

TRADUZIONE DEL BREVETTO EUROPEO N. 4176877 DAL TITOLO:
"METODI DI POTENZIAMENTO E/O STABILIZZAZIONE DELLA
FUNZIONE CARDIACA IN PAZIENTI CON MALATTIA DI FABRY"

*** **

DESCRIZIONE

RIFERIMENTO INCROCIATO A DOMANDE CORRELATE

Questa domanda rivendica la priorità rispetto alla domanda provvisoria U.S. N. di serie 62/550,984, depositata il 28 agosto 2017.

CAMPO TECNICO

I principi e le forme di realizzazione della presente invenzione riguardano in generale l'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 di glicosfingolipidi 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.

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.

US 2016/0324839 A1 descrive regimi di dosaggio per il trattamento delle malattie da accumulo lisosomiale utilizzando chaperoni farmacologici. Germain et al. (N Engl J Med 375(6): 545-555, 2016) descrivono il trattamento della malattia di Fabry con il chaperone farmacologico migalastat. Mehta et al. (Lancet 374(9706): 1986-1996, 2009) descrivono la terapia enzimatica sostitutiva con agalsidasi alfa in pazienti con malattia di Fabry e un'analisi dei dati di registro.

Tuttavia, rimane la necessità di terapie per il trattamento della malattia di Fabry, in particolare per potenziare la funzione cardiaca.

SOMMARIO

I riferimenti ai metodi di trattamento mediante terapia in questa descrizione devono essere interpretati come riferimenti a composti, composizioni farmaceutiche e medicinali della presente invenzione per l'uso in tali metodi.

La presente invenzione riguarda il trattamento della malattia di Fabry in pazienti già trattati con ERT utilizzando migalastat come definito nelle rivendicazioni. Tale trattamento include la stabilizzazione della funzione cardiaca, come la stabilizzazione dell'accorciamento frazionale centro-parietale (MWFS).

In una o più forme di realizzazione, il paziente ha MWFS compromesso prima di iniziare la somministrazione del migalastat o del relativo sale.

In una o più forme di realizzazione, il paziente ha ipertrofia del ventricolo sinistro (LVH) 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.

Al paziente sono somministrati 123 mg di FBE del migalastat o del relativo sale a giorni alterni.

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

In una o più forme di realizzazione, al paziente sono somministrati 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.

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

In una o più forme di realizzazione, il migalastat o il relativo sale viene somministrato per almeno 24 mesi.

Il paziente è un paziente già trattato con ERT.

In una o più forme di realizzazione, il migalastat o il relativo sale viene somministrato per almeno 30 mesi.

In una o più forme di realizzazione, la somministrazione di migalastat o di un relativo sale fornisce una variazione media di MWFS in un gruppo di pazienti già trattati con ERT con MWFS compromesso maggiore di circa -0,5% dopo 30 mesi di somministrazione di migalastat o di un relativo sale.

BREVE DESCRIZIONE DEI DISEGNI

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

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

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

e

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

DESCRIZIONE DETTAGLIATA

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 stabilizzano la funzione cardiaca.

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 di 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 con 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 essere presenti in emizigoti maschi e femmine portatori con la stessa prevalenza, sebbene le femmine siano tipicamente meno colpite.

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 specificamente a una proteina e ha uno o più dei seguenti effetti: (i) potenzia la formazione di una conformazione molecolare stabile della proteina; (ii) induce il trasferimento della proteina 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 specificamente 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 specificamente, questa espressione non si riferisce a chaperoni 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, cioè, chaperoni chimici. In una o più forme di realizzazione della presente invenzione, PC può essere un inibitore competitivo reversibile. 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 far riferimento 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 spostare

l'inibitore, cioè, gli inibitori competitivi possono legarsi in modo reversibile. Pertanto, la quantità di inibizione enzimatica dipende dalla concentrazione di inibitore, dalla concentrazione del substrato e dalle affinità relative dell'inibitore e del substrato per il sito attivo.

Come usata nella presente, l'espressione "si lega specificamente" si riferisce all'interazione di uno chaperone farmacologico con una proteina come α -Gal A, specificamente, un'interazione con i residui amminoacidici della proteina che partecipano direttamente all'entrata in contatto con il chaperone farmacologico. Uno chaperone farmacologico si lega specificamente 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 all'attività di α -Gal A nelle cellule di 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 (in particolare una malattia del sangue).

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 il 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 il 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 dei potenziamenti di marcatori surrogati per malattia di Fabry divulgati in U.S. 2010/0113517 includono aumenti dei livelli di α -Gal A o dell'attività nelle cellule (ad 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 di cellule miocardiche e fibrociti valvolari; riduzione di lyso-Gb₃ plasmatico; riduzione dell'ipertrofia cardiaca (in particolare del ventricolo sinistro), miglioramento dell'insufficienza valvolare e aritmie; miglioramento di proteinuria; concentrazioni urinarie diminuite di lipidi, come CTH, lattosilceramide, ceramide, e concentrazioni urinarie aumentate di glucosilceramide e sfingomieline; l'assenza di corpi di inclusione laminati (corpi zebrati) in cellule epiteliali glomerulari; miglioramenti della funzione renale; attenuazione dell'ipoidrosi; l'assenza di angiocheratomi; e miglioramenti di anomalie uditive quali perdita dell'udito sensorineurale ad alta frequenza, perdita progressiva dell'udito, sordità improvvisa o acufene. I miglioramenti dei sintomi neurologici includono la prevenzione di un attacco ischemico transitorio (TIA) o di un ictus; e il miglioramento del dolore neuropatico che si manifesta come acroparestesia (bruciore o formicolio delle estremità). Un altro tipo di marcatore clinico che può

essere valutato per la malattia di Fabry è la prevalenza di manifestazioni cardiovascolari deleterie.

"Accorciamento frazionale centro-parietale" o "MWFS" è una misura della funzione sistolica che identifica pazienti ipertesi che hanno evidenza di danno agli organi bersaglio, riserva contrattile compromessa e mortalità aumentata.

L'espressione "funzione cardiaca" si riferisce alla prestazione del cuore di un paziente. Per esempio, una valutazione della funzione cardiaca è la funzione sistolica del ventricolo sinistro, che si riferisce alle caratteristiche di svuotamento del cuore sinistro. La funzione sistolica del ventricolo sinistro può essere valutata in vari modi, inclusi, ma non limitati a, frazione di eiezione del ventricolo sinistro (LVEF), accorciamento frazionale endocardico (EFS) e MWFS.

Come usata qui, la frase "stabilizzazione della funzione cardiaca" e termini simili si riferiscono alla riduzione o all'arresto del declino della funzione cardiaca e/o il ripristino della funzione cardiaca. Poiché ci si aspetta che i pazienti con malattia di Fabry non trattati abbiano riduzioni significative della funzione cardiaca nel tempo, potenziamenti della frequenza di deterioramento della funzione cardiaca e/o potenziamenti della funzione cardiaca dimostrano un beneficio della terapia con migalastat come qui descritto. In varie forme di realizzazione, stabilizzazione della funzione cardiaca include stabilizzazione di MWFS. "Stabilizzazione di MWFS" similmente si riferisce alla riduzione o all'arresto del declino di MWFS.

L'espressione "potenziamento della funzione cardiaca" si riferisce a una variazione benefica in almeno un parametro usato per valutare la funzione cardiaca. Se il parametro di un paziente si trova all'estremità inferiore di un intervallo normale oppure è al di sotto dell'intervallo normale per tale parametro, una variazione benefica in tale parametro è un aumento di tale parametro. Per esempio, un aumento di MWFS per un paziente con un basso MWFS è un potenziamento in tale parametro. Analogamente, se il parametro di un paziente si trova all'estremità superiore di un intervallo normale oppure è al di sopra dell'intervallo normale per tale parametro, una variazione benefica in tale parametro è una diminuzione di tale parametro. In un aspetto, "potenziamento della funzione cardiaca" comprende uno o più tra (i) miglioramento della funzione del ventricolo sinistro, (ii) miglioramento dell'accorciamento frazionale, (iii) miglioramento della frazione di eiezione, (iv) riduzione del volume telediastolico, e (v) normalizzazione della geometria cardiaca.

Come usata qui, l'espressione "MWFS compromesso" si riferisce a un paziente con un MWFS al di sotto dell'intervallo normale. L'intervallo normale di MWFS per una femmina è almeno 15% l'intervallo normale di MWFS per un maschio è almeno 14%. Perciò, MWFS compromesso per un paziente femmina è $<15\%$ e MWFS compromesso per un paziente maschio è $<14\%$.

Come usata qui, l'espressione "normalizzazione di MWFS" si riferisce all'aumento del MWFS di un paziente da un MWFS

compromesso entro l'intervallo normale. Perciò, la normalizzazione di MWFS per un paziente femmina consiste in un aumento di MWFS da <15% ad almeno il 15%, e la normalizzazione di MWFS per un paziente maschio consiste in un aumento di MWFS da <14% ad almeno il 14%.

Come usata qui, l'espressione "ipertrofia del ventricolo sinistro" o "LVH" si riferisce a un paziente con un indice di massa ventricolare sinistra (LVMI) superiore all'intervallo normale di 43-95 g/m² per le femmine e 49-115 g/m² per i maschi. Perciò, LVH si riferisce a un LVMI > 95 g/m² per le femmine o > 115 g/m² per i maschi.

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

L'espressione "farmaceuticamente accettabile" si riferisce a entità e composizioni molecolari che sono fisiologicamente tollerabili e tipicamente non producono reazioni impreviste quando somministrate a un essere umano. In alcune forme di realizzazione, come 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 isolato

è rimosso 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 fonti naturali o mediante espressione ricombinante (come descritto in maggiore dettaglio di seguito). Il termine si riferisce anche all'introduzione di un enzima purificato in un individuo che diversamente richiede o beneficia della somministrazione di un enzima purificato, per esempio, affetto da insufficienza enzimatica. L'enzima introdotto può essere un enzima ricombinante, purificato prodotto *in vitro*, o una proteina purificata da tessuti o fluidi isolati, come, per esempio, placenta o latte animale, o da piante.

L'espressione "paziente ERT-naïve" si riferisce a un paziente con malattia di Fabry che non ha mai ricevuto ERT o non ha ricevuto ERT per almeno 6 mesi prima di iniziare la terapia con migalastat.

Il termine "paziente già trattato con ERT" si riferisce a un paziente con malattia di Fabry che stava ricevendo una ERT immediatamente prima dell'inizio della terapia con migalastat. In alcune forme di realizzazione, il paziente già trattato con ERT ha ricevuto almeno 12 mesi di ERT immediatamente prima 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 (ad esempio, migalastat HCl), a meno che non indicato specificamente in senso contrario.

I termini "mutazione" e "variante" (ad 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 di 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 con 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. L'insufficienza della funzione renale può manifestarsi come proteinuria e velocità di filtrazione glomerulare ridotta.

Poiché la malattia di Fabry è rara, coinvolge più organi, ha un'ampia gamma di età di esordio, ed è eterogenea, una diagnosi corretta è una sfida. Tra gli operatori sanitari la consapevolezza è bassa e le diagnosi errate sono frequenti. La diagnosi di malattia di Fabry è più spesso confermata sulla base 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 attività normali a molto basse. Dato che i portatori possono avere un'attività dell'enzima α -Gal A normale nei leucociti, soltanto l'identificazione di una mutazione di α -Gal A mediante test genetici fornisce un'identificazione e/o una diagnosi precise del portatore.

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 (ad esempio, migalastat). In questo saggio vengono creati costrutti di cDNA. Le corrispondenti forme mutanti di α -Gal A sono espresse in modo transiente nelle cellule HEK-293. Le cellule vengono successivamente incubate \pm migalastat (da 17 nM a 1 mM) per 4-5 giorni. Successivamente, i livelli di α -Gal A 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 un PC (ad esempio, migalastat) usando questi metodi sono elencate nel brevetto U.S. n. 8,592,362.

Chaperoni farmacologici

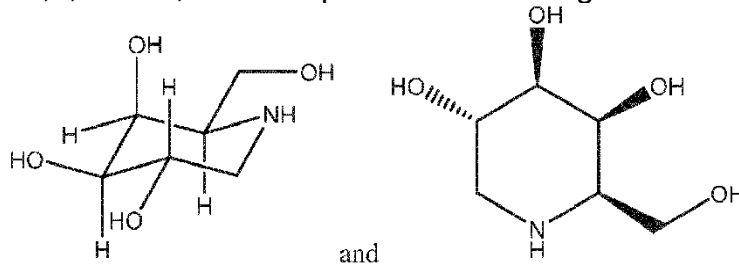
Il legame degli inibitori a piccole molecole di enzimi associati a LSD può aumentare la stabilità sia dell'enzima mutante che dell'enzima

di tipo selvatico corrispondente (si vedano i brevetti U.S. N. 6,274,597; 6,583,158; 6,589,964; 6,599,919; 6,916,829, e 7,141,582.

In particolare, la somministrazione di derivati a piccole molecole di glucosio e galattosio, che sono inibitori competitivi selettivi specifici per vari enzimi lisosomiali bersaglio, 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, i 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.

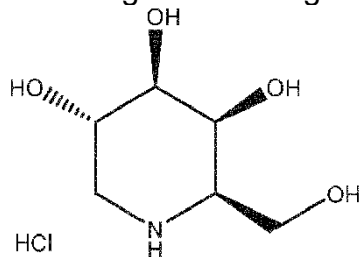
Il chaperone farmacologico comprende migalastat o un relativo sale. Il composto migalastat, anche noto come 1-

deossigalattojirimicina (1-DGJ) o (2R,3S,4R,5S)-2-(idrossimetil) piperidin-3,4,5-triolo, è un composto avente la seguente formula chimica:



Migalastat base libera

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 farmacologica (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 farmacologica" 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 farmacologica" perciò si riferisce a qualsiasi deposito di informazioni che include una o più mutazioni o varianti suscettibili. Una tabella di riferimento farmacologica 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 farmacologica 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 (ad 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
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

B

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

Cambiamento di nucleotide	di	Cambiamento di nucleotide	di	Cambiamento di sequenza proteica
c.104G>A		c.G104A		G35E
c.104G>C		c.G104C		G35A
c.104G>T		c.G104T		G35V
c.107T>C		c.T107C		L36S
c.107T>U		c.T107G		L36W
c.108G>C o c.108U>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		1VI42V
c.125T>A		c.T125A		M42K
c.125T>C		c.T125C		M42T
c.125T>G		c.T125G		M42R
c.126G>A o c.126G>C o c.126G>T		c.G126A o c.G126C o c.G126T		M42I
c.137A>C		c.A137C		H46P

Cambiamento di nucleotide	di	Cambiamento di nucleotide	di	Cambiamento di sequenza proteica
c.142G>C		c.G142C		E48Q
c.152T>A		c.T152A		M51K
c.153G>A o c.153G>T o c.153G>C		c.G153A o c.G153T o c.G153C		M51I
c.157A>G		c.A157G		N53D
c.[157A>C; 158A>T]		c.A157C/A158T		N53L
c.160C>T		c.C160T		L54F
c.161T>C		c.T161C		L54P
c.164A>G		c.A164G		D55G
c.164A>T		c.A164T		D55V
c.[164A>T; 170A>T]		c.A164T/A170T		D55V/Q57L
c.167G>T		c.G167T		C56F
c.167G>A		c.G167A		C56Y
c.170A>T		c.A170T		Q57L
c.175G>A		c.G175A		E59K
c.178C>A		c.C178A		P60T
c.178C>T		c.C178T		P60S

B

Cambiamento di nucleotide	di	Cambiamento di nucleotide	di	Cambiamento di sequenza proteica
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		G85S
c.254G>A		c.G254A		G85D
c.[253G>A; 254G>A]		c.G253A/G254A		G85N
c.[253G>A; 254G>T; 255T>G]		c.G253A/G25417T255G		G85M
c.261G>C o c.261G>T		c.G261C o c.G261T		E87D

B

Cambiamento di nucleotide	di	Cambiamento di nucleotide	di	Cambiamento di sequenza proteica
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		S102L
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
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

13

Cambiamento di nucleotide	di	Cambiamento di nucleotide	di	Cambiamento di sequenza proteica
c.352C>T		c.C352T		R118C
c.361G>A		c.G361A		A121T
c.368A>G		c.A368G		Y123C
c.373C>T		c.C373T		H125Y
c.374A>T		c.A374T		H125L
c.376A>G		c.A376G		S126G
c.383G>A		c.G383A		G128E
c.399T>G		c.T399G		I133M
c.404C>T		c.C404T		A135V
c.408T>A o c.408T>G		c.T408A o c.T408G		D136E
c.416A>G		c.A416G		N139S
c.419A>C		c.A419C		K140T
c.427G>A		c.G427A		A143T
c.431G>A		c.G431A		G144D
c.431G>T		c.G431T		G144V
c.434T>C		c.T434C		F145S
c.436C>T		c.C436T		P146S

Cambiamento di nucleotide	di	Cambiamento di nucleotide	di	Cambiamento di sequenza proteica
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
c.506T>C		c.T506C		F169S
c.511G>A		c.G511A		G171S
c.520T>C		c.T520C		C174R
c.520T>G		c.T520G		C174G

B

Cambiamento di nucleotide	di	Cambiamento di nucleotide	di	Cambiamento di sequenza proteica
c.525C>G o c.525C>A		c.C525G o c.C525A		D175E
c.539T>G		c.T539G		L180W
c.540G>C		c.G540C		L180F
c.548G>C		c.G548C		G183A
c.548G>A		c.G548A		G183D
c.550T>A		c.T550A		Y184N
c.551A>G		c.A551G		Y184C
c.553A>G		c.A553G		K185E
c.559A>G		c.A559G		M187V
c.559_564dup		c.559_564dup		p.M187_S188dup
c.560T>C		c.T560C		M187T
c.561G>T o c.561G>A o c.561G>C		c.G561T o c.G561A o c.G561C		M187I
c.572T>A		c.T572A		L191Q
c.580A>G		c.A580G		T194A
c.581C>T		c.C581T		T194I
c.584G>T		c.G584T		G195V

B

Cambiamento di nucleotide	di	Cambiamento di nucleotide	di	Cambiamento di sequenza proteica
c.586A>G		c.A586G		R196G
c.593T>C		c.T593C		I198T
c.595G>A		c.G595A		V199M
c.596T>C		c.T596C		V199A
c.596T>G		c.T596G		V199G
c.599A>G		c.A599G		Y200C
c.602C>T		c.C602T		S201F
c.602C>A		c.C602A		S201Y
c.608A>T		c.A608T		E203V
c.609G>C o c.609G>T		c.G609C o c.G609T		E203D
c.610T>G		c.T610G		W204G
c.613C>A		c.C613A		P205T
c.613C>T		c.C613T		P205S
c.614C>T		c.C614T		P205L
c.619T>C		c.T619C		Y207H
c.620A>C		c.A620C		Y207S
c.623T>G		c.T623G		M208R

B

Cambiamento di nucleotide	di	Cambiamento di nucleotide	di	Cambiamento di sequenza proteica
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
c.655A>C		c.A655C		I219L
c.656T>A		c.T656A		I219N
c.656T>C		c.T656C		I219T
c.659G>A		c.G659A		R220Q

Cambiamento di nucleotide	di	Cambiamento di nucleotide	di	Cambiamento di sequenza proteica
c.659G>C		c.G659C		R220P
c.662A>C		c.A662C		Q221P
c.671A>C		c.A671C		N224T
c.671A>G		c.A671G		N224S
c.673C>G		c.C673G		H225D
c.683A>G		c.A683G		N228S
c.687T>A o c.687T>G		c.T687A o c.T687G		F229L
c.695T>C		c.T695C		I232T
c.713G>A		c.G713A		S238N
c.716T>C		c.T716C		I239T
c.720G>C o c.720G>T		c.G720C o c.G720T		K240N
c.724A>G		c.A724G		I242V
c.724A>T		c.A724T		I242F
c.725T>A		c.T725A		I242N
c.725T>C		c.T725C		I242T
c.728T>G		c.T728G		L243W
c.729G>C o c.729G>T		c.G729C o c.G729T		L243F

B

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

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

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

B

Cambiamento di nucleotide	di	Cambiamento di nucleotide	di	Cambiamento di sequenza proteica
c.870G>A o c.870G>C o c.870G>T		c.G870A o c.G870C o c.G870T		M290I
c.871G>A		c.G871A		A291T
c.877C>A		c.C877A		P293T
c.881T>C		c.T881C		L294S
c.884T>G		c.T884G		F295C
c.886A>G		c.A886G		M296V
c.886A>T o c.886A>C		c.A886T o c.A886C		M296L
c.887T>C		c.T887C		M296T
c.888G>A o c.888G>T o c.888G>C		c.G888A o c.G888T o c.G888C		M296I
c.893A>G		c.A893G		N298S
c.897C>G o c.897C>A		c.C897G o c.C897A		D299E
c.898C>T		c.C898T		L300F
c.899T>C		c.T899C		L300P
c.901C>G		c.C901G		R301G
c.902G>C		c.G902C		R301P

B

Cambiamento di nucleotide	di	Cambiamento di nucleotide	di	Cambiamento di sequenza proteica
c.902G>A		c.G902A		R301Q
c.902G>T		c.G902T		R301L
c.907A>T		c.A907T		1303F
c.908T>A		c.T908A		I303N
c.911G>A		c.G911A		S304N
c.911G>C		c.G911C		S304T
c.919G>A		c.G919A		A307T
c.922A>G		c.A922G		K308E
c.924A>T o c.924A>C		c.A924T o c.A924C		K308N
c.925G>C		c.G925C		A309P
c.926C>T		c.C926T		A309V
c.928C>T		c.C928T		L310F
c.931C>G		c.C931G		L311V
c.935A>G		c.A935G		Q312R
c.936G>T o c.936G>C		c.G936T o c.G936C		Q312H
c.937G>T		c.G937T		D313Y
c.[937G>T; 1232G>A]		c.G937T/G1232A		D313Y/G411D

B

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

Cambiamento di nucleotide	di	Cambiamento di nucleotide	di	Cambiamento di sequenza proteica
c.979C>G		c.C979G		Q327E
c.980A>T		c.A980T		Q327L
c.983G>C		c.G983C		G328A
c.989A>G		c.A989G		Q330R
c.1001G>A		c.G1001A		G334E
c.1010T>C		c.T1010C		F337S
c.1012G>A		c.G1012A		E338K
c.1016T>A		c.T1016A		V339E
c.1027C>A		c.C1027A		P343T
c.1028C>T		c.C1028T		P343L
c.1033T>C		c.T1033C		S345P
c.1046G>C		c.G1046C		W349S
c.1055C>G		c.C1055G		A352G
c.1055C>T		c.C1055T		A352V
c.1061T>A		c.T1061A		1354K
c.1066C>G		c.C1066G		R356G
c.1066C>T		c.C1066T		R356W

B

Cambiamento di nucleotide	di	Cambiamento di nucleotide	di	Cambiamento di sequenza proteica
c.1067G>A		c.G1067A		R356Q
c.1067G>C		c.G1067C		R356P
c.1072G>C		c.G1072C		E358Q
c.1073A>C		c.A1073C		E358A
c.1073A>G		c.A1073G		E358G
c.1074G>T o c.1074G>C		c.G1074T o c.G1074C		E358D
c.1076T>C		c.T1076C		I359T
c.1078G>A		c.G1078A		G360S
c.1078G>T		c.G1078T		G360C
c.1079G>A		c.G1079A		G360D
c.1082G>A		c.G1082A		G361E
c.1082G>C		c.G1082C		G361A
c.1084C>A		c.C1084A		P362T
c.1085C>T		c.C1085T		P362L
c.1087C>T		c.C1087T		R363C
c.1088G>A		c.G1088A		R363H
c.1102G>A		c.GI 102A		A368T

B

Cambiamento di nucleotide	di	Cambiamento di nucleotide	di	Cambiamento di sequenza proteica
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
c.1225C>A		c.C1225A		P409T
c.1228A>G		c.A1228G		T410A
c.1229C>T		c.C1229T		T410I
c.1232G>A		c.G1232A		G411D

Cambiamento di nucleotide	di	Cambiamento di nucleotide	di	Cambiamento di sequenza proteica
c.1235C>A		c.C1235A		T412N
c.1253A>G		c.A1253G		E418G
c.1261A>G		c.A1261G		M421V

Dosaggio, formulazione e somministrazione

Al paziente con malattia di Fabry viene somministrato migalastat o relativo sale a una frequenza di una volta a giorni alterni (indicato anche come "QOD"). In varie forme di realizzazione, le dosi descritte qui 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".

Nella presente invenzione, al paziente sono somministrati 123 mg di equivalente di base libera (FBE) del migalastat o del relativo sale a giorni alterni.

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.

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

La somministrazione di migalastat o 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 28 giorni, come almeno 30, 60 o 90 giorni o almeno 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 16, 20, 24, 30 o 36 mesi o almeno 1, 2, 3, 4 o 5 anni. In varie forme di realizzazione, la terapia con migalastat è terapia con migalastat a lungo termine di almeno 6 mesi, come almeno 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 16, 20, 24, 30 o 36 mesi o almeno 1, 2, 3, 4 o 5 anni.

La somministrazione di migalastat o 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 ad 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 leganti (ad esempio, amido di mais pregelatinizzato, polivinilpirrolidone o idrossipropil metilcellulosa); cariche (ad esempio, lattosio, cellulosa microcristallina o calcio idrogeno fosfato); lubrificanti (ad esempio, stearato di magnesio, talco o silice); disgreganti (ad esempio, amido di patata o sodio amido glicolato); o agenti umettanti (ad esempio, sodio lauril solfato). 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 sospendenti (ad esempio, sciroppo di sorbitolo, derivati della cellulosa o grassi commestibili idrogenati); agenti emulsionanti (ad esempio, lecitina o acacia); veicoli non acquosi (ad esempio, olio di mandorle, esteri oleosi, alcol etilico o oli vegetali frazionati); o conservanti (ad 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, propilen glicole e polietilen glicole e simili), relative miscele adatte, e oli vegetali. La corretta fluidità può essere mantenuta, per esempio, mediante l'uso di un rivestimento come lecitina, mediante il mantenimento della granulometria 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; propilen glicole e polietilen glicole (ad 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 (ad esempio, una sacca i.v.) o interno (ad esempio, un impianto bioerodibile).

Le forme di realizzazione relative alle formulazioni farmaceutiche e alla somministrazione possono essere combinate con qualsiasi delle altre forme di realizzazione dell'invenzione.

In una o più forme di realizzazione, il PC (ad esempio, migalastat o relativo sale) è somministrato in combinazione con ERT. La ERT aumenta la quantità di proteina introducendo in modo esogeno un enzima di tipo selvatico o biologicamente funzionale mediante infusione. Questa terapia è stata sviluppata per molti disturbi genetici, 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 (ad 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.

Funzione cardiaca

I regimi di dosaggio descritti nella presente stabilizzano la funzione cardiaca (ad esempio, funzione sistolica del ventricolo sinistro) in pazienti con malattia di Fabry. Poiché pazienti con malattia di Fabry non trattati tipicamente mostrano un deterioramento della funzione cardiaca nel tempo, sia potenziamenti sia manutenzione della funzione cardiaca sono indicazioni di un beneficio della terapia con migalastat. Come descritto in ulteriore dettaglio negli Esempi di seguito, studi di fase 3 hanno trovato che la terapia con migalastat aumenta e/o stabilizza MWFS sia in pazienti già trattati con ERT che ERT-naïve. Questi studi di fase 3 hanno trovato anche che la terapia con migalastat normalizza MWFS in alcuni pazienti con MWFS compromesso. Di conseguenza, la terapia con migalastat può essere usata per trattare pazienti con malattia di Fabry mediante stabilizzazione di MWFS, aumento di MWFS e/o normalizzazione di MWFS in pazienti con malattia di Fabry ERT-naïve e/o già trattati con ERT, inclusi pazienti con MWFS compromesso.

La terapia con migalastat può arrestare o ridurre la riduzione di MWFS e/o aumentare MWFS per un paziente con malattia di Fabry

rispetto allo stesso paziente senza trattamento con terapia con migalastat. In una o più forme di realizzazione, la terapia con migalastat fornisce una variazione di MWFS per un paziente che è maggiore di (cioè, più positivo di) -2%, come superiore o uguale a circa -1,5%, -1,4%, -1,3%, -1,2%, -1,1%, -1%, -0,9%, -0,8%, -0,7%, -0,6%, -0,5%, -0,4%, -0,3%, -0,2%, -0,1%, 0%, 0,1%, 0,2%, 0,3%, 0,4%, 0,5%, 0,6%, 0,7%, 0,8%, 0,9%, 1%, 1,1%, 1,2%, 1,3%, 1,4%, 1,5%, 1,6%, 1,7%, 1,8%, 1,9%, 2%, 2,1%, 2,2%, 2,3%, 2,4% o 2,5%. Il paziente con malattia di Fabry è un paziente già trattato con ERT. In una o più forme di realizzazione, il paziente con malattia di Fabry ha MWFS compromesso prima di iniziare la terapia con migalastat.

In una o più forme di realizzazione, i pazienti già trattati con ERT hanno MWFS compromesso prima di iniziare la terapia con migalastat.

ESEMPI

ESEMPIO 1: Regimi di dosaggio per il trattamento di pazienti con malattia di Fabry ERT-naïve usando Migalastat cloridrato (esempio di riferimento)

Questo esempio descrive uno studio di fase 3 della terapia con migalastat in pazienti con malattia di Fabry ERT-naïve.

Arruolamento dei pazienti. I pazienti idonei avevano un'età compresa tra 16 e 74 anni e avevano la malattia di Fabry confermata geneticamente; non avevano mai ricevuto o non avevano ricevuto ERT per ≥ 6 mesi; avevano una mutazione di GLA che ha dato come risultato una proteina mutante che rispondeva a migalastat, in base al saggio con

cellule embrionali renali umane-293 (HEK) usato al momento dell'arruolamento; avevano un eGFR >30 ml/minuto/1,73 m², e avevano un GL-3 urinario ≥4 volte il limite superiore del normale.

Disegno dello studio. Dopo valutazioni di ammissibilità-basale (2 mesi), i pazienti sono stati randomizzati allo stadio 1-- 6 mesi di somministrazione in doppio cieco di 150 mg migalastat cloridrato o placebo a giorni alterni. Tutti i pazienti che hanno completato lo stadio 1 erano idonei a ricevere migalastat in aperto nello stadio 2 (mesi 6-12) e per un ulteriore anno (mesi 13-24) successivo. L'obiettivo primario consisteva nel confrontare l'effetto di migalastat col placebo su GL-3 renale valutato mediante punteggio istologico del numero di inclusioni nei capillari interstiziali dopo 6 mesi di trattamento. Gli obiettivi secondari dello stadio 1 consistevano nel confrontare l'effetto di migalastat col placebo in base ai livelli di GL-3 nelle urine, alla funzione renale, alle proteine nelle urine nelle 24 ore, e alla sicurezza e tollerabilità. Gli obiettivi terziari erano la funzione cardiaca, esiti riferiti dal paziente, analisi esplorative dei reni e attività di α-Gal A nei globuli bianchi. Coloro che hanno completato lo studio erano idonei all'arruolamento nello studio di estensione in aperto per un massimo di 5 anni.

Valutazione istologica del rene. Ciascun paziente è stato sottoposto a una biopsia renale al basale, nonché biopsie renali ripetute a 6 e 12 mesi. Il numero di inclusioni di GL-3 per capillare interstiziale renale per paziente al basale, e a 6 e 12 mesi è stato valutato quantitativamente in 300 capillari da 3 patologi indipendenti in cieco per

trattamento e visita. Tutti i valori per ciascuna singola biopsia in un dato momento sono stati mediati prima dell'analisi statistica.

Le variazioni di GL-3 nei podociti, nelle cellule endoteliali e nelle cellule mesangiali, e la sclerosi glomerulare, sono state valutate qualitativamente dagli stessi 3 patologi in cieco per trattamento/visita.

Globotriaosilceramide e globotriaosilsfingosina. Lyso-Gb3 plasmatico e GL-3 nelle urine delle 24 ore sono stati analizzati mediante cromatografia liquida-spettroscopia di massa usando un nuovo standard interno marcato con isotopo stabile, $^{13}\text{C}_6$ -lyso-Gb3 (limite inferiore di quantificazione: 0,200 ng/mL, 0,254 nmol/L).

Valutazione della funzione renale. I tassi di variazione annualizzati ($\text{mL}/\text{min}/1,73 \text{ m}^2/\text{anno}$) sono stati calcolati usando $\text{eGFR}_{\text{CKD-EPI}}$ di Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration) e la clearance di ioexolo misurata ($\text{-mGFR}_{\text{ioexolo}}$).

Ecocardiografia. LVMI , spessore della parete posteriore sinistra, spessore del setto interventricolare in diastole, parametri diastolici e altri parametri sono stati valutati attraverso una valutazione in cieco e centralizzata.

Esiti riferiti dal paziente. Gli esiti riferiti dal paziente sono stati valutati usando la scala di valutazione di sintomi gastrointestinali (GSRS), la forma breve-36v2TM e il breve questionario per la valutazione del dolore-componente gravità del dolore.

Analisi di sicurezza ed eventi avversi. I pazienti randomizzati che ricevono ≥ 1 dose sono stati inclusi nell'analisi di sicurezza, che

comprendeva segni vitali, esami fisici, elettrocardiogrammi, laboratori clinici ed eventi avversi.

Analisi statistiche per il substrato GL-3 capillare interstiziale renale. L'endpoint dello stadio primario 1 (6° mese) (popolazione ITT con biopsie al basale, n=64) era la proporzione di pazienti nei gruppi con migalastat e con placebo con una riduzione $\geq 50\%$ di inclusioni di GL-3 per capillare interstiziale. Altri due endpoint di stadio 1 sono stati valutati (popolazione ITT modificata: pazienti randomizzati con biopsie al basale e al mese 6 appaiate; n=60): variazione percentuale di inclusioni di GL-3 per capillare interstiziale, e percentuale di capillari interstiziali con zero inclusioni di GL-3.

Le analisi di efficacia per inclusioni di GL-3 per capillare interstiziale e altri endpoint prespecificati nello stadio 2 (mesi 6-12) e l'estensione in aperto (mesi 12-24) si basavano sulla popolazione con intenzione di trattamento modificata (mITT) che consiste in pazienti randomizzati con l'enzima α -Gal A mutante mostrato per essere adatto per il trattamento con migalastat mediante il saggio validato; n=50).

Risultati

Caratteristiche al basale. Sessantasette pazienti (età compresa tra 16 e 74 anni; 64% di femmine) con α -Gal A mutante potenzialmente responsivo sono stati randomizzati (popolazione ITT). La Tabella 2 fornisce le caratteristiche al basale per i 50 pazienti nella popolazione ITT con α -Gal A mutante adatto. Non vi erano differenze statisticamente significative nei parametri del basale.

Tabella 2: Caratteristiche al basale

Parametro	Gruppo di trattamento		Totale (N=50)
	Migalastat HCl (N=28)	Placebo per Migalastat HCl (N=22)	
Età (anni) (n)	28	22	50
Media±DS	41,5±13	45,1±8,0	43,1±11
Mediana	37,0	45,5	45,0
Peso (kg) (n)	28	22	50
Media±DS	72,6±15,35	76,1±16,52	74,1±15,81
Mediana	72,3	74,0	72,8
Numero di anni di diagnosi di malattia di Fabry (n)	28	21	49
Media±DS	5,6±6,89	7,3±8,80	6,3±7,73
Mediana	4,1	4,1	4,1
Numero di pazienti precedentemente in ERT (>6 mesi prima del basale) (%)	4 (14,3%)	7 (31,8%)	11 (22,0%)
Uso di ACEi/ARB/Ri al basale			
Sì (%)	9 (32,1%)	12 (54,5%)	21 (42,0%)

B

Parametro	Gruppo di trattamento		Totale (N=50)
	Migalastat HCl (N=28)	Placebo per Migalastat HCl (N=22)	
Età (anni) (n)	28	22	50
No (%)	19 (67,9%)	10 (45,5%)	29 (58,0%)
Proteinuria >150 mg/24h (%)	17 (60,7%)	18 (81,8%)	35 (70,0%)
Proteinuria > 300 mg/24h (%)	8 (28,6%)	11 (50,0%)	19 (38,0%)
Proteinuria > 1000 mg/24h (%)	3 (10,7%)	3 (13,6%)	6 (12,0%)
mGFR_{ioexolo} (mL/min/1,73 m²) (n)	27	21	48
Media±DS	79,95±30,9	83,12±22,8	81,34±27,5
Mediana	84,90	82,20	83,40
eGFR_{CKD-EPI} (mL/min/1,73 m²)	28	22	50
Media±DS	94,4±27,0	90,6±17,1	92,7±23,0
Mediana	96,6	93,5	94,0
Lyso-Gb₃ (n)	18	13	31
Media (nmol/L) ±DS	47,3±62	41,9±39	45,0±53

I resoconti pubblicati di fenotipo/i clinici associati ai genotipi di pazienti con mutazioni adatte (n=50) indicano che 30 (60%) avevano mutazioni associate al fenotipo classico di malattia di Fabry, uno (2%) con fenotipo non classico, tre (6%) con entrambi i fenotipi e 16 (32%) non ancora classificati. L'attività di α -Gal A in WBC residua $<3\%$ è stata trovata in 14 di 16 (87%) maschi; 29 di 31 (94%) maschi e femmine avevano lyso-Gb3 plasmatico elevato, e 47 di 50 (94%) maschi e femmine avevano malattia sistemica multiorgano.

MWFS basale. Al basale, MWFS compromesso ($<15\%$ per le femmine e $<14\%$ per i maschi) è stato riportato in 9 pazienti.

Migalastat e funzione cardiaca. Questo studio di pazienti ERT-naïve ha trovato che la terapia con migalastat aumentava MWFS in pazienti con MWFS compromesso al basale. La Tabella 3 di seguito mostra la variazione rispetto al basale di MWFS dopo terapia con migalastat.

Tabella 3: Variazioni percentuali rispetto al basale in MWFS nel tempo con terapia con migalastat in pazienti con MWFS compromesso al basale (pazienti con mutazioni suscettibili)

	MWFS medio basale = 11,3%				
	Punto temporale				
	Mese 12	Mese 24	Mese 36	Mese 48	LOCF
n	7	8	4	3	8
Variazione media rispetto al basale	0,1%	1,4%	1,4%	2,4%	1,9%
CI 95%	-1,2%, 1,4%	-1,3%, 4,0%	-1,5%, 4,3%	-2,1%, 6,9%	-0,8%, 4,5%
Eventuale aumento	2/7 (29%)	5/8 (63%)	3/4 (75%)	3/3 (100%)	6/8 (75%)
Normalizzazione	0	2/8 (25%)	2/4 (50%)	2/3 (67%)	3/8 (38%)
<p>Le analisi dell'ultima osservazione portata avanti (LOCF) si basano sull'ultima valutazione dello studio, incluse eventuali visite non programmate di terminazione prematura; MWFS anormale è <15% per femmine e <14% per maschi.</p>					

Come si può vedere dalla Tabella 3, l'analisi LOCF di pazienti ERT-naïve con MWFS compromesso al basale mostrava variazioni medie di MWFS dell'1,9% (CI al 95% -0,8%, 4,5%; n=8) per 48 mesi di terapia con migalastat. 6/8 (75%) dei pazienti avevano un aumento di

MWFS dopo la terapia con migalastat, con 3/8 (38%) che dimostrano la normalizzazione di MWFS.

MWFS è stato anche analizzato in pazienti con LVH al basale. La variazione rispetto al basale di MWFS in pazienti con LVH al basale è fornita nella Tabella 4 di seguito:

Tabella 4: Variazione rispetto al basale di MWFS con Migalastat in pazienti con LVH al basale (pazienti con mutazioni suscettibili)

	Basale	Variazione rispetto al basale				
		Mese	Mese	Mese	Mese	LOCF
		12	24	36	48	
n	10	9	9	5	4	10
%, media (DS) o (CI 95%)	12,2 (2,6)	0,2 (- 0,8, 1,1)	0,9 (- 1,6, 3,4)	0,7 (- 2,1, 3,4)	0,6 (- 5,7, 6,9)	1,0 (- 1,5, 3,5)
Eventuale aumento	-	4/9 (44%)	5/9 (56%)	3/5 (60%)	3/4 (75%)	7/10 (70%)
Normalizzazione	-	2/9 (22%)	2/9 (22%)	1/5 (20%)	0	2/10 (20%)

Le analisi di LOCF si basano sull'ultima valutazione dello studio incluse eventuali visite non programmate di terminazione prematura; sottogruppo LVH: LVMI >95 g/m² (femmine) o >115 g/m² (maschi).

Come si può vedere dalla Tabella 4, l'analisi LOCF di pazienti ERT-naïve con LVH al basale mostrava variazioni medie di MWFS dell'1,0% (CI al 95% -1,5%, 3,5%; n=10) per 48 mesi di terapia con migalastat. 7/10 (70%) dei pazienti avevano un aumento di MWFS dopo la terapia con migalastat, con 2/10 (20%) che dimostrano la normalizzazione di MWFS.

Sicurezza ed eventi avversi. Durante lo stadio 1, gli eventi avversi emergenti dal trattamento erano simili tra gruppi. Eventi avversi con frequenza superiore in pazienti che ricevono migalastat rispetto al placebo erano emicrania (12/34 pazienti-35% versus 7/33 pazienti-21%) e nasofaringite (6/34 pazienti-18% versus 2/34-6%). Gli eventi avversi riferiti più frequentemente per lo stadio 2 erano emicrania (9/63 pazienti-14%) e dolore procedurale (7/63 pazienti-11%-correlato a biopsie renali) e, per l'estensione in aperto, proteinuria (9/57 pazienti-16%), emicrania (6/57 pazienti-11%), e bronchite (6/57 pazienti-11%). La maggior parte degli eventi avversi era di gravità lieve o moderata. Nessun evento avverso ha portato all'interruzione di migalastat.

Sei pazienti hanno presentato gravi eventi avversi durante lo stadio 1 (2: migalastat; 4: placebo), 5 durante lo stadio 2, e 11 durante l'estensione in aperto. Due eventi avversi gravi sono stati valutati come eventualmente correlati a migalastat dal ricercatore-- affaticamento e parestesia. Entrambi si sono verificati nello stesso paziente tra i mesi 12-24 e risolti. Nessun singolo evento avverso serio è stato riportato da >1

paziente. Due pazienti hanno interrotto migalastat a causa di eventi avversi gravi; entrambi si ritenevano non correlati a migalastat. Non sono stati riportati decessi.

Proteinuria emergente dal trattamento è stata riportata in 9 pazienti (16%) tra i mesi 12-24, e in un caso, è stata giudicata come correlata a migalastat. In 5 pazienti, i valori di 24 mesi erano nello stesso intervallo del basale. Tre pazienti con mutazioni adatte avevano proteinuria al basale evidente (> 1 g/24 ore), che aumentava per 24 mesi. In 23/28 pazienti con proteinuria al basale < 300 mg/24 ore, proteine nelle urine nelle 24 ore rimanevano stabili durante il trattamento con migalastat.

Non vi era alcuna progressione a malattia renale allo stadio terminale, nessuna morte cardiaca e nessun ictus come definito in Banikazemi et al. Vi è stato un singolo caso di attacco ischemico transitorio giudicato non correlato a migalastat.

Le analisi dei parametri vitali, dei risultati fisici, di laboratorio e di ECG non hanno rivelato alcun effetto clinicamente rilevante di migalastat.

ESEMPIO 2: Regimi di dosaggio per il trattamento di pazienti con malattia di Fabry già trattati con ERT usando Migalastat cloridrato

Questo esempio descrive uno studio di fase 3 della terapia con migalastat in pazienti con malattia di Fabry già trattati con ERT.

Arruolamento dei pazienti. I pazienti idonei avevano un'età compresa tra 16 e 74 anni e avevano la malattia di Fabry confermata

geneticamente; avevano ricevuto ERT per ≥ 12 mesi; avevano una mutazione di GLA che ha dato come risultato una proteina mutante che rispondeva a migalastat, in base al saggio con cellule embrionali renali umane-293 (HEK) usato al momento dell'arruolamento; avevano un eGFR ≥ 30 ml/minuto/1,73 m²; e avevano un livello di dose e regime di ERT che erano stati stabili per almeno 3 mesi.

Disegno dello studio. Dopo valutazioni di ammissibilità-basale, 57 pazienti sono stati randomizzati per 18 mesi di terapia con migalastat o ERT, a cui ha fatto seguito 12 mesi di terapia con migalastat. Il regime di dosaggio di migalastat era 150 mg di migalastat cloridrato a giorni alterni. L'obiettivo primario consisteva nel confrontare l'effetto di migalastat con ERT sulla funzione renale valutata mediante mGFR_{ioexolo} dopo 18 mesi di trattamento. Gli obiettivi secondari consistevano nel confrontare l'effetto di migalastat con ERT su: funzione renale (valutata mediante eGFR e proteine nelle urine nelle 24 ore); esito clinico composito (valutato mediante il tempo per verificarsi di eventi renali, cardiaci, cerebrovascolari o morte); funzione cardiaca (valutata mediante ecocardiografia) e esiti riferiti dal paziente (dolore e qualità della vita).

MWFS basale. Al basale, MWFS compromesso (<15% per le femmine e <14% per i maschi) è stato riportato in 19 (14 migalastat, 5 ERT) pazienti.

Risultati

Migalastat e funzione cardiaca. Questo studio di pazienti già trattati con ERT ha trovato che la terapia con migalastat stabilizza MWFS

in pazienti con MWFS compromesso al basale. L'analisi LOCF di pazienti con MWFS compromesso al basale mostravano variazioni medie del basale di -0,2% (CI 95% -1,3%, 1,0%; n=14) per 30 mesi di terapia con migalastat. L'analisi LOCF di pazienti con MWFS compromesso al basale mostravano variazioni medie di MWFS di -0,6% (CI 95% -2,6%, 1,4%; n=5) per 18 mesi di trattamento con ERT.

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 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 l'uso nella stabilizzazione della funzione cardiaca in un paziente già trattato con terapia enzimatica sostitutiva (ERT) affetto da malattia di Fabry, in cui al paziente vengono somministrati 123 mg di equivalente di base libera (FBE) del migalastat o del relativo sale a giorni alterni.

2. Migalastat o relativo sale per l'uso secondo la rivendicazione 1, in cui il migalastat o il relativo sale è compreso in una formulazione, e in cui la formulazione è somministrata al paziente.

3. Migalastat o relativo sale per l'uso secondo la rivendicazione 1 o 2, in cui il paziente ha un accorciamento frazionale centro-parietale (MWFS) compromesso prima di iniziare la somministrazione del migalastat o del relativo sale.

4. Migalastat o relativo sale per l'uso secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 3, in cui il migalastat o il relativo sale potenzia l'attività di α -galattosidasi A.

5. Migalastat o relativo sale per l'uso secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 4, in cui in cui al paziente sono somministrati 123 mg di base libera di migalastat a giorni alterni.

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

7. Migalastat o relativo sale per l'uso secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 2 a 6, in cui la formulazione comprende una forma di dosaggio orale.

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

9. Migalastat o relativo sale per l'uso secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 8, in cui il migalastat o il relativo sale è somministrato per almeno 12 mesi, o per almeno 24 mesi.

10. Migalastat o relativo sale per l'uso secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 9, in cui il paziente ha una mutazione suscettibile al saggio HEK di α -galattosidasi A.

Si attesta la perfetta conformità della traduzione che precede.

B

ccctctctgtaggggcagagaggttctacttctacttgcgtctcctgggaaggecatcag 60
gactgctgggetaaaagtgggaaccaggactctttgtgagtlaaagaatttgggtatattat 120
gtgtgttatacacattttttaaaaaactgtaacgacatcagggtgagcagtcgtctcggg 180
gtgggtgaattatgtgtatttttaaatttatactataattgttatttttcaaagtctcgaa 240
attgaatatgtagattgttgttatcagcagaaaaataaacattattcaataactctattc 300
agtaaaagtaattttattggggcgcctttgtcaagcagcatttgcctagatgtgactctaca 360
gataaaattcacttggggcctccccctacagacaatcaggcagtgagagactgagtgccctg 420
aatggatagaccagcactcagaccactattttcagtatctgtttttcttaactcagggcc 480
gtggttttcaaacgtttttgccttaaggctcacccttagggcccccgagaccggcccag 540
acagacagatatacaaaaaacacatacacagtcacagcgtccaccatttccccaccaggc 600
gcagcacagggcggcttccoggcactgagatgggggggagggaggagagagcggcgggggg 660
gaggggaaagcagagaaacgaaagggcggaggcggccccgaacccccgctctgggtcttca 720
tcatcaccaccctgggtccccagttccccaccacacaccaacctctaacgataccgggt 780
aattttctctctctctccctcaaacggctatagcggagcggtagacgacgaccagaacta 840
cttctgctcagcgtaaagcagtaatacagtgagcgcctacgtcatgtgagatctcggtcac 900
gtgagcaactctcggcttaaacctcgggatcaactaaggctgcgcacttctctctggtatgg 960
aaataggcggggtcaatatcaagaaaggaagaggggtgatgggttagcggaaacgtcttacg 1020
tgactgatatttgggtctacctctggggataaacgtcccagttgccagagaaacaataacg 1080
tcattatttaataagtcacgtggtgatgggtccgccccctgaggttaattcttaaagcccag 1140
gttaccocgggaaatttatgctgtccggtcaccgtgacaatgcagctgaggaaccagaa 1200
ctacatctgggctgcgcgcttgcgcttcgcttctggcctcgtttctcgggacatccct 1260
gggctagagcactggacaatggattggcaaggcgcctaccatgggctggctgcaactgg 1320
gagcgtctcatgtgcaacctgactgccaggaagagccagattcctgcatcaggatcag 1380
atattgggtactcccttccctttgctttccatgtgtttgggtgtgtttggggaactgga 1440
gagctcaaacgggaacagttgagccccgagggagagctccccaccgactctgctgctgc 1500
ttttttatccccagcaaacgtcccgaatcaggactagccctaaactttctctgtgtgac 1560
ctttctgggatgggagtcogggccagcggccccctgtttctttctctctctctctctct 1620
cgttct 1680
ttctcttttttactgctccttgcagagcagggccaccctataggcagtggtgcccagg 1740
agccctgcccgggttctattcagacccttctgtgaactctgctcttctctgcccgggtg 1800
ctaaccgttagaacatctagggtgggtaggaggaatggggaactaagattcgtgccattt 1860
tttctccttttggggctcgtggatttctcggcagtatctcaggggagttagagagaccata 1920
aggtcgtgagatctctcccacctcgccatgagcgtggcatcaggctggaagggtgaca 1980
tggaggaactttatacaatttacaccttgogtgaggggtgagggctggattagataggtat 2040
tgaacatactgaccctcacaactccttatctgtaaatgggattacaaccttttaatttc 2100
agggagctgacaaaaaaaatctgaaaaatagtttcttatctcacacaggtgagttttcaag 2160
gagataacctatttaaagtaacatagcacagcgttggaccattcaactgcgcttacagagc 2220
aaatgttcaatgggaaaatgaatgtaaatctacaaatctgaatgaatattgtgtattttc 2280
tggagagaggatatttacctttcttcaaatctcaaaaggctctgtgatttaaaaaagg 2340
taggaatcactgatagatgttggtaaaagggtggcagtcacagtaacattctgtgtccata 2400
agttatctctatgaatatctttatagataaagtcaggatgttggtcagacatcacagaag 2460
aaattggccttgtaagtttcatgtgacctgtggtacagtatgtgtggcaattttgccc 2520
tcacggatttttttttatgggtatttgcactgattataaaaactaatgcatgatcattgc 2580
aaaaaatgtagataaagaagagcaaaatgaaaataaagatttccccaccggtccacca 2640
cccagaaataatcatggtttaaatgttaatacaaccttacaattgtttctatataaa 2700
tgaaaaacatagatttctttattttcattattttccataaaaaatggatcatgtttatgtca 2760
tgtttggctaatggcaagaccctggcaccagctcgggctcaaattctgocctcattgtta 2820
cttagccctgtgacattgggtaaatcacttttttttttttttttttttttttttttttt 2880

FIG.1A

B

tctcgtctctgtcggcccaggctggagtgacagtggaacgatctcggctcactgcaagtccgc 2940
ctcctgggttcacgccaattcttctgcctcagcctcccgagtagctgggactacaggcgcc 3000
tgccaccaogcctggctcttttttttttttttttttttttttttttttttagtacagacgggtttcac 3060
catgttagccagggtgggtctcaatctcctgacctcgtgattcggccgcctcagcctccca 3120
aagtgcctgggtgtgagccaccgtgcccagccttacttttttttttgagagggggtctcact 3180
ctgtcaccaggttggagtgacagtgggcgatctctgctcagtgcaaaactccacctcccg 3240
ggtttaagcagttctcctgtcgtagtctcctgagtagctgggat tacaggcaaccacca 3300
cggccagctaatttttgtatcttcagtagagacgggtttcaccatggtgcccaggctgggt 3360
ctcgaactcctggcctcaagtgatctgcccgccttggcctcccagagtgctgggattaca 3420
gggtgtgagccaccgcacccggcctcttttttttttttttttttttttttttttttttagtctatcataccttgcaata 3480
cagtggttcttctctatgtgttgggttttgatatttatgtaatcaaacacatcagtttttcc 3540
tttctgattttctgactttggggctcatgctgagaaaagtcctttcctacctgaagataatac 3600
agtataacgtttcttactagtatttttgtggatttttaaaatatttaaatctttagttcc 3660
atctgaacttggctctctatcagaaaatgccacat ttaataaaataataagtcctatgggtat 3720
cagatggctggaaggacctctttcgaaaacttggtttaattccat taatctgtgtattctt 3780
attctaagtctaataagttccacactagcttcccttatcttttttttttttttttttttt 3840
ttttgagctggagtttctcctcttggcttggcccaggctggagtaaatgtcacgatctcggtt 3900
caccgcaacctccgctcccagggtcaagcaattctcctgctcatcctcgcgagtagct 3960
ggaattacaggctgcgccaccacgctagctattttggatttttagtagagatggggtt 4020
tctccatggttggtaaggetggctcaaaactcccagcctcaggtgatctgctgctcggc 4080
ctccccaaatgctgttat tacaggcgtgagccaccagcccagccttcctcttttaatga 4140
atgtacatgtatgtaactcttttaggtgaactttttgtaatgttgtgccaagttccttaaa 4200
aagccttttggaaagctgggcaggtggccacgctgtaatcccagcattttgggagctctg 4260
aggcaggtggatcacttgaggccaggagttcaagactagcctagccaaaatgcaaaaccc 4320
tgtctactaaagatacaaaaat tagccggatgctgagtgccacatgctgtaatctcagc 4380
tactcgggaggtcaggtagaagaatcgcttgaaccggggaggcagaggttgacagtgagc 4440
aagatggcgcactgcactccagcctgggtgacagaggggagactccatctcaaaaaaaaa 4500
aaaaaaaaaaaaagataaaaaaggaaacctaaagtaactcttgggcttggtaaggattttgtt 4560
aaatatacaaaaggatttgcagggaaaataaactatttttaataatggagtagcttatcca 4620
agagcaaaaataatattttctccatttattcaaatcatttaggagcatcatagtttaacat 4680
atgggcttgcacgtatcttaatttatctctagccatttttaggttggttcagttgttctt 4740
gtgaaatgggatctttttctccaaataggattattgttgatctctgttgattatgtaact 4800
ttgtagtttctgactttactgaaactgtcttcttagatctaatactcttttcaatttcac 4860
atataattctcattcctattttgtttgggggttttttagggcgggaatattaacgggataag 4920
agagacaaaagaaaaatctggaaaaacaattcattttaccttacattgcttctgtgattacta 4980
ccacaactattactgggttggaaaaaattgtgaaatcccagggtgcttaataaatgggagg 5040
tacctaagtggttcatttaataatgaattgtaatgattattggaattctctcttcagtgagaag 5100
ctctcagtgagatggcagagctcatggctcagaaggctggaaggatgcaggttatgag 5160
tacctctgcattgatgactgtttggatggctccccaaagagattcagaaggcagacttcag 5220
gcagaccctcagcgtcttctcctcatgggattcggcagctagctaatatgtgagtttatag 5280
ataatgttcttgttcaattcagaggactgtaagcactctctgtacagaagcttgtttagaaa 5340
cagcctcatggccggcggtgggtggctcacgctgtaatcccacactttgggaggccgag 5400
gcggtggatcacctgaggtcaagagttcaagaccagcctggccaacatggtgaaacccc 5460
aactctataaaagtaaaaaaat tagctgggcattgggtggtaacgctgttaaccccagc 5520
tacttgggaggctgaggcaggagaatcgcttgaaccaggaggtggaagtttctcagtgagc 5580
tgagatcacgccattgcactctagcctgggcaacaaaagagaaaactccatctcaaaaaaa 5640
aaaaaaggaaaaaaagaaacagcctcatgacacttagaaaagtagaatagctggctgtt 5700
atctgaacattgaattgtaaggcttatcaggtggactttgcattccatcagcagacaatt 5760

FIG.1B

AB

tttttttttttttttttttttttgagatggagctctcattctgtctcccaggctggagggcagtg 5820
gtgcgatctoggctcactgcaagctccacctcctgggttcattgccattctcctgcctcag 5880
cctcccaagttagctgggaccacagggcaccgccaccatgccagttaattttttgtattt 5940
ttagttagagacgggggtttcaccatgttagccaagatgggtctcgatctcctgacctcgtga 6000
tccgcccacctcggcctcccaaagtgtgggattacaggcatgagccaccgcgcctagcc 6060
tacaaatgttttgtaatagctcttgaggccatcttggagttctccttttctaaaacca 6120
ctgaactctctaggaggaaaagggaacttgggtcttgacatattgtgtgcatgtatttcca 6180
tataaccttttaggaagctattgcaatgggtactataaaactagaattttagaagatagaagg 6240
aaaatattctggagatcattgaagagaaatggagtccaacactagttaaagatgatgaag 6300
acagatttttttttttgaocggagtctcgtctcgtcgcgccaggctggagtgcatggcaca 6360
atctcagctcactgcaacctccacctcttgggttcaagtgattctcctgcctcagcctc 6420
ccaagttagctgggactacaggcgcacaccaccgcocggctaatTTTTGTATTTTtagt 6480
agagacaagggtttcaccatattcgcacggctgggtctcgaactcctgaccttgaatccgc 6540
ccacctggcctcccaaagtgtgggattacaggcatgagccaccacgcocggcogatga 6600
agacagattttattcagtaactaccacagttagggaaaagagccaaagtccaattccaaat 6660
aacaaagacaggtggagatttatagccaatgagcagattgaggggggtcagtggtggaat 6720
atltagaagacatcaagggtagggagcttcttgctaaagcttcatgtacttaacaaga 6780
aggggtgggggatgagggaaattgatcagatcaaatgggtggcagttttagcttagcagga 6840
ttcttgcataagaggtcttgcctagggacagacataggaagccaaggtggaggtctagtcgaa 6900
aagaaggtcatcagagaagtctaaactaaagtttgggtcaagaagagttcttgcctcaaggt 6960
aatctatcatttccctcaaaaggtattttcaggatccctcaggaagattagcatggct 7020
gctagctttctcctcagttctgggctatagctcacatgctagtttgaactagctcagca 7080
gaactgggggatttatctttgtcttccaacaaactcactcggatgattttgggggtttg 7140
tggggaaaagcccccaatacctgggtgaagtaaccttgcctcttccccagcctggaatgg 7200
ttctctctttctgctacctcagattgtgcttctacaatgggtgactcttttctcctct 7260
catttcagggtcacagcaaggactgaagctagggatttatgcagatggttgaaaataaaa 7320
cctgcgcaggcttccctgggagttttggatactacgacattgatgccagacctttgctg 7380
actggggagtagatctgctaaaatttgatgggttggttactgtgacagtttggaatattgg 7440
cagatggtaattgtttcattccagagatttagccacaaaggaaagaactttgaggccatgg 7500
tagctgagccaaagaaccaatcttcagaattttaataacctgtcacaatactggaaata 7560
attattctccatgtgccagagctcccatctctctcttctcagttcattaattaattaatt 7620
aattcatgtaaaatccatgcatacctaaccatagctaatattgtgcacttataattcaag 7680
agggctctaagagtttaattagtaattgttaactctctataaacatcatttaggggagtcag 7740
gttgtaaatcgggtcacagagaaagaagcatcttcattcctgcctttcctcaatatacaca 7800
ccatctctgcactacttctcagaacaatcccagcagctcgggaggtactttacacaatt 7860
taagcacagagcaactgcctgtcctgtgctagtttaaacatgaaccttccaggtagcc 7920
tcttctaaaataatacagccccagctgggcatgatggctcactgcctgtaatcctagcact 7980
ttgggaggtcagggcgggtggattacttgagggtcaggagttcgagaccacctggccaac 8040
atgggtgaaaccccatctctagtaaaaatacaaaaatttagctgactttgggtggcactgcc 8100
tgtaatcccagctacttgggaagctgagacagaagagtcacttgaacctgggaaacagag 8160
ggtgcagtgagccaagatcgcaccactgcactccacctggatgacagactgaaccccat 8220
ctcaaaaaatataaataaaaataaaaataaataactatataatagccccagctggaaatt 8280
catttctttcccttattttaccattgtttctcctacacaggttataagcacatgtccttg 8340
gcctgaaataggactggcagaagcattgtgtactcctgtgagtgccctctttatagtg 8400
ccctttcaaaaggtgagatagtgagcccagaatccaatagaactgtactgatagatagaa 8460
cttgacaacaaaggaaaccaaggtctccttcaaagttcaacgcttacttactatcatccta 8520
ccatctctcccaggttcaaccacttctcaccatcccactgctgttaattatagcctaag 8580
ctaccatcacctggaaagtcactccttgcctcttcccttlatttaccatctatgctcctg 8640

FIG.1C

B

tctatcaaacagctcctccaccagtatctctaaaatatctcctgaatcagcccacttcctt 8700
ccatcttcaactacatgcaccctggccttccaagctactatcggctctcaaccagactgct 8760
gggaccacctgatctctctgcttccactctgtctcaacccccatctatcttccaagcagc 8820
actagagttatcatatataaaatgtaaatatcagtttttttttaagaaaaaacctga 8880
gacttaacagagttataaaaaatataaatgtcatcatcagttccctgcttaaaaccctta 8940
actcgttccaattgcaottggaatgaaaccaaactgcactgatccagcccttgccctgcc 9000
tccccaaagtccaaggggcatggctctttccctggctacactggttttctttctgtccc 9060
tcaacactgcaagcctattgctgccccaggcctttacaacttgctttttttctgcctaga 9120
acagttcttccccaaagatttttaaaaggcgggctccttaacattgaagtgcagacca 9180
aacgccacatatgcagacagttctctctactactttaaaatagccctctgtocattca 9240
ttctcatcacattaacctgttaattttctctcagagctccacactatttggagat 9300
ttgtgacttgttaccatgtctccccactagagtgaagtttcatgagggcagggacctt 9360
gtctgactttgactgtatctctgcgatatgggttaagtgttaaatagttatltatggaatg 9420
aatccctattatccctcatttatctctgcaaaaatagtctttttctcaacatcttaaacc 9480
tgatatccacactgctatctacaaaacttttttttgagacagagtctcactgtcaccca 9540
ggctagagtgccagtgggccatctcggctcactgcaacctccgctcccggtttaagcg 9600
attctcttgccctcagcctcccagtagctgggatfataggcctgagctaccacatctggct 9660
aatttttgatatttttagtagagatggttccaccatggtggccaggttctctcgaactcc 9720
tgaectcagatgatccactgectcggcctcccaaagtgtgggattacaggcatgacc 9780
accgtgccagcctctacaaaactttttattccatlaacaaaactatagctgggattlaag 9840
ttttcttaacttgatggagtcctatgtaattttcagagcttttaattttactaagacca 9900
ttttagttctgattatagaagtaaatlaacttlaagggatttcaagttatagccctact 9960
tctgaagcaaacctcttacagtgaaaattcattataagggtttagacctccttatggaga 10020
cgttcaatctgtaaacctcaagagaaaggctacaagtgcctcctttaaactgtttcatctc 10080
acaaggatgtagtagaaagtaaacagaagagtcabatctgtttcacagcccaattata 10140
cagaaatccgacagtaactgcaatcactggcgaaattttgctgacattgatgattcctgga 10200
aaagataaaagagtatctggactggacatctttlaaccaggagagaattgttgatgttg 10260
ctggaccaggggggttggaaatgaccagataatggtaaaaacttgagccctcctgttcaag 10320
accctggcggtaggctgtgttccctattttgacattcaaggtaaatacaggtaaagttcctg 10380
ggagggaggtttatgtgagagtaacttagagcaggatgctgtgaaagtggttctccata 10440
tgggtcacttaggtaaccttaagaatgtttccctcctctctgtttgaattattcattct 10500
ttttctcagttagtgtattggcaactttggcctcagctggaatcagcaagtaactcagatg 10560
gcctctgggctatcatggctgctcctttattcatgtctaatgacctccgacacatcagc 10620
cctcaagccaaagctctcctcaggataaggaogtaattgocatcaatcaggacccttg 10680
ggcaagcaagggtagcagcttagacaggtaaataagagtatatattttaagatggcttta 10740
tataccaataccaactttgtcttgggctaaaatctatttttttcccttgctcttgatgt 10800
tactatcagtaataaaagcttcttgctagaaacattactttatttccaaaataatgctaca 10860
ggatcatttttaatttttctcaaaagtgttgatagttctgacatlaagaatgaatgccaa 10920
actaacagggccacttatcactagttgctaagcaaccacactttcttggttttcagggga 10980
gacaactttgaagtgtgggaacgacctctctcaggttagcctgggctgtagctatgata 11040
aacccgagggagattgggtggacctcgtcttataccatcgcagttgcttccctgggtaaa 11100
ggagtggcctgtaactcctgcctgctcatcacacagctcctccctgtgaaaaggaagcta 11160
gggtctatgaaatggacttcaaggttaagaagtcacataaatcccacaggcactgttttg 11220
cttcagctagaaaaatacaatgcagatgtcattaaaagacttaactttaaagtgtttat 11280
attgccaaactactacttctctccacctttttctccattcactttaaagctcaaggcta 11340
gggtgctcatgectgtaateccagcaactttgggaggtgagggggcagatcaectgagg 11400
tcgggactttgagaccgcctggacaacatggtgaaaccccatttctaataaaaatataa 11460
aaattagccaggtgtggtggcgacctgtggtccagctactctggggctgagggcatga 11520

FIG.1D

B

```
gaatcgcttgaaccgggagtgagggttgcaattgagctgagatcatgccacctcactcca 11580
gcctgggcaacaagattccatctcaaaaaaaaaaaaaagccaggcacagtggctcatg 11640
cctggaatcccagcacttttggaaagctgaggcaggcagatcacttgaggtaggatttca 11700
agaccagcctggctaacatagtaaagccctgtctctactaaaaatacaaaaattagccag 11760
gtatggtggcgagcttctgtagccccagctactcaggagactgaggcaggagaatcactt 11820
gaaccggggaagtgggggggtgcagtgaaccaagatcacgccactgcattccagcctggg 11880
caacagagcaagactccatctcaaaaaaaaaaaagtctatcttctgaataaaaattttcgg 11940
aagtttaaacttttaggaataaaaactattaaaccogtatttactcatccagataccaccc 12000
cccttggtgagattctctcccaattatcaaaatgtgtagcatatttaactaccaagagct 12060
aaacatcattaagactgaaatgtattaagaaggatgtataggccaggcacoggtgtctcac 12120
gctgtaatcccaacactttgggaggccaagtcggggggatcacgaggtcaggagatgga 12180
gaccatcctggccaacatggtgaaacccctctctactaaaaatacaaaaattagccagg 12240
caggtggcaggcaacctgtaatcccagctactccagaggetgaggcaggacaatcacttga 12300
acctgggaggcagaggctgcagtgagctgaggttgtaccaattgcactccagcctaggt 12360
acgagcaacactccatctcaaaaaagaaaaaaaaaaagatgtataatttggaaactgtta 12420
agaggcattttaaaga 12436
```

FIG.1E

B

MQLRNPELHL	GCALALRFLA	LVSWDIPGAR	ALDNLARTP	TMCWLHWERF	MCNLDCQEEP	60
DSCISEKLFM	EMAELMVSEC	WKDACYEYLC	IDDCWMAQQR	DSEGRLLQADP	QRFPHCIHQ	120
ANYVHSHKGLK	LCIYADVCKN	TCAGFPSCFC	YYDIDAQTFA	DWCVDLLKFD	CCYCDLLENL	180
ADGYKHMSLA	LNRTGRSIVY	SCEWPLYMWP	FQKPNYTEIR	QYCNHWRNFA	DIDDSWKSJK	240
SILDWTSFNQ	ERIVDVAGPG	GWNDPDLVI	GNFGLSWNQ	VTQMALWAIM	AAPLFMSNDL	300
RHISPQAKAL	LQDKDVIAIN	QDPLGKQGYQ	LRQGDNFVW	ERPLSGLAWA	VAMINRQEIG	360
GPRSYTIAVA	SLGKGVACNP	ACFITQLLPV	KRKLGFYEW	SRLRSHINPT	GTVLLQLENT	420
MQKSLKDLL						429

FIG.2

Atgcagctgaggaatcccagctccacctgggctgtgctctggctctgoggttccctggcc	60
Ctcgtgtcctgggacatccctggcgctagggccctcgataaacggactggcccggaccccc	120
Acaatgggatggctccactgggaaagggttcattgtgcaatctggactgtcaggaggaacc	180
Gactcctgcctcagcgaaaagctcttcatggagatggccgagctgatggtgagcgagggc	240
Tggaaggacgcccggctacgagtatctgtgcatcgatgactgctggatggcccctcaaagg	300
Gactccgaaggcaggctgcaggetgatcccccagggtttccccacggaatccggcagctc	360
Cccaaactacgtgcattccaagggctcaagcteggaatctacgcgcgaogtgggcaacaaa	420
Acatgcccggattccccggcagcttcggctactacgacatcgacgcccagacattcgt	480
Gattggggagtggaacctgctgaagttcgacggctgttactgcgattccctggaaaacctg	540
Cccgacggctacaaacacatgtccctcgccctgaaccggacaggcagggtccatcgtgtac	600
Agctgcgagtgggcccctgtacatgtggcctttccagaagcccaactacacagagatcagg	660
Cagtactgcaaccactggaggaacttcgctgacatcgacgactcctggagagcatcaag	720
Agcatcctggactggaccagcttcaaccaggagaggatcgtggacgtggctggaccggga	780
Ggctggaaacgacccccgatatgctggtgatgggcaacttcggactgagctggaaccagcag	840
Gtgaccacagatggccctgtgggcccattatggccgctccctggttcattgtccaaccgacctg	900
Aggcacatcagccccagggccaaggctctgctgcaggacaaggatgtgatcgccatcaac	960
Caggacccccctgggcaagcagggtaccagctgaggcaaggagataacttcgaggtgtgg	1020
Gagaggccccctgtccggactggcttgggcccgtggccatgatcaatcggcaggagatcggc	1080
Ggaccccggtcctacaccattgctgtggccagcctgggaaaaggagtgcctgcaacccc	1140
Gcctgcttcattaccagctgctcccctggaagcgggaagctgggcttctatgagtgagcc	1200
Agcagctgaggtcccataatcctaccggcaccgtcctcctccagctcgagaataacc	1260
Atgcagatgagcctcaaggatctgctgtga	1290

FIG.3