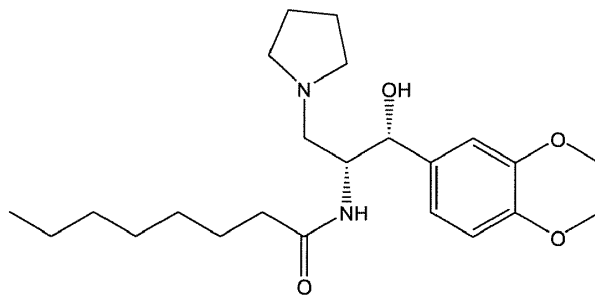
o un suo sale farmaceuticamente accettabile in combinazione con una quantità efficace di un secondo agente terapeutico che è efficace per trattare malattia di Gaucher.

Paragrafo 38. Il metodo del Paragrafo 37 in cui il secondo agente terapeutico è imiglucerasi.

Paragrafo 39. Il metodo del Paragrafo 37 in cui il secondo agente terapeutico è isofagomina.

Paragrafo 40. Il metodo del Paragrafo 37 in cui il secondo agente terapeutico è miglustat.

Paragrafo 41. Un metodo di trattamento di un soggetto con malattia di Fabry, il metodo comprendendo la somministrazione al soggetto di una quantità efficace di un primo agente terapeutico rappresentato dalla seguente formula strutturale:



o un suo sale farmaceuticamente accettabile in combinazione con una quantità efficace di a secondo agente terapeutico che è efficace per trattare malattia di Fabry.

Paragrafo 42. Il metodo del Paragrafo 41 dove il secondo agente terapeutico è migalastat.

Paragrafo 43. Il metodo del Paragrafo 41 dove il secondo agente terapeutico è Agalsidasi β .

Paragrafo 44. Il metodo di uno qualsiasi dei Paragrafi 37-43 in cui il primo agente terapeutico è somministrato come l'Emitartrato di uno qualsiasi dei Paragrafi 1-15.

Paragrafo 45. Il metodo di qualsiasi dei Paragrafi 37-43, in cui il trattamento con il primo agente terapeutico viene iniziato dopo il trattamento in un periodo di almeno dieci settimane con il secondo agente terapeutico.

Paragrafo 46. Il metodo di uno qualsiasi dei Paragrafi 37-43, in cui il trattamento con il primo agente terapeutico viene iniziato dopo trattamento con il secondo agente terapeutico e in cui il trattamento con il primo agente terapeutico è avviato dopo che la conta piastrinica del soggetto è uguale o superiore a 100.000 mm^3 ; la concentrazione di

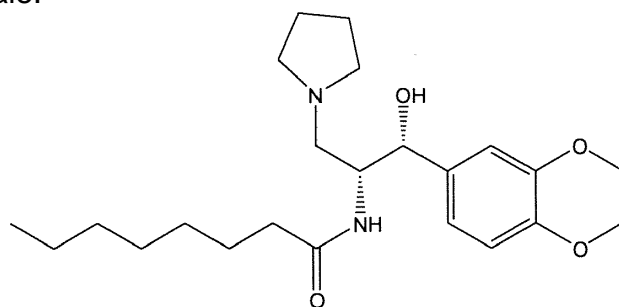
emoglobina è uguale o superiore a 11 g/dl (femmina) o 12 g/dl (maschio); e/o il volume della milza del soggetto è inferiore o uguale a 10 multipli del normale e i volumi del fegato sono inferiori o uguali a 1,5 multipli del normale.

Paragrafo 47. Il metodo del Paragrafo 45 o 46 in cui il trattamento con il secondo agente terapeutico è interrotto dopo l'inizio del trattamento con il primo agente terapeutico.

Paragrafo 48. Il metodo di uno qualsiasi dei Paragrafi 37-47, comprendente la somministrazione del primo agente terapeutico a una dose bigiornaliera da 25 milligrammi a 200 milligrammi.

Paragrafo 49. Il metodo di uno qualsiasi dei Paragrafi 37-47, comprendente la somministrazione del primo agente terapeutico a una dose bigiornaliera di 50 milligrammi.

Paragrafo 50. Una composizione farmaceutica comprendente: il sale Emitartrato di un composto rappresentato dalla seguente formula strutturale:



- almeno un riempitivo solubile in acqua;
- almeno un riempitivo insolubile in acqua;
- almeno un legante; e
- almeno un lubrificante.

Paragrafo 51. La composizione farmaceutica del Paragrafo 50, in cui il sale Emitartrato è il sale Emitartrato di uno qualsiasi dei Paragrafi 1-Paragrafo 15.

Paragrafo 52. La composizione farmaceutica del Paragrafo 50, in cui il riempitivo solubile in acqua è selezionato dal gruppo che consiste in lattosio anidro, lattosio monoidrato, mannitolo, cloruro di sodio, zucchero in polvere, sorbitolo, saccarosio, inositolo e amido pregelatinizzato.

Paragrafo 53. La composizione farmaceutica del Paragrafo 50, in cui il riempitivo insolubile in acqua è selezionato dal gruppo che consiste in cellulosa microcristallina, fosfato di calcio e amido.

Paragrafo 54. La composizione farmaceutica del Paragrafo 50, in cui il legante è selezionato dal gruppo che consiste in amido pregelatinizzato, sodio carbossimetil cellulosa, idrossipropil cellulosa, idrossipropil metil cellulosa, polivinil pirrolidone, copolividone, gelatina, gomme naturali, pasta di amido, saccarosio, sciroppo di mais, polietilen glicoli e sodio alginato.

Paragrafo 55. La composizione farmaceutica del Paragrafo 50, in cui il lubrificante è selezionato dal gruppo che consiste in olio vegetale idrogenato, calcio stearato, e gliceril beenato.

Paragrafo 56. La composizione farmaceutica del Paragrafo 50, in cui il riempitivo solubile in acqua è selezionato dal gruppo che consiste in lattosio anidro, lattosio monoidrato, mannitolo, cloruro di sodio, zucchero in polvere, sorbitolo, saccarosio, inositolo e amido

pregelatinizzato; il riempitivo insolubile in acqua è selezionato dal gruppo che consiste in cellulosa microcristallina, fosfato di calcio e amido; il legante è selezionato dal gruppo che consiste in amido pregelatinizzato, sodio carbossimetil cellulosa, idrossipropil cellulosa, idrossipropil metil cellulosa, polivinil pirrolidone, copolividone, gelatina, gomme naturali, pasta di amido, saccarosio, sciroppo di mais, polietilen glicoli e sodio alginato; e il lubrificante è selezionato dal gruppo che consiste in olio vegetale idrogenato, calcio stearato, e gliceril beenato.

Paragrafo 57. La composizione farmaceutica del Paragrafo 56, in cui la composizione comprende dal 26% in peso al 50% in peso del riempitivo solubile in acqua in base a solidi anidri.

Paragrafo 58. La composizione farmaceutica del Paragrafo 56, in cui la composizione comprende dall'8% in peso al 32% in peso del riempitivo insolubile in acqua in base a solidi anidri.

Paragrafo 59. La composizione farmaceutica del Paragrafo 56, in cui la composizione comprende dall'8% in peso al 24% in peso del riempitivo insolubile in acqua in base a solidi anidri.

Paragrafo 60. La composizione farmaceutica del Paragrafo 56, in cui la composizione comprende dal 12% in peso al 20% in peso del riempitivo insolubile in acqua in base a solidi anidri.

Paragrafo 61. La composizione farmaceutica del Paragrafo 56, in cui la composizione comprende dal 14% in peso al 18% in peso del riempitivo insolubile in acqua in base a solidi anidri.

Paragrafo 62. La composizione farmaceutica del Paragrafo 56, in cui la composizione comprende dal 2% in peso al 6% in peso del legante in base a solidi anidri.

Paragrafo 63. La composizione farmaceutica del Paragrafo 56, in cui la composizione comprende dallo 0,1% in peso al 2% in peso di un lubrificante in base a solidi anidri.

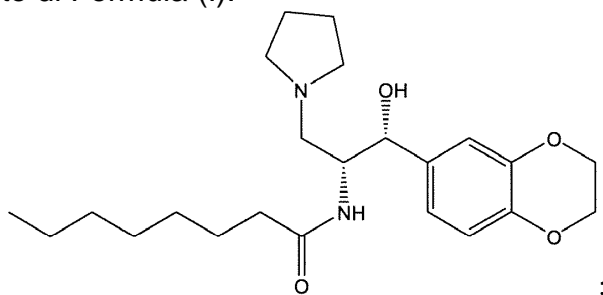
Paragrafo 64. La composizione farmaceutica del Paragrafo 56, in cui la composizione comprende dal 35% in peso al 40% in peso del sale Emitartrato, dal 26% in peso al 50% in peso del riempitivo solubile in acqua; dal 8% in peso al 32% in peso del riempitivo insolubile in acqua; dal 2% in peso al 6% in peso di the legante; e dallo 0,1% in peso al 2% in peso del lubrificante, tutti in base a solidi anidri.

Paragrafo 65. La composizione farmaceutica del Paragrafo 56, in cui il riempitivo solubile in acqua è lattosio monoidrato; il riempitivo insolubile in acqua è cellulosa microcristallina; il legante è idrossipropil metilcellulosa; e il lubrificante è gliceril beenato.

Paragrafo 66. La composizione farmaceutica del Paragrafo 65, in cui la composizione comprende dal 35% in peso al 40% in peso del sale Emitartrato, dal 26% in peso al 50% in peso del lattosio monoidrato; dall'8% in peso al 32% in peso della cellulosa microcristallina; dal 2% in peso al 6% in peso dell'idrossipropil metilcellulosa; e dallo 0,1% in peso al 2% in peso del gliceril beenato, tutti in base a solidi anidri.

Paragrafo 67. Un metodo di trattamento di un soggetto con malattia di Fabry, il metodo comprendendo:

a) somministrazione al soggetto di una quantità efficace di un composto di Formula (I):



o un suo sale farmaceuticamente accettabile;

b) analisi del soggetto per determinare se il soggetto è un metabolizzatore P450 scarso, intermedio o forte/ultrarapido;

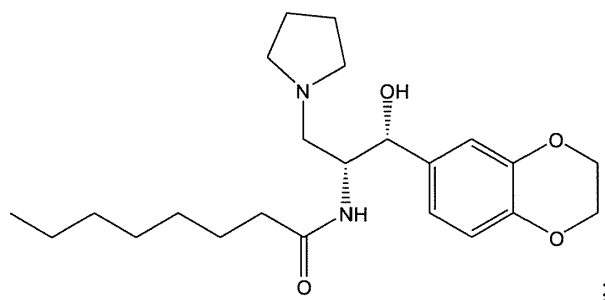
c) se il soggetto è un metabolizzatore P450 intermedio o forte/ultra rapido,

determinazione di una quantità efficace tarata del composto; e

d) somministrazione al soggetto di una quantità efficace tarata del composto di Formula (I) se il soggetto è un metabolizzatore P450 intermedio o forte/ultra rapido e somministrazione al soggetto di una quantità efficace del composto di Formula (I) se il soggetto è uno scarso metabolizzatore P450.

Paragrafo 68. Un metodo di trattamento di un soggetto con malattia di Gaucher, il metodo comprendendo:

a) somministrazione al soggetto di una quantità efficace di un composto di Formula (I):



o un suo sale farmaceuticamente accettabile;

b) analisi del soggetto per determinare se il soggetto è un metabolizzatore P450 scarso, intermedio o forte/ultrarapido;

c) se il soggetto è un metabolizzatore P450 intermedio o forte/ultra rapido, determinazione di una quantità efficace tarata del composto; e

d) somministrazione al soggetto di una quantità efficace tarata del composto di Formula (I) se il soggetto è un metabolizzatore P450 intermedio o forte/ultra rapido e somministrazione al soggetto di una quantità efficace del composto di Formula (I) se il soggetto è uno scarso metabolizzatore P450.

Paragrafo 69. Il metodo del Paragrafo 67 o 68, in cui il composto è il sale Emitartrato di uno qualsiasi dei Paragrafi 1-Paragrafo 15.

Paragrafo 70. Il metodo di uno qualsiasi dei Paragrafi 67-69, in cui l'analisi comprende il monitoraggio dei livelli plasmatici minimi del composto nel soggetto per un periodo di almeno una settimana.

Paragrafo 71. Il metodo di uno qualsiasi dei Paragrafi 67-69, in cui l'analisi comprende il monitoraggio dei livelli plasmatici minimi del composto nel soggetto per un periodo di almeno dieci settimane.

Paragrafo 72. Il metodo di uno qualsiasi dei Paragrafi 67-71, in cui il soggetto è un metabolizzatore enzima P450 intermedio o forte/ultra rapido se i livelli plasmatici minimi del composto nel soggetto sono inferiori a 5 ng/ml e la quantità efficace tarata del composto è selezionata per determinare livelli minimi del composto nel soggetto almeno di 5 ng/mg.

Paragrafo 73. Il metodo di uno qualsiasi dei Paragrafi 67-71, in cui il soggetto è un enzima del P450 scarso se i livelli plasmatici minimi del composto sono almeno di 5 ng/ml dopo essere stato trattato con una quantità efficace del composto.

Paragrafo 74. Il metodo di uno qualsiasi dei Paragrafi 67 o 68, in cui l'analisi in fase b) avviene prima o dopo l'inizio del trattamento.

Paragrafo 75. Il metodo di uno qualsiasi dei Paragrafi 67-74, in cui l'enzima del P450 è enzima CYP2D6 e/o enzima CYP3A4.

Paragrafo 76. Il metodo di uno qualsiasi dei Paragrafi 67-75, in cui il soggetto è uno scarso metabolizzatore P450 in conseguenza della co-somministrazione di un inibitore dell'enzima CYP2D6 o dell'enzima CYP3A4.

Paragrafo 77. Il metodo del Paragrafo 76, in cui l'inibitore è selezionato dal gruppo che consiste in paroxetina, fluoxetina, quinidina, e ketoconazolo.

Paragrafo 78. Il metodo del Paragrafo 67 o 69, in cui l'analisi in fase b) è mediante genotipaggio per enzima del P450.

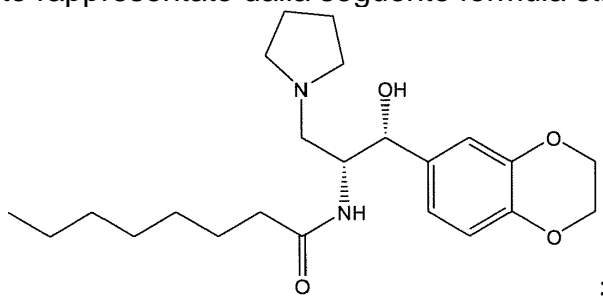
Paragrafo 79. Il metodo del Paragrafo 78 in cui l'enzima del P450 è CYP2D6.

Paragrafo 80. Il metodo di uno qualsiasi dei Paragrafi 67-79, in cui la quantità efficace del composto è una dose bigiornaliera da 25 milligrammi a 200 milligrammi.

Paragrafo 81. Il metodo di uno qualsiasi dei Paragrafi 67-79, in cui la quantità efficace del composto è una dose bigiornaliera di 50 milligrammi.

Paragrafo 82. Un metodo di trattamento di un soggetto con malattia di Fabry comprendente the fasi di:

a) somministrazione al soggetto di una quantità efficace di un composto rappresentato dalla seguente formula strutturale:



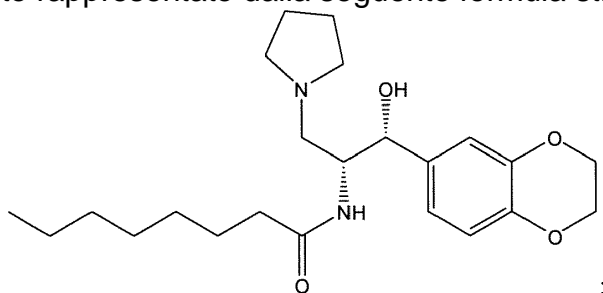
o un suo sale farmaceuticamente accettabile;

b) valutazione nel soggetto dei livelli plasmatici minimi del composto;

c) adeguamento della quantità di composto somministrata al soggetto affinché i livelli plasmatici minimi del composto nel soggetto siano almeno di 5 ng/ml.

Paragrafo 83. Un metodo di trattamento di un soggetto con malattia di Gaucher comprendente le fasi di:

a) somministrazione al soggetto di una quantità efficace di un composto rappresentato dalla seguente formula strutturale:



o un suo sale farmaceuticamente accettabile;

b) valutazione nel soggetto dei livelli plasmatici minimi del composto;

c) adeguamento della quantità di composto somministrata al soggetto affinché i livelli plasmatici minimi del composto nel soggetto sono almeno di 5 ng/ml.

Paragrafo 84. Il metodo del Paragrafo 82 o 83, in cui il soggetto è analizzato prima che il trattamento con il composto abbia inizio per valutare se il soggetto è un metabolizzatore P450 scarso, intermedio o forte/ultrarapido, e in cui la quantità efficace è determinata in base al fatto che il soggetto sia un metabolizzatore P450 scarso, intermedio o forte/ultrarapido.

Paragrafo 85. Il metodo del Paragrafo 82, 83 o 84, in cui il composto è il sale Emitartrato di uno qualsiasi dei Paragrafi 1-Paragrafo 15.

Paragrafo 86. Il metodo del Paragrafo 82 o 83, in cui in fase b) è valutata anche la C_{max} del composto nel soggetto e in cui in fase c) la quantità di composto somministrato al soggetto viene adeguata affinché

i livelli plasmatici minimi del composto nel soggetto siano almeno di 5 ng/ml e la C_{max} del composto nel soggetto sia inferiore a 100 ng/ml.

Paragrafo 87. Il metodo di uno qualsiasi dei Paragrafi 82-86, in cui l'enzima del P450 è enzima CYP2D6 e/o enzima CYP3A4.

Paragrafo 88. Il metodo di uno qualsiasi dei Paragrafi 82-86, in cui il soggetto è uno scarso metabolizzatore con enzimi P450 in conseguenza della co-somministrazione di un inibitore di enzimi del P450.

Paragrafo 89. Il metodo del Paragrafo 88, in cui l'inibitore è selezionato dal gruppo che consiste in paroxetina, fluoxetina, quinidina, e ketoconazolo.

Paragrafo 90. Il metodo di uno qualsiasi dei Paragrafi 82-86, in cui l'espressione di enzimi del P450 nel soggetto viene valutata per determinare se il soggetto è un metabolizzatore P450 scarso, intermedio o forte/ultrarapido.

Paragrafo 91. Il metodo del Paragrafo 90 in cui l'enzima p450 è CYP2D6 o CYP3A4.

Paragrafo 92. Il metodo di qualsiasi dei Paragrafi 82-90, in cui la quantità efficace del composto è una dose bigiornaliera da 25 milligrammi a 200 milligrammi.

Paragrafo 93. Il metodo di qualsiasi dei Paragrafi 82-90, in cui la quantità efficace del composto è una dose bigiornaliera di 50 milligrammi.

L'invenzione viene illustrata dai seguenti esempi, che non sono intesi essere limitanti in alcun modo.

SPERIMENTALE

Esempio 1: Preparazione di Sali di Formula (I)

Il sale Emitartrato di Formula I è facilmente cristallizzato e mostra molte proprietà vantaggiose rispetto ad altri sali. Per esempio, sono stati usati i seguenti acidi nella preparazione di sali del composto rappresentato dalla Formula (I): acido citrico (generando sali in rapporti 1:1, 1:2, e 1:3 (sale:Formula I)); L-malico (1:1 e 1:2); acido metansolfonico (1:1); acido fumarico (1:1 e 1:2); acido cloridrico (1:1); acido acetico (1:1) e acido tartarico (1:1 e 1:2). Solamente i sali generati da acido cloridrico (1:1); acido tartarico (1:1) e acido tartarico (1:2) erano in forma solida. Di questi tre sali, è stato trovato che acido cloridrico (1:1) e acido tartarico (1:1) erano igroscopici e non cristallini e pertanto non accettabili per uso in un prodotto farmaceutico. È stato trovato che l'Emitartrato (1 sale: 2 Formula I) del composto rappresentato dalla Formula I era cristallino e non igroscopico.

Preparazione di Formula (I) Emitartrato con acetone

Acido L-tartarico (6,02 g, 40,11 mmol, 0,497 equivalenti) è stato disciolto in acetone (175 mL) sottoponendo a refluxo la soluzione e quindi raffreddando a temperatura ambiente. Formula (I) Base libera (32,67 g, 80,76 mmol) è stata disciolta in acetone (300 mL) a temperatura ambiente. La soluzione di acido L-tartarico è stata aggiunta alla soluzione di Formula (I) Base libera a temperatura ambiente per 15

min. Un precipitato bianco si è formato a metà dell'aggiunta. La miscela è stata agitata a temperatura ambiente per 0,5 ore e quindi sottoposta brevemente a reflusso e raffreddata a temperatura ambiente. Dopo agitazione a temperatura ambiente per 0,5 h, il precipitato bianco è stato filtrato. Il solido bianco è stato lavato due volte con acetone (2 x 130 mL). Il solido è stato essiccato all'aria e quindi sotto vuoto essiccato a 55-60 °C. La resa era di 36,66g (95%).

Preparazione di Formula (I) Emitartrato con Metanolo al 5% in Acetone.

Formula (I) Base libera, 10 g/24,7 mmol, è stata disciolta in Metanolo al 5%/Acetone 120 mL o 240 mL. Acido L-tartarico, 1,85 g/12,3 mmol, è stato disciolto in Metanolo al 5%/Acetone 60 mL o 120 mL (N o 2N) riscaldando a 40-45 °C e questa soluzione è stata aggiunta alla prima soluzione. Dopo 1 ora senza precipitazione, 1 mg di Formula (I) Emitartrato è stato aggiunto come germe di cristallizzazione. La precipitazione è avvenuta dopo 5 minuti, e la reazione continuava a rimanere in agitazione per altri 30 minuti. La reazione è stata quindi riscaldata a reflusso per 5 minuti (il precipitato era completamente solubile) e quindi raffreddata a temperatura ambiente in un bagnetto in acqua a 20-22 °C. Si è formato un precipitato e la reazione continuava a rimanere in agitazione per 3 ore. Il prodotto finale è stato raccolto per filtrazione ed è stato lavato con acetone, 2 x 40 mL, e quindi essiccato in stufa sotto vuoto a 55-60 °C per 16 ore. Il peso del prodotto era di 8,72 g/74% di resa.

Preparazione di Formula (I) Emitartrato con Acqua all'1% in Acetone.

Formula (I) Base libera (10 g/24,7 mmol) è stata disciolta in Acqua all'1%/Acetone 120 mL o 240 mL a temperatura ambiente. Acido L-tartarico, 1,85 g/12,3 mmol, è stato disciolto in Acqua all'1%/Acetone 60 mL o 120 mL (N o 2N) riscaldando a 40-45 °C e questa soluzione è stata aggiunta alla prima soluzione. Dopo 1 ora senza precipitazione, 1 mg di Formula (I) Emitartrato è stato aggiunto come germe di cristallizzazione. La precipitazione è avvenuta dopo 5 minuti, e la reazione continuava a rimanere in agitazione per 30. La reazione è stata quindi riscaldata a refluxo per 5 minuti (il precipitato non era completamente solubile) e quindi raffreddata a temperatura ambiente in un bagnetto in acqua a 20-22 °C. Si è formato un precipitato e la reazione continuava a rimanere in agitazione per 3 ore. Il prodotto finale è stato raccolto per filtrazione ed è stato lavato con acetone, 2 x 40 mL e quindi essiccato in stufa sotto vuoto a 55-60 °C per 16 ore. Il peso del prodotto era di 8,62 g, 73% di resa.

Ricristallizzazione di Formula (I) Emitartrato con Metanolo al 5% in Acetone.

Formula (I) Emitartrato (3,06 g) è stato disciolto in 116 mL di metanolo al 5% in acetone a refluxo. La soluzione è stata raffreddata a temperatura ambiente e agitata a temperatura ambiente per 2 h. Il precipitato bianco è stato filtrato e lavato con 10 mL di metanolo al 5% in acetone e quindi acetone (15 mL). Dopo essiccamento sotto vuoto

per 18 h a 55-60 °C, si sono prodotti 2,38 g di Formula (I) Emitartrato (78% di recupero).

Ricristallizzazione di Formula (I) Emitartrato con H₂O all'1% in Acetone.

Formula (I) Emitartrato (3,05 g) è stato disciolto in 125 mL di H₂O all'1% in acetone a refluxo. La soluzione è stata raffreddata a temperatura ambiente e agitata a temperatura ambiente per 2 h. Il precipitato bianco è stato filtrato e lavato con 10 mL di H₂O all'1% in acetone e quindi acetone (15 mL). Dopo essiccamento sotto vuoto per una notte a 55-60 °C, sono stati ottenuti 2,35 g di Formula (I) Emitartrato (77% di recupero).

Esempio 2: Preparazione di Formula (I) Emitartrato cristallino

Formula (I) Emitartrato è stato cristallizzato mediante diversi metodi. Il lotto 1 è stato preparato usando i solventi etil acetato/acetone e essiccato a temperatura ambiente. Il lotto 3 è stato preparato usando i solventi etil acetato/acetone e ricristallizzato da etil acetato. Il lotto 4 è stato ricristallizzato da acetone usando materiale del Lotto 1. Il lotto 5 è stato ricristallizzato da isopropanolo. Il lotto 7 è stato preparato usando il solvente etil acetato/acetone similmente al Lotto 1 ma su larga scala, il Lotto 8 è stato preparato usando solamente acetone senza ulteriore cristallizzazione. Il lotto 9 è stato preparato usando solamente acetone con breve refluxo, nuovamente senza ulteriore ricristallizzazione.

Tabella 1: Sommario di screening di polimorfismi dei Lotti 1-9 di Formula (I) Emitartrato

| Lotto N. | Metodo di processamento | DSC | | Microscopio | TGA |
|-------------|--|--------------------------|----------------|-------------|-----------------------|
| | | Punto di fusione (°C) | Entalpia (J/g) | | |
| 1 | Precipitazione in acetone/etil acetato* | 162 | -81,4 | Cristallo | 99,91% a 100 °C |
| | | | | | 98,73% a 175 °C |
| 2 | Precipitazione in acetone/etil acetato- essiccato a temperatura ambiente* | 164 | -95,6 | Cristallo | N/A |
| 3 | Precipitazione in acetone/etil acetato- essiccato a 55-60 °C | 166 | -97,8 | Cristallo | 100,0% a 100 °C |
| | | | | | 99,98% a 153 °C |
| 4 | Ricristallizzazione da acetone | 166 | -107,2 | Cristallo | 100,2% a 100 °C |

| | | | | | |
|---|--|-----|--------|-------------|-----------------------|
| | | | | | 100,2% a 153 °C |
| 5 | Ricristallizzazione da isopropanolo | 166 | -102,6 | Cristallo | 100,0% a 100 °C |
| | | | | | 100,0% a 153 °C |
| 7 | Precipitazione in acetone/etil acetato | 166 | -99,4 | Cristallo** | 100,1% a 100 °C |
| | | | | | 99,91% a 153 °C |
| 8 | Precipitazione in acetone | 165 | -100,7 | Cristallo** | 100,0% a 100 °C |
| | | | | | 100,0% a 153 °C |
| 9 | Precipitazione in acetone con breve reflusso | 165 | -100,2 | Cristallo** | |

*: contenente una quantità di base libera nel termogramma DSC.

** : contenente abiti variati in questi lotti da forma piatta a bastoncino a ago, bastoncino e forme irregolari.

Le forme cristalline di Formula (I) Emitartrato sono state preparate anche usando evaporazione lenta, raffreddamento lento, raffreddamento rapido e precipitazione con antisolventi con una varietà di solventi.

Metodo di Evaporazione Lenta. Un campione pesato (solitamente 20 mg) è stato trattato con aliquote del solvente test. Le aliquote erano tipicamente 100-200 μ L. Tra le aggiunte di solvente, la miscela è stata agitata o sonicata. Quando i solidi erano disciolti, secondo giudizio di ispezione visiva, la soluzione è stata lasciata evaporare in condizioni ambientali in una provetta aperta coperta da foglio di alluminio perforato con piccoli fori. Le solubilità sono state stimate da questi esperimenti in base al solvente totale aggiunto per ottenere una soluzione trasparente.

Tabella 2: Solubilità approssimata di Formula (I) Emitartrato a temperatura ambiente (20-25 °C).

| Solvente organico | Solubilità approssimata (mg/mL) |
|-------------------|---------------------------------|
| Eptano | Non disponibile |
| Esano | Non disponibile |
| Toluene | <5 |
| Diclorometano | 100 |

| | |
|----------------------------|------|
| Etanolo | 29 |
| Alcol isopropilico | <5 |
| Acetonitrile | <5 |
| Etil Acetato | <5 |
| Metanolo | >200 |
| Acetone | <5 |
| Metil t-butil etere (TBME) | <5 |
| p-Diossano | <5 |
| Tetraidrofurano (THF) | <5 |

Tabella 3: Sommario di polimorfismi usando l'approccio con evaporazione lenta.

| Solvente organico | Forma solida generata da lenta evaporazione | DSC | | Microscopio | TGA |
|-------------------|---|-----------------------|----------------|-------------|--------------------|
| | | Punto di fusione (°C) | Entalpia (J/g) | | |
| Metanolo | No | N/A | N/A | N/A | N/A |
| Etanolo | Sì | 165 | -95,0 | Cristallo** | 100,0% a 100 °C |
| | | | | | 100,0% a 150 °C |

** : le particelle erano a forma piatta e a bastoncino

Metodo di raffreddamento Lento/Rapido. Formula (I) Emitartrato è stato disciolto in un solvente test a 50-60 °C. La soluzione risultante è stata quindi lasciata raffreddare a temperatura ambiente (lento

raffreddamento). Se dopo un giorno non si erano formati solidi, le provette venivano poste in frigorifero. Per esperimenti di raffreddamento rapido, la soluzione risultante è stata quindi lasciata raffreddare in frigorifero. I solidi sono stati raccolti per filtrazione ed essiccati all'aria.

Tabella 4: Sommario di polimorfismi usando l'approccio con raffreddamento lento.

| Solvente organico | Forma solida generata da Raffreddamento Lento | DSC | | Microscopio | TGA |
|-------------------|---|-----------------------|----------------|-------------|--|
| | | Punto di fusione (°C) | Entalpia (J/g) | | |
| Etanolo | Sì | 167 | -106,2 | Cristallo** | 100,1% a 100 °C 100,1% a 150 °C |

** :le particelle erano a forma piatta e a bastoncino

Tabella 5: Sommario di polimorfismi usando l'approccio con raffreddamento rapido

| Solvente organico | Forma solida generata da Raffreddamento Rapido | Punto di fusione DSC (°C) Entalpia (J/g) | | Microscopio | TGA |
|-------------------|--|--|--------|-------------|--------|
| | | | | | |
| Etanolo | Sì | 167 | -106,2 | Cristallo** | 100,0% |

| | | | | | |
|--|--|--|--|--|--------------------------------------|
| | | | | | a 100 °C 100,0% a 150 °C |
|--|--|--|--|--|--------------------------------------|

**le particelle erano a forma piatta e a bastoncino

Metodo con Antisolvente. Formula (I) Emitartrato è stato disciolto in un solvente. Un antisolvente è stato aggiunto alla soluzione. I solidi che si sono formati sono stati raccolti per filtrazione ed essiccati all'aria.

Tabella 6: Sommario di screening i polimorfismi usando l'approccio con antisolvente

| Solvente organico | Forma solida generata da approccio con Antisolvente | Punto di fusione DSC (°C) Entalpia (J/g) | | Microscopio | TGA |
|------------------------|---|--|--------|-------------|--|
| Metanolo/ etil acetato | Sì | 167 | -99,5 | Cristallo* | 100,1% a 100 °C 100,1% a 150 °C |
| Metanolo/ acetone | Sì | 167 | -106,2 | Cristallo* | 100,3% a 100 °C |

| | | | | | |
|---------------------------|----|-----|--------|-------------|--|
| | | | | | 100,2% a 150 °C |
| Metanolo/ acetonitrile | No | N/A | N/A | N/A | N/A |
| Metanolo/ toluene | No | N/A | N/A | N/A | N/A |
| Metanolo/ THF | No | N/A | N/A | N/A | N/A |
| Metanolo/ TBME | Sì | 167 | -102,0 | Cristallo* | 100,2% a 100 °C 100,1% a 150 °C |
| Metanolo/ p- diossano | No | N/A | N/A | N/A | N/A |
| Acqua/THF | No | N/A | N/A | N/A | N/A |
| Acqua/ TMBE | No | N/A | N/A | N/A | N/A |
| Acqua/ isopropanolo | No | N/A | N/A | N/A | N/A |
| Acqua/ acetonitrile | No | N/A | N/A | N/A | N/A |
| Acqua/ acetone | No | N/A | N/A | N/A | N/A |
| Diclorometano/ | Sì | 165 | -89,2 | Cristallo** | 100,0% |

| | | | | | |
|--------------------------------|-----------|-----|-------|-------------|--|
| eptano | | | | | a 100 °C 99,99% a 150 °C |
| Diclorometano/ etil acetato | Sì | 167 | -97,8 | Cristallo* | 100,2% a 100 °C 100,1% a 150 °C |
| Diclorometano/ toluene | Sì | 164 | -89,8 | Cristallo* | 99,95% a 100 °C 99,86% a 150 °C |
| Diclorometano/ TBME | Sì | 167 | -98,6 | Cristallo** | 100,0% a 100 °C 99,91% a 150 °C |
| Diclorometano/ | Sì (poco) | N/A | N/A | N/A | N/A |

| | | | | | |
|--------------------------------|----|-----|-----|-----|-----|
| p-diossane | | | | | |
| Diclorometano/ isopropanolo | No | N/A | N/A | N/A | N/A |

: le particelle erano a forma piatta e a bastoncino.

** : le singole particelle avevano più di un colore di birifrangenza.

*** : Le particelle era a forma di ago e bastoncino.

Esempio 3: Proprietà fisiche di Formula (I) Emitartrato

Calorimetria a scansione differenziale (DSC). I dati di DSC sono stati raccolti su uno strumento TA Q100 utilizzando azoto come gas di spurgo. All'incirca 2-5 mg di campione sono stati accuratamente pesati in un cassetto di alluminio per DSC. Il cassetto è stato coperto con un coperchio e perforato con una pinza. Il campione di cellule è stato equilibrato a 30 °C e riscaldato a un ritmo di 10 °C al minuto a una temperatura finale di 220 °C.

Microscopia su tavolino caldo. La microscopia su tavolino caldo è stata eseguita usando un tavolino caldo Linkam (model FTIR 600) montato su un Microscopio Leica DM LP dotato di una fotocamera Sony DXC-970MD 3CCD per la raccolta di immagini. Per osservare i campioni è stato usato un obiettivo 40x con luce polarizzata. Ciascun campione è stato posto tra due vetrini coprioggetto. Ciascun campione è stato osservato visivamente mentre il tavolino veniva riscaldato. Le immagini sono state catturate usando Links versione 2.27 (Linkam). Il tavolino caldo è stato calibrato usando standard di punto di fusione USP.

La transizione endotermica osservata nel profilo DSC è stata confermata essere una transizione di fusione a una temperatura tra 160-163°C mediante microscopia su tavolino caldo.

Esempio 4: Diffrazione di raggi x di polveri di Formula (I) Emitartrato

Tutte le analisi di diffrazione di raggi x di polveri (XRPD) sono state realizzate presso SSCI, Inc. (West Lafayette, IN 47906). Le analisi XPRD sono state eseguite usando un diffrattometro di raggi X di polveri Shimadzu XRD-6000 usando radiazioni α di Cu K. Lo strumento è dotato di un tubo radiogeno con messa a fuoco fine. Il voltaggio e l'ampereaggio del tubo sono stati impostati rispettivamente a 40 kV e 40 mA. La divergenza e le fenditure di diffusione sono state impostate a 1° e la fenditura ricevente è stata impostata a 0,15 mm. La radiazione diffratta è stata rilevata da un rivelatore di scintillazioni NaI. È stata usata una scansione continua 2θ - 2θ a 3°/min (0,4 sec/0,02° fase) da 2,5 a 40 °2 θ . È stato analizzato uno standard di silice per controllare l'allineamento dello strumento. I dati sono stati raccolti e analizzati usando XRD-6000 v 4.1.

Esempio 5: Confronto di Formula (I) Emitartrato con Formula (I) Base libera

La caratterizzazione dei solidi della base libera e del sale Emitartrato è riassunta in Tabella 7. Formula I Emitartrato presenta proprietà superiori rispetto a Formula I base libera. Per esempio, Formula I Emitartrato ha un punto di fusione più elevato (> 150 °C), energia di impaccamento più elevata (maggiore entalpia endotermica),

inferiore varianza nella dimensione delle particelle, maggiore solubilità in acqua, (oltre 300 mg/mL in acqua), forma dei cristalli adatta e maggiore densità apparente rispetto a Formula I Base libera.

Tabella 7: Sommario delle proprietà dello stato solido e fisiche e chimiche di Formula (I) Base libera e Formula (I) Emitartrato.

| Caratteristiche fisiche | Formula (I) Base libera | Formula (I) Emitartrato |
|----------------------------------|------------------------------------|---|
| Punto di fusione (°C) | 86-88 | 163 |
| Entalpia endotermica (J/g) | 75-82 | 96-106 |
| Dimensione delle particelle (µm) | <10 a 100 | ~ 3 (in media) |
| Solubilità in acqua (mg/mL) | 0,04 | >216 |
| Cristallino | Sì | Sì |
| Forma dei cristalli | Ago | Piatta, a bastoncino, alcuni irregolari |
| Igroscopicità (40°C/75% RH) | Nessuna | Nessuna |
| Densità apparente | ~0,2 | 0,4-0,5 |

Esempio 6: Attività e Specificità In Vitro

Attività di Formula (I) Emitartrato nell'inibire la sintesi di glicosfingolipidi in vitro. Sono stati usati due saggi per quantificare l'attività inibitoria di Formula (I) Emitartrato per glucosilceramide sintasi.

Poiché la glucosilceramide è la prima fase e la fase limitante la velocità nella biosintesi dei glicosfingolipidi, è stato usato un saggio di citometria a flusso che misura i livelli sulla superficie cellulare di GM1 e GM3 per valutare indirettamente l'attività dell'inibitore in cellule intatte. L'incubazione di cellule K562 o B16/F10 per 72 h con quantità crescenti di Formula (I) Emitartrato (0,6-1000 nM) ha prodotto una riduzione dipendente dalla dose dei livelli sulla superficie cellulare di entrambi GM1 e GM3. Il valore di IC_{50} medio per l'inibizione della presentazione sulla superficie cellulare di GM1 in cellule K562 era 24 nM (intervallo 14-34 nM) (Tabella 8) e quello per GM3 in cellule B16/F10 era 29 nM (intervallo 12-48 nM). Non si è notata evidente tossicità cellulare in alcuna linea cellulare quando testata alla dose massima.

Un saggio alternativo per l'attività misurava l'inibizione di glucosilceramide sintasi in microsomi derivati da cellule umane. In questo saggio, i microsomi sono stati preparati da cellule A375 di melanoma umano mediante sonicazione e centrifugazione. La preparazione microsomiale è stata incubata con un substrato di ceramide fluorescente (NBD-C6-ceramide), UDP-glucosio e quantità crescenti di Formula (I) Emitartrato (0-1000 nM) per un'ora a temperatura ambiente. Dopo l'incubazione, la glucosilceramide marcata in modo fluorescente e la ceramide non reagita non sono state separate e quantificate mediante HPLC in fase inversa e rilevamento della fluorescenza. In questo saggio il valore di IC_{50} per inibire la sintesi di glucosilceramide variava da 20 a 40 nM. Questo valore era simile a

quelli ottenuti sopra per GM1 e GM3 e suggerisce che le misurazioni di questi glicolipidi sulla superficie cellulare sono buoni surrogati dell'attività di Formula (I) Emitartrato per glucosilceramide sintasi.

Specificità di inibizione della sintesi di substrato da Formula (I) Emitartrato. La specificità di Formula (I) Emitartrato è stata valutata in una serie di saggi *in vitro* basati su cellule e privi di cellule. Gli enzimi glicosidasi intestinali sono state analizzate in omogenati tessuto di ratto (si veda U. Andersson, *et al.*, *Biochem. Pharm.* 59 (2000) 821-829) e l'enzima deramificante il glicogeno è stato analizzato in un saggio privo di cellule come descritto (si veda U. Andersson, *et al.*, *Biochem. Pharm.* 67 (2004) 697-705). Non è stata trovata inibizione rilevabile di glicosidasi intestinali (lattasi, maltasi, saccarasi), α -glucosidasi I e II, e dell'enzima deramificante citosolico (α -1,6-glucosidasi), a concentrazioni fino a 2500 μ M (Tabella 8).

La glucosilceramidasi non lisosomiale e la glucocerebrosidasi lisosomiale sono state analizzate in cellule umane intatte usando C₆-NBD-glucosilceramide come substrato (si veda H.S. Overkleeft, *et al.* *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 26522-26527). Condotto β epossido (uno specifico inibitore di glucocerebrosidasi lisosomiale) è stato usato per differenziare l'attività lisosomiale dalla non lisosomiale. L'attività della glucocerebrosidasi è stata misurata anche mediante separazione cellulare attivata da fluorescenza (FACS). Cellule K562 sono state coltivate con quantità crescenti di Formula (I) Emitartrato in presenza di 5-(pentafluorobenzoilammino)-fluoresceina di- β -D-glucopiranoside 1

μM (PFB-FDGlu, Molecular Probes/Invitrogen, Carlsbad, CA) per 30-60 min. Le cellule sono state immediatamente raffreddate su ghiaccio e la fluorescenza quantificata è sopra. La glucosilceramidasi non lisosomiale è stata debolmente inibita con una IC_{50} di $1600 \mu\text{M}$. Non vi era inibizione di glucocerebrosidasi lisosomiale, l'enzima che è deficitario nella malattia di Gaucher, fino alla più elevata concentrazione di $2500 \mu\text{M}$ (Tabella 8). Quindi, era necessario un differenziale nella concentrazione di all'incirca 40.000 per inibire la glucosilceramide sintasi rispetto a qualsiasi degli altri enzimi testati.

Tabella 8: Attività biochimiche di Formula (I) Emitrato *in vitro*

| | |
|---|-----------------------------|
| Potenza di inibizione del substrato (IC_{50} <i>in vitro</i>): | $\sim 0,024 \mu\text{M}$ |
| Specificità enzimatiche, IC_{50} : | |
| α -Glucosidasi I e II: | $>2500 \mu\text{M}$ |
| Glucocerebrosidasi lisosomiale (GBA1): | $>2500 \mu\text{M}$ |
| Glucosilceramidasi non lisosomiale (GBA2): | $1600 \mu\text{M}$ |
| Enzima deramificante il glicogeno: | $>2500 \mu\text{M}$ |
| Specificità enzimatiche, K_i : | |
| Inibizione di saccarasi: | No inib, a $10 \mu\text{M}$ |
| Inibizione di Maltasi: | No inib, a $10 \mu\text{M}$ |

Esempio 7: Gestione migliorata dei livelli di Glucosilceramide Lisosomiale in un modello murino

A. Malattia di Fabry

Per determinare se l'uso combinato sia della terapia di sostituzione di enzima (ERT) sia della terapia di riduzione del substrato

(SRT) potessero mantenere la riduzione del carico enzimatico o fornire ulteriori benefici, le relative efficacie delle terapie separate e combinate sono state confrontate in un modello murino di malattia di Fabry (Fabry-Rag). I topi Fabry parentali sono descritti in Wang, AM *et al.* Am. J. Hum. Genet. 59: A208 (1996). Il Fabry-Rag è incrociato con un topo RAG-1 e non sviluppa linfociti o cellule T maturi (immunocompromesso).
Studi su animali.

Per gli studi di monoterapia, topi Fabry sono stati posti sotto studio a 1 mese di età (modello di prevenzione). I gruppi di trattamento hanno ricevuto Formula (I) Emitartrato (Genzyme Corp., Cambridge, MA) come componente della dieta composta da mangime in pellet. Il farmaco è stato formulato a 0,15% (p/p) in mangime 5053 standard per topi (TestDiet, Richmond, IN) e fornito a volontà. Questa formulazione forniva 300 mg/kg di Formula (I) Emitartrato al giorno in un topo da 25 g.

Per gli studi di terapia di combinazione, topi Fabry-Rag sono stati posti sotto studio a 3 mesi di età (modello di trattamento). I topi nel gruppo A hanno ricevuto iniezioni intravenose di alfa-galattosidasi A ricombinante umana (Genzyme Corp.) a una dose di 1 mg/kg ogni 2 mesi (vale a dire a 3, 5, 7 e 9 mesi di età). Il gruppo B ha ricevuto le stesse dosi intravenose di enzima più essi hanno ricevuto Formula (I) Emitartrato (Genzyme Corp., Cambridge, MA) come componente della dieta composta da mangime in pellet. Il farmaco è stato formulato a 0,15% (p/p) in mangime 5053 standard per topi (TestDiet, Richmond,

IN) e fornito a volontà. Questa formulazione forniva 300 mg/kg di Formula (I) Emitartrato al giorno in un topo da 25 g. Il gruppo C ha ricevuto iniezioni di enzima ogni 4 mesi (vale a dire a 3 e 7 mesi di età) ed era sottoposto alla stessa dieta con farmaco nel cibo del gruppo B. Il gruppo D ha ricevuto solamente la dieta con farmaco nel cibo (come i gruppi B e C). Il gruppo E era composto da topi Fabry-Rag non trattati e il gruppo F era composto da controlli selvatici. Si veda FIG 10.

Quantificazione di livelli di globotriaosilceramide tissutale (GL-3, Gb3).
La Quantificazione di GL-3 è stata eseguita mediante spettrometria di massa in tandem essenzialmente come per GL-1.

Il saggio della piastra calda è stato eseguito come descritto in precedenza (Ziegler, RJ et al. Molec. Ther. 15(3), 492-500 (2007)).

Risultati

Monoterapia di Topi Fabry con Formula (I) Emitartrato

La SRT è stata valutata in un modello murino della malattia di Fabry, che è causata da un deficit di attività di α -galattosidasi A. La terapia con Formula (I) Emitartrato è stata avviata con topi Fabry di un mese di età ed è proseguita finché i topi non hanno raggiunto un anno di età. Gli animali sono stati trattati con Formula (I) Emitartrato 300 mg/kg nella loro ogni giorno. I test comportamentali (vale a dire, saggio sulla piastra calda) e i test biochimici (vale a dire, analisi delle urine e analisi dei livelli di GL-3 in tessuti/sangue/urine) dei topi sono stati eseguiti due volte al mese.

Come mostrato in FIGURA 7, la somministrazione di Formula (I) Emitartrato a topi Fabry-Rag in un periodo di 11 mesi ha abbattuto il tasso di accumulo lisosomiale di globotriaosliceramide (GL-3) negli organi somatici (fegato, rene, cuore e milza) di all'incirca il 50%. Questo si è tradotto in un ritardo della progressione della malattia osservato da una manifestazione tardiva dell'insensibilità a uno stimolo avverso di calore (si veda FIGURA 8) e in una prevenzione del deterioramento di fattori di analisi delle urine ad esempio, volume di urina, livelli di creatinina e sodio (si veda FIGURA 9). Quindi, l'inibizione della glucosilceramide sintasi mediata da Formula (I) Emitartrato che catalizza la prima fase della sintesi dei glicosfingolipidi non è solamente vantaggiosa in modelli animali della malattia di Gaucher, ma anche della malattia di Fabry, e potrebbe avere effetti positivi anche in altre glicosfingolipidosi.

Terapia di combinazione di Topi Fabry con α -galattosidasi A e Formula (I) Emitartrato

L'efficacia di ERT da sola e in combinazione con SRT usando Formula (I) Emitartrato è stata valutata in cinque popolazioni di topi Fabry-Rag (n=12/gruppo).

A partire da tremesi di età, i topi sono stati sottoposti a un programma di test comportamentali (vale a dire saggio sulla piastra calda) e test biochimici (vale a dire, analisi dei livelli di GL-3 in tessuti/sangue/urine), come mostrato in FIGURA 10. In topi sottoposti a ERT, sono state somministrate dosi di 1 mg/kg di α -galattosidasi A

secondo il programma come mostrato in FIGURA 10. In topi sottoposti a SRT, sono state somministrate giornalmente dosi di 300 mg/kg di Formula (I) Emitartrato nella dieta dei topi.

Come mostrato in FIGURA 11, la ERT riduce i livelli di GL-3 nel sangue in topi Fabry-Rag, cosa che non avviene con la SRT. Come mostrato in FIGURA 12, la combinazione ERT/SRT è la più efficace a ridurre i livelli di GL-3 in fegato e rene di topi Fabry-Rag.

Come mostrato in FIGURA 13, la SRT riduce i livelli di GL-3 nell'urina in topi Fabry-Rag, cosa che non avviene con la ERT. Come mostrato in FIGURA 14, la SRT ma non la ERT, ritarda la comparsa dell'insensibilità al calore in topi Fabry-Rag.

Riassumendo, topi Fabry-Rag trattati con una combinazione Fabrazyme e Formula (I) Emitartrato hanno mostrato miglioramenti nei marcatori di malattia rispetto a ERT o SRT da sole in un modello di trattamento nei seguenti modi: accumulo di GL-3 significativamente ridotto in fegato e rene con terapia di combinazione; GL-3 nell'urina migliorato nei gruppi SRT; GL-3 nel sangue migliorato nei gruppi ERT; e neuropatia periferica ritardata nei gruppi SRT.

B. Malattia di Gaucher. Per determinare se l'uso sequenziale sia della terapia di sostituzione di enzima (ERT) sia della terapia di riduzione del substrato (SRT) possa fornire ulteriori benefici, sono state confrontate le efficacie relative delle terapie separate e sequenziali in un modello murino della malattia di Gaucher (D409V/null).

Metodi

Studi su animali. Le procedure che interessavano animali sono stati revisionate e approvate dal Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC) presso Genzyme Corporation seguendo le linee guida provenienti dalla Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care (AAALAC). Il topo Gaucher (D409V/null) è un modello malattia di Gaucher di tipo 1 che mostra un accumulo di glucosilceramide in fegato, milza e polmoni ma che è privo di patologia nell'osso e nel cervello (si veda Y-H. Xu, *et al.*, *Am. J. Pathol.* 163, **2003**, 2093-2101). Animali di entrambi i sessi sono stati posti sotto studio a 3 mesi di età poiché esperimenti precedenti avevano indicato che non vi era differenza tra maschi e femmine nella risposta a glucocerebrosidasi ricombinante o a Formula (I) Emitartrato. Lo studio presentava 6 gruppi di topi con il gruppo A che veniva sacrificato dopo 2 settimane per fornire i livelli basali di glucosilceramide tissutale. I gruppi B, C, e D hanno ricevuto tuttiglucocerebrosidasi ricombinante umana (Genzyme Corp., Cambridge, MA) (10mg/kg) per via intravenosa tramite una vena caudale (100 µL) ogni 2 giorni per un totale di 8 iniezioni. Il gruppo B è stato sacrificato al termine di questo regime (allo stesso tempo del gruppo A) per fornire livelli di glucosilceramide tissutale ridotti dall'enzima. I gruppi D ed E sono stati entrambi alimentati con Formula (I) Emitartrato (Genzyme Corp., Cambridge, MA) come componente della dieta composta da mangime in pellet. Il farmaco è stato formulato allo 0,075% (p/p) in mangime standard 5053 per topi (TestDiet, Richmond, IN) e fornito a volontà.

Questa formulazione forniva 150 mg/kg di Formula (I) Emitartrato al giorno in un topo da 25 g. Il gruppo F non ha ricevuto trattamento ed è stato sacrificato assieme ai gruppi C, D ed E12 settimane dopo l'inizio dello studio. Il consumo di cibo e i pesi dei topi sono stati monitorati tre volte alla settimana per determinare l'assunzione del farmaco e il potenziale impatto del farmaco sulla salute complessiva. Gli animali sono stati sacrificati mediante inalazione di biossido di carbonio e i loro tessuti prelevati immediatamente. Metà di ciascun tessuto è stato congelato velocemente su ghiaccio secco e conservato a -80°C fino a che fosse pronto per ulteriore processamento. L'altra metà è stata processata per l'analisi istologica.

Quantificazione dei livelli tissutali diglucosilceramide. I livelli di glucosilceramide sono stati quantificati mediante spettrometria di massa come descritto in precedenza (si veda K. McEachern, *et al.*, *J. Gene. Med.* 8 (2006) 719-729; T. Doering, *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 11038-11045). Una massa nota di tessuto è stata omogenizzata in cloroformio:metanolo 2:1 (v/v) e incubata a 37°C per 15 min. I campioni sono stati centrifugati e i soprannatanti sono stati estratti con 0,2 volumi di acqua per una notte a 4°C. I campioni sono stati centrifugati, la fase acquosa è stata scartata e la fase organica è stata essiccata su un film sotto azoto. Per la analisi di spettrometria di massa (ESI/MS) con ionizzazione elettrospray, i campioni di tessuto sono stati ricostituiti all'equivalente di 50 ng di peso di tessuto originale in 1 ml di cloroformio:metanolo (2:1, v/v) e mescolati al vortex per 5 min. Aliquote

(40 μ L) di ciascun campione sono state poste in provette per recupero totale Waters e sono stati aggiunti 50 μ L di uno standard interno di d3-C16-GL-110 μ g/mL (Matreya, Inc., Pleasant Gap, PA). I campioni sono stati essiccati sotto azoto e ricostituiti con 200 μ L di DMSO:metanolo 1:4 (v/v). L'analisi ESI/MS di glucosilceramidi di diverse lunghezze di catena carboniosa è stata realizzata su un HPLC Waters Alliance (Modulo di separazione 2695) accoppiato a un micro sistema Micromass Quattro dotato di una fonte ionica elettrospray. I campioni sottoposti ad estrazione lipidica (20 μ L) sono stati iniettati su una colonna C8 (4 mL X 3 mm d.i.; Fenomenex, Torrance, CA) a 45°C ed eluiti con un gradiente di acetonitrile da 50 a 100% (ammonio acetato 2mM, acido formico 0,1%) a 0,5 mL/min. Il primo 0,5 min è stato mantenuto organico al 50% e quindi velocemente portato al 100% per i 3,5 min finali. La temperatura della fonte è stata mantenuta costante a 150°C, ed è stato usato azoto come gas di desolvatazione a una velocità di flusso di 670 L/h. Il voltaggio del capillare è stato mantenuto a 3,80 KV con un voltaggio del cono di 23 V, mentre il tempo di permanenza per ciascuna specie ionica è stato di 100 ms. Gli spettri sono stati acquisiti mediante la modalità MRM per monitorare otto isoforme dominanti (C16:0, C18:0, C20:0, C22:1, C22:0, C22:1-OH, C24:1, e C24:0). La quantificazione di glucosilceramide è stata in base alla somma di queste otto isoforme relativamente allo standard interno, con una curva di calibrazione che variava da 0,1 a 10 μ g/mL.

Istologia. Per l'analisi istologica, i tessuti sono stati fissati in formalina zincata (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA) a temperatura ambiente per 24 h, quindi conservati in PBS a 4°C fino a che non fossero pronti per ulteriore processamento. Tutti i campioni sono stati disidratati in etanolo, resi trasparenti in xileni, infiltrati e inclusi in paraffina Surgipath R (Surgipath, Richmond, IL). Sezioni da cinque micron sono state tagliate usando un microtomo rotatorio ed essiccate in stufa a 60°C prima di essere colorate. Le sezioni sono state deparaffinate in Hemo-De (Scientific Safety Solvents, Keller, TX) e reidratate in concentrazioni discendenti di etanolo seguito da un lavaggio in PBS. Le sezioni sono state colorate con ematossilina ed eosina (E&E) e marcate usando un anticorpo monoclonale di ratto anti-CD68 di topo (Serotec, Raleigh, NC) per identificare i macrofagi. Dopo lavaggio per 5 min in PBS, le fettine sono state disidratate in etanolo e rese trasparenti in Hemo-De prima di essere montate con mezzo montante SHUR/Mount™ per vetrini coprioggetto (TBS, Durham, NC). La percentuale di aree di immunopositività per CD68 nel fegato è stata quantificata usando analisi MetaMorph (MDS Analytical Technologies, Toronto, Canada) di dieci immagini 400X per sezione tissutale. Un patologo veterinario certificato dal comitato, in cieco per la designazione dei gruppi, ha esaminato tutte le sezioni.

Risultati

Regime di dosaggio di glucocerebrosidasi per ridurre l'accumulo di GL1 nel fegato, milza e polmone di topi Gaucher 3 mesi di

età. Per studiare i vantaggi relativi di combinazione e monoterapia con enzima o terapia di riduzione di enzima o del substrato, il regime enzimatico che diminuiva in modo più forte i livelli di GL1 negli organi viscerali di topi Gaucher è stato determinato per primo. I topi Gaucher di tre mesi di età (D409V/null) sono stati trattati per via intravenosa 2, 4 o 8 dosi di 10 mg/kg glucocerebrosidasi ricombinante umana. I topi che sono stati trattati con 2 o 4 dosi dell'enzima hanno ricevuto infusioni di farmaco ogni 3 giorni mentre quelli che sono stati trattati con 8 dosi hanno ricevuto l'enzima ogni 2 giorni. L'uso di un intervallo di tempo più breve tra le infusioni in animali che hanno ricevuto 8 trattamenti è stato progettato per minimizzare il potenziale impatto di qualsiasi risposta immunitaria nei confronti dell'enzima umano somministrato. Gli animali sono stati sacrificati 7 giorni dopo l'ultima infusione di enzima e le quantità di GL1 rimanente nei loro fegati, milze, e polmoni sono stati misurate.

Il trattamento con 2 dosi di glucocerebrosidasi ha ridotto i livelli di GL1 nel fegato del 50%. L'aumento del numero di infusioni di enzima a 4 o 8, come atteso, ha ridotto i livelli di GL1 nel fegato in una misura maggiore (di all'incirca il 75%). La riduzione meno che completa dei livelli di GL1, ancora con 8 dosi, è coerente con l'esperienza in soggetti Gaucher che mostra che l'epatosplenomegalia è ridotta solamente dopo un periodo di trattamento esteso (si veda G.A. Grabowski, *et al.*, Ann. Int. Med. 122 (1995) 33-39). I livelli di substrato delle milze dei topi Gaucher sono stati più refrattari al trattamento enzimatico. La

somministrazione di 2 dosi di glucocerebrosidasi non ha significativamente modificato i livelli di GL1 rispetto a quelli indicati in controlli non trattati. L'aumento del numero delle infusioni di enzima a 4 o 8 ha ridotto i livelli splenici di GL1 di circa il 50%. Nel polmone, una riduzione di all'incirca il 60% rispetto al controllo non trattato è stata osservata dopo 8 dosi. La misura leggermente inferiore di riduzione del substrato nel polmone è stata dovuta probabilmente a una inferiore accessibilità dell'enzima infuso nei macrofagi alveolari carichi di lipidi. L'osservazione di una maggiore eliminazione di GL1 nel fegato rispetto alla milza e al polmone riflette probabilmente la biodistribuzione dell'enzima dopo infusione sistemica (si veda S.M. Van Patten, *et al.* *Glycobiology* 17 (2007) 467-478). In base a questi risultati, il regime di trattamento che consiste in 8 dosi consecutive di glucocerebrosidasi 10 mg/kg somministrato a intervalli di 2 giorni è stato usato per i successivi studi.

Capacità relative di terapia di riduzione di enzima e di substrato di ridurre i livelli di GL1 nel fegato di topi Gaucher. Coorti di topi Gaucher di 3 mesi di età sono state trattate con glucocerebrosidasi ricombinante o Formula (I) Emifartrato separatamente o in sequenza. I topi nei gruppi B, C e D sono stati trattati con 8 dosi di enzima come descritto sopra (in un periodo di 2 settimane) per essere ripuliti dal GL1 accumulato. Gruppi diversi sono stati quindi alimentati con mangime regolare o mangime contenente Formula (I) Emifartrato (150 mg/kg/giorno) per altre 10 settimane, con il gruppo F che non riceveva trattamento e

serviva da controllo naive. Indipendentemente dalla formulazione del mangime, i topi hanno mangiato quantità comparabili di cibo e non vi sono state differenze discernibili nell'aumento di peso. All'incirca l'80% dei livelli di GL1 accumulato è stato eliminato dal fegato in seguito a 2 settimane di terapia con enzima da solo. Quando questi animali sono stati lasciati progredire senza ulteriore trattamento per 10 settimane, i loro livelli di GL1 nel fegato sono aumentati indicando che durante il periodo interposto era avvenuto un ri-accumulo del substrato (Figura 2, colonna C). Questi livelli di non erano significativamente differenti da quelli dei controlli non trattati (Figura 2, colonna F). Tuttavia, se i topi erano trattati con l'enzima e quindi con Formula (I) Emitartrato nel loro cibo per un periodo di 10 settimane, i loro livelli di GL1 nel fegato erano significativamente inferiori rispetto ai controlli non trattati (Figura 2, colonna D & F). Questo risultato suggerisce che l'ulteriore trattamento con Formula (I) Emitartrato aveva rallentato il ri-accumulo del substrato. In modo interessante, anche i topi Gaucher trattati con Formula (I) Emitartrato da solo durante l'intero periodo di studio (12 settimane) hanno mostrato livelli di GL-1 inferiori (Figura 2, colonna E) rispetto ai controlli di età corrispondente non trattati (Figura 2, colonna F) sebbene la differenza non sia stata significativa. La capacità di SRT da soli di ridurre i livelli di GL1 in questo modello animale è coerente con i nostri lavori precedenti (si veda K.A. McEachern, *et al.*, *Mol. Genet. Metab.* 91 (2007) 259-267) e rispecchia probabilmente il fatto che i topi Gaucher

(D409V/null) mantengono un'attività enzimatica residua (si veda Y-H. Xu, *et al.*, *Am. J. Pathol.* 163, **2003**, 2093-2101).

Capacità relative di terapia di riduzione di enzima e di substrato di ridurre i livelli di GL1 nella milza di topi Gaucher. Il trattamento di topi Gaucher di 3 mesi di età con glucocerebrosidasi ricombinante da sola per 2 settimane ha ridotto i livelli splenici di GL1 di all'incirca il 60% (Figura 3, colonna B). Quando questi animali sono stati lasciati invecchiare per altre 10 settimane senza ulteriore intervento, i livelli di substrato sono tornati a quelli osservati all'inizio dello studio (Figura 3, colonna C) e non erano significativamente differenti dal controllo non trattato (Figura 3, colonna F). Questo suggerisce che la velocità di riaccumulo di GL1 nella milza era più elevata rispetto al fegato. Questa supposizione era sostenuta anche dall'osservazione di livelli basali più elevati del substrato nella milza (~1500 mg/g tessuto; Figura 2, colonna A) rispetto al fegato (~500 mg/g tessuto; Figura 3, colonna A). Gli animali che erano stati trattati con enzima e quindi con Formula (I) Emitartrato per le successive 10 settimane hanno mostrato la riduzione maggiore dei livelli splenici di GL1 (Figura 3, colonna D) e questi erano significativamente inferiori rispetto a quelli delle milze dei controlli non trattati (Figura 3, colonna F). Questo ha indicato che l'impegno della SRT non ha solamente ritardato il ri-accumulo di substrato, ma ha anche agito nel ridurre ulteriormente il carico dell'accumulo in quest'organo. Sembrerebbe che almeno in questo caso, l'effetto netto dell'enzima endogeno residuo e della riduzione del

substrato abbiadeterminato un ulteriore declino nei livelli complessivi di substrato. L'osservazione di livelli splenici di GL1 inferiori nei topi trattati con Formula (I) Emitartrato da solo per 12 settimane (Figura 3, colonna E) rispetto ai controlli non trattati (Figura 3, colonna F) è coerente con quest'osservazione, sebbene la differenza non fosse significativa. Quindi, in pazienti di Gaucher tipo 1 leggera con residua attività enzimatica elevata, il trattamento con ERT seguito da SRT potrebbe potenzialmente accelerare la velocità e forse anche il grado di eliminazione del substrato incriminato.

Capacità relative di terapia di riduzione di enzima e di substrato di ridurre i livelli di GL1 nel polmone di topi Gaucher. Come indicato in precedenza, i livelli polmonari di GL1 sono stati eliminati con minore efficacia dalla somministrazione intravenosa di glucocerebrosidasi ricombinante. Il trattamento di topi Gaucher di 3 mesi di età con enzima per 2 settimane ha determinato una riduzione di solamente il 30% nei livelli di substrato nel polmone (Figura 4, colonna B). La coorte di animali alimentata con mangime normale per le successive 10 settimane seguenti ha mostrato, come atteso, ri-accumulo di GL1 e non era significativamente differente dai livelli dei non trattati livelli (Figura 4, colonna C & F). Al contrario, gli animali alimentati con mangime contenente Formula (I) Emitartrato nello stesso periodo intercorrente hanno mostrato una riduzione nei livelli di substrato fino a sotto quelli trattati con enzima da solo (Figura 4, colonna D) e sono stati significativamente inferiori rispetto a quelli nei controlli non trattati

(Figura 4, colonna F). Nuovamente, questo suggerisce che nel polmone, come nella milza, l'effetto netto di Formula (I) Emitartrato (in presenza di attività enzimatica endogena residua) non solamente ritarda il ri-accumulo di GL1 ma agisce anche per ridurli ulteriormente al di sotto dei livelli di partenza. Come con altri organi viscerali, il trattamento mediante Formula (I) Emitartrato da solo è stato efficace nel ridurre i livelli polmonari di GL1 (Figura 4, colonna E) rispetto a controlli non trattati (Figura 4, colonna F).

Analisi istopatologica del fegato di topi Gaucher dopo trattamento di riduzione di enzima e di substrato. Per visualizzare gli effetti dei diversi regimi terapeutici nel fegato, sezioni tissutali sono state colorate per CD68, un marcatore di macrofagi. Le analisi di sezioni di fegato da topi Gaucher non trattati di 3 mesi di età hanno mostrato la presenza di un gran numero di cellule di Gaucher ingolfate di lipidi positive per CD68 che rimanevano prevalentemente invariate dopo 12 settimane. In modo coerente con i dati biochimici precedenti, i fegati di animali trattati con glucocerebrosidasi ricombinante in un periodo di 2 settimane hanno mostrato una sostanziale eliminazione dei lipidi in questi macrofagi anormali. Se questi animali venivano lasciati invecchiare altre 10 settimane senza ulteriore trattamento, vi era evidenza di ri-accumulo di GL1 come indicato dall'ri-emergenza di cellule di Gaucher. Tuttavia, questo aumento di cellule di Gaucher è stato bloccato se i topi venivano trattati con terapia di riduzione del substrato con Formula (I) Emitartrato nello stesso periodo intercorrente.

Come indicato in precedenza, anche i topi Gaucher che hanno ricevuto Formula (I) Emitartrato da solo hanno mostrato ridotto accumulo del substrato, sebbene non nella stessa misura di quelli che hanno ricevuto una combinazione di ERT e SRT. Il grado di colorazione positiva per CD68 sulle varie sezioni è stata in oltre quantificata usando il software MetaMorph (Figura 18). Il grado di colorazione di queste sezioni rispecchiava la quantità di livelli di GL1 nel fegato determinata biochimicamente (Figura 15) sostenendo ulteriormente i suggerimenti sui vantaggi relativi dei diversi regimi di trattamento.

Esempio 8: Efficacia di Formula (I) Emitartrato in un modello murino di Malattia di Gaucher

Studi sui animali. Le procedure che coinvolgevano animali sono state revisionate e approvate da un Institutional animal care and use committee (IACUC) che segue le linee guida della Association for Assessment and Accreditation of laboratory animal care (AAALAC), dello stato e federali. I topi Gaucher *gba*^{D409V/null} (si veda Y.-H. Xu. *et al.*, Am. J. Pathol. 163 (2003) 2093-2101) sono stati lasciati crescere secondo le necessità dello studio. Non è stata trovata alcuna differenza nel fenotipo o nella risposta a Formula (I) Emitartrato tra maschi e femmine, quindi negli studi sono stati usati entrambi i sessi. Il rilascio di Formula (I) Emitartrato è avvenuto mediante una singola somministrazione giornaliera mediante sonda orale a un volume di 10 mL/kg. Gli animali sono stati abituati alla somministrazione mediante sonda orale con un volume simile di acqua per una settimana prima

dell'inizio del trattamento. Formula (I) Emitartrato è stato disciolto in acqua per iniezione (WFI; VWR, West Chester, PA) e somministrato in una dose crescente da 75 mg/kg/giorno a 150 mg/kg/giorno nel corso di nove giorni, con tre giorni per ciascuna dose e incrementi di 25 mg/kg/giorno. I topi sono stati pesati tre volte alla settimana per monitorare il potenziale impatto del farmaco sulla loro salute complessiva. Gli animali sono stati sacrificati mediante inalazione di biossido di carbonio e i loro tessuti immediatamente prelevati. Metà di ciascun tessuto è stata congelata velocemente su ghiaccio secco e conservata a -80 °C fino a che non fosse pronta per il successivo processamento. L'altra metà è stata prelevata per analisi istologica.

Quantificazione dei livelli tissutali di glucosilceramide mediante cromatografia su strato sottile ad elevate prestazioni. Le analisi di cromatografia su strato sottile ad elevate prestazioni (HP-TLC) sono state eseguite come descritto (A. Abe, *et al.*, J. Clin. Inv. 105 (2000) 1563-1571; H. Zhao, *et al.* Diabetes 56 (2007) 1341-1349; e S.P.F. Miller, *et al.* J. Lab. Clin. Med. 127 (1996) 353-358). In breve, è stata ottenuta una frazione lipidica totale mediante omogeneizzazione dei tessuti in PBS freddo, estraendo con cloroformio:metanolo 2:1 (v/v) e sonicando in un bagnetto in un sonicatore in bagnetto in acqua. I campioni sono stati centrifugati per separare le fasi e il soprannatante è stato recuperato. I precipitati sono stati ri-sonicati in cloroformio:metanolo:salina, centrifugati e il secondo soprannatante risultante è stato raccolto e combinato con il primo. Una miscela di 1:1

(v/v) cloroformio:salina è stata aggiunta ai soprannatanti combinati, mescolata al vortex e centrifugata. Dopo aver scartato lo strato acquoso superiore, è stato aggiunto metanolo:salina, mescolato al vortex e ricentrifugato. La fase organica è stata prelevata ed essiccata sotto azoto, disciolta in cloroformio:metanolo 2:1 (v/v) a 1 mL per 0,1 g di peso originale di tessuto e conservata a -20 °C.

Una porzione dell'estratto lipidico è stata usata per misurare il fosfato totale (si veda B.N. Ames, *Methods Enzymol.* 8 (1966) 115-118), vale a dire, il contenuto di fosfolipidi da usare come standard interno. Il restante è stato sottoposto a metanolisi alcalina per eliminare i fosfolipidi che migrano con glucosilceramide sulla piastra HP-TLC. Aliquote degli estratti contenenti quantità equivalenti del fosfato totale sono state disposte a spot su una piastra HP-TLC assieme a standard noti di glucosilceramide (Matreya inc. Pleasant Gap, PA). I lipidi sono stati separati e visualizzati con acetato cuprico monoidrato al 3% (p/v). Acido fosforico al 15% (v/v) seguito da cottura in stufa per 10 min a 150 °C. Le bande dei lipidi sono state scansionate su un densitometro (GS-700, Bio-Rad, Hercules, CA) e analizzate mediante software Quantity One (Bio-Rad).

Quantificazione dei livelli tissutali di glucosilceramide mediante spettrometria di massa. La glucosilceramide è stata quantificata mediante spettrometria di massa come descritto. (si vedano K. McEachern, *et al.* *J. Gene Med.* 8 (2006) 719-729; T. Doering, *et al.*, *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 11038-11045). Il tessuto è stato omogenizzato

in cloroformio:metanolo 2:1 (v/v) e incubato a 37 °C. I campioni sono stati centrifugati e i sopranatanti sono stati estratti con 0,2 volumi di acqua per una notte. I campioni sono stati centrifugati nuovamente, la fase acquosa è stata scartata e la fase organica è stata essiccata su un film sotto azoto.

Per l'analisi di spettrometria di massa con ionizzazione elettrospray (ESI/MS), i campioni di tessuto sono stati ricostituiti all'equivalente di 50 ng di peso di tessuto originale in 1 mL di cloroformio/metanolo (2:1, v/v) e mescolati al vortex per 5 min. Aliquote (40 µL) di ciascun campione sono state poste in provette per recupero totale Waters e sono stati aggiunti 50 µL di uno standard interno di d3-C16-GL-110 µg/mL (Matreya, Inc., Pleasant Gap, PA). I campioni sono stati essiccati sotto azoto e ricostituiti con 200 µL di DMSO:metanolo 1:4 (v/v). L'analisi ESI/MS di glucosilceramidi di diverse lunghezze di catena carboniosa è stata realizzata su un HPLC Waters alliance (Modulo di separazione 2695) accoppiato a un micro sistema Micromass Quattro dotato di una fonte ionica elettrospray. Venti microlitri di campioni sottoposti a estrazione lipidica sono stati iniettati su una colonna C8 (4 mL X 3 mm d.i.; Fenomenex, Torrance, CA) a 45°C e eluiti con un gradiente di acetonitrile da 50 a 100% (ammonio acetato 2mM, acido formico 0,1%) a 0,5 mL/min. Il primo 0,5 min è stato mantenuto organico al 50% e quindi velocemente portato al 100% per i 3,5 min finali. La temperatura della fonte è stata mantenuta costante a 150°C, ed è stato usato azoto come gas di desolvatazione a

una velocità di flusso di 670 L/h. Il voltaggio del capillare è stato mantenuto a 3,80 KV con un voltaggio del cono di 23 V, mentre il tempo di permanenza per ciascuna specie ionica è stato di 100 ms. Gli spettri sono stati acquisiti mediante la modalità MRM per monitorare otto isoforme dominanti (C16:0, C18:0, C20:0, C22:1, C22:0, C22:1-OH, C24:1, e C24:0). La quantificazione di glucosilceramide è stata in base alla somma di queste otto isoforme relativamente allo standard interno, con una curva di calibrazione che variava da 0,1 a 10 µg/mL.

Istologia. Per l'analisi istologica, i tessuti sono stati fissati in formalina zincata (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA) a temperatura ambiente per 24 h, quindi conservati in PBS a 4°C fino a che non fossero pronti per ulteriore processamento. Tutti i campioni sono stati disidratati in etanolo, resi trasparenti in xileni, infiltrati e inclusi in paraffina Surgipath R (Surgipath, Richmond, IL). Sezioni da cinque micron sono state tagliate usando un microtomo rotatorio e essiccate in stufa a 60°C prima di colorarle. Le sezioni sono state deparaffinate in xileni e reidratate in concentrazioni discendenti di alcol seguito da un lavaggio in acqua. Dopo un risciacquo da 1 min in acido acetico al 3%, le fettine sono state colorate per 40 min in Alcian Blue 8GX 1% (Electron Microscopy Sciences) in acido acetico al 3% a pH 2,0. Dopo risciacquo in acqua e ossidazione in acido periodico all'1% per 1 min, le fettine sono state colorate con reagente di Schiff (Surgipath) per 12 min. Dopo lavaggio per 5 min in acqua calda, le fettine sono state disidratate in alcol e rese trasparenti in xileni prima di essere montate con mezzo di

montaggio per coprioggetto SHUR/Mount™ (TBS, Durham, NC). Le cellule di Gaucher identificate morfologicamente nel fegato sono state quantificate usando un conteggio manuale di cellule per 10 campi ad elevato ingrandimento 10 (HPF, 400x).

Risultati

Effetto della somministrazione di Formula (I) Emitartrato a topi D409V/null. L'effetto della somministrazione di Formula (I) Emitartrato a topi D409V/null è stato valutato. I topi di all'incirca 7 mesi di età sono stati trattati con 150 mg/kg/giorno di Formula (I) Emitartrato (una dose mostrata in studi preliminari essere efficace nell'inibire la glucosilceramide sintasi) mediante sonda orale per 10 settimane. Questo trattamento non ha avuto effetti evidenti su benessere o le abitudini alimentari dei topi. Le misurazioni del loro peso corporeo nel corso dello studio non hanno mostrato significative deviazioni da quelli topi dei non trattati suggerendo che Formula (I) Emitartrato è stato ben tollerato a una dose mostrata efficace nell'inibire la glucosilceramide sintasi.

Efficacia di Formula (I) Emitartrato nel trattare topi Gaucher giovani presintomatici. Formula (I) Emitartrato è stato valutato per la riduzione dell'accumulo lisosomiale di glucosilceramide e la comparsa di cellule di Gaucher in topi D409V/null giovani (di 10 settimane). Questi giovani topi Gaucher mostrano bassi livelli di GL-1 nei tessuti colpiti. Animali di 10 settimane sono stati trattati con 75 o 150 mg/kg/giorno di Formula (I) Emitartrato mediante sonda orale per 10 settimane. La

misurazione dei livelli di glucosilceramide ha mostrato una riduzione dipendente dalla dose rispetto a controlli di età corrispondente trattati con veicolo. Nella coorte che era stata trattata con 150 mg/kg/giorno, i livelli di glucosilceramide erano il 60, 40 e 75% di quelli nei controlli, rispettivamente in fegato, polmone e milza. (FIG. 6). I livelli di glucosilceramide statisticamente significativamente inferiori osservati nel fegato e nel polmone di topi D409V/null trattati indicavano che Formula (I) Emitartrato è stato efficace nel ridurre l'accumulo di questo glicosfingolipide in questi tessuti.

La valutazione istopatologica dei fegati di topi D409V/null non trattati alla fine dello studio (20 settimane di età) ha mostrato la presenza di cellule di Gaucher in tutto il fegato. I topi trattati con 150 mg/kg/giorno di Formula (I) Emitartrato per 10 settimane hanno mostrato la presenza solamente occasionale di cellule di Gaucher che erano anche invariabilmente più piccole per dimensioni. La quantificazione di queste cellule in una serie di diverse sezioni ha confermato che la frequenza delle cellule di Gaucher era significativamente inferiore nei topi trattati con Formula (I) Emitartrato-trattati. Complessivamente, questi risultati biochimici e istologici suggerivano che la somministrazione giornaliera orale di Formula (I) Emitartrato a topi Gaucher presintomatici è stata efficace nel diminuire l'accumulo di glucosilceramide nei tessuti colpiti e la conseguente formazione di cellule di Gaucher nel fegato.

Efficacia di Formula (I) Emitartrato nel trattare topi Gaucher più vecchi con patologia preesistente. L'efficacia di Formula (I) Emitartrato nell'interrompere o invertire la progressione della malattia in topi Gaucher più vecchi, sintomatici è stata inoltre valutata. I topi D409V/null di sette mesi di età sono stati trattati con 150 mg/kg/giorno di Formula (I) Emitartrato mediante sonda orale per 10 settimane. Le analisi dei livelli di glucosilceramide in fegato, polmone e milza dei topi trattati a 5 e 10 settimane post-trattamento hanno mostrato che essi non erano aumentati rispetto a quelli osservati all'inizio dello studio. Dopo 10 settimane di trattamento, i livelli di glucosilceramide sono stati determinati essere inferiori del 60% nel fegato, inferiori del 50% nel polmone e inferiori del 40% nella milza rispetto ai topi trattati con veicolo. Questi risultati hanno mostrato che Formula (I) Emitartrato è stato efficace nell'inibire l'ulteriore accumulo di glucosilceramide in topi con un carico esistente di patologia da accumulo.

L'analisi istopatologica delle sezioni di tessuto ha mostrato un numero ridotto di cellule di Gaucher nel fegato di topi D409V/null trattati rispetto ai controlli non trattati. La quantificazione del numero di cellule di Gaucher ha corroborato i risultati biochimici; i topi D409V/null trattati mostravano conte di cellule di Gaucher che non erano significativamente differenti da quelle all'inizio del trattamento ai punti temporali sia a 5 sia a 10 settimane. Il numero di cellule di Gaucher ad entrambi questi punti temporali erano significativamente inferiori rispetto ai quelli dei topi D409V/null non trattati. Complessivamente, questi

datidimostrano che Formula (I) Emitartrato ha inibito efficacemente l'ulteriore accumulo di glucosilceramide e lo sviluppo dicellule di Gaucher in animali con patologia preesistente.

Discussione

Formula (I) Emitartrato ha dimostrato un elevato grado di specificità per l'enzima glucosilceramide sintasi. Non vi è stata inoltre una inibizione misurabile dell'attività di glucocerebrosidasi alla dose efficace, il che è una caratteristica importante quando si trattano pazienti affetti da malattia di Gaucher tipo 1, la maggior parte dei quali mantiene una attività di glucocerebrosidasi residua. Alla dose efficace di 150 mg/kg/giorno, non vi sono stati problemi gastrointestinali osservabili e non vi era differenza nei pesi corporei tra i gruppi trattati e controllo non trattati gruppi. Le concentrazioni sieriche alla IC₅₀ e superiori a questa (24-40 nM) sono state facilmente raggiungibili con le dosi orali che erano al di sotto del livello massimo tollerato. Formula (I) Emitartrato è stato anche facilmente metabolizzato ed eliminato: sia il composto genitore, sia i metaboliti, sono stati eliminati efficacemente entro 24 h come mostrato in studi di ADME con dosi orali singole e ripetute con composto radiomarcato con ¹⁴C in ratti e cani.

L'uso di un regime di dosaggio non ottimizzato di una singola somministrazione giornaliera mediante sonda orale ha impedito l'accumulo di glucosilceramide in topi sia giovani, presintomatici, sia in topi Gaucher più vecchi che mostravano già patologia da accumulo. I topi giovani di 10 settimane di età, sebbene recassero elevati livelli di

glucosilceramide rispetto ai controlli selvatici, non avevano ancora sviluppato i caratteristici macrofagi tissutali ingolfati, dette cellule di Gaucher. Il trattamento con 150 mg/kg/giorno di Formula (I) Emitartrato ha bloccato tutta la progressione misurabile della malattia e ha inibito lo sviluppo delle cellule di Gaucher. In topi più vecchi, che mostravano un livello più elevato di glucosilceramide lisosomiale e un numero più elevato di cellule di Gaucher, non vi è stato un ulteriore aumento dei livelli del glicosfingolipide o nel numero di cellule di accumulo dopo 5 settimane o 10 settimane di trattamento. Poiché è riportato che la fonte principale di glucosilceramide nelle cellule Gaucher è extracellulare per origine, questi risultati hanno implicato che l'inibizione di glucosilceramide sintasi da parte di Formula (I) Emitartrato era sistemica.

L'osservazione per cui Formula (I) Emitartrato è stato efficace nel prevenire l'ulteriore accumulo di glucosilceramide suggerisce una strategia terapeutica che potrebbe ulteriormente potenziare il trattamento della malattia di Gaucher.

Riassumendo, i dati presentati nella presente hanno dimostrato che Formula (I) Emitartrato è un inibitore attivo e specifico di glucosilceramide sintasi che non mostra effetti avversi evidenti in un modello murino della malattia di Gaucher. Esso è riuscito a prevenire la progressione della malattia sia in topi presintomatici sia in topi Gaucher malati più vecchi, inibendo l'accumulo di glucosilceramide e la formazione di cellule di Gaucher. Questi risultati suggeriscono che

Formula (I) Emitartrato può rappresentare ancora un'altra opzione terapeutica per la malattia di Gaucher di tipo 1, sia pediatrica, sia dell'adulto, e potenzialmente per altri disturbi da accumulo di sfingolipidi.

Esempio 9: Studio clinico di fase 2 di Formula (I) Emitartrato

Metodi. Questo studio clinico di Formula (I) Emitartrato, somministrato 50 o 100 mg bid per via orale, ha interessato il trattamento di 26 adulti con malattia di Gaucher tipo 1 (GD1) (16F:10M; età media di 34 anni, intervallo 18-60; tutti caucasici) presso 7 siti in 5 paesi. I pazienti presentavano splenomegalia (volume 10 il normale) e trombocitopenia (piastrine 45.000-100.000/mm³) o anemia (emoglobina 8-10 g/dl, femmina; 8-11 g/dl, maschio). Nessuno aveva ricevuto terapia di sostituzione di enzima o di riduzione del substrato nei precedenti 12 mesi. L'endpoint primario di efficacia composito è il livello di emoglobina (+0,5 g/dl) o la conta piastrinica (+15%) dopo 52 settimane di trattamento. Vengono inoltre valutati il volume del fegato, chitotriosidasi, glucosilceramide. I pazienti continuano a essere trattati e monitorati a lungo termine.

Risultati. I dati alla settimana 52 sono stati disponibili per fino a 20 pazienti; 4 altri si sono ritirati prematuramente e 2 erano ancora sotto studio. L'endpoint primario composito è stato soddisfatto da 19 dei 20 pazienti. Le variazioni medie (1SD) dal basale alla settimana 52 sono state: emoglobina +1,6 (11,35) g/dL; conta piastrinica +43,6% (137,59%); volume di milza e fegato (multipli del normale)

rispettivamente 40,2% (110,44%) e 15,8% (110,39%); e chitotriosidasi 49,9% (120,75%). I livelli plasmatici di glucosilceramide si sono normalizzati in tutti pazienti dopo 4 settimane, Formula (I) Emitartrato è stato ben tollerato con un profilo di sicurezza accettabile. Sono stati riportati sette eventi avversi correlati in 6 pazienti come correlati; tuttieroano lievi e transienti in natura.

Esempio 10: Composizione farmaceutica di Formula (I) Emitartrato, Capsule da 100 mg

Metodo di Preparazione di Capsule da 100 mg: Formula (I) Emitartrato, cellulosa microcristallina, lattosio monoidrato, e ipromellosio, E15 sono stati fatti passare separatamente attraverso un filtro a rete da 20 mesh. La quantità degli ingredienti filtrati indicata in Tabella 9 è stata miscelata in un granulatore ad elevata azione di taglio per da nove a dodici minuti.

Tabella 9. Formulazione farmaceutica per capsule da 100 mg

| Ingrediente | Quantità unitaria | | |
|----------------------------|--|-----------------------------|--|
| | Quantità unitaria di capsula da 100mg (mg) | % per dose unitaria (% p/p) | Dimensione nominale del lotto: 71.000 Capsule Quantità Totale 19,2 kg |
| Formula (I) Emitartrato | 100,0 | 37,0 | 7,1 |
| Cellulosa microcristallina | 45,0 | 16,7 | 3,2 |

| | | | |
|----------------------|-------|-------|------------|
| Lattosio monoidrato | 111,5 | 41,3 | 7,9 |
| Ipromellosio, E15 | 10,8 | 4,0 | 0,8 |
| Gliceril beenato | 2,7 | 1,0 | 0,2 |
| Peso riempito (mg) | 270 | | 248-292 mg |
| Composizione% totale | | 100,0 | 19,2 kg |

Gli ingredienti sono stati quindi granulati in umido mediante l'aggiunta di acqua purificata (2,2 kg; 11,7% di peso di ingredienti anidri) nel recipiente del granulatore fino a completamento, come confermato visivamente. La granulazione umido è stata scaricata dal contenitore e fatta passare attraverso un mulino di filtrazione girante rotante. La granulazione in umido è stata quindi essiccata in una stufa a secco ad arella riscaldamento diretto, a letto solido, statico a $50 \pm 5^\circ\text{C}$ fino a un contenuto di umidità non maggiore del 3,5%, come confermato da controllo durante il processo. I granuli essiccati sono stati quindi fatti passare attraverso un mulino di filtraggio e i granuli filtrati sono stati trasferiti in un miscelatore a V. Al miscelatore a V è stato aggiunto gliceril beenato (0,2 kg) e la miscela finale è stata miscelata fino a che la miscela non fosse uniforme, come determinato da un test di uniformità della miscela in linea e fuori dalla linea, tipicamente per da dieci a venti minuti. La miscela finale è stata quindi

incapsulata in una capsula di dimensione #2 usando un riempitore di capsule semi-automatico al peso di riempimento appropriato (in media 270 mg) e le capsule riempite sono state spolverate prima del confezionamento.

Esempio 11A: Composizione farmaceutica di Formula (I) Emitartrato,

Capsule da 10 mg

Metodo di Preparazione di Capsule da 10 mg: la procedura dell'Esempio 10 è stata seguita fino alla fase di incapsulamento. Per produrre una capsula da 10 mg, la miscela finale è stata incapsulata in una capsula di dimensione #4 o #5 usando un macchinario per riempire capsule al peso di riempimento appropriato (in media 27 mg) e le capsule riempite sono state spolverate prima del confezionamento.

Esempio 11B: Composizione farmaceutica di Formula (I) Emitartrato,

Capsule da 50 mg

Metodo di Preparazione di Capsule da 50 mg: la procedura dell'Esempio 10 è stata seguita fino alla fase di incapsulamento. Per produrre una capsula da 50 mg, la miscela finale è stata incapsulata in una capsula di dimensione #3 usando un macchinario per riempire capsule al peso di riempimento appropriato (in media 135 mg) e le capsule riempite sono state spolverate prima del confezionamento.

Esempio 11C: Composizione farmaceutica di Formula (I) Emitartrato,

Capsule da 150 mg

Metodo di Preparazione di Capsule da 150 mg: la procedura dell'Esempio 10 è stata seguita fino alla fase di incapsulamento. Per

produrre una capsula da 150 mg, la miscela finale è stata incapsulata in una capsula di dimensione #0 usando un macchinario per riempire capsule al peso di riempimento appropriato (in media 405 mg) e le capsule riempite sono state spolverate prima del confezionamento

Esempio 12: Composizione farmaceutica di Formula (I) Emitartrato, Capsule da 25 mg

Metodo di Preparazione di Capsule da 25 mg: la procedura dell'Esempio 10 è stata seguita fino alla fase di incapsulamento. Per produrre una capsula da 25 mg, la miscela finale è stata incapsulata in una capsula di dimensione #4 usando un macchinario per riempire capsule al peso di riempimento appropriato (in media 67,5 mg) e le capsule riempite sono state spolverate prima del confezionamento.

Esempio 13: Interazioni di farmaci con Formula (I) Emitartrato – inibitori di CYP2D6

Uno studio è stato eseguito per valutare la farmacocinetica, la sicurezza e la tollerabilità di dosi orali multiple di Formula (I) Emitartrato (100 mg BID) somministrato con e senza paroxetina (30 mg una volta al giorno), un potente inibitore di CYP2D6. Si è trattato di uno studio in aperto a sequenza fissata in 36 soggetti sani (17 maschi e 19 femmine). Gli obiettivi secondari erano la valutazione della PK di paroxetina in combinazione con dosi multiple di Formula (I) Emitartrato (100 mg BID) in soggetti sani e l'ulteriore valutazione della PK di

Formula (I) Emitartrato dopo la somministrazione di Formula (I) Emitartrato in dose multipla rispetto ad una dose singola.

I parametri medi di PK della base libera di Formula (I) Emitartrato come presente nel plasma sono stati non lineari e hanno mostrato un accumulo di 2 volte di AUC e C_{max} con somministrazione ripetuta (100 mg BID) rispetto alla somministrazione in dose singola. La somministrazione concomitante di Formula (I) Emitartrato e paroxetina ha determinato un aumento di 7 volte della C_{max} e un aumento di 9 volte dell'AUC rispetto alla somministrazione in dose multipla di Formula (I) Emitartrato da solo. Questi risultati indicano che la paroxetina può inibire il metabolismo di Formula (I) Emitartrato e aumentare le concentrazioni nel plasma del sangue del farmaco. Ci si attenderebbero effetti simili con altri potenti inibitori di CYP2D6 (ad esempio fluoxetina e quinidina) e sono necessari l'attento monitoraggio dei livelli plasmatici di farmaco e potenziali adattamenti della dose quando Formula (I) Emitartrato viene co-somministrato con un farmaco noto essere un potente inibitore di CYP2D6. Le concentrazioni di paroxetina erano circa da 1,5 a 2 volte più elevate rispetto all'atteso, il che suggerisce che Formula (I) Emitartrato o uno dei suoi metaboliti possa essere un blando inibitore di CYP2D6.

Esempio 14: Interazioni di farmaci con Formula (I) Emitartrato Farmaco – inibitori di CYP3A4 Inibitori e inibitori di p-glicoproteina (PGP)

È stato eseguito uno studio per valutare la farmacocinetica, la sicurezza e la tollerabilità di dosi orali multiple di Formula (I) Emitartrato

(100 mg due volte al giorno) con e senza ketoconazolo in dose multipla (400 mg una volta al giorno) in soggetti sani maschi e femmine. Si è trattato di uno studio in aperto a sequenza fissata in 36 soggetti sani (18 maschi e femmine) che consisteva in 3 periodi che includevano la somministrazione di una singola dose di 100 mg di Formula (I) Emitartrato, somministrazione di dosi multiple di Formula (I) Emitartrato, e somministrazione concomitante di Formula (I) Emitartrato 100 mg (due volte al giorno) con ketoconazolo 400 mg (una volta al giorno). La somministrazione ripetuta di Formula (I) Emitartrato e ketoconazolo, un forte inibitore di Citocromo p450 3A4 ("CYP 3A4") e p-glicoproteina, ha determinato un aumento di 4 volte dell'esposizione della base libera di Formula (I) Emitartrato come presente nel plasma allo stato stazionario. Pertanto, i pazienti che già ricevevano Formula (I) Emitartrato possono necessitare di una riduzione temporanea della dose mentre sono sottoposti a terapia concomitante con forti inibitori di CYP 3A4 o p-glicoproteina.

Esempio 15 - Studi di Stabilità per formulazione di Formula (I) Emitartrato

Sono state preparate miscele miscelando Formula (I) Emitartrato ed eccipienti (lattosio monoidrato di grado per incapsulamento, Avicel PH 301 (Cellulosa microcristallina) e Methocel E15 Prem LV (Idrossipropilmetilcellulosa) in una provetta per scintillazione in una scala di circa due grammi. È stato aggiunto il 15,6% di acqua alla miscela ed è stata miscelata per formare granuli

umidi. I granuli umidi sono stati filtrati usando un setaccio #10 (apertura da 2000 micron). I granuli filtrati sono stati quindi essiccati in una stufa a 50°C per 2 ore. I granuli essiccati sono stati filtrati usando un setaccio #18 (apertura da 1000 micron). Il lubrificante, gliceril beenato, è stato aggiunto alla miscela e miscelato per formare la miscela finale. Le miscele preparate sono mostrate nella tabella sotto:

Tabella

| Lotto # | AP | Lattosio Monoidrato | Avicel PH 101 | Formulazione 50 mg / 100 mg | Commento |
|----------------|-----------|----------------------------|----------------------|------------------------------------|---|
| 1 | 1 | 2,1 | 2,1 | 50 | controllo |
| 2 | 1 | 2,1 | 0 | 50 | senza Avicel |
| 3 | 1 | 0 | 2,1 | 50 | senza Lattosio |
| 4 | 1 | 2,1 | 1,1 | 50 | meno Avicel |
| 5 | 1 | 1,1 | 2,1 | 50 | meno Lattosio |
| 6 | 1 | 2,1 | 0,8 | 50 | Rapporto Avicel e Lattosio comparabile a 100 mg |
| 7 | 1 | 1,1 | 0,4 | 100 | controllo |

Methocel (HPMC) è stato usato nell'intervallo da 2 a 4%

Compritol ATO 88 è stato usato nell'intervallo da 1 a 1,6%

Le sette miscele di formulazione che hanno diversi rapporti API:lattosio:Avicel elencate sopra sono state esposte a una elevata temperatura a 85°C per 3 giorni (una condizione di studio di degradazione forzata) al fine di stabilire la velocità di degradazione e la stabilità di ciascuna formulazione. Questa condizione accelerata è stata scelta in base ai risultati di studi per cui il grado dei prodotti di degradazione del prodotto farmaceutico da 50mg farmaco a 24 mesi era simile a quello ottenuta a 85°C per 3 giorni.

Lo studio di degradazione forzata è stato eseguito usando un metodo di HPLC con gradiente in fase inversa che usava una colonna C18 (Waters T3, 3 µm, 100 x 4,6 mm), fasi mobili che consistevano in acqua e acetonitrile con acido trifluoroacetico allo 0,1% (TFA), rilevamento UV a 280 nm, temperatura della colonna a 40°C, e velocità di flusso a 2 mL/min. Il gradiente è partito mantenendo un 5% di B (acetonitrile e TFA 0,1%) per 0,5 minuti, e quindi incrementando il componente organico a 4,83% di B per minuto fino a 15 minuti.

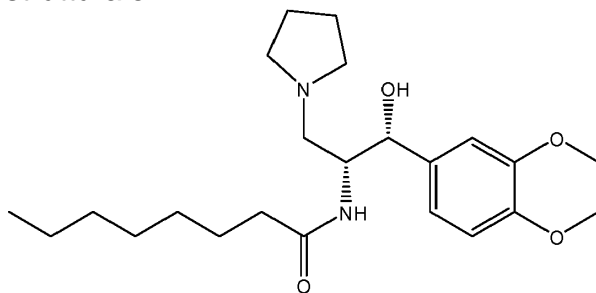
I degradanti totali di ciascuna miscela di formulazione sono stati sommati e messi in grafico rispetto al rapporto API:Lattosio:Avicel e i risultati sono mostrati in Figura 15. I risultati dello studio suggeriscono che, mentre si mantiene il rapporto tra API e Lattosio costante, la diminuzione della quantità di avicel migliora la stabilità della formulazione. Quando avicel viene rimosso, la formulazione ha un rapporto API:Lattosio:Avicel di 1:2,1:0, è una formulazione più stabile. Quando il lattosio viene rimosso, la formulazione ha un rapporto

API:Lattosio:Avicel di 1:0:2,1, e questa formulazione non è la più instabile rispetto ad altri rapporti. Le informazioni combinate suggeriscono che il lattosio stabilizza la formulazione, mentre avicel destabilizza la formulazione. Tuttavia, sono presenti entrambi gli eccipienti, essi interagiscono l'uno con l'altro. Il rapporto deve essere tarato per ottenere una formulazione stabile.

Per ingredienti farmaceutici attivi come Formula (I) emidrato che sono solubili in acqua, la cellulosa microcristallina aiuta a formare granuli durante la granulazione in umido poiché è insolubile in acqua. Se non viene usata cellulosa microcristallina, si presenta un marcato cambiamento dallo stadio di granulo alla forma in pasta. La forma in pasta era difficile da manipolare e le particelle risultanti dopo l'essiccamento non hanno la forza meccanica e la distribuzione dimensionale delle particelle adeguate. La composizione farmaceutica che ha il 37% in peso di Formula (I) Emitartrato, il 41,0% in peso di un riempitivo solubile in acqua; il 16,7% in peso di un riempitivo insolubile, dal 2% in peso a circa il 6% in peso di un legante; e circa dallo 0,1% in peso a circa il 2% in peso di un lubrificante, tutti in base a solidi anidri, ha il profilo di stabilità migliore rispetto alla quantità di degradanti formata.

RIVENDICAZIONI

1. Primo agente terapeutico rappresentato dalla seguente formula strutturale:

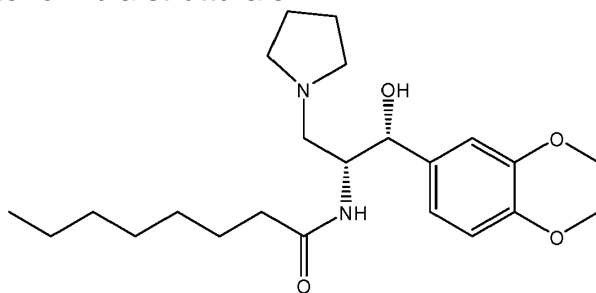


o un suo sale

farmaceuticamente accettabile, per uso nel trattamento della malattia di Gaucher,

in cui detto trattamento comprende la somministrazione di una quantità efficace del primo agente terapeutico in combinazione con una quantità efficace di un secondo agente terapeutico che è efficace per trattare la malattia di Gaucher.

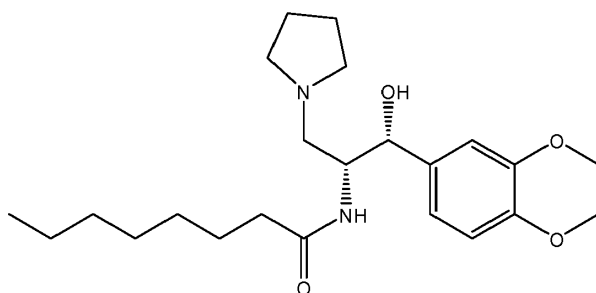
2. Uso di un primo agente terapeutico rappresentato dalla seguente formula strutturale:



o un suo sale

farmaceuticamente accettabile, nella produzione di un medicamento per uso nel trattamento della malattia di Gaucher,

in cui detto trattamento comprende la somministrazione di una quantità efficace del primo agente terapeutico in combinazione con una



o un suo sale

farmaceuticamente accettabile nella produzione di un medicamento per uso nel trattamento della malattia di Fabry,

in cui detto trattamento comprende la somministrazione di una quantità efficace del primo agente terapeutico in combinazione con una quantità efficace di un secondo agente terapeutico che è efficace per trattare la malattia di Fabry.

7. Composto per uso di Rivendicazione 5 o uso di Rivendicazione 6, in cui il secondo agente terapeutico è selezionato tra α galattosidasi A, analoghi di α galattosidasi A, e chaperon molecolari che legano α galattosidasi A e ripristinano la sua corretta conformazione.

8. Composto per uso di Rivendicazione 5 o uso di Rivendicazione 6, in cui il secondo agente terapeutico è migalastat, Agalsidasi beta, o Agalsidasi alfa.

9. Composto per uso o uso di una qualsiasi delle Rivendicazioni da 1 a 8, in cui il primo agente terapeutico è somministrato come sale Emitartrato.

10. Composto per uso o uso di Rivendicazione 9, in cui detto sale è amorfo o almeno il 70% in peso di detto sale è cristallino.

11. Composto per uso o uso di rivendicazione 9, in cui almeno il 70% in peso di detto sale è in una singola forma cristallina.

12. Composto per uso o uso di rivendicazione 11, in cui la singola forma cristallina è caratterizzata da uno, due, tre, quattro o cinque picchi principali di diffrazione di raggi x di polveri agli angoli 2θ di $5,1^\circ$, $6,6^\circ$, $10,7^\circ$, $11,0^\circ$, $15,9^\circ$ e $21,7^\circ$.

13. Composto per uso o uso di rivendicazione 11, in cui la singola forma cristallina è caratterizzata da picchi di diffrazione di raggi x di polveri agli angoli 2θ di $5,1^\circ$, $6,6^\circ$, $10,7^\circ$, $11,0^\circ$, $13,3^\circ$, $15,1^\circ$, $15,9^\circ$, $16,5^\circ$, $17,6^\circ$, $18,6^\circ$, $18,7^\circ$, $19,0^\circ$, $20,2^\circ$, $21,7^\circ$ e $23,5^\circ$.

14. Composto per uso o uso di rivendicazione 11, in cui la singola forma cristallina è caratterizzata dal profilo di diffrazione di raggi x di polveri di Figura 1.

15. Composto per uso o uso di una qualsiasi delle Rivendicazioni da 1 a 14, in cui il trattamento con il primo agente terapeutico viene iniziato dopo trattamento per un periodo di almeno dieci settimane con il secondo agente terapeutico.

16. Composto per uso o uso di una qualsiasi delle Rivendicazioni da 1 a 14, in cui il trattamento con il primo agente terapeutico viene iniziato dopo trattamento con il secondo agente terapeutico e in cui il trattamento con il primo agente terapeutico è avviato dopo che la conta piastrinica del soggetto è uguale o superiore a 100.000 mm^3 ; la concentrazione di emoglobina è uguale o superiore a 11 g/dl (femmina) o 12 g/dl (maschio); e/o il volume della milza del

soggetto è inferiore o uguale a 10 multipli del normale e i volumi del fegato sono inferiori o uguali a 1,5 multipli del normale.

17. Composto per uso o uso di Rivendicazione 15 o 16, in cui il trattamento con il secondo agente terapeutico viene terminato dopo l'inizio del trattamento con il primo agente terapeutico.

18. Composto per uso o uso di una qualsiasi delle Rivendicazioni da 1 a 17, in cui detto trattamento comprende la somministrazione del primo agente terapeutico a una dose compresa tra 25 milligrammi e 200 milligrammi bigiornaliera.

19. Composto per uso o uso di una qualsiasi delle Rivendicazioni da 1 a 18, in cui detto trattamento comprende la somministrazione del primo agente terapeutico a una dose di 50 milligrammi bigiornaliera.

*** **

Si attesta la perfetta conformità della traduzione che precede.

LEGENDA DELLE TAVOLE DEI DISEGNI

TAVOLA 1/15

Figura 1

“Group” = Gruppo

“Data = dati

TAVOLA 2/15

Figura 2

“Glucosylceramide” = Glucosilceramide

“g liver” = g di fegato

“Glucocerebrosidase” = Glucocerebrosidasi

“Hemitartrate” = Emitartrato

TAVOLA 3/15

Figura 3

“Glucosylceramide” = Glucosilceramide

“g spleen” = g di milza

“Glucocerebrosidase” = Glucocerebrosidasi

“Hemitartrate” = Emitartrato

TAVOLA 4/15

Figura 4

“Glucosylceramide” = Glucosilceramide

“g lung” = g di polmone

“Glucocerebrosidase” = Glucocerebrosidasi

“Hemitartrate” = Emitartrato

TAVOLA 5/15

Figura 5

“% area CD68 positive” =% di area positiva per CD68

“Glucocerebrosidase” = Glucocerebrosidasi

“Hemitartrate” = Emitartrato

TAVOLA 6/15

Figura 6

“Glucosylceramide” = Glucosilceramide

“% vehicle” =% rispetto al veicolo

“Liver” = fegato

“Lung” = Polmone

“Spleen” = Milza

TAVOLA 7/15

Figura 7

“Formula (I) Hemitartrate inhibits the extent of GL-3 accumulation in Fabry mice” = Formula (I) emitartrato inibisce la misura dell’accumulo di GL-3 in topi Fabry

“g tissue” = g di tessuto

“Age (months)” = Età (mesi)

“Liver” = fegato

“Heart” = Cuore

“Spleen” = Milza

“Kidney” = Rene

“Brain” = Cervello

“Blood” = Sangue

“Untreated Fabry” = Fabry non trattati

“C8 treated Fabry” = Fabry trattati C8

“Wild-type sv129” = sv129 selvatici

TAVOLA 8/15

Figura 8

“Formula (I) Hemitartrate delays onset and progression of peripheral neuropathy in Fabry mice” = Formula (I) emitartrato ritarda la comparsa e la progressione della neuropatia periferica in topi Fabry

“Fabry treated” = Fabry trattati

“Fabry non trattati” = Fabry non trattati

“Time (seconds)” = Tempo (secondi)

“Age (months)” = Età (mesi)

TAVOLA 9/15

Figura 9

“Treatment of Fabry mice with Formula (I) hemitartrate improves some markers of kidney function” = Il trattamento di topi Fabry con Formula (I) emitartrato migliora alcuni marcatori della funzionalità renale

“Sodium” = Sodio

“Creatinine” = Creatinina

“Wild-type” = Selvatici

“Treated Fabry” = Fabry trattati

“Untreated Fabry” = Fabry non trattati

“12-month time point” = Punto temporale a 12 mesi

TAVOLA 10/15

Figura 10

“Timeline for ERT ± SRT study in Fabry-Rag mouse” = Sequenza cronologica per lo studio di ERT ± SRT nel topo Fabry-Rag

“Fabrazyme bimonthly” = Fabrazyme due volte al mese

“Fabrazyme bimonthly + Formula (I) hemitartrate in food” = Fabrazyme due volte al mese + Formula (I) emitartrato nel cibo

“Formula (I) hemitartrate in food” = Formula (I) emitartrato nel cibo

“Untreated” = Non trattati

“Sac. Points” = Punti di sac.

“Urinalysis” = Analisi delle urine

“Hotplate/bleeds” = Piastra calda/prelievi di sangue

“Start @ 3 mo.” = Inizio a 3 mesi

“End @ 11 mo.” = Termine a 11 mesi

TAVOLA 11/15

Figura 11

“ERT but not SRT reduces blood GL-3 levels in Fabry-Rag mice” = ERT ma non SRT riduce i livelli di GL-3 in topi Fabry-Rag

“mL blood” = ml di sangue

“Age (months)” = Età (mesi)

“Untreated” = Non trattati

TAVOLA 12/15

Figura 12

“Combination ERT/SRT is most effective at reducing GL-3 levels in Fabry-Rag mice liver and kidney” = La combinazione ERT/SRT è la più efficace nel ridurre i livelli di GL-3 in fegato e rene di topi Fabry-Rag

“Heart” = Cuore

“11 months” = 11 mesi

“Kidney” = Rene

“Spleen” = Milza

“Liver” = fegato

“% WT control” =% del controllo WT

“Unt” = Non trattati

TAVOLA 13/15

Figura 13

“SRT but not ERT reduces urine GL-3 levels in Fabry-Rag mice” = SRT,
ma non ERT, riduce i livelli di GL-3 nell’urina di topi in Fabry-Rag

“mL urine” = ml di urina

“Age (months)” = Età (mesi)

“Untreated” = Non trattati

TAVOLA 14/15

Figura 14

“SRT but not ERT delays onset of heat-insensitivity in Fabry-Rag mice (11
months)” = SRT ma non ERT ritarda la comparsa dell’insensibilità al calore in
topi in Fabry-Rag

“Latency (secs)” = Latenza (s)

“2 mo” = 2 mesi

“4 mo” = 4 mesi

“Untreated” = Non trattati

“Wild-type” = Selvatici

“3 mo” = 3 mesi

TAVOLA 15/15

Figura 15

“Total degradant” = degradate totale

“Total degradant area%” = Area% di degradante totale

“API:Lactose:Avicel ratio” = Rapporto API:Lattosio:Avicel

*** **

Si attesta la perfetta conformità della traduzione che precede.

FIG. 1

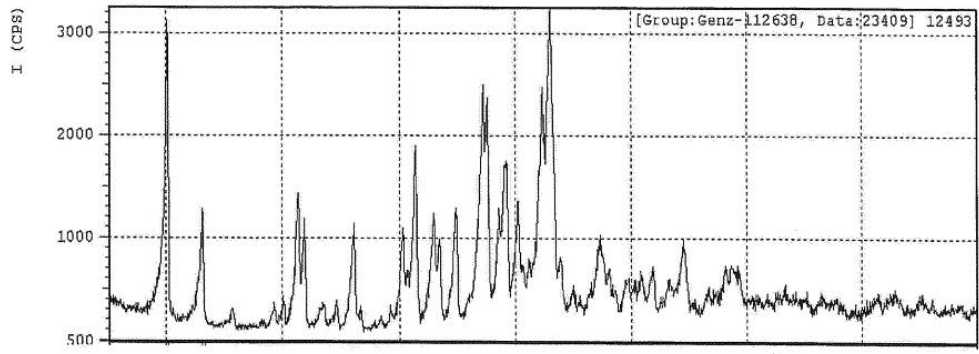


FIG. 2

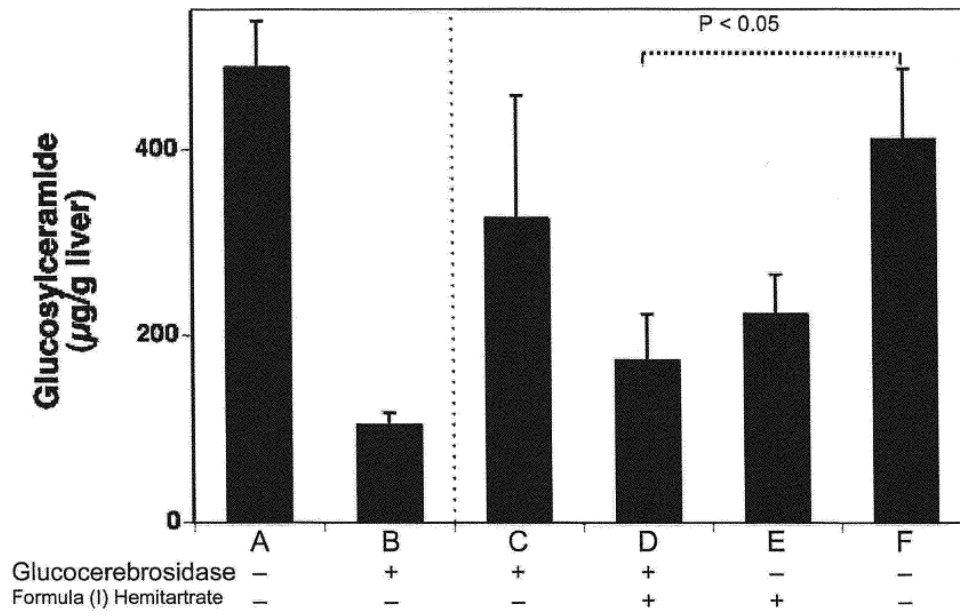


FIG. 3

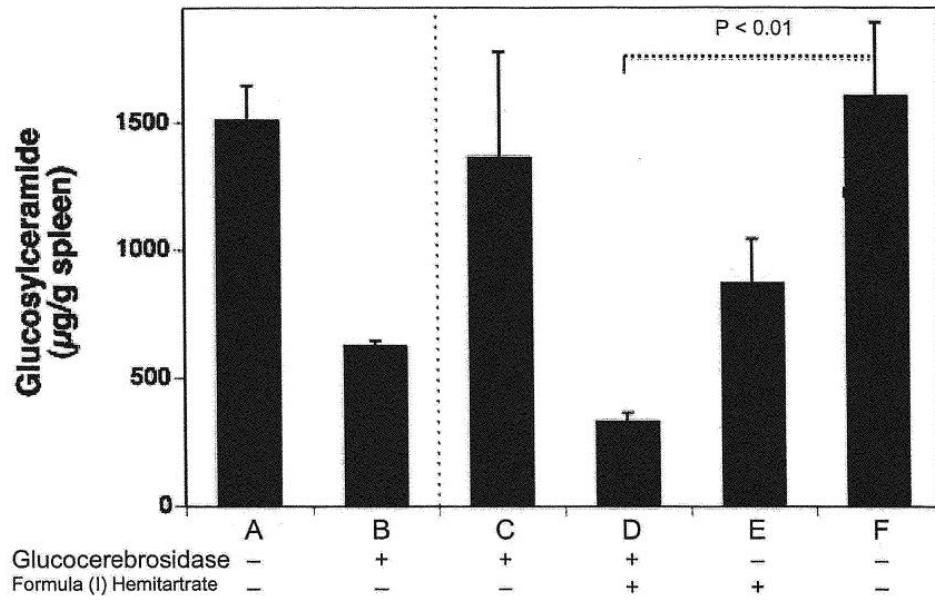


FIG 4.

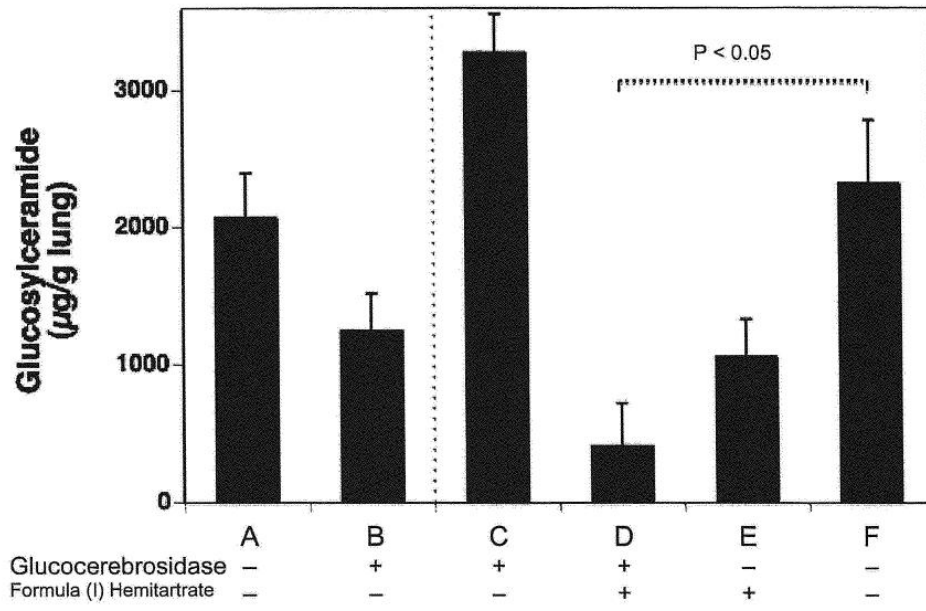
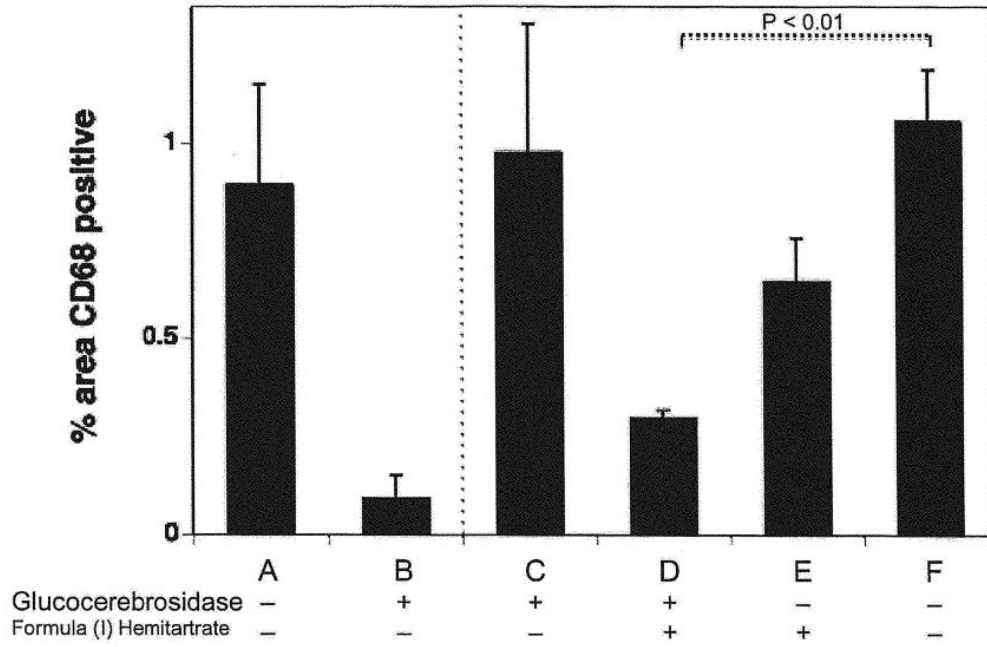


FIG. 5



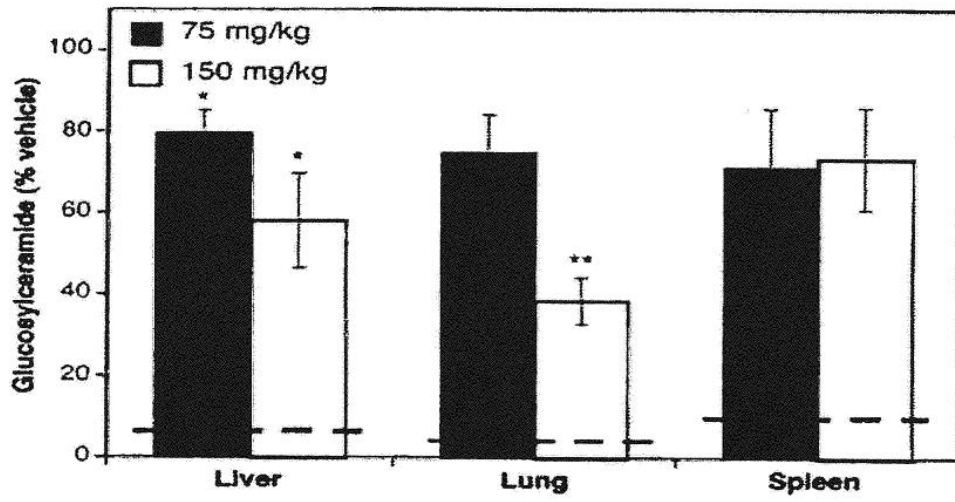


FIG. 6

FIG. 7

Formula (I) Hemitartrate inhibits the extent of GL-3 accumulation in Fabry mice

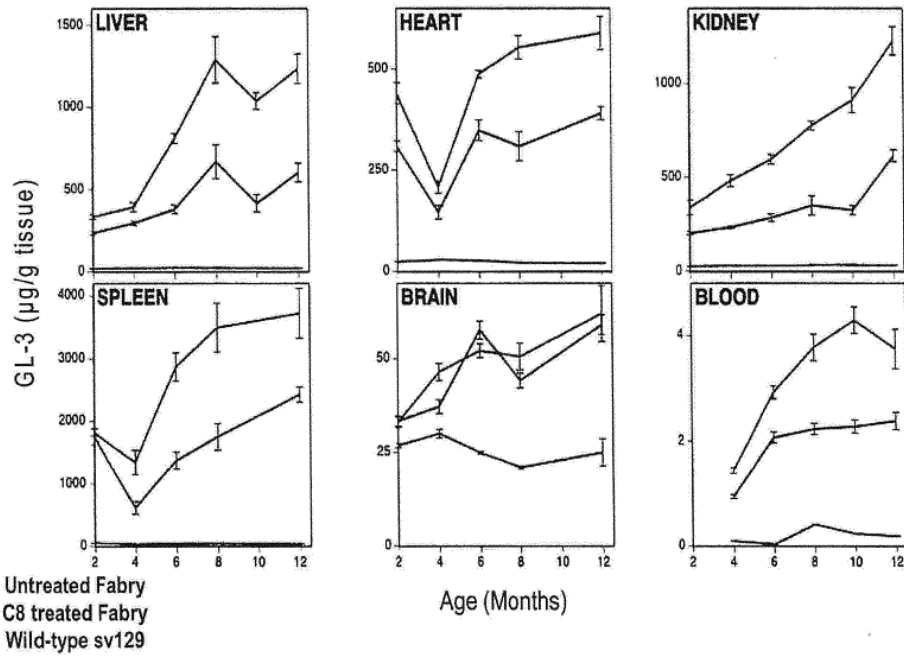


FIG. 8

Formula (I) Hemitartrate delays onset and progression of peripheral neuropathy in Fabry mice

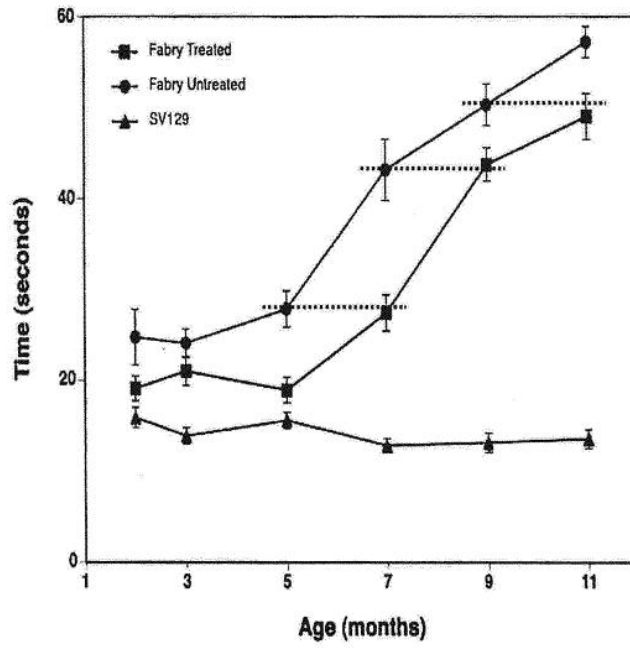


FIG. 9

**Treatment of Fabry mice with Formula (I)
Hemitartrate improves some markers of kidney
function**

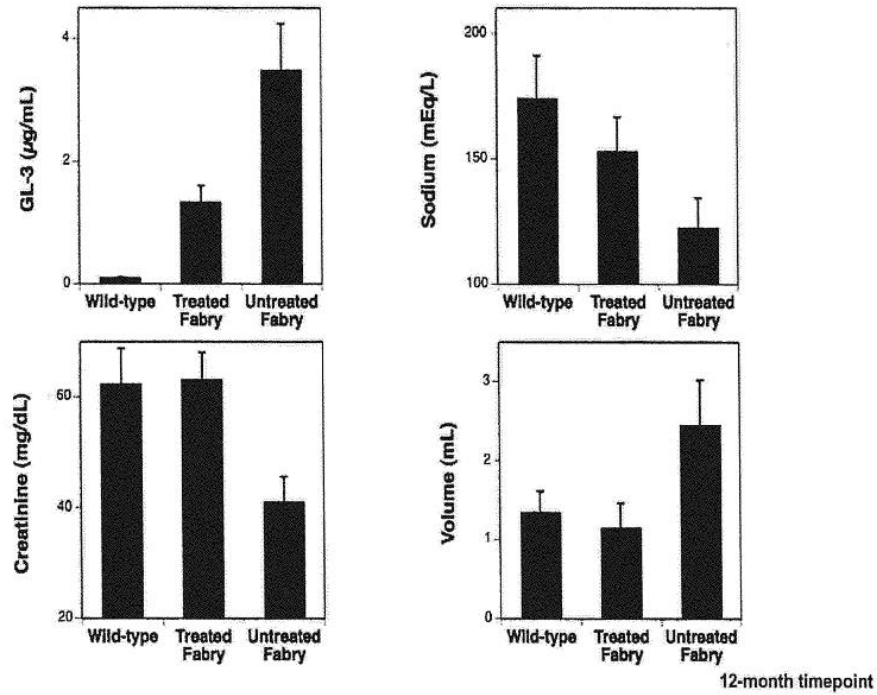


FIG. 10.

Timeline for ERT ± SRT study in Fabry-Rag mouse

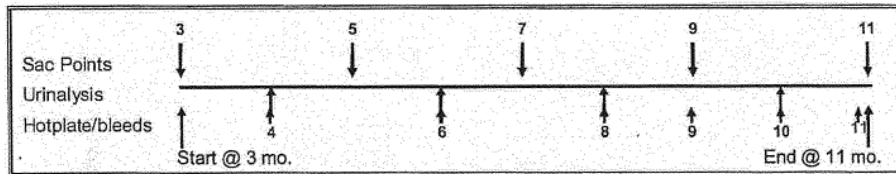
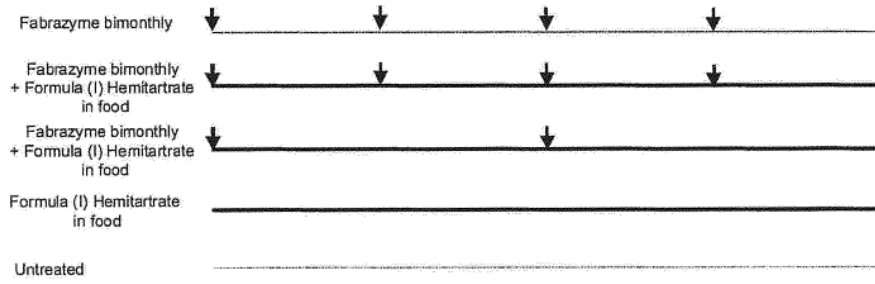


FIG. 11

ERT but not SRT reduces blood GL-3 levels in Fabry-Rag mice

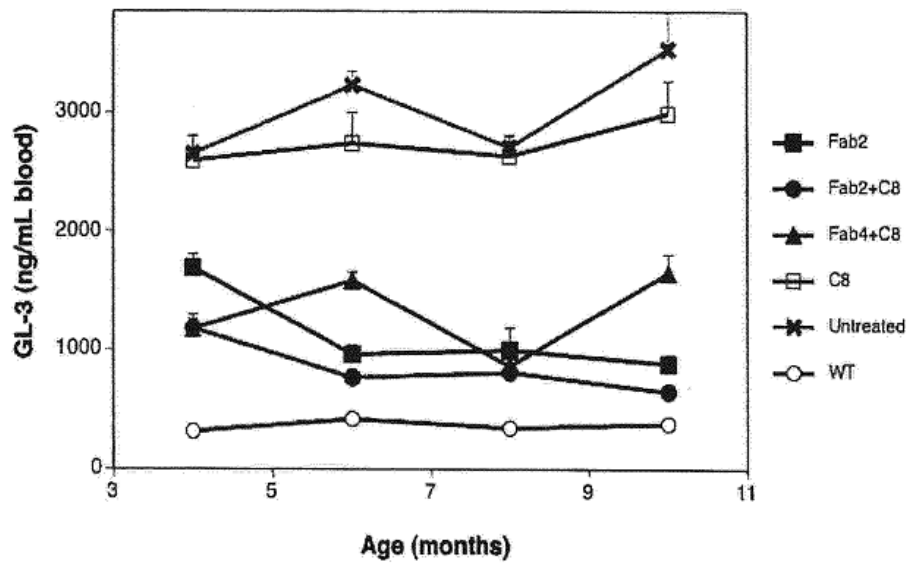


FIG. 12

**Combination ERT/SRT is most effective at reducing
GL-3 levels in Fabry-Rag mice liver & kidney**

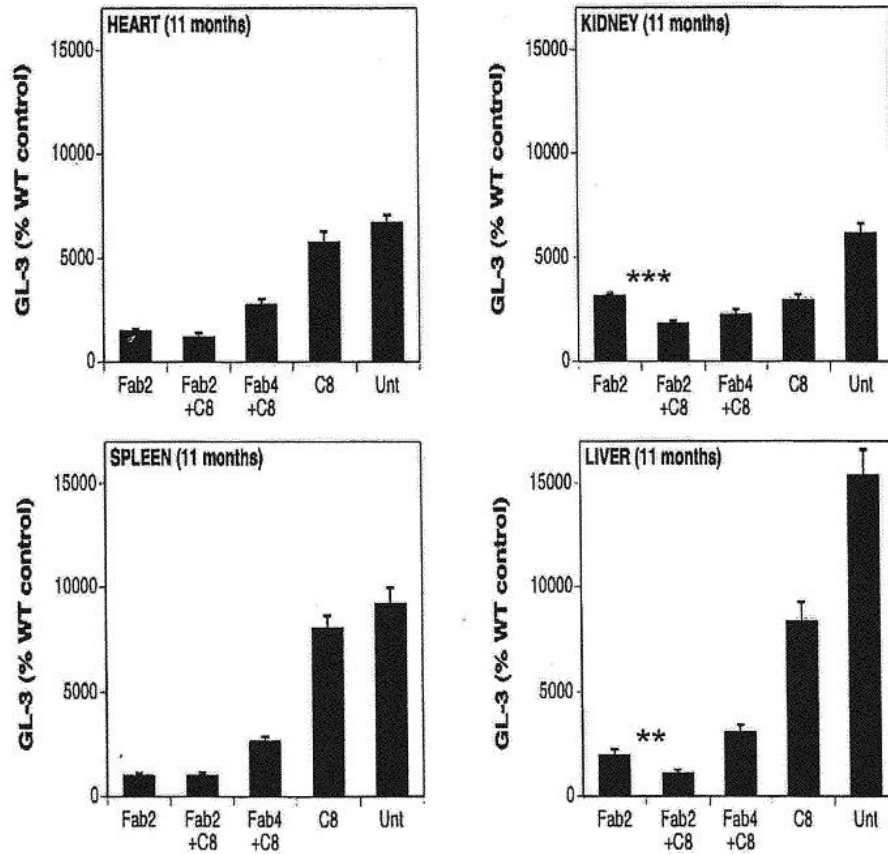


FIG. 13

SRT but not ERT reduces urine GL-3 levels in Fabry-Rag mice

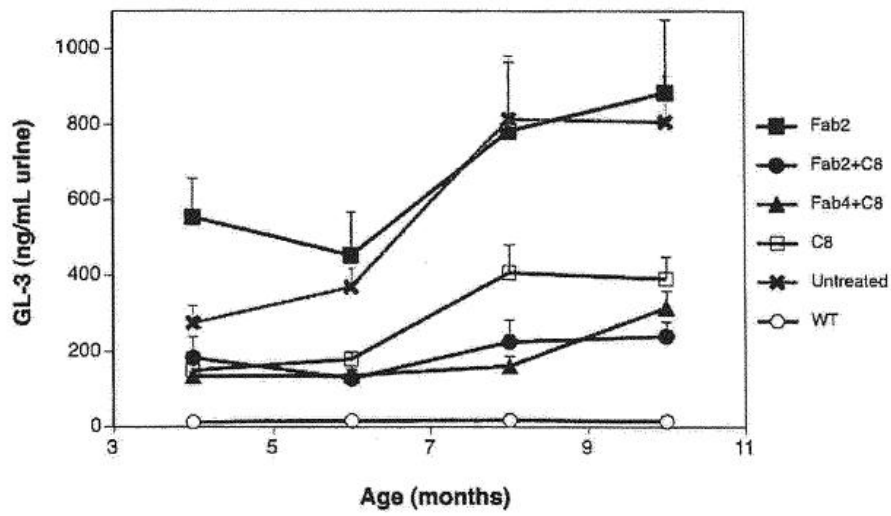


FIG. 14

SRT but not ERT delays onset of heat-insensitivity in Fabry-Rag mice (11 months)

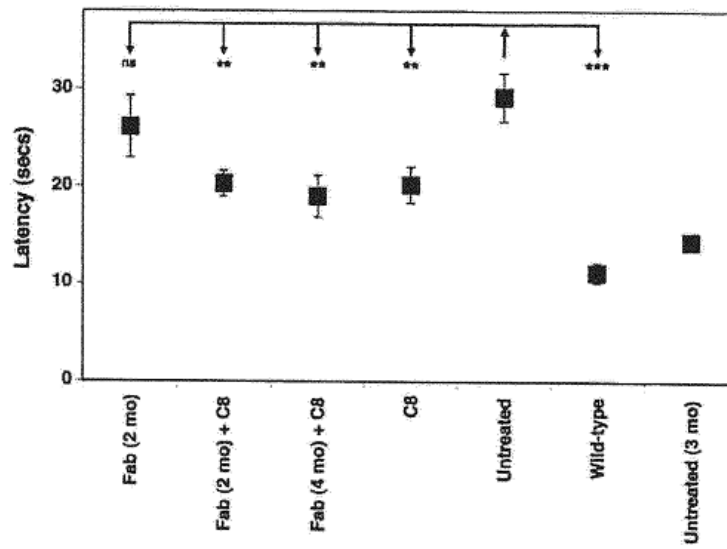


FIG 15

