

TRADUZIONE DEL TESTO DEL BREVETTO EUROPEO N. 4062916

DAL TITOLO:

“TRATTAMENTO DI PAZIENTI AFFETTI DA MALATTIA DI FABRY
AVENTI DETERMINATE MUTAZIONI”

*** **

DESCRIZIONE

CAMPO TECNICO

I principi e le forme di realizzazione della presente invenzione riguardano generalmente migalastat o relativo sale per l'uso nel trattamento della malattia di Fabry, in particolare in pazienti con gradi variabili di compromissione renale.

STATO DELL'ARTE

Molte malattie umane derivano da mutazioni che causano cambiamenti nella sequenza amminoacidica di una proteina che riducono la sua stabilità e possono impedirle di ripiegarsi correttamente. Le proteine generalmente si ripiegano in una regione specifica della cellula nota come reticolo endoplasmatico, o RE. La cellula dispone di meccanismi di controllo di qualità che assicurano che le proteine vengano ripiegate nella loro forma tridimensionale corretta prima che possano spostarsi dal RE alla destinazione appropriata nella cellula, un processo generalmente indicato come trasferimento di proteine. Le proteine ripiegate incorrettamente vengono spesso eliminate dai meccanismi di controllo di qualità dopo essere state inizialmente trattenute nel RE. In alcuni casi, le proteine ripiegate incorrettamente

possono accumularsi nel RE prima di venire eliminate. Il trattenimento delle proteine ripiegate incorrettamente nel RE interrompe il loro corretto trasferimento, e la ridotta attività biologica risultante può portare a una funzione cellulare compromessa e infine a malattia. In aggiunta, l'accumulo di proteine ripiegate incorrettamente nel RE può portare a vari tipi di stress nelle cellule, i quali possono anch'essi contribuire alla disfunzione cellulare e alla malattia.

Tali mutazioni possono portare a disturbi da accumulo lisosomiale (LSD), che sono caratterizzati da carenze di enzimi lisosomiali dovute a mutazioni nei geni codificanti gli enzimi lisosomiali. La malattia risultante causa l'accumulo patologico di substrati di questi enzimi, che includono lipidi, carboidrati e polisaccaridi. Sebbene vi siano molti genotipi mutanti differenti associati a ciascun LSD, molte delle mutazioni sono mutazioni missenso che possono portare alla produzione di un enzima meno stabile. Questi enzimi meno stabili vengono talvolta degradati prematuramente dalla via di degradazione associata al RE. Questo determina la carenza dell'enzima nel lisosoma, e l'accumulo patologico di substrato. Tali enzimi mutanti sono talvolta indicati nell'arte pertinente come "mutanti di ripiegamento" o "mutanti conformazionali."

La malattia di Fabry è un LSD causato da una mutazione nel gene GLA, che codifica l'enzima α -galattosidasi A (α -Gal A). α -Gal A è richiesto per il metabolismo dei glicosfingolipidi. La mutazione causa l'accumulo del substrato globotriaosilceramide (GL-3) in vari tessuti e organi. I maschi con malattia di Fabry sono emizigoti poiché i geni di

malattia sono codificati sul cromosoma X. È stimato che la malattia di Fabry colpisca 1 su 40.000 e 60.000 maschi, e si verifichi con minor frequenza nelle femmine.

Vi sono stati vari approcci al trattamento della malattia di Fabry. Una terapia approvata per trattare la malattia di Fabry è la terapia enzimatica sostitutiva (ERT), che tipicamente implica l'infusione endovenosa di una forma purificata della proteina di tipo selvatico corrispondente. Sono attualmente disponibili due prodotti di α -Gal A per il trattamento della malattia di Fabry: agalsidasi alfa (Replagal[®], Shire Human Genetic Therapies) e agalsidasi beta (Fabrazyme[®]; Sanofi Genzyme Corporation). Tuttavia, la ERT presenta vari svantaggi. Una delle principali complicanze con la ERT è la rapida degradazione della proteina infusa, che porta alla necessità di numerose e costose infusioni a dose elevata. La ERT presenta vari inconvenienti aggiuntivi, come difficoltà nella generazione su larga scala, nella purificazione e nella conservazione della proteina ripiegata correttamente; l'ottenimento di proteina nativa glicosilata; la generazione di una risposta immunitaria anti-proteina; e l'incapacità della proteina di attraversare la barriera ematoencefalica per mitigare le patologie del sistema nervoso centrale (vale a dire, bassa biodisponibilità). In aggiunta, l'enzima sostitutivo non può penetrare nel cuore o nel rene in quantità sufficienti per ridurre l'accumulo di substrato nei podociti renali o nei miociti cardiaci, che rivestono un ruolo importante nella patologia di Fabry.

Un altro approccio al trattamento di alcune carenze enzimatiche

implica l'uso di inibitori a piccole molecole per ridurre la produzione del substrato naturale di proteine enzimatiche carenti, migliorando così la patologia. Questo approccio di "riduzione del substrato" è stato specificamente descritto per una classe di circa 40 LSD che includono i disturbi da accumulo di glicosfingolipidi. Gli inibitori a piccole molecole proposti per l'uso come terapia sono specifici per inibire gli enzimi implicati nella sintesi dei glicolipidi, riducendo la quantità di glicolipide cellulare che deve essere demolito dall'enzima carente.

Un terzo approccio al trattamento della malattia di Fabry è stato il trattamento con quelli che sono chiamati chaperoni farmacologici (Pharmacological Chaperones, PC). Tali PC includono inibitori a piccole molecole di α -Gal A, che possono legarsi all' α -Gal A per aumentare la stabilità sia dell'enzima mutante sia del tipo selvatico corrispondente.

La versione di maggio 2016 del riassunto delle caratteristiche del prodotto (RPC) di Galafold (migalastat) dell'Agenzia europea per i medicinali (EMA) elenca le mutazioni di *GLA* suscettibili al trattamento con Galafold. Queste mutazioni non includono le mutazioni della presente invenzione.

Un problema con i trattamenti attuali è la difficoltà nel trattare pazienti che presentano compromissione renale, che è molto comune nei pazienti affetti da malattia di Fabry e progredisce con la malattia. In media, ci vogliono tra circa 10 e 20 anni affinché i pazienti declinino da una funzione renale normale a una compromissione renale grave, alcuni paesi riportando declini anche più rapidi. Secondo alcune stime, circa il

10% dei pazienti affetti da malattia di Fabry riceventi ERT può presentare compromissione renale moderata. Un altro 25% di maschi e 5% di femmine riceventi ERT ha un tasso di filtrazione glomerulare stimato (eGFR) inferiore a 30, corrispondente a una compromissione renale grave o anche a insufficienza renale. Tra questi, circa metà presenta compromissione renale grave, e circa metà è in dialisi.

Sfortunatamente, la compromissione renale progredirà nonostante il trattamento con ERT. Un paziente avente un eGFR di 30 può deteriorare al punto da necessitare di dialisi in due-cinque anni. Circa il 30% di pazienti riceventi ERT finirà in dialisi o necessiterà di un trapianto di rene, a seconda dell'inizio della ERT. Quanto più precocemente viene iniziata la ERT, tanto più a lungo può essere conservata la funzione renale, ma l'inizio della ERT può essere ritardato poiché la malattia di Fabry è rara e spesso erroneamente diagnosticata.

Inoltre, e come discusso sopra, la ERT spesso non penetra sufficientemente nei reni per ridurre l'accumulo di substrato, consentendo così un ulteriore danno durante la progressione della malattia. Con il trattamento con PC, i reni sono spesso il modo in cui il farmaco viene eliminato dal corpo, e la compromissione renale può influenzare la farmacocinetica del farmaco e/o la farmacodinamica del farmaco. Pertanto, vi è ancora una necessità di un trattamento di pazienti affetti da malattia di Fabry che presentano compromissione renale.

SOMMARIO

La presente invenzione riguarda migalastat o relativo sale per

l'uso nel trattamento della malattia di Fabry in un paziente avente una proteina α -galattosidasi A comprendente una mutazione suscettibile al saggio HEK selezionata dal gruppo costituito da N34D, N34T, G35V, I133M, F145S, P146R, L167V, L180W, R196G, M208R, I219L, Q221P, N224T, I242T, Q250R, Q250H, G261S, G261C, I303F, K326N, F337S, E358Q e G375E. La presente invenzione è inoltre definita nelle rivendicazioni allegate.

I pazienti affetti da malattia di Fabry possono avere compromissione renale e/o proteinuria elevata. Tale trattamento può includere stabilizzare la funzione renale, ridurre l'indice di massa ventricolare sinistra (LVMI), ridurre la globotriaosilsfingosina (liso-Gb₃) plasmatica e/o aumentare l'attività di α -Gal A nel paziente.

In una o più forme di realizzazione, il paziente ha compromissione renale, il trattamento comprendendo somministrare al paziente una quantità efficace di migalastat o relativo sale a una frequenza a giorni alterni. In una o più forme di realizzazione, la quantità efficace è equivalente di base libero (FBE) da circa 100 mg a circa 150 mg.

In una o più forme di realizzazione, il paziente ha una compromissione renale lieve o moderata.

In una o più forme di realizzazione, il paziente ha una compromissione renale lieve.

In una o più forme di realizzazione, il paziente ha una compromissione renale moderata.

In una o più forme di realizzazione, il paziente ha una compromissione renale grave.

In una o più forme di realizzazione, il paziente è un paziente già sottoposto a ERT.

In una o più forme di realizzazione, il paziente è un paziente naïve a ERT.

In una o più forme di realizzazione, il paziente ha un livello di proteinuria inferiore a 100 mg/24 ore prima dell'inizio della somministrazione del migalastat o relativo sale.

In una o più forme di realizzazione, il paziente ha un livello di proteinuria da 100 a 1.000 mg/24 ore prima dell'inizio della somministrazione del migalastat o relativo sale.

In una o più forme di realizzazione, il paziente ha un livello di proteinuria superiore a 1.000 mg/24 ore prima dell'inizio della somministrazione del migalastat o relativo sale.

In una o più forme di realizzazione, il migalastat o relativo sale potenzia l'attività di α -Gal A nel paziente. In una o più forme di realizzazione, l'attività di α -Gal A è l'attività di α -Gal A nei globuli bianchi (WBC).

In una o più forme di realizzazione, la somministrazione del migalastat o relativo sale è efficace per ridurre LVMi nel paziente.

In una o più forme di realizzazione, la somministrazione del migalastat o relativo sale è efficace per stabilizzare liso-Gb₃ plasmatico nel paziente.

In una o più forme di realizzazione, la somministrazione del migalastat o relativo sale è efficace per stabilizzare la funzione renale nel paziente.

In una o più forme di realizzazione, la quantità efficace è FBE circa 123 mg.

In una o più forme di realizzazione, la quantità efficace è base libera di migalastat circa 123 mg.

In una o più forme di realizzazione, il sale di migalastat è migalastat cloridrato.

In una o più forme di realizzazione, la quantità efficace è migalastat cloridrato circa 150 mg.

In una o più forme di realizzazione, il migalastat o relativo sale è in una forma farmaceutica orale. In una o più forme di realizzazione, la forma farmaceutica orale comprende una compressa, una capsula o una soluzione.

In una o più forme di realizzazione, il migalastat o relativo sale è somministrato per almeno 28 giorni.

In una o più forme di realizzazione, il migalastat o relativo sale è somministrato per almeno 6 mesi.

In una o più forme di realizzazione, il migalastat o relativo sale è somministrato per almeno 12 mesi.

In varie forme di realizzazione, il trattamento stabilizza la funzione renale in un paziente con diagnosi di malattia di Fabry e avente compromissione renale. In varie forme di realizzazione, il trattamento

comprende somministrare al paziente da circa 100 mg a circa 150 mg di FBE di migalastat o di un relativo sale con una frequenza a giorni alterni.

In una o più forme di realizzazione, il paziente ha una compromissione renale lieve o moderata.

In una o più forme di realizzazione, il paziente ha una compromissione renale lieve.

In una o più forme di realizzazione, il paziente ha una compromissione renale moderata.

In una o più forme di realizzazione, il paziente ha una compromissione renale grave.

In una o più forme di realizzazione, il paziente è un paziente già sottoposto a ERT.

In una o più forme di realizzazione, il paziente è un paziente naïve a ERT.

In una o più forme di realizzazione, il paziente ha un livello di proteinuria inferiore a 100 mg/24 ore prima dell'inizio della somministrazione del migalastat o relativo sale.

In una o più forme di realizzazione, il paziente ha un livello di proteinuria da 100 a 1.000 mg/24 ore prima dell'inizio della somministrazione del migalastat o relativo sale.

In una o più forme di realizzazione, il paziente ha un livello di proteinuria superiore a 1.000 mg/24 ore prima dell'inizio della somministrazione del migalastat o relativo sale.

In una o più forme di realizzazione, il migalastat o relativo sale

potenzia l'attività di α -Gal A.

In una o più forme di realizzazione, la quantità efficace è FBE circa 123 mg.

In una o più forme di realizzazione, la quantità efficace è base libera di migalastat circa 123 mg.

In una o più forme di realizzazione, il sale di migalastat è migalastat cloridrato.

In una o più forme di realizzazione, la quantità efficace è migalastat cloridrato circa 150 mg.

In una o più forme di realizzazione, il migalastat o relativo sale è in una forma farmaceutica orale. In una o più forme di realizzazione, la forma farmaceutica orale comprende una compressa, una capsula o una soluzione.

In una o più forme di realizzazione, il migalastat o relativo sale è somministrato per almeno 28 giorni.

In una o più forme di realizzazione, il migalastat o relativo sale è somministrato per almeno 6 mesi.

In una o più forme di realizzazione, il migalastat o relativo sale è somministrato per almeno 12 mesi.

In una o più forme di realizzazione, la somministrazione della quantità efficace del migalastat o relativo sale a un gruppo di pazienti che hanno una compromissione renale lieve o moderata fornisce un tasso di cambiamento annualizzato medio di $eGFR_{CKD-EPI}$ superiore a $-1,0$ ml/min/1,73 m².

In una o più forme di realizzazione, la somministrazione della quantità efficace del migalastat o relativo sale a un gruppo di pazienti che hanno una compromissione renale lieve fornisce un tasso di cambiamento annualizzato medio di $eGFR_{CKD-EPI}$ superiore a $-1,0$ ml/min/1,73 m².

In una o più forme di realizzazione, la somministrazione della quantità efficace del migalastat o relativo sale a un gruppo di pazienti che hanno una compromissione renale moderata fornisce un tasso di cambiamento annualizzato medio di $eGFR_{CKD-EPI}$ superiore a $-1,0$ ml/min/1,73 m².

In varie forme di realizzazione, il trattamento stabilizza liso-Gb₃ plasmatica in un paziente con diagnosi di malattia di Fabry e avente compromissione renale. In varie forme di realizzazione, il trattamento comprende somministrare al paziente da circa 100 mg a circa 150 mg di FBE di migalastat o di un relativo sale con una frequenza a giorni alterni.

In una o più forme di realizzazione, il paziente ha una compromissione renale lieve o moderata.

In una o più forme di realizzazione, il paziente ha una compromissione renale lieve.

In una o più forme di realizzazione, il paziente ha una compromissione renale moderata.

In una o più forme di realizzazione, il paziente ha una compromissione renale grave.

In una o più forme di realizzazione, il paziente è un paziente già

sottoposto a ERT.

In una o più forme di realizzazione, il paziente è un paziente naïve a ERT.

In una o più forme di realizzazione, il paziente ha un livello di proteinuria inferiore a 100 mg/24 ore prima dell'inizio della somministrazione del migalastat o relativo sale.

In una o più forme di realizzazione, il paziente ha un livello di proteinuria da 100 a 1.000 mg/24 ore prima dell'inizio della somministrazione del migalastat o relativo sale.

In una o più forme di realizzazione, il paziente ha un livello di proteinuria superiore a 1.000 mg/24 ore prima dell'inizio della somministrazione del migalastat o relativo sale.

In una o più forme di realizzazione, il migalastat o relativo sale potenzia l'attività di α -Gal A.

In una o più forme di realizzazione, la quantità efficace è FBE circa 123 mg.

In una o più forme di realizzazione, la quantità efficace è base libera di migalastat circa 123 mg.

In una o più forme di realizzazione, il sale di migalastat è migalastat cloridrato.

In una o più forme di realizzazione, la quantità efficace è migalastat cloridrato circa 150 mg.

In una o più forme di realizzazione, il migalastat o relativo sale è in una forma farmaceutica orale. In una o più forme di realizzazione, la

forma farmaceutica orale comprende una compressa, una capsula o una soluzione.

In una o più forme di realizzazione, il migalastat o relativo sale è somministrato per almeno 28 giorni.

In una o più forme di realizzazione, il migalastat o relativo sale è somministrato per almeno 6 mesi.

In una o più forme di realizzazione, il migalastat o relativo sale è somministrato per almeno 12 mesi.

In una o più forme di realizzazione, la somministrazione della quantità efficace del migalastat o del relativo sale a un gruppo di pazienti naïve alla ERT aventi compromissione renale moderata fornisce una riduzione media di liso-Gb₃ plasmatica di almeno circa 5 nmol/l dopo 24 mesi dalla somministrazione del migalastat o del relativo sale.

In varie forme di realizzazione, il trattamento riduce LVMi in un paziente con diagnosi di malattia di Fabry e avente compromissione renale. In varie forme di realizzazione, il trattamento comprende somministrare al paziente da circa 100 mg a circa 150 mg di FBE di migalastat o di un relativo sale con una frequenza a giorni alterni.

In una o più forme di realizzazione, il paziente ha una compromissione renale lieve o moderata.

In una o più forme di realizzazione, il paziente ha una compromissione renale lieve.

In una o più forme di realizzazione, il paziente ha una compromissione renale moderata.

In una o più forme di realizzazione, il paziente ha una compromissione renale grave.

In una o più forme di realizzazione, il paziente è un paziente già sottoposto a ERT.

In una o più forme di realizzazione, il paziente è un paziente naïve a ERT.

In una o più forme di realizzazione, il paziente ha un livello di proteinuria inferiore a 100 mg/24 ore prima dell'inizio della somministrazione del migalastat o relativo sale.

In una o più forme di realizzazione, il paziente ha un livello di proteinuria da 100 a 1.000 mg/24 ore prima dell'inizio della somministrazione del migalastat o relativo sale.

In una o più forme di realizzazione, il paziente ha un livello di proteinuria superiore a 1.000 mg/24 ore prima dell'inizio della somministrazione del migalastat o relativo sale.

In una o più forme di realizzazione, il migalastat o relativo sale potenzia l'attività di α -Gal A.

In una o più forme di realizzazione, la quantità efficace è FBE circa 123 mg.

In una o più forme di realizzazione, la quantità efficace è base libera di migalastat circa 123 mg.

In una o più forme di realizzazione, il sale di migalastat è migalastat cloridrato.

In una o più forme di realizzazione, la quantità efficace è

migalastat cloridrato circa 150 mg.

In una o più forme di realizzazione, il migalastat o relativo sale è in una forma farmaceutica orale. In una o più forme di realizzazione, la forma farmaceutica orale comprende una compressa, una capsula o una soluzione.

In una o più forme di realizzazione, il migalastat o relativo sale è somministrato per almeno 28 giorni.

In una o più forme di realizzazione, il migalastat o relativo sale è somministrato per almeno 6 mesi.

In una o più forme di realizzazione, il migalastat o relativo sale è somministrato per almeno 12 mesi.

In una o più forme di realizzazione, la somministrazione della quantità efficace del migalastat o del relativo sale a un gruppo di pazienti naïve alla ERT aventi compromissione renale moderata fornisce una riduzione media di LVMi di almeno circa 2 g/m² dopo 24 mesi di somministrazione del migalastat o del relativo sale.

In una o più forme di realizzazione, la somministrazione della quantità efficace del migalastat o del relativo sale a un gruppo di pazienti già trattati con ERT aventi compromissione renale moderata fornisce una riduzione media di LVMi di almeno circa 2 g/m² dopo 18 mesi di somministrazione del migalastat o del relativo sale.

In varie forme di realizzazione, il trattamento aumenta l'attività di α -Gal A nei globuli bianchi in un paziente con diagnosi di malattia di Fabry e avente compromissione renale. In varie forme di realizzazione, il

trattamento comprende somministrare al paziente da circa 100 mg a circa 150 mg di FBE di migalastat o di un relativo sale con una frequenza a giorni alterni.

In una o più forme di realizzazione, il paziente ha una compromissione renale lieve o moderata.

In una o più forme di realizzazione, il paziente ha una compromissione renale lieve.

In una o più forme di realizzazione, il paziente ha una compromissione renale moderata.

In una o più forme di realizzazione, il paziente ha una compromissione renale grave.

In una o più forme di realizzazione, il paziente è un paziente già sottoposto a ERT.

In una o più forme di realizzazione, il paziente è un paziente naïve a ERT.

In una o più forme di realizzazione, il paziente ha un livello di proteinuria inferiore a 100 mg/24 ore prima dell'inizio della somministrazione del migalastat o relativo sale.

In una o più forme di realizzazione, il paziente ha un livello di proteinuria da 100 a 1.000 mg/24 ore prima dell'inizio della somministrazione del migalastat o relativo sale.

In una o più forme di realizzazione, il paziente ha un livello di proteinuria superiore a 1.000 mg/24 ore prima dell'inizio della somministrazione del migalastat o relativo sale.

In una o più forme di realizzazione, la quantità efficace è FBE circa 123 mg.

In una o più forme di realizzazione, la quantità efficace è base libera di migalastat circa 123 mg.

In una o più forme di realizzazione, il sale di migalastat è migalastat cloridrato.

In una o più forme di realizzazione, la quantità efficace è migalastat cloridrato circa 150 mg.

In una o più forme di realizzazione, il migalastat o relativo sale è in una forma farmaceutica orale. In una o più forme di realizzazione, la forma farmaceutica orale comprende una compressa, una capsula o una soluzione.

In una o più forme di realizzazione, il migalastat o relativo sale è somministrato per almeno 28 giorni.

In una o più forme di realizzazione, il migalastat o relativo sale è somministrato per almeno 6 mesi.

In una o più forme di realizzazione, il migalastat o relativo sale è somministrato per almeno 12 mesi.

In una o più forme di realizzazione, la somministrazione della quantità efficace del migalastat o del relativo sale a un gruppo di pazienti naïve alla ERT aventi compromissione renale moderata fornisce un aumento medio dell'attività di α -Gal A nei globuli bianchi di almeno circa 1 4 MU/ora/mg dopo 24 mesi dalla somministrazione del migalastat o del relativo sale.

In una o più forme di realizzazione, la somministrazione della quantità efficace del migalastat o del relativo sale a un gruppo di pazienti già trattati con ERT aventi compromissione renale moderata fornisce un aumento medio dell'attività di α -Gal A nei globuli bianchi di almeno circa 1 4 MU/ora/mg dopo 18 mesi dalla somministrazione del migalastat o del relativo sale.

In varie forme di realizzazione, il trattamento stabilizza la funzione renale in un paziente con diagnosi di malattia di Fabry e avente proteinuria elevata. In varie forme di realizzazione, il trattamento comprende somministrare al paziente da circa 100 mg a circa 150 mg di FBE di migalastat o di un relativo sale con una frequenza a giorni alterni.

In una o più forme di realizzazione, il paziente ha una compromissione renale lieve o moderata.

In una o più forme di realizzazione, il paziente ha una compromissione renale lieve.

In una o più forme di realizzazione, il paziente ha una compromissione renale moderata.

In una o più forme di realizzazione, il paziente ha una compromissione renale grave.

In una o più forme di realizzazione, il paziente è un paziente già sottoposto a ERT.

In una o più forme di realizzazione, il paziente è un paziente naïve a ERT.

In una o più forme di realizzazione, il paziente ha un livello di

proteinuria da 100 a 1.000 mg/24 ore prima dell'inizio della somministrazione del migalastat o relativo sale.

In una o più forme di realizzazione, il paziente ha un livello di proteinuria superiore a 1.000 mg/24 ore prima dell'inizio della somministrazione del migalastat o relativo sale.

In una o più forme di realizzazione, il migalastat o relativo sale potenzia l'attività di α -Gal A.

In una o più forme di realizzazione, la quantità efficace è FBE circa 123 mg.

In una o più forme di realizzazione, la quantità efficace è base libera di migalastat circa 123 mg.

In una o più forme di realizzazione, il sale di migalastat è migalastat cloridrato.

In una o più forme di realizzazione, la quantità efficace è migalastat cloridrato circa 150 mg.

In una o più forme di realizzazione, il migalastat o relativo sale è in una forma farmaceutica orale. In una o più forme di realizzazione, la forma farmaceutica orale comprende una compressa, una capsula o una soluzione.

In una o più forme di realizzazione, il migalastat o relativo sale è somministrato per almeno 28 giorni.

In una o più forme di realizzazione, il migalastat o relativo sale è somministrato per almeno 6 mesi.

In una o più forme di realizzazione, il migalastat o relativo sale è

somministrato per almeno 12 mesi.

In una o più forme di realizzazione, la somministrazione della quantità efficace del migalastat o del relativo sale a un gruppo di pazienti aventi un livello di proteinuria da 100 a 1.000 mg/24 ore prima di iniziare la somministrazione del migalastat o del relativo sale fornisce un tasso di cambiamento annualizzato medio di $eGFR_{CKD-EPI}$ superiore a $-2,0$ ml/min/1,73 m².

In una o più forme di realizzazione, la somministrazione della quantità efficace del migalastat o del relativo sale a un gruppo di pazienti aventi un livello di proteinuria superiore a 1.000 mg/24 ore prima dell'inizio della somministrazione del migalastat o del relativo sale fornisce un tasso di cambiamento annualizzato medio di $eGFR_{CKD-EPI}$ superiore a $-5,0$ ml/min/1,73 m².

In varie forme di realizzazione, il paziente ha proteinuria elevata, il trattamento comprendendo somministrare al paziente una quantità efficace di migalastat o relativo sale a una frequenza a giorni alterni. In una o più forme di realizzazione, la quantità efficace è FBE da circa 100 mg a circa 150 mg.

In una o più forme di realizzazione, il paziente ha una compromissione renale lieve o moderata.

In una o più forme di realizzazione, il paziente ha una compromissione renale lieve.

In una o più forme di realizzazione, il paziente ha una compromissione renale moderata.

In una o più forme di realizzazione, il paziente ha una compromissione renale grave.

In una o più forme di realizzazione, il paziente è un paziente già sottoposto a ERT.

In una o più forme di realizzazione, il paziente è un paziente naïve a ERT.

In una o più forme di realizzazione, il paziente ha un livello di proteinuria da 100 a 1.000 mg/24 ore prima dell'inizio della somministrazione del migalastat o relativo sale.

In una o più forme di realizzazione, il paziente ha un livello di proteinuria superiore a 1.000 mg/24 ore prima dell'inizio della somministrazione del migalastat o relativo sale.

In una o più forme di realizzazione, il migalastat o relativo sale potenzia l'attività di α -Gal A.

In una o più forme di realizzazione, la quantità efficace è FBE circa 123 mg.

In una o più forme di realizzazione, la quantità efficace è base libera di migalastat circa 123 mg.

In una o più forme di realizzazione, il sale di migalastat è migalastat cloridrato.

In una o più forme di realizzazione, la quantità efficace è migalastat cloridrato circa 150 mg.

In una o più forme di realizzazione, il migalastat o relativo sale è in una forma farmaceutica orale. In una o più forme di realizzazione, la

forma farmaceutica orale comprende una compressa, una capsula o una soluzione.

In una o più forme di realizzazione, il migalastat o relativo sale è somministrato per almeno 28 giorni.

In una o più forme di realizzazione, il migalastat o relativo sale è somministrato per almeno 6 mesi.

In una o più forme di realizzazione, il migalastat o relativo sale è somministrato per almeno 12 mesi.

In una o più forme di realizzazione, la somministrazione della quantità efficace del migalastat o del relativo sale a un gruppo di pazienti aventi un livello di proteinuria da 100 a 1.000 mg/24 ore prima di iniziare la somministrazione del migalastat o del relativo sale fornisce un tasso di cambiamento annualizzato medio di $eGFR_{CKD-EPI}$ superiore a $-2,0$ ml/min/1,73 m².

In una o più forme di realizzazione, la somministrazione della quantità efficace del migalastat o del relativo sale a un gruppo di pazienti aventi un livello di proteinuria superiore a 1.000 mg/24 ore prima dell'inizio della somministrazione del migalastat o del relativo sale fornisce un tasso di cambiamento annualizzato medio di $eGFR_{CKD-EPI}$ superiore a $-5,0$ ml/min/1,73 m².

Varie forme di realizzazione sono elencate di seguito. Resta inteso che le forme di realizzazione elencate di seguito possono essere combinate non solo come elencato di seguito, ma in altre combinazioni adatte secondo la portata dell'invenzione.

BREVE DESCRIZIONE DEI DISEGNI

La Figura 1A mostra le concentrazioni plasmatiche di migalastat per pazienti non affetti da malattia di Fabry con gradi variabili di compromissione renale in funzione di CL_{CR} ;

La Figura 1B mostra le concentrazioni plasmatiche di migalastat per pazienti non affetti da malattia di Fabry con gradi variabili di compromissione renale in funzione del tempo post-dose;

La Figura 1C mostra l'area sotto la curva (AUC) per pazienti non affetti da malattia di Fabry con gradi variabili di compromissione renale;

La Figura 2 mostra la concentrazione di migalastat in funzione del tempo per pazienti che presentano una compromissione renale da moderata a grave;

La Figura 3 mostra la correlazione tra $AUC_{0-\infty}$ e concentrazione di migalastat dopo 48 ore per pazienti non affetti da malattia di Fabry con gradi variabili di compromissione renale;

La Figura 4 mostra la concentrazione di migalastat plasmatico dopo 48 ore in funzione di $eGFR_{MDRD}$ per pazienti non affetti da malattia di Fabry con gradi variabili di compromissione renale e due pazienti affetti da malattia di Fabry con compromissione renale;

La Figura 5 mostra l' $AUC_{0-\infty}$ plasmatica per pazienti non affetti da malattia di Fabry con gradi variabili di compromissione renale e due pazienti affetti da malattia di Fabry con compromissione renale;

Le Figure 6A-D mostrano la concentrazione di migalastat mediana e osservata simulata rispetto al tempo per, rispettivamente,

soggetti normali, con compromissione renale grave, lieve e moderata;

Le Figure 7A-D mostrano, rispettivamente, C_{max} , AUC, C_{min} e C_{48} simulate per soggetti normali, con compromissione renale lieve, moderata e grave;

Le Figure 8A-D mostrano la predizione di stato stazionario per QOD per, rispettivamente, soggetti normali, con compromissione renale grave, lieve e moderata;

Le Figure 9A-D mostrano, rispettivamente, C_{max} , AUC, C_{min} e C_{48} per soggetti normali, con compromissione renale grave, lieve e moderata;

Le Figure 10A-B mostrano i disegni di studio per due studi che esaminavano l'uso di migalastat in pazienti affetti da malattia di Fabry;

La Figura 11 mostra il tasso di cambiamento annualizzato di $eGFR_{CKD-EPI}$ per pazienti affetti da malattia di Fabry in terapia con migalastat che presentano funzione renale normale e compromissione renale lieve e moderata;

Le Figure 12A-B mostrano il tasso di cambiamento annualizzato di, rispettivamente, $eGFR_{CKD-EPI}$ e $mGFR_{ioexolo}$ per pazienti affetti da malattia di Fabry in terapia con migalastat ed ERT che presentano funzione renale normale e compromissione renale;

La Figura 13 mostra il tasso di cambiamento annualizzato di $eGFR_{CKD-EPI}$ per pazienti affetti da malattia di Fabry in terapia con migalastat ed ERT che presentano funzione renale normale e compromissione renale lieve e moderata;

La Figura 14A-E mostrano la sequenza di DNA completa del gene GLA di tipo selvatico umano (SEQ ID NO: 1); e

La Figura 15 mostra la proteina GLA di tipo selvatico (SEQ ID NO: 2).

DESCRIZIONE DETTAGLIATA

Prima di descrivere svariate forme di realizzazione esemplificative dell'invenzione, resta inteso che l'invenzione non è limitata ai dettagli delle fasi di costruzione o di processo esposte nella seguente descrizione. L'invenzione è suscettibile di altre forme di realizzazione e di essere praticata o realizzata in vari modi.

È stato sorprendentemente scoperto che la terapia con migalastat stabilizza la funzione renale, riduce il LVMi, riduce liso-Gb₃ plasmatica e aumenta l'attività di α -Gal A nei globuli bianchi in pazienti affetti da malattia di Fabry con compromissione renale lieve e moderata. Di conseguenza, vari aspetti della presente invenzione riguardano particolari regimi di dosaggio di migalastat per pazienti affetti da malattia di Fabry che presentano compromissione renale. Migalastat è uno chaperone farmacologico usato nel trattamento della malattia di Fabry. Questo chaperone farmacologico viene solitamente eliminato dal corpo dai reni. Tuttavia, i pazienti che presentano compromissione renale (un problema comune per i pazienti affetti da malattia di Fabry) possono non essere in grado di eliminare il migalastat dal corpo, e precedentemente non era noto come i pazienti sia con malattia di Fabry sia con compromissione renale avrebbero risposto alla terapia con migalastat.

Poiché gli chaperoni farmacologici sono anche inibitori, è molto difficile bilanciare gli effetti potenzianti e inibenti l'enzima degli chaperoni farmacologici come migalastat. Inoltre, a causa delle complesse interazioni tra malattia di Fabry e funzione renale, e della mancanza di conoscenza sul ruolo di uno chaperone farmacologico, il dosaggio di migalastat per pazienti affetti da malattia di Fabry con compromissione renale è difficile da accertare senza dati clinici significativi e/o modellazione al computer.

Di conseguenza, aspetti della presente invenzione riguardano migalastat o relativo sale per uso nel trattamento di pazienti affetti da Fabry aventi compromissione renale e/o proteinuria elevata usando migalastat o un relativo sale, come stabilizzando la funzione renale, riducendo LVMi, riducendo la liso-Gb₃ plasmatica e/o aumentando l'attività di α -Gal A nel paziente.

In una o più forme di realizzazione, il trattamento comprende somministrare al paziente da circa 100 mg a circa 150 mg di FBE di migalastat o di un relativo sale con una frequenza a giorni alterni. Il paziente può avere compromissione renale lieve, moderata o grave. In una o più forme di realizzazione, il paziente ha una compromissione renale lieve o moderata. In forme di realizzazione specifiche, il paziente ha una compromissione renale lieve. In altre forme di realizzazione specifiche, il paziente ha una compromissione renale moderata.

Definizioni

I termini usati in questa descrizione hanno generalmente i loro

significati ordinari nell'arte, nel contesto di questa invenzione e nel contesto specifico in cui ciascun termine viene usato. Alcuni termini sono discussi di seguito, o altrove nella specifica, per fornire una guida aggiuntiva al medico.

Il termine "malattia di Fabry" si riferisce a un errore innato legato all'X del catabolismo dei glicosfingolipidi dovuto alla carenza di attività di α -Gal A lisosomiale. Questo difetto causa l'accumulo del substrato globotriaosilceramide ("GL-3", anche noto come Gb₃ o ceramide trisioside) e dei glicosfingolipidi correlati nei lisosomi endoteliali vascolari del cuore, dei reni, della cute e di altri tessuti. Un altro substrato dell'enzima è la globotriaosilsfingosina plasmatica ("liso-Gb₃ plasmatica").

Un "portatore" è una femmina che ha un cromosoma X con un gene α -Gal A difettoso e un cromosoma X con il gene normale e in cui l'inattivazione del cromosoma X dell'allele normale è presente in uno o più tipi di cellule. A un portatore viene spesso diagnosticata la malattia di Fabry.

Un "paziente" si riferisce a un soggetto a cui è stata diagnosticata o si sospetta che abbia una particolare malattia. Il paziente può essere umano o animale.

Un "paziente affetto da malattia di Fabry" si riferisce a un individuo a cui è stata diagnosticata o si sospetta che abbia la malattia di Fabry e che ha un α -Gal A mutato come definito ulteriormente di seguito. Marcatori caratteristici della malattia di Fabry possono verificarsi in

emizigoti maschi e femmine portatrici con la stessa prevalenza, sebbene le femmine siano tipicamente colpite meno gravemente.

Il termine "paziente naïve alla ERT" si riferisce a un paziente affetto da malattia di Fabry che non ha mai ricevuto una ERT o non ha ricevuto una ERT per almeno 6 mesi prima dell'inizio della terapia con migalastat.

Il termine "paziente già trattato con ERT" si riferisce a un paziente affetto da malattia di Fabry che stava ricevendo una ERT immediatamente prima dell'inizio della terapia con migalastat. In alcune forme di realizzazione, il paziente già trattato con ERT ha ricevuto almeno 12 mesi di ERT immediatamente prima dell'inizio della terapia con migalastat.

α -galattosidasi A (α -Gal A) umana si riferisce a un enzima codificato dal gene GLA umano. La sequenza di DNA completa di α -Gal A, inclusi introni ed esoni, è disponibile in GenBank, n. di accesso X14448.1, e mostrata nella SEQ ID NO: 1 e nelle Figure 14A-E. L'enzima α -Gal A umano è costituito da 429 amminoacidi ed è disponibile in GenBank, n. di accesso X14448.1 e U78027.1, e mostrato nella SEQ ID NO: 2 e nella Figura 15.

Il termine "proteina mutante" include una proteina che ha una mutazione nel gene codificante la proteina che determina l'incapacità della proteina di conseguire una conformazione stabile nelle condizioni normalmente presenti nel RE. Il mancato conseguimento di una conformazione stabile determina una quantità sostanziale dell'enzima

che viene degradato, anziché essere trasportato al lisosoma. Tale mutazione viene talvolta chiamata "mutante conformazionale". Tali mutazioni includono, in via non limitativa, mutazioni missenso e piccole delezioni e inserzioni in frame.

Come usato nella presente in una forma di realizzazione, il termine " α -Gal A mutante" include un α -Gal A che ha una mutazione nel gene codificante α -Gal A che determina l'incapacità dell'enzima di conseguire una conformazione stabile nelle condizioni normalmente presenti nel RE. Il mancato conseguimento di una conformazione stabile determina una quantità sostanziale dell'enzima che viene degradato, anziché essere trasportato al lisosoma.

Come usato nella presente, il termine "chaperone farmacologico specifico" ("SPC") o "chaperone farmacologico" ("PC") si riferisce a qualsiasi molecola, inclusi una piccola molecola, una proteina, un peptide, un acido nucleico, un carboidrato, eccetera, che si lega specificamente a una proteina e ha uno o più dei seguenti effetti: (i) potenzia la formazione di una conformazione molecolare stabile della proteina; (ii) induce il trasferimento della proteina dal RE a un'altra posizione cellulare, preferibilmente una posizione cellulare nativa, vale a dire, impedisce la degradazione associata al RE della proteina; (iii) impedisce l'aggregazione delle proteine ripiegate incorrettamente; e/o (iv) ripristina o potenzia una funzione e/o attività di tipo selvatico almeno parziale nella proteina. Un composto che si lega specificamente, per esempio, ad α -Gal A significa che si lega a ed esercita un effetto di

chaperone sull'enzima e non su un gruppo generico di enzimi correlati o non correlati. Più specificamente, questo termine non si riferisce a chaperoni endogeni, come BiP, o ad agenti non specifici che hanno dimostrato un'attività di chaperone non specifica contro varie proteine, come glicerolo, DMSO o acqua deuterata, vale a dire, chaperoni chimici. In una o più forme di realizzazione della presente invenzione, il PC può essere un inibitore competitivo reversibile.

Un "inibitore competitivo" di un enzima può riferirsi a un composto che assomiglia strutturalmente alla struttura chimica e alla geometria molecolare del substrato enzimatico per legare l'enzima approssimativamente nella stessa posizione del substrato. Pertanto, l'inibitore compete per lo stesso sito attivo della molecola di substrato, aumentando così la K_m . L'inibizione competitiva è solitamente reversibile se sono disponibili molecole di substrato sufficienti per dislocare l'inibitore, vale a dire, gli inibitori competitivi possono legarsi reversibilmente. Pertanto, la quantità di inibizione enzimatica dipende dalla concentrazione di inibitore, dalla concentrazione di substrato e dalle affinità relative dell'inibitore e del substrato per il sito attivo.

Come usato nella presente, il termine "si lega specificamente" si riferisce all'interazione di uno chaperone farmacologico con una proteina come α -Gal A, specificamente, un'interazione con i residui amminoacidici della proteina che partecipano direttamente all'entrata in contatto con lo chaperone farmacologico. Uno chaperone farmacologico lega specificamente una proteina bersaglio, per esempio, α -Gal A, per

esercitare un effetto di chaperone sulla proteina e non su un gruppo generico di proteine correlate o non correlate. I residui amminoacidici di una proteina che interagiscono con qualsiasi chaperone farmacologico dato possono essere o meno all'interno del "sito attivo" della proteina. Il legame specifico può essere valutato attraverso saggi di legame di routine o attraverso studi strutturali, per esempio, co-cristallizzazione, NMR e simili. Il sito attivo per α -Gal A è il sito legante il substrato.

"Attività di α -Gal A carente" si riferisce a un'attività di α -Gal A nelle cellule derivanti da un paziente che è inferiore all'intervallo normale rispetto (usando gli stessi metodi) all'attività in individui normali che non hanno o che non si sospetta abbiano la malattia di Fabry o qualsiasi altra malattia (specialmente una malattia ematica).

Come usati nella presente, i termini "potenziare l'attività di α -Gal A" o "aumentare l'attività di α -Gal A" si riferiscono all'aumento della quantità di α -Gal A che adotta una conformazione stabile in una cellula messa a contatto con uno chaperone farmacologico specifico per l' α -Gal A, rispetto alla quantità in una cellula (preferibilmente dello stesso tipo cellulare o la stessa cellula, per esempio, in un momento precedente) non messa a contatto con lo chaperone farmacologico specifico per l' α -Gal A. Questo termine si riferisce anche all'aumento del trasferimento di α -Gal A al lisosoma in una cellula messa a contatto con uno chaperone farmacologico specifico per l' α -Gal A, rispetto al trasferimento di α -Gal A non messo a contatto con lo chaperone farmacologico specifico per la proteina. Questi termini si riferiscono ad α -Gal A sia di tipo selvatico sia

mutante. In una forma di realizzazione, l'aumento della quantità di α -Gal A nella cellula viene misurato misurando l'idrolisi di un substrato artificiale in lisati derivanti da cellule che sono state trattate con il PC. Un aumento dell'idrolisi è indicativo di un'attività di α -Gal A aumentata.

Il termine "attività di α -Gal A" si riferisce alla funzione fisiologica normale di un α -Gal A di tipo selvatico in una cellula. Per esempio, l'attività di α -Gal A include l'idrolisi di GL-3.

Un "risponditore" è un individuo a cui è stato diagnosticato o si sospetta che abbia un disturbo da accumulo lisosomiale, come, per esempio, la malattia di Fabry, le cui cellule presentano, rispettivamente, un'attività di α -Gal A sufficientemente aumentata e/o un miglioramento dei sintomi o un potenziamento dei marcatori surrogati, in risposta al contatto con un PC. Esempi non limitanti di potenziamenti dei marcatori surrogati per la malattia di Fabry sono liso-Gb₃ e quelli descritti nella pubblicazione di domanda di brevetto U.S. n. US 2010/0113517.

Esempi non limitanti di miglioramenti dei marcatori surrogati per la malattia di Fabry divulgati in US 2010/0113517 includono aumenti dei livelli o dell'attività di α -Gal A nelle cellule (per esempio, fibroblasti) e nel tessuto; riduzioni dell'accumulo di GL-3; concentrazioni plasmatiche diminuite di omocisteina e molecola di adesione cellulare vascolare-1 (VCAM-1); accumulo di GL-3 diminuito all'interno delle cellule miocardiche e dei fibrociti valvolari; riduzione di liso-Gb₃ plasmatica; riduzione dell'ipertrofia cardiaca (specialmente del ventricolo sinistro), miglioramento dell'insufficienza valvolare e delle aritmie; miglioramento

della proteinuria; concentrazioni urinarie diminuite di lipidi come CTH, lattosilceramide, ceramide, e concentrazioni urinarie aumentate di glucosilceramide e sfingomieline; assenza di corpi di inclusione laminati (corpi zebrati) nelle cellule epiteliali glomerulari; miglioramenti della funzione renale; mitigazione dell'ipoidrosi; assenza di angiocheratomi; e miglioramenti delle anomalie dell'udito, come perdita dell'udito neurosensoriale ad alta frequenza, perdita progressiva dell'udito, sordità improvvisa o tinnito. I miglioramenti dei sintomi neurologici includono la prevenzione di un attacco ischemico transitorio (TIA) o di un ictus; e il miglioramento del dolore neuropatico che si manifesta come acroparestesia (bruciore o formicolio delle estremità). Un altro tipo di marcatore clinico che può essere valutato per la malattia di Fabry è la prevalenza di manifestazioni cardiovascolari deleterie. Segni e sintomi a correlazione cardiaca comuni della malattia di Fabry includono ipertrofia ventricolare sinistra, malattia valvolare (specialmente prolasso e/o rigurgito della valvola mitrale), malattia arteriosa coronarica prematura, angina, infarto del miocardio, anomalie della conduzione, aritmie, insufficienza cardiaca congestizia.

Come usati nella presente, l'espressione "stabilizzare la funzione renale" e termini simili, tra le altre cose, si riferiscono alla riduzione del declino della funzione renale e/o al ripristino della funzione renale. Poiché è atteso che i pazienti affetti da malattia di Fabry non trattati abbiano diminuzioni significative della funzione renale, i miglioramenti del tasso di deterioramento della funzione renale e/o i miglioramenti della funzione

renale dimostrano un beneficio della terapia con migalastat come descritta nella presente. In particolare, la stabilizzazione della funzione renale può manifestarsi in un paziente affetto da malattia di Fabry, indipendentemente dalla gravità della funzione renale e dal fatto che sia naïve o già trattato con ERT, migliorando la funzione renale o ritardando il tasso di deterioramento della funzione renale rispetto a un paziente analogo non trattato con una terapia della presente invenzione, per esempio, fino a $0,2 \text{ ml/min/1,73 m}^2$ per una particolare popolazione di pazienti. Un vantaggio del metodo di trattamento divulgato nella presente rispetto al non trattamento (nessuno chaperone o trattamento con ERT) o al trattamento con ERT è che i pazienti affetti da malattia di Fabry trattati con la presente invenzione presentano un declino minore o assente della loro funzione renale. Per esempio, con il trattamento con ERT possono essere inizialmente osservati miglioramenti, ma la funzione renale dei pazienti trattati con ERT subisce un declino repentino dopo i primi due o tre anni della terapia, simile al grado di declino osservato prima del trattamento con ERT. Al contrario, la terapia descritta nella presente elimina GL-3 lisosomiale in modo più efficiente ed è stato mostrato che elicitava un miglioramento in pazienti (per esempio, vedere l'esempio 5) in cui non si attendeva un miglioramento, per esempio, in un paziente già trattato con ERT. È atteso che i dati clinici finora ottenuti usando la terapia descritta nella presente forniscano miglioramenti continuativi degli esiti per il paziente anche dopo due anni post-trattamento. Pertanto, in alcune forme di realizzazione, un paziente

trattato con la terapia descritta nella presente continua a stabilizzare la funzione renale per più di due anni dopo il trattamento (per esempio, migliorando un tasso di filtrazione glomerulare (GFR) o ritardando il tasso di declino di un GFR nel paziente).

"Compromissione renale" si riferisce a un paziente avente un GFR inferiore a $90 \text{ ml/min/1,73 m}^2$. Due delle equazioni più comunemente usate per calcolare un tasso di filtrazione glomerulare stimato (eGFR) dalla creatinina sierica sono l'equazione della Collaborazione epidemiologica per la malattia renale cronica (Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration, CKD-EPI) e la modifica della dieta nella malattia renale (Modification of Diet in Renal Disease, MDRD), che sono indicate, rispettivamente, come $eGFR_{\text{CKD-EPI}}$ ed $eGFR_{\text{MDRD}}$. La gravità della malattia renale cronica è stata definita in sei stadi:

- a. (Stadio 0) Funzione renale normale - GFR sopra $90 \text{ ml/min/1,73 m}^2$ e nessuna proteinuria;
- b. (Stadio 1) - GFR sopra $90 \text{ ml/min/1,73 m}^2$ con evidenza di danno renale;
- c. (Stadio 2) (lieve) - GFR da 60 a $89 \text{ ml/min/1,73 m}^2$ con evidenza di danno renale;
- d. (Stadio 3) (moderata) - GFR da 30 a $59 \text{ ml/min/1,73 m}^2$;
- e. (Stadio 4) (grave) - GFR da 15 a $29 \text{ ml/min/1,73 m}^2$;
- f. (Stadio 5) insufficienza renale - GFR inferiore a $15 \text{ ml/min/1,73 m}^2$.

"Proteinuria elevata" si riferisce a livelli proteici urinari che sono sopra l'intervallo normale. L'intervallo normale per la proteina urinaria è 0-150 mg al giorno, quindi una proteinuria elevata corrisponde a livelli proteici urinari di circa 150 mg al giorno.

Come usati nella presente, l'espressione "stabilizzare liso-Gb₃ plasmatica" e termini simili si riferiscono alla riduzione dell'aumento di liso-Gb₃ plasmatica e/o alla riduzione di liso-Gb₃ plasmatica. Poiché è atteso che i pazienti affetti da malattia di Fabry non trattati abbiano aumenti significativi di liso-Gb₃ plasmatica, i miglioramenti del tasso di accumulo di liso-Gb₃ plasmatica e/o i miglioramenti di liso-Gb₃ plasmatica dimostrano un beneficio della terapia con migalastat come descritta nella presente.

La dose che consegue una o più delle risposte summenzionate è una "dose terapeuticamente efficace".

L'espressione "farmaceuticamente accettabile" si riferisce a entità e composizioni molecolari che sono fisiologicamente tollerabili e tipicamente non producono reazioni impreviste quando somministrate a un essere umano. In alcune forme di realizzazione, come usato qui, il termine "farmaceuticamente accettabile" significa approvato da un ente di regolamentazione federale o governativo o riportato nella farmacopea statunitense o in altra farmacopea generalmente riconosciuta per l'uso negli animali e più in particolare negli esseri umani. Il termine "veicolante" in riferimento a un veicolante farmaceutico si riferisce a un diluente, adiuvante, eccipiente o veicolo con cui viene somministrato il composto.

Tali trasportatori farmaceutici possono essere liquidi sterili, come acqua e oli. Come veicolanti vengono preferibilmente impiegate soluzioni fisiologiche in acqua o in soluzione acquosa e soluzione acquose di destrosio e glicerolo, in particolare per soluzioni iniettabili. I veicolanti farmaceutici idonei sono descritti in "Remington's Pharmaceutical Sciences" di E. W. Martin, 18a edizione, o altre edizioni.

Il termine "terapia enzimatica sostitutiva" o "ERT" si riferisce all'introduzione di un enzima purificato non nativo in un individuo avente una carenza di tale enzima. La proteina somministrata può essere ottenuta da fonti naturali o mediante espressione ricombinante (come descritto in maggiore dettaglio di seguito). Il termine si riferisce anche all'introduzione di un enzima purificato in un individuo che diversamente richiede o beneficia della somministrazione di un enzima purificato, per esempio, affetto da insufficienza enzimatica. L'enzima introdotto può essere un enzima ricombinante purificato prodotto *in vitro*, oppure una proteina purificata da tessuto o fluido isolato, come, per esempio, placenta o latte animale, o da piante.

Come usato nella presente, il termine "isolato" indica che il materiale citato è rimosso dall'ambiente nel quale si trova normalmente. Pertanto, un materiale biologico isolato può essere privo di componenti cellulari, vale a dire, componenti delle cellule in cui si trova o viene prodotto il materiale. Nel caso di molecole di acido nucleico, un acido nucleico isolato include un prodotto di PCR, una banda di mRNA su un gel, un cDNA o un frammento di restrizione. In un'altra forma di

realizzazione, un acido nucleico isolato è preferibilmente rimosso dal cromosoma nel quale può trovarsi, e più preferibilmente non è più unito a regioni non regolatorie e non codificanti, ad altri geni, collocate a monte o a valle del gene contenuto dalla molecola di acido nucleico isolato quando si trova nel cromosoma. In ancora un'altra forma di realizzazione, l'acido nucleico isolato manca di uno o più introni. Gli acidi nucleici isolati includono sequenze inserite in plasmidi, cosmidi, cromosomi artificiali e simili. Pertanto, in una forma di realizzazione specifica, un acido nucleico ricombinante è un acido nucleico isolato. Una proteina isolata può essere associata ad altre proteine o acidi nucleici, o a entrambi, a cui si associa nella cellula, oppure a membrane cellulari se si tratta di una proteina associata alla membrana. Un organello, una cellula o un tessuto isolati vengono rimossi dal sito anatomico in cui si trovano in un organismo. Un materiale isolato può essere, ma non necessariamente, purificato.

I termini "circa" e "approssimativamente" indicano generalmente un grado accettabile di errore per la quantità misurata data la natura o la precisione delle misurazioni. Gradi esemplificativi tipici di errore sono entro il 20 per cento (%), preferibilmente entro il 10%, e più preferibilmente entro il 5%, di un valore o intervallo di valori dato. In alternativa, e in particolare nei sistemi biologici, i termini "circa" e "approssimativamente" possono indicare valori che sono entro un ordine di grandezza, preferibilmente entro 10 o 5 volte, e più preferibilmente entro 2 volte, un valore dato. Le quantità numeriche date nella presente sono approssimative se non diversamente indicato, il che significa che il

termine "circa" o "approssimativamente" può essere inferito quando non espressamente indicato.

Come usato nella presente, il termine "equivalente di base libera" o "FBE" si riferisce alla quantità di migalastat presente nel migalastat o nel relativo sale. In altre parole, il termine "FBE" indica una quantità di base libera di migalastat o la quantità equivalente di base libera di migalastat che viene fornita da un sale di migalastat. Per esempio, a causa del peso del sale cloridrato, 150 mg di migalastat cloridrato forniscono soltanto una quantità di migalastat pari a 123 mg della forma di base libera di migalastat. È atteso che altri sali abbiano fattori di conversione differenti, a seconda del peso molecolare del sale.

Il termine "migalastat" comprende la base libera di migalastat o un relativo sale farmaceuticamente accettabile (per esempio, migalastat HCl), se non specificamente indicato in senso contrario.

Malattia di Fabry

La malattia di Fabry è un disturbo da accumulo lisosomiale legato all'X raro, progressivo e devastante. Mutazioni nel gene GLA determinano una carenza dell'enzima lisosomiale, α -Gal A, che è richiesto per il metabolismo dei glicosfingolipidi. A partire dai primi anni di vita, la riduzione dell'attività di α -Gal A determina un accumulo di glicosfingolipidi, inclusi GL-3 e liso-Gb₃ plasmatica, e porta ai sintomi e alle sequele limitanti per la vita della malattia di Fabry, inclusi dolore, sintomi gastrointestinali, insufficienza renale, cardiomiopatia, eventi cerebrovascolari e mortalità precoce. Un inizio precoce della terapia e un

trattamento permanente forniscono un'opportunità di rallentare la progressione della malattia e di prolungare l'aspettativa di vita.

La malattia di Fabry comprende uno spettro di gravità della malattia e di età di esordio, sebbene sia stata tradizionalmente suddivisa in 2 fenotipi principali, "classico" e "a esordio tardivo". Il fenotipo classico è stato ascritto principalmente ai maschi con attività di α -Gal A da non rilevabile a bassa ed esordio precoce di manifestazioni renali, cardiache e/o cerebrovascolari. Il fenotipo a esordio tardivo è stato ascritto principalmente ai maschi con attività di α -Gal A residua superiore ed esordio tardivo di queste manifestazioni di malattia. Le femmine portatrici eterozigoti tipicamente esprimono il fenotipo a esordio tardivo ma, a seconda del pattern di inattivazione del cromosoma X, possono anche mostrare il fenotipo classico.

Sono state identificate più di 800 mutazioni di GLA che causano la malattia di Fabry. Approssimativamente il 60% sono mutazione missenso, determinando sostituzioni di singoli amminoacidi nell'enzima α -Gal A. Le mutazioni di GLA missenso spesso determinano la produzione di forme ripiegate in modo anomalo e instabili di α -Gal A e la maggior parte è associata al fenotipo classico. I normali meccanismi cellulari di controllo di qualità nel reticolo endoplasmatico bloccano il transito di queste proteine anomale ai lisosomi e ne fanno il bersaglio di una degradazione ed eliminazione prematura. Molte forme mutanti missenso sono bersagli per migalastat, uno chaperone farmacologico specifico per α -Gal A.

Le manifestazioni cliniche della malattia di Fabry coprono un ampio spettro di gravità e sono approssimativamente correlate ai livelli di α -GAL residui di un paziente. La maggior parte dei pazienti attualmente trattati sono indicati come pazienti affetti da malattia di Fabry classica, la maggioranza dei quali sono maschi. Questi pazienti sono affetti da malattia di vari organi, inclusi i reni, il cuore e il cervello, con sintomi di malattia che compaiono dapprima nell'adolescenza e tipicamente progrediscono in gravità fino alla morte nel quarto o quinto decennio di vita. Numerosi studi recenti suggeriscono che vi è un gran numero di maschi e femmine non diagnosticati che presentano una serie di sintomi di malattia di Fabry, come funzione cardiaca o renale compromessa e ictus, che solitamente compaiono per la prima volta in età adulta. Gli individui con questo tipo di malattia di Fabry, indicata come malattia di Fabry a esordio tardivo, tendono ad avere livelli di α -GAL residui superiori rispetto ai pazienti affetti da malattia di Fabry classica. Gli individui con malattia di Fabry a esordio tardivo tipicamente risentono dei sintomi di malattia per la prima volta in età adulta, e spesso presentano sintomi di malattia concentrati su un singolo organo, come l'ingrossamento del ventricolo sinistro o un'insufficienza renale progressiva. In aggiunta, la malattia di Fabry a esordio tardivo può anche presentarsi sotto forma di ictus di causa sconosciuta.

I pazienti affetti da malattia di Fabry presentano una compromissione renale progressiva, e i pazienti non trattati mostrano una compromissione renale allo stadio finale entro il quinto decennio di vita.

La carenza di attività di α -Gal A porta all'accumulo di GL-3 e dei glicosfingolipidi correlati in molti tipi cellulari, incluse le cellule nel rene. GL-3 si accumula nei podociti, nelle cellule epiteliali e nelle cellule tubulari del tubulo distale e dell'ansa di Henle. La compromissione della funzione renale può manifestarsi come proteinuria e tasso di filtrazione glomerulare ridotto.

Poiché la malattia di Fabry può causare un peggioramento progressivo della funzione renale, è importante comprendere la farmacocinetica (PK) dei potenziali agenti terapeutici negli individui con compromissione renale e in particolare per gli agenti terapeutici che vengono prevalentemente eliminati mediante escrezione renale. La compromissione della funzione renale può portare all'accumulo dell'agente terapeutico a livelli che diventano tossici.

Poiché la malattia di Fabry è rara, implica più organi, ha un ampio intervallo di età di esordio ed è eterogenea, una diagnosi corretta rappresenta una difficoltà. Tra gli operatori sanitari la consapevolezza è bassa e le diagnosi errate sono frequenti. La diagnosi di malattia di Fabry è più spesso confermata sulla base di un'attività di α -Gal A diminuita nel plasma o nei leucociti periferici (WBC), una volta che un paziente è sintomatico, unitamente a un'analisi mutazionale. Nelle femmine, la diagnosi è ancor più difficoltosa dato che l'identificazione enzimatica delle femmine portatrici è meno affidabile a causa dell'inattivazione casuale del cromosoma X in alcune cellule delle portatrici. Per esempio, alcune portatrici obbligate (figlie di maschi colpiti da malattia classica)

hanno attività dell'enzima α -Gal A che variano da attività normali a molto basse. Dato che i portatori possono avere un'attività dell'enzima α -Gal A normale nei leucociti, soltanto l'identificazione di una mutazione di α -Gal A mediante test genetici fornisce un'identificazione e/o una diagnosi precise del portatore.

Le forme mutanti di α -galattosidasi A considerate suscettibili a migalastat sono definite come mostranti un aumento relativo (migalastat +10 μ M) di $\geq 1,20$ volte e un aumento assoluto (migalastat +10 μ M) di $\geq 3,0\%$ rispetto al tipo selvatico quando la forma mutante di α -galattosidasi A è espressa in cellule HEK-293 (indicato come "saggio HEK") secondo un saggio *in vitro* validato dalle buone pratiche di laboratorio (Good Laboratory Practice, GLP) (GLP HEK o saggio di suscettibilità a migalastat). Tali mutazioni sono anche indicate nella presente come mutazioni "suscettibili al saggio HEK".

Sono stati forniti precedenti metodi di screening che valutano il potenziamento enzimatico prima dell'inizio del trattamento. Per esempio, è stato utilizzato in studi clinici un saggio che usa cellule HEK-293 per predire se una data mutazione sarà responsiva al trattamento con chaperone farmacologico (per esempio, migalastat). In questo saggio vengono creati costrutti di cDNA. Le corrispondenti forme mutanti di α -Gal A sono espresse in modo transiente nelle cellule HEK-293. Le cellule vengono successivamente incubate \pm migalastat (da 17 nM a 1 mM) per 4-5 giorni. Successivamente, i livelli di α -Gal A vengono misurati nei lisati cellulari usando un substrato fluorogenico sintetico (4-MU- α -Gal) o

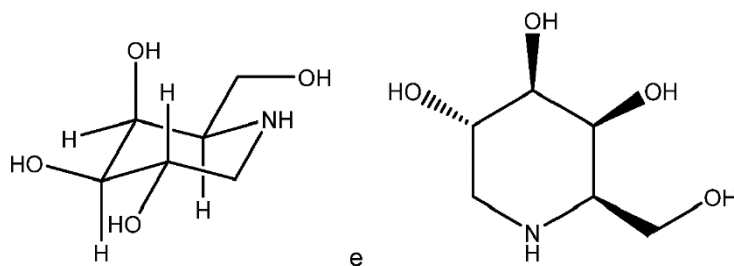
mediante western blot. Questo è stato fatto per note mutazioni missenso che causano malattia o con piccole inserzioni/delezioni in frame. Le mutazioni che sono state precedentemente identificate come responsive a un PC (per esempio migalastat) usando questi metodi sono elencate nel brevetto U.S. n. 8,592,362.

Chaperoni farmacologici

Il legame degli inibitori a piccole molecole di enzimi associati a LSD può aumentare la stabilità sia dell'enzima mutante sia dell'enzima di tipo selvatico corrispondente (vedere i brevetti U.S. n. 6,274,597; 6,583,158; 6,589,964; 6,599,919; 6,916,829 e 7,141,582). In particolare, la somministrazione di derivati a piccole molecole di glucosio e galattosio, che sono inibitori competitivi selettivi specifici per vari enzimi lisosomiali bersaglio, aumentava efficacemente la stabilità degli enzimi nelle cellule *in vitro* e, pertanto, aumentava il trasferimento degli enzimi al lisosoma. Pertanto, aumentando la quantità di enzima nel lisosoma, è atteso che l'idrolisi dei substrati enzimatici aumenti. La teoria originaria dietro a questa strategia era la seguente: dato che la proteina dell'enzima mutante è instabile nel RE (Ishii et al., Biochem. Biophys. Res. Comm. 1996; 220: 812-815), la proteina enzimatica è ritardata nella normale via di trasporto (RE→apparato di Golgi→endosomi→lisosoma) e prematuramente degradata. Pertanto, un composto che si lega a e aumenta la stabilità di un enzima mutante può fungere da "chaperone" per l'enzima e aumentare la quantità che può uscire dal RE e spostarsi ai lisosomi. In aggiunta, poiché il ripiegamento e il trasferimento di alcune

proteine di tipo selvatico sono incompleti, con fino al 70% di alcune proteine di tipo selvatico che vengono degradate in alcuni casi prima di raggiungere la loro posizione cellulare finale, gli chaperoni possono essere usati per stabilizzare enzimi di tipo selvatico e aumentare la quantità di enzima che può uscire dal RE ed essere trasferita ai lisosomi.

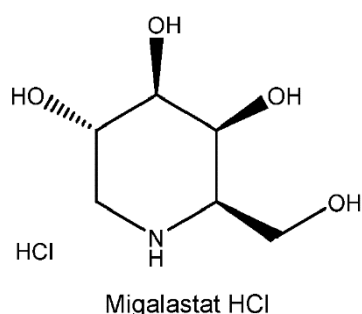
Lo chaperone farmacologico della presente invenzione è migalastat o un relativo sale. Il composto migalastat, anche noto come 1-deossigalattonojirimicina (1-DGJ) o (2R,3S,4R,5S)-2-(idrossimetil)piperidin-3,4,5-triolo, è un composto avente la seguente formula chimica:



base libera di Migalastat

Come discusso nella presente, nella presente invenzione possono anche essere usati sali farmaceuticamente accettabili di migalastat. Quando viene usato un sale di migalastat, il dosaggio del sale sarà regolato in modo che la dose di migalastat ricevuta dal paziente sia equivalente alla quantità che sarebbe stata ricevuta se fosse stata usata la base libera di migalastat. Un esempio di un sale farmaceuticamente accettabile di migalastat è migalastat HCl:

B



Migalastat è un imminozucchero a basso peso molecolare ed è un analogo del galattosio terminale di GL-3. Studi farmacologici *in vitro* e *in vivo* hanno dimostrato che migalastat agisce come uno chaperone farmacologico, che si lega selettivamente e reversibilmente, con elevata affinità, al sito attivo di α -Gal A di tipo selvatico e a forme mutanti specifiche di α -Gal A, i cui genotipi sono indicati come mutazioni suscettibili al saggio HEK. Il legame a migalastat stabilizza queste forme mutanti di α -Gal A nel reticolo endoplasmatico facilitando il loro trasferimento corretto ai lisosomi, laddove la dissociazione di migalastat consente ad α -Gal A di ridurre il livello di GL-3 e di altri substrati. Approssimativamente il 30-50% dei pazienti affetti da malattia di Fabry ha mutazioni suscettibili al saggio HEK; la maggior parte delle quali è associata al fenotipo classico della malattia. Un elenco di mutazioni suscettibili al saggio HEK include almeno le mutazioni elencate nella Tabella 1 di seguito. In una o più forme di realizzazione, se è presente una doppia mutazione sullo stesso cromosoma (maschi e femmine), quel paziente è considerato suscettibile al saggio HEK se la doppia mutazione è presente in una voce nella Tabella 1 (per esempio, D55V/Q57L). In alcune forme di realizzazione, se è presente una doppia mutazione su cromosomi differenti (soltanto nelle femmine) quel paziente è

considerato suscettibile al saggio HEK se una delle singole mutazioni è presente nella Tabella 1. In aggiunta alla Tabella 1 di seguito, le mutazioni suscettibili al saggio HEK si possono anche trovare nel riassunto delle caratteristiche del prodotto e/o nelle informazioni di prescrizione per GALAFOLD™ in vari paesi in cui GALAFOLD™ è approvato per l'uso, o sul sito web www.galafoldamenabilitytable.com.

Tabella 1

Cambiamento di nucleotide	Cambiamento di nucleotide	Cambiamento di sequenza proteica
c.7C>G	c.C7G	L3V
c.8T>C	c.T8C	L3P
c.[11G>T; 620A>C]	c.G11T/A620C	R4M/Y207S
c.37G>A	c.G37A	A13T
c.37G>C	c.G37C	A13P
c.43G>A	c.G43A	A15T
c.44C>G	c.C44G	A15G
c.53T>G	c.T53G	F18C
c.58G>C	c.G58C	A20P
c.59C>A	c.C59A	A20D
c.70T>C o c.70T>A	c.T70C o c.T70A	W24R
c.70T>G	c.T70G	W24G
c.72G>C o c.72G>T	c.G72C o c.G72T	W24C
c.95T>C	c.T95C	L32P
c.97G>T	c.G97T	D33Y

B

c.98A>G	c.A98G	D33G
c.100A>G	c.A100G	N34D
c.101A>C	c.A101C	N34T
c.101A>G	c.A101G	N34S
c.102T>G o c.102T>A	c.T102G o c.T102A	N34K
c.103G>C o c.103G>A	c.G103C o c.G103A	G35R
c.104G>A	c.G104A	G35E
c.104G>T	c.G104T	G35V
c.107T>C	c.T107C	L36S
c.107T>G	c.T107G	L36W
c.108G>C o c.108G>T	c.G108C o c.G108T	L36F
c.109G>A	c.G109A	A37T
c.110C>T	c.C110T	A37V
c.122C>T	c.C122T	T41I
c.124A>C o c.124A>T	c.A124C o c.A124T	M42L
c.124A>G	c.A124G	M42V
c.125T>A	c.T125A	M42K
c.125T>C	c.T125C	M42T
c.125T>G	c.T125G	M42R
c.126G>A o c.126G>C o c.126G>T	c.G126A o c.G126C o c.G126T	M42I
c.137A>C	c.A137C	H46P
c.142G>C	c.G142C	E48Q
c.152T>A	c.T152A	M51K

c.153G>A o c.153G>T o c.153G>C	c.G153A o c.G153T o c.G153C	M51I
c.157A>G	c.A157G	N53D
c.[157A>C; 158A>T]	c.A157C/A158T	N53L
c.160C>T	c.C160T	L54F
c.161T>C	c.T161C	L54P
c.164A>G	c.A164G	D55G
c.164A>T	c.A164T	D55V
c.[164A>T; 170A>T]	c.A164T/A170T	D55V/Q57L
c.167G>T	c.G167T	C56F
c.167G>A	c.G167A	C56Y
c.170A>T	c.A170T	Q57L
c.175G>A	c.G175A	E59K
c.178C>A	c.C178A	P60T
c.178C>T	c.C178T	P60S
c.179C>T	c.C179T	P60L
c.196G>A	c.G196A	E66K
c.197A>G	c.A197G	E66G
c.207C>A o c.207C>G	c.C207A o c.C207G	F69L
c.214A>G	c.A214G	M72V
c.216G>A o c.216G>T o c.216G>C	c.G216A o c.G216T o c.G216C	M72I
c.218C>T	c.C218T	A73V
c.227T>C	c.T227C	M76T

B

c.239G>A	c.G239A	G80D
c.247G>A	c.G247A	D83N
c.253G>A	c.G253A	G85S
c.254G>A	c.G254A	G85D
c.[253G>A; 254G>A]	c.G253A/G254A	G85N
c.[253G>A; 254G>T; 255T>G]	c.G253A/G254T/T255 G	G85M
c.261G>C o c.261G>T	c.G261C o c.G261T	E87D
c.265C>T	c.C265T	L89F
c.272T>C	c.T272C	I91T
c.288G>A o c.288G>T o c.288G>C	c.G288A o c.G288T o c.G288C	M96I
c.289G>C	c.G289C	A97P
c.290C>T	c.C290T	A97V
c.305C>T	c.C305T	S102L
c.311G>T	c.G311T	G104V
c.316C>T	c.C316T	L106F
c.322G>A	c.G322A	A108T
c.326A>G	c.A326G	D 109G
c.334C>G	c.C334G	R112G
c.335G>A	c.G335A	R112H
c.337T>A	c.T337A	F113I
c.337T>C o c.339T>A o c.339T>G	c.T337C o c.T339A o c.T339G	F113L

B

c.352C>T	c.C352T	R118C
c.361G>A	c.G361A	A121T
c.368A>G	c.A368G	Y123C
c.373C>T	c.C373T	H125Y
c.374A>T	c.A374T	H125L
c.376A>G	c.A376G	S126G
c.383G>A	c.G383A	G128E
c.399T>G	c.T399G	I133M
c.404C>T	c.C404T	A135V
c.408T>A o c.408T>G	c.T408A o c.T408G	D136E
c.416A>G	c.A416G	N139S
c.419A>C	c.A419C	K140T
c.427G>A	c.G427A	A143T
c.431G>A	c.G431A	G144D
c.431G>T	c.G431T	G144V
c.434T>C	c.T434C	F145S
c.436C>T	c.C436T	P146S
c.437C>G	c.C437G	P146R
c.454T>C	c.T454C	Y152H
c.455A>G	c.A455G	Y152C
c.466G>A	c.G466A	A156T
c.467C>T	c.C467T	A156V
c.471G>C o c.471G>T	c.G471C o c.G471T	Q157H
c.484T>G	c.T484G	W162G

B

c.493G>C	c.G493C	D165H
c.494A>G	c.A494G	D165G
c.[496C>G; 497T>G]	c.C496G/T497G	L166G
c.496C>G	c.C496G	L166V
c.496_497delinsTC	c.496_497delinsTC	L166S
c.499C>G	c.C499G	L167V
c.506T>C	c.T506C	F169S
c.511G>A	c.G511A	G171S
c.520T>C	c.T520C	C174R
c.520T>G	c.T520G	C174G
c.525C>G o c.525C>A	c.C525G o c.C525A	D175E
c.539T>G	c.T539G	L180W
c.540G>C	c.G540C	L180F
c.548G>C	c.G548C	G183A
c.548G>A	c.G548A	G183D
c.550T>A	c.T550A	Y184N
c.551A>G	c.A551G	Y184C
c.553A>G	c.A553G	K185E
c.559A>G	c.A559G	M187V
c.559_564dup	c.559_564dup	p.M187_S188dup
c.560T>C	c.T560C	M187T
c.561G>T o c.561G>A o c.561G>C	c.G561T o c.G561A o c.G561C	M187I
c.572T>A	c.T572A	L191Q

B

c.581C>T	c.C581T	T194I
c.584G>T	c.G584T	G195V
c.586A>G	c.A586G	R196G
c.593T>C	c.T593C	I198T
c.595G>A	c.G595A	V199M
c.596T>C	c.T596C	V199A
c.596T>G	c.T596G	V199G
c.599A>G	c.A599G	Y200C
c.602C>T	c.C602T	S201F
c.602C>A	c.C602A	S201Y
c.608A>T	c.A608T	E203V
c.609G>C o c.609G>T	c.G609C o c.G609T	E203D
c.613C>A	c.C613A	P205T
c.613C>T	c.C613T	P205S
c.614C>T	c.C614T	P205L
c.619T>C	c.T619C	Y207H
c.620A>C	c.A620C	Y207S
c.623T>G	c.T623G	M208R
c.628C>T	c.C628T	P210S
c.629C>T	c.C629T	P210L
c.638A>G	c.A638G	K213R
c.638A>T	c.A638T	K213M
c.640C>T	c.C640T	P214S
c.641C>T	c.C641T	P214L

c.643A>G	c.A643G	N215D
c.644A>G	c.A644G	N215S
c.644A>T	c.A644T	N215I
c.[644A>G; 937G>T]	c.A644G/G937T	N215S/D313Y
c.646T>G	c.T646G	Y216D
c.647A>G	c.A647G	Y216C
c.655A>C	c.A655C	I219L
c.656T>A	c.T656A	I219N
c.656T>C	c.T656C	I219T
c.659G>A	c.G659A	R220Q
c.659G>C	c.G659C	R220P
c.662A>C	c.A662C	Q221P
c.671A>C	c.A671C	N224T
c.671A>G	c.A671G	N224S
c.673C>G	c.C673G	H225D
c.683A>G	c.A683G	N228S
c.687T>A o c.687T>G	c.T687A o c.T687G	F229L
c.695T>C	c.T695C	I232T
c.713G>A	c.G713A	S238N
c.716T>C	c.T716C	I239T
c.720G>C o c.720G>T	c.G720C o c.G720T	K240N
c.724A>G	c.A724G	I242V
c.724A>T	c.A724T	I242F
c.725T>A	c.T725A	I242N

B

c.725T>C	c.T725C	I242T
c.728T>G	c.T728G	L243W
c.729G>C o c.729G>T	c.G729C o c.G729T	L243F
c.730G>A	c.G730A	D244N
c.730G>C	c.G730C	D244H
c.733T>G	c.T733G	W245G
c.740C>G	c.C740G	S247C
c.747C>G o c.747C>A	c.C747G o c.C747A	N249K
c.749A>C	c.A749C	Q250P
c.749A>G	c.A749G	Q250R
c.750G>C	c.G750C	Q250H
c.758T>C	c.T758C	I253T
c.758T>G	c.T758G	I253S
c.760-762delGTT	c.760_762delGTT	p.V254del
c.769G>C	c.G769C	A257P
c.770C>G	c.C770G	A257G
c.772G>C o c.772G>A	c.G772C o c.G772A	G258R
c.773G>T	c.G773T	G258V
c.776C>G	c.C776G	P259R
c.776C>T	c.C776T	P259L
c.779G>A	c.G779A	G260E
c.779G>C	c.G779C	G260A
c.781G>A	c.G781A	G261S
c.781G>C	c.G781C	G261R

B

c.781G>T	c.G781T	G261C
c.788A>G	c.A788G	N263S
c.790G>T	c.G790T	D264Y
c.794C>T	c.C794T	P265L
c.800T>C	c.T800C	M267T
c.805G>A	c.G805A	V269M
c.806T>C	c.T806C	V269A
c.809T>C	c.T809C	I270T
c.810T>G	c.T810G	I270M
c.811G>A	c.G811A	G271S
c.[811G>A; 937G>T]	c.G811A/G937T	G271S/D313Y
c.812G>A	c.G812A	G271D
c.823C>G	c.C823G	L275V
c.827G>A	c.G827A	S276N
c.829T>G	c.T829G	W277G
c.831G>T o c.831G>C	c.G831T o c.G831C	W277C
c.832A>T	c.A832T	N278Y
c.835C>G	c.C835G	Q279E
c.838C>A	c.C838A	Q280K
c.840A>T o c.840A>C	c.A840T o c.A840C	Q280H
c.844A>G	c.A844G	T282A
c.845C>T	c.C845T	T282I
c.850A>G	c.A850G	M284V
c.851T>C	c.T851C	M284T

B

c.860G>T	c.G860T	W287L
c.862G>C	c.G862C	A288P
c.866T>G	c.T866G	I289S
c.868A>C o c.868A>T	c.A868C o c.A868T	M290L
c.869T>C	c.T869C	M290T
c.870G>A o c.870G>C o c.870G>T	c.G870A o c.G870C o c.G870T	M290I
c.871G>A	c.G871A	A291T
c.877C>A	c.C877A	P293T
c.881T>C	c.T881C	L294S
c.884T>G	c.T884G	F295C
c.886A>G	c.A886G	M296V
c.886A>T o c.886A>C	c.A886T o c.A886C	M296L
c.887T>C	c.T887C	M296T
c.888G>A o c.888G>T o c.888G>C	c.G888A o c.G888T o c.G888C	M296I
c.893A>G	c.A893G	N298S
c.897C>G o c.897C>A	c.C897G o c.C897A	D299E
c.898C>T	c.C898T	L300F
c.899T>C	c.T899C	L300P
c.901C>G	c.C901G	R301G
c.902G>C	c.G902C	R301P
c.902G>A	c.G902A	R301Q
c.902G>T	c.G902T	R301L

B

c.907A>T	c.A907T	I303F
c.908T>A	c.T908A	I303N
c.911G>A	c.G911A	S304N
c.911G>C	c.G911C	S304T
c.919G>A	c.G919A	A307T
c.922A>G	c.A922G	K308E
c.924A>T o c.924A>C	c.A924T o c.A924C	K308N
c.925G>C	c.G925C	A309P
c.926C>T	c.C926T	A309V
c.928C>T	c.C928T	L310F
c.931C>G	c.C931G	L311V
c.935A>G	c.A935G	Q312R
c.936G>T o c.936G>C	c.G936T o c.G936C	Q312H
c.937G>T	c.G937T	D313Y
c.[937G>T; 1232G>A]	c.G937T/G1232A	D313Y/G411D
c.938A>G	c.A938G	D313G
c.946G>A	c.G946A	V316I
c.947T>G	c.T947G	V316G
c.950T>C	c.T950C	I317T
c.955A>T	c.A955T	I319F
c.956T>C	c.T956C	I319T
c.959A>T	c.A959T	N320I
c.962A>G	c.A962G	Q321R
c.962A>T	c.A962T	Q321L

B

c.963G>C o c.963G>T	c.G963C o c.G963T	Q321H
c.964G>A	c.G964A	D322N
c.964G>C	c.G964C	D322H
c.966C>A o c.966C>G	c.C966A o c.C966G	D322E
c.968C>G	c.C968G	P323R
c.973G>A	c.G973A	G325S
c.973G>C	c.G973C	G325R
c.978G>C o c.978G>T	c.G978C o c.G978T	K326N
c.979C>G	c.C979G	Q327E
c.980A>T	c.A980T	Q327L
c.983G>C	c.G983C	G328A
c.989A>G	c.A989G	Q330R
c.1001G>A	c.G1001A	G334E
c.1010T>C	c.T1010C	F337S
c.1012G>A	c.G1012A	E338K
c.1016T>A	c.T1016A	V339E
c.1027C>A	c.C1027A	P343T
c.1028C>T	c.C1028T	P343L
c.1033T>C	c.T1033C	S345P
c.1046G>C	c.G1046C	W349S
c.1055C>G	c.C1055G	A352G
c.1055C>T	c.C1055T	A352V
c.1061T>A	c.T1061A	I354K
c.1066C>G	c.C1066G	R356G

B

c.1066C>T	c.C1066T	R356W
c.1067G>A	c.G1067A	R356Q
c.1067G>C	c.G1067C	R356P
c.1072G>C	c.G1072C	E358Q
c.1073A>C	c.A1073C	E358A
c.1073A>G	c.A1073G	E358G
c.1074G>T o c.1074G>C	c.G1074T o c.G1074C	E358D
c.1076T>C	c.T1076C	I359T
c.1078G>A	c.G1078A	G360S
c.1078G>T	c.G1078T	G360C
c.1079G>A	c.G1079A	G360D
c.1082G>A	c.G1082A	G361E
c.1082G>C	c.G1082C	G361A
c.1084C>A	c.C1084A	P362T
c.1085C>T	c.C1085T	P362L
c.1087C>T	c.C1087T	R363C
c.1088G>A	c.G1088A	R363H
c.1102G>A	c.G1102A	A368T
c.1117G>A	c.G1117A	G373S
c.1124G>A	c.G1124A	G375E
c.1153A>G	c.A1153G	T385A
c.1168G>A	c.G1168A	V390M
c.1172A>C	c.A1172C	K391T

c.1184G>A	c.G1184A	G395E
c.1184G>C	c.G1184C	G395A
c.1192G>A	c.G1192A	E398K
c.1202_1203insGACT TC	c. 1202_1203insGACTT C	p.T400_S401dup
c.1208T>C	c.T1208C	L403S
c.1225C>G	c.C1225G	P409A
c.1225C>T	c.C1225T	P409S
c.1225C>A	c.C1225A	P409T
c.1228A>G	c.A1228G	T410A
c.1229C>T	c.C1229T	T410I
c.1232G>A	c.G1232A	G411D
c.1235C>A	c.C1235A	T412N
c.1253A>G	c.A1253G	E418G
c.1261A>G	c.A1261G	M421V

Funzione renale nei pazienti affetti da malattia di Fabry

Il progressivo declino della funzione renale è una complicanza principale della malattia di Fabry. Per esempio, i pazienti associati a un fenotipo Fabry classico presentano una compromissione renale progressiva che può infine richiedere dialisi o trapianto renale.

Un metodo frequentemente usato nell'arte per valutare la funzione renale è il GFR. Generalmente, il GFR è il volume di fluido filtrato dai capillari glomerulari renali nella capsula di Bowman per unità

di tempo. Clinicamente, le stime del GFR vengono realizzate in base all'eliminazione della creatinina dal siero. Il GFR può essere stimato raccogliendo l'urina per determinare la quantità di creatinina che è stata rimossa dal sangue durante un dato intervallo di tempo. Possono essere considerati anche età, corporatura e sesso. Più il numero GFR è basso, più il danno renale è avanzato.

Alcuni studi indicano che i pazienti affetti da malattia di Fabry non trattati subiscono un declino medio di GFR tra 7,0 e 18,9 ml/min/1,73 m² all'anno, mentre i pazienti riceventi ERT possono subire un declino medio di GFR tra 2,0 e 2,7 ml/min/1,73 m² all'anno, sebbene possano verificarsi declini più rapidi in pazienti con proteinuria più significativa o con malattia renale cronica più grave.

Un GFR stimato (eGFR) viene calcolato dalla creatinina sierica usando un'equazione tracciabile a spettrometria di massa a diluizione isotopica (IDMS). Due delle equazioni più comunemente usate per stimare il tasso di filtrazione glomerulare (GFR) dalla creatinina sierica sono l'equazione della Collaborazione epidemiologica per la malattia renale cronica (Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration, CKD-EPI) e l'equazione dello studio sulla modifica della dieta nella malattia renale (Modification of Diet in Renal Disease, MDRD). Entrambe le equazioni dello studio MDRD e CKD-EPI includono variabili per età, sesso e razza, che possono consentire ai fornitori di osservare che CKD è presente nonostante una concentrazione di creatinina sierica che sembra rientrare o essere appena sopra l'intervallo di riferimento

normale.

L'equazione CKD-EPI usa una "spline" a doppia pendenza per modellare la relazione tra GFR e creatinina sierica, età, sesso e razza.

L'equazione CKD-EPI è espressa come singola equazione, in cui:

S_{cr} è la creatinina sierica in mg/dl,

κ è 0,7 per le femmine e 0,9 per i maschi,

α è -0,329 per le femmine e -0,411 per i maschi,

min indica il minimo di S_{cr}/κ o 1, e

mass indica il massimo di S_{cr}/κ o 1.

La seguente è l'equazione dello studio MDRD tracciabile a IDMS (per i metodi della creatinina calibrati rispetto a un metodo di riferimento IDMS):

L'equazione non richiede le variabili di peso o altezza poiché i risultati sono riportati normalizzati a un'area di superficie corporea di 1,73 m², che è un'area di superficie di adulto media accettata. L'equazione è stata validata in modo approfondito in popolazioni caucasiche e afroamericane tra le età di 18 e 70 anni con funzione renale compromessa (eGFR <60 ml/min/1,73 m²) e ha mostrato una buona prestazione per pazienti con tutte le cause comuni di malattia renale.

Un metodo per stimare il tasso di eliminazione della creatinina (eC_{Cr}) consiste nell'usare l'equazione di Cockcroft-Gault, che a sua volta stima il GFR in ml/min:

L'equazione di Cockcroft-Gault è l'equazione suggerita per l'uso dalla Food and Drug Administration per gli studi di compromissione

renale. È consueto che l'eliminazione della creatinina calcolata mediante la formula di Cockcroft-Gault sia normalizzata per un'area di superficie corporea di $1,73 \text{ m}^2$. Pertanto, questa equazione può essere espressa come l'eGFR stimato in $\text{ml}/\text{min}/1,73 \text{ m}^2$. L'intervallo normale di GFR, regolato per l'area di superficie corporea, è $100\text{-}130 \text{ ml}/\text{min}/1,73 \text{ m}^2$ negli uomini e $90\text{-}120 \text{ ml}/\text{min}/1,73 \text{ m}^2$ nelle donne più giovani di 40 anni.

La gravità della malattia renale cronica è stata definita in sei stadi (vedere anche la Tabella 2): (Stadio 0) Funzione renale normale - GFR sopra $90 \text{ ml}/\text{min}/1,73 \text{ m}^2$ e nessuna proteinuria; (Stadio 1) - GFR sopra $90 \text{ ml}/\text{min}/1,73 \text{ m}^2$ con evidenza di danno renale; (Stadio 2) (lieve) - GFR da 60 a $89 \text{ ml}/\text{min}/1,73 \text{ m}^2$ con evidenza di danno renale; (Stadio 3) (moderata) - GFR da 30 a $59 \text{ ml}/\text{min}/1,73 \text{ m}^2$; (Stadio 4) (grave) - GFR da 15 a $29 \text{ ml}/\text{min}/1,73 \text{ m}^2$; (Stadio 5) insufficienza renale - GFR inferiore a $15 \text{ ml}/\text{min}/1,73 \text{ m}^2$. La Tabella 2 di seguito mostra i vari stadi di malattia renale con i corrispondenti livelli di GFR.

Tabella 2

Stadio di malattia renale cronica	Livello di GFR ($\text{ml}/\text{min}/1,73 \text{ m}^2$)
Stadio 1 (Normale)	≥ 90
Stadio 2 (Lieve)	$60 - 89$
Stadio 3 (Moderata)	$30 - 59$
Stadio 4 (Grave)	$15 - 29$
Stadio 5 (Insufficienza renale)	< 15

Dosaggio, formulazione e somministrazione

Uno o più dei regimi di dosaggio descritti nella presente sono

particolarmente idonei per i pazienti affetti da malattia di Fabry che presentano un certo grado di compromissione renale. Vari studi hanno esaminato l'uso di 150 mg di migalastat cloridrato a giorni alterni (QOD) in pazienti affetti da malattia di Fabry. Uno studio era una sperimentazione di 24 mesi, includente un periodo di 6 mesi in doppio cieco controllato con placebo, in 67 pazienti naive alla ERT. Un altro studio era una sperimentazione di 18 mesi controllata con agente attivo in 57 pazienti già trattati con ERT con un'estensione in aperto (OLE) di 12 mesi. Entrambi gli studi includevano pazienti aventi un tasso di filtrazione glomerulare stimato (eGFR) di ≥ 30 ml/min/1,73 m². Di conseguenza, entrambi gli studi includevano pazienti affetti da malattia di Fabry con funzione renale normale nonché pazienti con compromissione renale lieve e moderata, ma nessuno dei due studi includeva pazienti con insufficienza renale grave.

Gli studi del trattamento con migalastat di pazienti affetti da malattia di Fabry hanno stabilito che 150 mg di migalastat cloridrato a giorni alterni rallentavano la progressione della malattia come mostrato dai marcatori surrogati.

Pertanto, in una o più forme di realizzazione, al paziente affetto da malattia di Fabry viene somministrato migalastat o un relativo sale a una frequenza a giorni alterni (indicata anche come "QOD"). In varie forme di realizzazione, le dosi descritte nella presente si riferiscono a migalastat cloridrato o a una dose equivalente di migalastat o di un relativo sale diverso dal sale cloridrato. In alcune forme di realizzazione,

queste dosi si riferiscono alla base libera di migalastat. In forme di realizzazione alternative, queste dosi si riferiscono a un sale di migalastat. In ulteriori forme di realizzazione, il sale di migalastat è migalastat cloridrato. La somministrazione di migalastat o di un sale di migalastat è indicata nella presente come "terapia con migalastat".

La quantità efficace di migalastat o di un relativo sale può essere nell'intervallo da circa 100 mg di FBE a circa 150 mg di FBE. Dosi esemplificative includono circa 100 mg di FBE, circa 105 mg di FBE, circa 110 mg di FBE, circa 115 mg di FBE, circa 120 mg di FBE, circa 123 mg di FBE, circa 125 mg di FBE, circa 130 mg di FBE, circa 135 mg di FBE, circa 140 mg di FBE, circa 145 mg di FBE o circa 150 mg di FBE.

Ancora, si noti che 150 mg di migalastat cloridrato sono equivalenti a 123 mg della forma di base libera di migalastat. Pertanto, in una o più forme di realizzazione, la dose è 150 mg di migalastat cloridrato o una dose equivalente di migalastat o di un relativo sale diverso dal sale cloridrato, somministrati con una frequenza a giorni alterni. Come esposto sopra, questa dose è indicata come 123 mg di FBE di migalastat. In ulteriori forme di realizzazione, la dose è 150 mg di migalastat cloridrato somministrati con una frequenza a giorni alterni. In altre forme di realizzazione, la dose è 123 mg della base libera di migalastat somministrati con una frequenza a giorni alterni.

In varie forme di realizzazione, la quantità efficace è circa 122 mg, circa 128 mg, circa 134 mg, circa 140 mg, circa 146 mg, circa 150 mg, circa 152 mg, circa 159 mg, circa 165 mg, circa 171 mg, circa 177

mg o circa 183 mg di migalastat cloridrato.

Di conseguenza, in varie forme di realizzazione, la terapia con migalastat include somministrare 123 mg di FBE con una frequenza a giorni alterni, come 150 mg di migalastat cloridrato a giorni alterni.

La somministrazione di migalastat o di un relativo sale può avvenire per un determinato periodo di tempo. In una o più forme di realizzazione, migalastat o relativo sale è somministrato per una durata di almeno 28 giorni, come almeno 30, 60 o 90 giorni o almeno 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 16, 20, 24, 30 o 36 mesi o almeno 1, 2, 3, 4 o 5 anni. In varie forme di realizzazione, la terapia con migalastat è una terapia con migalastat a lungo termine di almeno 6 mesi, come almeno 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 16, 20, 24, 30 o 36 mesi o almeno 1, 2, 3, 4 o 5 anni.

La somministrazione di migalastat o di un relativo sale secondo la presente invenzione può avvenire in una formulazione idonea per qualsiasi via di somministrazione, ma preferibilmente viene somministrato in una forma di dosaggio orale come una compressa, capsula o soluzione. Come esempio, al paziente vengono somministrate per via orale capsule, ciascuna contenente 150 mg di migalastat cloridrato o una dose equivalente di migalastat o di un relativo sale diverso dal sale cloridrato.

In alcune forme di realizzazione, il PC (migalastat o relativo sale) è somministrato per via orale. In una o più forme di realizzazione, il PC (migalastat o relativo sale) è somministrato mediante iniezione. Il PC può essere accompagnato da un veicolante farmaceuticamente accettabile,

che può dipendere dal metodo di somministrazione.

In una o più forme di realizzazione, il PC (migelastat o un relativo sale) è somministrato come monoterapia, e può essere in una forma idonea per qualsiasi via di somministrazione, incluso, per esempio, per via orale nella forma di compresse o capsule o liquido, o in soluzione acquosa sterile per iniezione. In altre forme di realizzazione, il PC è fornito in una polvere liofilizzata secca da aggiungere alla formulazione dell'enzima sostitutivo durante o immediatamente dopo la ricostituzione per impedire l'aggregazione dell'enzima in vitro prima della somministrazione.

Quando il PC (migelastat o un relativo sale) è formulato per la somministrazione orale, le compresse o capsule possono essere preparate mediante mezzi convenzionali con eccipienti farmaceuticamente accettabili come agenti di legame (per esempio, amido di mais pregelatinizzato, polivinilpirrolidone o idrossipropil metilcellulosa); riempitivi (per esempio, lattosio, cellulosa microcristallina o idrogenofosfato di calcio); lubrificanti (per esempio, stearato di magnesio, talco o silice); disgreganti (per esempio, amido di patata o glicolato di amido di sodio); o agenti umettanti (per esempio, sodio laurilsolfato). Le compresse possono essere rivestite mediante metodi ben noti nell'arte. Le preparazioni liquide per somministrazione orale possono assumere la forma, per esempio, di soluzioni, sciroppi o sospensioni, oppure possono essere presentate come un prodotto secco da ricostituire con acqua o altro veicolo idoneo prima dell'uso. Tali

preparazioni liquide possono essere preparate mediante mezzi convenzionali con additivi farmaceuticamente accettabili come agenti di sospensione (per esempio sciroppo di sorbitolo, derivati di cellulosa o grassi edibili idrogenati); agenti emulsionanti (per esempio lecitina o acacia); veicoli non acquosi (per esempio olio di mandorla, esteri oleosi, alcol etilico oppure oli vegetali frazionati); e conservanti (per esempio p-idrossibenzoati di metile o propile o acido sorbico). Le preparazioni possono anche contenere sali tampone, agenti aromatizzanti, coloranti ed edulcoranti come appropriato. Le preparazioni per somministrazione orale possono essere opportunamente formulate per fornire un rilascio controllato del composto chaperone attivo.

Le formulazioni farmaceutiche del PC (migalastat o un relativo sale) idonee per uso parenterale/iniettabile generalmente includono soluzioni acquose sterili (laddove idrosolubili), o dispersioni e polveri sterili per la preparazione estemporanea di soluzioni iniettabili sterili o dispersioni. In tutti i casi, la forma deve essere sterile e deve essere fluida al punto da essere facilmente siringabile. Deve essere stabile nelle condizioni di produzione e conservazione e deve essere preservata dall'azione contaminante di microrganismi come batteri e funghi. Il veicolante può essere un solvente o un mezzo di dispersione contenente, per esempio, acqua, etanolo, poliolo (per esempio, glicerolo, propilenglicole e polietilenglicole e simili), relative miscele idonee e oli vegetali. La corretta fluidità può essere mantenuta, per esempio, mediante l'uso di un rivestimento come lecitina, mediante il

mantenimento della dimensione particellare richiesta in caso di dispersione e mediante l'uso di tensioattivi. La prevenzione dell'azione dei microrganismi può essere determinata da vari agenti antibatterici e antifungini, per esempio, parabeni, clorobutanolo, fenolo, alcol benzilico, acido sorbico e simili. In molti casi, sarà ragionevole includere agenti isotonici, per esempio, zuccheri o cloruro di sodio. Un assorbimento prolungato delle composizioni iniettabili può essere determinato dall'uso nelle composizioni di agenti che ritardano l'assorbimento, per esempio, monostearato di alluminio e gelatina.

Le soluzioni iniettabili sterili vengono preparate incorporando l'enzima purificato (se presente) e il PC (migalastat o un relativo sale) nella quantità richiesta nel solvente appropriato con vari altri ingredienti elencati sopra, come richiesto, proseguendo con sterilizzazione per filtrazione o terminale. Generalmente, le dispersioni vengono preparate incorporando i vari principi attivi sterilizzati in un veicolo sterile che contiene il mezzo di dispersione basico e gli altri ingredienti richiesti tra quelli elencati sopra. Nel caso di polveri sterili per la preparazione di soluzioni iniettabili sterili, i metodi di preparazione preferiti sono l'essiccazione sottovuoto e la tecnica di liofilizzazione, che forniscono una polvere dell'ingrediente attivo più qualsiasi ingrediente desiderato aggiuntivo da una relativa soluzione precedentemente filtrata sterilmente.

La formulazione può contenere un eccipiente. Gli eccipienti farmaceuticamente accettabili che possono essere inclusi nella

formulazione sono tamponi come tampone citrato, tampone fosfato, tampone acetato, tampone bicarbonato, amminoacidi, urea, alcoli, acido ascorbico e fosfolipidi; proteine, come albumina sierica, collagene e gelatina; sali come EDTA o EGTA e cloruro di sodio; liposomi; polivinilpirrolidone; zuccheri, come destrano, mannitolo, sorbitolo e glicerolo; propilen glicole e polietilen glicole (per esempio, PEG-4000, PEG-6000); glicerolo; glicina o altri amminoacidi; e lipidi. I sistemi tampone per l'uso con le formulazioni includono tamponi citrato; acetato; bicarbonato; e fosfato. Il tampone fosfato è una forma di realizzazione preferita.

La via di somministrazione del composto chaperone può essere orale o parenterale, inclusa quella endovenosa, sottocutanea, intraarteriosa, intraperitoneale, oftalmica, intramuscolare, buccale, rettale, vaginale, intraorbitale, intracerebrale, intradermica, intracranica, intraspinale, intraventricolare, intratecale, intracisternale, intracapsulare, intrapolmonare, intranasale, transmucosale, transdermica o tramite inalazione.

La somministrazione delle formulazioni parenterali descritte sopra del composto chaperone può avvenire mediante iniezioni periodiche di un bolo della preparazione, oppure può essere somministrato mediante somministrazione endovenosa o intraperitoneale da un serbatoio che è esterno (per esempio, una sacca e .v.) o interno (per esempio, un impianto bioerodibile).

Forme di realizzazione relative a formulazioni farmaceutiche e

alla somministrazione possono essere combinate con qualsiasi delle altre forme di realizzazione dell'invenzione, per esempio forme di realizzazione relative a migalastat o relativo sale per uso nel trattamento di un paziente con diagnosi di malattia di Fabry, nonché forme di realizzazione relative a mutazioni suscettibili, il PC e relativi dosaggi idonei.

In una o più forme di realizzazione, il PC (migalastat o relativo sale) è somministrato in combinazione con ERT. La ERT aumenta la quantità di proteina introducendo in modo esogeno un enzima di tipo selvatico o biologicamente funzionale mediante infusione. Questa terapia è stata sviluppata per molti disturbi genetici, inclusi LSD come la malattia di Fabry, come indicato sopra. Dopo l'infusione, è atteso che l'enzima esogeno venga assorbito dai tessuti attraverso un meccanismo non specifico o specifico per il recettore. In generale, l'efficienza di assorbimento non è elevata, e il tempo di circolazione della proteina esogena è breve. In aggiunta, la proteina esogena è instabile e soggetta a rapida degradazione intracellulare, oltre ad avere il potenziale per reazioni immunologiche avverse con trattamenti successivi. In una o più forme di realizzazione, lo chaperone è somministrato contemporaneamente all'enzima sostitutivo (per esempio, α -Gal A sostitutivo). In una o più forme di realizzazione, lo chaperone è co-formulato con l'enzima sostitutivo (per esempio, α -Gal A sostitutivo).

In una o più forme di realizzazione, un paziente passa dalla ERT alla terapia con migalastat. In alcune forme di realizzazione viene

identificato un paziente sottoposto a ERT, la ERT del paziente viene interrotta e il paziente inizia a ricevere la terapia con migalastat. La terapia con migalastat può essere in conformità con qualsiasi dei metodi descritti nella presente.

Stabilizzazione della funzione renale

I regimi di dosaggio descritti nella presente possono stabilizzare la funzione renale in pazienti affetti da malattia di Fabry con gradi variabili di compromissione renale. In una o più forme di realizzazione, a un paziente affetto da malattia di Fabry che presenta compromissione renale vengono somministrati da circa 100 mg a circa 150 mg di FBE di migalastat o di un relativo sale con una frequenza a giorni alterni. In una o più forme di realizzazione, al paziente vengono somministrati 123 mg di FBE di migalastat o di un relativo sale, come 123 mg di migalastat o 150 mg di migalastat cloridrato a giorni alterni. In una o più forme di realizzazione, il paziente ha una compromissione renale lieve o moderata. In forme di realizzazione specifiche, il paziente ha una compromissione renale lieve. In altre forme di realizzazione specifiche, il paziente ha una compromissione renale moderata. Il paziente può essere naive alla ERT o già trattato con ERT.

La somministrazione di migalastat può avvenire per un determinato periodo di tempo. In una o più forme di realizzazione, il migalastat viene somministrato per almeno 28 giorni, come almeno 30, 60 o 90 giorni o almeno 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 16, 20 o 24 mesi o almeno 1, 2, 3, 4 o 5 anni. In varie forme di realizzazione, la terapia con

migalastat è una terapia con migalastat a lungo termine di almeno 6 mesi, come almeno 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 16, 20 o 24 mesi o almeno 1, 2, 3, 4 o 5 anni.

La terapia con migalastat può ridurre il declino della funzione renale per un paziente affetto da malattia di Fabry rispetto allo stesso paziente senza trattamento con terapia con migalastat. In una o più forme di realizzazione, la terapia con migalastat fornisce a un paziente un cambiamento annualizzato di $eGFR_{CKD-EPI}$ superiore a (vale a dire più positivo di) $-5,0 \text{ ml/min/1,73 m}^2/\text{anno}$, come superiore a $-4,5, -4,0, -3,5, -3,0, -2,5, -2,0, -1,5, -1,0, -0,9, -0,8, -0,7, -0,6, -0,5, -0,4, -0,3, -0,2, -0,1$ o anche superiore a $0 \text{ ml/min/1,73 m}^2/\text{anno}$. In una o più forme di realizzazione, la terapia con migalastat fornisce a un paziente un cambiamento annualizzato di $mGFR_{ioexolo}$ superiore a $-5,0 \text{ ml/min/1,73 m}^2/\text{anno}$, come superiore a $-4,5, -4,0, -3,5, -3,0, -2,5, -2,0, -1,5, -1,0, -0,9, -0,8, -0,7, -0,6, -0,5, -0,4, -0,3, -0,2, -0,1$ o anche superiore a $0 \text{ ml/min/1,73 m}^2/\text{anno}$. Di conseguenza, la terapia con migalastat può ridurre il declino o anche migliorare la funzione renale del paziente. Questi tassi di cambiamento annualizzati possono essere misurati durante uno specifico periodo di tempo, come durante 6 mesi, 12 mesi, 18 mesi, 24 mesi, 30 mesi, 36 mesi, 48 mesi o 60 mesi.

La terapia con migalastat può ridurre il declino della funzione renale per un gruppo di pazienti affetti da malattia di Fabry, come sottopopolazioni di pazienti affetti da malattia di Fabry che presentano gradi variabili di compromissione renale. In una o più forme di

realizzazione, la terapia con migalastat fornisce un tasso di cambiamento annualizzato medio di $eGFR_{CKD-EPI}$ a pazienti affetti da malattia di Fabry aventi compromissione renale lieve, moderata o grave superiore a $-5,0$ ml/min/ $1,73$ m²/anno, come maggiore di $-4,5$, $-4,0$, $-3,5$, $-3,0$, $-2,5$, $-2,0$, $-1,5$, $-1,0$, $-0,9$, $-0,8$, $-0,7$, $-0,6$, $-0,5$, $-0,4$, $-0,3$, $-0,2$, $-0,1$ o anche superiore a 0 ml/min/ $1,73$ m²/anno. In una o più forme di realizzazione, la terapia con migalastat fornisce un tasso di cambiamento annualizzato medio di $mGFR_{ioexolo}$ a pazienti aventi compromissione renale lieve, moderata o grave superiore a $-5,0$ ml/min/ $1,73$ m²/anno, come superiore a $-4,5$, $-4,0$, $-3,5$, $3,0$, $-2,5$, $-2,0$, $-1,5$, $-1,0$, $-0,9$, $-0,8$, $-0,7$, $-0,6$, $-0,5$, $-0,4$, $-0,3$, $-0,2$, $-0,1$ o anche superiore a 0 ml/min/ $1,73$ m²/anno. Questi tassi di cambiamento annualizzati medi possono essere misurati durante uno specifico periodo di tempo, come durante 6 mesi, 12 mesi, 18 mesi, 24 mesi, 30 mesi, 36 mesi, 48 mesi o 60 mesi.

Massa ventricolare sinistra

I regimi di dosaggio descritti nella presente possono migliorare il LVMi nei pazienti affetti da malattia di Fabry. La storia naturale di LVMi e ipertrofia cardiaca in pazienti non trattati affetti da malattia di Fabry indipendentemente dal fenotipo (Patel, O'Mahony *et al.* 2015) è un aumento progressivo di LVMi tra $+4,07$ e $+8,0$ g/m²/anno (Kampmann, Linhart *et al.* 2008; Wyatt, Henley *et al.* 2012; Germain, Weidemann *et al.* 2013). Poiché i pazienti affetti da malattia di Fabry non trattati tipicamente presentano un aumento del LVMi nel tempo, sia le diminuzioni sia il mantenimento del LVMi sono indicazioni di un beneficio

della terapia con migalastat.

La terapia con migalastat può ridurre l'aumento del LVMi per un paziente affetto da malattia di Fabry rispetto allo stesso paziente senza trattamento con migalastat. In una o più forme di realizzazione, la migalastat fornisce a un paziente un cambiamento annualizzato di LVMi inferiore a (vale a dire più negativo di) 0 g/m^2 , come inferiore o uguale o uguale a circa -0,5, -1, -1,5, -2, -2,5, -3, -3,5, -4, -4,5, -5, -5,5, -6, -7, -8, -9, -10, -11, -12, -13, -14, -15, -16, -17, -18, -19 o -20 g/m^2 . Espresso in modo diverso, in una o più forme di realizzazione, la migalastat fornisce a un paziente una riduzione di LVMi superiore a 0 g/m^2 , come riduzioni di almeno circa 0,5, 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 5,5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 g/m^2 . In una o più forme di realizzazione, il paziente ha una compromissione renale lieve o moderata. In forme di realizzazione specifiche, il paziente ha una compromissione renale lieve. In altre forme di realizzazione specifiche, il paziente ha una compromissione renale moderata. Il paziente può essere naïve alla ERT o già trattato con ERT.

In una o più forme di realizzazione, la migalastat fornisce una diminuzione media del LVMi in un gruppo di pazienti già trattati con ERT di almeno circa 1 g/m^2 dopo 18 mesi di somministrazione di migalastat o di un relativo sale. In varie forme di realizzazione, la diminuzione media nel gruppo di pazienti già trattati con ERT dopo 18 mesi di somministrazione di migalastat o di un relativo sale è almeno circa 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 g/m^2 .

In una o più forme di realizzazione, la terapia con migalastat fornisce una diminuzione media del LVMi in un gruppo di pazienti già trattati con ERT che presentano una compromissione renale moderata di almeno circa 1 g/m² dopo 18 mesi di somministrazione di migalastat o di un relativo sale. In varie forme di realizzazione, la diminuzione media nel gruppo di pazienti già trattati con ERT dopo 18 mesi di somministrazione di migalastat o di un relativo sale è almeno circa 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 g/m².

In una o più forme di realizzazione, la terapia con migalastat fornisce una diminuzione media del LVMi in un gruppo di pazienti naïve alla ERT di almeno circa 1 g/m² dopo 24 mesi di somministrazione di migalastat o di un relativo sale. In varie forme di realizzazione, la diminuzione media nel gruppo di pazienti naïve alla ERT dopo 24 mesi di somministrazione di migalastat o di un relativo sale è almeno circa 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 g/m².

In una o più forme di realizzazione, la terapia con migalastat fornisce una diminuzione media del LVMi in un gruppo di pazienti naïve alla ERT che presentano una compromissione renale moderata di almeno circa 1 g/m² dopo 24 mesi di somministrazione di migalastat o di un relativo sale. In varie forme di realizzazione, la diminuzione media nel gruppo di pazienti naïve alla ERT dopo 24 mesi di somministrazione di migalastat o di un relativo sale è almeno circa 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 g/m².

Il riferimento in tutta questa descrizione a “una forma di

realizzazione”, “determinate forme di realizzazione”, “varie forme di realizzazione”, “una o più forme di realizzazione” o “una forma di realizzazione” indica che una peculiarità, struttura, materiale o caratteristica particolare descritta/o in associazione alla forma di realizzazione è inclusa/o in almeno una forma di realizzazione dell’invenzione. Pertanto, le occorrenze di espressioni come “in una o più forme di realizzazione,” “in determinate forme di realizzazione,” “in varie forme di realizzazione,” “in una forma di realizzazione” o “in una forma di realizzazione,” in vari punti in tutta questa descrizione non si riferiscono necessariamente alla stessa forma di realizzazione dell’invenzione. Inoltre ancora, le particolari peculiarità, strutture, materiali o caratteristiche possono essere combinati in qualsiasi modalità idonea in una o più forme di realizzazione.

Sebbene l’invenzione nel presente documento sia stata descritta facendo riferimento a forme di realizzazione particolari, occorre comprendere che queste forme di realizzazione sono semplicemente illustrative dei principi e delle applicazioni della presente invenzione. Risulterà evidente ai tecnici del ramo che è possibile apportare varie modifiche e varianti alla presente invenzione. Pertanto, è inteso che la presente invenzione include modifiche e variazioni che rientrano nell’ambito delle rivendicazioni allegate.

Brevetti, domande di brevetto, pubblicazioni, descrizioni di prodotti e protocolli sono citati in tutta questa domanda.

ESEMPI

Esempio 1: Farmacocinetica di migalastat in pazienti non affetti da malattia di Fabry con compromissione renale

È stata condotta una sperimentazione clinica per studiare la farmacocinetica e la sicurezza di migalastat HCl in soggetti non affetti da malattia di Fabry con compromissione renale. È stata somministrata una singola dose di migalastat HCl 150 mg a soggetti con compromissione renale lieve, moderata e grave, e funzione renale normale. L'eGFR è stato stimato mediante l'equazione di Cockcroft-Gault secondo le indicazioni della FDA per gli studi di compromissione renale.

I volontari sono stati arruolati in due coorti stratificate per la funzione renale calcolata usando l'equazione di Cockcroft-Gault per l'eliminazione della creatinina (CL_{CR}). I soggetti sono stati assegnati ai gruppi in base a una CL_{CR} stimata allo screening come calcolata usando l'equazione di Cockcroft-Gault. Per ciascun soggetto, i seguenti parametri farmacocinetici di migalastat plasmatico sono stati determinati mediante analisi non compartimentale con il software WinNonlin® (Pharsight Corporation, Versione 5.2).

C_{max} concentrazione osservata massima

t_{max} tempo alla concentrazione massima

AUC_{0-t} area sotto la curva concentrazione-tempo dall'ora 0 all'ultima concentrazione misurabile, calcolata usando la regola del trapezio lineare per le concentrazioni crescenti e la regola logaritmica per le concentrazioni decrescenti

$AUC_{0-\infty}$ area sotto la curva concentrazione-tempo estrapolata

all'infinito, calcolata usando la formula:

$$AUC_{0-\infty} = AUC_{0-t} + C_t / \lambda Z$$

in cui C_t è l'ultima concentrazione misurabile e λZ è la costante del tasso di eliminazione terminale apparente

λZ costante del tasso di eliminazione terminale apparente, in cui λZ è l'entità della pendenza della regressione lineare del profilo di concentrazione logaritmica rispetto al tempo durante la fase terminale

$t_{1/2}$ emivita di eliminazione terminale apparente (quando possibile), in cui

$$t_{1/2} = (\ln 2) / \lambda Z$$

CL/F eliminazione orale, calcolata come Dose/ $AUC_{0-\infty}$

Vd/F volume di distribuzione orale, calcolato come Dose/ $AUC_{0-\infty} \cdot \lambda Z$

C_{48} concentrazione 48 ore post-dose

I parametri farmacocinetici determinati erano: area sotto la curva concentrazione-tempo (AUC) dal tempo zero all'ultima concentrazione misurabile post-dose (AUC_{0-t}) ed estrapolata all'infinito ($AUC_{0-\infty}$), concentrazione osservata massima (C_{max}), tempo a C_{max} (t_{max}), concentrazione 48 ore post-dose (C_{48}), emivita di eliminazione terminale ($t_{1/2}$), eliminazione orale (CL/F) e costante del tasso di eliminazione terminale apparente (λZ).

I soggetti di studio sono stati definiti come presentanti compromissione renale se l'eliminazione della creatinina (CL_{CR}) era inferiore a 90 ml/min (vale a dire $CL_{CR} < 90$ ml/min) come determinato

usando la formula di Cockcroft-Gault. I soggetti sono stati raggruppati secondo il grado di disfunzione renale: lieve ($CL_{Cr} \geq 60$ e < 90 ml/min), moderata ($CL_{CR} \geq 30$ e < 60 ml/min) o grave ($CL_{CR} \geq 15$ e < 30 ml/min).

La farmacocinetica plasmatica e urinaria di migalastat è stata studiata in volontari sani e pazienti affetti da malattia di Fabry con funzione renale da normale a lievemente compromessa. Negli studi a singola dose, migalastat aveva un tasso di assorbimento moderato che raggiungeva le concentrazioni massime in approssimativamente 3 ore (intervallo, da 1 a 6 ore) dopo la somministrazione orale sull'intervallo di dose studiato. I valori di C_{max} e AUC_{0-t} medi aumentavano in una modalità proporzionale alla dose in seguito a dosi orali da 75 mg a 1250 mg di migalastat. La emivite di eliminazione medie ($t_{1/2}$) variavano da 3,04 a 4,79 ore. Le percentuali medie della dose recuperata nell'urina da dosi valutate nello studio a singola dose ascendente (SAD) erano del 32,2%, 43,0%, 49,3% e 48,5% per, rispettivamente, i gruppi di dose di 25 mg, 75 mg, 225 mg e 675 mg. Negli studi con dosi ascendenti multiple, è stato osservato soltanto un accumulo minimo di migalastat plasmatico. In uno studio TQT, migalastat era negativo per l'effetto sulla ripolarizzazione cardiaca a singole dosi di 150 mg e 1250 mg (Johnson et al., Clin Pharmacol Drug Dev. 2013 Apr;2(2):120-32).

In questo studio di compromissione renale a singola dose condotto in soggetti non affetti da malattia di Fabry, le concentrazioni plasmatiche di migalastat HCl 150 mg a singola dose aumentavano con l'aumentare del grado di insufficienza renale rispetto ai soggetti con

funzione renale normale. In seguito a una singola dose orale di migalastat HCl 150 mg, l' $AUC_{0-\infty}$ di migalastat plasmatico media aumentava nei soggetti con compromissione renale lieve, moderata o grave di, rispettivamente, 1,2 volte, 1,8 volte e 4,5 volte rispetto ai soggetti di controllo sani. Gli aumenti dei valori di $AUC_{0-\infty}$ di migalastat plasmatico erano statisticamente significativi nei soggetti con compromissione renale moderata o grave ma non nei soggetti con compromissione renale lieve in seguito alla somministrazione di una singola dose rispetto ai soggetti con funzione renale normale. Il t_{max} di migalastat era leggermente ritardato nel gruppo grave; la C_{max} non era aumentata attraverso nessuno dei gruppi in seguito a una singola dose orale di migalastat HCl 150 mg in soggetti con gradi variabili di compromissione renale rispetto ai soggetti di controllo sani. I livelli di C_{48} di migalastat plasmatico erano elevati nei soggetti con compromissione renale moderata (prevalentemente da soggetti con $Cr_{CL} < 50$ ml/min) e grave rispetto ai soggetti di controllo sani. Il $t_{1/2}$ di migalastat nel plasma aumentava a mano a mano che aumentava il grado di compromissione renale (media aritmetica [min, max]: 6,4 [3,66, 9,47], 7,7 [3,81, 13,8], 22,2 [6,74, 48,3] e 32,3 [24,6, 48,0] ore) nei soggetti con funzione renale normale e in quelli con, rispettivamente, compromissione renale lieve, moderata o grave. La CL/F media diminuiva con l'aumentare del grado di insufficienza renale e variava da 12,1 a 2,7 l/ora da una compromissione renale da lieve a grave (Johnson, et al., American College of Clinical Pharmacology 4.4 (2015): 256-261).

L'eliminazione di migalastat diminuiva con l'aumentare della compromissione renale, determinando aumenti di $t_{1/2}$, $AUC_{0-\infty}$ e C_{48} di migalastat HCl plasmatico rispetto ai soggetti con funzione renale normale. L'incidenza di eventi avversi era paragonabile attraverso tutti i gruppi di funzione renale.

In seguito a una singola dose orale di migalastat HCl 150 mg, l'esposizione plasmatica (espressa come AUC_{0-t}) aumentava a mano a mano che aumentava il grado di compromissione renale. La Figura 1A mostra un aumento dei valori di AUC_{0-t} di migalastat a mano a mano che diminuiscono i valori di CL_{CR} . La Figura 1B mostra i profili di concentrazione di migalastat plasmatico-tempo medi (SE) per ciascun gruppo di funzione renale. I valori di BLQ sono stati inseriti come zero e inclusi nel calcolo delle medie.

Come dimostrato nella FIG. 1C, a mano a mano che la compromissione renale peggiora, i valori di AUC_{0-t} di migalastat plasmatico aumentano in una modalità non lineare. I risultati dimostravano che, a mano a mano che la compromissione renale peggiorava, l'eliminazione di migalastat plasmatico diminuiva, determinando un $t_{1/2}$ prolungato, valori di C_{48} superiori e un'esposizione plasmatica ($AUC_{0-\infty}$) complessiva superiore, in particolare nei soggetti con compromissione renale grave. Migalastat viene principalmente escreto invariato nell'urina. Pertanto, un aumento dell'esposizione di migalastat plasmatico è coerente con un peggioramento della compromissione renale.

Conclusioni: L'eliminazione di migalastat plasmatico diminuiva a mano a mano che il grado di compromissione renale aumentava.

Un sommario dei risultati farmacocinetici è mostrato nella Tabella 3 di seguito.

Tabella 3

Farmacocinetica	Unità	Gruppo di funzione renale			
		Normale (N=8)	Lieve (N=8)	Moderata (N=8)	Grave (N=8)
AUC _{0-t}	(ng·ora/ml)	12306 (27,9)	14389 (31,1)	22126 (42,8)	53070 (27,0)
AUC _{0-∞}	(ng·ora/ml)	12397 (27,7)	14536 (30,7)	22460 (42,2)	56154 (24,9)
C _{max}	(ng/ml)	2100 (26,0)	2191 (28,8)	1868 (32,1)	2078 (45,5)
t _{max}	(ore)	2,50 (1,50, 3,00)	2,50 (1,50, 4,00)	3,00 (1,50, 4,00)	4,27 (3,00, 8,00)
t _½	(ore)	6,42 (1,93)	7,66 (3,02)	22,2 (14,2)	32,3 (7,35)
CL/F	(L/ora)	12,1 (27,7)	10,3 (30,7)	6,68 (42,2)	2,67 (24,9)
C ₄₈	(ng/ml)	5,70 (3,63)	9,34 (7,57)	64,5 (68,1)	334 (126)

Esempio 2: Simulazioni con dose multipla su soggetti con

compromissione renale

Nello studio di compromissione renale dell'esempio 1 sono stati osservati aumenti coerenti da 2 a 4 volte dell'area sotto la curva (AUC) e della concentrazione minima di migalastat 48 ore post-dose in seguito a un dosaggio QOD (C_{48}) a valori di eGFR ≤ 35 ml/min rispetto ai soggetti con funzione renale normale.

È stato sviluppato un modello farmacocinetico di popolazione per predire le esposizioni e il tempo sopra l'IC₅₀ in pazienti affetti da malattia di Fabry con gradi variabili di compromissione renale. Questo esempio fornisce simulazioni computerizzate del dosaggio dei soggetti con compromissione renale dell'esempio 1. L'ipotesi chiave era che l'esposizione caratterizzata nei soggetti non affetti da malattia di Fabry con compromissione renale fosse identica a quella nei pazienti affetti da malattia di Fabry con compromissione renale. Il programma software era WinNonlin versione 5.2 o superiore. Le condizioni del modello sono descritte di seguito. Nell'esercizio di modellazione sono stati inclusi 11 soggetti che avevano un eGFR_{Cockcroft-Gault} regolato con BSA ≤ 35 ml/min/1,73 m²; 3 presentavano una compromissione renale moderata, ma avevano ≥ 30 ml/min/1,73 m² e ≤ 35 ml/min/1,73 m², e 8 avevano ≥ 14 ml/min/1,73 m² e < 30 ml/min/1,73 m². Lo stato stazionario è stato ipotizzato entro la 7^a dose.

È stato usato un modello a 2 compartimenti per stimare le costanti Vd e del tasso di eliminazione dai dati di singola dose. Queste stime sono state inserite in ciascun regime di simulazione di dose

molecolare.

La Figura 2 mostra i grafici di simulazione medi per il regime di dosaggio di migalastat HCl 150 mg QOD. La Tabella 4 di seguito mostra le esposizioni e i rapporti di accumulo.

La Figura 3 mostra l'AUC rispetto a C_{48} dall'esempio 1. Questo grafico a bastoncini fornisce una correlazione visiva dell'AUC rispetto alla concentrazione a C_{48} attraverso tutti i livelli di funzione renale, e dimostra che i due valori sono ben visivamente correlati.

Tabella 4

Soggetto	Gruppo di funzione renale	eGFR-Cockcroft-Gault regolato con BSA (ml/min/1,73 m²)	AUC_{0-48ore}	R_{ac48ore}
1	Moderata (≥ 30 - ≤ 35)	35,3	31920	1.12
2	Moderata (≥ 30 - ≤ 35)	35,0	35320	1.17
3	Moderata (≥ 30 - ≤ 35)	32,2	17507	1.12
4	Grave (< 30)	18,4	59178	1.42
5	Grave (< 30)	17,0	44124	1.21
6	Grave (< 30)	20,6	37409	1.28
7	Grave (< 30)	15,8	41687	1.54
8	Grave (< 30)	21,9	45790	1.29
9	Grave (< 30)	29,3	56331	1.17
10	Grave (< 30)	14,4	23732	1.45
11	Grave (< 30)	24,4	39012	1.26

Media geometrica	22,9	37256	1.27
CV%	33,8	33.4	11.1

Esempio 3: Farmacocinetica di migalastat in pazienti affetti da malattia di Fabry con compromissione renale

La modellazione computerizzata di cui sopra fornisce scenari per l'esposizione di migalastat plasmatico, ma non tiene conto della compromissione renale nei pazienti affetti da malattia di Fabry. Ossia, i dati non includono il componente farmacodinamico (liso-Gb₃ plasmatica). Pertanto, sono stati valutati due pazienti affetti da malattia di Fabry con compromissione renale. Un paziente (P1) presentava una compromissione renale moderata, mentre l'altro paziente (P2) presentava una compromissione renale grave. La Tabella 5 di seguito mostra la concentrazione di migalastat plasmatico per P1 rispetto a uno studio di pazienti affetti da malattia di Fabry naive alla ERT e soggetti con compromissione moderata dello studio di compromissione renale dell'esempio 1. Vi sono due serie di misurazioni della concentrazione di migalastat acquisite a distanza di 6 mesi, e il paziente era stato precedentemente trattato con migalastat. La Tabella 6 mostra informazioni simili per P2, eccetto rispetto ai pazienti con compromissione grave dello studio di compromissione renale dell'esempio 1. Lo studio di pazienti naive alla ERT è stato eseguito in pazienti affetti da malattia di Fabry con mutazioni suscettibili in cui la farmacocinetica di popolazione è stata effettuata da un campionamento ematico sparso. Il confronto con i risultati derivanti dallo studio di pazienti

naive alla ERT consente il confronto della farmacocinetica nella popolazione affetta da malattia di Fabry con pazienti affetti da malattia di Fabry prevalentemente normali, ma alcuni con compromissione lieve e qualcuno con compromissione moderata. Nessuno dei pazienti nello studio di pazienti naive alla ERT presentava una compromissione renale grave poiché questi pazienti sono stati esclusi dallo studio.

Tabella 5

Ora Nominal e	Tempo (ore)	Conc di migalast at (ng/ml)	Conc. di migalast at 6 mesi dopo (ng/ml)	Confronto con la farmacocineti ca dello studio di pazienti naive alla ERT	Confronto con l'esempio 1 Compromissio ne moderata
0	Predos e	19,9	36.4	8.70	64,5 (105,6%)
3	3 ore dopo	1620	2160	1180 (31,0%)	1868 (29,7%)
24	24 ore dopo	168	211	-	239 (85,1%)
48	48 ore dopo	41,8	62.4	8.70	64,5 (105,6%)

Tabella 6

Ora Nomina le	Temp o Testo	Occasio ne	Concentrazio ne di migalastat (ng/ml)	Confronto con la farmacocineti ca di popolazione dello studio di pazienti naive alla ERT	Confronto con l'esempio 1 Compromissio ne grave
2	2 ore	1	564	-	1549 (59,3%)
48	48 ore	1	322	8.70	334 (38,2%)
24	24 ore	2	569	-	770 (26,5%)
48	48 ore	2	260	8.70	334 (38,2%)

Come osservato dalla Tabella 5, la concentrazione a C_{48} , sebbene aumentata del 49%, rimane simile ai soggetti non affetti da malattia di Fabry dell'esempio 1 con compromissione renale moderata. La C_{max} era aumentata del 33%, ma rimane simile all'esempio 1. La C_{24} è simile all'esempio 1 per la compromissione renale moderata. Anche l'eGFR_{MDRD} rimane entro l'intervallo per la compromissione moderata (32 ml/min).

Le percentuali in parentesi sono coefficienti di variazione, che

sono relativamente elevati, corrispondenti alla variabilità delle concentrazioni al tempo 0 ore o al tempo 48 ore. Questo risultato è probabilmente dovuto al fatto che metà dei soggetti dell'esempio 1 con compromissione renale moderata aveva basse concentrazioni e metà di essi concentrazioni elevate.

Le concentrazioni a 48 ore sono superiori a quelle a 0 ore per P1 (terza e quarta colonna), ma, per una persona con compromissione moderata dell'esempio 1, la concentrazione a 48 ore è identica a quella a 0 ore. Questo perché ai tempi 0 e 48 sono stati acquisiti campioni ematici separati in P1. Tuttavia, nell'esempio 1 sono stati usati risultati di simulazione di modellazione a dose ripetuta derivanti dai dati di singola dose, pertanto i valori sono gli stessi.

Tendenze simili possono essere osservate dalla Tabella 6. Di conseguenza, le Tabelle 5 e 6 confermano una simile farmacocinetica di migalastat in pazienti affetti da malattia di Fabry e non affetti da malattia di Fabry che presentano una compromissione renale simile.

La Figura 4 mostra le concentrazioni minime di migalastat plasmatico (C_{48}) dei pazienti affetti da malattia di Fabry rispetto allo studio di compromissione renale dell'esempio 1. La Figura 5 mostra le esposizioni dello studio di compromissione renale medie (SD) rispetto alle AUC stimate dei pazienti affetti da malattia di Fabry. Come osservato dalla figura, P1 e P2 seguivano la tendenza generale dei risultati dello studio di compromissione renale nei pazienti non affetti da malattia di Fabry.

B

La Tabella 7 di seguito mostra la liso-Gb₃/eGFR per P1.

Tabella 7

<u>Visite</u>	<u>Liso-Gb₃ (nM/l)</u>	<u>eGFR (MDRD), IDMS</u> <u>tracciabile</u>
Visita a 18 mesi	11,1	42
Visita a 24 mesi	13,1	37
Visita a 30 mesi	10,8	Non disponibile
Visita a 34 mesi	9,3	32

Nonostante il declino continuato della funzione renale a un eGFR di 32 ml/min/1,73 m², liso-Gb₃ plasmatica non ha mostrato cambiamenti clinicamente rilevanti dalle visite precedenti, e le concentrazioni di migalastat plasmatico rimangono simili a quelle osservate nei pazienti non affetti da malattia di Fabry con compromissione renale moderata.

Questo studio dimostra che le tendenze di compromissione renale e farmacocinetica nei pazienti affetti da malattia di Fabry sono correlate alle tendenze dei pazienti non affetti da malattia di Fabry.

Esempio 4: Simulazioni aggiuntive su soggetti con compromissione renale

Questo esempio fornisce simulazioni computerizzate aggiuntive del dosaggio di migalastat dei soggetti con compromissione renale dell'esempio 1.

Le Figure 6A-D mostrano la concentrazione di migalastat mediana e osservata simulata rispetto al tempo in, rispettivamente, soggetti normali con compromissione renale grave, lieve e moderata. La

Tabella 8 di seguito mostra i dati:

Tabella 8

Gruppo di funzione renale (intervallo CL_{CR} ml/min), N	C_{max}^a (ng/ml)	AUC_{0-∞}^a (ore*ng/ml)	Rapporto o AUC	t_{1/2}^c (ore)
Normale (>=90), 8	2270 (37,6)	12808 (31,3)	-	6,2 (1,6)
Lieve (>=60-<90), 8	2278 (22,5)	15359 (25,2)	1,2	8,0 (2,8)
Moderata (>=30-<60), 8	2058 (47,1)	23897 (38,9)	1,9	23,0 (13,3)
Grave (<30), 4	2122 (29,1)	61208 (23,1)	4,8	32,5 (2,4)

^a Media geometrica (CV%)

^c Media (SD)

Le Figure 7A-D mostrano, rispettivamente, C_{max}, AUC, C_{min} e C₄₈ simulate per soggetti normali, con compromissione renale lieve, moderata e grave.

Le Figure 8A-D mostrano la predizione di stato stazionario per QOD. La linea tratteggiata è il valore medio derivante dallo studio QT. Le Figure 9A-D mostrano, rispettivamente, C_{max}, AUC, C_{min} e C₄₈ per la stessa simulazione.

Esempio 5: Risultati clinici della terapia con migalastat in pazienti affetti da malattia di Fabry con compromissione renale e/o

proteinuria elevata

Come descritto sopra, sono stati condotti vari studi usando 150 mg di migalastat cloridrato a giorni alterni (QOD) in pazienti affetti da malattia di Fabry. Uno studio era una sperimentazione di 24 mesi, includente un periodo di 6 mesi in doppio cieco controllato con placebo, in 67 pazienti naive alla ERT. L'altro studio era una sperimentazione di 18 mesi controllata con agente attivo in 57 pazienti già trattati con ERT con un'estensione in aperto (OLE) di 12 mesi. Sia lo studio di pazienti naive alla ERT sia quello di pazienti già trattati con ERT includevano pazienti affetti da malattia di Fabry aventi un eGFR di ≥ 30 ml/min/1,73 m². I disegni di studio per questi studi sono mostrati nelle Figure 10A-B.

Nello studio di pazienti già trattati con ERT, i parametri di efficacia primari erano i cambiamenti annualizzati (ml/min/1,73 m²/anno) dal basale fino al mese 18 del GFR misurato usando l'eliminazione di ioexolo (mGFR_{ioexolo}) e dell'eGFR usando la formula della Collaborazione epidemiologica per la malattia renale cronica (CKD-EPI) (eGFR_{CKD-EPI}). Il cambiamento annualizzato dell'eGFR è stato anche calcolato usando la modifica della dieta nella malattia renale (eGFR_{MDRD}).

Nello studio di pazienti naive alla ERT, il parametro di efficacia primario erano le inclusioni di GL-3 per capillare interstiziale renale. Anche la funzione renale è stata valutata mediante mGFR_{ioexolo}, eGFR_{CKD-EPI} ed eGFR_{MDRD}.

Un'analisi post-hoc dei dati derivanti dallo studio di pazienti naive alla ERT esaminava il tasso di cambiamento annualizzato di eGFR_{CKD-}

EPI nei sottogruppi in base all'eGFR al basale per pazienti suscettibili con compromissione renale moderata (da 30 a <60 ml/min/1,73 m²), compromissione renale lieve (da 60 a <90 ml/min/1,73 m²) e funzione renale normale (≥90 ml/min/1,73 m²). Il tasso di cambiamento annualizzato di eGFR_{CKD-EPI} dal basale a 18/24 mesi è mostrato nella Figura 11. Come può essere osservato dalla Figura 11, i pazienti con compromissione renale moderata avevano un tasso di cambiamento annualizzato medio ± SEM di eGFR_{CKD-EPI} di $-0,7 \pm 3,97$ ml/min/1,73 m²/anno, i pazienti con compromissione renale lieve avevano un tasso di cambiamento annualizzato medio di eGFR_{CKD-EPI} di $-0,8 \pm 1,01$ ml/min/1,73 m²/anno e i pazienti con funzione renale normale avevano un tasso di cambiamento annualizzato medio di eGFR_{CKD-EPI} di $0,2 \pm 0,90$ ml/min/1,73 m²/anno. Questi dati mostrano che con il trattamento con migalastat veniva osservata una stabilizzazione della funzione renale indipendentemente dall'eGFR basale.

Un'analisi post-hoc dei dati derivanti dallo studio di pazienti già trattati con ERT esaminava il tasso di cambiamento annualizzato di eGFR_{CKD-EPI} e mGFR_{ioexolo} nei sottogruppi in base all'eGFR al basale per pazienti con compromissione renale lieve/moderata (da 30 a <90 ml/min/1,73 m²) e funzione renale normale (≥90 ml/min/1,73 m²). I tassi di cambiamento annualizzato dal basale a 18 mesi per i pazienti in terapia con migalastat (pazienti con mutazioni suscettibili) ed ERT sono mostrati nelle Figure 12A-B rispettivamente per eGFR_{CKD-EPI} e mGFR_{ioexolo}. Come può essere osservato dalla Figura 12A, i pazienti con

funzione renale normale avevano un tasso di cambiamento annualizzato medio di $eGFR_{CKD-EPI}$ di $-0,4 \text{ ml/min/1,73 m}^2/\text{anno}$ in terapia con migalastat e di $-1,03 \text{ ml/min/1,73 m}^2/\text{anno}$ sottoposti a ERT. I pazienti con compromissione renale lieve o moderata avevano un tasso di cambiamento annualizzato medio di $eGFR_{CKD-EPI}$ di $-3,33 \text{ ml/min/1,73 m}^2/\text{anno}$ in terapia con migalastat e di $-9,05 \text{ ml/min/1,73 m}^2/\text{anno}$ sottoposti a ERT. Come può essere osservato dalla Figura 12B, i pazienti con funzione renale normale avevano un tasso di cambiamento annualizzato medio di $mGFR_{ioexolo}$ di $-4,35 \text{ ml/min/1,73 m}^2/\text{anno}$ in terapia con migalastat e di $-3,24 \text{ ml/min/1,73 m}^2/\text{anno}$ sottoposti a ERT. I pazienti con compromissione renale lieve o moderata avevano un tasso di cambiamento annualizzato medio di $mGFR_{ioexolo}$ di $-3,51 \text{ ml/min/1,73 m}^2/\text{anno}$ in terapia con migalastat e di $-7,96 \text{ ml/min/1,73 m}^2/\text{anno}$ sottoposti a ERT. Questi dati mostrano che la terapia con migalastat e la ERT avevano effetti favorevoli paragonabili sulla funzione renale usando entrambi i metodi di GFR.

Un'altra analisi post-hoc dei dati derivanti dallo studio di pazienti già trattati con ERT esaminava il tasso di cambiamento annualizzato di $eGFR_{CKD-EPI}$ nei sottogruppi in base all' $eGFR$ al basale per i pazienti con compromissione renale moderata (da 30 a $<60 \text{ ml/min/1,73 m}^2$), compromissione renale lieve (da 60 a $<90 \text{ ml/min/1,73 m}^2$) e funzione renale normale ($\geq 90 \text{ ml/min/1,73 m}^2$). I tassi di cambiamento annualizzato dal basale a 18 mesi per i pazienti in terapia con migalastat (pazienti con mutazioni suscettibili) ed ERT sono mostrati nelle Figure

13. Come può essere osservato dalla Figura 13, i pazienti con compromissione renale normale avevano un tasso di cambiamento annualizzato medio \pm SE di $eGFR_{CKD-EPI}$ di $-2,0 \pm 0,57$ ml/min/1,73 m²/anno in terapia con migalastat e di $-2,1 \pm 1,60$ ml/min/1,73 m²/anno sottoposti a ERT. I pazienti con compromissione renale lieve avevano un tasso di cambiamento annualizzato medio \pm SE di $eGFR_{CKD-EPI}$ di $-0,2 \pm 1,25$ ml/min/1,73 m²/anno in terapia con migalastat e di $-7,3 \pm 6,01$ ml/min/1,73 m²/anno sottoposti a ERT. I pazienti con compromissione renale moderata avevano un tasso di cambiamento annualizzato medio \pm SE di $eGFR_{CKD-EPI}$ di $-4,5 \pm 2,68$ ml/min/1,73 m²/anno in terapia con migalastat e di $1,3$ ml/min/1,73 m²/anno sottoposti a ERT. Questi dati mostrano che migalastat stabilizzava la funzione renale indipendentemente dal fatto che il paziente avesse una funzione renale normale o una compromissione renale lieve. Sebbene il numero di pazienti con compromissione renale moderata inclusi in questa analisi fosse di due (rispetto a tre per lo studio di pazienti naive alla ERT), i dati supportano l'efficacia di migalastat quando somministrato a pazienti con una qualche forma di compromissione renale.

Un'ulteriore analisi dei dati derivanti da questi studi esaminava il cambiamento annualizzato di $eGFR_{CKD-EPI}$, il LVMi, l'attività di α -Gal A nei globuli bianchi e i livelli di liso-Gb₃ plasmatica in base alla funzione renale al basale. I risultati per ciascun sottogruppo renale sono mostrati nella Tabella 9 di seguito, con i sottogruppi dello studio di pazienti naive alla ERT basati sull' $eGFR_{MDRD}$ e i sottogruppi dello studio di pazienti già

trattati con ERT basati su $mGFR_{ioexolo}$.

Tabella 9

Trattamento	Sottogruppo renale	Cambiamento dal basale, media \pm SE [n]			
		Cambiamento annualizzato di $eGFR_{CKD-EPI}$ ml/min/1,73 m ²	LVMi, g/m ²	Attività di α -Gal A nei globuli bianchi, 4 MU/ora/mg (soltanto maschi)	Liso-Gb ₃ plasmatica, nmol/l (SD invece di SE)
Naive alla ERT					
Migalastat →	da 30 a	+3,2 \pm 1,1	-5,5 \pm 10,0	+1,4 [1]	-29,0
Migalastat	<60	[2]	[2]		(41,5) [2]
0-24 mesi	\geq 60	-0,7 \pm 0,6 [20]	-9,2 \pm 5,8 [14]	+1,6 \pm 1,5 [3]	-7,7 (24,5) [14]
Placebo →	da 30 a	-2,8 \pm 2,8	-21,0 \pm	+4,0 \pm 3,0	-
Migalastat	<60	[2]	14,1 [2]	[2]	
6-24 mesi	\geq 60	+0,1 \pm 0,7 [17]	-3,2 \pm 5,6 [10]	+5,2 1,4 [5]	-20,0 (28,7) [13]
Già trattati con ERT					

B

Migalastat	da 30 a	-4,2 ± 2,7	-10,2 ± 2,4	+4,6 ± 2,3	+0,5 (0,6)
0-18 mesi	<60	[2]	[2]	[2]	[3]
	≥60	-0,4 ± 0,8	-4,8 ± 2,3	+5,5 ± 1,4	1,9 (5,8)
		[32]	[24]	[12]	[28]

Come può essere osservato dalla Tabella 9, nello studio di pazienti naïve alla ERT, liso-Gb₃ plasmatica e LVMi diminuivano e l'attività di α-Gal A nei globuli bianchi aumentava con migalastat al mese 24 in entrambi i sottogruppi renali. Inoltre, indipendentemente dalla funzione renale, nello studio di pazienti naïve alla ERT, vi era una riduzione nelle inclusioni di GL-3 nei capillari interstiziali renali dal basale al mese 6 con migalastat (eGFR <60 ml/min/1,73 m², -0,39, n=3; eGFR ≥60 ml/min/1,73 m², -0,30, n=22) ma non con il placebo (<60, 0,04, n=2; ≥60, 0,07, n=18). La Tabella 9 mostra anche che, nello studio di pazienti già trattati con ERT, il LVMi diminuiva, l'attività di α-Gal A nei globuli bianchi aumentava e liso-Gb₃ rimaneva bassa e stabile durante 18 mesi di trattamento con migalastat in entrambi i sottogruppi renali. La Tabella 9 mostra anche che la funzione renale era stabilizzata nei pazienti con un eGFR basale ≥60 ml/min/1,73 m² in entrambi gli studi di pazienti naïve alla ERT e già trattati con ERT. Questi dati supportano ulteriormente l'efficacia di migalastat quando somministrato a pazienti con una qualche forma di compromissione renale.

In aggiunta agli studi descritti sopra, altri pazienti ricevevano anche una terapia con migalastat in altri studi, come studi di ricerca della dose e/o studi di estensione a lungo termine. I pazienti che completavano

gli stessi studi erano eleggibili per continuare migalastat HCl 150 mg in aperto a giorni alterni in uno studio di estensione separato.

Sono stati ulteriormente analizzati 12 pazienti che avevano completato studi multipli. È stata usata la regressione lineare per calcolare il tasso di cambiamento annualizzato di eGFR_{CKD-EPI} dal basale. Al momento di questa analisi, il tempo medio in terapia con migalastat per questi 12 pazienti era di 8,2 (deviazione standard [SD], 0,83) anni, il tempo mediano in trattamento era di 8,4 (intervallo, 6,3-9,3) anni, e 11 pazienti ricevevano migalastat HCl 150 mg QOD per ≥17 mesi. I dati demografici basali per questi 12 pazienti sono mostrati nella Tabella 10 di seguito:

Tabella 10

Paziente	Età (anni)	Sesso	eGFR (ml/min/1,73 m²)
1	37	M	100,9
2	39	M	114,4
3	42	M	87,1
4	49	M	84,4
5	24	M	126,2
6	39	M	121,7
7	55	M	92,0
8	47	M	135,7
9	62	F	90,1
10	59	F	76,4
11	36	F	100,6

12	43	F	116,0
Media (DS)	44,3 (10,7)	-	103,8 (18,7)
Mediana (min, max)	42,5 (24, 62)	-	100,8 (76, 136)

Il cambiamento annualizzato di $eGFR_{CKD-EPI}$ per questi pazienti è mostrato nella Tabella 11 di seguito:

Tabella 11

Paziente	Tasso di cambiamento annualizzato di $eGFR_{CKD-EPI}$, ml/min/1,72 m² a
1	-0.853
2	0.584
3	-2.838
4	0.488
5	0.001
6	-2.179
7	-0.704
8	-1.09
9	-0.443
10	0.219
11	-0.342
12	-0.871
Media (CI 95%)	-0,67 (-1,32, -0,02)

^aInclude l'intera durata del trattamento con migalastat, inclusi i periodi in cui i pazienti ricevevano vari regimi di dosaggio di migalastat e periodi in cui i pazienti ricevevano migalastat HCl 150 mg a giorni alterni

Come può essere osservato dalla Tabella 11, tra questi 12 pazienti, la funzione renale rimaneva stabile (cambiamento medio annualizzato di eGFR_{CKD-EPI}, -0,67 ml/min/1,72 m² [CI 95% -1,32, -0,02]) durante l'intero periodo di trattamento con migalastat (esposizione media, 8,2 anni). Anche la funzione renale rimaneva stabile (cambiamento medio annualizzato di eGFR_{CKD-EPI}, 0,24 ml/min/1,72 m² [CI 95% -1,7, 2,2]) in un'analisi degli 11 pazienti che ricevevano migalastat HCl 150 mg QOD per ≥17 mesi (esposizione media, 4-5 anni). Gli esiti renali per questi 11 pazienti in base al sesso e ai livelli di proteinuria basali sono mostrati nella Tabella 12 di seguito:

Tabella 12

Sesso	Proteina urinaria a 24 ore basale (mg/24 ore) Categoria^a	n	Tasso di cambiamento annualizzato di eGFR_{CKD-EPI}, ml/min/1,73 m², media (CI 95%)
Tutti	Tutti	11	+0,3 [-1,7, 2,2]
Maschi	<100	3	+0,4 [-4,1, 4,9]
Maschi	100-1000	4	+2,4 [-4,0, 8,8]
Femmine	<100	2	-1,6 [-2,4, -0,9]
Femmine	100-1000	2	-1,7 [-2,0, -1,3]

Questi risultati mostrano che è stata dimostrata una

stabilizzazione della funzione renale in pazienti maschi e femmine con malattia di Fabry e mutazioni suscettibili trattati con migalastat fino a 9 anni. Gli effetti sono stati osservati su un ampio intervallo di proteinuria basale.

È stata effettuata un'altra analisi su pazienti che avevano partecipato in studi multipli per l'uso di migalastat. I tassi di cambiamento annualizzati di $eGFR_{CKD-EPI}$ ed $eGFR_{MDRD}$ sono stati calcolati per i pazienti in base alla proteinuria al basale (<100, 100-1000, >1000 mg/24 ore). È stato analizzato un totale di 52 pazienti naive alla ERT con mutazioni suscettibili riceventi migalastat HCl 150 mg QOD per ≥ 17 mesi. La Tabella 13 di seguito mostra la proteinuria basale e la durata di trattamento con migalastat per questi pazienti.

Tabella 13

	Maschi		Femmine	
Proteina urinaria a 24 ore basale, mg/24 ore	n	Durata, anni, mediana (min, mass)	n	Durata, anni, mediana (min, mass)
<100	3	4,8 (4,8, 4,8)	9	4,2 (2,0, 5,3)
100-1000	16	4,3 (1,5, 4,9)	19	3,5 (1,5, 5,0)
>1000	2	3,6 (3,0, 4,3)	3	3,7 (1,5, 4,1)

Come può essere osservato dalla Tabella 13, la maggior parte dei pazienti (67%) aveva livelli di proteinuria tra 100-1000 mg/24 ore al basale; il 23% dei pazienti aveva livelli di proteinuria basali <100 mg/24 ore e il 10% aveva livelli >1000 mg/24 ore. La durata di trattamento

mediana variava da 3,5 a 4,8 anni (massimo, 5,3 anni) attraverso i sottogruppi di proteinuria basale.

Il cambiamento medio annualizzato di $eGFR_{CKD-EPI}$ con trattamento con migalastat in base alla proteinuria basale per questi pazienti è mostrato nella Tabella 14 di seguito.

Tabella 14

	Maschi		Femmine	
Proteina urinaria a 24 ore basale, mg/24 ore	n	Tasso di cambiamento di $eGFR_{CKD-EPI}$ annualizzato, ml/min/1,73 m². Media (SE)	n	Tasso di cambiamento di $eGFR_{CKD-EPI}$ annualizzato, ml/min/1,73 m², media (SE)
<100	3	0,4 (1,0)	9	-0,9 (0,4)
100-1000	16	0,2 (0,8)	19	-0,3 (1,0)
>1000	2	-5,1 (0,1)	3	-2,2 (1,3)

Come può essere osservato dalla Tabella 14, $eGFR_{CKD-EPI}$ rimaneva stabile nella maggior parte dei pazienti con proteinuria basale ≤ 1000 mg/24 ore durante il trattamento con migalastat. Sono stati osservati declini di $eGFR_{CKD-EPI}$ nei pazienti con livelli di proteinuria >1000 mg/24 ore al basale.

I risultati per $eGFR_{MDRD}$ sono stati confrontati ai cambiamenti di $eGFR_{MDRD}$ riportati in letteratura per pazienti non trattati con malattia di Fabry (coorte di storia naturale; Schiffmann R et al. Nephrol Dial

Transplant. 2009;24:2102-11) e sono mostrati nella Tabella 15 di seguito:

Tabella 15

	Maschi		Femmine	
Proteina urinaria a 24 ore basale, mg/24 ore	n	Tasso di cambiamento di eGFR annualizzato, ml/min/m², media (SEM)	n	Tasso di cambiamento di eGFR annualizzato, ml/min/m², media (SEM)
Coorte migalastat				
<100	3	1,2 (1,2)	9	-0,9 (0,5)
100-1000	16	0,9 (1,0)	19	1,3 (1,5)
>1000	2	-4,3 (0,1)	3	-1,7 (1,1)
Coorte di storia naturale (Schiffmann et al. 2009)				
<100	18	-1,6 (1,5)	7	-0,6 (2,6)
100-1000	21	-3,3 (1,8)	17	-2,2 (2,2)
>1000	22	-6,9 (1,5)	5	-4,6 (2,3)

Come mostrato nella Tabella 15, il cambiamento annualizzato medio di eGFR era complessivamente inferiore nei pazienti trattati con migalastat rispetto a quello osservato nella coorte di storia naturale attraverso le categorie di proteinuria. Mentre l'eGFR medio declinava in tutti i sottogruppi non trattati, sono stati osservati aumenti con migalastat nei pazienti con proteinuria basale <100 mg/24 ore (maschi) e 100-1000 mg/24 ore (maschi e femmine). Indipendentemente dal trattamento,

l'eGFR diminuiva nei pazienti con proteinuria basale >1000 mg/24 ore; tuttavia, i pazienti trattati con migalastat presentavano diminuzioni inferiori rispetto alla coorte di storia naturale. Pertanto, il trattamento con migalastat a lungo termine era generalmente associato a una funzione renale stabile nei pazienti con malattia di Fabry e mutazioni suscettibili, indipendentemente dai livelli di proteinuria basali.

La letteratura brevettuale e scientifica indicata nella presente stabilisce la conoscenza disponibile ai tecnici del ramo.

RIVENDICAZIONI

1. Migalastat o relativo sale per uso nel trattamento della malattia di Fabry in un paziente avente una proteina α -galattosidasi A comprendente una mutazione suscettibile al saggio HEK selezionata dal gruppo costituito da N34D, N34T, G35V, I133M, F145S, P146R, L167V, L180W, R196G, M208R, I219L, Q221P, N224T, I242T, Q250R, Q250H, G261S, G261C, I303F, K326N, F337S, E358Q e G375E.

2. Migalastat o relativo sale per uso secondo la rivendicazione 1 per il trattamento della malattia di Fabry in un paziente avente compromissione renale.

3. Migalastat o relativo sale per uso secondo la rivendicazione 2 per il trattamento della malattia di Fabry in un paziente avente compromissione renale lieve o moderata.

4. Migalastat o relativo sale per uso secondo la rivendicazione 2 per il trattamento della malattia di Fabry in un paziente avente compromissione renale grave.

5. Migalastat o relativo sale per uso secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 2 a 4, in cui il paziente è un paziente già trattato con terapia di sostituzione enzimatica (ERT).

6. Migalastat o relativo sale per uso secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 2 a 4, in cui il paziente è un paziente naïve alla terapia di sostituzione enzimatica (ERT).

7. Migalastat o relativo sale per uso secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 2 a 6, in cui il paziente ha un livello di proteinuria

inferiore a 100 mg/24 ore prima dell'inizio del trattamento.

8. Migalastat o relativo sale per uso secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 2 a 6, in cui il paziente ha un livello di proteinuria da 100 a 1.000 mg/24 ore prima dell'inizio del trattamento.

9. Migalastat o relativo sale per uso secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 2 a 6, in cui il paziente ha un livello di proteinuria superiore a 1.000 mg/24 ore prima dell'inizio del trattamento.

10. Migalastat o relativo sale per uso secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 9, in cui la mutazione è selezionata dal gruppo costituito da: N34D, N34T e G35V.

11. Migalastat o relativo sale per uso secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 9, in cui la mutazione è selezionata dal gruppo costituito da: I133M, F145S, P146R, L167V e L180W.

12. Migalastat o relativo sale per uso secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 9, in cui la mutazione è selezionata dal gruppo costituito da: R196G, M208R, I219L, Q221P, N224T, I242T, Q250R e Q250H.

13. Migalastat o relativo sale per uso secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 9, in cui la mutazione è selezionata dal gruppo costituito da: G261S, G261C e I303F.

14. Migalastat o relativo sale per uso secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 9, in cui la mutazione è selezionata dal gruppo costituito da: K326N, F337S, E358Q e G375E.

*** **



Si attesta la perfetta conformità della traduzione che precede.

LEGENDA DELLE TAVOLE DEI DISEGNI

TAVOLA 1/21

Figura 1A

“Adjusted CL_{CR} ” = CL_{CR} regolata”

TAVOLA 2/21

Figura 1B

“Semi-logarithmic Scale” = “Scala semilogaritmica”

“Migalastat plasma concentration” = “Concentrazione di migalastat plasmatico”

“Time postdose (hr)” = “Tempo post-dose (ore)”

“Normal” = “Normale”

“Mild” = “Lieve”

“Moderate” = “Moderata”

“Severe” = “Grave”

Figura 1C

“ng*hr/mL” = “ng*ora/mL”

“Normal” = “Normale”

“Mild” = “Lieve”

“Moderate” = “Moderata”

“Severe” = “Grave”

“Renal Function Group” = “Gruppo di funzione renale”

TAVOLA 3/21

Figura 2

“150 mg QOD in Moderate to Severe Renal Impairment” = “150 mg QOD nella compromissione renale da moderata a grave”

“Migalastat Conc” = “Conc. di migalastat”

“Time (hr)” = “Tempo (ore)”

TAVOLA 4/21

Figura 3

“Example 1” = “Esempio 1”

“eGFR_{Cockcroft-Gault}” = “eGFR_{Cockcroft-Gault}”

“ng*hr/mL” = “ng*ora/mL”

“AUC > 2-fold NRF” = “AUC > 2 volte rispetto alla funzione renale normale”

TAVOLA 5/21

Figura 4

“Plasma Migalastat C_{48h} Conc” = “Conc C_{48h} di migalastat plasmatico”

“C_{48h} from 015 Study” = “C_{48h} dallo studio 015”

“6 months later” = “6 mesi dopo”

TAVOLA 6/21

Figura 5

“ng*hr/mL” = “ng*ora/mL”

“AUC Estimate for P2” = “Stima dell'AUC per P2”

“AUC Estimate for P1 in 1st measurement & 6mo later” = “Stima dell'AUC per P1 nella 1^a misurazione e 6 mesi dopo”

“Normal” = “Normale”

B

“Mild” = “Lieve”

“Moderate” = “Moderata”

“Severe” = “Grave”

“Renal Function Group (range mL/min)” = “Gruppo di funzione renale
(intervallo mL/min)”

TAVOLA 7/21

Figura 6A

“Normal” = “Normale”

“Migalastat Concentration” = “Concentrazione di migalastat”

“Time (hr)” = “Tempo (ore)”

Figura 6B

“Severe” = “Grave”

“Migalastat Concentration” = “Concentrazione di migalastat”

“Time (hr)” = “Tempo (ore)”

Figura 6C

“Mild” = “Lieve”

“Migalastat Concentration” = “Concentrazione di migalastat”

“Time (hr)” = “Tempo (ore)”

Figura 6D

“Moderate” = “Moderata”

“Migalastat Concentration” = “Concentrazione di migalastat”

“Time (hr)” = “Tempo (ore)”

TAVOLA 8/21

Figura 7A

“Migalastat Concentration AUC (ng h/mL)” = “Concentrazione di migalastat AUC (ng ora/mL)”

“Normal” = “Normale”

“Mild” = “Lieve”

“Moderate” = “Moderata”

“Severe” = “Grave”

“Renal Category” = “Categoria renale”

Figura 7B

“Migalastat Concentration CMAX (ng/mL)” = “Concentrazione di migalastat CMAX (ng/mL)”

“Normal” = “Normale”

“Mild” = “Lieve”

“Moderate” = “Moderata”

“Severe” = “Grave”

“Renal Category” = “Categoria renale”

Figura 7C

“Migalastat Concentration CMIN (ng/mL)” = “Concentrazione di migalastat CMIN (ng/mL)”

“Normal” = “Normale”

“Mild” = “Lieve”

“Moderate” = “Moderata”

“Severe” = “Grave”

“Renal Category” = “Categoria renale”

Figura 7D

“Migalastat Concentration C48H (ng/mL)” = “Concentrazione di migalastat C48H (ng/mL)”

“Normal” = “Normale”

“Mild” = “Lieve”

“Moderate” = “Moderata”

“Severe” = “Grave”

“Renal Category” = “Categoria renale”

TAVOLA 9/21

Figura 9A

“Normal” = “Normale”

“Migalastat Concentration” = “Concentrazione di migalastat”

“Time (hr)” = “Tempo (ore)”

Figura 9B

“Severe” = “Grave”

“Migalastat Concentration” = “Concentrazione di migalastat”

“Time (hr)” = “Tempo (ore)”

Figura 9C

“Mild” = “Lieve”

“Migalastat Concentration” = “Concentrazione di migalastat”

“Time (hr)” = “Tempo (ore)”

Figura 9D

“Moderate” = “Moderata”

“Migalastat Concentration” = “Concentrazione di migalastat”

“Time (hr)” = “Tempo (ore)”

TAVOLA 10/21

Figura 9A

“Migalastat Concentration AUC (ng h/mL)” = “Concentrazione di migalastat AUC (ng ora/mL)”

“Normal” = “Normale”

“Mild” = “Lieve”

“Moderate” = “Moderata”

“Severe” = “Grave”

“Renal Category” = “Categoria renale”

Figura 9B

“Migalastat Concentration CMAX (ng/mL)” = “Concentrazione di migalastat CMAX (ng/mL)”

“Normal” = “Normale”

“Mild” = “Lieve”

“Moderate” = “Moderata”

“Severe” = “Grave”

“Renal Category” = “Categoria renale”

Figura 9C

“Migalastat Concentration CMIN (ng/mL)” = “Concentrazione di migalastat CMIN (ng/mL)”

“Normal” = “Normale”

“Mild” = “Lieve”

“Moderate” = “Moderata”

“Severe” = “Grave”

“Renal Category” = “Categoria renale”

Figura 9D

“Migalastat Concentration C48H (ng/mL)” = “Concentrazione di migalastat C48H (ng/mL)”

“Normal” = “Normale”

“Mild” = “Lieve”

“Moderate” = “Moderata”

“Severe” = “Grave”

“Renal Category” = “Categoria renale”

TAVOLA 11/21

Figura 10A

“ERT-Naïve Study Design” = “Disegno dello studio di pazienti naïve alla ERT”

“Kidney Biopsy” = “Biopsia renale”

“Baseline” = “Basale”

“Month *” = “Mese *”

“All patients” = “Tutti i pazienti”

“Amenable” = “Suscettibile”

“Screening and Randomization 1:1” = “Screening e randomizzazione 1:1”

“Migalastat 150 mg QOD” = “Migalastat 150 mg QOD”

“Double-Blind” = “Doppio cieco”

“Open-Label” = “In aperto”

“Open-Label Extension” = “Estensione in aperto”

“Completed Study” = “Studio completato”

“180 screened” = “180 sottoposti a screening”

“67 randomized, stratified by sex” = “67 randomizzati, stratificati per sesso”

“Amenable Patients” = “Pazienti suscettibili”

“Option to Enroll in Open-Label Extension” = “Opzione di arruolarsi nell'estensione in aperto”

“Amenability was determined using the CLP-validated HEK assay, which became available during the phase 3 study, replacing a preliminary HEK assay used for enrolling patients.” = “La suscettibilità è stata determinata usando il saggio HEK validato da CLP, che è diventato disponibile durante lo studio di fase 3, sostituendo un saggio HEK preliminare usato per arruolare i pazienti.”

TAVOLA 12/21

Figura 10B

“ERT-Experienced Study Design” = “Disegno dello studio di pazienti già trattati con ERT”

“Baseline” = “Basale”

“Month *” = “Mese *”

“Completed Mo 18” = “Mese 18 completato”

“All patients” = “Tutti i pazienti”

“Amenable” = “Suscettibile”

“Screening and Randomization 1:1” = “Screening e randomizzazione 1:1”

“Migalastat 150 mg QOD” = “Migalastat 150 mg QOD”

“Open-Label” = “In aperto”

“Open-Label Extension” = “Estensione in aperto”

“Completed Study” = “Studio completato”

“68 screened” = “180 sottoposti a screening”

“8 did not meet inclusion criteria” = “8 non soddisfacevano i criteri di inclusione”

“60 randomized, stratified by sex and proteinuria” = “60 randomizzati, stratificati per sesso e proteinuria”

“Agalsidase alfa or Agalsidase beta” = “Agalsidasi alfa o Agalsidasi beta”

“All treated patients” = “Tutti i pazienti trattati”

“Option to Enroll in Open-Label Extension” = “Opzione di arruolarsi nell'estensione in aperto”

“Amenability was determined using the CLP-validated HEK assay, which became available during the study, replacing a preliminary HEK assay used for enrolling patients.” = “La suscettibilità è stata determinata usando il saggio HEK validato da CLP, che è diventato disponibile durante lo studio, sostituendo un saggio HEK preliminare usato per arruolare i pazienti.”

TAVOLA 13/21

Figura 11

“Migalastat Stabilized Renal Function Regardless of Baseline eGFR (patients with amenable mutations)” = “Migalastat stabilizzava la funzione

renale indipendentemente dall'eGFR basale (pazienti con mutazioni suscettibili)”

“Annualized Rate of Change of eGFR_{CKD-EPI} By Subgroup” = “Tasso di cambiamento annualizzato di eGFR_{CKD-EPI} per sottogruppo”

“Annualized Rate of Change” = “Tasso di cambiamento annualizzato”

“Mean ± SEM” = “Media ± SEM”

“30 to <60” = “da 30 a <60”

“60 to <90” = “da 60 a <90”

“Baseline Renal Function” = “Funzione renale basale”

TAVOLA 14/21

Figura 12

“At Month 18, Migalastat and ERT Had Comparable favorable Effects on Renal Function using both GFR Methods (patients with amenable mutations)” = “Al mese 18, Migalastat ed ERT avevano effetti favorevoli paragonabili sulla funzione renale usando entrambi i metodi di GFR (pazienti con mutazioni suscettibili)”

“eGFR_{iohexol}” = “eGFR_{ioexolo}”

“All Patients” = “Tutti i pazienti”

“Baseline eGFR” = “eGFR basale”

“Annualized LS Mean Change” = “Cambiamento medio dei minimi quadrati (Least Squares, LS) annualizzato”

“Difference” = “Differenza”

“LS mean and 95% CI based on ANCOVA that includes treatment, baseline GFR, sex, age, and 24-hour urine protein.” = “Minimi quadrati

medi e CI 95% in base a un ANCOVA che include trattamento, GFR basale, sesso, età e proteina urinaria a 24 ore.” =

“LS = least-squares.” “LS = minimi quadrati.”

TAVOLA 15/21

Figura 13

“Annualized Rate of Change of eGFR_{CKD-EPI} By Baseline eGFR” =
“Tasso di cambiamento annualizzato di eGFR_{CKD-EPI} in base all'eGFR basale”

“Annualized Rate of Change” = “Tasso di cambiamento annualizzato”

“Mean ± SEM” = “Media ± SEM”

“30 to <60” = “da 30 a <60”

“60 to <90” = “da 60 a <90”

“Baseline Renal Function” = “Funzione renale basale”

“Inconclusive due to low n” = “Inconcludente a causa del n. basso”

*** **

Si attesta la perfetta conformità della traduzione che precede.

B

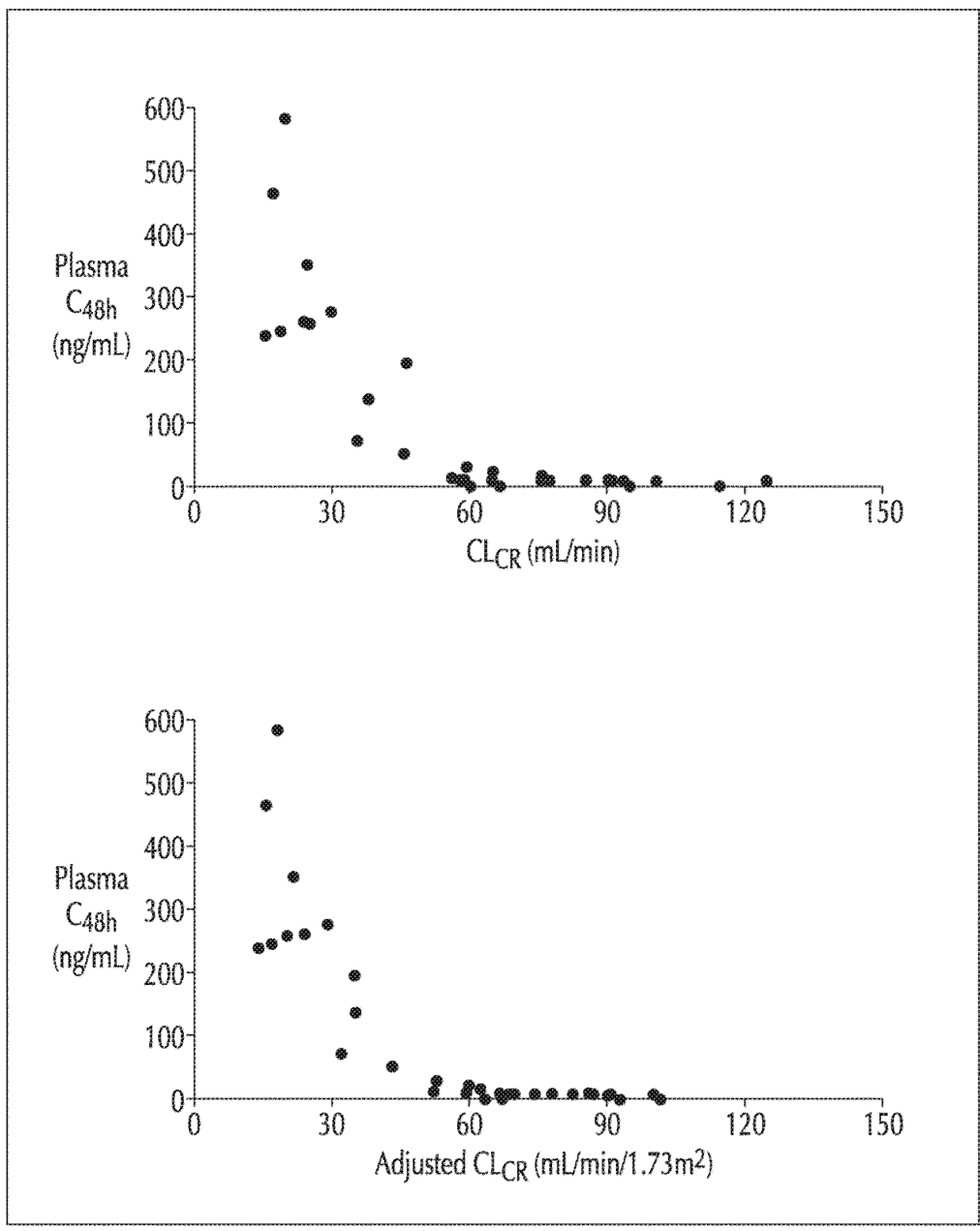


FIG. 1A

B

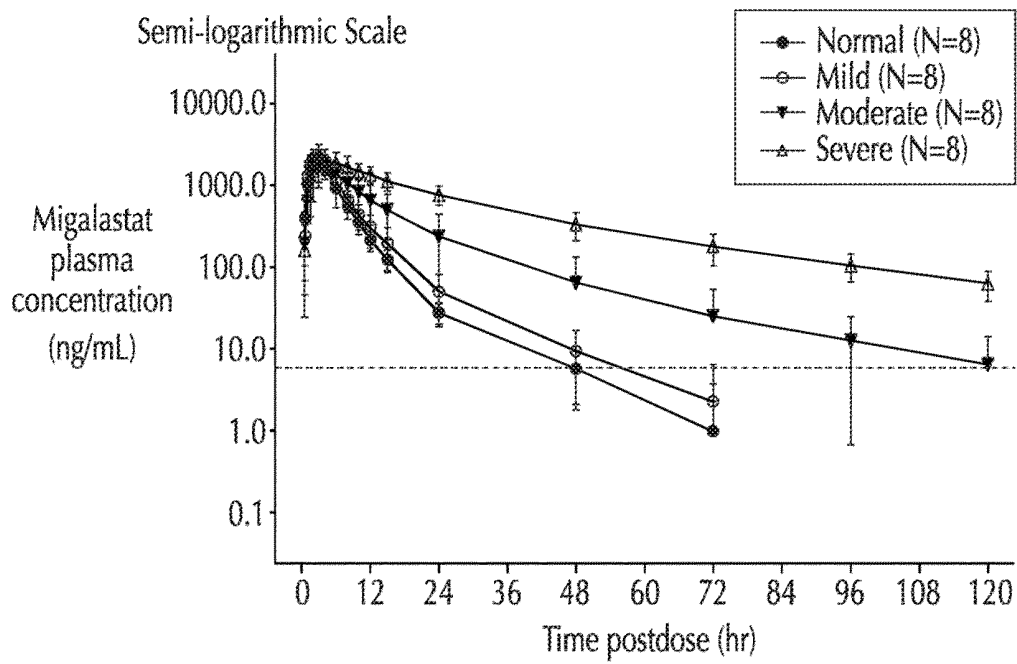


FIG. 1B

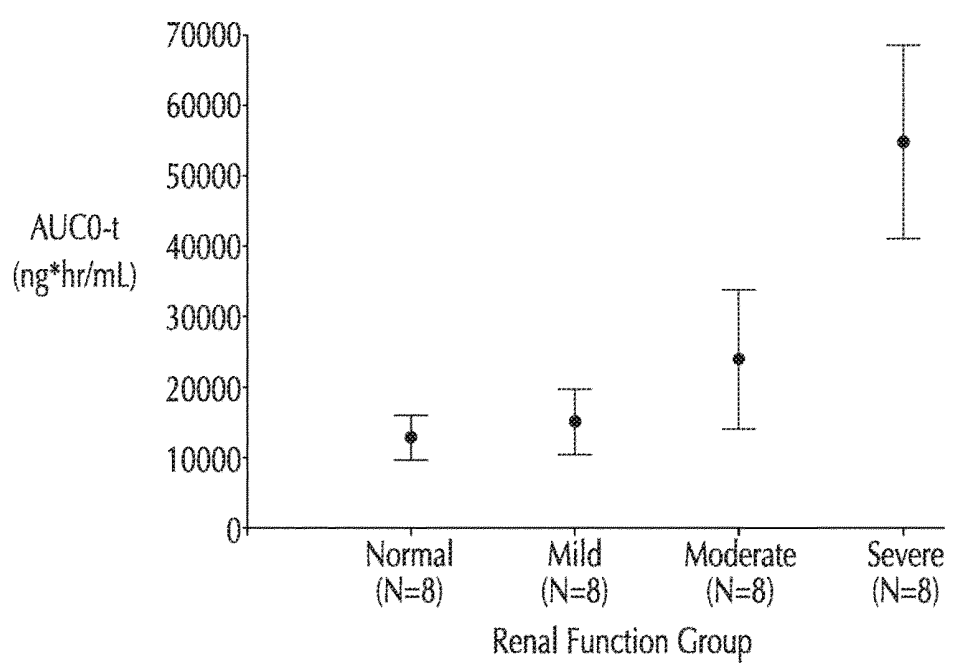


FIG. 1C

**150 mg QOD in Moderate to Severe Renal Impairment
(≤ 35 mL/min/1.73m²)**

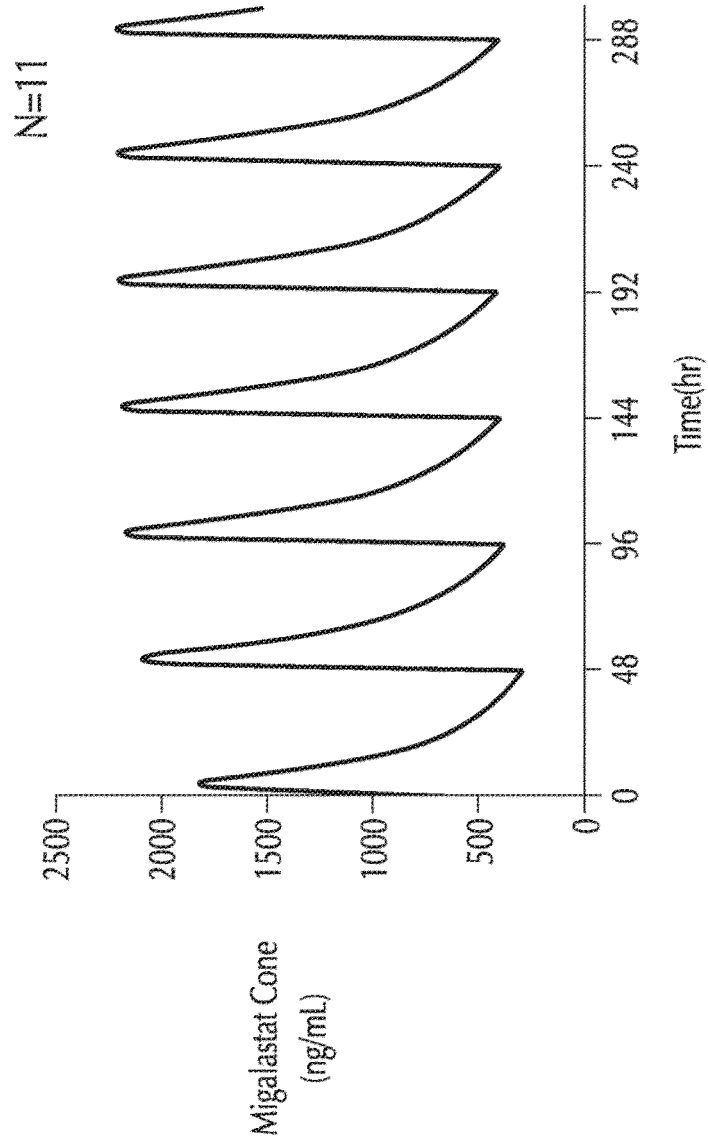


FIG. 2

R

FB

Example 1

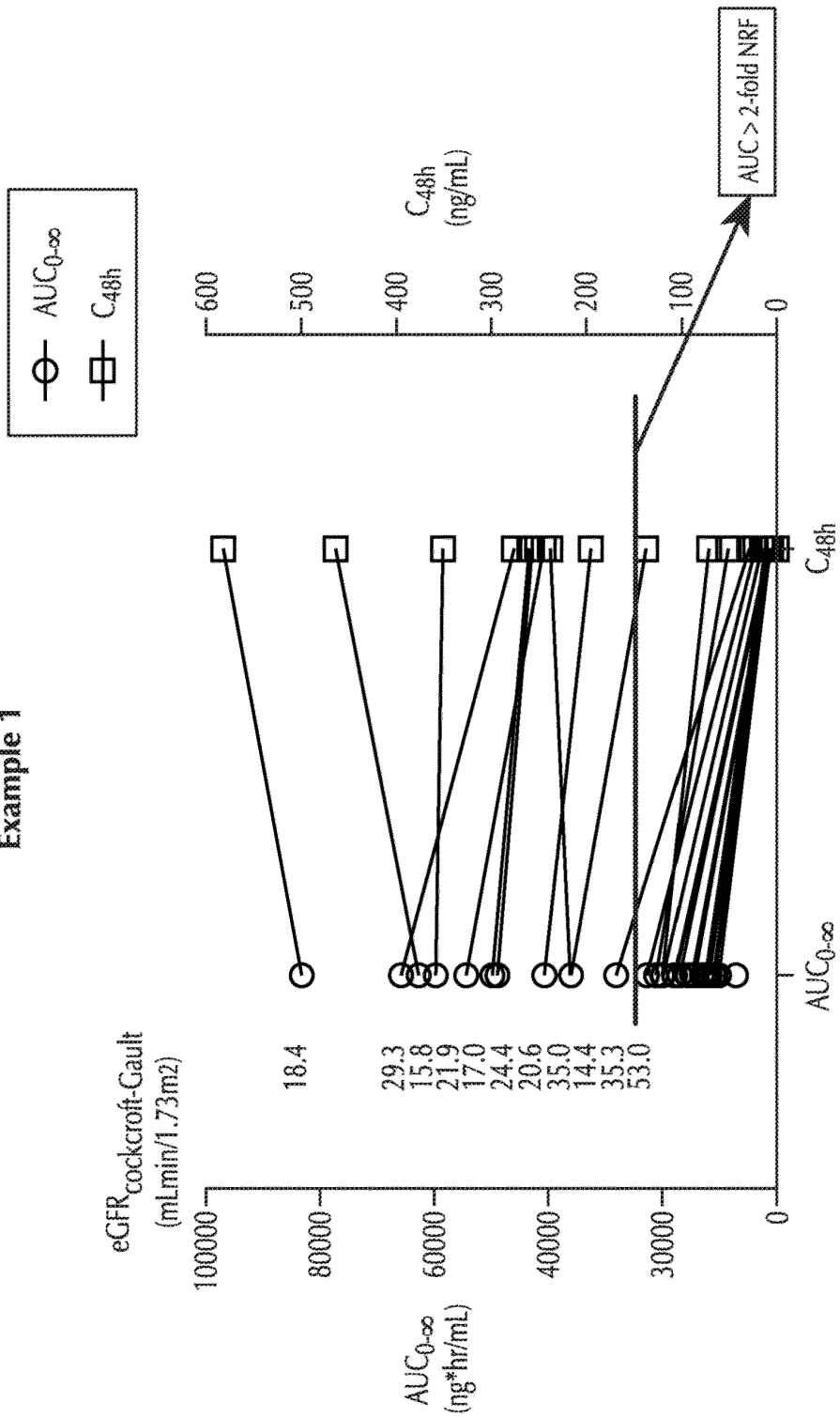


FIG. 3

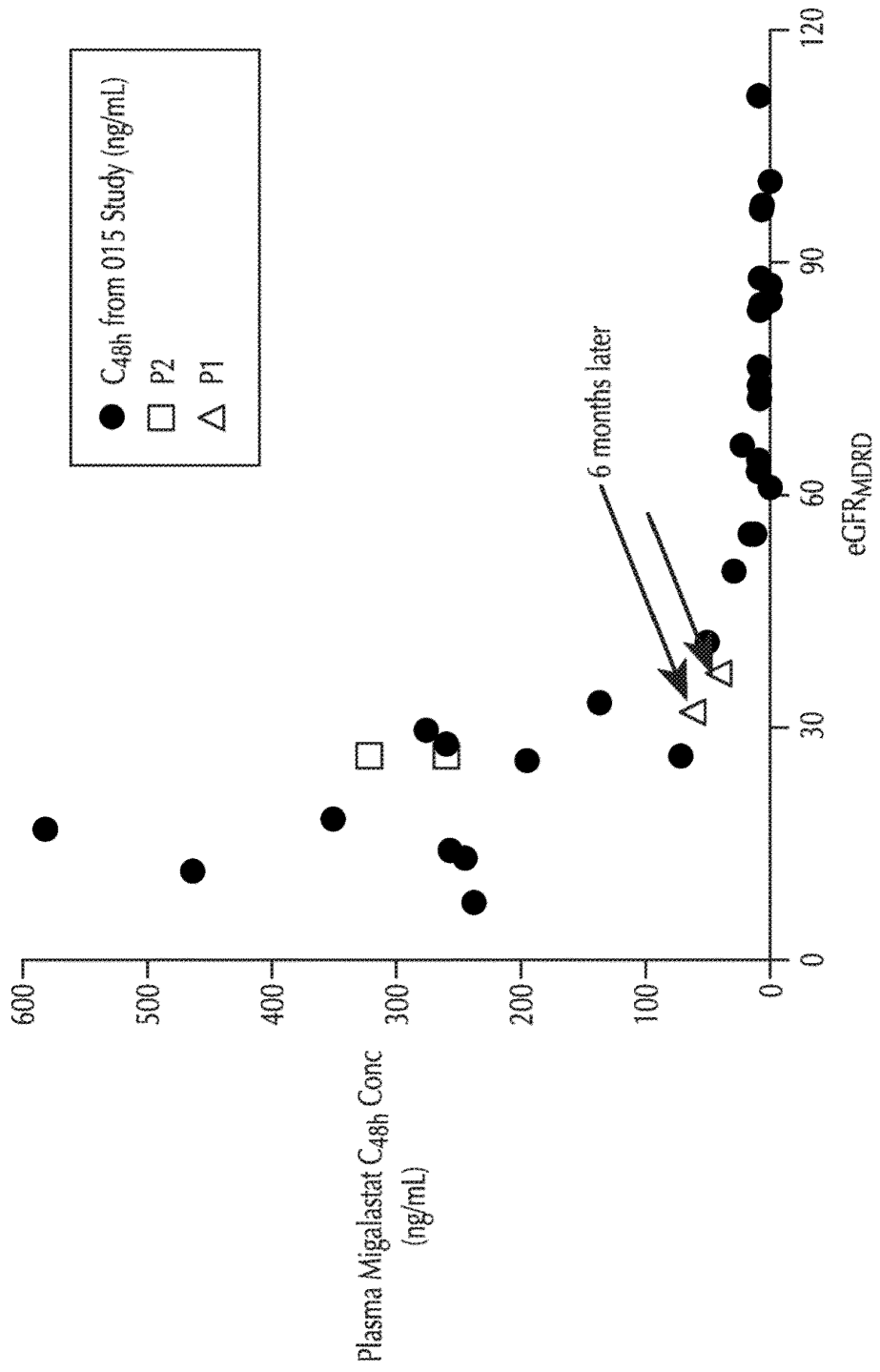


FIG. 4

B

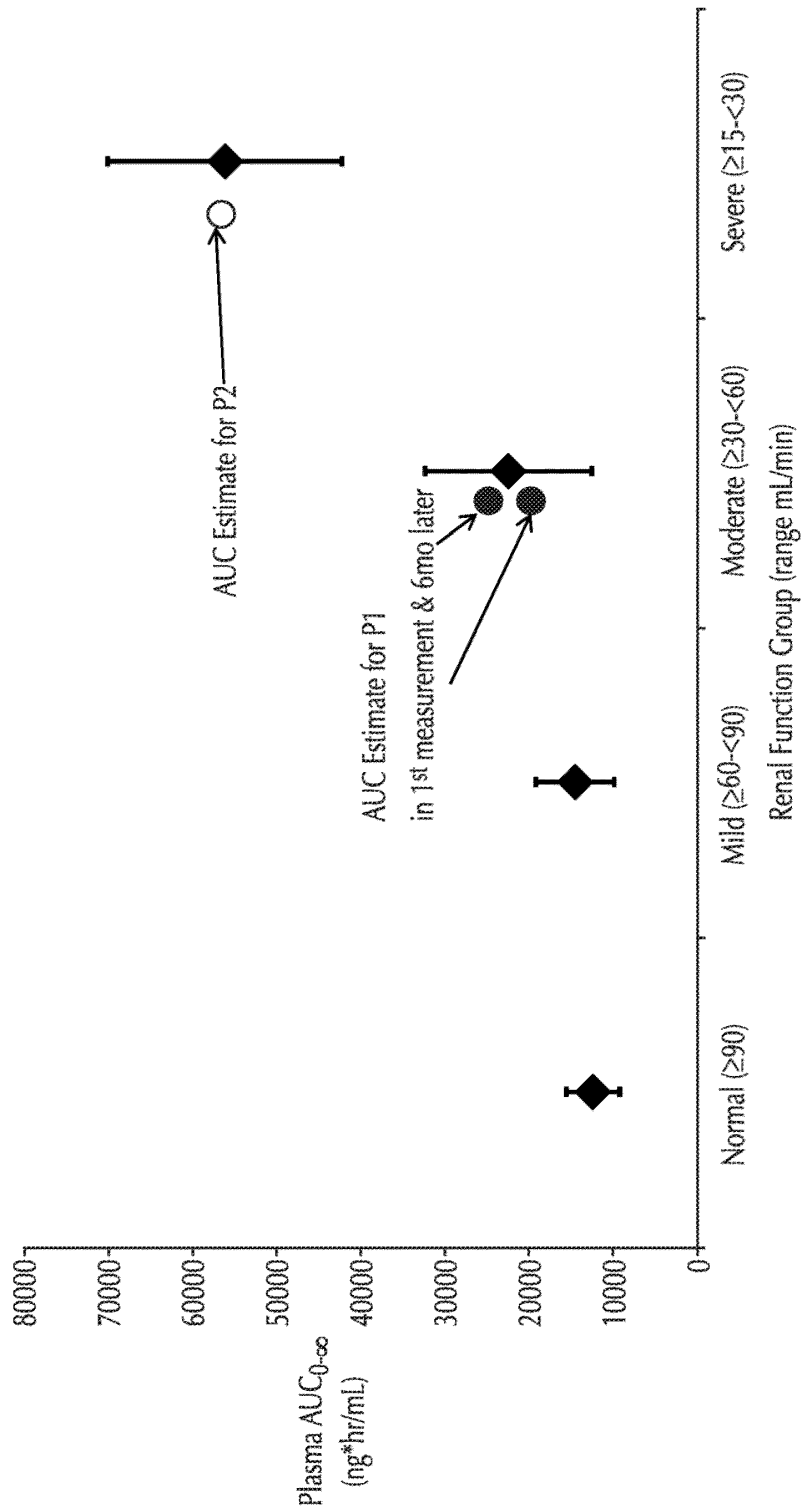


FIG. 5

B

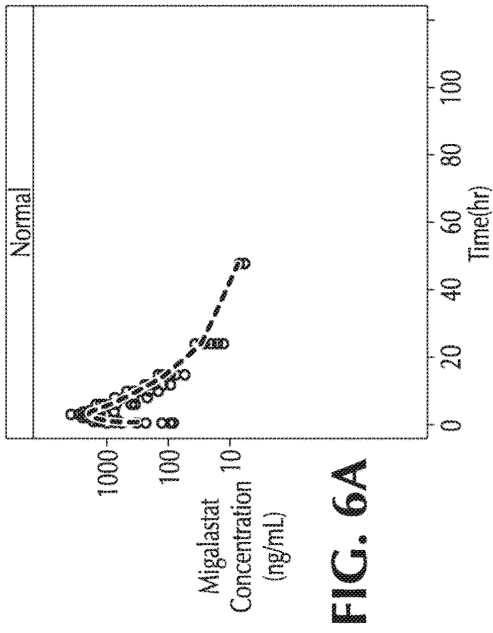


FIG. 6A

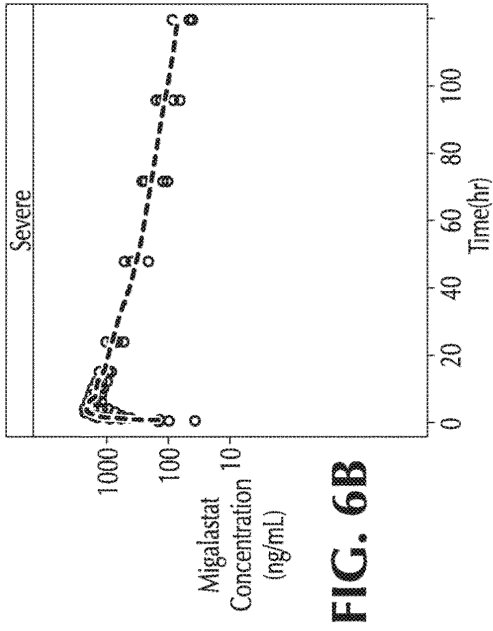


FIG. 6B

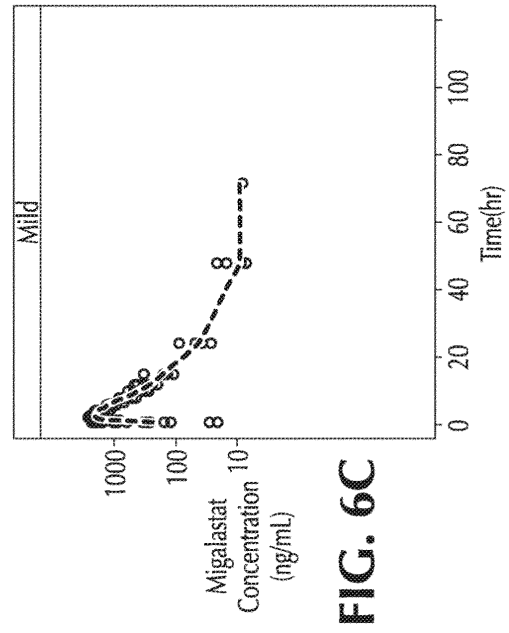


FIG. 6C

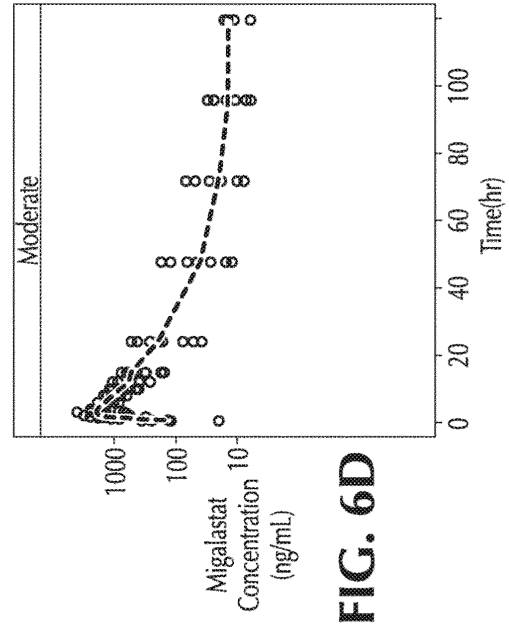


FIG. 6D

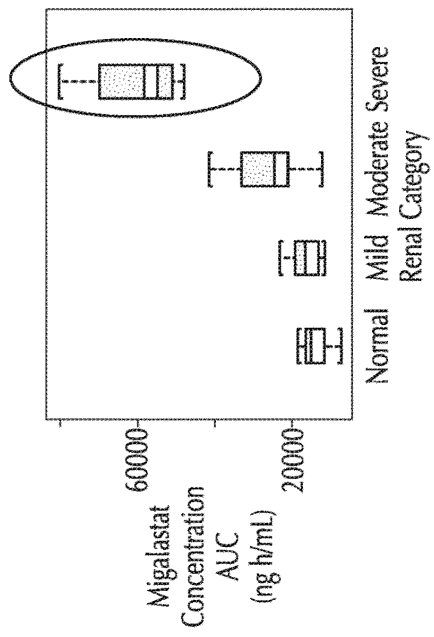


FIG. 7A

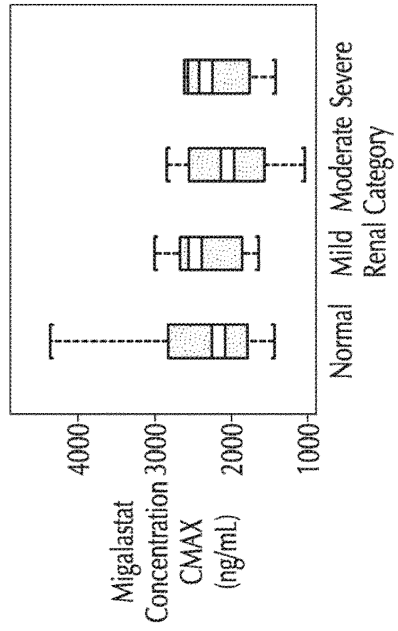


FIG. 7B

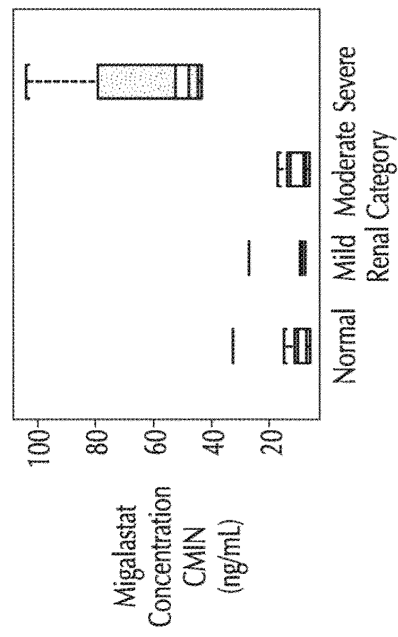


FIG. 7C

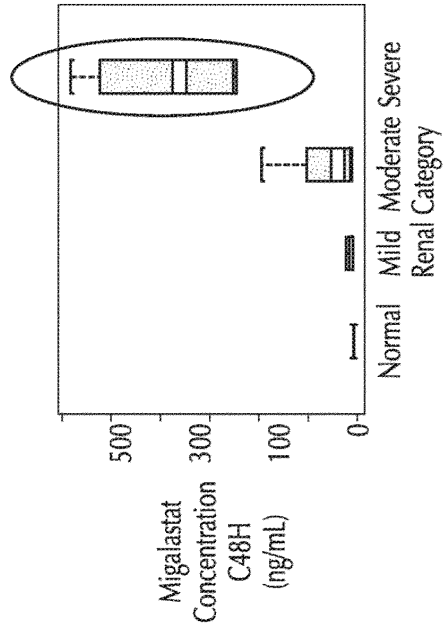
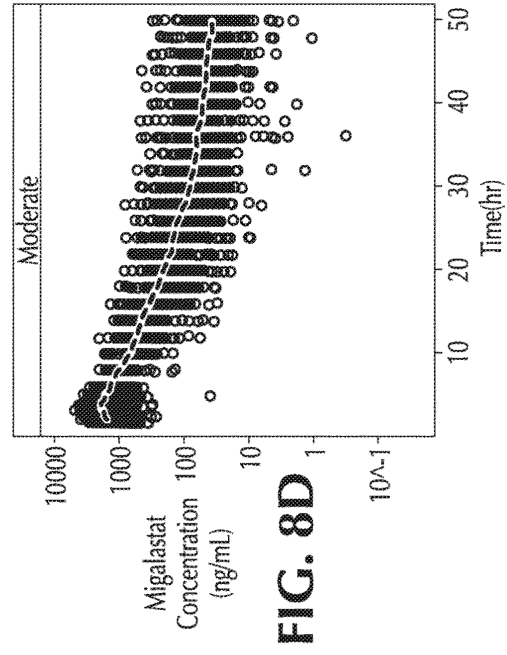
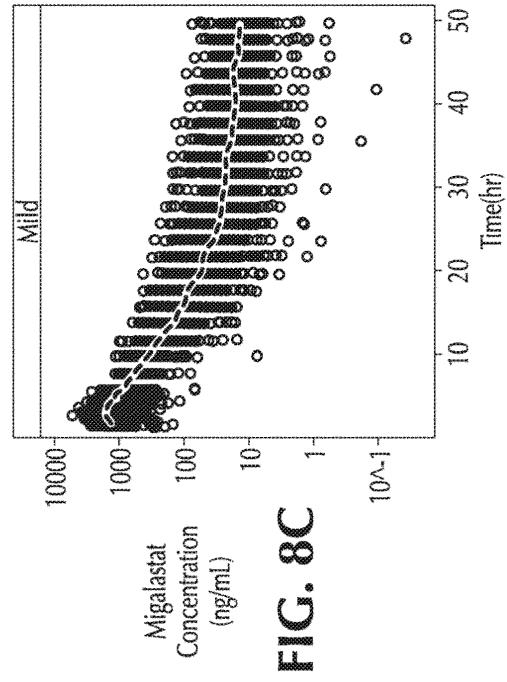
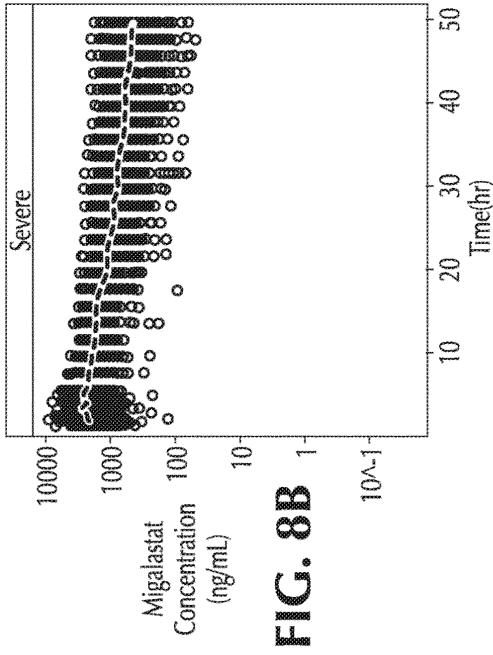
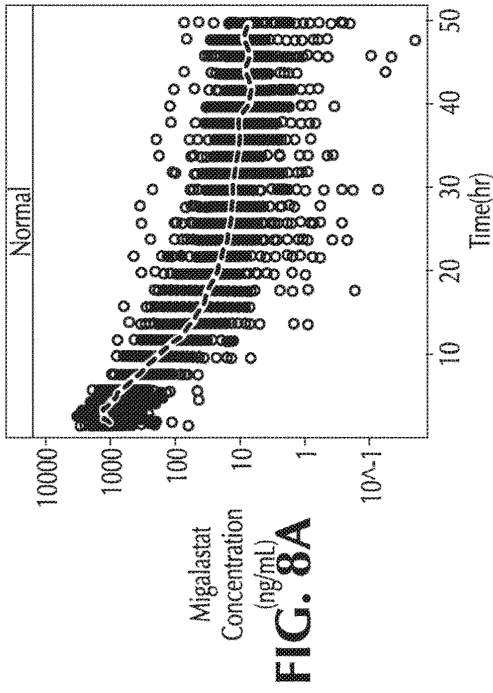


FIG. 7D

B



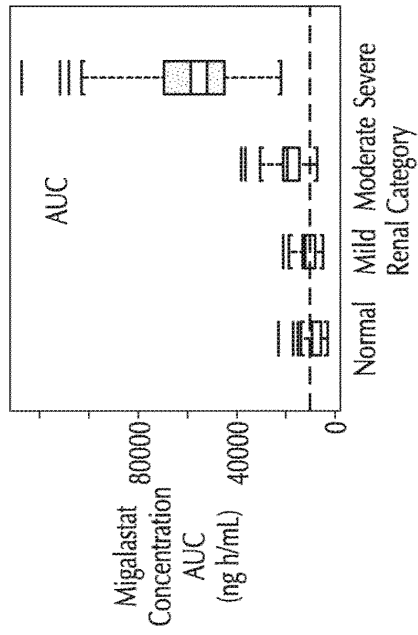


FIG. 9A

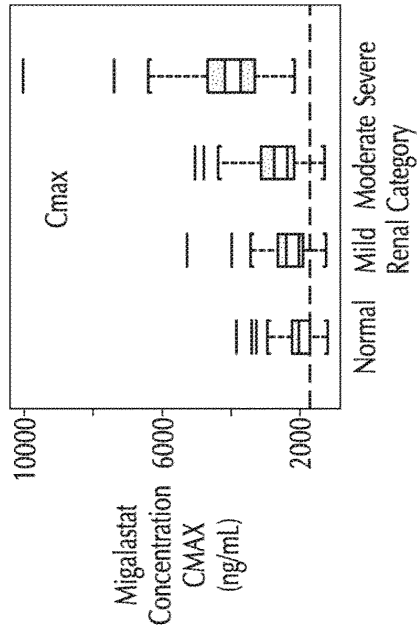


FIG. 9B

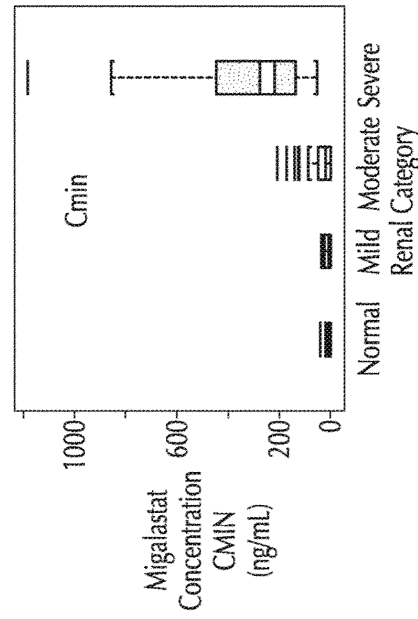


FIG. 9C

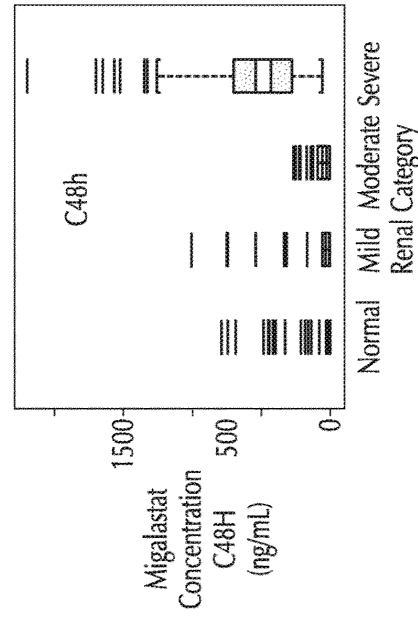
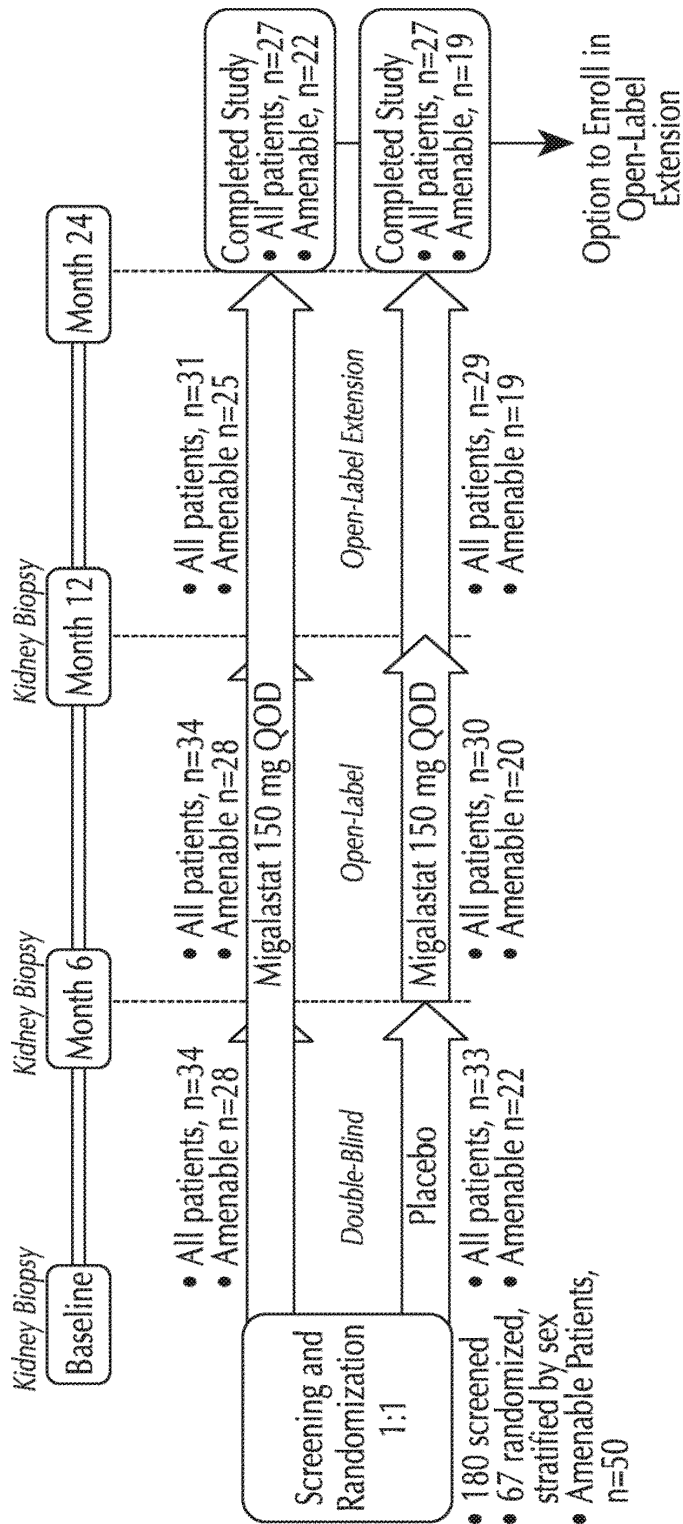


FIG. 9D

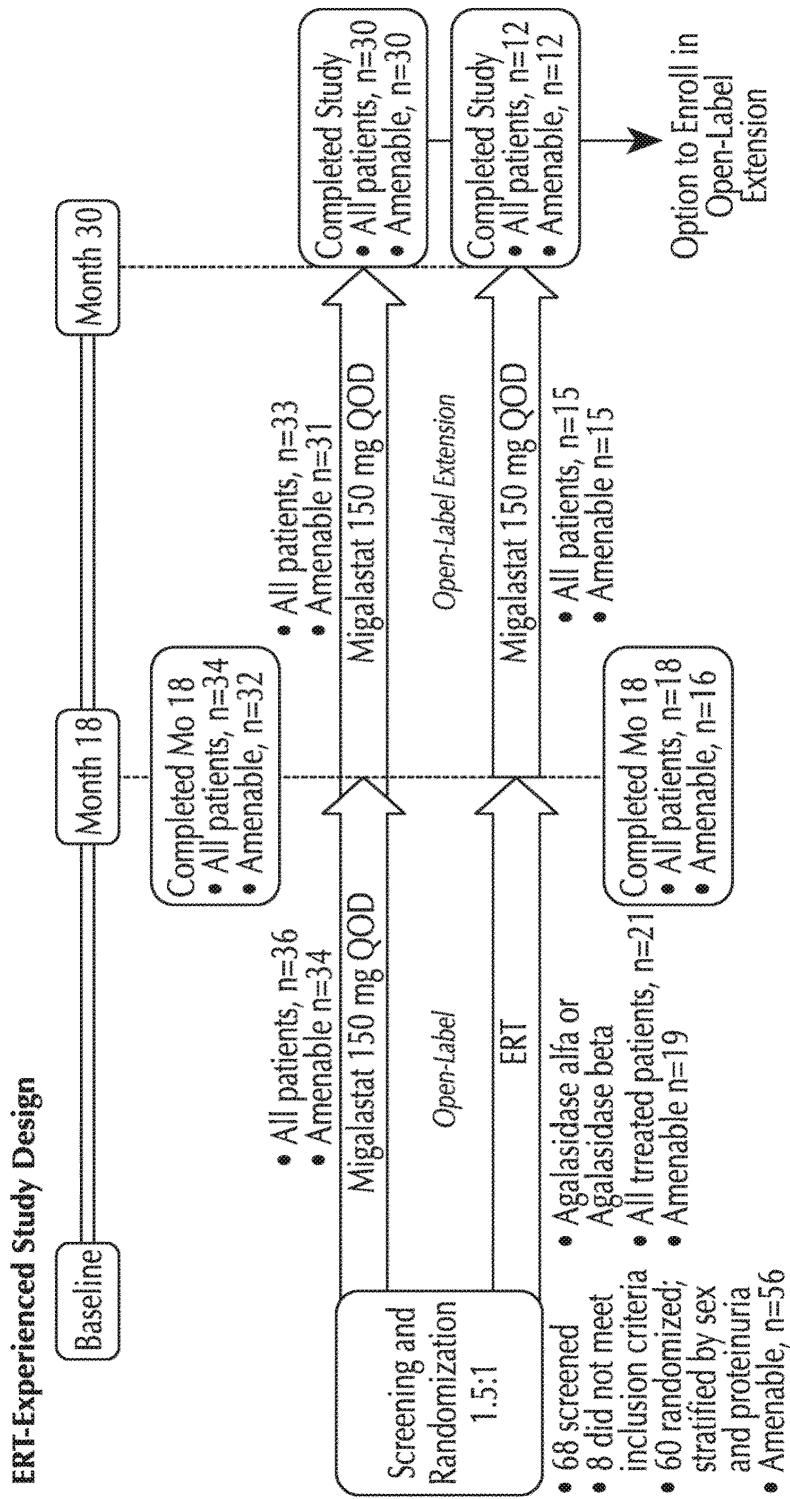
ERT-Naïve Study Design



Amenability was determined using the GLP-validated HEK assay, which became available during the phase 3 study, replacing a preliminary HEK assay used for enrolling patients. Germain DP et al. *N Engl J Med.* 2016;375(6):545-555.

FIG. 10A

FB



Amenability was determined using the GLP-validated HEK assay, which became available during the study, replacing a preliminary HEK assay used for enrolling patients. Hughes DA et al. / Med Genet. 2017;54:288-296.

FIG. 10B



**Migalastat Stabilized Renal Function Regardless of Baseline eGFR
(patients with amenable mutations)**

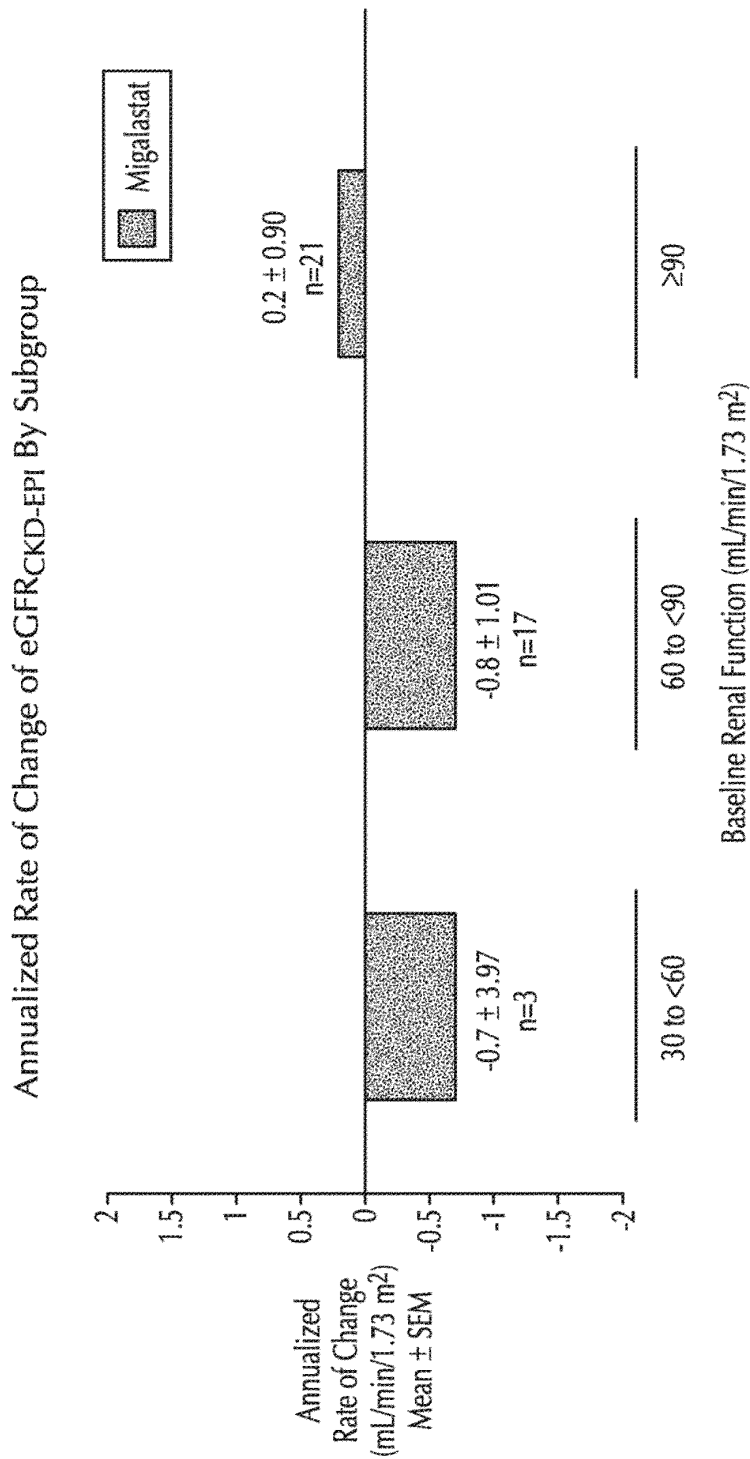
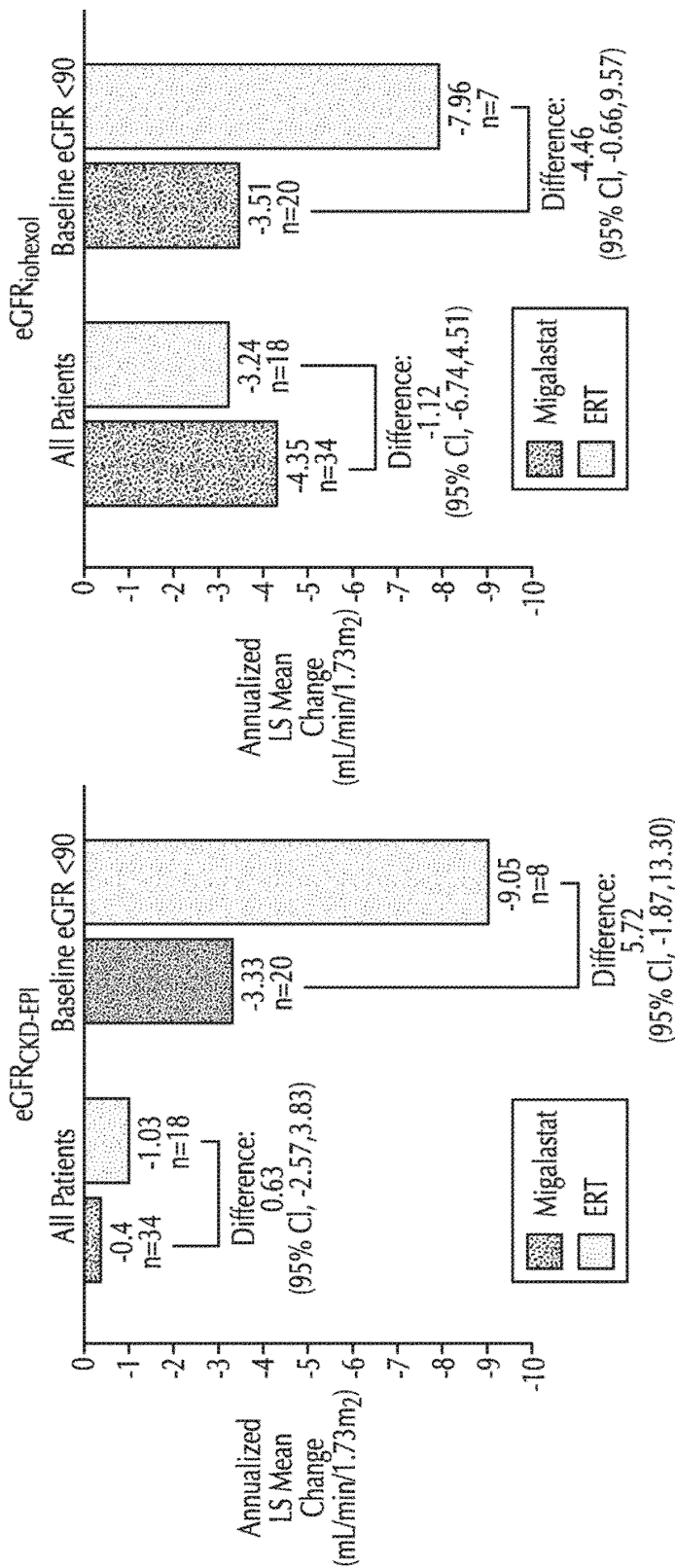


FIG. 11

B

At Month 18, Migalastat and ERT Had Comparable Favorable Effects on Renal Function using both GFR Methods (patients with amenable mutations)



LS mean and 95% CI based on ANCOVA that includes treatment, baseline GFR, sex, age, and 24-hour urine protein. LS = least-squares.

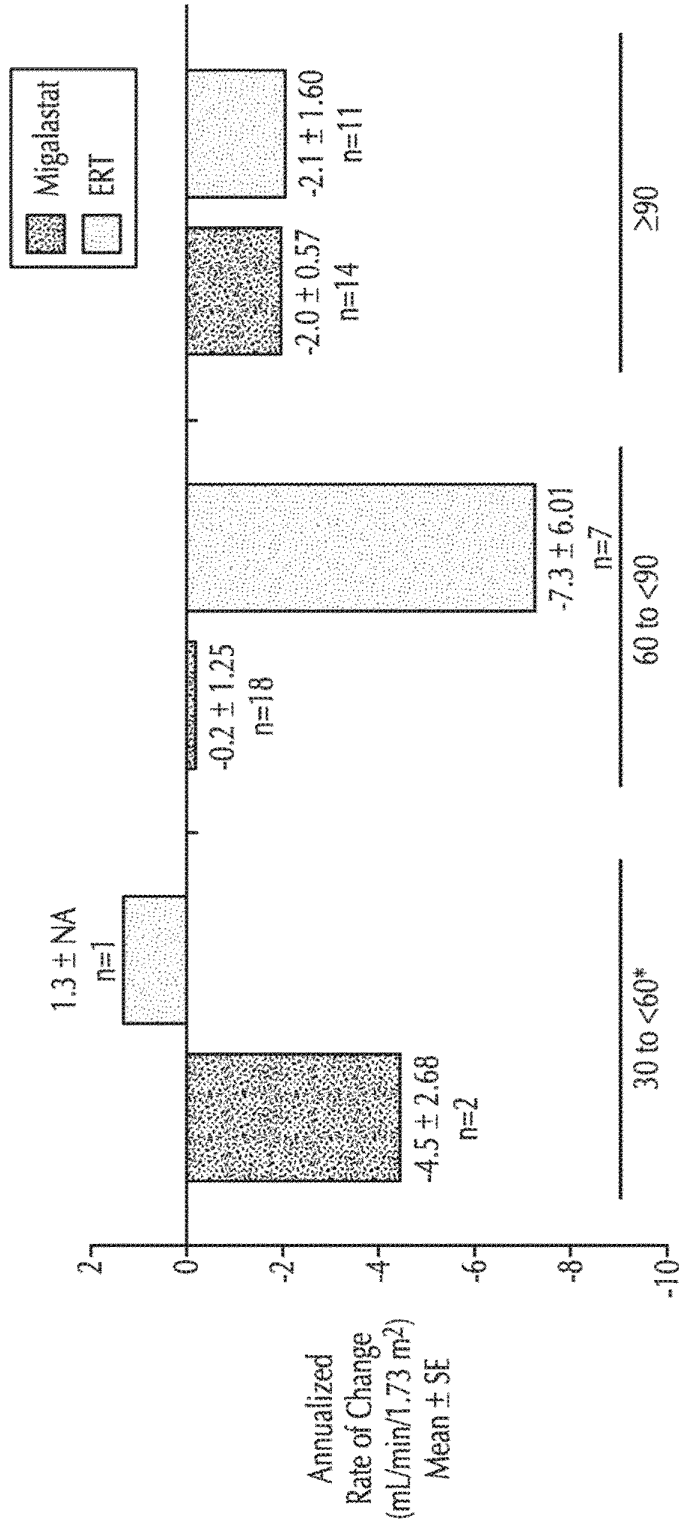
FIG. 12A

LS mean and 95% CI based on ANCOVA that includes treatment, baseline GFR, sex, age, and 24-hour urine protein. LS = least-squares.

FIG. 12B

B

Annualized Rate of Change of eGFR_{CKD-EPI} By Baseline eGFR



Baseline Renal Function (mL/min/1.73 m²)

*Inconclusive due to low n

FIG. 13

B

B

ccctctctgtaggggcagagaggttctacttcattactgogtctcctgggaaggccatcag 60
gactgctggctaaaagtgggaaccaggactcttctgtgagtttaagaatctgtgtatttatat 120
gtgtgttatacacatcttttaaaaaactgtaacgacatcaggttgagcagtcgtctccgg 180
gtgggtgaattatgtgtatttttaaatcttatactataattgttatttttcaaagtctcgaa 240
attgaatattgtagattgttgttatcagcagaaaaataaacattattcaaatactctattc 300
agtaaaagtaattttatgggcgcctttgtcaagcagcatttgcctagatgtgactctaca 360
gataaaattcacttggggcctccccttacagacaatcaggcagtgagactgagtgccctg 420
aatggatagaccagcactcagaccactatctcagtatctgtttttcttaactcagggcc 480
gtggtttcaaacgcttttcgecttacggtcacecttagggtcccccgagaccggcccag 540
acagacagatatacaaaaaacatacacagtcagtgagcgtccaccatttccccaccaggc 600
gcagcacaggcggcttcccggcactgagatgggggggaggaggagagagcgcgaggggg 660
gaggggaaagcagagaaagaaagaggcggaggcggccccgaaccccgctctggcttca 720
tcatcaccacccctgggtccccagttcccaccacacaccaacctctaacgataccgggt 780
aatcttctcctctctcctcctcaaacggctatagcgagacggtagaogacgaccagaacta 840
cttctgctcactgtaagcagtaaacacgtgagcgcctacgtcatgtgagatctcggctcac 900
gtgagcaactctcggcttaaacctcgggatcactaagggtgccgcaacttcttctgtgatgg 960
aaatagggcgggtcaatatcaagaaaggaagaggggtgattgggttagcggaacgtcttacg 1020
tgactgattattgggtctacctctggggataaacgtcccagttgccagagaaacaataacg 1080
tcattatctaataagtcacoggtgattgggtccgcccctgaggttaactctaaaagcccag 1140
gttaccocgggaaatctatgctgtccgggtcacctgtgacaatgcagctgaggaaccagaa 1200
ctacatctgggctgogcgtctgogcttctgcttctcctggccctcgtttcctgggacatcct 1260
gggctagagcactggacaatggattggcaaggacgcctaccatgggctggctgcaactgg 1320
gagcgtctcatgtgcaaccttgactgccaggaagagccagattcctgcatcaggtatcag 1380
atattgggtactccttccctttgctttccatgtgtttgggtgtgtttggggaactgga 1440
gagctcaaacgggaaacagttgagcccgaggagagctccccacccgactctgctgctgc 1500
tttttatccccagcaaacctgtcccgaatcaggactagccctaaaacttctctgtgtgac 1560
ctttcctgggatgggagtcocggccagcggccccctgttcttctctctctctctctctct 1620
cgttctcctctctcttctcttctcttcttctctctctctctctctctctctctctctct 1680
ttctctttttcactgctccttgcaagagcagggccaccctataggcagtggtgcccgaagt 1740
agccctgcccggttctattcagaccctcttctgtgaacttctgctcttctctctgcccgggtg 1800
ctaaccgcttagaacatctaggggtgggtaggaggaatggggaactaagattcgtgccattt 1860
ttctccttttggggctcgtggatttctcggcagtatctcgaggaggttagagagaccata 1920
aggtcgcctgagatctctcccacctcgcccagagcgtggcatcaggctggaaggttgaca 1980
tggaggaactttatacatttacaccttctgogtgaggggttagggctggattagataggtat 2040
tgaacatctgacctcacaatccttatctgtaaatgggattacaaccttttaatttc 2100
agggagctgacaaaaaaaatctgaaaaatagttcttatctcacacaggtgagttttcaag 2160
gagataacctatttaaagtacatagcacagcgttgaccattcaactgcgcttacagagc 2220
aaatgttcaatgggaaaatgaatgtaaatctacaaatctgaatgaatattgtgtattttc 2280
tggagagaggatatttacctttcttcaaatctcaaaaggctctgtgatttaaaaaaggt 2340
taggaatcactgatagatgttgggtaaaaggtggcagtcacagtacatttctgtgtccata 2400
agttattcctatgaatattcttatagataaagtcaggatgttggtcagacatcacagaag 2460
aaattggccttgtaagttcagtgaccctgtggtagatgtgtggcaattttgocca 2520
tcacggatttttttttattgggtatttgcactctgattataaaaactaatgcatgatcattgc 2580
aaaaaatgtagataaagaagagcaaaaatgaaaataaagatttccccaccgttccacca 2640
cccagaaataatcatggtttaaatgttaataatacaaccttacaattgttttctatataaa 2700
tgaaaaatagatattctttatttctattttccataaaaaatggatcatgtttatgtca 2760
tgtttggctaatggcaagaccctggcaccagctcgggctcaaatctgcctcattgtta 2820
cttagccctgtgacattgggtaaattacaacttttttttttttttttttttttttttttttt 2880

FIG. 14A

B

tctatcaacagtccttccaccagtatctctaaaaatctctcctgaatcagcccacttctt 8700
ccatcttcaactacatgcaacctggccttccaagctactatcggtctcaaccagactgct 8760
gggaccacctgatctctctgcttccactctgtctcaacccccatctattttccaagcagc 8820
actagagttatcatattaaaaatgtaaatatcagtttttttttaagaaaaaacctgca 8880
gacttaacagagttataaaaaatataaatgtcatcatcagttccctgcttaaaacctta 8940
actcgttccaattgcaacttgggaatgaaaccaaactgcaactgatccagcccttgccctgcc 9000
tccccaaagtccaaggggtcatggctcttccctggctacactggttttctttctgtccc 9060
tcaacactgcaagcctattgctgccccagggcctttacaactgctttttctgctcctaga 9120
acagttcttccccaaagattttaaggggcgggctccttaacattgaagtgcgagacca 9180
aacgccacatattgcagacagttcttctctaactactttaaaaatagccctctgtccattca 9240
ttcttcatcacattaacctgttttaattttcttctcagagctccacactatgttgaagtat 9300
ttgttgacttgttacatgtctcccactagagtgtaagtttcatgagggcagggacctt 9360
gtctgactttgactgtatctctcgcataatggtttaagtgtaaatagttatttatggaatg 9420
aatccctatttccctcattatctctgcaaaaatagcttttttctcaacatcttaaac 9480
tgatatcccactgctatctacaaaacttttttttggagacagagctcactgtcaccoca 9540
ggctagagtgcaagtggcgcctctcggctcactgcaacctccgctcccgggtttaagcg 9600
attctcttgccctcagcctcccagtagctgggattataggcgtgcgctaccacatctggct 9660
aatttttgtatttttagtagagatggttccaccatgttggccaggcttgtctcgaactcc 9720
tgacctcagatgatccacctgcccctcggcctcccaaagtgtgggattacagggcatgagcc 9780
accgtgcccagcctctacaaaacttttattccattacaaaactatagctgggatttaag 9840
ttttcttaataacttggatggagtcctatgtaattttcgagcttttaattttactaagacca 9900
ttttagttctgattatagaagtaaattaactttaagggtttcaagttatatggcctact 9960
tctgaagcaaaccttcttacagtgaaaattcattataagggttttagacctccttatggaga 10020
cgttcaatctgtaaacctcaagagaaggctacaagtgccctctttaaactgtttcatctc 10080
acaaggatgttagtagaaaagtaaacagaagagtcatactgttttccacagcccaattata 10140
cagaaatccgacagctactgcaatcactggcgaaattttggctgacattgatgattcctgga 10200
aaagtataaaagagttacttggactggacatcttttaaccaggagagaattggttgatgtg 10260
ctggaccagggggttggaaatgaccacagatattgtaaaaacttgagccctccttgttcaag 10320
acctgoggttaggcttgtttcctattttgacattcaaggtaaatcacaggtaaagtctctg 10380
ggaggaggctttatgtgagagtagcttagagcaggatgctgtggaaagtgggtttctccata 10440
tgggtcatctaggttaactttaagaatgtttcctcctctcttgttgaattatttcattct 10500
ttttctcagttagtgttggcaactttggcctcagctggaatcagcaagtaactcagatg 10560
gccctctgggctatcatggctgctcctttattcatgtctaatgacctccgacacatcagc 10620
cctcaagccaaaagctctccttcaggataaggacgtaattgccatcaatcaggacccttg 10680
ggcaagcaagggtagcagcttagacaggtaaataagagtatatattttaagatggcttta 10740
tataccaataaccaactttgtcttgggcctaaatctattttttcccttgcctcttgatgt 10800
tactatcagtaataaagcttcttgctagaaacattactttatttccaaaataatgctaca 10860
ggatcatttttaatttttctacaagtgttgatagttctgacattaagaatgaatgccaa 10920
actaacaggggccacttatcactagttgctaagcaaccacactttcttggtttttcagggca 10980
gacaactttgaagtggtgggaacgacctctctcaggcttagcctgggctgtagctatgata 11040
aacggcaggagattgggtggacctcgtcttataccatcgcagttgcttccctgggtaaa 11100
ggagtggcctgtaactcgtcctgcttcatcacacagctcctccctgtgaaaaggaagcta 11160
gggttctatgaaatggacttcaaggttaagaagtcacataaatcccacagggcactgttttg 11220
cttcagctagaaaatacaatgcagatgtcattaaaagacttactttaaaatgtttatttt 11280
attgccaaactactacttctgtccacctttttctccattcactttaaaagctcaaggcta 11340
gggtgctcatgacctgtaatcccagcactttgggaggtgagggcgggagatcacctgagg 11400
tcgggactttgagaccgctggacaacatggtgaaaccccccttttaataaaaaatataa 11460
aaattagccaggtgtgggtggcgcacctgtgggtcccagctactctgggggctgaggcatga 11520

FIG. 14D

B

```
gaatcgcttgaaccgggagtgagggtgcattgagctgagatcatgccacctcactcca 11580
gcctgggcaacaaagattccatctcaaaaaaaaaaaaaaaaaagccaggcacagtggctcatg 11640
cctggaatccagcacttttgggaagctgaggcaggcagatcacttgaggttaggatttca 11700
agaccagcctggctaacaatagtaaagccctgtctctactaaaaatacaaaaattagccag 11760
gtatggtggcgagcttctgtagcccagctactcaggagactgaggcaggagaatcactt 11820
gaaccgggaagtgggggggtgcagtgaaccaagatcacgccactgcatccagcctggg 11880
caacagagcaagactcoactcaaaaaaaaaaagttctatcttcttgaataaaattttccg 11940
aagtttaaacttttaggaataaaaactattaaaccogtatttactcatccagataccaccc 12000
cccttggtgagattctctcccaattatcaaatgtgtagcatatttaactaccaagagct 12060
aaacatcattaagactgaaatgtattaagaaggatgtataggccaggcaagggtgtctcac 12120
gcctgtaatcccaacactttgggaggccaagtggggggatcacgaggtcaggagatgga 12180
gaccatcctggccaacatgggtgaaaccccctctctactaaaaatacaaaaattagccagg 12240
caggtggcaggcacctgtaatcccagctaotccagaggtgaggcaggacaatcacttga 12300
acctgggaggcagaggctgcagtgagctgaggttgtaaccaattgactccagcctaggta 12360
acgagcaacactccatctcaaaaaaagaaaaaaaaaagatgtataaatttggaactgtta 12420
agaggcatttttaaga 12436
```

FIG. 14E

B

MQLRNPELHL	GCALALRFLA	LVSWDIPGAR	ALDNGLARTP	TMGWLHWERF	MCNLDCQEER	60
DSCISEKLFM	EMAELMVSEG	WKDAGYEYLC	IDDCWMAPQR	DSEGRLQADP	QRFPHGIRQL	120
ANYVHSGKGLK	LGIYADVGNK	TCAGFPGSFG	YYDIDAQTFA	DWGVDLLKFD	GCYCDSLENL	180
ADGYKHMSLA	LNRTGRSIVY	SCEWPLYMWP	FQKPNYTEIR	QYCNHWRNFA	DIDDSWKSJK	240
SILDWTSFNQ	ERIVDVAGPG	GWNDPDLVI	GNFGLSWNQQ	VTQMALWAIM	AAPLFMSNDL	300
RHISPQAKAL	LQDKDVIAIN	QDPLGKQGYQ	LRQGDNFEVW	ERPLSGLAWA	VAMINRQEIG	360
GPRSYTIAVA	SLGKGVACNF	ACFITQLLPV	KRKLGFYEWI	SRLRSHINPT	GTVLLQLENT	420
MQMSLKDLL						429

FIG. 15