

TRADUZIONE DEL BREVETTO EUROPEO N. 3914247 DAL TITOLO:
"USO DI MIGALASTAT NEL RIDURRE IL RISCHIO DI EVENTO
CEREBROVASCOLARE IN PAZIENTI CON MALATTIA DI FABRY"

*** **

DESCRIZIONE

CAMPO TECNICO

I principi e le forme di realizzazione della presente invenzione si riferiscono generalmente all'uso di chaperone farmacologici per il trattamento di disturbi da accumulo lisosomiale, in particolare all'uso di migalastat per il trattamento della malattia di Fabry.

STATO DELL'ARTE

La malattia di Fabry è un errore innato legato all'X, progressivo del metabolismo glicosfingolipidico causato da una carenza dell'enzima lisosomiale α -galattosidasi A (α -Gal A) come risultato di mutazioni nel gene α -Gal A (GLA). Nonostante sia un disturbo legato all'X, le femmine possono esprimere gradi variabili di manifestazioni cliniche. La malattia di Fabry è una malattia rara con incidenza stimata tra 1 su 40.000 maschi e 1 su 117.000 nella popolazione generale. Inoltre, vi sono varianti del fenotipo a esordio tardivo della malattia di Fabry che possono essere sottodiagnosticate, in quanto non presentano segni e sintomi classici. Questo, e lo screening neonatale per la malattia di Fabry, suggerisce che l'incidenza effettiva della malattia di Fabry può essere superiore rispetto a quanto attualmente stimato.

B

Se non trattata, l'aspettativa di vita nei pazienti con Fabry è ridotta e la morte si verifica solitamente nel quarto o quinto decennio a causa di malattia vascolare che interessa i reni, il cuore e/o il sistema nervoso centrale. La carenza enzimatica porta all'accumulo intracellulare del substrato, globotriaosilceramide (GL-3) nell'endotelio vascolare e nei tessuti viscerali in tutto il corpo. Il deterioramento graduale della funzione renale e lo sviluppo di azotemia, a causa del deposito di glicosfingolipidi, si verificano solitamente tra il terzo e il quinto decennio di vita, ma possono verificarsi già prima nel secondo decennio. Lesioni renali si trovano in pazienti sia emizigoti (maschio) sia eterozigoti (femmina).

La malattia cardiaca come risultato della malattia di Fabry si verifica nella maggior parte dei maschi e in molte femmine. I risultati cardiaci precoci includono l'ingrossamento del ventricolo sinistro, il coinvolgimento valvolare e le anomalie di conduzione. L'insufficienza mitrale è la lesione valvolare più frequente tipicamente presente nell'infanzia o nell'adolescenza. Le manifestazioni cerebrovascolari derivano principalmente da coinvolgimento multifocale di piccoli vasi e possono includere trombosi, attacchi ischemici transitori, ischemia e aneurisma dell'arteria basilare, convulsioni, emiplegia, emianestesia, afasia, disturbi labirintici, o emorragie cerebrali. L'età media dell'esordio delle manifestazioni cerebrovascolari è di 33,8 anni. Il cambiamento di personalità e il comportamento psicotico possono manifestarsi con l'aumentare dell'età.

Una terapia approvata per trattare la malattia di Fabry è la terapia enzimatica sostitutiva (ERT), che tipicamente comporta un'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). Sebbene la ERT sia efficace in molti contesti, il trattamento ha anche limitazioni. La ERT non ha dimostrato di diminuire il rischio di ictus, il muscolo cardiaco risponde lentamente e l'eliminazione di GL-3 da alcuni dei tipi cellulari dei reni è limitata. Alcuni pazienti sviluppano anche reazioni immunitarie alla ERT.

Di conseguenza, rimane la necessità di terapie per il trattamento della malattia di Fabry, soprattutto per ridurre il rischio di eventi cerebrovascolari.

Sunder-Plassmann *et al.* (Expert Opinion on Orphan Drugs, 6:5, 301-309; 2018) descrivono in generale il migalastat per il trattamento della malattia di Fabry. Hughes *et al.* (J Med Genet, 54(4): 288-296; 2017) descrivono lo chaperone migalastat farmacologico rispetto alla terapia enzimatica sostitutiva nella malattia di Fabry, e in particolare risultati a 18 mesi dallo studio ATTRACT randomizzato della fase III. Ranieri *et al.* (Curr Treat Options Neurol, 18(7): 33; 2016) descrivono il riconoscimento, la diagnosi e il trattamento di caratteristiche neurologiche della malattia di Fabry.

SOMMARIO

La presente invenzione è definita dalle rivendicazioni allegate. Vari aspetti della presente invenzione si riferiscono al migalastat o al relativo sale per l'uso nel trattamento della malattia di Fabry in paziente naïve alla ERT e pazienti con esperienza di ERT. Tale trattamento riduce il rischio di eventi cerebrovascolari (CBV). Il trattamento include terapia con migalastat a lungo termine, come un trattamento per almeno 2, 3, 4 o più anni.

Un aspetto della presente invenzione riguarda il migalastat o relativo sale per l'uso in un metodo di riduzione del rischio di un evento CBV in un paziente avente la malattia di Fabry, il metodo comprendendo somministrare al paziente una formulazione comprendente una quantità efficace di migalastat o relativo sale a giorni alterni, per almeno 2 anni, in cui la quantità efficace va da circa 100 mg a circa 150 mg di equivalente di equivalente di base libera (FBE).

In una o più forme di realizzazione, l'evento CBV comprende uno o più tra ischemia di tronco cerebrale, infarto cerebrale, emorragia cerebrale, ischemia cerebrale, accidente cerebrovascolare, ictus embolico o attacco ischemico transitorio.

In una o più forme di realizzazione, il paziente ha un rischio aumentato di un evento CBV prima di iniziare la somministrazione del migalastat o del relativo sale.

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

B

In una o più forme di realizzazione, al paziente sono somministrati circa 123 mg di FBE del migalastat o del relativo sale a giorni alterni.

In una o più forme di realizzazione, al paziente sono somministrati circa 123 mg di base libera di migalastat a giorni alterni.

In una o più forme di realizzazione, al paziente sono somministrati circa 150 mg di migalastat cloridrato a giorni alterni.

In una o più forme di realizzazione, la formulazione comprende una forma di dosaggio orale. In una o più forme di realizzazione, la forma farmaceutica orale comprende una compressa, una capsula o una soluzione.

Il migalastat o relativo sale è somministrato per almeno 2 anni.

In una o più forme di realizzazione, il migalastat o relativo sale è somministrato per almeno 3 anni.

In una o più forme di realizzazione, il migalastat o relativo sale è somministrato per almeno 4 anni.

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

In una o più forme di realizzazione, il paziente è un paziente con esperienza di ERT.

In una o più forme di realizzazione, il paziente ha una mutazione suscettibile al saggio HEK in α -galattosidasi A. In una o più forme di realizzazione, la mutazione è divulgata in una tabella di riferimento farmacologica. In una o più forme di realizzazione, la tabella di riferimento

farmacologica è fornita in un'etichetta di prodotto per un prodotto di migalastat approvato per il trattamento della malattia di Fabry. In una o più forme di realizzazione, la tabella di riferimento farmacologica è fornita in un'etichetta di prodotto per GALAFOLD®. In una o più forme di realizzazione, la tabella di riferimento farmacologica è fornita in un sito web. In una o più forme di realizzazione, il sito web è uno o più tra www.galafoldamenabilitytable.com o www.fabrygenevariantsearch.com.

BREVE DESCRIZIONE DEI DISEGNI

Ulteriori caratteristiche della presente invenzione risulteranno evidenti dalla seguente descrizione scritta e dalle figure allegate, in cui:

le figure 1A-E mostrano la sequenza completa di DNA del gene GLA di tipo selvatico umano (SEQ ID N.: 1);

la figura 2 mostra la proteina α -Gal A di tipo selvatico (SEQ ID N.: 2); e

la figura 3 mostra la sequenza di acido nucleico codificante la proteina α -Gal A di tipo selvatico (SEQ ID N.: 3).

DESCRIZIONE DETTAGLIATA

Prima di descrivere svariate forme di realizzazione esemplificative dell'invenzione, occorre comprendere che l'invenzione non è limitata ai dettagli di passaggi di costruzione o di processo esposti nella seguente descrizione. L'invenzione è suscettibile di altre forme di realizzazione e di essere praticata o essere effettuata in vari modi.

Vari aspetti della presente invenzione riguardano regimi di dosaggio per la somministrazione di migalastat per il trattamento della

malattia di Fabry. I regimi di dosaggio di migalastat riducono il rischio di un evento CBV.

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 è usato. Determinati termini sono esaminati di seguito o altrove nella descrizione per fornire una guida aggiuntiva al professionista nella descrizione delle composizioni e dei metodi dell'invenzione e di come realizzarli e usarli.

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

L'espressione "malattia di Fabry atipica" si riferisce a pazienti con manifestazioni principalmente cardiache della carenza di α -Gal A, ossia accumulo progressivo di GL-3 in cellule del miocardio che porta a un significativo ingrossamento del cuore, in particolare del ventricolo sinistro.

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 è spesso diagnosticata la malattia di Fabry.

Un "paziente" si riferisce a un soggetto a cui è stata diagnosticata o che si sospetta 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 che si sospetta 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.

L' α -galattosidasi A (α -Gal A) umana si riferisce a un enzima codificato dal gene GLA umano. La sequenza completa di DNA di α -Gal A, includente introni ed esoni, è disponibile in n. di accesso GenBank X14448.1 e mostrata nella figura 1A-E (SEQ ID N.: 1). L'enzima α -Gal A umano consiste in 429 amminoacidi ed è disponibile nei n. di accesso GenBank X14448.1 e U78027.1 e mostrato nella figura 2 (SEQ ID N.: 2). La sequenza di acido nucleico che include solamente le regioni codificanti (vale a dire gli esoni) di SEQ ID N.: 1 è mostrata nella figura 3 (SEQ ID N.: 3).

L'espressione "proteina mutante" include una proteina che ha una mutazione nel gene codificante la proteina che determina l'incapacità della proteina di ottenere una conformazione stabile nelle condizioni normalmente presenti nel reticolo endoplasmatico (RE). Il mancato

ottenimento di una conformazione stabile determina una quantità sostanziale dell'enzima che è degradato, anziché essere trasportato al lisosoma. Tale mutazione è talvolta chiamata "mutante conformazionale". Tali mutazioni includono, ma non sono limitate a, mutazioni missenso e piccole delezioni e inserzioni in frame.

Come usata nella presente in una forma di realizzazione, l'espressione " 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 ottenere una conformazione stabile nelle condizioni normalmente presenti nell'RE. Il mancato ottenimento di una conformazione stabile determina una quantità sostanziale dell'enzima che è degradato, anziché essere trasportato al lisosoma.

Come usata nella presente, l'espressione "chaperone farmacologico" ("PC") si riferisce a qualsiasi molecola includente una piccola molecola, proteina, peptide, acido nucleico, carboidrato, ecc. che si lega nello specifico 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 dall'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 erroneamente; e/o (iv) ripristina o potenzia una funzione e/o attività di tipo selvatico almeno parziale nella proteina. Un composto che si lega nello specifico a, per esempio, 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 nello specifico, questa espressione non si riferisce a chaperone endogeni, come BiP, o ad agenti non specifici che hanno dimostrato attività di chaperone non specifica contro varie proteine, come glicerolo, DMSO o acqua deuterata, vale a dire, chaperone chimici. In conformità con la presente invenzione, il PC è migalastat o un relativo sale. In un'altra forma di realizzazione, il PC è una base libera di migalastat (per esempio, 123 mg di base libera di migalastat). In ancora un'altra forma di realizzazione, il PC è un sale di migalastat (per esempio, 150 mg di migalastat HCl).

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 Km. 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 in modo reversibile. 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 usata nella presente, l'espressione "si lega nello specifico" si riferisce all'interazione di uno chaperone farmacologico con una proteina come α -Gal A, nello specifico, un'interazione con i residui

amminoacidici della proteina che partecipano direttamente all'entrata in contatto con lo chaperone farmacologico. Uno chaperone farmacologico si lega nello specifico a 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 dato chaperone farmacologico 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 usate nella presente, le espressioni "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 a contatto con uno chaperone farmacologico specifico per α -Gal A, rispetto alla quantità in una cellula (preferibilmente dello stesso tipo di cellula o della stessa cellula, per esempio, in un momento precedente) non a contatto con lo chaperone farmacologico specifico per l' α -Gal A. Questa espressione si riferisce anche a un aumento del trasferimento di α -Gal A

verso il lisosoma in una cellula a contatto con uno chaperone farmacologico specifico per l' α -Gal A, rispetto al trasferimento di α -Gal A non a contatto con lo chaperone farmacologico specifico per la proteina. Queste espressioni si riferiscono a α -Gal A sia di tipo selvatico che 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 nei lisati da cellule che sono state trattate con il PC. Un aumento di idrolisi è indicativo di attività di α -Gal A aumentata.

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

Un "responder" è un individuo con diagnosi o sospettato di avere un disturbo da accumulo lisosomiale (LSD), come, per esempio malattia di Fabry, le cui cellule presentano attività di α -Gal A sufficientemente aumentata, rispettivamente, e/o miglioramento dei sintomi o potenziamento nei marcatori surrogati, in risposta a contatto con un PC. Esempi non limitativi dei potenziamenti di marcatori surrogati per malattia di Fabry sono lyso-GB3 e quelli divulgati nella pubblicazione della domanda di brevetto US n. U.S. 2010/0113517.

Esempi non limitativi 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.

La dose che ottiene una o più delle risposte summenzionate è una "dose terapeutamente 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 usata nella presente, l'espressione "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 è somministrato il composto. Tali veicolanti farmaceutici possono essere liquidi sterili, come acqua e oli. Come veicolanti sono preferibilmente impiegate soluzioni fisiologiche in acqua o in soluzione acquosa e soluzioni 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, 18^a edizione o altre edizioni.

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 nelle quali il materiale si trova o è prodotto. 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 o ad altri geni collocati 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. 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 è rimosso/a dal sito anatomico in cui si trova in un organismo. Un materiale isolato può essere, ma non necessariamente, purificato.

L'espressione "terapia enzimatica sostitutiva" o "ERT" si riferisce all'introduzione di un enzima non nativo, purificato in un individuo avente una carenza di tale enzima. La proteina somministrata può essere ottenuta da sorgenti naturali o mediante espressione ricombinante (come descritto in maggior 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*, o una proteina purificata da tessuti o fluidi isolati, come, per esempio, placenta o latte animale, o da piante.

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 con esperienza di 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 con esperienza di ERT ha ricevuto

almeno 12 mesi di ERT immediatamente prima di iniziare la terapia con migalastat.

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 è 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 previsto 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), a meno che non indicato specificamente in senso contrario.

I termini "mutazione" e "variante" (per esempio, come in "mutazione o variante suscettibile") si riferiscono a una variazione della sequenza nucleotidica di un gene o un cromosoma. I due termini indicati nella presente sono tipicamente usati insieme - per esempio, come in "mutazione o variante" - con riferimento alla variazione di sequenza nucleotidica dichiarata nella frase precedente. Se solo uno dei due termini è indicato per qualche ragione, il termine mancante doveva essere incluso e si deve comprendere come tale. Inoltre, le espressioni "mutazione suscettibile" e "variante suscettibile" si riferiscono a una mutazione o variante che è suscettibile alla terapia con PC, per esempio,

una mutazione che è suscettibile alla terapia con migalastat. Un tipo particolare di mutazione o variante suscettibile è una "mutazione o variante suscettibile al saggio HEK", che è una mutazione o variante che viene determinata come suscettibile alla terapia con migalastat secondo i criteri nel saggio HEK *in vitro* descritto nella presente e nel brevetto U.S. n. 8,592,362.

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 fornite nella presente sono approssimative se non diversamente indicato, il che significa che il termine "circa" o "approssimativamente" può essere dedotto quando non espressamente indicato.

Malattia di Fabry

La malattia di Fabry è un LSD 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 lyso-

Gb3 plasmatico, e porta ai sintomi e alle conseguenze di malattia di Fabry limitanti la vita, inclusi dolore, sintomi gastrointestinali, insufficienza renale, cardiomiopatia, eventi cerebrovascolari e mortalità precoce. L'inizio precoce della terapia e del trattamento permanente forniscono un'opportunità di rallentare la progressione della malattia e 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 1.000 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 di controllo della qualità cellulare nel RE bloccano il transito di queste

proteine anormali verso i lisosomi e lo bersagliano per la degradazione e l'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 abbracciano un ampio spettro di gravità e sono approssimativamente correlate ai livelli di α -Gal A residui del paziente. La maggior parte dei pazienti attualmente trattati è indicata come pazienti con malattia di Fabry classica, la maggior parte dei quali sono maschi. Questi pazienti presentano la malattia in vari organi, inclusi i reni, il cuore e il cervello, con sintomi della 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 presenta una serie di sintomi della 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 A residuo superiori rispetto ai pazienti con malattia di Fabry classica. Gli individui con malattia di Fabry a esordio tardivo tipicamente presentano i primi sintomi della malattia in età adulta e spesso presentano sintomi della malattia focalizzati su un singolo organo, come ingrossamento del ventricolo sinistro o insufficienza renale progressiva. Inoltre, 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 dell'attività di α -Gal A porta all'accumulo di GL-3 e dei glicosfingolipidi correlati in molti tipi di cellule incluse le cellule nel rene. GL-3 si accumula nei podociti, nelle cellule epiteliali e nelle cellule tubulari del tubulo distale dell'ansa di Henle. La compromissione della funzione renale può manifestarsi come proteinuria e tasso di filtrazione glomerulare ridotto.

Poiché la malattia di Fabry è rara, coinvolge più organi, ha un ampio intervallo di età di esordio ed è eterogenea, una diagnosi corretta è complessa. La consapevolezza è bassa tra i professionisti del settore sanitario e sono frequenti diagnosi errate. La diagnosi di malattia di Fabry è più spesso confermata sulla base dell'attività di α -Gal A diminuita nel plasma o dei leucociti periferici (WBC), una volta che un paziente è sintomatico, accoppiata all'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 normale 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.

In una o più forme di realizzazione, forme mutanti di α -Gal 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 (WT) quando la forma mutante di α -Gal A è espressa in cellule HEK-293 (indicato come "saggio HEK") secondo un saggio *in vitro* convalidato dalle buone pratiche di laboratorio (Good Laboratory Practice, "GLP") (saggio di suscettibilità a HEK o migalastat GLP). 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 un saggio che usa cellule HEK-293 in sperimentazioni cliniche per predire se una data mutazione sarà responsiva al trattamento con chaperone farmacologico (per esempio, migalastat). In questo saggio, sono creati costrutti di cDNA. Le corrispondenti forme mutanti di α -Gal A vengono espresse in modo transiente nelle cellule HEK-293. Le cellule sono in seguito incubate \pm migalastat (da 17 nM a 1 mM) per 4-5 giorni. Successivamente, i livelli di α -Gal A sono misurati nei lisati cellulari usando un substrato fluorogenico sintetico (4-MU- α -Gal) o mediante western blot. Ciò è stato fatto per note mutazioni missenso che causano malattia o con piccole inserzioni/delezioni in frame. Le mutazioni che

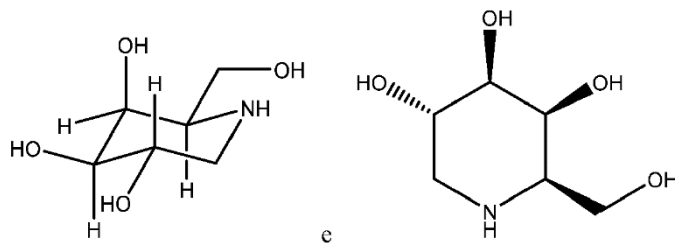
sono state precedentemente identificate come responsive a PC (per esempio, migalastat) usando questi metodi sono elencate nel brevetto statunitense n. 8,592,362.

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 (si vedano i brevetti statunitensi nn. 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, ha aumentato efficacemente la stabilità degli enzimi nelle cellule *in vitro* e, pertanto, ha aumentato il trasferimento degli enzimi al lisosoma. Pertanto, aumentando la quantità di enzima nel lisosoma, è previsto che l'idrolisi dei substrati enzimatici aumenti. La teoria originaria dietro questa strategia è stata la seguente: dato che la proteina enzimatica mutante è instabile nell'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 dall'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 sono degradate in alcuni casi prima di

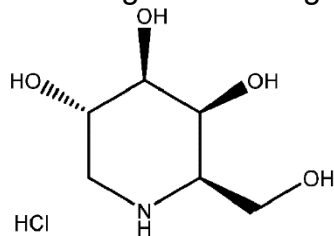
raggiungere la loro posizione cellulare finale, gli chaperoni possono essere usati per stabilizzare enzimi di tipo selvatico e aumentare la quantità di enzima che può uscire dall'RE ed essere trasferita ai lisosomi.

Lo chaperone farmacologico in conformità con la presente invenzione comprende migalastat o 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 esaminato nella presente, nella presente invenzione possono anche essere usati sali farmaceuticamente accettabili di migalastat. Quando è 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:



Migalastat HCl

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, legandosi 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 a 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.

Le mutazioni suscettibili al saggio HEK includono almeno quelle mutazioni elencate in una tabella di riferimento dei farmaci (per esempio, quelle indicate nelle etichette del prodotto statunitense o internazionali per un prodotto con migalastat come GALAFOLD®). Come usata nella presente, "tabella di riferimento dei farmaci" si riferisce a qualsiasi documento scritto o elettronico accessibile al pubblico, incluso nell'etichetta del prodotto all'interno della confezione di un prodotto con migalastat (per esempio, GALAFOLD®) o in un sito web accessibile da parte di operatori sanitari, che indica se una particolare mutazione o variante è responsiva a terapia con PC migalastat (per esempio, GALAFOLD®) e non è necessariamente limitato a documenti scritti

presentati in forma tabulare. In una forma di realizzazione della presente invenzione, una "tabella di riferimento dei farmaci" perciò si riferisce a qualsiasi deposito di informazioni che include una o più mutazioni o varianti suscettibili. Una tabella di riferimento dei farmaci esemplificativa per mutazioni suscettibili al saggio HEK si può trovare nel riassunto delle caratteristiche del prodotto e/o nelle informazioni sulla prescrizione di GALAFOLD® in vari paesi in cui GALAFOLD® è approvato per l'uso o su un sito web come www.galafoldamenabilitytable.com o www.fabrygenevariantsearch.com.

Una tabella di riferimento dei farmaci esemplificativa per mutazioni suscettibili al saggio HEK è fornita 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 differenti cromosomi (solamente nelle femmine) tale paziente è considerato suscettibile al saggio HEK se una delle singole mutazioni è presente nella tabella 1.

Tabella 1

Cambiamento di nucleotide	di	Cambiamento di nucleotide	di	Cambiamento di sequenza proteica
c.7C>G		c.C7G		L3V

Cambiamento di nucleotide	di	Cambiamento di nucleotide	di	Cambiamento di sequenza proteica
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>C		c.G97C		D33H
c.97G>T		c.G97T		D33Y
c.98A>G		c.A98G		D33G
c.100A>G		c.A100G		N34D

B

Cambiamento di nucleotide	di	Cambiamento di nucleotide	di	Cambiamento di sequenza proteica
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.G 104A		G35E
c.104G>C		c.G104C		G35A
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

Cambiamento di nucleotide	di Cambiamento di nucleotide	di Cambiamento di sequenza proteica
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

B

Cambiamento di nucleotide	di	Cambiamento di nucleotide	di	Cambiamento di sequenza proteica
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
c.239G>A		c.G239A		G80D
c.247G>A		c.G247A		D83N
c.253G>A		c.G253A		G85 S
c.254G>A		c.G254A		G85D

B

Cambiamento di nucleotide	di	Cambiamento di nucleotide	di	Cambiamento di sequenza proteica
c.[253G>A; 254G>A]		c.G253A/G254A		G85N
c.[253G>A; 254G>T; 255T>G]		c.G253A/G254T/T255G		G85M
c.261G>C o c.261G>T		c.G261C o c.G261T		E87D
c.263A>C		c.A263C		Y88S
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		S 102L
c.311G>T		c.G311T		G104V
c.316C>T		c.C316T		L106F
c.322G>A		c.G322A		A108T
c.326A>G		c.A326G		D109G
c.334C>G		c.C334G		R112G

B

Cambiamento di nucleotide	di	Cambiamento di nucleotide	di	Cambiamento di sequenza proteica
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
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

B

Cambiamento di nucleotide	di	Cambiamento di nucleotide	di	Cambiamento di sequenza proteica
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
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

B

Cambiamento di nucleotide	di	Cambiamento di nucleotide	di	Cambiamento di sequenza proteica
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		Y 184C
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

Cambiamento di nucleotide	di Cambiamento di nucleotide	di Cambiamento di sequenza proteica
c.572T>A	c.T572A	L191Q
c.580A>G	c.A580G	T194A
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	E203 V
c.609G>C o c.609G>T	c.G609C o c.G609T	E203D
c.610T>G	c.T610G	W204G
c.613C>A	c.C613A	P205T
c.613C>T	c.C613T	P205S

B

Cambiamento di nucleotide	di	Cambiamento di nucleotide	di	Cambiamento di sequenza proteica
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>C		c.A647C		Y216S
c.647A>G		c.A647G		Y216C

B

Cambiamento di nucleotide	di	Cambiamento di nucleotide	di	Cambiamento di sequenza proteica
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.695 T>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

B

Cambiamento di nucleotide	di	Cambiamento di nucleotide	di	Cambiamento di sequenza proteica
c.725T>A		c.T725A		I242N
c.725T>C		c.T725C		I242T
c.728T>G		c.T728G		L243 W
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.748C>A		c.C748A		Q250K
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

B

Cambiamento di nucleotide	di Cambiamento di nucleotide	di Cambiamento di sequenza proteica
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
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

B

Cambiamento di nucleotide	di Cambiamento di nucleotide	di Cambiamento di sequenza proteica
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
c.860G>T	c.G860T	W287L

B

Cambiamento di nucleotide	di	Cambiamento di nucleotide	di	Cambiamento di sequenza proteica
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

B

Cambiamento di nucleotide	di	Cambiamento di nucleotide	di	Cambiamento di sequenza proteica
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
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

Cambiamento di nucleotide	di Cambiamento di nucleotide	di Cambiamento di sequenza proteica
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
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

B

Cambiamento di nucleotide	di	Cambiamento di nucleotide	di	Cambiamento di sequenza proteica
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

B

Cambiamento di nucleotide	di	Cambiamento di nucleotide	di	Cambiamento di sequenza proteica
c.1055C>T		c.C1055T		A352V
c.1061T>A		c.T1061A		I354K
c.1066C>G		c.C1066G		R356G
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

B

Cambiamento di nucleotide	di	Cambiamento di nucleotide	di	Cambiamento di sequenza proteica
c.1085C>T		c.C108ST		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.1175G>C		c.G1175C		R392T
c.1184G>A		c.G1184A		G395E
c.1184G>C		c.G1184C		G395A
c.1192G>A		c.G1192A		E398K
c.1202_1203insGACTTC		c.1202_1203insGACTTC		p.T400_S401dup
c.1208T>C		c.T1208C		L403S
c.1225C>G		c.C1225G		P409A
c.1225C>T		c.C1225T		P409S

Cambiamento di nucleotide	di	Cambiamento di nucleotide	di	Cambiamento di sequenza proteica
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

Dosaggio, formulazione e somministrazione

In conformità con la presente invenzione, 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 riguardano migalastat cloridrato o una dose equivalente di migalastat o un relativo sale diverso dal sale cloridrato. In alcune forme di realizzazione, queste dosi riguardano la base libera di migalastat. In forme di realizzazione alternative, queste dosi riguardano 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".

In conformità con la presente invenzione, la quantità efficace di migalastat o di un relativo sale è 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. Perciò, in una o più forme di realizzazione, la dose è 150 mg di migalastat cloridrato o una dose equivalente di migalastat o un relativo sale diverso dal sale cloridrato, somministrata a una frequenza di una volta 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 somministrata a una frequenza di una volta a giorni alterni. In altre forme di realizzazione, la dose è 123 mg della base libera di migalastat somministrata a una frequenza di una volta 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 la somministrazione di 123 mg di FBE a una frequenza di una volta a giorni alterni, come 150 mg di migalastat cloridrato a giorni alterni.

La somministrazione di migalastat o del relativo sale può avvenire per un determinato periodo di tempo. In una o più forme di realizzazione, il migalastat o il relativo sale viene somministrato per una durata di almeno 24, 30 o 36 mesi o almeno 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 2, 3, 4 o 5 anni circa.

La somministrazione di migalastat o del relativo sale secondo la presente invenzione può essere in una formulazione adatta a qualsiasi via di somministrazione, ma è preferibilmente somministrata in una forma farmaceutica orale come una compressa, una capsula o una soluzione. Per esempio, al paziente sono somministrate per via orale capsule contenenti ciascuna 150 mg migalastat cloridrato o una dose equivalente di migalastat o un relativo sale diverso da 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 vettore farmaceuticamente accettabile, che può dipendere dal metodo di somministrazione.

In una o più forme di realizzazione, il PC (migalastat o relativo sale) è somministrato come monoterapia e può essere in una forma

adatta a qualsiasi via di somministrazione, tra cui per esempio, via orale sotto 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 prevenire l'aggregazione enzimatica *in vitro* prima della somministrazione.

Quando il PC (migalastat o relativo sale) è formulato per la somministrazione orale, le compresse o le 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 adatto 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 o oli vegetali frazionati); e conservanti (per esempio, metil o propil-p-idrossibenzoati o acido sorbico). Le preparazioni possono anche contenere sali tampone, agenti aromatizzanti, coloranti ed edulcoranti se necessario. 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 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 o dispersioni iniettabili sterili. In tutti i casi, la forma deve essere sterile e deve essere fluida nella misura in cui vi sia una siringabilità agevole. 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 sono preparate incorporando l'enzima purificato (se presente) e il PC (migelastat o relativo sale) nella quantità richiesta nel solvente appropriato con vari degli altri ingredienti elencati sopra, come richiesto, a cui fa seguito una sterilizzazione con filtro o terminale. Generalmente, le dispersioni sono preparate incorporando i vari ingredienti 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. 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; propilenglicole e polietilenglicole (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 endovenosa, sottocutanea, intra-arteriosa, intraperitoneale, oftalmica, intramuscolare, boccale, 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 i.v.) o interno (per esempio, un impianto bioerodibile).

Forme di realizzazione relative a formulazioni farmaceutiche e somministrazione possono essere combinate con qualsiasi delle altre forme di realizzazione dell'invenzione, per esempio forme di realizzazione relative a metodi di trattamento di pazienti con malattia di Fabry, metodi di trattamento di pazienti naïve alla ERT con malattia di

Fabry, metodi di trattamento di pazienti con esperienza di ERT con malattia di Fabry, metodi di riduzione del rischio di eventi CBV, metodi di trattamento di pazienti con malattia di Fabry con uno storico di eventi CBV, metodi di potenziamento di α -Gal A in un paziente a cui è stata diagnostica o che si sospetta abbia la malattia di Fabry, uso di uno chaperone farmacologico per α -Gal A per la fabbricazione di un medicinale per il trattamento di un paziente diagnosticato con malattia di Fabry o di uno chaperone farmacologico per α -Gal A per uso nel trattamento di un paziente a cui è stata diagnostica la malattia di Fabry nonché forme di realizzazione relative a mutazioni suscettibili, ai PC e relativi dosaggi idonei.

In una o più forme di realizzazione, PC (migalastat o relativo sale) è somministrato in combinazione con ERT. La ERT aumenta la quantità di proteina introducendo in modo esogeno enzima di tipo selvatico o biologicamente funzionale mediante infusione. Questa terapia è stata sviluppata per molti disturbi genetici, tra cui LSD come la malattia di Fabry, come indicato sopra. Dopo l'infusione, è previsto che l'enzima esogeno sia 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 alcune 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 è fatto passare dalla ERT alla terapia con migalastat. In alcune forme di realizzazione, un paziente in ERT è identificato, l'ERT del paziente è 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.

Eventi CBV

I regimi di dosaggio descritti nella presente possono ridurre il rischio di eventi CBV in pazienti con malattia di Fabry. Gli eventi CBV, includenti ma non limitati a ictus e attacco ischemico transitorio, sono eventi clinici gravi comuni tra pazienti con malattia di Fabry, che si verifica nel -18% dei pazienti non trattati in periodo medio di 4,5 anni secondo una metanalisi di El Dib, *et al.* (El Dib R. PLoS One. 2017;12(3):e0173358). È stato rilevato che l'incidenza di eventi CBV in pazienti che ricevono la ERT è varia dal 2% al 27%. Tuttavia, l'effetto della ERT sul rischio di eventi CBV resta sconosciuto per via della carenza di studi controllati con placebo, e l'enzima lisosomiale ricombinante non è stato mostrato attraversare la barriera ematoencefalica.

Come descritto in ulteriore dettaglio negli esempi di seguito, studi di fase 2 e 3 hanno riscontrato che la terapia con migalastat riduce

l'incidenza di eventi CBV sia nei pazienti naïve alla ERT sia con esperienza di ERT. Di conseguenza, la terapia con migalastat può essere usata per ridurre il rischio di eventi CBV e/o per trattare pazienti con malattia di Fabry che hanno un rischio elevato di eventi CBV, tra cui pazienti che hanno uno storico di eventi CBV o pazienti che non hanno uno storico di eventi CBV.

ESEMPI

ESEMPIO 1: Regimi posologici per il trattamento di pazienti con malattia di Fabry con esperienza di ERT e naïve alla ERT usando migalastat cloridrato

Questo esempio descrive studi di fase 2 e 3 della terapia con migalastat in pazienti con malattia di Fabry con esperienza di ERT e naïve alla ERT.

Progetti di studio

Queste analisi hanno incluso dati provenienti da 4 sperimentazioni cliniche di fase 2 e 4 di fase 3 con interruzione dei dati il 10 febbraio 2017 come mostrato nella figura X1 di seguito.

FAB-CL-202 (NCT00283959), FAB-CL-203 (NCT00283933), e FAB-CL-204 (NCT00304512) sono stati studi non comparativi di fase 2, in aperto, che hanno valutato la sicurezza, tollerabilità, farmacocinetica (PK) e farmacodinamica (PD) del migalastat (intervallo di dosaggio: 50-250 mg) in pazienti con malattia di Fabry.

FAB-CL-205 (NCT0052607) è stato uno studio di estensione in aperto (open-label extension, "OLE"), a lungo termine, di fase 2 per

pazienti che hanno completato le sperimentazioni cliniche di fase 2, tra cui FAB-CL-202, FAB-CL-203 e FAB-CL-204. Lo studio ha incluso un periodo con migalastat 150 mg a giorni alterni (QOD), in seguito un periodo di aumento di dosaggio, seguito da 150 mg QOD.

FACETS (AT1001-011, NCT00925301) è stato uno studio controllato con placebo di fase 3, progettato per valutare l'efficacia, la sicurezza e la PD di 6 mesi di migalastat 150 mg QOD rispetto al placebo, seguito da un'estensione in aperto (OLE) di 18 mesi di migalastat in pazienti naïve alla ERT con malattia di Fabry e varianti GLA suscettibili di migalastat.

ATTRACT (AT1001-012, NCT01218659) è stato uno studio con controllo attivo, in aperto, di fase 3 per confrontare l'efficacia e la sicurezza di 18 mesi di migalastat 150 mg QOD rispetto all'ERT, seguito da un'OLE di 12 mesi di migalastat, in pazienti trattati con ERT con varianti GLA suscettibili di migalastat.

AT1001-041 (NCT01458119) è stato uno studio di OLE a lungo termine che ha valutato la sicurezza e l'efficacia a lungo termine del migalastat in pazienti che hanno completato FAB-CL-205, AT1001-011 o AT1001-012

AT1001-042 (NCT02194985) è uno studio di OLE a lungo termine in sviluppo che ha valutato la sicurezza e l'efficacia a lungo termine del migalastat in pazienti che hanno partecipato a AT1001-012 o AT1001-041.

Analisi

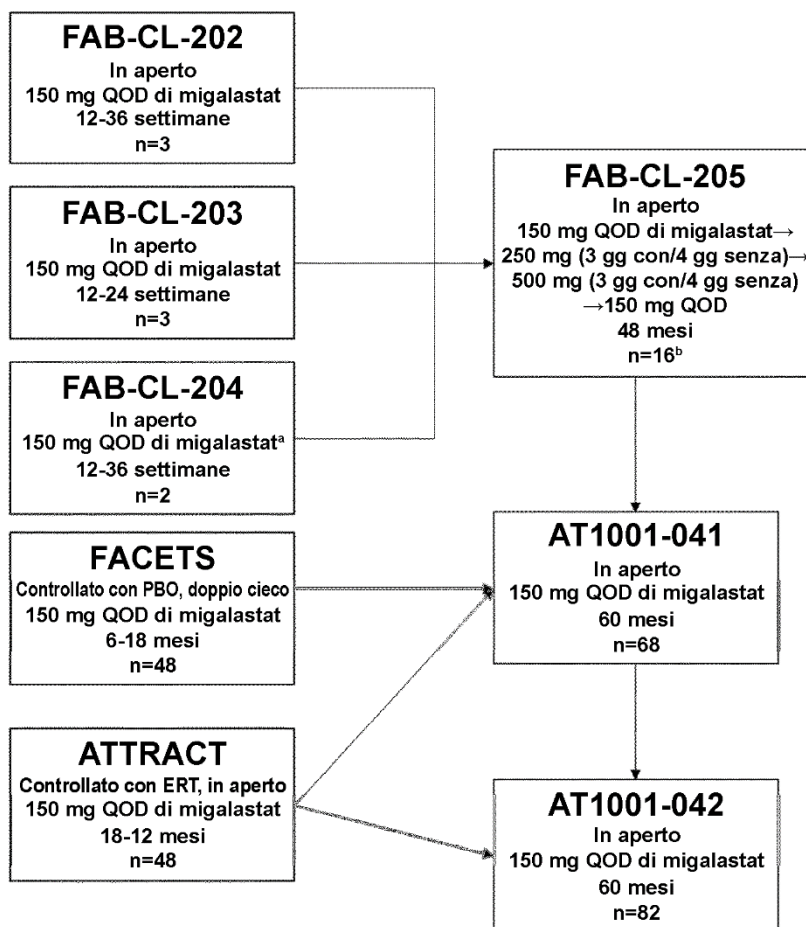
L'analisi valuta eventi CBV riportati come eventi avversi emergenti nel trattamento (treatment-emergent adverse events, "TEAE") durante il trattamento con migalastat a 150 mg QOD in pazienti con mutazioni suscettibili in sperimentazioni cliniche di fase 2 e fase 3.

Gli eventi CBV sono stati identificati ricercando nello storico medico e negli elenchi di TEAE con termini correlati a ictus, tra cui ischemia di tronco cerebrale, infarto cerebrale, emorragia cerebrale, ischemia cerebrale, accidente cerebrovascolare, ictus embolico e TIA.

Solo i pazienti suscettibili che hanno ricevuto almeno 1 dose di migalastat 150 mg QOD sono stati inclusi in questa analisi.

La suscettibilità è basata sui risultati convalidati da buone pratiche di laboratorio (GLP), saggio di suscettibilità di migalastat *in vitro*.

Studi clinici inclusi nelle analisi



PBO=placebo; QOD=a giorni alterni

I numeri dei pazienti indicano i pazienti suscettibili che hanno ricevuto almeno una dose di 150 mg QOD in ciascuno studio.

^aFAB-CL-204 ha incluso anche pazienti che hanno ricevuto 50 o 250 mg di migalastat QOD.

^bFAB-CL-205 ha coinvolto anche pazienti che hanno completato FAB-CL-ZOI (studio di aumento di dose di 25, 50, 100 e 250 mg di migalastat), nonché pazienti suscettibili aggiuntivi provenienti da FAB-CL-204 che hanno ricevuto 50 o 250 mg di migalastat QOD durante FAB-CL-204. Il numero di pazienti elencati per FAB-CL-205 include tutti i pazienti suscettibili che hanno ricevuto almeno 1 dose da 150 mg di migalastat QOD in FAB-CL-205.

^cAT1001-041 è stato interrotto precocemente e i pazienti in AT1001-041 hanno avuto la possibilità di essere trasferiti allo studio AT1001-042.

FAB-CL-202, FAB-CL-203, FAB-CL-204 e FAB-CL-205 sono studi clinici della fase 2; FACETS, ATTRACT, AT1001-41 AND AT1001-042 e sono studi clinici della fase 3

Risultati

Esposizione totale a migalastat 150 mg QOD

La durata media totale (SD) dell'esposizione a migalastat 150 mg QOD è stata di 4,0 (2,0) anni (N=114).

La durata dell'esposizione a migalastat 150 mg QOD è variata da 0,1 a 8,3 anni, con una mediana di 4,4 anni.

Caratteristiche demografiche e di base

L'età media (SD) di tutti i pazienti suscettibili che hanno ricevuto almeno 1 dose di migalastat 150 mg QOD è stata di 46,2 (13,1) anni (intervallo: da 16 a 72 anni) (tabella 2). La maggior parte era bianca e il 57,0% era femmina. Il tempo medio (SD) dal momento della diagnosi della malattia di Fabry è stato 9,8 (10,1) anni (intervallo: da 1 a 44 anni).

Tabella 2. Caratteristiche demografiche e di base: tutti i pazienti suscettibili che hanno ricevuto migalastat 150 mg QOD

Parametro	FAB-CL 202, 203, 204 e 205 (n=17)	FACETS (n=48)	ATTRACT (n=49)	Totale (N=114)
Età, anno				
Media (SD)	43,1 (13,4)	43,4 (11,2)	50,0 (14,0)	46,2 (13,1)
Mediana (intervallo)	42,0 (18, 65)	46,0 (16, 68)	54,0 (18, 72)	46,5
Gruppo di età, n (%)				
<18 anni	0	1 (2,1)	0	1 (0,9)

Parametro	FAB-CL 202, 203, 204 e 205 (n=17)	FACETS (n=48)	ATTRACT (n=49)	Totale (N=114)
Età, anno				
18, fino a <65 anni	15 (88,2)	46 (95,8)	42 (85,7)	103 (90,4)
≥65 anni	2 (11,8)	1 (2,1)	7 (14,3)	10(8,8)

Sesso, n (%)				
Femmina	5 (29,4)	30 (62,5)	30 (61,2)	65 (57,0)
Maschio	12 (70,6)	18 (37,5)	19 (38,8)	49 (43,0)
Anni diagnosticati con malattia di Fabry				
Media (SD)	7,2 (7,5)	7,6 (7,8) ^a	12,9 (12,1)	9,8 (10,1)
Mediana (intervallo)	5,0 (2, 34)	5,0 (1, 25)	7,0 (3, 44)	6,0 (1, 44)

ACEI = inibitore dell'enzima di conversione dell'angiotensina; ARB = blocco di recettore dell'angiotensina; RI = inibitore della renina; SD = deviazione standard.

^aLa data di diagnosi della malattia di Fabry non è stata registrata per 1 paziente in FACETS.

Storico medico di eventi CBV

Sedici su 114 pazienti (14%) ha avuto esperienza di eventi CBV prima del trattamento con migalastat (tabella 3). Un paziente proveniente dallo studio AT1001-012 ha riportato 2 eventi CBV nello storico medico.

In 5/16 pazienti, gli eventi CBV sono stati considerati una condizione corrente all'ingresso nello studio come riportato nello storico medico. Un paziente proveniente da AT1001-011 aveva un'ischemia cerebrale in sviluppo; un altro aveva infarto di tronco cerebrale in sviluppo. Due pazienti provenienti da AT1001-012 avevano TIA in sviluppo, uno aveva un accidente cerebrovascolare in sviluppo, nello specifico ictus dell'arteria cerebrale mediana sinistra.

L'età media (SD) al momento del primo evento CBV è stata 43,6 (14,4) anni.

Tabella 2. Storico medico di eventi CBV

	FAB-CL 202, 203, 204 e 205 (n=17)	FACETS (n=48)	ATTRACT (n=49)	Totale (N=114)
Ischemia del tronco cerebrale	0	0	0	0
Infarto cerebrale	0	1 (2%)	0	1 (1%)
Emorragia cerebrale	0	0	0	0
Ischemia cerebrale	0	1 (2%)	1 (2%)	2 (2%)

	FAB-CL 202, 203, 204 e 205 (n=17)	FACETS (n=48)	ATTRACT (n=49)	Totale (N=114)
Accidente cerebrovascolare	0	2 (4%)	3 (6%)	5 (4%)
Ictus embolico	0	0	0	0
Attacco ischemico transitorio	2 (12%)	2 (4%)	5 (10%)	9 (8%)
Storico di qualsiasi evento CBV^a	2 (12%)	6 (12%)	8 (16%)	16 (14%)
^a L'ultima riga mostra il numero di soli pazienti con eventi CBV. L'1 paziente con >1 evento CBV è stato contato una sola volta.				

Occorrenza di eventi CBV durante il trattamento con migalastat 150 mg QOD

Undici eventi CBV sono stati riportati durante il trattamento con migalastat 150 mg QOD in 8 pazienti (7%) (tabella 4). Sette eventi CBV sono stati classificati come eventi avversi gravi (SAE); tuttavia, la maggior parte degli (82%) eventi sono stati di gravità lieve o moderata (tabella 5). Due eventi CBV hanno portato all'interruzione del trattamento (tabella 5). Nessuno degli 11 eventi CBV è stato considerato correlato al trattamento.

Sei degli otto 8 pazienti ha avuto esperienza di eventi CBV prima di ricevere il trattamento con migalastat; pertanto solo il 2/114 (2%) dei pazienti ha avuto un primo evento CBV durante l'assunzione di migalastat (tabella 5). L'età media (SD) dei pazienti al primo evento durante il trattamento con migalastat è stata 50,6 (14,6) anni (tabella 5). Il periodo medio (SD) sotto migalastat 150 mg QOD all'inizio del primo evento è stato di 1,1 (1,1) anni.

Tra i 16 pazienti con evento CBV precedente al migalastat, 10 (63%) non hanno avuto esperienza di nuovo evento CBV durante il trattamento con migalastat.

Tabella 4. Eventi CBV durante il trattamento con migalastat 150 mg QOD secondo sperimentazione

	FAB-CL 202, 203, 204 e 205 (n=17)	FACETS (n=48)	ATTRACT (n=49)	Totale (N=114)
Ischemia del tronco cerebrale	0	1 (2%)	0	1 (1%)
Infarto cerebrale	1 (6%)	0	0	1 (1%)
Emorragia cerebrale	0	1 (2%)	0	1 (1%)
Ischemia cerebrale	1 (6%)	0	0	1 (1%)
Accidente cerebrovascolare	1 (6%)	0	0	1 (1%)

	FAB-CL 202, 203, 204 e 205 (n=17)	FACETS (n=48)	ATTRACT (n=49)	Totale (N=114)
Ictus embolico	0	0	0	0
Attacco ischemico transitorio	1 (6%)	1 (2%)	2 (4%)	4 (4%)
Qualsiasi evento CBV^a	3 (18%)	3 (6%)	2 (4%)	8 (7%)
^a L'ultima riga mostra il numero di soli pazienti con eventi CBV. I pazienti con >1 evento CBV sono stati contati una sola volta.				

**Tabella 5 Eventi CBV durante il trattamento con migalastat
150 mg QOD secondo paziente**

B

Paz ient e n.	Se ss o	Muta zion e	Event o CBV	Dur ata eve nto (gio rni)	Età all'ini zio dell'e vento (anni)	Tem po sotto miga lasta t a 150 mg QOD all'ini zio (gior ni)	Gr av e	Sev erit à	Ris olto	Tratta ment o interr otto	Stor ico di eve nti CB V
1	F	M284 T	TIA (occhi o destro)	3	38	589	Sì	Liev e	Sì	No	Acci dent e CB V
2	M	I253 T	Emorr agia cerebr ale	In svil upp o ^b	63	289	Sì	Gra ve	No	Sì	Nes sun o

Paz ient e n.	Se ss o	Muta zion e	Event o CBV	Dur ata eve nto (gio rni)	Età all'ini zio dell'e vento (anni)	Tem po sotto miga lasta t a 150 mg QOD all'ini zio (gior ni)	Gr av e	Sev erit à	Ris olto	Tratta ment o interr otto	Stor ico di eve nti CB V
3	M	I253 T	Ische mia del tronco cerebr ale (regio ne pontin a	47	66	1413	Sì	Mo der ata	Sì con pos tum i	No	Isch emi a cere bral e

B

Paz ient e n.	Se ss o	Muta zion e	Event o CBV	Dur ata eve nto (gio rni)	Età all'ini zio dell'e vento (anni)	Tem po sotto migra lasta t a 150 mg QOD all'ini zio (gior ni)	Gr av e	Sev erit à	Ris olto	Tratta ment o interr otto	Stor ico di eve nti CB V
			sinistr a)								
4	M	G35 R	TIA	7	59	24	Sì	Mo der ata	Sì	No	TIA
5	F	L32P	TIA	1	56	559	No	Liev e	Sì	No	TIA
			TIA	1	56	624	No	Mo der ata	Sì	No	

Paz ient e n.	Se ss o	Muta zion e	Event o CBV	Dur ata eve nto (gio rni)	Età all'ini zio dell'e vento (anni)	Tem po sotto miga lasta t a 150 mg QOD all'ini zio (gior ni)	Gr av e	Sev erit à	Ris olto	Tratta ment o interr otto	Stor ico di eve nti CB V
6	M	P259 R	Accide nte CBV	220	21	90	Sì	Gra ve	Sì con pos tum i	Sì	Nes sun o
7	F	R112 H	TIA	3	39	21	Sì	Mo der ata	Sì	No	TIA

AB

Paz ient e n.	Se ss o	Muta zion e	Event o CBV	Dur ata eve nto (gio rni)	Età all'ini zio dell'e vento (anni)	Tem po sotto miga lasta t a 150 mg QOD all'ini zio (gior ni)	Gr av e	Sev erit à	Ris olto	Tratta ment o interr otto	Stor ico di eve nti CB V
			TIA	2	41	666	Sì	Mo der ata	Sì	No	
8	F	P205 T	Infarto cerebr ale (arteri a media na	In svil upp o ^c	60	371	No	Mo der ata	No	No	TIA

B

Paz ient e n.	Se ss o	Muta zion e	Event o CBV	Dur ata eve nto (gio rni)	Età all'ini zio dell'e vento (anni)	Tem po sotto miga lasta t a 150 mg QOD all'ini zio (gior ni)	Gr av e	Sev erit à	Ris olto	Tratta ment o interr otto	Stor ico di eve nti CB V
			destra)								
			Scope rta di MRI anom ala (vecch io cambi	In svil upp o ^c	60	182	No	Mo der ata	No	No	

Paz ient e n.	Se ss o	Muta zion e	Event o CBV	Dur ata eve nto (gio rni)	Età all'ini zio dell'e vento (anni)	Tem po sotto miga lasta t a 150 mg QOD all'ini zio (gior ni)	Gr av e	Sev erit à	Ris olto	Tratta ment o interr otto	Stor ico di eve nti CB V
			ament o ische mico del lobo frontal e destro)								

B

Paz ient e n.	Se ss o	Muta zion e	Event o CBV	Dur ata eve nto (gio rni)	Età all'ini zio dell'e vento (anni)	Tem po sotto miga lasta t a 150 mg QOD all'ini zio (gior ni)	Gr av e	Sev erit à	Ris olto	Tratta ment o interr otto	Stor ico di eve nti CB V
Paziente n.		Parametri di base^a									
		Temp o dalla diagn osi (anni)	Pressione sanguigna (mm Hg)	Prote inuri a (mg/2 4 hr)	eGFR_{CKD-EPI} (mL/min/1,73 m²)	LVMi (g/m²)	Uso ACEI/A RB/RI				
1		14,5	120/80	399	81,8	88,7	No				
2		0,3	NA	1900	53,8	142, 8	No				

Paz ient e n.	Se ss o	Muta zion e	Event o CBV	Dur ata eve nto (gio rni)	Età all'ini zio dell'e vento (anni)	Tem po sotto miga lasta t a 150 mg QOD all'ini zio (gior ni)	Gr av e	Sev erit à	Ris olto	Tratta ment o interr otto	Stor ico di eve nti CB V
3		4,6	120/80	331	86,8			176, 2	Sì		
4		10	110/67	182	84,9			154, 9	Sì		
5		2,2	112/64	231	73,2			68,6	Sì		
6		8,3	110/70	66	137,4			NA	No		
7		5,8	113/73	163	120,0			NA	No		
8		1,9	129/69	NA	NA ^d			NA	No		

LVMi=indice di massa ventricolare sinistra; MRI=immagini di risonanza magnetica; Na=non applicabile; TIA=attacco ischemico transitorio.

^aLa base è l'inizio del migalastat 150 mg QOD.

^bIn sviluppo al momento dell'interruzione in FACETS.

^cIn sviluppo al termine di FAB-CL-204.

^dQuesto paziente ha avuto un eGFR_{MDRD} di 76,4 mL/min/1,73 m².

Come è possibile osservare dalle suddette tabelle, l'incidenza complessiva degli eventi CBV è stata inferiore durante il trattamento con migalastat. Durante una media di 4 anni di migalastat, 8/114 (7%) pazienti hanno avuto esperienza di eventi CBV, verificatisi prevalentemente in pazienti con uno storico di eventi CBV.

Le forme di realizzazione descritte nella presente sono destinate ad essere illustrative delle presenti composizioni e dei presenti metodi e non sono destinate a limitare la portata della presente invenzione. Sono destinate a essere escluse varie modifiche e cambiamenti coerenti con la descrizione come insieme e che sono prontamente evidenti al tecnico del ramo. Le rivendicazioni allegate non devono essere limitate dalle forme di realizzazione specifiche esposte negli esempi, ma deve essere data loro la più ampia interpretazione coerente con la descrizione nel suo complesso.

Sono citati nel corso di questa richiesta brevetti, domande di brevetto, pubblicazioni, descrizioni di prodotti, numeri di accesso GenBank e protocolli.

RIVENDICAZIONI

1. Migalastat o relativo sale per uso in un metodo di riduzione del rischio di evento cerebrovascolare (CBV) in un paziente avente malattia di Fabry, il metodo comprendendo somministrare al paziente una formulazione comprendente una quantità efficace del migalastat o relativo sale a giorni alterni per almeno 2 anni, in cui la quantità efficace è da circa 100 mg a circa 150 mg di equivalente di base libera (FBE).

2. Migalastat o relativo sale per l'uso secondo la rivendicazione 1, in cui l'evento CBV comprende uno o più tra ischemia di tronco cerebrale, infarto cerebrale, emorragia cerebrale, ischemia cerebrale, accidente cerebrovascolare, ictus embolico o attacco ischemico transitorio.

3. Migalastat o relativo sale per l'uso secondo la rivendicazione 1 o 2, in cui il migalastat o relativo sale potenzia l'attività di α -galattosidasi A.

4. Migalastat o relativo sale per l'uso secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1-3, in cui al paziente sono somministrati circa 123 mg di FBE di migalastat o relativo sale a giorni alterni.

5. Migalastat o relativo sale per l'uso secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1-4, in cui in cui al paziente sono somministrati circa 150 mg di migalastat cloridrato a giorni alterni.

6. Migalastat o relativo sale per l'uso secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1-5, in cui la formulazione comprende una forma di dosaggio orale.

7. Migalastat o relativo sale per l'uso secondo la rivendicazione 6, in cui la forma di dosaggio orale comprende una compressa, una capsula o una soluzione.

8. Migalastat o relativo sale per l'uso secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1-7, in cui il migalastat o relativo sale è somministrato per almeno 3 anni o per almeno 4 anni.

9. Migalastat o relativo sale per l'uso secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1-8, in cui il paziente non ha avuto un primo evento CBV prima di iniziare la somministrazione del migalastat o del relativo sale.

10. Migalastat o relativo sale per l'uso secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1-8, in cui il paziente ha avuto un primo evento CBV prima di iniziare la somministrazione del migalastat o del relativo sale.

11. Migalastat o relativo sale per l'uso secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1-10, in cui il paziente è un paziente naïve alla terapia enzimatica sostitutiva (ERT).

12. Migalastat o relativo sale per l'uso secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1-10, in cui il paziente è un paziente con esperienza di ERT.

13. Migalastat o relativo sale per l'uso secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1-12, in cui il paziente ha una mutazione suscettibile al saggio HEK di α -galattosidasi A.

14. Migalastat o relativo sale per l'uso secondo la rivendicazione 13, in cui la mutazione è divulgata in una tabella di riferimento farmacologica.



15. Migalastat o relativo sale per l'uso secondo la rivendicazione 14, in cui la tabella di riferimento farmacologica è fornita in un'etichetta di prodotto per un prodotto di migalastat approvato per il trattamento della malattia di Fabry.

Si attesta la perfetta conformità della traduzione che precede.

ccctctctgtaggggcagagaggttctacttcattactgcgtctcctgggaaggccatcag 60
 gactgctggctaaaagtgggaaccaggactctttgtgagttagaatttgggtatttatat 120
 gtgtgttatcacatTTTTTAAAAactgtaacgacatcagggtgagcagtcgtctccgg 180
 gtgggaattatgtgtatTTTTTAAATTTTactataatgttatttttcaaagtctgaa 240
 attgaatatgtagattgtgttatcagcagaaaaataaacattattcaaatactctattc 300
 agtaaagtaatttattggggcctttgtcaagcagcatttgcctagatgtgactctaca 360
 gataaaattcacttggggcctccccttacagacaatcaggcagtgagactgagtgccctg 420
 aatggatagaccagcactcagaccactattttcagtatctgtttttcttaactcagggcc 480
 gtggttttcaaactgtttttgccttacgggtcaccttaggggtccccgagaccggcccag 540
 acagacagatatacaaaaacacatacacagtcagagcgtccaccatttccccaccaggc 600
 gcagcacaggcggcttcccggcactgagatgggggggaggaggagagagcgcgaggggg 660
 gaggggaaagcagagaaacgaaagagggcggagggcggcccccgaaccccgctctggtctca 720
 tcatcaccacccctgggtcccagttcccacccacacccaacctctaacgataccgggt 780
 aattttcctccttcttcccctcaaacggctatagcgagacggtagacgacgaccagaacta 840
 cttctgctcacgtaagcgagtaatacagtgagcgcctacgtcatgtgagatctcggtcac 900
 gtgagcaactctcggcttaactcgggatcactaaggtgccgcaactccttctggtatgg 960
 aaataggcggggcaatatacaaaaaggaaggggtgattggttagcggaaactcttacg 1020
 tgactgattattggtctacctctggggataaccgtcccagttgccagagaaacaataacg 1080
 tcatattttaataagtcactcgggtgattggtcggcccctgaggtaactctaaaagcccag 1140
 gttaccgcgggaaatttatgctgtccggtcaccgtgacaatgcagctgaggaaccagaa 1200
 ctacatctgggctgcgcgcttgcgcttccgttccctggcctcgtttcctgggacatccct 1260
 ggggctagagcactggacaatggatggcaaggacgctaccatgggctggctgcactgg 1320
 gagcgttcatgtgcaaccttgactgccaggaagagccagattcctgcatcaggtatcag 1380
 atattgggactccttccccttgcctttccatgtggttgggtgtgtttggggaactgga 1440
 gactctcaacgggaaacagttgagcccagggagagctccccaccgactctgctgctgc 1500
 tttttatcccagaaaactgtccgaatcaggactagcctaaactttctctgtgtgac 1560
 ctttctgggatgggagtcgggcccagcggcccctgtttctttctctctctctctctct 1620
 cgttctccttctcttctcttctcttctcttctctctctctctctctctctctctctct 1680
 ttctcttttttcaactgctccttgcagagcagggccaccocataggcagtggtccc aaagt 1740
 agccctgcccggttctattcagacccttcttgtgaactctgctcttctctgcccgggtg 1800
 ctaccggttagaacatctagggtgggtaggaggaatggggaactaagattcgtgccattt 1860
 tttctccttttggggtcgtggatttctcggcagtatctcgaggaggttagagagaccata 1920
 aggtcgtgagatctctcccacctcgcccatgagcgtggcatcaggctggaaggttgaca 1980
 tggaggaactttatacatttacacctttgctgaggggtgaggctggattagataggtat 2040
 tgaacatatactgacctcacaatccttatctgtaattgggattacaaccttttaatttc 2100
 agggagctgacaaaaaaaaatctgaaaaatagttcttatctcacacaggtgagttttcaag 2160
 gagataacctatttaagttacatgacagcgttgaccattcaactgcgcttacagagc 2220
 aaatgttcaatgggaaaatgaatgtaaatctacaaatctgaatgaatatgtgtattttc 2280
 tggagagaggatatttaccttcttcaaattctcaaagggtctgtgatttaaaaaaggt 2340
 taggaatcactgatagatgttggtaaaaaggtggcagtcacagtaactttctgtgtccata 2400
 agttattcctatgaatctttatagataaagtcaggatgttggtcagacatcacagaag 2460
 aaatggccttgaagtctcatgtgacctgtggtacagtatgtgtggcaattttgccc 2520
 tcacggatttttttttatttggtatttgcacatctgattataaaaactaatgcagatcattgc 2580
 aaaaaatgtagataaagaagagcaaaatgaaaaataagatttccccccaccggtccacca 2640
 ccgagaaataatcatggtttaaatgttaataatacaaccttacaattgttttctataaaa 2700
 tgaaaacatagatttctttatttcattattttccataaaaaatggatcatgtttatgtca 2760
 tgtttggctaatggcaagaccctggcaccagctctgggctcaaattctgcctcattgtta 2820
 cttagccctgtgacattgggtaaattacacttttttttttttttttttttttttgagacggg 2880

FIG.1A

B

tctcgtctgtcgcccaggctggagtgagtgccacgatctcggtcactgcaagtcgccc
ctcctgggttcacgccattctctcgcctcagcctcccagtagctgggactacaggcgcc 2940
tgccaccacgcctggctcttttttttttttttttttttttttagtacagacggggttcac 3000
catgtagccagggtggctctcaatctcctgaacctcgtgattcgccccgctcagcctcca 3060
aagtgtgggtgtgagccaccgtgccagccttacttttttttttgagaggggtctcact 3120
ctgtcaccagggtggagtgagtgccgctctcgtcagtgcaaacccaccccccg 3180
ggtttaagcagttctcctgtcgtagctcctcagtagctgggattacaggcacaccacca 3240
cggccagctaatttttgtatttcagtagagacgggttcaccatgttgcccaagctggt 3300
ctcgaactcctggcctcaagtgatctgccccgcttggcctcccagagtgctgggattaca 3360
gggtgtgagccaccgcacccggcctctttttctttttttagtctatcataccttgcaata 3420
cagtggttcttctctatgtgtgggtttgatatttatgtaatacaaacacatcagttttcc 3480
ttcttgattctgactttggggctcatgctgagaaagtcctttcctacctgaagataatac 3540
agtataacgtttcttactagtattttgtggatttttaaaatatttaaatcttttagtcc 3600
atctgaacttgttctctatcagaaatgccacatttaataaataataagtcccatgggat 3660
cagatggctggaaggacctcttcgaaactttgtttaattccattaatctgtgtattctt 3720
atctaatgtcaatagttcccaactagcttcttcttttttttttttttttttttttttt 3780
ttttgagctggagtttcgctcttgttgcccaggctggagtagcaatgtcagatctcggtt 3840
caccgcaacctccgctcccaggctcaagcaattctcctgcctcatcctcgcgagtagct 3900
ggaaattacaggctcgcgccaccagcctagctatttttgtattttttagtagagatgggtt 3960
tctccatgttggtcaggctggctctcaaacccagcctcagggtgatctgcctgcctcggc 4020
ctccccaaatgctgttattacaggogtgagccaccaagccagccttcatcttttaataga 4080
atgtacatgtatgtaacttttaggtgaacttttgtaatgttggtgccaagttccttaa 4140
aagccttttggaagctgggacggtggccacgctgtaatcccagcattttgggagctcg 4200
aggcaggtggatcacttgaggccaggagttcaagactagcctagccaaaatgcaaaaccc 4260
tgtctcactaaagatacaaaaattagccggatgcatggcacatgcctgtaatctcagc 4320
tactcgggaggctgaggtagaagaatcgcttgaaccggggaggcagaggttgacgtgagc 4380
aagatggcgccactgcaactccagcctgggtgacagaggagactccatctcaaaaaaaaa 4440
aaaaaaaaaaaaagataaaaaaggaaacctaaagtaactctgggctttgttaaggattttgt 4500
aaatatacaaaaggattgcagggaaaattaactatttttaataatgagtagcttatcca 4560
agagcaaaaataatattctccatttattcaaatcatttaggagcatcatagttttaacat 4620
atgggccttgcaactatcttaatttatctctagggcattttaggttgttcagttgttctt 4680
gtgaatgggatctttttctccaaataggattattgttgatctggttgattatgtaact 4740
ttgtagttctgactttactgaactgtctcttagatctaatactcttttcaatttcatc 4800
atataattctcattcctattttgtttggggtttttagggcgggaatattaacgggataag 4860
agagcaaaaagaaaaatctgaaaaacaattcattttaccttacattgcttgtgattacta 4920
ccacactatfactgggttgaaaaaattgtgaaatccaagggtgcctaataaatgggagg 4980
tacctaagtggtcatttaataatgaattgtaatgatttatggaaattctctttcagtgagaag 5040
ctctcatggagatggcagagctcatggctcagaaggctggaaggatgcaggttatgag 5100
tacctctgcattgatgactgttgatggctccccaaagagattcagaaggcagacttcag 5160
gcagacctcagcgtttcctcatgggattcgcagctagctaattatgtgagttatag 5220
ataatgttcttggctcattcagaggactgaaagcacttctgtacagaagcttggttagaaa 5280
cagcctcatggccggcggtgggtgctcagcctgtaatcccaacactttgggaggccgag 5340
gcggtggatcacctgaggtcaagagttcaagaccagcctggccaacatggtgaaacccc 5400
aactctattaaaagtaaaaaaattagctggcagatggtggtgaaacgctgtaaccccagc 5460
tactgggaggctgaggcaggagaatcgcttgaaccaggaggtggaagttcagtgagc 5520
tgagatcacgccattgcaactcagcctgggcaacaaaagagaaactccatctcaaaaaa 5580
aaaaaaggaaaaaagaaacagccctcatgacacttagaaagtagaatagctggctgtt 5640
atctgaacattgaattgtaaggcttaccagtgagctttgcattccatcagcagacaatt 5700
5760

FIG.1B

B

tctatcaacagtccttccaccagtatctctaaaatatctcctgaatcagcccacttccct 8700
ccatcttcactacatgcaccctggccttccaagctactatcggctctcaaccagactgct 8760
gggaccacctgatctctctgcttccactctgtctcaacccccatctattttccaagcagc 8820
actagagttatcatattaaaatgtaaatacagtttttttttaagaaaaaacctga 8880
gacttaacagagttataaaaaatataaatgtcatcatcagttccctgcttaaaacctta 8940
actcgttccaattgcacttggaaatgaaaccaaactgcactgatccagcccttgctgcc 9000
tccccaaagtccaaggggtcatggctctttccctggctacactggttttctttctgtccc 9060
tcaacactgcaagcctattgctgccccagggcctttacacttgcttttttctgctaga 9120
acagttcttccccaaagatttttaagggcgggctccttaacattgaagtcgcagacca 9180
aacgccacatatgcagacagttcttctctactactttaaaatagccctctgtccattca 9240
ttcttcatcacattaacctgtttaattttctctcagagctccacactatgtggaagtat 9300
ttgtgacttgtaaccatgtctcccactagagtgtaagtttcatgagggcagggaacct 9360
gtctgacttgactgtatctctcgcatatggttaagtgtaaatagtattttatggaatg 9420
aatccctattattccctcattatctctgcaaaaatagcttttttctcaacatcttaaac 9480
tgatatcccacctgctatctcaaaacttttttttgagacagagctcactgtcacc 9540
ggctagagtgcaaggcgcctctcggctcactgcaacctccgcctccgggttaagcg 9600
attctcttgctcagcctcccagtagctgggattataggcgtgcgctaccacatctggct 9660
aatttttgatttttagtagagatggtttcccatggtggccaggctgtctcgaactcc 9720
tgacctcagatgatccacctgctcggcctcccaaagtgcgggattacaggcatgagcc 9780
accgtgccagcctctcaaaactttttattccattaacaaactatagctgggatttaag 9840
ttttcttaatacttgatggagtcctatgtaattttcagcttttaattttactaagacca 9900
ttttagttctgattatagaagtaaaatcaacttaagggatttcaagttatagggcctact 9960
ctgaaagcaaaactcttacagtgaaaattcattataagggtttagacctccttatggaga 10020
cgttcaatctgtaaaactcaagagaaggctacaagtgctcctttaaactgtttcatctc 10080
acaaggatgtagtagaaaagtaaacagaagagtcatactgttttcacagcccaattata 10140
cagaaatccgacagtagcactgcaatcactggcgaaattttgctgacattgatgatcctgga 10200
aaagtataaagagtatcttgactggacatcttttaaccaggagagaattggtgatgtg 10260
ctggaccaggggggttggaaatgaccagataggtaaaaacttgagccctcctgttcaag 10320
accctgggtaggctgtttctctattttgacattcaaggtaaatcacaggtaaagtctctg 10380
ggaggaggctttatgtgagagtagtagcaggatgctgtgaaagtgggttctccata 10440
tgggtcatctaggtaaactttaagaatgtttcctcctctctgtttgaattatttcattct 10500
ttttctcagtttagtgattggcaactttggcctcagctggaatcagcaagtaactcagatg 10560
gccctctgggctatcatggctgctcctttatcatgtctaatacactccgacacatcagc 10620
cctcaagccaaagctctccttcaggataaggacgtaattgccatcaatcaggacccttg 10680
ggcaagcaagggtaccagcttagacaggtaaatagagtatatattttaagatggcttta 10740
tatacccaataccaactttgtcttgggctaaaatctattttttcccttgctctgatgt 10800
tactatcagtaataaagcttcttgctagaaacattactttatttccaaaataatgctaca 10860
ggatcattttaatttttccacaagtgcttgatagttctgacattagaatgaatgccaa 10920
actaacagggccacttatcactagttgctaaagcaaccacactttcttggttttcagggga 10980
gacaactttgaagtgtgggaacgacctctcaggcttagcctgggctgtagctatgata 11040
aacggcaggagatgggtggacctcgtcttataccatcgcagttgcttccctgggtaaa 11100
ggagtggcctgtaactcctgctgcttcatcacacagctcctccctgtgaaaaggaagcta 11160
gggtctatgaatggacttcaaggtaagaagtcacataaatcccacaggcactgttttg 11220
cttcagctagaaaatacaatgcagatgtcataaaagacttactttaaaatgtttatttt 11280
attgccaactactacttctgtccaccttttctccattcactttaaaagctcaaggcta 11340
ggtggctcatgcctgtaatcccagcactttgggaggtgagggcgggcagatcacctgagg 11400
tcgggactttgagacccgcctggacaacatggtgaaacccatttctataaaaaatataa 11460
aaatagccagggtggtggcgcacctgtggtccagctactctggggctgagggcatga 11520

FIG.1D

B

```
gaatcgcttgaaccgggagtggagggtgcattgagctgagatcatgccacctcactcca 11580
gcctgggcaacaaagattccatctcaaaaaaaaaaaaaagccaggcacagtggctcatg 11640
cctggaatcccagcacttttggagctgaggcaggcagatcacttgaggtaggatttca 11700
agaccagcctggctaacaatagtaagccctgtctctactaaaaatacaaaaattagccag 11760
gtatggtggcgagcttctgtagccccagctactcaggagactgaggcaggagaatcactt 11820
gaaccgggaagtgggggggtgcagtgacccaagatcacgccactgcattccagcctggg 11880
caacagagcaagactccatctcaaaaaaaaaaagttctatcttctgaataaaaatttccg 11940
aagtttaacttttaggaataaaaactatataaaccgtatctactcatccagataccaccc 12000
cccttgttgagattctctcccaattatcaaaatgtgtagcatatctaactaccaagagct 12060
aaacatcattaagactgaaatgtattaagaaggatgtataggccaggcaagggtgtctcac 12120
gcctgtaatcccaacactttgggaggccaagtggggcggatcacgaggtcaggagatgga 12180
gaccatcctggccaacatggtgaaacccctctctactaaaaatacaaaaattagccagg 12240
caggtggcaggcacctgtaatcccagctactccagaggctgaggcaggacaatcacttga 12300
acctgggaggcagaggctgcagtgagctgaggttgtaccaattgcactccagcctaggta 12360
acgagcaacactccatctcaaaaaagaaaaaaaaaagatgtataatttggaactgta 12420
agaggcattttaaga 12436
```

FIG.1E

B

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

FIG.2

Atgcagctgaggaatcccagagctccacctgggctgtgctctggctctgcggttcctggcc	60
Ctcgtgtcctgggacatccctggcgttagggccctcgataacggactggcccggaccccc	120
Acaatgggatggctccactgggaaaggttcatgtgcaatctggactgtcaggaggaacc	180
Gactcctgcatcagcgaaaagctcttcatggagatggccgagctgatggtgagcgagggc	240
Tggaaggacgccggctacgagtatctgtgcatcgatgactgctggatggcccctcaaagg	300
Gactccgaaggcaggctgcaggctgatccccaaaggttccccacggaatccggcagctc	360
Gccaactacgtgcattccaagggcctcaagctcggcatctacgccgacgtgggcaacaaa	420
Acatgcccggattccccggcagcttcggctactacgacatcgacgccagacattcgct	480
Gattggggagtggaacctgctgaagtcgacggctgttactgcgattccctggaaaacctg	540
Gccgacggctacaaaacatgtccctcgccctgaaccggacaggcaggtccatcgtgtac	600
Agctgcgagtggcccctgtacatgtggccttccagaagcccaactacacagagatcagg	660
Cagtactgcaaccactggaggaacttcgctgacatcgacgactcctggaagagcatcaag	720
Agcacctggactggaccagcttcaaccaggagaggatcgtggacgtggctggaccggga	780
Ggctggaacgaccccgatatgctgggtgattggcaacttcggactgagctggaaccagcag	840
Gtgaccagatggccctgtgggccattatggccgctccctgttcatgtccaacgacctg	900
Aggcacatcagccccaggccaaggtctctgctgcaggacaaggatgtgatcgccatcaac	960
Caggaccccctgggcaagcagggtaccagctgaggcaaggagataacttcgaggtgtgg	1020
Gagaggcccctgtccggactggcttggccgtggccatgatcaatcggcaggagatcggc	1080
Ggaccccggctcctacaccattgctgtggccagcctgggaaaaggagtgcctgcaacccc	1140
Gcctgctcattaccagctgctccccgtgaagcggaagctgggcttctatgagtgacc	1200
Agcaggctgaggtcccatatcaatcctaccggcaccgtcctcctccagctcgagaatacc	1260
Atgcagatgagcctcaaggatctgctgtga	1290

FIG.3