(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **3 007 212**

(51) Int. Cl.:

***A61K 31/445*** (2006.01)
***A61P 9/00*** (2006.01)
***A61P 25/00*** (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.01.2020 PCT/US2020/014531**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **30.07.2020 WO20154354**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.01.2020 E 20708283 (5)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.11.2024 EP 3914247**

(54) Título: **Uso de migalostat para reducir el riesgo de evento cerebrovascular en pacientes con enfermedad de Fabry**

(30) Prioridad:

**22.01.2019 US 201962795524 P**

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
**19.03.2025**

(73) Titular/es:

**AMICUS THERAPEUTICS, INC. (100.00%)**
**3675 Market Street**
**Philadelphia, PA 19104, US**

(72) Inventor/es:

**SKUBAN, NINA y**
**LAGAST, HJALMAR**

(74) Agente/Representante:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Uso de migalostat para reducir el riesgo de evento cerebrovascular en pacientes con enfermedad de Fabry

### CAMPO TÉCNICO

Los principios y las realizaciones de la presente invención se refieren generalmente al uso de chaperonas farmacológicas para el tratamiento de trastornos de almacenamiento lisosomal, en particular al uso de migalastat para el tratamiento de la enfermedad de Fabry.

### ANTECEDENTES

La enfermedad de Fabry es un error congénito progresivo del metabolismo de los glicoesfingolípidos, ligado al cromosoma X, causado por una deficiencia en la enzima lisosomal α-galactosidasa A (α-Gal A) como resultado de mutaciones en el gen α-Gal A (GLA). A pesar de ser un trastorno vinculado al cromosoma X, las mujeres pueden expresar diversos grados de manifestaciones clínicas. La enfermedad de Fabry es una enfermedad rara con una incidencia estimada entre 1 de cada 40.000 hombres y 1 de cada 117.000 en la población general. Además, existen variantes de fenotipo de inicio tardío de la enfermedad de Fabry que pueden estar infradiagnosticadas, ya que no presentan signos ni síntomas clásicos. Junto con las pruebas de detección de la enfermedad de Fabry en recién nacidos, esto sugiere que la incidencia real de la enfermedad de Fabry puede ser más alta de lo que se estima actualmente.

Si no se trata, la esperanza de vida de los pacientes con enfermedad de Fabry se reduce y la muerte suele producirse en la cuarta o quinta década debido a una enfermedad bascular que afecta a los riñones, al corazón y/o al sistema nervioso central. La deficiencia enzimática conduce a una acumulación intracelular del sustrato globotriaosilceramida (GL-3) en el endotelio vascular y en los tejidos viscerales de todo el cuerpo. El deterioro gradual de la función renal y el desarrollo de azotemia debido al depósito de glicoesfingolípidos, se producen generalmente en la tercera a quinta década de vida, pero se pueden producir tan pronto como en la segunda década. Las lesiones renales se encuentran tanto en pacientes hemicigotos (hombres) como heterocigotos (mujeres).

La enfermedad cardíaca como resultado de la enfermedad de Fabry se produce en la mayoría de los hombres y en muchas mujeres. Los hallazgos cardíacos incluyen agrandamiento del ventrículo izquierdo, afectación valvular y anomalías de la conducción. La insuficiencia mitral es la lesión valvular más frecuente, presente normalmente en la infancia o en la adolescencia. Las manifestaciones cerebrovasculares son el resultado principalmente de la afectación multifocal de vasos pequeños y pueden incluir trombosis, ataques isquémicos transitorios, isquemia y aneurisma de la arteria basilar, convulsiones, hemiplejia, hemianestesia, afasia, trastornos del laberinto o hemorragias cerebrales. La edad media del inicio de las manifestaciones cerebrovasculares es de 33,8 años. El cambio de personalidad y el comportamiento psicótico pueden manifestarse con el aumento de la edad.

Una terapia aprobada para tratar la enfermedad de Fabry es la terapia de reemplazo enzimático (ERT), que generalmente implica la infusión intravenosa de una forma purificada de la proteína de tipo salvaje correspondiente. Actualmente hay dos productos α-Gal A disponibles para el tratamiento de la enfermedad de Fabry: agalsidasa alfa (Replagal®, Shire Human Genetic Therapies) y agalsidasa beta (Fabrazyme®; Sanofi Genzyme Corporation). Si bien la ERT es efectiva en muchos entornos, el tratamiento también tiene limitaciones. No se ha demostrado que la ERT reduzca el riesgo de accidente cerebrovascular, el músculo cardíaco responde lentamente, y la eliminación de GL-3 de algunos tipos de células de los riñones es limitada. Algunos pacientes también desarrollan reacciones inmunes a la ERT.

Por consiguiente, sigue existiendo la necesidad de terapias para el tratamiento de la enfermedad de Fabry, especialmente para reducir el riesgo de eventos cerebrovasculares.

Sunder-Plassmann et al. (Expert Opinion on Orphan Drugs, 6:5, 301-309; 2018) describen en general el migalastat para el tratamiento de la enfermedad de Fabry. Hughes et al. (J Med Genet, 54(4): (288-296; 2017) describen la chaperona farmacológica oral migalastat en comparación con la terapia de reemplazo enzimático en la enfermedad de Fabry, y en particular los resultados de 18 meses del estudio de fase III aleatorizado ATTRACT. Ranieri et al. (Curr Treat Options Neurol, 18(7): 33; 2016) describen el reconocimiento, diagnóstico y tratamiento de las características neurológicas de la enfermedad de Fabry.

### SUMARIO

La presente invención está definida por las reivindicaciones adjuntas. Diversos aspectos de la presente invención se refieren a migalastat o una sal del mismo para uso en el tratamiento de la enfermedad de Fabry en pacientes con y sin experiencia en ERT. Dicho tratamiento reduce el riesgo de eventos cerebrovasculares (CBV). El tratamiento incluye terapia con migalastat a largo plazo, tal como un tratamiento durante al menos 2, 3, 4 o más años.

Un aspecto de la presente invención se refiere a migalastat o una sal del mismo para uso en un método para reducir el riesgo de un evento CBV en un paciente que tiene enfermedad de Fabry, comprendiendo el método administrar al paciente una formulación que comprende una cantidad efectiva de migalastat o una sal del mismo cada dos días, durante al menos 2 años, en el que la cantidad efectiva alrededor de 100 mg a alrededor de 150 mg de equivalente de base libre (FBE).

En una o más realizaciones, el evento CBV comprende uno o más de isquemia del tronco encefálico, infarto cerebral, hemorragia cerebral, isquemia cerebral, accidente cerebrovascular, accidente cerebrovascular embólico o ataque isquémico transitorio.

En una o más realizaciones, el paciente tiene un mayor riesgo de un evento CBV antes de iniciar la administración del migalastat o una sal del mismo.

En una o más realizaciones, el migalastat o una sal del mismo refuerza la actividad de α-Gal A.

En una o más realizaciones, se administra al paciente alrededor de 123 mg de FBE de migalastat o sal del mismo cada dos días.

En una o más realizaciones, se administra al paciente alrededor de 123 mg de base libre de migalastat cada dos días.

En una o más realizaciones, se administra al paciente alrededor de 150 mg de hidrocloruro de migalastat cada dos días.

En una o más realizaciones, la formulación comprende una forma de dosificación oral. En una o más realizaciones, la dosificación oral comprende un comprimido, una cápsula o una solución.

El migalastat o una sal del mismo se administra durante al menos 2 años.

En una o más realizaciones, el migalastat o una sal del mismo se administra durante al menos 3 años.

En una o más realizaciones, el migalastat o una sal del mismo se administra durante al menos 4 años.

En una o más realizaciones, el paciente es un paciente sin tratamiento con ERT.

En una o más realizaciones, el paciente es un paciente con experiencia en ERT.

En una o más realizaciones, el paciente tiene una mutación susceptible de ensayo HEK en la α-galactosidasa A. En una o más realizaciones, la mutación se describe en una tabla de referencia farmacológica. En una o más realizaciones, la tabla de referencia farmacológica se proporciona en una etiqueta de producto para un producto migalastat aprobado para el tratamiento de la enfermedad de Fabry. En una o más realizaciones, la tabla de referencia farmacológica se proporciona en una etiqueta de producto para GALAFOLD®. En una o más realizaciones, la tabla de referencia farmacológica se proporciona en un sitio web. En una o más realizaciones, el sitio web es uno o más de www.galafoldamenabilitytable.com o www.fabrygenevariantsearch.com.

**BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS**

Otras características de la presente invención se harán evidentes a partir de la siguiente descripción escrita y las figuras que la acompañan, en las que:

Las FIGS. 1A-E muestran la secuencia de ADN completa del gen GLA de tipo salvaje humano (SEQ ID NO: 1);

la FIG. 2 muestra la proteína α-Gal A de tipo salvaje (SEQ ID NO: 2); y

la FIG. 3 muestra la secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína α-Gal A de tipo salvaje (SEQ ID NO: 3).

**DESCRIPCIÓN DETALLADA**

Antes de describir varias realizaciones ejemplares de la invención, debe entenderse que la invención no se limita a los detalles de construcción o etapas del procedimiento recogidos en la siguiente descripción. La invención es susceptible de otras realizaciones y de ser puesta en práctica o llevada a cabo de diversas maneras.

Diversos aspectos de la presente invención se refieren a regímenes de dosificación para la administración de migalastat para el tratamiento de la enfermedad de Fabry. Los regímenes de dosificación de migalastat reducen el riesgo de un evento CBV.

**Definiciones**

Las expresiones y los términos utilizados en esta memoria descriptiva tienen generalmente sus significados habituales en la técnica, dentro del contexto de esta invención y en el contexto específico en el que se utiliza cada término o expresión. Ciertos términos se discuten a continuación, o en otra parte en la memoria descriptiva, para proporcionar una guía adicional al profesional en la descripción de las composiciones y métodos de la invención, y cómo prepararlos y usarlos.

El término "enfermedad de Fabry" se refiere a un error congénito vinculado al cromosoma X del catabolismo de glicoesfingolípidos debido a una actividad lisosomal deficiente de α-Gal A. Este defecto provoca la acumulación del sustrato globotriaosilceramida ("GL-3", también conocido como Gb3 o trihexósido de ceramida) y glicoesfingolípidos relacionados en los lisosomas endoteliales vasculares del corazón, los riñones, la piel y otros tejidos. Otro sustrato de la enzima es globotriaosilesfingosina plasmática ("liso-$Gb_3$ plasmática").

La expresión "enfermedad de Fabry atípica" se refiere a pacientes con manifestaciones principalmente cardíacas de la deficiencia de α-Gal A, es decir, acumulación progresiva de GL-3 en las células del miocardio que conduce a un agrandamiento significativo del corazón, particularmente del ventrículo izquierdo.

Una "portadora" es una mujer que tiene un cromosoma X con un gen α-Gal A defectuoso y un cromosoma X con el gen normal y en la que la inactivación del cromosoma X del alelo normal está presente en uno o más tipos de células. A menudo se diagnostica la enfermedad de Fabry a una portadora.

Un "paciente" se refiere a un sujeto al que se le ha diagnosticado o se sospecha que padece una enfermedad particular. El paciente puede ser humano o animal.

Un "paciente de Fabry" se refiere a un individuo a quien se le ha diagnosticado o se sospecha que tiene la enfermedad de Fabry y tiene una α-Gal A mutada como se define más adelante. Los marcadores característicos de la enfermedad de Fabry pueden presentarse en hemicigotos masculinos y portadores femeninos con la misma prevalencia, aunque las mujeres suelen verse menos gravemente afectadas.

α-Galactosidasa A humana (α-Gal A) se refiere a una enzima codificada por el gen GLA humano. La secuencia de ADN completa de α-Gal A, incluidos intrones y exones, está disponible en GenBank con número de acceso X14448.1, y se muestra en la FIG. 1A-E (SEQ ID NO: 1). La enzima α-Gal A humana consiste en 429 aminoácidos, y está disponible en los números de acceso de GenBank X14448.1 y U78027.1, y se muestra en la FIG.2 (SEQ ID NO: 2). La secuencia de ácidos nucleicos que solo incluye las regiones codificantes (es decir, exones) de la SEQ ID NO: 1 se muestra en la FIG. 3 (SEQ ID NO: 3).

La expresión "proteína mutante" incluye una proteína que tiene una mutación en el gen que codifica la proteína, lo que da como resultado la incapacidad de la proteína para lograr una conformación estable en las condiciones normalmente presentes en el retículo endoplásmico (RE). Al no lograr una conformación estable, una cantidad sustancial de la enzima se degrada en lugar de transportarse al lisosoma. A esta mutación a veces se la denomina "mutante conformacional". Estas mutaciones incluyen, pero no se limitan a, mutaciones de sentido erróneo, y pequeñas deleciones e inserciones dentro del marco.

Como se utiliza aquí en una realización, la expresión "α-Gal A mutante" incluye una α-Gal A que tiene una mutación en el gen que codifica α-Gal A que da como resultado la incapacidad de la enzima para lograr una conformación estable en las condiciones normalmente presentes en el RE. Al no lograr una conformación estable, una cantidad sustancial de la enzima se degrada en lugar de transportarse al lisosoma.

Tal como se define en el presente documento, el término "chaperona farmacológica" ("PC") se refiere a cualquier molécula, incluida una molécula pequeña, proteína, péptido, ácido nucleico, carbohidrato, etc. que se une específicamente a una proteína y tiene uno o más de los siguientes efectos: (i) mejora la formación de una conformación molecular estable de la proteína; (ii) induce el tráfico de la proteína desde el RE a otra ubicación celular, preferiblemente una ubicación celular nativa, es decir, previene la degradación asociada al RE de la proteína; (iii) previene la agregación de proteínas mal plegadas; y/o (iv) restaura o mejora al menos parcialmente la función y/o actividad de tipo salvaje de la proteína. Un compuesto que se une específicamente, por ejemplo, a α-Gal A, significa que se une y ejerce un efecto de chaperona en la enzima y no en un grupo genérico de enzimas relacionadas o no relacionadas. Más específicamente, este término no se refiere a chaperonas endógenas, como BiP, o a agentes inespecíficos que han demostrado actividad de chaperona inespecífica frente a varias proteínas, como glicerol, DMSO o agua deuterada, es decir, chaperonas químicas. Según la presente invención, la PC es migalastat o una sal del mismo. En una realización, la PC es base libre de migalastat (por ejemplo, 123 mg de base libre de migalastat). En otra realización más, la PC es una sal de migalastat (por ejemplo, 150 mg de migalastat HCl).

Un "inhibidor competitivo" de una enzima puede referirse a un compuesto que estructuralmente se asemeja a la estructura química y la geometría molecular del sustrato enzimático para unirse a la enzima en aproximadamente la

misma ubicación que el sustrato. De esta forma, el inhibidor compite por el mismo sitio activo que la molécula de sustrato, aumentando así la Km. La inhibición competitiva suele ser reversible si hay suficientes moléculas de sustrato disponibles para desplazar al inhibidor, es decir, los inhibidores competitivos pueden unirse de forma reversible. Por lo tanto, la cantidad de inhibición enzimática depende de la concentración del inhibidor, la concentración del sustrato, y las afinidades relativas del inhibidor y el sustrato por el sitio activo.

Como se utiliza aquí, la expresión "se une específicamente" se refiere a la interacción de una chaperona farmacológica con una proteína tal como α-Gal A; específicamente, una interacción con restos de aminoácidos de la proteína que participan directamente en el contacto con la chaperona farmacológica. Una chaperona farmacológica se une específicamente a una proteína diana, por ejemplo α-Gal A, para ejercer un efecto de chaperona sobre la proteína y no sobre un grupo genérico de proteínas relacionadas o no relacionadas. Los restos de aminoácidos de una proteína que interactúan con una chaperona farmacológica determinada pueden estar o no dentro del "sitio activo" de la proteína. La unión específica se puede evaluar a través de ensayos de unión habituales, o mediante estudios estructurales, por ejemplo cocristalización, RMN y similares. El sitio activo de α-Gal A es el sitio de unión del sustrato.

"Actividad deficiente de α-Gal A" se refiere a una actividad de α-Gal A en las células de un paciente que está por debajo del intervalo normal en comparación (utilizando los mismos métodos) con la actividad en individuos normales que no tienen o no se sospecha que tienen Fabry o cualquier otra enfermedad (especialmente una enfermedad de la sangre).

Tal como se utilizan en el presente documento, los términos "reforzar la actividad de α-Gal A" o "aumentar la actividad de α-Gal A" se refiere a aumentar la cantidad de α-Gal A que adopta una conformación estable en una célula en contacto con una chaperona farmacológica específica para la α-Gal A, en relación con la cantidad de una célula (preferiblemente del mismo tipo de célula o la misma célula, por ejemplo en un momento anterior) que no ha estado en contacto con la chaperona farmacológica específica para la α-Gal A. Este término se refiere también al aumento del tráfico de α-Gal A al lisosoma en una célula en contacto con la chaperona farmacológica específica para la α-Gal A, en relación con el tráfico de α-Gal A que no ha estado en contacto con la chaperona farmacológica específica para la proteína. Estos términos se refieren a α-Gal A tanto de tipo salvaje como mutante. En una realización, el aumento de la cantidad de α-Gal A en la célula se mide mediante medición de la hidrólisis en un sustrato artificial en lisados de células que se han tratado con la PC. Un aumento en la hidrólisis es indicativo de un aumento de la actividad de α-Gal A.

El término "actividad de α-Gal A" se refiere a la función fisiológica normal de una α-Gal A de tipo salvaje en una célula. Por ejemplo, actividad de α-Gal A incluye hidrólisis de GL-3.

Un "respondedor" es un individuo diagnosticado o sospechoso de tener un trastorno de almacenamiento lisosomal (LSD), tal como, por ejemplo, la enfermedad de Fabry, cuyas células exhiben una actividad de α-Gal A suficientemente aumentada, respectivamente, y/o una mejora de los síntomas o una mejora en los marcadores sustitutos, en respuesta al contacto con una PC. Ejemplos no limitativos de mejoras en marcadores sustitutos para Fabry son liso-GB3 y aquellos descritos en la publicación de solicitud de patente de EE. UU. n.º US 2010/0113517.

Ejemplos no limitativos de mejoras en marcadores sustitutos para la enfermedad de Fabry descritos en el documento US 2010/0113517 incluyen aumentos en los niveles o la actividad de α-Gal A en células (por ejemplo, fibroblastos) y tejido; reducciones en la acumulación de GL-3; concentraciones plasmáticas reducidas de homocisteína y molécula de adhesión celular vascular-1 (VCAM-1); acumulación reducida de GL-3 dentro de células miocárdicas y fibrocitos valvulares; reducción en liso-$Gb_3$ plasmático; reducción en la hipertrofia cardíaca (especialmente del ventrículo izquierdo), mejora de la insuficiencia valvular y arritmias; mejora de la proteinuria; concentraciones urinarias reducidas de lípidos tales como CTH, lactosilceramida, ceramida, y concentraciones urinarias aumentadas de glucosilceramida y esfingomielina; la ausencia de cuerpos de inclusión laminados (cuerpos cebra) en células epiteliales glomerulares; mejoras en la función renal; mitigación de la hipohidrosis; la ausencia de angioqueratomas; y mejoras en anomalías auditivas tales como pérdida auditiva neurosensorial de alta frecuencia, pérdida auditiva progresiva, sordera repentina, o tinnitus.

La dosis que logra una o más de las respuestas mencionadas es una "dosis terapéuticamente eficaz".

La frase "farmacéuticamente aceptable" se refiere a entidades moleculares y composiciones que son fisiológicamente tolerables y no producen normalmente reacciones adversas cuando se administran a un ser humano. En algunas realizaciones, como se utiliza aquí, la expresión "farmacéuticamente aceptable" significa aprobado por una agencia reguladora del gobierno federal o estatal, o incluido en la Farmacopea de EE. UU. u otra farmacopea generalmente reconocida para su uso en animales, y más particularmente en seres humanos. El término "portador" en referencia a un portador farmacéutico se refiere a un diluyente, adyuvante, excipiente o vehículo con el que se administra el compuesto. Dichos portadores farmacéuticos pueden ser líquidos estériles, tal como agua y aceites. Como portadores se emplean preferentemente disoluciones salinas acuosas o acuosas y disoluciones acuosas de dextrosa y glicerol, en particular para disoluciones inyectables. Los portadores farmacéuticos adecuados se describen en "Remington's Pharmaceutical Sciences" de EW Martin, 18.ª edición, u otras ediciones.

Como se utiliza aquí, el término "aislado" significa que el material referenciado se elimina del entorno en el que normalmente se encuentra. De esta forma, un material biológico aislado puede estar libre de componentes celulares, es decir, componentes de las células en las que se encuentra o se produce el material. En el caso de las moléculas de ácido nucleico, un ácido nucleico aislado incluye un producto de PCR, una banda de ARNm en un gel, un ADNc, o un fragmento de restricción. En otra realización, un ácido nucleico aislado se escinde preferiblemente del cromosoma en el que se puede encontrar y más preferiblemente ya no se une a regiones no reguladoras, no codificantes, o a otros genes situados aguas arriba o aguas abajo del gen contenido por la molécula de ácido nucleico aislada cuando se encuentra en el cromosoma. En otra realización, el ácido nucleico aislado carece de uno o más intrones. Los ácidos nucleicos aislados incluyen secuencias insertadas en plásmidos, cósmidos, cromosomas artificiales y similares. Por lo tanto, en una realización específica, un ácido nucleico recombinante es un ácido nucleico aislado. Una proteína aislada se puede asociar a otras proteínas u otros ácidos nucleicos o a ambos, con los que se asocia en la célula, o con membranas celulares si se trata de una proteína asociada a la membrana. Un orgánulo, célula o tejido se extrae del sitio anatómico en el que se encuentra en un organismo. Un material aislado puede, pero no necesita ser purificado.

La expresión "terapia de reemplazo enzimático" o "ERT" se refiere a la introducción de una enzima purificada no nativa en un individuo que tiene una deficiencia de dicha enzima. La proteína administrada puede obtenerse de fuentes naturales o mediante expresión recombinante (como se describe con mayor detalle a continuación). La expresión también se refiere a la introducción de una enzima purificada en un individuo que de otro modo requeriría o se beneficiaría de la administración de una enzima purificada, por ejemplo que sufre de insuficiencia enzimática. La enzima introducida puede ser una enzima recombinante purificada producida *in vitro*, o una proteína purificada a partir de tejido o fluido aislado, tal como, por ejemplo, placenta o leche animal, o de plantas.

La expresión "paciente sin tratamiento previo con ERT" se refiere a un paciente con Fabry que nunca ha recibido ERT o que no ha recibido ERT durante al menos 6 meses antes de iniciar la terapia con migalastat.

El término "paciente con tratamiento previo con TRE" se refiere a un paciente de Fabry que estaba recibiendo TRE inmediatamente antes de iniciar la terapia con migalastat. En algunas realizaciones, el paciente con experiencia en ERT ha recibido al menos 12 meses de ERT inmediatamente antes de iniciar la terapia con migalastat.

Como se utiliza aquí, la expresión "equivalente de base libre" o "FBE" se refiere a la cantidad de migalastat presente en el migalastat o sal del mismo. En otras palabras, el término "FBE" significa una cantidad de base libre de migalastat o la cantidad equivalente de base libre de migalastat que proporciona una sal de migalastat. Por ejemplo, debido al peso de la sal de hidrocloruro, 150 mg de hidrocloruro de migalastat sólo proporcionan tanto migalastat como 123 mg de la forma de base libre de migalastat. Se espera que otras sales tengan factores de conversión diferentes, dependiendo del peso molecular de la sal.

El término "migalastat" abarca la base libre de migalastat o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo (por ejemplo, migalastat HCl), a menos que se indique específicamente lo contrario.

Los términos "mutación" y "variante" (por ejemplo, como en "mutación susceptible o variante") se refieren a un cambio en la secuencia nucleotídica de un gen o un cromosoma. Los dos términos a los que se hace referencia aquí normalmente se utilizan juntos (por ejemplo, como en "mutación o variante"), haciendo referencia al cambio en la secuencia nucleotídica señalado en la oración anterior. Si por alguna razón sólo se cita uno de los dos términos, se pretendía incluir el término faltante, y así debe entenderse. Además, las expresiones "mutación susceptible" y "variante susceptible" se refieren a una mutación o variante que es susceptible a la terapia con PC, por ejemplo una mutación que es susceptible a la terapia con migalastat. Un tipo particular de mutación o variante susceptible es una "mutación o variante susceptible de ensayo HEK", que es una mutación o variante que se determina como susceptible de tratamiento con migalastat según los criterios del ensayo HEK *in vitro* descrito aquí y en la patente de EE. UU. n.º 8.592.362.

Los términos "alrededor de" y "aproximadamente" generalmente significarán un grado aceptable de error para la cantidad medida dada la naturaleza o precisión de las mediciones. Los grados de error ejemplares típicos están dentro del 20 por ciento (%), preferiblemente dentro del 10%, y más preferiblemente dentro del 5% de un valor dado o intervalo de valores. Alternativamente, y particularmente en sistemas biológicos, los términos "alrededor de" y "aproximadamente" pueden significar valores que están dentro de un orden de magnitud, preferiblemente dentro de 10 o 5 veces, y más preferiblemente dentro de 2 veces de un valor dado. Las cantidades numéricas proporcionadas aquí son aproximadas a menos que se indique lo contrario, lo que significa que el término "alrededor de" o "aproximadamente" se puede inferir cuando no se señala expresamente.

**Enfermedad de Fabry**

La enfermedad de Fabry es un LSD raro, progresivo y destructivo, ligado al cromosoma X. Las mutaciones en el gen GLA dan como resultado una deficiencia de la enzima lisosómica α-Gal A, que es necesaria para el metabolismo de los glucoesfingolípidos. Comenzando temprano en la vida, la reducción en la actividad de α-Gal A da como resultado una acumulación de glicoesfingolípidos, incluyendo GL-3 y liso-Gb3 plasmática, y conduce a los síntomas y secuelas que limitan la vida de la enfermedad de Fabry, incluyendo molestia, síntomas gastrointestinales, insuficiencia renal,

cardiomiopatía, eventos cerebrovasculares y mortalidad temprana. El inicio temprano de terapia y el tratamiento de por vida ofrecen una oportunidad de retrasar la progresión y prolongar la esperanza de vida.

La enfermedad de Fabry abarca un espectro de gravedad de la enfermedad y la edad de inicio, aunque tradicionalmente se ha dividido en 2 fenotipos principales, "clásico" y "de inicio tardío". El fenotipo clásico se ha atribuido principalmente a hombres con actividad de α-Gal A indetectable a baja y un inicio más temprano de manifestaciones renales, cardíacas y/o cerebrovasculares. El fenotipo de inicio tardío se ha atribuido principalmente a hombres con actividad de α-Gal A residual más elevada y un inicio más tardío de estas manifestaciones de la enfermedad. Las mujeres heterocigóticas portadoras expresan normalmente el fenotipo de inicio tardío, pero también pueden mostrar el fenotipo clásico en función del patrón de inactivación del cromosoma X.

Se han identificado más de 1.000 mutaciones de GLA causantes de la enfermedad de Fabry. Aproximadamente el 60 % son mutaciones de aminoácido, que dan lugar a sustituciones de un único aminoácido en la enzima α-Gal A. Las mutaciones de aminoácido de GLA a menudo dan lugar a la producción de formas anormalmente plegadas e inestables de α-Gal A y la mayoría están asociadas con el fenotipo clásico. Los mecanismos normales de control de calidad celular en el RE bloquean el tránsito de estas proteínas anormales a los lisosomas y las dirigen hacia una degradación y eliminación prematuras. Muchas formas mutantes de sentido erróneo son dianas del migalastat, una chaperona farmacológica específica de α-Gal A.

las manifestaciones clínicas de la enfermedad de Fabry abarcan un amplio espectro de gravedad y se correlacionan aproximadamente con los niveles residuales de α-Gal A de un paciente. La mayoría de los pacientes tratados actualmente se denominan pacientes de Fabry clásicos, y la mayoría son varones. Estos pacientes padecen la enfermedad en varios órganos, incluidos los riñones, el corazón y el cerebro, apareciendo los síntomas de la enfermedad por primera vez en la adolescencia y normalmente progresan en gravedad hasta la muerte en la cuarta o quinta década de vida. Varios estudios recientes indican que hay un gran número de varones y mujeres sin diagnosticar que presentan una serie de síntomas de la enfermedad de Fabry, tales como deterioro de la función cardíaca o renal y accidentes cerebrovasculares, que suelen aparecer por primera vez en la edad adulta. Los individuos con este tipo de enfermedad de Fabry, denominada enfermedad de Fabry de comienzo tardío, tienden a tener mayores niveles de α-Gal A residual que los pacientes de Fabry clásicos. Las personas con enfermedad de Fabry de comienzo tardío generalmente experimentan los primeros síntomas de la enfermedad en la edad adulta, y a menudo tienen síntomas de la enfermedad concentrados en un solo órgano, tal como agrandamiento del ventrículo izquierdo o insuficiencia renal progresiva. Además, la enfermedad de Fabry de comienzo tardío también puede presentarse en forma de accidentes cerebrovasculares de causa desconocida.

Los pacientes con Fabry tienen deterioro renal progresivo, y los pacientes no tratados presentan deterioro renal terminal hacia la quinta década de vida. La deficiencia en la actividad de α-Gal A conduce a la acumulación de GL-3 y glicoesfingolípidos relacionados en muchos tipos de células, incluidas las células en el riñón. GL-3 se acumula en los podocitos, las células epiteliales y las células tubulares del túbulo distal y el asa de Henle. El deterioro de la función renal puede manifestarse como proteinuria y reducción de la tasa de filtración glomerular.

Debido a que la enfermedad de Fabry es poco común, afecta múltiples órganos, tiene un amplio intervalo de edad de comienzo, y es heterogénea, el diagnóstico adecuado es un desafío. La concienciación es baja entre los profesionales de la salud, y son frecuentes los diagnósticos erróneos. El diagnóstico de la enfermedad de Fabry se confirma con mayor frecuencia sobre la base de una disminución de la actividad de α-Gal A en el plasma o en los leucocitos periféricos (GB) una vez que el paciente presenta síntomas, junto con un análisis mutacional. En las mujeres, el diagnóstico es aún más complicado, ya que la identificación enzimática de las mujeres portadoras es menos fiable debido a la inactivación aleatoria del cromosoma X en algunas células de las portadoras. Por ejemplo, algunos portadores obligados (hijas de varones clásicamente afectados) tienen actividades de la enzima α-Gal A que oscilan de normales a muy bajas. Dado que los portadores pueden tener una actividad normal de la enzima α-Gal A en los leucocitos, sólo la identificación de una mutación α-Gal A mediante pruebas genéticas proporciona una identificación y/o diagnóstico preciso del portador.

En una o más realizaciones, las formas mutantes de α-Gal A se consideran susceptibles a migalastat, y se definen como aquellas que muestran un aumento relativo (+10 μM de migalastat) de ≥1,20 veces y un aumento absoluto (+10 μM de migalastat) de ≥3,0% del tipo salvaje (WT) cuando la forma mutante de α-Gal A se expresa en células HEK-293 (referido como "ensayo HEK") según el ensayo *in vitro* validado por las Buenas Prácticas de Laboratorio (GLP) (ensayo de susceptibilidad a migalastat o GLP HEK). Dichas mutaciones también se denominan aquí como mutaciones "aptas para el ensayo HEK".

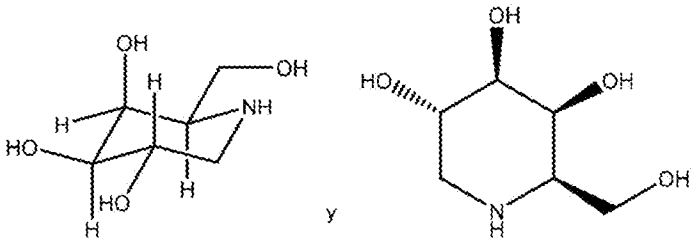
Se han proporcionado métodos de detección previos que evalúan la mejora enzimática antes del inicio del tratamiento. Por ejemplo, se ha utilizado un ensayo que utiliza células HEK-293 en ensayos clínicos para predecir si una mutación determinada responderá al tratamiento con una chaperona farmacológica (por ejemplo, migalastat). En este ensayo, se crean construcciones de ADNc. Las formas mutantes de α-Gal A correspondientes se expresan transitoriamente en células HEK-293. Después, las células se incuban ± migalastat (17 nM a 1 mM) durante 4 a 5 días. Posteriormente, los niveles de α-Gal A se miden en lisados celulares utilizando un sustrato fluorogénico sintético (4-MU-α-Gal) o mediante transferencia Western. Esto se ha hecho para mutaciones de sentido erróneo o pequeñas

inserciones/deleciones en el marco que causan enfermedades conocidas. Las mutaciones que previamente se han identificado como sensibles a una PC (por ejemplo, migalastat) utilizando estos métodos se enumeran en la patente de EE. UU. n.º 8.592.362.

**Chaperonas farmacológicas**

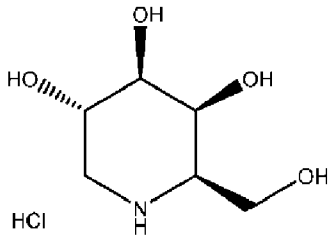
La unión de inhibidores de moléculas pequeñas de enzimas asociadas con LSD puede aumentar la estabilidad tanto de la enzima mutante como de la enzima de tipo salvaje correspondiente (véase la patente de EE. UU. n.º 6.274.597; 6.583.158; 6.589.964; 6.599.919; 6.916.829 y 7.141.582). En particular, la administración de derivados de molécula pequeña de glucosa y galactosa, que son inhibidores competitivos específicos y selectivos de varias enzimas lisosómicas diana, aumentó eficazmente la estabilidad de las enzimas en células *in vitro* y, por tanto, aumentó el tráfico de las enzimas al lisosoma. Por lo tanto, al aumentar la cantidad de enzima en el lisosoma, se espera que aumente la hidrólisis de los sustratos enzimáticos. La teoría original detrás de esta estrategia era la siguiente: dado que la proteína enzimática mutante es inestable en el RE (Ishii et al., Biochem. Biophys. Res. Comm. 1996; 220: 812-815), la proteína enzimática se retrasa en la vía de transporte normal (RE→aparato de Golgi→endosomas→lisosomas) y se degrada prematuramente. Por lo tanto, un compuesto que se une a una enzima mutante y aumenta su estabilidad, puede servir de "chaperona" para la enzima y aumentar la cantidad que puede salir del RE y pasar a los lisosomas. Además, dado que el plegamiento y el tráfico de algunas proteínas naturales es incompleto, con hasta el 70 % de algunas proteínas naturales que se degradan en algunos casos antes de alcanzar su ubicación celular final, las chaperonas pueden usarse para estabilizar las enzimas naturales y aumentar la cantidad de enzima que puede salir del RE y ser transportada a los lisosomas.

La chaperona farmacológica según la presente invención comprende migalastat o una sal del mismo. El compuesto migalastat, también conocido como 1-desoxigalactonojirimicina (1-DGJ) o (2R,3S,4R,5S)-2-(hidroximetil)piperidin-3,4,5-triol, es un compuesto que tiene la siguiente fórmula química:




Migalastat base libre

Como se trata en el presente documento, también se pueden usar sales farmacéuticamente aceptables de migalastat en la presente invención. Cuando se usa una sal de migalastat, la dosis de la sal se ajustará de modo que la dosis de migalastat recibida por el paciente sea equivalente a la cantidad que se habría recibido si se hubiera usado la base libre de migalastat. Un ejemplo de sal farmacéuticamente aceptable de migalastat es HCl de migalastat:




Migalastat HCl

Migalastat es un iminoazúcar de bajo peso molecular y es un análogo de la galactosa terminal de GL-3. Los estudios farmacológicos *in vitro* e *in vivo* han demostrado que migalastat actúa de chaperona farmacológica, uniéndose de forma selectiva y reversible, con gran afinidad, al sitio activo de la α-Gal A natural y a formas mutantes específicas de α-Gal A, cuyos genotipos se denominan mutaciones susceptibles de ensayo HEK. La unión de migalastat estabiliza estas formas mutantes de α-Gal A en el retículo endoplásmico, facilitando su tráfico adecuado a los lisosomas, donde la disociación de migalastat permite a α-Gal A reducir el nivel de GL-3 y otros sustratos. Aproximadamente el 30-50 % de los pacientes con enfermedad de Fabry tienen mutaciones susceptibles de ensayo HEK; la mayoría de las cuales están asociadas con el fenotipo clásico de la enfermedad.

Las mutaciones susceptibles de ensayo HEK incluyen al menos aquellas mutaciones enumeradas en una tabla de referencia farmacológica (por ejemplo, las que se mencionan en las etiquetas de productos estadounidenses o internacionales para un producto de migalastat tal como GALAFOLD®). Como se utiliza aquí, "tabla de referencia

farmacológica" se refiere a cualquier registro escrito o electrónico de acceso público, incluido en la etiqueta del producto dentro del envase de un producto de migalastat (por ejemplo, GALAFOLD®) o en un sitio web accesible para los proveedores de atención médica, que transmite si una mutación o variante particular responde a la terapia con la PC migalastat (por ejemplo, GALAFOLD®), y no se limita necesariamente a registros escritos presentados en forma de tabla. En una realización de la presente invención, una "tabla de referencia farmacológica" se refiere a cualquier depósito de información que incluye una o más mutaciones o variantes susceptibles. Se puede encontrar una tabla de referencia farmacológica ejemplar para mutaciones susceptibles de ensayo HEK en el resumen de las características del producto y/o en la información de prescripción de GALAFOLD® en diversos países en los que GALAFOLD® está aprobado para su uso, o en un sitio web tal como www.galafoldamenabilitytable.com o www.fabrygenevariantsearch.com.

En la Tabla 1 a continuación se proporciona una tabla de referencia farmacológica ejemplar para mutaciones susceptibles de ensayo HEK. En una o más realizaciones, si hay una mutación doble presente en el mismo cromosoma (hombres y mujeres), se considera que ese paciente es apto para el ensayo HEK si la mutación doble está presente en una entrada de la Tabla 1 (por ejemplo, D55V/Q57L). En algunas realizaciones, si una doble mutación está presente en diferentes cromosomas (solo en mujeres), se considera que el paciente es susceptible de prueba HEK si cualquiera de las mutaciones individuales está presente en la Tabla 1.

**Tabla 1**

| **Cambio nucleotídico** | **Cambio nucleotídico** | **Cambio de secuencia de proteínas** |
|---|---|---|
| c.7C>G | c.C7G | L3V |
| c.8T>C | c.T8C | L3P |
| c.[11G>T; 620A>C] | c.G11T/A620C | R4M/Y207S |
| c.37G>A | c.G37A | A13T |
| c.37G>C | c.G37C | A13P |
| c.43G>A | c.G43A | A15T |
| c.44C>G | c.C44G | A15G |
| c.53T>G | c.T53G | F18C |
| c.58G>C | c.G58C | A20P |
| c.59C>A | c.C59A | A20D |
| c.70T>C o c.70T>A | c.T70C o c.T70A | W24R |
| c.70T>G | c.T70G | W24G |
| c.72G>C o c.72G>T | c.G72C o c.G72T | W24C |
| c.95T>C | c.T95C | L32P |
| c.97G>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 |
| c.104G>A | c.G 104A | G35E |
| c.104G>C | c.G104C | G35A |
| c.104G>T | c.G104T | G35V |
| c.107T>C | c.T107C | L36S |
| c.107T>G | c.T107G | L36W |

| Cambio nucleotídico | Cambio nucleotídico | Cambio de secuencia de proteínas |
|---|---|---|
| c.108G>C o c.108G>T | c.G108C o c.G108T | L36F |
| c.109G>A | c.G109A | A37T |
| c.110C>T | c.C110T | A37V |
| c.122C>T | c.C122T | T41I |
| c.124A>C o c.124A>T | c.A124C o c.A124T | M42L |
| c.124A>G | c.A124G | M42V |
| c.125T>A | c.T125A | M42K |
| c.125T>C | c.T125C | M42T |
| c.125T>G | c.T125G | M42R |
| c.126G>A o c.126G>C o c.126G>T | c.G126A o c.G126C o c.G126T | M42I |
| c.137A>C | c.A137C | H46P |
| c.142G>C | c.G142C | E48Q |
| c.152T>A | c.T152A | M51K |
| c.153G>A o c.153G>T o c.153G>C | c.G153A o c.G153T o c.G153C | M51I |
| c.157A>G | c.A157G | N53D |
| c.[157A>C; 158A>T] | c.A157C/A158T | N53L |
| c.160C>T | c.C160T | L54F |
| c.161T>C | c.T161C | L54P |
| c.164A>G | c.A164G | D55G |
| c.164A>T | c.A164T | D55V |
| c.[164A>T; 170A>T] | c.A164T/A170T | D55V/Q57L |
| c.167G>T | c.G167T | C56F |
| c.167G>A | c.G167A | C56Y |
| c.170A>T | c.A170T | Q57L |
| c.175G>A | c.G175A | E59K |
| c.178C>A | c.C178A | P60T |
| c.178C>T | c.C178T | P60S |
| c.179C>T | c.C179T | P60L |
| c.196G>A | c.G196A | E66K |
| c.197A>G | c.A197G | E66G |
| c.207C>A o c.207C>G | c.C207A o c.C207G | F69L |
| c.214A>G | c.A214G | M72V |
| c.216G>A o c.216G>T o c.216G>C | c.G216A o c.G216T o c.G216C | M72I |
| c.218C>T | c.C218T | A73V |
| c.227T>C | c.T227C | M76T |
| c.239G>A | c.G239A | G80D |
| c.247G>A | c.G247A | D83N |
| c.253G>A | c.G253A | G85 S |
| c.254G>A | c.G254A | G85D |
| c.[253G>A; 254G>A] | c.G253A/G254A | G85N |

| Cambio nucleotídico | Cambio nucleotídico | Cambio de secuencia de proteínas |
|---|---|---|
| c.[253G>A; 254G>T; 255T>G] | c.G253A/G254T/T255G | G85M |
| c.261G>C o c.261G>T | c.G261C o c.G261T | E87D |
| c.263A>C | c.A263C | Y88S |
| c.265C>T | c.C265T | L89F |
| c.272T>C | c.T272C | I91T |
| c.288G>A o c.288G>T o c.288G>C | c.G288A o c.G288T o c.G288C | M96I |
| c.289G>C | c.G289C | A97P |
| c.290C>T | c.C290T | A97V |
| c.305C>T | c.C305T | S 102L |
| c.311G>T | c.G311T | G104V |
| c.316C>T | c.C316T | L106F |
| c.322G>A | c.G322A | A108T |
| c.326A>G | c.A326G | D109G |
| c.334C>G | c.C334G | R112G |
| c.335G>A | c.G335A | R112H |
| c.337T>A | c.T337A | F113I |
| c.337T>C o c.339T>A o c.339T>G | c.T337C o c.T339A o c.T339G | F113L |
| c.352C>T | c.C352T | R118C |
| c.361G>A | c.G361A | A121T |
| c.368A>G | c.A368G | Y123C |
| c.373C>T | c.C373T | H125Y |
| c.374A>T | c.A374T | H125L |
| c.376A>G | c.A376G | S126G |
| c.383G>A | c.G383A | G128E |
| c.399T>G | c.T399G | I133M |
| c.404C>T | c.C404T | A135V |
| c.408T>A o c.408T>G | c.T408A o c.T408G | D136E |
| c.416A>G | c.A416G | N139S |
| c.419A>C | c.A419C | K140T |
| c.427G>A | c.G427A | A143T |
| c.431G>A | c.G431A | G144D |
| c.431G>T | c.G431T | G144V |
| c.434T>C | c.T434C | F145S |
| c.436C>T | c.C436T | P146S |
| c.437C>G | c.C437G | P146R |
| c.454T>C | c.T454C | Y152H |
| c.455A>G | c.A455G | Y152C |
| c.466G>A | c.G466A | A156T |
| c.467C>T | c.C467T | A156V |
| c.471G>C o c.471G>T | c.G471C o c.G471T | Q157H |

| Cambio nucleotídico | Cambio nucleotídico | Cambio de secuencia de proteínas |
|---|---|---|
| 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 |
| c.525C>G o c.525C>A | c.C525G o c.C525A | D175E |
| c.539T>G | c.T539G | L180W |
| c.540G>C | c.G540C | L180F |
| c.548G>C | c.G548C | G183A |
| c.548G>A | c.G548A | G183D |
| c.550T>A | c.T550A | Y184N |
| c.551A>G | c.A551G | Y 184C |
| c.553A>G | c.A553G | K185E |
| c.559A>G | c.A559G | M187V |
| c.559_564dup | c.559_564dup | p.M187_S188dup |
| c.560T>C | c.T560C | M187T |
| c.561G>T o c.561G>A o c.561G>C | c.G561T o c.G561A o c.G561C | M187I |
| c.572T>A | c.T572A | L191Q |
| c.580A>G | c.A580G | T194A |
| c.581C>T | c.C581T | T194I |
| c.584G>T | c.G584T | G195V |
| c.586A>G | c.A586G | R196G |
| c.593T>C | c.T593C | I198T |
| c.595G>A | c.G595A | V199M |
| c.596T>C | c.T596C | V199A |
| c.596T>G | c.T596G | V199G |
| c.599A>G | c.A599G | Y200C |
| c.602C>T | c.C602T | S201F |
| c.602C>A | c.C602A | S201Y |
| c.608A>T | c.A608T | E203 V |
| c.609G>C o c.609G>T | c.G609C o c.G609T | E203D |
| c.610T>G | c.T610G | W204G |
| c.613C>A | c.C613A | P205T |
| c.613C>T | c.C613T | P205S |

| Cambio nucleotídico | Cambio nucleotídico | Cambio de secuencia de proteínas |
|---|---|---|
| c.614C>T | c.C614T | P205L |
| c.619T>C | c.T619C | Y207H |
| c.620A>C | c.A620C | Y207S |
| c.623T>G | c.T623G | M208R |
| c.628C>T | c.C628T | P210S |
| c.629C>T | c.C629T | P210L |
| c.638A>G | c.A638G | K213R |
| c.638A>T | c.A638T | K213M |
| c.640C>T | c.C640T | P214S |
| c.641C>T | c.C641T | P214L |
| c.643A>G | c.A643G | N215D |
| c.644A>G | c.A644G | N215S |
| c.644A>T | c.A644T | N215I |
| c [644A>G; 937G>T] | c.A644G/G937T | N215S/D313Y |
| c.646T>G | c.T646G | Y216D |
| c.647A>C | c.A647C | Y216S |
| c.647A>G | c.A647G | Y216C |
| c.655A>C | c.A655C | I219L |
| c.656T>A | c.T656A | I219N |
| c.656T>C | c.T656C | I219T |
| c.659G>A | c.G659A | R220Q |
| c.659G>C | c.G659C | R220P |
| c.662A>C | c.A662C | Q221P |
| c.671A>C | c.A671C | N224T |
| c.671A>G | c.A671G | N224S |
| c.673C>G | c.C673G | H225D |
| c.683A>G | c.A683G | N228S |
| c.687T>A o c.687T>G | c.T687A o c.T687G | F229L |
| c.695 T>C | c.T695C | I232T |
| c.713G>A | c.G713A | S238N |
| c.716T>C | c.T716C | I239T |
| c.720G>C o c.720G>T | c.G720C o c.G720T | K240N |
| c.724A>G | c.A724G | I242V |
| c.724A>T | c.A724T | I242F |
| c.725T>A | c.T725A | I242N |
| c.725T>C | c.T725C | I242T |
| c.728T>G | c.T728G | L243 W |
| c.729G>C o c.729G>T | c.G729C o c.G729T | L243F |
| c.730G>A | c.G730A | D244N |
| c.730G>C | c.G730C | D244H |

| Cambio nucleotídico | Cambio nucleotídico | Cambio de secuencia de proteínas |
|---|---|---|
| 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 |
| 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 |
| 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 |

| Cambio nucleotídico | Cambio nucleotídico | Cambio de secuencia de proteínas |
|---|---|---|
| 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 |
| c.870G>A o c.870G>C o c.870G>T | c.G870A o c.G870C o c.G870T | M290I |
| c.871G>A | c.G871A | A291T |
| c.877C>A | c.C877A | P293T |
| c.881T>C | c.T881C | L294S |
| c.884T>G | c.T884G | F295C |
| c.886A>G | c.A886G | M296V |
| c.886A>T o c.886A>C | c.A886T o c.A886C | M296L |
| c.887T>C | c.T887C | M296T |
| c.888G>A o c.888G>T o c.888G>C | c.G888A o c.G888T o c.G888C | M296I |
| c.893A>G | c.A893G | N298S |
| c.897C>G o c.897C>A | c.C897G o c.C897A | D299E |
| c.898C>T | c.C898T | L300F |
| c.899T>C | c.T899C | L300P |
| c.901C>G | c.C901G | R301G |
| c.902G>C | c.G902C | R301P |
| c.902G>A | c.G902A | R301Q |
| c.902G>T | c.G902T | R301L |
| c.907A>T | c.A907T | I303F |
| c.908T>A | c.T908A | I303N |
| c.911G>A | c.G911A | S304N |
| c.911G>C | c.G911C | S304T |
| c.919G>A | c.G919A | A307T |
| c.922A>G | c.A922G | K308E |
| c.924A>T o c.924A>C | c.A924T o c.A924C | K308N |
| c.925G>C | c.G925C | A309P |
| c.926C>T | c.C926T | A309V |
| c.928C>T | c.C928T | L310F |
| c.931C>G | c.C931G | L311V |
| c.935A>G | c.A935G | Q312R |
| c.936G>T o c.936G>C | c.G936T o c.G936C | Q312H |
| c.937G>T | c.G937T | D313Y |

| Cambio nucleotídico | Cambio nucleotídico | Cambio de secuencia de proteínas |
|---|---|---|
| c.[937G>T; 1232G>A] | c.G937T/G1232A | D313Y/G411D |
| c.938A>G | c.A938G | D313G |
| c.946G>A | c.G946A | V316I |
| c.947T>G | c.T947G | V316G |
| c.950T>C | c.T950C | I317T |
| c.955A>T | c.A955T | I319F |
| c.956T>C | c.T956C | I319T |
| c.959A>T | c.A959T | N320I |
| c.962A>G | c.A962G | Q321R |
| c.962A>T | c.A962T | Q321L |
| c.963G>C o c.963G>T | c.G963C o c.G963T | Q321H |
| c.964G>A | c.G964A | D322N |
| c.964G>C | c.G964C | D322H |
| c.966C>A o c.966C>G | c.C966A o c.C966G | D322E |
| c.968C>G | c.C968G | P323R |
| c.973G>A | c.G973A | G325S |
| c.973G>C | c.G973C | G325R |
| c.978G>C o c.978G>T | c.G978C o c.G978T | K326N |
| c.979C>G | c.C979G | Q327E |
| c.980A>T | c.A980T | Q327L |
| c.983G>C | c.G983C | G328A |
| c.989A>G | c.A989G | Q330R |
| c.1001G>A | c.G1001A | G334E |
| c.1010T>C | c.T1010C | F337S |
| c.1012G>A | c.G1012A | E338K |
| c.1016T>A | c.T1016A | V339E |
| c.1027C>A | c.C1027A | P343T |
| c.1028C>T | c.C1028T | P343L |
| c.1033T>C | c.T1033C | S345P |
| c.1046G>C | c.G1046C | W349S |
| c.1055C>G | c.C1055G | A352G |
| c.1055C>T | c.C1055T | A352V |
| c.1061T>A | c.T1061A | I354K |
| c.1066C>G | c.C1066G | R356G |
| c.1066C>T | c.C1066T | R356W |
| c.1067G>A | c.G1067A | R356Q |
| c.1067G>C | c.G1067C | R356P |
| c.1072G>C | c.G1072C | E358Q |
| c.1073A>C | c.A1073C | E358A |
| c.1073A>G | c.A1073G | E358G |

| Cambio nucleotídico | Cambio nucleotídico | Cambio de secuencia de proteínas |
|---|---|---|
| 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.C108ST | P362L |
| c.1087C>T | c.C1087T | R363C |
| c.1088G>A | c.G1088A | R363H |
| c.1102G>A | c.G1102A | A368T |
| c.1117G>A | c.G1117A | G373S |
| c.1124G>A | c.G1124A | G375E |
| c.1153A>G | c.A1153G | T385A |
| c.1168G>A | c.G1168A | V390M |
| c.1172A>C | c.A1172C | K391T |
| c.1175G>C | c.G1175C | R392T |
| c.1184G>A | c.G1184A | G395E |
| c.1184G>C | c.G1184C | G395A |
| c.1192G>A | c.G1192A | E398K |
| c.1202_1203insGACTTC | c.1202_1203insGACTTC | p.T400_S401dup |
| c.1208T>C | c.T1208C | L403S |
| c.1225C>G | c.C1225G | P409A |
| c.1225C>T | c.C1225T | P409S |
| c.1225C>A | c.C1225A | P409T |
| c.1228A>G | c.A1228G | T410A |
| c.1229C>T | c.C1229T | T410I |
| c.1232G>A | c.G1232A | G411D |
| c.1235C>A | c.C1235A | T412N |
| c.1253A>G | c.A1253G | E418G |
| c.1261A>G | c.A1261G | M421V |

**Dosificación, formulación y administración**

Según la presente invención, al paciente con Fabry se le administra migalastat o una sal del mismo con una frecuencia de una vez cada dos días (también denominada "QOD"). En diversas realizaciones, las dosis descritas en el presente documento pertenecen al hidrocloruro de migalastat o a una dosis equivalente de migalastat o de una sal del mismo diferente a la sal de hidrocloruro. En algunas realizaciones, estas dosis pertenecen a la base libre de migalastat. En realizaciones alternativas, estas dosis pertenecen a una sal de migalastat. En otras realizaciones, la sal de migalastat es hidrocloruro de migalastat. La administración de migalastat o de una sal de migalastat se denomina "terapia con migalastat" en el presente documento.

Según la presente invención, la cantidad efectiva de migalastat o sal del mismo está en el intervalo de alrededor de 100 mg de FBE a alrededor de 150 mg de FBE. Las dosis a modo de ejemplo incluyen aproximadamente 100 mg de

FBE, aproximadamente 105 mg de FBE, aproximadamente 110 mg de FBE, aproximadamente 115 mg de FBE, aproximadamente 120 mg de FBE, aproximadamente 123 mg de FBE, aproximadamente 125 mg de FBE, aproximadamente 130 mg de FBE, aproximadamente 135 mg de FBE, aproximadamente 140 mg de FBE, aproximadamente 145 mg de FBE o aproximadamente 150 mg de FBE.

Una vez más, se observa que 150 mg de clorhidrato de migalastat son equivalentes a 123 mg de la forma de base libre de migalastat. Por lo tanto, en una o más realizaciones, la dosis es 150 mg de hidrocloruro de migalastat o una dosis equivalente de migalastat o de una sal del mismo diferente a la sal de hidrocloruro, administrada a una frecuencia de una vez cada dos días. Como se ha establecido anteriormente, esta dosis se denomina 123 mg de FBE de migalastat. En otras realizaciones, la dosis es 150 mg de hidrocloruro de migalastat administrado a una frecuencia de una vez cada dos días. En otras realizaciones, la dosis es 123 mg de la base libre de migalastat administrado a una frecuencia de una vez cada dos días.

En diversas realizaciones, la cantidad efectiva es alrededor de 122 mg, alrededor de 128 mg, alrededor de 134 mg, alrededor de 140 mg, alrededor de 146 mg, alrededor de 150 mg, alrededor de 152 mg, alrededor de 159 mg, alrededor de 165 mg, alrededor de 171 mg, alrededor de 177 mg o alrededor de 183 mg de hidrocloruro de migalastat.

En consecuencia, en diversas realizaciones, la terapia con migalastat incluye la administración de 123 mg de FBE a una frecuencia de una vez cada dos días, como 150 mg de hidrocloruro de migalastat cada dos días.

La administración de migalastat o de una sal del mismo puede ser durante un cierto periodo de tiempo. En una o más realizaciones, el migalastat o sal del mismo se administra durante una duración de al menos 24, 30 o 36 meses o al menos 2, 3, 4 o 5 años. En diversas realizaciones, la terapia con migalastat es una terapia con migalastat a largo plazo de al menos alrededor de 2, 3, 4 o 5 años.

La administración de migalastat o una sal del mismo según la presente invención puede ser en una formulación adecuada para cualquier vía de administración, pero preferiblemente se administra en una forma de dosificación oral como un comprimido, cápsula o solución. Como ejemplo, al paciente se administran por vía oral cápsulas que contienen cada una 150 mg de hidrocloruro de migalastat o a una dosis equivalente de migalastat o de una sal del mismo diferente a la sal de hidrocloruro.

En algunas realizaciones, la PC (migalastat o una sal del mismo) se administra por vía oral. En una o más realizaciones, la PC (migalastat o una sal del mismo) se administra por inyección. La PC puede ir acompañada de un portador farmacéuticamente aceptable, lo que puede depender del método de administración.

En una o más realizaciones, la PC (migalastat o sal del mismo) se administra como monoterapia, y puede estar en una forma adecuada para cualquier vía de administración, incluyendo, por ejemplo, por vía oral en forma de comprimidos o cápsulas o líquido, o en disolución acuosa estéril para inyección. En otras realizaciones, la PC se proporciona en un polvo liofilizado seco para añadirse a la formulación de la enzima de reemplazo durante o inmediatamente después de la reconstitución para evitar la agregación de la enzima *in vitro* antes de la administración.

Cuando la PC (migalastat o sal del mismo) se formula para administración oral, los comprimidos o cápsulas se pueden preparar por medios convencionales con excipientes farmacéuticamente aceptables tales como agentes aglutinantes (por ejemplo, almidón de maíz pregelatinizado, polivinilpirrolidona o hidroxipropilmetilcelulosa); cargas (por ejemplo, lactosa, celulosa microcristalina o hidrogenofosfato de calcio); lubricantes (por ejemplo, estearato de magnesio, talco o sílice); disgregantes (por ejemplo, almidón de patata o glicolato de almidón sódico); o agentes humectantes (por ejemplo, lauril sulfato de sodio). Los comprimidos pueden recubrirse mediante métodos bien conocidos en la técnica. Las preparaciones líquidas para administración oral pueden tomar la forma, por ejemplo, de disoluciones, jarabes o suspensiones, o pueden presentarse como un producto seco para su constitución con agua u otro vehículo adecuado antes de su uso. Dichos preparados líquidos pueden prepararse por medios convencionales con aditivos farmacéuticamente aceptables, tales como agentes de suspensión (por ejemplo, jarabe de sorbitol, derivados de la celulosa o grasas comestibles hidrogenadas); emulsionantes (por ejemplo, lecitina o goma arábiga); vehículos no acuosos (por ejemplo, aceite de almendras, ésteres oleosos, alcohol etílico o aceites vegetales fraccionados); y conservantes (por ejemplo, metil o propil-p-hidroxibenzoatos o ácido sórbico). Los preparados también pueden contener sales tampón, aromatizantes, colorantes y edulcorantes, según proceda. Los preparados para administración oral pueden formularse adecuadamente para proporcionar una liberación controlada del compuesto activo de chaperona.

Las formulaciones farmacéuticas de la PC (migalastat o una sal del mismo) adecuadas para uso parenteral/inyectable incluyen generalmente soluciones acuosas estériles (cuando son hidrosolubles) o dispersiones y polvo estériles para la preparación extemporánea de soluciones inyectables estériles o dispersión. En todos los casos, la forma debe ser estéril y debe ser fluida en la medida en que exista posibilidad de jeringa. Debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento y debe conservarse contra la acción contaminante de microorganismos como bacterias y hongos. El portador puede ser un disolvente o medio de dispersión que contenga, pro ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo glicerol, propilenglicol y polietilenglicol y similares), mezclas adecuadas de los mismos y aceites

vegetales. La fluidez adecuada se puede mantener, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en caso de dispersión y mediante el uso de tensioactivos. La prevención de la acción de microorganismos se puede conseguir mediante diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo parabenos, clorobutanol, fenol, alcohol bencílico, ácido sórbico y similares. En muchos casos, será razonable incluir agentes isotónicos, por ejemplo azúcares o cloruro de sodio. La absorción prolongada de las composiciones inyectables se puede conseguir mediante el uso en las composiciones de agentes que retrasan la absorción, por ejemplo monoestearato de aluminio y gelatina.

Las soluciones inyectables estériles se preparan mediante incorporación de la enzima purificada (si la hubiera) y la PC (migalastat o una sal del mismo) en la cantidad requerida en el disolvente apropiado con varios de los demás ingredientes enumerados anteriormente, según sea necesario, seguida de esterilización por filtro o terminal. Generalmente, las dispersiones se preparan mediante incorporación de los diversos principios activos en un vehículo estéril que contiene el medio de dispersión básico y los demás ingredientes requeridos entre los enumerados anteriormente. En caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos preferidos de preparación son secado en vacío y la técnica de liofilización, que produce un polvo del principio activo además de cualquier principio adicional deseado a partir de una solución del mismo esterilizada filtrada previamente.

La formulación puede contener un excipiente. Los excipientes farmacéuticamente aceptables que pueden incluirse en la formulación son amortiguadores tales como amortiguador de citrato, amortiguador de fosfato, amortiguador de acetato, amortiguador de bicarbonato, aminoácidos, urea, alcoholes, ácido ascórbico, y fosfolípidos; proteínas, tales como seroalbúmina, colágeno, y gelatina; sales tales como EDTA o EGTA, y cloruro de sodio; liposomas; polivinilpirrolidona; azúcares, tales como dextrano, manitol, sorbitol, y glicerol; propilenglicol y polietilenglicol (por ejemplo, PEG-4000, PEG-6000); glicerol; glicina u otros aminoácidos; y lípidos. Los sistemas amortiguadores para uso con las formulaciones incluyen amortiguadores de citrato, acetato, bicarbonato y fosfato. El tampón fosfato es una realización preferida.

La vía de administración del compuesto chaperona puede ser oral o parenteral, incluyendo vía intravenosa, subcutánea, intraarterial, intraperitoneal, oftálmica, intramuscular, bocal, rectal, vaginal, intraorbital, intracerebral, intradérmica, intracraneal, intraespinal, intraventricular, intratecal, intracisternal, intracapsular, intrapulmonar, intranasal, transmucosa, transdérmica o por inhalación.

La administración de las formulaciones parenterales descritas anteriormente del compuesto chaperona puede realizarse mediante inyecciones periódicas de un bolo de la preparación, o puede administrarse mediante administración intravenosa o intraperitoneal desde un reservorio externo (por ejemplo, una bolsa intravenosa) o interno (por ejemplo, un implante bioerosionable).

Las realizaciones relacionadas con formulaciones farmacéuticas y con la administración se pueden combinar con cualquiera de las otras realizaciones de la invención, por ejemplo realizaciones relacionadas con métodos para tratar pacientes con enfermedad de Fabry, métodos para tratar pacientes con Fabry sin tratamiento previo con ERT, métodos para tratar pacientes con Fabry con experiencia en ERT, métodos para reducir el riesgo de eventos CBV, métodos para tratar pacientes con Fabry con mayor riesgo de eventos CBV, métodos para tratar pacientes con Fabry con antecedentes de eventos CBV, métodos para tratar pacientes con Fabry sin antecedentes de eventos CBV, métodos para mejorar α-Gal A en un paciente diagnosticado con o sospechoso de tener enfermedad de Fabry, uso de una chaperona farmacológica para α-Gal A para la fabricación de un medicamento para tratar un paciente diagnosticado con enfermedad de Fabry, o una chaperona farmacológica para α-Gal A para uso en el tratamiento de un paciente diagnosticado con enfermedad de Fabry, así como realizaciones relacionadas con mutaciones susceptibles, las PC y dosis adecuadas de las mismas.

En una o más realizaciones, la PC (migalastat o una sal del mismo) se administra en combinación con ERT. La ERT aumenta la cantidad de proteína mediante la introducción exógena de enzimas de tipo salvaje o biológicamente funcionales por medio de infusión. Esta terapia se ha desarrollado para muchos trastornos genéticos, incluidas las LSD, tales como la enfermedad de Fabry, a la que se ha hecho referencia anteriormente. Tras la infusión, se espera que la enzima exógena sea absorbida por los tejidos a través de un mecanismo no específico o específico de receptor. En general, la eficiencia de captación no es alta y el tiempo de circulación de la proteína exógena es corto. Además, la proteína exógena es inestable y está sujeta a una rápida degradación intracelular, además de tener el potencial de reacciones inmunológicas adversas con tratamientos posteriores. En una o más realizaciones, la chaperona se administra al mismo tiempo que la enzima de reemplazo (por ejemplo, α-Gal A de reemplazo). En algunas realizaciones, la chaperona se coformula con la enzima de reemplazo (por ejemplo, α-Gal A de reemplazo).

En una o más realizaciones, un paciente cambia de ERT a terapia con migalastat. En algunas realizaciones se identifica un paciente en ERT, se interrumpe la ERT del paciente y el paciente comienza a recibir terapia con migalastat. La terapia con migalastat puede ser según cualquiera de los métodos descritos en el presente documento.

**Eventos CBV**

Los regímenes de dosificación descritos aquí pueden reducir el riesgo de eventos CBV en pacientes con Fabry. Los eventos CBV, que incluyen, pero no se limitan a, accidente cerebrovascular y ataque isquémico transitorio, son eventos clínicos graves comunes entre pacientes con enfermedad de Fabry, y ocurren en -18% de los pacientes no tratados durante un seguimiento medio de 4,5 años según un metanálisis de El Dib, et al (El Dib R. PLoS One. 2017;12(3):e0173358). Se ha informado que la incidencia de eventos CBV en pacientes que reciben ERT oscila de 2% a 27%. Sin embargo, el efecto de la ERT sobre el riesgo de eventos CBV sigue siendo desconocido debido a la escasez de estudios controlados con placebo, y no se ha demostrado que la enzima lisosomal recombinante cruce la barrera hematoencefálica.

Como se describe con más detalle en los ejemplos a continuación, los estudios de fase 2 y 3 han descubierto que la terapia con migalastat reduce la incidencia de eventos CBV tanto en pacientes con experiencia en ERT como en pacientes sin tratamiento previo con ERT. En consecuencia, la terapia con migalastat se puede utilizar para reducir el riesgo de eventos CBV y/o tratar a pacientes con Fabry que tienen un alto riesgo de eventos CBV, incluyendo pacientes que tienen antecedentes de eventos CBV o pacientes que no tienen antecedentes de eventos CBV.

## EJEMPLOS

### EJEMPLO 1: Regímenes posológicos para el tratamiento de pacientes con Fabry con y sin ERT previa con hidrocloruro de migalastat

Este ejemplo describe estudios de fase 2 y fase 3 de la terapia con migalastat en pacientes con síndrome de Fabry con y sin experiencia en ERT.

#### Diseños de estudio

Estos análisis incluyeron datos de cuatro ensayos clínicos de fase 2 y cuatro de fase 3 con fecha de corte del 10 de febrero de 2017, como se muestra en la Figura X1 a continuación.

FAB-CL-202 (NCT00283959), FAB-CL-203 (NCT00283933) y FAB-CL-204 (NCT00304512) fueron estudios de fase 2, abiertos y no comparativos que evaluaron la seguridad, la tolerabilidad, la farmacocinética (PK) y la farmacodinámica (PD) de migalastat (intervalo de dosis: 50-250 mg) en pacientes con enfermedad de Fabry.

FAB-CL-205 (NCT0052607) fue un estudio de fase 2, de extensión abierta y a largo plazo (OLE) para pacientes que completaron ensayos clínicos de fase 2, incluyendo FAB-CL-202, FAB-CL-203 y FAB-CL-204. El estudio incluyó un período con migalastat 150 mg cada dos días (QOD), después un período de aumento de dosis, seguido de 150 mg QOD.

FACETS (AT1001-011, NCT00925301) fue un estudio de fase 3, controlado por placebo, diseñado para evaluar la eficacia, seguridad y PD de 6 meses de migalastat 150 mg QOD frente a placebo, seguido de una extensión abierta (OLE) de 18 meses de migalastat en pacientes sin tratamiento previo con ERT con enfermedad de Fabry y variantes de GLA susceptibles a migalastat.

ATTRACT (AT1001-012, NCT01218659) fue un estudio de fase 3, abierto, controlado con activo, para comparar la eficacia y seguridad de 18 meses de migalastat 150 mg QOD frente a ERT, seguido de 12 meses de OLE de migalastat, en pacientes tratados con ERT con variantes de GLA susceptibles a migalastat.

AT1001-041 (NCT01458119) fue un estudio OLE a largo plazo que evaluó la seguridad y eficacia a largo plazo de migalastat en pacientes que completaron FAB-CL-205, AT1001-011 o AT1001-012.

AT1001-042 (NCT02194985) es un estudio OLE a largo plazo, en curso, que evalúa la seguridad y eficacia a largo plazo de migalastat en pacientes que participaron en AT1001-012 o AT1001-041.

#### Análisis

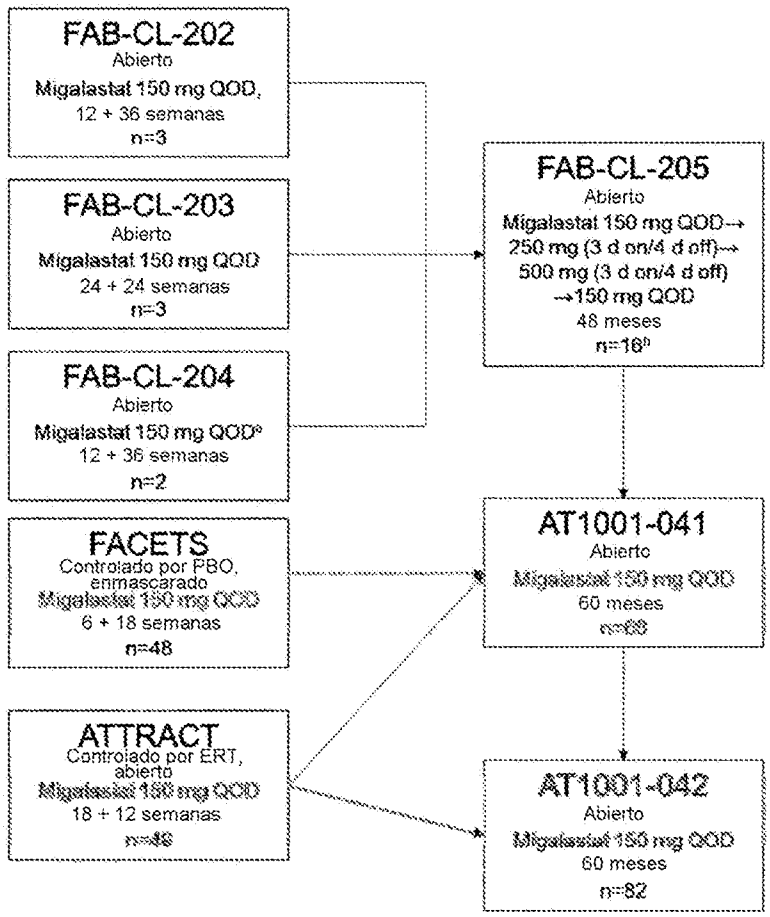
El análisis evalúa los eventos CBV informados como eventos adversos emergentes del tratamiento (TEAE) durante el tratamiento con migalastat 150 mg QOD en pacientes con mutaciones susceptibles en ensayos clínicos de fase 2 y fase 3.

Los eventos CBV se identificaron buscando los antecedentes médicos y en los listados de TEAE con términos relacionados con el accidente cerebrovascular, incluidos isquemia del tronco encefálico, infarto cerebral, hemorragia cerebral, isquemia cerebral, accidente cerebrovascular, accidente cerebrovascular embólico, y TIA.

Sólo se incluyeron en este análisis aquellos pacientes que recibieron al menos 1 dosis de migalastat 150 mg QOD.

La disponibilidad se basó en los resultados de un ensayo de disponibilidad de migalastat in vitro validado según buenas prácticas de laboratorio (GLP).

**Estudios clínicos incluidos en el análisis**




PBO=placebo; QOD=cada dos días

Los números de pacientes indican pacientes susceptibles de ser tratados que recibieron al menos una dosis de 150 mg QOD en cada estudio.

[a]FAB-CL-204 también incluyó pacientes que recibieron migalastat 50 o 250 mg QOD.

[b]FAB-CL-205 también enroló pacientes que completaron FAB-CL-201 (estudio de escalada de dosis de migalastat 25, 50, 100, y 250 mg), así como pacientes susceptibles de ser tratados adicionales de FAB-CL-204 que recibieron migalastat 50 o 250 mg QOD durante FAB-CL-204. El número de pacientes enumerado para FAB-CL-205 incluye todos los pacientes susceptibles de ser tratados que recibieron al menos 1 dosis de migalastat 150 mg QOD en FAB-CL-205.

[c]AT1001-041 se descontinuó tempranamente, y los pacientes en AT1001-041 tuvieron la opción de ser transferidos al estudio AT1001-042.

FAB-CL-202, FAB-CL-203, FAB-CL-204 y FAB-CL-205 son estudios clínicos de fase 2; FACETS, ATTRACT, AT1001-41 y AT1001-042 son estudios clínicos de fase 3

**Resultados**

**Exposición total a migalastat 150 mg QOD**

La duración media total (SD) de la exposición a migalastat 150 mg QOD fue 4,0 (2,0) años (N = 114).

La duración de la exposición a migalastat 150 mg QOD varió de 0,1 a 8,3 años, con una mediana de 4,4 años.

**Demografía y características de referencia**

La edad media (SD) de todos los pacientes que recibieron al menos 1 dosis de migalastat 150 mg QOD fue 46,2 (13,1) años (intervalo: 16 a 72 años) (Tabla 2). La mayoría eran blancos, y el 57,0% eran mujeres. El tiempo medio (SD) desde el diagnóstico de la enfermedad de Fabry fue 9,8 (10,1) años (intervalo: 1 a 44 años).

**Tabla 2. Datos demográficos y características de referencia: Todos los pacientes que cumplen los requisitos reciben migalastat 150 mg QOD**

| Parámetro | FAB-CL 202, 203, 204 y 205 (n=17) | FACETS (n=48) | ATTRACT (n=49) | Total (N=114) |
|---|---|---|---|---|
| **Edad, años** | | | | |
| Media (SD) | 43,1 (13,4) | 43,4 (11,2) | 50,0 (14,0) | 46,2 (13,1) |
| Mediana (intervalo) | 42,0 (18, 65) | 46,0 (16, 68) | 54,0 (18, 72) | 46,5 |
| **Grupo de edad, n (%)** | | | | |
| <18 años | 0 | 1 (2,1) | 0 | 1 (0,9) |
| 18 a <65 años | 15 (88,2) | 46 (95,8) | 42 (85,7) | 103 (90,4) |
| ≥65 años | 2 (11,8) | 1 (2,1) | 7 (14,3) | 10(8,8) |

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| **Sexo, n** (%) | | | | | |
| | Femenino | 5 (29,4) | 30 (62,5) | 30 (61,2) | 65 (57,0) |
| | Masculino | 12 (70,6) | 18 (37,5) | 19 (38,8) | 49 (43,0) |
| **Años diagnosticado con enfermedad de Fabry** | | | | | |
| | Media (SD) | 7,2 (7,5) | 7,6 (7,8)[a] | 12,9 (12,1) | 9,8 (10,1) |
| | Mediana (intervalo) | 5,0 (2, 34) | 5,0 (1, 25) | 7,0 (3, 44) | 6,0 (1, 44) |

ACEI=inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina; ARB=bloqueo del receptor de angiotensina; RI=inhibidor de renina; SD=desviación estándar.

[a]No se registró la fecha de diagnóstico de la enfermedad de Fabry para 1 paciente en FACETS.

**Antecedentes médicos de eventos CBV**

Dieciséis de 114 pacientes (14%) habían experimentado eventos CBV antes del tratamiento con migalastat (Tabla 3). Un paciente del estudio AT1001-012 había informado 2 eventos CBV en su anamnesis.

En 5/16 pacientes, los eventos CBV se consideraron una condición actual al ingresar al estudio según se informó en la anamnesis. Un paciente del AT1001-011 tenía isquemia cerebral en curso; otro tenía infarto del tronco encefálico en curso. Dos pacientes de AT1001-012 tenían TIA en curso, uno tenía un accidente cerebrovascular en curso, específicamente un accidente cerebrovascular de la arteria cerebral media izquierda.

La edad media (SE) en el momento del primer evento CBV fue 43,6 (14,4) años.

**Tabla 2. Antecedentes médicos de eventos CBV**

| | FAB-CL 202, 203, 204 y 205 (n=17) | FACETS (n=48) | ATTRACT (n=49) | Total (N=114) |
|---|---|---|---|---|
| Isquemia del tronco encefálico | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Infarto cerebral | 0 | 1 (2%) | 0 | 1 (1%) |
| Hemorragia cerebral | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Isquemia cerebral | 0 | 1 (2%) | 1 (2%) | 2 (2%) |

| | FAB-CL 202, 203, 204 y 205 (n=17) | FACETS (n=48) | ATTRACT (n=49) | Total (N=114) |
|---|---|---|---|---|
| Accidente cerebrovascular | 0 | 2 (4%) | 3 (6%) | 5 (4%) |
| Accidente cerebrovascular embólico | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Ataque isquémico transitorio | 2 (12%) | 2 (4%) | 5 (10%) | 9 (8%) |
| **Historial de cualquier evento CBV[a]** | **2 (12%)** | **6 (12%)** | **8 (16%)** | **16 (14%)** |
| [a]La última fila muestra el número de pacientes únicos con eventos CBV. El paciente con >1 evento CBV sólo se contó una vez. | | | | |

**Aparición de eventos CBV durante el tratamiento con migalastat 150 mg QOD**

Se notificaron once eventos CBV durante el tratamiento con migalastat 150 mg QOD en 8 pacientes (7%) (Tabla 4). Siete eventos CBV se clasificaron como eventos adversos graves (SAE); sin embargo, la mayoría (82%) de los eventos fueron de gravedad leve o moderada (Tabla 5). Dos eventos CBV llevaron a la interrupción del tratamiento (Tabla 5). Ninguno de los 11 eventos CBV se consideró relacionado con el tratamiento.

Seis de los 8 pacientes habían experimentado CBV antes de recibir el tratamiento con migalastat; por lo tanto, sólo 2/114 (2%) pacientes tuvieron un primer evento CBV mientras tomaban migalastat (Tabla 5). La edad media (SD) de los pacientes en el primer evento durante el tratamiento con migalastat fue 50,6 (14,6) años (Tabla 5). El tiempo medio (SD) con migalastat 150 mg QOD en el inicio del primer evento fue 1,1 (1,1) años.

Entre los 16 pacientes con evento CBV previo al migalastat, 10 (63%) no experimentaron un nuevo evento CBV durante el tratamiento con migalastat.

**Tabla 4. Eventos CBV durante el tratamiento con migalastat 150 mg QOD por ensayo**

| | FAB-CL 202, 203, 204 y 205 (n=17) | FACETS (n=48) | ATTRACT (n=49) | Total (N=114) |
|---|---|---|---|---|
| Isquemia del tronco encefálico | 0 | 1 (2%) | 0 | 1 (1%) |
| Infarto cerebral | 1 (6%) | 0 | 0 | 1 (1%) |
| Hemorragia cerebral | 0 | 1 (2%) | 0 | 1 (1%) |
| Isquemia cerebral | 1 (6%) | 0 | 0 | 1 (1%) |
| Accidente cerebrovascular | 1 (6%) | 0 | 0 | 1 (1%) |
| Accidente cerebrovascular embólico | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Ataque isquémico transitorio | 1 (6%) | 1 (2%) | 2 (4%) | 4 (4%) |
| **Cualquier evento CBV[a]** | **3 (18%)** | **3 (6%)** | **2 (4%)** | **8 (7%)** |
| [a]La última fila muestra el número de pacientes únicos con eventos CBV. Los pacientes con >1 evento CBV sólo se contaron una vez. | | | | |

Tabla 5 Eventos CBV durante el tratamiento con migalastat 150 mg QOD por paciente

| Paciente Nº | Sexo | Mutación | Evento CBV | Duración del evento (días) | Edad al inicio del evento (años) | Tiempo con migalastat 150 mg QOD al inicio (días) | Grave | Gravedad | Resuelto | Tratamiento interrumpido | Historia del evento CBV |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | F | M284T | TIA (lóbulo derecho) | 3 | 38 | 589 | Sí | Leve | Sí | No | Accidente CBV |
| 2 | M | I253T | Hemorragia cerebral | En curso[b] | 63 | 289 | Sí | Grave | No | Sí | Ninguno |
| 3 | M | I253T | Isquemia del tronco encefálico (región pontina izquierda) | 47 | 66 | 1413 | Sí | Moderado | Sí con secuela | No | Isquemia cerebral |
| 4 | M | G35R | TIA | 7 | 59 | 24 | Sí | Moderado | Sí | No | TIA |
| 5 | F | L32P | TIA | 1 | 56 | 559 | No | Leve | Sí | Na | TIA |
| | | | TIA | 1 | 56 | 624 | No | Moderado | Sí | No | |
| 6 | M | P259R | Accidente CBV | 226 | 71 | 98 | Sí | Grave | Sí con secuela | Sí | Ninguno |
| 7 | F | R112H | TIA | 3 | 39 | 21 | Sí | Moderado | Sí | No | TIA |
| | | | TIA | 2 | 41 | 666 | Sí | Moderado | Sí | No | |
| 8 | F | P205T | Infarto cerebral (arteria media derecha) | En curso[c] | 60 | 371 | No | Moderado | No | No | TIA |
| | | | Hallazgo anormal en MRI (cambio isquémico antiguo del lóbulo frontal derecho) | En curso[c] | 68 | 182 | No | Moderado | No | No | |

| Paciente Nº | Parámetros de referencia[a] | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | Tiempo desde el diagnóstico (años) | Tensión arterial (mm Hg) | Proteína en orina (mg/24 h) | $eGFR_{CKD-EPI}$ (ml/min/1,73 $m^2$) | LVMi (g/$m^2$) | Uso de ACEI/ARB/RI |
| 1 | 14,5 | 120/80 | 399 | 81,8 | 88,7 | No |
| 2 | 0,3 | NA | 1900 | 53,8 | 142,8 | No |
| 3 | 4,6 | 120/80 | 331 | 86,8 | 176,2 | Sí |
| 4 | 10 | 110/67 | 182 | 84,9 | 154,9 | Sí |
| 5 | 2,2 | 112/64 | 231 | 73,2 | 68,6 | Sí |
| 6 | 8,3 | 110/70 | 66 | 137,4 | NA | No |
| 7 | 5,8 | 113/73 | 163 | 120,0 | NA | No |
| 8 | 1,9 | 129/69 | NA | NA[d] | NA | No |

| Paciente Nº | Parámetros de referencia[a] | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | **Tiempo desde el diagnóstico (años)** | **Tensión arterial (mm Hg)** | **Proteína en orina (mg/24 h)** | **$eGFR_{CKD-EPI}$ (ml/min/1,73 $m^2$)** | **LVMi (g/$m^2$)** | **Uso de ACEI/ARB/RI** |

LVMi=índice de masa ventricular izquierda; MRI=resonancia magnética; NA=no aplicable; TIA=ataque isquémico transitorio.

[a]El valor inicial fue el inicio de migalastat 150 mg QOD.

[b]En curso en el momento de la discontinuación en FACETS.

[c]En curso al final de FAB-CL-204.

[d]Este paciente tenía una $eGFR_{MDRD}$ de 76,4 ml/min/1,73 $m^2$.

Como se puede observar en las tablas anteriores, la incidencia general de eventos CBV fue baja durante el tratamiento con migalastat. Durante un promedio de 4 años de migalastat, 8/114 (7%) pacientes habían experimentado eventos CBV, que ocurrieron predominantemente en pacientes con antecedentes de eventos CBV.

Las realizaciones descritas aquí pretenden ser ilustrativas de las presentes composiciones y métodos, y no pretenden limitar el alcance de la presente invención. Se pretende que se incluyan diversas modificaciones y cambios consistentes con la descripción en su conjunto y que sean fácilmente evidentes para el experto en la técnica. Las reivindicaciones adjuntas no deben limitarse a las realizaciones específicas expuestas en los ejemplos, sino que se les debe dar la interpretación más amplia coherente con la descripción en su totalidad.

En esta solicitud se citan patentes, solicitudes de patentes, publicaciones, descripciones de productos, números de acceso de GenBank, y protocolos.

**REIVINDICACIONES**

1. Migalastat o una sal del mismo para uso en un método para reducir el riesgo de un evento cerebrovascular (CBV) en un paciente que padece la enfermedad de Fabry, comprendiendo el método administrar al paciente una formulación que comprende una cantidad efectiva de migalastat o una sal del mismo cada dos días durante al menos 2 años, en el que la cantidad efectiva es alrededor de 100 mg a alrededor de 150 mg de equivalente de base libre (FBE).

2. Migalastat o sal del mismo para uso según la reivindicación 1, en el que el evento CBV comprende uno o más de isquemia del tronco encefálico, infarto cerebral, hemorragia cerebral, isquemia cerebral, accidente cerebrovascular, accidente cerebrovascular embólico o ataque isquémico transitorio.

3. Migalastat o sal del mismo para uso según la reivindicación 1 o 2, en el que el migalastat o sal del mismo mejora la actividad de la α-galactosidasa A.

4. Migalastat o una sal del mismo para uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que se administra al paciente alrededor de 123 mg de FBE del migalastat o una sal del mismo cada dos días.

5. Migalastat o una sal del mismo para uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que se administra al paciente alrededor de 150 mg de hidrocloruro de migalastat cada dos días.

6. Migalastat o una sal del mismo para uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que la formulación comprende una forma de dosificación oral.

7. Migalastat o una sal del mismo para uso según la reivindicación 6, en el que la forma de dosificación oral comprende un comprimido, una cápsula o una disolución.

8. Migalastat o una sal del mismo para uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en el que el migalastat o una sal del mismo se administra durante al menos 3 años o durante al menos 4 años.

9. Migalastat o una sal del mismo para uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en el que el paciente no tuvo un primer evento CBV antes de iniciar la administración del migalastat o una sal del mismo.

10. Migalastat o una sal del mismo para uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en el que el paciente tuvo un primer evento CBV antes de iniciar la administración del migalastat o una sal del mismo.

11. Migalastat o una sal del mismo para uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en el que el paciente es un paciente que no ha recibido terapia de reemplazo enzimático (ERT).

12. Migalastat o una sal del mismo para uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en el que el paciente es un paciente con experiencia en ERT.

13. Migalastat o una sal del mismo para uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-12, en el que el paciente tiene una mutación susceptible de ensayo HEK en la α-galactosidasa A.

14. Migalastat o sal del mismo para uso según la reivindicación 13, en el que la mutación se describe en una tabla de referencia farmacológica.

15. Migalastat o sal del mismo para uso según la reivindicación 14, en el que la tabla de referencia farmacológica se proporciona en una etiqueta de producto para un producto de migalastat aprobado para el tratamiento de la enfermedad de Fabry.

```
ccctctgtaggggcagagaggttctacttcattactgcgtctcctgggaaggccatcag      60
gactgctggctaaagtgggaaccaggactctttgtgagttaagaatttgtgtatttatat     120
gtgtgttatacacatttttttaaaaaactgtaacgacatcaggttgagcagtcgtctccgg     180
gtggtgaattatgtgtatttttaaatttttactatattgttatttttcaaatgttcgaa      240
attgaatatgtagattgttgttatcagcagaaaaataaacattattcaaatactctattc     300
agtaaagtaatttattgggcgcctttgtcaagcacgcatttgcctagatgtgactctaca     360
gataaaattcacttggggcctccccttacagacaatcaggcagtggagactgagtgcctg     420
aatggatagaccagcactcagaccactattttcagtatctgtttttcttaactcagggcc     480
gtggttttcaaacgtttttcgccttacggtcacccttagggtcccccgagaccggcccag     540
acagacagatatacaaaaacacatacacagtcatgagcgtccaccatttccccaccaggc     600
gcagcacaggcggcttcccggcactgagatgggggggaggagggagagagcgcgagggggg     660
gaggggaaagcagagaacgaaagaggcggaggcggcccccgaaccccgctctggtcttca     720
tcatcaccacccctgggtccccagttcccacccacacaccaacctctaacgatacgggt      780
aattttcctccttcttccctcaaacggctatagcgagacggtagacgacgaccagaacta     840
cttctgctcacgtaagcgagtaatcacgtgagcgcctacgtcatgtgagatctcggtcac     900
gtgagcaactctcggcttaaactcgggatcactaaggtgccgcacttccttctggtatgg     960
aaatagggcgggtcaatatcaagaaaggaagagggtgattggttagcggaacgtcttacg     1020
tgactgattattggtctacctctggggataaccgtcccagttgccagagaaacaataacg     1080
tcattatttaataagtcatcggtgattggtccgcccctgaggttaatcttaaaagcccag     1140
gttacccgcggaaatttatgctgtccggtcaccgtgacaatgcagctgaggaacccagaa     1200
ctacatctgggctgcgcgcttgcgcttcgcttcctggccctcgtttcctgggacatccct     1260
ggggctagagcactggacaatggattggcaaggacgcctaccatgggctggctgcactgg     1320
gagcgcttcatgtgcaaccttgactgccaggaagagccagattcctgcatcaggtatcag     1380
atattgggtactcccttcccttttgcttttccatgtgtttgggtgtgtttggggaactgga     1440
gagtctcaacgggaacagttgagcccgagggagagctcccccacccgactctgctgctgc     1500
ttttttatccccagcaaactgtcccgaatcaggactagccctaaactttctctgtgtgac      1560
ctttcctgggatgggagtccggccagcggccccctgtttctttctctctctctctctctct     1620
cgttctccttctctttctctttctcttctttcctctctctttctctctctccctgcccgg     1680
ttctctttttttcactgctccttgcagagcagggccaccccataggcagtgtgcccaaagt     1740
agccctgcccggttctattcagaccttcttgtgaacttctgctcttcctctgccgggtg      1800
ctaaccgttagaacatctagggtgggtaggaggaatggggaactaagattcgtgccattt     1860
tttctccttttggggtcgtggatttctcggcagtatctcgagggagttagagagaccata     1920
aggtcgctgagatctctcccacctcgcccatgagcgtggcatcaggctggaaggttgaca     1980
tggaggaactttatacatttacacctttgcgtgagggttgaggctggattagataggtat     2040
tgaacatatctgaccctcacaatccttatctgtaaattgggattacaaccttttaatttc     2100
agggagctgacaaaaaaaatctgaaaaatagttcttatctcacacaggtgagttttcaag     2160
gagataacctatttaaagtacatagcacagcgcttgaccattcaactgcgcttacagagc     2220
aaatgttcaatgggaaaatgaatgtaaatctacaaatctgaatgaatatgtgtatttttc     2280
tggagagaggatatttacctttcttcaaattctcaaagggctctgtgatttaaaaaaggt     2340
taggaatcactgatagatgttggtaaaaggtggcagtcacagtacatttctgtgtccata     2400
agttattcctatgaatatctttatagataaagtcaggatgttggtcagacatcacagaag     2460
aaattggccttgtaagtttcatgtgaccctgtggtacagtatgtgtggcaattttgccca     2520
tcacggatttttttttattggtatttgcatctgattataaaactaatgcatgatcattgc     2580
aaaaaatgtagataaagaagagcaaaatgaaaataaagatttccccccaccgttccacca     2640
cccagaaataatcatggtttaaatgttaatatacaaccttacaattgttttctatataaa     2700
tgaaaacatagatttctttatttcattatttccataaaaaatggatcatgtttatgtca      2760
tgtttggctaatggcaagaccctggcacccagtctgggctcaaattctgcctcattgtta     2820
cttagccctgtgacattgggtaaattacacttttttttttttttttttgagacgggg       2880
```

**FIG.1A**

tctcgctctgtcgcccaggctggagtgcagtggcacgatctcggctcactgcaagtccgc 2940
ctcctgggttcacgccattcttctgcctcagcctcccgagtagctgggactacaggcgcc 3000
tgccaccacgcctggctcttttttttttttttttttttttttagtacagacggggtttcac 3060
catgttagccagggtggtctcaatctcctgacctcgtgattcgcccgcctcagcctccca 3120
aagtgctggtgtgagccaccgtgcccagccttacttttttttttgagaggggtctcact 3180
ctgtcacccaggttggagtgcagtggcgcgatctctgctcagtgcaaactccacctcccg 3240
ggtttaagcagttctcctgtcgtagtctcctgagtagctgggattacaggcacaccacca 3300
cggccagctaatttttgtattttcagtagagacgggtttcaccatgttgcccaagctggt 3360
ctcgaactcctggcctcaagtgatctgcccgccttggcctcccagagtgctgggattaca 3420
ggtgtgagccaccgcacccggcctctttttttctttttttagtctatcataccttgcaaata 3480
cagtggttcttcctatgtgttggttttgatatttatgtaatcaaacacatcagtttttcc 3540
tttctgatttctgactttggggtcatgctgagaaagtcctttcctacctgaagataatac 3600
agtatatacgtttcttactagtatttttgtggatttttaaaatatttaaatctttagtcc 3660
atctgaacttgttcttctatcagaaatgccacatttaataaataataagtcccatggtat 3720
cagatggctggaaggacctctttcgaaacttttgtttaattccattaatctgtgtattctt 3780
attctaatgctaatagttccacactagcttcctttatctttttttttctttttttttttt 3840
ttttgagctggagtttcgctcttgttgcccaggctggagtacaatgtcacgatctcggtt 3900
caccgcaacctccgcctcccaggttcaagcaattctcctgcctcatcctcgcgagtagct 3960
ggaattacaggcatgcgccaccacgcctagctatttttgtatttttagtagagatggggtt 4020
tctccatgttggtcaggctggtctcaaactcccagcctcaggtgatctgcctgcctcggc 4080
ctcccaaaatgctgttattacaggcgtgagccaccacgcccagccttcatcttttaatga 4140
atgtacatgtatgtaatcttttaggtgaacttttttgtaatgttgtgccaagttccttaaa 4200
aagccctttttggaagctgggcaggtggccacgcctgtaatcccagcattttgggagtctg 4260
aggcaggtggatcacttgaggccaggagttcaagactagcctagccaaaatgcaaaaccc 4320
tgtctctactaaaagatacaaaaattagccggatgcgatggcacatgcctgtaatctcagc 4380
tactcgggaggctgaggtagaagaatcgcttgaaccggggaggcagaggttgcagtgagc 4440
aagatggcgccactgcactccagcctgggtgacagagggagactccatctcaaaaaaaaa 4500
aaaaaaaaaaagataaaaaggaaacctaagtactcttgggctttgttaaggattttgtt 4560
aaatatacaaaggattgcagggaaaattaacttatttttaatattgagtatgcttatcca 4620
agagcaaaataatatttctccatttattcaaatcatttaggagcatcatagttttaacat 4680
atgggccttgcacgtatcttaaatttatctctaggcattttaggttgttcagttgttctt 4740
gtgaatgggatctttttctccaaataggattattgttgatatctgttgattatgttaact 4800
ttgtagtttctgactttactgaactgtcttcttagatctaatactcttttcaatttcatc 4860
atatatttctcattcctatttttgtttggggtttttagggcgggaatattaacgggataag 4920
agagacaaaagaaaatctggaaaaacaattcatttttaccttacattgcttgtgattacta 4980
ccacactattactgggttggaaaaaattgtgaaatcccaaggtgcctaataaatgggagg 5040
tacctaagtgttcatttaatgaattgtaatgattattggaatttctctttcagtgagaag 5100
ctcttcatggagatggcagagctcatggtctcagaaggctggaaggatgcaggttatgag 5160
tacctctgcattgatgactgttggatggctccccaaagagattcagaaggcagacttcag 5220
gcagaccctcagcgctttcctcatgggattcgccagctagctaattatgtgagtttatag 5280
ataatgttcttgttcattcagaggactgtaagcacttctgtacagaagcttgtttagaaa 5340
cagccctcatggccgggcgtggtggctcacgctgtaatcccaacactttgggaggccgag 5400
gcgggtggatcacctgaggtcaagagttcaagaccagcctggccaacatggtgaaacccc 5460
aactctattaaaagtacaaaaaattagctgggcatggtggtgaacgcctgtaaccccagc 5520
tacttgggaggctgaggcaggagaatcgcttgaacccaggaggtggaagtttcagtgagc 5580
tgagatcacgccattgcactctagcctgggcaacaaaagagaaactccatctcaaaaaaa 5640
aaaacaaggaaaaaaagaaacagccctcatgacacttagaaagtagaatagctggctgtt 5700
atctgaacattgaattgtaaggcttatcaggtggactttgcattccatcagcagacaatt 5760

**FIG.1B**

```
ttttttttttttttttttgagatggagtctcattctgtctcccaggctggagggcagtg      5820
gtgcgatctcggctcactgcaagctccacctcctgggttcatgccattctcctgcctcag      5880
cctcccaagtagctgggaccacaggcacccgccaccatgcccagttaatttttgtatttt      5940
ttagtagagacggggtttcaccatgttagccaagatggtctcgatctcctgacctcgtga      6000
tccgcccacctcggcctcccaaagtgctgggattacaggcatgagccaccgcgcctagcc      6060
tacaaatgttttgtaatagctcttgaggcccatcttggagttctccttttgctaaaacca      6120
ctgaactctctaggaggaaaaaggaacttggttcttgacatatgtgtgcatgtatttcca      6180
tataacctttaggaagctattgcaatggtactataaactagaattttagaagatagaagg      6240
aaaatattctggagatcattgaagagaaatggagtccaacactagttaaagatgatgaag      6300
acagatttttttttgacggagtctcgctctgtcgcccaggctggagtgcagtggcaca      6360
atctcagctcactgcaaccctccacctcttgggttcaagtgattctcctgcctcagcctc      6420
ccaagtagctgggactacaggcgcacaccaccacgcccggctaatttttgtatttttagt      6480
agagacaaggtttcaccatattggccaggctggtctcgaactcctgaccttgtaatccgc      6540
ccaccttggcctcccaaagtgctgggattacaggcatgagccaccacgcccggccgatga      6600
agacagattttattcagtactaccacagtagaggaaagagccaagttcaattccaaatac      6660
aacaaagacaggtggagatttatagccaatgagcagattgaggggtcagtggatggaat      6720
atttaagaagacatcaagggtagggagcttcttgctaaagcttcatgtacttaaacaaga      6780
agggtgggggatgagggaaattgatcagatatcaatggtggcagtattgacttagcagga      6840
ttcttgctaagaggtcttgctaggacagacataggaagccaaggtggaggtctagtcgaa      6900
aagaaggctcatcagagaagtctaactaaagtttggtcaagaagagtctttgtcaaggta      6960
aatctatcatttccctcaaaaggtaattttcaggatcccatcaggaagattagcatggct      7020
gctagctttctcctcagttctgggctatagctcacatgcctagtttgaactagctcagca      7080
gaactgggggatttattctttgtcttccaacaaactcatctggatgattttgggggtttg      7140
tggggaaaagccccccaatacctggtgaagtaaccttgtctcttcccccagcctggaatgg      7200
ttctctctttctgctacctcacgattgtgcttctacaatggtgactcttttcctccctct      7260
catttcaggttcacagcaaaggactgaagctagggatttatgcagatgttggaaataaaa      7320
cctgcgcaggcttccctgggagttttggatactacgacattgatgcccagacctttgctg      7380
actggggagtagatctgctaaaatttgatggttgttactgtgacagtttggaaaatttgg      7440
cagatggtaatgtttcattccagagatttagccacaaaggaaagaactttgaggccatgg      7500
tagctgagccaaagaaccaatcttcagaattttaaataccctgtcacaatactggaaata      7560
attattctccatgtgccagagctcccatctcttctctttcagttcattaattaattaatt      7620
aattcatgtaaaatccatgcatacctaaccatagctaatattgtgcacttataattcaag      7680
agggctctaagagttaattagtaattgtaactctctataacatcatttaggggagtccag      7740
gttgtcaatcggtcacagagaaagaagcatcttcattcctgccttttcctcaatatacaca      7800
ccatctctgcactacttcctcagaacaatcccagcagtctgggaggtactttacacaatt      7860
taagcacagagcaactgcctgtccctgctgctagtttaaacatgaaccttccaggtagcc      7920
tcttcttaaaatatacagccccagctgggcatgatggctcatgcctgtaatcctagcact      7980
ttgggaggctgaggcgggtggattacttgaggtcaggagttcgagaccacccctggccaac      8040
atggtgaaaccccatctctagtaaaaatacaaaaattagctgactttggtggcacatgcc      8100
tgtaatcccagctacttgggaagctgagacagaagagtcacttgaacctgggaaacagag      8160
gttgcagtgagccaagatcgcaccactgcactccaccctggatgacagactgaaccccat      8220
ctcaaaaaattaaaataaaataaaataaaataactatatatatagccccagctggaaatt      8280
catttctttccttattttacccattgttttctcatacaggttataagcacatgtccttg      8340
gccctgaataggactggcagaagcattgtgtactcctgtgagtggcctctttatatgtgg      8400
ccctttcaaaaggtgagatagtgagcccagaatccaatagaactgtactgatagatagaa      8460
cttgacaacaaaggaaaccaaggtctccttcaaagtccaacgttacttactatcatcctа      8520
ccatctctcccaggttccaaccacttctcaccatccccactgctgtaattatagcctaag      8580
ctaccatcacctggaaagtcatccttgtgtcttcccctttatttcaccattcatgtcctg      8640
```

FIG.1C

```
tctatcaacagtccttccaccagtatctctaaaatatctcctgaatcagcccacttcctt      8700
ccatcttcactacatgcaccctggccttccaagctactatcggctctcaaccagactgct      8760
gggaccacctgatctctctgcttccactctgtctcaacccccatctattttccaagcagc      8820
actagagttatcatattaaaatgtaaatatcagtttttttttaaagaaaaaaaccctga      8880
gacttaacagagttataaaaaatataaatgtcatcatcagttccctgcttaaaaccctta      8940
actcgcttccaattgcacttggaatgaaaccaaactgcactgatccagcccttgcctgcc      9000
tccccaaagtccaaggggtcatggctctttccctggctacactggttttctttctgtccc      9060
tcaacactgcaagcctattgctgccccagggcctttacacttgctttttttctgcctaga      9120
acagttcttccccaaagatttttaaagggccgggctccttaacattgaagtcgcagacca      9180
aacgccacatatgcagacagttcttctctaactactttaaaatagccctctgtccattca      9240
ttcttcatcacattaacctgtttaattttcttctcagagctccacactatttggaagtat      9300
ttgttgacttgttaccatgtctccccactagagtgtaagtttcatgagggcagggacctt      9360
gtctgactttgactgtatctctcgcatatggttaagtgttaaatagttatttatggaatg      9420
aatccctattattccctcattatctctgcaaaatagtctttttttctcaacatcttaaacc      9480
tgatatcccacctgcctatctacaaacttttttttgcgacagagtctcactgtcaccca      9540
ggctagagtgcagtggcgccatctcggctcactgcaacctccgcctcccgggtttaagcg      9600
attctcttgcctcagcctcccagtagctgggattataggcgtgcgctaccacatctggct      9660
aatttttgtatttttagtagagatggtttcaccatgttggccaggcttgtctcgaactcc      9720
tgacctcagatgatccacctgcctcggcctcccaaagtgctgggattacaggcatgagcc      9780
accgtgcccagcctctacaaacttttattccattaacaaactatatgctgggatttaag      9840
ttttcttaatacttgatggagtcctatgtaattttcgagcttttaatttactaagacca      9900
ttttagttctgattatagaagtaaattaactttaagggatttcaagttatatggcctact      9960
tctgaagcaaacttcttacagtgaaaattcattataagggtttagacctccttatggaga     10020
cgttcaatctgtaaactcaagagaaggctacaagtgcctcctttaaactgttttcatctc     10080
acaaggatgttagtagaaagtaaacagaagagtcatatctgttttcacagcccaattata     10140
cagaaatccgacagtactgcaatcactggcgaaattttgctgacattgatgattcctgga     10200
aaagtataaagagtatcttggactggacatcttttaaccaggagagaattgttgatgttg     10260
ctggaccaggggttggaatgacccagatatggtaaaaacttgagccctccttgttcaag     10320
accctgcggtaggcttgtttcctattttgacattcaaggtaaatacaggtaaagttcctg     10380
ggaggaggctttatgtgagagtacttagagcaggatgctgtggaaagtggtttctccata     10440
tgggtcatctaggtaactttaagaatgtttcctcctctcttgtttgaattatttcattct     10500
ttttctcagttagtgattggcaactttggcctcagctggaatcagcaagtaactcagatg     10560
gccctctgggctatcatggctgctcctttattcatgtctaatgacctccgacacatcagc     10620
cctcaagccaaagctctccttcaggataaggacgtaattgccatcaatcaggacccctg      10680
ggcaagcaagggtaccagcttagacaggtaaataagagtatatattttaagatggcttta     10740
tatacccaataccaactttgtcttgggcctaaatctatttttttcccttgctcttgatgt     10800
tactatcagtaataaagcttcttgctagaaacattacttttatttccaaaataatgctaca     10860
ggatcattttaatttttcctacaagtgcttgatagttctgacattaagaatgaatgccaa     10920
actaacagggccacttatcactagttgctaagcaaccacactttcttggtttttcaggga     10980
gacaactttgaagtgtgggaacgacctctctcaggcttagcctgggctgtagctatgata     11040
aaccggcaggagattggtggacctcgctcttataccatcgcagttgcttccctgggtaaa     11100
ggagtggcctgtaatcctgcctgcttcatcacacagctcctccctgtgaaaaggaagcta     11160
gggttctatgaatggacttcaaggttaagaagtcacataaatcccacaggcactgttttg     11220
cttcagctagaaaatacaatgcagatgtcattaaaagacttactttaaaatgtttatttt     11280
attgccaactactacttcctgtccacctttttctccattcactttaaaagctcaaggcta     11340
ggtggctcatgcctgtaatcccagcactttgggaggctgaggcgggcagatcacctgagg     11400
tcgggactttgagacccgcctggacaacatggtgaaaccccatttctaataaaaatataa     11460
aaattagccaggtgtggtggcgcacctgtggtcccagctactctgggggctgaggcatga     11520
```

FIG.1D

```
gaatcgcttgaacccgggagtggaggttgcattgagctgagatcatgccacctcactcca      11580
gcctgggcaacaaagattccatctcaaaaaaaaaaaaaaagccaggcacagtggctcatg      11640
cctggaatcccagcacttttggaagctgaggcaggcagatcacttgaggttaggatttca      11700
agaccagcctggctaacatagtaaagccctgtctctactaaaaatacaaaaattagccag      11760
gtatggtggcgagcttctgtagccccagctactcaggagactgaggcaggagaatcactt      11820
gaacccgggaagtgggggggtgcagtgacccaagatcacgccactgcattccagcctggg      11880
caacagagcaagactccatctcaaaaaaaaaaagttctatttccttgaataaaattttccg      11940
aagtttaaactttaggaataaaactattaaacccgtatttactcatccagatacccaccc      12000
cccttgttgagattctctcccaattatcaaaatgtgtagcatatttaactaccaagagct      12060
aaacatcattaagactgaaatgtattaagaaggatgtataggccaggcacggtgtctcac      12120
gcctgtaatcccaacactttgggaggccaagtcgggcggatcacgaggtcaggagatgga      12180
gaccatcctggccaacatggtgaaacccccctctctactaaaaatacaaaaattagccagg      12240
caggtggcaggcacctgtaatcccagctactccagaggctgaggcaggacaatcacttga      12300
acctgggaggcagaggctgcagtgagctgaggttgtaccaattgcactccagcctaggta      12360
acgagcaacactccatctcaaaaaaagaaaaaaaaaaagatgtataatttggaactgtta      12420
agaggcattttaaaga                                                  12436
```

FIG.1E

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

**FIG.2**

```
Atgcagctgaggaatcccgagctccacctgggctgtgctctggctctgcggttcctggcc      60
Ctcgtgtcctgggacatccctggcgctagggccctcgataacggactggcccggaccccc      120
Acaatgggatggctccactgggaaaggttcatgtgcaatctggactgtcaggaggaaccc      180
Gactcctgcatcagcgaaaagctcttcatggagatggccgagctgatggtgagcgagggc      240
Tggaaggacgccggctacgagtatctgtgcatcgatgactgctggatggcccctcaaagg      300
Gactccgaaggcaggctgcaggctgatccccaaaggtttccccacggaatccggcagctc      360
Gccaactacgtgcattccaagggcctcaagctcggcatctacgccgacgtgggcaacaaa      420
Acatgcgccggattccccggcagcttcggctactacgacatcgacgcccagacattcgct      480
Gattggggagtggacctgctgaagttcgacggctgttactgcgattccctggaaaacctg      540
Gccgacggctacaaacacatgtccctcgccctgaaccggacaggcaggtccatcgtgtac      600
Agctgcgagtggcccctgtacatgtggcctttccagaagcccaactacacagagatcagg      660
Cagtactgcaaccactggaggaacttcgctgacatcgacgactcctggaagagcatcaag      720
Agcatcctggactggaccagcttcaaccaggagaggatcgtggacgtggctggacccgga      780
Ggctggaacgaccccgatatgctggtgattggcaacttcggactgagctggaaccagcag      840
Gtgacccagatggccctgtgggccattatggccgctccctgttcatgtccaacgacctg      900
Aggcacatcagccccaggccaaggctctgctgcaggacaaggatgtgatcgccatcaac      960
Caggacccctgggcaagcagggctaccagctgaggcaaggagataacttcgaggtgtgg     1020
Gagaggccctgtccggactggcttgggccgtggccatgatcaatcggcaggagatcggc     1080
Ggaccccggtcctacaccattgctgtggccagcctgggaaaaggagtcgcctgcaacccc     1140
Gcctgcttcattacccagctgctccccgtgaagcggaagctgggcttctatgagtggacc     1200
Agcaggctgaggtcccatatcaatcctaccggcaccgtcctcctccagctcgagaatacc     1260
Atgcagatgagcctcaaggatctgctgtga                                   1290
```

**FIG.3**