



**(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

**(45)** Дата публикации и выдачи патента

**2016.07.29**

**(21)** Номер заявки

**201270646**

**(22)** Дата подачи заявки

**2010.11.24**

**(51)** Int. Cl. *C07D 405/06* (2006.01)

*A61K 31/4025* (2006.01)

*A61P 35/00* (2006.01)

**(54) ИНГИБИТОРЫ ГЛЮКОЗИЛЦЕРАМИДСИНТАЗЫ**

**(31)** 61/264,748

**(32)** 2009.11.27

**(33)** US

**(43)** 2013.01.30

**(86)** PCT/US2010/057952

**(87)** WO 2011/066352 2011.06.03

**(71)(73)** Заявитель и патентовладелец:

**ДЖЕНЗИМ КОРПОРЭЙШН (US)**

**(72)** Изобретатель:

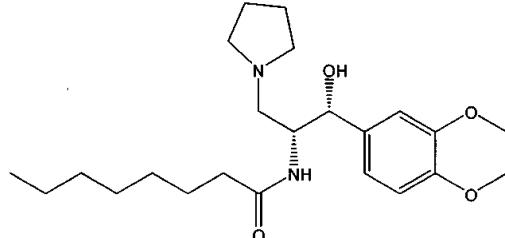
**Лиу Ханлан, Уиллис Крис,  
Бардваж Рену, Коупланд Диане  
П., Харианавала Абизер, Скелл  
Джеффри, Маршалл Джон, Кочлинг  
Джинанмеи, Палас Джерард,  
Петершмитт Джудит, Сигел Крейг,  
Ченг Сенг (US)**

**(74)** Представитель:

**Лыу Т.Н. (RU)**

**(56)** MCEACHERN, KERRY ANNE ET AL.: "A specific and potent inhibitor of glucosylceramide synthase for substrate inhibition therapy of Gaucher disease", MOLECULAR GENETICS AND METABOLISM, [Online] vol. 91, no. 3, 16 May 2007 (2007-05-16), pages 259-267, XP002617211, ISSN: 1096-7192 page 260, right-hand column, paragraph 1 WO-A2-2006053043

**(57)** Описана гемитартратная соль соединения, представленного следующей структурной формулой:



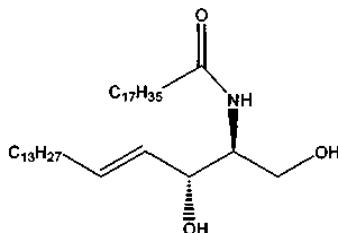
(гемитартрат соединения формулы I), которая может быть использована в фармацевтических областях применения; конкретные отдельные кристаллические формы гемитартрата соединения формулы (I), характеризуемые множеством свойств и физических измерений. Также обсуждаются способы получения гемитартрата соединения формулы (I) и его использования для ингибирования глюкозилцерамидсинтазы или снижения содержаний глюкосфинголипидов у субъектов для лечения ряда заболеваний. Также описываются фармацевтические композиции.

### Родственные заявки

Данная заявка испрашивает приоритет по предварительной заявке на выдачу патента США № 61/264748, поданной 27 ноября 2009 г., все содержание которой включено в настоящий документ.

### Уровень техники

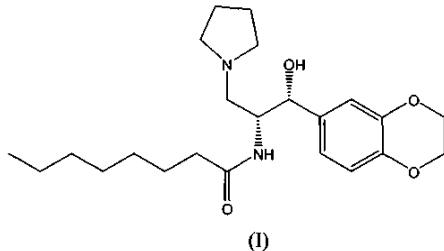
Глюкосфинголипиды (GSL) представляют собой класс природных соединений, которые характеризуются множеством биологических функций, включая способность стимулировать клеточный рост, клеточную дифференцировку, адгезию между клетками или между клетками и матрикными белками, прикрепление микроорганизмов и вирусов к клеткам и метастазирование опухолевых клеток. GSL образуются из глюкозилцерамида (GlcCer), образующегося из церамида, и UDP-глюкозы ферментом UDP-глюкоза:N-ацилсфингозинглюкозилтрансферазой (GlcCer-синтазой). Структура церамида показана ниже:



Церамид

Накопление GSL связывали с рядом заболеваний, включая болезни Тея-Сакса, Гоше и Фабри (см., например, патент США № 6051598). GSL также связывали с определенными злокачественными опухолями. Например, было обнаружено, что определенные GSL встречаются только в опухолях или содержатся в опухолях в аномально высоких концентрациях; проявляют выраженное стимулирующее или ингибирующее действие на рост опухоли при добавлении к опухолевым клеткам в культуральной среде; и ингируют нормальную систему иммунной защиты организма при выделении опухолями в окружающую внеклеточную жидкость. Состав опухолевых GSL меняется по мере увеличения злокачественности опухолей, а антитела против некоторых GSL ингируют рост опухолей.

Соединения, ингибирующие GlcCer-синтазу, могут снижать концентрацию GSL, и сообщалось, что они применимы для лечения субъектов, страдающих одним из вышеупомянутых заболеваний. Ряд эффективных ингибиторов GlcCer, в настоящем документе называемых "аминоцерамидоподобными соединениями", раскрыт в патентах США № 6051598, 5952370, 5945442, 5916911 и 6030995. Соединение формулы (I), показанной ниже, является ингибитором GlcCer-синтазы, проходящим в настоящий момент клинические испытания на предмет лечения болезни Гоше:



(I)

Существует необходимость в солевых формах этого потенциального лекарственного средства, которые являются кристаллическими и обладают иными физическими свойствами, позволяющими наладить их крупномасштабное производство. Также существует необходимость в фармацевтических композициях, в которых это потенциальное лекарственное средство было бы стабильным и могло бы эффективно доставляться субъекту, а также в усовершенствованных способах лечения, предусматривающих использование этого соединения.

### Сущность изобретения

Было обнаружено, что гемитартратная соль соединения формулы (I) (далее "гемитартрат соединения формулы (I)") может быть кристаллизована при вполне определенных условиях с получением определенных негигроскопичных кристаллических форм. Гемитартрат соединения формулы (I) характеризуется некоторыми предпочтительными свойствами по сравнению с другими солями соединения формулы (I). Как описано ниже в примере 1, множество солей соединения формулы (I), включая цитрат, малат, фумарат, метилсульфонат и ацетат, не может быть получено в твердой форме. Хотя гидрохлорид и тартратная соль 1:1 соединения формулы (I) были получены в твердой форме, ни одна из них не была кристаллической, и обе были слишком гигроскопичными для использования в композиции. Гемитартрат соединения формулы (I) легче включать в композиции и синтезировать, чем свободное основание или другие соли. Также гемитартрат соединения формулы (I) является кристаллическим, негигроскопичным, растворимым в воде, характеризуется лучшей текучестью, чем соответствующее свободное основание (далее "свободное основание соединения формулы (I)") и другие соли. Таким образом, эти благоприятные свойства делают гемитартрат соединения формулы (I) применимым в качестве потенциального ле-

карственного средства для крупномасштабного производства.

Также было обнаружено, что стабильные гранулы для композиций капсул, содержащих гемитарtrат соединения формулы (I), могут быть изготовлены при использовании определенных соотношений нерастворимого в воде наполнителя, растворимого в воде наполнителя и гемитарtrата соединения формулы (I). На основе этой находки раскрыты стабильные фармацевтические композиции гемитарtrата соединения формулы (I).

Также было обнаружено, что соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемые соли (включая гемитарtrат соединения формулы (I)) метаболизируются в печени, преимущественно ферментами цитохромами P450. На основе этой находки раскрыты способы лечения соединением формулы (I) или его фармацевтически приемлемыми солями (включая гемитарtrат соединения формулы (I)), которые уменьшают вероятность взаимодействия между лекарственными средствами.

Также было обнаружено, что у мышей Gaucher, которым вводили рекомбинантную глюкоцереброzидазу и затем гемитарtrат соединения формулы (I), наблюдалось более низкое содержание GL1 во внутренних органах и уменьшалось число клеток Гоше в печени по сравнению с таковыми, получавшими лечение только глюкоцереброzидазой или только гемитарtrатом соединения формулы (I). На основе этой находки также раскрыты комбинированные способы лечения с использованием соединения формулы (I) или его фармацевтически приемлемых солей (включая гемитарtrат соединения формулы (I)).

Одним вариантом осуществления согласно настоящему документу является гемитарtrатная соль соединения, представленного формулой (I). Как отмечено выше, гемитарtrатная соль соединения, представленного формулой (I), в настоящем документе называют "гемитарtrатом соединения формулы (I)". Соединение, представленное формулой (I), в настоящем документе называют "свободным основанием соединения формулы (I)".

Другой вариант осуществления согласно настоящему документу относится к фармацевтической композиции, содержащей фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель и гемитарtrат соединения формулы (I).

Другой вариант осуществления относится к способу ингибиования глюкозилцерамидсинтазы или снижения концентрации глюкосфинголипидов у нуждающегося в этом субъекта путем введения субъекту эффективного количества гемитарtrата соединения формулы (I).

Другой вариант осуществления относится к применению гемитарtrата соединения формулы (I) для производства лекарственного препарата для ингибиования глюкозилцерамидсинтазы или снижения концентрации глюкосфинголипидов у нуждающегося в этом субъекте.

Другой вариант осуществления относится к применению гемитарtrата соединения формулы (I) для ингибиования глюкозилцерамидсинтазы или снижения концентрации глюкосфинголипидов у нуждающегося в этом субъекте.

Другой вариант осуществления представляет собой способ лечения субъекта, страдающего болезнью Гоше. Способ предусматривает введение субъекту эффективного количества первого терапевтического средства в комбинации с эффективным количеством второго терапевтического средства. Первое терапевтическое средство представлено соединением формулы (I) или его фармацевтически приемлемой солью, а второе терапевтическое средство является эффективным для лечения болезни Гоше.

Другой вариант осуществления представляет собой способ лечения субъекта, страдающего болезнью Фабри. Способ предусматривает введение субъекту эффективного количества первого терапевтического средства в комбинации с эффективным количеством второго терапевтического средства. Первое терапевтическое средство представлено соединением формулы (I) или его фармацевтически приемлемой солью, а второе терапевтическое средство является эффективным для лечения болезни Фабри.

Другой вариант осуществления относится к фармацевтической композиции, содержащей гемитарtrатную соль соединения, представленного формулой (I); по меньшей мере один растворимый в воде наполнитель; по меньшей мере один нерастворимый в воде наполнитель; по меньшей мере одно связующее вещество; и по меньшей мере одно смазывающее вещество.

Другой вариант осуществления изобретения представляет собой способ лечения субъекта, страдающего болезнью Фабри. Способ предусматривает стадии:

а) введения субъекту эффективного количества соединения формулы (I) или его фармацевтически приемлемой соли;

б) тестирования субъекта с целью определения, характеризуется ли субъект слабым, средним или сильным/сверхсильным метаболизмом посредством P450;

в) если субъект характеризуется средним или сильным/сверхсильным метаболизмом посредством P450, определения уточненного эффективного количества соединения;

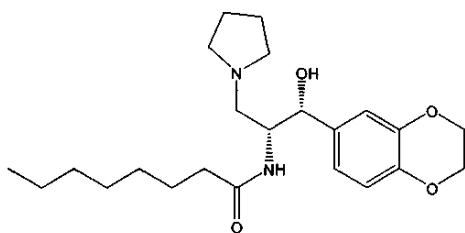
г) если субъект характеризуется средним или сильным/сверхсильным метаболизмом посредством P450, введения субъекту уточненного эффективного количества соединения формулы (I), а если субъект характеризуется слабым метаболизмом посредством P450, введения субъекту эффективного количества соединения формулы (I).

Другой вариант осуществления изобретения представляет собой способ лечения субъекта, страдающего болезнью Гоше. Способ предусматривает стадии:

- введения субъекту эффективного количества соединения формулы (I) или его фармацевтически приемлемой соли;
- тестирования субъекта с целью определения, характеризуется ли субъект слабым, средним или сильным/сверхсильным метаболизмом посредством P450;
- если субъект характеризуется средним или сильным/сверхсильным метаболизмом посредством P450, определения уточненного эффективного количества соединения;
- если субъект характеризуется средним или сильным/сверхсильным метаболизмом посредством P450, введения субъекту уточненного эффективного количества соединения формулы (I), а если субъект характеризуется слабым метаболизмом посредством P450, введения субъекту эффективного количества соединения формулы (I).

Другой вариант осуществления изобретения представляет собой способ лечения субъекта, страдающего болезнью Фабри. Способ предусматривает стадии:

- введения субъекту эффективного количества соединения, представленного следующей структурной формулой:



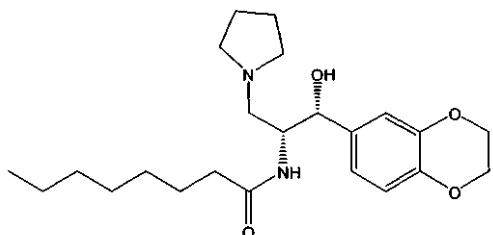
или его фармацевтически приемлемой соли;

- определения содержания соединения в плазме субъекта непосредственно перед введением очередной его дозы; и

с) уточнения вводимого субъекту количества соединения таким образом, что содержание соединения в плазме субъекта непосредственно перед введением очередной его дозы составляет по меньшей мере 5 нг/мл. Альтернативно на стадии б) определяют содержание в плазме субъекта непосредственно перед введением очередной дозы и  $C_{max}$  соединения, а на стадии с) вводимое субъекту количество соединения уточняют таким образом, что содержание соединения в плазме субъекта непосредственно перед введением очередной его дозы составляет по меньшей мере 5 нг/мл, а  $C_{max}$  соединения у субъекта составляет менее 100 нг/мл.

Другой вариант осуществления изобретения представляет собой способ лечения субъекта, страдающего болезнью Гоше. Способ предусматривает стадии:

- введения субъекту эффективного количества соединения, представленного следующей структурной формулой:



или его фармацевтически приемлемой соли;

- определения содержания соединения в плазме субъекта непосредственно перед введением очередной его дозы; и

с) уточнения вводимого субъекту количества соединения таким образом, что содержание соединения в плазме субъекта непосредственно перед введением очередной его дозы составляет по меньшей мере 5 нг/мл.

Альтернативно на стадии б) определяют содержание в плазме субъекта непосредственно перед введением очередной дозы и  $C_{max}$  соединения, а на стадии с) вводимое субъекту количество соединения уточняют таким образом, что содержание соединения в плазме субъекта непосредственно перед введением очередной его дозы составляет по меньшей мере 5 нг/мл, а  $C_{max}$  соединения у субъекта составляет менее 100 нг/мл.

#### Краткое описание чертежей

На фиг. 1 показана экспериментальная XRPD-дифрактограмма гемитартрата соединения формулы (I) (при комнатной температуре).

На фиг. 2 представлен график эффективности лечения, основанного на снижении содержания фермента и субстрата, по снижению содержания глюкозилцерамида в печени мышей Gaucher. Содержание

GL1 в печени измеряли у мышей Gaucher в возрасте 3 месяцев, не получавших лечение, (A) и после 2 недель лечения рекомбинантной глюкоцереброзидазой (B). Мышей, получавших лечение рекомбинантной глюкоцереброзидазой, анализировали через 10 недель без дополнительного лечения (C) или после лечения гемитартратом соединения формулы (I) при введении с пищей 150 мг/кг (D). Также показано содержание GL1 в печени мышей, которым вводили только гемитартрат соединения формулы (I) в течение всего периода исследования (E), и у не получавшего лечение контроля той же возрастной группы (F). Данные выражены как среднее  $\pm$  стандартная ошибка среднего (SEM) (n=5). Статистическую значимость определяли с помощью двухвыборочного t-критерия для независимых выборок.

На фиг. 3 представлен график эффективности лечения, основанного на снижении содержания фермента и субстрата, по снижению содержания глюкозилцерамида в селезенке мышей Gaucher. Содержание GL1 в селезенке измеряли у мышей Gaucher в возрасте 3 месяцев, не получавших лечение, (A) и после 2 недель лечения рекомбинантной глюкоцереброзидазой (B). Мышей, получавших лечение рекомбинантной глюкоцереброзидазой, анализировали через 10 недель без дополнительного лечения (C) или после лечения гемитартратом соединения формулы (I) (D). Также показано содержание GL1 в селезенке мышей, которым вводили только гемитартрат соединения формулы (I) в течение всего периода исследования (E), и у не получавшего лечение контроля той же возрастной группы (F). Данные выражены как среднее  $\pm$  стандартная ошибка среднего (SEM) (n=5). Статистическую значимость определяли с помощью двухвыборочного t-критерия для независимых выборок.

На фиг. 4 представлен график эффективности лечения, основанного на снижении содержания фермента и субстрата, по снижению содержания глюкозилцерамида в легком мышей Gaucher. Содержание GL1 в легком измеряли у мышей Gaucher в возрасте 3 месяцев, не получавших лечение, (A) и после 2 недель лечения рекомбинантной глюкоцереброзидазой (B). Мышей, получавших лечение рекомбинантной глюкоцереброзидазой, анализировали через 10 недель без дополнительного лечения (C) или после лечения гемитартратом соединения формулы (I) (D). Также показано содержание GL1 в легком мышей, которым вводили только гемитартрат соединения формулы (I) в течение всего периода исследования (E), и у не получавшего лечение контроля той же возрастной группы (F). Данные выражены как среднее  $\pm$  стандартная ошибка среднего (SEM) (n=5). Статистическую значимость определяли с помощью двухвыборочного t-критерия для независимых выборок.

На фиг. 5 представлен график, иллюстрирующий количественную оценку степени окрашивания CD68 в печени. Степень CD68-положительного окрашивания в гистологических срезах печени количественно оценивали с помощью программного обеспечения MetaMorph. Показаны уровни у не получавших лечение мышей Gaucher в возрасте 3 месяцев (A) и после лечения глюкоцереброзидазой (B). Также показаны результаты, полученные на мышах, получавших лечение ферментом и затем проанализированных через 10 недель без дополнительного терапевтического вмешательства (C) или после терапии гемитартратом соединения формулы (I) (D). Также показана степень окрашивания печени у мышей Gaucher, которым вводили только гемитартрат соединения формулы (I) (E) и у не получавших лечение контрольных мышей той же возрастной группы (F). Были сопоставлены данные анализа десяти 400x изображений на срез от каждой мыши. Статистическую значимость определяли с помощью двухвыборочного t-критерия для независимых выборок.

На фиг. 6 представлен график, иллюстрирующий эффективность гемитартрата соединения формулы (I) на молодых D409V/null мышах. Гемитартрат соединения формулы (I) вводили D409V/null мышам в возрасте 10 недель ежедневно путем перорального зондового питания в дозе 75 или 150 мг/кг в течение 10 недель. Содержание глюкозилцерамида в печени, легком, сосудистой системе и селезенке оценивали в конце исследования методом HP-TLC. Данные представлены как относительное содержание GL-1 у не получавших лечение контрольных мышей той же возрастной группы. Пунктирными линиями показано содержание глюкозилцерамида, наблюдаемое у нормальных мышей дикого типа. \*p<0,05; \*\*p<0,01 относительно не получавшего лечение контроля (двусторонний, двухвыборочный t-критерий для независимых выборок). Данные выражены как среднее  $\pm$  стандартная ошибка среднего (SEM) (n=5 для 75 мг/кг; n=6 для 150 мг/кг).

На фиг. 7 показано воздействие терапии гемитартратом соединения формулы (I) на накопление GL-3 в печени, сердце, почке, селезенке, головном мозге и крови мышей Fabry.

На фиг. 8 показан график воздействия терапии гемитартратом соединения формулы (I) на возникновение и развитие периферической невропатии у мышей Fabry.

На фиг. 9 показаны графики измерений некоторых маркеров функции почек у мышей Fabry, получавших лечение гемитартратом соединения формулы (I).

На фиг. 10 показана временная шкала исследований ERT и SRT популяций мышей, получающих различную медикаментозную терапию: А) Фабразим раз в два месяца без гемитартрата соединения формулы (I); В) Фабразим раз в два месяца и гемитартрат соединения формулы (I) в пище; С) Фабразим, вводимый в начале исследования и на четвертом месяце исследования, и гемитартрат соединения формулы (I) в пище; D) гемитартрат соединения формулы (I) в пище без Фабразима; и Е) без медикаментозной терапии.

На фиг. 11 показаны графики содержания GL-3 в крови у шести популяций (n=?) мышей, выраженные в нг/мл крови (A-E Fabry-Rag, а F дикий тип). Популяции мышей получали следующее лечение: А) Фабразим раз в два месяца без гемитартрата соединения формулы (I); В) Фабразим раз в два месяца и гемитартрат соединения формулы (I) в пище; С) Фабразим, вводимый в начале исследования и на четвертом месяце исследования, и гемитартрат соединения формулы (I) в пище; D) гемитартрат соединения формулы (I) в пище без Фабразима; Е) без лекарственной терапии; и F) без медикаментозной терапии.

На фиг. 12 показаны графики содержания GL-3 в печени и почке мышей Fabry-Rag; популяции мышей (n=?) получали следующее лечение: А) Фабразим раз в два месяца без гемитартрата соединения формулы (I); В) Фабразим раз в два месяца и гемитартрат соединения формулы (I) в пище; С) Фабразим, вводимый в начале исследования и на четвертом месяце исследования, и гемитартрат соединения формулы (I) в пище; D) гемитартрат соединения формулы (I) в пище без Фабразима; и Е) без медикаментозной терапии.

На фиг. 13 показаны графики содержания GL-3 в моче мышей Fabry-Rag; популяции мышей (n=?) получали следующее лечение: А) Фабразим раз в два месяца без гемитартрата соединения формулы (I); В) Фабразим раз в два месяца и гемитартрат соединения формулы (I) в пище; С) Фабразим, вводимый в начале исследования и на четвертом месяце исследования, и гемитартрат соединения формулы (I) в пище; D) гемитартрат соединения формулы (I) в пище без Фабразима; и Е) без медикаментозной терапии.

На фиг. 14 представлен график, показывающий выраженный в секундах латентный период термо-чувствительности мышей Fabry-Rag, получавших следующее лечение: Фабразим раз в два месяца без гемитартрата соединения формулы (I); Фабразим раз в два месяца и гемитартрат соединения формулы (I) в пище; Фабразим, вводимый в начале исследования и на четвертом месяце исследования, и гемитартрат соединения формулы (I) в пище; гемитартрат соединения формулы (I) в пище без Фабразима; без медикаментозной терапии; мыши дикого типа; и не получавшие лечение в течение 3 месяцев.

На фиг. 15 представлен график, показывающий общее значение площади разложения под кривыми HPLC различных смесей, содержащих гемитартрат соединения формулы (I), моногидрат лактозы для капсулирования и Avicel PH 301 (микрокристаллическую целлюлозу) после того, как они были выдержаны при 85°C в течение 3 суток. Площадь разложения под кривой HPLC представляет собой отношение общей площади пиков, соответствующих продуктам разложения, к общей площади пиков, соответствующих гемитартрату соединения формулы (I) и продуктам разложения.

#### Подробное описание изобретения

Настоящий документ относится к уникальным кристаллическим формам гемитартрата соединения формулы (I) и новым фармацевтическим композициям гемитартрата соединения формулы (I), содержащим кристаллические формы гемитартрата соединения формулы (I), описанные в настоящем документе. Настоящий документ также относится к способам ингибирования глюкозилцерамидсинтазы или снижения концентрации глюкосфинголипидов у нуждающегося в этом субъекта. Дополнительно, настоящий документ относится к способам получения определенных кристаллических форм гемитартрата соединения формулы (I). Настоящий документ также относится к стабильным фармацевтическим композициям гемитартрата соединения формулы (I), комбинированным способам лечения соединением формулы (I) или его фармацевтически приемлемыми солями (включая гемитартрат соединения формулы (I)) и способам лечения соединением формулы (I) или его фармацевтически приемлемыми солями (включая гемитартрат соединения формулы (I)), которые минимизируют риск взаимодействия между лекарственными средствами.

#### Кристаллические формы гемитартрата соединения формулы (I).

Согласно конкретному варианту осуществления по меньшей мере определенная относительная массовая доля гемитартрата соединения формулы (I) является кристаллической. Конкретная относительная массовая доля включает 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% или относительную долю в диапазоне между 70 и 100%.

Согласно другому конкретному варианту осуществления по меньшей мере конкретная относительная массовая доля гемитартрата соединения формулы (I) является единой кристаллической формой гемитартрата соединения формулы (I). Конкретная относительная массовая доля включает 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% или относительную долю в промежутке между 70 и 100%.

Используемый в настоящем документе термин "кристаллический" относится к твердому веществу, характеризующемуся кристаллической структурой, в которой отдельные молекулы характеризуются высокогомогенным постоянным устойчивым химическим строением. Кристаллический гемитартрат соединения формулы (I) может представлять собой кристаллы единой кристаллической формы гемитартрата соединения формулы (I) или смесь кристаллов различных отдельных кристаллических форм. Термин "единая кристаллическая форма" означает гемитартрат соединения формулы (I) в виде единственного кристалла или множества кристаллов, в котором каждый кристалл имеет одну и ту же кристаллическую форму.

Когда конкретная относительная массовая доля гемитартрата соединения формулы (I) представляет собой единую кристаллическую форму, оставшийся гемитартрат соединения формулы (I) представляет

собой некую комбинацию аморфного гемитартрата соединения формулы (I) и/или одной или нескольких других кристаллических форм гемитартрата соединения формулы (I), исключая эту единую кристаллическую форму. Когда кристаллический гемитартрат соединения формулы (I) определен в виде конкретной относительной доли определенной кристаллической формы гемитартрата соединения формулы (I), оставшееся количество изготовлено из аморфной формы и/или кристаллических форм, отличных от одной или нескольких определенных форм, указанных конкретно. Примеры единой кристаллической формы включают Форму А гемитартрата соединения формулы (I), характеризующуюся одним или более свойством, как обсуждается выше.

Поскольку винная кислота имеет две карбоксильные группы, она может образовывать соли с различным мольным соотношением соединения, представленного формулой (I), и тартрата (основания, со-пряженного с винной кислотой). Например, соль, в которой молярное соотношение тартрата к соединению формулы (I) составляет около один к одному, является тартратом соединения формулы (I) (1 тартрат:1 соединение формулы (I)), а соль, в которой молярное соотношение тартрата к соединению формулы (I) составляет около один к двум, является гемитартратом соединения формулы (I) (1 тартрат: 2 соединения формулы (I)).

Гемитартратная соль может существовать в различных стереоизомерных формах. Стереоизомерами являются соединения, которые отличаются только своей пространственной ориентацией. Энантиомеры представляют собой пары стереоизомеров, чьи зеркальные отображения не совпадают друг с другом чаще всего из-за того, что они содержат ассиметрично замещенный атом углерода, действующий как хиральный центр. Диастереоизомеры представляют собой стереоизомеры, которые не соотносятся между собой как зеркальные отображения чаще всего из-за того, что они содержат два или более ассиметрично замещенных атомов углерода.

Код стереоизомер назван (как в случае, например, L-(+)-винной кислоты) или изображен в виде структуры (как в случае, например, соединения формулы (I)), названный или изображенный стереоизомер является по меньшей мере на 60, 70, 80, 90, 99 или 99,9% по массе чистым относительно других стереоизомеров. Когда один стереоизомер назван (как в случае, например, L-(+)-винной кислоты) или изображен в виде структуры (как в случае, например, соединения формулы (I)), названный или изображенный стереоизомер является по меньшей мере на 80, 90, 99 или 99,9% по массе оптически чистым. Массовый процент оптической чистоты представляет собой отношение массы энантиомера к массе энантиомера плюс масса его оптического изомера.

"Рацемат" или "рацемическая смесь" означает смесь эквимолярных количеств двух энантиомеров, которая не проявляет оптической активности, например не вращает плоскость поляризованного света.

Винная кислота имеет три стереоизомера: L-(+)-винную кислоту или левовращающую винную кислоту, ее энантиомер - правовращающую винную кислоту или D-(-)-винную кислоту и ахиральную форму - мезовинную кислоту. Обозначение L и D указывает на способность кислоты вращать плоскость поляризованного света.

Для изготовления гемитартрата соединения формулы (I) могут быть использованы любые стереоизомеры винной кислоты. Например, гемитартрат может быть образован из только одного из ее стереоизомеров или из их комбинации. Гемитартратную соль выбирают из D-гемитартрата, L-гемитартрата, гемимезотартрата или рацемического D,L-гемитартрата. В определенном воплощении гемитартратной солью является L-гемитартрат. Термин "L-гемитартрат" означает, что гемитартратная соль образована из L-винной кислоты. Термин "рацемический D,L-гемитартрат" означает, что для изготовления гемитартрата соединения формулы (I) использовали D-тартрат, и L-тартрат. Количество D-тартрата в рацемическом D,L-гемитартрате может быть больше, равно или меньше количества присутствующего L-тартрата.

Термин "левовращающий" означает, что поляризованный свет вращается влево при прохождении через ассиметричное соединение. Префикс для обозначения левовращающих соединений - "L".

Термин "правовращающий" означает, что поляризованный свет вращается вправо при прохождении через ассиметричное соединение. Префикс для обозначения правовращающих соединений - "D".

Получение гемитартрата соединения формулы (I).

Гемитартрат соединения формулы (I) может быть получен путем смешивания соединения формулы (I) с L-винной кислотой в приемлемом растворителе. Осаждению гемитартрата соединения формулы (I) можно способствовать добавлением затравочного кристалла. Растворителями, которые могут быть использованы, являются метанол, вода, этанол, ацетон, этилацетат или их комбинации.

Определенные твердые формы гемитартрата соединения формулы (I) могут быть изготовлены, например, с помощью медленного упаривания, медленного охлаждения и осаждения осадителем. Растворители, которые могут быть использованы в этих способах, включают воду, гептан, гексан, толуол, дихлорметан, этанол, изопропиловый спирт, ацетонитрил, этилацетат, метанол, ацетон, метил-трет-бутиловый эфир (обозначенный в настоящем документе как "MTBE"), п-диоксан и тетрагидрофуран (обозначенный в настоящем документе как "THF").

Твердые формы гемитартрата соединения формулы (I) могут быть получены с помощью выпаривания растворителя из раствора гемитартрата соединения формулы (I) в растворителе или смеси растворителей. Приемлемые смеси растворителей включают метанол, этанол, ацетон, воду, этилацетат и дихлор-

метан. Предпочтительные смеси растворителей включают этанол, метанол, воду и ацетон.

Твердые формы гемитартрата соединения формулы (I) могут быть получены посредством медленного охлаждения нагретого раствора гемитартрата соединения формулы (I) в растворителе. Приемлемые растворители включают этанол, метанол, воду, ацетон и этилацетат.

Твердые формы гемитартрата соединения формулы (I) могут быть получены посредством быстрого охлаждения нагретого раствора гемитартрата соединения формулы (I) в растворителе путем помещения раствора в ледяную баню. Приемлемые растворители включают этанол, метанол, воду, этилацетат или смеси этих растворителей.

Твердые формы гемитартрата соединения формулы (I) могут быть получены с помощью добавления раствора гемитартрата соединения формулы (I) в растворителе, как описано выше, в осадитель при данной температуре. Более конкретно, осадителем является этилацетат, ацетон, ацетонитрил, толуол, THF, MTBE, п-диоксан, изопропанол или гептан. В частности смеси растворитель/осадитель включают метанол/ этилацетат, метанол/ ацетон, метанол/ гексан, метанол/ гептан, метанол/ ацетонитрил, метанол/ толуол, метанол/ THF, метанол/ MTBE, метанол/ п-диоксан, этанол/ этилацетат, этанол/ гексан, этанол/ гептан, этанол/ ацетон, этанол/ ацетонитрил, этанол/ толуол, этанол/ MTBE, этанол/ THF, вода/ THF, вода/ изопропанол, вода/ ацетонитрил, вода/ ацетон, дихлорметан/ гептан, дихлорметан/ ацетон, дихлорметан/ этилацетат, дихлорметан/ ацетонитрил, дихлорметан/ толуол, дихлорметан/ THF, дихлорметан/ MTBE, дихлорметан/ п-диоксан и дихлорметан/ изопропанол.

Предпочтительные смеси растворитель/осадитель включают метанол/ этилацетат, метанол/ ацетон, метанол/ MTBE и вода/ ацетон.

Используемый в настоящем документе термин "осадитель" касается растворителя, в котором гемитартрат соединения формулы (I) имеет низкую растворимость и который вызывает осаждение гемитартрата из раствора в форме мелкого порошка или кристаллов.

Дополнительные способы для образования твердых форм гемитартрата соединения формулы (I) включают осаждение твердого вещества из этилацетата/ ацетона и необязательно сушку образовавшегося твердого вещества при комнатной температуре. В другом способе твердое вещество может быть затем перекристаллизовано в ацетоне с добавлением или без добавления затравочного кристалла. Альтернативно гемитартрат соединения формулы (I) может быть осажден из растворителей этилацетат/ ацетон и перекристаллизован в этилацетате. Альтернативно гемитартрат соединения формулы (I) затем может быть перекристаллизован в изопропаноле. Альтернативно гемитартрат соединения формулы (I) может быть изготовлен с использованием только ацетона без дополнительной перекристаллизации. Альтернативно гемитартрат соединения формулы (I) может быть осажден из ацетона после краткого кипячения в колбе с обратным холодильником без дополнительной перекристаллизации.

Альтернативно гемитартрат соединения формулы (I) затем может быть перекристаллизован в метаноле/ ацетоне с добавлением или без добавления затравочного кристалла. Альтернативно гемитартрат соединения формулы (I) затем может быть перекристаллизован в воде/ ацетоне с добавлением или без добавления затравочного кристалла.

Характеристика кристаллических форм гемитартрата соединения формулы (I).

Согласно конкретному варианту осуществления, кристаллическая форма гемитартрата соединения формулы (I), кристаллическая Форма А, характеризуется одним, двумя, тремя, четырьмя или пятью основными пиками на рентгеновской порошковой дифрактограмме при углах 20 5,1, 6,6, 10,7, 11,0, 15,9 и 21,7°. В еще более частном воплощении, кристаллическая форма характеризуется пиками на рентгеновской порошковой дифрактограмме при углах 20 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 и 23,5°. Должно быть понятно, что определенный угол 2θ означает определенное значение  $\pm 0,2^\circ$ .

Используемый в настоящем документе термин "основной пик на рентгеновской порошковой дифрактограмме" относится к пику на рентгеновской порошковой дифрактограмме с относительной интенсивностью большей чем 25%. Относительная интенсивность рассчитывается как отношение интенсивности пика, представляющего интерес, к интенсивности наибольшего пика.

Способы лечения с использованием гемитартрата соединения формулы (I).

Используемый в настоящий заявке термин "субъект" означает млекопитающее, предпочтительно пациента человека, но также может означать животное, нуждающееся в ветеринарном лечении, такое как домашнее животное (например, собаки, кошки и т.п.), сельскохозяйственное животное (например, коровы, овцы, свиньи, лошади и т.п.) или лабораторное животное (например, крысы, мыши, морские свинки и т.п.). Термины "субъект" и "пациент" используются взаимозаменяющими.

Одним из воплощений настоящей заявки является способ замедления, например ингибиравания или снижения активности глюкозилцерамидсинтазы, или снижения концентраций глюкосфинголипидов у нуждающегося в этом субъекта, путем введения субъекту эффективного количества гемитартратной соли соединения формулы (I), включая ее кристаллические формы, как описано выше.

Нуждающимся в лечении субъектом является субъект с состоянием или заболеванием, требующим ингибиравания глюкозилцерамидсинтазы или снижения концентраций глюкосфинголипидов в клетках, в

частности, в лизосомах или мембранах клеток. Ингибиторы глюкозилцерамидсинтазы показаны пригодными для лечения лизосомальных болезней накопления, таких как болезни Тея-Сакса, Гоше или Фабри (см., например, патенты США № 6569889; 6255336; 5916911; 5302609; 6660749; 6610703; 5472969; 5525616, все сведения из которых включаются в настоящую заявку путем ссылки).

Примеры состояний или заболеваний включают поликистозную болезнь почек и мембранные гло-мерулопатию (см. предварительные заявки США № 61/130401 и 61/102541, все сведения из которых включаются в настоящую заявку путем ссылки); гломерулонефрит и гломерулосклероз (см. предварительную заявку США 61/137214); волчанку (см. PCT/US 2009/001773, все приведенные в ней сведения включаются в настоящую заявку путем ссылки); сахарный диабет, включая сахарный диабет 2 типа (см. WO 2006/053043, все приведенные в ней сведения включаются в настоящую заявку путем ссылки); лечение нарушений, вызывающих рост и деление клеток, включая раковые заболевания, коллагеноз со-судов, атеросклероз и гепатрофию почек у пациентов с сахарным диабетом (см. патенты США № 6916802 и 5849326, все приведенные в них сведения включаются в настоящую заявку путем ссылки); ингибирование роста артериальных эпителиальных клеток (см. патенты США № 6916802 и 5849326); лечение пациентов, страдающих от инфекций (см. Svensson, M. et al., "Epithelial Glucosphingolipid Expression as a Determinant of Bacterial Adherence and Cytokine Production," *Infect, and Immun.*, 62:4404-4410 (1994), все приведенные в ней сведения включаются в настоящую заявку путем ссылки); предотвращение генерирования организмом реципиента, например пациента, антител против опухоли (см. Inokuchi, J. et al., "Antitumor Activity in Mice of an Inhibitor of Glycosphingolipid Biosynthesis," *Cancer Lett.*, 38: 23-30 (1987), все приведенные в ней сведения включаются в настоящую заявку путем ссылки); и лечение опу-холей (см. Nakomori, 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 Lung Carcinoma by an Inhibitor of Glucosylceramide Synthase and its Possible Mechanism of Action," *Cancer Res.*, 50:6731-6737 (1990) и 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), все приведенные в них сведения включаются в настоящую заявку путем ссылки).

Гемитартрат соединения формулы (I) может быть также использован для опухолевых вакцино-подобных композиций (см., например, патенты США № 6569889; 6255336; 5916911; 5302609; 6660749; 6610703; 5472969; 5525616).

Соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемая соль (включая его гемитартратную соль) могут быть использованы в раскрытых способах в качестве монотерапии, например в качестве единственного фармацевтически активного ингредиента, вводимого для лечения показания.

Альтернативно соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемая соль (включая его гемитартратную соль) могут быть использованы в раскрытых способах виде комбинированной терапии совместно с другими терапевтически активными лекарственными средствами, известными из уровня техники как предназначенные для лечения требуемых заболеваний или показаний. Термины "совместная терапия" или "комбинация", или "комбинированная терапия" или "совместно вводимые" используются в настоящем документе взаимозаменяющими и означают, что соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемую соль (включая гемитартратную соль) вводят до, после или одновременно с одним или более другим терапевтическим средством. Согласно одному из вариантов осуществления комбинирован-ную терапию используют для лечения лизосомального заболевания, такого как болезнь Гоше или болезнь Фабри. Альтернативно соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемую соль (вклю-чая гемитартратную соль) вводят одновременно (например, параллельно) в виде отдельных композиций или в виде единой композиции. Альтернативно средства могут быть введены в виде отдельных компози-ций последовательно в пределах подходящих временных рамок, определяемых квалифицированным практикующим врачом (например, времени, достаточного для перекрывания фармацевтических эффек-тов от лечения). Соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемая соль (включая гемитарт-ратную соль) и одно или несколько других терапевтических средств могут быть введены одной дозой или множеством доз по графику, приемлемому для того, чтобы достичь желаемого терапевтического эффекта.

Терапевтические агенты, эффективные для лечения болезни Гоше, включают глюкоцереброзидазу, аналоги глюкоцереброзидазы, ингибиторы глюкозилцерамидсинтазы и молекулярные шапероны, кото-рые связываются с глюкоцереброзидазой и восстанавливают ее правильную конформацию. Глюкоцереб-розидаза или ее аналоги могут быть глюкоцереброзидазой или ее аналогами человека или млекопитаю-щего. Альтернативно глюкоцереброзидаза или ее аналоги могут быть получены рекомбинантно. Аналоги глюкоцереброзидазы включают процессы, формы фермента и/или ферменты с измененной по-следовательностью аминокислот по сравнению с природной последовательностью нативного фермента, обес-печивающей сохранение биологической активности. Примеры аналогов глюкоцереброзидазы вклю-чают имиглюциразу (продаваемую Genzyme Corporation под торговым наименованием Cerezyme®), та-лиглюциразу альфа (доступную на рынке под торговым наименованием Uplysso® и разработанную Pro-talix Biotherapeutics, Inc.) и велаглюциразу альфа (разработанную Shire PLC), которые являются аналога-

ми р-глюкоцереброзидазы человека, произведенными с помощью рекомбинантной ДНК. Примеры молекулярных шаперонов включают изофагомин (находится в разработке Amicus Therapeutics, Cranbury, NJ под торговым наименованием Plicera<sup>TM</sup>). Изофагомин также известен как тартрат афегостата, содержащий тартратную форму изофагомина в качестве активного ингредиента. Примеры ингибиторов глюкоцереброзидазы включают миглустат (разработанный Actelion Pharmaceuticals Ltd. Allschwil, Switzerland под торговым наименованием Zavesca<sup>TM</sup>).

Терапевтические агенты, эффективные для лечения болезни Фабри, включают  $\alpha$ -галактозидазу А, аналоги  $\alpha$ -галактозидазы А и молекулярные шапероны, которые связываются с  $\alpha$ -галактозидазой А и восстанавливают ее правильную конформацию.  $\alpha$ -галактозидаза А или ее аналоги могут быть  $\alpha$ -галактозидазой А или ее аналогами человека или млекопитающего. Альтернативно  $\alpha$ -галактозидаза А и ее аналоги могут быть получены рекомбинантно. Аналоги  $\alpha$ -галактозидазы включают процессированные формы фермента и/или ферменты с измененной последовательностью аминокислот по сравнению с природной последовательностью нативного фермента, обеспечивающей сохранение биологической активности. Примеры аналогов  $\alpha$ -галактозидазы А включают агалзидазу бета (рекомбинантная  $\alpha$ -галактозидаза человека, продаваемая Genzyme Corporation в виде сублимированного лекарственного препарата под торговым наименованием Fabrazyme<sup>®</sup>) и агалзидазу альфа (рекомбинантный белок, продаваемый Shire PLC под торговым наименованием Replagal<sup>®</sup>). Примеры молекулярных шаперонов включают мигаластат (разработанный Amicus Therapeutics, Cranbury, NJ в виде лекарственного средства, содержащего в качестве активного ингредиента гидрохлорид мигаластата, под торговым наименованием Amigal<sup>TM</sup>).

Согласно одному из вариантов осуществления комбинированная терапия для лечения болезней Гоше и Фабри осуществляется в две стадии. На первой стадии используют лекарственное средство, эффективное для лечения болезни Фабри или болезни Гоше (обычно глюкоцереброзидаза или ее аналог для болезни Гоше и галактозидаза А или ее аналог для болезни Фабри), для того чтобы стабилизировать субъекта. Например, при болезни Гоше (или болезни Фабри) используют одно из этих лекарственных средств для того чтобы снизить нагрузку на внутренние органы, такие как печень, селезенка, легкие и/или почки, вызванную накоплением GL-1. Как только эта стадия завершена, на второй стадии используют соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемую соль (включая гемитартратную соль) в качестве подходящей поддерживающей терапии. Первая стадия длится обычно вплоть до одной, двух, трех или четырех недель или вплоть до одного, двух, трех, четырех, шести, девяти или двенадцати месяцев, или до тех пор, пока количество тромбоцитов у субъекта не станет равным или большим чем 100000 на  $\text{мм}^3$ ; концентрация гемоглобина не станет равной или большей чем 11 г/дл (женщины) или 12 г/дл (мужчины); и/или до тех пор пока объем селезенки субъекта не станет меньше или равным 10-кратному нормальному объему, а объемы печени не станут меньше или равными 1,5-кратным нормальным объемам. Введение по первой стадии обычно заканчивается, как только начинается терапия соединением формулы (I).

Используемый в настоящем документе термин "эффективное количество" относится к количеству, эффективному для облегчения симптомов, имеющихся у получающего лечение пациента, с минимальными побочными эффектами для пациента. Определенная композиция, путь введения и доза подбираются врачом, исходя из состояния пациента. Доза и интервал могут быть субъектуально уточнены для того чтобы обеспечить содержание активного соединения в плазме, достаточное для поддержания желаемых терапевтических эффектов. В дополнении к состоянию пациента и режиму введения вводимая доза будет зависеть от степени тяжести симптомов у пациента, возраста пациента и его веса. Эффективное количество обычно будет давать в результате содержание соединения в плазме непосредственно перед приемом его очередной дозы выше по меньшей мере 5 нг/мл. Если содержание соединения в плазме непосредственно перед приемом его очередной дозы выше по меньшей мере 5 нг/мл. Если содержание соединения в плазме непосредственно перед приемом его очередной дозы после введения эффективного количества соединения составляет меньше 5 нг/мл, вводимую этому субъекту дозу меняют на "уточненное эффективное количество", такое, что содержание соединения в плазме непосредственно перед приемом его очередной дозы составляет по меньшей мере 5 нг/мл. Альтернативно если после введения эффективного количества соединения содержание соединения в плазме непосредственно перед приемом его очередной дозы составляет меньше 5 нг/мл и/или  $C_{\text{max}}$  составляет свыше 100 нг/мл, вводимую субъекту дозу изменяют на "уточненное эффективное количество", такое, что содержание соединения в плазме непосредственно перед приемом его очередной дозы в плазме составляет по меньшей мере 5 нг/мл, а  $C_{\text{max}}$  составляет меньше 100 нг/мл. Эффективные количества могут находиться в диапазоне от 0,1 до 500 мг/сутки. Альтернативно эффективное количество лежит в диапазоне 50-300 мг/сутки. В другой альтернативе, эффективное количество лежит в диапазоне 100-300 мг/сутки. Соединение по настоящей заявке может вводиться непрерывно или через определенные временные интервалы. Например, соединение по настоящей заявке может быть введено 1,2,3 или 4 раза в сутки, в виде, например, ежедневной композиции или композиции, вводимой дважды в сутки. Для определения оптимального диапазона доз и/или графиков введения могут быть использованы коммерчески доступные методы анализа.

Согласно одному из вариантов осуществления эффективным количеством соединения формулы (I) или его фармацевтически приемлемой соли (включая описанную выше гемитартратную соль) является (вне зависимости от того, вводятся они в качестве монотерапии или в качестве совместной терапии) ежедневная доза от 25 до 300 мг (альтернативно от 25 до 150 мг, в другой альтернативе от 50 до 300 мг и в другой альтернативе от 100 до 300 мг), такая как 25, 50, 100, 200 или 300 мг в сутки. В определенном воплощении эффективным количеством соединения формулы (I) или его фармацевтически приемлемой соли (включая гемитартрат соединения формулы (I)) является (вне зависимости от того, вводятся они в качестве монотерапии или в качестве совместной терапии) вводимая дважды в сутки доза 50 мг (всего 100 мг в сутки), 100 мг (всего 200 мг в сутки) или 150 мг (всего 300 мг в сутки). В альтернативном воплощении эффективным количеством соединения формулы (I) или его фармацевтически приемлемой соли (включая гемитартрат соединения формулы (I)) является (вне зависимости от того, вводятся они в качестве монотерапии или в качестве совместной терапии) вводимая один раз в сутки доза 100 мг/сутки, 200 мг/сутки или 300 мг/сутки.

В другом воплощении эффективное количество определяют, исходя из предположения, что субъект "характеризуется слабым метаболизмом посредством P450" и затем определяют содержание соединения в плазме непосредственно перед приемом его очередной дозы и/или  $C_{max}$ . Вводимое субъекту количество затем заменяют на уточненное эффективное количество, как описано ниже, если содержание соединения в плазме непосредственно перед приемом его очередной дозы составляет меньше 5 нг/мл; или содержание соединения в плазме непосредственно перед приемом его очередной дозы составляет меньше 5 нг/мл и/или  $C_{max}$  больше 100 нг/мл; или если субъект определен как характеризующийся средним или быстрым/сверхбыстрым метаболизмом посредством P450. Количество, эффективное для субъектов, характеризующихся слабым метаболизмом посредством P450, обычно составляет (вне зависимости от того, вводится оно в качестве монотерапии или в качестве совместной терапии) обычно от 100 до 200 мг в сутки, например 100 или 200 мг в виде вводимой один раз в сутки дозы или в виде вводимой два раза в сутки дозы.

Обычно фармацевтические композиции по настоящей заявке могут вводиться до или после приема пищи, или совместно с приемом пищи. Использованные в настоящем документе термины "до" или "после" приема пищи означают в пределах 2 ч, предпочтительно в пределах одного часа, более предпочтительно в пределах 30 мин, наиболее предпочтительно в пределах 10 мин до начала или после завершения приема пищи соответственно.

Было обнаружено, что соединение формулы (I) и его фармацевтически приемлемые соли (включая гемитартрат соединения формулы (I)) метаболизируются в печени, преимущественно ферментами цитохрома P450. Ферменты цитохрома P450 ("CYPs") являются главными метаболизирующими ксенобиотики печеночными ферментами. Существует одиннадцать выделяемых обычной печенью человека метаболизирующих ксенобиотики ферментов цитохрома P450 (например, CYP1A2, CYP2A6, CYP2B6, CYP2C8/9/18/19, CYP2D6, CYP2E1 и CYP3A4/5). В настоящее время также было обнаружено, что CYP2D6 и CYP3A4 являются основными изоформами цитохрома P450, которые ответственны за детоксикацию соединения формулы (I) и его фармацевтически приемлемых солей, таких как гемитартрат соединения формулы (I). Уровень активности ферментов P450 различается в зависимости от субъектуальных особенностей организма. Например, организмы могут быть классифицированы как характеризующиеся слабым, средним и быстрым/сверхбыстрым метаболизмом посредством P450. Поскольку низкие уровни активности P450 в организме могут приводить к возникновению взаимодействий между лекарственными средствами ("DDI"), другое воплощение изобретения состоит в том, чтобы определить, характеризуется ли субъект слабым, средним или быстрым/сверхбыстрым метаболизмом посредством P450. Если субъект характеризуется средним или быстрым/сверхбыстрым метаболизмом, то вводимая такому субъекту доза должна быть повышена до "уточненной эффективной дозы", например количества, которое в результате дает содержание соединения в плазме непосредственно перед приемом его очередной дозы по меньшей мере 5 нг/мл; или количества, которое в результате дает содержание соединения в плазме непосредственно перед приемом его очередной дозы по меньшей мере 5 нг/мл и  $C_{max}$  соединения ниже 100 нг/мл. Доза может повышаться постепенно с повторным тестированием субъекта однократно, двукратно, трехкратно, четырехкратно или столько раз, сколько необходимо для того, чтобы достичь уточненной эффективной дозы.

Для гена CYP2D6 существует четыре прогнозных фенотипа.

Фенотип "слабого метаболизма посредством P450" имеет два мутантных аллеля, которые в результате дают полную потерю ферментной активности.

Фенотип "среднего метаболизма посредством P450" имеет один аллель со сниженной активностью и один нулевой аллель.

Фенотип "быстрого метаболизма посредством P450" имеет по меньшей мере один и не более чем два нормальных функциональных аллеля.

Фенотип "сверхбыстрого метаболизма посредством P450" имеет множество копий (3-13) функциональных аллелей и проявляет избыточную ферментную активность.

Субъект обычно определяется как характеризующийся слабым, средним или быст-

рым/сверхбыстрым метаболизмом посредством P450 посредством генотипирования или посредством мониторинга содержания метаболизируемого ферментом P450, таким как CYP2D6 или CYP3A4, лекарственного средства в плазме непосредственно перед приемом его очередной дозы. В основном мониторинг содержания соединения в плазме у пациента непосредственно перед приемом его очередной дозы и/или  $C_{max}$  соединения формулы (I) или его фармацевтически приемлемой соли, включая гемитартрат соединения формулы (I), проводят в течение вплоть до одной, двух, трех или четырех недель, или вплоть до одного, двух, трех, шести или двенадцати месяцев, или больше после начала лечения соединением. Уточнения дозы осуществляют в той мере, как необходимо для того чтобы поддерживать содержание внутри описанных пределов, например содержание соединения в плазме непосредственно перед приемом его очередной дозы в плазме 5 нг/мл или больше.

Субъекты могут приобрести слабый метаболизм посредством P450 в результате получения лечения определенными лекарственными средствами, являющимися ингибиторами фермента P450. Примеры таких лекарственных средств включают пароксетин, флуоксетин, квинидин или кетоконазол. Альтернативно субъект характеризуется слабым метаболизмом посредством P450 в результате низкой экспрессии фермента P450. В таком случае низкая экспрессия может быть обнаружена с помощью определения экспрессии фермента P450 у субъекта, например с помощью генотипирования субъекта по ферменту P450. Например, экспрессию CYP2D6 в основном определяют путем ПЦР (McElroy et al., "CYP2D6 Genotyping as an Alternative to Phenotyping for Determination of Metabolic Status in a Clinical Trial Setting", AAPS PharmSci (2000) 2(4):article 33 (<http://www.pharmsci.org/>)) или путем микроматричного анализа, основанного на фармакогеномном тестировании (Background Information, Roche Diagnostics "The CYP450 Gene Family and Drug Metabolism", Hoffmann La Roche Ltd.). Все сведения, содержащиеся в этих документах, включаются в настоящую заявку путем ссылки. Фактически, субъект может быть удобно генотипирован по экспрессии P450 (например, CYP2D6) перед началом лечения, и ему, если необходимо, может быть введено уточненное эффективное количество. В случае генотипирования перед началом лечения по-прежнему рекомендуется проводить мониторинг содержания соединения в плазме непосредственно перед приемом его очередной дозы и  $C_{max}$  соединения и уточнять дозу как необходимо.

Эффективные количества мигаластата, агалзидазы, имиглюцеразы, изофагомина и миглустата являются теми же, что указаны в инструкции по применению лекарственного средства, или теми же, что реализовывались в клинических исследованиях каждого лекарственного средства.

Соединение формулы (I) могут вступать во взаимодействие с фармацевтически приемлемыми кислотами для образования фармацевтически приемлемой соли. Примеры фармацевтически приемлемых кислот включают неорганические кислоты, такие как хлороводородная кислота, бромоводородная кислота, йодоводородная кислота, серная кислота, ортофосфорная кислота и т.п., и органические кислоты, такие как *п*-толуолсульфоновая кислота, метансульфоновая кислота, щавелевая кислота, *п*-бромфенилсульфоновая кислота, капроновая кислота, янтарная кислота, лимонная кислота, бензойная кислота, уксусная кислота и т.п. Примеры таких солей включают сульфат, пирофосфат, бисульфат, сульфит, бисульфит, фосфат, моногидрофосфат, дигидрофосфат, метафосфат, пиофосфат, хлорид, бромид, йодид, ацетат, пропионат, деканоат, каприлат, акрилат, формиат, изобутират, капронат, гептanoат, пропиолат, оксалат, малонат, сукцинат, суберат, себацат, фумарат, малеат, бутин-1,4-диоат, гексин-1,6-диоат, бензоат, хлорбензоат, метилбензоат, динитробензоат, гидроксибензоат, метоксибензоат, фталат, сульфонат, ксиленсульфонат, фенилацетат, фенилпропионат, фенилбутират, цитрат, лактат, гамма-гидроксибутират, гликолят, тарtrат, метансульфонат, пропансульфонат, нафтилин-1-сульфонат, нафтилин-2-сульфонат, манделат и т.п.

Фармацевтические композиции, содержащие гемитартрат соединения формулы (I).

Приемлемые композиции и режимы введения соединения формулы (I) или его фармацевтически приемлемых солей (включая его гемитартратную соль) включают составы и режимы, описанные в патенте США № 7253185, все сведения, содержащиеся в которой, включены в настоящую заявку путем ссылки. Предпочтительная композиция для гемитартрата соединения формулы (I) описывается в следующих параграфах.

Одним из воплощений изобретения является фармацевтическая композиция, содержащая гемитартрат соединения формулы (I), по меньшей мере один растворимый в воде наполнитель, по меньшей мере один нерастворимый в воде наполнитель, по меньшей мере одно связующее вещество и по меньшей мере одно смазывающее вещество. Приемлемые растворимые в воде наполнители могут включать, например, безводную лактозу, моногидрат лактозы, маннитол, хлорид натрия, сахарную пудру, сорбитол, сахарозу, инозитол и прежелатинизированный крахмал. Приемлемые нерастворимые в воде наполнители могут включать, например, микрокристаллическую целлюлозу, фосфат кальция и крахмал. Приемлемые связующие вещества могут включать, например, прежелатинизированный крахмал, натрийкарбоксиметилцеллюлозу, гидроксипропилцеллюлозу, гидроксипропилметилцеллюлозу, поливинилпирролидон, сополивидон, желатин, натуральные камеди, крахмальный клейстер, сахарозу, кукурузный сироп, полиэтиленгликоли и альгинат натрия. Приемлемые смазывающие вещества могут включать, например, гидрогенизированное растительное масло, стеарат кальция и глицерилбегенат. Согласно одному из вариантов осуществления фармацевтической композиции растворимый в воде наполнитель выбирают из группы,



лем является моногидрат лактозы, а нерастворимым в воде наполнителем является микрокристаллическая целлюлоза. И даже более конкретно, растворимым в воде наполнителем является моногидрат лактозы; нерастворимым в воде наполнителем является микрокристаллическая целлюлоза;

связующим веществом является гидроксипропилметилцеллюлоза; а смазывающим веществом является глицерилбегенат.

Изобретение иллюстрируется следующими примерами, которые не предназначены для ограничения каким-либо образом.

### Экспериментальная часть

#### Пример 1. Получение солей соединения формулы (I).

Гемитартратная соль соединения формулы (I) легко кристаллизуется и проявляет множество полезных свойств по сравнению с другими солями. Например, для получения солей соединения, представленного формулой (I), были использованы следующие кислоты: лимонная кислота (с образованием солей с соотношениями (соль:соединение формулы (I)) 1:1, 1:2 и 1:3); L-яблочная кислота (1:1 и 1:2); метансульфоновая кислота (1:1); фумаровая кислота (1:1 и 1:2), хлороводородная кислота (1:1); уксусная кислота (1:1) и винная кислота (1:1 и 1:2). Только образованные хлороводородной кислотой (1:1), винной кислотой (1:1) и винной кислотой (1:2) соли были в твердой форме. Из этих трех солей для солей хлороводородной кислоты (1:1) и винной кислоты (1:1) было обнаружено, что эти соли являются гигроскопичными и некристаллическими, а потому неприемлемы для использования в фармацевтическом продукте. Для гемитартрата (1 соль:2 соединения формулы I) соединения, представленного формулой I было обнаружено, что он является кристаллическим и негигроскопичным.

#### Получение гемитартрата соединения формулы (I) с использованием ацетона.

L-винную кислоту (6,02 г, 40,11 ммоль, 0,497 эквивалента) растворяли в ацетоне (175 мл) путем кипячения раствора в колбе с обратным холодильником и последующим охлаждением до комнатной температуры. Свободное основание формулы (I) (32,67 г, 80,76 ммоль) растворяли в ацетоне (300 мл) при комнатной температуре. Раствор L-винной кислоты добавляли в раствор свободного основания формулы (I) при комнатной температуре в течение 15 мин. В середине процесса добавления образовывался белый осадок. Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 0,5 ч и затем недолго кипятили в колбе с обратным холодильником и охлаждали до комнатной температуры. После перемешивания при комнатной температуре в течение 0,5 ч фильтровали белый осадок. Белое твердое вещество дважды отмывали ацетоном (2×130 мл). Твердое вещество сушили на воздухе и затем под вакуумом при 55-60°C. Выход составил 36,66 г (95%).

Получение гемитартрата соединения формулы (I) с использованием 5% раствора метанола в ацетоне.

10 г/24,7 ммоль свободного основания формулы (I) растворяли в 120 мл или 240 мл 5% раствора метанола в ацетоне. 1,85г/12,3 ммоль L-винной кислоты растворяли в 60 мл или 120 мл 5% раствора метанола в ацетоне (N или 2N) путем нагревания до 40-45°C и этот раствор добавляли в первый раствор. После 1 ч без осаждения добавляли 1 мг гемитартрата соединения формулы (I) в качестве затравочного кристалла. Осаждение происходило спустя 5 мин, и реакционную смесь продолжали перемешивать в течение еще 30 мин. Затем реакционную смесь в течение 5 мин нагревали в колбе с обратным холодильником (осадок полностью растворялся) и затем охлаждали до комнатной температуры в водяной бане 20-22°C. Образовывался осадок, и реакционную смесь продолжали перемешивать в течение 3 ч. Конечный продукт собирали путем фильтрации и отмывали ацетоном, 2×40 мл, и затем сушили в вакуумной печи при 55-60°C в течение 16 ч. Масса продукта составила 8,72 г/выход 74%.

Получение гемитартрата соединения формулы (I) с использованием 1% раствора воды в ацетоне С-важное основание соединения формулы (I) (10 г/24,7 ммоль) растворяли в 120 мл или 240 мл 1% раствора воды в ацетоне при комнатной температуре. 1,85г/12,3 ммоль L-винной кислоты растворяли в 60 мл или 120 мл 1% раствора воды в ацетоне (N или 2N) путем нагревания до 40-45°C и этот раствор добавляли в первый раствор. После 1 ч без осаждения добавляли 1 мг гемитартрата соединения формулы (I) в качестве затравочного кристалла. Осаждение происходило спустя 5 мин, и реакционную смесь продолжали перемешивать еще в течение 30 мин. Затем реакционную смесь в течение 5 мин нагревали в колбе с обратным холодильником (осадок растворялся не полностью) и затем охлаждали до комнатной температуры в водяной бане 20-22°C. Образовывался осадок, и реакционную смесь продолжали перемешивать в течение 3 ч. Конечный продукт собирали путем фильтрации и отмывали ацетоном, 2×40 мл, и затем сушили в вакуумной печи при 55-60°C в течение 16 ч. Масса продукта составила 8,62 г/выход 73%.

#### Перекристаллизация гемитартрата соединения формулы (I) в 5% растворе метанола в ацетоне.

Гемитартрат соединения формулы (I) (3,06 г) растворяли в 116 мл 5% раствора метанола в ацетоне при кипячении в колбе с обратным холодильником. Раствор охлаждали до комнатной температуры и перемешивали при комнатной температуре в течение 2 ч. Белый осадок фильтровали и отмывали 10 мл 5% раствора метанола в ацетоне и затем ацетоном (15 мл). После вакуумной сушки в течение 18 ч при 55-60°C получено 2,38 г гемитартрата соединения формулы (I) (78% выход).

#### Перекристаллизация гемитартрата соединения формулы (I) в 1% растворе H<sub>2</sub>O в ацетоне.

Гемитартрат соединения формулы (I) (3,05 г) растворяли в 125 мл 1% раствора  $H_2O$  в ацетоне при кипячении в колбе с обратным холодильником. Раствор охлаждали до комнатной температуры и перемешивали при комнатной температуре в течение 2 ч. Белый осадок фильтровали и отмывали 10 мл 1% раствора  $H_2O$  в ацетоне и затем ацетоном (15 мл). После вакуумной сушки в течение ночи при 55-60°C было получено 2,35 г гемитартрата соединения формулы (I) (77% выход).

Пример 2. Получение кристаллического гемитартрата соединения формулы (I).

Гемитартрат соединения формулы (I) кристаллизовали несколькими способами. Партию 1 готовили с использованием растворителей этилацетат/ацетон и сушили при комнатной температуре. Партию 3 готовили с использованием растворителей этилацетат/ацетон и перекристаллизовали из этилацетата. Партию 4 перекристаллизовали из ацетона с использованием материала партии 1. Партию 5 перекристаллизовали из изопропанола. Партию 7 готовили с использование растворителя этилацетат/ацетон аналогично партии 1, но в большом количестве. Партию 8 готовили с использованием только ацетона без дополнительной перекристаллизации. Партию 9 готовили с использованием только ацетона с кратким кипячением в колбе с обратным холодильником снова без дополнительной перекристаллизации.

Таблица 1

Обобщенные результаты скрининга полиморфизма партий 1-9 гемитартрата соединения формулы (I)

Партия №	Способ обработки	ДСК		Микроскопия	Термогравиметрический анализ
		Точка плавления (°C)	Энталпия (Дж/г)		
1	Осаждение в ацетоне/этилацетате*	162	-81,4	Кристаллы	99,91% при 100 °C 98,73% при 175 °C
2	Осаждение в ацетоне/этилацетате – сушка при комнатной температуре*	164	-95,6	Кристаллы	н/д
3	Осаждение в ацетоне/этилацетате – сушка при 55-60 °C	166	-97,8	Кристаллы	100,0% при 100 °C 99,98% при 153 °C
4	Перекристаллизация из ацетона	166	-107,2	Кристаллы	100,2% при 100 °C 100,2% при 153 °C
5	Перекристаллизация из изопропанола	166	-102,6	Кристаллы	100,0% при 100 °C 100,0% при 153 °C
7	Осаждение в ацетоне/этилацетате	166	-99,4	Кристаллы **	100,1% при 100 °C 99,91% при 153 °C
8	Осаждение в ацетоне	165	-100,7	Кристаллы **	100,0% при 100 °C
					100,0% при 153 °C
9	Осаждение в ацетоне с кратким кипячением в колбе с обратным холодильником	165	-100,2	Кристаллы **	

\*: содержащие некоторое количество свободного основания по данным ДСК-термограммы;

\*\*: в этих партиях имеются изменения внешнего вида кристаллов со столбчатого, пластинчатого на игольчатый, столбчатый и неправильной формы.

Кристаллические формы гемитартрата соединения формулы (I) также готовили с использованием медленного упаривания, медленного охлаждения, быстрого охлаждения и осаждения осадителем в разнообразных растворителях.

Способ медленного упаривания. Взвешенный образец (обычно 20 мг) обрабатывали аликовтными количествами тестового растворителя. Аликовтные количества обычно составляли 100-200 мкл. В промежутках между добавлениями растворителя смесь встряхивали и обрабатывали ультразвуком. Когда твердое вещество растворялось, о чем судили путем визуального осмотра, раствор оставляли упариваться при условиях окружающей среды в открытом сосуде, прикрытым перфорированной мелкими отверстиями алюминиевой фольгой. Растворимости в этих экспериментах оценивали, основываясь на общем количестве растворителя, добавленного чтобы получить прозрачный раствор.

Таблица 2

Приблизительная растворимость гемитартрата соединения формулы (I) при комнатной температуре (20-25°C)

Органический растворитель	Приблизительная растворимость (мг/мл)
Гептан	нет данных
Гексан	нет данных
Толуол	<5
Дихлорметан	100
Этанол	29
Изопропиловый спирт	<5
Ацетонитрил	<5
Этилацетат	<5
Метанол	>200
Ацетон	<5
Метил-трет-бутиловый эфир (МТВЕ)	<5
п-диоксан	<5
Тетрагидрофуран (THF)	<5

Таблица 3

Обобщенные результаты о полиморфизме при использовании подхода медленного упаривания

Органический растворитель	Твердое вещество образуется при медленном упаривании	ДСК		Микроскопия	Термогравиметрический анализ
		Точка плавления (°C)	Энталпия (Дж/г)		
Метанол	Нет	н/д	н/д	н/д	н/д
Этанол	Да	165	-95,0	Кристаллы**	100,0% при 100 °C 100,0% при 150 °C

\*\*: частицы были пластинчатыми и столбчатыми.

Способ медленного/быстрого охлаждения. Гемитартрат соединения формулы (I) растворяли в тестовом растворителе при 50-60°C. Полученный в результате раствор оставляли остыть до комнатной температуры (медленное охлаждение). Если по истечении суток твердых веществ не образовывалось, сосуды помещали в холодильный шкаф. Для экспериментов по быстрому охлаждению полученный в результате раствор оставляли остыть в холодильном шкафу. Твердые вещества собирали путем фильтрования и сушили на воздухе.

Таблица 4

Обобщенные результаты о полиморфизме при использовании подхода медленного охлаждения

Органический растворитель	Твердое вещество образуется при медленном охлаждении	ДСК		Микроскопия	Термогравиметрический анализ
		Точка плавления (°C)	Энталпия (Дж/г)		
Этанол	Да	167	-106,2	Кристаллы**	100,1% при 100 °C 100,1% при 150 °C

\*\*: частицы были пластинчатыми и столбчатыми.

Таблица 5

Обобщенные результаты о полиморфизме при использовании подхода быстрого охлаждения

Органический растворитель	Твердое вещество образуется при быстром охлаждении	ДСК		Микроскопия	Термогравиметрический анализ
		Точка плавления (°C)	Энталпия (Дж/г)		
Этанол	Да	167	-106,2	Кристаллы**	100,0% при 100 °C 100,0% при 150 °C

\*\*: частицы были пластинчатыми и столбчатыми.

Способ осадителя. Гемитартрат соединения формулы (I) растворяли в растворителе. В раствор добавляли осадитель. Образовавшиеся твердые вещества собирали путем фильтрации и сушили на воздухе.

Таблица 6

Обобщенные результаты скрининга полиморфизма при использования подхода осадителя

Органический растворитель	Твердое вещество образуется при использовании подхода осадителя	ДСК		Микроскопия	Термогравиметрический анализ
		Точка плавления (°C)	Энталпия (Дж/г)		
Метанол/ этилацетат	Да	167	-99,5	Кристаллы*	100,1% при 100 °C 100,1% при 150 °C
Метанол/ацетон	Да	167	-106,2	Кристаллы*	100,3% при 100 °C 100,2% при 150 °C
Метанол/ ацетонитрил	Нет	н/д	н/д	н/д	н/д
Метанол/толуол	Нет	н/д	н/д	н/д	н/д
Метанол/THF	Нет	н/д	н/д	н/д	н/д
Метанол/MTBE	Да	167	-102,0	Кристаллы*	100,2% при 100 °C 100,1% при 150 °C
Метанол/п-диоксан	Нет	н/д	н/д	н/д	н/д
Вода/THF	Нет	н/д	н/д	н/д	н/д
Вода/MTBE	Нет	н/д	н/д	н/д	н/д
Вода/изопропанол	Нет	н/д	н/д	н/д	н/д
Вода/ацетонитрил	Нет	н/д	н/д	н/д	н/д
Вода/ацетон	Нет	н/д	н/д	н/д	н/д
Дихлорметан/ гептан	Да	165	-89,2	Кристаллы*	100,0% при 100 °C

					99,99% при 150 °C
Дихлорметан/ этилацетат	Да	167	-97,8	Кристаллы*	100,2% при 100 °C 100,1% при 150 °C
Дихлорметан/ толуол	Да	164	-89,8	Кристаллы*	99,95% при 100 °C 99,86% при 150 °C
Дихлорметан/М ТВЕ	Да	167	-98,6	Кристаллы*	100,0% при 100 °C 99,91% при 150 °C
Дихлорметан/г- диоксан	Да (немного)	н/д	н/д	н/д	н/д
Дихлорметан/ изопропанол	Нет	н/д	н/д	н/д	н/д

\*: частицы были пластинчатыми и столбчатыми;

\*\*: отдельные частицы имели более чем один цвет двойного лучепреломления;

\*\*\*: частицы были игольчатыми и столбчатыми.

Пример 3. Физические свойства гемитартрата соединения формулы (I).

Дифференциальная сканирующая калориметрия (ДСК). Данные ДСК собирали на приборе TA Q100 с использованием азота в качестве продувочного газа. Точно взвешивали приблизительно 2-5 мг пробы в алюминиевой чаше ДСК. Чашу накрывали крышкой и перфорировали пинцетом. Ячейку с образцом приводили в состояние равновесия при 30°C и нагревали со скоростью 10°C/мин до конечной температуры 220°C.

Высокотемпературная микроскопия. Высокотемпературную микроскопию осуществляли с использованием нагревательного столика Linkam (model FTIR 600), смонтированного на микроскопе Leica DM LP, оснащенном камерой Sony DXC-970MD 3CCD для получения фотографий. Для наблюдения за образцами использовали 40x объектив с поляризованным светом. Каждую пробу помещали между двух покровных стекол. Каждую пробу визуально наблюдали при нагревании столика. Фотографии получали с использованием программы Links версии 2.27 (Linkam). Нагревательный столик калибровали с использованием стандартов определения точки плавления фармакопеи США.

Эндотермический переход, наблюдаемый на кривой ДСК, подтверждало наличием фазового перехода в расплав при температуре от 160 до 163°C с помощью высокотемпературной микроскопии.

Пример 4. Рентгеновская порошковая дифрактометрия гемитартрата соединения формулы (I).

Все анализы рентгеновской порошковой дифрактометрии (XRPD) выполняли в SSCI, Inc. (West Lafayette, IN 47906). XRPD анализы проводили с использованием рентгеновского порошкового дифрактометра Shimadzu XRD-6000 и Cu K $\alpha$  излучения. Прибор оснащен рентгеновской трубкой с точной фокусировкой. Напряжение и силу тока трубки устанавливали на 40 кВ и 40 мА соответственно. Рассеивающие щели устанавливали на 1°, а принимающую щель устанавливали на 0,15 мм. Рассеянное излучение определяли с помощью NaI сцинтилляционного детектора. Использовали 0-2θ непрерывное сканирование при скорости 3°/мин (шаг 0,4с/0,02°) с 2,5 до 40° 2θ. Для проверки настройки прибора анализировали кремниевый стандарт. Данные собирали и анализировали с использованием XRD-6000 v 4.1.

Пример 5. Сравнение гемитартрата соединения формулы (I) и свободного основания формулы (I).

Характеристики свободного основания и гемитартратной соли как твердого вещества кратко приведены в табл. 7. Гемитартрат соединения формулы (I) имел лучшие свойства по сравнению со свободным основанием формулы (I). Например, гемитартрат соединения формулы I имел более высокую точку плавления (>150°C), более высокую энергию упаковки (большую эндотермическую энталпию), меньший разброс размера частиц, более высокую растворимость в воде (свыше 300 мг/мл в воде), приемлемую форму кристаллов и более высокую насыпную плотность по сравнению со свободным основанием формулы I.

Таблица 7

Краткие сведения о твердой фазе и физических и химических свойствах свободного основания формулы (I) и гемитартрата соединения формулы (I)

Физические характеристики	Свободное основание формулы (I)	Гемитартрат соединения формулы (I)
Точка плавления (°C)	86-88	163
Эндотермическая энталпия (Дж/г)	75-82	96-106
Размер частиц (мкм)	<10 до 100	~ 3 (в среднем)
Растворимость в воде (мг/мл)	0,04	>216
Кристаллическое вещество	Да	Да
Форма кристаллов	Игольчатая	Пластиничатая, столбчатая, некоторое количество неправильной формы
Гигроскопичность (40°C/75 % относительная влажность)	Отсутствует	Отсутствует
Насыпная плотность	~0,2	0,4-0,5

Пример 6. Активность и специфичность *in vitro*.

Активность гемитартрата соединения формулы (I) при ингибиции синтеза глюкосфинголипидов *in vitro*.

Для количественной оценки ингибирующей глюкозилцерамидсингазы активности гемитартрата соединения формулы (I) использовали два метода анализа. Поскольку синтез глюкозилцерамида является первой и лимитирующей скоростью стадией в биосинтезе глюкосфинголипидов, для непрямого определения активности ингибитора в интактных клетках использовали метод проточной цитометрии, которым измеряется содержание GM1 и GM3 на поверхности клеток. Инкубирование в течение 72 ч клеток K562 или B16/F10 совместно с повышенными количествами гемитартрата соединения формулы (I) (0,6-1000 нмоль) давало в результате дозозависимое снижение содержания GM1 и GM3 на поверхности клеток. Среднее значение IC<sub>50</sub> для ингибиции присутствия GM1 на поверхности клеток для клеток K562 составило 24 нмоль (диапазон 14-34 нмоль) (табл. 8), а для ингибиции присутствия GM3 на поверхности клеток для клеток B16/F10 составило 29 нмоль (диапазон 12-48 нмоль).

Даже при тестировании самых высоких доз для обеих линий клеток не отмечалось никакой явной клеточной токсичности.

Альтернативным методом анализа активности измерялось ингибирование глюкозилцерамидсингазы в полученных из клеток человека микросомах. В этом анализе микросомы готовили из A375 клеток меланомы человека путем обработки их ультразвуком и центрифугированием. Микросомальный препарат в течение одного часа инкубировали при комнатной температуре вместе с флуоресцентным церамидным субстратом (NBD-С<sub>6</sub>-церамид), УДФ-глюкозой и повышенными количествами гемитартрата соединения формулы (I) (0-1000 нмоль). После инкубирования разделяли флуоресцентно-меченный глюкозилцерамид и непрореагировавший церамид и количественно оценивали при помощи обращено-фазовой HPLC и флуоресцентного детектирования. Для этого метода анализа значение IC<sub>50</sub> для ингибиции синтеза глюкозилцерамида находилось в диапазоне от 20 до 40 нмоль. Это значение было похоже на значение, полученное выше для GM1 и GM3, и это дает основание полагать, что измерения этих синголипидов на поверхности клеток являются хорошими идентификаторами активности гемитартрата соединения формулы (I) для глюкозилцерамидсингазы.

Специфичность ингибиции синтеза субстрата гемитартратом соединения формулы (I).

Специфичность гемитартрата соединения формулы (I) оценивали в серии клеточных и бесклеточных анализов *in vitro*. Кишечные ферменты глюкозидазы анализировали на крысиных тканевых гомогенатах (см. U. Andersson, et al., Biochem. Pharm. 59 (2000) 821-829, все сведения из которой включаются в настоящую заявку путем ссылки). При концентрациях вплоть до 2500 мкмоль не было обнаружено поддающегося обнаружению ингибиции кишечных глюкозидаз (лактазы, мальтазы, сахаразы),  $\alpha$ -глюкозидазы I и II и цитозольного девятьщего фермента ( $\alpha$ -1,6-глюкозидазы) (табл. 8).

Нелизосомальную глюкозилцерамидазу и лизосомальную глюкоцереброзидазу анализировали в интактных клетках человека с использованием в качестве субстрата C<sub>6</sub>-NBD-глюкозилцерамида (см. H.S. Overkleef, et al., J. Biol. Chem. 273 (1998) 26522-26527, все сведения из которой включаются в настоящую заявку путем ссылки). Для того чтобы различить лизосомальную от нелизосомальной активности использовали кондуритол- $\beta$ -эпоксид (специфический ингибитор лизосомальной глюкоцереброзидазы). Активность глюкоцереброзидазы также измеряли с помощью сортировки флуоресцентно-активированных клеток (FACS). Клетки K562 в течение 30-60 мин выращивали в питательной среде с повышенными количествами гемитартрата соединения формулы (I) в присутствии 1 мкмоль 5-(пентафторбензоиламино)флуоресцеина ди- $\beta$ -D-глюкопиранозидазы (PFB-FDGlu, Molecular Probes/Invitrogen, Carlsbad, CA). Клетки немедленно замораживали на льду и количественно оценивали

флуоресценцию как указано выше. Нелизосомальная глюкозилцерамида слабо ингибиралась IC<sub>50</sub> 1600 мкмоль. Ингибиции лизосомальной глюкоцереброзидазы, повреждающегося при болезни Гоше фермента, не было вплоть до самой высокой концентрации 2500 мкмоль (табл. 8). Следовательно для того чтобы ингибирать глюкозилцерамидсингазу по сравнению с любыми другими протестированными ферментами требуется разница в концентрации примерно 40000.

Таблица 8

Биохимическая активность гемитартрата соединения формулы (I) <i>in vitro</i>	
Активность ингибиции субстрата ( <i>in vitro</i> IC <sub>50</sub> ):	~0,024 мкмоль
Специфичность к ферменту, IC <sub>50</sub> :	
α-глюкозидаза I и II:	>2500 мкмоль
Лизосомальная глюкоцереброзидаза (GBA1):	>2500 мкмоль
Нелизосомальная глюкозилцерамида(GBA2):	1600 мкмоль
Глюкоген-девятьший фермент:	>2500 мкмоль
Специфичности к ферментам, K <sub>i</sub> :	
Ингибиция сахаразы:	Не ингибируется до 10 мкмоль
Ингибиция мальтазы:	Не ингибируется до 10 мкмоль

Пример 7. Улучшенное управление содержанием лизосомального глюкозилцерамида на мышиной модели.

А. Болезнь Фабри.

Для того чтобы определить, может ли комбинированное использование фермент-заместительной терапии (ERT) и субстрат-снижающей терапии (SRT) поддерживать уменьшение объема фермента или обеспечивать дополнительные позитивные свойства, сравнивали эффективности раздельных и комбинированных терапий на мышиной модели болезни Фабри (Fabry-Rag). Исходные мыши Fabry описаны в Wang, AM et al., Am. J. Hum. Genet 59: A208 (1996). Мышей Fabry-Rag скрещивали с мышами RAG-1 и не развивали созревание лимфоцитов и Т-клеток (с ослабленной иммунной системой).

Исследования на животных.

Для исследований монотерапии мышей Fabry вводили в исследование в возрасте 1 месяца (модель профилактики). Группы лечения получали гемитартрат соединения формулы (I) (Genzyme Corp., Cambridge, MA) в виде компонента гранул корма. Лекарственное средство составляло 0,15% (мас./мас.) в стандартной пище 5053 мышей (TestDiet, Richmond, IN) и предоставлялось свободно. Эта композиция обеспечивала дозу гемитартрата соединения формулы (I) 300 мг/кг в сутки для 25 г мыши.

Для исследований комбинированной терапии мышей Fabry-Rag вводили в исследование в возрасте 3 месяцев (модель лечения). Мыши в группе А каждые 2 месяца (например, в возрасте 3, 5, 7 и 9 месяцев) получали внутривенные инъекции рекомбинантной альфа-галактозидазы А человека (Genzyme Corp.) при дозе 1 мг/кг. Группа В получала те же внутривенные дозы фермента плюс получала гемитартрат соединения формулы (I) (Genzyme Corp., Cambridge, MA) в виде компонента гранул корма. Лекарственное средство составляло 0,15% (мас./мас.) в стандартной пище 5053 мышей (TestDiet, Richmond, IN) и предоставлялось свободно. Эта композиция обеспечивала дозу гемитартрата соединения формулы (I) 300 мг/кг в сутки для 25 г мыши. Группа С получала инъекции фермента каждые 4 месяца (например, в возрасте 3 и 7 месяцев) и была на той же диете "лекарство-в-пище" как группа В. Группа D получала только диету "лекарство-в-пище" (такую же, как группы В и С). Группу Е составляли не получавшие лечения мыши Fabry-Rag, а группа F была немутантным контролем. См. фиг. 10.

Количественное определение содержаний глоботриаозилцерамида (GL-3, Gb3) в тканях.

Количественное определение GL-3 с помощью tandemной масс-спектрометрии фактически было таким же, как и для GL-1.

Тест "горячая пластина" осуществляли, как описано ранее (Ziegler, RJ et al., Molec. Ther. 15(3), 492-500, 2007).

Результаты.

Монотерапия гемитартратом соединения формулы (I) мышей Fabry SRT оценивали на мышиной модели болезни Фабри, которая вызывается дефектом активности α-галактозидазы А. Терапию гемитартратом соединения формулы (I) начинали на мышах Fabry в возрасте 1 месяц и продолжали до тех пор, пока мыши не достигали возраста 1 год. Животным каждые сутки в пище вводили дозу гемитартрата соединения формулы (I) 300 мг/кг. Поведенческие тесты (например, тест "горячая пластина") и биохимические тесты (например, анализ мочи и анализ содержания GL-3 в тканях/крови/моче) мышей проводили раз в два месяца.

Как показано на фиг. 7, введение гемитартрата соединения формулы (I) мышам Fabry-Rag в течение 11 месяцев уменьшало скорость лизосомального накопления глоботриаозилцерамида (GL-3) в соматических органах (печени, почках, сердце и селезенке) приблизительно на 50%. Это приводило к задержке прогрессирования заболевания, как подтверждается дальнейшей демонстрацией нечувствительности к

вызывающему отвращение тепловому воздействию (см. фиг. 8), и предотвращению ухудшения показателей анализа мочи, например объема мочи, содержаний креатинина и натрия (см. фиг. 9). Следовательно, ингибирование гемитартратом соединения формулы (I) глюкозилцерамидсинтазы, катализирующей первую стадию синтеза глюкосфинголипидов, обладает преимуществами не только для животных моделей болезни Гоше, но также и для моделей болезни Фабри, и может также обладать положительными воздействиями на другие глюкосфинголипиды.

Комбинированная терапия  $\alpha$ -галактозидазой А и гемитартратом соединения формулы (I) мышей Fabry.

Эффективность только ERT и в комбинации с SRT с использованием гемитартрата соединения формулы (I) оценивали в пяти группах мышей Fabry-Rag ( $n=12$ /группу). Начиная с возраста 3 месяцев мышей подвергали поведенческим тестам (например, тесту "горячая пластина") и биохимическим тестам (например, анализу содержания GL-3 в тканях/крови/моче) по расписанию, как показано на фиг. 10. Мышам, подвергшимся ERT, по расписанию, показанному на фиг. 10, вводили  $\alpha$ -галактозидазу А в дозах 1 мг/кг. Мышам, подвергшимся SRT, ежедневно в пище вводили дозы 300 мг/кг гемитартрата соединения формулы (I).

Как показано на фиг. 11, ERT снижает содержание GL-3 в крови мышей Fabry-Rag, в то время как SRT этого не делает. Как показано на фиг. 12, комбинация ERT/SRT является наиболее эффективной при снижении содержания GL-3 в печени и почках мышей Fabry-Rag. Как показано на фиг. 13, SRT снижает содержание GL-3 в моче мышей Fabry-Rag, в то время как ERT не делает этого. Как показано на фиг. 14, SRT задерживает наступление тепловой нечувствительности у мышей Fabry-Rag, а ERT нет.

Таким образом, мыши Fabry-Rag, получавшие лечение комбинацией Фабразима и гемитартрата соединения формулы (I) проявляли улучшенные маркеры заболевания по сравнению с только ERT или только SRT при следующих моделях лечения: значительное снижение накопления GL-3 в печени и почках при комбинированной терапии; улучшенное содержание GL-3 в моче в группе SRT; улучшенное содержание GL-3 в крови в группах ERT и задержка периферической невропатии в группах SRT.

#### В. Болезнь Гоше.

Для того, чтобы определить, может ли последовательное использование фермент-заместительной терапии (ERT) и субстрат-снижающей терапии (SRT) привести к дополнительным благоприятным эффектам, сравнивали относительные эффективности отдельных и последовательной терапий на мышевой модели болезни Гоше (D409V/null).

#### Методы.

Исследования на животных. Процедуры с использованием животных рассматривались и утверждались Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC) при Genzyme Corporation, следуя нормам, установленным Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care (AAALAC). Мыши Gaucher (D409V/null) являются моделью болезни Гоше типа 1, проявляющейся в накоплении глюкозилцерамида в печени, селезенке и легких, но без костной патологии или патологии головного мозга (см. Y-H. Xu, et al., Am. J. Pathol. 163, 2003, 2093-2101, все сведения из которой включаются в настоящую заявку путем ссылки). Животные обоего пола вводились в исследование в возрасте 3 месяцев, поскольку предыдущие эксперименты показали, что между самцами и самками не было разницы в ответах на рекомбинантную глюкоцереброзидазу или гемитартрат соединения формулы (I). В исследовании участвовали 6 групп мышей совместно с группой А, умершвойленной после 2 недель исследования, для того чтобы определить исходное содержание глюкозилцерамида в тканях. Группы В, С и D каждые 2 суток получали рекомбинантную глюкоцереброзидазу человека (Genzyme Corp., Cambridge, MA) (10 мг/мг) внутривенно через хвостовую вену (100 мкл), всего 8 инъекций. Группу В умершвляли в конце этой схемы лечения (в тоже самое время, что и группу А), чтобы получить сниженное ферментом содержание глюкозилцерамида в тканях. Группы D и E получали с пищей гемитартрат соединения формулы (I) (Genzyme Corp., Cambridge, MA) в виде компонента гранул корма. Лекарственное средство составляло 0,075% (мас./мас.) в стандартной пище 5053 мышей (TestDiet, Richmond, IN) и предоставлялось свободно. Эта композиция обеспечивала дозу гемитартрата соединения формулы (I) 150 мг/кг в сутки для 25 г мыши. Группа F не получала лечения и была умершвлена наряду с группами С, D и E 12 недель спустя после начала исследования. Потребление пищи и массы мышей контролировали 3 раза в неделю, чтобы определить потребление лекарственного средства и возможное влияние лекарственного средства на общее самочувствие. Животных забивали ингаляцией углекислого газа и немедленно собирали их ткани. Половину каждой ткани быстро замораживали на сухом льду и хранили при -80°C до готовности для дополнительной обработки. Другую половину подвергали гистологическому исследованию.

#### Количественное определение содержания глюкозилцерамида в тканях.

Содержания глюкозилцерамида количественно определяли с помощью масс-спектрометрии как ранее описано (см. K. McEachern, et al., J. Gene. Med. 8 (2006) 719-729; T. Doering, J. Biol. Chem. 274 (1999) 11038-11045, все сведения из которой включаются в настоящую заявку путем ссылки). Ткань известной массы гомогенизировали в хлороформе:метаноле 2:1 (об./об.) и выдерживали при 37°C в течение 15 мин. Образцы центрифугировали и надосадочные жидкости экстрагировали 0,2 объемами воды в течение ночи при 4°C. Образцы центрифугировали, водную фазу сбрасывали, а органическую фазу осушали в азоте

до пленки. Для масс-спектрометрического исследования с ионизацией электрораспылением (ESI/MS), образцы ткани ресуспендировали до массы, эквивалентной 50 нг исходной ткани, в 1 мл хлороформа:метанола (2:1, об./об.) и перемешивали в вортексе в течение 5 мин. Аликвоты (40 мкл) каждого образца помещали в сосуды торговой марки Total Recovery Vials фирмы Waters и добавляли 50 мкл 10мкг/мл внутреннего стандарта d3-C16-GL-1 (Matreya, Inc., Pleasant Gap, PA). Образцы высушивали в азоте и ресуспендировали в 200 мкл 1:4 (об./об.) ДМСО:метанола. ESI/MS анализ глюкозилцерамидов с различной длиной углеродной цепи проводили на HPLC системе Waters alliance HPLC (Separation Module 2695), подсоединенной к системе Micromass Quattro Micro system, оснащенной электрораспылительным ионным источником. Образцы липидного экстракта (20 мкл) вводили в колонку C8 (4 мл×3 мм внутреннего диаметра, Phenomenex, Torrance, CA) при 45°C и элюировали с градиентом от 50 до 100% ацетонитрилом (2 ммоль ацетата аммония, 0,1% муравьиной кислоты) при 0,5 мл/мин. Первые 0,5 мин поддерживали 50% органической фазы и затем в течение последних 3,5 мин переключали на 100%. Температуру источника поддерживали постоянной при 150°C, а в качестве осушающего газа использовали азот при расходе 670 л/ч. Поддерживали капиллярное напряжение 3,8 кВ с напряжением на конусе 23 В, в то время как время выдержки для каждого вида ионов составляло 100 мс. С помощью режима MRM была получена спектральная функция для мониторинга восьми доминантных изоформ (C16:0, C18:0, C20:0, C22:1, C22:0, C22:1-OH, C24:1 и C24:0). Количественное определение содержания глюкозилцерамида основывалось на суммировании содержаний этих восьми изоформ относительно внутреннего стандарта с калибровочной кривой в диапазоне от 0,1 до 10 мкг/мл.

**Гистология.** Для гистологического исследования ткани в течение 24 ч при комнатной температуре фиксировали в цинк-формалине (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA), затем хранили в физиологическом растворе с фосфатным буфером при 4°C до готовности для дополнительной обработки. Все образцы дегидрировали в этаноле, светляли в ксилоле, инфильтрировали и заключали в парафин Surgipath R (Surgipath, Richmond, IL). С помощью микротома вырезали пятимикронные гистологические срезы и до окрашивания высушивали их в печи при 60°C. Гистологические срезы депарафинизировали в Нето-De (Scientific Safety Solvents, Keller, TX) и регидратировали в уменьшающихся концентрациях этанола с последующей отмыvkой физиологическим раствором с фосфатным буфером. Гистологические срезы окрашивали гематоксилином и эозином (H&E) и метили с помощью крысиного антимышиного моноклонального антитела CD68 (Serotec, Raleigh, NC) для того чтобы определить макрофаги. После отмыки физиологическим раствором с фосфатным буфером в течение 5 мин микроскопические препараты дегидратировали в этаноле и очищали в Нето-De для заливки покровной гистологической средой SHUR/Mount™ (TBS, Durham, NC). Процент площади CD68 иммуноположительности в печени количественно оценивали с помощью MetaMorph анализа (MDS Analytical Technologies, Toronto, Canada) десяти 400X фотографий на гистологический срез ткани. Все срезы в слепом относительно группы назначения режиме оценивал получивший профессиональную сертификацию ветеринар.

#### Результаты.

Режим дозирования глюкоцереброзидазы для снижения объема накопления GL1 в печени, селезенке и легких 3-месячных мышей Gaucher.

Для того чтобы исследовать относительные преимущества комбинации и монотерапии фермент- или субстрат-снижающей терапией, вначале определяли режим введения фермента, максимально снижающий содержание GL-1 во внутренних органах мышей Gaucher. Трехмесячным мышам Gaucher (D409V/null) внутривенно вводили 2, 4 или 8 доз рекомбинантной глюкоцереброзидазы человека 10 мг/кг. Мыши, получавшие лечение 2 или 4 дозами фермента, получали инфузии лекарственного средства каждые 3 суток, в то время как мыши, получавшие лечение 8 дозами, получали фермент каждые 2 суток. Использование более коротких интервалов между инфузиями животным, получавшим лечение 8 дозами, было разработано для того чтобы минимизировать возможное воздействие на какой-либо иммунный ответ на вводимый человеческий фермент. Животных забивали 7 суток спустя после последней инфузии и измеряли количество GL1, оставшееся в печени, селезенке и легких.

Лечение 2 дозами глюкоцереброзидазы на 50% снижало содержание GL1 в печени. Увеличение количества инфузии фермента до 4 или 8, как и ожидалось, в большей степени снижало содержания GL1 в печени (приблизительно на 75%). Неполное снижение содержаний GL1 даже 8 дозами соотносится с опытом с субъектами с болезнью Гоше, показывающим, что гепатосplenомегалия снижается только после продолжительного лечения (см. G.A. Grabowski, et al., Ann. Int. Med. 122 (1995) 33-39, все сведения которой включаются в настоящую заявку путем ссылки). Еще труднее поддавалось снижению лечением ферментом содержания субстрата в селезенке мышей Gaucher. Введение 2 доз глюкоцереброзидазы значительно не меняло содержания GL1 по сравнению с содержаниями, обнаруженными в не получавшем лечения контроле. Увеличение числа инфузии фермента до 4 или 8 снижало селезеночные содержания GL1 на около 50%. В легких после 8 доз наблюдалось снижение до 60% уровня не получавшего лечения контроля. Немногое более низкая степень снижения субстрата в легких возможно вызвана более слабой доступностью вводимого фермента для содержащих большое количество липидов альвеолярных макрофагов. Обнаружение большего очищения печени от GL1 по сравнению с селезенкой и легкими правдопо-

добно отражает биораспределение фермента после систематического введения (см. M. Van Patten, et al. Glycobiology 17 (2007) 467-478, все сведения которой включаются в настоящую заявку путем ссылки). Основываясь на этих результатах, для последующих исследований использовали режим лечения, состоящий из 8 последовательных доз глюкоцереброзидазы 10 мг/кг, вводимых с 2-дневными интервалами.

Относительные способности фермент- и субстрат-снижающей терапии снижать содержания GL1 в печени мышей Gaucher. Когорты 3-месячных мышей Gaucher получали лечение рекомбинантной глюкоцереброзидазой или гемитартратом соединения формулы (I) по отдельности или последовательно. Мыши в группах B, C и D давали 8 доз фермента, как описано выше (в течение 2 недель) для очистки от накопленного GL1. Затем различные группы получали питание обычной пищей или пищей, содержащей гемитартрат соединения формулы (I) (150 мг/кг/сутки), в течение дополнительных 10 недель, с не получавшей лечение группой F и служившей в качестве естественного контроля. Вне зависимости от состава пищи мыши съедали сравнимые количества пищи, и не было заметных различий в увеличении массы. Приблизительно 80% накопленных содержаний GL1 выводилось из печени после 2-недельной терапии исключительно ферментом. Если этим животным позволяли развиваться без дополнительного лечения в течение 10 недель, содержания GL1 в их печени повышались, указывая на то, что в наступающем периоде происходило повторное накопление субстрата (фиг. 2, колонка C). Эти содержания незначительно отличались от содержаний не получавшего лечения контроля (фиг. 2, колонка F). Однако если мыши получали лечение ферментом и затем в течение 10-недельного периода гемитартратом соединения формулы (I) в пище, содержания GL1 в их печени были значительно меньше, чем у не получавшего лечения контроля (фиг. 2, колонки D и F). Эти результаты дают основание полагать, что дополнительное лечение гемитартратом соединения формулы (I) замедляло повторное накопление субстрата. Примечательно, что мыши Gaucher, получавшие лечение только гемитартратом соединения формулы (I) в течение всего периода исследования (12 недель), также демонстрировали более низкие содержания GL1 (фиг. 2, колонка E) по сравнению с не получавшим лечение контролем той же возрастной группы (фиг. 2, колонка F) хотя различие было незначительным. Способность SRT в одиночку снижать содержания GL1 в этой животной модели согласуется с нашим предыдущим докладом (см. K.A. McEachern, et al., Mol. Genet Metab. 91 (2007) 259-267, все сведения которой включаются в настоящую заявку путем ссылки), и правдоподобно отражает тот факт, что мыши Gaucher (D409V/null) сохраняют остаточную ферментную активность (см. Y-H. Xu, et al., Am. J. Pathol. 163, 2003, 2093-2101, все сведения которой включаются в настоящую заявку путем ссылки).

Относительные способности фермент- и субстрат-снижающей терапии снижать содержания GL1 в селезенке мышей Gaucher.

Лечение 3-месячных мышей Gaucher рекомбинантной глюкоцереброзидазой в течение 2 недель в одиночку снижало селезеночные содержания GL1 приблизительно на 60% (фиг. 3, колонка B). Если этим животным позволяли созревать в течение дополнительных 10 недель без дополнительного вмешательства, содержания субстрата возвращались к содержаниям, наблюдавшимся в начале исследования (фиг. 3, колонка C), и незначительно отличались от не получавшего лечения контроля (фиг. 3, колонка F). Это дает основание полагать, что скорость повторного накопления GL1 в селезенке была выше, чем в печени. Это предположение также подтверждалось наблюдением более высоких базальных содержаний субстрата в селезенке (~1500 мг/г ткани; фиг. 2, колонка A) чем в печени (~500 мг/г ткани; фиг. 3, колонка D). Животные, которые получали лечение ферментом и затем в течение следующих 10 недель гемитартратом соединения формулы (I), демонстрировали самое высокое снижение селезеночных содержаний GL1 (фиг. 3, колонка D) и эти содержания были значительно ниже, чем содержания в селезенке не получавшего лечения контроля (фиг. 3, колонка F). Это указывает на то, что применение SRT не только задерживает повторное накопление субстрата, но также способна дополнительно снижать тяжесть накопления в этом органе. Похоже, что по меньшей мере в данном случае совокупный эффект остаточного эндогенного фермента и снижение субстрата приводят к дополнительному снижению общих содержаний субстрата. Наблюдение у получавших в течение 12 недель лечение только гемитартратом соединения формулы (I) мышей (фиг. 3, колонка E) более низких селезеночных содержаний GL1 чем у не получавшего лечения контроля (фиг. 3, колонка F), согласовывалось с этой точкой зрения, хотя различия были незначительными. Следовательно, лечение с помощью ERT с последующей SRT потенциально может повысить скорость и возможно даже степень выведения провоцирующего субстрата у пациентов с болезнью Гоше типа 1 средней тяжести.

Относительные способности фермент- и субстрат-снижающей терапии снижать содержания GL1 в легких мышей Gaucher.

Как указано ранее, легочные содержания GL1 наименее эффективно выводились с помощью внутривенного введения рекомбинантной глюкоцереброзидазы. Лечение 3-месячных мышей Gaucher ферментом в течение 2 недель давало в результате только 30% снижение содержаний субстрата в легких (фиг. 4, колонка B). Когорта животных, получавших в течение последующих 10 недель обычную пищу, как и ожидалось, демонстрировала повторное накопление GL1 и при этом не было значительной разницы с содержаниями GL1 не получавшей лечения группы (фиг. 4, колонки C и F). В отличие от этого, животные, получавшие пищу, содержащую гемитартрат соединения формулы (I), в течение такого же периода

вмешательства, демонстрировали снижение содержаний субстрата ниже, чем у животных, которым вводили только фермент (фиг. 4, колонка D), и значительно ниже, чем у животных в не получавшем лечении контроле (фиг. 4, колонка F). И снова это дает основание полагать, что в легких, так же как и селезенке, совокупный эффект гемитартрата соединения формулы (I) (в присутствии остаточной активности эндогенного фермента) не только замедляет повторное накопление GL1, но также дополнительно снижает его содержание ниже исходных уровней. Так же, как и для других внутренних органов, лечение только гемитартрратом соединения формулы (I) было эффективным для снижения легочных содержаний GL1 (фиг. 4, колонка E) по сравнению с не получавшим лечение контролем (фиг. 4, колонка F).

Гистопатологический анализ печени мышей Gaucher под энзим- и субстрат-снижающего лечения.

Для того чтобы визуализировать воздействие различных схем лечения на печень гистологические срезы ткани окрашивали маркером макрофагов CD68. Анализ срезов печени не получавших лечение 3-месячных мышей Gaucher показал присутствие большого числа наполненных липидами, CD68-положительных клеток Гоше, которые оставались в основном неизменными при анализе 12 недель спустя. В соответствии с биохимическими данными выше, печень животных, которым вводили рекомбинантную глюкоцереброзидазу в течение 2 недель, демонстрировала существенное очищение от липидов в этих аномальных макрофагах. Если этим животным позволяли развиваться дополнительно 10 недель без дополнительного лечения, подтверждалось повторное накопление GL1, на что указывало повторное возникновение клеток Гоше. Однако это увеличение числа клеток Гоше устранилось, если мыши получали субстрат-снижающую терапию гемитартрратом соединения формулы (I) в течение такого же периода вмешательства. Как указано ранее, мыши Gaucher, получавшие только гемитартррат соединения формулы (I), также демонстрировали снижение накопления субстрата, хотя и не в той же самой степени, что мыши Gaucher, получавшие комбинацию ERT и SRT. Степень CD68-положительного окрашивания на разнообразных срезах оценивалась также количественно с использованием программного обеспечения Meta-Morph (фиг. 18). Степень окрашивания в этих гистологических срезах, отражающая содержания GL1 в печени, дополнительно подтверждает предположения о сравнительной эффективности различных схем лечения.

Пример 8. Эффективность гемитартрата соединения формулы (I) на мышной модели болезни Гоше.

Исследования на животных. Процедуры с использованием животных рассматривались и утверждались Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC), следуя нормам Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care (AAALAC), нормам Штата и Федеральным нормам. Мышам Gaudier gba<sup>D409v/null</sup> (см. Y.-H. Xu. et al., Am. J. Pathol. 163 (2003) 2093-2101, все сведения из которой включаются в настоящую заявку путем ссылки) позволяли созреть в соответствии с требованиями исследования. Поскольку у самцов и самок не было обнаружено никакой разницы в фенотипе или ответе на гемитартррат соединения формулы (I), в исследованиях использовались оба пола. Гемитартррат соединения формулы (I) вводили путем однократного суточного принудительного вспаивания при объеме 10 мл/кг. Животных в течение одной недели перед началом исследования приучали к принудительному вспаиванию аналогичным объемом воды. Гемитартррат соединения формулы (I) растворяли в воде для инъекций (WFI; VWR, West Chester, PA) и вводили с увеличением дозы от 75 до 150 мг/кг/сутки в течение 9-дневного курса, с 3 сутками на каждую дозу и шагом повышения дозы 25 мг/кг/сутки. Мышей взвешивали три раза в неделю, чтобы отследить потенциальное воздействие лекарственного средства на их общее самочувствие. Животных забивали с помощью ингаляции углекислого газа и немедленно собирали их ткани. Половину каждой ткани быстро замораживали на сухом льду и хранили при -80°C до готовности для дополнительной обработки. Другую половину подвергали гистологическому исследованию.

Количественное определение содержаний глюкозилцерамида с помощью высокоэффективной тонкослойной хроматографии.

Анализ высокоэффективной тонкослойной хроматографией (HPTLC) был таким же, как описано A. Abe, et al., в J. Clin. Inv. 105 (2000) 1563-1571; H. Zhao, et al., Diabetes 56 (2007) 1341-1349 и S.P.F. Miller, et al., в J. Lab. Clin. Med. 127 (1996) 353-358, все сведения из которых включаются в настоящую заявку путем ссылки). Коротко, общую липидную фракцию получали гомогенезированием ткани в холодном физиологическом растворе с фосфатным буфером, экстрагируя смесью хлороформ:метанол 2:1 (об./об.) и обрабатывая ультразвуком в ультразвуковом аппарате с водяной баней. Чтобы разделить фазы, образцы центрифугировали и отделяли надосадочную жидкость. Гранулы повторно обрабатывали ультразвуком в смеси хлороформ:метанол:физиологический раствор, центрифугировали и полученную в результате вторую надосадочную жидкость собирали и комбинировали с первой. К скомбинированным надосадочным жидкостям добавляли смесь хлороформ:физиологический раствор 1:1 (об./об.), перемешивали в вортексе и центрифугировали. После отбрасывания верхнего водного слоя добавляли смесь метанол:физиологический раствор, перемешивали в вортексе и повторно центрифугировали. Органическую фазу отбирали и сушили в азоте, растворяли в смеси хлороформ:метанол 2:1 (об./об.) из расчета 1 мл на 0,1 г исходной массы ткани и хранили при -20°C.

Часть липидного экстракта использовали, чтобы измерить содержание общего фосфата (см. B.N. Ames, Methods Enzymol. 8 (1966) 115-118, все сведения которой включаются в настоящую заявку путем ссылки), например содержание фосфолипида, чтобы использовать его в качестве внутреннего стандарта. Остатки подвергали щелочному метанолизу чтобы удалить фосфолипиды, переносимые вместе с глюкозилцерамидом на HPTLC планшет. Аликвоты экстрактов, содержащих эквивалентные количества общего фосфата наносили в виде пятен на HPTLC планшет совместно с известными стандартами глюкозилцерамида (Matreya inc. Pleasant Gap, PA). Липиды повторно растворяли и визуализировали 3% моногидратом ацетата меди (мас./об.), 15% фосфорной кислотой (об./об.) с последующей термической обработкой в течение 10 мин при 150°C. Липидные полосы сканировали на денситометре (GS-700, Bio-Rad, Hercules, CA) и анализировали с помощью программного обеспечения Quantity One (Bio-Rad).

Количественный анализ содержания глюкозилцерамида в тканях с помощью масс-спектрометрии. Глюкозилцерамид количественно анализировали с помощью масс-спектроскопии, как описано. (см. K. McEachern, et al., J. Gene Med. 8 (2006) 719-729; T. Doering, et al., J. Biol. Chem. 274 (1999) 11038-11045, полное содержание каждого из документов включено в настоящее описание посредством ссылки). Ткань гомогенизировали в 2:1 (об./об.) хлороформ:метанол и инкубировали при 37°C. Образцы центрифугировали и надосадочные жидкости экстрагировали с использованием 0,2 объемов воды в течение ночи. Образцы центрифугировали снова, водную фазу отбрасывали, а органическую фазу полностью высушивали до пленки в атмосфере азота.

Для масс-спектрометрического исследования с ионизацией электрораспылением (ESI/MS) образцы ткани ресуспендировали до эквивалента 50 нг первоначальной массы ткани в 1 мл смеси хлороформ/метанол (2:1, об./об.) и перемешивали в вортеце в течение 5 мин. Аликвоты каждого образца (40 мкл) помещали в сосуды торговой марки Total Recovery Vials фирмы Waters и добавляли 50 мкл внутреннего стандарта d3-C16-GL-1 с концентрацией 10 мкг/мл (Matreya, Inc., Pleasant Gap, PA). Образцы сушили в атмосфере азота и ресуспендировали с использованием 200 мкл 1:4 DMSO:метанола. ESI/MS анализ глюкозилцерамидов с различной длиной углеродной цепи проводили на HPLC системе Waters alliance HPLC (Separation Module 2695) соединенной с системой Micromass Quattro Micro, снабженной ионным источником для электрораспыления. Двадцать микролитров образцов липидного экстракта вводили в колонку C8 (4 мл×3 мм внутренний диаметр; Phenomenex, Torrance, CA) при 45°C и элюировали с градиентом 50-100% ацетонитрила (2 ммоль ацетата аммония, 0,1% муравьиной кислоты) при 0,5 мл/мин. Первые 0,5 мин поддерживали 50% органического вещества, а затем быстро переключали на 100% в течение последних 3,5 мин. Температуру источника поддерживали постоянной при 150°C, а в качестве осушающего газа использовали азот при скорости потока 670 л/ч. Напряжение капилляра поддерживали при 3,80 кВ с напряжением на конусе 23 В, тогда как время выдержки для каждого вида ионов составляло 100 мс. С помощью режима MRM была получена спектральная функция для мониторинга восьми доминантных изоформ (C16:0, C18:0, C20:0, C22:1, C22:0, C22:1-OH, C24:1, и C24:0). Количественное определение содержания глюкозилцерамида основывалось на суммировании содержаний этих восьми изоформ относительно внутреннего стандарта с калибровочной кривой в диапазоне от 0,1 до 10 мкг/мл.

**Гистология.** Для гистологического анализа ткани фиксировали в цинк-формалине (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA) при комнатной температуре в течение 24 ч, затем хранили в физиологическом растворе с фосфатным буфером при 4°C до готовности к последующей обработке. Все образцы дегидратировали в повышающихся концентрациях спирта, осветляли в ксилоле и инфильтрировали и заключали в парафин Surgipath R (Surgipath, Richmond, IL). Гистологические срезы толщиной пять мкм вырезали, используя ротационный микротом, и сушили в печи при 60°C перед окрашиванием. Гистологические срезы депарафинизировали в ксилоле и регидратировали в понижающихся концентрациях спирта с последующим промыванием водой. После 1 мин промывания в 3% уксусной кислоте, микроскопические препараты окрашивали в течение 40 мин в 1% альциановом синем 8GX (Electron Microscopy Sciences) в 3% уксусной кислоте pH 2,0. После промывания в воде и окисления в 1% йодной кислоте в течение 1 мин микроскопические препараты окрашивали реактивом Шиффа (Surgipath) в течение 12 мин. После промывания в течение 5 мин в горячей воде, микроскопические препараты дегидратировали в спирте и осветляли в ксилоле перед заливкой покровной гистологической средой SHUR/Mount™ (TBS, Durham, NC). Клетки Гоше, морфологически идентифицированные в печени, количественно анализировали с путем подсчета клеток вручную в 10 полях зрения под большим увеличением (HPFs, 400x).

#### Результаты.

Эффект от введения гемитартрата соединения формулы (I) мышам D409V/null. Определяли эффект от введения гемитартрата соединения формулы (I) мышам D409V/null. Мышам в возрасте примерно 7 месяцев вводили 150 мг/кг/сутки гемитартрата соединения формулы (I) (доза, показанная эффективной при ингибировании глюкозилцерамидсинтазы в предварительных исследованиях) посредством принудительного вспаивания в течение 10 недель. Это лечение не оказывало заметного воздействия на самочувствие или пищевые привычки мышей. Измерения их массы тела на протяжении всего исследования не показали существенного отклонения от массы тела мышей, не получавших лечения, давая основание по-

лагать, что гемитартрат соединения формулы (I) хорошо переносился в дозе, которая была показана эффективной при ингибиции синтазы.

Эффективность гемитартрата соединения формулы (I) при лечении молодых мышей до появления симптомов болезни Гоше. Гемитартрат соединения формулы (I) оценивали в отношении уменьшения лизосомального накопления глюкозилцерамида и появления клеток Гоше у молодых мышей D409V/null (10-недельного возраста). У этих молодых мышей Gaucher демонстрируются низкие содержания GL-1 в пораженных тканях. Животным десятинедельного возраста в течение 10 недель посредством принудительного вспаивания вводили 75 или 150 мг/кг/сутки гемитартрата соединения формулы (I). Измерение содержаний глюкозилцерамида показало дозозависимое снижение по сравнению с контрольными животными той же возрастной группы, которым вводили носитель. В когорте, получавшей лечение 150 мг/кг/сутки, содержание глюкозилцерамида составляло 60, 40 и 75% от содержания в контроле, в печени, легких и селезенке, соответственно (фиг. 6). Статистически значимое более низкое содержание глюкозилцерамида, наблюдавшееся в печени и легких получавших лечение мышей D409V/null, указывали на то, что гемитартрат соединения формулы (I) был эффективен при снижении накопления этого гликосфинголипида в этих тканях.

Гистопатологическая оценка печени мышей D409V/null, не подвергавшихся лечению, в конце исследования (20 недельный возраст) показала наличие клеток Гоше по всей печени. У мышей, получавших лечение 150 мг/кг/сутки гемитартрата соединения формулы (I) в течение 10 недель было показано только случайное наличие клеток Гоше, которые также были неизменно меньшего размера. Количественная оценка этих клеток в ряде различных срезов подтвердила, что частота встречаемости клеток Гоше была значительно ниже у мышей, получавших лечение гемитартрата соединения формулы (I). Вместе эти биохимические и гистологические сведения дают основания предположить, что ежедневное пероральное введение гемитартрата соединения формулы (I) мышам до появления симптомов болезни Гоше, было эффективным в снижении накопления глюкозилцерамида в пораженных тканях и последующем образовании клеток Гоше в печени.

Эффективность гемитартрата соединения формулы (I) при лечении старых мышей Gaucher с уже существующей патологией. Также оценивали эффективность гемитартрата соединения формулы (I) в задержке или реверсии прогрессирования заболевания у старых мышей с симптомами болезни Гоше. Семимесячным мышам D409V/null вводили 150 мг/кг/сутки гемитартрата соединения формулы (I) посредством принудительного вспаивания в течение 10 недель. Анализы содержания глюкозилцерамида в печени, легких и селезенке получавших лечение мышей на 5 и 10 неделе после обработки показали отсутствие увеличения свыше того, что наблюдалось в начале исследования. После 10 недель лечения содержания глюкозилцерамида, которые были определены, были на 60% ниже в печени, на 50% ниже в легких и на 40% ниже в селезенке, чем у мышей, получавших лечение носителем. Эти результаты показали, что гемитартрат соединения формулы (I) был эффективен при ингибиции дальнейшего накопления глюкозилцерамида у мышей с существующей отягощенной патологией накопления.

Гистопатологическое исследование срезов тканей показало сниженное число клеток Гоше в печени мышей D409V/null, получавших лечение, по сравнению с контрольными животными без лечения. Количественное определение числа клеток Гоше подтвердило биохимические данные; у мышей D409V/null, подвергавшихся лечению, было показано, что количество клеток Гоше, которое существенно не отличалось от этого количества в начале лечения как в момент времени на 5, так и на 10 неделе. Число клеток Гоше в оба эти момента времени было значительно ниже, чем число клеток у мышей D409V/null, не подвергавшихся лечению. Взятые вместе эти данные демонстрируют, что гемитартрат соединения формулы (I) эффективно ингибирировал дальнейшее накопление глюкозилцерамида и развитие клеток Гоше у животных с уже существующей патологией.

#### Обсуждение.

Гемитартрат соединения формулы (I) показал высокую степень специфичности в отношении фермента глюкозилцерамидсигнатазы. Также не было измеримого ингибиции активности глюкоцереброзидазы в эффективной дозе, что является важной особенностью при лечении пациентов с болезнью Гоше 1 типа, у большинства из которых сохраняется остаточная глюкоцереброзидазная активность. В эффективной дозе 150 мг/кг/сутки не было наблюдавших желудочно-кишечных проблем и не было отличия в массе тела между группами животных, получавших лечение и группами контрольных животных, не получавших лечения. Сывороточные концентрации в  $IC_{50}$  (24-40 нмоль) и выше быстро достигались при использовании пероральных доз, которые были ниже максимально переносимого уровня. Гемитартрат соединения формулы (I) также быстро метаболизировался и выводился: как исходное соединение, так и метаболиты эффективно выводились в течение 24 ч, как показано в испытаниях ADME с однократными и повторными дозами с соединением, радиоактивно-запечатанным  $^{14}C$ , у крыс и собак.

Используя неоптимизированный режим дозирования однократной суточной дозы пероральный препарат, вводимый принудительным вспаиванием, успешно предотвращал накопление глюкозилцерамида как у молодых мышей до появления симптомов заболевания, так и у старых мышей Gaucher, у которых уже демонстрировалась патология аккумулирования. У молодых мышей в возрасте 10 недель, хотя и накапливалось повышенное содержание глюкозилцерамида по сравнению с контрольными живот-

ными дикого типа, еще не развивались характерные набухшие тканевые макрофаги, называемые клетками Гоше. Лечение с использованием 150 мг/кг/сутки гемитартрата соединения формулы (I) останавливало любое значительное прогрессирование заболевания и ингибиравало развитие клеток Гоше. У старых мышей, у которых наблюдалось более высокое содержание лизосомального глюкозилцерамида и числа клеток Гоше, не было дальнейшего повышения содержания глюкосфинголипида или числа накопленных клеток либо спустя 5 недель, либо спустя 10 недель лечения. Поскольку, как сообщалось, основной источник глюкозилцерамида в клетках Gaucher является внеклеточного происхождения, эти результаты означали, что ингибиование глюкозилцерамидсинтазы под действием гемитартрата соединения формулы (I) было системным.

Наблюдение того, что гемитартрат соединения формулы (I) был эффективным для профилактики дальнейшего накопления глюкозилцерамида, предлагает терапевтическую стратегию, которая могла бы в дальнейшем улучшить лечение болезни Гоше.

Таким образом, данные, представленные в настоящем документе, показали, что гемитартрат соединения формулы (I) является активным и специфичным ингибитором глюкозилцерамидсинтазы, демонстрирующим отсутствие выраженных побочных эффектов в мышевой модели болезни Гоше. Это соединение с успехом предотвращало прогрессирование заболевания как у мышей Gaucher до появления симптомов, так и у старых, пораженных болезнью, мышей Gaucher, путем ингибиования накопления глюкозилцерамида и образования клеток Гоше. Эти данные дают возможность предположить, что гемитартрат соединения формулы (I) может представлять еще один возможный способ лечения болезни Гоше 1 типа, как у детей, так и у взрослых, и, потенциально, других болезней накопления гликосфинголипидов.

Пример 9. 2 фаза клинических испытаний гемитартрата соединения формулы (I).

Методы. В этом клиническом испытании гемитартрата соединения формулы (I), вводимого 50 или 100 мг перорально два раза в сутки, лечили 26 взрослых людей с болезнью Гоше 1 типа (GDI) (16Ж:10М; средний возраст 34 года, диапазон 18-60; все лица белой расы) в 7 местах в 5 странах. Пациенты были со спленомегалией (объем 10 нормальных) и либо с тромбоцитопенией (тромбоциты 45000-100000/мм<sup>3</sup>), либо с анемией (гемоглобин 8-10 г/дл, женщины; 8-11 г/дл, мужчины). Ни один из них не получал заместительную ферментную или субстрат-снижающую терапию в предыдущие 12 месяцев. Основным совокупным показателем эффективности является содержание глобина (+0,5 г/дл) или количество тромбоцитов (+15%) после 52 недель лечения. Также оценивали объем печени, хитотриозидазу, глюкозилцерамид. Пациенты продолжали проходить лечение и находились под наблюдением врача длительное время.

Результаты. Данные 52 недели были доступны для 20 пациентов; 4 других досрочно отказались от участия и 2 продолжали испытание. Совокупный основной показатель эффективности обеспечивался 19 из 20 пациентов. Средние (1SD) изменения по сравнению с исходным содержания к 52 неделе представляли собой: гемоглобин +1,6 (11,35) г/дл; количество тромбоцитов +43,6% (137,59%); объем селезенки и печени (кратный нормальному) 40,2% (110,44%) и 15,8% (110,39%), соответственно; и хитотриозидаза 49,9% (120,75%). Содержание глюкозилцерамида в плазме приходило в норму через 4 недели у всех пациентов, гемитартрат соединения формулы (I) хорошо переносился с приемлемыми показателями безопасности. Сообщалось о семи связанных с этим препаратом случаях побочных эффектов у шести пациентов; все были слабо выраженными и временными по характеру.

Пример 10. Фармацевтическая композиция гемитартрата соединения формулы (I), капсулы 100 мг.

Способ получения капсул 100 мг: гемитартрат соединения формулы (I), микрокристаллическую целлюлозу, моногидрат лактозы и гипромеллозу, E15 отдельно пропускали через сито размером 20 меш. Количество просеянных ингредиентов, показанные в табл. 9, перемешивали в грануляторе с высоким усилием сдвига в течение 9-12 мин.

Таблица 9

## Фармацевтическая композиция для капсул 100 мг

Ингредиент	Единичное количество		
	Единичное количество капсулы 100 мг (мг)	% на единичную дозу (% масс/масс)	Номинальный размер партии: 71000 капсул общее количество 19,2 кг
Гемитартрат соединения формулы (I)	100,0	37,0	7,1
Микрокристаллическая целлюлоза	45,0	16,7	3,2
Моногидрат лактозы	111,5	41,3	7,9
Гипромеллоза, Е15	10,8	4,0	0,8
Глицерилбегенат	2,7	1,0	0,2
Масса заполнения (мг)	270		248-292 мг
Общий % композиции		100,0	19,2 кг

Затем ингредиенты подвергали влажной грануляции путем добавления очищенной воды (2,2 кг; 11,7% массы сухих ингредиентов) в чашу гранулятора пока не завершится процесс, что подтверждается визуально. Влажный гранулят выгружали из чаши и пропускали через вращающееся лопастное колесо, просеивающую дробилку. Затем влажный гранулят высушивали в стационарной монолитной сушильной печи с непосредственным обогревом с опорной плитой и поддоном при температуре  $50\pm5^{\circ}\text{C}$  до содержания влаги не более 3,5%, как подтверждено внутрипроизводственной проверкой. Сухие гранулы затем пропускали через просеивающую дробилку и просеянные гранулы переносили в V-смеситель. Глицерилбегенат (0,2 кг) добавляли в V-смеситель и конечную смесь перемешивали до однородности смеси, как определено с помощью теста однородности смеси в едином масштабе времени или автономно, обычно в течение 10-20 мин. Конечную смесь затем инкапсулировали в капсулы размером № 2, используя полуавтоматический наполнитель капсул, до соответствующей массы заполнения (270 мг в среднем), и заполненные капсулы обеспыливали перед упаковкой.

Пример 11А. Фармацевтическая композиция гемитартрата соединения формулы (I), капсулы 10 мг.

Способ получения капсул 10 мг: процесс, описанный в примере 10, осуществляли до стадии инкапсулирования. Для получения капсул 10 мг, конечную смесь инкапсулировали, используя машину для заполнения капсул, в капсулы размером № 4 или № 5 до соответствующей массы заполнения (27 мг в среднем), и заполненные капсулы обеспыливали перед упаковкой.

Пример 11В. Фармацевтическая композиция гемитартрата соединения формулы (I), капсулы 50 мг.

Способ получения капсул 50 мг: процесс, описанный в примере 10, осуществляли до стадии инкапсулирования. Для получения капсул 50 мг, конечную смесь инкапсулировали, используя машину для заполнения капсул, в капсулы размером № 3 до соответствующей массы заполнения (135 мг в среднем), и заполненные капсулы обеспыливали перед упаковкой.

Пример 11С. Фармацевтическая композиция гемитартрата соединения формулы (I), капсулы 150 мг.

Способ получения капсул 150 мг: процесс, описанный в примере 10, осуществляли до стадии инкапсулирования. Для получения капсул 150 мг, конечную смесь инкапсулировали, используя машину для заполнения капсул, в капсулы размером № 0 до соответствующей массы заполнения (405 мг в среднем), и заполненные капсулы обеспыливали перед упаковкой.

Пример 12. Фармацевтическая композиция гемитартрата соединения формулы (I), капсулы 25 мг.

Способ получения капсул 25 мг: процесс, описанный в примере 10, осуществляли до стадии инкапсулирования. Для получения капсул 25 мг, конечную смесь инкапсулировали, используя машину для заполнения капсул, в капсулы размером №4 до соответствующей массы заполнения (67.5 мг в среднем), и заполненные капсулы обеспыливали перед упаковкой.

Пример 13. Лекарственные взаимодействия гемитартрата соединения формулы (I) - ингибиторы CYP2D6.

Исследование проводили для оценки фармакокинетических параметров, безопасности и переносимости многократных пероральных доз гемитартрата соединения формулы (I) (100 мг два раза в сутки) вводимых с пароксетином - мощным ингибитором CYP2D6 (30 мг один раз ежедневно), и без него. Это испытание представляло собой открытое испытание с фиксированной последовательностью действий на 36 здоровых людях (17 мужчин и 19 женщин). Дополнительными задачами было оценить РК пароксетина в сочетании с многократными дозами гемитартрата соединения формулы (I) (100 мг два раза в сутки) у здоровых людей, и дополнительно оценить РК гемитартрата соединения формулы (I) после многократных доз по сравнению с введением однократной дозы гемитартрата соединения формулы (I).

Средние значения РК параметров свободного основания гемитартрата соединения формулы (I), как он существует в плазме, были нелинейными и показали 2-кратное накопление в AUC и  $C_{\text{max}}$  с повторным

введением (100 мг два раза в сутки) по сравнению с введением однократной дозы. Одновременное введение гемитартрата соединения формулы (I) и пароксетина в результате приводило к 7-кратному увеличению  $C_{max}$  и 9-кратному увеличению AUC по сравнению с многократным введением только гемитартрата соединения формулы (I). Эти результаты указывают на то, что пароксетин может ингибировать метаболизм гемитартрата соединения формулы (I) и повышает концентрации этого лекарственного средства в плазме крови. Аналогичные эффекты ожидались бы и с другими мощными ингибиторами CYP2D6 (например, флуоксетином и квинидином) и тщательное наблюдение за содержанием лекарственного средства в плазме и корректировки возможных доз необходимы в тех случаях, когда гемитартрат соединения формулы (I) вводят совместно с лекарственным средством, известным как мощный ингибитор CYP2D6. Концентрации пароксетина составляли примерно в 1,5-2 раза выше, чем ожидалось, что дает возможность предположить, что гемитартрат соединения формулы (I), или один из его метаболитов, может являться легким ингибитором CYP2D6.

Пример 14. Лекарственные взаимодействия гемитартрата соединения формулы (I) - ингибиторов CYP3A4 и ингибиторов р-гликопротеина (PGP).

Исследование проводили для оценки фармакокинетических параметров, безопасности и переносимости многократных доз гемитартрата соединения формулы (I) (100 мг дважды в сутки) с многократными дозами кетоконазола (400 мг один раз ежедневно) или без него, у здоровых лиц мужского и женского пола. Это исследование представляло собой открытое исследование с фиксированной последовательностью действий на 36 здоровых людях (18 мужчин и женщин), состоящее из 3 периодов, которые включали однократное введение 100 мг дозы гемитартрата соединения формулы (I), многократное введение дозы гемитартрата соединения формулы (I) и одновременное введение 100 мг гемитартрата соединения формулы (I) (два раза ежедневно) с 400 мг кетоконазола (один раз ежедневно). Повторное введение гемитартрата соединения формулы (I) и кетоконазола, сильного ингибитора цитохрома P450 3A4 ("CYP 3A4") и р-гликопротеина, в результате приводило к 4-кратному увеличению времени воздействия свободного основания гемитартрата соединения формулы (I), как он существует в плазме в равновесной концентрации. Таким образом, пациенты, уже получающие гемитартрат соединения формулы (I), могут нуждаться во временном уменьшении дозы во время одновременного лечения сильными ингибиторами CYP 3A4 или р-гликопротеина.

Пример 15. Исследования стабильности для композиции гемитартрата соединения формулы (I).

Смеси готовили путем перемешивания гемитартрата соединения формулы (I) и excipientов (моногидрат лактозы капсулирующей степени чистоты, Avicel PH 301 (микрокристаллической целлюлозы) и Methocel E15 Prem LV (гидроксипропилметилцеллюлозы)) в сцинтилляционном флаконе со шкалой примерно 2 г. 15,6% воды добавляли в смесь и перемешивали для получения влажных гранул. Влажные гранулы просеивали, используя сито № 10 (отверстия 2000 мкм). Просеянные гранулы затем высушивали в печи при 50°C в течение 2 ч. Высушенные гранулы просеивали, используя сито № 18 (отверстия 1000 мкм). Смазывающее вещество, глицерилбегенат, добавляли в смесь и перемешивали для получения конечной смеси. Полученные смеси показаны в таблице, приведенной ниже:

Таблица 10

№ серии	AP	Моногидрат лактозы	Avicel PH 101	Композиция 50 мг/100 мг	Комментарии
1	1	2,1	2,1	50	контроль
2	1	2,1	0	50	Без Avicel
3	1	0	2,1	50	Без лактозы
4	1	2,1	1,1	50	Меньшее количество Avicel
5	1	1,1	2,1	50	Меньшее количество лактозы
6	1	2,1	0,8	50	Соотношение Avicel и лактозы аналогично 100 мг
7	1	1,1	0,4	100	контроль

Метилцеллюлозу (HPMC) использовали в диапазоне от 2 до 4%. Компритол АТО 88 использовали в диапазоне от 1 до 1,6%.

Семь композиций смесей, которые имели различные соотношения АФИ:лактоза:Avicel, перечисленные выше, подвергали воздействию высокой температуры при 85°C в течение 3 суток (исследование в условиях форсированной деградации), чтобы узнать скорость деградации и стабильность каждой композиции. Это условие ускоренного испытания было выбрано, исходя из результатов исследования, что степень продуктов деградации 50 мг готовой лекарственной формы через 24 месяца была сравнимой с таковой, полученной при 85°C в течение 3 суток.

Исследование форсированной деградации проводили, используя метод градиентной HPLC с обращенной фазой, в котором использовали колонку C18 (Waters T3, 3 мкм, 100×4,6 мм), подвижные фазы, состоящие из воды и ацетонитрила с 0,1% трифторуксусной кислотой (TFA), УФ обнаружение при 280 нм, при температуре колонки 40°C, и скорости потока 2 мл/мин. Градиент начинался при поддержи-

вании на уровне 5% В (ацетонитрил и 0,1% TFA) в течение 0,5 мин, а затем увеличивался органический компонент при 4,83% В в минуту вплоть до 15 мин.

Общие продукты деградации каждой смеси композиции суммировали и наносили на график в зависимости от соотношения АФИ:лактоза:Avicel, и результаты показаны на фиг. 15. Результаты этого исследования дают основания полагать, что при поддержании постоянным соотношения АФИ и лактозы, уменьшение количества Avicel улучшает стабильность композиции. В тех случаях, когда Avicel удален, композиция имеет соотношение АФИ:лактоза:Avicel 1:2,1:0, это является наиболее стабильной композицией. В тех случаях, когда удалена лактоза, композиция имеет соотношение АФИ:лактоза:Avicel 1:0:2,1, и эта композиция не является наиболее нестабильной по сравнению с другими соотношениями. Объединенная информация дает основания полагать, что лактоза стабилизирует эту композицию, тогда как авицел дестабилизирует эту композицию. Однако, в тех случаях, когда присутствуют оба эксципиента, они взаимодействуют друг с другом. Это соотношение должно быть скорректировано для получения стабильной композиции.

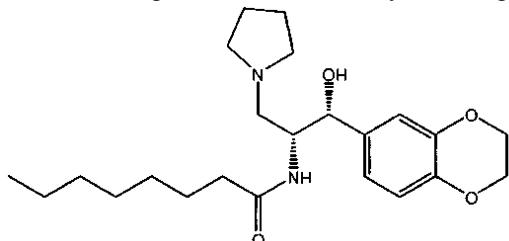
Для активных фармацевтических ингредиентов наподобие гемитартрата соединения формулы (I), которые являются водорастворимыми, микрокристаллическая целлюлоза помогает формировать гранулы во время влажной грануляции, поскольку она нерастворима в воде. Если микрокристаллическая целлюлоза не используется, происходит резкое изменение от состояния гранул до пастообразной формы. Пастообразную форму было трудно обрабатывать и полученные в результате частицы после высушивания не имели подходящей механической прочности и распределения по размеру частиц. Фармацевтическая композиция, которая содержит 37 мас.% гемитартрата соединения формулы (I), 41,0 мас.% растворимого в воде наполнителя; 16,7 мас.% нерастворимого в воде наполнителя, от 2 до примерно 6 мас.% связующего вещества; и примерно от 0,1 до примерно 2 мас.% смазывающего вещества, все в пересчете на сухое вещество, обладает наилучшим профилем стабильности в отношении количества образованных продуктов деградации.

Сведения, представленные во всех патентах, опубликованных патентных заявках и ссылках, приведенных в настоящем документе, включены посредством ссылки в полном объеме.

Хотя настоящее изобретение было в частности показано и описано со ссылкой на его варианты воплощения, приводимые в качестве примера, специалистам в данной области будет понятно, что в настоящем изобретении могут быть сделаны различные изменения в форме и в частностях, не отклоняясь от объема, заключенного в прилагаемой формуле изобретения.

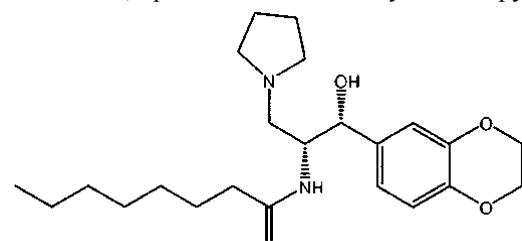
#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Гемитартратная соль соединения, представленного следующей структурной формулой:



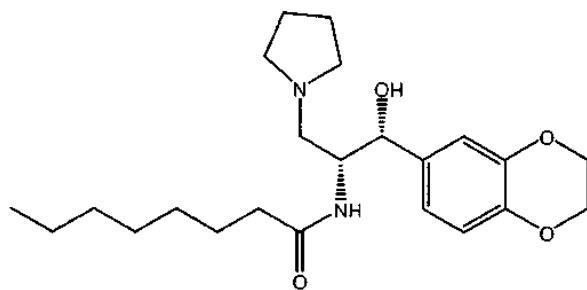
причем соль находится в кристаллической форме, характеризующейся по меньшей мере одним основным пиком рентгеновской порошковой дифракции при углах 2θ 5,1°, 6,6°, 10,7°, 11,0°, 15,9° и 21,7°.

2. Гемитартратная соль соединения, представленного следующей структурной формулой:



причем соль находится в кристаллической форме, характеризующейся основными пиками рентгеновской порошковой дифракции при углах 2θ 5,1°, 6,6°, 10,7°, 11,0°, 15,9° и 21,7°.

3. Гемитартратная соль соединения, представленного следующей структурной формулой:



причем соль находится в кристаллической форме, характеризующейся пиками рентгеновской порошковой дифракции при углах 2θ 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° и 23,5°.

4. Гемитартратная соль по любому из пп.1-3, отличающаяся тем, что гемитартратная соль представляет собой L-гемитартрат.

5. Фармацевтическая композиция для лечения субъекта, страдающего болезнью Гоше или болезнью Фабри, содержащая гемитартратную соль по любому из пп.1-4 и фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель.

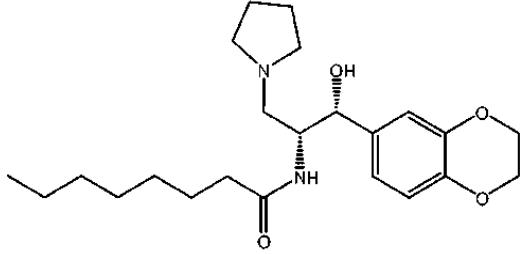
6. Способ лечения субъекта, страдающего болезнью Гоше или болезнью Фабри, предусматривающий введение субъекту эффективного количества гемитартратной соли по любому из пп.1-4 или фармацевтической композиции по п.5.

7. Способ ингибирования глюкозилцерамидсинтазы у нуждающегося в этом субъекта, предусматривающий введение субъекту эффективного количества гемитартратной соли по любому из пп.1-4 или фармацевтической композиции по п.5.

8. Способ снижения концентраций глюкосфинголипидов у нуждающегося в этом субъекта, предусматривающий введение субъекту эффективного количества гемитартратной соли по любому из пп.1-4 или фармацевтической композиции по п.5.

9. Способ по любому из пп.6-8, предусматривающий введение гемитартратной соли при дозе от 25 до 200 мг два раза в сутки.

10. Способ лечения субъекта, страдающего болезнью Гоше, предусматривающий введение субъекту эффективного количества первого терапевтического агента, представленного следующей структурной формулой:



или его фармацевтически приемлемой соли в комбинации с эффективным количеством второго терапевтического агента, которое является эффективным для лечения болезни Гоше.

11. Способ по п.10, отличающийся тем, что второй терапевтический агент выбран из глюкоцереброзидазы, аналогов глюкоцереброзидазы, ингибиторов глюкозилцерамидсинтазы и молекулярных шаперонов, которые связываются с глюкоцереброзидазой и восстанавливают ее правильную конформацию.

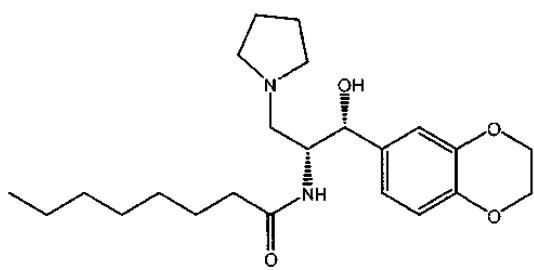
12. Способ по п.10, отличающийся тем, что второй терапевтический агент представляет собой имиглюциразу, изофагомин, миглустат, талиглюциразу или велаглюциразу.

13. Способ по любому из пп.10-12, отличающийся тем, что первый терапевтический агент вводится в форме гемитартратной соли.

14. Способ по п.13, отличающийся тем, что гемитартратная соль представляет собой кристаллическую соль.

15. Способ по п.13, отличающийся тем, что гемитартратная соль представляет собой аморфную соль.

16. Способ лечения субъекта, страдающего болезнью Фабри, предусматривающий введение субъекту эффективного количества первого терапевтического агента, представленного следующей структурной формулой:



или его фармацевтически приемлемой соли в комбинации с эффективным количеством второго терапевтического агента, которое является эффективным для лечения болезни Фабри.

17. Способ по п.16, отличающийся тем, что второй терапевтический агент выбран из  $\alpha$ -галактозидазы А, аналогов  $\alpha$ -галактозидазы А и молекулярных шаперонов, которые связываются с  $\alpha$ -галактозидазой А и восстанавливают ее правильную конформацию.

18. Способ по п.16, где второй терапевтический агент представляет собой мигаластат, агалзидазу  $\alpha$  или агалзидазу  $\beta$ .

19. Способ по любому из пп.16-18, отличающийся тем, что первый терапевтический агент вводится в форме гемитартратной соли.

20. Способ по п.19, отличающийся тем, что гемитартратная соль представляет собой кристаллическую соль.

21. Способ по п.19, отличающийся тем, что гемитартратная соль представляет собой аморфную соль.

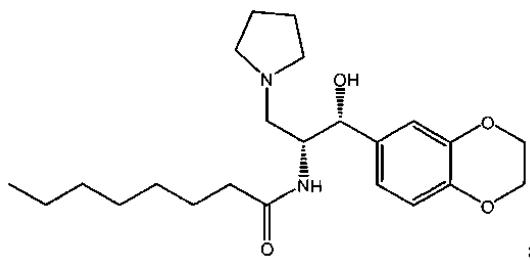
22. Способ по любому из пп.10-21, отличающийся тем, что лечение первым терапевтическим агентом начинают после лечения в течение по меньшей мере десяти недель вторым терапевтическим агентом.

23. Способ по любому из пп.10-21, отличающийся тем, что лечение первым терапевтическим агентом начинают после лечения вторым терапевтическим агентом, причем лечение первым терапевтическим агентом начинают после того, как количество тромбоцитов у субъекта станет равно или превысит 100000 на  $\text{мм}^3$ , концентрация гемоглобина станет равна или превысит 11 г/дл (женщины) или 12 г/дл (мужчины), и/или объем селезенки субъекта станет меньше или равным 10-кратному нормальному объему, а объемы печени станут меньше или равны 1,5-кратным нормальным объемам.

24. Способ по п.22 или 23, отличающийся тем, что лечение вторым терапевтическим агентом прекращают после начала лечения первым терапевтическим агентом.

25. Способ по любому из пп.10-24, предусматривающий введение первого терапевтического агента при дозе от 25 до 200 мг два раза в сутки.

26. Фармацевтическая композиция для лечения субъекта, страдающего болезнью Гоше или болезнью Фабри, содержащая гемитартратную соль соединения, представленного следующей структурной формулой:



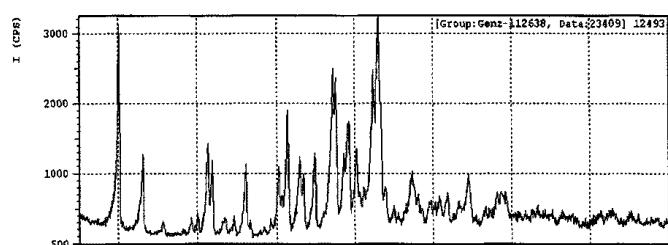
по меньшей мере один растворимый в воде наполнитель, по меньшей мере один нерастворимый в воде наполнитель, по меньшей мере одно связующее вещество и по меньшей мере одно смазывающее вещество.

27. Фармацевтическая композиция по п.26, отличающаяся тем, что гемитартратная соль представляет собой гемитартратную соль по любому из пп.1-4.

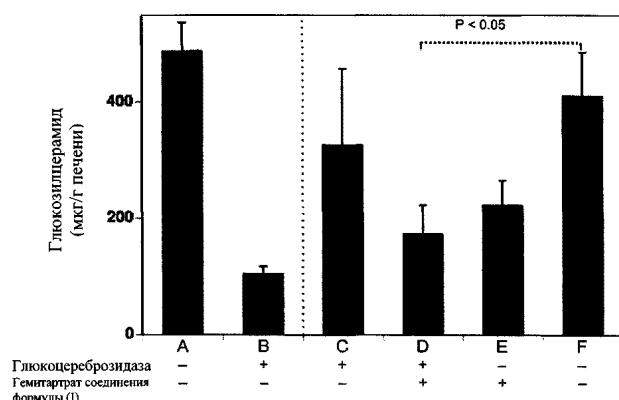
28. Фармацевтическая композиция по п.26, отличающаяся тем, что растворимый в воде наполнитель выбирают из группы, состоящей из безводной лактозы, моногидрата лактозы, маннитола, хлорида натрия, сахарной пудры, сорбитола, сахарозы, инозитола и прежелатинизированного крахмала; нерастворимый в воде наполнитель выбирают из группы, состоящей из микрокристаллической целлюлозы, фосфата кальция и крахмала; связующее вещество выбирают из группы, состоящей из прежелатинизированного крахмала, натрийкарбоксиметилцеллюлозы, гидроксипропилцеллюлозы, гидроксипропилметилцеллюлозы, поливинилпирролидона, сополивидона, желатина, натуральных камедей, крахмального клейстера, сахарозы, кукурузного сиропа, полиэтиленгликолей и альгината натрия; а смазывающее вещество выбирают из группы, состоящей из гидрогенезированного растительного масла, стеарата кальция и глицерилбегената.

29. Фармацевтическая композиция по п.28, отличающаяся тем, что композиция содержит от 14 до 18 мас.% нерастворимого в воде наполнителя в пересчете на сухое вещество.

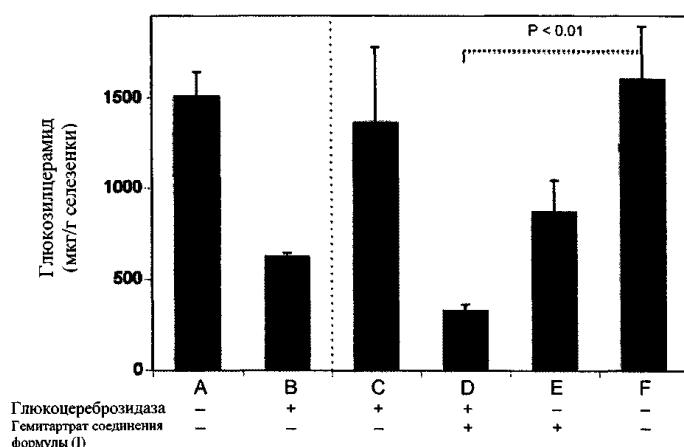
30. Фармацевтическая композиция по п.29, отличающаяся тем, что композиция содержит от 35 до 40 мас.% гемитартратной соли; от 26 до 50 мас.% моногидрата лактозы; от 8 до 32 мас.% микрокристаллической целлюлозы; от 2 до 6 мас.% гидроксипропилметилцеллюлозы; и от 0,1 до 2 мас.% глицерилбенгата, все в пересчете на сухое вещество.



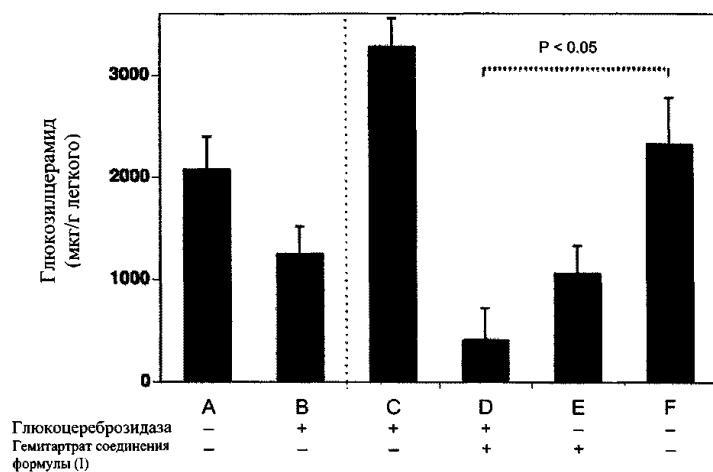
Фиг. 1



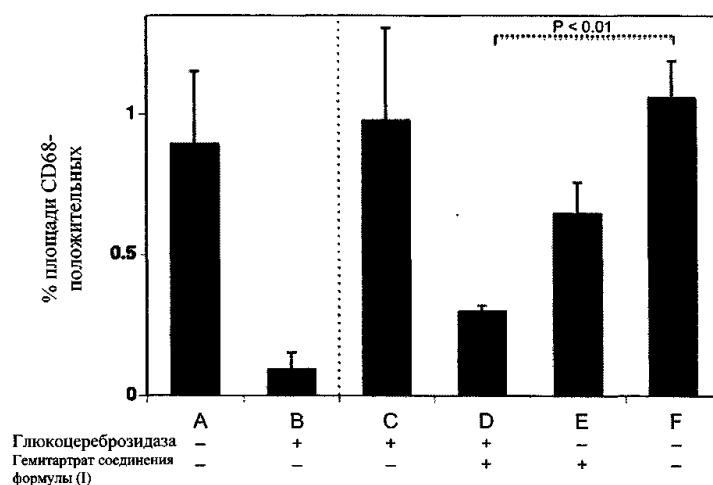
Фиг. 2



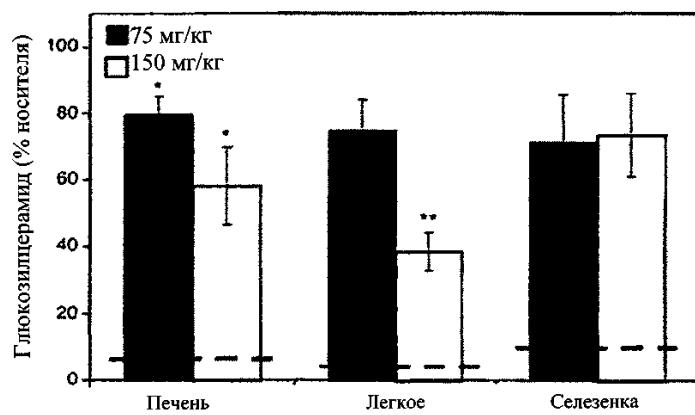
Фиг. 3



ФИГ. 4

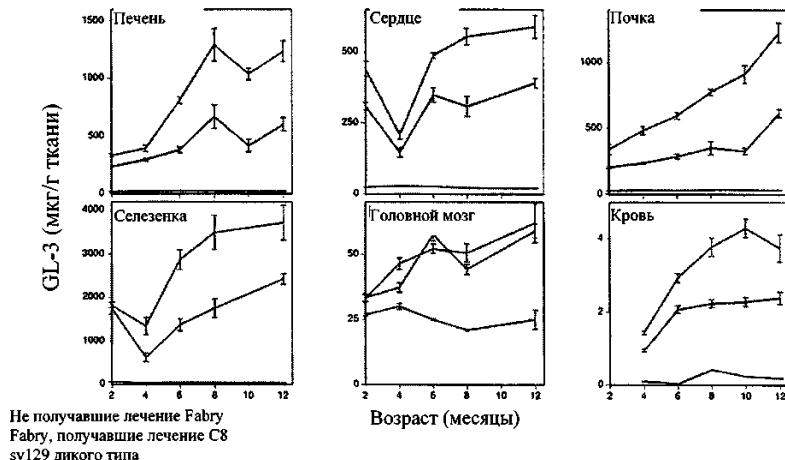


ФИГ. 5



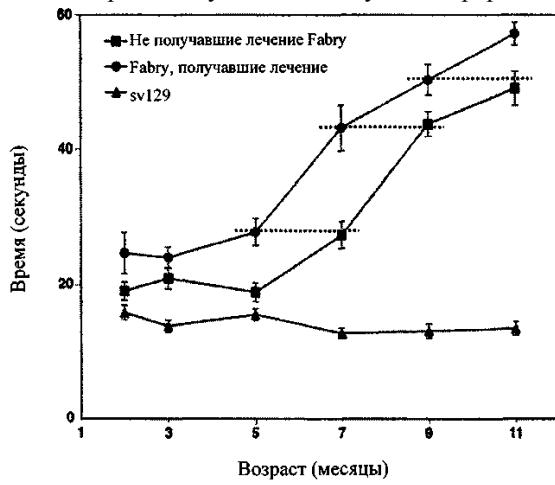
ФИГ. 6

Ингибирирование гемитартратом соединения формулы (I) степени накопления GL-3 у мышей Fabry



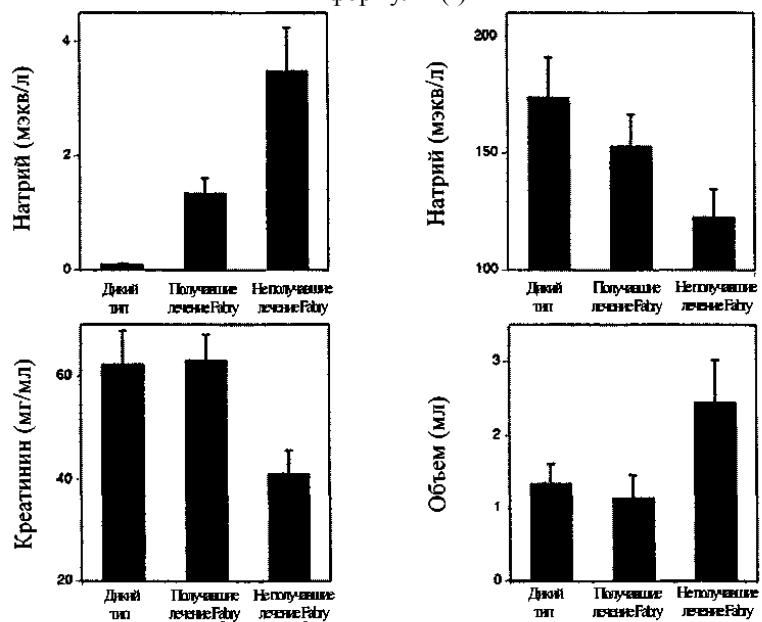
Фиг. 7

Задержка наступления и развития невропатии у мышей Fabry гемитартратом соединения формулы (I)



Фиг. 8

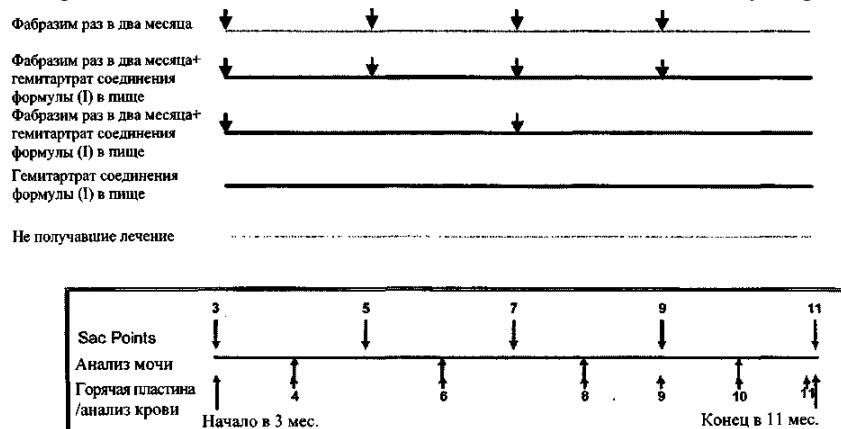
Увеличение некоторых маркеров функции печени при лечении мышей Fabry гемитартратом соединения формулы (I)



12-месячная временная точка

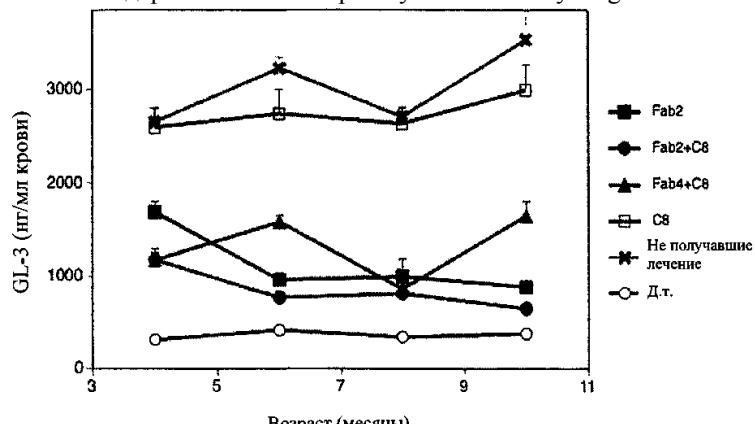
Фиг. 9

## Временная шкала для исследования ERT±SRT на мышах Fabry-Rag



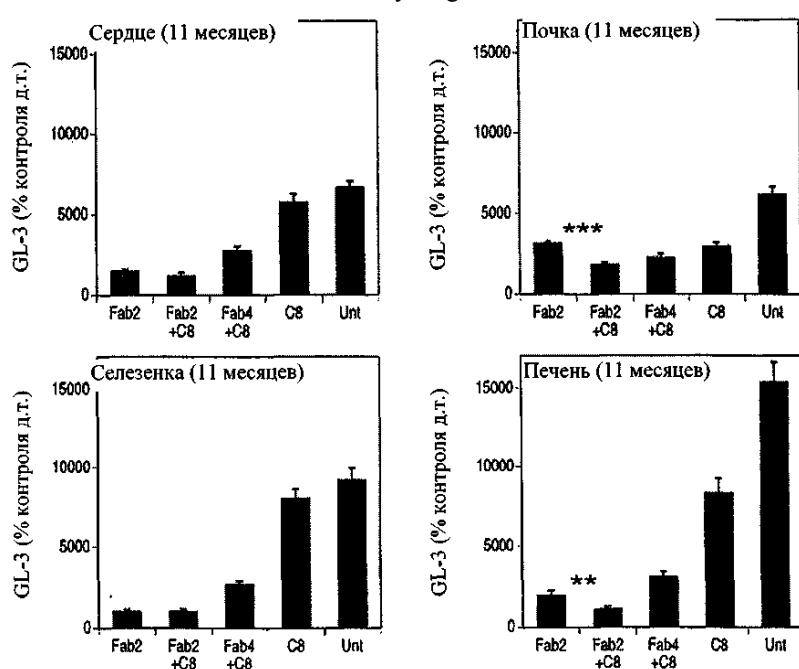
Фиг. 10

## Снижение содержания GL-3 в крови у мышей Fabry-Rag ERT без SRT



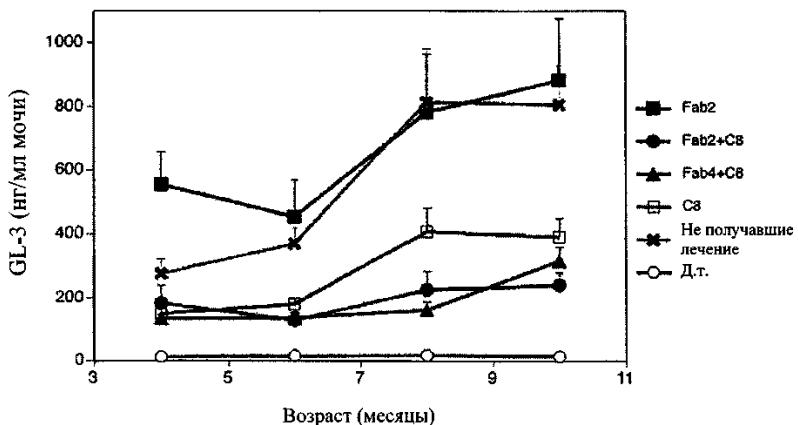
Фиг. 11

## Наибольшая эффективность комбинации ERT+SRT при снижении содержания GL-3 в печени и почках Fabry-Rag



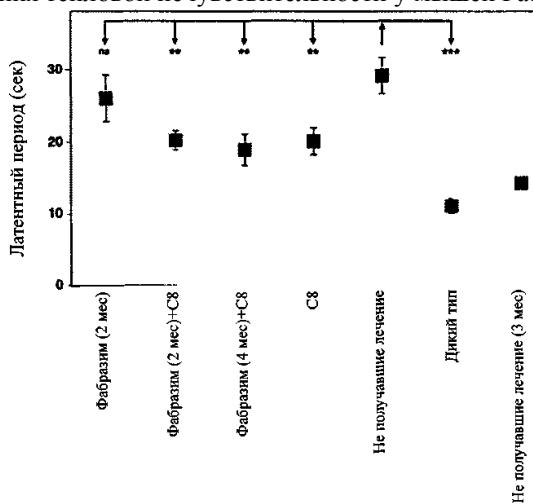
Фиг. 12

## Снижение содержания GL-3 в моче мышей Fabry-Rag SRT без ERT



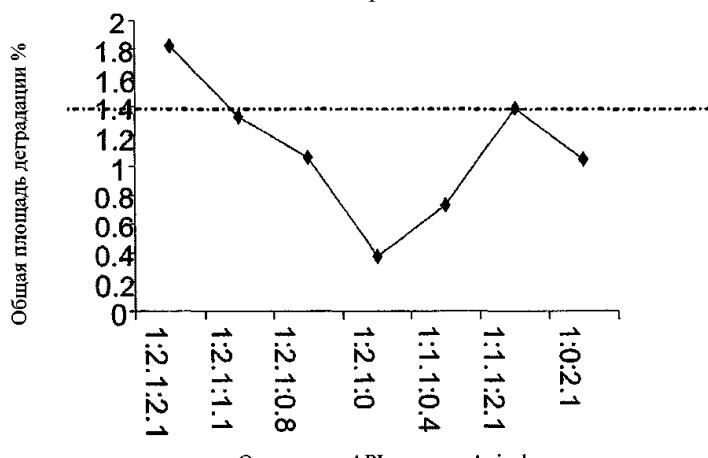
Фиг. 13

## Задержка наступления тепловой нечувствительности у мышей Fabry-Rag (11 месяцев)



Фиг. 14

## Общая деградация



Фиг. 15



Евразийская патентная организация, ЕАПО

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2