

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 013 813**

51 Int. Cl.:

A61K 31/445 (2006.01)

A61P 3/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.03.2021 PCT/US2021/020984**

87 Fecha y número de publicación internacional: **10.09.2021 WO21178737**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.03.2021 E 21715035 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.12.2024 EP 4114390**

54 Título: **Métodos de tratamiento de la enfermedad de Fabry en pacientes que tienen una mutación en el gen GLA**

30 Prioridad:

06.03.2020 US 202062986297 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

15.04.2025

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**BENJAMIN, ELFRIDA y
WU, XIAOYANG**

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

ES 3 013 813 T3

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

Métodos de tratamiento de la enfermedad de Fabry en pacientes que tienen una mutación en el gen GLA

5 **CAMPO TÉCNICO**

Los principios y realizaciones de la presente invención se refieren en general al uso de chaperonas farmacológicas para el tratamiento de la enfermedad de Fabry, en particular en pacientes con mutaciones o variantes del gen de la α -galactosidasa (GLA).

10

ANTECEDENTES

Muchas enfermedades humanas son el resultado de mutaciones que provocan cambios en la secuencia de aminoácidos de una proteína que reducen su estabilidad y pueden evitar que se pliegue adecuadamente. Las proteínas por lo general se pliegan en una región específica de la célula conocida como el retículo endoplasmático o ER (por sus siglas en inglés). La célula tiene mecanismos de control de la calidad que garantizan que las proteínas se plieguen en su forma tridimensional correcta antes de que puedan alejarse del ER para dirigirse al destino apropiado en la célula, un proceso denominado generalmente tráfico de proteínas. Las proteínas plegadas de manera errónea a menudo son eliminadas por los mecanismos de control de la calidad después de haber sido retenidas en primer lugar en el ER. En ciertos casos, las proteínas plegadas de manera errónea se pueden acumular en el ER antes de ser eliminadas. La retención de las proteínas plegadas de manera errónea en el ER interrumpe su tráfico adecuado y la reducción resultante de la actividad biológica puede dar lugar a una afectación de la función celular y en última instancia a una enfermedad. Además, la acumulación de proteínas plegadas de manera errónea en el ER puede dar lugar a diversos tipos de estrés en las células, que también puede contribuir a la disfunción celular y enfermedad.

15

20

25

Dichas mutaciones pueden dar lugar a tesarismosis lisosómicas (LSD, por sus siglas en inglés), que se caracterizan por deficiencias de las enzimas lisosómicas debido a mutaciones en los genes que codifican las enzimas lisosómicas. La enfermedad resultante provoca la acumulación patológica de los sustratos de esas enzimas, que incluyen lípidos, carbohidratos y polisacáridos. Aunque existen muchos fenotipos mutantes diferentes asociados con cada LSD, muchas de las mutaciones son mutaciones de aminoácidos que pueden dar lugar a la producción de una enzima menos estable. Estas enzimas menos estables son a veces degradadas de manera prematura por la vía de degradación asociada al ER. Esto da como resultado una deficiencia enzimática en el lisosoma y la acumulación patológica del sustrato. Dichas enzimas mutantes se denominan a veces en la técnica pertinente «mutantes de plegamiento» o «mutantes conformacionales».

30

35

La enfermedad de Fabry es una LSD provocada por una mutación en el gen GLA, que codifica la enzima α -galactosidasa A (α -Gal A). α -Gal A resulta necesaria para el metabolismo de los glucoesfingolípidos. La mutación provoca que se acumule el sustrato globotriaosilceramida (GL-3) en diversos tejidos y órganos. Los hombres con la enfermedad de Fabry son hemicígotos debido a que los genes de la enfermedad están codificados por el cromosoma X. Se estima que la enfermedad de Fabry afecta a 1 de entre 40 000 y 60 000 hombres, y ocurre con menos frecuencia en las mujeres.

40

Se ha dispuesto de varias estrategias para tratar la enfermedad de Fabry. Una terapia aprobada para tratar la enfermedad de Fabry es la terapia de reemplazo enzimático (ERT, por sus siglas en inglés), que normalmente conlleva la infusión intravenosa de una forma purificada de la correspondiente proteína de tipo natural. En la actualidad se dispone de dos productos de α -Gal A para el tratamiento de la enfermedad de Fabry: agalsidasa alfa (Replagal®, Shire Human Genetic Therapies) y agalsidasa beta (Fabrazyme®, Sanofi Genzyme Corporation). Sin embargo, la ERT presenta varios inconvenientes.

45

50

r. Una de las principales complicaciones con la ERT es la rápida degradación de la proteína infundida, que da lugar a que se necesiten numerosas costosas infusiones de dosis elevada. La ERT tiene varios inconvenientes adicionales, tales como dificultades con la generación, purificación y almacenamiento de la proteína plegada de manera adecuada a gran escala; obtención de la proteína nativa glucosilada; generación de una respuesta inmunitaria anti-proteína; e incapacidad de la proteína de cruzar la barrera hematoencefálica para mitigar las patologías del sistema nervioso central (es decir, baja biodisponibilidad). Además, la enzima de reemplazo no puede penetrar en el corazón o los riñones en cantidades suficientes para reducir la acumulación de sustrato en los podocitos renales o los miocitos cardíacos, con una presencia importante en la patología de Fabry.

55

Otra estrategia para tratar algunas deficiencias enzimáticas conlleva el uso de moléculas de bajo peso molecular inhibitoras para reducir la producción del sustrato natural de las proteínas enzimáticas eficientes, para mejorar de esta manera la patología. Esta estrategia de "reducción del sustrato" se ha descrito específicamente para una clase de aproximadamente 40 LSD que incluyen tesarismosis de glucoesfingolípidos. Las moléculas de bajo peso molecular inhibitoras propuestas para su uso como terapia son específicas para inhibir las enzimas involucradas en la síntesis de glucolípidos y reducir la cantidad de glucolípido celular que es necesario que la enzima deficiente descomponga.

60

65

Una tercera estrategia para tratar la enfermedad de Fabry ha sido el tratamiento con lo que se denominan chaperonas farmacológicas (PC, por sus siglas en inglés). Tales PC incluyen moléculas de bajo peso molecular inhibitoras de α -Gal A, que se pueden unir a la α -Gal A para aumentar la estabilidad tanto de la enzima mutante como del tipo natural correspondiente. Sin embargo, los pacientes de la terapia con PC deben tener una mutación o variante sensible que dé como resultado la producción de una enzima que se pueda estabilizar y plegar en una conformación que permita el tráfico fuera del ER.

Por lo tanto, incluso cuando se diagnostica la enfermedad de Fabry detectando una deficiencia de la actividad de α -Gal A en el plasma o leucocitos periféricos (WBC, por sus siglas en inglés), resulta muy difícil, si no imposible, predecir si un paciente de Fabry particular responderá al tratamiento con una PC. Por lo tanto, sigue siendo necesario identificar nuevas mutaciones o variantes de GLA que respondan a una PC y proporcionar nuevos métodos de tratamiento a los pacientes con Fabry con estas mutaciones o variantes.

Shin *et al.* (Pharmacogenet Genomics 18(9): 773-780; 2008) tienen como objetivo predecir la respuesta de una alfa-galactosidasa A mutada a una chaperona farmacológica. Se puede encontrar la información de prescripción de Galafold en la versión de agosto de 2018 de la etiqueta de la FDA. Benjamin *et al.* (Genet Med 19(4): 430-438; 2017) describen la validación de la farmacogenética para la identificación de pacientes con Fabry que se vayan a tratar con migalastat. Sin embargo, ninguna de estas publicaciones describe la presente invención como la definen las reivindicaciones adjuntas.

SUMARIO

La presente invención está definida por las reivindicaciones adjuntas.

Un aspecto de la invención se refiere a migalastat o una sal de este para su uso en un método de tratamiento de un paciente diagnosticado con la enfermedad de Fabry. El método comprende administrar al paciente una dosis terapéuticamente eficaz de esta chaperona farmacológica para α -Gal A, en donde el paciente tiene una mutación de aminoácido de la secuencia de ácido nucleico que codifica α -Gal A. La mutación es A29D, R38S, N53Y, Y88C, V124G, I133F, A143V, Y152N, F159C, A160D, D165N, F169I, L180V, D182G, R196T, W209R, A257T, P259S, G271A, S276T, M290V, A291S, I303T, I303V, L310V, G360A, G360R, G375A, L394P, G411S, o N419D.

En diversas realizaciones, estas mutaciones son relativas a la SEQ ID NO: 2. En una o más realizaciones, la mutación es A29D relativa a la SEQ ID NO: 2. En una o más realizaciones, la mutación es R38S relativa a la SEQ ID NO: 2. En una o más realizaciones, la mutación es N53Y relativa a la SEQ ID NO: 2. En una o más realizaciones, la mutación es Y88C relativa a la SEQ ID NO: 2. En una o más realizaciones, la mutación es V124G relativa a la SEQ ID NO: 2. En una o más realizaciones, la mutación es I133F relativa a la SEQ ID NO: 2. En una o más realizaciones, la mutación es A143V relativa a la SEQ ID NO: 2. En una o más realizaciones, la mutación es Y152N relativa a la SEQ ID NO: 2. En una o más realizaciones, la mutación es F159C relativa a la SEQ ID NO: 2. En una o más realizaciones, la mutación es A160D relativa a la SEQ ID NO: 2. En una o más realizaciones, la mutación es D165N relativa a la SEQ ID NO: 2. En una o más realizaciones, la mutación es F169I relativa a la SEQ ID NO: 2. En una o más realizaciones, la mutación es L180V relativa a la SEQ ID NO: 2. En una o más realizaciones, la mutación es D182G relativa a la SEQ ID NO: 2. En una o más realizaciones, la mutación es R196T relativa a la SEQ ID NO: 2. En una o más realizaciones, la mutación es W209R relativa a la SEQ ID NO: 2. En una o más realizaciones, la mutación es A257T relativa a la SEQ ID NO: 2. En una o más realizaciones, la mutación es P259S relativa a la SEQ ID NO: 2. En una o más realizaciones, la mutación es G271A relativa a la SEQ ID NO: 2. En una o más realizaciones, la mutación es S276T relativa a la SEQ ID NO: 2. En una o más realizaciones, la mutación es M290V relativa a la SEQ ID NO: 2. En una o más realizaciones, la mutación es A291S relativa a la SEQ ID NO: 2. En una o más realizaciones, la mutación es I303T relativa a la SEQ ID NO: 2. En una o más realizaciones, la mutación es I303V relativa a la SEQ ID NO: 2. En una o más realizaciones, la mutación es L310V relativa a la SEQ ID NO: 2. En una o más realizaciones, la mutación es G360A relativa a la SEQ ID NO: 2. En una o más realizaciones, la mutación es G360R relativa a la SEQ ID NO: 2. En una o más realizaciones, la mutación es G375A relativa a la SEQ ID NO: 2. En una o más realizaciones, la mutación es L394P relativa a la SEQ ID NO: 2. En una o más realizaciones, la mutación es G411S relativa a la SEQ ID NO: 2. En una o más realizaciones, la mutación es N419D relativa a la SEQ ID NO: 2.

La chaperona farmacológica comprende migalastat o una sal de este. En una o más realizaciones, la dosis de migalastat o sal de este es de aproximadamente 100 mg a aproximadamente 150 mg de equivalente de base libre (FBE, por sus siglas en inglés). En otras realizaciones, la sal de migalastat es clorhidrato de migalastat. Por lo tanto, en una o más realizaciones, la dosis es de aproximadamente 150 mg en días alternos de clorhidrato de migalastat o una dosis equivalente de migalastat o de una sal de este diferente de la sal de clorhidrato. En algunas realizaciones, el migalastat o una sal de este se administra por vía oral o por inyección. Estas realizaciones se pueden combinar entre sí o con otras realizaciones de la invención, por ejemplo, realizaciones relacionadas con la chaperona farmacológica para α -Gal A para su uso en el tratamiento de un paciente diagnosticado con la enfermedad de Fabry, así como realizaciones relacionadas con mutaciones sensibles, PC adecuadas y dosis, formulaciones y vías de administración de estas.

En otro aspecto, el método de la invención potencia la α -Gal A en un paciente al que se le ha diagnosticado o que se sospecha que padece la enfermedad de Fabry. El método comprende administrar a un paciente una dosis terapéuticamente eficaz de una chaperona farmacológica para α -Gal A, en donde el paciente tiene una mutación de aminoácido en la secuencia de ácido nucleico que codifica α -Gal A. La mutación es A29D, R38S, N53Y, Y88C, V124G, I133F, A143V, Y152N, F159C, A160D, D165N, F169I, L180V, D182G, R196T, W209R, A257T, P259S, G271A, S276T, M290V, A291S, I303T, I303V, L310V, G360A, G360R, G375A, L394P, G411S, o N419D.

En diversas realizaciones, estas mutaciones son relativas a la SEQ ID NO: 2. En una o más realizaciones, la mutación es A29D relativa a la SEQ ID NO: 2. En una o más realizaciones, la mutación es R38S relativa a la SEQ ID NO: 2. En una o más realizaciones, la mutación es N53Y relativa a la SEQ ID NO: 2. En una o más realizaciones, la mutación es Y88C relativa a la SEQ ID NO: 2. En una o más realizaciones, la mutación es V124G relativa a la SEQ ID NO: 2. En una o más realizaciones, la mutación es I133F relativa a la SEQ ID NO: 2. En una o más realizaciones, la mutación es A143V relativa a la SEQ ID NO: 2. En una o más realizaciones, la mutación es Y152N relativa a la SEQ ID NO: 2. En una o más realizaciones, la mutación es F159C relativa a la SEQ ID NO: 2. En una o más realizaciones, la mutación es A160D relativa a la SEQ ID NO: 2. En una o más realizaciones, la mutación es D165N relativa a la SEQ ID NO: 2. En una o más realizaciones, la mutación es F169I relativa a la SEQ ID NO: 2. En una o más realizaciones, la mutación es L180V relativa a la SEQ ID NO: 2. En una o más realizaciones, la mutación es D182G relativa a la SEQ ID NO: 2. En una o más realizaciones, la mutación es R196T relativa a la SEQ ID NO: 2. En una o más realizaciones, la mutación es W209R relativa a la SEQ ID NO: 2. En una o más realizaciones, la mutación es A257T relativa a la SEQ ID NO: 2. En una o más realizaciones, la mutación es P259S relativa a la SEQ ID NO: 2. En una o más realizaciones, la mutación es G271A relativa a la SEQ ID NO: 2. En una o más realizaciones, la mutación es S276T relativa a la SEQ ID NO: 2. En una o más realizaciones, la mutación es M290V relativa a la SEQ ID NO: 2. En una o más realizaciones, la mutación es A291S relativa a la SEQ ID NO: 2. En una o más realizaciones, la mutación es I303T relativa a la SEQ ID NO: 2. En una o más realizaciones, la mutación es I303V relativa a la SEQ ID NO: 2. En una o más realizaciones, la mutación es L310V relativa a la SEQ ID NO: 2. En una o más realizaciones, la mutación es G360A relativa a la SEQ ID NO: 2. En una o más realizaciones, la mutación es G360R relativa a la SEQ ID NO: 2. En una o más realizaciones, la mutación es G375A relativa a la SEQ ID NO: 2. En una o más realizaciones, la mutación es L394P relativa a la SEQ ID NO: 2. En una o más realizaciones, la mutación es G411S relativa a la SEQ ID NO: 2. En una o más realizaciones, la mutación es N419D relativa a la SEQ ID NO: 2.

La chaperona farmacológica comprende migalastat o una sal de este. En una o más realizaciones, la dosis de migalastat o sal de este es de aproximadamente 100 mg a aproximadamente 150 mg de equivalente de FBE. En otras realizaciones, la sal de migalastat es clorhidrato de migalastat. Por lo tanto, en una o más realizaciones, la dosis es de aproximadamente 150 mg en días alternos de clorhidrato de migalastat o una dosis equivalente de migalastat o de una sal de este diferente de la sal de clorhidrato. En algunas realizaciones, el migalastat o una sal de este se administra por vía oral o por inyección. Estas realizaciones se pueden combinar entre sí o con otras realizaciones de la invención, por ejemplo, realizaciones relacionadas con la chaperona farmacológica para α -Gal A para su uso en el tratamiento de un paciente diagnosticado con la enfermedad de Fabry, así como realizaciones relacionadas con mutaciones susceptibles, PC adecuadas y dosis, formulaciones y vías de administración de estas.

Otro aspecto de la invención se refiere a migalastat o una sal de este para su uso en el tratamiento de un paciente diagnosticado con la enfermedad de Fabry, en donde el paciente tiene una mutación de aminoácido en la secuencia de ácido nucleico que codifica α -Gal A. La mutación es A29D, R38S, N53Y, Y88C, V124G, I133F, A143V, Y152N, F159C, A160D, D165N, F169I, L180V, D182G, R196T, W209R, A257T, P259S, G271A, S276T, M290V, A291S, I303T, I303V, L310V, G360A, G360R, G375A, L394P, G411S, o N419D.

En diversas realizaciones, estas mutaciones son relativas a la SEQ ID NO: 2. En una o más realizaciones, la mutación es A29D relativa a la SEQ ID NO: 2. En una o más realizaciones, la mutación es R38S relativa a la SEQ ID NO: 2. En una o más realizaciones, la mutación es N53Y relativa a la SEQ ID NO: 2. En una o más realizaciones, la mutación es Y88C relativa a la SEQ ID NO: 2. En una o más realizaciones, la mutación es V124G relativa a la SEQ ID NO: 2. En una o más realizaciones, la mutación es I133F relativa a la SEQ ID NO: 2. En una o más realizaciones, la mutación es A143V relativa a la SEQ ID NO: 2. En una o más realizaciones, la mutación es Y152N relativa a la SEQ ID NO: 2. En una o más realizaciones, la mutación es F159C relativa a la SEQ ID NO: 2. En una o más realizaciones, la mutación es A160D relativa a la SEQ ID NO: 2. En una o más realizaciones, la mutación es D165N relativa a la SEQ ID NO: 2. En una o más realizaciones, la mutación es F169I relativa a la SEQ ID NO: 2. En una o más realizaciones, la mutación es L180V relativa a la SEQ ID NO: 2. En una o más realizaciones, la mutación es D182G relativa a la SEQ ID NO: 2. En una o más realizaciones, la mutación es R196T relativa a la SEQ ID NO: 2. En una o más realizaciones, la mutación es W209R relativa a la SEQ ID NO: 2. En una o más realizaciones, la mutación es A257T relativa a la SEQ ID NO: 2. En una o más realizaciones, la mutación es P259S relativa a la SEQ ID NO: 2. En una o más realizaciones, la mutación es G271A relativa a la SEQ ID NO: 2. En una o más realizaciones, la mutación es S276T relativa a la SEQ ID NO: 2. En una o más realizaciones, la mutación es M290V relativa a la SEQ ID NO: 2. En una o más realizaciones, la mutación es A291S relativa a la SEQ ID NO: 2. En una o más realizaciones, la mutación es I303T relativa a la SEQ ID NO: 2. En una o más realizaciones, la mutación es I303V relativa a la SEQ ID NO: 2. En una o más realizaciones, la mutación es L310V relativa a la SEQ ID NO: 2. En una o más realizaciones, la mutación es G360A relativa a la SEQ ID NO: 2. En una o más realizaciones, la mutación es G360R relativa a la SEQ ID NO: 2. En una o más realizaciones, la mutación es G375A relativa a la SEQ ID NO: 2. En una o más realizaciones, la mutación es L394P relativa a la SEQ ID NO: 2.

En una o más realizaciones, la mutación es G411S relativa a la SEQ ID NO: 2. En una o más realizaciones, la mutación es N419D relativa a la SEQ ID NO: 2.

La chaperona farmacológica comprende migalastat o una sal de este. En una o más realizaciones, la dosis de migalastat o sal de este es de aproximadamente 100 mg a aproximadamente 150 mg de equivalente de FBE. En otras realizaciones, la sal de migalastat es clorhidrato de migalastat. Por lo tanto, en una o más realizaciones, la dosis es de aproximadamente 150 mg en días alternos de clorhidrato de migalastat o una dosis equivalente de migalastat o de una sal de este diferente de la sal de clorhidrato. En algunas realizaciones, el migalastat o una sal de este se administra por vía oral o por inyección. Estas realizaciones se pueden combinar entre sí o con otras realizaciones de la invención, por ejemplo, realizaciones relacionadas con realizaciones que se refieren a mutaciones sensibles, PC adecuadas y dosis, formulaciones y vías de administración de estas.

A continuación se enumeran diversas realizaciones. Se entenderá que las realizaciones enumeradas a continuación pueden combinarse no solo como se enumera a continuación, sino en otras combinaciones adecuadas de acuerdo con el alcance de la invención.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

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

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

la FIG. 3 muestra la secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína α -Gal A de tipo natural (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 pasos de procedimiento expuestos en la siguiente descripción. La invención admite otras realizaciones y puede ser puesta en práctica o llevada a cabo de diversas maneras.

La invención se basa en la identificación de nuevas mutaciones de GLA en pacientes con Fabry que responderán al tratamiento con chaperonas farmacológicas. La invención se refiere al tratamiento de estos pacientes con Fabry. Por ejemplo, se ha descubierto inesperadamente que la baja actividad de α -Gal A resultado de las mutaciones de aminoácido A29D, R38S, N53Y, Y88C, V124G, I133F, A143V, Y152N, F159C, A160D, D165N, F169I, L180V, D182G, R196T, W209R, A257T, P259S, G271A, S276T, M290V, A291S, I303T, I303V, L310V, G360A, G360R, G375A, L394P, G411S, o N419D en α -Gal A puede aumentarse cuando se expone a chaperonas farmacológicas. En consecuencia, los pacientes con estas mutaciones responderán al tratamiento con chaperonas farmacológicas.

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 analizan a continuación, o en otra parte en la memoria descriptiva, para proporcionar una guía adicional al facultativo al describir las composiciones y métodos de la invención, y cómo prepararlos y usarlos.

La expresión «enfermedad de Fabry» se refiere a un error congénito vinculado al cromosoma X del catabolismo de glucoesfingolípidos debido a una actividad lisosómica deficiente de α -Gal A. Este defecto provoca la acumulación del sustrato globotriaosilceramida («GL-3», también conocido como Gb₃ o trihexósido de ceramida) y glucoesfingolípidos relacionados en los lisosomas endoteliales vasculares del corazón, los riñones, la piel y otros tejidos. Otro sustrato de la enzima es la globotriaosilesfingosina plasmática («Iso-Gbs plasmática»).

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 celulares. 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 del que se sospecha que padece una enfermedad particular. El paciente puede ser un ser humano o un animal.

Un «paciente con Fabry» se refiere a un individuo a quien se le ha diagnosticado o del que 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 hemicígotos masculinos y portadores femeninos con la misma prevalencia, aunque las mujeres normalmente se ven afectadas con menor gravedad.

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 el N.º de acceso X14448.1, y se muestra en las FIGS. 1A-E (SEQ ID NO: 1). La enzima α -Gal A humana consiste en 429 aminoácidos y está disponible

en GenBank con los N.^{os} de acceso X14448.1 y U78027 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).

5 La expresión «proteína mutante» incluye una proteína que tiene una mutación en el gen que codifica la proteína que da lugar a la incapacidad de la proteína para alcanzar una conformación estable en las condiciones normalmente presentes en el ER. La incapacidad de alcanzar una conformación estable da lugar a que una cantidad sustancial de la enzima se degrade, en lugar de ser transportada al lisosoma. Dicha mutación se denomina a veces «mutante conformacional». Dichas mutaciones incluyen, pero no se limitan a, mutaciones de aminoácido y pequeñas deleciones e inserciones dentro del marco de lectura. Tal como se utiliza en el presente documento, las deleciones se indican mediante la abreviatura «del» y las inserciones se indican mediante la abreviatura «ins». Por lo tanto, el cambio de nucleótido «c.184_185insTAG» se refiere a una inserción de la secuencia de nucleótidos TAG entre los nucleótidos 184 y 185 y el cambio de secuencia de proteína «S62delinsLA» se refiere a una delección del aminoácido S (serina) en la posición 62 y una inserción de la secuencia de aminoácidos LA (leucina y alanina).

15 Tal como se utiliza en el presente documento 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 ER. La incapacidad de alcanzar una conformación estable da lugar a que una cantidad sustancial de la enzima se degrade, en lugar de ser transportada al lisosoma.

20 Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión «chaperona farmacológica específica» («SPC», por sus siglas en inglés) o «chaperona farmacológica» («PC») se refiere a cualquier molécula, incluida una molécula de bajo peso molecular, proteína, péptido, ácido nucleico, carbohidrato, etc., que se une específicamente a una proteína y tiene uno o más de los siguientes efectos: (i) potencia la formación de una conformación molecular estable de la proteína; (ii) induce el tráfico de la proteína desde el ER a otra ubicación celular, preferentemente una ubicación celular nativa, es decir, previene la degradación de la proteína asociada al ER; (iii) previene la agregación de proteínas mal plegadas; y/o (iv) restaura o potencia al menos parcialmente la función y/o actividad de tipo natural de la proteína. Un compuesto que se une específicamente a, p. ej., α-Gal A, significa que se une y ejerce un efecto de chaperona sobre la enzima y no sobre un grupo genérico de enzimas relacionadas o no relacionadas. Más específicamente, esta expresión no se refiere a chaperonas endógenas, tales como BiP, ni a agentes no específicos que han mostrado actividad de chaperona no específica contra diversas proteínas, tales como el glicerol, el DMSO o el agua deuterada, es decir, chaperonas químicas. En una o más realizaciones de la presente invención, la PC puede ser un inhibidor competitivo reversible. La PC de la invención es migalastat o una sal de este. En una realización, la PC es base libre de migalastat (p. ej., 123 mg de base libre de migalastat). En otra realización más, la PC es una sal de migalastat (p. ej., 150 mg de migalastat-HCl).

35 Un «inhibidor competitivo» de una enzima puede referirse a un compuesto que se asemeja estructuralmente a la estructura química y la geometría molecular del sustrato de la enzima y se une 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, y aumenta así la Km. La inhibición competitiva suele ser reversible si están disponibles suficientes moléculas de sustrato 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 de inhibidor, la concentración de sustrato y las afinidades relativas del inhibidor y el sustrato por el sitio activo.

45 Tal como se utiliza en el presente documento, 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 residuos 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, p. ej., 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 residuos de aminoácidos de una proteína que interactúan con cualquier chaperona farmacológica dada pueden o no estar dentro del «sitio activo» de la proteína. La unión específica puede evaluarse mediante ensayos de unión rutinarios o mediante estudios estructurales, p. ej., cocristalización, RMN y similares. El sitio activo de la α-Gal A es el sitio de unión del sustrato.

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

55 Tal como se utiliza en el presente documento, las expresiones «potenciar la actividad de α-Gal A» o «aumentar la actividad de α-Gal A» se refieren 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, respecto a la cantidad en una célula (preferentemente del mismo tipo celular o la misma célula, p. ej., en un momento anterior) no en contacto con la chaperona farmacológica específica para la α-Gal A. Esta expresión también se refiere al aumento del tráfico de α-Gal A al lisosoma en una célula en contacto con una chaperona farmacológica específica para la α-Gal A, respecto al tráfico de α-Gal A no en contacto con la chaperona farmacológica específica para la proteína. Estos términos se refieren a α-Gal A tanto de tipo natural como mutante. En una realización, el aumento de la cantidad de α-Gal A en la

célula se mide midiendo 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.

5 La expresión «actividad de α -Gal A» se refiere a la función fisiológica normal de una α -Gal A de tipo natural en una célula. Por ejemplo, actividad de α -Gal A incluye hidrólisis de GL-3.

10 Un «paciente que responde» es un individuo diagnosticado con, o del que se sospecha que tiene, una tesaurismosis lisosómica, tal como por ejemplo, enfermedad de Fabry, cuyas células exhiben un aumento suficiente de la actividad de α -Gal A, respectivamente, y/o una mejoría de síntomas o una mejora en los marcadores indirectos, en respuesta al contacto con una PC. Ejemplos no limitantes de mejoras en marcadores indirectos de Fabry son la liso-Gb₃ y los divulgados en la Publicación de Solicitud de Patente de EE. UU. N.º US 2010-0113517.

15 Los ejemplos no limitantes de mejoras en marcadores indirectos de la enfermedad de Fabry divulgados en el documento US 2010/0113517 incluyen aumentos en los niveles o la actividad de α -Gal A en células (p. ej., fibroblastos) y tejido; reducciones en la acumulación de GL-3; reducción de las concentraciones plasmáticas de homocisteína y molécula de adhesión celular vascular-1 (VCAM-1, por sus siglas en inglés); disminución de la acumulación de GL-3 dentro de células miocárdicas y fibrocitos valvulares; reducción en liso-Gb₃ en plasma; reducción de la hipertrofia cardíaca (especialmente del ventrículo izquierdo), mejora de la insuficiencia valvular y arritmias; mejora de la proteinuria; disminución de las concentraciones urinarias de lípidos tales como CTH, lactosilceramida, ceramida, y aumento de las concentraciones en orina de glucosilceramida y esfingomielina; la ausencia de cuerpos de inclusión laminados (cuerpos cebra) en células epiteliales glomerulares; mejoras de 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 acúfenos. Las mejoras en los síntomas neurológicos incluyen la prevención del accidente isquémico transitorio (TIA, por sus siglas en inglés) o el ictus; y la mejora del dolor neuropático que se manifiesta como acroparestesia (ardor u hormigueo en las extremidades). Otro tipo de marcador clínico que puede evaluarse en la enfermedad de Fabry es la prevalencia de manifestaciones cardiovasculares perjudiciales. Los signos y síntomas cardíacos más comunes de la enfermedad de Fabry incluyen hipertrofia ventricular izquierda, valvulopatía (especialmente prolapso y/o regurgitación de la válvula mitral), arteriopatía coronaria prematura, angina de pecho, infarto de miocardio, anomalías de la conducción, arritmias, 20 insuficiencia cardíaca congestiva.

La dosis que logra una o más de las respuestas mencionadas anteriormente es una «dosis terapéuticamente eficaz».

35 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, tal como se utiliza en el presente documento, 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, tales como agua y aceites. Como portadores se emplean preferentemente soluciones salinas acuosas o en agua y soluciones acuosas de dextrosa y glicerol, en particular para soluciones inyectables. En «Remington's Pharmaceutical Sciences» de E. W. Martin, 18.ª edición, u otras ediciones, se describen portadores farmacéuticos adecuados.

45 Tal como se utiliza en el presente documento, el término «aislado» significa que el material referenciado se elimina del entorno en el que normalmente se encuentra. Por tanto, un material biológico aislado puede estar exento 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 preferentemente del cromosoma en el que se pueda encontrar y más preferentemente ya no está unido a regiones no reguladoras, no codificantes, o a otros genes situados en dirección 5' o en dirección 3' 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 50 recombinante es un ácido nucleico aislado. Una proteína aislada se puede asociar a otras proteínas o 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 purificarse, pero no es necesario que lo esté.

60 Los términos «alrededor de» y «aproximadamente» significarán generalmente un grado aceptable de error para la cantidad medida, dada la naturaleza o la precisión de las medidas. Los grados de error típicos ejemplares están dentro de un 20 por ciento (%), preferentemente dentro de un 10 %, y más preferentemente dentro de un 5 % de un valor o intervalo de valores dado. Como alternativa, y en particular en los sistemas biológicos, la expresión «alrededor de» y el término «aproximadamente» pueden significar valores medios que están dentro de un orden de magnitud, 65 preferentemente dentro de 10 o 5 veces, y más preferentemente dentro de 2 veces un valor dado. Las cantidades numéricas proporcionadas en el presente documento son aproximadas a menos que se indique lo contrario, lo que

significa que la expresión «alrededor de» o el término «aproximadamente» se puede inferir cuando no se indica expresamente.

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 más adelante). El término se refiere también a la introducción de una enzima purificada en un individuo que por lo demás requeriría o se beneficiaría de la administración de una enzima purificada, p. ej., si sufre de insuficiencia enzimática. La enzima introducida puede ser una enzima purificada recombinante producida *in vitro*, o una proteína purificada a partir de tejido o líquido aislado, tal como, p. ej., placenta o leche animal, o a partir de plantas.

Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión «equivalente de base libre» o «FBE» se refiere a la cantidad de migalastat presente en el migalastat o sal de este. En otras palabras, el término «FBE» se refiere a 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 clorhidrato, 150 mg de clorhidrato de migalastat solo 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 de este (p. ej., migalastat HCl), a menos que se indique específicamente lo contrario.

Los términos «mutación» y «variante» (p. ej., como en «mutación o variante sensible») se refieren a un cambio en la secuencia de nucleótidos de un gen o un cromosoma. Los dos términos a los que se hace referencia en el presente documento normalmente se utilizan juntos (p. ej., como en «mutación o variante»), haciendo referencia al cambio en la secuencia de nucleótidos señalado en la oración anterior. Si por alguna razón sólo se cita uno de los dos términos, se pretende incluir el término que falta, y así debe entenderse. Además, las expresiones «mutación sensible» y «variante sensible» se refieren a una mutación o variante que es sensible a la terapia con PC, p. ej., una mutación que es sensible a terapia con migalastat. Un tipo particular de mutación o variante sensible es una «mutación o variante sensible al ensayo HEK», que es una mutación o variante que se determina como sensible al tratamiento con migalastat según los criterios del ensayo HEK *in vitro* descrito en el presente documento.

Enfermedad de Fabry

La enfermedad de Fabry es una tesarismosis lisosómica vinculada al cromosoma X poco frecuente, progresiva y muy grave. 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. A partir de una edad temprana, la reducción de la actividad de la α -Gal A da como resultado una acumulación de glucoesfingolípidos, que incluyen GL-3 y liso-Gb₃ plasmáticas, y da lugar a los síntomas y las secuelas incapacitantes de la enfermedad de Fabry, incluidos dolor, 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 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 de 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 heterocigotas 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 1000 mutaciones de GLA causantes de la enfermedad de Fabry. Aproximadamente un 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 plegadas de manera anómala 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 retículo endoplásmico bloquean el tránsito de estas proteínas anómalas a los lisosomas y las señalan para su degradación y eliminación prematuras. Muchas formas con mutaciones de aminoácido son dianas de 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 del paciente. La mayoría de los pacientes tratados actualmente se denominan pacientes con la enfermedad de Fabry clásica, la mayoría de los cuales son varones. Estos pacientes padecen la enfermedad en varios órganos, incluidos los riñones, el corazón y el cerebro, y los síntomas de la enfermedad aparecen 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 hombres y mujeres sin diagnosticar que presentan una serie de síntomas de la enfermedad de Fabry, tales como deterioro de la función cardíaca o renal e ictus, que suelen aparecer por primera vez en la edad adulta. Los individuos con este tipo de

5 enfermedad de Fabry, denominada enfermedad de Fabry de inicio tardío, tienden a tener niveles residuales de α -GAL más elevados que los pacientes con enfermedad de Fabry clásica. Los individuos con enfermedad de Fabry de inicio tardío experimentan normalmente los primeros síntomas de la enfermedad en la edad adulta, y a menudo tienen síntomas de la enfermedad centrados en un solo órgano, tales como el agrandamiento del ventrículo izquierdo o la insuficiencia renal progresiva. Además, la enfermedad de Fabry de inicio tardío también puede presentarse en forma de ictus de causa desconocida.

10 Los pacientes con enfermedad de Fabry tienen insuficiencia renal progresiva y los pacientes no tratados presentan insuficiencia renal terminal en la quinta década de vida. La deficiencia en la actividad de α -Gal A conduce a la acumulación de GL-3 y glucoesfingolípidos relacionados en muchos tipos de células, incluidas las células del 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.

15 Debido a que la enfermedad de Fabry es poco común, afecta múltiples órganos, comienza en un amplio intervalo de edad, y es heterogénea, el diagnóstico adecuado es complicado. 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 basándose en una disminución de la actividad de α -Gal A en el plasma o en los leucocitos periféricos (WBC) 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, algunas portadoras obligadas (hijas de varones con afectación clásica) tienen actividades de la enzima α -Gal A que oscilan de normales a muy bajas. Dado que las portadoras pueden tener una actividad normal de la enzima α -Gal A en los leucocitos, solo la identificación de una mutación α -Gal A mediante pruebas genéticas proporciona una identificación y/o diagnóstico preciso de la portadora.

25 Además, tal como se ha descrito anteriormente, la edad de inicio, progresión y gravedad de la enfermedad de Fabry depende al menos parcialmente de la tasa de acumulación del sustrato, que se correlaciona con la actividad enzimática en lisosomas. Por lo tanto, una falta completa de actividad residual puede corresponder a una rápida acumulación de sustrato y, por lo tanto, una forma más grave de la enfermedad (que tiene inicio temprano y progresión rápida). Sin embargo, incluso pequeñas cantidades de actividad residual pueden ser suficientes para degradar grandes cantidades de sustrato. Esto a su vez conduciría a una enfermedad más leve con un inicio posterior y una progresión más lenta debido a la acumulación lenta de sustrato. Teniendo en cuenta estos factores, se cree que incluso aumentos modestos en la actividad enzimática pueden reducir el efecto de un fenotipo clínico grave. Los datos sugieren que para la mayoría de las LSD, se ha estimado que tan solo de un 1 % a un 6 % de la actividad normal es suficiente para retrasar o prevenir el inicio de la enfermedad o dar lugar a una forma más leve de la enfermedad. Es decir, simplemente pequeños aumentos en la actividad podrían tener un impacto significativo en los niveles de sustrato, y por lo tanto la gravedad de la enfermedad y la velocidad de progresión de la enfermedad. Por el contrario, se espera que una enzima lisosómica mutante que no muestra respuesta *in vitro* tampoco responda *in vivo*.

40 En una o más realizaciones, las formas mutantes o variantes de α -Gal A que se consideran sensibles a migalastat se definen como aquellas que muestran un aumento relativo (+10 μ M de migalastat) de $\geq 1,20$ veces y un aumento absoluto (+10 μ M de migalastat) $\geq 3,0$ % del tipo natural 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, por sus siglas en inglés) (ensayo de sensibilidad a migalastat o GLP HEK). Dichas mutaciones también se denominan en el presente documento mutaciones o variantes «sensibles al ensayo HEK».

50 Se han proporcionado métodos de cribado previos que evalúan la mejora enzimática antes del inicio del tratamiento. Por ejemplo, se ha utilizado un ensayo clínico que utiliza células HEK-293 en ensayos clínicos para predecir si una mutación dada responderá al tratamiento con la chaperona farmacológica (p. ej., migalastat). En este ensayo, se crean constructos de ADNc. Las formas mutantes de α -Gal A correspondientes se expresan de manera transitoria en células HEK-293. Después, las células se incuban \pm migalastat (17 nM a 1 mM) durante de 4 a 5 días. Posteriormente, se miden los niveles de α -Gal A en lisados celulares utilizando un sustrato fluorógeno sintético (4-MU- α -Gal) o mediante inmunoelectrotransferencia. Esto se ha hecho para mutaciones conocidas de aminoácido o pequeñas inserciones/deleciones en el marco de lectura que causan enfermedades. Las mutaciones que se han identificado previamente como con respuesta a una PC (p. ej., migalastat) usando estos métodos se enumeran en la Pat. de EE. UU. N.º 8 592 362

60 Las mutaciones sensibles de ensayo HEK incluyen al menos aquellas mutaciones enumeradas en una tabla de referencia farmacológica (p. ej., las que se mencionan en las etiquetas de productos estadounidenses o internacionales para un producto de migalastat tal como GALAFOLD®). Tal como se utiliza en el presente documento, «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 (p. ej., GALAFOLD®) o en un sitio web al que pueden acceder los profesionales sanitarios, que transmite si una mutación o variante particular responde a la terapia con la PC migalastat (p. ej., 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 sensibles. En otra realización, una «tabla de

referencia farmacológica» se refiere a un depósito actualizado de mutaciones o variantes sensibles que incluye las mutaciones o variantes novedosas divulgadas en el presente documento (es decir, A29D, R38S, N53Y, Y88C, V124G, I133F, A143V, Y152N, F159C, A160D, D165N, F169I, L180V, D182G, R196T, W209R, A257T, P259S, G271A, S276T, M290V, A291S, I303T, I303V, L310V, G360A, G360R, G375A, L394P, G411S, o N419D). Se puede encontrar una tabla de referencia farmacológica ejemplar para mutaciones sensibles al 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

5 Sin embargo, como solo ciertas mutaciones son sensibles al tratamiento con migalastat, resulta necesario identificar nuevas mutaciones y determinar si tales mutaciones son sensibles a la terapia con migalastat. Como se describe en el Ejemplo más adelante, se han identificado varias mutaciones nuevas y se ha determinado que son mutaciones que son sensibles a la terapia con migalastat. Estas mutaciones incluyen A29D, R38S, N53Y, Y88C, V124G, I133F, A143V, Y152N, F159C, A160D, D165N, F169I, L180V, D182G, R196T, W209R, A257T, P259S, G271A, S276T, M290V, A291S, I303T, I303V, L310V, G360A, G360R, G375A, L394P, G411S, y N419D.

10 Por consiguiente, en una o más realizaciones, se usa migalastat para tratar la enfermedad de Fabry y/o potenciar la actividad de α -Gal A en un paciente que tiene una mutación de α -Gal A seleccionada del grupo que consiste en: A29D, R38S, N53Y, Y88C, V124G, I133F, A143V, Y152N, F159C, A160D, y D165N. En una o más realizaciones, se usa migalastat para tratar la enfermedad de Fabry y/o potenciar la actividad de α -Gal A en un paciente que tiene una mutación de α -Gal A seleccionada del grupo que consiste en: F169I, L180V, D182G, R196T, W209R, A257T, P259S, G271A, S276T, y M290V. En una o más realizaciones, se usa migalastat para tratar la enfermedad de Fabry y/o potenciar la actividad de α -Gal A en un paciente que tiene una mutación de α -Gal A seleccionada del grupo que consiste en: A291S, I303T, I303V, L310V, G360A, G360R, G375A, L394P, G411S, y N419D.

20 En una o más realizaciones, el paciente tiene la mutación A29D. En una o más realizaciones, el paciente tiene la mutación R38S. En una o más realizaciones, el paciente tiene la mutación N53Y. En una o más realizaciones, el paciente tiene la mutación Y88C. En una o más realizaciones, el paciente tiene la mutación I133F. En una o más realizaciones, el paciente tiene la mutación V124G. En una o más realizaciones, el paciente tiene la mutación A143V. En una o más realizaciones, el paciente tiene la mutación Y152N. En una o más realizaciones, el paciente tiene la mutación F159C. En una o más realizaciones, el paciente tiene la mutación A160D. En una o más realizaciones, el paciente tiene la mutación D165N. En una o más realizaciones, el paciente tiene la mutación F169I. En una o más realizaciones, el paciente tiene la mutación L180V. En una o más realizaciones, el paciente tiene la mutación D182G. En una o más realizaciones, el paciente tiene la mutación R196T. En una o más realizaciones, el paciente tiene la mutación W209R. En una o más realizaciones, el paciente tiene la mutación A257T. En una o más realizaciones, el paciente tiene la mutación P259S. En una o más realizaciones, el paciente tiene la mutación G271A. En una o más realizaciones, el paciente tiene la mutación S276T. En una o más realizaciones, el paciente tiene la mutación M290V. En una o más realizaciones, el paciente tiene la mutación A291S. En una o más realizaciones, el paciente tiene la mutación I303T. En una o más realizaciones, el paciente tiene la mutación I303V. En una o más realizaciones, el paciente tiene la mutación L310V. En una o más realizaciones, el paciente tiene la mutación G360A. En una o más realizaciones, el paciente tiene la mutación G360R. En una o más realizaciones, el paciente tiene la mutación G375A. En una o más realizaciones, el paciente tiene la mutación L394P. En una o más realizaciones, el paciente tiene la mutación G411S. En una o más realizaciones, el paciente tiene la mutación N419D. En varias realizaciones, estas mutaciones de α -Gal A son relativas a la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 2.

45 Los cambios de nucleótidos ejemplares asociados con estas mutaciones novedosas se muestran en la Tabla 1 a continuación:

50 Tabla 1: Mutaciones novedosas sensibles a migalastat

Cambio de nucleótidos	Cambio en la secuencia de proteínas
c.86C>A	A29D
c.114G>C	R38S
c.157A>T	N53Y
c.263A>G	Y88C
c.371T>G	V124G
c.397A>T	I133F
c.428C>T	A143V
c.454T>A	Y152N
c.476T>G	F159C

ES 3 013 813 T3

Cambio de nucleótidos	Cambio en la secuencia de proteínas
c.479C>A	A160D
c.493G>A	D165N
c.505T>A	F169I
c.538T>G	L180V
c.545A>G	D182G
c.587G>C	R196T
c.625T>A	W209R
c.769G>A	A257T
c.775C>T	P259S
c.812G>C	G271A
c.827G>C	S276T
c.868A>G	M290V
c.871G>T	A291S
c.908T>C	I303T
c.907A>G	I303V
c.928C>G	L310V
c.1079G>C	G360A
c.1078G>C	G360R
c.1124G>C	G375A
c.1181T>C	L394P
c.1231G>A	G411S
c.1255A>G	N419D

5 Por consiguiente, en diversas realizaciones, se usa migalastat para tratar la enfermedad de Fabry y/o potenciar la actividad de α -Gal A en un paciente que tiene una mutación de GLA seleccionada del grupo que consiste en: c.86C>A, c.114G>C, c.157A>T, c.263A>G, c.371T>G, c.397A>T, c.428C>T, c.454T>A, c.476T>G, c.479C>A, c.493G>A, c.505T>A, c.538T>G, c.545A>G, c.587G>C, c.625T>A, c.769G>A, c.775C>T, c.812G>C, c.827G>C, c.868A>G, c.871G>T, c.908T>C, c.907A>G, c.928C>G, c.1079G>C, c.1078G>C, c.1124G>C, c.1181T>C, c.1231G>A y c.1255A>G. En una o más realizaciones, el paciente tiene la mutación de GLA c.86C>A. En una o más realizaciones, el paciente tiene la mutación de GLA c.114G>C. En una o más realizaciones, el paciente tiene la mutación de GLA c.157A>T. En una o más realizaciones, el paciente tiene la mutación de GLA c.263A>G. En una o más realizaciones, el paciente tiene la mutación de GLA c.371T>G. En una o más realizaciones, el paciente tiene la mutación de GLA c.397A>T. En una o más realizaciones, el paciente tiene la mutación de GLA c.428C>T. En una o más realizaciones, el paciente tiene la mutación de GLA c.454T>A. En una o más realizaciones, el paciente tiene la mutación de GLA c.476T>G. En una o más realizaciones, el paciente tiene la mutación de GLA c.479C>A. En una o más realizaciones, el paciente tiene la mutación de GLA c.493G>A. En una o más realizaciones, el paciente tiene la mutación de GLA c.505T>A. En una o más realizaciones, el paciente tiene la mutación de GLA c.538T>G. En una o más realizaciones, el paciente tiene la mutación de GLA c.545A>G. En una o más realizaciones, el paciente tiene la mutación de GLA c.587G>C. En una o más realizaciones, el paciente tiene la mutación de GLA c.625T>A. En una o más realizaciones, el paciente tiene la mutación de GLA c.769G>A. En una o más realizaciones, el paciente tiene la mutación de GLA c.775C>T. En una o más realizaciones, el paciente tiene la mutación de GLA c.812G>C. En una o más realizaciones, el paciente tiene la mutación de GLA c.827G>C. En una o más realizaciones, el paciente tiene la mutación de GLA c.868A>G. En una o más realizaciones, el paciente tiene la mutación de GLA c.871G>T. En una o más realizaciones, el paciente tiene la mutación de GLA c.908T>C. En una o más realizaciones, el paciente tiene la mutación de GLA c.907A>G. En una o más realizaciones, el paciente tiene la mutación de GLA c.928C>G. En una o más realizaciones, el paciente tiene la mutación de GLA c.1079G>C. En una o más realizaciones, el paciente tiene la mutación de GLA c.1078G>C. En una o más realizaciones, el paciente tiene la mutación de GLA c.1124G>C. En una o más realizaciones, el paciente tiene la mutación de GLA c.1181T>C. En una o más realizaciones, el paciente tiene la mutación de GLA c.1231G>A. En una o más realizaciones, el paciente tiene la mutación de GLA c.1255A>G. En diversas realizaciones, estas mutaciones de GLA son relativas a la secuencia nucleica mostrada en la SEQ ID NO: 3.

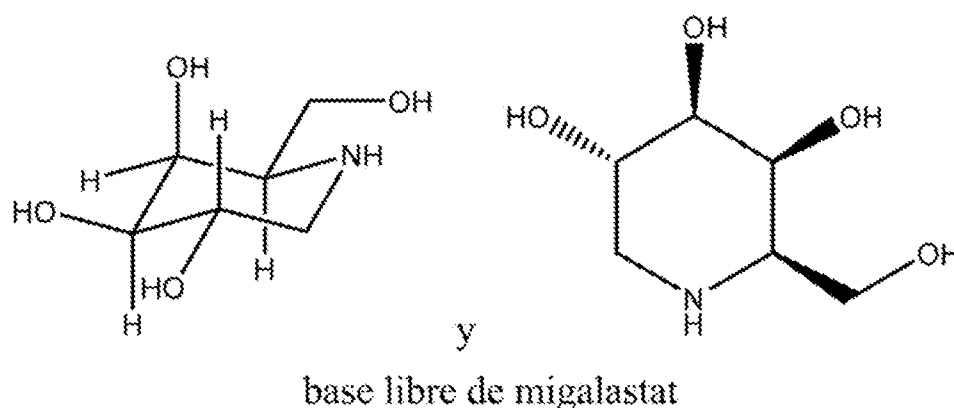
Además, diversas realizaciones de la presente invención proporcionan PC para el tratamiento de la enfermedad de Fabry en un paciente que tiene una mutación en el gen que codifica α -Gal A, en donde se identifica que el paciente tiene una mutación de aminoácido en una α -Gal A humana codificada por una secuencia de ácido nucleico expuesta en la SEQ ID NO: 1 y/o la SEQ ID NO: 3. A continuación se muestran detalles y realizaciones adicionales de estos usos. Cualquiera de las realizaciones relacionadas con la chaperona farmacológica para α -Gal A para su uso en el tratamiento de un paciente diagnosticado con la enfermedad de Fabry, en donde se identifica que el paciente tiene una mutación de aminoácido en una α -Gal A humana codificada por una secuencia de ácido nucleico expuesta en la SEQ ID NO: 1 y/o la SEQ ID NO: 3 se puede combinar con cualquiera de las otras realizaciones de la invención, por ejemplo, realizaciones relacionadas con las PC y dosis adecuadas de estas.

En una o más realizaciones, el paciente puede tener otras mutaciones en su gen GLA. Por ejemplo, puede haber mutaciones en la región intrónica que pueden afectar o no a la enzima α -Gal A resultante. Por lo tanto, en una o más realizaciones, el paciente tiene α -Gal A mutante codificada por una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos un 95, 96, 97, 98, 99, 99,1, 99,2, 99,3, 99,4, 99,5, 99,6, 99,7, 99,8 o 99,9 % de identidad con la SEQ ID NO: 1. Además, el paciente puede tener una o más mutaciones adicionales en la región codificante del gen GLA. Por lo tanto, en una o más realizaciones, el paciente tiene α -Gal A mutante codificada por una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos un 95, 96, 97, 98, 99, 99,1, 99,2, 99,3, 99,4, 99,5, 99,6, 99,7, 99,8 o 99,9 % de identidad con la SEQ ID NO: 3. Además, en una o más realizaciones, el paciente tiene 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20 o 30 mutaciones relativas a la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 3. También se observa que algunas mutaciones de ácido nucleico en la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 3 pueden dar como resultado que no haya cambios en el aminoácido para la proteína resultante, ya que varios aminoácidos están codificados por múltiples secuencias de ácido nucleico. De nuevo, cualquiera de estas realizaciones se puede combinar con cualquiera de las otras realizaciones de la invención, por ejemplo, realizaciones relacionadas con mutaciones sensibles, las PC y dosis adecuadas de estas.

Chaperonas farmacológicas

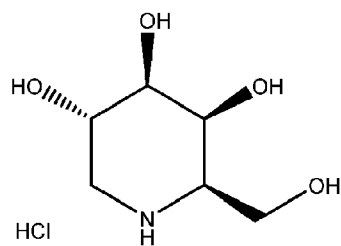
La unión de moléculas de bajo peso molecular inhibitoras de enzimas asociadas con LSD puede aumentar la estabilidad tanto de la enzima mutante como de la correspondiente enzima de tipo natural (véanse las patentes de EE. UU. N.ºs 6 274 597; 6 583 158; 6 589 964; 6 599 919; 6 916 829 y 7 141 582). En particular, la administración de moléculas de bajo peso molecular derivadas 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 ER (Ishii *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 1996; 220: 812-815), la proteína enzimática se retrasa en la vía de transporte normal (ER→aparato de Golgi→endosomas→lisosomas) y se degrada prematuramente. Por lo tanto, un compuesto que se una a una enzima mutante y aumenta su estabilidad, puede servir de «chaperona» para la enzima y aumentar la cantidad que puede salir del ER y pasar a los lisosomas. Además, dado que el plegamiento y el tráfico de algunas proteínas de tipo natural es incompleto, con hasta un 70 % de algunas proteínas de tipo natural que se degradan en algunos casos antes de alcanzar su ubicación celular final, las chaperonas pueden usarse para estabilizar las enzimas de tipo natural y aumentar la cantidad de enzima que puede salir del ER y ser transportada a los lisosomas.

La chaperona farmacológica de la presente invención comprende migalastat o una sal de este. 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:



Como se analiza 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 migalastat·HCl:



Migalastat HCl

5 El 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 el migalastat actúa como una chaperona farmacológica, uniéndose de manera selectiva y reversible, con alta afinidad, al sitio activo de la α -Gal A de tipo natural y formas mutantes específicas de α -Gal A. La unión de migalastat estabiliza estas formas mutantes de α -Gal A en el retículo endoplasmático y facilita su tráfico adecuado a los lisosomas donde la disociación de migalastat permite que la α -Gal A reduzca el nivel de GL-3 y otros sustratos.

10 La PC de la presente invención comprende migalastat o una sal de este. En realizaciones adicionales, la PC comprende clorhidrato de migalastat.

15 Cualquiera de estas PC para α -Gal A puede usarse en combinación con cualquiera de las otras realizaciones de la invención, por ejemplo, realizaciones relacionadas con la chaperona farmacológica para α -Gal A para su uso en el tratamiento de un paciente diagnosticado con la enfermedad de Fabry, así como realizaciones relacionadas con dosis adecuadas de PC, mutaciones sensibles y el tratamiento de un paciente con Fabry que tiene ciertas mutaciones en la secuencia de ácido nucleico que codifica α -Gal A.

Dosis, formulación y administración

25 En una o más realizaciones, al paciente con Fabry se le administra migalastat o una sal de este con una frecuencia de una vez cada dos días (también denominada «QOD»). En diversas realizaciones, las dosis descritas en el presente documento se refieren a clorhidrato de migalastat o a una dosis equivalente de migalastat o una sal de este que no es la sal de clorhidrato. En algunas realizaciones, estas dosis se refieren a la base libre de migalastat. En realizaciones alternativas, estas dosis se refieren a una sal de migalastat. En otras realizaciones, la sal de migalastat es clorhidrato de migalastat. La administración de migalastat o de una sal de migalastat se denomina «terapia con migalastat» en el presente documento.

30 La cantidad eficaz de migalastat o la sal de este puede estar en el intervalo de aproximadamente 100 mg de FBE a aproximadamente 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.

35 Una vez más, se señala 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 de 150 mg de clorhidrato de migalastat o una dosis equivalente de migalastat o de una sal de este que no es la sal de clorhidrato, administrada con 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 de 150 mg de clorhidrato de migalastat administrado con una frecuencia de una vez cada dos días. En otras realizaciones, la dosis es de 123 mg de la base libre de migalastat administrada con una frecuencia de una vez cada dos días.

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

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

55 La administración de migalastat o de una sal de este puede ser durante un cierto periodo de tiempo. En una o más realizaciones, el migalastat o una sal de este se administra durante al menos 28 días, tal como al menos 30, 60 o 90

días o al menos 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 16, 20, 24, 30 o 36 meses o al menos 1, 2, 3, 4 o 5 años. En diversas realizaciones, la terapia con migalastat es una terapia con migalastat a largo plazo de al menos 6 meses, tal como al menos 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 16, 20, 24, 30 o 36 meses o al menos 1, 2, 3, 4 o 5 años.

5 La administración de migalastat o una sal de este de acuerdo con la presente invención puede ser en una formulación adecuada para cualquier vía de administración, pero preferentemente se administra en una forma farmacéutica oral tal como un comprimido, cápsula o solución. Como ejemplo, al paciente se administran por vía oral cápsulas que contienen cada una 150 mg de clorhidrato de migalastat o a una dosis equivalente de migalastat o de una sal de este que no es la sal de clorhidrato.

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

15 En una o más realizaciones, la PC (migalastat o sal de este) se administra como monoterapia, y puede estar en una forma adecuada para cualquier vía de administración, que incluye, p. ej., por vía oral en forma de comprimidos o cápsulas o líquido, o en solución acuosa estéril para inyección. En otras realizaciones, la PC se proporciona en un polvo liofilizado seco para añadirlo 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.

20 Cuando la PC (p. ej., migalastat o sal de este) se formula para administración oral, los comprimidos o cápsulas se pueden preparar por medios convencionales con excipientes farmacéuticamente aceptables tales como agentes aglutinantes (p. ej., almidón de maíz pregelatinizado, polivinilpirrolidona o hidroxipropilmetilcelulosa); rellenos (p. ej., lactosa, celulosa microcristalina o hidrogenofosfato de calcio); lubricantes (p. ej., estearato de magnesio, talco o sílice);
 25 disgregantes (p. ej., almidón de papa o glicolato de almidón sódico); o agentes humectantes (p. ej., laurilsulfato de sodio). Los comprimidos pueden recubrirse mediante métodos muy conocidos en la técnica. Los preparados líquidos para administración oral pueden adoptar la forma, por ejemplo, de soluciones, jarabes o suspensiones, o pueden presentarse como un producto seco para su preparación 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 (p. ej., jarabe de sorbitol, derivados de la celulosa o grasas comestibles hidrogenadas);
 30 agentes emulsionantes (p. ej., lecitina o goma arábiga); vehículos no acuosos (p. ej., aceite de almendras, ésteres oleosos, alcohol etílico o aceites vegetales fraccionados); y conservantes (p. ej., *p*-hidroxibenzoatos de propilo o metilo o ácido sórbico). Los preparados también pueden contener sales tampón, saborizantes, colorantes y edulcorantes según corresponda. Los preparados para administración oral pueden formularse adecuadamente para proporcionar
 35 una liberación controlada del compuesto activo chaperona.

Las formulaciones farmacéuticas de la PC (migalastat o una sal de este) adecuadas para uso parenteral/inyectable incluyen generalmente soluciones acuosas estériles (cuando son hidrosolubles) o dispersiones y polvo estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersión inyectables estériles. En todos los casos, la forma debe ser
 40 estéril y debe ser fluida hasta el punto en el que resulte fácilmente inyectable. Debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento y debe conservarse contra la acción contaminante de microorganismos tales como bacterias y hongos. El portador puede ser un disolvente o medio de dispersión que contenga, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol y similares), mezclas adecuadas de estos y aceites vegetales. La fluidez adecuada se puede mantener, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento tal como lecitina,
 45 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 incorporando la enzima purificada (si la hubiera) y la PC (migalastat o una sal de este) en la cantidad requerida en el disolvente apropiado con varios de los demás ingredientes enumerados anteriormente, según sea necesario, con posterior esterilización por filtro o terminal. Generalmente, las
 55 dispersiones se preparan incorporando los diversos principios activos esterilizados en un vehículo estéril que contenga 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 de este esterilizada por filtración previamente.

60 La formulación puede contener un excipiente. Los excipientes farmacéuticamente aceptables que pueden incluirse en la formulación son tampones tales como tampón de citrato, tampón de fosfato, tampón de acetato, tampón 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 (p. ej., PEG-4000, PEG-6000); glicerol;
 65

glicina u otros aminoácidos; y lípidos. Los sistemas tamponantes para uso con las formulaciones incluyen tampones de citrato, acetato, bicarbonato y fosfato. El tampón de fosfato es una realización preferida.

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

10 La administración de las formulaciones parenterales descritas anteriormente del compuesto chaperona puede realizarse mediante inyecciones periódicas de un bolo del preparado, o puede administrarse mediante administración intravenosa o intraperitoneal desde un depósito externo (p. ej., una bolsa i.v.) o interno (p. ej., un implante bioerosionable).

15 Las realizaciones relacionadas con formulaciones farmacéuticas y la administración se pueden combinar con cualquiera de las otras realizaciones de la invención, por ejemplo, realizaciones relacionadas con la chaperona farmacológica para α -Gal A para su uso en el tratamiento de un paciente diagnosticado con la enfermedad de Fabry, así como realizaciones relacionadas con mutaciones sensibles, las PC y dosis adecuadas de estas.

20 En una o más realizaciones, la PC (p. ej., migalastat o una sal de este) se administra en combinación con ERT. La ERT aumenta la cantidad de proteína mediante la introducción exógena de enzima de tipo natural o biológicamente funcional por medio de infusión. Esta terapia se ha desarrollado para muchos trastornos genéticos, incluidas LSD, tales como la enfermedad de Fabry, como se ha mencionado anteriormente. Tras la infusión, se espera que la enzima exógena sea captada por los tejidos a través de un mecanismo no específico o específico del 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 existir la posibilidad de reacciones inmunológicas adversas con tratamientos posteriores. En una o más realizaciones, la chaperona se administra al mismo tiempo que la enzima de reemplazo (p. ej., α -Gal A de reemplazo). En algunas realizaciones, la chaperona se coformula con la enzima de reemplazo (p. ej., α -Gal A de reemplazo).

30 La referencia a lo largo de esta memoria descriptiva a «una realización», «ciertas realizaciones», «diversas realizaciones», «una o más realizaciones» o «una realización» significa que una característica, estructura, material o característica particular que se describe en relación con la realización se incluye en al menos una realización de la invención. Por lo tanto, las apariciones de las frases tales como «en una o más realizaciones», «en ciertas realizaciones», «en diversas realizaciones», «en una sola realización» o «en una realización» en diversos lugares a
35 lo largo de esta memoria descriptiva no se refieren necesariamente a la misma realización de la invención. Además, los atributos, estructuras, materiales o características particulares se pueden combinar de cualquier manera adecuada en una o más realizaciones.

40 Aunque la invención en el presente documento se ha descrito con referencia a realizaciones particulares, debe entenderse que estas realizaciones son meramente ilustrativas de los principios y aplicaciones de la presente invención. Será evidente para los expertos en la técnica que se pueden realizar diversas modificaciones y variaciones en el método y el aparato de la presente invención. Por lo tanto, se pretende que la presente invención incluya modificaciones y variaciones que están dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas y sus equivalentes.

45 **EJEMPLO: Efecto de migalastat sobre mutaciones de α -Gal A**

La actividad de α -Gal A se midió en lisados preparados a partir de células HEK-293 transfectadas de manera transitoria con la forma mutante indicada de α -Gal A y se incubaron en ausencia o presencia de migalastat 10 μ m durante 5 días. La actividad de α -Gal A se expresa como los nmoles de 4-MU libre liberados por miligramo de proteína por hora
50 (nmol/mg/h). La actividad de α -Gal A inicial y la actividad de α -Gal A después de la incubación con migalastat 10 μ m, se expresaron adicionalmente como un porcentaje de la actividad de α -Gal A de tipo natural inicial (% WT). La actividad de α -Gal A de tipo natural que se usó para calcular estos porcentajes fue la actividad promedio medida en lisados de células transfectadas de tipo natural, incubadas en ausencia de migalastat, medida en paralelo.

55 Los resultados de la prueba de actividad de α -Gal A para las mutaciones novedosas A29D, R38S, N53Y, Y88C, V124G, I133F, A143V, Y152N, F159C, A160D, D165N, F169I, L180V, D182G, R196T, W209R, A257T, P259S, G271A, S276T, M290V, A291S, I303T, I303V, L310V, G360A, G360R, G375A, L394P, G411S, y N419D se muestran en la Tabla 2 a continuación:

60 Tabla 2: Efecto de migalastat sobre la actividad de α -Gal A

ES 3 013 813 T3

Forma mutante de α -Gal A	Actividad de α -Gal A inicial (nmol/mg/h)	Actividad de α -Gal A con migalastat 10 μ M (nmol/mg/h)	Valor ascendente de Mann-Whitney	Actividad de α -Gal A inicial (% WT)	Actividad de α -Gal A con migalastat 10 μ M (% WT)	Aumento absoluto (% WT)	Aumento relativo
A29D	5091 \pm 413	6877 \pm 474	0,0024	15,1 \pm 1,1	20,3 \pm 1,1	5,1	1,35
R38S	24042 \pm 1962	30928 \pm 1484	0,0026	73,3 \pm 5,5	100 \pm 9,3	26,6	1,29
N53Y	11238 \pm 1196	22871 \pm 2192	0,0001	34 \pm 2,1	68,5 \pm 2,6	34,5	2,04
Y88C	1614 \pm 64	5459 \pm 307	0,0001	4,1 \pm 0,2	14 \pm 1,1	9,9	3,38
V124G	1750 \pm 140	4316 \pm 432	0,0001	4,3 \pm 0,3	10,7 \pm 1	6,4	2,47
I133F	293 \pm 19	1542 \pm 154	0,0001	0,7 \pm 0,1	3,8 \pm 0,3	3,1	5,27
A143V	4108 \pm 355	13309 \pm 921	0,0001	13,7 \pm 1	45,5 \pm 3,2	31,7	3,24
Y152N	9417 \pm 783	18554 \pm 1297	0,0001	25,8 \pm 1	51,6 \pm 2,2	25,9	1,97
F159C	4472 \pm 332	9238 \pm 513	0,0001	13,8 \pm 0,9	29,6 \pm 2,3	15,8	2,07
A160D	9985 \pm 523	18238 \pm 1048	0,0001	30,1 \pm 1,7	56 \pm 4,1	25,9	1,83
D165N	1540 \pm 60	10562 \pm 1017	0,0001	6 \pm 0,3	40 \pm 2,7	34	6,86
F169I	4622 \pm 482	15903 \pm 567	0,0001	15,9 \pm 2,1	51,7 \pm 2,2	35,9	3,44
L180V	12900 \pm 829	25437 \pm 1279	0,0001	37,2 \pm 2	73,4 \pm 2,9	36,2	1,97
D182G	28037 \pm 2162	43772 \pm 4156	0,0014	84 \pm 3,7	129,6 \pm 9,7	45,6	1,56
R196T	17659 \pm 1084	26217 \pm 1611	0,0002	47 \pm 2,1	69,5 \pm 2,6	22,4	1,48
W209R	22944 \pm 2196	28729 \pm 1293	0,0006	63,5 \pm 5,4	81,1 \pm 4,6	17,5	1,25
A257T	7405 \pm 465	18990 \pm 1196	0,0001	25,7 \pm 1,5	66,2 \pm 4,1	40,6	2,56
P259S	15425 \pm 1009	28621 \pm 3141	0,0001	44,3 \pm 1,5	79,8 \pm 4,8	35,5	1,86
G271A	4890 \pm 570	18928 \pm 1069	0,0001	12,1 \pm 1,1	46,4 \pm 1,8	34,4	3,87
S276T	547 \pm 44	4104 \pm 439	0,0001	1,3 \pm 0,1	9,6 \pm 0,9	8,3	7,5
M290V	23663 \pm 2202	45804 \pm 2927	0,0001	66,6 \pm 6,2	128,1 \pm 8,2	61,5	1,94
A291S	12908 \pm 1151	20029 \pm 1654	0,0036	47,7 \pm 2,8	74,5 \pm 4	26,8	1,55
I303T	BLD	2809 \pm 520	0,0001	BLD	7,3 \pm 1,4	7,3	NC
I303V	15157 \pm 1669	28958 \pm 3153	0,0001	38,2 \pm 4,6	73,2 \pm 8,8	35	1,91
L310V	23233 \pm 3157	31936 \pm 2527	0,0036	55,5 \pm 6,3	78,4 \pm 4,8	22,8	1,37
G360A	10510 \pm 874	13443 \pm 1048	0,0137	23,8 \pm 1,4	31,3 \pm 2,6	7,5	1,28
G360R	388 \pm 48	1418 \pm 93	0,0001	1,1 \pm 0,1	4,0 \pm 0,3	3	3,65
G375A	19691 \pm 1167	24212 \pm 1520	0,0169	54,8 \pm 2,6	66,8 \pm 2,4	12	1,23
L394P	5083 \pm 465	7749 \pm 582	0,0001	15,2 \pm 2,1	22,3 \pm 2,4	7,2	1,52
G411S	11132 \pm 675	17543 \pm 867	0,0001	39,1 \pm 2,6	61,1 \pm 3,2	22	1,58

Forma mutante de α -Gal A	Actividad de α -Gal A inicial (nmol/mg/h)	Actividad de α -Gal A con migalastat 10 μ M (nmol/mg/h)	Valor ascendente de Mann-Whitney	Actividad de α -Gal A inicial (% WT)	Actividad de α -Gal A con migalastat 10 μ M (% WT)	Aumento absoluto (%)	Aumento relativo
N419D	10639 \pm 512	14558 \pm 678	0,0001	31,5 \pm 1,5	44,1 \pm 2,9	12,6	1,37

En la Tabla 2, se calcularon los valores para la media \pm error estándar de la media (EEM). Los nmol/mg/h indican «nmoles de 4-MU libre liberados por mg de proteína por hora». WT indica «tipo natural». NC indica «no calculable». N/A indica «no aplicable».

5 **Actividad de α -Gal A inicial y con migalastat 10 μ m:** Las diferencias en la actividad de α -Gal A entre lisados incubados en ausencia y presencia de migalastat 10 μ m se determinaron utilizando una prueba U de Mann Whitney unilateral; se consideró significativo un aumento con migalastat 10 μ m con una $p < 0,05$. «BLD» indica que la actividad media de α -Gal A estaba por debajo del límite de detección (<142 nmol/mg/h).

10 **Actividad de α -Gal A inicial (% WT)** = (actividad de α -Gal A en lisados de células transfectadas mutantes sin migalastat \div actividad de α -Gal A en lisados de células transfectadas de tipo natural sin migalastat) * 100.

15 **Actividad de α -Gal A con migalastat 10 μ M (% WT)** = (actividad de α -Gal A en lisados de células transfectadas mutantes incubadas con migalastat 10 μ M \div actividad de α -Gal A en lisados de células transfectadas de tipo natural sin migalastat) * 100.

20 **Aumento absoluto (% WT)** = es la actividad de α -Gal A con migalastat 10 μ M (% WT) menos la actividad de α -Gal A inicial (% WT).

El **aumento relativo** es la actividad de α -Gal A con migalastat 10 μ M en lisados de células transfectadas mutantes \div actividad de α -Gal A inicial en lisados de células transfectadas mutantes incubados sin migalastat.

25 Como puede observarse en la Tabla 2, las mutaciones novedosas de α -Gal A A29D, R38S, N53Y, Y88C, V124G, I133F, A143V, Y152N, F159C, A160D, D165N, F169I, L180V, D182G, R196T, W209R, A257T, P259S, G271A, S276T, M290V, A291S, I303T, I303V, L310V, G360A, G360R, G375A, L394P, G411S, y N419D demostraron una respuesta *in vitro* a la incubación con migalastat que cumplía los criterios de sensibilidad. Por consiguiente, se espera que los pacientes con estas mutaciones puedan tratarse con terapia con migalastat como se describe en el presente documento.

30 La bibliografía de patentes y científica a la que se hace referencia en el presente documento establece el conocimiento del que disponen los expertos en la técnica.

35 Si bien esta invención se ha mostrado y descrito particularmente con referencias a sus realizaciones preferidas, los expertos en la técnica entenderán que se pueden realizar diversos cambios en la forma y los detalles en esta sin alejarse del alcance de la invención comprendido en las reivindicaciones adjuntas.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Migalastat o una sal de este para su uso en un método para el tratamiento de la enfermedad de Fabry en un paciente humano que lo necesite, comprendiendo el método administrar al paciente una dosis terapéuticamente eficaz de migalastat o una sal de este, en donde el paciente tiene una mutación de α -galactosidasa A seleccionada del grupo que consiste en: A29D, R38S, N53Y, Y88C, V124G, I133F, A143V, Y152N, F159C, A160D, D165N, F169I, L180V, D182G, R196T, W209R, A257T, P259S, G271A, S276T, M290V, A291S, I303T, I303V, L310V, G360A, G360R, G375A, L394P, G411S, y N419D.
- 10 2. Migalastat o una sal de este para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el migalastat o sal de este se administra al paciente cada dos días.
- 15 3. Migalastat o una sal de este para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde al paciente se le administran de aproximadamente 100 a aproximadamente 150 mg de equivalente de base libre del migalastat o sal de este cada dos días.
- 20 4. Migalastat o una sal de este para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde al paciente se le administran aproximadamente 123 mg de equivalente de base libre del migalastat o sal de este cada dos días.
- 25 5. Migalastat o una sal de este para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde se administran al paciente aproximadamente 123 mg de base libre de migalastat cada dos días.
6. Migalastat o una sal de este para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde se administran al paciente aproximadamente 150 mg de clorhidrato de migalastat cada dos días.
- 30 7. Migalastat o una sal de este para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde el migalastat o sal de este se administra por vía oral.
8. Migalastat o una sal de este para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde el migalastat o sal de este se administra por inyección.
- 35 9. Migalastat o una sal de este para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en donde el paciente es un hombre.
10. Migalastat o una sal de este para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en donde el paciente es una mujer.

cocttctgttaggygcagagaggyttctacttccattacttgcgtctccctgggaaaggccatcag 60
 gactgcctggctaaagtgggaaaccaggactctttgtgagtttaagaatttctgtgattttat 120
 gtgtgntatccacahfffftaaaaaactgtaacagactcaggttgaagcagtcgtctccgg 180
 gtgggtgaattatgtgtatttttaaattttatactatattggtatttttccaaatgrrtogaa 240
 attgaaatgtatgattgttggttatcagcagaaaaatcaaatattttccaaatccctctattc 300
 agtaaaqttaatttattggggtcctttgtcaagcaogcaitttgcctagatgtgacbtaca 360
 gataaaatccacttggggtcccttaccagcaaatcagycagtgagagactgagtgccctg 420
 aatggatagaccgacccagaccactatttccagtatctgrrttttcttaactcagggtcc 480
 gtggttttcaaacgfffftgccttaccggtccaccttaggggtcccccagagaccggcccag 540
 acagacagatatacaaaaaaacatcacacagtcactgagcgtccacacatttcccccaccaggc 600
 gcagcacaggcggcttccccggcactgagatgggggggaaaggaggagagagcgcgaggggg 660
 ggggggaaagcagagaaacgaaagggcggagggggcccccgaaccccgtctctggtcttca 720
 tcatcaccacccctgggtcccccagttcccccacccacacccaaacctctaacgatccgggt 780
 aattttccctctcttccctcaaacgggtatagcagagaggttagacagcagaccagaacta 840
 ctctctgctcaggttagcaggttaactcaggtgagcgcctcagctcatgtagagatoboggtcac 900
 gtgagcaactctcggcttaaacctcgggtactcaaggtgcgcgcacttccctctctggtatgg 960
 aaataggggcgggtcaaatatcaagaaaggaagaggytqattgggttagcgggaactcttaag 1020
 tgaactgattatgggtctacctctggggataaacctcccccgttgcagagaaacaaataaag 1080
 tcaatttttaafaagtcactcgggtgattgggtccggccctcaggttaactcttaaaagcccag 1140
 gttaccocgggaaatttarctgtccgggtcaccogtgacaatgcagctgaggaaccagaa 1200
 ctacatctgggttgcgcgttgcgcttcggttccctggccctcgtttcccttggganatccct 1260
 ggggtcagagcactggacaatgatttggcaaggaogcctaccatgggttgcctgcaactgg 1320
 gaggcctccatgtgcaaccttgaactgcagyaagagaccagattccctgcatcaggtatcag 1380
 atattgggtactccctcccttgcctttccatgctgttttgggtgcttttgggaaactgga 1440
 gagtcocaaacgggaacagttgagcccgagggagagctcccccacccgactctgctgctgc 1500
 ttttttatccccagcaaacctgtccccaatcaggactagccctaaacttctctctgtgtgac 1560
 ctttccctgggatgggagtcocggccagcggccctgtttctttctctctctctctctctct 1620
 cgtctccttctctcttctctctctctctctctctctctctctctctctctctctctctct 1680
 ttctcttttttactgctcttgcagagcagggccacccmataggcagtytgcccacaaagt 1740
 agccctgcocgggtctattcagacacctcttctgtgaaactctctctctctctctctctct 1800
 ctacccgttagaacaactaggggtgggttaggaggaatggggaactaaqatccctgcccctt 1860
 tttctctcttttggggtcgtggaiffctcggcagatctcagagggagtttagagagaccata 1920
 aggtccttgagactctcccccctcggcccafgagcgttggcafcagycctggaaggttgaca 1980
 tggaggaactttatcacatttacacctttgcttgaggggttgaggtcggattagataggtat 2040
 tgaacatactgaccctcacaatcccttactctgtaaatgggattacaaccttttaatttc 2100
 agggagctgacaaaaaaaatctgaaaaaagttcttactctcaocacaggtgagttttcaag 2160
 gagataacctatttaaagtacatagcacagcgtctgaccattcaactgcgcttaacagagc 2220
 aatgttcaatgggaaaaatgaatgtaaatctacaaatctgaatgaatatgtgbatttttc 2280
 tggagagaggtatattacccttcttcaaatctcaaacgggctctgtgatttaaaaaagggt 2340
 taggaahcactgafagatggttggtaaaagggtggcagtcacaghaacattctctgtgtccaa 2400
 agttatccctafgaatatactttatagataaagtcaggtatgctggtcagacatcacagaa 2460
 aaattggccttgaagttttcatgtgacctgtggtacagtatgtgtggcaattttgccc 2520
 tcaaggattttttttatnrytatttgcactctgatttaaaaaactaangcatgacattgc 2580
 aaaaaatgtatataaagaagagcaaaaagaaaaaagatttccccccacogttonacca 2640
 ccagaaaaaatcatgggttaaatgttaatatcaaaccttcaaatgttttctabataaaa 2700
 tgaaaaactagatttctttatttcaatttttccataaaaaatggatcatgbbatgtca 2760
 tgtttggcctaatggcaagaccctggcaaccagctctgggtccaaatctgcccctaatgrra 2820
 cttagccctgtgacattgggttaaaftaaccttttttttttttttttttttttttttttttt 2880

FIG. 1A

ES 3 013 813 T3

tctatcaacagtccttccaccagtatctctaaaatatctctgaatcagcccaacttccctt 8700
ccatcttccactacatgcacccctggccttccaaagctactatcggctctcaaccagactgct 8760
gggaccacccgagctctctctgcttccactctgtctcaaacccccatctatcttccaaagcagc 8820
acagaggttatcatataaaaatgtaaatacagttttttttttaaagcaaaaaaccctga 8880
gacttaacagagtttatataaaaatataaaatgtatcctcagttccctgcttaaaaaccctta 8940
actcgttcccaattgcacttgggaatgaaacaaaactgcactgatccagcccttgcctgac 9000
tccccaaaagtcacaaggggtcatggctcttccctggctacactgggtttctcttctgtccc 9060
tcaaacctgcagcctatctgctgccccagggctttacacttgcctttttctgctaga 9120
acagttcttcccccagattttttaaagggccgggctccttaacattgaaagtccagacca 9180
aacgccacatctgcagacagttcttctctaaactctttaaataagccctctgtccattca 9240
ttcttcatcacattaacctgtttaattttcttctcagagctccacactatcttggagat 9300
ttgttgacttgttaaccatgctctcccactagagtgtaagtttccatgagggcagggacctt 9360
gtctgactttgactgtatctctcgcctatggttaagtggttaaatggtatcttatggaaatg 9420
aatccctattcttccctcattatctctgcaaaatgctcttttttctccacatcttaaac 9480
tgatateccacactgctctctcaaaaacttttttttgogacagagctcactgtcaccaca 9540
ggctagagtgagtgggcccaatctcggctcactgcaacccccggcctcccggtttaagcg 9600
attctcttgcctccagctcccagtagctgggttatagggctggctaccacatctggct 9660
aatttttgtatttttagtagagatggttccaccatggttggccaggcttctctcgaactcc 9720
tgacctcagatgatccacctgcctcggcctcccaagtgctgggttacagggcatgagcc 9780
accgtgcccagcctctcaaaaactttttatccattcaaaaaactatgctgggttttaag 9840
ttttcttaaaccttgatggagctcctatgtaattttccagcttttaattttactcaagacca 9900
tcttagttctgattatagaggttaaatcaacttaagggttccaggttatatggccact 9960
tctgaagcaactcttaccagtgaaaattcatttaagggtttagaccctcttatggaga 10020
cgttcaatctgtaaacccaagagagaaggtaccaggtgcctccttttaactgtttccatctc 10080
acaaggatgtragttagaaagtcaacagagaggtcctatctgttttccacagcccattata 10140
cagaatccgacagtaactgcaatcacgggcaaattttgcctgacattgatgatccctgga 10200
aaagtataaaggtatcttggactggacatcttttaaccaggagagaattggtgatgttg 10260
ctggaccaggggggtgggaatgcccagatctggtaaaaacttgaccctccttctgtccag 10320
cccttgggtggcttcttctctatctttgacattcaaggttaaatcaaggttaagttcctg 10380
ggaggagctttatcggagagctacttagagcaggtatgctgtggaaaggtggttctccata 10440
tgggtcatctaggttaactttaagaatgtttcctcctctcttgtttgaantatttctctct 10500
tctctcagttagtgatgggcaacttggpccagctggaatccgcaagtaactccagatg 10560
gcctctgggtatcatggctgctcctttatccatgctaatgactccgcaacatcagc 10620
cccacagccaaaagctcctcctcaggatcaaggaaggttaattgpcatcaatcaggaaccctt 10680
ggcaagcaaggtaccagcttagcaggttaataagagttatataatcaagatgctctta 10740
taccaccaatacaaaccttctcttgggcccraaatctatctttttcccttgcctctgatgt 10800
tactatcagtaataaagctctcctgctagaacaatcactttatcttcaaaaataatgctaca 10860
ggatcatttttaactttccctacaagtgcctgctagttctgacattagaatgaatgccaa 10920
actaacagggccacttatcaactgcttgcctaaagccaccactttcttgggtttttcaggg 10980
gcccactttgaagtgctgggaacgacccctcctcaggttagcctgggctgtagcctgata 11040
aacgggcagggagattgggtggacctcgtctcttataccctcgcagttgcttccctgggtaaa 11100
ggagtgccctgtaactcctgctgcttcaatcacacagctcctcctgtgaaaaggaagcta 11160
gggtctctatgaatggaactccaggttaagaagtcacataaaatcccacagggcactgttttg 11220
cttcagctagaaaatacaatgcagatgtcattaaaagacttactttaaaatgttttttt 11280
atggcaactactactcctgtccacctttttctccattcaacttaaaagctcaaggota 11340
ggtggctcahgccctgtaatccagcacttttggaggtgagggcgggagatccactgag 11400
toggactttgagaccgctggacaacaatggtgaaaccctttctcaataaaatataa 11460
aaattagccaggtgtggtggcgaactgtggtcccagctactctgggggtgagggcatga 11520

FIG. 1D

ES 3 013 813 T3

```
geatcgcttgaaccggggagtgagggttgcattgagctgagatcatggcaactcactcca 11580
gcctgggcaacaagaattccatctcaaaaaaaaaaaaaaaaaagccagycacagtggtccatg 11640
cctgggaatcccagcacttttgggaagctgagggcaggcagatcacttgagggttaggatttca 11700
agaccagcctggctaacatagcaaaagccctgtctctactaamaaaacaaaaattagccag 11760
gratgggtggcagactctotgtagccccagctactcaggagactgagggcaggagaatcactt 11820
gaaccggggaagtgggggggtgcagtgacccaagatcacgccactgcattccagcctggg 11880
caccagagcaagactccatctcaaaaaaaaaaagttctatttcttgaataaaattttccg 11940
aagttfaaactttaggaataaaaactattaaacccgtatttactcatccagatacccaacc 12000
cccttgttgagatctctccccattatcaaaatggtgtagcatatttaactaccaagagct 12060
aaacafcatteagactgaaatgtattaagaaggctgtataggccgggcaagggtgtctcac 12120
gcctgtaatcccaacactttgggaggcccaagctcgggcyggtcacgaggtcaggagatgga 12180
gaccatcctggcacaacatgggtgaaaccctcctctactaaaaaacaaaaattagccagg 12240
caggtggcaggcactgtaatcccagctactccagaggctgagggcaggacaatcacttga 12300
acctgggaggccagaggctgcagtgagctgaggttgtaccaattgcactccagcctaggtc 12360
acgggcaacactccatctcaaaaaaaaaagcaaaaaaaaaagctgtataaatttggactgtta 12420
agaggaattttaaga
```

FIG. 1E

MQLRNPELHL	GCALALRFLA	LVSWDYDQAR	ALDNLAKTP	TMQWLHNERF	MCNLDCQREP	60
DSCISEKLFM	EMAEMLVSEG	WKDAGVHYLC	IDDCWMAQQR	DSEGLQADP	QRFPFGIRQL	120
ANYVHSEGLN	LGTYADVGNK	TCAGFPGSGF	YYDIDAQIFA	DWGVDLKFD	CCYCDLLENL	180
ADGYKHMSLA	LNRTRSIIVY	SCWFLYKWP	FQKPNYTEIF	CYCNSWRNFA	DIDDSWKSIX	240
SILWTSFNQ	ERIVDVAGPC	GWNDPDMIVI	GNPCLSWNQQ	VTQMALWAIM	AAPLFMSNDL	300
RHISPAKAL	LQDKDVIAIN	QDPLGKQCYQ	LKQCDNFEVW	ERPLGCLAWA	VAMINRQETC	360
QPRSYTLAVA	SLGKGVACNP	ACFLTQLLPV	KRKLGFYEW	SBLKSHINPT	QTVLLQLENT	420
KQMSLKDLL						429

FIG. 2

atgcagctgaggaatccogagctccacctgggctgtgctctggctctgaggctcctggcctc
gtgtcctgggacatccctggcgctagggccctcgataacgggactggccccggacccccacaatg
ggatggctccactgggaaagggttcatgtgcaatctggactgtcaggaggaacccgactcctgc
atcagcgaaaaagctcttcatggagatggccgagctgatgggtgagcagggctggaaggacgcc
ggctacgaglatctgtgcacogatgactgotggatggccctcaaaagggaactcogaaggcagg
ctgcaggctgatccccaaagggttccccacggaaatccggcagctcgccaaactaogtgcattcc
aaggccctcaagctcggcatctacgocgagctgggcaacaaaaacatggcgcggattccccggc
agcttcggctactacgacatcgacgccagacattcgtgatggggagtggaactgctgag
ttcgaaggctgttactgogattccctggasaacctggccogacggctacaaaacacatgtccctc
gzcctgaaccggacaggcaggtccatcgtgtacagctgogagtgggccctgtacatgtggcct
ttccagaagccccactacacagagatcaggcagctactgcaaccactggaggaacttcgctgac
atcgacgactcctggaaagagcatcaagagcatcctggactggaccagcttcaaccaggagagg
atcgtggacgtggctggacccggaggctggaacgacccccgatatgctggtgattggcaacttc
ggactgagctggaaaccagcaggtgacccagatggccctgtgggcatfatggccogctccctg
ttcatgtccaacyacctgaggccacatcagccccagggccaaggctctgctgcaggacaaggat
gtgatccocatcaaccaggacccccctgggcaagcagggctaccagctgaggcaaggagataac
ttcagaggtgtggagaggccccctgtccggactggcttgggocgtggccatgatcaatcggcag
gagatogggcggaaccocggtecotacaccatgtctgtggccagcctgggaaaaggagtagcctgc
aaccocgctgtctcattacccagctgctcccctgaaagoggaaagctgggctctatgagtg
accagcaggtgaggtcccatatcaatcctacggcaaccgtcctcctccagctggagatacc
atgcagatgagcctcaaggatctgctgtga

FIG. 3