



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0079280
(43) 공개일자 2020년07월02일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/445 (2006.01) A61K 38/47 (2006.01)
A61K 47/02 (2006.01) A61K 47/12 (2006.01)
A61K 47/26 (2017.01) A61K 9/00 (2006.01)
A61K 9/08 (2006.01) A61K 9/19 (2006.01)
A61P 25/16 (2006.01) A61P 25/28 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
A61K 31/445 (2013.01)
A61K 38/47 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2020-7014990
- (22) 출원일자(국제) 2018년10월25일
심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2020년05월26일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2018/057575
- (87) 국제공개번호 WO 2019/084309
국제공개일자 2019년05월02일
- (30) 우선권주장
62/577,429 2017년10월26일 미국(US)

- (71) 출원인
샤이어 휴먼 지네틱 테라피즈 인크.
미국 매사추세츠 (우편번호 02421) 랙싱턴 샤이어 웨이 300
- (72) 발명자
박, 영, 희
미국 02476 매사추세츠주 알링턴 메이플라워 로드 5
첸, 낸시
미국 01890 매사추세츠주 윈체스터 베이즈 로드 6 (뒷면에 계속)
- (74) 대리인
양영준, 김영

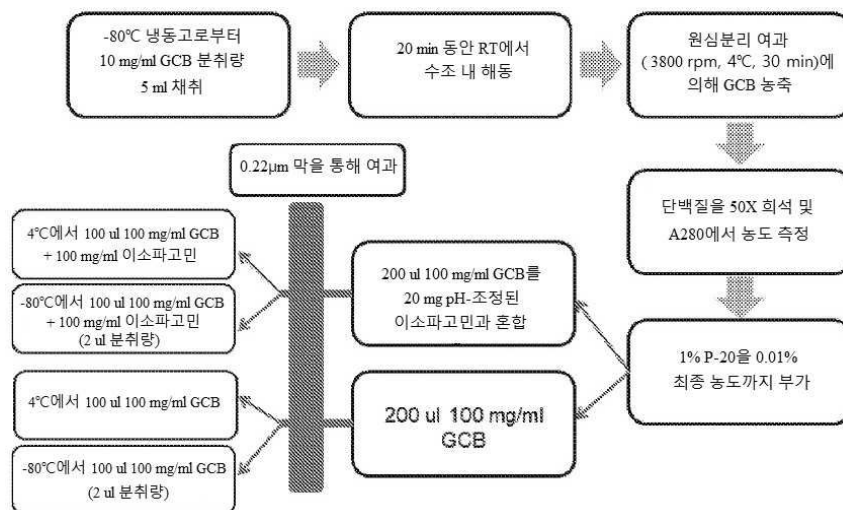
전체 청구항 수 : 총 77 항

(54) 발명의 명칭 글루코세레브로시다제 및 이소파고민을 포함하는 제제

(57) 요약

본발명은 글루코세레브로시다제, 가령 적어도 약 1:2.5의 몰 비로 벨라글루세라제 알파, 및 이소파고민의 조성물을 제공한다. 또한 GCase 경로에서의 기능이상과 관련된 장애의 치료를 위한 상기 조성물의 용도가 제공된다. 장애는 리소좀 저장 질환, 가령 고세병, 파브리병, 폼페병, 점액다당류증, 또는 다계통 위축증일 수 있다. 장애는 또한 신경변성 장애, 가령 파킨슨병, 알츠하이머병, 또는 루이소체 치매일 수 있다. 상기 조성물은 글루코세레브로시다제에 대해 적어도 약 3-배 몰 과량으로 0.5 내지 5.0 mg/kg의 글루코세레브로시다제 및 이소파고민을 가질 수 있다. 상기 조성물은 정맥내로 또는 피하로 투여될 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 47/02 (2013.01)
A61K 47/12 (2013.01)
A61K 47/26 (2013.01)
A61K 9/0021 (2013.01)
A61K 9/08 (2013.01)
A61K 9/19 (2013.01)
A61P 25/16 (2018.01)
A61P 25/28 (2018.01)
A61K 2300/00 (2013.01)

(72) 발명자

후, 준

미국 01776 매사추세츠주 서드베리 웰험 아일랜드
로드 31

메이아판, 무투라만

미국 02421 매사추세츠주 렉싱턴 매닝 스트리트 11

밀러, 토마스, 앨런

미국 01880 매사추세츠주 웨이크필드 파크 애비뉴
18

명세서

청구범위

청구항 1

적어도 약 1:2.5의 몰 비로 글루코세레브로시다제 (GCB) 및 이소파고민 (IFG)을 포함하는 조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서, GCB는 벨라글루세라제 알파인 조성물.

청구항 3

제 1항 또는 제 2항에 있어서, 상기 조성물의 pH는 약 6.0, 약 6.5, 또는 약 7.0인 조성물.

청구항 4

제 1-3항 중 어느 한 항에 있어서, GCB 대 IFG의 몰비는 약 1:2.5 내지 약 1:30인 조성물.

청구항 5

제 1-3항 중 어느 한 항에 있어서, GCB 대 IFG의 몰비는 약 1:2.5 내지 약 1:10인 조성물.

청구항 6

제 1-3항 중 어느 한 항에 있어서, GCB 대 IFG의 몰비는 약 1:10 내지 약 1:30인 조성물.

청구항 7

제 1-3항 중 어느 한 항에 있어서, GCB 대 IFG의 몰비는 약 1:2.5 내지 약 1:3.5인 조성물.

청구항 8

제 1-3항 중 어느 한 항에 있어서, GCB 대 IFG의 몰비는 약 1:3.0인 조성물.

청구항 9

제 1-3항 중 어느 한 항에 있어서, GCB 대 IFG의 몰비는 1:3.0인 조성물.

청구항 10

제 1-9항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조성물은 적어도 20 °C의 온도인 조성물.

청구항 11

제 1-9항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조성물은 0 °C 내지 20 °C의 온도인 조성물.

청구항 12

제 1-9항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조성물은 0 °C 미만의 온도이다인 조성물.

청구항 13

제 8-12항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조성물은 수성 용액인 조성물.

청구항 14

제 1-9항 및 12항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조성물은 동결건조물인 조성물.

청구항 15

1-14항 중 어느 한 항에 있어서, 약제학적으로 허용되는 부형제, 약제학적으로 허용되는 염, 또는 둘 다 약제학적으로 허용되는 부형제 및 약제학적으로 허용되는 염을 추가로 포함하는 조성물.

청구항 16

제 1-15항 중 어느 한 항에 있어서, IFG는 이소파고민 타르트레이트인 조성물.

청구항 17

제 16항에 있어서, 이소파고민 타르트레이트는 이소파고민 D-타르트레이트인 조성물.

청구항 18

제 1-13 및 15-17항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조성물은 액체인 조성물.

청구항 19

제 항 1-18중 어느 한 항에 있어서, 항산화제를 추가로 포함하는 조성물.

청구항 20

제 1-19항 중 어느 한 항에 있어서, 탄수화물을 추가로 포함하는 조성물.

청구항 21

제 1-20항 중 어느 한 항에 있어서, 계면활성제를 추가로 포함하는 조성물.

청구항 22

제 1-21항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조성물은 45-120 mg/mL의 GCB 및 0.2 내지 1.8 mg/mL 이소파고민을 포함하는 조성물.

청구항 23

제 22항에 있어서, 상기 조성물은 60 mg/mL의 GCB 및 0.9 mg/mL 이소파고민을 포함하는 조성물.

청구항 24

제 22 또는 23항에 있어서, 상기 조성물은 50 mM 소듐 시트레이트 또는 소듐 포스페이트, 및 0.01% 폴리소르베이트 20을 추가로 포함하는 조성물.

청구항 25

제24 항에 있어서, 상기 조성물은 5-20 mM 소듐 시트레이트 및 0.01% 폴리소르베이트-20을 포함하는 조성물.

청구항 26

제 25항에 있어서, 상기 조성물은 10 mM 소듐 시트레이트 및 0.01% 폴리소르베이트-20을 포함하는 조성물.

청구항 27

제 24항에 있어서, 상기 조성물은 5-20 mM 소듐 포스페이트 및 0.01% 폴리소르베이트-20을 포함하는 조성물.

청구항 28

제 27항에 있어서, 상기 조성물은 10 mM 소듐 포스페이트 및 0.01% 폴리소르베이트-20을 포함하는 조성물.

청구항 29

제 22-28항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조성물은 약 pH 6.0인 조성물.

청구항 30

제 22-28항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조성물은 pH 6.0인 조성물.

청구항 31

제 1-30항 중 어느 한 항의 조성물을 포함하는 용기.

청구항 32

제 31항에 있어서, 용기는 미리 충전된 주사기, 바이알, 또는 앰플로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 용기.

청구항 33

물 내 IFG를 용해시키고, pH를 약 6.0로 조정하고, GCB를 부가하여 상기 조성물을 얻는 것을 포함하는, 제 1-30항 중 어느 한 항의 조성물을 제조하는 방법.

청구항 34

제 33항에 있어서, GCB 부가 이전 IFG를 동결건조시키는 것을 추가로 포함하는 방법.

청구항 35

제 33 또는 34항에 있어서, 폴리소르베이트 20 을 0.01% 부가하는 것을 추가로 포함하는 방법.

청구항 36

제 33-35항 중 어느 한 항에 있어서, 0.22 μm 막을 통해 상기 조성물을 여과시키는 것을 추가로 포함하는 것법.

청구항 37

제 33-36항 중 어느 한 항에 있어서, IFG는 상기 조성물 내 GCB의 안정성을 유지시키기에 충분한 양으로 존재하는 방법.

청구항 38

제 33-36항 중 어느 한 항에 있어서, IFG는 적어도 3 일 동안 0-50 $^{\circ}\text{C}$ 에서 상기 조성물 내 GCB의 안정성을 유지시키기에 충분한 양으로 존재하는 방법.

청구항 39

제 33-36항 중 어느 한 항에 있어서, IFG는 적어도 6 개월 0-40 $^{\circ}\text{C}$ 에서 상기 조성물 내 GCB의 안정성을 유지시키기에 충분한 양으로 존재하는 방법.

청구항 40

제 1-30항 중 어느 한 항에 있어서, 치료법에서 사용을 위한 조성물.

청구항 41

제 1-11, 13 및 15-30항 중 어느 한 항에 있어서의 조성물을 이를 필요로 하는 환자에게 투여하는 것을 포함하는, GCase 경로에서의 기능이상과 관련된 장애를 치료하는 방법.

청구항 42

제 41항에 있어서, 상기 방법은 장애를 치료하기에 효과적인 방법.

청구항 43

제 41 또는 42항에 있어서, 상기 조성물은 정맥내로 또는 피하로 투여되는 방법.

청구항 44

제 43항에 있어서, 상기 조성물은 피하로 투여되는 방법.

청구항 45

제 44항에 있어서, 여기서 피하 투여는 피하 주사인 방법.

청구항 46

제 41-45항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조성물은 매주 2회 투여되는 방법.

청구항 47

제 41-45항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조성물은 매주 1회 투여되는 방법.

청구항 48

제 41-45항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조성물은 종종 매주 1회 미만 투여되는 방법.

청구항 49

제 41-45항 중 어느 한 항에 있어서, 여기서 상기 조성물은 2주마다 1회 투여되는 방법.

청구항 50

제 41-49항 중 어느 한 항에 있어서, 여기서 상기 장애는 GCASE 활성에서의 결함을 포함하는 방법.

청구항 51

제 50항에 있어서, 상기 GCASE 활성에서의 결함은 감소된 효소 활성을 포함하는 방법.

청구항 52

제 41-49항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 장애는 알파-시누클레인 조절장애를 포함하는 방법.

청구항 53

제 41-52항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 장애는 리소좀 저장 질환인 방법.

청구항 54

제 53항에 있어서, 상기 리소좀 저장 질환은 고세병, 파브리병, 폼페병, 점액다당류증, 및 다계통 위축증로부터 선택되는 방법.

청구항 55

제 41-54항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 장애는 신경변성 장애인 방법.

청구항 56

제 55항에 있어서, 상기 신경변성 장애는 파킨슨병, 알츠하이머병, 및 루이소체 치매로부터 선택되는 방법.

청구항 57

제 1-11, 13 및 15-30항 중 어느 한 항에 있어서의 조성물을 이를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 것을 포함하는 GCASE 경로에서의 기능이상을 치료하는 방법.

청구항 58

제 57항에 있어서, 대상체는 인간인 방법.

청구항 59

GCB에 대해 적어도 약 3-배 몰 과량인 0.5 내지 5.0 mg/kg GCB 및 IFG를 포함하는 조성물을 대상체에게 투여하는 것을 포함하는 GCASE 경로에서의 기능이상을 치료하는 방법, 여기서 상기 조성물은 피하로 투여됨.

청구항 60

제 59항에 있어서, 상기 조성물은 0.8 내지 4.0 mg/kg GCB을 포함하는 방법.

청구항 61

제 60항에 있어서, 상기 조성물은 1.0 내지 3.0 mg/kg GCB을 포함하는 방법.

청구항 62

제 60항에 있어서, 상기 조성물은 1.2 내지 2.0 mg/kg GCB을 포함하는 방법.

청구항 63

제 60항에 있어서, 상기 조성물은 약 1.5 mg/kg GCB을 포함하는 방법.

청구항 64

제60 항에 있어서, 상기 조성물은 1.5 mg/kg GCB을 포함하는 방법.

청구항 65

제 59항에 있어서, 상기 조성물은 2.0 내지 5.0 mg/kg GCB을 포함하는 방법.

청구항 66

제 59항에 있어서, 상기 조성물은 2.25 내지 4.5 mg/kg GCB을 포함하는 방법.

청구항 67

제 59항에 있어서, 상기 조성물은 2.25 내지 3.75 mg/kg GCB을 포함하는 방법.

청구항 68

제 59항에 있어서, 상기 조성물은 3.5 내지 5.0 mg/kg GCB을 포함하는 방법.

청구항 69

제 60-68항 중 어느 한 항에 있어서, IFG는 GCB에 대해 3 내지 10-배 물 비를 가지는 방법.

청구항 70

제 60-68항 중 어느 한 항에 있어서, IFG는 GCB에 대해 10 내지 30-배 물 비를 가지는 방법.

청구항 71

제 60-68항 중 어느 한 항에 있어서, IFG는 GCB에 대해 30 내지 100-배 물 비를 가지는 방법.

청구항 72

제 60-68항 중 어느 한 항에 있어서, IFG는 GCB에 대해 3-배 물 비를 가지는 방법.

청구항 73

제 41-72항 중 어느 한 항에 있어서, 비장 내 GCB의 노출, 활성화, 또는 생물학적이용율이 증가되는 방법.

청구항 74

제 41-73항 중 어느 한 항에 있어서, 간 내 GCB의 노출, 활성화, 또는 생물학적이용율이 증가되는 방법.

청구항 75

제 41-74항 중 어느 한 항에 있어서, 혈청 내 GCB의 노출, 활성화, 또는 생물학적이용율이 증가되는 방법.

청구항 76

제 1-11, 13 및 15-30항 중 어느 한 항에 있어서, 제 41-75항 중 어느 한 항의 방법에서의 사용을 위한 조성물.

청구항 77

제 41-76항 중 어느 한 항의 방법에 대한 약제 제조에서의, 제 1-11, 13 및 15-30항 중 어느 한 항의 조성물의 용도.

발명의 설명

기술 분야

[0001] **관련 출원에 대한 상호참조**

[0002] 본 출원은 2017년 10월 26일에 출원된 미국 가출원 제 62/577,429호를 우선권으로 주장하며, 그 개시 내용은 그 전문이 본원에 참조로 포함된다.

배경 기술

[0003] **발명의 배경**

[0004] 글루코세레브로시다제 (GCB)는 (GCB)의 결핍을 특징으로 하는 상염색체 열성 리소좀 저장 장애인 고셔병을 치료하는데 사용될 수 있는 단백질 약물이다.

[0005] 고셔병은 GBA 유전자의 돌연변이에 의해 야기되는 상염색체 열성 장애이며, 이는 리소좀 효소 베타-글루코세레브로시다제의 결핍을 초래한다. 글루코세레브로시다제는 스핑고지질 글루코세레브로사이드의 글루코스 및 세라마이드로의 전환을 촉매한다. 효소 결핍은 주로 대식세포의 리소좀 구획에 글루코세레브로사이드의 축적을 유발하여 거품 세포 또는 "Gaucher 세포"를 발생시킨다. 고셔병에서, 다양한 형태의 돌연변이 GCCase는 돌연변이된 아미노산 또는 아미노산에 따라 글루코실세라마이드 절단 활성을 감소 시키거나 거의 또는 전혀 갖지 않았다. 이 장애의 중증도는 상대적 수준의 잔류 효소 활성 및 결과적인 기질 축적 정도와 상관 관계가 있다.

[0006] GCB는 백혈구 및 적혈구의 막에서 글리코스핑고 지질의 분해 후 형성된 당지질 글루코세레브로사이드를 가수 분해하는 리소좀 효소이다. 이 효소의 결핍은 고셔 환자의 간, 비장 및 골수에 위치한 식세포의 리소좀에 글루코세레브로사이드가 대량으로 축적되게 한다. 이 분자의 축적은 비장 비대, 간 비대, 골격 장애, 혈소판 감소증 및 빈혈을 포함한 다양한 임상 증상을 유발한다. (Beutler et al. "Gaucher disease" The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease (McGraw-Hill, Inc, New York, 1995, pp. 2625-2639.)

[0007] 벨라글루세라제 알파는 고셔병 치료에 사용되는 GCB의 한 형태이다. VPRIV은 벨라글루세라제 알파를 함유하는 제제이다. 벨라글루세라제 알파는 글루코세레브로사이드의 가수 분해를 촉진하여 축적된 글루코세레브로사이드의 양을 감소시킨다. 임상 시험에서 VPRIV는 비장과 간 크기를 줄이고 빈혈과 혈소판 감소증을 개선시킨다.

[0008] VPRIV 및 벨라 글루세라제 알파 및 단백질을 함유하는 다른 유사한 약물 제품은 액체 또는 동결 건조된 형태, 즉 동결 건조된 형태로 저장된다. 동결 건조된 약물 제품은 종종 환자 사용 직전에 적합한 투여 희석제를 첨가하여 재구성된다. 변성 및 응집을 포함한 물리적 불안정성뿐만 아니라 가수 분해, 탈 아미드화 및 산화를 포함하는 화학적 불안정성의 결과로 액체 또는 동결 건조된 형태의 벨라글루세라제 알파 또는 GCB의 양이 감소될 수 있다.

[0009] GCB, VPRIV 또는 벨라글루세라제 알파, 특히 피하 (SC) 투여에 적합한 것들의 개선된 안정성을 갖는 개선된 제제가 필요하다. GCB는 24시간에 걸쳐 실온에서 30 mg/mL 미만의 용해도 한계를 갖는다. SC 주사 제품의 편리한 부피는 전형적으로 2.5 mL 이하이다. 이는 치료적으로 적절한 용량을 투여하기에 충분히 높은 수준으로 농축될 수 있는 제형을 필요로 한다. 또한, 제제는 이상적으로는 실온 또는 냉장 조건 하에서 적절한 저장 안정성을 갖는다.

[0010] GCB, VPRIV, 또는 벨라글루세라제 알파의 생체 이용률이 개선된 SC 투여용 제제가 또한 필요하다. 정맥 내 (IV) 투여되는 현재 VPRIV 제형은 대략 1%의 혈청 생체 이용율을 제공한다. 피하 (SC) 투여는 IV 투여와 동등한 조직 노출을 제공하지 않을 것이다. GCB는 IV 투여 약물로서 15분 미만의 혈청 반감기를 갖는다. 개선된 혈청 안정성은 더 많은 SC-투여된 GCB가 SC 구획으로부터 전신 순환으로 분산될 수 있게 한다. 향상된 혈청 안

에서, 상기 조성물은 약 pH 6.0이다. 일부 구체예에서, 상기 조성물은 pH 6.0이다.

- [0017] 또다른 양상에서 여기서 기술된 조성물 중 어느 하나를 포함하는 용기가 제공된다. 일부 구체예에서, 용기는 미리 충전된 주사기, 바이알, 또는 앰플로 이루어진 그룹으로부터 선택된다.
- [0018] 또다른 양상에서 여기서 기술된 조성물 중 어느 하나를 제조하는 방법이 제공된다. 상기 방법은 IFG를 용해시키고 (예를 들어, 물 내), pH를 약 6.0로 조정하고, GCB를 부가하여 상기 조성물을 얻는 것을 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 방법은 GCB 부가 이전 IFG를 동결건조시키는 것을 추가로 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 방법은 폴리소르베이트 20을 0.01%까지 부가를 추가로 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 방법은 폴리소르베이트 20을 0.01% (w/v)까지 부가를 추가로 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 방법은 폴리소르베이트 20 내지 0.01% (v/v)의 부가를 추가로 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 방법은 0.22 μm 막을 통해 상기 조성물 여과를 추가로 포함한다. 일부 구체예에서, IFG는 상기 조성물 내 GCB의 안정성을 유지시키기에 충분한 양으로 존재한다. 일부 구체예에서, IFG는 적어도 3 일 동안 0-50 °C에서 상기 조성물 내 GCB의 안정성을 유지시키기에 충분한 양으로 존재한다. 일부 구체예에서, IFG는 적어도 6 개월 0-40 °C에서 상기 조성물 내 GCB의 안정성을 유지시키기에 충분한 양으로 존재한다.
- [0019] 또다른 양상에서 여기서 기술된 조성물 중 어느 하나를 투여하는 것을 포함하는 GCCase 경로에서의 기능이상과 관련된 장애를 치료하는 방법이 제공된다. 일부 구체예에서, 상기 방법은 장애를 치료하기에 효과적이다. 일부 구체예에서, 상기 조성물은 정맥내로 또는 피하로 투여된다. 일부 구체예에서, 상기 조성물은 피하로, 예를 들어, 피하 주사로 투여되고, 이는 특히 본발명을 실시하기 위해 적절하다. 일부 구체예에서, 상기 조성물은 매주 2회, 매주 1회, 종종 매주 1회 미만, 또는 2주마다 1회 투여된다. 대표적으로, 여기서 기술된 조성물은 1주 1회 또는 2회, 또는 2주마다 1회 주사로 피하로 투여된다. 피하로 투여된 여기서 기술된 조성물 (특히, 제제 IFGT를 갖는)은 GCB 단독의 필적하는 정맥내 투여량과 비교하여 상당히 더 큰 혈청 노출을 제공할 수 있다. 더 큰 혈청 생물학적이용율은 유리하게는 대상체에게 투여되어야 하는 피하 주사 횟수 감소를 허용한다. 예를 들어, 치료적으로 효과적인 양을 달성하기 위해 치료 당 더 적은 주사가 투여될 필요가 있고 및/또는 피하 주사 사이의 시간 간격이 연장될 수 있다.
- [0020] 또다른 양상에서, 여기서 기술된 조성물은 치료법에서의 사용을 위한 것이다. 하나의 구체예에서, 여기서 기술된 조성물은 여기서 개시된 GCCase 경로에서의 기능이상과 관련된 장애를 치료하는 방법에서의 사용을 위한 것이다. 또다른 구체예에서, 여기서 기술된 조성물은 예를 들어 여기서 개시된 GCCase 경로에서의 기능이상과 관련된 장애를 치료하는 약제 제조에서의 사용을 위한 것이다. 일부 구체예에서, 상기 조성물은 정맥내로 또는 피하로 투여된다. 일부 구체예에서, 상기 조성물은 피하로, 예를 들어, 피하 주사로 투여된다. 일부 구체예에서, 상기 조성물은 매주 2회, 매주 1회, 종종 매주 1회 미만, 또는 2주마다 1회 투여된다. 대표적으로, 여기서 기술된 조성물은 1주 1회 또는 2회, 또는 2주마다 1회 주사로 피하로 투여된다.
- [0021] 일부 구체예에서, 장애는 GCCase 활성에서의 결함을 포함한다. 일부 구체예에서, GCCase 활성에서의 결함은 감소된 효소 활성을 포함한다. 일부 구체예에서, 장애는 알파-시누클레인 조절장애를 포함한다. 일부 구체예에서, 장애는 리소좀 저장 질환, 예를 들어, 고세병, 파브리병, 폼페병, 점액다당류증, 또는 다계통 위축증이다. 여기서 기술된 조성물은 고세병을 치료하기 위해 특히 적절하다. 일부 구체예에서, 장애는 신경변성 장애, 예를 들어, 파킨슨병, 알츠하이머병, 또는 루이소체 치매이다.
- [0022] 또다른 양상에서 이를 필요로 하는 대상체에게 여기서 기술된 조성물 중 어느 하나를 투여하는 것을 포함하는 GCCase 경로에서의 기능이상을 치료하는 방법이 제공된다. 일부 구체예에서, 대상체는 인간이다.
- [0023] 또다른 양상에서 0.5 내지 5.0 mg/kg GCB 및 IFG, 예를 들어 IFG는 GCB에 대해 적어도 약 1, 1.25, 1.5, 2, 2.5, 3, 4, 또는 5-배 물 과량임,을 포함하는 조성물을 대상체에게 투여하는 것을 포함하는 GCCase 경로에서의 기능이상을 치료하는 방법, 여기서 상기 조성물은 피하로 투여됨, 이 제공된다. 또다른 양상에서 GCCase 경로에서의 기능이상을 치료하는 방법, 여기서 상기 조성물은 피하로 투여됨,에서의 사용을 위한, 0.5 내지 5.0 mg/kg GCB 및 IFG, 예를 들어 IFG는 GCB에 대해 적어도 약 1, 1.25, 1.5, 2, 2.5, 3, 4, 또는 5-배 물 과량임,을 포함하는 조성물이 제공된다. 또다른 양상에서 GCCase 경로에서의 기능이상을 치료하는 방법에 대한 약제제조에서의, 0.5 내지 5.0 mg/kg GCB 및 IFG, 예를 들어 IFG는 GCB에 대해 적어도 약 1, 1.25, 1.5, 2, 2.5, 3, 4, 또는 5-배 물 과량임,을 포함하는 조성물의 용도가 제공된다. 일부 구체예에서, 상기 조성물 내 IFG는 내인성 혈청 GCB 활성을 증가시키지 않는 양으로 투여된다. 일부 구체예에서, 상기 조성물은 0.8 내지 4.0 mg/kg GCB을 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 조성물은 1.0 내지 3.0 mg/kg GCB을 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 조성물은 1.2 내지 2.0 mg/kg GCB을 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 조성물은 약 1.5 mg/kg GCB을 포함한다.

일부 구체예에서, 상기 조성물은 1.5 mg/kg GCB을 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 조성물은 2.0 내지 5.0 mg/kg GCB을 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 조성물은 2.25 내지 4.5 mg/kg GCB을 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 조성물은 2.25 내지 3.75 mg/kg GCB을 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 조성물은 3.5 내지 5.0 mg/kg GCB을 포함한다. 일부 구체예에서, IFG는 GCB에 대해 1 내지 5 또는 1 내지 10-배 몰 비를 가진다. 일부 구체예에서, IFG는 GCB의 2 내지 10-배 몰 비를 가진다. 일부 구체예에서, IFG는 GCB에 대해 10 내지 30-배 몰 비를 가진다. 일부 구체예에서, IFG는 GCB에 대해 30 내지 100-배 몰 비를 가진다. 일부 구체예에서, IFG는 GCB에 대해 2.5 내지 3.5-배 몰 비를 가진다. 일부 구체예에서, IFG는 GCB에 대해 3-배 몰 비를 가진다. 일부 구체예에서, GCB의 노출, 활성, 또는 생물학적이용율은 예를 들어, IV 투여된 GCB 단독의 동등 양의 노출, 활성, 또는 생물학적이용율에 비해 증가된다. 일부 구체예에서, 비장 내 GCB의 노출, 활성, 또는 생물학적이용율이 증가된다. 일부 구체예에서, 간 내 GCB의 노출, 활성, 또는 생물학적이용율이 증가된다. 일부 구체예에서, 혈청 내 GCB의 노출, 활성, 또는 생물학적이용율이 증가된다.

도면의 간단한 설명

[0024]

- 도 1은 글루코세레브로시다제 (GCB) 및 이소파고민 (IFG) 제제를 제조하기 위한 공정을 나타내는 흐름도 이다.
- 도 2A 및 2B는 IFG를 부가한 후 제 1후 일(2A) 및 IFG를 부가한 2 주 후 (2B) GCB 샘플의 SDS-PAGE 시험을 예시한다. IFG의 pH 조정은 수행되지 않았다.
- 도 3은 pH-조정된 이소파고민 타르트레이트 (IFGT)의 동결건조된 용액을 함유하는 에펜도르프 튜브를 나타낸다.
- 도 4A 및 4B는 IFG를 부가한 당일 (4A) 및 저장 3 일후(4B) GCB 샘플의 SDS-PAGE 시험을 예시한다. IFG는 pH 조정되었다.
- 도 5는 GCB에 부가된 pH-조정된 IFGT의 크기 배제 크로마토그래피 (SEC) 어세이의 결과를 예시한다.
- 도 6A 및 6B는 GCB에 부가된 pH-조정된 IFG의 크기 배제 크로마토그래피 (SEC) 어세이의 결과를 예시한다.
- 도 7A-7D는 GCB에 결합하는 IFG의 표면 플라즈몬공명 연구의 결과를 예시한다.
- 도 8는 GCB:IFG의 1:3 내지 1:100범위의 상이한 IFG 몰 비로 GCB 용점 변화를 평가하는 나노-시차 주사 형광측정법 (나노-DSF) 어세이로부터의 결과를 예시한다.
- 도 9A-9C는 IFGT로 예비배양된벨라글루세라제 알파상에서 수행된 효소 활성 반응의 결과를 예시한다. 도 9A는 합성 비색 pNP-GPS 기질을 사용한 저해 곡선을 나타낸다. 도 9B는 합성 형광측정 4MU-GPS 기질을 사용한 저해 곡선을 나타낸다. 도 9C는 천연 글리코스포리피드C12-GluCer 기질을 사용한 저해를 나타낸다.
- 도 10A는 40 °C에서 3 주 저장된 GCB/IFGT 샘플의 외관을 나타낸다. 도 10B는 3 주 저장된 GCB/IFGT 샘플의 SDS-PAGE 분석을 나타낸다. 그룹 1-3 (G1, G2, G3)의 용액은 투명하게 보인다. 그룹 4 (G4) 용액은 불투명하게 보인다.
- 도 11은 시노물구스 원숭이에서 IFG를 사용한 정맥내 GCB 및 피하 GCB의 약물동력학적 연구로부터 GCB 면역조직화학(적)-분석 (IHC)에 대한 음성 및 양성 대조구를 나타낸다.
- 도 12는 GCB의 피하 주사 (상부 패널) 및 GCB의 정맥내 주사 (하부 패널) 후 다양한 시점에서 2X 확대에서 간 내 GCB의 염색을 나타낸다.
- 도 13은 GCB의 피하 주사 (상부 패널) 및 GCB의 정맥내 주사 (하부 패널) 후 다양한 시점에서 20X 확대에서 간 내 GCB의 염색을 나타낸다.
- 도 14는 GCB의 피하 주사 (상부 패널) 및 GCB의 정맥내 주사 (하부 패널) 후 다양한 시점에서 2X 확대에서 비장 내 GCB의 염색을 나타낸다.
- 도 15는 GCB의 피하 주사 (상부 패널) 및 GCB의 정맥내 주사 (하부 패널) 후 다양한 시점에서 20X 확대에서 비장 내 GCB의 염색을 나타낸다.
- 도 16A 및 16B는 벨라글루세라제 알파 (16A) 및 1:3 몰 비로 IFGT와 함께 벨라글루세라제 알파 (16B) 투여후 간 및 비장 균질화물 내 벨라글루세라제 알파 단백질 및 효소 활성 수준의 어세이의 결과를 나타낸다.
- 도 16C는 IFGT와 함께 벨라글루세라제 알파의 피하 투여후 시노물구스 원숭이 내 GCB의 혈청 활성 수준의 어세이의 결과를 나타낸다.

도 17A 및 17B는 (1:3 내지 1:100)의 상이한 물 비 범위에서 4 mg/kg 벨라글루세라제 알파 및 IFG의 피하 투여 후 GCB의 혈청 생물학적이용율의 ECL ELISA 어세이(17A) 및 GCB 활성 어세이 (17B)의 결과를 나타낸다.

도 18A 및 18B는 10 mg/kg 벨라글루세라제 알파의 정맥내 투여 또는 1:100 물 비에서 4 mg/kg 벨라글루세라제 알파 및 IFG 의 피하 투여후 간 (18A) 및 비장 (18B) 내 GCB 함량 프로파일의 ECL ELISA 어세이의 결과를 나타낸다.

도 19A 및 19B는 1:3 물 비인 4 mg/kg 벨라글루세라제 알파 및 IFG의 피하 투여 후 간 내 (19A) 및 비장 (19B) 내 GCB 함량 프로파일의 ECL ELISA 어세이의 결과를 나타낸다.

도 20A 및 20B는 (1:1 내지 1:30)의 상이한 물 비 범위에서의 1.5 mg/kg 벨라글루세라제 알파 및 IFG의 피하 투여후 GCB의 혈청 생물학적이용율 (20A) 및 GCB 활성 어세이 (20B)의ECL ELISA 어세이의 결과를 나타낸다.

도 21은 IFG 없음, 3nM IFG, 10 nM IFG, 30 nM IFG, 100 nM IFG, 300 nM IFG 및 1000 nM IFG와 함께 37 °C에서 배양된 인간 혈청 내 VPRIV의 활성 어세이의 결과를 나타낸다.

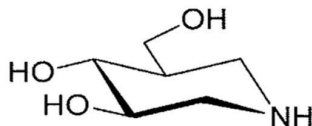
발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0025] 상세한 설명

[0026] 개요

[0027] 글루코세레브로시다제 (GCB)을 포함하는 조성물은 가령 상기 조성물이 액체인 때 증가된 안정성이 유리할 수 있다. GCB 내 3 노출된 유리 티올 그룹은, 예를 들어, GCB분자의 응집에 의해 안정성감소를 유도하는 반응을 겪을 수 있다. 예를 들어, 6의 pH에서 완충액 내 대표적으로 1-2%의 단백질이 1개월 저장에 의해 응집되었고 약 15%는 저장6 개월후 응집되었다. 엄격히 이론 또는 메카니즘에 구속되기를 원하지 않으면서, 단백질 안정성은 많은 인자에 의해 영향을 받는다.

[0028] 이소과고민 (IFG), 예를 들어, 이소과고민 타르트레이트 (IFGT) 부가는 특히 IFG, 예를 들어, IFGT가, GCB에 부가되기 이전 pH 6.0로 조정된 때 시험관 내 GCB의 안정성을 향상시킨다. IFG는 다음 구조를 가진다:



[0029]

[0030] 이론에 구속되고자 하지 않으면서, IFG는 활성 부위 근처에 존재하는 아미노산과 상호 작용하여 안정성을 향상시키는 형태로 GCB를 잠글 수 있다. Shen, J.S. et al., Biochem. Biophys. Res. Comm., 2008, 369:1071-1075 참조. IFG는 GCB를 더 작고 열적으로 더 안정적으로 만들기 위해 GCB와 연관될 수 있기 때문에 IFG는 GCB가 응집되는 것을 방지할 수 있다.

[0031] 본 발명자들은 IFG 대 GCB의 물비가 액체 조성물에서 GCB를 안정화시키는데 중요하다는 것을 보여 주었다. 본 출원 전체에서 보다 상세하게 설명된 바와 같이, 물비가 적어도 1: 2.5 (GCB: IFG) 인 조성물 (즉, 1: x (여기서 x는 2.5 이상))은 실질적으로 적은 GCB 응집 및 분해를 가질 수 있다. 실질적으로 1: 2.5 미만의 물비로 GCB의 실질적으로 더 많은 응집 및 분해가 있을 수 있다.

[0032] 본 발명자들은 또한 적어도 1: 2.5 (GCB: IFG)의 IFG/IFGT 대 GCB의 물비를 갖는 조성물이 피하 투여시 GCB 생체 이용률, 활성, 조직 노출 및 전신 노출을 개선시켰다는 것을 보여 주었다. 개선된 생체 이용률은 간에서의 GCB의 조직 염색 증가, 비장에서의 GCB의 증가된 조직 염색, 혈청에서의 GCB의 증가된 농도 및 혈청에서의 증가된 GCB 활성 중 하나 이상에 의해 검출될 수 있다. 혈청에서 GCB의 단백질 농도 또는 GCB의 효소 활성을 측정함으로써 개선된 전신 노출을 분석할 수 있다. GCB에 대해 IFG, 예를 들어, IFGT의 적어도 1:2.5 (GCB:IFG)의 물 비에서의 부가는 피하 제제에서의 GCB의 생물학적이용율, 활성, 조직 노출, 또는 전신 노출이, 정맥내 제제, 특히 IFG가 없는 제제에서의 GCB 생물학적이용율, 활성, 조직 노출, 또는 전신 노출과 유사한, 또는 더 큰 것을 허용할 수 있다.

[0033] 정의

[0034] 용어 "대상체"는 인간, 비인간 영장류, 영장류, 개코 원숭이, 침팬지, 원숭이, 설치류 (예를 들어, 마우스, 래트), 토끼, 고양이, 개, 말, 소, 양, 염소, 돼지 등을 포함하여 이에 한정되지 않는 임의의 동물을 포함하지만

이에 제한되지 않는 임의의 포유 동물을 지칭한다. 용어 "대상체"는 용어 "환자"와 상호 교환적으로 사용될 수 있다.

- [0035] 용어 "단리된"은 자연 환경이 실질적으로 없는 분자를 지칭한다. 예를 들어, 단리된 단백질은 세포 물질 또는 이로부터 유래된 세포 또는 조직 공급원으로부터의 다른 단백질이 실질적으로 없다. 단리된 단백질을 포함하는 제제는 치료적 조성물로서 투여되기에 충분히 순수, 또는 적어도 70% 내지 80% (w/w) 순수, 더욱 바람직하게는, 적어도 80% 내지 90% (w/w) 순수, 심지어 더욱 바람직하게는, 90 내지 95% 순수; 및, 가장 바람직하게는, 적어도 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.5%, 99.8% 또는 100% (w/w) 순수하다.
- [0036] 여기서 사용된, 용어 "약"은 이 용어에 의해 평가되는 값의 최대 +/-10%를 지칭한다. 예를 들어, 약 50 mM는 50 mM +/- 5 mM를 지칭하고; 약 4%는 4% +/- 0.4%를 지칭한다.
- [0037] 본원에 사용된 어구 "비경구 투여", "비경구 투여" 및 "비경구 투여"는 일반적으로 주사에 의한 장내 및 국소 투여 이외의 투여 방식을 지칭하며, 정맥 내 (IV), 근육 내, 동맥 내, 척수강 내, 캡슐 내, 안와 내, 심장 내, 피내, 복강 내, 기관 내, 피하 (SC), 피하, 관절 내, 피막 내, 피막 하내, 척추 내, 경막 외 및 경 막내 주사 및 주입을 포함한다.
- [0038] 용어 "치료적으로 효과적인 투여량," 및 "치료적으로 효과적인 양"은 증상 예방, 예를 들어, 증상, 예를 들어, 고세병에 걸린 것으로 진단된 대상체에서의 고세병 증상)의 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 예방, 증상 온셋 지연, 또는 고세병 증상완화를 유발하는 화합물의 양을 지칭한다. 치료 유효량은 예를 들어 고세병과 관련된 장애의 하나 이상의 증상의 치료, 예방, 중증도 감소, 발병 지연 및/또는 발생 위험을 감소시키기 에 충분할 것이다. 유효량은 당 업계에 널리 공지된 방법에 의해 그리고 본 설명의 후속 섹션에 기재된 바와 같이 결정될 수 있다.
- [0039] "치료" 및 "치료 방법"이라는 용어는 기존 장애의 치료 및/또는 예방/예방 조치를 지칭한다. 치료를 필요로 하는 사람들은 이미 특정 의학적 장애를 앓고 있는 개인뿐만 아니라 그 장애를 겪을 위험이 있거나 궁극적으로 장애를 앓을 수 있는 사람들을 포함할 수 있다. 치료의 필요성은 예를 들어 장애의 발생, 장애의 존재 또는 진행, 또는 장애를 갖는 대상체의 치료에 대한 수용 가능성과 관련된 하나 이상의 위험 인자의 존재에 의해 평가된다. 치료는 장애의 진행을 늦추거나 역전시키는 것을 포함할 수 있다.
- [0040] 용어 "치료하는"은 장애 (예를 들어, 본원에 기재된 장애)와 관련된 상태, 증상 또는 파라미터를 개선 또는 예방하거나 발병, 진행 또는 장애의 악화를 통계적으로 유의한 정도로 또는 당업자에게 검출 가능한 정도로 예방 하는데 효과적인 양, 방식 및/또는 방식으로 요법을 투여하는 것을 지칭한다. 따라서, 치료는 치료적 및/또는 예방적 이점을 달성할 수 있다. 효과적인 양, 방식, 또는 모드는 대상체에 따라 다를 수 있고 대상체에 맞게 조절될 수 있다. 특정의 구체예에서, GCase 경로에서의 기능이상과 관련된 장애 (예를 들어, 고세병)의 치료는 예를 들어, GCase 경로에서의 기능 이상이 치료되지 않은 대상체에서, 헤모글로빈 농도증가, 혈소판 수준증가, 간 내 부피감소, 비장 내 부피감소, 또는 골격 파라미터변화 (예를 들어, 골 미네랄 밀도증가) 중 하나 이상을 유발하는 치료이다. 특정의 구체예에서, GCase 경로에서의 기능이상과 관련된 장애 (예를 들어, 고세병)의 치료는 예를 들어, GCase 경로에서의 기능 이상이 치료된 대상체에서, 헤모글로빈 농도증가, 혈소판 수준증가, 간 내 부피감소, 비장 내 부피감소, 또는 골격 파라미터변화 (예를 들어, 골 미네랄 밀도증가), 또는 이들 파라미터 중 하나 이상의 유지 중 하나 이상을 유발하는 치료이다.
- [0041] 용어 "조합"은 동일한 환자를 치료하기 위한 2 종 이상의 작용제 또는 요법의 사용을 지칭하며, 여기서 작용제 또는 요법의 사용 또는 작용은 시간이 겹친다. 작용제 또는 요법은 동시에 (예를 들어, 환자에게 투여되는 단일 제제 또는 동시에 투여되는 2 개의 개별 제제로서) 또는 임의의 순서로 순차적으로 투여될 수 있다.
- [0042] 본원에 사용된 용어 "지속 방출", "지속 방출 전달" 및 "지속 방출 약물 전달"은 약물의 단일 투여가 혈액에서 약물의 유효 농도를 장기간, 예를 들어 12 시간 이상 유지함을 의미한다. 예를 들어, 폴리펩티드의 일반적인 투여 경로는 피하, 근육 내 또는 정맥 내 (IV) 주사이다.
- [0043] 용어 "염"은 유리 산 또는 유리 염기의 부가 염을 포함한다. 용어 "약제학적으로 허용되는 염"은 약제학적 적용에 유용성을 제공하는 범위 내에서 독성 프로파일을 갖는 염을 지칭한다. 약제학적으로 허용되는 염이 아닌 염은 높은 결정화도와 같은 특성으로 인해 합성, 정제 또는 제형에 여전히 유용할 수 있다.
- [0044] GCB, 벨라글루세라제, 또는 벨라글루세라제 알파에 대해 용어 "유닛"은 p-니트로페닐 베타-D-글루코피라노사이드의 1 마이크로몰을 p-니트로페놀로, 또는 4-메틸움벨리페론 베타-D-글루코피라노사이드를

4-메틸옵벨리페론로, 분 당 37 °C에서 전환시키기 위해 필요한 이들의 양을 지칭한다.

[0045] **글루코세레브로시다제**

[0046] 벨라글루세라제는 선택된 인간 세포주에서 내인성 β- 글루코세레브로시다제 유전자를 활성화시키는 프로모터와 의 표적화된 재조합과 같은, 인간 세포주에서의 유전자 활성화에 의해 생성된 인간 β- 글루코세레브로시다제이다. 벨라글루세라제는 대략 63 kDa의 단량체 당단백질로서 분비된다. 벨라글루세라제는 천연 인간 단백질과 동일한 서열을 갖는 497 아미노 산으로 구성된다. Zimran et al., Blood Cells Mol. Dis., 2007, 39: 115-118 참조.

[0047] 벨라글루세라제 알파의 글리코실화는 WO 2013/130963에서 보다 상세히 기술된 바와 같이, 글리칸 당 6-9 만노스 단위를 갖는 주로 고-만노스형 글리칸을 함유하는 분비된 단백질을 생성하도록 세포 배양 동안 만노시다제 I 억제제인 키푸넨신을 사용함으로써 변경될 수 있다.

[0048] 이미글루세라제 (Cerezyme®)은 재조합 인간 β-글루코세레브로시다제의 다른 형태이다. 이미글루세라제는 중국 햄스터 난소 (CHO) 세포에서 재조합적으로 제조된다.

[0049] 탈리글루세라제 알파 (Elelyso® 또는 Uplyso®)은 식물 세포내에서 발현되는 재조합 글루코세레브로시다제 (prGCB)이다. 식물 재조합 글루코세레브로시다제는 적어도 미국 특허 공개 번호 2009/0208477 및 2008/0038232 및 PCT 공개 번호 WO 2004/096978 및 WO 2008/132743에 기술된 방법에 의해 얻을 수 있다.

[0050] 재조합 GCB 중 어느 하나는 생물반응기 및 공지된 본업계에서 생산 규모 합성 방법을 사용하여 제조될 수 있다. 임의의 수의 생산 규모 정제 시스템이 사용될 수 있다.

[0051] **이소파고민**

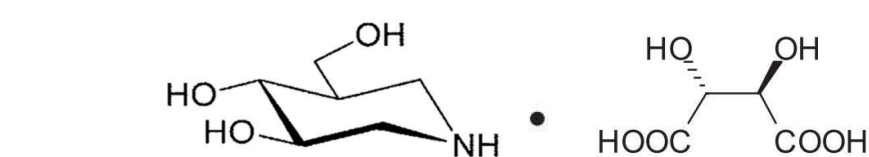
[0052] 다양한 대안적 형태의 이소파고민이 사용될 수 있다. 이들은 이소파고민 타르트레이트, 이소파고민 HCl, 이소파고민 유리 염기 및 이소파고민 시트레이트 중 어느 하나를 포함한다. 일부 구체예에서, 이소파고민은 이소파고민 HCl, 이소파고민 유리 염기 및 이소파고민 시트레이트 중 하나 이상을 포함한다. 일부 구체예에서, 이소파고민은 이소파고민 타르트레이트를 포함한다.

[0053] 이소파고민 HCl은 미국 특허 번호 5,844,102 및 7,501,439에서 기술되어 있다. 이소파고민 HCl은 낮은 용점을 갖는 황색 고체이다. 이소파고민 유리 염기는 이소파고민 HCl을 유리 염기 형태로 전환함에 의해 제조될 수 있다.

[0054] 여기서 기술된 양상 및 구체예 중 어느 하나에서, 이소파고민은 이소파고민 타르트레이트의 형태가 아닐 수 있거나, 또는 GCB/IFG 조성물은 이소파고민 타르트레이트를 포함하지 않을 수 있다.

[0055] **이소파고민 타르트레이트**

[0056] 이소파고민 타르트레이트 (IFGT)은 여기서 개시된 다양한 구체예에서 사용될 수 있고, 특히 본발명을 실시하기 위한 적절한 이소파고민 (IFG)의 특이적 형태이다. IFGT는 다음 식을 가진다:



[0058] IFGT는 IFG와 비교하여, 향상된 합성 제조성을 포함하는 향상된 특성을 가진다. 예를 들어, 용매 가령 물 및 에탄올 내에서 IFGT를 정제하는 것이 더 용이할 수 있다. IFGT는 이소파고민의 다른 공지된 염 형태보다 더 큰 안정성을 가진다. IFGT는 또한 산업적 규모 생산, 예를 들어, 1 kg 초과 생성물 생산에 특히 적절하다.

[0059] GCB 및 IFG를 포함하는 조성물은 종종 분출원 전체를 통해 GCB/IFG 조성물로서 언급된다. GCB 및 IFGT를 포함하는 조성물은 종종 분출원 전체를 통해 GCB/IFGT 조성물로서 언급된다.

[0060] **GCB 대 IFG/IFGT의 몰 비**

[0061] 다양한 구체예에서, 상기 조성물은, 예를 들어, 이소파고민 타르트레이트 (IFGT), 적어도 약 1:1, 1:1.5, 1:2, 또는 1:2.5 (GCB:IFG)의 몰 비로 글루코세레브로시다제 (GCB) 및 이소파고민 (IFG)을 포함한다. GCB 대 IFG, 예를 들어, GCB 대 IFGT의 몰비는 1:1, 1:1.5, 1:2, 1:2.5, 1:2.6, 1:2.7, 1:2.8, 1:2.9, 1:3.0, 1:3.1,

1:3.2, 1:3.3, 1:3.4, 1:3.5, 1:3.6, 1:3.7, 1:3.8, 1:3.9, 1:4.0, 1:4.1, 1:4.2, 1:4.3, 1:4.4, 1:4.5, 1:4.6, 1:4.7, 1:4.8, 1:4.9, 1:5.0, 1:5.1, 1:5.2, 1:5.3, 1:5.4, 1:5.5, 1:5.6, 1:5.7, 1:5.8, 1:5.9, 1:6.0, 1:6.1, 1:6.2, 1:6.3, 1:6.4, 1:6.5, 1:6.6, 1:6.7, 1:6.8, 1:6.9, 1:7.0, 1:7.1, 1:7.2, 1:7.3, 1:7.4, 1:7.5, 1:7.6, 1:7.7, 1:7.8, 1:7.9, 1:8.0, 1:8.1, 1:8.2, 1:8.3, 1:8.4, 1:8.5, 1:8.6, 1:8.7, 1:8.8, 1:8.9, 1:9.0, 1:9.1, 1:9.2, 1:9.3, 1:9.4, 1:9.5, 1:9.6, 1:9.7, 1:9.8, 1:9.9, 1:10.0, 1:10.1, 1:10.2, 1:10.3, 1:10.4, 1:10.5, 1:10.6, 1:10.7, 1:10.8, 1:10.9, 1:11.0, 1:11.1, 1:11.2, 1:11.3, 1:11.4, 1:11.5, 1:11.6, 1:11.7, 1:11.8, 1:11.9, 1:12.0, 1:12.1, 1:12.2, 1:12.3, 1:12.4, 1:12.5, 1:12.6, 1:12.7, 1:12.8, 1:12.9, 1:13.0, 1:13.1, 1:13.2, 1:13.3, 1:13.4, 1:13.5, 1:13.6, 1:13.7, 1:13.8, 1:13.9, 1:14.0, 1:14.1, 1:14.2, 1:14.3, 1:14.4, 1:14.5, 1:14.6, 1:14.7, 1:14.8, 1:14.9, 1:15.0, 1:15.1, 1:15.2, 1:15.3, 1:15.4, 1:15.5, 1:15.6, 1:15.7, 1:15.8, 1:15.9, 1:16.0, 1:16.1, 1:16.2, 1:16.3, 1:16.4, 1:16.5, 1:16.6, 1:16.7, 1:16.8, 1:16.9, 1:17.0, 1:17.1, 1:17.2, 1:17.3, 1:17.4, 1:17.5, 1:17.6, 1:17.7, 1:17.8, 1:17.9, 1:18.0, 1:18.1, 1:18.2, 1:18.3, 1:18.4, 1:18.5, 1:18.6, 1:18.7, 1:18.8, 1:18.9, 1:19.0, 1:19.1, 1:19.2, 1:19.3, 1:19.4, 1:19.5, 1:19.6, 1:19.7, 1:19.8, 1:19.9, 1:20.0, 1:20.1, 1:20.2, 1:20.3, 1:20.4, 1:20.5, 1:20.6, 1:20.7, 1:20.8, 1:20.9, 1:21.0, 1:21.1, 1:21.2, 1:21.3, 1:21.4, 1:21.5, 1:21.6, 1:21.7, 1:21.8, 1:21.9, 1:22.0, 1:22.1, 1:22.2, 1:22.3, 1:22.4, 1:22.5, 1:22.6, 1:22.7, 1:22.8, 1:22.9, 1:23.0, 1:23.1, 1:23.2, 1:23.3, 1:23.4, 1:23.5, 1:23.6, 1:23.7, 1:23.8, 1:23.9, 1:23.9, 1:24.0, 1:24.1, 1:24.2, 1:24.3, 1:24.4, 1:24.5, 1:24.6, 1:24.7, 1:24.8, 1:24.9, 1:25.0, 1:25.1, 1:25.2, 1:25.3, 1:25.4, 1:25.5, 1:25.6, 1:25.7, 1:25.8, 1:25.9, 1:26.0, 1:26.1, 1:26.2, 1:26.3, 1:26.4, 1:26.5, 1:26.6, 1:26.7, 1:26.8, 1:26.9, 1:27.0, 1:27.1, 1:27.2, 1:27.3, 1:27.4, 1:27.5, 1:27.6, 1:27.7, 1:27.8, 1:27.9, 1:28.0, 1:28.1, 1:28.2, 1:28.3, 1:28.4, 1:28.5, 1:28.6, 1:28.7, 1:28.8, 1:28.9, 1:29.0, 1:29.1, 1:29.2, 1:29.3, 1:29.4, 1:29.5, 1:29.6, 1:29.7, 1:29.8, 1:29.9, 또는 1:30.0일 수 있다.

[0062] GCB 대 IFG, 예를 들어, GCB 대 IFGT의 몰비는 1:2.5 내지 1:3.5, 1:2.6 내지 1:3.4, 1:2.7 내지 1:3.5, 1:2.7 내지 1:3.4, 1:2.5 내지 1:3.3, 1:2.8 내지 1:3.5, 1:2.8 내지 1:3.3, 1:2.7 내지 1:3.2, 1:2.6 내지 1:3.1, 1:2.5 내지 1:3.0, 1:2.9 내지 1:3.3, 1:2.8 내지 1:3.2, 1:2.7 내지 1:3.1, 1:2.6 내지 1:3.0, 1:2.5 내지 1:2.9, 1:3.0 내지 1:3.4, 또는 1:3.1 내지 1:3.5일 수 있다.

[0063] GCB 대 IFG, 예를 들어, GCB 대 IFGT의 몰비는 1:7 내지 1:33, 1:8 내지 1:32, 1:9 내지 1:33, 1:7 내지 1:31, 1:9 내지 1:31, 1:8 내지 1:30, 1:7 내지 1:29, 1:10 내지 1:32, 1:11 내지 1:33, 1:7 내지 1:29, 1:10 내지 1:30, 1:9 내지 1:29, 1:8 내지 1:28, 1:7 내지 1:27, 1:11 내지 1:31, 1:12 내지 1:32, 1:13 내지 1:33, 1:11 내지 1:29, 1:10 내지 1:28, 1:9 내지 1:27, 1:8 내지 1:26, 1:7 내지 1:25, 1:12 내지 1:30, 1:13 내지 1:31, 1:14 내지 1:32, 1:15 내지 1:33, 1:13 내지 1:29, 1:12 내지 1:28, 1:11 내지 1:27, 1:10 내지 1:26, 1:9 내지 1:25, 1:8 내지 1:24, 1:7 내지 1:23, 1:14 내지 1:30, 1:15 내지 1:31, 1:16 내지 1:32, 1:17 내지 1:33, 1:14 내지 1:28, 1:13 내지 1:27, 1:12 내지 1:26, 1:11 내지 1:25, 1:10 내지 1:24, 1:9 내지 1:23, 1:8 내지 1:22, 1:7 내지 1:21, 1:15 내지 1:29, 1:16 내지 1:30, 1:17 내지 1:31, 1:18 내지 1:32, 1:19 내지 1:33, 1:15 내지 1:27, 1:14 내지 1:26, 1:13 내지 1:25, 1:12 내지 1:24, 1:11 내지 1:23, 1:10 내지 1:22, 1:9 내지 1:21, 1:8 내지 1:20, 1:7 내지 1:19, 1:16 내지 1:28, 1:17 내지 1:29, 1:18 내지 1:30, 1:19 내지 1:31, 1:20 내지 1:32, 또는 1:21 내지 1:33일 수 있다.

[0064] GCB 대 IFG, 예를 들어, GCB 대 IFGT의 몰비는 1:16 내지 1:26, 1:15 내지 1:25, 1:14 내지 1:24, 1:13 내지 1:23, 1:12 내지 1:22, 1:11 내지 1:31, 1:10 내지 1:30, 1:9 내지 1:29, 1:8 내지 1:28, 1:7 내지 1:27, 1:17 내지 1:27, 1:18 내지 1:28, 1:19 내지 1:29, 1:20 내지 1:30, 1:21 내지 1:31, 1:22 내지 1:32, 1:23 내지 1:33, 1:17 내지 1:25, 1:14 내지 1:24, 1:13 내지 1:23, 1:12 내지 1:22, 1:11 내지 1:21, 1:10 내지 1:20, 1:9 내지 1:19, 1:18 내지 1:26, 1:19 내지 1:27, 1:20 내지 1:28, 1:21 내지 1:29, 1:22 내지 1:30, 1:23 내지 1:31, 1:18 내지 1:24, 1:17 내지 1:23, 1:16 내지 1:22, 1:15 내지 1:21, 1:14 내지 1:20, 1:13 내지 1:19, 1:12 내지 1:18, 1:11 내지 1:17, 1:19 내지 1:25, 1:20 내지 1:26, 1:21 내지 1:27, 1:22 내지 1:28, 1:23 내지 1:29, 1:24 내지 1:30, 1:19 내지 1:23, 1:17 내지 1:21, 1:15 내지 1:19, 1:13 내지 1:17, 1:11 내지 1:15, 1:9 내지 1:13, 1:7 내지 1:11, 1:21 내지 1:25, 1:23 내지 1:27, 1:25 내지 1:29, 1:27 내지 1:31, 1:29 내지 1:33, 1:20 내지 1:23, 1:18 내지 1:21, 1:16 내지 1:19, 1:14 내지 1:17, 1:12 내지 1:15, 1:10 내지 1:13, 1:8 내지 1:11, 1:22 내지 1:25, 1:24 내지 1:27, 1:26 내지 1:29, 1:28 내지 1:31, 또는 1:30 내지 1:33일 수 있다.

- [0065] GCB 대 IFG, 예를 들어, GCB 대 IFGT의 몰비는 1:31, 1:32, 1:33, 1:34, 1:35, 1:36, 1:37, 1:38, 1:39, 1:40, 1:41, 1:42, 1:43, 1:44, 1:45, 1:46, 1:47, 1:48, 1:49, 1:50, 1:51, 1:52, 1:53, 1:54, 1:55, 1:56, 1:57, 1:58, 1:35, 1:59, 1:60, 1:61, 1:62, 1:63, 1:64, 1:65, 1:66, 1:67, 1:68, 1:69, 1:70, 1:71, 1:72, 1:73, 1:74, 1:75, 1:76, 1:77, 1:78, 1:79, 1:80, 1:81, 1:82, 1:83, 1:84, 1:85, 1:86, 1:87, 1:88, 1:89, 1:90, 1:91, 1:92, 1:93, 1:94, 1:95, 1:96, 1:97, 1:98, 1:99, 또는 1:100일 수 있다.
- [0066] GCB 대 IFG, 예를 들어, GCB 대 IFGT의 몰비는 1:30 내지 1:100, 1:30 내지 1:80, 1:40 내지 1:90, 1:50 내지 1:100, 1:30 내지 1:60, 1:40 내지 1:70, 1:50 내지 1:80, 1:60 내지 1:90, 1:70 내지 1:100, 1:30 내지 1:50, 1:40 내지 1:60, 1:50 내지 1:70, 1:60 내지 1:80, 1:70 내지 1:90, 1:80 내지 1:100, 1:30 내지 1:40, 1:40 내지 1:50, 1:50 내지 1:60, 1:60 내지 1:70, 1:70 내지 1:80, 1:80 내지 1:90, 또는 1:90 내지 1:100일 수 있다.
- [0067] 여기서 기술된 다른 다양한 구체예에서, 상기 조성물은 적어도 약 1:2.5의 몰 비로 글루코세레브로시다제 (GCB) 및 이소파고민 타르트레이트 (IFGT)을 포함한다.
- [0068] 여기서 기술된 다른 다양한 구체예에서, 상기 조성물은 적어도 약 1:2.5의 몰 비로 글루코세레브로시다제 (GCB) 및 이소파고민 시트레이트를 포함한다.
- [0069] 여기서 기술된 다른 다양한 구체예에서, 상기 조성물은 적어도 약 1:2.5의 몰 비로 글루코세레브로시다제 (GCB) 및 이소파고민 HCl을 포함한다.
- [0070] 여기서 기술된 다른 다양한 구체예에서, 상기 조성물은 적어도 약 1:2.5의 몰 비로 글루코세레브로시다제 (GCB) 및 이소파고민 유리 염기를 포함한다.
- [0071] 여기서 기술된 다른 다양한 구체예에서, 상기 조성물은 적어도 약 1:2.5의 몰 비로 글루코세레브로시다제 (GCB) 및 IFGT을 포함하지 않는 이소파고민을 포함한다.
- [0072] **GCB 농도**
- [0073] 상기 조성물 중 어느 하나 내 GCB의 농도는 약 0.1 내지 약 40 mg/ml, 약 0.5 내지 약 10 mg/ml, 약 5 내지 약 15 mg/ml, 약 10 내지 약 20 mg/ml, 약 15 내지 약 25 mg/ml, 약 20 내지 약 30 mg/ml, 약 25 내지 약 35 mg/ml, 약 30 내지 약 40 mg/ml, 약 2 내지 약 8 mg/ml, 약 5 내지 약 11 mg/ml, 약 8 내지 약 14 mg/ml, 약 11 내지 약 17 mg/ml, 약 14 내지 약 20 mg/ml, 약 17 내지 약 23 mg/ml, 약 20 내지 약 26 mg/ml, 약 23 내지 약 29 mg/ml, 약 26 내지 약 32 mg/ml, 약 29 내지 약 35 mg/ml, 약 32 내지 약 38 mg/ml, 약 2 내지 약 5 mg/ml, 약 5 내지 약 8 mg/ml, 약 8 내지 약 11 mg/ml, 약 11 내지 약 14 mg/ml, 약 14 내지 약 17 mg/ml, 약 17 내지 약 20 mg/ml, 약 20 내지 약 23 mg/ml, 약 23 내지 약 26 mg/ml, 약 26 내지 약 29 mg/ml, 약 29 내지 약 32 mg/ml, 약 32 내지 약 35 mg/ml, 약 35 내지 약 38 mg/ml, 약 0.5 mg/ml, 약 1 mg/ml, 약 2 mg/ml, 약 3 mg/ml, 약 4 mg/ml, 약 5 mg/ml, 약 6 mg/ml, 약 7 mg/ml, 약 8 mg/ml, 약 9 mg/ml, 약 10 mg/ml, 약 11 mg/ml, 약 12 mg/ml, 약 13 mg/ml, 약 14 mg/ml, 약 15 mg/ml, 약 16 mg/ml, 약 17 mg/ml, 약 18 mg/ml, 약 19 mg/ml, 약 20 mg/ml, 약 21 mg/ml, 약 22 mg/ml, 약 23 mg/ml, 약 24 mg/ml, 약 25 mg/ml, 약 26 mg/ml, 약 27 mg/ml, 약 28 mg/ml, 약 29 mg/ml, 약 30 mg/ml, 약 31 mg/ml, 약 32 mg/ml, 약 33 mg/ml, 약 34 mg/ml, 약 35 mg/ml, 약 36 mg/ml, 약 37 mg/ml, 약 38 mg/ml, 약 39 mg/ml, 또는 약 40 mg/ml일 수 있다.
- [0074] GCB의 농도는 50 유닛/ml 내지 200 유닛/ml, 70 유닛/ml 내지 160 유닛/ml, 80 유닛/ml 내지 175 유닛/ml, 90 유닛/ml 내지 190 유닛/ml, 60 유닛/ml 내지 145 유닛/ml, 50 유닛/ml 내지 130 유닛/ml, 80 유닛/ml 내지 140 유닛/ml, 70 유닛/ml 내지 120 유닛/ml, 60 유닛/ml 내지 100 유닛/ml, 50 유닛/ml to 85 유닛/ml, 90 유닛/ml 내지 160 유닛/ml, 100 유닛/ml 내지 180 유닛/ml, 120 유닛/ml 내지 200 유닛/ml, 90 유닛/ml 내지 125 유닛/ml, 80 유닛/ml 내지 105 유닛/ml, 70 유닛/ml 내지 100 유닛/ml, 60 유닛/ml to 90 유닛/ml, 50 유닛/ml to 80 유닛/ml, 100 유닛/ml 내지 140 유닛/ml, 115 유닛/ml 내지 160 유닛/ml, 130 유닛/ml 내지 180 유닛/ml, 145 유닛/ml 내지 200 유닛/ml, 100 유닛/ml 내지 115 유닛/ml, 90 유닛/ml 내지 105 유닛/ml, 80 유닛/ml to 95 유닛/ml, 70 유닛/ml to 85 유닛/ml, 60 유닛/ml to 75 유닛/ml, 50 유닛/ml to 65 유닛/ml, 110 유닛/ml 내지 125 유닛/ml, 120 유닛/ml 내지 135 유닛/ml, 130 유닛/ml 내지 145 유닛/ml, 140 유닛/ml 내지 160 유닛/ml, 160 유닛/ml 내지 180 유닛/ml, 180 유닛/ml 내지 200 유닛/ml, 약 50 유닛/ml, 약 60 유닛/ml, 약 70 유닛/ml, 약 80 유닛/ml, 약 90 유닛/ml, 약 100 유닛/ml, 약 110 유닛/ml, 약 120 유닛/ml, 약 130 유닛/ml, 약 140 유닛/ml, 약 150 유닛/ml, 약 160 유닛/ml, 약 170 유닛/ml, 약 180 유닛/ml, 약 190 유닛/ml, 약 200 유닛/ml, 50 유닛/ml, 60 유닛/ml, 70 유닛/ml, 80 유닛/ml, 90 유닛/ml, 100 유닛/ml, 110 유닛/ml, 120 유닛/ml

/ml, 130 유닛/ml, 140 유닛/ml, 150 유닛/ml, 160 유닛/ml, 170 유닛/ml, 180 유닛/ml, 190 유닛/ml, 또는 200 유닛/ml일 수 있다.

[0075] 약제학적 조성물

[0076] 약제학적 조성물은 "치료적으로 효과적인 양"의 GCB/IFG, 예를 들어, GCB/IFGT, 여기서 기술된 조성물을 포함할 수 있다. 그러한 효과적인 양은 투여된 조성물의 효과에 기초하여 결정될 수 있다. GCB/IFG, 예를 들어, GCB/IFGT, 조성물의 치료적으로 효과적인 양은 또한 질환 상태, 연령, 성별 및 개체의 체중, 및 원하는 반응을 유도하는 조성물의 능력, 예를 들어, 병태 또는 장애, 예를 들어, 글루코세레브로시다제 결핍, 예를 들어, 고세병의 적어도 하나의 증상의 완화과 같은 요인에 따라 달라질 수 있다. 치료적 유효량은 또한 조성물의 임의의 독성 또는 유해 효과보다 치료적 이로운 효과가 더 큰 양이다.

[0077] GCB/IFG 조성물은 IFGT가 없을 수 있다.

[0078] 본발명의 약제학적 조성물은 그의 의도된 투여경로에 적합하도록 제제화될 수 있다. 예를 들어, GCB/IFG, 예를 들어, GCB/IFGT, 조성물은 비경구 모드, 예를 들어, 정맥내, 피하, 복강내, 또는 근육내 주사로 투여될 수 있다. 다양한 구체예에서, 투여 경로는 정맥내이다. 다양한 구체예에서, 투여 경로 피하이다. 비경구 적용에 사용되는 용액 또는 현탁액은 다음 성분을 포함할 수 있다: 주사용 물, 식염수, 고정 유, 폴리에틸렌 글리콜, 글리세린, 프로필렌 글리콜 또는 다른 합성 용매와 같은 멸균 희석제; 항생제 가령 벤질 알콜 또는 메틸 파라벤; 항산화제 가령 아스코르브산 또는 소듐 바이설파이트; 킬레이트제 가령 에틸렌디아민테트라아세트산; 완충액 가령 아세테이트, 시트레이트 또는 포스페이트 및 장력조정제 가령 소듐 클로라이드 또는 텍스트로스. 약제학적 조성물의 pH는 산 또는 염기, 가령 염산 또는 소듐 히드록사이드로 조정될 수 있다. 비경구 제제는 앰플, 일회용 주사기 또는 유리 또는 플라스틱으로 만들어진 다중 용량 바이알에 포함될 수 있다.

[0079] pH

[0080] pH는 여기서 기술된 다양한 GCB/IFG 및 GCB/IFGT 조성물에서 GCB의 안정성에 영향을 미칠 수 있다. pH는 GCB의 형태 및/또는 응집 및/또는 분해 및/또는 반응성에 영향을 미칠 수 있다. 예를 들어, 더 높은 pH에서, 산소는 더욱 반응성일 수 있다. pH는 바람직하게는 7.0 미만, 더욱 바람직하게는 약 4.5 내지 약 6.5, 더욱 바람직하게는 약 5.0 내지 약 6.0, 및 더욱 바람직하게는 약 5.5 내지 약 5.8의 범위 내, 더욱 바람직하게는 약 5.7이다. GCB를 사용하면 응집은 pH 7.0 이상에서 바람직하지 않은 수준에 도달할 수 있으며 분해 (예: 단편화)는 pH 4.5 또는 5.0 미만에서 또는 pH 6.5 또는 7.0 이상에서 바람직하지 않은 수준에 도달할 수 있다.

[0081] 시험 GCB/IFG, 예를 들어 GCB/IFGT, 조성물을 제공하고, 조성물을 후보 pH로 조정하고, 산소 조성물을 퍼지함으로써 후보 pH를 시험할 수 있다. 후보 pH에서 조성물 내 GCB의 안정성은 미리 결정된 시간에, 예를 들어 응집 또는 분해 퍼센트로서 측정될 수 있다. 측정된 안정성은 하나 이상의 표준과 비교될 수 있다. 예를 들어, 적합한 표준은 조성물의 pH가 조정되지 않는 것을 제외하고는 시험 조성물과 유사한 조성물일 것이다. pH 조정 및 비 pH 조정 조성물의 안정성은 이후 비교될 수 있다. GCB가 비교 표준 조성물의 것보다 더 안정하다면 GCB/IFG, 예를 들어 GCB/IFGT 조성물이 더 적합할 수 있다. 이 표준과 비교하여 안정성을 증가시키는 시험 처리에 의해 적합성을 나타낼 수 있다. 예를 들어, 비교 표준 GCB/IFG 조성물의 pH가 5.5이지만 GCB/IFG 조성물의 pH가 6.3일 때 증가된 GCB 안정성이 보이는 경우, pH 5.5 보다 pH 6.3에서 GCB가 보다 안정하기 때문에 pH 6.3의 조성물이 더 적합하다.

[0082] 단백질 조성물의 pH를 조정하기 위해 사용될 수 있는 완충제는 히스티딘, 시트레이트, 포스페이트, 글리신, 속 시네이트, 아세테이트, 글루타메이트, 트리스, 타르트레이트, 아스파테이트, 말레에이트 및 락테이트를 포함한다.

[0083] GCB 안정성 어세이

[0084] 단백질 안정성은 단백질 응집 또는 단백질 분해를 측정함으로써 측정될 수 있다. 단백질 응집은 예를 들어 크기 배제 크로마토그래피 (SEC), 비변성 PAGE, 또는 크기를 결정하기 위한 다른 방법 등을 포함하는 다양한 방법에 의해 결정될 수 있다. 단백질 분해는, 예를 들어, 역상 HPLC, 비-변성 PAGE, 이온-교환 크로마토그래피, 펩티드 맵핑, 또는 유사한 방법에 의해 결정될 수 있다.

[0085] 본원에 사용된 안정성은 단백질 구조 (예를 들어, 단백질 구조의 변화를 최소화 또는 방지, 예를 들어, 단백질 응집 또는 단백질 분해 (예를 들어, 단편화)) 및/또는 단백질의 생물학적 활성, 예를 들어, 기질을 생성물로 변환하는 능력과 같은 파라미터를 포함한다.

- [0086] GCB 안정성은, 예를 들어, 단백질 응집, 단백질 분해, 또는 GCB의 생물학적 활성수준 측정에 의해 측정될 수 있다. GCB의 응집은 크기 배제 크로마토그래피, 비-변성 PAGE, 및 크기를 결정하기 위한 다른 방법 등을 포함하는 다양한 방법에 의해 결정될 수 있다. 예를 들어, 상기 조성물은 저장 (예를 들어, 2-8℃의 온도에서 최대 3, 6, 9, 12, 또는 24 개월 (또는 더 긴) 기간 동안 저장) 이전 상기 조성물 내에 있던 단백질 응집양과 비교하여 GCB 단백질 응집의 양 (예를 들어, 크기 배제 크로마토그래피로 측정된)에서 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 또는 50% 미만 증가를 가질 수 있다.
- [0087] 단백질 분해는 역상 HPLC, 비-변성 PAGE, 이온-교환 크로마토그래피, 펩티드 맵핑, 또는 유사한 방법을 포함하는 다양한 방법에 의해 결정될 수 있다. 예를 들어, 상기 조성물은 저장 (예를 들어, 2-8℃의 온도에서 최대 3, 6, 9, 12, 또는 24 개월 (또는 더 긴) 기간 동안 저장) 이전 상기 조성물 내에 있던 GCB의 분해양과 비교하여 GCB 단백질 분해의 양 (예를 들어, 역상 HPLC로 측정된)에서 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 또는 50% 미만 증가를 가질 수 있다. GCB의 생물학적 활성은 예를 들어, 시험 관내 또는 생체 내 분석, 예를 들어 ELISA (예를 들어, 결합 또는 효소 활성을 측정하기 위해) 및 다른 효소 분석 (예를 들어, 분광 광도, 형광 측정, 열량 측정, 화학 발광, 방사선 측정, 또는 크로마토그래피 분석법), 키나제 분석법 등에 의해 측정될 수 있다. 예를 들어, 상기 조성물은 저장 (예를 들어, 2-8℃의 온도에서 최대 3, 6, 9, 12, 또는 24 개월 (또는 더 긴) 기간 동안 저장) 이전 상기 조성물 내에 있던 생물학적 활성양과 비교하여 생물학적 활성 (예를 들어, 시험 관 내 어세이로 측정된)에서 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 또는 50% 미만 감소를 가질 수 있다.
- [0088] **항산화제 및 안정화제**
- [0089] 여기서 기술된 GCB/IFG 및 GCB/IFGT 조성물은 항산화제를 추가로 포함할 수 있다. 하나의 적절한 항산화제는 시스테인이다. 시스테인은 0.030% 내지 0.100%, 0.050% 내지 0.080%, 0.040% 내지 0.070%, 0.030% 내지 0.060%, 0.060% 내지 0.090%, 0.070% 내지 0.100%, 0.065% 내지 0.080%, 0.060% 내지 0.075%, 0.055% 내지 0.070%, 0.050% 내지 0.065%, 0.070% 내지 0.085%, 0.075% 내지 0.090%, 약 0.065%, 약 0.070%, 약 0.075%, 약 0.080%, 0.065%, 0.070%, 0.075%, 또는 0.080%에서 존재할 수 있다. 이론에 구속되지 않음으로써, 시스테인은 GCB를 추가로 안정화시킬 수 있다.
- [0090] 여기서 기술된 GCB/IFG 및 GCB/IFGT 조성물은 탄수화물 가령 수크로스 또는 트레할로스를 추가로 포함할 수 있다. 탄수화물, 예를 들어, 수크로스 또는 트레할로스는 12% 내지 19%, 13% 내지 18%, 14% 내지 17%, 12% 내지 15%, 13% 내지 16%, 15% 내지 17%, 약 16%, 또는 16%에서 존재할 수 있다. 이론에 구속되지 않음으로써, 수크로스 또는 트레할로스는 티올 (-SH) 그룹의 이용가능성을 감소시킴에 의해 GCB를 추가로 안정화시킬 수 있다.
- [0091] 본원의 GCB/IFG 및 GCB/IFGT 조성물은 세제를 추가로 포함할 수 있다. 세제는 폴리소르베이트 20 (이는 특히 본발명을 실시하기 위해 적절하다) 또는 임의의 수의 폴록소머-기초 화합물일 수 있다.
- [0092] 특정의 구체예에서, GCB의 안정성은 탄수화물 (수크로스 또는 트레할로스), 항산화제, 또는 탄수화물 및 항산화제 둘 다 가 결합된 것에서 상이한 조성물 내 GCB의 안정성보다 예비-선택된 조건하에서 적어도 5-80% 초과 (예를 들어, 적어도 약 5%, 적어도 약 10%, 적어도 약 15%, 적어도 약 20%, 적어도 약 25%, 적어도 약 30%, 적어도 약 35%, 적어도 약 40%, 적어도 약 45%, 적어도 약 50%, 적어도 약 55%, 적어도 약 60%, 적어도 약 65%, 적어도 약 70%, 적어도 약 75%, 또는 적어도 약 80% 초과)이다.
- [0093] GCB/IFG 및 GCB/IFGT 조성물은 용기에 저장하기 전에 산소로 퍼지될 수 있다. 또한, 용기는 산소의 침입을 방지하기 위해 이상적으로 기밀 상태이다. 본원에 기재된 조성물, 예를 들어 GCB를 함유하는 액체 조성물 중 GCB는 연장된 안정성을 가질 수 있다. 예를 들어, 예비-선택된 조건, 예를 들어, 최대 3, 6, 9, 12, 또는 24 개월 (또는 일부 구체예에서 더 긴)의 기간 동안 2-8 ℃의 온도에서 가스 기밀 용기 내 저장 하에서, 상기 조성물 내 GCB는 저장 이전 가졌던 안정성의 적어도 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 99, 또는 100%를 보유했 것이다.
- [0094] 0.075 % 시스테인, 16 % 수크로스를 함유하는 조성물을 제공하고, pH를 5.7로 조정하고, GCB를 후보 농도로 조정하고, O₂의 조성물을 퍼지함으로써 적합한 단백질 농도를 시험할 수 있다. 미리 결정된 시간에, 예를 들어 응집 또는 분해 퍼센트로서 측정된과 후보 농도에서 GCB/IFG, 예를 들어, GCB/IFGT, 조성물 내 GCB의 안정성은 하나의 이상 표준과 비교된다. 각 농도에서 GCB의 안정성을 비교한다. 적합성은 본원에 기재된 농도보다 안정성에 필적하거나 더 우수한 효과를 갖는 후보 농도에 의해 보여 질 수 있다.
- [0095] GCB 안정성은 본 출원 전체에 기술된 임의의 방법, 예를 들어 단백질 응집 또는 단백질 분해를 측정함으로써 측

정될 수 있다. 단백질 응집은 예를 들어 크기 배제 크로마토그래피, 비변성 PAGE, 또는 크기를 결정하기 위한 다른 방법 등에 의해 결정될 수 있다. 단백질 분해는 예를 들어 역상 HPLC, 비변성 PAGE, 이온 교환 크로마토그래피, SEC, SEC HPLC, 펩티드 맵핑 또는 유사한 방법에 의해 결정될 수 있다.

[0096] 계면활성제

[0097] 여기서 기술된 GCB/IFG 및 GCB/IFGT 조성물은 하나의 이상 계면활성제를 추가로 포함할 수 있다. 이론에 구속되지 않고, 계면 활성제는 교반 또는 배송 중에 단백질 분해를 감소시킬 수 있는 공기/액체 계면을 제공함으로써 단백질 안정성을 증가시킬 수 있다. 특정 액체 조성물에서 단백질 분해를 유발하지 않는 것과 같이 단백질 안정성을 증가시키는 계면 활성제가 선택될 수 있다. 예시적인 계면 활성제는 폴록사머 188 또는 플루로닉 F68이다. 계면 활성제는 약 0.005 % 내지 약 5 %, 예를 들어, 약 0.01 % 내지 약 1 %, 예를 들어, 약 0.025 % 내지 약 0.5 %, 예를 들어, 약 0.03 % 내지 약 0.25 %, 약 0.04 내지 약 0.1 %, 예를 들어, 약 0.05 % 내지 약 0.075 %, 예를 들어, 0.05 %의 양으로 존재할 수 있다. 이상적인 계면 활성제는 GCB에 의해 변형되거나 절단되지 않은 계면 활성제이다.

[0098] 예를 들어, 후보 계면 활성제는 2 mg/ml GCB, 양의 IFG, 0.075 % 시스테인, 16 % 수크로스를 함유하는 조성물을 제공한 다음 pH를 5.7로 조정된 후 후보 계면 활성제를 첨가하고, 상기 O₂ 조성물을 퍼지함으로써 시험될 수 있다. 후보 계면 활성제를 함유하는 GCB/IFG 조성물의 안정성은 하나 이상의 표준과 비교하여 미리 결정된 시간에 예를 들어 응집 또는 분해 백분율로서 측정된다. 예를 들어, 적합한 표준은 계면 활성제가 조성물에 첨가되지 않는 것을 제외하고는 시험 조건과 유사한 조성물일 것이다. 처리된 (계면 활성제를 함유하는) 조성물 및 처리되지 않은 (계면 활성제가 없는) 조성물의 안정성은 "실제" 시나리오, 예를 들어 저장 및 운송을 시뮬레이션하는 조건에서 비교될 수 있다. 폴록사머 188 대신에 다른 계면 활성제가 사용된다는 점을 제외하고, 표준은 시험 조성물과 유사한 조성물일 수 있다. 그 후 폴록사머 188은 비교의 기준이 될 것이다. 본 명세서에 기재된 계면 활성제보다 안정성에서 필적하거나 더 우수한 효과를 갖는 후보 계면 활성제에 의해 적합성이 보여질 수 있다. 후보 계면 활성제가 적합한 것으로 결정되면 (예를 들어, 표준 중 하나와 비교하여 조성물의 안정성을 증가시킨다), 후보 계면 활성제의 농도를 정제할 수 있다. 예를 들어, 농도는 값의 범위에 걸쳐 증가 또는 감소될 수 있고, 표준 및 시험되는 다른 농도와 비교하여 어느 농도가 안정성의 최대 증가를 야기하는지를 결정한다.

[0099] 대안적으로, 두 개 이상의 계면활성제의 조합이 여기서 기술된 조성물에서 사용된다. 조합의 적합성은 계면 활성제의 시험 조합을 갖는 GCB/IFG 조성물의 안정성을, 폴록사머 188을 사용한 GCB/IFG 조성물의 안정성과 비교함으로써 상기 기재된 바와 같이 시험될 수 있다.

[0100] 단백질 안정성은 예를 들어, 단백질 응집 또는 단백질 분해를 측정함으로써 측정될 수 있다. 단백질 응집은 예를 들어 크기 배제 크로마토그래피, 비변성 PAGE, 또는 크기를 결정하기 위한 다른 방법 등에 의해 결정될 수 있다. 단백질 분해는, 예를 들어, 역상 HPLC, 비-변성 PAGE, 이온-교환 크로마토그래피, 펩티드 지도화, 또는 유사한 방법에 의해 결정될 수 있다.

[0101] 약제학적으로 허용되는 염

[0102] 약제학적 조성물은 염 또는 약제학적으로 허용되는 염을 추가로 포함할 수 있다.

[0103] 적절한 약제학적으로-허용되는 산 부가 염은 무기 산 또는 유기 산으로부터 제조될 수 있다. 무기산의 예에는 염산, 브롬화 수소산, 요오드화 수소산, 질산, 탄산, 황산 및 인산이 포함된다. 적절한 유기산은 유기산의 지방족, 지환족, 방향족, 지방족, 헤테로시클릭, 카르복실산 및 술폰산 부류 중에서 선택될 수 있으며, 이의 예에는 포름산, 아세트산, 프로피온산, 숙신산, 글리콜산, 글루콘산, 락트산, 말산, 타르타르산, 시트르산, 아스코르브산, 글루쿠론산, 말레산, 푸마르산, 피루브산, 아스파르트산, 글루탐산, 벤조산, 안트라닐산, 4-히드록시벤조산, 페닐 아세트산, 만델릭산, 엠본산 (파모산), 메탄 술폰산, 에탄 술폰산, 벤젠술폰산, 판토텐산, 트리플루오로메탄 술폰산, 2-히드록시에탄 술폰산, p-톨루엔술폰산, 설파닐산, 시클로헥실 아미노술폰산, 스테아르산, 알긴산, 베타-히드록시부티르산, 살리실산, 갈락타르산, 옥살산, 말론산 및 갈락투론산이 포함된다. 약제학적으로 허용되지 않는 산 부가 염의 예는 예를 들어 퍼클로레이트 및 테트라플루오로보레이트를 포함한다. 이들 산 부가 염은 모두 예를 들어 적절한 산을 화합물과 반응시킴으로써 이소파고민 또는 GCB로부터 제조될 수 있다.

[0104] 이소파고민의 적합한 약제학적으로 허용되는 염기 부가 염은, 예를 들어 알칼리 금속, 알칼리토금속 및 전이 금속 염, 예를 들어 칼슘, 마그네슘, 칼륨, 나트륨 및 아연 염을 포함하는 금속염을 포함한다. 약제학적으로 허

용되는 염기 부가 염은 또한 염기성 아민, 예를 들어 N, N'- 디벤질 에틸렌 디아민, 클로로프로카인, 콜린, 디에탄올아민, 에틸렌디아민, 메글루민 (N- 메틸글루카민) 및 프로카인으로 제조된 유기 염을 포함한다. 약제학적으로 허용되지 않는 염기 부가 염의 예는 리튬 염 및 시아네이트 염을 포함한다. 이들 염기 부가 염은 모두 예를 들어 적절한 염기를 화합물과 반응시킴으로써 이소파코민으로부터 제조될 수 있다.

[0105] 약제학적 담체

[0106] GCB-함유 약제학적 조성물은 하나의 이상 약제학적으로 허용되는 담체를 포함할 수 있다. 본원에서 사용되는 "약제학적으로 허용되는 담체"란 용어는 약제학적 투여에 적합성인 임의의 및 모든 용매, 부형제, 분산 매질, 코팅제, 향균 및 항진균제, 등장성 및 흡착지연제 등을 포함하는 것으로 의도된다. 제약 제제는 잘 확립된 기술이며, 예를 들어 Genmaro (ed.), Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20th ed., Lippincott, Williams & Wilkins (2000) (ISBN: 0683306472); Ansel et al., Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, 7th Ed., Lippincott Williams & Wilkins Publishers (1999) (ISBN: 0683305727); 및 Kibbe (ed.), Handbook of Pharmaceutical Excipients American Pharmaceutical Association, 3rd ed. (2000) (ISBN: 091733096X)에 추가로 기술되어 있다. 임의의 통상적인 매질 또는 작용제가 활성 화합물과 양립할 수 없는 경우를 제외하고, 이러한 매질은 본 발명의 조성물에 사용될 수 있다. 보충 활성 화합물이 또한 조성물에 함유될 수 있다.

[0107] 본원에 기술된 약학 조성물은, 예를 들어 임플란트 및 마이크로 캡슐화된 전달 시스템을 포함하는 제어 방출 제제로부터 체내에서 화합물의 신속한 제거로부터 보호하는 담체를 포함할 수 있다. 생분해성, 생체적합성 중합체, 예컨대 에틸렌 비닐 아세테이트, 폴리무수물, 폴리글리콜산, 콜라겐, 폴리오르토에스테르 및 폴리락트산이 사용될 수 있다. 이러한 제형의 제조 방법은 당업자에게 명백할 것이다. 리포솜 현탁액 (바이러스 항원에 대한 모노클로날 항체로 감염된 세포를 표적으로 하는 리포솜 포함)은 또한 약학적으로 허용되는 담체로서 사용될 수 있다. 이들은 예를 들어 미국 특허 제 4,522,811 호에 기재된 바와 같이 당업자에게 공지된 방법에 따라 제조될 수 있다.

[0108] IV 투여의 경우, 적합한 담체는 생리 식염수, 정균수, CREMOPHOR EL™ (BASF, Parsippany, N.J.) 또는 포스페이트 완충 식염수 (PBS)를 포함한다. 모든 경우에, 조성물은 멸균되어야 하고 용이한 주사 가능성이 존재하는 정도로 유동적이어야 한다. 상기 조성물은 제조 및 저장 조건 하에서 안정해야 하며 박테리아 및 진균과 같은 미생물의 오염 작용에 대해 보존되어야 한다. 담체는 예를 들어 물, 에탄올, 폴리올 (예를 들어, 글리세롤, 프로필렌 글리콜 및 액체 폴리에틸렌 글리콜 등) 및 이들의 적합한 혼합물을 함유하는 용매 또는 분산 매체일 수 있다. 적절한 유동성은 예를 들어 레시틴과 같은 코팅의 사용, 분산의 경우 필요한 입자 크기의 유지, 및 계면활성제의 사용에 의해 유지될 수 있다. 미생물 작용의 예방은 다양한 향균 및 항진균제, 예를 들어 파라벤, 클로로부탄올, 페놀, 아스코르브산, 티메로살 등에 의해 달성될 수 있다. 많은 경우에, 등장화제, 예를 들어 당, 폴리알코올, 예컨대 만니톨, 소르비톨, 염화나트륨을 조성물에 포함시키는 것이 바람직할 것이다. 주사용 조성물의 연장된 안정성은 흡착을 지연시키는 작용제, 예를 들어 알루미늄 모노스테아레이트, 인간 혈청 알부민 및 젤라틴을 포함시킴으로써 야기될 수 있다.

[0109] 멸균 주사용 용액은 필요에 따라 상기 열거된 성분 중 하나 또는 조합과 함께 적절한 용매에 GCB/IFG를 혼입한 후 필터 멸균함으로써 제조할 수 있다. 일반적으로, 분산액은 활성 화합물을 염기성 분산 매질 및 상기 열거된 것으로부터 필요한 다른 성분을 함유하는 멸균 비히클에 함유함으로써 제조된다. 멸균 주 사용 용액의 조성물을 위한 멸균 분말의 경우, 바람직한 조성물의 방법은 진공 건조 및 동결 건조, 예를 들어 동결 건조이며, 이는 이전에 멸균된-여과된 것으로부터 활성 성분의 분말 및 임의의 추가의 원하는 성분을 생성한다.

[0110] 활성 화합물 (예를 들어, 본원에 기술된 GCB 조성물)은 임플란트 및 미세 캡슐화된 전달 시스템을 포함하는 제어 방출 제제와 같은, 신체로부터 화합물을 신속하게 제거하는 것을 방지할 수 있는 담체로 제조될 수 있다. 생분해성, 생체적합성 중합체, 예컨대 에틸렌 비닐 아세테이트, 폴리무수물, 폴리글리콜산, 콜라겐, 폴리오르토에스테르 및 폴리락트산이 사용될 수 있다. 이러한 제형의 제조 방법은 당업자에게 명백할 것이다. 상기 물질은 또한 Alza Corporation 및 Nova Pharmaceuticals, Inc.로부터 상업적으로 입수할 수 있다. 리포솜 현탁액 (바이러스 항원에 대한 단일 클론 항체를 갖는 감염된 세포를 표적으로 하는 리포솜 포함)은 또한 약제학적으로 허용되는 담체로서 사용될 수 있다. 이들은 예를 들어 미국 특허 제 4,522,811 호에 기재된 바와 같이 당업자에게 공지된 방법에 따라 제조될 수 있다.

[0111] 포장 및 배송

- [0112] 여기서 기술된 GCB/IFG 및 GCB/IFGT 조성물은 다양한 의료 장치로 투여될 수 있다. 예를 들어, 여기서 기술된 조성물은 니들-없는 피하 주사 장치, 가령 미국 특허 번호 5,399,163, 5,383,851, 5,312,335, 5,064,413, 4,941,880, 4,790,824, 또는 4,596,556호에 개시된 장치로 투여될 수 있다. 본 발명에 유용한 잘 알려진 임플란트 및 모듈의 예는 다음을 포함한다: 제어된 속도로 약물을 분배하기 위한 이식 가능한 미세 주입 펌프를 개시하는 미국 특허 제 4,487,603 호; 피부를 통해 약제를 투여하기 위한 치료 장치를 개시하는 미국 특허 제 4,486,194 호; 정확한 주입 속도로 약물을 전달하기 위한 약물 주입 펌프를 개시하는 미국 특허 제 4,447,233 호; 지속적인 약물 전달을 위한 가변 흐름 이식형 주입 장치를 개시하는 미국 특허 제 4,447,224 호; 다중 챔버 구획을 갖는 삼투 약물 전달 시스템을 개시하는 미국 특허 제 4,439,196 호; 및 삼투 약물 전달 시스템을 개시하는 미국 특허 제 4,475,196 호. 물론, 다른 많은 임플란트, 전달 시스템 및 모듈도 알려져 있다.
- [0113] 여기서 기술된 GCB/IFG 및 GCB/IFGT 조성물은 2 개의 챔버 주사기로 포장될 수 있다. 예를 들어, 동결건조된 형태의 GCB/IFG 및 GCB/IFGT 조성물은 제 1 주사기 챔버에 배치될 수 있고 액체는 제 2 주사기 챔버에 존재할 수 있다 (예를 들어, 미국 공개 출원 번호 2004-0249339 참조).
- [0114] 여기서 기술된 GCB/IFG 및 GCB/IFGT 조성물은 무 바늘 주사기로 포장될 수 있다 (예를 들어, 미국 특허 번호 6,406,455 및 6,939,324 참조). 간단히, 일 예로서, 주입 장치는 다음을 포함한다: 가스 또는 가스 공급원을 포함하는 가스 챔버; 가스 챔버로부터 가스를 방출할 수 있는 포트; 가스 챔버로부터 가스가 방출될 때 적어도 제 1 피스톤의 이동을 야기할 수 있는 플런저; 제 1 피스톤; 제 2 피스톤; 제 1 챔버, 예를 들어 약물 저장 및 혼합에 유용한 챔버; 상기 제 1 피스톤, 상기 제 2 피스톤 및 상기 제 1 챔버가 배치된 피스톤 하우스; 가스 챔버로부터 가스의 동력과 무관하게, 제 1 및 제 2 피스톤 중 하나 또는 둘 모두의 이동을 야기할 수 있는 변위 부재 (변위 부재는 플런저 또는 별도의 부재일 수 있음); 제 1 챔버와 연통하는 무니들 주입에 적합한 오리피스; 여기서, 제 1 및 제 2 피스톤은 피스톤 하우스 내에 활주 가능하게 배치되고, 변위 부재, 가스 공급원 및 플런저는 다음과 같이 배치된다: 피스톤의 제 1 위치에서, 제 2 챔버, 예를 들어 유체 저장조가 제 1 피스톤, 피스톤 하우스 및 제 2 피스톤에 의해 피스톤 하우스 내에 정의되고, 변위 부재는 피스톤 중 하나 또는 둘 모두를 제 2 위치로 이동할 수 있고, 여기서 제 1 피스톤은, 유체 저장 용기일 수 있는 제 2 챔버가, 약물 저장 및 혼합 챔버일 수 있는 제 1 챔버와 연통하고, 제 2 피스톤은 제 1 피스톤의 방향으로 이동함으로써, 제 2 챔버의 부피를 감소시키고 제 2 챔버로부터 제 1 챔버로의 유체의 전달을 허용하고, 플런저는 가스 챔버로부터 가스의 방출에 의해, 제 1 챔버의 체적을 감소시켜 물질이 오리피스를 통해 그리고 챔버로부터 그리고 예를 들어 대상체에게 배출될 수 있도록 제 1 피스톤을 이동시키도록 배치된다.
- [0115] 무 바늘 주사기는 제 1 성분, 예를 들어 건조 또는 액체 성분, 및 제 2 성분, 예를 들어 액체 성분을 위한 별도의 모듈을 포함할 수 있다. 모듈은 2 개의 개별 구성 요소로서 제공될 수 있고, 예를 들어, 구성 요소를 스스로 관리할 대상에 의해 또는 다른 사람에 의해, 예를 들어 건강 관리를 제공하거나 전달하는 개인에 의해 조립될 수 있다. 함께, 모듈은 본원에 기술된 장치의 피스톤 하우스의 전부 또는 일부를 형성할 수 있다. 장치는 대상체에게 투여하기 전에 임의의 제 1 및 제 2 성분을 개별적으로 저장 또는 제공하고 이들을 조합하는 것이 바람직한 경우 상기 성분을 제공하기 위해 사용될 수 있다.
- [0116] **치료하는 방법**
- [0117] 여기서 기술된 GCB/IFG 및 GCB/IFGT 제제 중 어느 하나는 환자에게 투여될 수 있다. 여기서 기술된 GCB/IFG 및 GCB/IFGT 제제는 GCase 경로에서의 기능이상과 관련된 장애, 특히 고세병을 치료하는 방법에서의 사용을 위한 것이다. 상기 조성물은 또한 본원에 기재된 치료 방법에 의해 이러한 장애를 치료하기 위한 의학의 제조에 사용된다.
- [0118] 투여량은 2주마다 투여되는 약 60 유닛/kg, 또는 60 유닛/kg일 수 있다. 투여량은 매주 투여되는 약 30 유닛/kg, 또는 30 유닛/kg일 수 있다. 대안적으로, 투여량은 2주마다 투여되는 30 내지 80 유닛/kg, 2주마다 투여되는 40 내지 70 유닛/kg, 2주마다 투여되는 50 내지 80 유닛/kg, 2주마다 투여되는 45 내지 65 유닛/kg, 2주마다 투여되는 40 내지 60 유닛/kg, 2주마다 투여되는 35 내지 55 유닛/kg, 2주마다 투여되는 30 내지 50 유닛/kg, 2주마다 투여되는 45 내지 65 유닛/kg, 2주마다 투여되는 50 내지 70 유닛/kg, 2주마다 투여되는 55 내지 75 유닛/kg, 2주마다 투여되는 60 내지 80 유닛/kg, 2주마다 투여되는 55 내지 65 유닛/kg, 2주마다 투여되는 45 내지 55 유닛/kg, 2주마다 투여되는 35 내지 45 유닛/kg, 2주마다 투여되는 또는 65 내지 75 유닛/kg 범위일 수 있다. 대안적으로, 투여량은 매주 투여되는 15 내지 40 유닛/kg, 매주 투여되는 20 내지 35 유닛/kg, 매주 투여되는 25 내지 40 유닛/kg, 매주 투여되는 22.5 내지 32.5 유닛/kg, 매주 투여되는 20 내지 30 유닛/kg, 매주 투여되는 17.5 내지 22.5 유닛/kg, 매주 투여되는 15 내지 25 유닛/kg, 매주 투여되는 22.5 내지 32.5 유닛

/kg, 매주 투여되는 25 내지 35 유닛/kg, 매주 투여되는 22.5 내지 37.5 유닛/kg, 매주 투여되는 30 내지 40 유닛/kg, 매주 투여되는 27.5 내지 32.5 유닛/kg, 매주 투여되는 22.5 내지 27.5 유닛/kg, 매주 투여되는 17.5 내지 22.5 유닛/kg, 매주 투여되는 또는 32.5 내지 37.5 유닛/kg 범위일 수 있다. 대표적으로, 투여량은 2주마다 투여되는 15-60 유닛/kg, 특히 2주마다 투여되는 60 유닛/kg이다. 치료 목표의 달성 및 유지에 기초하여 개별적으로 용량 조정이 이루어질 수 있다.

[0119] 투여량은 2주마다 투여되는 약 1.5 mg/kg, 또는 1.5 mg/kg일 수 있다. 투여량은 매주 투여되는 약 0.75 mg/kg, 또는 0.75 mg/kg일 수 있다. 대안적으로, 투여량은 2주마다 투여되는 0.75 내지 2.0 mg/kg, 2주마다 투여되는 1.0 내지 1.75 mg/kg, 2주마다 투여되는 1.25 내지 2.0 mg/kg, 2주마다 투여되는 1.125 내지 1.625 mg/kg, 2주마다 투여되는 1.0 내지 1.5 mg/kg, 2주마다 투여되는 0.875 내지 1.375 mg/kg, 2주마다 투여되는 0.75 내지 1.25 mg/kg, 2주마다 투여되는 1.215 내지 1.625 mg/kg, 2주마다 투여되는 1.25 내지 1.75 mg/kg, 2주마다 투여되는 1.375 내지 1.875 mg/kg, 2주마다 투여되는 1.5 내지 2.0 mg/kg, 2주마다 투여되는 1.375 내지 1.625 mg/kg, 2주마다 투여되는 1.125 내지 1.375 mg/kg, 2주마다 투여되는 0.875 내지 1.125 mg/kg, 2주마다 투여되는 또는 1.625 내지 1.875 mg/kg 범위일 수 있다. 대안적으로, 투여량은 매주 투여되는 0.375 내지 1.0 mg/kg, 매주 투여되는 0.5 내지 0.875 mg/kg, 매주 투여되는 0.625 내지 1.0 mg/kg, 매주 투여되는 0.5625 내지 0.8125 mg/kg, 매주 투여되는 0.5 내지 0.75 mg/kg, 매주 투여되는 0.4375 내지 0.5625 mg/kg, 매주 투여되는 0.375 내지 0.625 mg/kg, 매주 투여되는 0.5625 내지 0.8125 mg/kg, 매주 투여되는 0.625 내지 0.875 mg/kg, 매주 투여되는 0.5625 내지 0.9375 mg/kg, 매주 투여되는 0.75 내지 1.0 mg/kg, 매주 투여되는 0.6875 내지 0.8125 mg/kg, 매주 투여되는 0.5625 내지 0.6875 mg/kg, 매주 투여되는 0.4375 내지 0.5625 mg/kg, 매주 투여되는 또는 0.8125 내지 0.9375 mg/kg 범위일 수 있다. 대표적으로, 투여량은 특히 피하 투여로 2주마다 투여되는 15 mg/kg이다. 치료 목표의 달성 및 유지에 기초하여 개별적으로 용량 조정이 이루어질 수 있다.

[0120] 여기서 기술된 GCB/IFG 및 GCB/IFGT 제제 중 어느 하나는 환자에게 투여될 수 있다. 투여량은 2주마다 투여되는 약 90 내지 180 유닛/kg일 수 있다. 투여량은 매주 투여되는 약 90 유닛/kg, 또는 90 유닛/kg일 수 있다. 대안적으로, 투여량은 2주마다 투여되는 90 내지 150 유닛/kg, 2주마다 투여되는 110 내지 160 유닛/kg, 2주마다 투여되는 120 내지 180 유닛/kg, 2주마다 투여되는 120 내지 150 유닛/kg, 2주마다 투여되는 90 내지 120 유닛/kg, 2주마다 투여되는 100 내지 130 유닛/kg, 2주마다 투여되는 110 내지 140 유닛/kg, 2주마다 투여되는 120 내지 150 유닛/kg, 2주마다 투여되는 130 내지 160 유닛/kg, 2주마다 투여되는 140 내지 170 유닛/kg, 2주마다 투여되는 또는 150 내지 180 유닛/kg 범위일 수 있다. 대안적으로, 투여량은 2주마다 투여되는 90 내지 110 유닛/kg, 2주마다 투여되는 100 내지 120 유닛/kg, 2주마다 투여되는 110 내지 130 유닛/kg, 2주마다 투여되는 120 내지 140 유닛/kg, 2주마다 투여되는 130 내지 150 유닛/kg, 2주마다 투여되는 140 내지 160 유닛/kg, 2주마다 투여되는 150 내지 170 유닛/kg, 2주마다 투여되는 또는 160 내지 180 유닛/kg 범위일 수 있다.

[0121] 투여량은 2주마다 투여되는 약 2.25 내지 4.5 mg/kg일 수 있다. 대안적으로, 투여량은 2주마다 투여되는 2.25 내지 3.75 mg/kg, 2주마다 투여되는 2.75 내지 4.0 mg/kg, 2주마다 투여되는 3.0 내지 4.5 mg/kg, 2주마다 투여되는 3.0 내지 3.75 mg/kg, 2주마다 투여되는 2.25 내지 3.0 mg/kg, 2주마다 투여되는 2.5 내지 3.25 mg/kg, 2주마다 투여되는 2.75 내지 3.5 mg/kg, 2주마다 투여되는 3.0 내지 3.75 mg/kg, 2주마다 투여되는 3.25 내지 4.0 mg/kg, 2주마다 투여되는 3.5 내지 4.25 mg/kg, 2주마다 투여되는 또는 3.75 내지 4.5 mg/kg 범위일 수 있다. 대안적으로, 투여량은 2주마다 투여되는 2.25 내지 2.75 mg/kg, 2주마다 투여되는 2.5 내지 3.0 mg/kg, 2주마다 투여되는 2.75 내지 3.25 mg/kg, 2주마다 투여되는 3.0 내지 3.5 mg/kg, 2주마다 투여되는 3.25 내지 3.75 mg/kg, 2주마다 투여되는 3.5 내지 4.0 mg/kg, 2주마다 투여되는 3.75 내지 4.25 mg/kg, 2주마다 투여되는 또는 4.0 내지 4.5 mg/kg 범위일 수 있다.

[0122] GCB/IFG 및 GCB/IFGT 조성물의 투여는 리소솜 저장 질환과 같은 GCCase 경로의 기능 장애와 관련된 장애를 치료하기 위해 수행될 수 있다. 예시적인 리소솜 저장 질병은 고세병, 파브리병, 폼페병, 점액다당류증, 및 다계통 위축증을 포함한다. 여기서 기술된 조성물은 고세병을 치료하기 위해 특히 적절하다. 장애는 신경변성 장애, 예를 들어, 파킨슨병, 알츠하이머병, 또는 루이소체 치매일 수 있다. 대안적으로, 장애는 알파-시누클레인 조절장애를 수반할 수 있다.

[0123] 장애치료에서 GCB/IFG 및 GCB/IFGT 조성물은 정맥내로 또는 피하로 투여될 수 있다. 피하 투여는 피하 주사를 포함하고, 이는 특히 본발명을 실시하기 위해 적절하다. 조성물을 투여하기 위해 다양한 투여 스케줄이 사용될 수 있다. 예를 들어, 상기 조성물은 매주 1회, 1회 매 2주, 또는 1개월 1회 투여될 수 있다. 상기 조성물은 조성물은 예를 들어 3 일마다, 4 일마다, 5 일마다, 6 일마다, 8 일마다, 9 일마다, 10 일마다, 11 일마다, 12 일마다, 13 일마다, 15 일마다, 또는 16 일마다 투여될 수 있다. 투여 빈도는 다양한 요인으로 인해 치료 과정

에 걸쳐 변경될 수 있다. 대표적으로, 여기서 기술된 조성물은 피하로 주사로 1주 1회 또는 2회, 또는 2주마다 1회 투여된다.

[0124] 본원에 기재된 조성물이 피하 투여에 의해 기술되는 경우, 투여 동안 환자의 불편을 최소화하기 위해 주의를 기울여야 한다. 따라서, 주사당 환자에게 투여되는 총 부피는 일반적으로 5 mL를 초과하지 않는다. 보다 전형적으로, 피하 투여량은 주 사당 2.5 mL 미만일 것이다. 치료적으로 효과적인 용량을 달성하기 위해 다수의 피하 주사가 필요한 경우, 이들은 상이한 부위에서 투여될 수 있다. 대안적으로, 치료 간격이 감소될 수 있다. 치료 목표의 달성 및 유지에 기초하여 개별적으로 용량 조정이 이루어질 수 있다.

[0125] **실시예**

[0126] 본 발명은 또한 하기 실시예에 의해 기술되고 설명된다. 그러나, 명세서의 어느 곳에서나 이들 및 다른 예의 사용은 단지 예시적인 것이며 본 발명 또는 임의의 예시된 용어의 범위 및 의미를 제한하는 것은 아니다. 마찬가지로, 본 발명은 여기에 설명된 임의의 특정 바람직한 실시예로 제한되지 않는다. 실제로, 본 명세서를 읽으면 본 발명의 많은 수정 및 변형이 당업자에게 명백할 수 있으며, 그러한 변형은 본 발명을 사상 또는 범위에서 벗어나지 않고 이루어질 수 있다. 그러므로, 본 발명은 첨부된 청구 범위의 용어와 그 청구 범위가 부여되는 등가물의 전체 범위에 의해서만 제한되어야 한다.

[0127] **실시예 1 GCB의 농도**

[0128] GCB (5 ml의 10 mg/ml)을 -80 °C에서 저장 후 녹였다. GCB을 이후 3800 rpm, 4 °C에서 30 분 동안 원심분리 여과에 의해 농축하였다. GCB을 이후 50x 회석하고 농도를 A280에서 측정하였다. 100 mg/ml GCB의 농도를 얻었다. 이후, 1% 폴리소르베이트 20을 0.1%의 최종 농도까지 부가하였다. 용액 중 일부에, 20 mg의 pH-조정된 이소파고민을 부가하였다.

[0129] 0.22 um 막을 통한 여과를 수행하였다. 특이적 공정을 도 1에 나타낸다.

[0130] **실시예 2 비-pH 조정 IFG의 부가는 GCB를 탈안정화시킨다**

[0131] 아래에 나타낸 바와 같이 다양한 GCB 샘플을 분석하기 위해, SDS-PAGE을 사용하였다. 샘플을 37 °C에서 15 분 동안 변성시켰다. SDS-PAGE을 8-16% Novex™ 트리스-글리신 예비-주조 겔 상에서 수행하였다. 50 mM 디티오프레티올을 환원제로서 사용하였다. 샘플 중 일부는 pH-조정되지 않은 부가 이소파고민을 가진다. 제 1 일로부터의 결과를 도 2A에 나타낸다:

[0132] **레인 1:** 분자량 마커

[0133] **레인 2:** 0.5% 어세이 대조구 (60 ng GCB)

[0134] **레인 3:** 1% 어세이 대조구 (120 ng GCB)

[0135] **레인 4:** 12 µg GCB 기준, 환원됨

[0136] **레인 5:** 12 µg GCB (4 °C) 데이 1, 비-환원됨

[0137] **레인 6:** 12 µg GCB (4 °C) 데이 1, 환원됨

[0138] **레인 7:** 12 µg GCB (4 °C) 데이 1 12 µg

[0139] 이소파고민, 비-환원됨

[0140] **레인 8:** 12 µg GCB (4 °C) 데이 1 12 µg

[0141] 이소파고민, 환원됨

[0142] **레인 9:** 12 µg GCB (-80 °C) 데이 1, 비-환원됨

[0143] **레인 10:** 12 µg GCB (-80 °C) 데이 1, 환원됨

[0144] **레인 11:** 12 µg GCB (-80 °C) 데이 1 12 µg

[0145] 이소파고민, 비-환원됨.

- [0146] 레인 12: 12 μ g GCB (-80°C) 데이 1 12 μ g
- [0147] 이소파고민, 환원됨
- [0148] 2주 후 결과를 도 2B에 나타낸다:
- [0149] 레인 1: 분자량 마커
- [0150] 레인 2: 0.5% 어세이 대조구 (60 ng GCB)
- [0151] 레인 3: 1% 어세이 대조구 (120 ng GCB)
- [0152] 레인 4: 12 μ g GCB 기준, 환원됨
- [0153] 레인 5: 12 μ g GCB (4°C) 주 2, 비-환원됨
- [0154] 레인 6: 12 μ g GCB (4°C) 주 2, 환원됨
- [0155] 레인 7: 12 μ g GCB (4°C) 주 2 12 μ g
- [0156] 이소파고민, 비-환원됨
- [0157] 레인 8: 12 μ g GCB (4°C) 주 2 12 μ g
- [0158] 이소파고민, 환원됨.
- [0159] 레인 9: 12 μ g GCB (-80°C) 주 2, 비-환원됨
- [0160] 레인 10: 12 μ g GCB (-80°C) 주 2, 환원됨
- [0161] 레인 11: 12 μ g GCB (-80°C) 주 2 12 μ g
- [0162] 이소파고민, 비-환원됨
- [0163] 레인 12: 12 μ g GCB (-80°C) 주 2 12 μ g
- [0164] 이소파고민, 환원됨.
- [0165] 농축 절차 자체는 총 단백질의 약 0.5 %를 포함할 수 있는 레인 4-12에서 150kDa 내지 200 kDa의 희미한 밴드로 나타낸 바와 같이 GCB의 시스테인-관련 올리고머화를 유도했을 수 있다. 도 2A의 레인 7 및 8에서 50kDa 미만의 크기로 몇 개의 희미한 밴드로 표시된 것처럼, 이소파고민이 -80°C 에서 GCB에 첨가될 때보다 4°C 에서 이소파고민이 GCB에 첨가될 때 실질적으로 더 많은 GCB 단편이 관찰되었다. 희미한 밴드의 출현은 산성 이소파고민에 의한 GCB의 불안정화 때문일 수 있다.
- [0166] 이소파고민의 첨가에 의해 -80°C 가 아닌 4°C 에서 GCB 단편이 생성되었다. 도 2A 및 2B의 레인 5-8 참조.
- [0167] **실시예 3: IFGT의 pH 조정 및 연이은 동결건조**
- [0168] IFGT를 물 내에 용해시킬 때, 산성 용액이 얻어진다. 특히, 103 mg 이소파고민 타르테이트를 5 ml의 물 내에 용해시킬 때, 용액의 pH는 3.25이다. 상기 용액에 15 μ l 10 M 소듐 히드록사이드 부가로 pH를 6.0으로 조정하였다.
- [0169] 500 μ l 분취량의 pH 조정된 IFGT 용액을 2 ml 에펜도르프 튜브에 부가하였다. 에펜도르프 튜브 함유 용액을 드라이 아이스에서 1 시간 동안 동결시키고, 파라필름으로 덮고, 이를 니들로 찢어 밤새 동결 건조시켰다. 동결건조물을 갖는 에펜도르프 튜브를 도 3에 나타낸다.
- [0170] **실시예 4 pH 조정된 IFG에 GCB의 부가**
- [0171] pH 6.0-조정된 IFGT에 GCB 부가 이전에 GCB 용액의 pH를 또한 소듐 시트레이트로 6.0으로 조정하였다. 특히, 50 mM 소듐 시트레이트 내 100 mg/ml GCB은 pH 6.0을 갖는 용액을 생성한다. 100 mM/ml IFGT (pH 6.0에서)을 50 mM 소듐 시트레이트 내 100 mg/ml GCB에 부가할 때 pH는 6.0였다.

[0172] **실시예 5 pH 조정된 IFG의 부가는 GCB를 탈안정화시키지 않는다**

[0173] pH-조정된 이소파고민에 부가된 GCB을 포함하는, 아래에 나타낸 바와 같이 동일한 날 (데이 0) 및 저장 3 일 후 (데이 3)에 제조된 다양한 GCB 샘플을 분석하기 위해 SDS-PAGE을 사용하였다. 샘플을 37 °C에서 15 분 동안 변성시켰다. SDS-PAGE을 8-16% Novex™ 트리스-글리신 예비-주조 겔 상에서 수행하였다. 50 mM 디티오프레티올을 환원제로서 사용하였다. 샘플 중 일부는, pH-조정되지 않은 부가된 이소파고민을 가진다.

[0174] **레인 1:** 분자량 마커

[0175] **레인 2:** 0.5% 어세이 대조구 (60 ng GCB)

[0176] **레인 3:** 1% 어세이 대조구 (120 ng GCB)

[0177] **레인 4:** 12 µg GCB 기준, 비-환원됨

[0178] **레인 5:** 100 mg/ml 농도로부터의 12 µg GCB, 비-환원됨

[0179] **레인 6:** 100 mg/ml 농도로부터의 12 µg GCB, 환원됨

[0180] **레인 7:** 12 µg pH-조정된 이소파고민과 함께 100 mg/ml 농도로부터의 12 µg GCB, 비-환원됨

[0181] **레인 8:** 12 µg pH-조정된 이소파고민과 함께 100 mg/ml 농도로부터의 12 µg GCB, 환원됨

[0182] SEC HPLC을 안정성을 확인하기 위해 데이 3 샘플 상에서 수행하였다. 파라미터는 이동상으로서 400 mM 소듐 클로라이드를 부가한 Gibco DPBS, 0.8 ml/min. 흐름 속도, SEC 칼럼으로서 Sepax Zenix-C SEC-150. 3 µm, 150 A, 7.8 x 300mm, 및 25 °C의 칼럼 온도를 포함하였다.

[0183] 결과를 데이 0에 대해 도 4A 및 데이 3에 대해 도 4B에 나타낸다. GCB 밴드가 레인 4-8에 보였다. 50 kDa 미만 크기를 가지는 더 작은 밴드는 데이 0 또는 데이 3에 관찰되지 않았다. GCB와 유사한, 이소파고민의 pH의 6.0으로의 조정은 GCB의 탈안정화를 최소화시킬 수 있다.

[0184] **실시예 6 GCB 안정성에 대한 pH 조정된 IFGT의 분석**

[0185] GCB을 100 mg/ml로 농축하였다. 100 mg/ml의 이소파고민 타르트레이트 (IFGT)을 6.0으로 pH-조정하였다. IFGT을 이후 GCB와 혼합하였다. IFGT의 pH 조정을 수행하지 않았을 때, GCB/IFGT는 안정하지 않았고 단백질 클리핑이 SDS-PAGE에 의해 관찰되었다.

[0186] pH 조정을 수행한 때, 용액 내 GCB는 SEC로 측정된 바와 같이 적어도 3 일 동안 안정하였다. 이동상은 400 mM 소듐 클로라이드를 부가한 Gibco DPBS, 흐름 속도는 0.8 ml/min, SEC 칼럼은 Sepax Zenic-C SEC-150, 3 µm, 150 A, 7.8 x 300 mm였다. 칼럼 온도는 25 °C였다. 4 샘플을 도 5에 나타낸 바와 같이 SEC로 분석하였다. DS 완충액 내 GCB, 98.8% 순도를 갖는 GCB 기준, 및 98.7% 순도를 갖는 GCB를 표준으로서 사용하였다. 3 일 동안 저장된 중화된 이소파고민 (6.0으로 pH 조정된)를 갖는 GCB을 또한 SEC 상에서 분석하였고 안정하게 보였다.

[0187] **실시예 7 GCB 안정성에 대한 pH 조정된 IFG의 크기 배제 크로마토그래피 분석**

[0188] SEC 분리 어세이를 아래에 표 1에 나열된 적어도 다음 샘플 상에서 수행하였다:

표 1

샘플 이름	설명
GR (GCB 기준)	2.04 mg/ml로 희석된 GCB
G4	2.01 mg/ml로 희석된 4 °C GCB 샘플
GI4	1.81 mg/ml로 희석된 4 °C GCB/IFG 샘플
G80	1.90 mg/ml로 희석된 -80 °C GCB 샘플
GI80	1.81 mg/ml로 희석된 -80 °C GCB/IFG °C 샘플

[0190] 다음 파라미터를 SEC에 대해 사용하였다: 400 mM 소듐 클로라이드의 부가의 Gibco DPBS을 이동상으로서 사용하였다. 흐름 속도는 0.8 ml/min였다. SEC 칼럼은 Sepax Zenix-C SEC-150. 3 μm, 150 Å, 7.8 x 300 mm였다. 칼럼 온도는 25 °C였다.

[0191] 결과를 도 6A 및 6B에 나타낸다. SDS-PAGE로 관찰된 펩티드 단편은 약 10 분 및 30 초 내지 10 분 및 45 초에서 용리하는 피크에서 보인다. -80 °C에서 이소파고민 및 GCB 둘 다를 갖는 샘플은 4 °C인 샘플 또는 심지어 -80 °C에서인 GCB 샘플보다 펩티드 단편과 연관된 더 작은 피크를 가진다.

[0192] **실시예 8 점도에 대한 GCB 및 IFG 농도의 효과**

[0193] 이소파고민 (GCB/IFG)과 혼합된 (a) GCB 및 (b) GCB의 다양한 제형을 제조하였다. GCB 제제는 10 mg/ml GCB, 25 mg/ml GCB, 50 mg/ml GCB, 75 mg/ml GCB, 및 100 mg/ml GCB을 포함하였다. GCB/IFG 제제는 5 mg/mL IFG 타르트레이트를 함유한10 mg/ml GCB, 12.5 mg/mL IFG 타르트레이트를 함유한25 mg/ml GCB, 25 mg/mL IFG 타르트레이트를 함유한50 mg/ml GCB, 37.5 mg/mL IFG 타르트레이트를 함유한75 mg/ml GCB, 및 50 mg/mL IFG 타르트레이트를 함유한100 mg/ml GCB을 포함하였다. 각 제형의 점도 및 전단 속도는 점도계 (RheoSense, San Ramon, CA, USA로부터 m-VROC)에서 측정되었다. 각 측정에 약 200 μl 크기의 샘플이 필요하다. Slope Fit Rsqrd> 0.98의 점도 결과가 보고된다. 결과를 다음 표에 나타낸다:

표 2

[0194]

샘플	점도 (cP)	전단 속도 (1/s)	Slope Fit R 제곱
100 mg/ml GCB	4.952	119.4	0.9973
75 mg/ml GCB	2.455	621.4	0.9998
50 mg/ml GCB	1.722	953.6	0.9999
25 mg/ml GCB	1.312	1192.4	0.9994
10 mg/ml GCB	1.074	1192.4	0.9999

표 3

[0195]

샘플	점도 (cP)	전단 속도 (1/s)	Slope Fit R 제곱
100 mg/ml GCB + 50 mg/ml IFGT	4.969	579.2	0.9896
75 mg/ml GCB + 37.5 mg/ml IFGT	2.911	95.2	0.96
50 mg/ml GCB + 25 mg/ml IFGT	1.565	953.6	0.9998
25 mg/ml GCB + 12.5 mg/ml IFGT	1.224	477.7	0.999
10 mg/ml GCB + 5 mg/ml IFGT	1.064	1192.4	0.9998

- [0196] 점도는 GCB의 농도와 관련이 있다. 100 mg/ml GCB 및 50 mg/ml IFG 타르트레이트를 갖는 제제는 약 5 cP의 점도를 가지며, 이는 피하 주사가 가능하다.
- [0197] **실시예 9 Biacore에 의해 측정된 pH 7.4 및 pH 5.0에서 GCB에 결합하는 IFG**
- [0198] 표면 플라즈몬 공명 (SPR)에 의해 pH 7.4 및 5.0에서 GCB 및 이소파고민 결합 친화도 및 동역학을 특성화하기 위해 실험을 수행하였다. 이들 pH는 상이한 pH 값을 갖는 혈장, 세포질 및 리소좀 구획과 같은 상이한 환경에서 GCB와 이소파고민이 서로 어떻게 결합 하는지를 설명할 수 있다.
- [0199] 모든 SPR 실험은 단일 사이클 동역학 방법으로 Biacore S-200에서 수행하였다. pH 7.4에서의 실험에서, 2 mg/ml GCB를 100 µg/ml의 최종 농도로 GE 아세테이트 pH 5.0 완충액으로 희석하였다. 고정화 실험 완충제는 10mM HEPES, 5mM EDTA, 0.01 % P-20, pH 7.4였다. 이 완충액은 이후 결합 분석에 직접 사용되었다.
- [0200] pH 5.0에서의 실험에서, 2 mg/ml GCB를 100 µg/ml의 최종 농도로 GE 아세테이트 pH 5.0 완충액으로 희석하였다. 고정화 실험 완충제는 20 mM 소듐 포스페이트, 2.7 mM 포타슘 클로라이드, 137 mM 소듐 클로라이드, 5 mM 타르트레이트, 0.01% P-20, pH 5.0였다. 타르트레이트를 실험 완충제에 첨가하여 이소파고민 타르트레이트에 의해 도입된 용질 효과를 제거하였다. GCB는 정상적인 이민 커플 링 절차를 사용하여 CM5 칩에 고정되었다. 목표 고정 수준은 4000 RU였다.
- [0201] pH 7.4에서의 Biacore 실험의 경우 농도 범위는 0.39 -100 nM였다. 2 배 연속 희석으로 총 9 점이였다. pH 5.0에서의 Biacore 실험의 경우 농도 범위는 0.39 -100 nM였다. 2 배 연속 희석으로 총 9 점이였다.
- [0202] 결합 어세이 조건은 다음과 같았다: 30 µl/min 유속, 120 s 결합 시간, 600 s 분해 시간 및 재생 시약으로서 3 M 염화 마그네슘. 표면 재생 없이 단일 사이클 모드에서 고정화된 벨라글루세라제 알파에 초기에 0.3 µM에서 100 µM까지의 이소파고민 농도를 유동시켰다.
- [0203] pH 5.0 및 pH 7.4 연구 각각에 대해, 두 번의 실험을 수행하였다. 얻어진 데이터를 다음 표 및 도 7A-7D에 나타낸다. 검은 선은 실제 데이터를 나타내고 빨간 선은 모델 피팅을 나타낸다.

표 4

[0204] pH 5.0에서 제 1 실험

ka (1/Ms)	kd (1/s)	K _D (M)	Rmax (RU)	t _c	Chi ² (RU ²)	U-값
1.25 x 10 ⁴	0.00314	2.51 x 10 ⁻⁷	26.73	8.51 x 10 ⁵	0.138	1

표 5

[0205] pH 5.0에서 제 2 실험

ka (1/Ms)	kd (1/s)	K _D (M)	Rmax (RU)	t _c	Chi ² (RU ²)	U-값
9883	0.001954	1.98 x 10 ⁻⁷	24.39	1.70 x 10 ¹⁰	0.339	1

표 6

[0206] pH 7.4에서 제 1 실험:

ka (1/Ms)	kd (1/s)	K _D (M)	Rmax (RU)	t _c	Chi ² (RU ²)	U-값
2.42 x 10 ⁵	0.002274	9.40 x 10 ⁻⁹	12.1	1.08 x 10 ⁹	0.105	1

표 7

pH 7.4에서 제 2 실행:

ka (1/Ms)	kd (1/s)	K _D (M)	Rmax (RU)	t _c	Chi ² (RU ²)	U-값
2.80 x 10 ⁵	0.001785	6.38 x 10 ⁻⁹	10.86	6.90 x 10 ⁹	0.178	2

[0208] pH 5.0에서 GCB/IFG 결합의 K_D는 198-251 nM이다. pH 7.4에서 GCB/IFG 결합의 K_D는 6.4 - 9.4 nM이다.

[0209] **실시예 10 이소파고민은 벨라글루세라제 알파의 용점을 증가시킨다**

[0210] 벨라글루세라제 단독 또는 이소파고민의 상이한 비와의 조합의 열적 안정성을 나노-시차 주사 형광측정법을 사용하여 (나노-DSF) 평가하였다 (도 8). 40 mg/mL 벨라글루세라제 알파 농도에서 나타난 이소파고민 물 비로 샘플을 초기에 제조하였다. 나노-DSF 장치로의 로딩 이전, 샘플을 2 mg/mL 벨라글루세라제 알파 농도로 희석하였다. 도 8에 나열된 샘플 조건은 다음과 같다:

[0211] Ctr: 이소파고민 D-타르트레이트 (IFGT) 없음

[0212] 샘플 1: 100x 물 비 IFGT

[0213] 샘플 2: 30x 물 비 IFGT

[0214] 샘플 3: 10x 물 비 IFGT

[0215] 샘플 4: 3x 물 비 IFGT

[0216] 샘플 5: 없음 IFGT

[0217] 샘플 7: 100x 물 비 이소파고민 하이드로클로라이드

[0218] 샘플 8: 100x 물 비 이소파고민 아세테이트

[0219] 벨라글루세라제 알파에 대한 이소파고민 결합을 또한 GCB 효소 활성 어세이로 결정하였다. 효소 반응을 37 °C에서 1 시간 동안 실행하였다. 이소파고민 타르트레이트를 벨라글루세라제 알파와 함께 대략 10 분 동안 예비-배양하였다.

[0220] 이소파고민 타르트레이트에 대한 어세이 농도를 도 9A-9C에 나타난 그래프에서 나타낸다. 벨라글루세라제 알파에 대한 최종 어세이 농도는 pH 5.0에서 ~1 nM 및 pH 7.4에서 ~10 nM였다. 도 9A는 합성 비색 pNP-GPS 기질을 사용한 활성 저해 곡선을 나타낸다. 도 9B는 합성 형광측정 4MU-GPS 기질을 사용한 활성 저해 곡선을 나타낸다. 도 9C는 천연 글리코스핑고리피드 C12-GluCer 기질을 사용한 활성 저해를 나타낸다. C12-GluCer 분해 반응을 글루코스 옥시다제 어세이 키트를 사용하여 글루코스 생산을 측정하였다.

[0221] **실시예 11 3 주 안정성 연구**

[0222] GCB의 4 상이한 혼합물 및 이소파고민 D-타르트레이트를 아래에 표 8에 나타난 바와 같이 제조하였다.

표 8

혼합물 이름	GCB 농도 (mg/ml)	IFG D-타르트레이트 농도 (mg/ml)	GCB 대 IFGT의 물 비
그룹 1	15.	2.25.	1:30
그룹 2	15.	0.75.	1:10
그룹 3	15.	0.225	1:3
그룹 4	15.	0.075	1:1

[0224] 초기 시점 및 40 °C에서 3 주 동안 저장 후, SEC, rpHPLC, 및 SDS-PAGE 각각에 의해 측정된 특이적 활성 및 순도를 어세이하였다. SEC는 가용성 고-분자량 종을 검출할 수 있고, rpHPLC은 GCB의 화학적 안정성에 대한 정보, 가령 산화저항성을 제공한다. SDS-PAGE는 단백질 클리핑 및 응집을 검출할 수 있다. 특이적 활성에 대해 기준 표준의 활성은 16 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ (데이 0) 및 18 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ (주 3)였다. 상당한 일-대-일 가변성을 형광-기초 활성 어세이로 관찰하였다. 모든 안정성 샘플은 기준 표준보다 약간 더 높은 활성을 가졌다.

[0225] 시각 검사를 또한 수행하였다. 샘플의 이미지를 도 10A에 나타낸다. 데이터를 아래 표에 나타낸다. 도 10B에 나타낸 SDS-PAGE 결과에서 다음 레인이 상기 샘플에 상응한다:

[0226] 레인 1: 분자량 마커

[0227] 레인 2: 12 μg GCB 기준, 비-환원됨

[0228] 레인 3: 12 μg GCB 그룹 1, 비-환원됨

[0229] 레인 4: 12 μg GCB 그룹 2, 비-환원됨

[0230] 레인 5: 12 μg GCB 그룹 3, 비-환원됨

[0231] 레인 6: 12 μg GCB 그룹 4, 비-환원됨

표 9

혼합물 이름	특이적 활성 ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$) 데이 0에서	특이적 활성 ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$) 주 3에서
그룹 1, 1:30 GCB 대 IFG의 몰 비	21	28
그룹 2, 1:10 GCB 대 IFG의 몰 비	20	22
그룹 3, 1:3 GCB 대 IFG의 몰 비	25	28
그룹 4, 1:1GCB 대 IFG의 몰 비	22	22

표 10

혼합물 이름	SEC 순도 (%) 데이 0에서	SEC 순도 (%) 주 3에서
그룹 1, 1:30 GCB 대 IFG의 몰 비	99.6	99.4
그룹 2, 1:10 GCB 대 IFG의 몰 비	99.5	99.3
그룹 3, 1:3 GCB 대 IFG의 몰 비	99.5	99.2
그룹 4, 1:1 GCB 대 IFG의 몰 비	99.5	98.8

표 11

[0234]

혼합물 이름	rpHPLC 순도 (%) 데이 0에서	rpHPLC 순도 (%) 주 3에서
그룹 1, 1:30 GCB 대 IFG의 물 비	97.4	96.8
그룹 2, 1:10 GCB 대 IFG의 물 비	97.4	98.3
그룹 3, 1:3 GCB 대 IFG의 물 비	97.4	98.1
그룹 4, 1:1 GCB 대 IFG의 물 비	97.3	98.3

표 12

[0235]

혼합물 이름	SDS-PAGE 순도 (%) 데이 0에서	SDS-PAGE 순도 (%) 주 3에서
그룹 1, 1:30 GCB 대 IFG의 물 비	>98	>98
그룹 2, 1:10 GCB 대 IFG의 물 비	>98	>98
그룹 3, 1:3 GCB 대 IFG의 물 비	>98	>98
그룹 4, 1:1 GCB 대 IFG의 물 비	>98	응집물 관찰됨

[0236]

1:1 GCB 대 IFG의 물비는 40 °C에서 3 주에 걸쳐 안정성을 제공하기에는 너무 낮았다. SDS-PAGE 어세이에서 응집물이 보였고 용액은 3 주에서 불투명하게 보였다. 그러나, 3 주에서 1:3 이상의 GCB 대 IFG의 물 비에서, 순도는 SDS-PAGE에서 적어도 98%였고 용액은 투명하게 보였다.

[0237]

실시에 12 시노볼구스 원숭이에서 IFG를 함유한 정맥내 GCB 및 피하 GCB의 약물동력학적 연구

[0238]

시노볼구스 원숭이의 두 개의 그룹을 GCB의 약물동력학에 대해 시험하였다. 그룹 1에서 GCB을 정맥내 주사로 1회 투여하였다. 그룹 2에서, IFG를 함유한 GCB의 제제를 1회 피하 주사로 투여하였다. 간 및 비장으로부터 3 샘플을 투여 후 1 시간, 2 시간, 8 시간 및 24 시간 각각에서 수집하였다. 연구 설계의 부가적 상세사항은 아래 표 13에 나타낸다:

표 13

[0239]

그룹 번호 및 기원	시험 물품 및 투여량	농도 (mg/ml)	투여량 부피 (ml/kg)	ROA/TOA
1 (12 수컷, PNN 기원)	10 mg/kg GCB	10	1	데이 1 (T=0)에 IV 주사 1회

2. (12 수컷, PNN 기원)	함께 제제화된 10 mg/kg GCB 및 5 mg/kg 이소과고민 타르트레이 트 (100x IFG 몰 비)	100 (GCB) 50 (이소과고민 타르트 레이트)	0.1	데이 1 (T=0)에 SC 주사 1회

- [0240] 간 및 비장에서의 수집은 투여 후 1, 2, 8 및 24 시간 (n = 3)에 이루어졌다.
- [0241] 이어서, 모든 샘플에 대해 조직학적 분석을 수행하였다. 파라핀 차단을 위해 10 % NBF 고정 간 및 비장을 처리하였다. GCB IHC (1 차 항체 TK36- 마우스 항 -huGCB 1: 10,000) 및 헤모톡실린 및 에오신 염색을 위해 5 미크론 섹션을 제조하였다.
- [0242] 도 11은 간 및 비장의 원숭이 조직에서 GCB IHC 염색에 대한 음성 및 양성 대조군을 보여준다. GCB IHC 항체가 없는 경우 무시할 수 있는 염색이 관찰되었다 (상단 패널). GCB IHC 항체의 존재 하에서, 미처리 간 (하부 좌측 패널)에서 희미한 배경 염색이 관찰되었다. 처리된 간 및 비장에서 GCB IHC 항체 (중간 하부 및 우측 하부 패널)의 존재하에 어두운 염색이 관찰되었다. 특히, 간은 쿠퍼 세포, 내피 및 간세포에서 GCB- 양성 염색을 나타내었고, 비장은 내피 및 대 식세포 양성 염색을 나타냈다.
- [0243] 간에서의 GCB의 생체 분포는 정맥 내 주사에 의한 GCB의 전달 및 피하 주사에 의한 IFG를 함유한 GCB의 전달 후 연구되었다. 피하 주사로 치료된 원숭이의 간에서, 8 시간 시점에 강한 GCB가 관찰되었다. 정맥 주사로 처리된 원숭이의 간에서 1 시간 및 2 시간 시점에 강한 GCB 염색이 관찰되었다. 결과는 도 12 (2 배 확대) 및 도 13 (20 배 확대)에 도시되어있다.
- [0244] 도 14 (2x 확대) 및 도 15 (20x 확대)에 도시된 바와 같이, 비장에서도 유사한 결과가 나타났다. 이들 데이터는 IFG와 함께 GCB의 피하 투여가 GCB의 IV 투여의 그것에 필적하는 GCB 조직 노출을 제공할 수 있음을 시사한다.
- [0245] **실시예 13 간 내 및 비장 단백질 수준과 벨라글루세라제 알파 활성의 관계**
- [0246] 시노물구스 원숭이 내 IV 투여량 투여 후 간 및 비장 균질화물 내 벨라글루세라제 알파 단백질 및 효소 활성 수준을 평가하였다. 투여 후 예비-결정 시점 (0.5 - 24 시간)에서 조직을 수집하였다. 데이터를 도 16A 및 16B에 나타낸다. 특히, 도 16A는 벨라글루세라제 알파를 2 내지 10 mg/kg 범위로 IV 투여한 결과를 보여준다. 도 16B는 벨라글루세라제 알파 대 이소과고민의 몰비가 1: 3이 되도록 하는 상응하는 양의 이소과고민 (0.0075 - 5 mg/kg)으로 제제화된, 1.5 내지 10 mg/kg 범위의 벨라 그루 세라 제 알파를 사용한 SC 투약의 결과를 보여준다.
- [0247] **실시예 14 이소과고민 타르트레이트의 피하 투여후 시노물구스 원숭이 내 혈청 GCB 활성 수준**
- [0248] GCB의 혈청 활성 수준을 이소과고민 타르트레이트로 벨라글루세라제 알파의 피하 (SC) 투여 후 시노물구스 원숭이에서 분석하였다. 데이터를 도 16C에 나타낸다. 내인성 GCB 혈청 활성은 비히클 및 GCB로 처리된 투여 전 동물 (n = 39)로부터 측정되었고 4-14 ng/mL 또는 0.07 - 0.25 nmol 4MU/min/mL 범위였다. 이소과고민 타르트레이트는 2.5 mg/kg의 SC 용량으로 정상의 상한 이상으로 혈청에서 GCB 활성을 증가시킬 수 있다. 이러한 증가는 혈청에서 지속적으로 발생하는 천연 GCB 분해 과정의 예방에 기인한 것으로 보인다. Vela-3xIFGT (0.0225 mg/kg)에 포함된 이소과고민 타르트레이트 용량은 더 높은 0.025 mg/kg 용량의 데이터에 기초하여 내인성 혈청 GCB 활성을 증가시키지 않을 것이다.
- [0249] **실시예 15 IFG는 벨라글루세라제 알파 SC 혈청 노출에서 >25x 증가를 제공한다**
- [0250] 4 mg/kg 용량으로 시노물구스 원숭이에 피하로 투여된 1: 3 몰비의 벨라글루세라제 알파 및 IFG는 4 mg/kg IV 용량의 벨라글루세라제 알파에 비해 혈청 노출에서 25 배 이상의 개선을 제공할 수 있었다. 벨라글루세라제 알파에 비해 3 배 내지 100 배 몰 과잉의 IFG 비는 혈청 노출에서 유사한 증가를 촉진시켰다. ECL ELISA 분석으로부터 결정된 혈청 생체 이용률의 증가는 GCB 활성 분석 (4MU-GPS 기질)으로 입증되었다. 결과를 도 17A 및 17B에 나타낸다. 0.07 mg/kg의 IFGT를 4 mg/kg GCB에 첨가하면 혈청 (16A) 및 GCB (16B)의 전체 효소 활성에서 GCB의 양이 실질적으로 증가하였다. 따라서, 데이터는 GCB가 IFG, 예를 들어 IFGT와, 특히 적어도 1: 3의 몰비 (GCB: IFG, 예를 들어, GCB: IFGT)로 공-제형화될 때, 이는 SC 투여를 허용하는 혈청 생물학적이용률에 대해 제공될 수 있음을 입증한다.

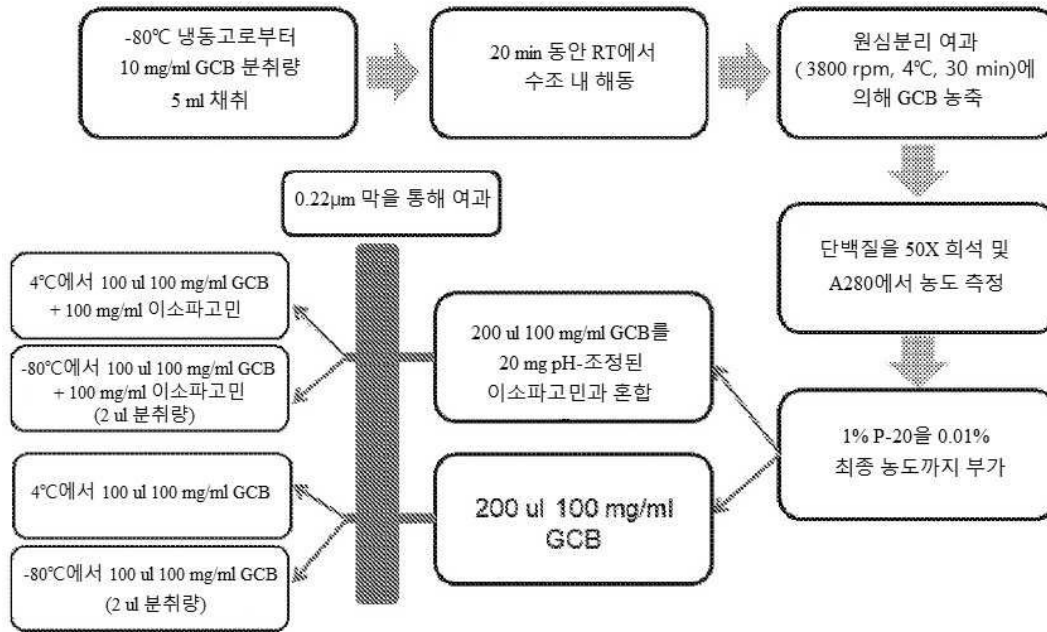
- [0251] 실시예 16 VPRIV 단독의 정맥 내 투여와 비교하여 1: 100 몰비의 IFG를 갖는 피하 VPRIV의 우수한 조직 생체 분포
- [0252] 4 mg/kg 용량으로 시노물구스 원숭이에 피하로 투여된 1: 100 몰비의 벨라글루세라제 알파 및 IFG는 10 mg/kg IV 용량의 벨라글루세라제 알파 단독의 것보다 10 mg/kg IV의 벨라글루세라제 알파의 조직 흡수를 부여할 수 있었다. VPRIV의 표준 치료 IV- 주입 용량은 1.5 mg/kg이다. 일부 구체에에서, 대략 1.5 mg/kg의 표적 피하 투여량이 사용될 수 있다. 약 250 mg의 조직을 1 ml의 HEPES/Triton X-100 용해 완충액에서 균질화시켰다. 조직 내의 벨라글루세라제 알파 함량을 ECL ELISA 분석을 사용하여 측정하고 BCA 분석으로부터 결정된 바와 같이 총 단백질 함량으로 정규화하였다. 결과를 도 18A 및 18B에 나타낸다. 1: 100 몰비의 GCB: IFG의 피하 투여 후 간 (18A) 및 비장 (18B)에 존재하는 GCB의 노출 프로파일은 5 일 (120 시간) 동안 GCB의 정맥 내 투여보다 우수하였다.
- [0253] 실시예 17 정맥 내 용량의 VPRIV 단독에 대해 1: 3 몰비로 IFG를 갖는 피하 VPRIV의 조직 생체 분포 비교
- [0254] 표적 1.5 mg/kg 임상 용량으로 시노물구스 원숭이에게 피하로 투여된 1: 3 몰 비의 벨라글루세라제 알파 및 IFG는 2 mg/kg IV 용량의 벨라글루세라제 단독에 필적하는 벨라글루세라제 알파의 조직 흡수를 부여할 수 있었다. VPRIV의 표준 치료 IV- 주입 용량은 1.5 mg/kg이다. 약 250 mg의 조직을 1 ml의 HEPES/Triton X-100 용해 완충액에서 균질화시켰다. 조직 내의 벨라글루세라제 알파 함량을 ECL ELISA 분석을 사용하여 측정하고 BCA 분석으로부터 결정된 바와 같이 총 단백질 함량으로 정규화하였다. 결과를 도 19A 및 19B에 나타낸다. 1: 3 몰비의 GCB: IFG의 피하 투여 후 간에 존재하는 GCB의 양은 8 시간 및 24 시간 두 시점 모두에서 GCB의 정맥 내 투여의 양에 필적하였다. 유사하게, 1: 3 몰비의 GCB: IFG의 피하 투여 후 비장에서의 GCB 조직 노출은 8 시간 및 24 시간 시점 모두에서 GCB의 정맥 내 투여의 것과 유사하였다.
- [0255] 유사하게, 1: 3 몰비의 GCB: IFG의 피하 투여 후 비장에서의 GCB 조직 노출은 8 시간 및 24 시간 시점 모두에서 GCB의 정맥 내 투여의 것과 유사하였다. 따라서, IFG, 예를 들어 IFGT를 GCB 제제에 첨가하면 GCB 함유 제제의 피하 투여가 가능하다.
- [0256] 실시예 18 1: 1의 낮은 이소파고민 비율은 높은 이소파고민 몰비와 유사한 혈청 노출을 제공한다
- [0257] 1.5 mg/kg 용량으로 시노물구스 원숭이에게 피하 투여된 1: 1 몰비의 벨라글루세라제 알파 및 IFG는 높은 이소파고민 비와 유사한 GCB 혈청 노출을 제공할 수 있었다. 1: 1 내지 1: 100의 몰비에 대해서는 GCB 혈청 노출에서 명백한 차이가 관찰되지 않았다. ECL ELISA 분석으로부터 결정된 혈청 생체 이용률의 증가는 GCB 활성 분석 (4MU-GPS 기질)으로 입증되었다. 결과를 도 20A 및 20B에 나타낸다.
- [0258] 투여를 위한 시험 물품을 투여 전에 동물 시설에 냉동 제형으로 제조하였다. 시험 물품을 투여이전 대략 1 내지 3 시간에 녹였다. 따라서, 데이터는 GCB가 IFG, 예를 들어 IFGT와 함께 적어도 1: 1의 몰 비로(GCB: IFG, 예를 들어 GCB: IFGT) 공-제제화될 때 상온 저장 책임이 저온 저장 (예를 들어, 냉동)에 의해 회피될 수 있는 경우, SC 투여를 허용하는 충분한 혈청 생체 이용률을 제공할 수 있음을 입증한다.
- [0259] 실시예 19 이소파고민은 인간 혈청에서 37 °C의 열 변성에 대해 VPRIV를 보호한다
- [0260] IFG가 GCB를 안정화시킬 수 있는지를 결정하기 위해 10nM VPRIV (GCB 형태)를 함유하는 혈청을 시험하였다. IFG가 혈청 내 다음 IFG 농도를 가지도록 IFG를 VPRIV에 부가하였다: 1 nM, 3 nM, 10 nM, 30 nM, 100 nM, 300 nM, 및 1000 nM. IFG를 첨가하지 않은 음성 대조군을 사용하였다.
- [0261] 4- 메틸 움벨리페론 b-D- 글루코피라노사이드 기질의 절단을 사용하여 효소 활성을 측정하였다. 음성 대조군, 1 nM IFG 및 10 nM IFG로 60 분에 걸쳐 활성이 100 %에서 약 40 %로 감소하였다. 도 21 참조. 그러나, 30 nM (3x 몰비) 이상의 농도의 첨가는 대부분의 활성 손실을 방지하였다. IFG는 혈청의 열 변성으로부터 GCB를 보호하는 데 효과적일 수 있다. 열분해에 대한 GCB의 IFG- 및 IFGT- 매개 보호는 GCB 생체 이용률을 향상시키고, 혈청에서 GCB 지속성을 향상시키고, GCB의 세포 및 조직 흡수 과정이 더 오래 지속될 수 있게한다.
- [0262] * * *
- [0263] 본 발명은 여기에 기술된 특정 실시예에 의해 그 범위가 제한되지 않아야 한다. 실제로, 본 명세서에 기술된 것들에 추가하여 본 발명의 다양한 변형이 진술한 설명 및 첨부 도면으로부터 당업자에게 명백해질 것이다. 이러한 변형은 첨부된 청구 범위의 범주 내에 속한다. 또한 모든 값은 근사치이며 설명을 위해 제공되는 것으로 이해되어야 한다.

[0264]

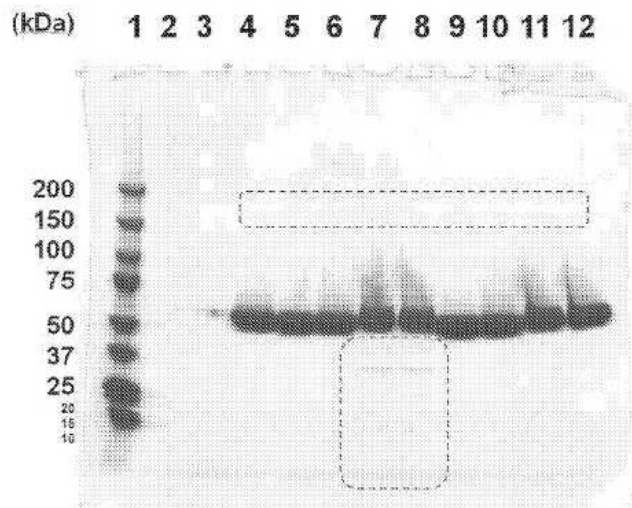
본원에 언급된 모든 공보, 특허 출원, 특허 및 기타 참고 문헌은 그 전문이 참고로 포함된다. 충돌의 경우, 정의를 포함한 본 명세서가 우선한다. 또한, 재료, 방법, 및 예시는 단지 예시적이고 제한적인 의도가 아니다.

도면

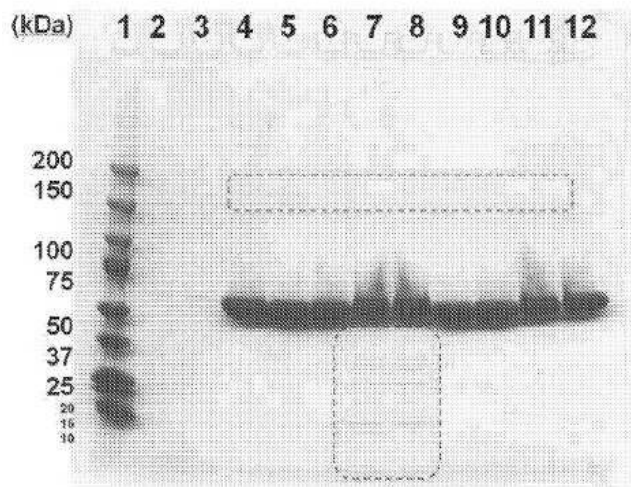
도면1



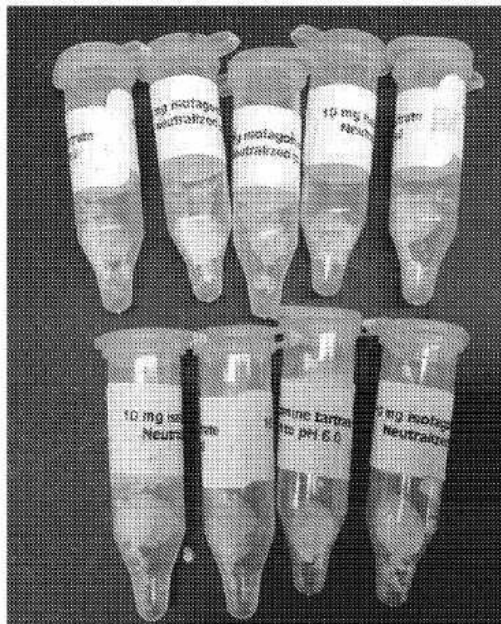
도면2a



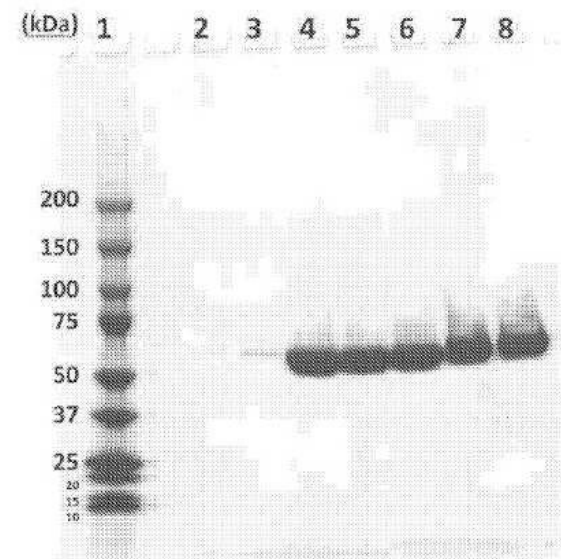
도면2b



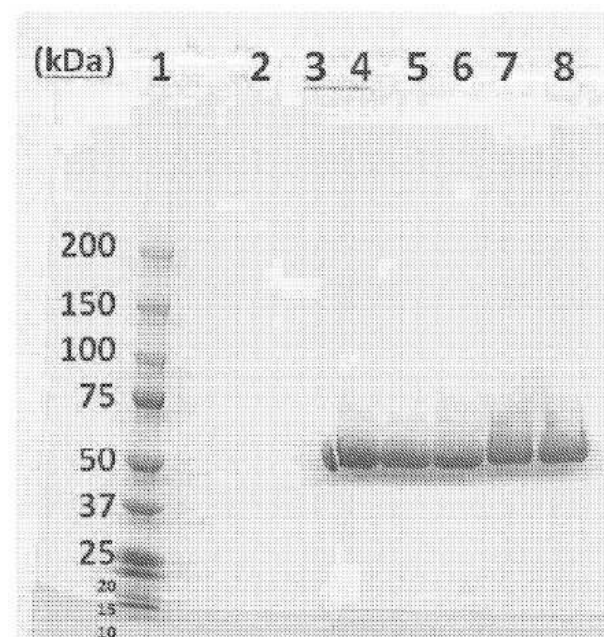
도면3



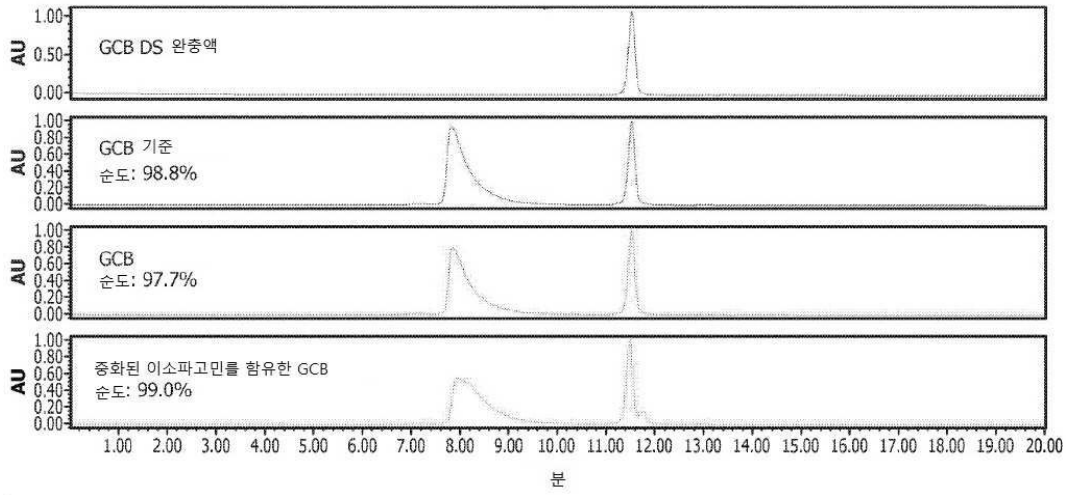
도면4a



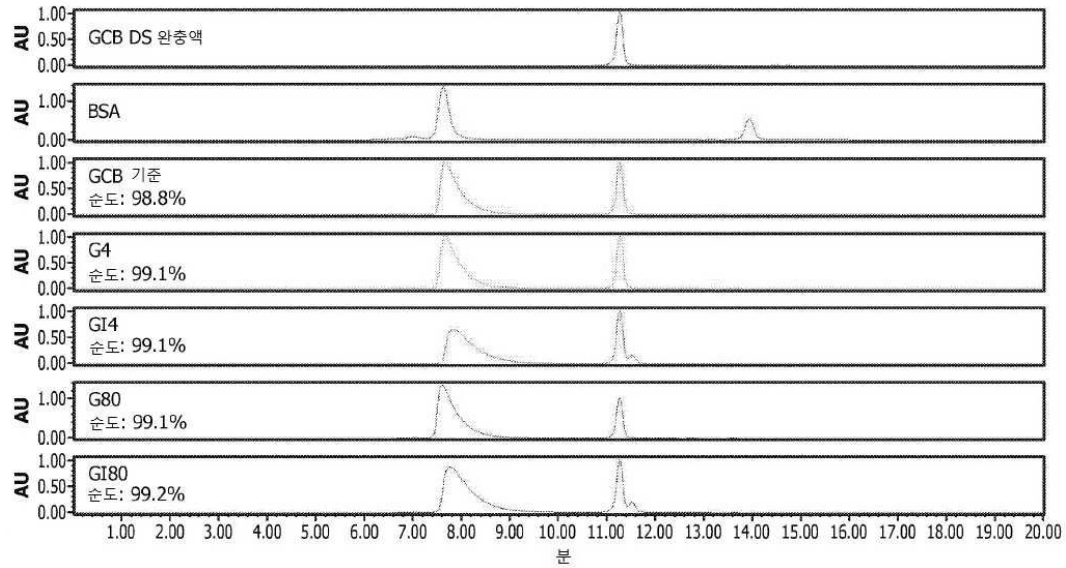
도면4b



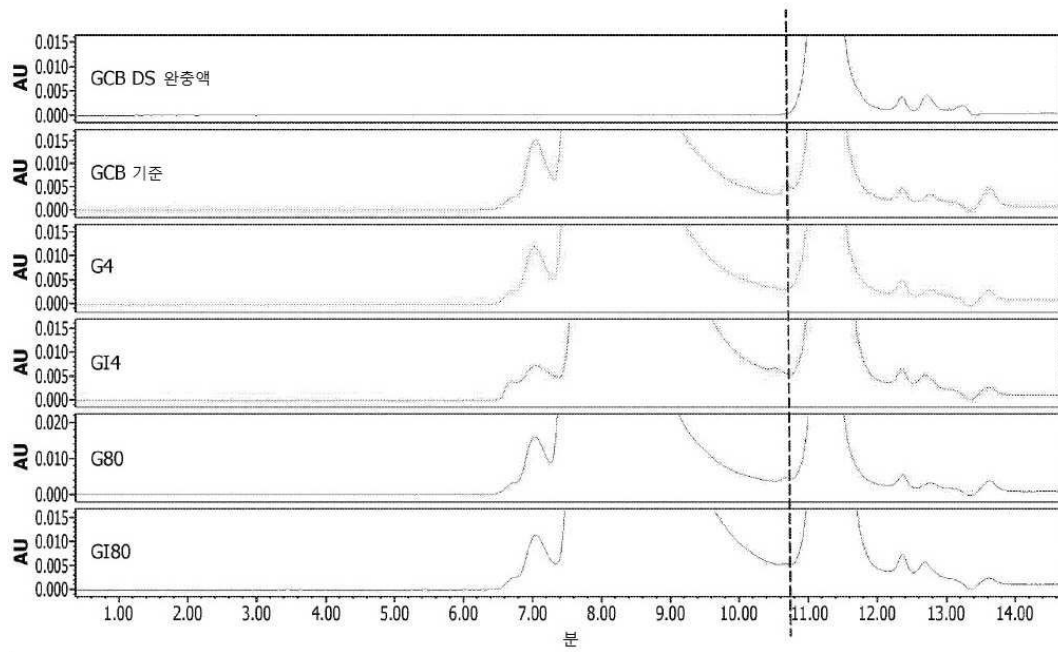
도면5



도면6a



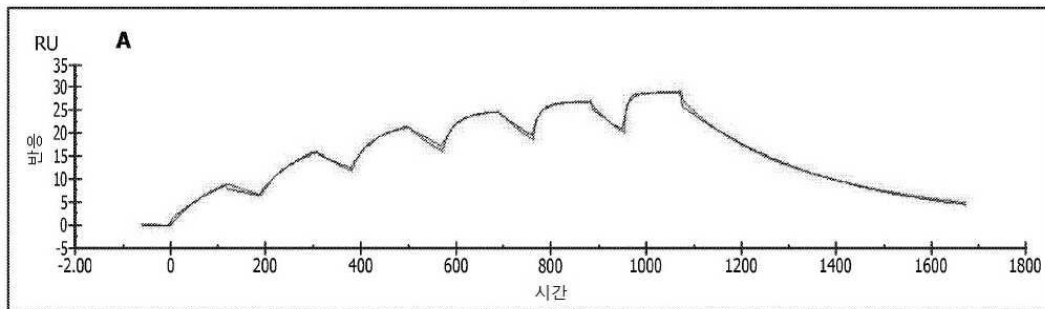
도면6b



도면7a

pH 5.0

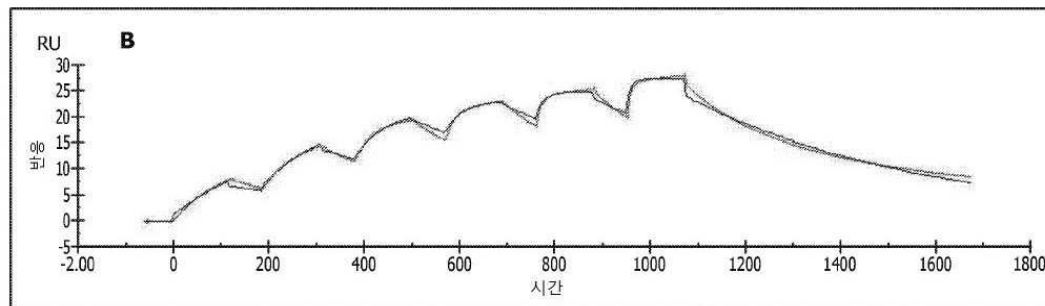
제 1 실험 ($K_d = 251 \text{ nM}$)



도면7b

pH 5.0

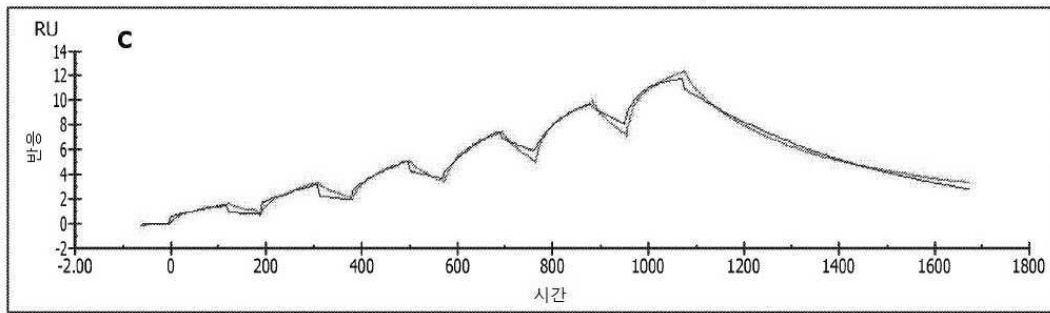
제 2 실험 ($K_d = 198 \text{ nM}$)



도면7c

pH 7.4

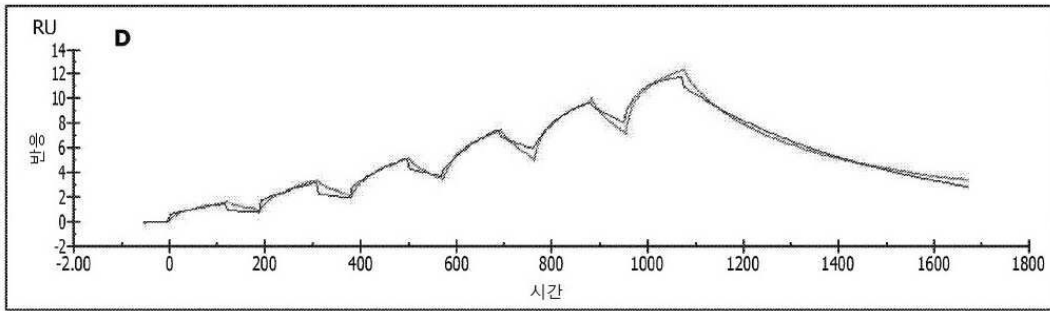
제 1 실험 (Kd = 9.4 nM)



도면7d

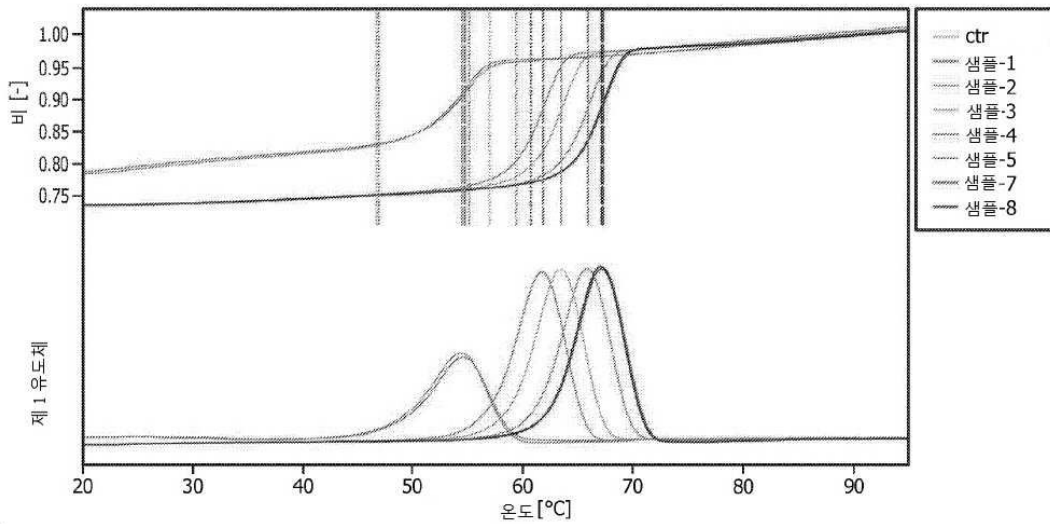
pH 7.4

제 2 실험 (Kd = 6.9 nM)

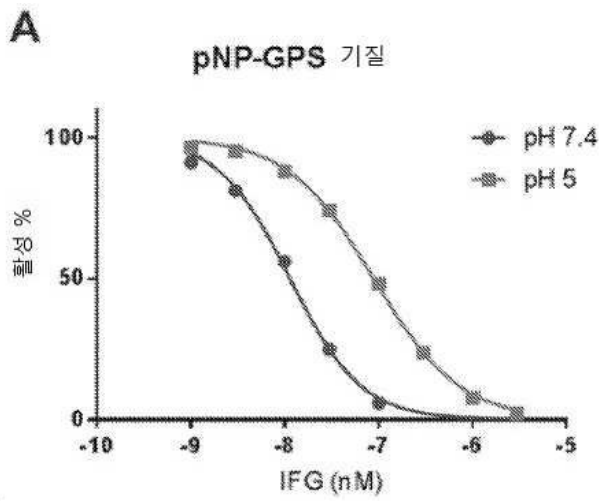


도면8

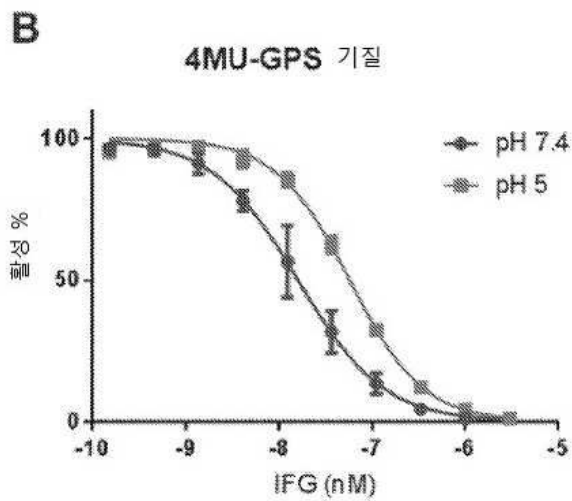
2017년 5월 9일 CGB-IFG 적정



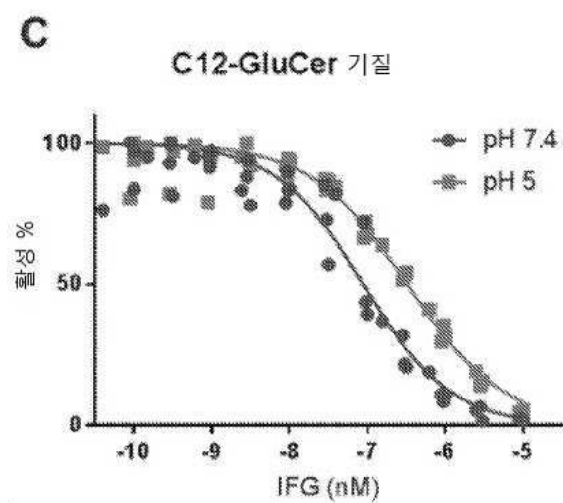
도면9a



도면9b



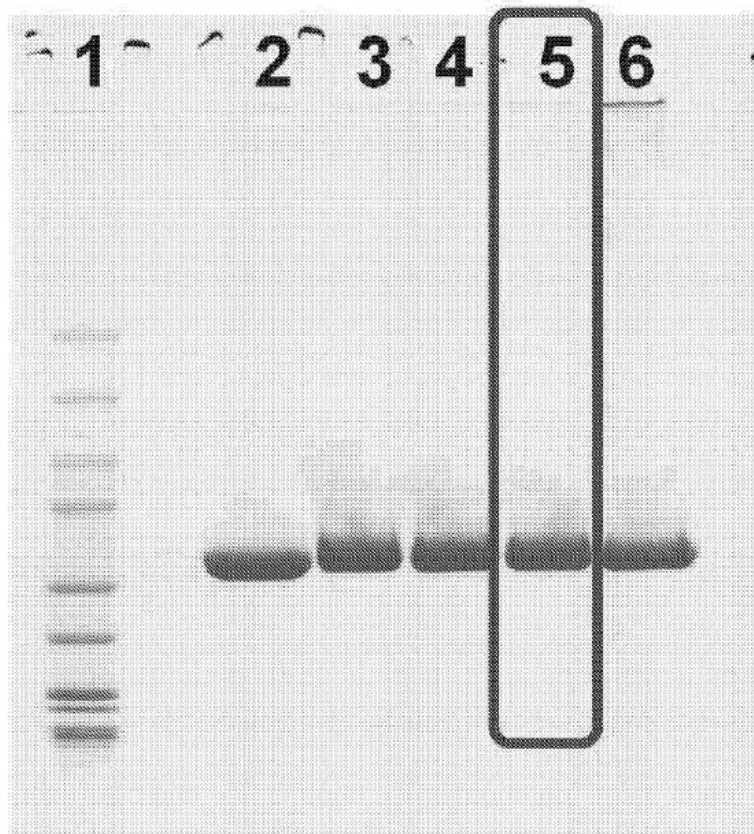
도면9c



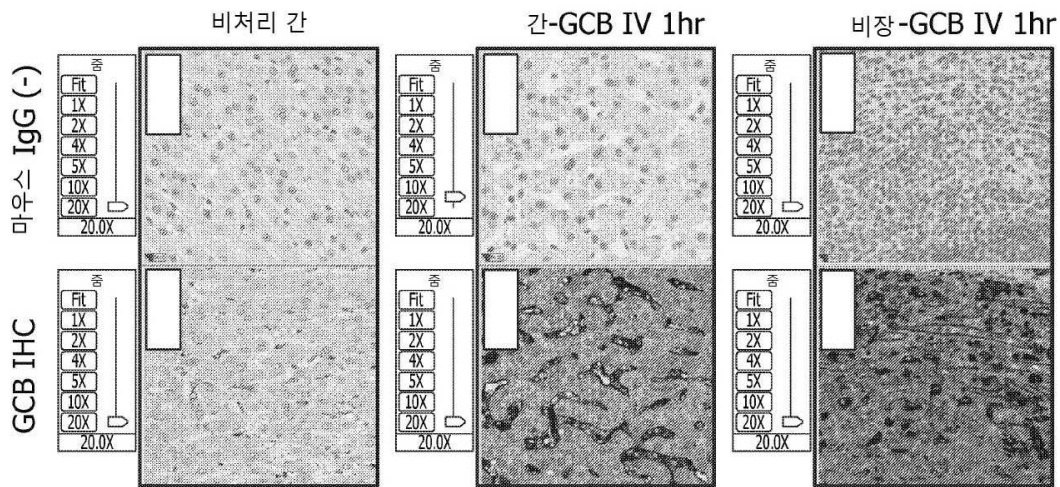
도면10a



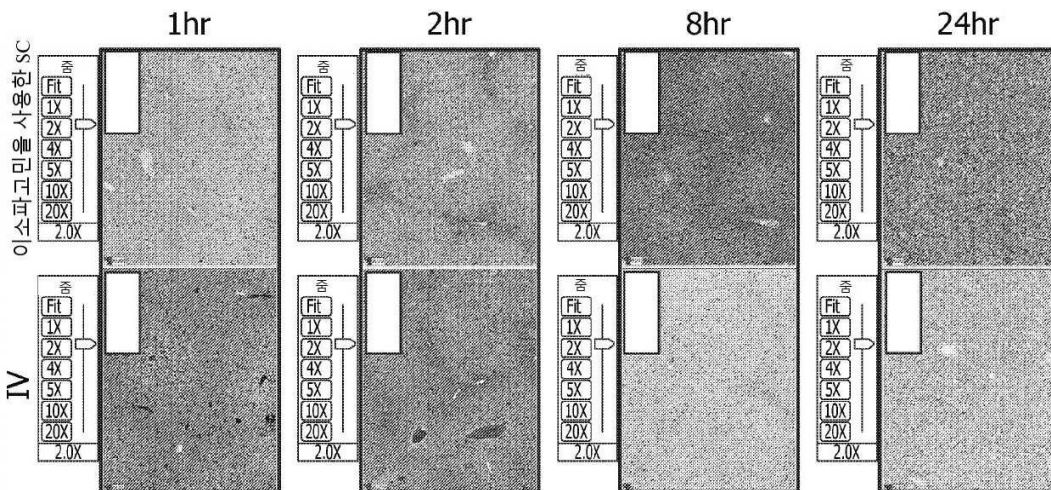
도면10b



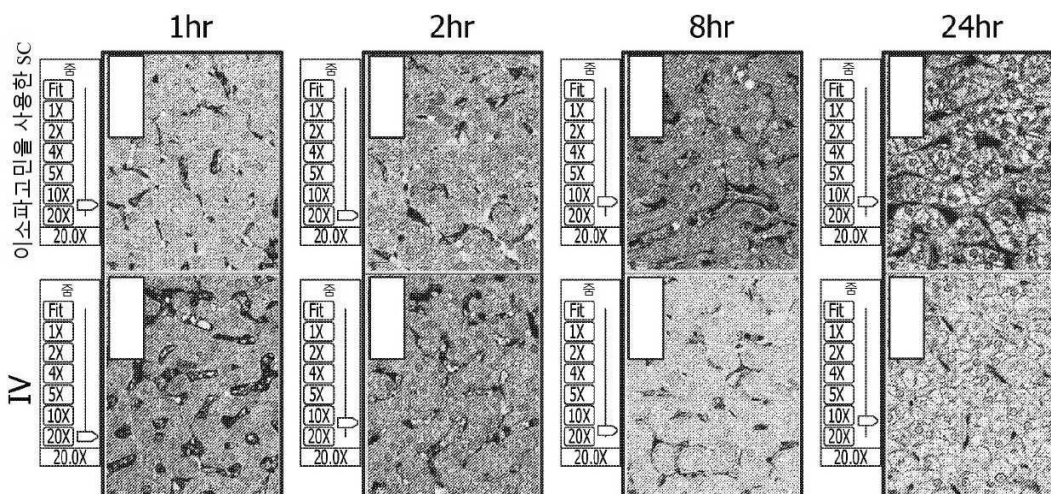
도면11



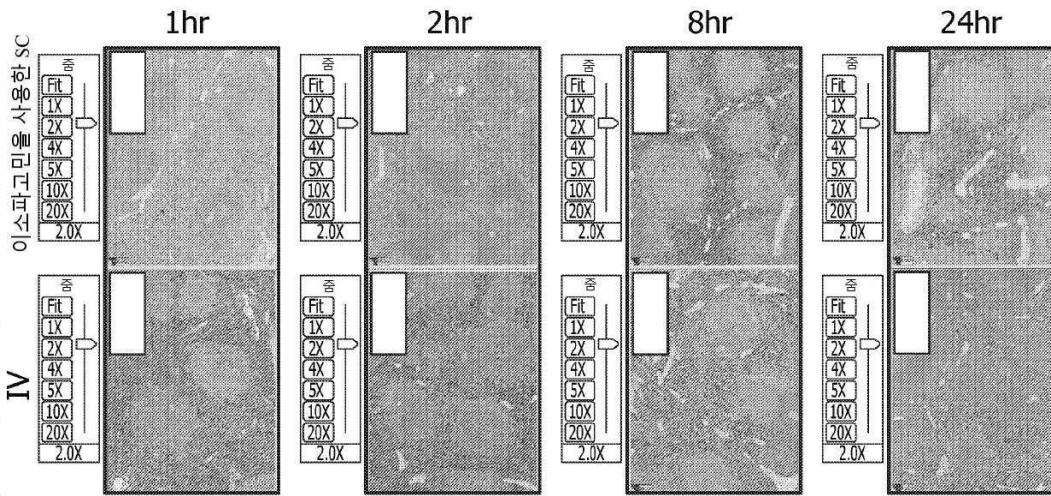
도면12



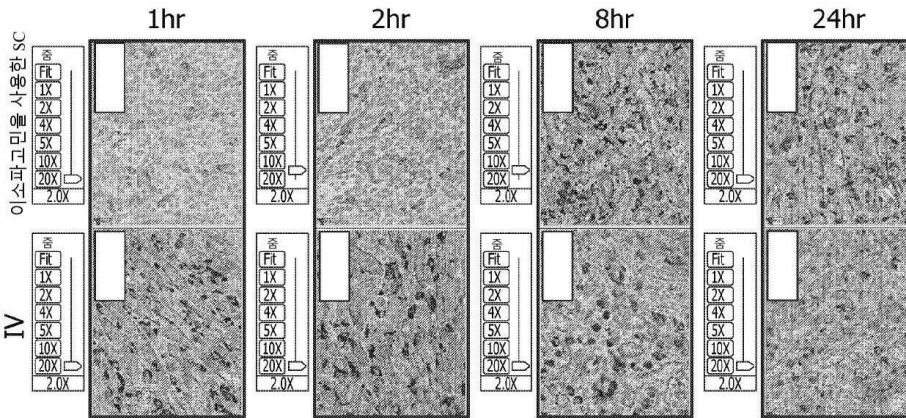
도면13



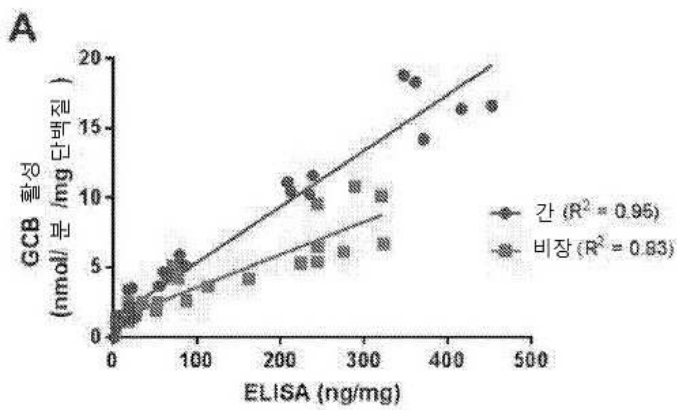
도면14



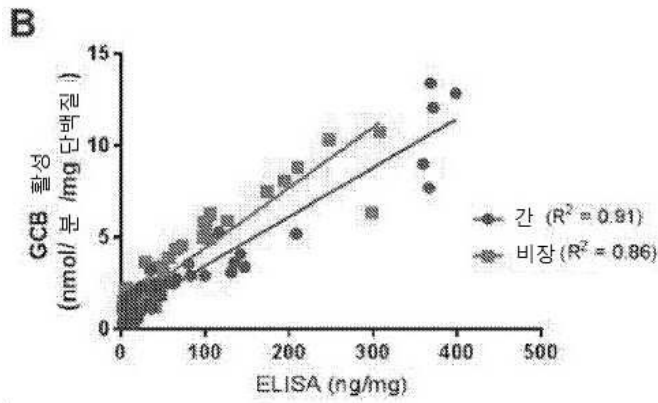
도면15



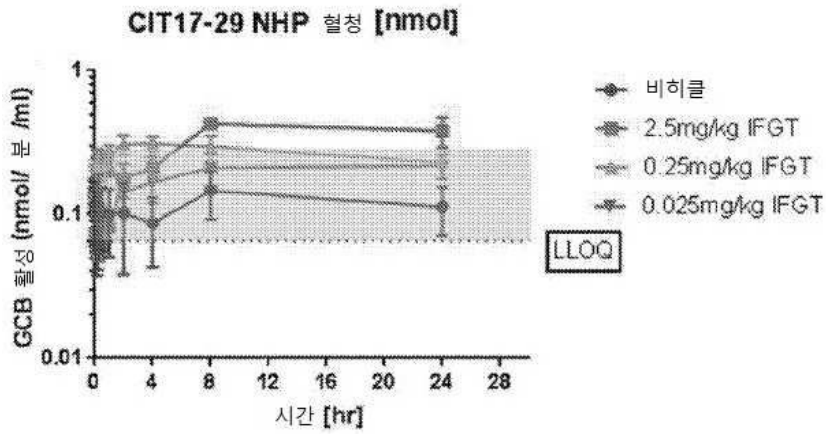
도면16a



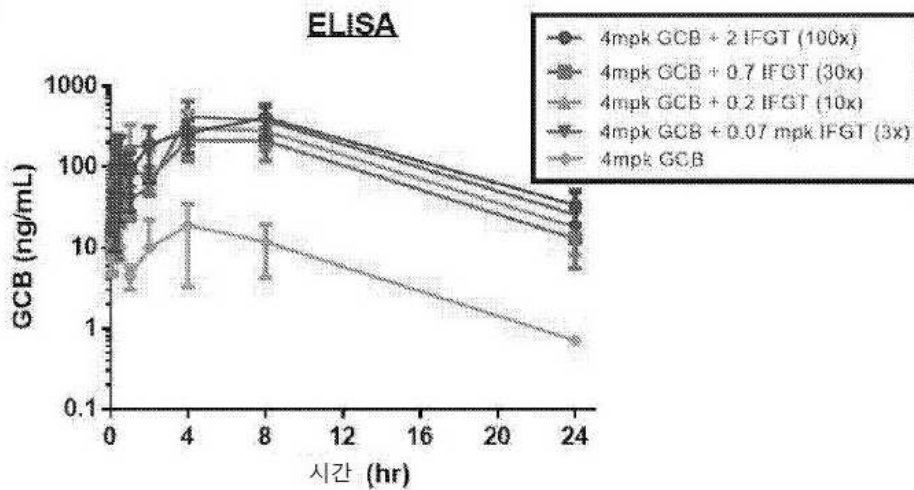
도면16b



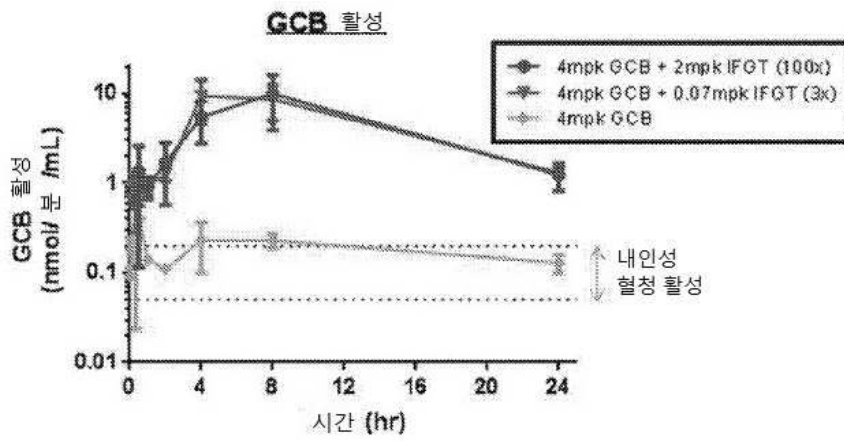
도면16c



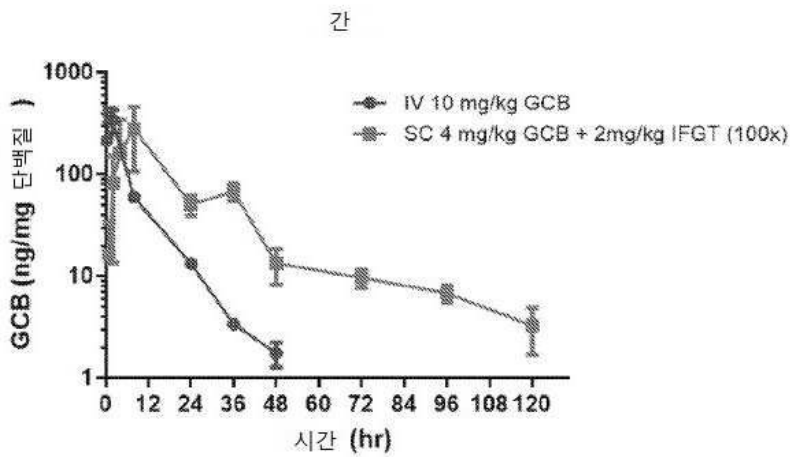
도면17a



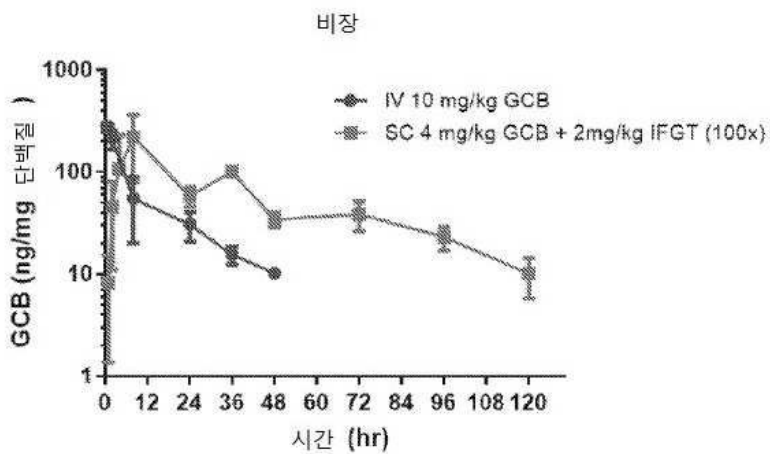
도면17b



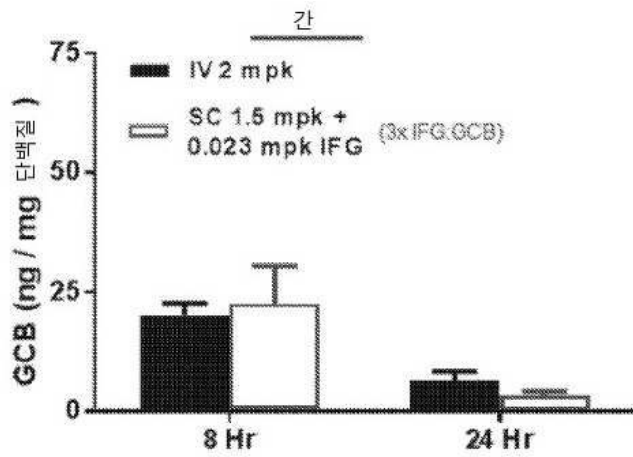
도면18a



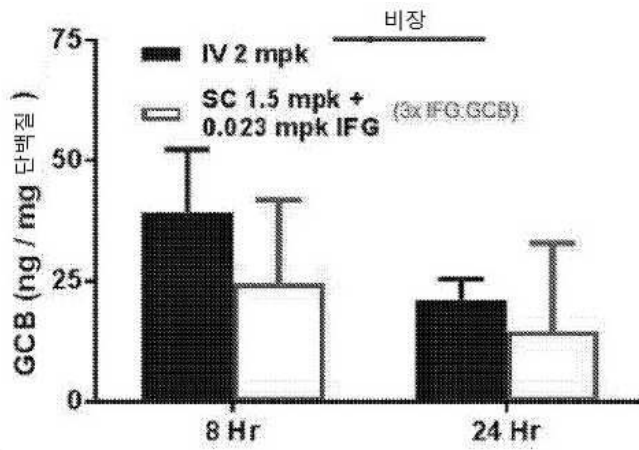
도면18b



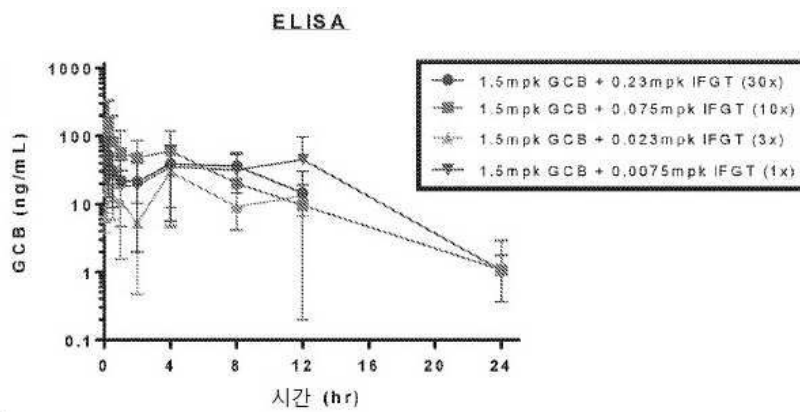
도면19a



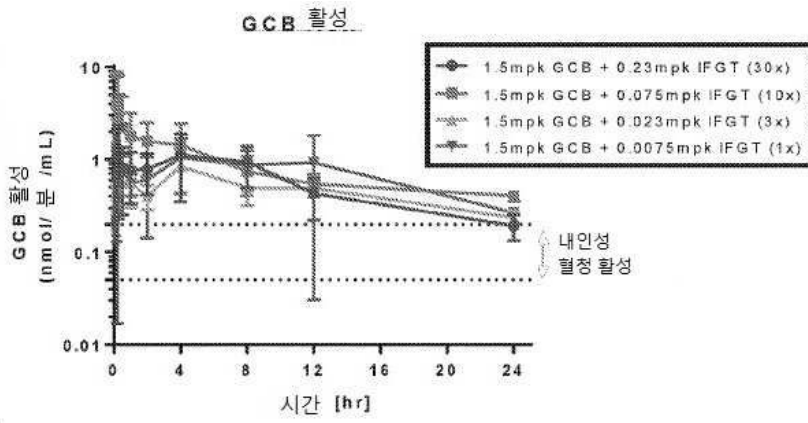
도면19b



도면20a



도면20b



도면21

