

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(21) **202292536** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки  
2022.11.02

(51) Int. Cl. *A61K 31/445* (2006.01)  
*A61P 3/00* (2006.01)

(22) Дата подачи заявки  
2021.03.05

---

(54) **СПОСОБЫ ЛЕЧЕНИЯ БОЛЕЗНИ ФАБРИ У ПАЦИЕНТОВ, У КОТОРЫХ ИМЕЕТСЯ  
МУТАЦИЯ В ГЕНЕ GLA**

---

(31) 62/986,297

(32) 2020.03.06

(33) US

(86) PCT/US2021/020984

(87) WO 2021/178737 2021.09.10

(71) Заявитель:

**АМИКУС ТЕРАПЬЮТИКС, ИНК.  
(US)**

(72) Изобретатель:

**Бенджамин Эльфрида, У Сяоян (US)**

(74) Представитель:

**Абильманова К.С. (KZ)**

---

(57) Предусмотрены способы лечения пациента, у которого диагностировано наличие болезни Фабри, и способы обеспечения усиления в отношении  $\alpha$ -галактозидазы А у пациента, у которого диагностировано или подозревается наличие болезни Фабри. Определенные способы предусматривают введение пациенту терапевтически эффективной дозы фармакологического шаперона для  $\alpha$ -галактозидазы А, при этом у пациента имеется мутация в последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей  $\alpha$ -галактозидазу А. Также описаны пути применения фармакологических шаперонов для лечения болезни Фабри и композиции для применения в лечении болезни Фабри.

---

**A1**

**202292536**

**202292536**

**A1**

## СПОСОБЫ ЛЕЧЕНИЯ БОЛЕЗНИ ФАБРИ У ПАЦИЕНТОВ, У КОТОРЫХ ИМЕЕТСЯ МУТАЦИЯ В ГЕНЕ GLA

### ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

**[0001]** Принципы и варианты осуществления настоящего изобретения в целом относятся к применению фармакологических шаперонов для лечения болезни Фабри, в частности, у пациентов с мутациями или вариантами в гене  $\alpha$ -галактозидазы (GLA).

### ПРЕДПОСЫЛКИ К СОЗДАНИЮ ИЗОБРЕТЕНИЯ

**[0002]** Многие заболевания человека возникают в результате мутаций, которые вызывают изменения в аминокислотной последовательности белка, которые снижают его стабильность и могут препятствовать его правильному сворачиванию. Белки обычно сворачиваются в конкретной области клетки, известной как эндоплазматический ретикулум или ER. Клетка имеет механизмы контроля качества, которые обеспечивают сворачивание белков в их правильную трехмерную форму, прежде чем они могут переместиться из ER к соответствующему месту назначения в клетке, процесс, который обычно называют транспортом белка. Неправильно свернутые белки часто устраняются посредством механизмов контроля качества после первоначального удерживания в ER. В некоторых случаях неправильно свернутые белки могут накапливаться в ER до их устранения. Удержание неправильно свернутых белков в ER нарушает их надлежащий транспорт, и в результате сниженная биологическая активность может привести к нарушению клеточной функции и, в конечном итоге, к развитию заболевания. Кроме того, накопление неправильно свернутых белков в ER может привести к различным типам стресса, оказываемого на клетки, что также может способствовать развитию клеточной дисфункции и заболевания.

**[0003]** Такие мутации могут привести к развитию лизосомальных нарушений накопления (LSD), которые характеризуются недостатком лизосомальных ферментов из-за мутаций в генах, кодирующих лизосомальные ферменты. Возникшее в результате заболевание является причиной патологического накопления субстратов таких ферментов, к которым относятся липиды, углеводы и полисахариды. Хотя существует много разных мутантных генотипов, связанных с каждым из LSD, многие из мутаций являются миссенс-мутациями, которые могут привести к выработке менее стабильного фермента. Такие менее стабильные ферменты иногда преждевременно разрушаются вследствие связанного с ER пути разрушения. В результате это приводит к дефициту фермента в лизосоме и патологическому накоплению субстрата. Такие мутантные ферменты иногда называют в соответствующей области техники "мутантами с нарушенным сворачиванием" или "конформационными мутантами".

**[0004]** Болезнь Фабри представляет собой LSD, вызванное мутацией в гене GLA, который кодирует фермент  $\alpha$ -галактозидазу А ( $\alpha$ -Gal A).  $\alpha$ -Gal A необходим для метаболизма гликофинголипидов. Мутация вызывает накопление субстрата, представляющего собой глоботриаозилцерамида (GL-3), в различных тканях и органах. Мужчины с болезнью Фабри являются гемизиготами, поскольку гены данного заболевания кодируются на X-хромосоме. По оценкам, болезнь Фабри поражает 1 из 40000 и 60000 мужчин и встречается реже у женщин.

**[0005]** К настоящему моменту существует несколько подходов к лечению болезни Фабри. Одним одобренным вариантом терапии для лечения болезни Фабри является заместительная ферментная терапия (ERT), которая обычно предусматривает внутривенную инфузию очищенной формы соответствующего белка дикого типа. В настоящее время для лечения болезни Фабри доступны два продукта на основе  $\alpha$ -Gal A: агалсидаза альфа (Replagal<sup>®</sup>, Shire Human Genetic Therapies) и агалсидаза бета (Fabrazyme<sup>®</sup>; Sanofi Genzyme Corporation). Однако ERT имеет несколько недостатков.

[0006] г. Одним из основных затруднений при ERT является быстрое разрушение белка, введенного путем инфузии, что приводит к необходимости осуществления многочисленных дорогостоящих инфузий в высоких дозах. В отношении ERT существует несколько дополнительных нюансов, таких как трудности с крупномасштабным получением, очисткой и хранением правильно свернутого белка; получение гликозилированного нативного белка; выработка иммунного ответа к белку; и неспособность белка преодолевать гематоэнцефалический барьер для обеспечения частичного устранения патологий в центральной нервной системе (т. е. низкая биодоступность). Кроме того, заместительный фермент не может проникать в сердце или почку в достаточных количествах для обеспечения уменьшения уровня накопления субстрата в подоцитах почки или миоцитах сердца, который играет заметную роль в патологии Фабри.

[0007] Другой подход к лечению видов дефицита некоторых ферментов предусматривает применение низкомолекулярных ингибиторов для уменьшения уровня выработки природного субстрата дефицитных ферментных белков с обеспечением таким образом смягчения патологии. Такой подход на основе "уменьшения содержания субстрата" был в частности описан для класса из приблизительно 40 LSD, куда входят нарушения, развивающиеся в результате накопления гликосфинголипидов. Низкомолекулярные ингибиторы, предлагаемые для применения в качестве средства терапии, являются специфичными в отношении ингибирования ферментов, участвующих в синтезе гликолипидов, уменьшая количество клеточного гликолипида, который необходимо расщеплять дефицитным ферментом.

[0008] Третий подход к лечению болезни Фабри заключается в лечении так называемыми фармакологическими шаперонами (PC). К таким PC относятся низкомолекулярные ингибиторы  $\alpha$ -Gal A, которые могут связываться с  $\alpha$ -Gal A, увеличивая стабильность как мутантного фермента, так и соответствующего фермента дикого типа. Однако, для осуществления терапии с помощью PC у пациентов должна иметься мутация или вариант, поддающиеся лечению,

которые приводят к продуцированию фермента, который может быть стабилизирован и свернут в конформацию, позволяющую осуществление транспорта из ER.

**[0009]** Таким образом, даже если наличие болезни Фабри диагностировано путем выявления недостаточности активности  $\alpha$ -Gal A в плазме крови или периферических лейкоцитах (WBC), очень трудно, если вообще возможно, предсказать, будет ли отвечать конкретный пациент с болезнью Фабри на лечение с помощью РС. Таким образом, сохраняется необходимость в идентификации новых мутаций или вариантов GLA, которые будут чувствительными к РС и сделают возможным создание новых способов лечения пациентов с болезнью Фабри с такими мутациями или вариантами.

#### КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ

**[0010]** Один аспект настоящего изобретения относится к способу лечения пациента, у которого диагностировано наличие болезни Фабри. Способ включает введение пациенту терапевтически эффективной дозы фармакологического шаперона для  $\alpha$ -Gal A, при этом у пациента имеется миссенс-мутация последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей  $\alpha$ -Gal A. В одном или нескольких вариантах осуществления мутация представляет собой 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 или N419D.

**[0011]** В различных вариантах осуществления эти мутации указаны относительно SEQ ID NO: 2. В одном или нескольких вариантах осуществления мутация представляет собой A29D относительно SEQ ID NO: 2. В одном или нескольких вариантах осуществления мутация представляет собой R38S относительно SEQ ID NO: 2. В одном или нескольких вариантах осуществления мутация представляет собой N53Y относительно SEQ ID NO: 2. В одном или нескольких вариантах осуществления мутация представляет собой Y88C



мутация представляет собой L310V относительно SEQ ID NO: 2. В одном или нескольких вариантах осуществления мутация представляет собой G360A относительно SEQ ID NO: 2. В одном или нескольких вариантах осуществления мутация представляет собой G360R относительно SEQ ID NO: 2. В одном или нескольких вариантах осуществления мутация представляет собой G375A относительно SEQ ID NO: 2. В одном или нескольких вариантах осуществления мутация представляет собой L394P относительно SEQ ID NO: 2. В одном или нескольких вариантах осуществления мутация представляет собой G411S относительно SEQ ID NO: 2. В одном или нескольких вариантах осуществления мутация представляет собой N419D относительно SEQ ID NO: 2.

**[0012]** В некоторых вариантах осуществления фармакологический шаперон предусматривает мигаластат или его соль. В одном или нескольких вариантах осуществления доза мигаластата или его соли составляет от приблизительно 100 мг до приблизительно 150 мг эквивалента свободного основания (FBE). В некоторых вариантах осуществления соль мигаластата представляет собой гидрохлорид мигаластата. В одном или нескольких вариантах осуществления доза составляет приблизительно 150 мг гидрохлорида мигаластата раз в два дня или представляет собой эквивалентную дозу мигаластата или его соли, отличной от гидрохлоридной соли. В некоторых вариантах осуществления мигаластат или его соль вводят перорально или путем инъекции. Такие варианты осуществления могут быть объединены друг с другом или с другими вариантами осуществления настоящего изобретения, например с вариантами осуществления, относящимися к способу обеспечения усиления в отношении  $\alpha$ -Gal A у пациента, у которого диагностировано или подозревается наличие болезни Фабри, применению фармакологического шаперона для  $\alpha$ -Gal A для получения лекарственного препарата для лечения пациента, у которого диагностировано наличие болезни Фабри, или фармакологическому шаперону для  $\alpha$ -Gal A для применения при лечении пациента, у которого диагностировано наличие болезни Фабри, а также с вариантами осуществления, относящимися к мутациям, поддающимся лечению, подходящим РС и дозам, составам и путям их введения.

**[0013]** Другой аспект настоящего изобретения относится к способу обеспечения усиления в отношении  $\alpha$ -Gal A у пациента, у которого диагностировано или подозревается наличие болезни Фабри. Способ включает введение пациенту терапевтически эффективной дозы фармакологического шаперона для  $\alpha$ -Gal A, при этом у пациента имеется миссенс-мутация в последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей  $\alpha$ -Gal A. В одном или нескольких вариантах осуществления мутация представляет собой 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 или N419D.

**[0014]** В различных вариантах осуществления эти мутации указаны относительно SEQ ID NO: 2. В одном или нескольких вариантах осуществления мутация представляет собой A29D относительно SEQ ID NO: 2. В одном или нескольких вариантах осуществления мутация представляет собой R38S относительно SEQ ID NO: 2. В одном или нескольких вариантах осуществления мутация представляет собой N53Y относительно SEQ ID NO: 2. В одном или нескольких вариантах осуществления мутация представляет собой Y88C относительно SEQ ID NO: 2. В одном или нескольких вариантах осуществления мутация представляет собой V124G относительно SEQ ID NO: 2. В одном или нескольких вариантах осуществления мутация представляет собой I133F относительно SEQ ID NO: 2. В одном или нескольких вариантах осуществления мутация представляет собой A143V относительно SEQ ID NO: 2. В одном или нескольких вариантах осуществления мутация представляет собой Y152N относительно SEQ ID NO: 2. В одном или нескольких вариантах осуществления мутация представляет собой F159C относительно SEQ ID NO: 2. В одном или нескольких вариантах осуществления мутация представляет собой A160D относительно SEQ ID NO: 2. В одном или нескольких вариантах осуществления мутация представляет собой D165N относительно SEQ ID NO: 2. В одном или нескольких вариантах осуществления мутация представляет собой F169I относительно SEQ ID NO: 2. В одном или нескольких вариантах осуществления мутация представляет собой L180V относительно SEQ ID NO: 2. В одном или

нескольких вариантах осуществления мутация представляет собой D182G относительно SEQ ID NO: 2. В одном или нескольких вариантах осуществления мутация представляет собой R196T относительно SEQ ID NO: 2. В одном или нескольких вариантах осуществления мутация представляет собой W209R относительно SEQ ID NO: 2. В одном или нескольких вариантах осуществления мутация представляет собой A257T относительно SEQ ID NO: 2. В одном или нескольких вариантах осуществления мутация представляет собой P259S относительно SEQ ID NO: 2. В одном или нескольких вариантах осуществления мутация представляет собой G271A относительно SEQ ID NO: 2. В одном или нескольких вариантах осуществления мутация представляет собой S276T относительно SEQ ID NO: 2. В одном или нескольких вариантах осуществления мутация представляет собой M290V относительно SEQ ID NO: 2. В одном или нескольких вариантах осуществления мутация представляет собой A291S относительно SEQ ID NO: 2. В одном или нескольких вариантах осуществления мутация представляет собой I303T относительно SEQ ID NO: 2. В одном или нескольких вариантах осуществления мутация представляет собой I303V относительно SEQ ID NO: 2. В одном или нескольких вариантах осуществления мутация представляет собой L310V относительно SEQ ID NO: 2. В одном или нескольких вариантах осуществления мутация представляет собой G360A относительно SEQ ID NO: 2. В одном или нескольких вариантах осуществления мутация представляет собой G360R относительно SEQ ID NO: 2. В одном или нескольких вариантах осуществления мутация представляет собой G375A относительно SEQ ID NO: 2. В одном или нескольких вариантах осуществления мутация представляет собой L394P относительно SEQ ID NO: 2. В одном или нескольких вариантах осуществления мутация представляет собой G411S относительно SEQ ID NO: 2. В одном или нескольких вариантах осуществления мутация представляет собой N419D относительно SEQ ID NO: 2.

**[0015]** В некоторых вариантах осуществления фармакологический шаперон предусматривает мигаластат или его соль. В одном или нескольких вариантах осуществления доза мигаластата или его соли составляет от приблизительно 100 мг до приблизительно 150 мг FBE. В некоторых вариантах

осуществления соль мигаластата представляет собой гидрохлорид мигаластата. В одном или нескольких вариантах осуществления доза составляет приблизительно 150 мг гидрохлорида мигаластата раз в два дня или представляет собой эквивалентную дозу мигаластата или его соли, отличной от гидрохлоридной соли. В некоторых вариантах осуществления мигаластат или его соль вводят перорально или путем инъекции. Такие варианты осуществления могут быть объединены друг с другом или с другими вариантами осуществления настоящего изобретения, например с вариантами осуществления, относящимися к способу лечения пациента с болезнью Фабри, применению фармакологического шаперона для  $\alpha$ -Gal A для получения лекарственного препарата для лечения пациента, у которого диагностировано наличие болезни Фабри, или фармакологическому шаперону для  $\alpha$ -Gal A для применения при лечении пациента, у которого диагностировано наличие болезни Фабри, а также с вариантами осуществления, относящимися к мутациям, поддающимся лечению, подходящим РС и дозам, составам и путям их введения.

[0016] Другой аспект настоящего изобретения относится к применению фармакологического шаперона для  $\alpha$ -Gal A для получения лекарственного препарата для лечения пациента, у которого диагностировано наличие болезни Фабри, при этом у пациента имеется миссенс-мутация в последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей  $\alpha$ -Gal A. В одном или нескольких вариантах осуществления мутация представляет собой 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 или N419D.

[0017] В различных вариантах осуществления эти мутации указаны относительно SEQ ID NO: 2. В одном или нескольких вариантах осуществления мутация представляет собой A29D относительно SEQ ID NO: 2. В одном или нескольких вариантах осуществления мутация представляет собой R38S относительно SEQ ID NO: 2. В одном или нескольких вариантах осуществления мутация представляет собой N53Y относительно SEQ ID NO: 2. В одном или



относительно SEQ ID NO: 2. В одном или нескольких вариантах осуществления мутация представляет собой L310V относительно SEQ ID NO: 2. В одном или нескольких вариантах осуществления мутация представляет собой G360A относительно SEQ ID NO: 2. В одном или нескольких вариантах осуществления мутация представляет собой G360R относительно SEQ ID NO: 2. В одном или нескольких вариантах осуществления мутация представляет собой G375A относительно SEQ ID NO: 2. В одном или нескольких вариантах осуществления мутация представляет собой L394P относительно SEQ ID NO: 2. В одном или нескольких вариантах осуществления мутация представляет собой G411S относительно SEQ ID NO: 2. В одном или нескольких вариантах осуществления мутация представляет собой N419D относительно SEQ ID NO: 2.

**[0018]** В некоторых вариантах осуществления фармакологический шаперон предусматривает мигаластат или его соль. В одном или нескольких вариантах осуществления доза мигаластата или его соли составляет от приблизительно 100 мг до приблизительно 150 мг FBE. В некоторых вариантах осуществления соль мигаластата представляет собой гидрохлорид мигаластата. В одном или нескольких вариантах осуществления доза составляет приблизительно 150 мг гидрохлорида мигаластата раз в два дня или представляет собой эквивалентную дозу мигаластата или его соли, отличной от гидрохлоридной соли. В некоторых вариантах осуществления мигаластат или его соль вводят перорально или путем инъекции. Такие варианты осуществления могут быть объединены друг с другом или с другими вариантами осуществления настоящего изобретения, например с вариантами осуществления, относящимися к способу лечения пациента с болезнью Фабри, способу обеспечения усиления в отношении  $\alpha$ -Gal A у пациента, у которого диагностировано или подозревается наличие болезни Фабри, или к фармакологическому шаперону для  $\alpha$ -Gal A для применения при лечении пациента, у которого диагностировано наличие болезни Фабри, а также с вариантами осуществления, относящимися к мутациям, поддающимся лечению, подходящим РС и дозам, составам и путям их введения.

[0019] Другой аспект настоящего изобретения относится к фармакологическому шаперону для  $\alpha$ -Gal A для применения при лечении пациента, у которого диагностировано наличие болезни Фабри, при этом у пациента имеется миссенс-мутация в последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей  $\alpha$ -Gal A. В одном или нескольких вариантах осуществления мутация представляет собой 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 или N419D.

[0020] В различных вариантах осуществления эти мутации указаны относительно SEQ ID NO: 2. В одном или нескольких вариантах осуществления мутация представляет собой A29D относительно SEQ ID NO: 2. В одном или нескольких вариантах осуществления мутация представляет собой R38S относительно SEQ ID NO: 2. В одном или нескольких вариантах осуществления мутация представляет собой N53Y относительно SEQ ID NO: 2. В одном или нескольких вариантах осуществления мутация представляет собой Y88C относительно SEQ ID NO: 2. В одном или нескольких вариантах осуществления мутация представляет собой V124G относительно SEQ ID NO: 2. В одном или нескольких вариантах осуществления мутация представляет собой I133F относительно SEQ ID NO: 2. В одном или нескольких вариантах осуществления мутация представляет собой A143V относительно SEQ ID NO: 2. В одном или нескольких вариантах осуществления мутация представляет собой Y152N относительно SEQ ID NO: 2. В одном или нескольких вариантах осуществления мутация представляет собой F159C относительно SEQ ID NO: 2. В одном или нескольких вариантах осуществления мутация представляет собой A160D относительно SEQ ID NO: 2. В одном или нескольких вариантах осуществления мутация представляет собой D165N относительно SEQ ID NO: 2. В одном или нескольких вариантах осуществления мутация представляет собой F169I относительно SEQ ID NO: 2. В одном или нескольких вариантах осуществления мутация представляет собой L180V относительно SEQ ID NO: 2. В одном или нескольких вариантах осуществления мутация представляет собой D182G

относительно SEQ ID NO: 2. В одном или нескольких вариантах осуществления мутация представляет собой R196T относительно SEQ ID NO: 2. В одном или нескольких вариантах осуществления мутация представляет собой W209R относительно SEQ ID NO: 2. В одном или нескольких вариантах осуществления мутация представляет собой A257T относительно SEQ ID NO: 2. В одном или нескольких вариантах осуществления мутация представляет собой P259S относительно SEQ ID NO: 2. В одном или нескольких вариантах осуществления мутация представляет собой G271A относительно SEQ ID NO: 2. В одном или нескольких вариантах осуществления мутация представляет собой S276T относительно SEQ ID NO: 2. В одном или нескольких вариантах осуществления мутация представляет собой M290V относительно SEQ ID NO: 2. В одном или нескольких вариантах осуществления мутация представляет собой A291S относительно SEQ ID NO: 2. В одном или нескольких вариантах осуществления мутация представляет собой I303T относительно SEQ ID NO: 2. В одном или нескольких вариантах осуществления мутация представляет собой I303V относительно SEQ ID NO: 2. В одном или нескольких вариантах осуществления мутация представляет собой L310V относительно SEQ ID NO: 2. В одном или нескольких вариантах осуществления мутация представляет собой G360A относительно SEQ ID NO: 2. В одном или нескольких вариантах осуществления мутация представляет собой G360R относительно SEQ ID NO: 2. В одном или нескольких вариантах осуществления мутация представляет собой G375A относительно SEQ ID NO: 2. В одном или нескольких вариантах осуществления мутация представляет собой L394P относительно SEQ ID NO: 2. В одном или нескольких вариантах осуществления мутация представляет собой G411S относительно SEQ ID NO: 2. В одном или нескольких вариантах осуществления мутация представляет собой N419D относительно SEQ ID NO: 2.

**[0021]** В некоторых вариантах осуществления фармакологический шаперон предусматривает мигаластат или его соль. В одном или нескольких вариантах осуществления доза мигаластата или его соли составляет от приблизительно 100 мг до приблизительно 150 мг FBE. В некоторых вариантах осуществления соль мигаластата представляет собой гидрохлорид мигаластата.

В одном или нескольких вариантах осуществления доза составляет приблизительно 150 мг гидрохлорида мигаластата раз в два дня или представляет собой эквивалентную дозу мигаластата или его соли, отличной от гидрохлоридной соли. В некоторых вариантах осуществления мигаластат или его соль вводят перорально или путем инъекции. Такие варианты осуществления могут быть объединены друг с другом или с другими вариантами осуществления настоящего изобретения, например с вариантами осуществления, относящимися к способу лечения пациента с болезнью Фабри, способу обеспечения усиления в отношении  $\alpha$ -Gal A у пациента, у которого диагностировано или подозревается наличие болезни Фабри, или применению фармакологического шаперона для  $\alpha$ -Gal A для получения лекарственного препарата для лечения пациента, у которого диагностировано наличие болезни Фабри, а также с вариантами осуществления, относящимися к мутациям, поддающимся лечению, подходящим РС и дозам, составам и путям их введения.

[0022] Ниже перечислены различные варианты осуществления. Будет понятно, что перечисленные ниже варианты осуществления можно комбинировать не только как указано ниже, но и в других подходящих комбинациях в соответствии с объемом настоящего изобретения.

#### КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[0023] На фиг. 1A-E показана полная последовательность ДНК гена GLA дикого типа человека (SEQ ID NO: 1);

[0024] на фиг. 2 показан белок  $\alpha$ -Gal A дикого типа (SEQ ID NO: 2); и

[0025] на фиг. 3 показана последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая белок  $\alpha$ -Gal A дикого типа (SEQ ID NO: 3).

#### ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

[0026] Прежде чем перейти к описанию нескольких иллюстративных вариантов осуществления настоящего изобретения, следует понимать, что

настоящее изобретение не ограничено подробными данными по конструкции или стадиям способа, указанными в следующем описании. Настоящее изобретение допускает другие варианты осуществления и может быть осуществлено на практике или выполнено различными путями.

[0027] Различные аспекты настоящего изобретения относятся к идентификации новых мутаций GLA у пациентов с болезнью Фабри, которые будут отвечать на лечение фармакологическими шаперонами. Другие аспекты настоящего изобретения также относятся к лечению таких пациентов с болезнью Фабри. Например, неожиданно было обнаружено, что низкая активность  $\alpha$ -Gal A в результате миссенс-мутаций 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 или N419D в  $\alpha$ -Gal A может повышаться при воздействии фармакологических шаперонов. А значит пациенты с такими мутациями будут чувствительными к лечению с помощью фармакологических шаперонов.

[0028] Определения

[0029] Термины, используемые в данном описании в целом имеют их обычные значения в данной области техники, в контексте настоящего изобретения и в конкретном контексте, где используется каждый термин. Определенные термины обсуждаются ниже или в других местах в данном описании, чтобы обеспечить дополнительное указание для практикующего специалиста при описании композиций и способов по настоящему изобретению и их получении и использовании.

[0030] Термин "болезнь Фабри" относится к X-сцепленной врожденной ошибке катаболизма гликофинголипидов из-за недостаточности активности лизосомальной  $\alpha$ -Gal A. Этот дефект вызывает накопление субстрата, представляющего собой глоботриаозилцерамид ("GL-3", также известный как Gb<sub>3</sub> или тригексозид церамида), и родственных гликофинголипидов в эндотелиальных лизосомах сосудов сердца, почек, кожи и других тканей.

Другим субстратом фермента является глоботриаозилсфингозин плазмы крови ("lyso-Gbb<sub>3</sub> плазмы крови").

[0031] "Носителем" является женщина, у которой имеется одна X-хромосома с дефектным геном  $\alpha$ -Gal A и одна X-хромосома с нормальным геном и у которой в клетках одного или нескольких типов имеет место инактивация X-хромосомы с нормальным аллелем. У носителя часто диагностируют наличие болезни Фабри.

[0032] "Пациент" относится к субъекту, у которого диагностировано или подозревается наличие определенного заболевания. Пациентом может быть человек или животное.

[0033] "Пациент с болезнью Фабри" относится к индивидууму, у которого диагностировано или подозревается наличие болезни Фабри и который имеет мутантную  $\alpha$ -Gal A, как дополнительно определено ниже. Характерные маркеры болезни Фабри могут встречаться у мужчин-гемизигот и женщин-носителей с одинаковой распространенностью, хотя женщины, как правило, поражаются менее тяжелой формой.

[0034]  $\alpha$ -галактозидаза A ( $\alpha$ -Gal A) человека относится к ферменту, кодируемому геном GLA человека. Полная последовательность ДНК  $\alpha$ -Gal A, включая интроны и экзоны, доступна в GenBank под № доступа X14448.1 и показана на фиг. 1A-E (SEQ ID NO: 1). Фермент  $\alpha$ -Gal A человека состоит из 429 аминокислот и доступен в GenBank под №№ доступа X14448.1 и U78027 и показан на фиг. 2 (SEQ ID NO: 2). Последовательность нуклеиновой кислоты, которая содержит только кодирующие области (т. е. экзоны) под SEQ ID NO: 1, показана на фиг. 3 (SEQ ID NO: 3).

[0035] Термин "мутантный белок" включает белок, который характеризуется наличием мутации в гене, кодирующем этот белок, которая в результате приводит к неспособности белка достичь стабильной конформации в условиях, обычно присутствующих в ER. Неспособность достичь стабильной

конформации в результате приводит к тому, что значительное количество фермента разрушается, а не транспортируется в лизосому. Такую мутацию иногда называют "конформационным мутантом". Такие мутации включают без ограничения миссенс-мутации и небольшие делеции и вставки в рамке считывания. Как используется в данном документе, делеции обозначены сокращением "del", а вставки обозначены сокращением "ins". Таким образом, изменение нуклеотида "с.184\_185insTAG" относится к вставке нуклеотидной последовательности TAG между нуклеотидами 184 и 185, а изменение белковой последовательности "S62delinsLA" относится к делеции аминокислоты S (серина) в положении 62 и к вставке аминокислотной последовательности LA (лейцина и аланина).

**[0036]** Используемый в одном варианте осуществления в данном документе термин "мутантная  $\alpha$ -Gal A" включает  $\alpha$ -Gal A, которая характеризуется наличием мутации в гене, кодирующем  $\alpha$ -Gal A, которая в результате приводит к неспособности фермента достичь стабильной конформации в условиях, обычно присутствующих в ER. Неспособность достичь стабильной конформации в результате приводит к тому, что значительное количество фермента разрушается, а не транспортируется в лизосому.

**[0037]** Применяемый в данном документе термин "специфический фармакологический шаперон" ("SPC") или "фармакологический шаперон" ("PC") относится к любой молекуле, включая малую молекулу, белок, пептид, нуклеиновую кислоту, углевод и т. д., которая специфически связывается с белком и оказывает один или несколько из следующих эффектов: (i) усиливает образование стабильной молекулярной конформации белка; (ii) индуцирует транспорт белка из ER в другое местоположение в клетке, предпочтительно в его нативное местоположение в клетке, т. е. предотвращает связанное с ER разрушение белка; (iii) предотвращает агрегацию неправильно свернутых белков; и/или (iv) восстанавливает или усиливает по меньшей мере частичную функцию и/или активность белка дикого типа. Соединение, которое

специфически связывается, например, с  $\alpha$ -Gal A, означает, что оно связывается с определенным ферментом и оказывает шаперонный эффект в отношении этого фермента, а не общей группы родственных или неродственных ферментов. Более конкретно, этот термин не относится к эндогенным шаперонам, таким как BiP, или к неспецифическим средствам, у которых была продемонстрирована неспецифическая шапероновая активность в отношении различных белков, таких как глицерин, DMSO или дейтерированная вода, т.е. химическим шаперонам. В одном или нескольких вариантах осуществления настоящего изобретения PC может быть обратимым конкурентным ингибитором. В одном варианте осуществления PC представляет собой мигаластат или его соль. В другом варианте осуществления PC представляет собой свободное основание мигаластата (например, 123 мг свободного основания мигаластата). В еще одном варианте осуществления PC представляет собой соль мигаластата (например, 150 мг мигаластата HCl).

[0038] "Конкурентный ингибитор" фермента может относиться к соединению, которое структурно напоминает химическую структуру и молекулярную геометрию субстрата фермента для связывания фермента примерно в том же месте, что и субстрат. Таким образом, ингибитор конкурирует за тот же активный сайт, что и молекула субстрата, тем самым увеличивая  $K_m$ . Конкурентное ингибирование обычно является обратимым, если имеется достаточное количество молекул субстрата для замены ингибитора, т. е. конкурентные ингибиторы могут связываться обратимо. Следовательно, степень ингибирования фермента зависит от концентрации ингибитора, концентрации субстрата и значений относительной аффинности ингибитора и субстрата к активному сайту.

[0039] Применяемый в данном документе термин "специфически связывает" относится к взаимодействию фармакологического шаперона с белком, таким как  $\alpha$ -Gal A, в частности, к взаимодействию с аминокислотными остатками белка, которые непосредственно участвуют в контакте с фармакологическим шапероном. Фармакологический шаперон специфически

связывается с целевым белком, например с  $\alpha$ -Gal A, оказывая шаперонный эффект в отношении этого белка, а не общей группы родственных или неродственных белков. Аминокислотные остатки белка, которые взаимодействуют с каким-либо определенным фармакологическим шапероном, могут находиться или не находиться в "активном сайте" белка. Специфическое связывание можно оценивать с помощью стандартных анализов связывания или с помощью структурных исследований, например совместной кристаллизации, ЯМР и т. п. Активным сайтом у  $\alpha$ -Gal A является сайт связывания субстрата.

**[0040]** "Недостаточная активность  $\alpha$ -Gal A" относится к активности  $\alpha$ -Gal A в клетках пациента, которая ниже нормального диапазона по сравнению (с использованием тех же способов) с активностью у здоровых индивидуумов, не имеющих или без подозрения на наличие болезни Фабри или любого другого заболевания (особенно заболевания крови).

**[0041]** Применяемые в данном документе термины "усиливать активность  $\alpha$ -Gal A" или "увеличивать активность  $\alpha$ -Gal A" относятся к увеличению количества  $\alpha$ -Gal A, которая принимает стабильную конформацию в клетке, которую приводили в контакт с фармакологическим шапероном, специфическим к  $\alpha$ -Gal A, относительно количества в клетке (предпочтительно клетке того же типа или той же клетке, например, в более раннее время), которую не приводили в контакт с фармакологическим шапероном, специфическим к  $\alpha$ -Gal A. Этот термин также относится к увеличению уровня транспорта  $\alpha$ -Gal A в лизосому в клетке, которую приводили в контакт с фармакологическим шапероном, специфическим к  $\alpha$ -Gal A, по сравнению с транспортом  $\alpha$ -Gal A, которую не приводили в контакт с фармакологическим шапероном, специфическим к такому белку. Эти термины относятся как к  $\alpha$ -Gal A дикого типа, так и к мутантной  $\alpha$ -Gal A. В одном варианте осуществления увеличение количества  $\alpha$ -Gal A в клетке измеряют путем измерения уровня гидролиза искусственного субстрата в лизатах из клеток, которые были обработаны с помощью РС. Увеличение уровня гидролиза свидетельствует об увеличенной активности  $\alpha$ -Gal A.

[0042] Термин "активность  $\alpha$ -Gal A" относится к нормальной физиологической функции  $\alpha$ -Gal A дикого типа в клетке. Например, активность  $\alpha$ -Gal A предусматривает гидролиз GL-3.

[0043] "Пациент, у которого наблюдается ответ на лечение" представляет собой индивидуума, у которого диагностировано или подозревается наличие лизосомального нарушения накопления, такого как, например, болезнь Фабри, клетки которого проявляют достаточно увеличенную активность  $\alpha$ -Gal A соответственно, и/или уменьшение выраженности симптомов или увеличение уровня суррогатных маркеров в ответ на контакт с РС. Неограничивающими примерами увеличения уровня суррогатных маркеров при болезни Фабри являются lyso-GB<sub>3</sub> и соединения, раскрытые в публикации заявки на патент США № US 2010-0113517, которая, таким образом, включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

[0044] Неограничивающие примеры улучшения в отношении суррогатных маркеров при болезни Фабри, раскрытых в US 2010/0113517, включают увеличение уровней или активности  $\alpha$ -Gal A в клетках (например, фибробластах) и ткани; уменьшение уровня накопления GL-3; снижение концентрации гомоцистеина и васкулярной молекулы клеточной адгезии-1 (VCAM-1) в плазме крови; снижение уровня накопления GL-3 в клетках миокарда и фиброцитах клапанов; уменьшение уровня lyso-Gb<sub>3</sub> в плазме крови; уменьшение степени гипертрофии сердца (особенно левого желудочка), уменьшение выраженности клапанной недостаточности и аритмии; уменьшение выраженности протеинурии; сниженные концентрации липидов в моче, таких как СТН, лактозилцерамид, церамид, и увеличение концентрации глюкозилцерамида и сфингомиелина в моче; отсутствие слоистых телец-включений (зэбровидных телец) в эпителиальных клетках клубочков; варианты улучшения функции почек; частичное устранение гипогидроза; отсутствие ангиокератом; и варианты улучшения в отношении нарушений слуха, таких как высокочастотная нейросенсорная тугоухость, прогрессирующая тугоухость, внезапная глухота или шум в ушах. Ослабления неврологических симптомов включают

предотвращение преходящего нарушения мозгового кровообращения (ТИА) или инсульта; и уменьшение интенсивности нейропатической боли, проявляющейся как акропарестезия (чувство жжения или покалывания в конечностях). Другим типом клинического маркера, который можно оценивать при болезни Фабри, является частота случаев болезнетворных сердечно-сосудистых проявлений. Общие связанные с сердцем признаки и симптомы болезни Фабри включают гипертрофию левого желудочка, клапанный порок (особенно пролапс митрального клапана и/или регургитация), преждевременное заболевание коронарной артерии, стенокардию, инфаркт миокарда, нарушения проводимости, аритмии, застойную сердечную недостаточность.

**[0045]** Доза, которая приводит к достижению одного или нескольких из вышеупомянутых ответов, является "терапевтически эффективной дозой".

**[0046]** Фраза "фармацевтически приемлемый" относится к молекулярным единицам и композициям, которые являются физиологически переносимыми и обычно не приводят к нежелательным реакциям при введении человеку. В некоторых вариантах осуществления используемый в данном документе термин "фармацевтически приемлемый" означает одобренный регулирующим ведомством федерального правительства или правительства штата или включенный в список препаратов для применения у животных, а более конкретно у людей, в Фармакопее США или другой общепризнанной фармакопее. Термин "носитель" применительно к фармацевтическому носителю относится к разбавителю, адъюванту, вспомогательному веществу или среденосителю, с которыми вводят соединение. Такими фармацевтическими носителями могут являться стерильные жидкости, такие как вода и масла. В качестве носителей, в частности для инъекционных растворов, предпочтительно используют воду или водные солевые растворы и водные растворы декстрозы и глицерина. Подходящие фармацевтические носители описаны в 18-ом издании "Remington's Pharmaceutical Sciences", E.W, Martin, или других изданиях.

[0047] Применяемый в данном документе термин "выделенный" означает, что указанный материал удален из среды, в которой он обычно находится. Таким образом, выделенный биологический материал может не содержать клеточных компонентов, т. е. компонентов клеток, в которых материал встречается или продуцируется. В случае молекул нуклеиновой кислоты выделенная нуклеиновая кислота включает продукт ПЦР, полосу mRNA на геле, cDNA или рестрикционный фрагмент. В другом варианте осуществления выделенная нуклеиновая кислота предпочтительно является вырезанной из хромосомы, в которой она может встречаться, и более предпочтительно уже не присоединена к нерегуляторным, некодирующим областям или к другим генам, расположенным выше или ниже гена, содержащегося в выделенной молекуле нуклеиновой кислоты, когда он находится в хромосоме. В еще одном варианте осуществления в выделенной нуклеиновой кислоте отсутствует один или несколько интронов. Выделенные нуклеиновые кислоты включают последовательности, вставленные в плазмиды, космиды, искусственные хромосомы и т. п. Таким образом, в конкретном варианте осуществления рекомбинантная нуклеиновая кислота представляет собой выделенную нуклеиновую кислоту. Выделенный белок может быть связан с другими белками или нуклеиновыми кислотами или как с первыми, так и со вторыми, с которыми он связан в клетке, или с клеточными мембранами, если он является мембраносвязанным белком. Выделенные органелла, клетка или ткань являются удаленными из анатомического участка, в котором они находятся в организме. Выделенный материал может быть очищенным, однако это не является обязательным.

[0048] Термины "приблизительно" и "примерно" в целом должны означать приемлемую степень погрешности для измеряемой величины с учетом природы или точности измерений. Обычно иллюстративные степени погрешности находятся в пределах 20 процентов (%), предпочтительно в пределах 10% и более предпочтительно в пределах 5% от заданного значения или диапазона значений. В качестве альтернативы и, в частности, в биологических системах термины "приблизительно" и "примерно" могут означать значения, которые находятся в пределах порядка величин, предпочтительно в пределах 10- или 5-

кратного и более предпочтительно в пределах 2-кратного изменения от указанного значения. Численные величины, приведенные в данном документе, являются примерными, если не указано иное, что означает, что термин "приблизительно" или "примерно" может подразумеваться, если не указано точно.

**[0049]** Термин "заместительная ферментная терапия" или "ERT" относится к введению ненативного очищенного фермента индивидууму с дефицитом такого фермента. Вводимый белок можно получить из природных источников или путем рекомбинантной экспрессии (как описано более подробно ниже). Термин также относится к введению очищенного фермента индивидууму, которому по другим причинам необходимо введение очищенного фермента или получающему пользу от этого, например, страдающему от недостаточности фермента. Вводимый фермент может представлять собой очищенный рекомбинантный фермент, полученный *in vitro*, или белок, очищенный из выделенной ткани или жидкости, такой как, например, плацента или молоко животных, или из растений.

**[0050]** Применяемый в данном документе термин "эквивалент свободного основания" или "FBE" относится к количеству мигаластата, присутствующего в мигаластате или его соли. Другими словами, термин "FBE" означает либо количество свободного основания мигаластата, либо эквивалентное количество свободного основания мигаластата, которое представлено солью мигаластата. Например, из-за веса гидрохлоридной соли, из 150 мг гидрохлорида мигаластата получают лишь 123 мг мигаластата в виде мигаластата в форме свободного основания. Ожидается, что и другие соли будут иметь различные коэффициенты преобразования в зависимости от молекулярного веса соли.

**[0051]** Термин "мигаластат" охватывает свободное основание мигаластата или его фармацевтически приемлемую соль (например, мигаластат HCl), если конкретно не указано иное.

[0052] Термины "мутация" и "вариант" (например, как в "мутация или вариант, поддающиеся лечению") относятся к изменению в нуклеотидной последовательности гена или хромосомы. Эти два термина, упоминаемых в данном документе, как правило, применяются вместе, например, как в "мутация или вариант", в отношении изменения в нуклеотидной последовательности, указанного в предыдущем предложении. Если по какой-либо причине упоминается только один из двух терминов, включение отсутствующего термина предусмотрено, и это следует понимать таким образом. Кроме того, термины "мутация, поддающаяся лечению" и "вариант, поддающийся лечению" относятся к мутации или варианту, которые поддаются лечению посредством терапии с помощью РС, например к мутации, которая поддается лечению посредством терапии с помощью мигаластата. Конкретным типом мутации или варианта, поддающихся лечению, является "мутация или вариант, поддающиеся лечению согласно результатам анализа в клетках НЕК", которые представляют собой мутацию или вариант, определяемые как поддающиеся лечению посредством терапии с помощью мигаластата в соответствии с критериями в анализе в клетках НЕК *in vitro*, описанном в данном документе.

[0053] Болезнь Фабри

[0054] Болезнь Фабри представляет собой редкое, прогрессирующее и разрушительное лизосомальное нарушение накопления, сцепленное с X-хромосомой. Мутации в гене GLA приводят к дефициту лизосомального фермента  $\alpha$ -Gal A, который необходим для метаболизма гликофинголипидов. Снижение активности  $\alpha$ -Gal A на ранних этапах жизни приводит к накоплению гликофинголипидов, в том числе GL-3 и lyso-Gb<sub>3</sub> в плазме крови, и приводит к симптомам и ограничивающим жизнь последствиям от болезни Фабри, включая боль, желудочно-кишечные симптомы, отказ почек, кардиомиопатию, цереброваскулярные явления и раннюю смертность. Раннее начало терапии и пожизненное лечение предоставляют возможность замедлить прогрессирование заболевания и продлить продолжительность жизни.

[0055] Болезнь Фабри охватывает спектр степеней тяжести заболевания и возраст возникновения, хотя ее традиционно делят на 2 основных фенотипа: "классический" и "с поздним началом". Классический фенотип был приписан главным образом мужчинам с уровнем активности  $\alpha$ -Gal A в диапазоне от не поддающегося обнаружению до низкого и более ранним началом почечных, сердечных и/или цереброваскулярных проявлений. Фенотип с поздним началом был приписан главным образом мужчинам с более высокой остаточной активностью  $\alpha$ -Gal A и более поздним началом таких проявлений. Гетерозиготные носители женского пола обычно экспрессируют фенотип с поздним началом, но в зависимости от характера инактивации X-хромосомы может также проявляться классический фенотип.

[0056] Было выявлено более 1000 мутаций GLA, вызывающих болезнь Фабри. Примерно 60% являются миссенс-мутациями, приводящими к одиночным аминокислотным заменам в ферменте  $\alpha$ -Gal A. Миссенс-мутации GLA часто приводят к образованию аномально свернутых и нестабильных форм  $\alpha$ -Gal A, и большинство из них связаны с классическим фенотипом. Нормальные клеточные механизмы контроля качества в эндоплазматическом ретикулуле блокируют перенос таких аномальных белков в лизосомы и направляют их на преждевременное разрушение и выведение. Многие миссенс-мутантные формы являются мишенями для мигаластата, фармакологического шаперона, специфического в отношении  $\alpha$ -Gal A.

[0057] Клинические проявления болезни Фабри охватывают широкий спектр степеней тяжести и в общих чертах коррелируют с остаточными уровнями  $\alpha$ -GAL у пациента. Большинство пациентов, которых лечат в настоящее время, называют пациентами, с классической болезнью Фабри, большая часть из которых — мужчины. Эти пациенты страдают от заболевания различных органов, в том числе почек, сердца и головного мозга, при этом симптомы заболевания впервые появляются в подростковом возрасте и обычно прогрессируют по степени тяжести вплоть до смерти на четвертом или пятом десятилетии жизни. Ряд недавних исследований позволяет предположить, что

существует большое количество мужчин и женщин, которым не поставлен диагноз, у которых имеется ряд симптомов болезни Фабри, таких как нарушение функции сердца или почек и инсульта, которые обычно впервые появляются в зрелом возрасте. Индивидуумы с таким типом болезни Фабри, называемой болезнью Фабри с поздним началом, склонны иметь более высокие остаточные уровни  $\alpha$ -GAL, чем пациенты, болеющие классической болезнью Фабри. Индивидуумы с поздним началом болезни Фабри обычно впервые испытывают симптомы заболевания во взрослом возрасте и часто имеют симптомы заболевания, сосредоточенные на одном органе, такие как увеличение левого желудочка или прогрессирующий отказ почек. Кроме того, болезнь Фабри с поздним началом также может проявляться в виде инсультов с неизвестной этиологией.

**[0058]** Пациенты с болезнью Фабри имеют прогрессирующую почечную недостаточность, а у не проходящих лечение пациентов к пятому десятилетию жизни проявляется терминальная стадия почечной недостаточности. Дефицит активности  $\alpha$ -Gal A приводит к накоплению GL-3 и родственных гликофинголипидов в клетках многих типов, включая клетки в почке. GL-3 накапливается в подоцитах, эпителиальных клетках и канальцевых клетках дистального канальца и петли Генле. Недостаточность функции почек может проявляться в виде протеинурии и сниженной скорости клубочковой фильтрации.

**[0059]** Поскольку болезнь Фабри является редкой, поражает множество органов, имеет широкий возрастной диапазон начала проявления и неоднородна, правильная диагностика является проблематичной. Уровень осведомленности среди работников здравоохранения низок, и часто ставятся ошибочные диагнозы. Диагноз болезни Фабри чаще всего подтверждают по сниженной активности  $\alpha$ -Gal A в плазме крови или периферических лейкоцитах (WBC) после прохождения пациентом симптоматического анализа в сочетании с мутационным анализом. У женщин диагностика является еще более сложной, поскольку ферментативная идентификация женщин-носителей менее надежна

из-за случайной инактивации X-хромосомы в некоторых клетках у носителей. Например, некоторые "неизбежные носители" (дочери классически пораженных мужчин) имеют активности фермента  $\alpha$ -Gal A в диапазоне от нормальной до очень низкой активности. Поскольку носители могут обладать нормальной активностью фермента  $\alpha$ -Gal A в лейкоцитах, только идентификация мутации  $\alpha$ -Gal A путем генетического тестирования обеспечивает точную идентификацию и/или диагностику носителя.

**[0060]** Кроме того, как описано выше, возраст начала, прогрессирование и тяжесть болезни Фабри по меньшей мере частично зависят от скорости накопления субстрата, который коррелирует с ферментативной активностью в лизосомах. Таким образом, полное отсутствие остаточной активности может соответствовать быстрому накоплению субстрата и, следовательно, более тяжелой форме заболевания (с ранним началом и быстрым прогрессированием). Однако даже небольших количественных показателей остаточной активности может быть достаточно для разрушения больших количеств субстрата. Это, в свою очередь, приведет к развитию более легкого заболевания с более поздним началом и более медленным прогрессированием вследствие замедленного накопления субстрата. Принимая во внимание эти факторы, считают, что даже незначительное увеличение ферментативной активности может обеспечить уменьшение эффекта тяжелого клинического фенотипа. Данные указывают на то, что согласно оценкам в случае большинства LSD наличие даже 1%-6% нормальной активности является достаточным, чтобы отсрочить или предотвратить начало заболевания или вызвать более легкую форму заболевания. То есть даже небольшое увеличение активности может оказать значительное влияние на уровни субстрата и, следовательно, на тяжесть заболевания и скорость прогрессирования заболевания. И наоборот, предполагают, что мутантный лизосомальный фермент, который не демонстрирует ответ *in vitro*, также не будет отвечать *in vivo*.

**[0061]** В одном или нескольких вариантах осуществления мутантные или вариантные формы  $\alpha$ -Gal A, которые считаются поддающимися лечению с

помощью мигаластата, определяют как демонстрирующие относительное увеличение (+10 мкМ мигаластата) в  $\geq 1,20$  раза и абсолютное увеличение (+10 мкМ мигаластата), составляющее  $\geq 3,0\%$  от значения для дикого типа, при экспрессии мутантной формы  $\alpha$ -Gal A в клетках HEK-293 (что называют "анализом в клетках HEK") в соответствии с валидированным согласно надлежащей лабораторной практике (GLP) анализом *in vitro* (анализом в клетках HEK или анализом восприимчивости к лечению с помощью мигаластата, соответствующим требованиям GLP). Такие мутации или варианты также в данном документе называют мутациями или вариантами, "поддающимися лечению согласно результатам анализа в клетках HEK".

**[0062]** Были предусмотрены способы предварительного скрининга, с помощью которых оценивают повышение уровня фермента до начала лечения. Например, анализ с применением клеток HEK-293 используют в клинических испытаниях для прогнозирования того, будет ли данная мутация чувствительной к лечению с помощью фармакологического шаперона (например, мигаластата). В данном анализе создают cDNA-конструкции. Соответствующие мутантные формы  $\alpha$ -Gal A временно экспрессируют в клетках HEK-293. Затем клетки инкубируют  $\pm$  мигаластат (от 17 нМ до 1 мМ) в течение 4-5 дней. После этого измеряют уровни  $\alpha$ -Gal A в лизатах клеток с применением синтетического флуорогенного субстрата (4-MU- $\alpha$ -Gal) или с помощью вестерн-блоттинга. Так поступают в случае известных миссенс-мутаций или небольших вставок/делеций в рамке считывания, вызывающих заболевание. Мутации, которые ранее были идентифицированы как чувствительные к РС (например, мигаластату) с помощью таких способов, перечислены в патенте США № 8592362, который, таким образом, включен в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

**[0063]** Мутации, поддающиеся лечению согласно результатам анализа в клетках HEK, включают по меньшей мере такие мутации, перечисленные в таблице справочных данных по фармакологии (например, мутации, упоминаемые в инструкциях по медицинскому применению США или

международных инструкциях по медицинскому применению для продукта на основе мигаластата, такого как GALAFOLD<sup>®</sup>). Применяемый в данном документе термин "таблица справочных данных по фармакологии" относится к любой общедоступной письменной или электронной записи, включенной либо в инструкцию по медицинскому применению в упаковке продукта на основе мигаластата (например, GALAFOLD<sup>®</sup>), либо на веб-сайте, доступном поставщикам медицинских услуг, которая сообщает о том, являются ли конкретные мутация или вариант чувствительными к терапии с помощью РС, представляющего собой мигаластат (например, GALAFOLD<sup>®</sup>), и такая запись не обязательно ограничена письменными записями, представленными в табличной форме. В одном варианте осуществления настоящего изобретения "таблица справочных данных по фармакологии", таким образом, относится к любому хранилищу информации, которое включает в себя одну(один) или несколько мутаций или вариантов, поддающихся лечению. В другом варианте осуществления «таблица справочных данных по фармакологии» относится к обновленному хранилищу поддающихся лечению мутаций или вариантов, которое включает новые мутации или варианты, раскрытые в настоящем документе (т. е., 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 или N419D). Иллюстративную таблицу справочных данных по фармакологии для мутаций, поддающихся лечению согласно результатам анализа в клетках НЕК, также можно найти в общей характеристике лекарственного препарата и/или информации о назначении для GALAFOLD<sup>®</sup> в ряде стран, в которых GALAFOLD<sup>®</sup> одобрен для применения, или на веб-сайте, таком как [www.galafoldamenabilitytable.com](http://www.galafoldamenabilitytable.com) или [www.fabrygenevariantsearch.com](http://www.fabrygenevariantsearch.com), каждый из которых, таким образом, включен в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

[0064] Однако поскольку только определенные мутации поддаются лечению с помощью мигаластата, существует необходимость идентификации новых мутаций и определения того, поддаются ли такие мутации лечению

посредством терапии с помощью мигаластата. Как описано в приведенных ниже примерах, некоторые новые мутации были идентифицированы и определены как мутации, которые поддающимся лечению посредством терапии с помощью мигаластата. Такие мутации включают 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 и N419D.

**[0065]** Соответственно, в одном или нескольких вариантах осуществления мигаластат применяют для лечения болезни Фабри и/или усиления активности  $\alpha$ -Gal A у пациента, у которого имеется мутация  $\alpha$ -Gal A, выбранная из группы, состоящей из A29D, R38S, N53Y, Y88C, V124G, I133F, A143V, Y152N, F159C, A160D и D165N. В одном или нескольких вариантах осуществления мигаластат применяют для лечения болезни Фабри и/или усиления активности  $\alpha$ -Gal A у пациента, у которого имеется мутация  $\alpha$ -Gal A, выбранная из группы, состоящей из F169I, L180V, D182G, R196T, W209R, A257T, P259S, G271A, S276T и M290V. В одном или нескольких вариантах осуществления мигаластат применяют для лечения болезни Фабри и/или усиления активности  $\alpha$ -Gal A у пациента, у которого имеется мутация  $\alpha$ -Gal A, выбранная из группы, состоящей из A291S, I303T, I303V, L310V, G360A, G360R, G375A, L394P, G411S и N419D.

**[0066]** В одном или нескольких вариантах осуществления у пациента имеется мутация A29D. В одном или нескольких вариантах осуществления у пациента имеется мутация R38S. В одном или нескольких вариантах осуществления у пациента имеется мутация N53Y. В одном или нескольких вариантах осуществления у пациента имеется мутация Y88C. В одном или нескольких вариантах осуществления у пациента имеется мутация V124G. В одном или нескольких вариантах осуществления у пациента имеется мутация I133F. В одном или нескольких вариантах осуществления у пациента имеется мутация A143V. В одном или нескольких вариантах осуществления у пациента имеется мутация Y152N. В одном или нескольких вариантах осуществления у пациента имеется мутация F159C. В одном или нескольких вариантах

осуществления у пациента имеется мутация A160D. В одном или нескольких вариантах осуществления у пациента имеется мутация D165N. В одном или нескольких вариантах осуществления у пациента имеется мутация F169I. В одном или нескольких вариантах осуществления у пациента имеется мутация L180V. В одном или нескольких вариантах осуществления у пациента имеется мутация D182G. В одном или нескольких вариантах осуществления у пациента имеется мутация R196T. В одном или нескольких вариантах осуществления у пациента имеется мутация W209R. В одном или нескольких вариантах осуществления у пациента имеется мутация A257T. В одном или нескольких вариантах осуществления у пациента имеется мутация P259S. В одном или нескольких вариантах осуществления у пациента имеется мутация G271A. В одном или нескольких вариантах осуществления у пациента имеется мутация S276T. В одном или нескольких вариантах осуществления у пациента имеется мутация M290V. В одном или нескольких вариантах осуществления у пациента имеется мутация A291S. В одном или нескольких вариантах осуществления у пациента имеется мутация I303T. В одном или нескольких вариантах осуществления у пациента имеется мутация I303V. В одном или нескольких вариантах осуществления у пациента имеется мутация L310V. В одном или нескольких вариантах осуществления у пациента имеется мутация G360A. В одном или нескольких вариантах осуществления у пациента имеется мутация G360R. В одном или нескольких вариантах осуществления у пациента имеется мутация G375A. В одном или нескольких вариантах осуществления у пациента имеется мутация L394P. В одном или нескольких вариантах осуществления у пациента имеется мутация G411S. В одном или нескольких вариантах осуществления у пациента имеется мутация N419D. В различных вариантах осуществления такие мутации  $\alpha$ -Gal A указаны относительно аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 2.

**[0067]** Иллюстративные изменения нуклеотидов в соответствии с такими новыми мутациями показаны в приведенной ниже таблице 1.

Таблица 1. Новые мутации, поддающиеся лечению с помощью мигаластата

<b>Изменение нуклеотида</b>	<b>Изменение последовательности белка</b>
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
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

**[0068]** Соответственно, в различных вариантах осуществления, мигаластат применяют для лечения болезни Фабри и/или усиления активности  $\alpha$ -Gal A у пациента, у которого имеется мутация GLA, выбранная из группы, состоящей из 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 и c.1255A>G. В одном или нескольких вариантах осуществления у пациента имеется мутация GLA c.86C>A. В одном или нескольких вариантах осуществления у пациента имеется мутация GLA c.114G>C. В одном или нескольких вариантах осуществления у пациента имеется мутация GLA c.157A>T. В одном или нескольких вариантах осуществления у пациента имеется мутация GLA c.263A>G. В одном или нескольких вариантах осуществления у пациента имеется мутация GLA c.371T>G. В одном или нескольких вариантах осуществления у пациента имеется мутация GLA c.397A>T. В одном или нескольких вариантах осуществления у пациента имеется мутация GLA c.428C>T. В одном или нескольких вариантах осуществления у пациента имеется мутация GLA c.454T>A. В одном или нескольких вариантах осуществления у пациента имеется мутация GLA c.476T>G. В одном или нескольких вариантах осуществления у пациента имеется мутация GLA c.479C>A. В одном или нескольких вариантах осуществления у пациента имеется мутация GLA c.493G>A. В одном или нескольких вариантах осуществления у пациента имеется мутация GLA c.505T>A. В одном или нескольких вариантах

осуществления у пациента имеется мутация GLA с.538T>G. В одном или нескольких вариантах осуществления у пациента имеется мутация GLA с.545A>G. В одном или нескольких вариантах осуществления у пациента имеется мутация GLA с.587G>C. В одном или нескольких вариантах осуществления у пациента имеется мутация GLA с.625T>A. В одном или нескольких вариантах осуществления у пациента имеется мутация GLA с.769G>A. В одном или нескольких вариантах осуществления у пациента имеется мутация GLA с.775C>T. В одном или нескольких вариантах осуществления у пациента имеется мутация GLA с.812G>C. В одном или нескольких вариантах осуществления у пациента имеется мутация GLA с.827G>C. В одном или нескольких вариантах осуществления у пациента имеется мутация GLA с.868A>G. В одном или нескольких вариантах осуществления у пациента имеется мутация GLA с.871G>T. В одном или нескольких вариантах осуществления у пациента имеется мутация GLA с.908T>C. В одном или нескольких вариантах осуществления у пациента имеется мутация GLA с.907A>G. В одном или нескольких вариантах осуществления у пациента имеется мутация GLA с.928C>G. В одном или нескольких вариантах осуществления у пациента имеется мутация GLA с.1079G>C. В одном или нескольких вариантах осуществления у пациента имеется мутация GLA с.1078G>C. В одном или нескольких вариантах осуществления у пациента имеется мутация GLA с.1124G>C. В одном или нескольких вариантах осуществления у пациента имеется мутация GLA с.1181T>C. В одном или нескольких вариантах осуществления у пациента имеется мутация GLA с.1231G>A. В одном или нескольких вариантах осуществления у пациента имеется мутация GLA с.1255A>G. В различных вариантах осуществления эти мутации GLA относятся к последовательности нуклеиновой кислоты, представленной под SEQ ID NO: 3.

[0069] Кроме того, различные варианты осуществления настоящего изобретения относятся к РС для лечения болезни Фабри у пациента, у которого имеется мутация в гене, кодирующем  $\alpha$ -Gal A, при этом пациента идентифицируют как имеющего миссенс-мутацию в  $\alpha$ -Gal A человека,

кодируемой последовательностью нуклеиновой кислоты, приведенной под SEQ ID NO: 1 и/или SEQ ID NO: 3. Другой аспект настоящего изобретения относится к способу лечения пациента, у которого диагностировано наличие болезни Фабри. В одном или нескольких вариантах осуществления способ включает введение пациенту терапевтически эффективной дозы РС для  $\alpha$ -Gal A. В следующих вариантах осуществления у пациента имеется миссенс-мутация в последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей  $\alpha$ -Gal A. Другой аспект настоящего изобретения относится к способу обеспечения усиления в отношении  $\alpha$ -Gal A у пациента, у которого диагностировано или подозревается наличие болезни Фабри. В одном или нескольких вариантах осуществления способ включает введение пациенту терапевтически эффективной дозы РС для  $\alpha$ -Gal A, при этом у пациента имеется мутантная  $\alpha$ -Gal A, кодируемая последовательностью нуклеиновой кислоты, характеризующейся наличием миссенс-мутации относительно SEQ ID NO: 1 и/или SEQ ID NO: 3. Ниже представлены подробные данные по этим путям применения и способам и их дополнительные варианты осуществления. Любой из вариантов осуществления, относящихся к способу лечения пациента с болезнью Фабри, способу обеспечения усиления в отношении  $\alpha$ -Gal A у пациента, у которого диагностировано или подозревается наличие болезни Фабри, применению фармакологического шаперона для  $\alpha$ -Gal A для получения лекарственного препарата для лечения пациента, у которого диагностировано наличие болезни Фабри, или фармакологическому шаперону для  $\alpha$ -Gal A для применения при лечении пациента, у которого диагностировано наличие болезни Фабри, где пациента идентифицируют как имеющего миссенс-мутацию в  $\alpha$ -Gal A человека, кодируемой последовательностью нуклеиновой кислоты, приведенной под SEQ ID NO: 1 и/или SEQ ID NO: 3, может быть объединен с любым из других вариантов осуществления настоящего изобретения, например вариантов осуществления, относящихся к РС и их подходящим дозам.

**[0070]** В одном или нескольких вариантах осуществления у пациента могут иметься другие мутации в его гене GLA. Например, в интронной области могут быть мутации, которые могут влиять или могут не влиять на

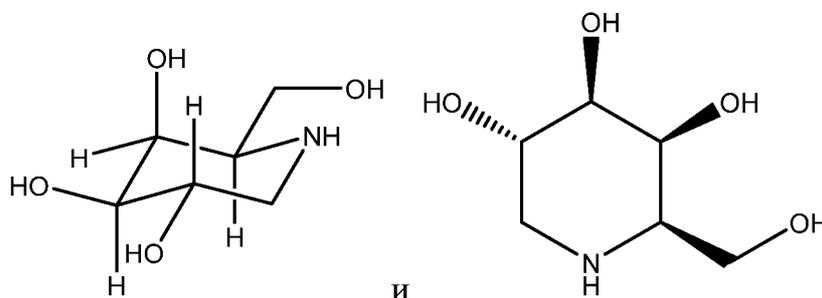
образующийся в результате фермент  $\alpha$ -Gal A. Таким образом, в одном или нескольких вариантах осуществления у пациента имеется мутантная  $\alpha$ -Gal A, кодируемая последовательностью нуклеиновой кислоты, характеризующейся по меньшей мере 95, 96, 97, 98, 99, 99,1, 99,2, 99,3, 99,4, 99,5, 99,6, 99,7, 99,8 или 99,9% идентичностью с SEQ ID NO: 1. Кроме того, у пациента может иметься одна или несколько дополнительных мутаций в кодирующей области гена GLA. Таким образом, в одном или нескольких вариантах осуществления у пациента имеется мутантная  $\alpha$ -Gal A, кодируемая последовательностью нуклеиновой кислоты, характеризующейся по меньшей мере 95, 96, 97, 98, 99, 99,1, 99,2, 99,3, 99,4, 99,5, 99,6, 99,7, 99,8 или 99,9% идентичностью с SEQ ID NO: 3. Более того, в одном или нескольких вариантах осуществления у пациента имеется 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20 или 30 мутаций относительно SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 3. Также следует отметить, что некоторые мутации нуклеиновой кислоты в SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 3 могут в результате не приводить к изменению аминокислоты в получаемом белке, поскольку различные аминокислоты кодируются несколькими последовательностями нуклеиновой кислоты. Опять таки, любой из таких вариантов осуществления может быть объединен с любым из других вариантов осуществления настоящего изобретения, например, вариантов осуществления, относящихся мутациям, к поддающимся лечению, РС и их подходящим дозам.

**[0071]**      Фармакологические шапероны

**[0072]**      Связывание низкомолекулярных ингибиторов ферментов, связанных с LSD, может увеличивать стабильность как мутантного фермента, так и соответствующего фермента дикого типа (см. патенты США №№ 6274597, 6583158, 6589964, 6599919, 6916829 и 7141582, все включены в данный документ посредством ссылки). В частности, введение низкомолекулярных производных глюкозы и галактозы, которые являются специфическими селективными конкурентными ингибиторами для нескольких целевых лизосомальных ферментов, эффективно увеличивало стабильность ферментов в клетках *in vitro* и, таким образом, увеличивало уровень транспорта ферментов в

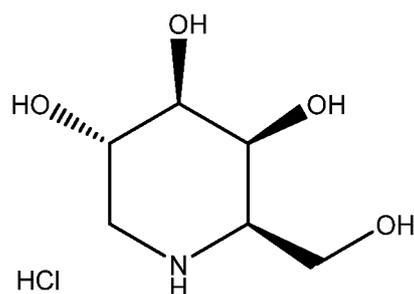
лизосому. Таким образом, ожидается, что при увеличении количества фермента в лизосоме увеличится уровень гидролиза субстратов фермента. Первоначальная теория, лежащая в основе этой стратегии, заключалась в следующем: поскольку мутантный ферментный белок нестабилен в ER (Ishii et al., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 1996; 220: 812-815), ферментный белок тормозится в нормальном транспортном пути (ER → аппарат Гольджи → эндосомы → лизосома) и преждевременно разрушается. Следовательно, соединение, которое связывается с мутантным ферментом и увеличивает его стабильность, может служить в качестве "шаперона" для фермента и увеличивать количество фермента, которое может покинуть ER и перемещаться в лизосомы. Кроме того, поскольку сворачивание и транспорт некоторых белков дикого типа являются неполными, при этом до 70% некоторых белков дикого типа в некоторых случаях разрушаются до достижения своей окончательной локализации в клетке, для стабилизации ферментов дикого типа и увеличения количества фермента, которое может покинуть ER и транспортироваться в лизосомы, можно применять шапероны.

[0073] В одном или нескольких вариантах осуществления фармакологический шаперон предусматривает мигаластат или его соль. Соединение мигаластат, также известное как 1-дезоксигалактоноджиримицин (1-DGJ) или (2R,3S,4R,5S)-2-(гидроксиметил)пиперидин-3,4,5-триол, представляет собой соединение, имеющее следующую химическую формулу:



Свободное основание мигаластата

[0074] Как обсуждается в данном документе, также в настоящем изобретении можно применять фармацевтически приемлемые соли мигаластата. При применении соли мигаластата дозировку соли корректируют так, чтобы доза мигаластата, полученная пациентом, была эквивалентной количеству, которое было бы получено при применении свободного основания мигаластата. Одним примером фармацевтически приемлемой соли мигаластата является мигаластата HCl:



Мигаластата HCl

[0075] Мигаластат представляет собой низкомолекулярный иминосахар и является аналогом концевой галактозы GL-3. Фармакологические исследования *in vitro* и *in vivo* продемонстрировали, что мигаластат действует как фармакологический шаперон, селективно и обратимо связывающийся с высокой аффинностью с активным сайтом  $\alpha$ -Gal A дикого типа и конкретными мутантными формами  $\alpha$ -Gal A. Связывание мигаластата стабилизирует эти мутантные формы  $\alpha$ -Gal A в эндоплазматическом ретикулуме, способствуя их правильному транспорту в лизосомы, где отсоединение мигаластата позволяет  $\alpha$ -Gal A уменьшить уровень GL-3 и других субстратов.

[0076] В конкретном варианте осуществления РС предусматривает мигаластат или его соль. В следующих вариантах осуществления РС предусматривает гидрохлорид мигаластата.

[0077] Любой из этих РС для  $\alpha$ -Gal A может быть применен в комбинации с любым из других вариантов осуществления настоящего изобретения, например вариантов осуществления, относящихся к способу лечения пациента с болезнью

Фабри, способу обеспечения усиления в отношении  $\alpha$ -Gal A у пациента, у которого диагностировано или подозревается наличие болезни Фабри, применению фармакологического шаперона для  $\alpha$ -Gal A для получения лекарственного препарата для лечения пациента, у которого диагностировано наличие болезни Фабри, или фармакологическому шаперону для  $\alpha$ -Gal A для применения при лечении пациента, у которого диагностировано наличие болезни Фабри, а также вариантов осуществления, относящихся к подходящим дозам РС, мутациям, поддающимся лечению, и лечению пациента с болезнью Фабри, у которого имеются определенные мутации в последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей  $\alpha$ -Gal A.

**[0078]**      Дозирование, состав и введение

**[0079]**      В одном или нескольких вариантах осуществления пациенту с болезнью Фабри вводят мигаластат или его соль с частотой один раз в два дня (также называемой "QOD"). В различных вариантах осуществления описанные в данном документе дозы относятся к гидрохлориду мигаластата или эквивалентной дозе мигаластата или его соли, отличной от гидрохлоридной соли. В некоторых вариантах осуществления такие дозы относятся к свободному основанию мигаластата. В альтернативных вариантах осуществления такие дозы относятся к соли мигаластата. В дополнительных вариантах осуществления соль мигаластата представляет собой гидрохлорид мигаластата. Введение мигаластата или соли мигаластата в данном документе называют "терапией мигаластатом".

**[0080]**      Эффективное количество мигаластата или его соли может находиться в диапазоне от приблизительно 100 мг FBE до приблизительно 150 мг FBE. Иллюстративные дозы включают приблизительно 100 мг FBE, приблизительно 105 мг FBE, приблизительно 110 мг FBE, приблизительно 115 мг FBE, приблизительно 120 мг FBE, приблизительно 123 мг FBE, приблизительно 125 мг FBE, приблизительно 130 мг FBE, приблизительно 135

мг FBE, приблизительно 140 мг FBE, приблизительно 145 мг FBE или приблизительно 150 мг FBE.

**[0081]** Еще раз следует отметить, что 150 мг гидрохлорида мигаластата эквивалентны 123 мг мигаластата в форме свободного основания. Таким образом, в одном или нескольких вариантах осуществления доза составляет 150 мг гидрохлорида мигаластата или представляет собой эквивалентную дозу мигаластата или его соли, отличной от гидрохлоридной соли, вводимую с частотой один раз в два дня. Как указано выше, эту дозу называют 123 мг FBE мигаластата. В дополнительных вариантах осуществления доза составляет 150 мг гидрохлорида мигаластата, вводимого с частотой один раз в два дня. В других вариантах осуществления доза составляет 123 мг свободного основания мигаластата, вводимого с частотой один раз в два дня.

**[0082]** В различных вариантах осуществления эффективное количество составляет приблизительно 122 мг, приблизительно 128 мг, приблизительно 134 мг, приблизительно 140 мг, приблизительно 146 мг, приблизительно 150 мг, приблизительно 152 мг, приблизительно 159 мг, приблизительно 165 мг, приблизительно 171 мг, приблизительно 177 мг или приблизительно 183 мг гидрохлорида мигаластата.

**[0083]** Соответственно, в различных вариантах осуществления терапия мигаластатом включает введение 123 мг FBE с частотой один раз в два дня, например, 150 мг гидрохлорида мигаластата раз в два дня.

**[0084]** Введение мигаластата или его соли можно осуществлять в течение определенного периода времени. В одном или нескольких вариантах осуществления мигаластат или его соль вводят в течение периода по меньшей мере 28 дней, например, по меньшей мере 30, 60 или 90 дней или по меньшей мере 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 16, 20, 24, 30 или 36 месяцев или по меньшей мере 1, 2, 3, 4 или 5 лет. В различных вариантах осуществления терапия мигаластатом представляет собой долгосрочную терапию мигаластатом,

длящуюся по меньшей мере 6 месяцев, например, по меньшей мере 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 16, 20, 24, 30 или 36 месяцев или по меньшей мере 1, 2, 3, 4 или 5 лет.

**[0085]** Введение мигаластата или его соли в соответствии с настоящим изобретением можно осуществлять в составе, подходящем для любого пути введения, но предпочтительно его вводят в лекарственной форме для перорального применения, такой как таблетка, капсула или раствор. В качестве одного примера, пациенту перорально вводят капсулы, каждая из которых содержит 150 мг гидрохлорида мигаластата или эквивалентную дозу мигаластата или его соли, отличной от гидрохлоридной соли.

**[0086]** В некоторых вариантах осуществления РС (например, мигаластат или его соль) вводят перорально. В одном или нескольких вариантах осуществления РС (например, мигаластат или его соль) вводят путем инъекции. РС может сопровождаться фармацевтически приемлемым носителем, который может зависеть от способа введения.

**[0087]** В одном или нескольких вариантах осуществления РС (например, мигаластат или его соль) вводят в рамках монотерапии, и он может быть представлен в форме, подходящей для любого пути введения, включая, например, перорально в форме таблеток, или капсул, или жидкости, или в виде стерильного водного раствора для инъекций. В других вариантах осуществления РС представлен в виде сухого лиофилизированного порошка для добавления в состав заместительного фермента во время или сразу после восстановления для предупреждения агрегации фермента *in vitro* до введения.

**[0088]** Если РС (например, мигаластат или его соль) составляют для перорального введения, таблетки или капсулы можно получить традиционными способами с фармацевтически приемлемыми вспомогательными веществами, такими как связующие средства (например, прежелатинизированный маисовый крахмал, поливинилпирролидон или гидроксипропилметилцеллюлоза), наполнители (например, лактоза, микрокристаллическая целлюлоза или гидрофосфат кальция), смазывающие вещества (например, стеарат магния, тальк

или диоксид кремния), разрыхлители (например, картофельный крахмал или крахмалгликолят натрия) или увлажняющие средства (например, лаурилсульфат натрия). Таблетки можно покрывать с помощью способов, хорошо известных из уровня техники. Жидкие препараты для перорального введения могут быть в форме, например, растворов, сиропов или суспензий, или они могут быть в виде сухого продукта для соединения с водой или другой подходящей средой-носителем перед применением. Такие жидкие препараты можно получать посредством традиционных способов с фармацевтически приемлемыми добавками, такими как суспендирующие средства (например, сорбитный сироп, производные целлюлозы или гидрогенизированные пищевые жиры), эмульгирующие средства (например, лецитин или гуммиарабик), неводные среды-носители (например, миндальное масло, маслянистые сложные эфиры, этиловый спирт или фракционированные растительные масла) и консерванты (например, метил- или пропил-п-гидроксibenзоаты или сорбиновая кислота). Препараты при необходимости также могут содержать буферные соли, ароматизаторы, красители и подсластители. Препараты для перорального введения можно составить подходящим образом для получения контролируемого высвобождения соединения активного шаперона.

**[0089]** Фармацевтические составы РС (например, мигаластата или его соли), подходящие для парентерального/инъекционного применения, обычно содержат стерильные водные растворы (т. е. растворимые в воде) или дисперсии и стерильные порошки для немедленного приготовления стерильных инъекционных растворов или дисперсий. Во всех случаях форма должна быть стерильной и должна быть жидкой в такой мере, чтобы легко вводилась шприцем. Она должна быть стабильна при условиях производства и хранения и должна быть законсервирована относительно загрязняющего воздействия микроорганизмов, таких как бактерии и грибки. Носитель может представлять собой растворитель или дисперсионную среду, содержащую, например, воду, этанол, полиол (например, глицерин, пропиленгликоль и полиэтиленгликоль, и т. п.), их подходящие смеси и растительные масла. Надлежащую текучесть можно поддерживать, например, путем использования покрытия, такого как

лецитин, путем поддержания требуемого размера частиц в случае дисперсии и путем использования поверхностно-активных веществ. Предотвращение воздействия микроорганизмов можно осуществлять посредством различных антибактериальных и противогрибковых средств, например, парабенов, хлорбутанола, фенола, бензилового спирта, сорбиновой кислоты и т. п. Во многих случаях будет обосновано включение изотонических средств, например, сахаров или хлорида натрия. Пролонгированную абсорбцию инъекционных композиций можно получать путем применения в композициях средств, замедляющих абсорбцию, например, моностеарата алюминия и желатина.

**[0090]** Стерильные инъекционные растворы получают включением очищенного фермента (при наличии) и РС (например, мигаластата или его соли) в требуемом количестве в соответствующий растворитель с различными другими ингредиентами, указанными выше, при необходимости, с последующим фильтрованием или окончательной стерилизацией. Обычно дисперсии получают включением различных стерилизованных активных ингредиентов в стерильную среду, которая содержит основную дисперсионную среду и другие требуемые ингредиенты из указанных выше. В случае стерильных порошков для получения стерильных инъекционных растворов предпочтительными способами получения являются техники вакуумной сушки и сублимационной сушки, которые дают порошок активного ингредиента плюс любой дополнительный необходимый ингредиент из его предварительно простерилизованного и отфильтрованного раствора.

**[0091]** Состав может содержать вспомогательное вещество. Фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества, которые можно включать в состав, представляют собой буферы, такие как цитратный буфер, фосфатный буфер, ацетатный буфер и бикарбонатный буфер, аминокислоты, мочевины, спирты, аскорбиновую кислоту и фосфолипиды; белки, такие как сывороточный альбумин, коллаген и желатин; соли, такие как EDTA или EGTA и хлорид натрия; липосомы; поливинилпирролидон; сахара, такие как декстран, маннит, сорбит и глицерин; пропиленгликоль и полиэтиленгликоль (например,

PEG-4000, PEG-6000); глицерин; глицин или другие аминокислоты; и липиды. Буферные системы для использования с составами включают цитратные; ацетатные; бикарбонатные и фосфатные буферы. Фосфатный буфер является предпочтительным вариантом осуществления.

**[0092]** Путь введения соединения шаперона может представлять собой пероральный или парентеральный, включая внутривенный, подкожный, внутриартериальный, внутрибрюшинный, офтальмический, внутримышечный, буккальный, ректальный, вагинальный, подглазничный, внутричерепной, внутрикожный, внутричерепной, интраспинальный, внутрижелудочковый, интратекальный, интрацестеральный, внутрисуставной, внутрилегочный, интраназальный, чресслизистый, трансдермальный или посредством ингаляции.

**[0093]** Введение описанных выше парентеральных составов соединения шаперона можно осуществлять путем периодических инъекций болюса препарата, или их можно вводить посредством внутривенного или внутрибрюшинного введения из резервуара, который находится вне (например, пакет для внутривенных инъекций) или внутри (например, биоразлагаемый имплантат) организма.

**[0094]** Варианты осуществления, относящиеся к фармацевтическим составам и введению, могут быть объединены с любым из других вариантов осуществления настоящего изобретения, например вариантов осуществления, относящихся к способам лечения пациентов с болезнью Фабри, применению фармакологического шаперона для  $\alpha$ -Gal A для получения лекарственного препарата для лечения пациента, у которого диагностировано наличие болезни Фабри, или фармакологическому шаперону для  $\alpha$ -Gal A для применения при лечении пациента, у которого диагностировано наличие болезни Фабри, а также вариантами осуществления, относящимися к мутациям, поддающимся лечению, РС и их подходящим дозам.

**[0095]** В одном или нескольких вариантах осуществления РС (например, мигаластат или его соль) вводят в комбинации с ERT. При ERT увеличивается

количество белка путем экзогенного введения инфузией фермента дикого типа или биологически функционального фермента. Эта терапия была разработана для многих генетических нарушений, включая LSD, такие как болезнь Фабри, как указано выше. Согласно ожиданиям, после инфузии экзогенный фермент должен поглощаться тканями с помощью неспецифического или рецептор-специфического механизма. В целом, эффективность поглощения не высокая, а время циркуляции экзогенного белка короткое. Кроме того, экзогенный белок является нестабильным и подвержен быстрому внутриклеточному разрушению, а также имеет потенциал вызывать неблагоприятные иммунологические реакции с последующей необходимостью различных видов лечения. В одном или нескольких вариантах осуществления шаперон вводят одновременно с заместительным ферментом (например, заместительным в отношении  $\alpha$ -Gal A). В некоторых вариантах осуществления шаперон составлен совместно с заместительным ферментом (например, заместительным в отношении  $\alpha$ -Gal A).

[0096] Ссылка в данном описании на "один вариант осуществления", "определенные варианты осуществления", "разные варианты осуществления", "один или несколько вариантов осуществления" или "вариант осуществления" означает, что конкретный признак, структура, материал или характеристика, описанные в связи с вариантом осуществления, включены по меньшей мере в один вариант осуществления настоящего изобретения. Таким образом, такие фразы как "в одном или нескольких вариантах осуществления", "в определенных вариантах осуществления", "в разных вариантах осуществления", "в одном варианте осуществления" или "в варианте осуществления", появляющиеся в различных местах в данном описании, необязательно относятся к одному и тому же варианту осуществления настоящего изобретения. Кроме того, конкретные признаки, структуры, материалы или характеристики можно объединять любым подходящим образом в одном или нескольких вариантах осуществления.

[0097] Хотя настоящее изобретение в данном документе было описано со ссылкой на конкретные варианты осуществления, следует понимать, что эти варианты осуществления представлены только для иллюстрации принципов и

путей применения настоящего изобретения. Специалистам в данной области техники будет очевидно, что различные модификации и изменения можно сделать в способе и устройстве согласно настоящему изобретению без отклонения от сущности и объема настоящего изобретения. Таким образом, предполагается, что настоящее изобретение включает модификации и изменения, которые находятся в пределах объема приложенной формулы изобретения и ее эквивалентов.

ПРИМЕР. Эффект мигаластата в отношении мутаций  $\alpha$ -Gal A

[0098] Активность  $\alpha$ -Gal A измеряли в лизатах, полученных из клеток НЕК-293, временно трансфицированных указанной мутантной формой  $\alpha$ -Gal A и подвергнутых инкубации в присутствии или в отсутствие 10 мкМ мигаластата в течение 5 дней. Активность  $\alpha$ -Gal A выражена в наномолях свободного 4-MU, высвобождаемого на миллиграмм белка в час (нмоль/мг/час). Исходную активность  $\alpha$ -Gal A и активность  $\alpha$ -Gal A после инкубации с 10 мкМ мигаластата дополнительно выражали в виде процентной доли от исходной активности  $\alpha$ -Gal A дикого типа (% WT). Активность  $\alpha$ -Gal A дикого типа, которую использовали для вычисления таких процентных долей, представляла собой среднюю активность, измеренную в лизатах из клеток, трансфицированных диким типом, подвергнутых инкубации в отсутствие мигаластата, в режиме параллельного измерения.

[0099] Результаты тестирования активности  $\alpha$ -Gal A при новых мутациях 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 и N419D показаны в приведенной ниже таблице 2.

Таблица 2. Эффект мигаластата в отношении активности  $\alpha$ -Gal A

Мутантная форма $\alpha$ -Gal A	Исходная активность $\alpha$ -Gal A (нмоль/мг/час)	Активность $\alpha$ -Gal A с 10 мкМ мигаластата (нмоль/мг/час)	p-значение в U-тесте Манна-Уитни	Исходная активность $\alpha$ -Gal A (% WT)	Активность $\alpha$ -Gal A с 10 мкМ мигаластата (% WT)	Абсолютное увеличение (% WT)	Относительное увеличение
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 $\pm$	15903 $\pm$ 567	0,0001	15,9 $\pm$	51,7 $\pm$ 2,2	35,9	3,44

Мутантная форма $\alpha$ -Gal A	Исходная активность $\alpha$ -Gal A (нмоль/мг/час)	Активность $\alpha$ -Gal A с 10 мкМ мигаластата (нмоль/мг/час)	p-значение в U-тесте Манна-Уитни	Исходная активность $\alpha$ -Gal A (% WT)	Активность $\alpha$ -Gal A с 10 мкМ мигаластата (% WT)	Абсолютное увеличение (% WT)	Относительное увеличение
	482			2,1			
L180 V	12900 ± 829	25437 ± 1279	0,0001	37,2 ± 2	73,4 ± 2,9	36,2	1,97
D182 G	28037 ± 2162	43772 ± 4156	0,0014	84 ± 3,7	129,6 ± 9,7	45,6	1,56
R196 T	17659 ± 1084	26217 ± 1611	0,0002	47 ± 2,1	69,5 ± 2,6	22,4	1,48
W20 9R	22944 ± 2196	28729 ± 1293	0,0006	63,5 ± 5,4	81,1 ± 4,6	17,5	1,25
A257 T	7405 ± 465	18990 ± 1196	0,0001	25,7 ± 1,5	66,2 ± 4,1	40,6	2,56
P259 S	15425 ± 1009	28621 ± 3141	0,0001	44,3 ± 1,5	79,8 ± 4,8	35,5	1,86
G271 A	4890 ± 570	18928 ± 1069	0,0001	12,1 ± 1,1	46,4 ± 1,8	34,4	3,87
S276 T	547 ± 44	4104 ± 439	0,0001	1,3 ± 0,1	9,6 ± 0,9	8,3	7,5
M290 V	23663 ± 2202	45804 ± 2927	0,0001	66,6 ± 6,2	128,1 ± 8,2	61,5	1,94
A291 S	12908 ± 1151	20029 ± 1654	0,0036	47,7 ± 2,8	74,5 ± 4	26,8	1,55
I303 T	BLD	2809 ± 520	0,0001	BLD	7,3 ± 1,4	7,3	NC
I303	15157 ±	28958 ±	0,0001	38,2 ±	73,2 ± 8,8	35	1,91

Мутантная форма $\alpha$ -Gal A	Исходная активность $\alpha$ -Gal A (нмоль/мг/час)	Активность $\alpha$ -Gal A с 10 мкМ мигаластата (нмоль/мг/час)	p-значение в U-тесте Манна-Уитни	Исходная активность $\alpha$ -Gal A (% WT)	Активность $\alpha$ -Gal A с 10 мкМ мигаластата (% WT)	Абсолютное увеличение (% WT)	Относительное увеличение
V	1669	3153		4,6			
L310 V	23233 ± 3157	31936 ± 2527	0,0036	55,5 ± 6,3	78,4 ± 4,8	22,8	1,37
G360 A	10510 ± 874	13443 ± 1048	0,0137	23,8 ± 1,4	31,3 ± 2,6	7,5	1,28
G360 R	388 ± 48	1418 ± 93	0,0001	1,1 ± 0,1	4,0 ± 0,3	3	3,65
G375 A	19691 ± 1167	24212 ± 1520	0,0169	54,8 ± 2,6	66,8 ± 2,4	12	1,23
L394 P	5083 ± 465	7749 ± 582	0,0001	15,2 ± 2,1	22,3 ± 2,4	7,2	1,52
G411 S	11132 ± 675	17543 ± 867	0,0001	39,1 ± 2,6	61,1 ± 3,2	22	1,58
N419 D	10639 ± 512	14558 ± 678	0,0001	31,5 ± 1,5	44,1 ± 2,9	12,6	1,37

[00100] В таблице 2 приведены вычисленные значения среднего  $\pm$  стандартная ошибка среднего (SEM). нмоль/мг/час означает "наномолей свободного 4-MU, высвобождаемых на мг белка в час". WT означает "дикий тип". NS означает "не вычисляется". N/A означает "не применяется".

[00101] **Исходная активность  $\alpha$ -Gal A и ее активность с 10 мкМ мигаластата.** Различия в активности  $\alpha$ -Gal A между лизатами, подвергнутыми инкубации в отсутствие и в присутствии 10 мкМ мигаластата, определяли с использованием одностороннего U-теста Манна-Уитни; увеличение значения

при использовании 10 мкМ мигаластата с  $p < 0,05$  считали значимым. "BLD" означает, что среднее значение активности  $\alpha$ -Gal A было ниже предела выявления ( $< 142$  нмоль/мг/час).

[00102] **Исходная активность  $\alpha$ -Gal A (% WT)** = (активность  $\alpha$ -Gal A в лизатах клеток, трансфицированных мутантной формой, без мигаластата  $\div$  активность  $\alpha$ -Gal A в лизатах клеток, трансфицированных диким типом, без мигаластата) \* 100.

[00103] **Активность  $\alpha$ -Gal A с 10 мкМ мигаластата (% WT)** = (активность  $\alpha$ -Gal A в лизатах клеток, трансфицированных мутантной формой, подвергнутых инкубации с 10 мкМ мигаластата  $\div$  активность  $\alpha$ -Gal A в лизатах клеток, трансфицированных диким типом, без мигаластата) \* 100.

[00104] **Абсолютное увеличение (% WT)** = активность  $\alpha$ -Gal A с 10 мкМ мигаластата (% WT) минус исходная активность  $\alpha$ -Gal A (% WT).

[00105] **Относительное увеличение** представляет собой активность  $\alpha$ -Gal A с 10 мкМ мигаластата в лизатах клеток, трансфицированных мутантной формой  $\div$  исходная активность  $\alpha$ -Gal A в лизатах клеток, трансфицированных мутантной формой, подвергнутых инкубации без мигаластата.

[00106] Как можно увидеть из таблицы 2, новые мутации  $\alpha$ -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 и N419D демонстрировали *in vitro* ответ на инкубацию с мигаластатом, который отвечал критерию восприимчивости к лечению. Соответственно, предполагают, что пациенты с такими мутациями будут поддаваться лечению посредством терапии с помощью мигаластата, как описано в данном документе.

[00107] В патентной и научной литературе, на которую ссылаются в данном документе, представлены сведения, доступные специалистам в данной области техники. Все патенты США и опубликованные или неопубликованные заявки на

патенты США, цитируемые в данном документе, включены посредством ссылки. Все опубликованные зарубежные патенты и патентные заявки, цитируемые в данном документе, таким образом, включены посредством ссылки. Все остальные опубликованные источники, документы, монографии и научная литература, цитируемые в данном документе, таким образом, включены посредством ссылки.

**[00108]** Несмотря на то, что настоящее изобретение было конкретно показано и описано со ссылкой на предпочтительные варианты осуществления, специалистам в данной области техники будет понятно, что в него можно внести различные изменения по форме и деталям, без отступления от объема настоящего изобретения, охватываемого прилагаемой формулой изобретения.

### Опубликованная формула изобретения

1. Способ лечения болезни Фабри у пациента-человека, нуждающегося в этом, где способ включает введение пациенту терапевтически эффективной дозы мигаластата или его соли, при этом у пациента имеется мутация  $\alpha$ -галактозидазы А, выбранная из группы, состоящей из 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 и N419D.
2. Способ по п. 1, где мигаластат или его соль вводят пациенту раз в два дня.
3. Способ по п. 1, где пациенту вводят от приблизительно 100 до приблизительно 150 мг эквивалента свободного основания мигаластата или его соли раз в два дня.
4. Способ по п. 1, где пациенту вводят приблизительно 123 мг эквивалента свободного основания мигаластата или его соли раз в два дня.
5. Способ по п. 1, где пациенту вводят приблизительно 123 мг свободного основания мигаластата раз в два дня.
6. Способ по п. 1, где пациенту вводят приблизительно 150 мг гидрохлорида мигаластата раз в два дня.
7. Способ по любому из пп. 1-6, где мигаластат или его соль вводят перорально.
8. Способ по любому из пп. 1-6, где мигаластат или его соль вводят путем инъекции.
9. Способ по любому из пп. 1-8, где мигаластат или его соль усиливают активность  $\alpha$ -галактозидазы А.
10. Способ по любому из пп. 1-9, где пациент представляет собой мужчину.

11. Способ по любому из пп. 1-9, где пациент представляет собой женщину.
12. Способ по любому из пп. 1-11, где мутация представляет собой A29D.
13. Способ по любому из пп. 1-11, где мутация представляет собой R38S.
14. Способ по любому из пп. 1-11, где мутация представляет собой N53Y.
15. Способ по любому из пп. 1-11, где мутация представляет собой Y88C.
16. Способ по любому из пп. 1-11, где мутация представляет собой V124G.
17. Способ по любому из пп. 1-11, где мутация представляет собой I133F.
18. Способ по любому из пп. 1-11, где мутация представляет собой A143V.
19. Способ по любому из пп. 1-11, где мутация представляет собой Y152N.
20. Способ по любому из пп. 1-11, где мутация представляет собой F159C.
21. Способ по любому из пп. 1-11, где мутация представляет собой A160D.
22. Способ по любому из пп. 1-11, где мутация представляет собой D165N.
23. Способ по любому из пп. 1-11, где мутация представляет собой F169I.
24. Способ по любому из пп. 1-11, где мутация представляет собой L180V.
25. Способ по любому из пп. 1-11, где мутация представляет собой D182G.
26. Способ по любому из пп. 1-11, где мутация представляет собой R196T.
27. Способ по любому из пп. 1-11, где мутация представляет собой W209R.
28. Способ по любому из пп. 1-11, где мутация представляет собой A257T.
29. Способ по любому из пп. 1-11, где мутация представляет собой P259S.
30. Способ по любому из пп. 1-11, где мутация представляет собой G271A.

31. Способ по любому из пп. 1-11, где мутация представляет собой S276T.
32. Способ по любому из пп. 1-11, где мутация представляет собой M290V.
33. Способ по любому из пп. 1-11, где мутация представляет собой A291S.
34. Способ по любому из пп. 1-11, где мутация представляет собой I303T.
35. Способ по любому из пп. 1-11, где мутация представляет собой I303V.
36. Способ по любому из пп. 1-11, где мутация представляет собой L310V.
37. Способ по любому из пп. 1-11, где мутация представляет собой G360A.
38. Способ по любому из пп. 1-11, где мутация представляет собой G360R.
39. Способ по любому из пп. 1-11, где мутация представляет собой G375A.
40. Способ по любому из пп. 1-11, где мутация представляет собой L394P.
41. Способ по любому из пп. 1-11, где мутация представляет собой G411S.
42. Способ по любому из пп. 1-11, где мутация представляет собой N419D.
43. Способ по любому из пп. 1-42, где мутация раскрыта в таблице справочных данных по фармакологии.
44. Способ по п. 43, где таблица справочных данных по фармакологии предусмотрена в инструкции по медицинскому применению для продукта на основе мигаластата, одобренного для лечения болезни Фабри.
45. Способ по п. 43, где таблица справочных данных по фармакологии предусмотрена в инструкции по медицинскому применению для GALAFOLD<sup>®</sup>.
46. Способ по п. 43, где таблица справочных данных по фармакологии предусмотрена на веб-сайте.

47. Способ по п. 46, где веб-сайт представляет собой один или несколько из [www.galafoldamenabilitytable.com](http://www.galafoldamenabilitytable.com) или [www.fabrygenevariantsearch.com](http://www.fabrygenevariantsearch.com).
48. Способ обеспечения усиления в отношении  $\alpha$ -галактозидазы А у пациента, у которого диагностировано или подозревается наличие болезни Фабри, при этом способ включает введение пациенту терапевтически эффективной дозы мигаластата или его соли, где у пациента имеется мутация в  $\alpha$ -галактозидазе А, выбранная из группы, состоящей из 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 и N419D.
49. Способ по п. 48, где мигаластат или его соль вводят пациенту раз в два дня.
50. Способ по п. 48, где пациенту вводят от приблизительно 100 до приблизительно 150 мг эквивалента свободного основания мигаластата или его соли раз в два дня.
51. Способ по п. 48, где пациенту вводят приблизительно 123 мг эквивалента свободного основания мигаластата или его соли раз в два дня.
52. Способ по п. 48, где пациенту вводят приблизительно 123 мг свободного основания мигаластата раз в два дня.
53. Способ по п. 48, где пациенту вводят приблизительно 150 мг гидрохлорида мигаластата раз в два дня.
54. Способ по любому из пп. 48-53, где мигаластат или его соль вводят перорально.
55. Способ по любому из пп. 48-53, где мигаластат или его соль вводят путем инъекции.
56. Способ по любому из пп. 48-55, где пациент представляет собой мужчину.

57. Способ по любому из пп. 48-55, где пациент представляет собой женщину.
58. Способ по любому из пп. 48-57, где мутация представляет собой A29D.
59. Способ по любому из пп. 48-57, где мутация представляет собой R38S.
60. Способ по любому из пп. 48-57, где мутация представляет собой N53Y.
61. Способ по любому из пп. 48-57, где мутация представляет собой Y88C.
62. Способ по любому из пп. 48-57, где мутация представляет собой V124G.
63. Способ по любому из пп. 48-57, где мутация представляет собой I133F.
64. Способ по любому из пп. 48-57, где мутация представляет собой A143V.
65. Способ по любому из пп. 48-57, где мутация представляет собой Y152N.
66. Способ по любому из пп. 48-57, где мутация представляет собой F159C.
67. Способ по любому из пп. 48-57, где мутация представляет собой A160D.
68. Способ по любому из пп. 48-57, где мутация представляет собой D165N.
69. Способ по любому из пп. 48-57, где мутация представляет собой F169I.
70. Способ по любому из пп. 48-57, где мутация представляет собой L180V.
71. Способ по любому из пп. 48-57, где мутация представляет собой D182G.
72. Способ по любому из пп. 48-57, где мутация представляет собой R196T.
73. Способ по любому из пп. 48-57, где мутация представляет собой W209R.
74. Способ по любому из пп. 48-57, где мутация представляет собой A257T.
75. Способ по любому из пп. 48-57, где мутация представляет собой P259S.
76. Способ по любому из пп. 48-57, где мутация представляет собой G271A.

77. Способ по любому из пп. 48-57, где мутация представляет собой S276T.
78. Способ по любому из пп. 48-57, где мутация представляет собой M290V.
79. Способ по любому из пп. 48-57, где мутация представляет собой A291S.
80. Способ по любому из пп. 48-57, где мутация представляет собой I303T.
81. Способ по любому из пп. 48-57, где мутация представляет собой I303V.
82. Способ по любому из пп. 48-57, где мутация представляет собой L310V.
83. Способ по любому из пп. 48-57, где мутация представляет собой G360A.
84. Способ по любому из пп. 48-57, где мутация представляет собой G360R.
85. Способ по любому из пп. 48-57, где мутация представляет собой G375A.
86. Способ по любому из пп. 48-57, где мутация представляет собой L394P.
87. Способ по любому из пп. 48-57, где мутация представляет собой G411S.
88. Способ по любому из пп. 48-57, где мутация представляет собой N419D.
89. Способ по любому из пп. 48-88, где мутация раскрыта в таблице справочных данных по фармакологии.
90. Способ по п. 89, где таблица справочных данных по фармакологии предусмотрена в инструкции по медицинскому применению для продукта на основе мигаластата, одобренного для лечения болезни Фабри.
91. Способ по п. 89, где таблица справочных данных по фармакологии предусмотрена в инструкции по медицинскому применению для GALAFOLD<sup>®</sup>.
92. Способ по п. 89, где таблица справочных данных по фармакологии предусмотрена на веб-сайте.

93. Способ по п. 92, где веб-сайт представляет собой один или несколько из [www.galafoldamenabilitytable.com](http://www.galafoldamenabilitytable.com) или [www.fabrygenevariantsearch.com](http://www.fabrygenevariantsearch.com).

cccttctgtaggggcagagaggttctactteactactgegtctcctgggaaggccatcag 60  
 gactgctggctaaagtgggaaccaggactctttgtgagttagaatttctgtgatttatat 120  
 gtgtgttatacacatttttaaaaaactgtaacgacatcagggttgagcagtcgtctccgg 180  
 gtggtgaattatgtgtatttttaattttatactatattgttatttttcaaatgttogaa 240  
 attgaatatgtagattgttgttatcagcagaaaaataaacattattcaaatactctatc 300  
 agtaaagtaattttattgggcgcctttgtcaaggcagcatttgcctagatgtgactctaca 360  
 gataaaattcacttggggcctccccttacagacaatcaggcagtgagactgagtgcctg 420  
 aatggatagaccagcactcagaccactatcttcagtatctgtttttcttaactcagggcc 480  
 gtggttttcaaacgtttttcgccttacggtcacccttaggggtcccccgagaccggcccag 540  
 acagacagatatacaaaaaacacatacacagtcagagcgtccaccatttccccaccaggc 600  
 gcagcacaggcggcttccccggcactgagatgggggggaggaggagagagcgcgaggggg 660  
 gaggggaaagcagagaaacgaaagaggcggaggcggcccccgaaaccccgctctggtctca 720  
 tcatcaccaccctgggtccccagttcccaccacacaccaacctctaacgataccgggt 780  
 aattttctctctctctctctcaaacggctatagcagacggtagacgacgaccagaacta 840  
 ctctctgctcaagtaagcagtaatcacgtgagcgcctacgtcatgtgagatctcggtcac 900  
 gtgagcaactctcggttaaactcgggatcactaagggtgcgcacttctctctggtatgg 960  
 aataggggcgggtcaatatcaagaaaggaagagggtgattgggttagcggaaactcttacg 1020  
 tgactgattattgggtctacctctggggataaacctcaccagttgccagagaaacaataacg 1080  
 tcattathtaataagtcacgtgattgggtccgcctcagggttaattctaaaagcccag 1140  
 gttaccgcgggaaatttatgctgtccgggtcaccgtgacaatgcagctgaggaaccagaa 1200  
 ctacatctgggctgcgcgcttgcgcttccgcttctgcccctcgtttctctgggacatcct 1260  
 ggggttagagcactggacaatggattggcaaggacgcctaccatgggctggctgcactgg 1320  
 gagcgttctatgtgcaaccttgactgccaggaagagccagattctctgcatcaggtatcag 1380  
 atattgggtactccttccctttgcttttccatgtgtttgggtgtgtttggggaaactgga 1440  
 gagtctcaacgggaacagttgagcccaggggagagctccccaccgcactctgctgctgc 1500  
 ttttttatcccagcaaaactgtcccgaatcaggactagccctaaactttctctgtgtgac 1560  
 ctctctgggatgggagtcgggccagcggcccctgtttctttctctctctctctctctct 1620  
 cgttct 1680  
 ttctcttttttcaactgctccttgcagagcagggccaccccattagcagtggtgcccagg 1740  
 agccctgcccgggtctattcagaccctctctgtgaaactctctctctctctctctctct 1800  
 ctAACCGTtagaacatctagggtgggtaggaggaatggggaactaagattcgtgccattt 1860  
 tttctcttttggggctcgtggatttctcggcagtatctcaggggagttagagagaccata 1920  
 aggtcctgagatctctcccactcgcctatgagcgtggcatcaggctggaaggttgaca 1980  
 tggaggaactttatacatttacacctttgcgtgaggggtgaggctggattagataggtat 2040  
 tgaacatctctgaccctcacaatccttatctgtaaattggggattacaaccttttaattc 2100  
 agggagctgacaaaaaaaaatctgaaaaatagttcttatctcacacaggtgagttttcaag 2160  
 gagataacctatthaaagtacatagcacagcgttgaccattcaactgcgcttacagagc 2220  
 aatggtcaatgggaaaaatgaatgtaaatctacaaatctgaatgaatatgtgtattttc 2280  
 tggagagaggatatttacctttcttcaaatctcaagggtctctgtgatttaaaaaaggt 2340  
 taggaatcactgatagatgttggtaaaaggtggcagtcacagtaacattctctgtgtccata 2400  
 agttattcctatgaatatctttatagataaaagtcaggatgttggtcagacatcacagaag 2460  
 aatttgcccttgtaagttctatgtgacctgtgggtacagtatgtgtggcaattttgccc 2520  
 tcaggatttttttttatttggatattgcatctgattataaaactaatgcatgatcattgc 2580  
 aaaaaatgtagataaagaagagcaaaatgaaaaataagatttccccccaccgttccacca 2640  
 ccagaaataatcattggtttaaattgtaataatacaaccttacaattgtttctatataaa 2700  
 tgaaacatagatttctttatttcattatctccataaaaaatggatcattgttatgtca 2760  
 tgtttggctaatggcaagacctggcaccagctctgggtcacaattctgctcattgtta 2820  
 cttagccctgtgacattgggtaaattacaacttttttttttttttttttttttttttttt 2880

Фиг. 1А

tetegetetgtgccccaggetggagtgcaagtggcaegateteggetcaetgcaagtece 2940  
ctectgggttcaegccattcttetgeeteagectcccagtagetgggaactacaggogcc 3000  
tgccaccaagcctgggetettttttttttttttttttttttagtacagacggggtttcac 3060  
catgttagccaggggtggtctcaatctectgaectogtgattogccccctcagcctccca 3120  
aagtgtgggtgtgagccaccgtgcccagccttaacttttttttttgagaggggggtctact 3180  
ctgtcaccaggttgagtgcaagtggcggcatctctgctcagtgcaaacctccacctcccg 3240  
ggtttaagcagttctectgtcgtagctctctgagtagctgggattacaggcacaccacca 3300  
cggccagctaatttttgtattttcagtagagacggggttccaccatggtgcccagctggg 3360  
ctcgaaactctggcctcaagtgatctgcccgccttggcctcccagagtgctgggattaca 3420  
gggtgtgagccaccgcccggcctctttttttcttttttagtctatcataccttgcaata 3480  
cagtggttcttctatgtgttgggttttgatatttatgtaatacaaacacatcagttttcc 3540  
ttctgattttctgactttggggctcatgctgagaaagtcctttctactgaagataatac 3600  
agtatatacgtttcttactagttttttgtggatttttaaaatatttaaatcttttagtcc 3660  
atctgaaactgttctctatcagaaatgccacatttaataaataataagtcccaggtat 3720  
cagatggctggaaggacctctttcgaaactttgtttaattccattaatctgtgtattctt 3780  
attctaagtctaataagttccacactagcttcccttatctttttttcttttttttttttt 3840  
ttttgagctggagttctctctctgttggcccaggetggagtaaatgtcagcatctcggtt 3900  
caccgcaacctccgcctcccaggttcaagcaattctectgeectcatctctcgagtagct 3960  
ggaattacaggcatggcccaccagcctagctattttgtatttttagtagagatgggggtt 4020  
tctccatgttggtcaggctggctctcaaacctcccagcctcaggtgatctgctgctcggc 4080  
ctccccaaatgctgtttattacaggcgtgagccaccaagcccagcctcatcttttaatga 4140  
atgtacatgtatgtaactcttttaggtgaacttttgaatgttgtgccaagtctcttaaa 4200  
aagcccttttggaaagetggcaggtggcccagcctgtaatcccagcattttgggagctg 4260  
aggcaggtggatcacttgaggccaggagttcaagactagcctagccaaaatgcaaaacc 4320  
tgtctctactaaagatacaaaaattagccggatggcatggcacatgctgtaatctcagc 4380  
tactcgggaggetgaggtagaagaategcttgaaccggggaggcagaggttgcagtgagc 4440  
aagatggcggccactgcactccagcctgggtgacagaggggagactccatctcaaaaaaaa 4500  
aaaaaaaaaaaaagataaaaaggaaaccttaagtaactcttgggctttgttaaggattttgtt 4560  
aaatatacaaaaggattgcagggaaaattaacttatttttaatttgagtatgcttatcca 4620  
agagcaaaaataatattctccatttatccaaatcatttaggagcatcatagttttaacat 4680  
atgggcttgcagctatcttaatttatctctaggeattttaggttgttcagttgttctt 4740  
gtgaatgggatctttctccaaataggattattgttgatctgttgattatgttaact 4800  
ttgtagttctgactttactgaactgtctcttagatctaatactctttcaattctc 4860  
atataattctcattctctattttgtttgggggttttagggcgggaatattaacgggataag 4920  
agagacaaaagaaaatctggaaaaacaattcattttacctacattgcttgtgattacta 4980  
ccacactattactgggttggaaaaaattgtgaaateccaaggtgctaataaatgggagg 5040  
tacctaagtgttcatttaatgaattgtaattgattattggaatttctctttcagtgagaag 5100  
ctcttcatggagatggcagagctcatggtctcagaaggctggaaggatgcaggttatgag 5160  
tacctctgcattgatgactgttggatggctccccaaagagatcagaaggcagacttcag 5220  
gcagacctcagccttctctcatgggattogccagctagctaatatgtgagtttatag 5280  
ataatgttcttgttcatcagaggactgtaagcaactctctgtacagaagcttgtttagaaa 5340  
cagccctcatggccggcgtggtggctcagcctgtaatcccacactttgggagggccag 5400  
gggggtggatcactgaggtcaagagttcaagaccagcctggccaacatggtgaaacccc 5460  
aactctatbaaaagtaaaaaaattagctgggcctggtggtgaaacgctgtaaccccagc 5520  
tactgggaggetgaggcaggagaategcttgaaccaggaggtggaagtctcagtgagc 5580  
tgagatcacgccattgcactctagcctgggcaacaaaagagaaaactccatctcaaaaa 5640  
aaaacaaggaaaaaaagaaacagcctcatgacacttagaaagtagaatagctggctgtt 5700  
atctgaacattgaattgtaaggcttatcaggtggactttgcattccatcagcagacaatt 5760

Фиг. 1В



tctatcaacagtccttccaccagttatctctaaaatatctcctgaatcagcccacttccctt 8700  
ccatcttcaactacatgcaccctggccttccaagctactatcggtctccaaccagaactgct 8760  
gggaccacctgatctctctgcttccaactctgtctcaacccccatctatcttccaagcagc 8820  
actagagttatcatattaaaaatgtaaatatcagtttttttttaaaagaaaaaacctga 8880  
gacttaacagagttataaaaaatataaatgtcatcatcagttccctgcttaaaacctta 8940  
actcgttccaattgcacttggaatgaaaccaaactgcactgatccagcccttgcctgcc 9000  
tccccaaagtccaaggggtcatggctctttccctggctacactgggtttctttctgtccc 9060  
tcaacactgcaagcctattgctgccccagggcctttacacttgctttttctgtcctaga 9120  
acagttcttcccaaaagatttttaaaagggcgggctccttaacattgaagtgcagacca 9180  
aacgccacatatgcagacagttcttctctactacttttaaaatagccctctgtccattca 9240  
ttcttcatcacattaacctgtttaattttcttctcagagctccacactatttggaagtat 9300  
ttgttgacttgttaccatgtctccccactagagtgtaagtttcatgagggcagggacctt 9360  
gtctgactttgactgtatctctcgcataatgggtaagtggttaaatagttatctatggaatg 9420  
aatccctattattccctcattatctctgcaaaatagtctttttctcaacatcttaaac 9480  
tgatatcccacctgacctatctacaaaacttttttttggcagacagagctcactgtcacca 9540  
ggctagagtgcaagtgcccatctcggtcactgcaacctccgctccgggtttaagcg 9600  
attctcttgcctcagcctccagtagctgggattatagggctggctaccacatctggct 9660  
aatttttgatttttagtagagatgggttccaccatgttggccaggcttgtctcgaactcc 9720  
tgactcagatgatccacctgctcggcctcccaagtgctgggattacaggeatgagcc 9780  
accgtgccagcctctacaaaactttttattccattacaaaactatagctgggatttaag 9840  
ttttcttaactcttgatggagtccatgtaattttcgagcttttaattttactaagacca 9900  
ttttagttctgattatagaagtaaatcttaagggatttcaagttatagggcctact 9960  
ctgaaagcaaacctcttacagtgaaaattcattataaggggttagacctccttatggaga 10020  
cgttcaatctgtaaaccaagagaaggctacaagtgccctctttaaactgttttcatctc 10080  
acaaggatgttagtagaaagttaacagaagagtcatactgttttccacagcccaattata 10140  
cagaaatccgacagtaactgcaatcactggcgaaattttgctgacattgatgattcctgga 10200  
aaagtataaagatctcttgactggacatcttttaaccaggagagaattggttgatggtg 10260  
ctggaccaggggttggaatgaccagataggtaaaaacttgagccctccttgttcaag 10320  
accctgggtaggcttgttccctattttgacattcaaggtaaatacaggtaaagttccctg 10380  
ggaggaggctttatgtgagagtaacttagagcaggatgctgtggaaagtggtttctccata 10440  
tgggtcatctaggttaactttaagaatgttccctcctctcttgtttgaattatctcattct 10500  
ttttctcagttagtgattggcaactttggcctcagctggaatcagcaagtaactcagatg 10560  
gccctctgggctatcatggtgctcctttatctatgtctaatgacctccgacacatcagc 10620  
cctcaagccaaagctctcctcaggataaggaagtaattggccatcaatcaggacccttg 10680  
ggcaagcaagggtaaccagcttagacaggtaataaagagtataattttaagatggcttta 10740  
tataccaataccaactttgtcttgggctaaactctatttttcccttgcctcttgatgt 10800  
tactatcagtaataaagcttcttgcctagaaacattactttatttccaaaataatgctaca 10860  
ggatcatttttaatttttccatacaagtgccttgatagttctgacattaagaatgaatgcaa 10920  
actaacagggccacttatcactagttgctaagcaaccacactttcttgggtttttcagggg 10980  
gacaactttgaagtgtgggaacgacctctctcaggttagcctgggctgtagetatgata 11040  
aacggcagggagattgggtggacctcgtctttataccatcgcagttgcttccctgggtaaa 11100  
ggagtgccctgtaactcctgctgcttcatcacacagctcctccctgtgaaaaggaagcta 11160  
gggttctatgaaatggacttcaaggttaagaagtcacataaatcccacagggcactgttttg 11220  
cttcagctagaaaatacaatgcagatgtcattaaaagacttactttaaaatgtttatctt 11280  
attgccaactactacttccctgtccacctttttctccattcactttaaaagctcaaggcta 11340  
ggtggctcatgctgtaatcccagcactttgggaggctgaggcgggcagatcacctgagg 11400  
tcgggactttgagaccgcctggacaacatgggtgaaaccccatttctaataaaaatataa 11460  
aaattagccagggtgtggtggcgcacctgtggtcccagctactctgggggctgaggcatga 11520

Фиг. 1D

gaatcgcttgaacccgggagtgagggttgcaattgagctgagatcatgccacctcactcca	11580
gctgggcaacaaaagattccatctcaaaaaaaaaaaaaaaaaagccaggcacagtggtcctg	11640
cctggaatcccagcacttttggaaagctgaggcaggcagatcacttgagggttaggatttca	11700
agaccagcctggctaacaatagtaaagccctgtctctactaaaaatacaaaaattagccag	11760
gtatggtggcgagcttctgtagcccagctactcaggagactgaggcaggagaatcaactt	11820
gaacccgggaagtgggggggtgcagtgacccaagatcacgccactgcattccagcctggg	11880
caacagagcaagactccatctcaaaaaaaaaaagttctatttcccttgaataaaaattttcog	11940
aagtttaaaactttaggaataaaaactattaacccgtatcttactcatccagatacccacc	12000
cccttggtgagattctctcccaattatcaaaatgtgtagcatatttaactaccaagagct	12060
aaacatcattaagactgaaatgtattaagaaggatgtataggccaggcacggtgtctcac	12120
gctgtaatcccaacactttgggaggccaagtcgggcccgatcacgaggtcaggagatgga	12180
gaccatcctggccaacatggtgaaacccctctctactaaaaatacaaaaattagccagg	12240
cagggtggcaggeacctgtaateccagctactccagaggctgaggcaggacaatcaactga	12300
acctgggaggcagaggctgcagtgagctgaggttgtaccaattgcactccagcctaggta	12360
acgagcaacactccatctcaaaaaaaaaaagataataatttggaaactgtta	12420
agaggcattttaaaga	12436

**Фиг. 1E**

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

## Фиг. 2

atgcagctgaggaatcccagagctccacctgggctgtgctctggctctgcggttctctggccctc  
gtgtcctgggacatccctggcgttagggccctcgataacggactggcccggacccccacaatg  
ggatggctccactgggaaaggttcatgtgcaatctggactgtcaggaggaaccgactcctgc  
atcagcgaaaagctcttcatggagatggccgagctgatggtgagcggagggtggaaggacgcc  
ggctacgagtatctgtgcatcgatgactgctggatggccccctcaaagggactccgaaggcagg  
ctgcaggctgatccccaaaggtttccccacgggaatccggcagctcgccaactacgtgcatte  
aagggcctcaagctcggcatctacgccgacgtgggcaacaaaacatgcgcgggattccccggc  
agcttcggctactacgacatcgacgccagacattcgctgattggggagtggaacctgctgaag  
ttegaeggctgttaactgegattccctggaaaacctggccgacggctacaaacacatgtccctc  
gccctgaaccggacaggcaggtccatcgtgtacagctggcagtgcccctgtacatgtggcct  
ttccagaagccccaaactacacagagatcaggcagtaactgcaaccactggaggaacttcgctgac  
atcgacgactcctggaagagcatcaagagcatcctggactggaccagcttcaaccaggagagg  
atcgtggacgtggctggaccocggaggctggaacgacccccgatatgctggtgattggcaacttc  
ggactgagctggaaccagcaggtgaccacagatggccctgtgggccattatggccgctccctg  
ttcatgtccaacgacctgaggcacatcagccccagggccaaggctctgctgcaggacaaggat  
gtgatcgccatcaaccaggacccccctgggcaagcagggtaccagctgaggcaaggagataac  
ttcgaggtgtgggagaggccccctgtccggactggcttgggcccgtggccatgatcaatcggcag  
gagatcggcggacccccggctcctacaccattgctgtggccagcctgggaaaaggagtcgcctgc  
aaccocgctgcttcattaccagctgctccccgtgaagcgggaagctgggcttctatgagtg  
accagcaggtgaggtcccatatcaatcctaccggcaccgtcctcctccagctcgagaatacc  
atgcagatgagcctcaaggatctgctgtga

## Фиг. 3