

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 586 947**

51 Int. Cl.:

**C07D 405/06** (2006.01)

**A61K 31/4025** (2006.01)

**A61P 35/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.11.2010 E 14164650 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.05.2016 EP 2796457**

54 Título: **Genz 112638 para tratar la enfermedad de Gaucher o de Fabry en terapia de combinación**

30 Prioridad:

**27.11.2009 US 264748 P**

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

**19.10.2016**

73 Titular/es:

**GENZYME CORPORATION (100.0%)  
500 Kendall Street  
Cambridge, MA 02142, US**

72 Inventor/es:

**LIU, HANLAN;  
WILLIS, CHRIS;  
BHARDWAJ, RENU;  
COPELAND, DIANE, P.;  
HARIANAWALA, ABIZER;  
SKELL, JEFFREY;  
MARSHALL, JOHN;  
KOCHLING, JIANMEI;  
PALACE, GERARD;  
PETERSCHMITT, JUDITH;  
SIEGEL, CRAIG y  
CHENG, SENG**

74 Agente/Representante:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

**ES 2 586 947 T3**

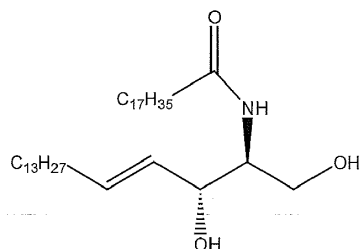
Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Genz 112638 para tratar la enfermedad de Gaucher o de Fabry en terapia de combinación

## ANTECEDENTES

5 Los glucoesfingolípidos (GSLs) son una clase de compuestos de origen natural que tienen una multitud de funciones biológicas, incluyendo la capacidad para promover el crecimiento celular, la diferenciación celular, la adhesión entre células o entre células y proteínas de la matriz, la unión de microorganismos y virus a las células, y la metástasis de células tumorales. Los GSLs derivan de glucosilceramida (GlcCer), que se produce a partir de ceramida y UDP-glucosa mediante la enzima UDP-glucosa: *N*-acil-esfingosina glucosiltransferasa (GlcCer sintasa). La estructura de la ceramida se muestra a continuación:



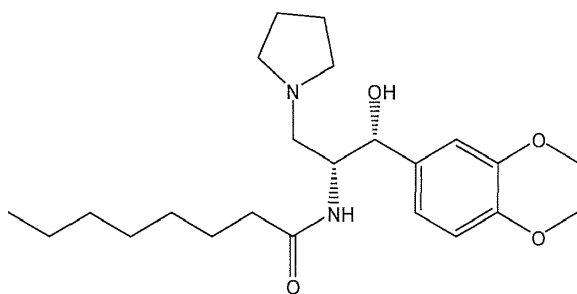
10

Ceramida

15 La acumulación de GSLs se ha relacionado con un número de enfermedades, incluyendo enfermedades de Tay-Sachs, de Gaucher, y de Fabry (véase, por ejemplo, la patente U.S. n° 6.051.598). Los GSLs también se han relacionado con ciertos cánceres. Por ejemplo, se ha encontrado que ciertos GSLs se producen solamente en tumores o en concentraciones anormalmente elevadas en tumores; ejercen acciones estimulantes o inhibitoras notables sobre el crecimiento tumoral cuando se añaden a células tumorales en medios de cultivo; e inhiben el sistema de inmunodefensa normal del cuerpo cuando son desprendidos por tumores en el fluido extracelular circundante. La composición de GSLs tumorales cambia a medida que los tumores se hacen cada vez más malignos y los anticuerpos contra ciertos GSLs inhiben el crecimiento de los tumores.

20 Los compuestos que inhiben GlcCer sintasa pueden reducir las concentraciones de GSL, y se ha dado a conocer que son útiles para tratar un sujeto con una de las enfermedades mencionadas anteriormente. En las patentes U.S. n°s 6.051.598, 5.952.370, 5.945.442, 5.916.911 y 6.030.995 se describe un número de inhibidores potentes de GlcCer, denominados aquí como "compuestos similares a aminoceramidas". El compuesto de Fórmula (I), mostrado más abajo, es un inhibidor de GlcCer sintasa actualmente en ensayos clínicos para el tratamiento de la enfermedad de Gaucher:

25



(I).

30 Existe la necesidad de formas salinas de este candidato farmacéutico que sean cristalinas y tengan de otro modo propiedades físicas que sean susceptibles a la fabricación a gran escala. También existe la necesidad de formulaciones farmacéuticas en las que este candidato farmacéutico sea estable y se suministre eficazmente al paciente, así como métodos de tratamiento mejorados que utilicen este compuesto.

McEachern K et al., *Molecular Genetics and Metabolism*, 91(3), 2007, 259-267 se refiere a un inhibidor de glucosilceramida sintasa para la terapia de inhibición del sustrato de la enfermedad de Gaucher.

El documento WO 2006/053043, se refiere a métodos para tratar un sujeto diabético que comprenden administrar un inhibidor de glucosilceramida sintasa al sujeto.

35 El documento US 2003/050299 se refiere a la síntesis de UDP-glucosa *N*-acilesfingosina glucosiltransferasa.

## SUMARIO DE LA INVENCION

Se ha encontrado que la sal de hemitartrato del compuesto de Fórmula (I) (en lo sucesivo "Hemitartrato de Fórmula (I)") se puede cristalizar en condiciones bien definidas para proporcionar ciertas formas cristalinas no higroscópicas. El Hemitartrato de Fórmula (I) tiene varias propiedades ventajosas cuando se compara con otras sales de Fórmula (I). Como se describe adicionalmente en el Ejemplo 1, muchas sales de la Fórmula (I), incluyendo citrato, malato, 5 fumárico, metilsulfónico, y acético, no se podrían obtener en forma sólida. Aunque la sal de hidrocloreuro y de tartrato 1:1 de Fórmula (I) se obtuvieron en forma sólida, ninguna de las dos fue cristalina, y ambas fueron demasiado higroscópicas para la formulación. El Hemitartrato de Fórmula (I) es más fácil de formular y sintetizar que la base libre y que las otras sales. El Hemitartrato de Fórmula (I) es también cristalino, no higroscópico, soluble en agua, y fluye mejor que la base libre correspondiente (en lo sucesivo "Base Libre de la Fórmula (I)") y otras sales. De este 10 modo, estas propiedades favorables hacen al Hemitartrato de Fórmula (I) susceptible para la fabricación a gran escala como candidato farmacéutico.

También se ha encontrado que los gránulos estables para la formulación en cápsulas del Hemitartrato de Fórmula (I) se pueden preparar usando relaciones definidas de una carga insoluble en agua, una carga soluble en agua y Hemitartrato de Fórmula (I). Basándose en este descubrimiento, se describen formulaciones farmacéuticas estables 15 de Hemitartrato de Fórmula (I).

También se ha encontrado que el compuesto de Fórmula (I) o sus sales farmacéuticamente aceptables (incluyendo Hemitartrato de Fórmula (I)) son metabolizados por el hígado, principalmente por las enzimas de citocromo P450. Basándose en este descubrimiento, se describen métodos de tratamiento con el compuesto de Fórmula (I) o sus 20 sales farmacéuticamente aceptables (incluyendo Hemitartrato de Fórmula (I)) que reducen el potencial de interacciones fármaco-fármaco.

También se ha encontrado que los ratones con Gaucher a los que se les administra glucocerebrosidasa recombinante y después Hemitartrato de Fórmula (I) mostraron niveles más bajos de GL1 en órganos viscerales, y redujeron el número de células de Gaucher en el hígado en comparación con el tratamiento con glucocerebrosidasa sola o con Hemitartrato de Fórmula (I) solo. Basándose en este descubrimiento, también se describen terapias de 25 combinación con el compuesto de Fórmula (I) o sus sales farmacéuticamente aceptables (incluyendo Hemitartrato de Fórmula (I)).

Se describe aquí la sal de hemitartrato del compuesto representado por la Fórmula (I). Como se señala anteriormente, la sal de hemitartrato del compuesto representado por la Fórmula (I) se denomina aquí "Hemitartrato de Fórmula (I)". El compuesto representado por la Fórmula (I) se denomina aquí "Base Libre de la Fórmula (I)".

30 También se describe aquí una composición farmacéutica que comprende un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable y Hemitartrato de Fórmula (I).

También se describe aquí un método para inhibir glucosilceramida sintasa o reducir las concentraciones de glucoesfingolípidos en un sujeto que lo necesite administrando al sujeto una cantidad eficaz de Hemitartrato de Fórmula (I).

35 También se describe aquí el uso del Hemitartrato de Fórmula (I) para la fabricación de un medicamento para inhibir glucosilceramida sintasa o reducir las concentraciones de glucoesfingolípidos en un sujeto que lo necesite.

También se describe aquí el uso del Hemitartrato de Fórmula (I) para inhibir glucosilceramida sintasa o reducir las concentraciones de glucoesfingolípidos en un sujeto que lo necesite.

40 En un aspecto, la presente invención proporciona un primer agente terapéutico para uso en un método para tratar un sujeto con la enfermedad de Gaucher. El método comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de un primer agente terapéutico en combinación con una cantidad eficaz de un segundo agente terapéutico. El primer agente terapéutico está representado por la Fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma; y el segundo agente terapéutico es eficaz para el tratamiento de la enfermedad de Gaucher.

45 En otro aspecto, la presente invención proporciona un primer agente terapéutico para uso en un método para tratar un sujeto con la enfermedad de Fabry. El método comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de un primer agente terapéutico en combinación con una cantidad eficaz de un segundo agente terapéutico. El primer agente terapéutico está representado por la Fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma; y el segundo agente terapéutico es eficaz para el tratamiento de la enfermedad de Fabry.

También se describe aquí una composición farmacéutica que comprende:

50 la sal de hemitartrato de un compuesto representado por la Fórmula (I); al menos una carga soluble en agua; al menos una carga insoluble en agua; al menos un aglutinante; y al menos un lubricante.

También se describe aquí un método para tratar un sujeto con enfermedad de Fabry. El método comprende las etapas de:

a) administrar al sujeto una cantidad eficaz de un compuesto de Fórmula (I), o una sal farmacéuticamente

aceptable del mismo;

b) estudiar el sujeto para determinar si el sujeto es un metabolizador pobre, intermedio o amplio/ultrarrápido de P450;

5 c) si el sujeto es un metabolizador intermedio o amplio/ultrarrápido de P450, determinar una cantidad eficaz ajustada del compuesto; y

d) administrar al sujeto una cantidad eficaz ajustada del compuesto de Fórmula (I) si el sujeto es un metabolizador intermedio o amplio/ultrarrápido de P450, y administrar al sujeto una cantidad eficaz del compuesto de Fórmula (I) si el sujeto es un metabolizador pobre de P450.

10 También se describe aquí un método para tratar un sujeto con enfermedad de Gaucher. El método comprende las etapas de:

a) administrar al sujeto una cantidad eficaz de un compuesto de Fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;

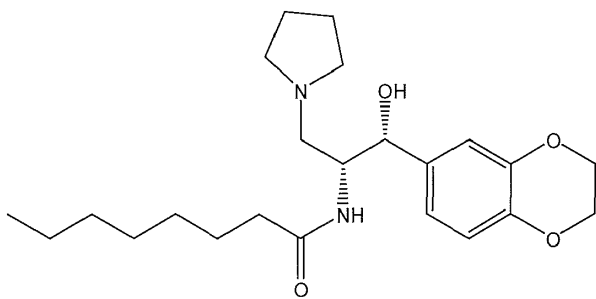
b) estudiar el sujeto para determinar si el sujeto es un metabolizador pobre, intermedio o amplio/ultrarrápido de P450;

15 c) si el sujeto es un metabolizador intermedio o amplio/ultrarrápido de P450, determinar una cantidad eficaz ajustada del compuesto; y

d) administrar al sujeto una cantidad eficaz ajustada del compuesto de Fórmula (I) si el sujeto es un metabolizador intermedio o amplio/ultrarrápido de P450, y administrar al sujeto una cantidad eficaz del compuesto de Fórmula (I) si el sujeto es un metabolizador pobre de P450.

20 También se describe aquí un método para tratar un sujeto con enfermedad de Fabry. El método comprende las etapas de:

a) administrar al sujeto una cantidad eficaz de un compuesto representado mediante la siguiente fórmula estructural:



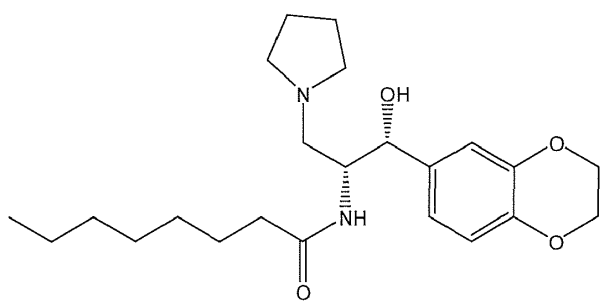
25 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;

b) evaluar los niveles plasmáticos valle del compuesto en el sujeto; y

30 c) ajustar la cantidad de compuesto administrada al sujeto de manera que los niveles plasmáticos valle del compuesto sean al menos 5 ng/ml. Como alternativa, los niveles plasmáticos valle y  $C_{max}$  del compuesto en el sujeto se evalúan en la etapa b), y en la etapa c) la cantidad de compuesto administrada al sujeto se ajusta de manera que los niveles plasmáticos valle del compuesto en el sujeto sean al menos 5 ng/ml y la  $C_{max}$  del compuesto en el sujeto esté por debajo de 100 ng/ml.

También se describe aquí un método para tratar un sujeto con enfermedad de Gaucher. El método comprende las etapas de:

35 a) administrar al sujeto una cantidad eficaz de un compuesto representado mediante la siguiente fórmula estructural:



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;

b) evaluar los niveles plasmáticos valle del compuesto en el sujeto; y

5 c) ajustar la cantidad de compuesto administrada al sujeto de manera que los niveles plasmáticos valle del compuesto en el sujeto sean al menos 5 ng/ml. Como alternativa, los niveles plasmáticos valle y  $C_{max}$  del compuesto en el sujeto se evalúan en la etapa b), y en la etapa c) la cantidad de compuesto administrada al sujeto se ajusta de manera que los niveles plasmáticos valle del compuesto en el sujeto sean al menos 5 ng/ml y la  $C_{max}$  del compuesto en el sujeto esté por debajo de 100 ng/ml.

#### BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

10 La FIG. 1 muestra el patrón de XRPD experimental (temperatura ambiente) para Hemitartrato de Fórmula (I).

La FIG. 2 es una gráfica de la eficacia de terapias enzimática y de reducción de sustrato a la hora de reducir los niveles de glucosilceramida en el hígado de ratones con Gaucher. Los niveles de GL1 del hígado se midieron en ratones con Gaucher de 3 meses no tratados (A) y tras 2 semanas de tratamiento con glucocerebrosidasa recombinante (B). Los ratones tratados con glucocerebrosidasa recombinante se analizaron 10 semanas más tarde sin tratamiento posterior (C) o tras terapia con Hemitartrato de Fórmula (I) (D) a 150 mg/kg de comida. También se muestran los niveles de GL1 en el hígado de ratones a los que se les administró Hemitartrato de Fórmula (I) solo durante todo el período de estudio (E) y en controles no tratados de edad parecida (F). Los datos se expresan como media  $\pm$  error estándar de la media (SEM) (n = 5). La significancia estadística se determinó usando la prueba de la t no pareada.

20 La FIG. 3 es una gráfica de la eficacia de terapias enzimática y de reducción de sustrato a la hora de reducir los niveles de glucosilceramida en el bazo de ratones con Gaucher. Los niveles de GL1 del bazo se midieron en ratones con Gaucher de 3 meses no tratados (A) y tras 2 semanas de tratamiento con glucocerebrosidasa recombinante (B). Los ratones tratados con glucocerebrosidasa recombinante se analizaron 10 semanas más tarde sin tratamiento posterior (C) o tras la terapia con Hemitartrato de Fórmula (I) (D). También se muestran los niveles de GL1 en el bazo de ratones a los que se les administró Hemitartrato de Fórmula (I) solo durante todo el período de estudio (E) y en controles no tratados de edad parecida (F). Los datos se expresan como media  $\pm$  error estándar de la media (SEM) (n = 5). La significancia estadística se determinó usando la prueba de la t no pareada.

30 La FIG. 4 es una gráfica de la eficacia de las terapias enzimática y de reducción de sustrato a la hora de reducir los niveles de glucosilceramida en el pulmón de ratones con Gaucher. Los niveles de GL1 del pulmón se midieron en ratones con Gaucher de 3 meses no tratados (A) y tras 2 semanas de tratamiento con glucocerebrosidasa recombinante (B). Los ratones tratados con glucocerebrosidasa recombinante se analizaron 10 semanas más tarde sin tratamiento posterior (C) o tras terapia con Hemitartrato de Fórmula (I) (D). También se muestran los niveles de GL1 en el pulmón de ratones a los que se les administró Hemitartrato de Fórmula (I) solo durante todo el período de estudio (E) y en controles no tratados de edad parecida (F). Los datos se expresan como media  $\pm$  error estándar de la media (SEM) (n = 5). La significancia estadística se determinó usando la prueba de la t no pareada.

40 La FIG. 5 es una gráfica que muestra la cuantificación del grado de tinción de CD68 en el hígado. El grado de tinción positiva para CD68 en las secciones hepáticas se cuantificó usando el software MetaMorph. Se muestran niveles en hígado de ratones con Gaucher de 3 meses no tratado (A) o después del tratamiento con glucocerebrosidasa (B). También se ilustran los ratones tratados con enzima y analizados después 10 semanas más tarde sin intervención terapéutica adicional (C) o tras terapia con Hemitartrato de Fórmula (I) (D). También se muestra el grado de tinción en el hígado de ratones con Gaucher a los que se les administró Hemitartrato de Fórmula (I) solo (E) y en ratones de control no tratados de edad parecida (F). Los datos se recopilaron de un análisis de diez imágenes 400x por sección de cada uno de los ratones. La significancia estadística se determinó usando la prueba de la t no pareada.

45 La FIG. 6 es una gráfica que muestra la eficacia de Hemitartrato de Fórmula (I) en ratones D409V/null

jóvenes. Se administró diariamente mediante administración oral, a una dosis de 75 o 150 mg/kg durante 10 semanas, Hemitartrato de Fórmula (I) a ratones D409V/null de 10 semanas. Los niveles de glucosilceramida en el hígado, pulmón, vasculatura y bazo se evaluaron al final del estudio mediante HP-TLC. Los datos se presentan como un porcentaje de GL-1 en ratones de control no tratados de edad parecida. Las líneas discontinuas indican niveles de glucosilceramida observados en ratones normales de tipo salvaje. \*p < 0,05; \*\*p < 0,01 con respecto a un control no tratado (prueba de la t no pareada, de dos colas). Los datos se representan como media + error estándar de la media (SEM) n = 5 para 75 mg/kg; n = 6 para 150 mg/kg).

La FIG. 7 muestra el efecto de la terapia con Hemitartrato de Fórmula (I) sobre la acumulación de GL-3 en hígado, corazón, riñón, bazo, cerebro y sangre de ratones con Fabry.

La FIG. 8 muestra una gráfica del efecto de la terapia con Hemitartrato de Fórmula (I) sobre el comienzo y progresión de neuropatía periférica en ratones con Fabry.

La FIG. 9 muestra gráficas de medidas de algunos marcadores de la función renal en ratones con Fabry tratados con Hemitartrato de Fórmula (I).

La FIG. 10 muestra la línea de tiempo para estudios ERT y SRT de poblaciones de ratones que reciben diferentes terapias farmacéuticas: A) Fabrazyme bimensualmente, nada de Hemitartrato de Fórmula (I); B) Fabrazyme bimensualmente y Hemitartrato de Fórmula (I) en el alimento; C) Fabrazyme administrada al comienzo del estudio y en el cuarto mes del estudio, y Hemitartrato de Fórmula (I) en el alimento; D) sin Fabrazyme, Hemitartrato de Fórmula (I) en el alimento; y E) nada de terapia con fármacos.

La FIG. 11 muestra gráficas de los niveles sanguíneos de GL-3, en ng/ml de sangre, en seis poblaciones (n = ?) de ratones (A-E Fabry-Rag; y F tipo salvaje); las poblaciones de ratones recibieron las siguientes terapias: A) Fabrazyme bimensualmente, nada de Hemitartrato de Fórmula (I); B) Fabrazyme bimensualmente y Hemitartrato de Fórmula (I) en el alimento; C) Fabrazyme administrada al comienzo del estudio y en el cuarto mes del estudio, y Hemitartrato de Fórmula (I) en el alimento; D) sin Fabrazyme, Hemitartrato de Fórmula (I) en el alimento; E) nada de terapia con fármacos; y F) ninguna terapia con fármacos.

La FIG. 12 muestra gráficas de los niveles de GL-3 en el hígado y riñón de ratones con Fabry-Rag; las poblaciones de ratones (n = ?) recibieron las siguientes terapias: A) Fabrazyme bimensualmente, sin Hemitartrato de Fórmula (I); B) Fabrazyme bimensualmente y Hemitartrato de Fórmula (I) en el alimento; C) Fabrazyme administrada al comienzo del estudio y en el cuarto mes del estudio, y Hemitartrato de Fórmula (I) en el alimento; D) sin Fabrazyme, Hemitartrato de Fórmula (I) en el alimento; y E) sin terapia con fármacos.

La FIG. 13 muestra gráficas de los niveles de orina de GL-3 en ratones con Fabry-Rag; las poblaciones de ratones (n = ?) recibieron las siguientes terapias: A) Fabrazyme bimensualmente, sin Hemitartrato de Fórmula (I); B) Fabrazyme bimensualmente, y Hemitartrato de Fórmula (I) en el alimento; C) Fabrazyme administrada al comienzo del estudio y en el cuarto mes del estudio, y Hemitartrato de Fórmula (I) en el alimento; D) sin Fabrazyme, Hemitartrato de Fórmula (I) en el alimento; y E) sin terapia con fármacos.

La FIG. 14 es una gráfica que muestra la latencia en segundos de sensibilidad térmica de ratones con Fabry-Rag que reciben las siguientes terapias: Fabrazyme bimensualmente, sin Hemitartrato de Fórmula (I); Fabrazyme bimensualmente y Hemitartrato de Fórmula (I) en el alimento; Fabrazyme administrada al comienzo del estudio y en el cuarto mes del estudio, y Hemitartrato de Fórmula (I) en el alimento; sin Fabrazyme, Hemitartrato de Fórmula (I) en el alimento; sin terapia con fármacos; ratones de tipo salvaje; y no tratados a los tres meses.

La Figura 15 es una gráfica que muestra la cantidad total de área de degradación de una traza de HPLC de diversas mezclas que comprenden Hemitartrato de Fórmula (I), Monohidrato de Lactosa grado encapsulante y Avicel PH 301 (celulosa microcristalina) después de haber sido expuestas a 85°C durante 3 días. El área de degradación de la traza de HPLC es la relación del área total de picos que corresponden a la degradación con respecto al área total de picos que corresponden a Hemitartrato de Fórmula (I) y productos de degradación.

#### DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La presente solicitud describe formas cristalinas únicas de Hemitartrato de Fórmula (I) y nuevas composiciones farmacéuticas de Hemitartrato de Fórmula (I) que comprenden las formas cristalinas de Hemitartrato de Fórmula (I) descritas aquí. La presente solicitud también describe métodos para inhibir glucosilceramida sintasa o reducir las concentraciones de glucoesfingolípidos en un sujeto que lo necesite. Adicionalmente, la presente solicitud describe métodos para preparar formas cristalinas específicas de Hemitartrato de Fórmula (I). La presente solicitud también describe formulaciones farmacéuticas estables de Hemitartrato de Fórmula (I), terapias de combinación con el compuesto de Fórmula (I) o sus sales farmacéuticamente aceptables (incluyendo Hemitartrato de Fórmula (I)), y métodos de tratamiento con el compuesto de Fórmula (I) o sus sales farmacéuticamente aceptables (incluyendo Hemitartrato de Fórmula (I)) que minimizan el riesgo de interacciones fármaco/fármaco.

## Formas cristalinas de Hemitartrato de Fórmula (I)

En una realización particular, al menos un porcentaje particular en peso de Hemitartrato de Fórmula (I) es cristalino. Los porcentajes en peso particulares incluyen 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 un porcentaje entre 70% y 100%.

- 5 En otra realización particular, al menos un porcentaje particular en peso de Hemitartrato de Fórmula (I) es una forma cristalina individual de Hemitartrato de Fórmula (I). Los porcentajes en peso particulares incluyen 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 un porcentaje entre 70% y 100%.

10 Como se usa aquí, "cristalino" se refiere a un sólido que tiene una estructura de cristal en la que las moléculas individuales tienen una configuración química inmovilizada normal muy homogénea. El Hemitartrato de Fórmula (I) cristalino puede ser cristales de una forma cristalina individual del Hemitartrato de Fórmula (I), o una mezcla de cristales de diferentes formas cristalinas individuales. Una forma cristalina individual significa Hemitartrato de Fórmula (I) como un cristal individual o una pluralidad de cristales, en la que cada cristal tiene la misma forma de cristal.

15 Cuando un porcentaje particular en peso de Hemitartrato de Fórmula (I) es una forma cristalina individual, el resto del Hemitartrato de Fórmula (I) es alguna combinación de Hemitartrato de Fórmula (I) amorfo, y/o una o más formas cristalinas adicionales de Hemitartrato de Fórmula (I), excluyendo la forma cristalina individual. Cuando el Hemitartrato de Fórmula (I) cristalino se define como un porcentaje específico de una forma cristalina particular de Hemitartrato de Fórmula (I), el resto está formado por forma amorfa y/o formas cristalinas distintas de la una o más formas particulares que se especifican. Los ejemplos de una forma cristalina individual incluyen la Forma A de Hemitartrato de Fórmula (I) caracterizada por una o más propiedades como se discute aquí.

20 Debido a que el ácido tartárico tiene dos grupos ácido carboxílico, puede formar sales con relaciones molares diferentes del compuesto representado por la Fórmula (I) a tartrato (la base conjugada del ácido tartárico). Por ejemplo, la sal en la que hay alrededor de una relación molar uno a uno de tartrato a Fórmula (I) es Tartrato de Fórmula (I) (1 de tartrato: 1 de Fórmula (I)); y la sal en la que hay alrededor de una relación molar uno a dos de tartrato a Fórmula (I) es Hemitartrato de Fórmula (I) (1 de tartrato: 2 de Fórmula (I)).

25 La sal de hemitartrato puede existir en diversas formas estereoisómeras. Los estereoisómeros son compuestos que difieren solamente en su disposición espacial. Los enantiómeros son pares de estereoisómeros cuyas imágenes especulares no son superponibles, muy habitualmente debido a que contienen un átomo de carbono asimétricamente sustituido que actúa como centro quiral. Los diastereómeros son estereoisómeros que no están relacionados como imágenes especulares, muy habitualmente debido a que contienen dos o más átomos de carbono asimétricamente sustituidos.

30 Cuando la estereoquímica se nombra (como por ejemplo en ácido L-(+)-tartárico) o se representa mediante estructura (como por ejemplo en la Fórmula (I)), el estereoisómero nombrado o representado es al menos 60%, 70%, 80%, 90%, 99% o 99,9% en peso puro con respecto a los otros estereoisómeros. Cuando un enantiómero individual se nombra (como por ejemplo en ácido L-(+)-tartárico) o se representa mediante estructura (como por ejemplo en la Fórmula (I)), el enantiómero representado o nombrado es al menos 80%, 90%, 99% o 99,9% en peso ópticamente puro. El porcentaje en peso de pureza óptica es la relación del peso del enantiómero con respecto al peso del enantiómero más el peso de su isómero óptico.

40 "Racemato" o "mezcla racémica" significa un compuesto de cantidades equimolares de dos enantiómeros, en el que tales mezclas no muestran actividad óptica, es decir, no rotan el plano de la luz polarizada.

El ácido tartárico tiene tres estereoisómeros: ácido L-(+)-tartárico o ácido dextrotartárico y su enantiómero, ácido levotartárico o ácido D-(-)-tartárico, y la forma aquiral, ácido mesotartárico. La designación L o D no indican la capacidad del ácido para rotar el plano de luz polarizada.

45 Cualquiera de los estereoisómeros de ácido tartárico se puede usar para preparar Hemitartrato de Fórmula (I). Por ejemplo, el hemitartrato se puede formar a partir de uno solo de sus estereoisómeros, o una combinación de los mismos. La sal de hemitartrato se selecciona de D-hemitartrato, L-hemitartrato, ácido hemimesotartárico, o D,L-hemitartrato racémico. En una realización específica, la sal de hemitartrato es L-hemitartrato. "L-hemitartrato" significa que la sal de hemitartrato se forma a partir de ácido L-tartárico. D,L-hemitartrato racémico significa que se usaron tanto D-tartrato como L-tartrato en la preparación del Hemitartrato de Fórmula (I). La cantidad de D-tartrato en D,L-hemitartrato racémico puede ser mayor, igual o menor que la cantidad de L-tartrato presente.

"Levorrotatorio" significa que la luz polarizada está girada a la izquierda cuando se hace pasar a través de un compuesto asimétrico. El prefijo para designar levorrotatorio es "L".

55 "Dextrorrotatorio" significa que la luz polarizada está girada a la derecha cuando se hace pasar a través de un compuesto asimétrico. El prefijo para designar levorrotatorio es "D".

## Preparación de Hemitartrato de Fórmula (I)

El Hemitartrato de Fórmula (I) se puede preparar mezclando Fórmula (I) con ácido L-tartárico en un disolvente adecuado. La precipitación de Hemitartrato de Fórmula (I) se puede ayudar mediante la adición de un cristal de siembra. Los disolventes que se pueden usar son metanol, agua, etanol, acetona, acetato de etilo, o sus combinaciones.

Las formas sólidas particulares de Hemitartrato de Fórmula (I) se pueden preparar, por ejemplo, mediante evaporación lenta, enfriamiento lento, y precipitación con antisolventes. Los disolventes que se pueden usar en estos métodos incluyen agua, heptano, hexano, tolueno, diclorometano, etanol, alcohol isopropílico, acetonitrilo, acetato de etilo, metanol, acetona, metil terc-butil éter (denominado aquí "TBME"), p-dioxano, y tetrahidrofurano (denominado aquí "THF").

Las formas sólidas de Hemitartrato de Fórmula (I) se pueden preparar mediante evaporación del disolvente a partir de una disolución de Hemitartrato de Fórmula (I) en un disolvente o una mezcla de disolventes. Las mezclas de disolventes adecuadas incluyen metanol, etanol, acetona, agua, acetato de etilo y diclorometano. Las mezclas de disolventes preferidas incluyen etanol, metanol, agua y acetona.

Las formas sólidas de Hemitartrato de Fórmula (I) se pueden preparar a través del enfriamiento lento de una disolución calentada de Hemitartrato de Fórmula (I) en un disolvente. Los disolventes adecuados incluyen etanol, metanol, agua, acetona, y acetato de etilo.

Las formas sólidas de Hemitartrato de Fórmula (I) se pueden preparar a través del enfriamiento rápido de una disolución calentada de Hemitartrato de Fórmula (I) en un disolvente, colocando la disolución en un baño de enfriamiento. Los disolventes adecuados incluyen etanol, metanol, acetona, agua, acetato de etilo, o mezclas de estos disolventes.

Las formas sólidas de Hemitartrato de Fórmula (I) se pueden preparar añadiendo una disolución de Hemitartrato de Fórmula (I) en un disolvente como se describe anteriormente a un antisolvente a una temperatura dada. Más particularmente, el antisolvente es acetato de etilo, acetona, acetonitrilo, tolueno, THF, TBME, p-dioxano, isopropanol, o heptano. Las mezclas particulares disolvente/antisolvente incluyen metanol/acetato de etilo, metanol/acetona, metanol/hexano, metanol/heptano, metanol/acetonitrilo, metanol/tolueno, metanol/THF, metanol/TBME, metanol/p-dioxano, etanol/acetato de etilo, etanol/hexano, etanol/heptano, etanol, acetona, etanol/acetonitrilo, etanol/tolueno, etanol/TBME, etanol/THF, agua/THF, agua/isopropanol, agua/acetonitrilo, agua/acetona, diclorometano/heptano, diclorometano/acetona, diclorometano/acetato de etilo, diclorometano/acetonitrilo, diclorometano/tolueno, diclorometano/THF, diclorometano/TBME, diclorometano/p-dioxano, y diclorometano/isopropanol.

Las mezclas preferidas de disolvente/antisolvente incluyen metanol/acetato de etilo, metanol/acetona, metanol/TBME, y agua/acetona.

Como se usa aquí, "antisolvente" se refiere a un disolvente en el que el Hemitartrato de Fórmula (I) tiene baja solubilidad y provoca que el Hemitartrato precipite de la disolución en forma de polvo fino o cristales.

Métodos adicionales para generar las formas sólidas de Hemitartrato de Fórmula (I) incluyen precipitar el sólido en acetato de etilo/acetona y secar opcionalmente el sólido formado a temperatura ambiente. En otro método, el sólido se puede recrystalizar entonces en acetona, con o sin la adición de un cristal de siembra. Como alternativa, el Hemitartrato de Fórmula (I) se puede precipitar en disolventes de acetato de etilo/acetona y se puede recrystalizar en acetato de etilo. Como alternativa, el Hemitartrato de Fórmula (I) se puede recrystalizar entonces en isopropanol. Como alternativa, el Hemitartrato de Fórmula (I) se puede preparar usando acetona solamente, sin recrystalización adicional. Como alternativa, el Hemitartrato de Fórmula (I) se puede precipitar en acetona tras un reflujo breve, sin recrystalización adicional.

Como alternativa, el Hemitartrato de Fórmula (I) se puede recrystalizar entonces en metanol/acetona, con o sin la adición de un cristal de siembra. Como alternativa, el Hemitartrato de Fórmula (I) se puede recrystalizar entonces en agua/acetona, con o sin la adición de un cristal de siembra.

## Caracterización de formas cristalinas de Hemitartrato de Fórmula (I)

En una realización particular, la forma cristalina de Hemitartrato de Fórmula (I), Forma A de cristal, se caracteriza por uno, dos, tres, cuatro o cinco picos de XRPD principales a ángulos  $2\theta$  de  $5,1^\circ$ ,  $6,6^\circ$ ,  $10,7^\circ$ ,  $11,0^\circ$ ,  $15,9^\circ$ , y  $21,7^\circ$ . En una realización incluso más particular, la forma cristalina se caracteriza por picos de XRPD a ángulos  $2\theta$  de  $5,1^\circ$ ,  $6,6^\circ$ ,  $10,7^\circ$ ,  $11,0^\circ$ ,  $13,3^\circ$ ,  $15,1^\circ$ ,  $15,9^\circ$ ,  $16,5^\circ$ ,  $17,6^\circ$ ,  $18,6^\circ$ ,  $18,7^\circ$ ,  $19,0^\circ$ ,  $20,2^\circ$ ,  $21,7^\circ$  y  $23,5^\circ$ . Se entiende que un ángulo  $2\theta$  específico significa el valor específico  $\pm 0,2^\circ$ .

Como se usa aquí, "pico de XRPD principal" se refiere a un pico de XRPD con una intensidad relativa mayor que 25%. La intensidad relativa se calcula como una relación de la intensidad de pico del pico de interés frente a la intensidad de pico del pico más grande.



## Métodos de tratamiento usando Hemitartrato de Fórmula (I)

Como se usa aquí, un sujeto es un mamífero, preferiblemente un paciente humano, pero también puede ser un animal que necesite tratamiento veterinario, tal como un animal de compañía (por ejemplo, perros, gatos, y similares), un animal de granja (por ejemplo, vacas, ovejas, cerdos, caballos, y similares) o un animal de laboratorio (por ejemplo, ratas, ratones, cobayas, y similares). Sujeto y paciente se usan de forma intercambiable.

Se describe aquí un método para ralentizar, por ejemplo inhibir o reducir, la actividad de glucosilceramida sintasa, o reducir las concentraciones de glucoesfingolípidos en un sujeto que lo necesite mediante la administración al sujeto de una cantidad eficaz de sal de hemitartrato de Fórmula (I), incluyendo sus formas cristalinas, como se describe anteriormente.

Un sujeto que necesite tratamiento es un sujeto con una afección o enfermedad que se beneficia de la inhibición de glucosilceramida sintasa o de la reducción de las concentraciones de glucoesfingolípidos en las células, particularmente el lisosoma o la membrana de células. Se ha demostrado que los inhibidores de glucosilceramida sintasa son útiles para tratar enfermedades de almacenamiento lisosómico tales como enfermedad de Tay-Sachs, de Gaucher o de Fabry (véanse, por ejemplo, las patentes U.S. n<sup>os</sup> 6.569.889; 6.255.336; 5.916.911; 5.302.609; 6.660.749; 6.610.703; 5.472.969; 5.525.616).

Los ejemplos de afecciones o enfermedades incluyen enfermedad renal policística y glomerulopatía membranosa (véanse las Solicitudes de Patentes Provisionales U.S. 61/130.401 y 61/102.541), glomerulonefritis y glomeruloesclerosis (véase la Solicitud de Patente Provisional U.S. 61/137.214), lupus (véase el documento PCT/US2009/001773), diabetes, incluyendo diabetes tipo 2 (véase el documento WO 2006/053043); tratar trastornos que implican el crecimiento y división celulares, incluyendo cáncer, enfermedades vasculares de colágeno, aterosclerosis, y la hipertrofia renal de pacientes diabéticos (véanse las patentes U.S. n<sup>os</sup> 6.916.802 y 5.849.326); inhibir el crecimiento de células epiteliales arteriales (véanse las patentes U.S. n<sup>os</sup> 6.916.802 y 5.849.326); tratar pacientes que sufren infecciones (véase Svensson, M. et al., "Epithelial Glucosphingolipid Expression as a Determinant of Bacterial Adherence and Cytokine Production", *Infect. and Immun.*, 62:4404-4410 (1994)); prevenir que el hospedante, es decir, el paciente, genere anticuerpos frente al tumor (véase Inokuchi, J. et al., "Antitumor Activity in Mice of an Inhibitor of Glycosphingolipid Biosynthesis", *Cancer Lett.*, 38:23-30(1987)); y tratar tumores (véase Hakomori, S. "New Directions in Cancer Therapy Based on Aberrant Expression of Glycosphingolipids: Anti-adhesion and Ortho-Signaling 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) y 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).

El Hemitartrato de Fórmula (I) también se puede usar para una preparación similar a una vacuna contra el cáncer (véanse, por ejemplo, las patentes U.S. n<sup>os</sup> 6.569.889; 6.255.336; 5.916.911; 5.302.609; 6.660.749; 6.610.703; 5.472.969; 5.525.616).

El compuesto de Fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo (incluyendo su sal de hemitartrato) se puede usar en los métodos descritos como una monoterapia, es decir, como el único ingrediente farmacéuticamente activo que se administre para tratar la indicación.

Según la presente invención, el compuesto de Fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo (incluyendo la sal de hemitartrato del mismo) se puede usar en los métodos descritos como una terapia de combinación con otros fármacos terapéuticamente activos conocidos en la técnica para tratar las enfermedades o indicaciones deseadas. "Coterapia" o "combinación" o "terapia de combinación" o "coadministrado" se usan aquí de forma intercambiable, y significa que el compuesto de Fórmula (I) o sal farmacéuticamente aceptable del mismo (incluyendo la sal de hemitartrato) se administra antes, después o concurrentemente con uno o más agentes terapéuticos adicionales. La terapia de combinación se usa para tratar enfermedad de Gaucher o enfermedad de Fabry. El compuesto de Fórmula (I) o su sal farmacéuticamente aceptable (incluyendo la sal de hemitartrato) se puede coadministrar simultáneamente (por ejemplo, concurrentemente) como formulaciones separadas o como una formulación conjunta. Como alternativa, los agentes se pueden administrar secuencialmente, como composiciones separadas, dentro de un marco de tiempo apropiado, según se determina por el médico experto (por ejemplo, un tiempo suficiente para permitir un solapamiento de los efectos farmacéuticos de las terapias). El compuesto de Fórmula (I) o su sal farmacéuticamente aceptable (incluyendo la sal de hemitartrato) y uno o más agentes terapéuticos adicionales se pueden administrar en una única dosis o en múltiples dosis, en un orden o en un calendario adecuado para lograr un efecto terapéutico deseado.

Los agentes terapéuticos eficaces para el tratamiento de la enfermedad de Gaucher que se pueden usar en una realización de la presente invención incluyen glucocerebrosidasa, análogos de glucocerebrosidasa, inhibidores de glucosilceramida sintasa, y chaperonas moleculares que se unen a glucocerebrosidasa y restauran su conformación correcta. La glucocerebrosidasa o sus análogos pueden derivar de seres humanos o de mamíferos. Como alternativa, la glucocerebrosidasa y sus análogos se pueden obtener recombinantemente. Los análogos de glucocerebrosidasa incluyen formas truncadas de la enzima y/o enzimas con sustituciones de aminoácidos con respecto a la secuencia de aminoácidos nativa de la enzima nativa, con la condición de que se retenga la actividad

biológica. Los ejemplos de análogos de glucocerebrosidasa incluyen Imiglucerase (vendida con el nombre Cerezyme®) por Genzyme Corporation), Taliglucerase Alfa (comercializado con el nombre Uplyso® y desarrollado por Protalix Biotherapeutics, Inc.) y Velaglucerase Alfa (desarrollado por Shire PLC), que son un análogo de  $\beta$ -glucocerebrosidasa humana producido mediante ADN recombinante. Los ejemplos de chaperonas moleculares incluyen isofagomina (en desarrollo bajo el nombre comercial Plicera™ por Amicus Therapeutics, Cranbury, NJ). Isofagomina es también conocida como tartrato de afegostat, y contiene la forma de sal de tartrato de isofagomina como su ingrediente activo. Los ejemplos de inhibidores de glucocerebrosidasa incluyen miglustat (desarrollado con el nombre comercial de Zavesca™ por Actelion Pharmaceuticals Ltd. Allschwil, Suiza).

Los agentes terapéuticos eficaces para el tratamiento de la enfermedad de Fabry que se pueden usar en una realización de la presente invención incluyen  $\alpha$  galactosidasa A, análogos de  $\alpha$  galactosidasa A, y chaperonas moleculares que se unen a  $\alpha$  galactosidasa A y restauran su conformación correcta. La  $\alpha$  galactosidasa A o sus análogos pueden derivar de seres humanos o de mamíferos. Como alternativa, la  $\alpha$  galactosidasa A y sus análogos se pueden obtener recombinantemente. Los análogos de  $\alpha$  galactosidasa A incluyen formas truncadas de la enzima y/o enzimas con sustituciones de aminoácidos con respecto a la secuencia de aminoácidos nativa de la enzima nativa, con la condición de que se retenga la actividad biológica. Los ejemplos de análogos de  $\alpha$  galactosidasa A incluyen Agalsidase beta (una  $\alpha$ -galactosidasa humana recombinante vendida por Genzyme Corporation con el nombre comercial Fabrazyme® como un medicamento liofilizado) y Agalsidase alfa (una proteína recombinante vendida con el nombre Replagal® por Shire PLC). Los ejemplos de chaperonas moleculares incluyen migalastat (desarrollada con el nombre Amigal™ por Amicus Therapeutics, Cranbury, NJ como un fármaco que contiene hidrocloreuro de migalastat como su ingrediente activo).

En una realización, la terapia de combinación para el tratamiento de la enfermedad de Gaucher o de Fabry se lleva a cabo en dos etapas. En una primera etapa, se usa un fármaco eficaz para el tratamiento de la enfermedad de Gaucher o de Fabry (típicamente, glucocerebrosidasa o un análogo de la misma para enfermedad de Gaucher, y galactosidasa A o un análogo de la misma para la enfermedad de Fabry) para estabilizar el sujeto. Por ejemplo, en la enfermedad de Gaucher (o en la enfermedad de Fabry), uno de estos fármacos se usa para reducir la carga de almacenamiento de GL-1 en los órganos viscerales tales como en el hígado, bazo, pulmón y/o riñón. Una vez que se ha logrado esto, se usa el compuesto de Fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo (incluyendo la sal de hemitartrato) en la segunda etapa como una terapia de mantenimiento conveniente. La primera etapa dura típicamente hasta una, dos, tres o cuatro semanas o hasta uno, dos, tres, cuatro, seis, nueve o doce meses, o hasta que el recuento plaquetario del sujeto es igual o mayor que 100.000 mm<sup>3</sup>; la concentración de hemoglobina es igual o mayor que 11 g/dl (mujeres) o 12 g/dl (hombres); y/o el volumen del bazo del sujeto es menor o igual a 10 múltiplos del normal, y los volúmenes del hígado son menores o iguales a 1,5 múltiplos del normal. La administración de la primera etapa termina típicamente una vez que se inicia la terapia con el compuesto de Fórmula (I).

Como se usa aquí, una "cantidad eficaz" se refiere a una cantidad eficaz para aliviar los síntomas existentes del sujeto que se está tratando, con efectos secundarios inaceptables mínimos en el sujeto. La formulación exacta, vía de administración, y dosificación se escogen por el médico individual a la vista del estado del paciente. La cantidad e intervalo de la dosificación se pueden ajustar individualmente para proporcionar niveles plasmáticos del compuesto activo que son suficientes para mantener los efectos terapéuticos deseados. Además del estado del paciente y del modo de administración, la dosis administrada dependería de la gravedad de los síntomas del paciente y de la edad y peso del paciente. Una cantidad eficaz dará típicamente como resultado niveles plasmáticos valle del compuesto por encima de al menos 5 ng/ml. Si los niveles plasmáticos valle están por debajo de 5 ng/ml tras la administración de una cantidad eficaz del compuesto, la dosis que se administra a ese sujeto se cambia hasta una "cantidad eficaz ajustada", de manera que los niveles valle del compuesto sean al menos 5 ng/ml. Como alternativa, si los niveles plasmáticos valle del compuesto están por debajo de 5 ng/ml y/o la  $C_{max}$  está por encima de 100 ng/ml tras la administración de una cantidad eficaz del compuesto, la dosis que se administra al sujeto se cambia a una "cantidad eficaz ajustada", de manera que los niveles plasmáticos valle del compuesto sean al menos 5 ng/ml y la  $C_{max}$  esté por debajo de 100 ng/ml. Las cantidades eficaces pueden oscilar desde 0,1 hasta 500 mg/por día. Como alternativa, la cantidad eficaz oscila de 50-300 mg/día. En otra alternativa, la cantidad eficaz oscila de 100-300 mg/día. El compuesto de la presente solicitud se puede administrar de forma continua o a intervalos de tiempo específicos. Por ejemplo, el compuesto de la presente solicitud se puede administrar 1, 2, 3 o 4 veces por día, tal como, por ejemplo, una formulación diaria o de dos veces al día. Se pueden emplear ensayos comercialmente disponibles para determinar los intervalos de dosis óptimos y/o los calendarios para la administración.

En un caso, una cantidad eficaz para el compuesto de Fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo (incluyendo la sal de hemitartrato descrita anteriormente) es (ya sea como una monoterapia o como una coterapia) una dosis diaria de 25 miligramos a 300 miligramos (como alternativa, 25 miligramos a 150 miligramos; en otra alternativa, de 50 miligramos a 300 miligramos; y en otra alternativa, de 100 miligramos a 300 miligramos), tal como 25, 50, 100, 200 o 300 miligramos por día. En un caso específico, una cantidad eficaz del compuesto de Fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo (incluyendo hemitartrato de Fórmula (I)) es (ya sea como una monoterapia o como una coterapia) una dosis dos veces al día de 50 miligramos (para un total de 100 miligramos por día), 100 miligramos (para un total de 200 miligramos por día) o 150 miligramos (para un total de 300 miligramos por día). En un caso alternativo, una cantidad eficaz para el compuesto de Fórmula (I) o una sal farmacéuticamente

aceptable del mismo (incluyendo hemitartrato de Fórmula (I)) se administra (ya sea como una monoterapia o como una coterapia) como una dosis una vez al día de 100 miligramos/día, 200 miligramos/día o 300 miligramos/día.

5 Una cantidad eficaz se puede determinar suponiendo que el sujeto es un “metabolizador pobre de P450” y evaluando entonces los niveles plasmáticos valle y/o  $C_{max}$ . La cantidad administrada al sujeto se cambia entonces a una cantidad eficaz ajustada, como se describe más abajo, si los niveles plasmáticos valle están por debajo de 5 ng/ml; o los niveles valle del compuesto están por debajo de 5 ng/ml y/o la  $C_{max}$  está por encima de 100 ng/ml; o si se determina que el sujeto es un metabolizador intermedio o amplio/ultrarrápido de P450. Una cantidad eficaz para metabolizadores pobres de P450 está (ya sea como una monoterapia o como una coterapia) habitualmente entre 100-200 miligramos por día, por ejemplo 100 o 200 miligramos, como una dosis una vez al día o una dosis dos veces al día.

Típicamente, las composiciones farmacéuticas descritas aquí se pueden administrar antes o después de una comida, o con una comida. Como se usa aquí, “antes” o “después” de una comida es típicamente dentro de dos horas, preferiblemente en una hora, más preferiblemente en treinta minutos, lo más preferible en diez minutos de comenzar o terminar una comida, respectivamente.

15 Ahora se ha encontrado que el compuesto de Fórmula (I) y sales farmacéuticamente aceptables del mismo (incluyendo Hemitartrato de Fórmula (I)) es metabolizado por el hígado, principalmente por las enzimas del citocromo P450. Las enzimas del citocromo P450 (“CYPs”) son las principales enzimas metabolizantes xenobióticas hepáticas. Hay once enzimas del citocromo P450s metabolizantes xenobióticas expresadas en un hígado humano típico (es decir, CYP1A2, CYP2A6, CYP2B6, CYP2C8/9/18/19, CYP2D6, CYP2E1 y CYP3A4/5). Ahora se ha encontrado también que CYP2D6 y CYP3A4 son las isoformas primarias del citocromo P450 que son responsables de la detoxificación del compuesto de Fórmula (I) y sus sales farmacéuticamente activas, tales como Hemitartrato de Fórmula (I). El nivel de actividad de las enzimas de P450 difiere según el individuo. Por ejemplo, los individuos se pueden clasificar como metabolizadores pobres, intermedios y amplios/ultrarrápidos de P450. Debido a que niveles más bajos de actividad de P450 en un individuo pueden dar lugar a interacciones fármaco/fármaco (“DDI”), otra realización de la invención es determinar si el sujeto es un metabolizador pobre, intermedio y amplio/ultrarrápido de P450. Si el sujeto es un metabolizador intermedio o amplio/ultrarrápido, entonces la dosis administrada a ese sujeto se debería elevar hasta una “dosis eficaz ajustada”, es decir, la cantidad que dé como resultado niveles plasmáticos valle del compuesto de al menos 5 ng/ml; o la cantidad que dé como resultado niveles valle del compuesto de al menos 5 ng/ml y una  $C_{max}$  del compuesto por debajo de 100 ng/ml. La dosis se puede elevar por incrementos, y el sujeto se puede volver a estudiar una vez, dos veces, tres veces, cuatro o tantas veces como sean necesarias para lograr una dosis eficaz ajustada.

Para el gen CYP 2D6, hay cuatro fenotipos predichos:

Un “metabolizador pobre de P450” posee dos alelos mutantes, que dan como resultado la pérdida completa de actividad enzimática.

35 Un “metabolizador intermedio de P450” posee un alelo de actividad reducida y un alelo nulo.

Un “metabolizador amplio de P450” posee al menos uno y no más de dos alelos funcionales normales.

Un “metabolizador ultrarrápido de P450” posee múltiples copias (3-13) de alelos funcionales y produce actividad enzimática en exceso.

40 Un sujeto se evalúa típicamente como metabolizador pobre, intermedio o amplio/ultrarrápido de P450 ya sea a través del genotipado o a través de la monitorización de los niveles plasmáticos valle de un fármaco que es metabolizado por una enzima de P450, tal como CYP2D6 o CYP3A4. Habitualmente, los niveles plasmáticos valle y/o  $C_{max}$  del compuesto de Fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, incluyendo hemitartrato de Fórmula (I), se monitorizan en el sujeto durante un tiempo de hasta una, dos, tres o cuatro semanas, o hasta uno, dos, tres, seis, nueve o doce meses o más tras el inicio del tratamiento con el compuesto. Se realizan ajustes de la dosis, según sea necesario, para mantener los niveles dentro de los límites descritos, es decir, un nivel plasmático valle en o por encima de 5 ng/ml.

Los sujetos se pueden convertir en metabolizadores pobres de P450 como resultado de ser tratados con ciertos fármacos que son inhibidores de la enzima de P450. Los ejemplos de tales fármacos incluyen paroxetina, fluoxetina, quinidina o ketoconazol. Como alternativa, un sujeto es un metabolizador pobre de P450 como resultado de una expresión baja de una enzima de P450. En tales casos, la expresión baja se puede evaluar determinando la expresión de la enzima de P450 en el sujeto, es decir, genotipando el sujeto para la enzima de P450. Por ejemplo, la expresión de CYP2D6 se evalúa habitualmente mediante PCR (McElroy et. al. “CYP2D6 Genotyping as an Alternative to Phenotyping for Determination of Metabolic Status in a Clinical Trial Setting”, AAPS Pharmsi (2000) 2(4):artículo 33 (<http://www.pharmsci.org/>)) o mediante un ensayo farmacogenómico a base de micromatrices (Background Information, Roche Diagnostics “The CYP450 Gene Family and Drug Metabolism”, Hoffmann La Roche Ltd.). Como tal, el sujeto se puede genotipar convenientemente para determinar la expresión de P450 (por ejemplo, CYP2D6) antes del inicio del tratamiento, y se le puede administrar una cantidad eficaz ajustada, si es necesario. En el caso del genotipado antes del inicio del tratamiento, todavía es aconsejable monitorizar los niveles plasmáticos

valle y  $C_{max}$  del compuesto y ajustar la dosis, según sea necesario.

Las cantidades eficaces para migalastat, agalsidasa  $\beta$ , imiglucerasa, isofagomina y miglustat son como se describen en la etiqueta del fármaco, o como se lleva a cabo en los ensayos clínicos de cada fármaco.

5 El compuesto de Fórmula (I) puede reaccionar con ácidos farmacéuticamente aceptables para formar una sal farmacéuticamente aceptable. Los ejemplos de ácidos farmacéuticamente aceptables incluyen ácidos inorgánicos tales como ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido yodhídrico, ácido sulfúrico, ácido fosfórico, y similares, y ácidos orgánicos tales como ácido p-toluenosulfónico, ácido metanosulfónico, ácido oxálico, ácido p-bromofenil-sulfónico, ácido carbónico, ácido succínico, ácido cítrico, ácido benzoico, ácido acético, y similares. Los ejemplos de  
10 tales sales incluyen el sulfato, piro-sulfato, bisulfato, sulfito, bisulfito, fosfato, monohidrogenofosfato, dihidrogenofosfato, metafosfato, pirofosfato, cloruro, bromuro, yoduro, acetato, propionato, decanoato, caprilato, acrilato, formiato, isobutirato, caproato, heptanoato, propiolato, oxalato, malonato, succinato, suberato, sebacato, fumarato, maleato, butino-1,4-dioato, hexino-1,6-dioato, benzoato, clorobenzoato, metilbenzoato, dinitrobenzoato, hidroxibenzoato, metoxibenzoato, ftalato, sulfonato, xilenosulfonato, fenilacetato, fenilpropionato, fenilbutirato, citrato, lactato, gamma-hidroxibutirato, glicolato, tartrato, metanosulfonato, propanosulfonato, naftaleno-1-sulfonato,  
15 naftaleno-2-sulfonato, mandelato, y similares.

Composiciones farmacéuticas que incluyen Hemitartrato de Fórmula (I)

Las formulaciones adecuadas y modos de administración para el compuesto de Fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo (incluyendo la sal de hemitartrato del mismo) incluyen aquellos descritos en la patente U.S. n° 7.253.185. En los siguientes párrafos se describe una formulación preferida para Hemitartrato de  
20 Fórmula (I).

SE describe aquí una composición farmacéutica que comprende Hemitartrato de Fórmula (I), al menos una carga soluble en agua, al menos una carga insoluble en agua, al menos un aglutinante, y al menos un lubricante. Las cargas adecuadas solubles en agua pueden incluir, por ejemplo, lactosa anhidra, lactosa monohidratada, manitol, cloruro de sodio, azúcar en polvo, sorbitol, sacarosa, inositol, y almidón pregelatinizado. Las cargas adecuadas  
25 insolubles en agua pueden incluir, por ejemplo, celulosa microcristalina, fosfato de calcio y almidón. Los aglutinantes adecuados pueden incluir, por ejemplo, almidón pregelatinizado, carboximetilcelulosa sódica, hidroxipropilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, polivinilpirrolidona, copolividona, gelatina, gomas naturales, pasta de almidón, sacarosa, jarabe de maíz, polietilenglicoles y alginato de sodio. Los lubricantes adecuados pueden incluir, por ejemplo, aceite vegetal hidrogenado, estearato de calcio, y behenato de glicerilo. En un caso de la composición farmacéutica, la  
30 carga soluble en agua se selecciona del grupo que consiste en lactosa anhidra, lactosa monohidratada, manitol, cloruro de sodio, azúcar en polvo, sorbitol, sacarosa, inositol y almidón pregelatinizado; la carga insoluble en agua se selecciona del grupo que consiste en celulosa microcristalina, fosfato de calcio y almidón; el aglutinante se selecciona del grupo que consiste en almidón pregelatinizado, carboximetilcelulosa sódica, hidroxipropilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, polivinilpirrolidona, copolividona, gelatina, gomas naturales, pasta de almidón, sacarosa,  
35 jarabe de maíz, polietilenglicoles, y alginato de sodio; y el lubricante se selecciona del grupo que consiste en aceite vegetal hidrogenado, estearato de calcio, y behenato de glicerilo.

La fórmula farmacéutica comprende entre 8% en peso y 32% en peso, entre 8% en peso y 24% en peso, entre 12% en peso y 20% en peso, o entre 14% en peso y 18% en peso de la carga insoluble en agua, sobre una base en sólidos secos.

40 La fórmula farmacéutica comprende entre 26% en peso y 50% en peso, entre 30% en peso y 46% en peso, entre 34% en peso y 46% en peso, o entre 38% en peso y 44% en peso de la carga soluble en agua, sobre una base en sólidos secos.

La composición farmacéutica comprende entre 30% en peso y 45% en peso, entre 35% en peso y 40% en peso, y 36% en peso y 39% en peso de Hemitartrato de Fórmula (I), sobre una base en sólidos secos.

45 La formulación farmacéutica comprende típicamente entre 2% en peso y 6% en peso de aglutinante, sobre una base en sólidos secos.

La formulación farmacéutica comprende típicamente entre 0,1% en peso y 2% en peso de aglutinante, sobre una base en sólidos secos.

50 En un caso específico, la fórmula farmacéutica comprende entre 8% en peso y 32% en peso de carga insoluble en agua, entre 26% en peso y 50% en peso de carga soluble en agua, entre 30% en peso y 45% en peso de Hemitartrato de Fórmula (I), entre 2% en peso y 6% en peso de aglutinante, y entre 0,1% en peso y 2% en peso de aglutinante, todo ello sobre una base en sólidos secos. Más específicamente, la carga soluble en agua es lactosa monohidratada; y la carga insoluble en agua es celulosa microcristalina. Incluso más específicamente, la carga soluble en agua es lactosa monohidratada; la carga insoluble en agua es celulosa microcristalina; el aglutinante es  
55 hidroxipropilmetilcelulosa; y el lubricante es behenato de glicerilo.

En un caso específico, la fórmula farmacéutica comprende entre 8% en peso y 32% en peso de carga insoluble en

5 agua, entre 26% en peso y 50% en peso de carga soluble en agua, entre 35% en peso y 40% en peso de Hemitartrato de Fórmula (I), entre 2% en peso y 6% en peso de aglutinante, y entre 0,1% en peso y 2% en peso de aglutinante, todo sobre una base en sólidos secos. Más específicamente, la carga soluble en agua es lactosa monohidratada; y la carga insoluble en agua es celulosa microcristalina. Incluso más específicamente, la carga soluble en agua es lactosa monohidratada; la carga insoluble en agua es celulosa microcristalina; el aglutinante es hidroxipropilmetilcelulosa; y el lubricante es behenato de glicerilo.

10 En otro caso específico, la fórmula farmacéutica comprende entre 8% en peso y 24% en peso de carga insoluble en agua, entre 30% en peso y 46% en peso de carga soluble en agua, entre 35% en peso y 40% en peso de Hemitartrato de Fórmula (I), entre 2% en peso y 6% en peso de aglutinante, y entre 0,1% en peso y 2% en peso de aglutinante, todo sobre una base en sólidos secos. Más específicamente, la carga soluble en agua es lactosa monohidratada; y la carga insoluble en agua es celulosa microcristalina. Incluso más específicamente, la carga soluble en agua es lactosa monohidratada; la carga insoluble en agua es celulosa microcristalina; el aglutinante es hidroxipropilmetilcelulosa; y el lubricante es behenato de glicerilo.

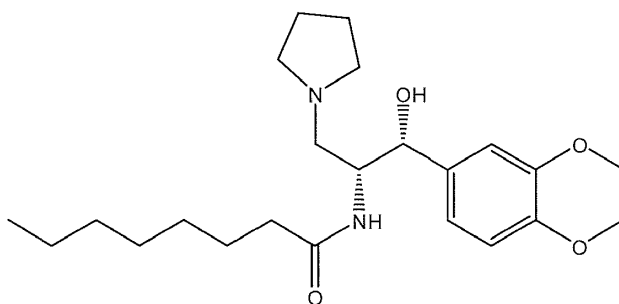
15 En otro caso específico, la fórmula farmacéutica comprende entre 12% en peso y 20% en peso de carga insoluble en agua, entre 34% en peso y 46% en peso de carga soluble en agua, entre 35% en peso y 40% en peso de Hemitartrato de Fórmula (I), entre 2% en peso y 6% en peso de aglutinante, y entre 0,1% en peso y 2% en peso de aglutinante, todo sobre una base en sólidos secos. Más específicamente, la carga soluble en agua es lactosa monohidratada; y la carga insoluble en agua es celulosa microcristalina. Incluso más específicamente, la carga soluble en agua es lactosa monohidratada; la carga insoluble en agua es celulosa microcristalina; el aglutinante es hidroxipropilmetilcelulosa; y el lubricante es behenato de glicerilo.

20 En otro caso específico, la fórmula farmacéutica comprende entre 14% en peso y 18% en peso de carga insoluble en agua, entre 38% en peso y 44% en peso de carga soluble en agua, entre 35% en peso y 40% en peso de Hemitartrato de Fórmula (I), entre 2% en peso y 6% en peso de aglutinante, y entre 0,1% en peso y 2% en peso de aglutinante, todo sobre una base en sólidos secos. Más específicamente, la carga soluble en agua es lactosa monohidratada; y la carga insoluble en agua es celulosa microcristalina. Incluso más específicamente, la carga soluble en agua es lactosa monohidratada; la carga insoluble en agua es celulosa microcristalina; el aglutinante es hidroxipropilmetilcelulosa; y el lubricante es behenato de glicerilo.

25 En otro caso específico, la fórmula farmacéutica comprende entre 14% en peso y 18% en peso de carga insoluble en agua, entre 38% en peso y 44% en peso de carga soluble en agua, entre 36% en peso y 39% en peso de Hemitartrato de Fórmula (I), entre 2% en peso y 6% en peso de aglutinante, y entre 0,1% en peso y 2% en peso de aglutinante, todo sobre una base en sólidos secos. Más específicamente, la carga soluble en agua es lactosa monohidratada; y la carga insoluble en agua es celulosa microcristalina. Incluso más específicamente, la carga soluble en agua es lactosa monohidratada; la carga insoluble en agua es celulosa microcristalina; el aglutinante es hidroxipropilmetilcelulosa; y el lubricante es behenato de glicerilo.

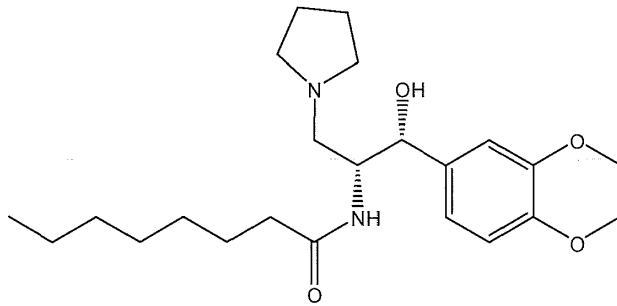
30 La invención se ilustra mediante los siguientes ejemplos, que de ningún modo están destinados a ser limitantes.

Párrafo 1. La sal de hemitartrato de un compuesto representado por la siguiente fórmula estructural:



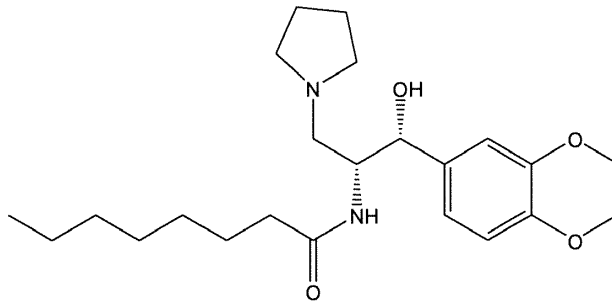
en la que la sal es una sal amorfa.

Párrafo 2. La sal de hemitartrato de un compuesto representado por la siguiente fórmula estructural:



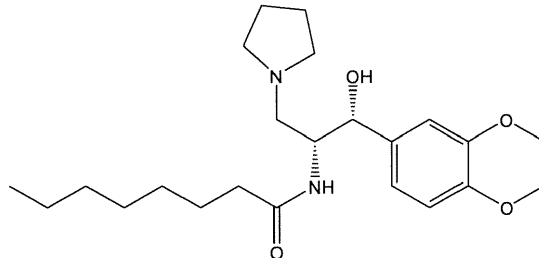
en la que al menos 70% en peso de la sal es cristalino.

Párrafo 3. La sal de hemitartrato de un compuesto representado por la siguiente fórmula estructural:



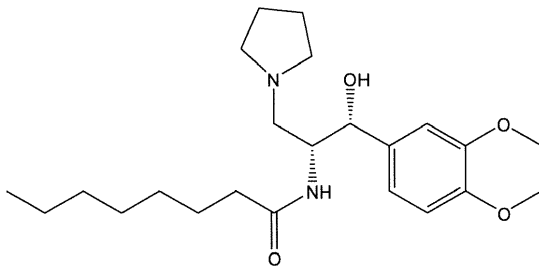
5 en la que al menos 70% en peso de la sal está en una forma cristalina individual.

Párrafo 4. La sal de hemitartrato de un compuesto representado por la siguiente fórmula estructural:



en la que al menos 99% en peso de la sal es cristalino.

Párrafo 5. La sal de hemitartrato de un compuesto representado por la siguiente fórmula estructural:



10 en la que al menos 99% en peso de la sal está en una forma cristalina individual.

Párrafo 6. La sal de hemitartrato de uno cualquiera de los Párrafos 1-5, en la que la sal de hemitartrato se selecciona de D-hemitartrato, L-hemitartrato, ácido hemimesotartárico o D,L-hemitartrato racémico.

15 Párrafo 7. La sal de hemitartrato de uno cualquiera de los Párrafos 1-5, en la que la sal de hemitartrato es L-hemitartrato.

Párrafo 8. La sal de los Párrafos 3 o 5, en la que al menos 70 % en peso de la sal está en la forma cristalina individual Forma A.

Párrafo 9. La sal de los Párrafos 3 o 5, en la que la forma cristalina individual se caracteriza por al menos un pico de difracción de rayos x de polvo principal a ángulos  $2\theta$  de  $5,1^\circ$ ,  $6,6^\circ$ ,  $10,7^\circ$ ,  $11,0^\circ$ ,  $15,9^\circ$ , y  $21,7^\circ$ .

Párrafo 10. La sal de los Párrafos 3 o 5, en la que la forma cristalina individual se caracteriza por al menos dos picos de difracción de rayos x de polvo principales a ángulos  $2\theta$  de  $5,1^\circ$ ,  $6,6^\circ$ ,  $10,7^\circ$ ,  $11,0^\circ$ ,  $15,9^\circ$ , y  $21,7^\circ$ .

5 Párrafo 11. La sal de los Párrafos 3 o 5, en la que la forma cristalina individual se caracteriza por al menos tres picos de difracción de rayos x de polvo principales a ángulos  $2\theta$  de  $5,1^\circ$ ,  $6,6^\circ$ ,  $10,7^\circ$ ,  $11,0^\circ$ ,  $15,9^\circ$ , y  $21,7^\circ$ .

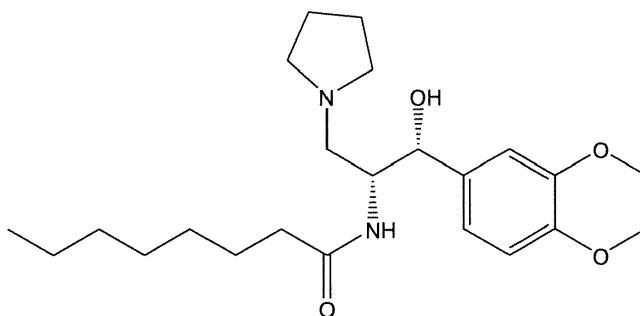
Párrafo 12. La sal de los Párrafos 3 o 5, en la que la forma cristalina individual se caracteriza por al menos cuatro picos de difracción de rayos x de polvo principales a ángulos  $2\theta$  de  $5,1^\circ$ ,  $6,6^\circ$ ,  $10,7^\circ$ ,  $11,0^\circ$ ,  $15,9^\circ$ , y  $21,7^\circ$ .

10 Párrafo 13. La sal de los Párrafos 3 o 5, en la que la forma cristalina individual se caracteriza por picos de difracción de rayos x de polvo principales a ángulos  $2\theta$  de  $5,1^\circ$ ,  $6,6^\circ$ ,  $10,7^\circ$ ,  $11,0^\circ$ ,  $15,9^\circ$ , y  $21,7^\circ$ .

Párrafo 14. La sal de los Párrafos 3 o 5, en la que la forma cristalina individual se caracteriza por picos de difracción de rayos x de polvo a ángulos  $2\theta$  de  $5,1^\circ$ ,  $6,6^\circ$ ,  $10,7^\circ$ ,  $11,0^\circ$ ,  $13,3^\circ$ ,  $15,1^\circ$ ,  $15,9^\circ$ ,  $16,5^\circ$ ,  $17,6^\circ$ ,  $18,6^\circ$ ,  $18,7^\circ$ ,  $19,0^\circ$ ,  $20,2^\circ$ ,  $21,7^\circ$  y  $23,5^\circ$ .

15 Párrafo 15. La sal de los Párrafos 3 o 5, en la que la forma cristalina individual se caracteriza por el patrón de difracción de rayos x de polvo de la FIG. 1.

Párrafo 16. Una composición farmacéutica que comprende la sal de hemitartrato de un compuesto representado por la siguiente fórmula estructural:



20 y un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable.

Párrafo 17. La composición farmacéutica del Párrafo 16, en la que la sal es una sal amorfa.

Párrafo 18. La composición farmacéutica del Párrafo 16, en la que al menos 70% en peso de la sal es cristalino.

25 Párrafo 19. La composición farmacéutica del Párrafo 16, en la que al menos 70% en peso de la sal está en una forma cristalina individual.

Párrafo 20. La composición farmacéutica del Párrafo 16, en la que al menos 99% en peso de la sal es cristalino.

Párrafo 21. La composición farmacéutica del Párrafo 16, en la que al menos 99% en peso de la sal está en una forma cristalina individual.

30 Párrafo 22. La composición farmacéutica del Párrafo 16, en la que la sal de hemitartrato se selecciona de D-hemitartrato, L-hemitartrato, ácido hemimesotartárico o D,L-hemitartrato racémico.

Párrafo 23. La composición farmacéutica del Párrafo 16, en la que la sal de hemitartrato es L-hemitartrato.

Párrafo 24. La composición farmacéutica del Párrafo 19 o 21, en la que al menos 70% en peso de la sal está en la forma cristalina individual Forma A.

Párrafo 25. La composición farmacéutica del Párrafo 19 o 21, en la que la forma cristalina individual se caracteriza por al menos un pico de difracción de rayos x de polvo principal a ángulos  $2\theta$  de 5,1°, 6,6°, 10,7°, 11,0°, 15,9°, y 21,7°.

5 Párrafo 26. La composición farmacéutica del Párrafo 19 o 21, en la que la forma cristalina individual se caracteriza por al menos dos picos de difracción de rayos x de polvo principales a ángulos  $2\theta$  de 5,1°, 6,6°, 10,7°, 11,0°, 15,9°, y 21,7°.

Párrafo 27. La composición farmacéutica del Párrafo 19 o 21, en la que la forma cristalina individual se caracteriza por al menos tres picos de difracción de rayos x de polvo principales a ángulos  $2\theta$  de 5,1°, 6,6°, 10,7°, 11,0°, 15,9°, y 21,7°.

10 Párrafo 28. La composición farmacéutica del Párrafo 19 o 21, en la que la forma cristalina individual se caracteriza por al menos cuatro picos de difracción de rayos x de polvo principales a ángulos  $2\theta$  de 5,1°, 6,6°, 10,7°, 11,0°, 15,9°, y 21,7°.

15 Párrafo 29. La composición farmacéutica del Párrafo 19 o 21, en la que la forma cristalina individual se caracteriza por picos de difracción de rayos x de polvo principales a ángulos  $2\theta$  de 5,1°, 6,6°, 10,7°, 11,0°, 15,9°, y 21,7°.

Párrafo 30. La composición farmacéutica del Párrafo 19 o 21, en la que la forma cristalina individual se caracteriza por picos de difracción de rayos x de polvo a ángulos  $2\theta$  de 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° y 23,5°.

20 Párrafo 31. La composición farmacéutica del Párrafo 19 o 21, en la que la forma cristalina individual se caracteriza por el patrón de difracción de rayos x de polvo de la FIG. 1.

Párrafo 32. Un método para tratar un sujeto con enfermedad de Gaucher, que comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de la sal de hemitartrato de uno cualquiera de los Párrafos 1-Párrafo 15.

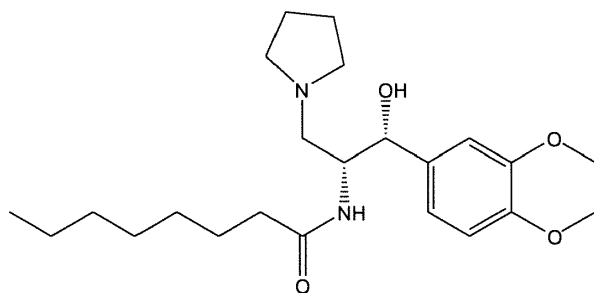
Párrafo 33. Un método para tratar un sujeto con enfermedad de Fabry, que comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de la sal de hemitartrato de uno cualquiera de los Párrafos 1-Párrafo 15.

25 Párrafo 34. Un método para inhibir glucosilceramida sintasa o reducir las concentraciones de glucoesfingolípidos en un sujeto que lo necesite, administrando al sujeto una cantidad eficaz de la sal de hemitartrato de uno cualquiera de los Párrafos 1-Párrafo 15.

Párrafo 35. El método del Párrafo 32, 33 o 34, que comprende administrar la sal de hemitartrato a una dosis dos veces al día de 25 miligramos a 200 miligramos.

30 Párrafo 36. El método del Párrafo 32, 33 o 34, que comprende administrar la sal de hemitartrato a una dosis dos veces al día de 50 miligramos.

Párrafo 37. Un método para tratar un sujeto con enfermedad de Gaucher, que comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de un primer compuesto representado por la siguiente fórmula estructural:



;

35 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en combinación con una cantidad eficaz de un segundo agente terapéutico que es eficaz para tratar enfermedad de Gaucher.

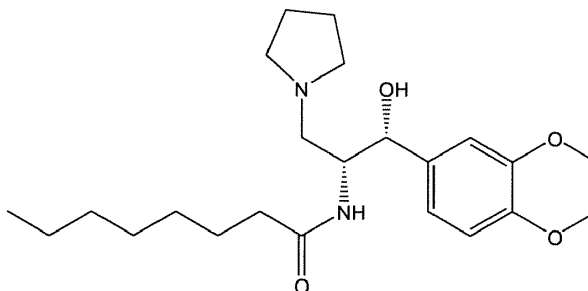


Párrafo 38. El método del Párrafo 37, en el que el segundo agente terapéutico es imiglucerasa.

Párrafo 39. El método del Párrafo 37, en el que el segundo agente terapéutico es isofagomina.

Párrafo 40. El método del Párrafo 37, en el que el segundo agente terapéutico es miglustat.

5 Párrafo 41. Un método para tratar un sujeto con enfermedad de Fabry, comprendiendo el método administrar al sujeto una cantidad eficaz de un primer agente terapéutico representado por la siguiente fórmula estructural:



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en combinación con una cantidad eficaz de un segundo agente terapéutico que es eficaz para tratar enfermedad de Fabry.

10 Párrafo 42. El método del Párrafo 41, en el que el segundo agente terapéutico es migalastat.

Párrafo 43. El método del Párrafo 41, en el que el segundo agente terapéutico es agalsidasa  $\beta$ .

Párrafo 44. El método de uno cualquiera de los Párrafos 37-43, en el que el primer agente terapéutico se administra como el hemitartrato de uno cualquiera de los Párrafos 1-15.

15 Párrafo 45. El método de cualquiera de los Párrafos 37-43, en el que el tratamiento con el primer agente terapéutico se comienza después del tratamiento durante un período de al menos diez semanas con el segundo agente terapéutico.

20 Párrafo 46. El método de uno cualquiera de los Párrafos 37-43, en el que el tratamiento con el primer agente terapéutico se comienza después del tratamiento con el segundo agente terapéutico y en el que el tratamiento con el primer agente terapéutico se inicia después de que el recuento plaquetario del sujeto es igual o mayor que  $100,000 \text{ mm}^3$ , la concentración de hemoglobina es igual o mayor que 11 g/dl (mujeres) o 12 g/dl (hombres); y/o el volumen del bazo del sujeto es menor o igual a 10 múltiplos del normal, y los volúmenes del hígado son menores o iguales a 1,5 múltiplos del normal.

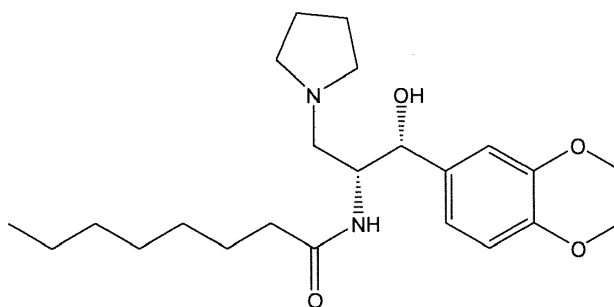
Párrafo 47. El método del Párrafo 45 o 46, en el que el tratamiento con el segundo agente terapéutico se termina tras iniciar el tratamiento con el primer agente terapéutico.

25 Párrafo 48. El método de uno cualquiera de los Párrafos 37-47, que comprende administrar el primer agente terapéutico a una dosis dos veces al día de 25 miligramos a 200 miligramos.

Párrafo 49. El método de uno cualquiera de los Párrafos 37-47, que comprende administrar el primer agente terapéutico a una dosis dos veces al día de 50 miligramos.

Párrafo 50. Una composición farmacéutica que comprende:

30 la sal de hemitartrato de un compuesto representado por la siguiente fórmula estructural:



- al menos una carga soluble en agua;
- al menos una carga insoluble en agua;
- al menos un aglutinante; y
- 5 al menos un lubricante.

Párrafo 51. La composición farmacéutica del Párrafo 50, en la que la sal de hemitartrato es la sal de hemitartrato de uno cualquiera de los Párrafos 1-Párrafo 15.

10 Párrafo 52. La composición farmacéutica del Párrafo 50, en la que la carga soluble en agua se selecciona del grupo que consiste en lactosa anhidra, lactosa monohidratada, manitol, cloruro de sodio, azúcar en polvo, sorbitol, sacarosa, inositol y almidón pregelatinizado.

Párrafo 53. La composición farmacéutica del Párrafo 50, en la que la carga insoluble en agua se selecciona del grupo que consiste en celulosa microcristalina, fosfato de calcio y almidón.

15 Párrafo 54. La composición farmacéutica del Párrafo 50, en la que el aglutinante se selecciona del grupo que consiste en almidón pregelatinizado, carboximetilcelulosa sódica, hidroxipropilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, polivinilpirrolidona, copovidona, gelatina, gomas naturales, pasta de almidón, sacarosa, jarabe de maíz, polietilenglicoles y alginato de sodio.

Párrafo 55. La composición farmacéutica del Párrafo 50, en la que el lubricante se selecciona del grupo que consiste en aceite vegetal hidrogenado, estearato de calcio, y behenato de glicerilo.

20 Párrafo 56. La composición farmacéutica del Párrafo 50, en la que la carga soluble en agua se selecciona del grupo que consiste en lactosa anhidra, lactosa monohidratada, manitol, cloruro de sodio, azúcar en polvo, sorbitol, sacarosa, inositol y almidón pregelatinizado; la carga insoluble en agua se selecciona del grupo que consiste en celulosa microcristalina, fosfato de calcio y almidón; el aglutinante se selecciona del grupo que consiste en almidón pregelatinizado, carboximetilcelulosa sódica, hidroxipropilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, polivinilpirrolidona, copovidona, gelatina, gomas naturales, pasta de almidón, sacarosa, jarabe de maíz, polietilenglicoles y alginato de sodio; y el lubricante se selecciona del grupo que

25 consiste en aceite vegetal hidrogenado, estearato de calcio, y behenato de glicerilo.

Párrafo 57. La composición farmacéutica del Párrafo 56, en la que la composición comprende 26% en peso a 50% en peso de la carga soluble en agua sobre una base en sólidos secos.

30 Párrafo 58. La composición farmacéutica del Párrafo 56, en la que la composición comprende 8% en peso a 32% en peso de la carga insoluble en agua sobre una base en sólidos secos.

Párrafo 59. La composición farmacéutica del Párrafo 56, en la que la composición comprende 8% en peso a 24% en peso de la carga insoluble en agua sobre una base en sólidos secos.

Párrafo 60. La composición farmacéutica del Párrafo 56, en la que la composición comprende 12% en peso a 20% en peso de la carga insoluble en agua sobre una base en sólidos secos.

35 Párrafo 61. La composición farmacéutica del Párrafo 56, en la que la composición comprende 14% en peso a 18% en peso de la carga insoluble en agua sobre una base en sólidos secos.

Párrafo 62. La composición farmacéutica del Párrafo 56, en la que la composición comprende 2% en peso a 6% en peso del aglutinante sobre una base en sólidos secos.

Párrafo 63. La composición farmacéutica del Párrafo 56, en la que la composición comprende 0,1% en peso a 2% en peso de un lubricante sobre una base en sólidos secos.

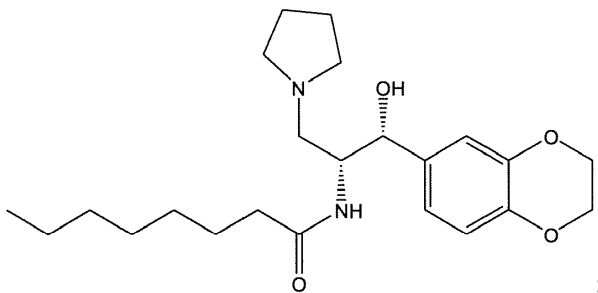
5 Párrafo 64. La composición farmacéutica del Párrafo 56, en la que la composición comprende 35% en peso a 40% en peso de la sal de hemitartrato, 26% en peso a 50% en peso de la carga soluble en agua; 8% en peso a 32% en peso de la carga insoluble en agua; 2% en peso a 6% en peso del aglutinante; y 0,1% en peso a 2% en peso del lubricante, todos sobre una base en sólidos secos.

10 Párrafo 65. La composición farmacéutica del Párrafo 56, en la que la carga soluble en agua es lactosa monohidratada; la carga insoluble en agua es celulosa microcristalina; el aglutinante es hidroxipropilmetilcelulosa; y el lubricante es behenato de glicerilo.

15 Párrafo 66. La composición farmacéutica del Párrafo 65, en la que la composición comprende 35% en peso a 40% en peso de la sal de hemitartrato, 26% en peso a 50% en peso de la lactosa monohidratada; 8% en peso a 32% en peso de la celulosa microcristalina; 2% en peso a 6% en peso de la hidroxipropilmetilcelulosa; y 0,1% en peso a 2% en peso del behenato de glicerilo, todos sobre una base en sólidos secos.

Párrafo 67. Un método para tratar un sujeto con enfermedad de Fabry, comprendiendo el método:

a) administrar al sujeto una cantidad eficaz de un compuesto de Fórmula (I):



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;

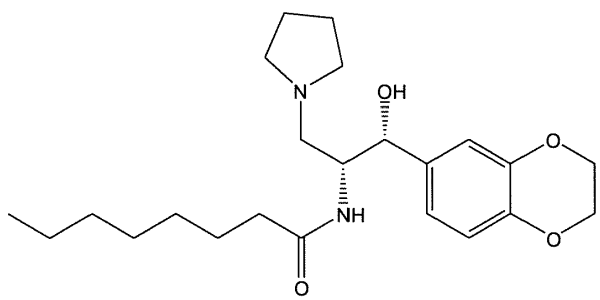
20 b) estudiar el sujeto para determinar si el sujeto es un metabolizador pobre, intermedio o amplio/ultrarrápido de P450;

c) si el sujeto es un metabolizador intermedio o amplio/ultrarrápido de P450, determinar una cantidad eficaz ajustada del compuesto; y

25 d) administrar al sujeto una cantidad eficaz ajustada del compuesto de Fórmula (I) si el sujeto es un metabolizador intermedio o amplio/ultrarrápido de P450, y administrar al sujeto una cantidad eficaz del compuesto de Fórmula (I) si el sujeto es un metabolizador pobre de P450.

Párrafo 68. Un método para tratar un sujeto con enfermedad de Gaucher, comprendiendo el método:

a) administrar al sujeto una cantidad eficaz de un compuesto de Fórmula (I):



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;

b) estudiar el sujeto para determinar si el sujeto es un metabolizador pobre, intermedio o amplio/ultrarrápido de P450;

5 c) si el sujeto es un metabolizador intermedio o amplio/ultrarrápido de P450, determinar una cantidad eficaz ajustada del compuesto; y

d) administrar al sujeto una cantidad eficaz ajustada del compuesto de Fórmula (I) si el sujeto es un metabolizador intermedio o amplio/ultrarrápido de P450, y administrar al sujeto una cantidad eficaz del compuesto de Fórmula (I) si el sujeto es un metabolizador pobre de P450.

10 Párrafo 69. El método del Párrafo 67 o 68, en el que el compuesto es la sal de hemitartrato de uno cualquiera de los Párrafos 1-Párrafo 15.

Párrafo 70. El método de uno cualquiera de los Párrafos 67-69, en el que el ensayo comprende monitorizar los niveles plasmáticos valle del compuesto en el sujeto durante un período de al menos una semana.

15 Párrafo 71. El método de uno cualquiera de los Párrafos 67-69, en el que el ensayo comprende monitorizar los niveles plasmáticos valle del compuesto en el sujeto durante un período de al menos diez semanas.

Párrafo 72. El método de uno cualquiera de los Párrafos 67-71, en el que el sujeto es un metabolizador intermedio o amplio/ultrarrápido de la enzima de P450 si los niveles valle plasmáticos del compuesto en el sujeto están por debajo de 5 ng/ml, y la cantidad eficaz ajustada del compuesto se selecciona para dar como resultado niveles valle del compuesto en el sujeto de al menos 5 ng/mg.

20 Párrafo 73. El método de uno cualquiera de los Párrafos 67-71, en el que el sujeto es un metabolizador pobre de la enzima de P450 si los niveles valle plasmáticos del compuesto son al menos 5 ng/ml tras administrársele una cantidad eficaz del compuesto.

Párrafo 74. El método de uno cualquiera de los Párrafos 67 o 68, en el que el ensayo en la etapa b) ocurre antes o después de que comienza el tratamiento.

25 Párrafo 75. El método de uno cualquiera de los Párrafos 67-74, en el que la enzima de P450 es la enzima CYP2D6 y/o la enzima CYP3A4.

Párrafo 76. El método de uno cualquiera de los Párrafos 67-75, en el que el sujeto es un metabolizador pobre de P450 como resultado de coadministrarle un inhibidor de la enzima CYP2D6 o la enzima CYP3A4.

30 Párrafo 77. El método del Párrafo 76, en el que el inhibidor se selecciona del grupo que consiste en paroxetina, fluoxetina, quinidina, y ketoconazol.

Párrafo 78. El método del Párrafo 67 o 69, en el que el ensayo en la etapa b) es mediante genotipado para la enzima de P450.

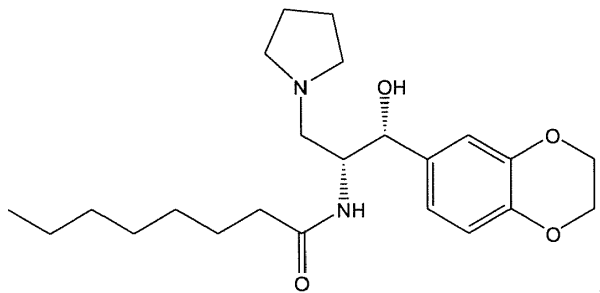
Párrafo 79. El método del Párrafo 78, en el que la enzima de P450 es CYP2D6.

35 Párrafo 80. El método de uno cualquiera de los Párrafos 67-79, en el que la cantidad eficaz del compuesto es una dosis de dos veces al día de 25 miligramos a 200 miligramos.

Párrafo 81. El método de uno cualquiera de los Párrafos 67-79, en el que la cantidad eficaz del compuesto es una dosis de dos veces al día de 50 miligramos.

Párrafo 82. Un método para tratar un sujeto con enfermedad de Fabry, que comprende las etapas de:

5 a) administrar al sujeto una cantidad eficaz de un compuesto representado por la siguiente fórmula estructural:



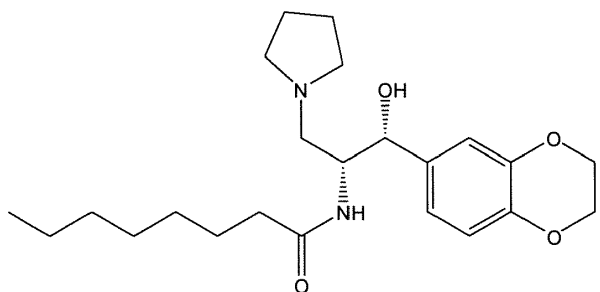
o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;

b) evaluar los niveles plasmáticos valle del compuesto en el sujeto; y

10 c) ajustar la cantidad de compuesto administrada al sujeto de manera que los niveles plasmáticos valle del compuesto sean al menos 5 ng/ml.

Párrafo 83. Un método para tratar un sujeto con enfermedad de Gaucher, que comprende las etapas de:

a) administrar al sujeto una cantidad eficaz de un compuesto representado por la siguiente fórmula estructural:



15 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;

b) evaluar los niveles plasmáticos valle del compuesto en el sujeto; y

c) ajustar la cantidad de compuesto administrada al sujeto de manera que los niveles plasmáticos valle del compuesto sean al menos 5 ng/ml.

20 Párrafo 84. El método del Párrafo 82 o 83, en el que el sujeto se ensaya antes del que comience el tratamiento con el compuesto para evaluar si el sujeto es un metabolizador pobre, intermedio o amplio/ultrarrápido de P450, y en el que la cantidad eficaz se determina en base a si el sujeto es un metabolizador pobre, intermedio o amplio/ultrarrápido de P450.

Párrafo 85. El método del Párrafo 82, 83 u 84, en el que el compuesto es la sal de hemitartrato de uno cualquiera de los Párrafos 1-Párrafo 15.

25 Párrafo 86. El método del Párrafo 82 o 83, en el que, en la etapa b), se evalúa la  $C_{max}$  del compuesto en el sujeto, y en el que, en la etapa c), la cantidad de compuesto administrada al sujeto se ajusta de manera que

los niveles plasmáticos valle del compuesto en el sujeto son al menos 5 ng/ml y la  $C_{max}$  del compuesto en el sujeto está por debajo de 100 ng/ml.

Párrafo 87. El método de uno cualquiera de los Párrafos 82-86, en el que la enzima de P450 es CYP2D6 y/o la enzima CYP3A4.

5 Párrafo 88. El método de uno cualquiera de los Párrafos 82-86, en el que el sujeto es un metabolizador pobre de la enzima de P450 como resultado de la coadministración de un inhibidor de la enzima de P450.

Párrafo 89. El método del Párrafo 88, en el que el inhibidor se selecciona del grupo que consiste en paroxetina, fluoxetina, quinidina, y ketoconazol.

10 Párrafo 90. El método de uno cualquiera de los Párrafos 82-86, en el que la expresión de la enzima de P450 en el sujeto se evalúa para determinar si el sujeto un metabolizador pobre, intermedio o amplio/ultrarrápido de P450.

Párrafo 91. El método del Párrafo 90 en el que la enzima de p450 es CYP2D6 o CYP3A4.

Párrafo 92. El método de cualquiera de los Párrafos 82-90, en el que la cantidad eficaz del compuesto es una dosis de dos veces al día de 25 miligramos a 200 miligramos.

15 Párrafo 93. El método de cualquiera de los Párrafos 82-90, en el que la cantidad eficaz del compuesto es una dosis de dos veces al día de 50 miligramos.

## EXPERIMENTAL

### Ejemplo 1: Preparación de sales de Fórmula (I)

20 La sal de hemitartrato de Fórmula I se cristaliza fácilmente y muestra muchas propiedades beneficiosas en comparación con otras sales. Por ejemplo, se usaron los siguientes ácidos en la preparación de sales del compuesto representado por la Fórmula (I): ácido cítrico (que genera sales en relaciones 1:1, 1:2 y 1:3 (sal:Fórmula I)); ácido L-málico (1:1 y 1:2); ácido metanosulfónico (1:1); ácido fumárico (1:1 y 1:2); ácido clorhídrico (1:1); ácido acético (1:1); y ácido tartárico (1:1 y 1:2). Sólo las sales generadas por ácido clorhídrico (1:1); ácido tartárico (1:1) y ácido tartárico (1:2) fueron de forma sólida. De estas tres sales, se encontró que ácido clorhídrico (1:1) y ácido tartárico (1:1) son higroscópicas y no cristalinas, y por lo tanto son inaceptables para uso en un producto farmacéutico. Se encontró que el hemitartrato (1 de sal:2 de Fórmula I) del compuesto representado por la Fórmula I es cristalino y no higroscópico.

#### Preparación de Hemitartrato de Fórmula (I) en acetona

30 Se disolvió ácido L-tartárico (6,02 g, 40,11 mmoles, 0,497 equivalentes) en acetona (175 ml) poniendo a reflujo la disolución y después enfriando hasta la temperatura ambiente. Se disolvió Base Libre de Fórmula (I) (32,67 g, 80,76 mmoles) en acetona (300 ml) a temperatura ambiente. La disolución de ácido L-tartárico se añadió a la disolución de la Base Libre de Fórmula (I) a temperatura ambiente durante 15 min. Se formó un precipitado blanco a la mitad de la adición. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 0,5 h horas, y después se puso a reflujo brevemente y se enfrió hasta la temperatura ambiente. Tras agitar a temperatura ambiente durante 0,5 h, el precipitado blanco se filtró. El sólido blanco se lavó dos veces con acetona (2 x 130 ml). El sólido se secó al aire, y después se secó a vacío a 55-60°C. El rendimiento fue 36,66 g (95%).

#### Preparación de Hemitartrato de Fórmula (I) en metanol al 5% en acetona.

40 Se disolvió Base Libre de Fórmula (I), 10 g/24,7 mmoles, en metanol al 5%/acetona 120 ml o 240 ml. Se disolvió ácido L-tartárico, 1,85 g/12,3 mmoles, en metanol al 5%/acetona 60 ml o 120 ml (N o 2N) mediante calentamiento hasta 40-45°C, y esta disolución se añadió a la primera disolución. Después de 1 hora sin precipitación, se añadió 1 mg de Hemitartrato de Fórmula (I) como un cristal de siembra. La precipitación se produjo después de 5 minutos, y la reacción se continuó agitando durante 30 minutos más. La reacción se calentó entonces a reflujo durante 5 minutos (el precipitado era completamente soluble) y después se enfrió hasta la temperatura ambiente en un baño de agua a 20-22°C. Se formó un precipitado, y la reacción se continuó agitando durante 3 horas. El producto final se recogió mediante filtración y se lavó con acetona, 2 x 40 ml, y después se secó en el horno de vacío a 55-60°C durante 16 horas. El peso del producto fue 8,72 g/74% de rendimiento.

#### Preparación de Hemitartrato de Fórmula (I) en agua al 1% en acetona.

45 Se disolvió Base Libre de Fórmula (I) (10 g/24,7 mmoles) en agua al 1%/acetona 120 ml o 240 ml a temperatura ambiente. Se disolvió ácido L-tartárico, 1,85 g/12,3 mmoles, en agua al 1%/acetona 60 ml o 120 ml (N o 2N)

5 mediante calentamiento hasta 40-45°C, y esta disolución se añadió a la primera disolución. Después de 1 hora sin precipitación, se añadió 1 mg de Hemitartrato de Fórmula (I) como un cristal de siembra. La precipitación se produjo después de 5 minutos, y la reacción se continuó agitando durante 30 minutos. La reacción se calentó entonces a reflujo durante 5 minutos (el precipitado no era completamente soluble) y después se enfrió hasta la temperatura ambiente en un baño de agua a 20-22°C. Se formó un precipitado, y la reacción se continuó agitando durante 3 horas. El producto final se recogió mediante filtración y se lavó con acetona, 2 x 40 ml, y después se secó en el horno de vacío a 55-60°C durante 16 horas. El peso del producto fue 8,62 g 73% de rendimiento.

Recristalización de Hemitartrato de Fórmula (I) en metanol al 5% en acetona.

10 Se disolvió Hemitartrato de Fórmula (I) (3,06 g) en 116 ml de metanol al 5% en acetona a reflujo. La disolución se enfrió hasta la temperatura ambiente y se agitó a temperatura ambiente durante 2 h. El precipitado blanco se filtró y se lavó con 10 ml de metanol al 5% en acetona y después acetona (15 ml). Después de secar a vacío durante 18 h a 55-60°C, se recibieron 2,38 g de Hemitartrato de Fórmula (I) (78% de recuperación).

Recristalización de Hemitartrato de Fórmula (I) en H<sub>2</sub>O al 1% en acetona.

15 Se disolvió Hemitartrato de Fórmula (I) (3,05 g) en 125 ml de H<sub>2</sub>O al 1% en acetona a reflujo. La disolución se enfrió hasta la temperatura ambiente y se agitó a temperatura ambiente durante 2 h. El precipitado blanco se filtró y se lavó con 10 ml de H<sub>2</sub>O al 1% en acetona y después acetona (15 ml). Después de secar a vacío toda la noche a 55-60°C, se obtuvieron 2,35 g de Hemitartrato de Fórmula (I) (77% de recuperación).

**Ejemplo 2: Preparación de Hemitartrato de Fórmula (I) cristalino**

20 Hemitartrato de Fórmula (I) se cristalizó mediante varios métodos. El Lote 1 se preparó usando disolventes de acetato de etilo/acetona, y se secó a temperatura ambiente. El Lote 3 se preparó usando disolventes de acetato de etilo/acetona, y se recristalizó en acetato de etilo. El Lote 4 se recristalizó en acetona usando material del Lote 1. El Lote 5 se recristalizó en isopropanol. El Lote 7 se preparó usando un disolvente de acetato de etilo/acetona similar al Lote 1, pero en una escala mayor; el Lote 8 se preparó usando acetona solamente, sin cristalización posterior. El Lote 9 se preparó usando acetona solamente con un breve reflujo, y nuevamente sin recristalización posterior.

25 Tabla 1: Sumario de la identificación de polimorfismos de los Lotes 1-9 de Hemitartrato de Fórmula (I)

Lote nº	Método de procesamiento	Punto de fusión mediante DSC (°C)		Microscopio	TGA
		Entalpía (J/g)			
1	Precipitación en acetona/acetato de etilo*	162	-81,4	Cristal	99,91% a 100°C 98,73% a 175°C
2	Precipitación en acetona/acetato de etilo-secado a temperatura ambiente *	164	-95,6	Cristal	N/A
3	Precipitación en acetona/acetato de etilo-secado a 55-60°C	166	-97,8	Cristal	100,0% a 100°C 99,98% a 153°C
4	Recristalización en acetona	166	-107,2	Cristal	100,2% a 100°C 100,2% a 153°C
5	Recristalización en isopropanol	166	-102,6	Cristal	100,0% a 100°C 100,0% a 153°C
7	Precipitación en acetona/acetato de etilo	166	-99,4	Cristal**	100,1% a 100°C 99,91% a 153°C
8	Precipitación en acetona	165	-100,7	Cristal**	100,0% a 100°C 100,0% a 153°C
9	Precipitación en acetona con reflujo breve	165	-100,2	Cristal**	

\*: que contiene algo de base libre en el termograma de DSC.

\*\* : que contiene hábitos cambiados en estos lotes desde formas de varillas, formas de placas a formas de agujas, varillas e irregulares.

También se prepararon formas de cristal de Hemitartrato de Fórmula (I) usando evaporación lenta, enfriamiento lento, enfriamiento rápido y precipitación con antidisolventes con una variedad de disolventes.

5 Método de evaporación lenta. Se trató una muestra pesada (habitualmente 20 mg) con alícuotas del disolvente de ensayo. Las alícuotas tenían típicamente 100-200  $\mu\text{l}$ . Entre las adiciones de los disolventes, la mezcla se agitó o se trató con ultrasonidos. Cuando los sólidos se disolvieron, según se juzgó mediante inspección visual, la disolución se dejó evaporar en condiciones ambientales en un vial abierto cubierto con papel de aluminio perforado con orificios de aguja. Las solubilidades se estimaron a partir de estos experimentos basándose en el disolvente total añadido para obtener una disolución transparente.

Tabla 2: Solubilidad aproximada de Hemitartrato de Fórmula (I) a temperatura ambiente (20-25°C).

Disolvente orgánico	Solubilidad aproximada (mg/ml)
Heptano	No disponible
Hexano	No disponible
Tolueno	<5
Diclorometano	100
Etanol	29
Alcohol isopropílico	<5
Acetonitrilo	<5
Acetato de etilo	<5
Metanol	>200
Acetona	<5
Metil t-butil éter (TBME)	<5
p-Dioxano	<5
Tetrahidrofurano (THF)	<5

10

Tabla 3: Sumario de polimorfismo usando el enfoque de evaporación lenta.

Disolvente orgánico	Forma sólida generada a partir de evaporación lenta	Punto de fusión mediante DSC (°C)		Microscopio	TGA
		Entalpía (J/g)			
Metanol	No	N/A	N/A	N/A	N/A
Etanol	Sí	165	-95,0	Cristal**	100,0% a 100°C 100,0% a 150°C

\*\* : las partículas tuvieron forma de placas y de varillas

15

Método de enfriamiento lento/rápido. Se disolvió Hemitartrato de Fórmula (I) en un disolvente de ensayo a 50-60°C. La disolución resultante se dejó entonces enfriar hasta la temperatura ambiente (enfriamiento lento). Si no se formó ningún sólido después de un día, los viales se colocaron en un refrigerador. Para experimentos de enfriamiento rápido, la disolución resultante se dejó entonces enfriar en un refrigerador. Los sólidos se recogieron mediante filtración y se secaron al aire.



Tabla 4: Sumario de polimorfismo usando el enfoque de enfriamiento lento.

Disolvente orgánico	Forma sólida generada a partir de enfriamiento lento	Punto de fusión mediante DSC (°C)		Microscopio	TGA
		Entalpía (J/g)			
Etanol	Sí	167	-106,2	Cristal**	100,1% a 100°C 100,1% a 150°C

\*\* : las partículas tuvieron forma de placas y de varillas

Tabla 5: Sumario de polimorfismo usando el enfoque de enfriamiento rápido.

Disolvente orgánico	Forma sólida generada a partir de enfriamiento rápido	Punto de fusión mediante DSC (°C)		Microscopio	TGA
		Entalpía (J/g)			
Etanol	Sí	167	-106,2	Cristal**	100,0% a 100°C 100,0% a 150°C

\*\* : las partículas tuvieron forma de placas y de varillas

5

Método con antidisolventes. El Hemitartrato de Fórmula (I) se disolvió en un disolvente. Se añadió un antidisolvente a la disolución. Los sólidos que se formaron se recogieron mediante filtración y se secaron al aire.

Tabla 6: Sumario de identificación de polimorfismos usando el enfoque de antidisolventes

Disolvente orgánico	Forma sólida generada a partir de enfoque con antidisolventes	Punto de fusión mediante DSC (°C)		Microscopio	TGA
		Entalpía (J/g)			
Metanol/acetato de etilo	Sí	167	-99,5	Cristal*	100,1% a 100°C 100,1% a 150°C
Metanol/acetona	Sí	167	-106,2	Cristal*	100,3% a 100°C 100,2% a 150°C
Metanol/acetoneitrilo	No	N/A	N/A	N/A	N/A
Metanol/tolueno	No	N/A	N/A	N/A	N/A
Metanol/THF	No	N/A	N/A	N/A	N/A
Metanol/TBME	Sí	167	-102,0	Cristal*	100,2% a 100°C 100,1% a 150°C
Metanol/p-dioxano	No	N/A	N/A	N/A	N/A
Agua/THF	No	N/A	N/A	N/A	N/A
Agua/TMBE	No	N/A	N/A	N/A	N/A
Agua/isopropanol	No	N/A	N/A	N/A	N/A
Agua/acetonitrilo	No	N/A	N/A	N/A	N/A

Disolvente orgánico	Forma sólida generada a partir de enfoque con antidisolventes	Punto de fusión mediante DSC (°C)		Microscopio	TGA
		Entalpía (J/g)			
Agua/acetona	No	N/A	N/A	N/A	N/A
Dicolorometano/heptano	Sí	165	-89,2	Cristal**	100,0% a 100°C 99,99% a 150°C
Dicolorometano/acetato de etilo	Sí	167	-97,8	Cristal*	100,2% a 100°C 100,1% a 150°C
Dicolorometano/tolueno	Sí	164	-89,8	Cristal*	99,95% a 100°C 99,86% a 150°C
Dicolorometano/TBME	Sí	167	-98,6	Cristal**	100,0% a 100°C 99,91% a 150°C
Dicolorometano/p-dioxano	Sí (poca)	N/A	N/A	N/A	N/A
Dicolorometano/isopropanol	No	N/A	N/A	N/A	N/A

\*: Las partículas tenían forma de placa y de varilla.  
 \*\*: Las partículas individuales tuvieron más de un color de birrefringencia.  
 \*\*\*: Las partículas tuvieron forma de agujas y de varillas.

### Ejemplo 3: Propiedades físicas de Hemitartrato de Fórmula (I)

5 Calorimetría de barrido diferencial (DSC). Los datos de DSC se recogieron en un instrumento TA Q100 utilizando nitrógeno como el gas de purga. Se pesaron exactamente aproximadamente 2-5 mg de muestra en una bandeja de DSC de aluminio. La bandeja se cubrió con una tapa y se perforó con un fórceps. La celda de muestra se equilibró a 30°C y se calentó a una velocidad de 10°C por minuto hasta una temperatura final de 220°C.

10 Microscopía de platina caliente. La microscopía de platina caliente se llevó a cabo usando una platina caliente Linkam (modelo FTIR 600) montada sobre un microscopio Leica DM LP equipado con una cámara Sony DXC-970MD 3CCD para la recogida de imágenes. Se usó un objetivo 40x con luz polarizada para visualizar las muestras. Cada una de las muestras se colocó entre dos cubreobjetos. Cada muestra se observó visualmente a medida que se calentaba la platina. Las imágenes se capturaron usando Links version 2.27 (Linkam). La platina caliente se calibró usando patrones de punto de fusión USP.

Se confirmó que la transición endotérmica observada en el perfil de DSC es una transición de fusión a una temperatura entre 160-163°C mediante microscopía de platina caliente.

### 15 Ejemplo 4: Difracción de rayos X de polvo de Hemitartrato de Fórmula (I)

20 Todos los análisis de difracción de rayos X de polvo (XRPD) se realizaron en SSCI, Inc. (West Lafayette, IN 47906). Los análisis de XRPD se llevaron a cabo usando un difractómetro de rayos X de polvo Shimadzu XRD-6000, usando radiación CuK $\alpha$ . El instrumento está equipado con un tubo de rayos X de foco fino. El voltaje y amperaje del tubo se ajustaron a 40 kV y 40 mA, respectivamente. Las ranuras de divergencia y de dispersión se ajustaron a 1°, y la ranura receptora se ajustó a 0,15 mm. La radiación difractada se detectó mediante un detector de centelleo de NaI. Se usó el barrido continuo de theta dos theta a 3°/min. (0,4 s/0,02° etapa) de 2,5 a 40° 2 $\theta$ . Se analizó un patrón de silicio para comprobar el alineamiento del instrumento. Los datos se recogieron y analizaron usando XRD-6000 v 4.1.

### Ejemplo 5: Comparación de Hemitartrato de Fórmula (I) con Base Libre de Fórmula (I)

25 La caracterización de sólidos de la base libre y de la sal de hemitartrato se resume en la Tabla 7. El Hemitartrato de Fórmula I tiene propiedades superiores en comparación con la base libre de Fórmula I. Por ejemplo, el Hemitartrato de Fórmula I tiene un mayor punto de fusión (> 150°C), mayor energía de empaquetamiento (mayor entalpía

endotérmica), menor varianza en el tamaño de partículas, mayor solubilidad acuosa (alrededor de 300 mg/ml en agua), forma de cristal adecuada, y mayor densidad aparente, en comparación con la Base Libre de Fórmula I.

Tabla 7: Sumario de estado sólido y propiedades físicas y químicas de Base Libre de Fórmula (I) y de Hemitartrato de Fórmula (I)

Características físicas	Base Libre de Fórmula (I)	Hemitartrato de Fórmula (I)
Punto de fusión (°C)	86-88	163
Entalpía endotérmica (J/g)	75-82	96-106
Tamaño de partículas (µm)	<10 a 100	~3 (Media)
Solubilidad acuosa (mg/ml)	0,04	>216
Cristalina	Sí	Sí
Forma del cristal	Aguja	Placa, varilla, algo irregular
Higroscopía (40°C/75% RH)	Ninguna	Ninguna
Densidad aparente	~0,2	0,4-0,5

5

#### Ejemplo 6: Actividad y especificidad in vitro

Actividad de Hemitartrato de Fórmula (I) inhibiendo la síntesis de glucoesfingolípidos in vitro. Se usaron dos ensayos para cuantificar la actividad inhibidora de Hemitartrato de Fórmula (I) para glucosilceramida sintasa. Puesto que la glucosilceramida es la primera etapa y la etapa limitante de la velocidad en la biosíntesis de glucoesfingolípidos, se usó un ensayo de citometría de flujo que midió los niveles de superficie celular de GM1 y GM3 para evaluar indirectamente la actividad del inhibidor en células intactas. La incubación de células K562 o B16/F10 durante 72 h con cantidades crecientes de Hemitartrato de Fórmula (I) (0,6-1000 nM) dio como resultado una reducción de los niveles de la superficie celular de tanto GM1 como GM3, dependiente de la dosis. El valor medio de IC<sub>50</sub> para inhibir la presentación de GM1 en la superficie celular en células K562 fue 24 nM (intervalo 14-34 nM) (Tabla 8), y aquel para GM3 en células B16/F10 fue 29 nM (intervalo 12-48 nM). No se observó toxicidad celular abierta en ninguna estirpe celular, incluso cuando se ensayó a la dosis más elevada.

10

15

20

25

Un ensayo alternativo para la actividad midió la inhibición de glucosilceramida sintasa en microsomas derivados de células humanas. En este ensayo, los microsomas se prepararon a partir de células A375 de melanoma humano mediante tratamiento con ultrasonidos y centrifugación. La preparación microsómica se incubó con un sustrato de ceramida fluorescente (NBD-C6-ceramida), UDP-glucosa, y cantidades crecientes de Hemitartrato de Fórmula (I) (0-1000 nM) durante una hora a temperatura ambiente. Tras la incubación, la glucosilceramida marcada fluorescentemente y la ceramida sin reaccionar se separaron y cuantificaron mediante HPLC de fase inversa y detección de la fluorescencia. En este ensayo, el valor de IC<sub>50</sub> para inhibir la síntesis de glucosilceramida osciló de 20 a 40 nM. Este valor fue similar a los obtenidos anteriormente para GM1 y GM3, y sugiere que las medidas de estos glucolípidos de la superficie celular son buenos sustitutos de la actividad de Hemitartrato de Fórmula (I) para glucosilceramida sintasa.

30

Especificidad de la inhibición de la síntesis del sustrato por Hemitartrato de Fórmula (I). La especificidad de Hemitartrato de Fórmula (I) se evaluó en una serie de ensayos *in vitro* a base de células y libres de células. Las enzimas de glucosidasas intestinales se evaluaron en homogenados de tejidos de rata (véase U. Andersson, et al., Biochem. Pharm. 59 (2000) 821-829), y la enzima desramificadora de glucógeno se evaluó en un ensayo libre de células como se describió (véase U. Andersson, et al., Biochem. Pharm. 67 (2004) 697-705). No se encontró inhibición detectable de glucosidasas intestinales (lactasa, maltasa, sacarasa),  $\alpha$ -glucosidasa I y II, y la enzima desramificadora citosólica ( $\alpha$ -1,6-glucosidasa) a concentraciones de hasta 2500 µM (Tabla 8).

35

40

Se ensayaron glucosilceramidasa no lisosómica y glucocerebrosidasa lisosómica en células humanas intactas usando como sustrato C<sub>6</sub>-NBD-glucosilceramida (véase H.S. Overkleeft, et al. J. Biol. Chem. 273 (1998) 26522-26527). Se usó conuritól β epóxido (un inhibidor específico de glucocerebrosidasa lisosómica) para diferenciar la actividad lisosómica frente a la no lisosómica. La actividad de glucocerebrosidasa también se midió mediante clasificación celular activada por fluorescencia (FACS). Se cultivaron células K562 con cantidades crecientes de Hemitartrato de Fórmula (I) en presencia de 1 µM de 5-(pentafluorobenzoilamino)-fluorescein di-β-D-glucopiranosido (PFB-FDGlu, Molecular Probes/Invitrogen, Carlsbad, CA) durante 30-60 min. Las células se congelaron inmediatamente en hielo, y la fluorescencia se cuantificó como antes. La glucosilceramidasa no lisosómica fue inhibida débilmente con una IC<sub>50</sub> de 1600 µM. No hubo inhibición de glucocerebrosidasa lisosómica, la enzima que es deficiente en la enfermedad de Gaucher, hasta la concentración más elevada de 2500 µM (Tabla 8). Por tanto,

fue necesaria una diferencia de aproximadamente 40.000 en la concentración para inhibir glucosilceramida sintasa en comparación con cualquiera de las otras enzimas ensayadas.

Tabla 8: Actividades bioquímicas de Hemitartrato de Fórmula (I) *in vitro*

Potencia de inhibición del sustrato (IC <sub>50</sub> <i>in vitro</i> ):	~0,024 μM
Especificidades de la enzima, IC <sub>50</sub> :	
α-Glucosidasa I y II:	>2500 μM
glucocerebrosidasa lisosómica (GBA1):	>2500 μM μM
glucosilceramidasa no lisosómica (GBA2):	1600 μM
Enzima desramificadora de glucógeno:	>2500 μM
Especificidades de la enzima, K <sub>i</sub> :	
Inhibición de sacarasa:	Sin inhib. hasta 10 μM
Inhibición de maltasa:	Sin inhib. hasta 10 μM

## 5 Ejemplo 7: Manejo mejorado de niveles de glucosilceramida lisosómica en un modelo de ratón

### A. Enfermedad de Fabry.

Para determinar si el uso combinado de tanto la terapia de sustitución enzimática (ERT) como la terapia de reducción de sustrato (SRT) mantienen la reducción enzimática o proporcionan beneficios adicionales, se compararon las eficacias relativas de las terapias separadas y combinadas en un modelo murino de enfermedad de Fabry (Fabry-Rag). Los ratones con Fabry progenitores se describen en Wang, AM et al. Am. J. Hum. Genet. 59: A208 (1996). El Fabry-Rag se cruza con un ratón RAG-1 y no desarrolla linfocitos maduros o células T (inmunocomprometido).

### Estudios con animales.

Para los estudios de monoterapia, los ratones con Fabry entraron en el estudio al mes de edad (modelo de prevención). Los grupos de tratamiento recibieron Hemitartrato de Fórmula (I) (Genzyme Corp., Cambridge, MA) como componente de la dieta alimentaria en peletes. El fármaco se formuló a 0,15% (p/p) en comida de ratón 5053 estándar (TestDiet, Richmond, IN) y se proporcionó a voluntad. Esta formulación proporcionó 300 mg/kg de Hemitartrato de Fórmula (I) por día en un ratón de 25 g.

Para los estudios de terapia de combinación, ratones Fabry-Rag entraron en el estudio a los 3 meses de edad (modelo de tratamiento). Los ratones en el grupo A recibieron inyecciones intravenosas de alfa-galactosidasa A humana recombinante (Genzyme Corp.), a una dosis de 1 mg/kg cada 2 meses (es decir, a los 3, 5, 7 y 9 meses de edad). El grupo B recibió las mismas dosis intravenosas de enzima más recibieron Hemitartrato de Fórmula (I) (Genzyme Corp., Cambridge, MA) como componente de la dieta alimentaria en peletes. El fármaco se formuló a 0,15% (p/p) en comida de ratón 5053 estándar (TestDiet, Richmond, IN) y se proporcionó a voluntad. Esta formulación proporcionó 300 mg/kg de Hemitartrato de Fórmula (I) por día en un ratón de 25 g. El grupo C recibió inyecciones de enzima cada 4 meses (es decir, a los 3 y 7 meses de edad), y estaba en la misma dieta de fármaco en alimento como en el grupo B. El grupo D recibió sólo la dieta de fármaco en alimento (la misma que los grupos B y C). El grupo E fueron ratones Fabry-Rag sin tratar, y el grupo F fueron controles de tipo salvaje. Véase la FIG 10.

### Cuantificación de niveles de globotriaosilceramida tisular (GL-3, Gb3)

La cuantificación de GL-3 fue mediante espectrometría de masas en tándem, esencialmente igual que para GL-1.

El ensayo de platina caliente se realizó como se describió previamente (Ziegler, RJ et al. Molec. Ther. 15(3), 492-500 (2007)).

### Resultados

#### Monoterapia de ratones con Fabry con Hemitartrato de Fórmula (I)

La SRT se evaluó en un modelo de ratón de enfermedad de Fabry, que está provocada por una deficiencia de actividad de α-galactosidasa A. La terapia con Hemitartrato de Fórmula (I) comenzó con ratones con Fabry de un mes y continuó hasta que los ratones alcanzaron un año de edad. A los animales se les dosificó 300 mg/kg de

Hemitartrato de Fórmula (I) en su dieta cada día. Se llevaron a cabo bimensualmente ensayos de comportamiento (es decir, ensayo de platina caliente) y ensayos bioquímicos (es decir, análisis de orina y análisis de los niveles de GL-3 en tejidos/sangre/orina) de los ratones.

5 Como se muestra en la FIGURA 7, la administración de Hemitartrato de Fórmula (I) a ratones con Fabry-Rag durante un período de 11 meses disminuyó la velocidad de acumulación lisosómica de globotriaosilceramida (GL-3) en los órganos somáticos (hígado, riñón, corazón y bazo) en aproximadamente 50%. Esto se tradujo en un retraso en el progreso de la enfermedad, como se evidencia por una presentación tardía de la insensibilidad a un estímulo caluroso repelente (véase FIGURA 8) y una prevención del deterioro de los factores del análisis de orina, por ejemplo volumen de orina, niveles de creatinina y sodio (véase FIGURA 9). Por tanto, la inhibición mediada por  
10 Hemitartrato de Fórmula (I) de glucosilceramida sintasa, que cataliza la primera etapa en la síntesis de glucoesfingolípidos, no sólo es ventajosa en modelos de animales de enfermedad de Gaucher sino también de la enfermedad de Fabry, y podría también tener efectos positivos en otras glucoesfingolipidosis.

Terapia de combinación de ratones con Fabry con  $\alpha$ -galactosidasa A y Hemitartrato de Fórmula (I)

15 Se evaluó la eficacia de la ERT sola y en combinación con SRT usando Hemitartrato de Fórmula (I) en cinco poblaciones de ratones con Fabry-Rag (n = 12/grupo). Comenzando a los tres meses de edad, los ratones se sometieron a un programa de ensayos de comportamiento (es decir, ensayo de platina caliente) y ensayos bioquímicos (es decir, análisis de los niveles de GL-3 en tejidos/sangre/orina), como se muestra en la FIGURA 10. En ratones sometidos a ERT, se administraron dosis de 1 mg/kg de  $\alpha$ -galactosidasa A en el programa como se muestra en la FIGURA 10. En ratones sometidos a SRT, se administraron diariamente en la dieta de los ratones  
20 dosis de 300 mg/kg de Hemitartrato de Fórmula (I).

Como se muestra en la FIGURA 11, ERT reduce los niveles de GL-3 en sangre en ratones con Fabry-Rag, mientras que SRT no lo hace. Como se muestra en la FIGURA 12, la combinación ERT/SRT es más eficaz reduciendo los niveles de GL-3 en el hígado y riñón de ratones con Fabry-Rag.

25 Como se muestra en la FIGURA 13, SRT reduce los niveles de GL-3 en orina en ratones con Fabry-Rag, mientras que ERT no lo hace. Como se muestra en la FIGURA 14, SRT, pero no ERT, retrasa el comienzo de la insensibilidad al calor en ratones con Fabry-Rag.

30 En resumen, los ratones con Fabry-Rag tratados con una combinación de Fabrazyme y Hemitartrato de Fórmula (I) mostraron mejoras en los marcadores de la enfermedad con respecto a ERT o SRT solas en un modelo de tratamiento de las siguientes maneras: acumulación significativamente reducida de GL-3 en hígado y riñón con la terapia de combinación; GL-3 en orina mejorada en los grupos de SRT; GL-3 en sangre mejorada en grupos de ERT; y neuropatía periférica retrasada en grupos de SRT.

35 B. Enfermedad de Gaucher. Para determinar si el uso secuencial tanto de la terapia de sustitución enzimática (ERT) como de la terapia de reducción de sustrato (SRT) puede proporcionar beneficios adicionales, se compararon las eficacias relativas de las terapias separadas y secuenciales en un modelo murino de enfermedad de Gaucher (D409V/null).

#### Métodos

40 Estudios con animales. Los procedimientos que implican animales se revisaron y aprobaron por el Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC) en Genzyme Corporation siguiendo las directrices expedidas por la Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care (AAALAC). El ratón con Gaucher (D409V/null) es un modelo de enfermedad de Gaucher tipo 1 que muestra acumulación de glucosilceramida en hígado, bazo y pulmones, pero carece de patología ósea o cerebral (véase Y-H. Xu, et al., Am. J. Pathol. 163, 2003, 2093-2101). Los animales de ambos sexos entraron en el estudio a los 3 meses de edad ya que experimentos previos habían indicado que no había ninguna diferencia en la respuesta entre machos y hembras a glucocerebrosidasa recombinante o Hemitartrato de Fórmula (I). El estudio tuvo 6 grupos de ratones, sacrificándose el grupo A después de 2 semanas para proporcionar niveles de línea base de glucosilceramida tisular. Los grupos B, C y D recibieron todos ellos glucocerebrosidasa humana recombinante (Genzyme Corp., Cambridge, MA) (10 mg/kg) intravenosamente vía la vena de la cola (100  $\mu$ l) cada 2 días durante un total de 8 inyecciones. El grupo B se sacrificó al final de este régimen (al mismo tiempo que el grupo A), para proporcionar niveles de glucosilceramida tisular reducidos por la enzima. Los dos grupos D y E se alimentaron con Hemitartrato de Fórmula (I) (Genzyme Corp., Cambridge, MA) como componente de la dieta alimentaria en peletes. El fármaco se formuló a 0,075% (p/p) en comida de ratones 5053 estándar (TestDiet, Richmond, IN), y se proporcionó a voluntad. Esta formulación proporcionó 150 mg/kg de Hemitartrato de Fórmula (I) por día en un ratón de 25 g. El grupo F no recibió tratamiento, y se sacrificó junto con los grupos C, D y E 12 semanas después del comienzo del estudio. El consumo de alimento y los pesos de los ratones se monitorizaron tres veces por semana para determinar la ingesta de fármaco y el  
55 impacto potencial del fármaco sobre la salud global. Los animales se sacrificaron mediante inhalación de dióxido de carbono, y sus tejidos se recogieron inmediatamente. La mitad de cada tejido se congeló instantáneamente en hielo seco y se almacenó a -80°C hasta que estuviese listo para el procesamiento posterior. La otra mitad se procesó para el análisis histológico.

5 Cuantificación de niveles tisulares de glucosilceramida. Los niveles de glucosilceramida se cuantificaron mediante espectrometría de masas como se describió previamente (véanse K. McEachern, et al., J. Gene. Med. 8 (2006) 719-729; T. Doering, J. Biol. Chem. 274 (1999) 11038-11045). Una masa conocida de tejido se homogeneizó en cloroformo:metanol 2:1 (v/v) y se incubó a 37°C durante 15 min. Las muestras se centrifugaron, y los sobrenadantes se extrajeron con 0,2 volúmenes de agua toda la noche a 4°C. Las muestras se centrifugaron, la fase acuosa se desechó, y la fase orgánica se secó hasta una película en nitrógeno. Para el análisis mediante espectrometría de masas por ionización mediante electropulverización (ESI/MS), las muestras tisulares se reconstituyeron hasta el equivalente de 50 ng de peso de tejido original en 1 ml de cloroformo:metanol (2:1, v/v), y se sometieron a vórtice durante 5 min. Se suministraron alícuotas (40 µl) de cada muestra a viales de recuperación total de Waters, y se añadieron 50 µl de un patrón interno d3-C16-GL-1 10 µg/ml (Matreya, Inc., Pleasant Gap, PA). Las muestras se secaron en nitrógeno y se reconstituyeron con 200 µl de DMSO:metanol 1:4 (v/v). El análisis mediante ESI/MS de las glucosilceramidas de diferentes longitudes de cadena de carbono se llevó a cabo en una HPLC Waters alliance (Separation Module 2695) acoplada a un sistema Micromass Quattro Micro equipado con una fuente de ion por electropulverización. Se inyectaron muestras de extractos de lípidos (20 µl) en una columna C8 (4 ml x 3 mm i.d.; Phenomenex, Torrance, CA) a 45°C y se eluyeron con un gradiente de 50 a 100% de acetonitrilo (2 mM de acetato de amonio, ácido fórmico al 0,1%) a 0,5 ml/min. Los primeros 0,5 min. se mantuvieron a 50% de orgánico y después se cambió rápidamente a 100% durante los 3,5 min. finales. La temperatura de la fuente se mantuvo constante a 150°C, y se usó nitrógeno como el gas de desolvatación, a un caudal de 670 l/h. El voltaje del capilar se mantuvo a 3,80 KV, con un voltaje de cono de 23 V, mientras que el tiempo de residencia para cada especie iónica fue 100 ms. Los espectros se adquirieron mediante el modo MRM para monitorizar ocho isoformas dominantes (C16:0, C18:0, C20:0, C22:1, C22:0, C22:1-OH, C24:1, y C24:0). La cuantificación de glucosilceramida se basó en la suma de estas ocho isoformas con respecto al patrón interno, oscilando la curva de calibración desde 0,1 a 10 µg/ml.

25 Histología. Para el análisis histológico, los tejidos se fijaron en formalina de cinc (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA) a temperatura ambiente durante 24 h, después se almacenaron en PBS a 4°C hasta que estuvieron listos para el procesamiento posterior. Todas las muestras se deshidrataron en etanol, se aclararon en xilenos, se infiltraron y se embebieron en parafina Surgipath R (Surgipath, Richmond, IL). Se cortaron secciones de cinco micrómetros usando un microtomo giratorio, y se secaron en un horno a 60°C antes de la tinción. Las secciones se desparafinaron en Hemo-De (Scientific Safety Solvents, Keller, TX) y se rehidrataron en concentraciones descendentes de etanol, seguido de un lavado con PBS. Las secciones se tiñeron con Hematoxilina y Eosina (H&E) y se marcaron usando anticuerpo monoclonal anti-CD68 de ratón de rata (Serotec, Raleigh, NC), para identificar macrófagos. Tras lavar durante 5 min. en PBS, los portaobjetos se deshidrataron en etanol y se aclararon en Hemo-De antes de montar con medio de montaje de cubreobjetos SHUR/Mount™ (TBS, Durham, NC). El porcentaje de área de inmunopositividad de CD68 en el hígado se cuantificó usando análisis MetaMorph (MDS Analytical Technologies, Toronto, Canadá) de diez imágenes 400X por sección tisular. Un patólogo veterinario certificado de un panel examinador, que no conocía la designación de los grupos, examinó todas las secciones.

#### Resultados

35 Régimen de dosificación de glucocerebrosidasa para la reducción de GL1 acumulada en el hígado, bazo y pulmón de ratones con Gaucher de 3 meses. Para investigar las ventajas relativas de la combinación y de la monoterapia con terapia enzimática o de reducción de sustrato, se determinó en primer lugar el régimen enzimático que agotó de forma máxima los niveles de GL1 en los órganos viscerales de ratones con Gaucher. A ratones con Gaucher (D409V/null) de tres meses se les administraron intravenosamente 2, 4 u 8 dosis de glucocerebrosidasa humana recombinante 10 mg/kg. Los ratones que se trataron con 2 o 4 dosis de la enzima recibieron infusiones de fármaco cada 3 días, mientras que aquellos que se trataron con 8 dosis recibieron la enzima cada 2 días. El uso de un intervalo de tiempo más corto entre infusiones en animales que recibieron 8 tratamientos se diseñó para minimizar el impacto potencial de cualquier respuesta inmunitaria a la enzima humana administrada. Los animales se sacrificaron 7 días después de la última infusión de enzima, y se midió la cantidad de GL1 que queda en sus hígados, bazos y pulmones.

50 El tratamiento con 2 dosis de glucocerebrosidasa redujo los niveles de GL1 en el hígado en un 50%. El incremento del número de infusiones de enzima hasta 4 u 8, como se esperaba, redujo los niveles de GL1 del hígado en un grado mayor (aproximadamente 75%). La reducción menor del total de los niveles de GL1, incluso con 8 dosis, es consistente con la experiencia en sujetos con Gaucher que muestran que la hepatoesplenomegalia se reduce sólo después de un período prolongado de tratamiento (véase G.A. Grabowski, et al., Ann. Int. Med. 122 (1995) 33-39). Los niveles de sustrato en los bazos de ratones con Gaucher fueron más refractarios al tratamiento enzimático. La administración de 2 dosis de glucocerebrosidasa no alteró significativamente los niveles de GL1 con respecto a aquellos observados en los controles no tratados. El incremento del número de infusiones de enzima hasta 4 u 8 redujo los niveles esplénicos de GL1 en alrededor de 50%. En el pulmón, se observó una reducción hasta aproximadamente 60% del control no tratado después de 8 dosis. El grado ligeramente menor de reducción del sustrato en el pulmón fue probablemente debido a una accesibilidad más pobre de la enzima infundida a los macrófagos alveolares llenos de lípidos. La observación del mayor aclaramiento de GL1 en el hígado cuando se compara con el bazo y el pulmón refleja probablemente la biodistribución de la enzima tras la infusión sistémica (véase S.M. Van Patten, et al. Glycobiology 17 (2007) 467-478). En base a estos resultados, el régimen de tratamiento que consiste en 8 dosis consecutivas de glucocerebrosidasa 10 mg/kg, administrada a intervalos de 2

días, se usó para los estudios subsiguientes.

Capacidades relativas de la terapia enzimática y de reducción del sustrato para reducir los niveles de GL1 en el hígado de ratones con Gaucher. Cohortes de ratones con Gaucher de 3 meses se trataron con glucocerebrosidasa recombinante o con Hemitartrato de Fórmula (I), separada o secuencialmente. A los ratones en los grupos B, C y D se les administraron 8 dosis de enzima como se describe anteriormente (durante un período de 2 semanas) para aclarar GL1 acumulada. Los diferentes grupos se alimentaron entonces con comida normal o con comida que contiene Hemitartrato de Fórmula (I) (150 mg/kg/día) durante 10 semanas adicionales, recibiendo el grupo F ningún tratamiento y sirviendo como el control no sometido a tratamiento previo. Independientemente de la formulación de la comida, los ratones comieron cantidades comparables de alimento, y no hubo diferencias discernibles en la ganancia de peso. Aproximadamente 80% de los niveles de GL1 almacenados se aclararon del hígado después de 2 semanas de terapia enzimática sola. Cuando a estos animales se les dejó progresar sin tratamiento adicional durante 10 semanas, sus niveles hepáticos de GL1 aumentaron, indicando que se había producido reacomulación del sustrato durante el intervalo (Figura 2, columna C). Estos niveles no fueron significativamente diferentes de aquellos de los controles no tratados (Figura 2, columna F). Sin embargo, si los ratones se trataron con enzima y después con Hemitartrato de Fórmula (I) en su alimento durante un período de 10 semanas, sus niveles hepáticos de GL1 fueron significativamente más bajos que los controles no tratados (Figura 2, columna D y F). Este resultado sugiere que el tratamiento adicional con Hemitartrato de Fórmula (I) había ralentizado la reacomulación del sustrato. De forma interesante, los ratones con Gaucher tratados con Hemitartrato de Fórmula (I) solo durante todo el período de estudio (12 semanas) también mostraron niveles más bajos de GL-1 (Figura 2, columna E) cuando se compararon con controles no tratados de edad parecida (Figura 2, columna F), aunque la diferencia no fue significativa. La capacidad de SRT sola para reducir los niveles de GL1 en este modelo de animal es consistente con nuestro informe previo (véase K.A. McEachem, et al., *Mol. Genet. Metab.* 91 (2007) 259-267) y refleja probablemente el hecho de que los ratones con Gaucher (D409V/null) retienen actividad enzimática residual (véase Y-H. Xu, et al., *Am. J. Pathol.* 163, 2003, 2093-2101).

Capacidades relativas de la terapia enzimática y de reducción del sustrato para disminuir los niveles de GL1 en el bazo de ratones con Gaucher. El tratamiento de ratones con Gaucher de 3 meses con glucocerebrosidasa recombinante sola durante 2 semanas redujo los niveles esplénicos de GL1 en aproximadamente 60% (Figura 3, columna B). Cuando estos animales se les dejó envejecer durante 10 semanas adicionales sin intervención adicional, los niveles del sustrato volvieron a aquellos observados al comienzo del estudio (Figura 3, columna C) y no fueron significativamente diferentes del control no tratado (Figura 3, columna F). Esto sugiere que la velocidad de reacomulación de GL1 en el bazo fue mayor que en el hígado. Esta suposición también está apoyada por la observación de mayores niveles basales del sustrato en el bazo (~1500 mg/g de tejido; Figura 2, columna A) que en el hígado (~ 500 mg/g de tejido; Figura 3, columna A). Los animales que habían sido tratados con enzima y después con Hemitartrato de Fórmula (I) durante las siguientes 10 semanas mostraron la reducción más grande en niveles esplénicos de GL1 (Figura 3, columna D), y estos fueron significativamente menores que aquellos en los bazos de los controles no tratados (Figura 3, columna F). Esto indicó que el uso de SRT no sólo retrasó la acumulación de sustrato sino que también actuó para reducir adicionalmente la carga de almacenamiento en este órgano. Parecería que al menos en este caso, el efecto neto de enzima endógena residual y reducción de sustrato condujo a una disminución adicional en los niveles de sustrato globales. La observación de niveles esplénicos de GL1 en los ratones tratados con Hemitartrato de Fórmula (I) solo durante 12 semanas (Figura 3, columna E) menores que en los controles no tratados (Figura 3, columna F) es consistente con esta noción, aunque la diferencia no fue significativa. Por tanto, en pacientes con Gaucher tipo 1 leve con actividad enzimática residual elevada, el tratamiento con ERT seguido de SRT podría acelerar potencialmente la velocidad e incluso quizá el grado de aclaramiento del sustrato ofensivo.

Capacidades relativas de la terapia enzimática y de reducción del sustrato para reducir los niveles de GL1 en el pulmón de ratones con Gaucher. Como se señaló anteriormente, los niveles pulmonares de GL1 se aclararon de forma mucho menos eficaz mediante administración intravenosa de glucocerebrosidasa recombinante. El tratamiento de ratones con Gaucher de 3 meses con enzima durante 2 semanas dio como resultado solamente una reducción del 30% en los niveles de sustrato en el pulmón (Figura 4, columna B). La cohorte de animales alimentados con comida normal durante las siguientes 10 semanas subsiguientes mostró, como se esperaba, reacomulación de GL1, y no fueron significativamente diferentes de los niveles no tratados (Figura 4, columna C y F). Por el contrario, los animales alimentados con comida que contiene Hemitartrato de Fórmula (I) durante el mismo intervalo mostraron una reducción en los niveles de sustrato hasta por debajo de aquellos a los que se les administró enzima sola (Figura 4, columna D), y fueron significativamente menores que aquellos en los controles no tratados (Figura 4, columna F). Nuevamente, esto sugiere que en el pulmón, como en el bazo, el efecto neto de Hemitartrato de Fórmula (I) (en presencia de actividad enzimática endógena residual) no sólo retrasó la reacomulación de GL1 sino que también actuó para reducirlos adicionalmente hasta por debajo de los niveles de partida. Al igual que con los otros órganos viscerales, el tratamiento mediante Hemitartrato de Fórmula (I) solo fue eficaz reduciendo los niveles pulmonares de GL1 (Figura 4, columna E) cuando se compara con controles no tratados (Figura 4, columna F).

Análisis histopatológico del hígado de ratones con Gaucher después del tratamiento enzimático y de reducción de sustrato. Para visualizar los efectos de los diferentes regímenes terapéuticos en el hígado, se tñeron secciones

5 tisulares para CD68, un marcador de macrófagos. El análisis de las secciones hepáticas de ratones con Gaucher de 3 meses no tratados mostró la presencia de grandes números de células de Gaucher CD68-positivas, hinchadas de lípidos, que permanecieron en su gran mayoría sin cambios cuando se analizaron 12 semanas más tarde. Consistente con los datos bioquímicos anteriores, los hígados de animales a los que se les administró glucocerebrosidasa recombinante durante un período de 2 semanas mostraron aclaramiento sustancial del lípido en estos macrófagos anormales. Si a estos animales se les deja envejecer unas 10 semanas adicionales sin tratamiento posterior, había signos de reacumulación de GL1, según se indica mediante la reemergencia de células de Gaucher. Sin embargo, este incremento en células de Gaucher se anuló si a los ratones se les administraba terapia de reducción de sustrato con Hemitartrato de Fórmula (I) durante el mismo intervalo. Como se señala previamente, los ratones con Gaucher que recibieron Hemitartrato de Fórmula (I) solo también mostraron acumulación reducida del sustrato, aunque no en el mismo grado que aquellos que recibieron una combinación de ERT y SRT. El grado de tinción CD68-positiva en las diversas secciones también se cuantificó usando software MetaMorph (Figura 18). El grado de tinción en estas secciones reflejó las cantidades de niveles hepáticos de GL1 determinados bioquímicamente (Figura 15), apoyando adicionalmente las sugerencias sobre las ventajas relativas de los diferentes regímenes de tratamiento.

### Ejemplo 8: Eficacia de Hemitartrato de Fórmula (I) en un modelo de ratón de enfermedad de Gaucher

20 Estudios con animales. Los procedimientos que implican animales se revisaron y se aprobaron por un Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC) siguiendo las directrices estatales y federales de la Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care (AAALAC). Los ratones *gba*<sup>D409vnull</sup> con Gaucher (véase Y.-H. Xu. et al., Am. J. Pathol. 163 (2003) 2093-2101) se dejaron envejecer según los requisitos del estudio. No se ha encontrado diferencia en fenotipo o respuesta a Hemitartrato de Fórmula (I) entre machos y hembras, de manera que se usaron ambos sexos en los estudios. El suministro de Hemitartrato de Fórmula (I) fue mediante una única sonda oral diaria a un volumen de 10 ml/kg. Los animales se aclimataron a la sonda oral con un volumen similar de agua durante una semana antes del inicio del tratamiento. El Hemitartrato de Fórmula (I) se disolvió en agua para inyección (WFI; VWR, West Chester, PA) y se administró en una escala de dosis desde 75 mg/kg/día hasta 150 mg/kg/día durante el transcurso de nueve días, con tres días en cada dosis e incrementos de 25 mg/kg/día. Los ratones se pesaron tres veces por semana para monitorizar el impacto potencial del fármaco sobre su salud general. Los animales se sacrificaron mediante inhalación de dióxido de carbono, y sus tejidos se recogieron inmediatamente. La mitad de cada tejido se congeló instantáneamente en hielo seco y se almacenó a -80°C hasta que estuvo listo para el procesamiento posterior. La otra mitad se recogió para el análisis histológico.

35 Cuantificación de niveles tisulares de glucosilceramida mediante cromatografía de capa fina de altas prestaciones. El análisis mediante cromatografía de capa fina de altas prestaciones (HP-TLC) fue como se describió (A. Abe, et al., J. Clin. Inv. 105 (2000) 1563-1571; H. Zhao, et al. Diabetes 56 (2007) 1341-1349; y S.P.F. Miller, et al. J. Lab. Clin. Med. 127 (1996) 353-358). De forma breve, una fracción lipídica total se obtuvo homogeneizando tejido en PBS frío, extrayendo con cloroformo:metanol 2:1 (v/v) y sometiendo a ultrasonidos en un sonicador de baño de agua. Las muestras se centrifugaron para separar las fases, y se recuperó el sobrenadante. Los peletes se volvieron a tratar con ultrasonidos en cloroformo:metanol:disolución salina, se centrifugaron, y el segundo sobrenadante resultante se recogió y se combinó con el primero. Se añadió una mezcla de cloroformo:disolución salina 1:1 (v/v) a los sobrenadantes combinados, se sometió a vórtice, y se centrifugó. Después de desechar la capa acuosa superior, se añadió metanol:disolución salina, se sometió a vórtice y se volvió a centrifugar. La fase orgánica se recogió y se secó en nitrógeno, se disolvió en cloroformo:metanol 2:1 (v/v) a 1 ml por 0,1 g de peso de tejido original, y se almacenó a -20°C.

45 Una porción del extracto lipídico se usó para medir fosfato total (véase B.N. Ames, Methods Enzymol. 8 (1966) 115-118), es decir, el contenido de fosfolípidos a usar como patrón interno. El resto sufrió metanolisis alcalina para eliminar fosfolípidos que migran con glucosilceramida en la placa de HP-TLC. Alícuotas de los extractos que contienen cantidades equivalentes del fosfato total se mancharon sobre una placa de HP-TLC junto con patrones de glucosilceramida conocidos (Matreya inc. Pleasant Gap, PA). Los lípidos se resolvieron y se visualizaron con acetato cúprico monohidratado al 3% (p/v). Ácido fosfórico al 15% (v/v) seguido de la cocción durante 10 min. a 150°C. Las bandas de lípidos se escanearon en un densitómetro (GS-700, Bio-Rad, Hercules, CA) y se analizaron mediante software Quantity One (Bio-Rad).

55 Cuantificación de niveles tisulares de glucosilceramida mediante espectrometría de masas. La glucosilceramida se cuantificó mediante espectrometría de masas como se describió. (Véanse K. McEachern, et al. J. Gene Med. 8 (2006) 719-729; T. Doering, et al., J. Biol. Chem. 274 (1999) 11038-11045). El tejido se homogeneizó en cloroformo:metanol 2:1 (v/v) y se incubó a 37°C. Las muestras se centrifugaron, y los sobrenadantes se extrajeron con 0,2 volúmenes de agua toda la noche. Las muestras se centrifugaron nuevamente, la fase acuosa se desechó, y la fase orgánica se secó hasta una película en nitrógeno.

60 Para el análisis de espectrometría de masas mediante ionización por electropulverización (ESI/MS), las muestras tisulares se reconstituyeron hasta el equivalente de 50 ng de peso de tejido original en 1 ml de cloroformo/metanol (2:1, v/v), y se sometieron a vórtice durante 5 min. Alícuotas de cada muestra (40 µl) se suministraron a viales de recuperación total de Waters, y se añadieron 50 µl de un patrón interno d3-C16-GL-1 10 µg/ml (Matreya, Inc., Pleasant Gap, PA). Las muestras se secaron en nitrógeno y se reconstituyeron con 200 µl de DMSO:metanol 1:4. El



análisis mediante ESI/MS de las glucosilceramidas de diferentes longitudes de cadena de carbono se llevó a cabo en una HPLC Waters alliance (Separation Module 2695) acoplada a un sistema Micromass Quattro Micro equipado con una fuente de ion por electropulverización. Se inyectaron veinte microlitros de muestras de extracto lipídico en una columna C8 (4 ml x 3 mm i.d.; Phenomenex, Torrance, CA) a 45°C y se eluyeron con un gradiente de 50-100% de acetonitrilo (2 mM de acetato de amonio, ácido fórmico al 0,1%) a 0,5 ml/min. Los primeros 0,5 min. se mantuvieron a 50% de orgánico, y después se cambió rápidamente a 100% durante los 3,5 min. finales. La temperatura de la fuente se mantuvo constante a 150°C, y se usó nitrógeno como el gas de desolvatación, a un caudal de 670 l/h. El voltaje del capilar se mantuvo a 3,80 KV, con un voltaje de cono de 23 V, mientras que el tiempo de residencia para cada especie iónica fue 100 ms. Los espectros se adquirieron mediante el modo MRM para monitorizar ocho isoformas dominantes (C16:0, C18:0, C20:0, C22:1, C22:0, C22:1-OH, C24:1, y C24:0). La cuantificación de glucosilceramida se basó en la suma de estas ocho isoformas respecto al patrón interno, con un intervalo de la curva de calibración desde 0,1 hasta 10 µg/ml.

Histología. Para el análisis histológico, los tejidos se fijaron en formalina de cinc (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA) a temperatura ambiente durante 24 h, después se almacenaron en PBS a 4°C hasta que estuvieron listos para el procesamiento posterior. Todas las muestras se deshidrataron en concentraciones ascendentes de alcohol, se aclararon en xilenos y se infiltraron y embebieron en parafina Surgipath R (Surgipath, Richmond, IL). Se cortaron secciones de cinco micrómetros usando un microtomo giratorio, y se secaron en un horno a 60°C antes de la tinción. Las secciones se desparafinaron en xilenos, y se rehidrataron en concentraciones descendentes de alcohol, seguido de un lavado con agua. Después de un aclarado de 1 min. en ácido acético al 3%, los portaobjetos se tiñeron durante 40 min. en 1% de Alcian Blue 8GX (Electron Microscopy Sciences) en ácido acético al 3%, pH 2,0. Después de aclarar en agua y oxidar en ácido peryódico al 1% durante 1 min., los portaobjetos se tiñeron con reactivo de Schiff (Surgipath) durante 12 min. Después de lavar durante 5 min. en agua caliente, los portaobjetos se deshidrataron en alcohol y se aclararon en xilenos antes de montarlos con medio de montaje de cubreobjetos SHUR/Mount™ (TBS, Durham, NC). Las células de Gaucher identificadas morfológicamente en el hígado se cuantificaron usando un recuento celular manual por 10 campos de alta potencia (HPFs, 400x).

#### Resultados

Efecto de la administración de Hemitartrato de Fórmula (I) a ratones D409V/null. Se evaluó el efecto de la administración de Hemitartrato de Fórmula (I) a ratones D409V/null. A ratones de aproximadamente 7 meses se les administró 150 mg/kg/día de Hemitartrato de Fórmula (I) (una dosis que en los estudios preliminares mostró ser eficaz inhibiendo glucosilceramida sintasa) mediante sonda oral durante 10 semanas. Este tratamiento no tuvo efectos notables sobre el bienestar o hábitos alimentarios de los ratones. Las medidas de su peso corporal durante el estudio no mostraron desviación significativa de aquellas de los ratones no tratados, sugiriendo que el Hemitartrato de Fórmula (I) fue bien tolerado a una dosis que mostró ser eficaz inhibiendo la sintasa.

Eficacia de Hemitartrato de Fórmula (I) a la hora de tratar ratones con Gaucher jóvenes presintomáticos. Se evaluó el Hemitartrato de Fórmula (I) para determinar la reducción de la acumulación lisosómica de glucosilceramida y la aparición de células de Gaucher en ratón D409V/null joven (10 semanas). Estos ratones con Gaucher jóvenes muestran niveles bajos de GL-1 en los tejidos afectados. A animales de diez semanas se les administró 75 o 150 mg/kg/día de Hemitartrato de Fórmula (I) mediante sonda oral durante 10 semanas. La medida de los niveles de glucosilceramida mostró una reducción dependiente de la dosis cuando se compara con controles tratados con vehículo de edad parecida. En la cohorte que había sido tratada con 150 mg/kg/día, los niveles de glucosilceramida fueron 60, 40 y 75% de aquellos en los controles, en el hígado, pulmón y bazo, respectivamente (FIG. 6). Los niveles estadística y significativamente menores de glucosilceramida observados en el hígado y pulmón de ratones D409V/null tratados indicaron que Hemitartrato de Fórmula (I) fue eficaz reduciendo la acumulación de este glucoesfingolípido en estos tejidos.

La evaluación histopatológica de los hígados de ratones D409V/null no tratados al final del estudio (20 semanas) mostró la presencia de células de Gaucher por todo el hígado. Los ratones tratados con 150 mg/kg/día de Hemitartrato de Fórmula (I) durante 10 semanas mostraron solamente la presencia ocasional de células de Gaucher que también tuvieron invariablemente un menor tamaño. La cuantificación de estas células en un número de diferentes secciones confirmó que la frecuencia de células de Gaucher fue significativamente menor en los ratones tratados con Hemitartrato de Fórmula (I). Juntos, estos hallazgos bioquímicos e histológicos sugieren que la administración oral diaria de Hemitartrato de Fórmula (I) a ratones con Gaucher presintomáticos fue eficaz a la hora de disminuir la acumulación de glucosilceramida en los tejidos afectados y la formación consiguiente de células de Gaucher en el hígado.

Eficacia de Hemitartrato de Fórmula (I) en el tratamiento de ratones con Gaucher más viejos con patología preexistente. También se evaluó la eficacia de Hemitartrato de Fórmula (I) a la hora de detener o invertir la progresión de la enfermedad en ratones con Gaucher sintomáticos más viejos. A ratones D409V/null de siete meses se les administró 150 mg/kg/día de Hemitartrato de Fórmula (I) mediante sonda oral durante 10 semanas. Los análisis de los niveles de glucosilceramida en el hígado, pulmón y bazo de ratones tratados a 5 y 10 semanas después del tratamiento mostraron que no habían aumentado más allá de aquellos observados al comienzo del estudio. Después de 10 semanas de tratamiento, se determinó que los niveles de glucosilceramida eran 60% más bajos en el hígado, 50% más bajos en el pulmón y 40% más bajos en el bazo que en ratones tratados con el

vehículo. Estos resultados mostraron que Hemitartrato de Fórmula (I) fue eficaz inhibiendo la acumulación adicional de glucosilceramida en ratones con una carga existente de patología de almacenamiento.

El análisis histopatológico de secciones tisulares mostró un número reducido de células de Gaucher en el hígado de ratones D409V/null tratados, cuando se compara con controles no tratados. La cuantificación del número de células de Gaucher corroboró los hallazgos bioquímicos; los ratones D409V/null tratados presentaron recuentos de células de Gaucher que no fueron significativamente diferentes de aquellos al comienzo del tratamiento tanto en los puntos de tiempo de 5 como de 10 semanas. Los números de células de Gaucher en ambos puntos de tiempo fueron significativamente menores que aquellos de ratones D409V/null no tratados. Juntos, estos datos demuestran que Hemitartrato de Fórmula (I) inhibió eficazmente la acumulación adicional de glucosilceramida y el desarrollo de células de Gaucher en animales con patología preexistente.

#### Discusión

El Hemitartrato de Fórmula (I) demostró un grado elevado de especificidad por la enzima glucosilceramida sintasa. Tampoco hubo ninguna inhibición medible de la actividad de glucocerebrosidasa a la dosis eficaz, lo que es un rasgo importante cuando se trata a pacientes con la enfermedad de Gaucher tipo 1, la mayoría de los cuales retienen actividad residual de glucocerebrosidasa. A la dosis eficaz de 150 mg/kg/día, no hubo aspectos gastrointestinales observables, y no hubo diferencia en pesos corporales entre los grupos tratados y los grupos no tratados del control. Las concentraciones séricas a o por encima de la IC<sub>50</sub> (24-40 nM) fueron fácilmente obtenibles con dosis orales que estaban por debajo del nivel tolerado máximo. El Hemitartrato de Fórmula (I) también se metabolizó y aclaró fácilmente: tanto el compuesto progenitor como los metabolitos se aclararon eficazmente en las 24 h, como se muestra en estudios ADME de dosis oral única y repetida con compuesto radiomarcado con <sup>14</sup>C en ratas y perros.

El uso de un régimen de dosificación no optimizado de una sonda oral diaria única evitó con éxito la acumulación de glucosilceramida tanto en ratones presintomáticos jóvenes como en ratones con Gaucher más viejos que ya mostraron patología de almacenamiento. Los ratones jóvenes de 10 semanas, aunque poseen niveles elevados de glucosilceramida con respecto a los controles de tipo salvaje, todavía no habían desarrollado los macrófagos de tejidos hinchados característicos, denominados células de Gaucher. El tratamiento con 150 mg/kg/día de Hemitartrato de Fórmula (I) detuvo toda progresión medible de la enfermedad e inhibió el desarrollo de células de Gaucher. En ratones más viejos que mostraron un nivel mayor de glucosilceramida lisosómica y un número de células de Gaucher, no hubo incremento adicional en los niveles del glucoesfingolípido o en el número de células de almacenamiento después de 5 semanas o 10 semanas de tratamiento. Puesto que se da a conocer que la fuente principal de glucosilceramida en células de Gaucher tiene origen extracelular, estos resultados suponen que la inhibición de glucosilceramida sintasa por Hemitartrato de Fórmula (I) fue sistémica.

La observación de que Hemitartrato de Fórmula (I) fue eficaz previniendo la acumulación adicional de glucosilceramida sugiere una estrategia terapéutica que podría potenciar adicionalmente el tratamiento de la enfermedad de Gaucher.

En resumen, los datos presentados aquí demostraron que Hemitartrato de Fórmula (I) es un inhibidor activo y específico de glucosilceramida sintasa que no muestra efectos adversos abiertos en un modelo de ratón de enfermedad de Gaucher. Evitó con éxito la progresión de la enfermedad tanto en ratones con Gaucher presintomáticos como en ratones con Gaucher enfermos más viejos, al inhibir la acumulación de glucosilceramida y la formación de células de Gaucher. Estos hallazgos sugieren que Hemitartrato de Fórmula (I) puede representar además otra opción terapéutica tanto para enfermedad de Gaucher tipo 1 pediátrica como de adulto, y potencialmente otros trastornos de almacenamiento de glucoesfingolípidos.

#### **Ejemplo 9: Ensayo clínico de fase 2 de Hemitartrato de Fórmula (I)**

Métodos. Este ensayo clínico de Hemitartrato de Fórmula (I), administrado oralmente dos veces al día 50 o 100 mg, trató 26 adultos con enfermedad de Gaucher tipo 1 (GD1) (16M:10H; edad media de 34 años, intervalo 18-60; todos caucásicos) en 7 sitios en 5 países. Los pacientes tenían esplenomegalia (un volumen 10 veces el normal) y trombocitopenia (plaquetas 45.000-100.000/mm<sup>3</sup>) o anemia (hemoglobina 8-10 g/dl, mujeres; 8-11 g/dl, hombres). Ninguno recibió terapia de sustitución enzimática o de reducción de sustrato en los 12 meses previos. El punto final de eficacia primaria compuesta es el nivel de globina (+0,5 g/dl) o el recuento plaquetario (+15%) después de 52 semanas de tratamiento. También se evaluó el volumen hepático, quitotriosidasa, y glucosilceramida. Los pacientes continuaron siendo tratados y monitorizados a largo plazo.

Resultados. Los datos en la semana 52 estuvieron disponibles para un número de hasta 20 pacientes; otros 4 se retiraron prematuramente, y 2 estaban en desarrollo. El punto final primario compuesto fue satisfecho por 19 de los 20 pacientes. Los cambios medios (1SD) con respecto de la línea base a la Semana 52 fueron: hemoglobina +1,6 (11,35) g/dl; recuento plaquetario +43,6% (137,59%); volumen del bazo y del hígado (múltiplos del normal) 40,2% (110,44%) y 15,8% (110,39%), respectivamente; y quitotriosidasa 49,9% (120,75%). Los niveles plasmáticos de glucosilceramida se normalizaron después de 4 semanas en todos los pacientes, el Hemitartrato de Fórmula (I) fue bien tolerado con un perfil de seguridad aceptable. Se han dado a conocer siete sucesos adversos relacionados en 6 pacientes; todos ellos fueron de naturaleza leve y transitoria.

**Ejemplo 10: Composición farmacéutica de Hemitartrato de Fórmula (I), cápsulas de 100 mg**

Método de preparación de cápsulas de 100 mg: Hemitartrato de Fórmula (I), celulosa microcristalina, lactosa monohidratada, e hipromelosa, E15, se hicieron pasar separadamente a través de un tamiz de malla 20. Las cantidades de los ingredientes tamizados indicadas en la Tabla 9 se amasaron en un granulador de alto cizallamiento durante nueve a doce minutos.

5

Tabla 9. formulación farmacéutica para cápsulas de 100 mg

Ingrediente	Cantidad unitaria		
	Cápsula de cantidad unitaria de 100 mg (mg)	% por dosis unitaria (% p/p)	Tamaño nominal del lote: 71.000 Cápsulas Cantidad total 19,2 kg
Hemitartrato de Fórmula (I)	100,0	37,0	7,1
Celulosa microcristalina	45,0	16,7	3,2
Monohidrato de lactosa	111,5	41,3	7,9
Hipromelosa, E15	10,8	4,0	0,8
Behenato de glicerilo	2,7	1,0	0,2
Peso lleno (mg)	270		248-292 mg
composición % Total		100,0	19,2 kg

Los ingredientes se granularon entonces en húmedo mediante la adición de agua purificada (2,2 kg; 11,7% de peso de ingredientes secos) al bol del granulador hasta su terminación, según se confirmó visualmente. La granulación húmeda se descargó del bol y se hizo pasar a través de un molino tamizador con rueda de paletas giratorias. La granulación húmeda se secó entonces en un horno seco de bandeja, de lecho, sólido, estático, con calefacción directa, a  $50 \pm 5^\circ\text{C}$  para humedecer el contenido no más de 3,5%, según se confirmó mediante comprobación en el proceso. Los gránulos secos se hicieron pasar entonces a través de un molino tamizador, y los gránulos tamizados se transfirieron a una amasadora en V. Se añadió behenato de glicerilo (0,2 kg) a la amasadora en V, y la mezcla final se mezcló hasta que la mezcla fue uniforme, según se determina mediante un ensayo de uniformidad de mezcla en línea y fuera de línea, típicamente durante diez a veinte minutos. La mezcla final se encapsuló entonces en una cápsula de tamaño #2, usando un recargador de cápsulas semiautomático hasta el peso de llenado apropiado (270 mg de media), y las cápsulas rellenas se desempolvieron antes del envasado.

10

15

**Ejemplo 11A: Composición farmacéutica de Hemitartrato de Fórmula (I), cápsulas de 10 mg**

Método de preparación de cápsulas de 10 mg: Se siguió el procedimiento del Ejemplo 10 hasta la etapa de encapsulamiento. Para producir una cápsula de 10 mg, la mezcla final se encapsuló en una cápsula de tamaño #4 o #5 usando una máquina de relleno de cápsulas hasta el peso de llenado apropiado (27 mg de media), y las cápsulas llenas se desempolvieron antes del envasado.

20

**Ejemplo 11B: Composición farmacéutica de Hemitartrato de Fórmula (I), cápsulas de 50 mg**

Método de preparación de cápsulas de 50 mg: Se siguió el procedimiento del Ejemplo 10 hasta la etapa de encapsulamiento. Para producir una cápsula de 50 mg, la mezcla final se encapsuló en una cápsula de tamaño #3 usando una máquina de relleno de cápsulas hasta el peso de llenado apropiado (135 mg de media), y las cápsulas llenas se desempolvieron antes del envasado.

25

**Ejemplo 11C: Composición farmacéutica de Hemitartrato de Fórmula (I), cápsulas de 150 mg**

Método de preparación de cápsulas de 150 mg: Se siguió el procedimiento del Ejemplo 10 hasta la etapa de encapsulamiento. Para producir una cápsula de 150 mg, la mezcla final se encapsuló en una cápsula de tamaño #0 usando una máquina de relleno de cápsulas hasta el peso de llenado apropiado (405 mg de media), y las cápsulas llenas se desempolvieron antes del envasado.

30

**Ejemplo 12: Composición farmacéutica de Hemitartrato de Fórmula (I), cápsulas de 25 mg**

Método de preparación de cápsulas de 25 mg: Se siguió el procedimiento del Ejemplo 10 hasta la etapa de

35

encapsulamiento. Para producir una cápsula de 25 mg, la mezcla final se encapsuló en una cápsula de tamaño #4 usando una máquina de relleno de cápsulas hasta el peso de llenado apropiado (67,5 mg de media), y las cápsulas llenas se despolvoraron antes del envasado.

#### Ejemplo 13: Interacciones del fármaco Hemitartrato de Fórmula (I) – inhibidores de CYP2D6

5 Se llevó a cabo un estudio para evaluar la farmacocinética, seguridad y tolerabilidad de múltiples dosis orales de Hemitartrato de Fórmula (I) (100 mg, dos veces al día) administradas con y sin paroxetina (30 mg, una vez al día), un potente inhibidor de CYP2D6. Esto fue un estudio de secuencia fija, de etiqueta abierta, en 36 sujetos sanos (17 hombres y 19 mujeres). Los objetivos secundarios fueron evaluar la PK de paroxetina en combinación con múltiples dosis de Hemitartrato de Fórmula (I) (100 mg, dos veces al día) en sujetos sanos, y evaluar además la PK de Hemitartrato de Fórmula (I) tras la administración de múltiples dosis en comparación con una única dosis de Hemitartrato de Fórmula (I).

15 Los parámetros medios de PK de la base libre de Hemitartrato de Fórmula (I) como existe en el plasma fueron no lineales, y mostraron una acumulación de 2 veces en AUC y  $C_{max}$  con la administración repetida (100 mg, dos veces al día) en comparación con la administración de una única dosis. La administración concomitante de Hemitartrato de Fórmula (I) y paroxetina dio como resultado un incremento de 7 veces en  $C_{max}$  y un incremento de 9 veces en AUC, en comparación con la administración de múltiples dosis de Hemitartrato de Fórmula (I) solo. Estos resultados indican que paroxetina puede inhibir el metabolismo de Hemitartrato de Fórmula (I) e incrementar las concentraciones plasmáticas sanguíneas del fármaco. Serían de esperar efectos similares con otros potentes inhibidores de CYP2D6 (por ejemplo fluoxetina y quinidina), y es necesaria una monitorización cuidadosa de los niveles plasmáticos del fármaco y ajustes potenciales de la dosis cuando Hemitartrato de Fórmula (I) se coadministra con un fármaco que se sabe que es un potente inhibidor de CYP2D6. Las concentraciones de paroxetina fueron alrededor de 1,5 a 2 veces mayores que las esperadas, lo que sugiere que Hemitartrato de Fórmula (I) o uno de sus metabolitos puede ser un inhibidor leve de CYP2D6.

#### 25 Ejemplo 14: Interacciones del fármaco Hemitartrato de Fórmula (I) – inhibidores de CYP3A4 e inhibidores de p-glicoproteína (PGP)

Se llevó a cabo un estudio para evaluar la farmacocinética, seguridad y tolerabilidad de múltiples dosis de Hemitartrato de Fórmula (I) (100 mg, dos veces al día) con y sin múltiples dosis de ketoconazol (400 mg, una vez al día) en sujetos masculinos y femeninos sanos. Esto fue un estudio de secuencia fija y de etiqueta abierta en 36 sujetos sanos (18 hombres y mujeres), que consiste en 3 períodos que incluyeron la administración de una sola dosis de 100 mg de Hemitartrato de Fórmula (I), la administración de múltiples dosis de Hemitartrato de Fórmula (I), y la administración concomitante de Hemitartrato de Fórmula (I) 100 mg (dos veces al día) con ketoconazol 400 mg (una vez al día). La administración repetida de Hemitartrato de Fórmula (I) y ketoconazol, un inhibidor potente de citocromo p450 3A4 (“CYP 3A4”) y p-glicoproteína, dio como resultado un incremento de 4 veces en la exposición de la base libre del Hemitartrato de Fórmula (I) tal como existe en plasma en el estado estacionario. De este modo, los pacientes que ya recibieron Hemitartrato de Fórmula (I) pueden necesitar una reducción temporal de la dosis mientras se encuentren en terapia concomitante con inhibidores potentes de CYP 3A4 o p-glicoproteína.

#### Ejemplo 15 – Estudios de estabilidad para la formulación de Hemitartrato de Fórmula (I)

Se prepararon mezclas mezclando Hemitartrato de Fórmula (I) y excipientes (lactosa monohidratada de grado encapsulante, Avicel PH 301 (celulosa microcristalina) y Methocel E15 Prem LV (hidroxipropilmetilcelulosa) en un vial de centelleo a alrededor de una escala de dos gramos. Se añadió agua al 15,6% a la mezcla y se mezcló para formar gránulos húmedos. Los gránulos húmedos se tamizaron usando un tamiz #10 (abertura de 2000 micrómetros). Los gránulos tamizados se secaron entonces en un horno a 50°C durante 2 horas. Los gránulos secos se tamizaron usando un tamiz #18 (abertura de 1000 micrómetros). El lubricante, behenato de glicerilo, se añadió a la mezcla y se mezcló para formar la mezcla final. Las mezclas preparadas se muestran en la tabla a continuación:

45 Tabla

Lote nº	AP	Lactosa monohidratada	Avicel PH 101	50 mg / 100 mg formulación	Comentario
1	1	2,1	2,1	50	control
2	1	2,1	0	50	Sin Avicel
3	1	0	2,1	50	Sin Lactosa
4	1	2,1	1,1	50	Menos Avicel
5	1	1,1	2,1	50	Menos Lactosa

Lote nº	AP	Lactosa monohidratada	Avicel PH 101	50 mg / 100 mg formulación	Comentario
6	1	2,1	0,8	50	Relación de Avicel y Lactosa comparable a 100 mg
7	1	1,1	0,4	100	control
Methocel (HPMC) se usó en el intervalo de 2 a 4%					
Compritol ATO 88 se usó en el intervalo de 1 a 1,6%.					

Las siete mezclas de formulación, que tuvieron diferentes relaciones API:lactosa:Avicel, enumeradas anteriormente, se expusieron a una temperatura elevada a 85°C durante 3 días (condición de estudio de degradación forzada), a fin de comprender la velocidad de degradación y la estabilidad de cada formulación. Esta condición acelerada se escogió basándose en los resultados del estudio que el grado de los productos de degradación del producto farmacéutico de 50 mg a 24 meses fue similar a los obtenidos a 85°C durante 3 días.

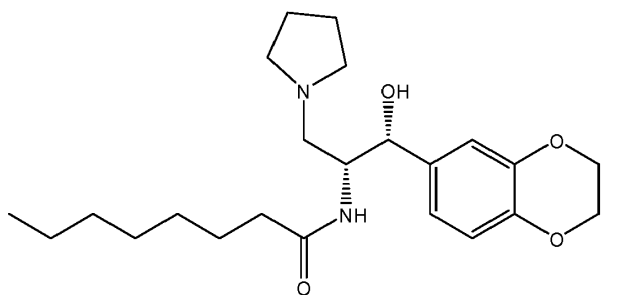
El estudio de degradación forzada se llevó a cabo usando un método de HPLC de gradiente de fase inversa, que usó una columna C18 (Waters T3, 3 µm, 100 x 4,6 mm), fases móviles que consisten en agua y acetonitrilo con ácido trifluoroacético (TFA) al 0,1%, detección de UV a 280 nm, temperatura de la columna a 40°C, y caudal a 2 ml/min. El gradiente comenzó manteniendo a 5% de B (acetonitrilo y TFA al 0,1%) durante 0,5 minutos, y después ascendiendo el componente orgánico a 4,83% de B por minuto hasta 15 minutos.

Los degradantes totales de cada mezcla de formulación se sumaron y se representaron gráficamente frente a la relación de API:lactosa:Avicel, y los resultados se muestran en la Figura 15. Los resultados del estudio sugieren que mientras se mantiene la relación de API y lactosa constante, la disminución de la cantidad de Avicel mejora la estabilidad de la formulación. Cuando se elimina Avicel, la formulación tiene una relación API:lactosa:Avicel de 1:2,1:0, y es la formulación más estable. Cuando se elimina la lactosa, la formulación tiene una relación API:lactosa:Avicel de 1:0:2,1, y esta formulación no es la más inestable en comparación con otras relaciones. La información combinada sugiere que la lactosa estabiliza la formulación, mientras que Avicel desestabiliza la formulación. Sin embargo, cuando ambos excipientes están presentes, interaccionan entre sí. La relación se debe ajustar para obtener una formulación estable.

Para ingredientes farmacéuticos activos como hemihidrato de Fórmula (I) que son solubles en agua, la celulosa microcristalina ayuda a formar gránulos durante la granulación húmeda, ya que es insoluble en agua. Si no se usó celulosa microcristalina, se produce un cambio nítido desde la etapa de gránulo a la forma de pasta. La forma de pasta fue difícil de manipular, y las partículas resultantes después del secado no tienen la resistencia mecánica y distribución de tamaños de partículas adecuadas. La composición farmacéutica que tiene 37% en peso de un Hemitartrato de Fórmula (I), 41,0% en peso de una carga soluble en agua; 16,7% en peso de una carga insoluble, 2% en peso a alrededor de 6% en peso de un aglutinante; y alrededor de 0,1% en peso a alrededor de 2% en peso de un lubricante, todos ellos sobre una base en sólidos secos, tiene el mejor perfil de estabilidad con respecto a la cantidad de degradantes formados.

**REIVINDICACIONES**

1. Un primer agente terapéutico representado por la siguiente fórmula estructural:

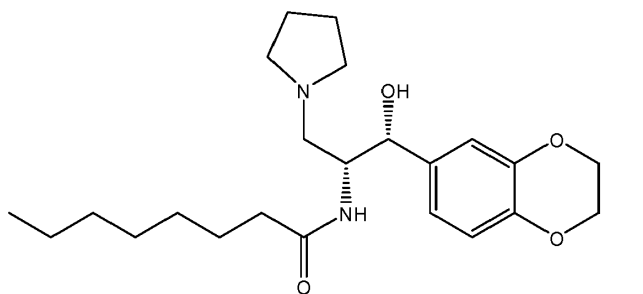


;

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para uso en el tratamiento de la enfermedad de Gaucher,

5 en el que dicho tratamiento comprende administrar una cantidad eficaz del primer agente terapéutico en combinación con una cantidad eficaz de un segundo agente terapéutico que es eficaz para tratar enfermedad de Gaucher.

2. El uso de un primer agente terapéutico representado por la siguiente fórmula estructural:



;

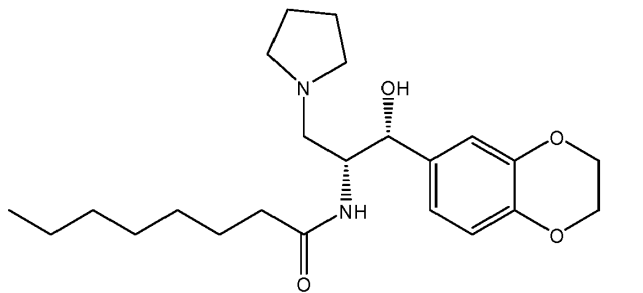
10 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en la fabricación de un medicamento para uso en el tratamiento de la enfermedad de Gaucher,

en el que dicho tratamiento comprende administrar una cantidad eficaz del primer agente terapéutico en combinación con una cantidad eficaz de un segundo agente terapéutico que es eficaz para tratar enfermedad de Gaucher.

15 3. El compuesto para uso de la reivindicación 1 o el uso de la reivindicación 2, en el que el segundo agente terapéutico se selecciona de glucocerebrosidasa, análogos de glucocerebrosidasa, inhibidores de glucosilceramida sintasa, y chaperonas molecular que se unen a glucocerebrosidasa y restauran su conformación correcta.

4. El compuesto para uso de la reivindicación 1 o el uso de la reivindicación 2, en el que el segundo agente terapéutico es imiglucerasa, isofagomina, miglustat, taliglucerasa alfa o velaglucerasa alfa.

20 5. un primer agente terapéutico representado por la siguiente fórmula estructural:

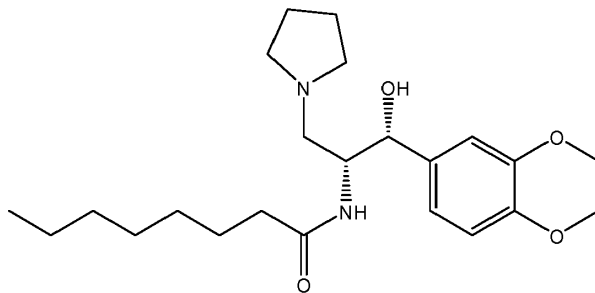


;

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para uso en el tratamiento de la enfermedad de Fabry,

25 en el que dicho tratamiento comprende administrar una cantidad eficaz del primer agente terapéutico en combinación con una cantidad eficaz de un segundo agente terapéutico que es eficaz para tratar enfermedad de Fabry.

6. El uso de un primer agente terapéutico representado por la siguiente fórmula estructural:



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en la fabricación de un medicamento para uso en el tratamiento de la enfermedad de Fabry,

- 5 en el que dicho tratamiento comprende administrar una cantidad eficaz del primer agente terapéutico en combinación con una cantidad eficaz de un segundo agente terapéutico que es eficaz para tratar enfermedad de Fabry.
7. El compuesto para uso de la reivindicación 5 o el uso de la reivindicación 6, en el que el segundo agente terapéutico se selecciona de  $\alpha$  galactosidasa A, análogos de  $\alpha$  galactosidasa A, y chaperonas moleculares que se unen a  $\alpha$  galactosidasa A y restauran su conformación correcta.
- 10 8. El compuesto para uso de la reivindicación 5 o el uso de la reivindicación 6, en el que el segundo agente terapéutico es migalostat, agalsidasa beta, o agalsidasa alfa.
9. El compuesto para uso o uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que el primer agente terapéutico se administra como la sal de hemitartrato.
- 15 10. El compuesto para uso o uso de la reivindicación 9, en el que dicha sal es amorfa, o al menos 70% en peso de dicha sal es cristalino.
11. El compuesto para uso o uso de la reivindicación 9, en la que al menos 70% en peso de dicha sal está en una forma cristalina individual.
- 20 12. El compuesto para uso o uso de la reivindicación 11, en el que la forma cristalina individual se caracteriza por uno, dos, tres, cuatro o cinco picos de difracción de rayos x de polvo principales a ángulos  $2\theta$  de 5,1°, 6,6°, 10,7°, 11,0°, 15,9° y 21,7°.
13. El compuesto para uso o uso de la reivindicación 11, en el que la forma cristalina individual se caracteriza por picos de difracción de rayos x de polvo a ángulos  $2\theta$  de 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° y 23,5°.
- 25 14. El compuesto para uso o uso de la reivindicación 11, en el que la forma cristalina individual se caracteriza por el patrón de difracción de rayos x de polvo de la Figura 1.
15. El compuesto para uso o uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en el que el tratamiento con el primer agente terapéutico se comienza después del tratamiento durante un período de al menos diez semanas con el segundo agente terapéutico.
- 30 16. El compuesto para uso o uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en el que el tratamiento con el primer agente terapéutico se comienza después del tratamiento con el segundo agente terapéutico, y en el que el tratamiento con el primer agente terapéutico se inicia después de que el recuento plaquetario del sujeto es igual o mayor que 100.000  $\text{mm}^3$ ; la concentración de hemoglobina es igual o mayor que 11 g/dl (mujeres) o 12 g/dl (hombres); y/o el volumen del bazo del sujeto es menor o igual a 10 múltiplos del normal, y los volúmenes del hígado son menores o iguales a 1,5 múltiplos del normal.
- 35 17. El compuesto para uso o uso de la reivindicación 15 o 16, en el que el tratamiento con el segundo agente terapéutico se termina tras el inicio del tratamiento con el primer agente terapéutico.
18. El compuesto para uso o uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17, en el que dicho tratamiento comprende administrar el primer agente terapéutico a una dosis dos veces al día de 25 miligramos a 200 miligramos.
- 40 19. El compuesto para uso o uso de uno cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18, en el que dicho tratamiento comprende administrar el primer agente terapéutico a una dosis dos veces al día de 50 miligramos.

FIG. 1

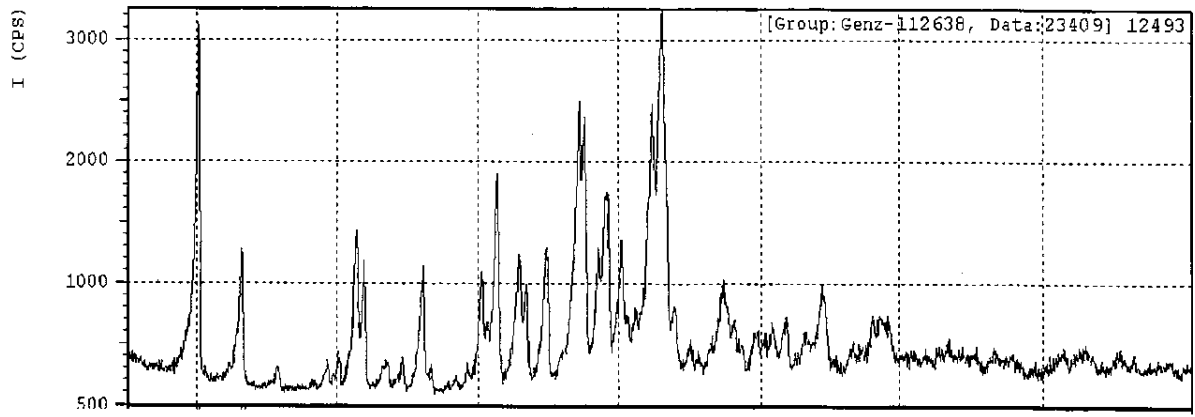




FIG. 2

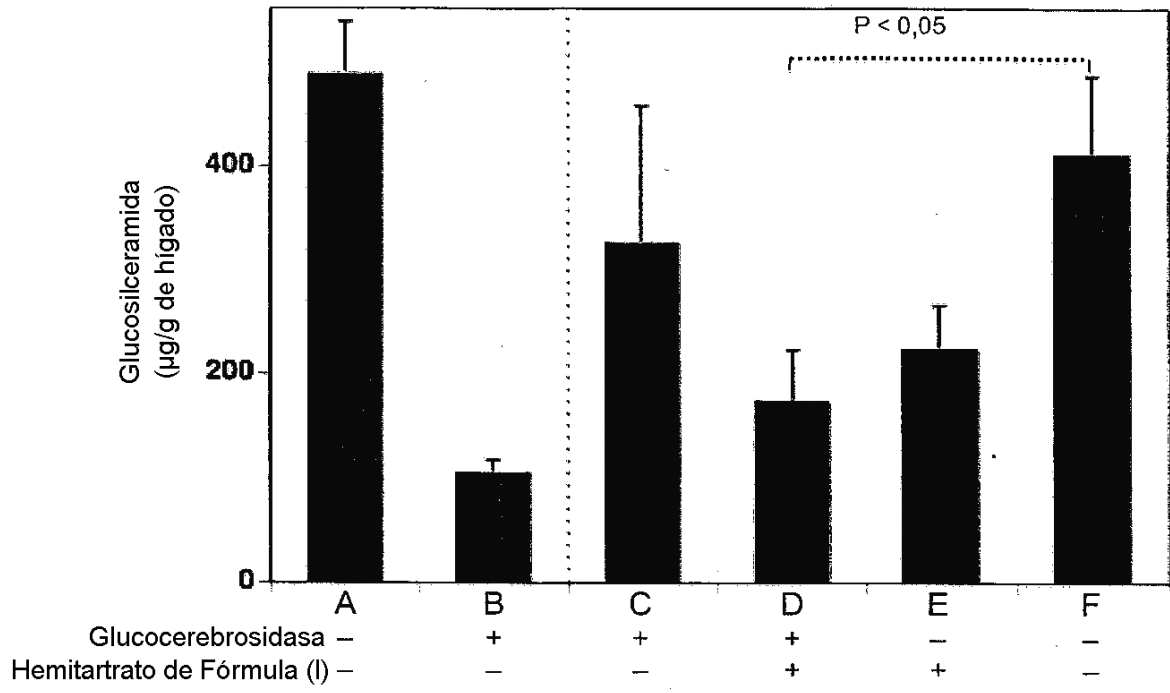


FIG. 3

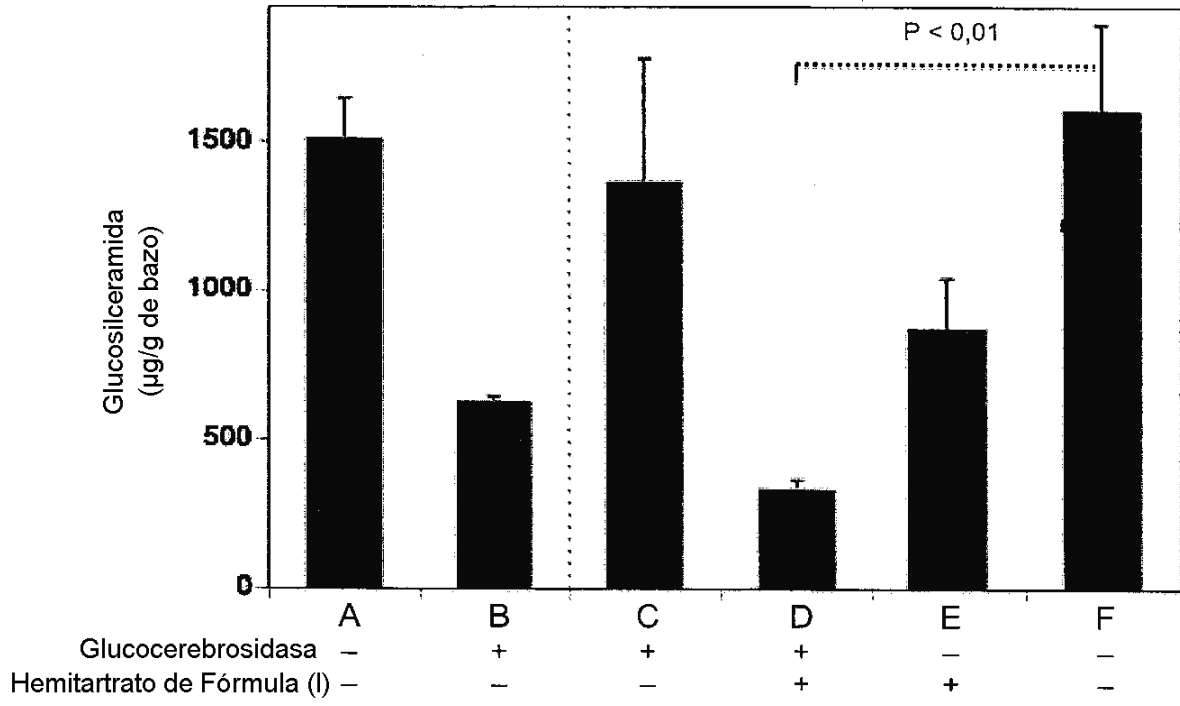


FIG 4.

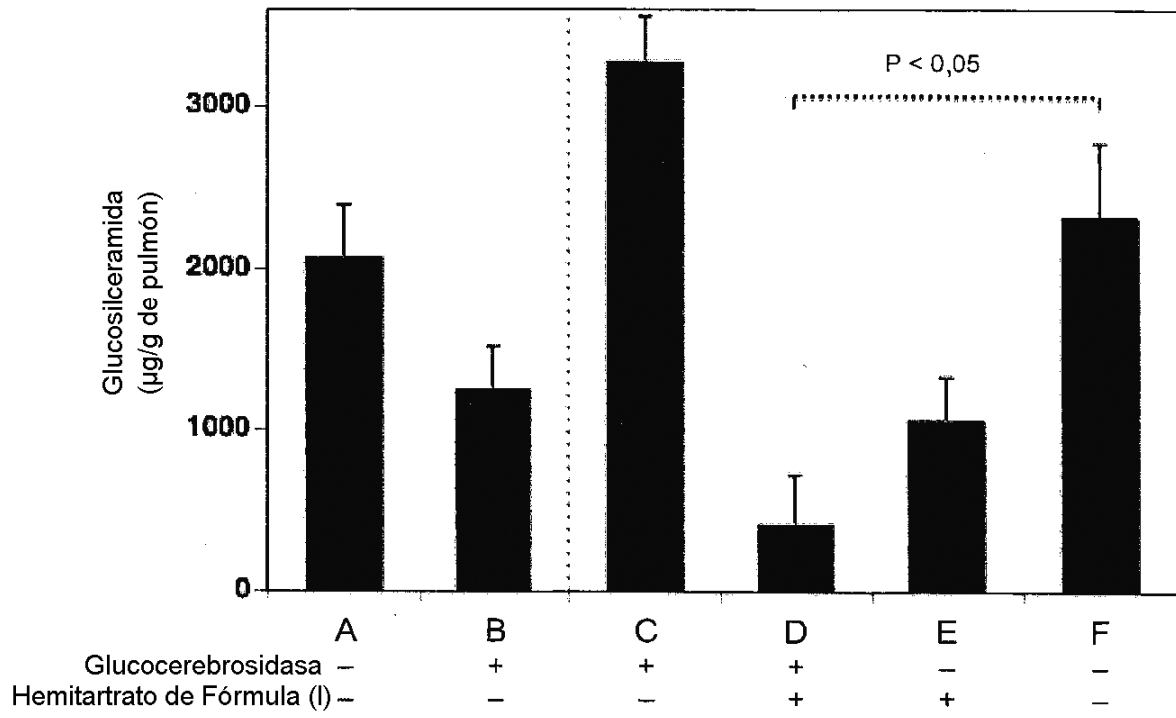
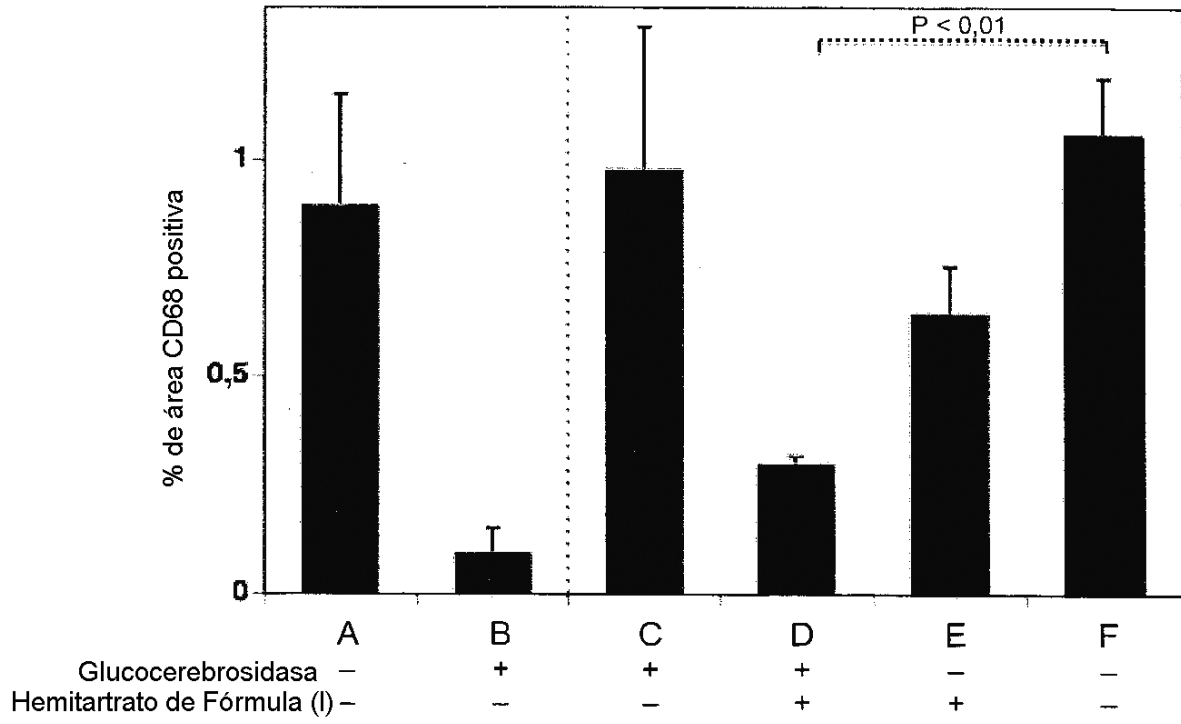


FIG. 5



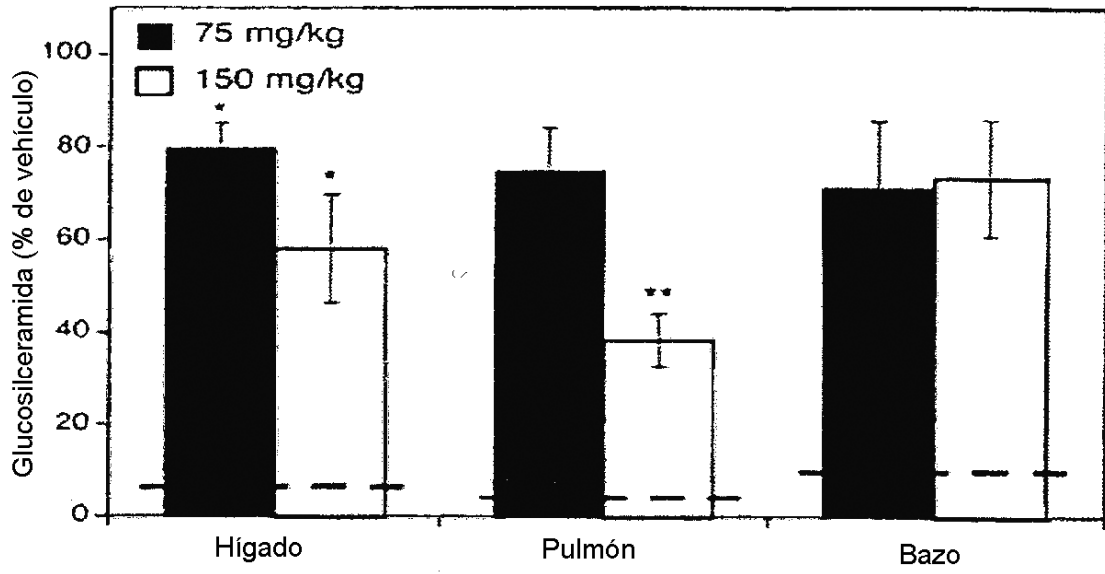


FIG. 6

FIG. 7

Hemitartrato de Fórmula (I) inhibe el grado de acumulación de GL-3 en ratones con Fabry

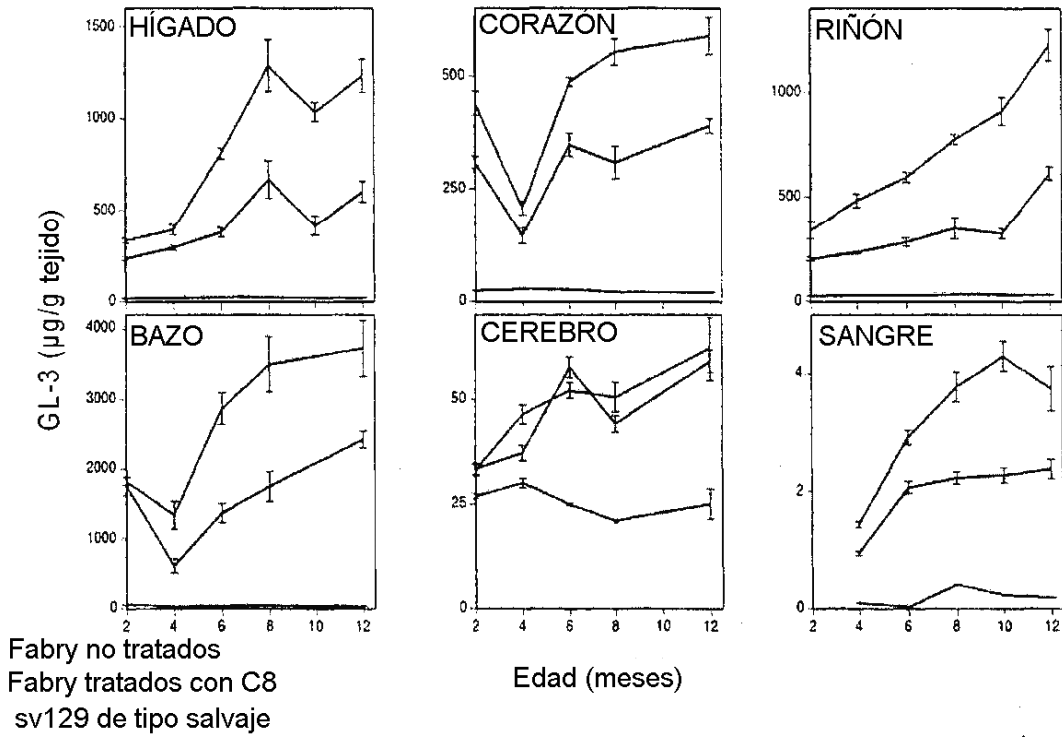


FIG. 8

Hemitartrato de Fórmula (I) retrasa el comienzo y progresión de neuropatía periférica en ratones con Fabry

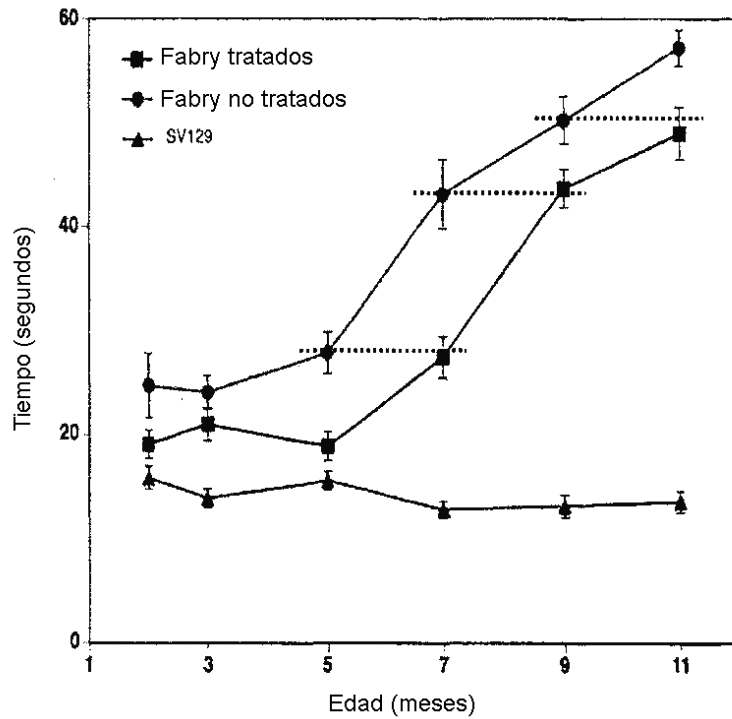


FIG. 9

El tratamiento de ratones con Fabry con Hemitartrato de Fórmula (I) mejora algunos marcadores de la función renal

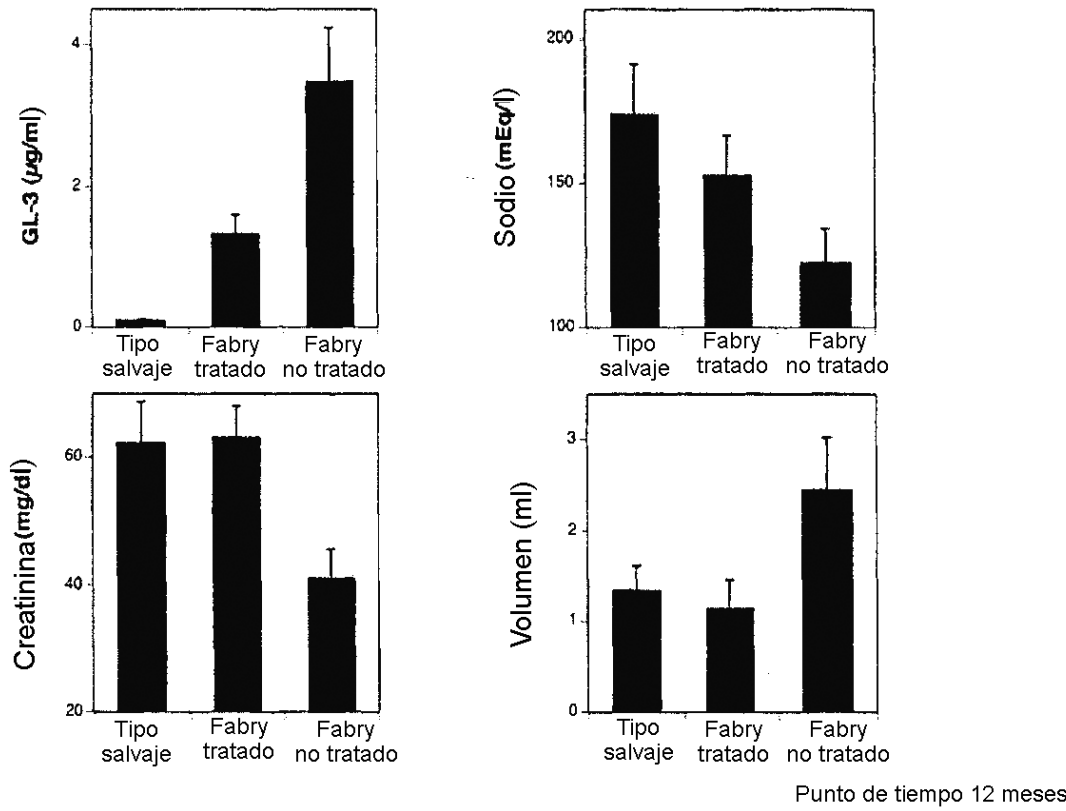




FIG. 10

Línea de tiempo para el estudio de ERT ± SRT en ratón Fabry-Rag

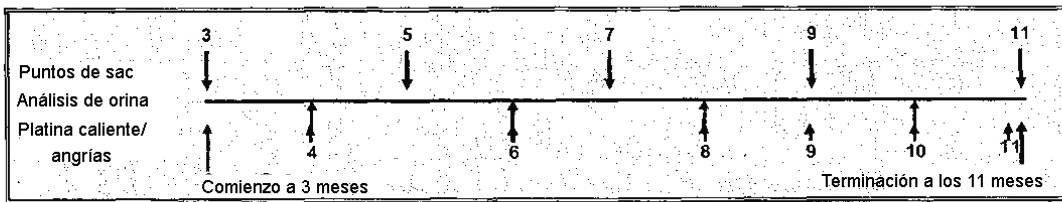
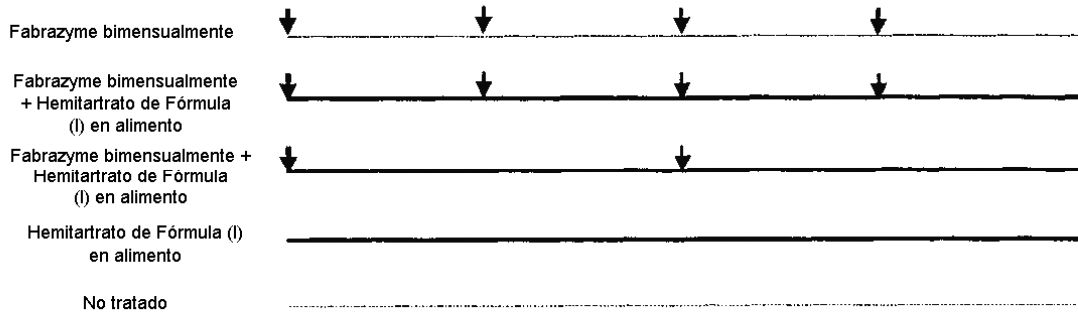


FIG. 11

ERT, pero no SRT, reduce los niveles de GL-3 en sangre en ratones Fabry-Rag

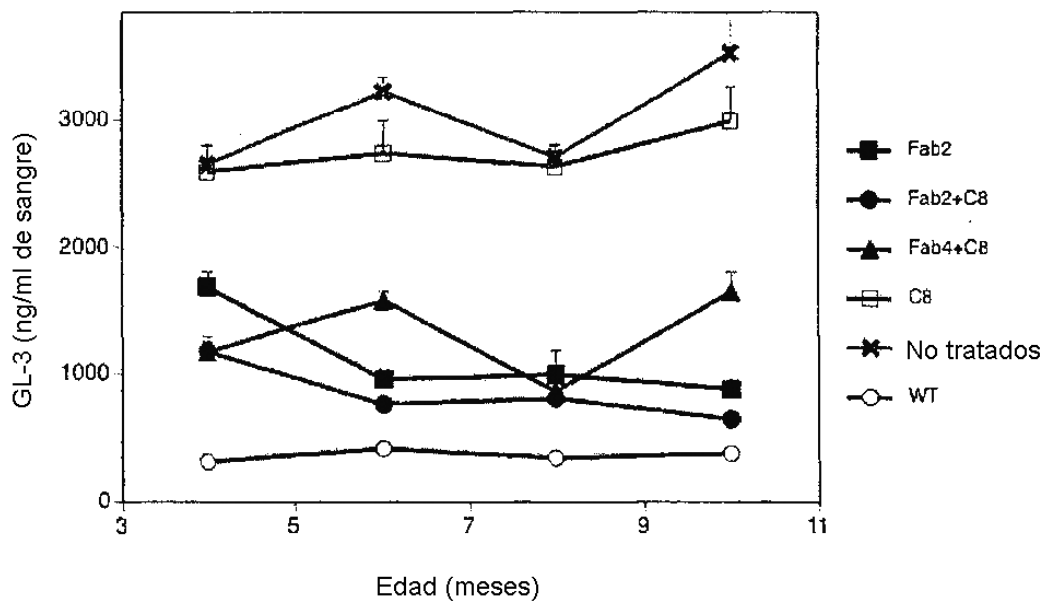


FIG. 12

La combinación ERT/SRT es la más eficaz reduciendo los niveles de GL-3 en el hígado y riñón de ratones Fabry-Rag

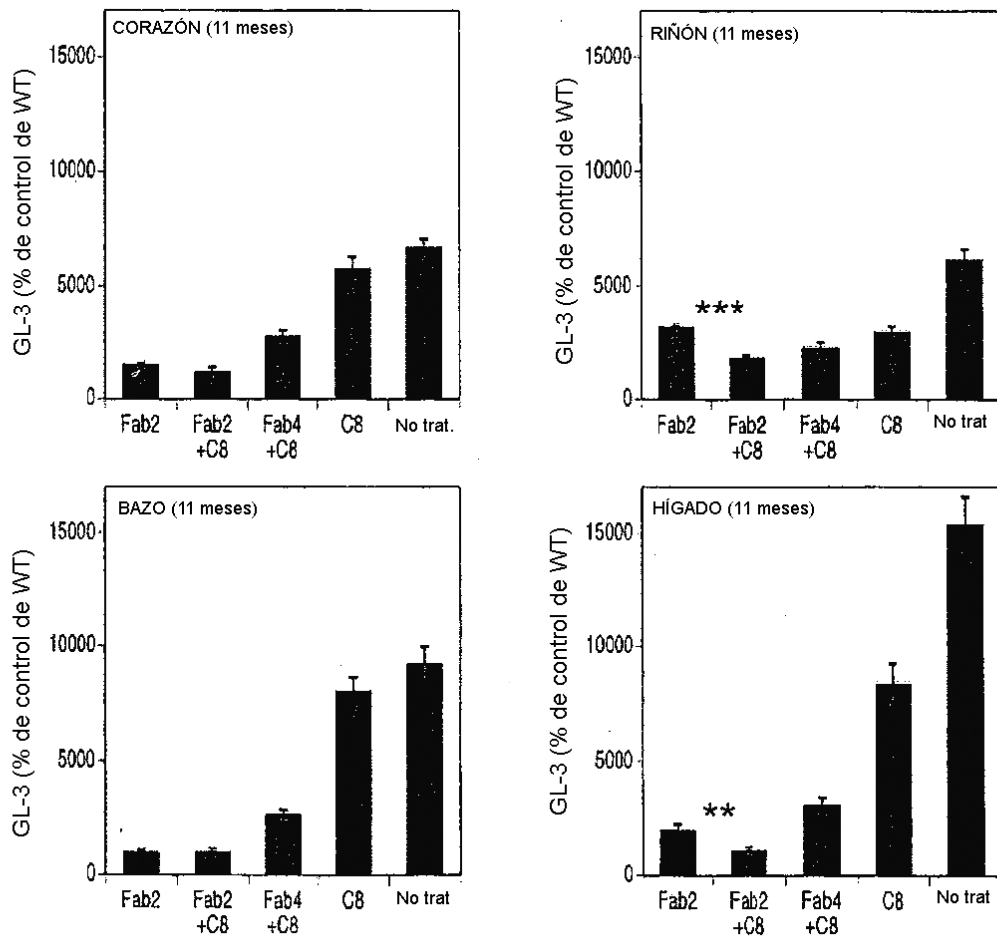
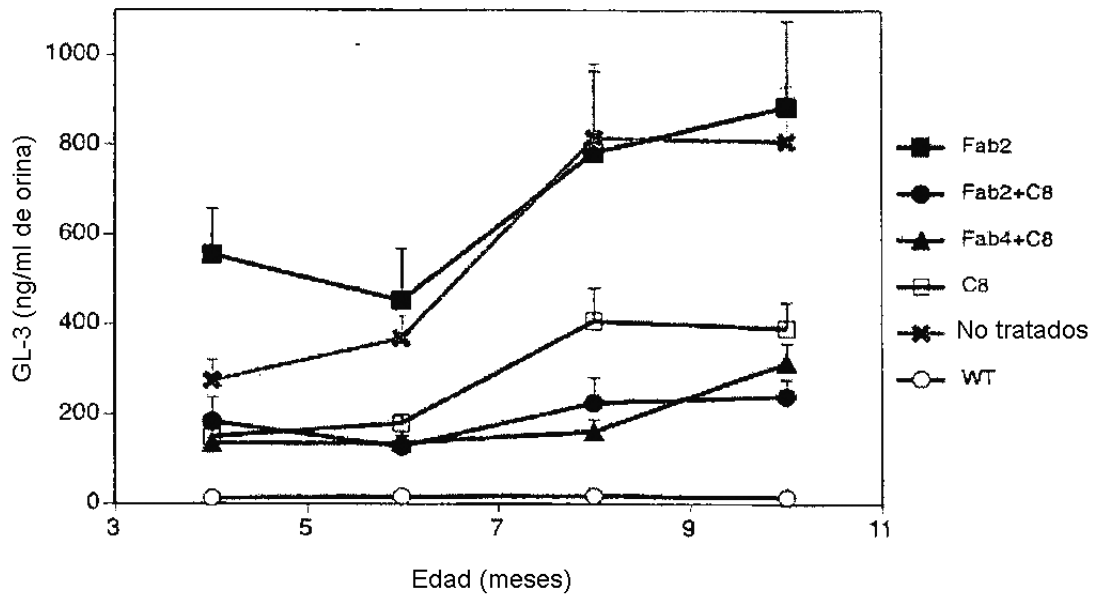


FIG. 13

SRT, pero no ERT, reduce los niveles de GL-3 en orina en ratones Fabry-Rag



**FIG. 14**

SRT, pero no ERT, retrasa el comienzo de insensibilidad al calor en ratones Fabry-Rag (11 meses)

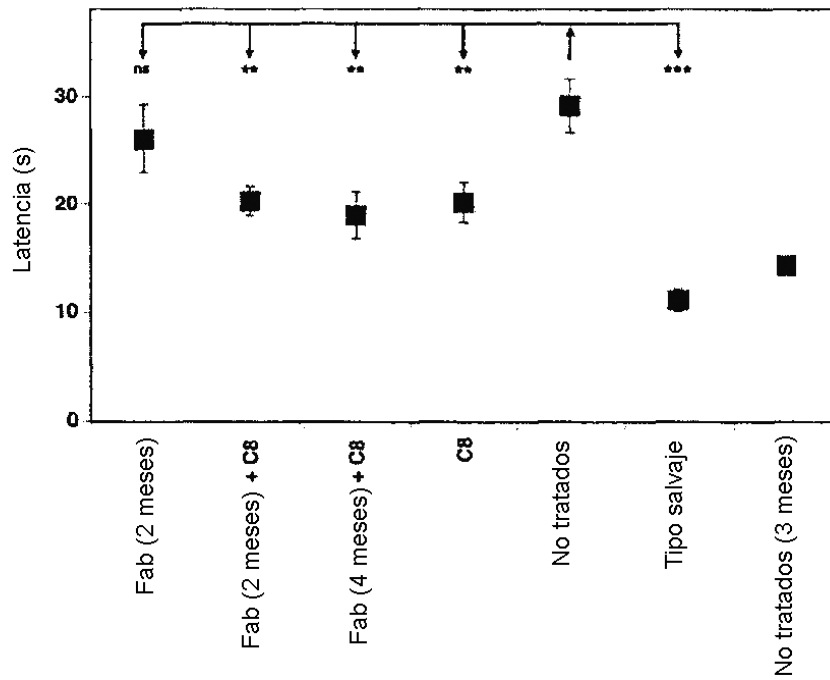


FIG 15

