(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 114630673 A
(43)申请公布日 2022.06.14

(21)申请号 202080076522.3

(22)申请日 2020.09.03

(30)优先权数据
62/895,230 2019.09.03 US
62/983,862 2020.03.02 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2022.04.29

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2020/049156 2020.09.03

(87)PCT国际申请的公布数据
WO2021/046190 EN 2021.03.11

(71)申请人 特拉维尔治疗瑞士有限公司
地址 瑞士拉珀斯维尔-乔纳

(72)发明人 M·塞洛斯-莫拉 E·M·布布利尔 F·格拉文

(74)专利代理机构 北京市君合律师事务所 11517
专利代理师 吴瑜 顾云峰

(51)Int.Cl.
A61K 38/51(2006.01)
A61K 47/60(2006.01)
C12N 9/88(2006.01)
C12N 9/96(2006.01)

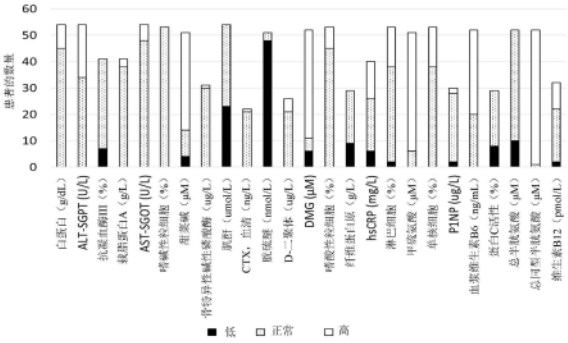
权利要求书3页 说明书86页
序列表8页 附图4页

(54)发明名称

用于治疗升高的同型半胱氨酸水平的胱硫醚β-合成酶酶疗法

(57)摘要

本公开提供了用于治疗受试者的同型胱氨酸尿症或升高的同型半胱氨酸水平的方法,包括改善认知功能和改善骨骼脆性的方法,以及将患者群体分层以确定疾病进展或严重程度和/或确定治疗方案的方法。在一些实施方式中,改善具有升高的血浆总同型半胱氨酸(tHcy)水平的受试者的认知功能的方法进一步包含提供认知或行为干预。



CN 114630673 A

1.一种治疗受试者的CBS缺乏症的方法,所述方法包含:

a.确定所述受试者中疾病严重程度或疾病进展的代谢指标的水平;和

b.向所述受试者施用治疗有效量的药物制剂,所述药物制剂包含:

i.包含有包含SEQ ID NO:1的分离的胱硫醚β-合酶(CBS)蛋白的药物物质;

ii.与CBS蛋白共价结合的PEG分子;以及

iii.药学上可接受的赋形剂、稀释剂或佐剂;

其中所述受试者是具有升高的tHcy水平的非遗传定义的患者或具有CBS缺乏症的非遗传定义的患者,并且其中所述药物制剂的所述治疗有效量包含根据所述受试者中所述疾病严重程度或疾病进展的代谢指标的所述水平调节的所述药物物质的剂量。

2.根据权利要求1所述的方法,其中确定所述受试者中疾病严重程度或疾病进展的代谢指标的水平包含从所述受试者获得血液或血浆样品,测量所述样品中疾病严重程度或疾病进展的一种或多种代谢指标的水平,以及将所述疾病严重程度或疾病进展的一种或多种代谢指标的所述水平与来自健康受试者的对照样品中的相同代谢指标的水平进行比较。

3.根据权利要求1所述的方法,其中根据所述受试者中所述疾病严重程度或疾病进展的代谢指标的水平调节的所述药物物质的剂量包含低剂量、中等剂量或高剂量的20NHS PEG-CBS。

4.根据权利要求3所述的方法,其中低剂量的20NHS PEG-CBS包含约0.25mg/kg至约1.0mg/kg的20NHS PEG-CBS。

5.根据权利要求3所述的方法,其中中等剂量的20NHS PEG-CBS包含约0.5mg/kg至约1.5mg/kg的20NHS PEG-CBS。

6.根据权利要求3所述的方法,其中高剂量的20NHS PEG-CBS包含约1mg/kg至约2mg/kg的20NHS PEG-CBS。

7.根据权利要求3所述的方法,其中高剂量的20NHS PEG-CBS包含约2mg/kg至约10mg/kg的20NHS PEG-CBS。

8.根据权利要求1至7中任一项所述的方法,其中所述疾病严重程度或疾病进展的代谢指标是总同型半胱氨酸(tHcy)、甲硫氨酸、肌酸酐、c-反应性蛋白、二甲基甘氨酸、丙氨酸转氨酶、蛋白C、天冬氨酸转氨酶(AST)、抗凝血酶III和/或载脂蛋白A。

9.根据权利要求1至8中任一项所述的方法,其中所述疾病严重程度或进展的代谢指标是tHcy,并且根据升高-低、升高-中或升高-高tHcy水平向所述受试者施用20NHS PEG-CBS的剂量。

10.一种改善具有升高的血浆总同型半胱氨酸(tHcy)水平的受试者的认知功能的方法,所述方法包含向所述受试者施用治疗有效量的药物制剂,所述药物制剂包含:

包含有包含SEQ ID NO:1的分离的胱硫醚β-合酶(CBS)蛋白的药物物质;

与CBS蛋白共价结合的PEG分子;以及

药学上可接受的赋形剂、稀释剂或佐剂。

11.根据权利要求10所述的方法,其进一步包含提供认知或行为干预。

12.根据权利要求10或11所述的方法,其中所述认知或行为干预包括父母行为训练(BPT)或行为课堂管理(BCM)。

13.一种降低具有升高的血浆总同型半胱氨酸(tHcy)水平的受试者的骨骼脆性的方

法,所述方法包含向所述受试者施用治疗有效量的药物制剂,所述药物制剂包含:

包含有包含SEQ ID NO:1的分离的胱硫醚β-合酶(CBS)蛋白的药物物质;

与CBS蛋白共价结合的PEG分子;以及

药学上可接受的赋形剂、稀释剂或佐剂。

14.根据权利要求13所述的方法,其中通过骨矿物质密度测定来评估所述受试者的骨骼脆性。

15.根据权利要求10至14中任一项所述的方法,其中所述PEG分子是ME-200GS。

16.根据权利要求10至15中任一项所述的方法,其中所述治疗有效量包含约0.25mg/kg至约10mg/kg所述药物物质的剂量。

17.根据权利要求16所述的方法,其中所述剂量为约0.33mg/kg所述药物物质。

18.根据权利要求16所述的方法,其中所述剂量为约0.66mg/kg所述药物物质。

19.根据权利要求16所述的方法,其中所述剂量为约1.0mg/kg所述药物物质。

20.根据权利要求16所述的方法,其中所述剂量为约1.5mg/kg所述药物物质。

21.根据权利要求10至20中任一项所述的方法,其进一步包含向所述受试者施用维生素B6、维生素B12、叶酸和甜菜碱中的一种或多种。

22.根据权利要求10至21中任一项所述的方法,其中所述受试者处于甲硫氨酸(Met)受限的饮食中。

23.根据权利要求22所述的方法,其进一步包含终止或放松所述甲硫氨酸受限的饮食。

24.根据权利要求10至23中任一项所述的方法,其进一步包含施用抗血小板剂。

25.根据权利要求24所述的方法,其中所述抗血小板剂是华法林血液稀释剂或抗凝血剂。

26.根据权利要求10至25中任一项所述的方法,其中所述施用治疗有效量的所述药物制剂每3天进行约一次。

27.根据权利要求10至25中任一项所述的方法,其中所述施用治疗有效量的所述药物制剂每天进行约一次。

28.根据权利要求10至25中任一项所述的方法,其中所述施用治疗有效量的所述药物制剂每天进行约两次。

29.根据权利要求10至25中任一项所述的方法,其中所述施用治疗有效量的所述药物制剂每周进行约一次。

30.根据权利要求10至25中任一项所述的方法,其中所述施用治疗有效量的所述药物制剂每周进行约两次。

31.根据权利要求10至30中任一项所述的方法,其中所述施用治疗有效量的所述药物制剂被重复持续约6周。

32.根据权利要求10至30中任一项所述的方法,其中所述施用治疗有效量的所述药物制剂被重复持续约3个月。

33.根据权利要求10至30中任一项所述的方法,其中所述施用治疗有效量的所述药物制剂被重复持续约6个月。

34.根据权利要求10至30中任一项所述的方法,其中所述施用治疗有效量的所述药物制剂被重复持续超过6个月。

35.根据权利要求10至30中任一项所述的方法，其中所述施用治疗有效量的所述药物制剂被重复持续所述受试者的剩余寿命。

36.根据权利要求10至35中任一项所述的方法，其中所述受试者中所述升高的血浆总同型半胱氨酸(tHcy)水平包括大于约5μmol/L的tHcy水平。

37.根据权利要求10至36中任一项所述的方法，其中所述受试者中所述升高的血浆总同型半胱氨酸(tHcy)水平包括大于约10μmol/L的tHcy水平。

38.根据权利要求10至37中任一项所述的方法，其中所述受试者中所述升高的血浆总同型半胱氨酸(tHcy)水平包括大于约15μmol/L的tHcy水平。

39.根据权利要求10至38中任一项所述的方法，其中所述具有升高的血浆总同型半胱氨酸(tHcy)水平的受试者是遗传定义的HCU患者。

40.根据权利要求10至38中任一项所述的方法，其中所述具有升高的血浆总同型半胱氨酸(tHcy)水平的受试者是具有升高的tHcy水平或具有CBS缺乏症的非遗传定义的患者。

用于治疗升高的同型半胱氨酸水平的胱硫醚β-合成酶酶疗法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2019年9月3日提交的美国临时专利申请第62/895,230号和2020年3月2日提交的美国临时专利申请第62/983,862号的优先权,其各自内容通过引用整体并入本文。

[0003] 参考序列表

[0004] 本申请与电子格式的序列表一起提交。标题为2089_1006PCT_SL.txt的序列表文件创建于2020年9月3日,并且大小为18,341字节。序列表的电子格式的信息通过引用整体并入本文。

技术领域

[0005] 本公开涉及使用本文描述的药物产品用于治疗同型胱氨酸尿症和用于治疗与升高的同型半胱氨酸水平相关的病症的酶疗法的组合物和方法。

背景技术

[0006] 经典的同型胱氨酸尿症,在本文中被称为HCU或HCU 1型并且也被称为胱硫醚β-合酶缺陷型同型胱氨酸尿症(CBSDH),是一种影响儿童和成人的孤儿疾病。HCU是一种罕见的常染色体隐性代谢病症,其特征是由于胱硫醚β-合酶(CBS)酶的活性降低或缺乏引起过量的尿液、组织和血浆中复合同型半胱氨酸(Hcy)(参见Kraus等人.在:Carmel R,Jacobsen DW编辑,《健康和疾病中的同型半胱氨酸(Homocysteine in Health and Disease)》.英国剑桥:剑桥大学出版社(Cambridge University Press);2001:223-243;Sacharow等人.“由胱硫醚β-合酶缺乏症引起的同型胱氨酸尿症(Homocystinuria Caused by Cystathionine Beta-Synthase Deficiency)”,在:Adam MP,Ardinger HH,Pagon RA,Wallace SE,Bean LJH,MeffordHC等人编辑.《基因评论TM[互联网]》(GeneReviewsTM[Internet]).西雅图(华盛顿州):西雅图华盛顿大学,2017;其各自均通过引用整体并入)。

[0007] 如Sacharow等人所述,可以通过CBS基因的分子遗传学测试来证实HCU的诊断。CBS是硫氨基酸甲硫氨酸(Met)的代谢中的酶,其存在于饮食中的蛋白质中(参见Maclean等人.《生物化学杂志(J Biol Chem.)》2012;287(38):31994-32005,其据此通过引用整体并入)。

[0008] 可以基于以下怀疑HCU:1)临床发现,包括晶状体异位(眼内晶状体的移位)和/或严重近视、虚弱体质(高且瘦)、骨骼异常、早发性骨质疏松和/或血栓栓塞事件、不明原因的发育迟缓/智力残疾;2)新生儿的高甲硫氨酸血症的筛选或者特别是CBS缺乏症的阳性家族史可以导致症状前患者鉴定;以及3)家族史。在所有这些临床体征和患者中症状发作的年龄方面都存在相当大的差异。当前的筛选方法通常不能检测出具有不太严重的CBS缺乏症的新生儿,并且只能检测出少数具有更严重的HCU的患者(参见,Huemer等人.《遗传代谢疾病杂志(J Inherit Metab Dis.)》2015年11月;38(6):1007-19;Yap,《孤儿百科全书(Orphanet Encyclopedia)》[在线丛书].2005,第1-13页;Schiff等人.《神经儿科(Neuropediatrics)》2012年12月;43(6):295-304;其各自均据此通过引用整体并入)。

[0009] 在同型胱胺酸尿症(即,经诊断的或遗传定义的HCU)的背景之外,升高的血浆总同型半胱氨酸水平与骨质疏松和/或骨折的风险增加相关(参见van Meurs等人.《新英格兰医学杂志(N Engl J Med)》2004;350:2033-2041)。此外,升高的tHcy是"认知减退、痴呆和阿尔茨海默病的发展的可改变的风险因素(a modifiable risk factor for development of cognitive decline,dementia,andAlzheimer's disease)"(Smith,A.David等人."同型半胱氨酸和痴呆:国际共识声明(Homocysteine and dementia:an international consensus statement)".《阿尔茨海默病杂志(Journal ofAlzheimer's Disease)》62.2(2018):561-570)。

[0010] 因此,本领域需要一种用于对具有CBS缺乏症和/或升高的tHcy水平的受试者进行鉴定、分层和治疗的方法,所述受试者没有诊断出的或遗传上定义的HCU。

发明内容

[0011] 本文提供了改善具有升高的血浆总同型半胱氨酸(tHcy)水平的受试者的认知功能的方法,所述方法包括向所述受试者施用治疗有效量的药物制剂,所述药物制剂包含:包含有包含SEQ ID NO:1的分离的胱硫醚β-合酶(CBS)蛋白的药物物质;与CBS蛋白共价结合的PEG分子;以及药学上可接受的赋形剂、稀释剂或佐剂。

[0012] 在一些实施方式中,改善具有升高的血浆总同型半胱氨酸(tHcy)水平的受试者的认知功能的方法进一步包含提供认知或行为干预。

[0013] 在一些实施方式中,认知或行为干预包括父母行为训练(BPT)或行为课堂管理(BCM)。

[0014] 还提供了降低具有升高的血浆总同型半胱氨酸(tHcy)水平的受试者的骨骼脆性的方法,所述方法包含向所述受试者施用治疗有效量的药物制剂,所述药物制剂包含:包含有包含SEQ ID NO:1的分离的胱硫醚β-合酶(CBS)蛋白的药物物质;与CBS蛋白共价结合的PEG分子;以及药学上可接受的赋形剂、稀释剂或佐剂。

[0015] 在一些实施方式中,通过骨矿物质密度测定来评估受试者的骨骼脆性。

[0016] 在一些实施方式中,与CBS蛋白共价结合的PEG分子是ME-200GS。

[0017] 在一些实施方式中,治疗有效量包含约0.25mg/kg至约10mg/kg药物物质的剂量。在一些实施方式中,治疗有效量包含每日两次约0.25mg/kg至约10mg/kg药物物质的剂量。

[0018] 在一些实施方式中,剂量为约0.33mg/kg药物物质。在一些实施方式中,剂量为每日两次约0.33mg/kg药物物质。

[0019] 在一些实施方式中,剂量为约0.66mg/kg药物物质。在一些实施方式中,剂量为每日两次约0.66mg/kg药物物质。

[0020] 在一些实施方式中,剂量为约1.0mg/kg药物物质。在一些实施方式中,剂量为每日两次约1.0mg/kg药物物质。

[0021] 在一些实施方式中,剂量为约1.5mg/kg药物物质。在一些实施方式中,剂量为每日两次约1.5mg/kg药物物质。

[0022] 在一些实施方式中,剂量为自我施用。

[0023] 在一些实施方式中,所述方法进一步包含向所述受试者施用维生素B6和甜菜碱中的一种或多种。

[0024] 在一些实施方式中,受试者处于甲硫氨酸(Met)受限的饮食中。

[0025] 在一些实施方式中,所述方法进一步包括终止或放松甲硫氨酸受限的饮食。例如,在施用药学有效量的本文所述的药物产品后,受试者可以脱离甲硫氨酸受限的饮食,或者可以具有放松的甲硫氨酸受限的饮食。

[0026] 在一些实施方式中,所述方法进一步包含施用抗血小板剂。

[0027] 在一些实施方式中,抗血小板剂为华法林血液稀释剂或抗凝血剂。

[0028] 在一些实施方式中,施用治疗有效量的药物制剂每3天进行约一次。

[0029] 在一些实施方式中,施用治疗有效量的药物制剂每2天进行约一次。在一些实施方式中,施用治疗有效量的药物制剂每天进行约一次。

[0030] 在一些实施方式中,施用治疗有效量的药物制剂每天进行约两次。

[0031] 在一些实施方式中,施用治疗有效量的药物制剂每周进行约一次。

[0032] 在一些实施方式中,施用治疗有效量的药物制剂每周进行约两次。

[0033] 在一些实施方式中,施用治疗有效量的药物制剂被重复持续约6周。

[0034] 在一些实施方式中,施用治疗有效量的药物制剂被重复持续约3个月。

[0035] 在一些实施方式中,施用治疗有效量的药物制剂被重复持续约6个月。

[0036] 在一些实施方式中,施用治疗有效量的药物制剂被重复持续超过6个月。

[0037] 在一些实施方式中,施用治疗有效量的药物制剂被重复持续受试者的剩余寿命。

[0038] 在一些实施方式中,受试者中升高的血浆总同型半胱氨酸(tHcy)水平包含大于约5μmol/L的tHcy水平。

[0039] 在一些实施方式中,受试者中升高的血浆总同型半胱氨酸(tHcy)水平包含大于约10μmol/L的tHcy水平。

[0040] 在一些实施方式中,受试者中升高的血浆总同型半胱氨酸(tHcy)水平包含大于约15μmol/L的tHcy水平。

[0041] 在一些实施方式中,具有升高的血浆总同型半胱氨酸(tHcy)水平的受试者是遗传定义的HCU患者。

[0042] 在一些实施方式中,具有升高的血浆总同型半胱氨酸(tHcy)水平的受试者是具有升高的tHcy水平或具有CBS缺乏症的非遗传定义的患者。

[0043] 还提供了治疗受试者中CBS缺乏症的方法,所述方法包括:确定受试者中疾病严重程度或疾病进展的代谢指标的水平;以及向所述受试者施用治疗有效量的药物制剂,所述药物制剂包含:(i)包含有包含SEQ ID NO:1的分离的胱硫醚β-合酶(CBS)蛋白的药物物质;(ii)与CBS蛋白共价结合的PEG分子;以及(iii)药学上可接受的赋形剂、稀释剂或佐剂;其中所述受试者是具有升高的tHcy水平或具有CBS缺乏症的遗传定义的HCU患者或非遗传定义的患者,并且其中所述药物制剂的治疗有效量包含根据所述受试者中疾病严重程度或疾病进展的代谢指标的水平调节的所述药物物质的剂量。

[0044] 在一些实施方式中,确定受试者中疾病严重程度或疾病进展的代谢指标的水平包含从受试者获得血液或血浆样品,测量样品中疾病严重程度或疾病进展的一种或多种代谢指标的水平,以及将疾病严重程度或疾病进展的一种或多种代谢指标的水平与来自健康受试者的对照样品中相同代谢指标的水平进行比较。

[0045] 在一些实施方式中,根据受试者中疾病严重程度或疾病进展的代谢指标的水平调

节的药物物质的剂量包含低剂量、中等剂量或高剂量的20NHS PEG-CBS。

[0046] 在一些实施方式中，低剂量的20NHS PEG-CBS包含约0.25mg/kg至约1.0mg/kg的20NHS PEG-CBS，每天一次或两次。

[0047] 在一些实施方式中，中等剂量的20NHS PEG-CBS包含约0.5mg/kg至约1.5mg/kg的20NHS PEG-CBS，每天一次或两次。

[0048] 在一些实施方式中，高剂量的20NHS PEG-CBS包含约1mg/kg至约2mg/kg的20NHS PEG-CBS，每天一次或两次。

[0049] 在一些实施方式中，高剂量的20NHS PEG-CBS包含约2mg/kg至约10mg/kg的20NHS PEG-CBS，每天一次或两次。

[0050] 在一些实施方式中，疾病严重程度或疾病进展的代谢指标是总同型半胱氨酸(tHcy)、甲硫氨酸、肌酐、C-反应蛋白、二甲基甘氨酸、丙氨酸转氨酶、蛋白C、天冬氨酸转氨酶(AST)、抗凝血酶III和/或载脂蛋白A。

[0051] 在一些实施方式中，疾病严重程度或进展的代谢指标是tHcy，并且根据升高的-低、升高的-中等或升高的-高的tHcy水平向受试者施用20NHS PEG-CBS的剂量。

[0052] 本文还描述了治疗具有或疑似具有同型胱氨酸尿症的受试者的方法，所述方法包含：测量受试者中的肌酐、高敏感性C-反应蛋白、纤维蛋白原或蛋白C活性中的一种或多种的水平；将所述一种或多种水平与已知不具有同型胱氨酸尿症的受试者的群体或已知具有同型胱氨酸尿症的受试者的群体或两者中的所述一种或多种水平的已知值的范围进行比较；根据在所述受试者中测量的所述一种或多种水平评估所述受试者中的疾病进展或疾病严重程度；根据所述疾病进展或疾病严重程度调节所述受试者的酶疗法的剂量；以及向受试者施用酶疗法。在这些方法中，施用酶疗法包含施用包含分离的胱硫醚β-合酶(CBS)蛋白的药物物质，所述分离的胱硫醚β-合酶(CBS)蛋白包含SEQ ID NO:1或由SEQ ID NO:1组成，其中CBS蛋白具有与CBS蛋白共价结合的PEG分子。

附图说明

[0053] 如附图所示，根据本公开的特定实施方式的以下描述，前述和其他目的、特征和优点将变得显而易见。附图不一定是按比例绘制的；而是，重点放在说明本公开的各种实施方式的原理上。

[0054] 图1是示出了在HCU患者的自然史研究中测试的某些生物标记物的实验室值高、正常或低的患者的数量的图表。图1中，ALT-SGPT＝丙氨酸转氨酶-血清谷氨酸-丙酮酸转氨酶；AST-SGOT＝天冬氨酸转氨酶-血清谷氨酸-草酰乙酸转氨酶；DMG＝二甲基甘氨酸；hsCRP＝“高敏感性”C-反应蛋白；P1NP＝前胶原1型N-末端前肽。

[0055] 图2示出了血浆tHcy水平≤100μM且>100μM与骨骼脆性的相关性。

[0056] 图3示出了所测试的认知功能的NIH工具箱中位和四分位数评分。箱形图箱包含数据的第25至第75个百分位，其中中位值被表示为箱中的水平线。须代表数据的最小值和最大值。晶体认知复合＝反映过去学习和知识的认知领域。流体认知复合＝反映学习、解决新问题和使用记忆的能力的认知领域。

[0057] 图4示出了tHcy水平对认知功能的影响。

具体实施方式

[0058] I.引言

[0059] 胱硫醚β-合酶缺乏型同型胱氨酸尿症(HCU)的特征在于血浆同型半胱氨酸(Hcy)水平升高,以及Met水平升高和半胱氨酸(Cys)浓度降低(参见Yap S.“由胱硫醚β-合酶缺乏引起的同型胱氨酸尿症(Homocystinuria due to cystathionine beta-synthase deficiency)”.《孤儿百科全书》[在线丛书]2005;Morris等人.《遗传代谢疾病杂志》2017;40:49-74;NORD,Kraus JP.“胱硫醚β-合酶缺乏症引起的高胱氨酸尿症”.NORD[在线丛书]2017;其各自据此通过引用整体并入)。迄今为止,已经鉴定出超过180种与HCU相关的CBS基因突变(参见人类基因组突变数据库(Human Genome Mutation Database).2017.参考类型:在线来源.可在hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php上获得,其据此通过引用整体并入)。同型半胱氨酸(Hcy)是一种天然存在的氨基酸,其与丝氨酸一起作为CBS酶的底物。CBS通过在转甲基化、转硫和再甲基化途径的交叉点处操作来控制硫从甲硫氨酸(Met)向半胱氨酸(Cys)的单向流动(参见Maclean等人.《生物化学杂志》.2012;287(38):31994-32005,其据此通过引用整体并入)。天然CBS被变构激活剂S-腺苷甲硫氨酸(SAM)的结合激活,并催化β-置换反应,其中丝氨酸与Hcy以吡哆醛-5'-磷酸酯(吡哆醇或维生素B6)依赖性方式缩合,以形成胱硫醚(Cth)。在CBS下游操作的胱硫醚γ-裂解酶(CGL)使用Cth作为底物以生成Cys。因此,CBS的正常功能对于调节Hcy、Met和Cys的代谢非常重要。

[0060] 正常总同型半胱氨酸(tHcy)水平随年龄、性别和营养状态而变化,但通常在4.5与11μmol/L之间(参见Quest Diagnostics参考范围;questdiagnostics.com,其据此通过引用整体并入)。男性倾向于具有比女性略高(高出1至2μmol/L)的tHcy水平,并且观察到从儿童到80岁的患者平均值大约翻了一番(参见Refsum等人.《临床化学(Clin Chem)》2004;50:3-32,其据此通过引用整体并入)。在补充叶酸的群体中,tHcy水平的上限(97.5%)在<65岁的成人中为大约12μmol/L,并且在大于65岁的成人中为大约16μmol/L。许多HCU患者表现出严重的高同型半胱氨酸血症,其中总tHcy水平大于100μmol/L,而其他患者表现出从轻度到正常几倍范围的升高(参见Morris等人.《遗传代谢疾病杂志》2017;40:49-74,其据此通过引用整体并入)。已经观察到tHcy水平与疾病的严重程度高度相关(参见Yap等人.《遗传代谢疾病杂志》1998;21:738-747,其据此通过引用整体并入)。

[0061] HCU体征和症状的严重程度和表现在患者之间存在很大差异(参见Karaca等人.《基因(Gene)》2014;534:197-203;Trondle等人.Acta MedAustriaca 2001;28:145-151;Kluijtmans等人.《美国人类遗传学杂志(Am J Hum Genet)》1999;65:59-67;其各自据此通过引用整体并入)。许多患者表现出严重的高同型半胱氨酸血症,其中总同型半胱氨酸(tHcy)水平大于100μmol/L,而其他患者表现出从轻度到正常的几倍范围的tHcy升高(参见Morris等人.《遗传代谢疾病杂志》2017;40:49-74,其据此通过引用整体并入)。显著升高的tHcy水平通常与更严重的表现相关,而较低的水平通常与更温和形式的疾病相关。

[0062] HCU通常根据受影响的个体是否应答使用吡哆醇(维生素B6)的降低总同型半胱氨酸(tHcy)的治疗来分类,吡哆醇是正常CBS功能所需的CBS酶辅因子(参见Mudd等人.《美国人类遗传学杂志》1985;37:1-31;Abbott等人.《美国医学遗传学杂志(Am J Med Genet)》1987;26:959-969;它们据此通过引用整体并入)。一般而言,对吡哆醇具有应答性的患者具有较低的tHcy水平,导致较轻形式的障碍。这些患者在今后的生活中可能仅表现出一种或

几种HCU症状，并且许多仍未确诊。因此，认为对吡哆醇具有高度应答性的患者在大多数研究中代表性不足。

[0063] 回顾性的研究表明，具有最高tHcy水平(治疗或未治疗)的患者会表现出更严重的症状，并且在生命更早期出现(参见Yap等人.《遗传代谢疾病杂志》1998;21:738-747;Mudd等人.《美国人类遗传学杂志》1985;37:1-31，两者均据此通过引用整体并入)。具有升高的tHcy水平的未治疗的个体通常表现为发育不良(failure to thrive)、血栓栓塞、严重近视伴随后的视神经晶状体脱位、骨质疏松型骨折、马凡样习性(Marfanoid habitus)(特别是长骨延长)和精神异常，包括学习困难(参见Yap S.“胱硫醚β-合酶缺乏症引起的高胱氨酸尿症”.《孤儿百科全书》[在线丛书]2005;Morris等人.《遗传代谢疾病杂志》2017;40:49-74;NORD,Kraus JP.“胱硫醚β-合酶缺乏症引起的高胱氨酸尿症”.NORD[在线丛书]2017，其各自据此通过引用整体并入)。一些具有升高的tHcy水平的患者患有严重的儿童发病多系统疾病。在未经治疗的情况下，在更严重的患者中预期寿命显著缩短(参见Morris等人.《遗传代谢疾病杂志》2017;40:49-74，其据此通过引用整体并入)。

[0064] 以tHcy测量的Hcy衍生化合物由游离硫醇同型半胱氨酸(Hcy-SH或fHcy)、二硫化物(诸如同型半胱氨酸-半胱氨酸和同型半胱氨酸)和蛋白结合同型半胱氨酸组成(参见Ueland;《北方医学(Nord Med)》1989;104:293-298;Mudd等人.《新英格兰医学杂志》1995;333:325;Mudd等人.《动脉硬化血栓血管生物学(Arterioscler Thromb Vasc Biol)》2000;20:1704-1706;其各自据此通过引用整体并入)。巯基形式(同型半胱氨酸;Hcy)和二硫化物形式(同型半胱氨酸)之间的区别(参见Yap S.“胱硫醚β-合酶缺乏症引起的高胱氨酸尿症”.《孤儿百科全书》[在线丛书]2005，其据此通过引用整体并入)是重要的，因为许多病理生理学效应取决于Hcy中巯基基团的存在(参见Yap S.“胱硫醚β-合酶缺乏症引起的高胱氨酸尿症”.《孤儿百科全书》[在线丛书]2005;Ueland等人.《北方医学》1989;104:293-298;Mudd等人.《新英格兰医学杂志》1995;333:325;其各自据此通过引用整体并入)。

[0065] CBS主要在肝、胰腺、肾和脑中表达(参见Morris等人.《遗传代谢疾病杂志》2017;40:49-74，其据此通过引用整体并入)。催化结构域结合吡哆醛5′-磷酸酯(辅因子也被称为吡哆醇或维生素B6)，并且调节结构域结合SAM(一种变构激活剂)。

[0066] CBS酶促活性水平不足阻断了第一步的转硫途径，导致Hcy积累、SAH和Met水平升高以及Cth和Cys水平降低。由于本文回顾的这些失调的Met代谢物的临床证据表明，升高的Hcy(临床上最常测量为血浆tHcy)与HCU的病理生理学密切相关。

[0067] 高于正常的Hcy水平修饰蛋白质上的巯基基团，阻止正确的蛋白质交联，并导致跨过多个身体系统的结构异常。升高的Hcy水平也会损害细胞内信号传导，导致内皮功能障碍，并最终导致血栓栓塞和血管疾病。在HCU中，Hcy的积累会导致眼部、骨骼、血管和心理表现。

[0068] HCU的诊断有时通过CBS基因的分子遗传学测试来证实(参见Sacharow等人.“胱硫醚β-合酶缺乏症引起的高胱氨酸尿症”.在:Adam MP,Ardinger HH,Pagon RA,Wallace SE,Bean LJH,Mefford HC等人编辑.《基因评论TM[互联网]》.西雅图(WA):西雅图华盛顿大学;1993-2017，其据此通过引用整体并入)。目前的筛选方法通常不能检测出具有不太严重的CBS缺乏症的新生儿，并且只能检测出少数具有更严重的HCU的患者(参见Huemer等人.《遗传代谢疾病杂志》.2015年11月;38(6):1007-19;Yap,《孤儿百科全书》[在线丛书].2005年，

第1-13页;Schiff等人.《神经儿科(Neuropediatrics)》.2012年12月;43(6):295-304)。

[0069] 选择用于确定临床样品中Hcy水平的测量是tHcy,其包括游离Hcy以及与蛋白质结合的Hcy或二硫化物形式的Hcy。正常tHcy水平因年龄、性别和营养状况而异,但通常在4.5与11μM之间(QUEST DIAGNOSTICS™参考范围)。许多HCU患者表现出严重的升高的-高胱胺酸尿症,其中总tHcy水平大于100μM,而其他患者表现出从轻度到正常的几倍的升高(参见Morris等人.《遗传代谢疾病杂志》.2017年1月;40(1):49-74,其据此通过引用整体并入)。tHcy水平与疾病的严重程度高度相关(参见Yap等人.《遗传代谢疾病杂志》1998;21:738-47)。

[0070] 研究已经表明,HCU患者中Hcy水平的降低与临床症状的较不严重的表现相关(参见Yap等人.《遗传代谢疾病杂志》1998;21:738-47;Yap等人.《动脉硬化血栓血管生物学》.2001年12月;21(12):2080-5;两者均据此通过引用并入本文)。同型半胱氨酸水平对这些系统造成损害的途径已被广泛描述(参见Ajith等人.《临床化学学报(Clin ChimActa)》2015;450:316-321;Behera等人.《细胞生理学杂志(J Cell Physiol)》99999:1-6,2016;Saha等人.《美国实验生物学学会联合会杂志(FASEB J)》2016;30:441-456;它们据此通过引用整体并入)并且已经进行了对Hcy在一般群体中的作用进行调查的研究,这些研究揭示了Hcy在疾病中的重要致病作用。

[0071] 使用本文所述的药物产品治疗的一个目标是增加循环中的CBS酶活性,导致改善的代谢控制,从而改善疾病的临床表现并减缓或防止进一步恶化。诸如酶的高分子量化合物具有有限的组织渗透能力,因此主要存在于血浆中。这些蛋白质通常在循环中维持较短的时间段,因为它们通过几种机制从血流中清除(参见Vugmeyster等人.《世界生物化学杂志(World J Biol Chem)》2012;3(4):73-92,其据此通过引用整体并入)。理想地,施用的CBS可以在足够长的时间内维持血浆中的高活性,从而对硫氨基酸代谢产生稳定影响。这一目标可以通过PEG化来实现,即在蛋白质的表面上添加PEG部分。蛋白质的PEG化是一种已变得被广泛接受的策略,并且已被证明能最小化蛋白水解、免疫应答和抗原性,同时增加蛋白质稳定性和大小,并减少肾脏排泄(参见Kang等人.2009;14(2):363-380,其据此通过引用整体并入)。本文所述的药物产品是一种PEG化htCBS C15S酶,其被配制成用于向受试者施用并被设计成用于延长的系统暴露。

[0072] A.同型胱氨酸尿症的临床表现

[0073] 存在显著的证据表明,在HCU患者中通常受影响的四个系统(眼部、骨骼、心血管和神经系统)中,升高的tHcy水平和负面临床结果具有因果效应。这些数据通过在一般群体中的研究被进一步补充,研究表明tHcy的轻度升高水平与负面结果之间存在密切关系。

[0074] 1.眼睛

[0075] 影响眼睛的异常可能是HCU的早期临床体征。许多个体发展眼睛晶状体远离眼球中心的移位(晶状体异位)。受影响的个体通常还会发展严重的近视(myopia/short sightedness/near sightedness)和虹膜震颤(眼睛的有色部分的颤动)。晶状体异位和近视通常发生在出生后的第一年,并且在未治疗的个体中,在10岁前发生(参见Mudd等人.《美国人类遗传学杂志》1985;37:1-31,其据此通过引用整体并入)。其他不太常见的眼部异常包括白内障、视神经变性和青光眼。一些个体可能患有视网膜脱离,这可能会导致视力模糊或在视野中出现“漂浮物”(参见Burke等人.《英国眼科杂志(Br J Ophthalmol)》,1989;73

(6):427-31,其据此通过引用整体并入)。

[0076] 在患有HCU的患者中和在一般群体中,升高的Hcy水平是眼部并发症(尤其是晶状体脱位)的强有力的且独立的风险因素(参见Mudd等人.《美国人类遗传学杂志》1985;37:1-31;Ajith等人.《临床化学学报》2015;450:316-321;Mulvihill等人.《美国斜视与小儿眼科学会杂志(JAAPOS)》2001;5:311-315;它们据此通过引用整体并入)。即使采用处方的药物和饮食干预,大多数HCU患者最终仍表现出眼部并发症。已观察到降低Hcy水平可延缓并可能预防HCU患者的晶状体脱位(参见Yap等人.《遗传代谢疾病杂志》1998;21:738-47,其据此通过引用整体并入)。

[0077] 2.中枢神经系统

[0078] 发育迟缓和学习问题(诸如认知症状)也可能是在1至3岁时发生的HCU的早期体征(参见"遗传学的筛选、技术和研究(STAR-G)项目(Screening,Technology and Research in Genetics(STAR-G)Project)".2016.高胱氨酸尿症(Homocystinuria).可在newbornscreening.info上获得;美国国立卫生研究院(National Institutes ofHealth)(NIH),美国国家医学图书馆(US National Library ofMedicine),遗传学家庭参考(Genetics Home Reference).高胱氨酸尿症.2016.ghr.nlm.nih.gov;它们据此通过引用整体并入)。据报告,患有HCU的个人的智商(IQ)在10至138的范围内。与受较轻影响的患者(其中平均IQ为79)相比,具有最高tHcy水平的患者更可能具有较低的IQ(其中如果未治疗,平均IQ为57)(参见Sacharow等人."胱硫醚β-合酶缺乏引起的高胱氨酸尿症(Homocystinuria Causedby Cystathionine Beta-Synthase Deficiency)".在:Adam MP,Ardinger HH,Pagon RA,Wallace SE,Bean LJH,Mefford HC等人编辑,《基因评论TM[互联网]》.西雅图(WA):西雅图华盛顿大学;1993-2017,其据此通过引用整体并入)。

[0079] 在大约20%的患有HCU的未治疗个体中发生癫痫发作(参见Mudd等人.《美国人类遗传学杂志》1985;37:1-31,其据此通过引用整体并入)。许多个体都具有精神病问题,包括人格障碍、焦虑、抑郁症、强迫行为和精神病发作(参见Sacharow等人.2017)。也可能出现诸如肌张力障碍的锥体外系体征(参见"遗传学的筛选、技术和研究(STAR-G)项目)".2016.高胱氨酸尿症.可在newbornscreening.info上获得,其据此通过引用整体并入)。

[0080] 研究表明,由低Met饮食、叶酸/B维生素补充剂和/或吡哆醇和甜菜碱疗法诱导的Hcy水平的早期降低可以延迟并且有时可以预防或逆转各种神经系统障碍的进展,并允许患有HCU的患者的正常IQ发育(参见El Bashir等人.《JIMD报告(JIMD Rep)》2015;21:89-95;Yap等人.《遗传代谢疾病杂志》2001;24:437-447;它们据此通过引用整体并入)。在HCU患者和一般群体中,Hcy的升高的水平与中枢神经系统(CNS)症状(包括认知症状、神经退行性疾病、癫痫发作、肌张力障碍、精神病、认知障碍、痴呆和抑郁症)之间的关联已有充分记录(参见Abbott等人.《美国医学遗传学杂志》1987;26:959-969;Schimke等人.《美国医学会杂志(JAMA)》1965;193:711-719;Herrmann等人.《临床化学实验室医学(Clin Chem Lab Med)》2011;49:435-441;它们据此通过引用整体并入)。

[0081] 3.骨骼系统

[0082] 患有HCU的个体经常出现各种骨骼异常。受影响的个体通常高且瘦,具有"马凡样"习性,其包括长骨的变薄和变长(肢体细长症)、膝盖向内弯曲,使得当腿伸直时接触(膝外翻("knock knees"或genu valgum))、高度弓状足(弓形足)、脊柱异常侧弯(脊柱侧凸)、胸

部异常突出(鸡胸)或胸部异常凹陷(漏斗胸)。到十几岁时,50%的个体显示出骨质疏松的体征(参见,“遗传学的筛选、技术和研究(STAR-G)项目)”.2016.高胱氨酸尿症.可在newbornscreening.info上获得,其据此通过引用整体并入)。HCU与骨质疏松性骨折的增加的风险有关,这部分可以归因于低骨矿物质密度(参见Mudd等人.《美国人类遗传学杂志》1985;37:1-31;Weber等人.《分子遗传学和代谢(Mol Genet Metab)》2016;117:351-354;它们据此通过引用整体并入)。

[0083] 在一项对25名患有HCU的爱尔兰患者进行了25年随访的研究中发现,与不依从的患者相比,骨骼异常的风险在对降低Hcy治疗具有良好的依从性好的患者中明显较低(参见Yap等人.《遗传代谢疾病杂志》1998;21:738-47,其据此通过引用整体并入)。

[0084] 4.心血管系统

[0085] 1985年,在一项在具有由纯合的HCU引起的中度至重度升高的Hcy水平的患者的流行病学研究中,首次证明了HCU与血管疾病之间的关系(参见Mudd等人.《美国人类遗传学杂志》1985;37:1-31,其据此通过引用整体并入)。血栓栓塞是HCU的最严重的、通常危及生命的并发症,并且可以影响任何血管。它是患有HCU的患者的发病和早期死亡的主要原因(参见Yap等人.《动脉硬化血栓血管生物学》.2001年12月;21(12):2080-5,其据此通过引用整体并入)。

[0086] 血栓栓塞事件的风险到16岁时为大约25%并且到29岁时为大约50%。几份报告描述了降低tHcy水平的治疗如何显著降低HCU患者的血管事件(发病的主要原因)的发生率(参见Wilcken等人.《遗传代谢疾病杂志》1997;20:295-300;Yap等人.《动脉硬化血栓血管生物学》.2001年12月;21(12):2080-5,其据此通过引用整体并入)。从那时起,许多其他研究表明,HCU患者的血管事件尤其是静脉血栓形成的风险增加(参见Kelly等人.《神经病学(Neurology)》2003;60:275-279;Magner等人.《遗传代谢疾病杂志》2011;34:33-37;它们据此通过引用整体并入)。

[0087] 5.额外表现

[0088] 虽然不太常见,但在患有HCU的患者中还报告了其他额外的发现,包括极细、脆弱的皮肤、脆弱的头发、皮肤变色(色素沉着不足)和脸颊上的皮疹(颧颊潮红)。一些个体可能会出现肝脏的脂肪变化、部分肠通过腹壁的撕裂而突出(腹股沟疝)或胰腺的炎症。在患有HCU的个体中也报告了异常的脊柱前后弯曲(脊柱后凸)和肺萎陷(自发性气胸)(参见Yap;《孤儿百科全书》[在线丛书].2005年,第1-13页,其据此通过引用整体并入)。

[0089] B.非遗传定义的患者群体中升高的同型半胱氨酸血症

[0090] 正常tHcy水平因年龄、性别和营养状况而异,但通常在4.5与11μmol/L之间的范围内(Quest Diagnostics参考范围,questdiagnostics.com)。男性倾向于具有比女性略高(高出1至2μmol/L)的tHcy水平,并且观察到从儿童到80岁的患者平均值大约翻了一番(参见Refsum等人.《临床化学》2004;50:3-32,其据此通过引用整体并入)。在补充叶酸的群体中,tHcy水平的上限(97.5%)在<65岁的成人中为大约12μmol/L,并且在大于65岁的成人中为大约16μmol/L。

[0091] tHcy水平高于正常值的受试者处于发生与升高的tHcy相关的并发症的较高的风险。例如,升高的血浆总同型半胱氨酸水平与骨质疏松和/或骨折的增加的风险有关(参见van Meurs等人.《新英格兰医学杂志》2004;350:2033-2041;其据此通过引用整体并入)。此

外,升高的tHcy是认知症状(包括痴呆和阿尔茨海默病)的已知风险因素(Smith,A.David等人.“同型半胱氨酸和痴呆:国际共识声明”《阿尔茨海默病杂志》62.2(2018):561-570;其据此通过引用整体并入)。

[0092] 因此,具有升高的tHcy水平,即大于4.5与11μmol/L之间的正常范围的患者,可以使用本文所述的化合物和方法治疗,以减轻升高的tHcy水平的骨骼、心血管和/或认知症状,而与胱硫醚β-合酶的遗传确定的缺乏无关。

[0093] II.组合物

[0094] A.天然人类CBS酶

[0095] CBS全天然酶是具有四个相同单体的四聚体,其中每个单体(大小为63kDa)被组织成三个功能结构域。第一个是约70个氨基酸的N末端区域,其结合血红素并被认为在氧化还原传感和/或酶折叠中起作用。第二个是含有催化核心并且显示II型家族PLP(吡哆醛-5’-磷酸酯)依赖性酶的折叠的中心结构域。辅酶PLP被深埋在N-末端结构域与C-末端结构域之间的缝隙中。第三个区域是C-末端调节结构域,其由一对串联的CBS基序组成,该CBS基序在与S-腺苷甲硫氨酸(SAM)结合时激活该酶。调控区域的去除会产生一种具有组成型活性的酶(参见Miles等人.《生物化学杂志》.2004年7月16日;279(29):29871-4,其据此通过引用整体并入)。

[0096] 吡哆醛-5’-磷酸酯(PLP)依赖性酶折叠含有血红素基团。它对PLP依赖性β-置换反应进行催化,在该反应中,它使L-同型半胱氨酸与L-丝氨酸缩合,以形成L-胱硫醚。通过S-腺苷-L-甲硫氨酸(Ado-Met)与C-末端调节结构域的结合对其进行构象重排,从而导致这些结构域的构象重排并释放自身抑制性阻断剂。CBS激活也可以通过完全去除C-末端调节结构域,生成具有组成型活性的二聚体形式的酶来实现(参见Miles等人.《生物化学杂志》.2004年7月16日;279(29):29871-4;Ereno-Orbea等人.《美国国家科学院院刊(Proc Natl Acad Sci USA)》111(37),E3845-3852(2014);其各自据此通过引用整体并入)。

[0097] 本文所述的药物产品中的活性物质是重组人截短的CBS蛋白,与本发明的序列表中的SEQ ID NO:2的氨基酸序列(其代表天然CBS蛋白)相比,在该蛋白的氨基酸位置15(htCBS C15S)处具有半胱氨酸到丝氨酸的取代,其已通过添加聚乙二醇(PEG)进行修饰。这种酶也被称为htCBS C15S。在某些实施方式中,药物物质htCBS C15S具有SEQ ID NO:1的氨基酸序列。

[0098] 这种形式的酶具有高度的聚集倾向,其对人类CBS(hCBS)的制造和生产构成了主要限制。PEG化的htCBS C15S(包括如本文定义的“20NHS PEG-CBS”)已经被工程改造以形成不易聚集的二聚体而非四聚体。高分子量化合物(诸如酶)通过经由蛋白水解的降解和各种清除机制从循环中去除(参见Vugmeyster等人.《世界生物化学杂志》.2012;3(4):73-92,其据此通过引用整体并入)。已知PEG化最小化蛋白水解和免疫原性,同时增加蛋白稳定性并减少肾脏排泄(参见Kang等人.2009;14(2):363-380,其据此通过引用整体并入)。这些结构修饰使本文所述的包含PEG化htCBS C15S的药物产品成为比天然hCBS更适合作为HCU的酶疗法(ET)的候选物。

[0099] 天然CBS是一种细胞内酶,并且已知不存在将酶从细胞外环境吸收到其主要细胞内作用位点的机制,而PEG化的htCBS C15S在细胞外发挥作用。与天然内源性CBS不同,PEG化的htCBS C15S通过直接在循环中操作和间接在组织中操作来纠正代谢异常,并且这样做

无需激活SAM。当S-腺苷甲硫氨酸(SAM)与其C-末端调节结构域结合时，天然hCBS酶在细胞中被激活。然而，在患者和健康个体的循环中的SAM水平均远低于激活CBS所需的水平(参见Stabler等人.《代谢(Metabolism)》2002.51(8):第981-8页，其据此通过引用整体并入)。因此，将天然CBS施用到循环中将是无效的，因为CBS不会被激活。PEG化的htCBS C15S虽然仍在循环中且不会进入细胞，但已被工程改造，以通过去除CBS C-末端调节结构域(使酶具有组成型活性)来绕过SAM活化的需要，使得所述酶具有组成性活性。

[0100] B.酶疗法(ET)

[0101] PEG化的htCBS C15S是一种PEG化的、截短的hCBS，在ET的位置15处具有半胱氨酸到丝氨酸的取代，用于治疗HCU和/或治疗非遗传定义的患者的升高的血浆总同型半胱氨酸。这种修饰优化了酶以形成二聚体而不是四聚体，并且具有组成型活性。

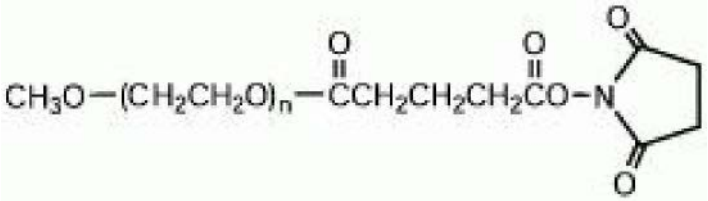
[0102] PEG化的htCBS C15S补充CBS活性缺陷，从而降低同型半胱氨酸(Hcy)和甲硫氨酸(Met)的血浆水平，增加胱硫醚(Cth)水平，并使半胱氨酸(Cys)水平正常化。降低总Hcy(tHcy)水平是当前的治疗目标(参见，Morris等人.《遗传代谢疾病杂志》.2017年1月;40(1):49-74，其据此通过引用整体并入)并且与临床(眼、骨骼、血管和神经)结果的改善强烈相关(Yap;《孤儿百科全书》[在线丛书].2005，第1-13页，其据此通过引用整体并入)。

[0103] PEG htCBS C15S降低具有升高的Hcy水平的受试者(包括具有升高的tHcy水平的非遗传定义的受试者)的同型半胱氨酸(Hcy)的血浆水平。PEG化的htCBS C15S是天然人CBS酶的重组形式，其在大肠杆菌细菌中产生。对天然人CBS的DNA序列(在本发明的序列表中的SEQ ID NO:3)进行遗传修饰，以除去C-末端调控区(氨基酸414-551)(SEQ ID NO:4)，形成人截短的CBS。进一步修饰人截短的CBS的DNA序列，以在DNA编码区(对应于SEQ ID NO:3)的位置43处引入T→A的点突变，导致在翻译的蛋白质的位置15处的半胱氨酸到丝氨酸的取代，产生人截短的CBS C15S(htCBS C15S)(SEQ ID NO:5)。与天然HCB相比，这一变化减少了聚集，并允许批次间的一致性。

[0104] 酶在表达期间在大肠杆菌细菌中被进一步修饰，导致从SEQ ID NO:1所示的蛋白质中去除第一Met。纯化后，htCBS C15S酶通过用N-羟基琥珀酰亚胺酯官能化的20kDa PEG部分PEG化被进一步修饰，该PEG部分与蛋白质的表面上的伯胺反应。大约平均5.1个PEG分子被附接到酶的每个单体单元上，产生平均分子量为290kDa的异质二聚体产物。

[0105] C.htCBS C15S的PEG化产生20NHS PEG-CBS

[0106] ME-200GS(也被称为甲氧基-PEG-CO$(CH_2)_3$COO-NHS)在本文中用于PEG化htCBS C15S：

[0107] 

[0108] ME-200GS具有20kDa的分子量和α-琥珀酰亚胺基氧基戊二酰-ω-甲氧基聚氧乙烯的化学名称。ME-200GS靶向htCBS C15S的表面上的游离胺。在PEG与htCBS C15S上的赖氨酸残基之间形成酰胺键。所得的分子在整个公开中被称为“20NHS PEG-CBS”，并且是琥珀酰化的人胱硫醚β-合酶分子，其被截短并且具有C15S突变，如SEQ ID NO:1中所提供的。

[0109] D.翻译后修饰

[0110] 翻译后修饰可能需要额外的生物加工步骤来分离修饰的和未修饰的多肽，这增加了成本并降低了生物制品的生产效率。因此，在一些实施方式中，通过调节编码影响翻译后修饰的蛋白质的靶基因的表达来增强细胞中多肽试剂的产生。在另外的实施方式中，通过调节编码影响第一翻译后修饰的蛋白质的第一靶基因的表达和调节编码影响第二翻译后修饰的蛋白质的第二靶基因的表达来增强生物制品的生产。

[0111] 此外，在原核细胞或真核细胞中表达的蛋白质可以经历若干翻译后修饰，所述翻译后修饰可以损害生物产物的产生和/或结构、生物活性、稳定性、同质性和/或其他性质。这些修饰中的许多修饰是在细胞生长和多肽表达期间自发发生的，并且可以发生在几个位点，包括肽主链、氨基酸侧链以及给定多肽的氨基和/或羧基末端。此外，给定的多肽可以包含几种不同类型的修饰。例如，在细菌细胞诸如大肠杆菌中表达的蛋白质可以经受乙酰化、组蛋白剪切、羧基化和/或脱酰胺化(参见Yang等人.《美国国家科学院院刊(PNAS)》111(52)E5633-E5642(2014)，其据此通过引用整体并入)。例如，在鸟类和哺乳动物细胞(诸如中国仓鼠卵巢(CHO)细胞)中表达的蛋白质可以经受乙酰化、羧基化、γ-羧基化、组蛋白剪切、脱酰胺作用、N-末端谷氨酰胺环化和脱酰胺作用以及天冬酰胺脱酰胺作用。

[0112] 在一些实施方式中，通过调节编码参与蛋白质脱酰胺的蛋白质的靶基因的表达来增强蛋白质生产。蛋白质可以通过多种途径脱酰胺，包括N-末端谷氨酰胺的环化和脱酰胺作用和天冬酰胺的脱酰胺作用。因此，在一个实施方式中，参与蛋白质脱酰胺作用的蛋白质是N-末端天冬酰胺酰胺水解酶。蛋白质脱酰胺作用可以导致改变的结构性质、降低的效力、降低的生物活性、降低的功效、增加的免疫原性和/或其他不期望的性质，并且可以通过几种方法测量，包括但不限于通过例如离子交换色谱法、HPLC、等电点聚焦、毛细管电泳、天然凝胶电泳、反相色谱法、疏水相互作用色谱法、亲和色谱法、质谱法或使用L-异戊基甲基转移酶基于电荷分离蛋白质。

[0113] 在一些实施方式中，影响蛋白质分泌的蛋白质是选自由以下组成的群组的分子伴侣:Hsp40、HSP47(也被称为丝氨酸蛋白酶抑制剂，clade H;热休克蛋白47)、HSP60、Hsp70、HSP90、HSP100、蛋白二硫键异构酶、肽基脯氨酰异构酶、钙蛋白酶、Erp57(蛋白二硫键异构酶家族A，成员3)和BAG 1。在一些实施方式中，影响蛋白分泌的蛋白选自由γ分泌酶、p115、信号识别颗粒(SRP)蛋白、分泌素和激酶(例如MEK)组成的群组。

[0114] 预期可以通过系统地添加或移除核苷酸以产生更长或更短的序列并测试通过从该点沿靶RNA上下移动更长或更短大小的窗口而产生的那些序列来实现进一步优化。将这种产生新的候选靶的方法与基于那些靶序列的RNA效应子分子在如本领域已知的或如本文所述的抑制测定中的有效性测试相结合，可以导致抑制效率的进一步提高。仍进一步地，此类优化的序列可以通过例如引入如本文所述或如本领域已知的修饰核苷酸、添加或改变突出端、或如本领域已知和/或本文所述的其他修饰来调节，以进一步优化分子(例如，增加血清稳定性或循环半衰期、增加热稳定性、增强跨膜递送、靶向特定位置或细胞类型、增加与沉默途径酶的相互作用、增加从内体(endosome)的释放等)作为表达抑制剂。

[0115] E.稳定性

[0116] 药物物质或药物产品在各种温度和储存条件下是稳定的。在一些实施方式中，当在-65℃和-20℃下储存时，药物物质或药物产品是稳定的。可替代地，当在约2℃至约8℃的

范围内的温度下储存时，药物物质或药物产品可以是稳定的。可替代地，当在25℃±2℃的范围内的温度下储存时，药物物质或药物产品可以是稳定的。例如，药物物质或药物产品在20℃与25℃之间保持稳定。在某些实施方式中，药物物质或药物产品在还原条件下是稳定的。在某些实施方式中，药物物质或药物产品在非还原条件下是稳定的。在一些实施方式中，药物物质或药物产品在至少2天、至少7天、至少1个月、至少2个月、至少3个月、至少6个月或至少12个月内保持稳定。例如，药物物质或药物产品在储存期间在约2天内保持稳定。例如，药物物质或药物产品在储存期间在约7天内保持稳定。例如，药物物质或药物产品在储存期间在约1个月内保持稳定。例如，药物物质或药物产品在储存期间在约2个月内保持稳定。例如，药物物质或药物产品在储存期间在约3个月内保持稳定。例如，药物物质或药物产品在储存期间在约6个月内保持稳定。例如，药物物质或药物产品在储存期间在约12个月内保持稳定。例如，药物物质或药物产品在储存期间在约18个月内保持稳定。

[0117] 在一些实施方式中，药物物质或药物产品在-65℃下储存长达18个月保持稳定。在一些实施方式中，药物物质或药物产品在约2℃至约8℃之间的储存长达3个月保持稳定。在一些实施方式中，药物物质或药物产品在25℃±2℃下储存长达1个月保持稳定。

[0118] 在一些实施方式中，药物物质或药物产品在至少3个冻融循环中保持稳定。在一些实施方式中，药物物质或药物产品在长达6个冻融循环中保持稳定。例如，药物物质或药物产品在5个冻融循环中保持稳定。在某些实施方式中，药物产品在从注射器中排出后是稳定的。

[0119] III.药物组合物

[0120] 本文所述的包含PEG化htCBS C15S的药物产品旨在通过降低患有HCU的患者的同型半胱氨酸水平并使半胱氨酸水平正常化来恢复代谢控制并改善该疾病的临床表现。htCBS C15S通过重组技术，使用大肠杆菌BL21(DE3)生产，并且被配制成在15mM磷酸钾、8％(w/v)海藻糖，pH 7.5中的无菌药物产品。药物产品旨在通过皮下(SC)注射施用。

[0121] 循环中的PEG化htCBS C15S活性也改善或甚至完全正常化组织中的代谢产物概况(参见WO 2017/083327，其据此通过引用整体并入)。因此，药物产品不一定需要被递送到其天然的细胞内环境中。

[0122] 药物产品减少了有毒Hcy在HCU患者体内的蓄积；使循环中的Cys水平正常化；增加循环中的Cth的水平；和/或防止、延迟和/或逆转HCU表现的发作。该药物产品在允许患者享受正常饮食的同时，实现了这些益处中的至少一种。事实上，即使在常规饮食(例如4.0g/kg的MET)下，增加的Cth活性也已经被观察到是药物产品的增加的活性和/或减少的肾脏消除的证据。

[0123] 根据SEC/UV/MS的同位素平均分子量计算的药物物质的分子量对于单体为45.290kDa，并且对于二聚体为90.58kDa。

[0124] 所有批次均为透明液体，该透明液体几乎无可见颗粒且颜色为暗红色。此外，在还原条件和非还原条件下进行的SDS-PAGE以及蛋白质印迹提供的结果对于各批次均彼此一致。使用这些方法中的每一种，均证明了PEG化变体的独特、一致和恒定的模式。伴随的药物，包括抗凝剂、维生素和矿物质补充剂、甜菜碱、抗抑郁症药，也可与本文所述的药物产品组合，以增强药物组合物的功效。

[0125] IV.制剂

[0126] 对于上述治疗用途，施用的剂量将随所用的化合物、施用方式、所需的治疗和所指示的障碍而变化。例如，如果吸入，本发明的化合物的日剂量可以在0.05微克/千克体重(μg/kg)至100微克/千克体重(μg/kg)的范围内。可替代地，如果化合物被口服施用，则本公开的化合物的日剂量可以在0.01微克/千克体重(μg/kg)至100毫克/千克体重(mg/kg)的范围内。

[0127] 具有氨基酸序列SEQ ID NO:1的蛋白质(其被PEG化以形成本文所述的药物物质)可以单独使用，但通常以与药学上可接受的佐剂、稀释剂或载体结合的药物组合物的形式施用。因此，本公开进一步提供了一种药物组合物，所述药物组合物包含本文所述的药物物质以及药学上可接受的佐剂、稀释剂或载体。

[0128] 可以用于本公开的药物组合物中的药学上可接受的佐剂、稀释剂或载体是在药物制剂领域中常规使用的那些，并且包括但不限于糖、糖醇、淀粉、离子交换剂、氧化铝、硬脂酸铝、卵磷脂、血清蛋白诸如人血清白蛋白、缓冲物质诸如磷酸盐、甘油、山梨酸、山梨酸钾、饱和植物脂肪酸的偏甘油酯混合物、水、盐或电解质诸如硫酸鱼精蛋白、磷酸氢二钠、磷酸氢钾、氯化钠、锌盐、胶体二氧化硅、三硅酸镁、聚乙烯吡咯烷酮、纤维素基物质、聚乙二醇、羧甲基纤维素钠、聚丙烯酸酯、蜡、聚乙烯-聚氧丙烯-嵌段聚合物、聚乙二醇和羊毛脂肪(羊毛脂)。

[0129] 本公开的药物组合物可以被口服、肠胃外、通过吸入喷雾、直肠、鼻、颊、阴道或通过植入的储器施用。在一个实施方式中，药物组合物可以被口服施用。在一个实施方式中，药物组合物可以被皮下施用。本公开的药物组合物可以含有任何常规的无毒的药学上可接受的佐剂、稀释剂或载体。如本文使用的术语肠胃外包括皮下、皮内、静脉内、肌内、关节内、滑膜内、胸骨内、鞘内、病灶内和颅内注射或输注技术。

[0130] 药物组合物可以是无菌可注射制剂的形式，例如作为无菌可注射水性或油性悬浮液。可以根据本领域已知的技术，使用合适的分散剂或湿润剂(诸如例如吐温80)和悬浮剂来配制悬浮液。无菌可注射制剂也可以是在无毒肠胃外可接受的佐剂、稀释剂或载体中的无菌可注射溶液或悬浮液，例如作为在1,3-丁二醇中的溶液。可以使用的可接受的佐剂、稀释剂和载体包括甘露醇、水、林格氏溶液(Ringer's solution)和等渗氯化钠溶液。此外，无菌的固定油通常被用作溶剂或悬浮介质。为此，可以使用任何温和的固定油，包括合成的甘油一酯或甘油二酯。脂肪酸诸如油酸及其甘油酯衍生物可用于制备注射剂，天然的药学上可接受的油诸如橄榄油或蓖麻特别是其聚氧乙烯化形式也可用于制备注射剂。这些油溶液或悬浮液也可能含有长链醇稀释剂或分散剂。

[0131] 本公开的药物组合物可以以任何口服可接受的剂型被口服施用，包括但不限于胶囊、片剂、散剂、颗粒剂和水性悬浮液和溶液。这些剂型是根据药物制剂领域熟知的技术制备的。在用于口服用途的片剂的情况下，常用的载体包括乳糖和玉米淀粉。通常还添加润滑剂，诸如硬脂酸镁。对于胶囊形式的口服施用，有用的稀释剂包括乳糖和干燥的玉米淀粉。当水性悬浮液被口服施用时，将活性成分与乳化剂和悬浮剂混合。如果需要，可以加入某些甜味剂和/或调味剂和/或着色剂。

[0132] 本公开的药物组合物还可以被配制成用于直肠施用的栓剂的形式。这些组合物可以通过将活性成分与合适的非刺激性赋形剂混合来制备，所述赋形剂在室温下为固体，但在直肠温度下为液体，因此将在直肠中熔化以释放活性成分。此类材料包括但不限于可可

脂、蜂蜡和聚乙二醇。

[0133] 本公开的药物组合物可以通过鼻气雾剂或吸入被施用。此类组合物是根据药物制剂领域众所周知的技术制备的，并且可以使用苯甲醇或其他合适的防腐剂、提高生物利用度的吸收促进剂、碳氟化合物和/或本领域已知的其他增溶剂或分散剂制备成盐水溶液。

[0134] 本文的药物组合物可以是待通过如在WO 2015/153102、WO 2016/183482和WO2018/009838中所示的循环系统施用的形式，其均据此通过引用整体并入。CBS蛋白可能通过由去核造血细胞(EHC)(包括红细胞样细胞或血栓样细胞)表达的重组核酸编码。例如，红细胞样细胞是红血球(red blood cell)、红细胞(erythrocyte)或网织红细胞(reticulocyte)。例如，血栓样细胞是血小板。在某些实施方式中，编码的CBS蛋白与翻译的膜锚定多肽融合。在某些实施方式中，CBS蛋白位于EHC的表面上。CBS蛋白可能被裂解，以用于激活胞外空间中的酶。可替代地，内部定位的CBS蛋白可以通过EHC的裂解被释放到细胞外空间中。可替代地，CBS蛋白的酶促靶可以进入EHC，然后在改变后通过膜离开。在某些实施方式中，在本发明的序列列表中，CBS蛋白具有SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:5的氨基酸序列。

[0135] 取决于施用方式，药物组合物将包含0.05至99％重量(重量百分比)，更具体地0.05至80％重量，还更具体地0.10至70％重量，并且甚至更具体地0.10至50％重量的活性成分，所有重量百分比都基于总组合物。

[0136] 用于选择和制备合适的药物制剂的常规程序描述于，例如，“药剂学-剂型设计的科学(Pharmaceutics-The Science ofDosage Form Design)”，M.E.Aulton，Churchill Livingstone，1988中，其据此通过引用整体并入。在某些实施方式中，药物产品被配制成用于在受试者中暴露约50mU/μL。冻干制剂可以用于在复溶后施用于人类。

[0137] A.冻干

[0138] 药物组合物可以是冻干制剂。在一些实施方式中，冻干制剂包含药物物质、缓冲液和赋形剂。在某些实施方式中，在合适的复溶缓冲液、水或任何其他药学上可接受的佐剂、稀释剂或载体中复溶冻干制剂时，药物物质的浓度在约20-30mg/ml之间。在一些实施方式中，药物物质的浓度为约20mg/ml、约21mg/ml、约22mg/ml、约23mg/ml、约24mg/ml、约25mg/ml、约26mg/ml、约27mg/ml、约28mg/ml、约29mg/ml或约30mg/ml。在一些实施方式中，药物物质的浓度为约25.4mg/ml。在某些实施方式中，在合适的复溶缓冲液、水或任何其他药学上可接受的佐剂、稀释剂或载体中复溶冻干制剂时，缓冲液是浓度为15mM的磷酸钾。在某些实施方式中，赋形剂是浓度为8％(w/v)的海藻糖。在一些实施方式中，制剂包含蔗糖，使得在合适的复溶缓冲液、水或药学上可接受的佐剂、稀释剂或载体中复溶冻干制剂时，蔗糖的浓度为5％。在一些实施方式中，通过冷冻干燥显微镜测定的崩解起始温度(Tc，on)为-21℃。在一些实施方式中，制剂具有7.5的pH。

[0139] 在一些实施方式中，冻干过程可以在48小时或更短时间内进行，而不熔化结晶饼结构。可以优化冻干过程以调节以下参数或性质中的一个或多个，例如但不限于：(i)冻干制剂的缩短的复溶时间(例如，小于1分钟)，(ii)降低的粘度以允许更浓缩的药物产物，(iii)并入等渗缓冲液以使患者的疼痛最小化，和/或(iv)减少的脱PEG化。

[0140] 可以使用以下方案来制备冻干制剂。在制剂制备前三天，将20-30mg/ml或约25mg/ml的药物物质(储存在-80℃)在2-8℃下在冰箱中解冻72小时。在解冻后，通过轻轻搅动使

药物物质均质化。透析在受控的条件下在2-8℃下进行24小时。使用截止值为20-kDa的透析盒,并以每次大于或等于1:50的体积比交换缓冲液三次。在总透析时间3小时和6小时后更换缓冲液。最后一个透析步骤进行过夜。在透析后,从透析盒中回收制剂,并使用0.22-μm聚偏二氟乙烯(PVDF)过滤器过滤。在过滤后,在层流气流条件下,以1.0ml的填充体积填充小瓶。

[0141] 冻干是在Epsilon 2-12D中试规模冷冻干燥机(Martin Christ,德国奥斯特罗德(Osterode,Germany))中进行的。腔室压力由电容计控制,并由真空泵和受控的氮气剂量调节。

[0142] 在将小瓶平衡至5℃后,将小瓶冷冻至-45℃,并在-45℃下平衡另外的5小时。在初次干燥中,将搁板温度设定为-15℃持续31小时。二次干燥在40℃的搁板温度下进行2.5小时。在冻干过程结束时,用氮气将腔室充气至800毫巴,并通过提起搁板来塞住小瓶。在加塞后,用氮气将腔室充气至大气压。

[0143] 在冷冻干燥过程期间,对产品温度、搁板温度、冷凝器温度和腔室压力(电容和皮拉尼计(Pirani gauge))进行监控。产品温度由Pt100传感器(OMEGA™)监控。

[0144] V.疾病、障碍或病症的治疗

[0145] 患有HCU的个体在出生时通常是无症状的,并且除非对他们进行治疗,否则随着时间的推移在这些个体中出现症状,一些早在婴儿期,许多在儿童期,并且由于这是一种谱系疾病,在一些患者中症状仅在成年期出现(参见Yap,2005;Mudd等人.《美国人类遗传学杂志》1985;37:1-31;Morris等人.“胱硫醚β-合酶缺乏症的诊断和管理指南(Guidelines for the diagnosis and management ofcystathionine beta-synthase deficiency)”.《遗传代谢疾病杂志》2017;40:49-74;Mudd等人.在:Scriver CL,BeaudetAL,Sly WS,Valle D编辑,《遗传性疾病的代谢和分子基础(Metabolic and Molecular Basis ofInherited Diseases)》,第7版,纽约:McGraw Hill;2001;1279-1327,其各自据此通过引用整体并入)。通常涉及四个主要器官系统:眼、骨骼和血管系统,以及CNS。也可能涉及其他器官,诸如肝脏、胰腺、胃肠道和皮肤(包括毛囊)(参见Mudd等人.《美国人类遗传学杂志》1985;37:1-31;Morris等人.《遗传代谢疾病杂志》2017;40:49-74;Muacevic-Katanec等人.Coll Antropol2011;35:181-185;Suri等人.《神经科学杂志(JNeurol Sci)》2014;347:305-309,其各自据此通过引用整体并入)。

[0146] 积累的数据表明,Hcy水平的降低可以作为酶疗法(ET)在HCU中成功应用的指标。它与NIH-FDA生物标记物工作组的(参见FDA-NIH生物标记物工作组.BEST(生物标记物、终点S和其他工具(Biomarkers,EndpointS,and other Tools))资源[互联网].马里兰州银泉市:美国食品药品监督管理局(Food and DrugAdministration(US));2016-.合理可能的替代终点(Reasonably Likely Surrogate Endpoint).2017年9月25日,由美国国立卫生研究院(US)、贝塞斯达(马里兰州)共同出版.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK326791/,其据此通过引用整体并入)的“药效学/应答生物标记物,其水平响应于暴露于医疗产品而变化……”的定义一致,并且甚至更进一步地在HCU的ET的情况下,标记物与药物作用机制密切相关。因此,血液或血浆Hcy不仅是药效学研究的有用标记物,而且之前已经被认为是高胱氨酸尿症(HCU)的“合理可能的替代终点”。

[0147] 在患有HCU的婴儿和儿童中,优先事项是预防与HCU相关的并发症并确保正常智力

的适当生长和发育(参见Morris等人.《遗传代谢疾病杂志》2017;40:49-74,其据此通过引用整体并入)。在生命后期诊断的患者中,治疗的目的应是预防危及生命的血栓栓塞,并使已确定的并发症的进展最小化。为了实现这些目标,必须改善与HCU相关的生化异常,如有可能,还应使其正常化(参见Morris等人.《遗传代谢疾病杂志》2017;40:49-74,其据此通过引用整体并入)。

[0148] 根据2016《HCU诊断和管理指南》,应尽可能将Hcy水平维持接近正常值。在给予可用治疗的患有HCU的患者中,这通常是不可能的,并且因此表明理想目标在具有吡哆醇应答性HCU的患者中低于50μmol/L,并且在非吡哆醇应答性患者中低于100μmol/L(参见Morris等人.《遗传代谢疾病杂志》2017;40:49-74,其据此通过引用整体并入)。如前所述,非吡哆醇应答性患者倾向于具有比吡哆醇应答性患者较高的Hcy水平。尽管建议对患有同一疾病的患者设定两个目标,但这些目标被设计成是可实现的而非优化的,以便最小化并发症。

[0149] 总体而言,管理HCU所需的长期治疗的有效性(尤其是因为它们最经常依赖于饮食限制和补充)会受到差的或不一致的终生依从性影响。HCU的ET将避免许多这样的陷阱。通过一种不需要严格Met限制或Cys补充的机制来补偿HCU的代谢缺陷,ET将有望实现更一致的Hcy降低,同时不会危险地升高Met水平,并且还允许饮食的放松或正常化。

[0150] 目前没有纠正该病症的潜在遗传原因的HCU的治愈,但普遍接受的治疗目标是尽可能降低tHcy水平(参见Morris等人.《遗传代谢疾病杂志》.2017年1月;40(1):49-74,其据此通过引用整体并入)。因此,目前的治疗旨在纠正生化异常,从而降低疾病的不良临床表现的风险。通过目前对于患有HCU的患者可用的治疗很少能使Hcy水平完全正常化。

[0151] 需要策略的组合以在大多数患者中实现治疗目标。这些治疗策略包括:1)通过向吡哆醇敏感的患者施用药物剂量的吡哆醇(维生素B6,一种CBS的辅助因子,与叶酸一起)来增加残余的CBS活性(参见Yap等人.《动脉硬化血栓血管生物学》2001年12月;21(12):2080-5,其据此通过引用整体并入);2)通过严格的饮食/蛋白质限制来降低甲硫氨酸负荷,同时用代谢阻滞以外的产物补充饮食,以及3)增强替代代谢途径以对抗CBS缺乏症的影响,例如,施用甜菜碱(甲基供体)以增强Hcy向Met的再甲基化。在某些实施方式中,提供叶酸补充剂和(如果需要的话)维生素B12补充剂(参见Morris等人.《遗传代谢疾病杂志》2017年1月;40(1):49-74,其据此通过引用整体并入)。

[0152] A.HCU的当前疗法

[0153] 在一些实施方式中,患有HCU的患者应接受足够的叶酸补充剂和(如果需要的话)维生素B_{12}补充剂(参见Morris等人.《遗传代谢疾病杂志》2017;40:49-74,其据此通过引用整体并入)。此外,患者应用吡哆醇疗法(如有应答)、Met限制的、Cys补充的饮食和/或甜菜碱疗法治疗。需要策略的组合以在大多数患者中实现治疗目标。

[0154] 最常见的处方治疗是饮食和甜菜碱的组合,其次是单独的甜菜碱和单独的饮食(参见Adam等人.《分子遗传学和代谢》2013;110:454-459,其据此通过引用整体并入)。随着患者年龄增长至大于16岁,考虑到成年患者对Met限制饮食的较差依从性,他们最经常被开具仅在无饮食情况下的甜菜碱处方。然而,成人中对甜菜碱的依从性也很差。蛋白质摄入量中位值在患者之间差异很大,并随着年龄的增长而显著增加。

[0155] 与这些发现一致,最近的报告指出,在24名患者中,只有4名成年患者在这种治疗后,被开具了低蛋白饮食和特定的HCU适宜的氨基酸补充(参见Lorenzini等人.《遗传代谢

疾病杂志》.2017年10月4日,其据此通过引用整体并入)。多名HCU专家已经描述了美国类似的广泛可变性(孤儿技术科学咨询委员会(Orphan Technology Scientific Advice Board),由美国HCU专家的医师组成)。一项比较来自未治疗的患者相对于治疗的患者(分别为25和93名患者)的tHcy值的研究得出结论,在这两组之间没有显著差异(tHcy范围分别为15.7至281.4和4.8至312μmol/l;中位值分别为125.0和119.0μmol/L),尽管该研究未提供关于患者的治疗方案的详情(参见Stabler等人.《JIMD报告》2013;11:149-163,其据此通过引用整体并入)。这些结果表明了以下结论的全部或组合:患者要么具有异质性疾病表现,标准治疗无效,和/或治疗的依从性差。

[0156] 1.吡哆醇

[0157] 在诊断后,测试患者对吡哆醇(CBS的一种辅因子)的应答性。吡哆醇(维生素B6)按药物剂量施用会增加已经显示对吡哆醇应答的个体中CBS的残余活性。吡哆醇应答性的定义因位点与位点而异,尽管作为欧洲高胱氨酸尿症和甲基化缺陷网络和登记处(European network and registry for homocystinuria and methylation defects)(EHOD)的一部分编写的2016年指南将吡哆醇应答性定义为在吡哆醇暴露的6周内tHcy水平降低20%。tHcy水平严重升高的患者和tHcy水平轻度或中度升高的患者均可以被定义为具有应答性,尽管表现出非常不同的tHcy水平。此外,不同的治疗中心对吡哆醇应答性的定义不同,因此根据tHcy水平而不是根据其吡哆醇应答性对患者进行分类更合适且更严格。一般而言,对吡哆醇具有应答性的患者具有一些残余的CBS活性,因此具有较低的tHcy水平,导致较不严重的症状。

[0158] 通常认为吡哆醇对患有HCU的患者是安全的(参见Yap;《孤儿百科全书》[在线丛书].2005,第1-13页,其据此通过引用整体并入)。其最常报告的不良作用包括在用定义为大于900mg/天的高剂量治疗的患者中的周围神经病变(参见Schaumburg等人.《新英格兰医学杂志》1983;309:445-448;Ludolph等人.《欧洲儿科杂志(Eur J Pediatr)》1993;152:271;它们据此通过引用整体并入)、在接受500mg/天的剂量的吡哆醇的新生儿中的呼吸暂停和无应答(Mudd等人.《美国人类遗传学杂志》1985;37:1-31,其据此通过引用整体并入)和横纹肌溶解症(参见Shoji等人.《遗传代谢疾病杂志》1998;21:439-440,其据此通过引用整体并入)。

[0159] 虽然吡哆醇治疗被广泛使用,但它提供tHcy水平的适度降低,并且单独使用吡哆醇时大多数被定义为具有应答性的患者不能显著降低(更不用说使其正常化)tHcy水平,因为它们的起始水平比正常水平高许多倍(参见Morris等人.《遗传代谢疾病杂志》2017年1月;40(1):49-74,其据此通过引用整体并入)。除了长期的吡哆醇治疗外,建议对吡哆醇具有应答性的患者(HCU患者)也接受叶酸,并根据需要接受维生素B12补充。

[0160] 2.饮食限制

[0161] 以前已经建议对所有患有HCU的患者实行终身饮食限制(参见Morris等人.《遗传代谢疾病杂志》.2017年1月;40(1):49-74;Walter等人.《欧洲儿科杂志》.1998年4月;157补刊2:S71-6;它们据此通过引用整体并入)。推荐的饮食极其有限,并且旨在通过限制蛋白质含量来减少Met的摄入量。

[0162] 目前对HCU患者的疗法主要是终生低蛋白饮食,包括每天少至5g的天然蛋白质(www.hcunetworkamerica.org),其补充有不含Met的L-氨基酸,并且在许多情况下,给与额

外的Cys(Yap等人.《遗传代谢疾病杂志》1998;21:738-47;Morris等人.《遗传代谢疾病杂志》.2017年1月;40(1):49-74;其据此通过引用整体并入)以用于补充饮食。严格受限的饮食由低甲硫氨酸谷类食品、低甲硫氨酸水果和蔬菜、低甲硫氨酸医用食品、油和糖组成。应避免诸如肉、鸡、鱼、蛋、牛奶、酸奶、奶酪、大豆制品、坚果、豆类和许多含有适量Met的水果和蔬菜的食物。由于天然CBS是Met代谢中的关键酶,摄入Met(在许多食物中发现的一种必需氨基酸)会导致升高的tHcy血浆浓度以及降低的下游代谢产物Cth和Cys浓度。

[0163] 预制食品、烘焙食品和包装食品必须受到严格限制,因为它们通常含有奶、蛋或面粉。每个HCU病患者所需和耐受的蛋白质的量不同,并且可能随时间变化。根据在频繁血液测试中监测到的tHcy水平(高胱氨酸尿症的ASIEM低蛋白手册(ASIEM Low Protein Handbook for Homocystinuria))来调整该量。接受饮食治疗的大多数患者还需要每日消耗适口性差、不含Met的合成氨基酸配方,以防止继发性营养不良,和确保儿童的正常生长以及成人的适当的营养(参见Morris等人.《遗传代谢疾病杂志》.2017年1月;40(1):49-74;其据此通过引用整体并入)。

[0164] 虽然饮食调整联合维生素补充可以在一定程度上降低完全遵守高度限制性饮食的个体中的tHcy水平,但大多数HCU患者的tHcy水平仍比正常水平高出几倍至几个数量级。对于大多数个体来说,要实现对饮食调整的完全终生依从性是非常具有挑战性的,并且由此产生的不良代谢控制的时期会产生累积的有害影响(参见Morris等人.《遗传代谢疾病杂志》).2017年1月;40(1):49-74;其据此通过引用整体并入)。饮食的依从性通常较差,并且通常在青春期和成年期间进一步恶化(参见Walter等人.《欧洲儿科杂志》1998年4月;157补刊2:S71-6;Schiff等人.《神经儿科(Neuropediatrics)》.2012年12月;43(6):295-304;Garland等人.《儿科儿童健康(Paediatr ChildHealth)》.1999年11月;4(8):557-62;它们据此通过引用整体并入)。此外,食用高Met食物不会引起立即的负面身体反应,进一步加重了饮食依从性的困难(www.hcunetworkamerica.org)。Met限制在儿童中甚至更具挑战性,因为需要确保足够的Met以促进生长和发育。大多数接受饮食治疗的患者还需要富含Cys、不含Met的L-氨基酸补充剂,以确保儿童的正常生长和和成人的适当营养(参见Morris等人.《遗传代谢疾病杂志》2017;40:49-74,其据此通过引用整体并入)。

[0165] 最近的报告指出,在24名患者中,只有4名成年患者在这种治疗后,被开具了低蛋白饮食和特定的HCU适宜的氨基酸补充(参见Lorenzini等人.《遗传代谢疾病杂志》.(2018)41:109-115,其据此通过引用整体并入)。多名HCU专家已经描述了美国类似的广泛可变性。

[0166] 3.甜菜碱补充

[0167] 与主要基于饮食的疗法相关的问题需要其他降低Hcy的方法,最显著的是每天至少两次施用甜菜碱(N,N,N-三甲基甘氨酸,以CYSTADANE™销售)的补充。甜菜碱很少作为单一疗法起作用(Sakamoto等人.《国际儿科》2003;45:333-338,其据此通过引用整体并入),并且通常用作吡哆醇和/或Met受限饮食的佐剂(参见Morris等人.《遗传代谢疾病杂志》.2017年1月;40(1):49-74;其据此通过引用整体并入)。

[0168] 甜菜碱不解决潜在的CBS缺乏症,而是诱导替代途径,导致Hcy再甲基化回Met,并通过纠正CBS突变体的部分错折叠(参见Kopecka等人.《遗传代谢疾病杂志》2011;34:39-48,其据此通过引用整体并入)。在存在甜菜碱的情况下,酶甜菜碱同型半胱氨酸甲基转移酶(BHMT)将Hcy再甲基化为Met(Singh等人.《医学遗传学(Genet Med)》2004;6:90-95,其据

此通过引用整体并入),从而部分降低Hcy水平,同时增加已经高度升高的Met水平。通过甜菜碱施用并不能改善CBS下游的代谢产物,并且可能需要Cys补充。此外,在患有急性脑水肿的患者中(Devlin等人.《儿科学杂志》2004,144:545-548;Yaghmai等人.《美国医学遗传学杂志》2002;108:57-63;其据此通过引用整体并入)和没有急性脑水肿的患者中(Vatanavicharn等人.《遗传代谢疾病杂志》2008;31补刊3:477-481;Brenton等人.《儿童神经病学杂志(J ChildNeurol)》2014;29:88-92;Sasai等人.《东北实验医学杂志(Tohoku J Exp Med)》2015;237:323-327;其据此通过引用整体并入),甜菜碱治疗与脑白质异常有关,脑白质异常是大脑血管损伤的体征(Prins等人.《自然综述神经病学(Nat RevNeurol)》2015;11:157-165,其据此通过引用整体并入)。尽管已知甜菜碱治疗会加剧甲硫氨酸积累,但Schwann等人已经表明甲硫氨酸是引起脑水肿的主要药剂(参见Schwann,Bernd C等人.《JIMD报告》52.1(2020):3-10,其据此通过引用整体并入)。

[0169] 甜菜碱可能不可口(Walter等人.《欧洲儿科杂志》1998年4月;157补刊2:S71-6,其据此通过引用整体并入),并导致令人不快的鱼腥味和/或呼吸(参见Manning等人.《JIMD报告》2012;5:71-75,其据此通过引用整体并入)。由于需要高剂量(在成人和儿科患者中大于6g/天),这两种影响都可能加重。因此,依从性通常较差(参见Adam等人.《分子遗传学和代谢》2013年12月;110(4):454-9;Walter等人.《欧洲儿科杂志》.1998年4月;157补刊2:S71-6;Sakamoto等人.《国际儿科》2003;45:333-338;它们据此通过引用整体并入)。

[0170] 甜菜碱的药物制剂CYSTADANE™在2006年获得FDA批准,并且用于降低高胱氨酸尿症障碍(包括CBS缺乏症、5,10-亚甲基四氢叶酸还原酶(MTHFR)缺乏症和钴胺素辅因子代谢(cbl)缺乏症)中的血液Hcy升高(参见Recordati.CYSTADANE™产品信息(PI).2017.参考类型:在线来源,其据此通过引用整体并入)。

[0171] 迄今为止对HCU吡哆醇无应答患者的饮食习惯进行的最大调查表明,甜菜碱是一种常见的治疗选择,特别是在晚期诊断患者、青少年和成人中。在34%的非饮食患者中使用甜菜碱作为主要疗法被认为是由于缺乏对饮食的依从性,因为没有对照研究检查在非饮食的情况下给予时甜菜碱的长期有效性(参见Adam等人.《分子遗传学和代谢》,2013;110:454-459,其据此通过引用整体并入)。实际上,在HCU小鼠模型中的研究发现,甜菜碱治疗显著降低tHcy的能力随着时间的推移而降低(参见Maclean KN.“甜菜碱治疗胱硫醚b-合酶缺陷型高胱氨酸尿症:它有效并且可以改进吗?(Betaine treatment of cystathionine b-synthase-deficient homocystinuria;does it work and can itbe improved?)”Dove出版社(Dove press)2012;2:23-33,其据此通过引用整体并入)。

[0172] 4.抗血小板疗法

[0173] 除了降低Hcy的疗法之外,具有不良的受控Hcy水平的患者和/或具有额外血栓形成的风险因素的患者(例如莱顿第五因子(FactorV Leiden)、既往血栓形成和妊娠),也可以从用抗血小板药剂(例如阿司匹林(aspirin)、双嘧达莫(dipyridamole)或氯吡格雷(clopidogrel))的治疗中获益(参见Morris等人.《遗传代谢疾病杂志》2017年1月;40(1):49-74;其据此通过引用整体并入)。COUMADIN™血液稀释剂也可以用于患有既往静脉血栓形成的患者。然而,抗凝剂与脑出血的增加的风险相关,并且应基于个体患者确定其使用(参见Morris等人.《遗传代谢疾病杂志》.2017年1月;40(1):49-74;其据此通过引用整体并入)。

[0174] 5.当前疗法的临床结果

[0175] HCU的表现不断发展,其中典型的临床症状达到不同程度的残疾,并且对受影响的个体的生活质量产生影响。无论个体的发病年龄,任何年龄的生化控制的丧失均与可能危及生命的严重并发症的发展有关(参见Walter等人.《欧洲儿科杂志》1998年4月;157补刊2:S71-6,其据此通过引用整体并入)。

[0176] 治疗必须终生持续,因为不良代谢控制的时期具有累积性有害作用,其可以导致严重并发症和过早死亡(参见Morris等人.《遗传代谢疾病杂志》.2017年1月;40(1):49-74,其据此通过引用整体并入)。

[0177] 在未治疗的情况下,吡哆醇无应答的HCU的预后较差,并且患者的预期寿命显著缩短。自1962年首次描述疾病以来,尚未进行HCU的饮食或其他疗法的随机对照试验(参见Carson等人.《儿童-胎儿疾病档案(Arch Dis Child)》1969年6月;44(235):387-92;Gerritsen等人.《生化和生物物理研究通讯(Biochem Biophys Res Commun.)》.1962年12月19日;9:493-6;它们据此通过引用整体并入)。然而,已经发表了几项观察性研究。

[0178] 一项记录了629例未治疗的CBS患者的自然史的国际研究表明,并发症的风险随着年龄的增加而增加(参见Mudd等人.《美国人类遗传学杂志》1985;37:1-31,其据此通过引用整体并入)。观察到治疗(吡哆醇、Met受限饮食)降低了血浆tHcy水平,并且显著地降低了血栓栓塞事件和晶状体脱位的风险,尽管观察到对受限饮食的依从性较差。

[0179] Yap等人.《动脉硬化血栓血管生物学》2001年12月;21(12):2080-5)在158名治疗的患者中进行了一项国际多中心研究。当与来自Mudd等人.《美国人类遗传学杂志》1985;37:1-31,其据此通过引用整体并入)的历史对照数据相比时,在这一治疗组中,心血管事件的发生率显著降低。这种明显的益处与治疗的患者的tHcy血浆水平降低(但未恢复正常)相关。应当注意,始终如一地遵守所需的方案是非常困难的。

[0180] 总体而言,虽然几种HCU治疗策略是可用的,但它们无法使大多数患者恢复至接近正常的tHcy水平。此外,它们的长期有效性受制于较差的或不一致的终身依从性。因此,在HCU患者中难以保持持续的Hcy降低。用本文所述的药物产品的治疗旨在避免许多此类陷阱。通过经由一种不需要严格Met限制或Cys补充的机制来补偿HCU的代谢缺陷,酶疗法(ET)疗法有望实现更一致的Hcy降低,同时不会危险地升高Met水平。

[0181] B.改善认知功能的方法

[0182] 本专利申请涉及改善具有或疑似具有高胱氨酸尿症的受试者的认知功能的方法。所述方法可以包含向受试者施用治疗有效量的药物制剂,所述药物制剂包含:包含分离的胱硫醚β-合酶(CBS)蛋白(SEQ ID NO:1)的药物物质;与CBS蛋白共价结合的PEG分子;以及药学上可接受的赋形剂、稀释剂或佐剂。在一些方面中,将包含施用包含如本文所述的htCBS C15S蛋白的药物制剂的酶疗法与一种或多种认知或行为干预相结合,可以在具有或疑似具有高胱氨酸尿症的受试者中提供认知功能或行为的进一步改善。在一些实施方式中,神经行为或认知治疗或干预包括类似于针对其他执行功能问题(诸如ADHD)的支持,包括例如行为疗法,例如父母行为训练(BPT)和行为课堂管理(BCM)(参见例如Pelham Jr,William E.和Gregory A.Fabiano.“注意力缺陷/多动症的循证心理社会治疗(Evidence-based psychosocial treatments for attention-deficit/hyperactivity disorder)”.《临床儿童和青少年心理学杂志(Journal of Clinical Child&Adolescent Psychology)》

37.1(2008):184-214;和Pfiffner,Linda J.和Lauren M.Haack.“患有ADHD的学龄儿童的行为管理(Behavior management for school-aged children withADHD)”.《儿童和青少年精神病诊所(Child andAdolescent Psychiatric Clinics)》23.4(2014):731-746,其各自内容通过引用整体并入本文)。因此,本公开提供了组合疗法,涉及如本文所述的酶疗法与神经行为或认知疗法的组合,以进一步改善具有或疑似具有高胱氨酸尿症的受试者的认知功能。与单独的酶疗法或神经行为/认知疗法相比,预计此类联合疗法将更有效地改善患者的认知功能,包括儿科受试者的认知发育。

[0183] 用于改善认知功能的方法的药物制剂可以包含施用作为PEG分子的ME-200GS。药物制剂可以包含浓度为约25.4mg/ml的药物物质,任选地在5%蔗糖中,约15mM的磷酸钾;和约8%(w/v)的海藻糖。药物制剂可以被冻干。

[0184] C.基于代谢指标的治疗方法

[0185] 本文还描述了治疗具有或疑似具有高胱氨酸尿症的受试者的方法,所述方法包含:测量受试者中的肌酐、高敏感性C-反应蛋白、纤维蛋白原或蛋白C活性中的一种或多种的水平;将所述一种或多种水平与已知不具有高胱氨酸尿症的受试者的群体或已知具有高胱氨酸尿症的受试者的群体或两者中的所述一种或多种水平的已知值的范围进行比较;根据在所述受试者中测量的所述一种或多种水平评估所述受试者中的疾病进展或疾病严重程度;根据所述疾病进展或疾病严重程度调节所述受试者的酶疗法的剂量;以及向受试者施用酶疗法。在这些方法中,施用酶疗法包含施用包含分离的胱硫醚β-合酶(CBS)蛋白的药物物质,所述分离的胱硫醚β-合酶(CBS)蛋白包含SEQ ID NO:1或由SEQ ID NO:1组成,其中CBS蛋白具有与CBS蛋白共价结合的PEG分子。

[0186] 在本文所述的方法中,可以使用≥600μM的甲硫氨酸水平以基于儿科和成年HCU受试者对甲硫氨酸受限饮食和/或甜菜碱和/或维生素补充剂的应答来鉴定和分层受试者。在一些实施方式中,可以使用>1000μM的甲硫氨酸水平以基于儿科和成年HCU受试者对甲硫氨酸受限饮食和/或甜菜碱和/或维生素补充的应答来鉴定和分层受试者。

[0187] 可以使用高于正常上限(ULN)的二甲基甘氨酸(DMG)水平,以基于儿科和成年HCU受试者对甜菜碱的应答来鉴定和分层受试者。可以使用低于正常下限(LLN)的肌酐水平,以根据本文所述的方法来鉴定和分层可以受益于酶疗法的受试者。在一些实施方式中,可以使用高于ULN的高敏感性C-反应蛋白(hsCRP)水平,以据本文所述的方法来鉴定和分层可以受益于酶疗法的受试者。在一些实施方式中,可以使用低蛋白C活性水平和/或低纤维蛋白原水平,以根据本文所述的方法来鉴定和分层可以受益于酶疗法的受试者。

[0188] 本文所述的方法可以进一步包含对受试者中的CBS基因进行分子遗传测试,其中CBS基因中突变的鉴定指示疾病严重程度的水平或确认高胱氨酸尿症的诊断。在表3中提供了CBS基因突变的非限制性实施例。

[0189] D.改善骨骼脆性的方法

[0190] 在一些实施方式中,本申请涉及降低具有或疑似具有高胱氨酸尿症的受试者的骨骼脆性的方法。所述方法可以包含向受试者施用治疗有效量的药物制剂,所述药物制剂包含:包含分离的胱硫醚β-合酶(CBS)蛋白(SEQ ID NO:1)的药物物质;与CBS蛋白共价结合的PEG分子;以及药学上可接受的赋形剂、稀释剂或佐剂。

[0191] 用于改善骨骼脆性的方法的药物制剂可以包含ME-200GS作为PEG分子。所述药物

制剂可以包含以约25.4mg/ml的浓度施用所述药物物质,任选地在5%蔗糖中,约15mM的磷酸钾;和约8%(w/v)的海藻糖。药物制剂可以被冻干。

[0192] E.改善心血管症状的方法

[0193] 在一些实施方式中,本申请涉及改善具有或疑似具有高胱氨酸尿症的受试者的如本文所述的心血管症状和血管并发症的方法(参见van Meurs等人.《新英格兰医学杂志》2004;350:2033-2041;Hankey等人.《柳叶刀(Lancet)》,1999;354:407-413;两者均据此通过引用整体并入)。所述方法可以包含向受试者施用治疗有效量的药物制剂,所述药物制剂包含:包含分离的胱硫醚β-合酶(CBS)蛋白(SEQ ID NO:1)的药物物质;与CBS蛋白共价结合的PEG分子;以及药学上可接受的赋形剂、稀释剂或佐剂。

[0194] 用于改善心血管症状和血管并发症的方法的药物制剂可以包含ME-200GS作为PEG分子。所述药物制剂可以包含以约25.4mg/ml的浓度施用所述药物物质,任选地在5%蔗糖中,约15mM的磷酸钾;和约8%(w/v)的海藻糖。药物制剂可以被冻干。

[0195] F.治疗非遗传定义的患者群体中升高的tHcy水平的方法

[0196] 本文所述的方法包含治疗具有升高的tHcy水平的非遗传定义的患者群体。术语“非遗传定义的患者”或“非遗传定义的受试者”是指一个或多个未被或没有被诊断为具有胱硫醚β-合酶的遗传定义的缺陷(例如,在一个或多个CBS基因等位基因中没有错义或功能丧失突变)的个体。

[0197] 具有升高的tHcy水平的非遗传定义的受试者可能表现出或具有增加的发展骨骼异常的风险,诸如骨折的增加的患病率、降低的骨矿物质密度和/或骨质疏松(参见,例如,Filip,Alexandru等人.“同型半胱氨酸与脆性骨折之间的关系-系统综述(The Relationship between Homocysteine and Fragility Fractures-A Systematic Review)”.《生物学年度研究与评论(Annual Research&Review in Biology)》(2017):1-8;van Meurs等人.《新英格兰医学杂志》2004;350:2033-2041;其各自通过引用整体并入本文)。因此,本文所述的方法的一些实施方式通过向受试者施用本文所述的药物组合物或药物制剂来提供与升高的tHcy水平相关的骨骼症状的治疗或缓解。在一些实施方式中,将所述药物组合物或药物制剂施用于具有升高的tHcy水平的非遗传定义的受试者降低了受试者中的tHcy水平。在一些实施方式中,将所述药物组合物或药物制剂施用于具有升高的tHcy水平的非遗传定义的受试者减轻了与受试者中升高的tHcy水平相关的骨骼症状,包括骨折、骨矿物质密度降低和/或骨质疏松的风险。

[0198] 具有升高的tHcy水平的非遗传定义的受试者可能表现出或具有增加的发展认知症状或认知异常的风险,例如增加的认知下降、痴呆和/或阿尔茨海默病的患病率(参见,例如,Smith,A.David等人.“同型半胱氨酸和痴呆:国际共识声明”.《阿尔茨海默病杂志》62.2(2018):561-570;Smith,A.David和Helga Refsum.“同型半胱氨酸、B族维生素和认知障碍(Homocysteine,B vitamins,and cognitive impairment)”.《营养年度回顾(Annual review ofnutrition)》36(2016):211-239;Setién-Suero,Esther等人:“同型半胱氨酸与认知:111项研究的系统评价(Homocysteine and cognition:a systematic review of 111studies)”.《神经科学与生物行为评论(Neuroscience&Biobehavioral Reviews)》69(2016):280-298;其各自通过引用整体并入本文)。因此,本文所述方法的一些实施方式通过向受试者施用本文所述的药物组合物或药物制剂来提供与升高的tHcy水平相关的认知

症状的治疗或缓解。在一些实施方式中，本文所述的方法提供治疗或避免或减缓与升高的tHcy水平相关的神经变性障碍的进展，包括阿尔茨海默病(参见Farina,Nicolas等人.“在阿尔茨海默病的认知进展中的同型半胱氨酸浓度(Homocysteine concentrations in the cognitive progression ofAlzheimer'sdisease)”.《实验性老年学(Experimental Gerontology)》99(2017):146-150，其公开内容通过引用整体并入本文)。在一些实施方式中，将所述药物组合物或药物制剂施用于具有升高的tHcy水平的非遗传定义的受试者降低了受试者中的tHcy水平。在一些实施方式中，将所述药物组合物或药物制剂施用于具有升高的tHcy水平的非遗传定义的受试者减轻了受试者中与升高的tHcy水平相关的认知症状，包括认知下降、痴呆或阿尔茨海默病。

[0199] 具有升高的水平的非遗传定义的受试者可能表现出或具有增加的发展血管疾病的风险(参见，例如，Kang,Soo-Sang和Robert S.Rosenson.“用于治疗高同型半胱氨酸血症的分析方法及其对血管疾病的影响(Analytic approaches for the treatment of hyperhomocysteinemia and its impact on vascular disease)”.《心血管药物和疗法(Cardiovascular drugs andtherapy)》32.2(2018):233-240，其内容通过引用整体并入本文)。因此，本文所述方法的一些实施方式提供了血管疾病的治疗、减轻或避免。

[0200] 具有升高的tHcy水平的非遗传定义的受试者可能表现出或具有增加的发展中风的风险(参见，例如，Spence,J.David.“降低同型半胱氨酸水平以用于中风预防:揭示证据的复杂性(Homocysteine lowering for stroke prevention:unravelling the complexity of the evidence)”.《国际中风杂志(International Journal ofStroke)》11.7(2016):744-747，其内容通过引用整体并入本文)。因此，本文所述方法的一些实施方式提供了中风的治疗、缓解或避免。

[0201] 具有升高的tHcy水平的非遗传定义的受试者可能表现出或具有增加的发展眼部疾病的风险(参见，例如，Ajith,ThekkuttuparambilAnanthanarayanan.“眼部疾病中的同型半胱氨酸(Homocysteine in ocular diseases)”.《临床化学学报》450(2015):316-321，其内容通过引用整体并入本文)。因此，本文所述方法的一些实施方式提供了眼部疾病的治疗、缓解或避免。

[0202] 升高的tHcy水平可能影响多种代谢和生理系统。因此，非遗传定义的受试者可能表现出或具有增加的发展各种表型结果的风险，包括骨骼症状、认知症状、眼部症状、心血管症状和生殖症状以及其他症状。

[0203] 例如，具有升高的tHcy水平的非遗传定义的受试者可能表现出或具有增加的流产的风险(参见Cavallé-Busquets,Pere等人.“中度升高的早期妊娠空腹血浆总同型半胱氨酸与流产的增加的可能性有关.Reus-Tarragona出生队列研究(Moderately elevated first trimester fasting plasma total homocysteine is associated with increased probability of miscarriage.The Reus-Tarragona Birth Cohort Study)”.《生物化学(Biochimie)》(2020)，其公开内容整体并入本文)。因此，本文所述的方法提供了在具有中度升高的早期妊娠tHcy水平的妇女中避免流产。

[0204] 具有升高的tHcy水平的非遗传定义的受试者，包括儿童和青少年，可能表现出或具有增加的焦虑和抑郁症的风险(参见Folstein,Marshal等人.“抑郁症的同型半胱氨酸假说(The homocysteine hypothesis of depression)”.《美国精神病学杂志(American

Journal of Psychiatry)》164.6(2007):861-867;Chung,Kuo-Hsuan,Hung-Yi Chiou和Yi-Hua Chen.“血清同型半胱氨酸水平与台湾儿童及青少年的焦虑与抑郁症的关系(Associations between serum homocysteine levels and anxiety and depression among children and adolescents in Taiwan)”.《科学报告(Scientific reports)》7.1(2017):1-7;还参见Mech,ArnoldW.和Andrew Farah.“在对MTHFR C677T或A1298C多态性呈阳性的MDD的患者中,在用减少的B族维生素的疗法期间,临床应答与同型半胱氨酸减少的相关性:一项随机的、双盲的、安慰剂对照研究(Correlation of clinical response with homocysteine reduction during therapy with reduced B vitamins in patients with MDD who are positive for MTHFR C677T or A1298Cpolymorphism:a randomized,double-blind,placebo-controlled study)”《临床精神病学杂志》77.5(2016):668-671;其公开内容整体并入本文)。因此,本文所述的方法提供了在具有升高的早期妊娠tHcy水平的儿童和青少年中避免焦虑或抑郁症。

[0205] 具有升高的tHcy水平的非遗传定义的受试者可能表现出或具有增加的肾脏并发症和/或心血管疾病及相关病症(包括缺血性心脏病和中风)的风险(参见van Guldener,Coen.“为什么同型半胱氨酸在肾衰竭时会升高?以及降低同型半胱氨酸可以预期什么?(Why is homocysteine elevated in renal failure and what can be expected from homocysteine-lowering?)”.《肾病透析移植(Nephrology Dialysis Transplantation)》21.5(2006):1161-1166;Clarke,Robert,Sarah Lewington和Martin Landray.“同型半胱氨酸、肾功能和心血管疾病的风险(Homocysteine,renal function,and risk of cardiovascular disease)”.《肾脏国际(Kidney international)》63(2003):S131-S133;Yang,Hui-Fang等人.“血清同型半胱氨酸能解释性频率与心血管风险之间的联系吗?(Does serum homocysteine explain the connectionbetween sexual frequency and cardiovascular risk?)”《性医学杂志(The Journal ofSexual Medicine)》14.7(2017):910-917;其公开内容整体并入本文)。因此,本文所述的方法提供了在具有升高的tHcy水平的受试者中治疗或避免肾脏并发症,包括例如肾衰竭和慢性肾病以及心血管疾病。

[0206] VI.给药和施用

[0207] 在某些实施方式中,药物产品可以通过皮下(SC)、静脉内(IV)或腹膜内(IP)注射被施用于受试者。在一个实施方式中,药物产品可以被施用于受试者1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20次。在另一个实施方式中,药物产品被施用超过20次。在另一个实施方式中,药物产品被施用超过100次。可替代地,可以在受试者的剩余生存期内施用该药物产品。

[0208] 在某些实施方式中,可以每隔12小时、13小时、14小时、15小时、16小时、17小时、18小时、19小时、20小时、21小时、22小时、23小时、每天、2天、3天、4天、5天、6天、一周、两周、三周和一个月重复施用药物产品。在某些实施方式中,药物产品的施用每3天进行一次、每2天进行一次或每天进行一次。

[0209] 在某些实施方式中,药物产品的施用可以是相隔数分钟、数小时、数天或数周的一系列剂量。例如,系列中的剂量的数目可以是1、2、3、4、5或6。作为非限制性实施例,受试者间隔24小时被施用3个剂量。作为另一个非限制性实施例,受试者间隔12小时被施用5个剂量。受试者可以是人类。

[0210] 在某些实施方式中，药物产品的施用可以遵循在第一系列剂量与第二系列剂量之间具有间隙的一系列剂量的给药方案。剂量之间的间隔可以是2小时、3小时、4小时、5小时、6小时、7小时、8小时、9小时、10小时、11小时、12小时、13小时、14小时、15小时、16小时、17小时、18小时、19小时、20小时、21小时、22小时、23小时、1天、2天、3天、4天、5天、6天、1周、2周、3周、每月、2个月、3个月、4个月、5个月、6个月、7个月、8个月、9个月、10个月、11个月、12个月、13个月、14个月、15个月、16个月、17个月或18个月。系列中的剂量的数目可以是2、3、4、5或6。作为非限制性实施例，受试者可以间隔12小时施用第一系列的5个剂量，然后在第一剂量14天后，受试者间隔12小时被施用第二系列的5个剂量。作为另一个非限制性实施例，在8周的时间内向受试者施用两个系列的剂量，其中第一系列是一个剂量，每周两次，持续2周，并且第二系列的剂量是每周三次，持续6周。

[0211] 在某些实施方式中，药物产品可以在受试者已经被施用甜菜碱之后施用至少一次。甜菜碱施用与药物产品施用之间的时间可以是1小时、2小时、3小时、4小时、5小时、6小时、7小时、8小时、9小时、10小时、11小时、12小时、13小时、14小时、15小时、16小时、17小时、18小时、19小时、20小时、21小时、22小时、23小时、1天、2天、3天、4天、5天、6天、1周、2周、3周、每月、2个月、每季度、4个月、5个月、6个月、7个月、8个月、9个月、10个月、11个月、12个月、13个月、14个月、15个月、16个月、17个月或18个月。作为非限制性实施例，药物产品可以在受试者被施用甜菜碱后14天施用。作为另一个非限制性实施例，在受试者被施用甜菜碱之后，受试者可以被施用药物产品两个剂量。作为另一个非限制性实施例，药物产品可以在甜菜碱施用后14或15天被施用。

[0212] 在某些实施方式中，药物产品可以与甜菜碱联合被施用于受试者。在一些实施方式中，甜菜碱施用涉及非处方药补充剂(over the counter supplement)的自我施用。在一些实施方式中，开具甜菜碱施用，例如作为半胱氨酸。甜菜碱施用可以包括各种补充剂或药物产品，并且可以包括甜菜碱HCl、三甲基甘氨酸、无水甜菜碱或其他形式。甜菜碱和本文所述的药物产品的组合可以施用至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14和15次。某些实施方式中，药物产品可以与甜菜碱联合施用超过15次。可以施用于患者的其他联合疗法包括药物产品和至少一种降低tHcy水平的治疗，诸如极低蛋白/Met饮食和/或维生素/补充剂。

[0213] 在一些实施方式中，基于受试者特征诸如年龄、性别和体重来确定施用于受试者的药物产品的剂量。例如，药物产品可以以诸如小瓶的剂型提供，其中剂型中药物产品的量基于受试者的年龄、受试者的体重和/或受试者的性别被预先确定。根据受试者的年龄、受试者的体重、受试者的性别和/或其他特征，药物产品可以在设定的时间段内以多种剂型施用，以便随着时间调整受试者的药物产品暴露量。药物产品的剂型可以以任何治疗有效量提供。

[0214] 在一些实施方式中，施用于受试者的药物产品的剂量可以在约0.25mg/kg与约10mg/kg之间。例如，剂量为约0.33mg/kg、约0.66mg/kg、1.0mg/kg或1.5mg/kg中的一种。可替代地，剂量为约2mg/kg、约7mg/kg和约10mg/kg。例如，剂量可以为约0.5mg/kg。可替代地，治疗有效量为选自约5.0mg/kg至约50mg/kg和约10.0mg/kg至约25mg/kg的范围的剂量。例如，剂量选自由以下组成的群组：约0.25mg/kg、约0.33mg/kg、约0.66mg/kg、约1.00mg/kg、约1.10mg/kg、约1.20mg/kg、约1.30mg/kg、约1.40mg/kg、约1.50mg/kg、约1.60mg/kg、约1.70mg/kg、约1.80mg/kg、约1.90mg/kg、约2.00mg/kg、约3.00mg/kg、约4.00mg/kg、约

5.00mg/kg、约6.00mg/kg、约7.00mg/kg、约8.00mg/kg、约9.00mg/kg、约10.0mg/kg、约11.0mg/kg、约12.0mg/kg、约13.0mg/kg、约14.0mg/kg、约15.0mg/kg、约16.0mg/kg、约17.0mg/kg、约18.0mg/kg、约19.0mg/kg、约20.0mg/kg、约21.0mg/kg、约22.0mg/kg、约23.0mg/kg、约24.0mg/kg、约25.0mg/kg、约26.0mg/kg、约27.0mg/kg、约28.0mg/kg、约29.0mg/kg、约30.0mg/kg、约31.0mg/kg、约32.0mg/kg、约33.0mg/kg、约34.0mg/kg、约35.0mg/kg、约36.0mg/kg、约37.0mg/kg、约38.0mg/kg、约39.0mg/kg、约40.0mg/kg、约41.0mg/kg、约42.0mg/kg、约43.0mg/kg、约44.0mg/kg、约45.0mg/kg、约46.0mg/kg、约47.0mg/kg、约48.0mg/kg、约49.0mg/kg和约50.0mg/kg。本文所述的剂量可以每日一次施用,或在一些实施方式中每日两次施用。

[0215] 在某些实施方式中,通过甲硫氨酸受限的饮食向受试者施用药物产品。可替代地,将药物产品施用于未接受甲硫氨酸受限的饮食的受试者。在一些实施方式中,将药物产品施用于具有升高的tHcy水平的受试者。在一些实施方式中,受试者不是遗传定义的HCU患者。

[0216] 在某些实施方式中,药物产品可以与另一种治疗剂共同施用以用于治疗HCU。如本文所施用的,“共同施用”是指施用两种或更多种组分。这些用于共同施用的组分包括但不限于甜菜碱或维生素B6。共同施用是指两种或多种组分同时施用或在施用之间经过一段时间,例如1秒、5秒、10秒、15秒、30秒、45秒、1分钟、2分钟、3分钟、4分钟、5分钟、6分钟、7分钟、8分钟、9分钟、10分钟、11分钟、12分钟、13分钟、14分钟、15分钟、16分钟、17分钟、18分钟、19分钟、20分钟、21分钟、22分钟、23分钟、24分钟、25分钟、26分钟、27分钟、28分钟、29分钟、30分钟、31分钟、32分钟、33分钟、34分钟、35分钟、36分钟、37分钟、38分钟、39分钟、40分钟、41分钟、42分钟、43分钟、44分钟、45分钟、46分钟、47分钟、48分钟、49分钟、50分钟、51分钟、52分钟、53分钟、54分钟、55分钟、56分钟、57分钟、58分钟、59分钟、1小时、1.5小时、2小时、2.5小时、3小时、4小时、5小时、6小时、7小时、8小时、9小时、10小时、11小时、12小时、13小时、14小时、15小时、16小时、17小时、18小时、19小时、20小时、21小时、22小时、23小时、1天、1.5天、2天或3天。在某些实施方式中,施用两种或更多种组分之间的时间间隔大于3天。

[0217] 在某些实施方式中,药物产品可以被用作肠胃外药剂,以在每周一次的初始给药间隔中通过皮下(SC)注射慢性施用于患者。例如,每周药物给药6个剂量。在某些实施方式中,受试者可以在18至65岁的年龄范围内。在某些实施方式中,可以类似地治疗小到16岁的受试者。

[0218] 在某些实施方式中,施用发生在1天、2天、3天、4天、5天或6天的过程中。在某些实施方式中,施用发生在1周、2周、3周、4周、5周、6周、7周、8周、9周、10周、11周、12周、13周、14周、15周、16周、17周、18周、19周、20周、21周、22周、23周、24周、25周、26周、27周、28周、29周、30周、31周、32周、33周、34周、35周、36周、37周、38周、39周、40周、41周、42周、43周、44周、45周、46周、47周、48周、49周、50周、51周或52周的过程中。

[0219] 在一些实施方式中,根据一种或多种代谢指标或其他指标或疾病严重程度或进展的水平,向具有CBS缺乏症的受试者(包括具有升高的tHcy或CBS缺乏症的遗传定义的HCU患者或非遗传定义的患者)施用如本文所述的不同剂量的治疗。例如,可以基于受试者的tHcy水平或其他代谢指标水平的测量结果,向受试者施用预期治疗剂量范围内的20NHS PEG-CBS的剂量(例如,每天两次0.25至10mg/kg)。以这种方式,受试者可以根据本文所述的疾病

严重程度或进展的代谢指标被分层，并且根据疾病严重程度或进展被施用20NHS PEG-CBS的剂量。

[0220] 作为非限制性实施例，可以在具有CBS缺乏症的受试者中测量tHcy水平。tHcy的测量的水平可以根据升高的-低的、升高的-中等的或升高的-高进行分层。

[0221] 在一些实施方式中，升高的-低的tHcy水平在约10μmol/L至约50μmol/L的范围内，即约10μmol/L、约15μmol/L、约20μmol/L、约25μmol/L、约30μmol/L、约35μmol/L、约40μmol/L、约45μmol/L或约50μmol/L。

[0222] 在一些实施方式中，升高的-中等的tHcy水平在约50μmol/L至约100μmol/L的范围内，即约50μmol/L、约55μmol/L、约60μmol/L、约65μmol/L、约70μmol/L、约75μmol/L、约80μmol/L、约85μmol/L、约90μmol/L、约95μmol/L或约100μmol/L。

[0223] 在一些实施方式中，升高的-高的tHcy水平在约100μmol/L或更高的范围内，例如，约100μmol/L至约1000μmol/L或约100μmol/L至约500μmol/L;即，约100μmol/L、约110μmol/L、约120μmol/L、约130μmol/L、约140μmol/L、约150μmol/L、约160μmol/L、约170μmol/L、约180μmol/L、约190μmol/L、约200μmol/L、约210μmol/L、约220μmol/L、约230μmol/L、约240μmol/L、约250μmol/L、约260μmol/L、约270μmol/L、约280μmol/L、约290μmol/L、约300μmol/L、约310μmol/L、约320μmol/L、约330μmol/L、约340μmol/L、约350μmol/L、约360μmol/L、约370μmol/L、约380μmol/L、约390μmol/L、约400μmol/L、约410μmol/L、约420μmol/L、约430μmol/L、约440μmol/L、约450μmol/L、约460μmol/L、约470μmol/L、约4800μmol/L、约490μmol/L或约500μmol/L。

[0224] 在一些实施方式中，基于受试者的tHcy水平测量为升高的-低、升高的-中等或升高的-高，将预期治疗剂量范围(0.25至10mg/kg)内的20NHS PEG-CBS的剂量施用于受试者。例如，可以分别向受试者施用低剂量、中等剂量或高剂量。在一些实施方式中，20NHS PEG-CBS的低剂量包含约0.25mg/kg至约1.0mg/kg，即约0.25mg/kg、约0.50mg/kg、约0.75mg/kg或约1mg/kg。在一些实施方式中，20NHS PEG-CBS的中等剂量包含约0.5mg/kg至约1.5mg/kg，即约0.5mg/kg、0.75mg/kg、1mg/kg、1.25mg/kg或约1.5mg/kg。在一些实施方式中，20NHS PEG-CBS的高剂量包含约1mg/kg至约2mg/kg，即约1mg/kg、约1.25mg/kg、约1.50mg/kg、约1.75mg/kg或约2mg/kg。在一些实施方式中，20NHS PEG-CBS的高剂量包含高于约2mg/kg的剂量，即约2.25mg/kg、约2.50mg/kg、约2.75mg/kg、约3mg/kg、约3.25mg/kg、约3.50mg/kg、约3.75mg/kg、约4mg/kg、约4.25mg/kg、约4.50mg/kg、约4.75mg/kg或约5mg/kg或更高。

[0225] 在某些实施方式中，药物产品作为与吡哆醇(也被称为维生素B6)和/或抗血小板疗法的联合疗法被施用。在一些实施方式中，维生素B12作为与吡哆醇和/或抗血小板疗法的联合疗法被施用。在一些实施方式中，叶酸(folate/folic acid)作为与吡哆醇和/或抗血小板疗法的联合疗法被施用。因此，本文提供的治疗方法的一些实施方式包括将本文所述的药物产品与吡哆醇、抗血小板疗法、维生素B12和/或叶酸中的一种或多种一起施用。

[0226] VII.患者分层

[0227] 如本文所用的“患者分层”是指在患有或疑似患有HCU的患者中使用疾病进展或疾病严重程度的临床、生物化学、分子、行为、认知或其他指标。在一些实施方式中，根据疾病进展或疾病严重程度的临床、生物化学、分子、行为、认知或其他指标对患者进行分层包含定量或定性记录患者或患者组中疾病进展或疾病严重程度的一种或多种临床、生物化学、

分子、行为、认知或其他指标，并根据患者的或患者组的记录的定性或定量指标，与来自正常患者群体(即已知未患有HCU的患者群体)和/或已知患有HCU的对照患者群体的相应定量或定性记录或观察结果相比较，在疾病进展或疾病严重程度的等级上对患者或患者组进行分级。根据本文所述的方法对患者进行分层可以促进CSBDH的临床诊断、研究和/或治疗的各个方面。例如，基于本文所述的疾病进展或疾病严重程度的临床、生物化学、分子、行为、认知或其他指标的患者分层可以用于在临床试验中招募受试者，确定治疗的剂量，确定治疗施用方案，和/或通知可以与本文所述的酶疗法组合使用的额外治疗或干预，以减轻患者症状和/或改善患者的生活质量。在某些实施方式中，有资格使用本文所述的药物产品进行有效酶疗法的个体包括诊断为HCU的患者，其基于通过CBS基因的突变分析和大于或等于80μM的tHcy血浆水平对遗传性CBS缺乏型高胱氨酸尿症的确认。在某些实施方式中，有资格登记使用本文所述的药物产品进行酶疗法的临床试验的个体包括诊断为HCU的患者，其基于通过CBS基因的突变分析和大于或等于80μM的tHcy血浆水平对遗传性CBS缺乏型高胱氨酸尿症的确认。

[0228] 在一些实施方式中，根据一种或多种代谢指标的水平，向具有CBS缺乏症的受试者施用不同剂量的如本文所述的治疗。例如，基于对受试者的tHcy水平或其他代谢指标水平的测量，可以向受试者施用在预期的治疗剂量范围内(例如，0.25至10mg/kg，每天两次)的20NHS PEG-CBS的剂量。以这种方式，可以根据本文所述的疾病严重程度或进展的代谢指标对受试者进行分层，并且根据疾病严重程度或进展施用20NHS PEG-CBS的剂量。

[0229] 作为非限制性实施例，可以在具有CBS缺乏症的受试者中测量tHcy水平。tHcy的测量的水平可以根据升高的-低、升高的-中等或升高的-高进行分层。

[0230] 在一些实施方式中，升高的-低的tHcy水平在约10μmol/L至约50μmol/L的范围内，即约10μmol/L、约15μmol/L、约20μmol/L、约25μmol/L、约30μmol/L、约35μmol/L、约40μmol/L、约45μmol/L或约50μmol/L。

[0231] 在一些实施方式中，升高的-中等的tHcy水平在约50μmol/L至约100μmol/L的范围内，即约50μmol/L、约55μmol/L、约60μmol/L、约65μmol/L、约70μmol/L、约75μmol/L、约80μmol/L、约85μmol/L、约90μmol/L、约95μmol/L或约100μmol/L。

[0232] 在一些实施方式中，升高的-高的tHcy水平在约100μmol/L或更高的范围内，例如，约100μmol/L至约1000μmol/L或约100μmol/L至约500μmol/L;即，约100μmol/L、约110μmol/L、约120μmol/L、约130μmol/L、约140μmol/L、约150μmol/L、约160μmol/L、约170μmol/L、约180μmol/L、约190μmol/L、约200μmol/L、约210μmol/L、约220μmol/L、约230μmol/L、约240μmol/L、约250μmol/L、约260μmol/L、约270μmol/L、约280μmol/L、约290μmol/L、约300μmol/L、约310μmol/L、约320μmol/L、约330μmol/L、约340μmol/L、约350μmol/L、约360μmol/L、约370μmol/L、约380μmol/L、约390μmol/L、约400μmol/L、约410μmol/L、约420μmol/L、约430μmol/L、约440μmol/L、约450μmol/L、约460μmol/L、约470μmol/L、约4800μmol/L、约490μmol/L或约500μmol/L。

[0233] 在一些实施方式中，基于受试者的tHcy水平测量为升高的-低、升高的-中等或升高的-高，将预期治疗剂量范围内的20NHS PEG-CBS的剂量(例如，0.25至10mg/kg，每天两次)施用于受试者。例如，可以分别向受试者施用低剂量、中等剂量或高剂量。在一些实施方式中，20NHS PEG-CBS的低剂量包含约0.25mg/kg至约1.0mg/kg，即约0.25mg/kg、约0.50mg/

kg、约0.75mg/kg或约1mg/kg。在一些实施方式中，20NHS PEG-CBS的中等剂量包含约0.5mg/kg至约1.5mg/kg，即约0.5mg/kg、0.75mg/kg、1mg/kg、1.25mg/kg或约1.5mg/kg。在一些实施方式中，20NHS PEG-CBS的高剂量包含约1mg/kg至约2mg/kg，即约1mg/kg、约1.25mg/kg、约1.50mg/kg、约1.75mg/kg或约2mg/kg。在一些实施方式中，20NHS PEG-CBS的高剂量包含高于约2mg/kg的剂量，即约2.25mg/kg、约2.50mg/kg、约2.75mg/kg、约3mg/kg、约3.25mg/kg、约3.50mg/kg、约3.75mg/kg、约4mg/kg、约4.25mg/kg、约4.50mg/kg、约4.75mg/kg或约5mg/kg或更高。

[0234] A.临床表现

[0235] 根据《HCU诊断和管理指南(Guidelines for the Diagnosis and Management ofHCU)》，在表现出严重或快速进展的肌病、晶状体脱位和/或发育迟缓的儿童中应怀疑该疾病(参见Morris等人.《胱硫醚β-合酶缺乏症的诊断和管理指南(Guidelines for the diagnosis and management ofcystathionine beta-synthase deficiency)》.《遗传代谢疾病杂志》2017;40:49-74，其据此通过引用整体并入)。对于表现出血栓栓塞和/或晶状体脱位但无其他症状的成年人以及患有多系统疾病(包括眼部、结缔组织、神经精神和血管并发症)的人，也需要进行测试(参见Mudd等人.《美国人类遗传学杂志》1985;37:1-31;Morris等人.《胱硫醚β-合酶缺乏症的诊断和管理指南》.《遗传代谢疾病杂志》2017;40:49-74;Kelly等人.《神经病学》2003;60:275-279，其各自据此通过引用整体并入)。

[0236] B.生物化学分析

[0237] 1.总同型半胱氨酸水平

[0238] 在用还原剂处理血浆之后，使用所有游离和结合的同型半胱氨酸物质的总和来确定血浆tHcy的水平。在饮食习惯稳定的健康个体中，tHcy水平随着时间的推移保持相对稳定(参见Refsum等人.《临床化学(Clin Chem)》2004;50:3-32;McKinley等人.《临床化学》2001;47:1430-1436;其各自据此通过引用整体并入)。然而，消耗富含蛋白质的膳食可以在数小时的时间段内使tHcy水平增加约10％(参见Verhoef等人.《美国临床营养学杂志》2005;82:553-558，其据此通过引用整体并入)。一项针对具有高同型半胱氨酸血症(tHcy>40μmol/L)的个体的研究发现，个体内tHcy水平在4至8个月期间变化高达25％。然而，未提供有关饮食、测定方法和采样时间的可变性的信息，妨碍了对数据进行解释的能力(参见Refsum H,SmithAD,Ueland PM等人.“关于总同型半胱氨酸测定的事实和建议:专家意见(Facts and recommendations about total homocysteine determinations:an expert opinion)”.《临床化学》2004;50:3-32，其据此通过引用整体并入)。

[0239] 在没有叶酸补充的群体中，相应的参考上限分别为大约15和20μmol/L。为了支持新生儿中CBS的诊断，血浆中的tHcy预期在50至大于100μmol/L之间，并且血浆中的Met预期在200至1500μmol/L(即，3-23mg/dL)之间(参见Sacharow等人.“胱硫醚β-合酶缺乏症引起的高胱氨酸尿症(Homocystinuria Caused by Cystathionine Beta-Synthase Deficiency)”.《基因评论(GeneReviews)》2017，其据此通过引用整体并入)。为了支持未治疗的老年个体的CBS的诊断，血浆中的tHcy预期大于100μmol/L，并且血浆中的Met预期大于50μmol/L(即，大于0.7mg/dL)。预期对照新生儿或较老个体在血浆中具有小于15μmol/L的tHcy和在10至40μmol/L(0.2-0.6mg/dL)之间的Met。

[0240] 在一些实施方式中，根据tHcy的水平，向具有升高的tHcy和/或CBS缺乏症的受试

者施用如本文所述的不同剂量的治疗。例如，根据对受试者的tHcy水平的测量，可以向受试者施用在预期治疗剂量范围(0.25至10mg/kg)内的20NHS PEG-CBS的剂量。以这种方式，受试者可以根据本文所述的疾病严重程度或进展的代谢指标分层，并根据疾病严重程度或进展施用20NHS PEG-CBS的剂量。

[0241] 作为非限制性实施例，可以在具有CBS缺乏症的受试者中测量tHcy水平。tHcy的测量的水平可以根据升高的-低、升高的-中等或升高的-高进行分层。

[0242] 在一些实施方式中，升高的-低的tHcy水平在约10μmol/L至约50μmol/L的范围内，即约10μmol/L、约15μmol/L、约20μmol/L、约25μmol/L、约30μmol/L、约35μmol/L、约40μmol/L、约45μmol/L或约50μmol/L。

[0243] 在一些实施方式中，升高的-中等的tHcy水平在约50μmol/L至约100μmol/L的范围内，即约50μmol/L、约55μmol/L、约60μmol/L、约65μmol/L、约70μmol/L、约75μmol/L、约80μmol/L、约85μmol/L、约90μmol/L、约95μmol/L或约100μmol/L。

[0244] 在一些实施方式中，升高的-高的tHcy水平在约100μmol/L或更高的范围内，例如，约100μmol/L至约1000μmol/L或约100μmol/L至约500μmol/L;即，约100μmol/L、约110μmol/L、约120μmol/L、约130μmol/L、约140μmol/L、约150μmol/L、约160μmol/L、约170μmol/L、约180μmol/L、约190μmol/L、约200μmol/L、约210μmol/L、约220μmol/L、约230μmol/L、约240μmol/L、约250μmol/L、约260μmol/L、约270μmol/L、约280μmol/L、约290μmol/L、约300μmol/L、约310μmol/L、约320μmol/L、约330μmol/L、约340μmol/L、约350μmol/L、约360μmol/L、约370μmol/L、约380μmol/L、约390μmol/L、约400μmol/L、约410μmol/L、约420μmol/L、约430μmol/L、约440μmol/L、约450μmol/L、约460μmol/L、约470μmol/L、约4800μmol/L、约490μmol/L或约500μmol/L。

[0245] 在一些实施方式中，基于受试者的tHcy水平测量为升高的-低、升高的-中等或升高的-高，将预期治疗剂量范围(0.25至10mg/kg)内的20NHS PEG-CBS的剂量施用于受试者。例如，可以分别向受试者施用低剂量、中等剂量或高剂量。在一些实施方式中，20NHS PEG-CBS的低剂量包含约0.25mg/kg至约1.0mg/kg，即约0.25mg/kg、约0.50mg/kg、约0.75mg/kg或约1mg/kg。在一些实施方式中，20NHS PEG-CBS的中等剂量包含约0.5mg/kg至约1.5mg/kg，即约0.5mg/kg、0.75mg/kg、1mg/kg、1.25mg/kg或约1.5mg/kg。在一些实施方式中，20NHS PEG-CBS的高剂量包含约1mg/kg至约2mg/kg，即约1mg/kg、约1.25mg/kg、约1.50mg/kg、约1.75mg/kg或约2mg/kg。在一些实施方式中，20NHS PEG-CBS的高剂量包含高于约2mg/kg的剂量，即约2.25mg/kg、约2.50mg/kg、约2.75mg/kg、约3mg/kg、约3.25mg/kg、约3.50mg/kg、约3.75mg/kg、约4mg/kg、约4.25mg/kg、约4.50mg/kg、约4.75mg/kg或约5mg/kg或更高。

[0246] 2.甲硫氨酸水平

[0247] 高至高正常值的Met水平(参考范围通常分别为40至45和12至15μmol/L)与低至低正常值的Cth水平(参考范围分别为0.05至0.08和0.35至0.5μmol/L)相结合可能有助于区分HCU与由Hcy再甲基化的遗传和营养障碍引起的HCU(参见Morris等人.《遗传代谢疾病杂志》2017;40:49-74;Stabler等人.《JIMD报告》2013;11:149-163;Bartl等人.《临床化学学报》2014;437:211-217，其各自据此通过引用整体并入)。另一有用的测试使用放射性或氘标记的底物确定培养的成纤维细胞中来自Hcy和丝氨酸的Cth产生(参见Morris等人.《遗传代谢疾病杂志》2017;40:49-74;Kraus JP.《酶学方法(Methods Enzymol)》1987;143:388-

394;Smith等人.《生物医学和生命科学中的色谱B分析技术杂志(JChromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci)》2012;911:186-191,其各自据此通过引用整体并入)。然而,酶分析不能始终区分吡哆醇应答和非应答个体,并且在轻度病例中酶促活性可能正常(参见Alcaide等人.《临床化学学报》2015;438:261-265,其据此通过引用整体并入)。最近,测量从器官释放到血浆中的CBS的活性的快速稳定同位素测定显示在吡哆醇无应答患者中灵敏度为100%,而在吡哆醇应答者中灵敏度仅为86%(参见Alcaide等人.《临床化学学报》,2015;438:261-265;Krijt等人.《遗传代谢疾病杂志》2011;34:49-55,两者均据此通过引用整体并入)。

[0248] ≥600μM的甲硫氨酸水平,并且在一些情况下大于≥1000μM的甲硫氨酸水平,以及高于正常值上限(ULN)的二甲基甘氨酸(DMG)水平,即使在经历使用天然蛋白质受限饮食和/或不含Met的L-氨基酸混合物和补充剂(包括甜菜碱)治疗的患者中也观察到显著数量,如在实施例4-5中所述以及在表5和图1中所示。这些数据表明,目前的饮食和治疗干预效果不佳。特别是,与普遍观点相反,甜菜碱本身不足以治疗HCU。需要进一步研究以了解患者对常规治疗的应答与升高的甲硫氨酸、DMG和其他生化指标之间的相关性。在本文所述方法的一些实施方式中,测量和跟踪各种生化指标的水平可用于根据疾病严重程度和患者对治疗的应答来鉴定HCU受试者并对其进行分层。

[0249] 在一些实施方式中,根据甲硫氨酸的水平,向具有CBS缺乏症的受试者施用如本文所述的不同剂量的治疗。例如,根据受试者的甲硫氨酸水平的测量,可以向受试者施用预期治疗剂量范围(0.25至10mg/kg)内的20NHS PEG-CBS的剂量。以这种方式,受试者可以根据本文所述的疾病严重程度或进展的代谢指标分层,并且根据疾病严重程度或进展施用20NHS PEG-CBS的剂量。

[0250] 作为非限制性实施例,可以在具有CBS缺乏症的受试者中测量tHcy水平。tHcy的测量的水平可以根据升高的-低或升高的-高分层。在一些实施方式中,升高的-低甲硫氨酸水平为约10μmol/L至约100μmol/L,并且升高的高甲硫氨酸水平为约100μmol/L至约500μmol/L,或高于约150μmol/L。

[0251] 3.肌酐水平

[0252] 低于正常下限(LLN)的肌酐水平可以用于鉴定和分层儿科和成年患者中的HCU,包括根据患者对甲硫氨酸受限饮食和/或甜菜碱和/或维生素补充剂的应答分层。下降的肌酐水平可能是由于在接受蛋白质受限饮食的受试者中,继发于蛋白质限制的低肌肉质量。因此,低于LLN的肌酐水平可以用于根据限制饮食和/或限制饮食依从性对受试者进行监测和分层。

[0253] 4.C-反应蛋白水平

[0254] 高于ULN的高敏感性C-反应蛋白(hsCRP)水平可以用于鉴定患者中的HCU并对其进行分层,包括基于患者对甲硫氨酸受限饮食和/或甜菜碱和/或维生素补充的应答进行分层。

[0255] 低蛋白C活性水平和/或低纤维蛋白原水平可以用于鉴定患者中的HCU并对其进行分层,包括基于患者对甲硫氨酸受限饮食和/或甜菜碱和/或维生素补充的应答进行分层。

[0256] 5.其他代谢指标

[0257] 使用多个单独或组合的生化指标的更精细的生化分析可以用于对患者进行分层

以用于HCU的诊断或治疗(参见实施例5,表5,图1)。生化标记物可以可替代地用于监测患者对传统非ET治疗的应答。在一些情况下,如本文所述的ET治疗方法可减轻接受甲硫氨酸受限饮食的受试者或服用维生素或甜菜碱补充剂的受试者中这些生化标记物在正常范围外的升高或降低。除了升高的tHcy和Met以及低的胱硫醚和总半胱氨酸水平之外,以下生化指标也可以有助于鉴定受试者中的HCU并对其进行分层,包括基于患者对受限饮食和/或甜菜碱和维生素补充剂治疗方法的应答。

[0258] 在一些实施方式中,可以单独或联合使用甲硫氨酸水平、DMG水平、ALT水平、肌酐水平、hsCRP水平和/或蛋白C活性水平来鉴定患者中的HCU并对其进行分层,包括基于患者对甲硫氨酸受限饮食和/或甜菜碱和/或维生素补充剂的应答进行分层。使用这些生化指标中的多个可以提高诊断和分层的敏感性和准确性。这些生化指标可以进一步与已知在HCU患者中的正常范围内的生化指标相结合。例如,天冬氨酸转氨酶(AST)、抗凝血酶III和载脂蛋白A的正常水平可以用于进一步鉴定HCU病患者并对其进行分层。

[0259] 6.根据代谢指标调整CBS治疗

[0260] 在一些实施方式中,如本文所述的用于CBS缺乏症的治疗的施用可以根据本文提供的疾病严重程度或进展的一种或多种代谢指标的水平进行剂量调节。例如,如果对疾病进展或严重程度的一种或多种代谢指标的测量或测定表明CBS缺乏症的严重或晚期进展,则可以以低剂量、中等剂量或高剂量施用CBS治疗,诸如20NHS PEG-CBS。在一些实施方式中,20NHS PEG-CBS的低剂量包含约0.25mg/kg至约1.0mg/kg,即约0.25mg/kg、约0.50mg/kg、约0.75mg/kg或约1mg/kg。在一些实施方式中,20NHS PEG-CBS的中等剂量包含约0.5mg/kg至约1.5mg/kg,即约0.5mg/kg、0.75mg/kg、1mg/kg、1.25mg/kg或约1.5mg/kg。在一些实施方式中,20NHS PEG-CBS的高剂量包含约1mg/kg至约2mg/kg,即约1mg/kg、约1.25mg/kg、约1.50mg/kg、约1.75mg/kg或约2mg/kg。在一些实施方式中,20NHS PEG-CBS的高剂量包含高于约2mg/kg的剂量,即约2.25mg/kg、约2.50mg/kg、约2.75mg/kg、约3mg/kg、约3.25mg/kg、约3.50mg/kg、约3.75mg/kg、约4mg/kg、约4.25mg/kg、约4.50mg/kg、约4.75mg/kg或约5mg/kg或更高。

[0261] C.分子诊断

[0262] 分子遗传学测试可以通过单基因测试或使用多基因小组(multi-gene panel)进行(参见Yap S.,“胱硫醚β-合酶缺乏症引起的高胱氨酸尿症”.《孤儿百科全书》[在线丛书]2005;Sacharow SJ,Picker JD,Levy HL.“胱硫醚β-合酶缺乏症引起的高胱氨酸尿症”.《基因评论》2017;Morris等人.《遗传代谢疾病杂志》2017;40:49-74;Katsanis等人《自然综述遗传学(Nat Rev Genet)》2013;14:415-426;其各自据此通过引用整体并入)。具有特定CBS突变的高风险的个体应使用靶向单基因测试进行筛选。然而,这仅在具有共同CBS突变的选定群体中(例如,93%来自卡塔尔(Qatar)的患有HCU的个体携带p.Arg336Cys;c.1006C>T突变)和在来自具有已知致病变体的家族的个体中是有用的。在其他患者中,可以对CBS基因进行测序,并且仅在发现一种致病变体或未发现致病变体时才进行基因靶向缺失/重复分析。表3提供了可以用于鉴定患者中的HCU并对其进行分层的遗传突变的非限制性列表。

[0263] 可替代地,可以使用多基因小组同时进行多个基因的分子测试。所使用的方法可以包括序列分析、缺失/重复分析和其他基于非测序的测试(参见Morris等人.《遗传代谢疾病杂志》2017;40:49-74,其据此通过引用整体并入)。一般而言,分子遗传测定仅适用于流

行突变数量有限的高危群体(参见Morris等人.《遗传代谢疾病杂志》2017;40:49-74;Huemer等人.《遗传代谢疾病杂志》2015;38:1007-101,其各自据此通过引用整体并入)。

[0264] D.吡哆醇应答性测试

[0265] 在临床上使用吡哆醇应答性测试来确定是否应为患有HCU的患者开具吡哆醇补充。因为不同的治疗中心对吡哆醇应答性定义不同(参见Morris等人.《遗传代谢疾病杂志》2017;40:49-74,其据此通过引用整体并入),通过tHcy水平而不是通过它们的吡哆醇应答性对患者进行分类更为严格。吡哆醇应答性不是代谢控制的量度,而是仍有一些残余CBS活性的指征。

[0266] E.新生儿筛选(NBS)

[0267] 通常,通过分析干血斑点测定Met水平,来进行HCU缺乏症的NBS测试。可替代地,在全球少数中心可评估NBS的tHcy水平,而非干血斑点中的Met。它被用作第二层测试(second-tier test),以降低Met水平高的个体中NBS的假阳性率(参见Turgeon等人.《临床化学》2010;56:1686-1695,其据此通过引用整体并入)并且不用于提高灵敏度或降低假阴性率。

[0268] F.认知功能

[0269] 具有较低的血浆tHcy水平的患者在执行功能的测量方面表现更好。NIH工具箱或其他神经行为或认知功能的评估可以用于根据随时间推移的认知功能对患者进行评估和分层,包括跟踪对干预的应答。认知和tHcy水平之间的相关性可以进一步用于对患者进行分层(参见,例如,表9和图3以及图4)。如本文所述,ET后受试者中降低的tHcy水平可以用作受试者将具有改善的神经行为或认知干预的结果的指标。另一方面,升高的tHcy水平可以表明受试者需要或将受益于神经行为或认知干预联合如本文所述的ET。例如,tHcy水平>50μM、>60μM、>70μM、>80μM、>90μM或>100μM可以用作用于测量和/或跟踪神经行为和认知功能的阈值,和/或用作在患有或疑似患有HCU的患者中患者对神经行为或认知治疗或干预的易感性或需求的指标。在一些实施方式中,神经行为或认知治疗或干预包括类似于针对诸如ADHD的其他执行功能问题的那些支持的支持,包括例如诸如父母行为训练(BPT)和行为课堂管理(BCM)的行为治疗(参见,例如,Pelham Jr,William E和Gregory A.Fabiano.“注意力缺陷/多动障碍的循证心理社会治疗(Evidence-based psychosocial treatments for attention-deficit/hyperactivity disorder)”.《临床儿童和青少年心理学杂志》37.1(2008):184-214;和Pfiffner,Linda J和Lauren M.Haack.“针对患有ADHD的学龄儿童的行为管理”.《儿童和青少年精神病诊所》23.4(2014):731-746,其各自的内容通过引用整体并入本文)。

[0270] G.非遗传定义的患者分层

[0271] 本文所述的组合物和方法可用于治疗或缓解与升高的tHcy水平相关的并发症或病症,包括在具有升高的tHcy水平的非遗传定义的受试者或群体中。

[0272] 使用Broad Institute GnomAD数据库保守地筛选CBS突变的频率,估计在美国有数千名患者普遍患有CBS的功能丧失和/或错义突变变体。一些估计提供了超过4,000个具有CBS的功能丧失和/或错义突变变体的个体,而其他估计提供了超过14,000个具有CBS的功能丧失和/或错义突变变体的个体。

[0273] tHcy测试是常见且廉价的。估计每年有500万患者接受tHcy测试。31,000至35,000

名患者显示tHcy水平高于平均值超过2个标准偏差。许多具有升高的tHcy的患者具有还与经典HCU相关的诊断史,但不到10%的患者具有HCU或硫氨基酸代谢障碍的诊断记录。这些患者中的许多患者可能具有非遗传定义的升高的tHcy水平。

[0274] 如本文所用的升高的tHcy水平是指基于受试者的年龄、性别、饮食或其他因素,高于受试者预期的正常平均值的tHcy水平(即,血浆总同型半胱氨酸水平)。在一些实施方式中,具有升高的tHcy水平的受试者具有高于约4μmol/L、高于约5μmol/L、高于约6μmol/L、高于约7μmol/L、高于约8μmol/L、高于约9μmol/L、高于约10μmol/L、高于约11μmol/L、高于约12μmol/L、高于约13μmol/L、高于约14μmol/L、高于约15μmol/L、高于约16μmol/L、高于约17μmol/L、高于约18μmol/L、高于约19μmol/L、高于约20μmol/L、高于约21μmol/L、高于约22μmol/L、高于约23μmol/L、高于约24μmol/L、高于约25μmol/L、高于约26μmol/L、高于约27μmol/L、高于约28μmol/L、高于约29μmol/L、高于约30μmol/L。在一些实施方式中,升高的tHcy水平可以高达100μmol/L。在一些实施方式中,升高的tHcy水平可以高于100μmol/L。因此,本公开的一些实施方式提供了受试者中升高的tHcy水平,如在约4μmol/L至约100μmol/L之间,或更高。

[0275] 因此,所述方法和组合物的一些实施方式包括基于升高的tHcy水平对患者群体进行分层,并在群体中选择用于治疗升高的tHcy水平的受试者,包括治疗和缓解与升高的tHcy水平相关的病症和并发症。在一些实施方式中,治疗具有升高的tHcy水平的受试者缓解了相关病症和并发症,诸如认知或骨骼异常,而不依赖于任何潜在的病理,例如CBS缺乏症或HCU。

[0276] VIII.表型结果

[0277] 回顾性研究显示tHcy水平与结果之间的比例关系。具有最高的tHcy水平(治疗或未治疗)的患者在生命早期表现出更严重的症状,而具有较低的tHcy水平的患者表现出更少的症状且进展更慢(参见Yap S.“胱硫醚β-合酶缺乏症引起的高胱氨酸尿症”.《孤儿百科全书》[在线丛书]2005;Mudd等人.《美国人类遗传学杂志》1985;37:1-31,其各自据此通过引用整体并入)。具有升高的tHcy水平的个体通常表现出发育不良、血栓栓塞、严重近视伴随后的视神经晶状体脱位、骨质疏松型骨折、马凡样习性(特别是长骨延长)和/或精神异常,诸如学习困难(参见Yap S.“胱硫醚β-合酶缺乏症引起的高胱氨酸尿症”.《孤儿百科全书》[在线丛书]2005;Morris等人.《遗传代谢疾病杂志》2017;40:49-74;NORD,Kraus JP.“胱硫醚β-合酶缺乏症引起的高胱氨酸尿症”.NORD[在线丛书]2017,其各自据此通过引用整体并入)。反映CBS缺乏症的谱系,一些患者患有严重的儿童期发病的多系统疾病,而Hcy轻度升高的患者在成年后可能仍未得到诊断(参见Morris等人.《遗传代谢疾病杂志》2017;40:49-74,其据此通过引用整体并入)。在Hcy水平严重升高的患者中预期寿命显著缩短,尽管即使tHcy水平中度升高的患者也具有多种负面临床结果。

[0278] 已经观察到显著的证据表明,在HCU患者中通常受影响的四个系统(眼部、骨骼、心血管和神经系统)中,升高的tHcy水平和负面临床结果具有因果效应。在眼部系统中,经常观察到的表型结果包括:晶状体异位、虹膜震颤、近视,并且不太经常观察到的表型结果包括:青光眼、视神经萎缩、视网膜变性、视网膜脱离、白内障和角膜异常。在骨骼系统中,经常观察到的表型结果包括:骨质疏松、双凹椎骨、脊柱侧凸、长骨长度增加、不规则的干骺端增宽、干骺端骨针、骨骺异常大小/形状、生长停滞线、弓形足和高腭穹(high-archedpalate);

并且不太经常观察到的表型结果包括:蜘蛛脚样指、腕骨增大、骨龄异常、鸡胸/漏斗胸、膝外翻、驼背和第四掌骨短。在血管系统中,经常观察到的表型结果包括:血管闭塞、颧颊潮红和网织青斑症。在中枢神经系统中,经常观察到的表型结果包括:认知症状、精神障碍和锥体外系体征,并且不太经常观察到的表型结果包括:癫痫发作和脑电图异常。在额外的身体系统中,经常观察到以下表型结果:浅色、易碎的头发、薄的皮肤、肝脏中的脂肪变化、腹股沟疝、肌病、内分泌异常、凝血因子减少和自发性肠穿孔。

[0279] 已经观察到tHcy水平轻度升高与负面结果之间存在密切关系,但数据也已经表明,降低tHcy水平会对临床表现产生积极影响。关于HCU的文献受到该疾病的罕见性和随后的较小研究的影响,但受益于在Hcy水平严重升高的群体中临床结果的放大。相反,在更广泛群体中的研究受益于大样品量但tHcy水平的升高较小。总之,这些研究一致表明,升高的tHcy水平强有力预示着负面的临床结果,并且降低这些水平的药物干预是有益的。

[0280] 使用本文所述的药物产品治疗HCU的潜在结果是将血浆tHcy浓度降低至尽可能低的水平,同时维持更宽松的饮食,包括比HCU和其他必需氨基酸的其他疗法中提供的Met浓度更高。在患有HCU的婴儿和儿童中,优先事项是预防与HCU相关的并发症并确保正常智力的适当生长和发育(参见Morris等人.《遗传代谢疾病杂志》.2017年1月;40(1):49-74,其据此通过引用整体并入)。在生命后期诊断的患者中,优先事项可能是预防危及生命的血栓栓塞,并使已经确定的并发症的进展最小化。为了实现这些目标,可以改善与HCU相关的生化异常,并且如有可能,还应使其正常化(参见Morris等人.《遗传代谢疾病杂志》2017年1月;40(1):49-74,其据此通过引用整体并入)。一项在8个欧洲国家的29个中心对患有HCU的患者的饮食管理做法进行比较的调查发现,在治疗中心中对血浆tHcy水平的目标范围几乎没有共识,其中在29个中心中,中位推荐目标值小于55μM并且在小于20至100μM的范围内(参见Adam等人.《分子遗传学和代谢》2013年12月;110(4):454-9,其据此通过引用整体并入)。

[0281] 鉴于相隔几个月测试的血浆tHcy水平的个人内变异性为25%,本文选择大于或等于80μM的tHcy水平的治疗合格的临界值,以避免排除先前血浆tHcy水平为约100μM的患者(参见Refsum等人.《临床化学》2004;50:3-32;Guttormsen等人.《临床研究杂志(J.Clin Invest.)》1996,98(9):2174-83;其各自据此通过引用整体并入),以提供足够高的水平来检测少数患者中临床上显著的减少。相隔几个月测试的血浆tHcy水平的25%的个人内变异性(参见Refsum等人.《临床化学》2004;50:3-32;Guttormsen等人.《临床研究杂志》1996,98(9):2174-83;其各自据此通过引用整体并入)可能部分是由于HCU患者的饮食、药物或补充剂随时间的变化。

[0282] 如果未治疗,吡哆醇无应答的HCU的患者的预后是暗淡的(参见Morris等人.《遗传代谢疾病杂志》2017;40:49-74,其据此通过引用整体并入)。1985年,一项记录629例患者中的HCU的自然史的国际回顾性研究,通过治疗前的事件时间分析,显示70%的患者到10岁时发生晶状体脱位,其中85%的患者到12岁时发展症状(参见Mudd等人.《美国人类遗传学杂志》1985;37:1-31;Mudd等人.Skovby F.“转硫障碍(Disorders of transsulfuration)”.在:Scriver CL,BeaudetAL,Sly WS,Valle D编辑.《遗传性疾病的代谢和分子基础》第7版.纽约:McGraw Hill;2001;1279-1327,两者均据此通过引用整体并入)。总体而言,50%的受影响个体到15岁时通过放射影像学检测到脊柱骨质疏松,并且23%的吡哆醇无应答患者(4%有应答的患者)到30岁时死亡(参见Mudd等人.《美国人类遗传学杂志》1985;37:1-31,

其据此通过引用整体并入)。

[0283] 整体而言,现有证据表明,目前治疗HCU的方法,包括限制性饮食和使用膳食补充剂,在阻止大多数患者的疾病进展的进展方面无效。因此,对鉴定将改善或使HCU的代谢异常正常化并减缓或阻止疾病的临床表现的进展的耐受性良好的疗法存在大量未满足的医疗需求。

[0284] 已经观察到升高的Hcy水平和与HCU相关的关键临床结果(包括眼部并发症(特别是晶状体脱位)、骨骼结果(特别是骨质疏松)、血管事件(特别是中风和小血管疾病)和各种CNS结果(特别是认知功能)之间的因果关系。通过在一般群体中的多项研究进一步加强了升高的tHcy水平与负面临床结果之间的关系,以及相反地,降低的Hcy水平与改善的临床结果之间的关系。总体而言,这些临床发现强调了早期HCU诊断和及时治疗的必要性,以将Hcy水平降至尽可能接近正常水平。

[0285] 尽管尚未发表关于HCU患者生活质量(QoL)的研究,但未发表的报告表明,患者及其护理人员因遵循和管理高度受限且与社会隔离的饮食而遭受心理社会影响,并对该疾病的长期医疗后果极度焦虑。毫不奇怪,患者渴望能够在不损害其长期前景的情况下放松他们的饮食。

[0286] tHcy水平与患有HCU的患者的关键临床结果之间的密切关系表明,tHcy水平的变化是HCU的临床终点组合的可靠替代标记物。因此,tHcy水平的变化可用于(i)监测临床中的患者进展,和(ii)预测临床试验中新治疗的临床益处,以及(iii)预测疗法的疗效。

[0287] tHcy水平也为选择具有非遗传定义的CBS缺乏症的受试者提供了可靠的替代物。根据本文所述的方法,可以使用本文所述的PEG化htCBS C15S药物产品来治疗具有升高的tHcy和/或具有CBS缺乏症的受试者,以治疗或改善与升高的tHcy相关的症状,包括升高的tHcy的眼部、骨骼、心血管和神经系统症状。

[0288] 例如,与在向受试者施用药物产品之前相比,该药物产品使受试者的股动脉柔韧性正常化或增加股动脉柔韧性。例如,与野生型小鼠相比,I278T小鼠具有显著较低的股动脉柔韧性。事实上,与常规饮食的用药物产品治疗的小鼠和未用药物产品治疗的小鼠中相比,Met受限饮食可能导致I278T小鼠中较小的股动脉直径。

[0289] 之前在该疾病的3种鼠模型中进行的研究已经证明,htCBS C15S在全身施用后是有效的,如在WO 2017/083327(其据此通过引用整体并入)中所述。这些研究显示,细胞外Hcy血浆和组织(诸如脑)中的细胞内Hcy水平下降高达90%。观察到药物产品的施用导致浓度梯度,其中Hcy的通量从细胞内空间中的较高浓度到细胞外空间中的较低浓度,在细胞外空间中药物产品可以对其进行进一步加工。细胞外PEG化的htCBS C15S充当Hcy“库”。总之,在HCU的动物模型中,药物产品恢复了对Met代谢途径的控制。

[0290] 这些研究还已经显示,在HCU的鼠模型中,SC给药PEG化的htCBS C15S纠正了代谢产物水平,包括Cth水平的升高和Cys水平的正常化。此外,PEG化的htCBS C15S积极地影响小鼠中该疾病的表型表达,包括面部脱发、肝脏组织学、骨质疏松、身体成分、糖尿病性视网膜病(可能继发于肾病)以及由视网膜血管闭塞或非动脉炎性缺血性视神经病变引起的黄斑和视神经萎缩、细胞因子和脂质水平。PEG化的htCBS C15S还可使CBS敲除(KO)小鼠免于过早死亡(参见Looker等人.《糖尿病学(Diabetologia)》2003;46:766-772;Pusparajah等人.《生理学前沿(Front Physiol)》2016;7:200;Gerth等人.《美国斜视与小儿眼科学会杂

志》2008;12:591-596;Stanger等人.《临床化学实验室医学》2005;43:1020-1025;Cahill等人.《美国眼科杂志(Am J Ophthalmol)》2003;136:1136-1150;Minniti等人.《欧洲眼科杂志(Eur J Ophthalmol)》2014;24:735-743;其各自据此通过引用整体并入)。在该疾病的动物模型中,还观察到PEG化的htCBS C15S耐受良好,其中未观察到慢性给药的毒理学效应。

[0291] PEG化的htCBS C15S在细胞外空间中发挥作用,并且预计降低tHcy血浆浓度,无论患者的遗传学、同时疗法或基线tHcy水平如何。因此,用于本研究的合格群体应包括吡哆醇应答和无应答患者。

[0292] 在健康个体中,tHcy水平在大约5至15μM的范围内(OECD环境健康与安全出版物.良好实验室规范和合规性监控原则系列.编号1ENV/MC/CHEM(98)17“良好实验室规范原则”(OECD Environmental Health and Safety Publications.Series on Principles of Good Laboratory Practice and Compliance Monitoring.1ENV/MC/CHEM(98)17 “Principles of Good Laboratory Practice”)(如在1997年修订),其据此通过引用整体并入),其中98%为二硫化物形式或与蛋白质结合。只有2%的tHcy以非结合的、游离的、还原的氨基硫醇(其可以用作酶的底物)形式存在(参见EMA:生物分析方法验证指南(Guideline on bioanalytical method validation),EMEA/CHMP/EWP/192217/2009,ev.12011年7月1日;ATL-15-1419Atlanbio研究报告“在研究期间采集的猴血浆样品中作为胱硫醚β合酶活性的产物的胱硫醚-D4的LC-MS/MS测定529736(LC-MS/MS determination ofcystathionine-D4 as product of the cystathionineβ-synthase activity in monkey plasma samples collected during the study529736)”;两者均据此通过引用整体并入)。另一方面,HCU患者不仅表现出可能达到400μM或更高的血浆水平,而且还表现出显著改变的平衡,其中游离同型半胱氨酸达到tHcy值的10-25%。

[0293] 在小鼠模型中,施用PEG化的htCBS C15S导致tHcy水平降低高达90%。因此,该酶可用的游离同型半胱氨酸的初始水平(总量的10%-25%)不能单独解释所记录的tHcy水平的显著下降,并且必须有额外的池可供该酶使用。例如,由于PEG htCBS活性导致游离Hcy变得稀少,血浆中游离的Hcy与Hcy加合物(以蛋白结合的Hcy或二硫化物的形式)之间的平衡发生变化,以有利于产生游离的Hcy,其可以由酶进一步加工。

[0294] A.眼部并发症

[0295] 在患有HCU的患者和一般群体中,升高的Hcy水平是眼部并发症(尤其是晶状体脱位)的强有力的且独立的风险因素。即使采用处方的药物和饮食干预,大多数HCU患者最终仍表现出眼部并发症。降低Hcy水平已经显示可延缓并可能预防HCU患者的晶状体脱位(参见Yap S.“胱硫醚β-酶缺乏症引起的高胱氨酸尿症”).《孤儿百科全书》[在线丛书]2005;Mudd等人.《美国人类遗传学杂志》1985;37:1-31;Martinez-Gutierrez等人.《国际眼科学(Int Ophthalmol)》(2011)31:227-232;Ajith等人.《临床化学学报》2015;450:316-321;Mulvihill等人.《美国斜视与小儿眼科学会杂志》2001;5:311-315;Marti-Carvajal等人.《Cochrane系统综述数据库(Cochrane Database Syst Rev)》2015;1:CD006612;Sweetser等人.《新英格兰医学杂志》2016,375:1879-1890;Sadiq等人.《眼科研讨会(Semin Ophthalmol)》2013;28:313-320;Wright等人.“同型半胱氨酸、叶酸与眼睛(Homocysteine,folates,and the eye)”.《眼睛(Eye)》(伦敦)2008;22:989-993;Lieberman等人.《美国眼科杂志》1966,61:252-255;Harrison等人.《眼科学》1998,105:1886-1890;Ramsey等人.《美

国眼科杂志》1972;74:377-385;Couser等人.《眼科基因(Ophthalmic Genet)》2017,38:91-94;Ghorbanihaghjo等人.《分子视觉》2008,14:1692-1697;Javadzadeh等人.《分子视觉》2010;16:2578-2584;Seddon等人.《美国眼科杂志》2006;141:201-203;Coral等人.《眼睛》(伦敦)2006;20:203-207;Axer-Siegel等人.《美国眼科杂志》2004,137:84-89;Heuberger等人.《美国临床营养学杂志》2002;76:897-902;Huang等人.《科学报告(Sci Rep)》2015;5:10585;Sen等人.《印度临床生物化学杂志(Indian J Clin Biochem)》2008;23:255-257;Yousefi等人.《蛋白质和肽快报(Protein Pept Lett)》2013;20:932-941;Gerth等人.《美国斜视与小儿眼科学会杂志》2008;12:591-596;Stanger等人.《临床化学实验室医学》2005,43:1020-1025;Cahill等人.《美国眼科杂志》2003,136:1136-1150;Minniti等人.《欧洲眼科杂志》2014,24:735-743;Turkcu等人.《医学(Medicina)》(考纳斯(Kaunas))2013,49:214-218;Vessani等人.《美国眼科杂志》2003;136:41-46;Leibovitch等人.《青光眼杂志(J Glaucoma)》2003;12:36-39;Leibovitzh等人.《医药(Medicine)》(巴尔的摩(Baltimore))2016;95:e 4858;Micheal等人.《分子视觉(Mol Vis)》2009;15:2268-2278;Clement等人.《青光眼杂志》2009;18:73-78;Cumurcu等人.《BMC眼科学(BMC Ophthalmol)》2006;6:6;Bleich等人.《神经传输杂志(J Neural Transm)》(维也纳(Vienna))2002;109:1499-1504;Lee等人.《目前的眼科研究(Curr Eye Res)》2017;1-6;Wang等人.《美国眼科杂志》2004;137:401-406;Ganapathy等人.《调查眼科和视觉科学(Invest Ophthalmol Vis Sci)》2009;50:4460-4470,其各自据此通过引用整体并入)。即使采用处方的药物和饮食干预,大多数HCU患者最终仍表现出眼部并发症。降低Hcy水平已经被证明可延缓并可能预防HCU患者的晶状体脱位(参见Yap等人.《遗传代谢疾病杂志》1998;21:738-747,其据此通过引用整体并入)。

[0296] HCU的最一致存在和最早的表现之一是晶状体异位(晶状体脱位)(参见Mulvihill等人.《美国斜视与小儿眼科学会杂志》2001;5:311-315,其据此通过引用整体并入)。这通常发生在两岁之后,并且大约50%未治疗的吡哆醇无应答患者到六岁时出现,而50%未治疗的吡哆醇应答患者到10岁时出现(参见Mudd等人.《美国人类遗传学杂志》1985;37:1-31,其据此通过引用整体并入)。脱位可以是部分的(半脱位)或完全的,并且尽管它可能发生在下侧或鼻侧,但通常发生在双侧(参见Mulvihill等人.《美国斜视与小儿眼科学会杂志》2001;5:311-315;Sweetser等人.《新英格兰医学杂志》2016;375:1879-1890,两者均据此通过引用整体并入)。

[0297] 晶状体脱位经常伴随一段时间的近视快速进展,其可导致显著的散光、单眼复视和最佳矫正视力下降(参见Sadiq等人.《眼科研讨会》2013;28:313-320,其据此通过引用整体并入)。总体而言,据信近视(大于1屈光度[D])影响了约85%的HCU患者,其中极高度近视(大于5D)影响了50%至76%的患者。虹膜震颤(在移动眼球后虹膜的颤动)影响大约56%的患者,并且球形晶状体(一种易于半脱位的小型球形晶状体)影响大50%的患者(参见Yap S.“胱硫醚β-合酶缺乏症引起的高胱氨酸尿症”.《孤儿百科全书》[在线丛书]2005;Mulvihill等人.《美国斜视与小儿眼科学会杂志》2001;5:311-315,其各自据此通过引用整体并入)。与HCU相关的其他并发症包括白内障形成、慢性玻璃体炎(玻璃体炎症)和脉络膜视网膜炎症、瞳孔阻滞伴急性和/或慢性闭角型青光眼和(儿童)弱视(amblyopia/lazy eye)(参见Sadiq等人.《眼科研讨会》2013;28:313-320,其据此通过引用整体并入)。

[0298] 对25名24岁以下患有HCU的患者进行的长期回顾性研究的证据表明，在其tHcy水平从幼年开始持续降低的患者中，晶状体脱位是可以预防的，或至少显著减少和延迟(参见Yap等人.《遗传代谢疾病杂志》1998;21:738-747，其据此通过引用整体并入)。早期降低Hcy治疗还与整体眼部并发症(包括近视恶化)的降低的风险相关。支持性证据来自一项针对32例患有HCU的患者和25例同胞对照的病例对照研究，其中与在晚年治疗或不完全依从治疗的患者相比，早期降低Hcy治疗与眼部并发症的显著减少相关(参见El Bashir等人.《JIMD报告》2015;21:89-95，其据此通过引用整体并入)。

[0299] 迄今为止对25例患有钴胺素C缺乏症的患者(其类似地特征在于升高的tHcy水平)的眼部结果进行的最大和最长纵向研究发现，黄斑变性、视神经苍白、眼球震颤、斜视和血管改变均存在于大多数患者中。

[0300] 在HCU患者和一般群体中进行的大量研究证明了升高的Hcy水平与各种眼部障碍之间的关系(参见Mudd等人.《美国人类遗传学杂志》1985;37:1-31;Ajith,《临床化学学报》2015;450:316-321;Mulvihill等人.《美国斜视与小儿眼科学会杂志》2001;5:311-315;Wright等人.《眼睛》(伦敦)2008;22:989-993，其各自据此通过引用整体并入)，包括近视和晶状体脱位(参见Yap S.“胱硫醚β-合酶缺乏症引起的高胱氨酸尿症”.《孤儿百科全书》[在线丛书]2005;Mudd等人.《美国人类遗传学杂志(Am J Hum Genet)》1985;37:1-31;Martinez-Gutierrez等人.《国际眼科学》,2011;31:227-232;Suri等人.《神经科学杂志(JNeurol Sci)》2014;347:305-309;Mulvihill等人.《美国斜视与小儿眼科学会杂志》2001;5:311-315;Lieberman等人.《美国眼科杂志》,1966;61:252-255;Harrison等人.《眼科学》1998;105:1886-1890;Ramsey等人.《美国眼科杂志》1972;74:377-385;Couser等人.《眼科基因(Ophthalmic Genet)》2017;38:91-94;其各自据此通过引用整体并入)、虹膜震颤(参见Mulvihill等人.《美国斜视与小儿眼科学会杂志》2001;5:311-315，其据此通过引用整体并入)、视网膜动脉硬化(参见Ghorbanihaghjo等人.《分子视觉》2008;14:1692-1697，其据此通过引用整体并入)、年龄相关的黄斑变性(参见Javadzadeh等人.《分子视觉》2010;16:2578-2584;Seddon等人.《美国眼科杂志》2006;141:201-203;Coral等人.《眼睛》(伦敦)2006;20:203-207;Axer-Siegel等人.《美国眼科杂志》2004;137:84-89，其各自据此通过引用整体并入)、年龄相关的黄斑病变(AMD)(参见Heuberger等人.《美国临床营养学杂志》2002;76:897-902;Huang等人.《科学报告》2015;5:10585，两者均据此通过引用整体并入)、白内障(参见Sen等人.《印度临床生物化学杂志》2008;23:255-257;Yousefi等人.《蛋白质和肽快报》2013;20:932-941，两者均据此通过引用整体并入)、糖尿病性视网膜病(可能继发于肾病)(参见Looker等人.《糖尿病学(Diabetologia)》2003;46:766-772;Pusparajah等人.《生理学前沿》2016;7:200，两者均据此通过引用整体并入)和由于视网膜血管闭塞或非动脉缺血性视神经病变引起的黄斑和视神经萎缩(参见Gerth等人.《美国斜视与小儿眼科学会杂志》2008;12:591-596;Stanger等人.《临床化学实验室医学》2005;43:1020-1025;Cahill等人.《美国眼科杂志》2003;136:1136-1150;Minniti等人.《欧洲眼科杂志》2014;24:735-743;其各自据此通过引用整体并入)。

[0301] 对629名患有HCU的患者的回顾性研究发现，晶状体脱位通常发生在两岁之后，并且在大约50％未治疗的吡哆醇无应答患者中到六岁时出现，而在50％未治疗的吡哆醇应答患者中到10岁时出现(参见Mudd等人.《美国人类遗传学杂志》1985;37:1-31，其据此通过引

用整体并入)。迄今为止,对25名患有钴胺素C缺乏症的患者(其类似地特征在于升高的tHcy水平)的眼部结果进行的最大和最长时间的纵向研究发现,黄斑变性、视神经苍白、眼球震颤、斜视和血管变化均存在于大多数患者中(参见Brooks等人.《眼科学》2016年3月;123(3):571-82,其据此通过引用整体并入)。

[0302] 在HCU患者和一般群体中进行的大量研究已经证明了升高的Hcy水平与多种眼部障碍之间的关系(参见Mudd等人.《美国人类遗传学杂志》1985;37:1-31;Ajith TA,Ranimenon.《临床化学学报》2015;450:316-321;Mulvihill等人.《美国斜视与小儿眼科学会杂志》2001;5:311-315;Wright等人.《眼睛》(伦敦)2008;22:989-993;其各自据此通过引用整体并入),包括近视和晶状体脱位(参见Yap S.“胱硫醚β-合酶缺乏症引起的高胱氨酸尿症”《孤儿百科全书》[在线丛书]2005;Mudd等人.《美国人类遗传学杂志》1985;37:1-31;Martinez-Gutierrez等人.《国际眼科学》2011;31:227-232;Mulvihill等人.《美国斜视与小儿眼科学会杂志》2001;5:311-315;Sadiq等人.《眼科研讨会》2013;28:313-320;Lieberman等人.《美国眼科杂志》1966;61:252-255;Harrison等人.《眼科学》1998;105:1886-1890;Ramsey等人.《美国眼科杂志》1972;74:377-385;Couser等人.《眼科基因》2017;38:91-94,其各自据此通过引用整体并入)、虹膜震颤(参见Mulvihill等人.《美国斜视与小儿眼科学会杂志》2001;5:311-315,其据此通过引用整体并入)、视网膜动脉硬化(参见Ghorbanihaghjo等人.《分子视觉》2008;14:1692-1697,其据此通过引用整体并入)、年龄相关的黄斑变性(参见Javadzadeh等人.《分子视觉》2010;16:2578-2584;Seddon等人.《美国眼科杂志》2006;141:201-203;Coral等人.《眼睛》(伦敦)2006;20:203-207;Axer-Siegel等人.《美国眼科杂志》2004;137:84-89;其各自据此通过引用整体并入)、年龄相关的黄斑病变(AMD)(参见Heuberger等人.《美国临床营养学杂志》2002;76:897-902;Huang等人.《科学报告》2015;5:10585,两者均据此通过引用整体并入)、白内障(参见Sen等人.《印度临床生物化学杂志》2008;23:255-257;Yousefi等人.《蛋白质和肽快报》2013;20:932-941,两者均据此通过引用整体并入)、糖尿病性视网膜病(可能继发于肾病)(参见Looker等,《糖尿病学》2003;46:766-772;Pusparajah等人.《生理学前沿》2016;7:200,两者均据此通过引用整体并入)和由于视网膜血管闭塞或非动脉炎性缺血性视神经病变引起的黄斑和视神经萎缩(参见Gerth等人.《美国斜视与小儿眼科学会杂志》2008;12:591-596;Stanger等人.《临床化学实验室医学》2005;43:1020-1025;Cahill等人.《美国眼科杂志》2003;136:1136-1150;Minniti等人.《欧洲眼科杂志》2014;24:735-743;其各自据此通过引用整体并入)。

[0303] 调查Hcy水平与青光眼之间关联的研究提供了不一致的结果。一些研究显示Hcy水平与正常眼压性青光眼、假性剥脱性青光眼(PEXG)和原发性开角型青光眼(POAG)之间正相关,而其他研究未显示(参见Lieberman等人.《美国眼科杂志》,1966;61:252-255;Turkcu等人.《医学》(考纳斯)2013;49:214-218;Vessani等人.《美国眼科杂志》2003;136:41-46;Leibovitch等人.《青光眼杂志》2003;12:36-39;Leibovitzh等人.“在男性和女性中同型半胱氨酸和眼内压之间的关系:一项基于群体的研究(Relationship between homocysteine and intraocular pressure in men and women:Apopulation-based study)”.《药物》(巴尔的摩)2016;95:e 4858;Micheal等人.《分子视觉》2009;15:2268-2278;Clement等人.《青光眼杂志》2009;18:73-78;Cumurcu等人.《BMC眼科学》2006;6:6;Bleich等人.《神经传输杂志》(维亚纳)2002;109:1499-1504;Lee等人.《目前的眼科研究》2017;1-6;Wang等人.《美国

眼科杂志》2004;137:401-406;其各自据此通过引用整体并入)。然而,在具有由CBS基因缺失导致的内源性升高的Hcy水平的小鼠中证实了视网膜神经节细胞(RGC)的丢失(患有青光眼的患者中的常见观察结果),这表明在患有HCU的患者中青光眼与升高的tHcy水平之间可能存在联系(参见Ganapathy等人.《调查眼科和视觉科学》2009;50:4460-4470,其据此通过引用整体并入)。

[0304] 1.机制

[0305] 已经提出了许多机制来解释升高的Hcy水平对眼睛健康的影响(参见Ajith TA,Ranimenon;《临床化学学报》2015;450:316-321,其据此通过引用整体并入)。解释升高的tHcy的效应的机制包括血管内皮功能受损、视网膜神经节细胞的凋亡、细胞外基质改变、赖氨酰氧化酶活性和氧化应激下降,以及Hcy的直接细胞毒性和促炎作用,这些似乎有助于晶状体混浊和视神经损伤。

[0306] 潜在机制还包括N-甲基-D-天冬氨酸(NMDA)受体的激活,导致钙的细胞内流入和增加的活性氧物质(ROS)生成,这两者都有助于白内障的形成。这些变化,以及Hcy的直接细胞毒性作用,可能导致内皮损伤,从而启动RGC的血栓形成和细胞凋亡,导致视网膜病变和青光眼。研究还显示,升高的Hcy水平会增加不对称二甲基精氨酸(AMDA)的水平并阻断一氧化氮合酶(NOS)活性,从而通过降低一氧化氮(NO)水平导致血管收缩和视神经萎缩。最后,血管壁上同型半胱氨酸化蛋白的积累可触发抗Hcy抗体的产生和炎性应答,从而导致吞噬作用、氧化应激、RGC的凋亡和细胞外基质(ECM)改变。此类变化共同损害脉管系统、晶状体蛋白和视神经,最终导致视觉功能障碍。

[0307] 在HCU患者中,晶状体脱位被视为主要由小带纤维的变性变化引起,特别是富含Cys的多结构域ECM蛋白,诸如原纤蛋白-1(参见Sadiq等人.《眼科研讨会》2013;28:313-320;Hubmacher等人.《生物化学(Biochemistry)》2011;50:5322-5332;Hubmacher等人.《生物化学杂志》2005;280:34946-34955;Hubmacher等人.《生物化学杂志》2010;285:1188-1198;其各自据此通过引用整体并入)。

[0308] 在健康个体中,在原纤蛋白-1内大量结构域内二硫键的形成使蛋白质能够精确折叠,这对结构完整性和功能至关重要。然后,原纤蛋白-1链可以形成链间二硫键,导致被称为微原纤维的高分子量多蛋白组装体的组装(参见Kinsey等人.《细胞科学杂志(J Cell Sci)》2008;121:2696-2704;Hubmacher等人.《美国国家科学院院刊》2008;105:6548-6553,两者均据此通过引用整体并入)。

[0309] 这一过程高度依赖于原纤蛋白-1和纤连蛋白之间的相互作用(参见Hubmacher等人.《生物化学》2011;50:5322-5332,其据此通过引用整体并入)。微原纤维形成用于沉积原弹性蛋白的支架,这是形成弹性纤维(诸如在皮肤、肺、血管/动脉、韧带和眼睛中发现的弹性纤维)中的必要步骤(参见Hubmacher等人.《生物化学杂志》2010;285:1188-1198,其据此通过引用整体并入)。通过患有马凡氏综合征(一种由原纤蛋白-1基因中的突变引起的病症)的患者说明了原纤蛋白-1的重要性,其中结缔组织功能障碍与诸如晶状体脱位、器官脱垂、骨质疏松和关节过度活动的症状有关(参见Suk等人.《生物化学杂志》2004;279:51258-51265;Collod-Beroud等人.《人类突变(Hum Mutat)》2003;22:199-208,两者均据此通过引用整体并入)。

[0310] 体外研究表明,向原纤蛋白-1中添加Hcy会破坏二硫键的形成,进而导致异常的蛋

白质折叠、对蛋白水解降解的增加的敏感性以及ECM和弹性纤维的异常形成(参见Hubmacher等人.《生物化学杂志》2010;285:1188-1198;Whiteman等人.《抗氧化剂和氧化还原信号(Antioxid Redox Signal)》2006;8:338-346,两者均据此通过引用整体并入)。向人皮肤成纤维细胞中加入Hcy也与减少的次最佳结合至原纤蛋白-1的纤连蛋白的形式有关,从而防止微原纤维形成(参见Hubmacher等人.《生物化学》2011;50:5322-5332;Hubmacher等人.《生物化学杂志》2010;285:1188-1198,两者均据此通过引用整体并入)。

[0311] 除了晶状体脱位外,患有HCU的患者的小带纤维的变性还可以导致增加的晶状体曲率、透镜状近视、散光、视网膜脱离、斜视、白内障和虹膜震颤(参见Sadiq等人.《眼科研讨会》2013;28:313-320,其据此通过引用整体并入)。如果未治疗,晶状体前脱位可导致急性瞳孔阻滞性青光眼。在极端情况下,完全性晶状体脱位与增加的眼轴长度有关,可能是对视力模糊的代偿性反应(参见Mulvihill等人.《美国斜视与小儿眼科学会杂志》2001;5:311-315,其据此通过引用整体并入)。

[0312] 通过国家NBS计划或通过临床表现,对1971年至1996年在爱尔兰发现的25个HCU病例进行了回顾性研究,以检查降低Hcy疗法对临床结果的影响(参见Yap等人.《遗传代谢疾病杂志》1998;21:738-747,其据此通过引用整体并入)。大多数病例(24/25)为吡哆醇无应答。因此,大多数患者的治疗包括不含Met、补充Cys的饮食,以及维生素B_{12}和叶酸补充剂(如果需要)。患者在6周龄之前开始治疗,并与在诊断后开始治疗的不同组和一名从未治疗的对照患者进行比较。在6周龄之前治疗的组中平均随访时间为14.3年(范围2.5至23.4),其他患者的平均随访时间为14.7年(范围11.7至18.8),结果是总计治疗365.7个患者年。在由NBS检测的21个患者中,18个在治疗期间未出现并发症。在这些个体中,15/18具有20:20的视力,并且3/18在之前两年期间具有增加的近视。

[0313] 与Mudd等人的发现一致(参见Mudd等人.《美国人类遗传学杂志》1985;37:1-31,其据此通过引用整体并入),晚期诊断的个体中的晶状体脱位发生在大约两岁时。在早期治疗的且对疗法具有良好依从性的任何个体中,均未报告晶状体脱位。“早期治疗患者”(具有最高fHcy水平的患者)中有3名患者具有恶化的近视而无晶状体脱位,这很可能是因为这一小组患者中的相对高的fHcy水平。这导致作者提出,进行性近视可能是晶状体脱位之前饮食依从性差的第一个迹象,尽管患者坚持相反。这些患者的恶化的近视凸显了在这些患者的中性和负面临床结果之间的平衡是多么脆弱。晚期检测到的患者都出现了晶状体异位。这表明治疗可能会延迟晶状体脱位的发生,而不是预防晶状体脱位的发生。

[0314] 在具有近视的患者中终生中位血浆fHcy水平高于没有近视的患者(分别为18、18和48μmol/L相对于11μmol/L)。在诊断后开始治疗的组中,由NBS鉴定的发展并发症的三名患者中,所有患者对其饮食都不依从。总体上,6/24名患者具有晶状体脱位;在这些患者中,两名被早期诊断,但不依从他们的饮食,并且四名被晚期诊断,包括一名从未治疗的患者。与Mudd等人的发现一致(参见Mudd等人.《美国人类遗传学杂志》1985;37:1-31,其据此通过引用整体并入),晚期诊断的个体(即在2岁后表现出并发症的患者)中的晶状体脱位发生在大约两岁时。在本研究发表时,早期治疗的对疗法依从性良好的任何个体均没有被报告晶状体脱位。

[0315] 依从性患者将其fHcy水平维持至tHcy等效水平,大大低于120μmol/L。然而,在发表时,所有患者均未满24岁,且许多患者仍为儿科患者。研究显示,从青春期到成年期,对蛋

白质受限饮食的依从性会迅速下降。上述微妙的平衡表明,随着这些患者年龄的增长,由这些患者实现的tHcy水平的适度降低可能会延迟症状的发作,而不是预防症状的发生。

[0316] 这些结果(参见Yap等人.《遗传代谢疾病杂志》1998;21:738-747;Mudd等人.《美国人类遗传学杂志》1985;37:1-31;其各自据此通过引用整体并入)得到来自在卡塔尔(Qatar)进行的类似病例对照研究的结果的支持,该研究报告了32例HCU和25例同胞对照的结果,包括视力障碍(参见El Bashir等人.《JIMD报告》2015;21:89-95,其据此通过引用整体并入)。受试者的平均年龄为11.2岁(范围为0.6至29岁),并且56%为男性。总体上,9/32个病例(28%)经NBS诊断并在出生后第一个月接受治疗。其余在14至240个月龄被诊断。通过NBS诊断的患者与临床诊断的患者相比,tHcy和Met水平显著降低。这可能归因于生命早期对饮食和药物治疗的更好的依从性。在本研究发表时,由NBS鉴定的9例病例中没有一个出现视力问题,相比之下,在晚期诊断的组中有18例(78%)出现视力问题(组间$p<0.001$)。然而,与上述25例患者的爱尔兰研究相似,本研究中的患者年龄在0.6至29岁的范围内,并且长期并发症尚不清楚。

[0317] 来自Yap和Naughten的数据(参见Yap等人.《遗传代谢疾病杂志》1998;21:738-747,其据此通过引用整体并入)与由Mudd等人产生的Kaplan-Meier曲线的比较表明,患有晶状体脱位和骨质疏松的治疗依从性“早期治疗”患者的比例显著低于未治疗的患有HCU的患者的预期比例($p\leq0.001$)。

[0318] 因此,在患有HCU的患者和一般群体中,升高的Hcy水平被认为是眼部并发症(尤其是晶状体脱位)的强有力且独立的风险因素(例如,如Yap等人和Mudd等人所示)。这强调了早期HCU诊断和治疗的必要性,以及患者的治疗依从性。

[0319] B.骨骼并发症

[0320] HCU与骨质疏松性骨折的增加的风险有关,其可以部分地归因于低的骨矿物质密度(参见Mudd等人和Weber等人.《分子遗传学和代谢》2016;117:351-354;其各自据此通过引用整体并入)。

[0321] 对来自19名HCU患者超过8年的数据的回顾性图表审查发现,低骨矿物质密度(BMD)在儿科和成年HCU患者中都很常见(参见Weber等人)。这项研究表明,在儿童期和青春期(骨骼生长的关键时期)的骨量增加在HCU方面是不足的,并且可能对峰值骨量的获得产生负面影响。这项研究还强调,即使是tHcy水平仅比正常范围高5倍的中度升高的饮食依从性患者在儿童期也已经遭受较差的骨骼临床结果。

[0322] 根据Mudd等人,80%的患有HCU的患者在30岁之前出现骨质疏松。此外,即使在没有HCU的患者中,升高的Hcy水平也与骨质疏松性骨折的增加的风险相关(参见van Meurs等人.《新英格兰医学杂志》2004;350:2033-2041;McLean等人.《新英格兰医学杂志》2004;350:2042-2049;其各自据此通过引用整体并入)。

[0323] 对来自在2002年至2010年之间经历临床DXA骨密度测定的19名受试者(9名男性,年龄为3.5至49.2岁)的数据的回顾性图表审查发现,低BMD在儿童和成年HCU患者中均很常见(参见Weber等人.《分子遗传学和代谢》2016;117:351-354,其据此通过引用整体并入)。在首次DXA扫描时,平均腰椎(LS)BMD Z评分为-1.2 ± 1.3,并且总髋部BMD Z评分为-0.89 ± 0.4;两者均显著低于0(在一般群体中的预期平均Z评分),其中分别地$p=0.002$和0.02。诊断时的LS BMD Z评分在年龄<21岁的患者中为-1.26 ± 1.4,并且在成人中为-1.06 ± 1.1。总

体上,38％的患者因年龄(如通过Z评分≤2的定义)具有低BMD。在多元线性回归模型中,tHcy和Met水平均与LS BMD Z评分正相关(参见Weber等人.《分子遗传学和代谢》2016;117:351-354,其据此通过引用整体并入)。这19名个体的平均tHcy水平仅为59.2μmol/L,并且19名患者中的大多数为儿科患者。这项研究表明,在儿童期和青春期(骨骼生长的关键时期)期间的骨量增加在HCU方面是不足的,并且可能对峰值骨量的获得产生负面影响。这项研究还强调了tHcy水平仅比正常范围高5倍的中度升高的饮食依从性患者如何在儿童期已经遭受较差的骨骼临床结果。

[0324] 先前的研究已经证明了Hcy水平与老年群体的骨折的风险之间的明确关系(参见van Meurs等人.《新英格兰医学杂志》2004;350:2033-2041;McLean等人.《新英格兰医学杂志》2004;350:2042-2049;其各自据此通过引用整体并入)。来自两项前瞻性的、基于群体的研究(包括2406名年龄≥55岁的受试者)的结果显示,tHcy水平每升高一个SD,经年龄和性别调整的骨折的风险就会增加30％(参见van Meurs等人.《新英格兰医学杂志》2004;350:2033-2041;其据此通过引用整体并入)。最高年龄特异性四分位数中的同型半胱氨酸水平与骨折风险增加1.9倍相关。同型半胱氨酸水平与骨折的风险之间的关联似乎与骨矿物质密度和其他潜在的骨折风险因素无关。增加的同型半胱氨酸水平是一般群体中老年男性和女性的骨质疏松性骨折的强有力且独立的风险因素,其幅度与已确定的骨折和心血管疾病的风险因素相似(参见van Meurs等人.《新英格兰医学杂志》2004;350:2033-2041;其据此通过引用整体并入)。此外,一项针对825名男性和1174名女性的美国前瞻性研究(HOPE-2试验亚研究)发现,与最低四分位数的血清tHcy水平相比,最高四分位数的血清tHcy水平与女性的髋部骨折风险增加1.9倍和男性风险增加4倍相关(参见Sawka等人.《内科医学档案(Arch Intern Med)》2007年10月22日;167(19):2136-9,其据此通过引用整体并入)。tHcy水平与骨折风险之间的关联与BMD和其他骨折的潜在风险因素无关(参见van Meurs等人.《新英格兰医学杂志》2004;350:2033-2041;McLean等人.《新英格兰医学杂志》2004,350:2042-2049;Sawka等人.《内科医学档案》2007年10月22日;167(19):2136-9;其各自据此通过引用整体并入)。

[0325] 与这些结果一致,在433名年龄大于65岁的中风患者中的研究发现,每1000人年髋部骨折的年龄调整的发病率从Hcy水平最低四分位数的2.89几乎线性增加至最高四分位数的27.87(参见)。总之,这些结果表明,升高的Hcy水平是老年男性和女性中骨质疏松性骨折的强有力且独立的风险因素。

[0326] 骨骼异常在出生时并不存在,并且在婴儿和非常小的儿童中是不常见的(参见Mudd等人.《美国人类遗传学杂志》1985;37:1-31其据此通过引用整体并入)。骨骼受累的最初体征通常是膝外翻和弓形足,其中长骨延长(马凡氏综合征的典型特征)通常在接近青春期时发展(参见Morris等人.《遗传代谢疾病杂志》2017;40:49-74;其据此通过引用整体并入)。骨质疏松,尤其是椎骨和长骨的骨质疏松,在HCU患者中很常见,并且可能导致脊柱侧凸/脊柱后凸和/或椎骨塌陷(参见Mudd等人.《美国人类遗传学杂志》1985;37:1-31;Weber等人.《分子遗传学和代谢》2016;117:351-354;其各自据此通过引用整体并入)。其他骨骼表现可能包括由突出的上牙和高腭引起的马凡样面部特征以及前胸壁畸形,诸如漏斗胸或鸡胸(参见Morris等人.《遗传代谢疾病杂志》2017;40:49-74;Sweetser等人.《新英格兰医学杂志》2016;375:1879-1890;Brenton等人.《骨关节外科杂志-英国卷(J Bone Joint

Surg Br)》1972;54:277-298;其各自据此通过引用整体并入)。由于马凡氏综合征和HCU之间的这些共享的骨骼特征,HCU患者有时被误认为马凡氏患者(Marfan patients)。

[0327] 一项对25名患有HCU的爱尔兰患者超过25年随访的研究发现,与非依从性患者或晚期诊断患者相比,在通过新生儿筛选鉴定的具有良好降低Hcy治疗依从性(饮食、维生素和/或甜菜碱)的患者中,骨质疏松的风险显著降低(参见Yap等人.《遗传代谢疾病杂志》1998;21:738-747)。这些结果的支持性证据来自一项针对5名具有良好的长期代谢控制的HCU患者的小型韩国研究。在这项研究中,接受早期降低Hcy的疗法的患者比那些晚期诊断的患者具有更少的骨骼异常(参见Lim等人.《国际骨质疏松(Osteoporos Int)》2013,24:2535-2538,其据此通过引用整体并入本文)。最后,在一项使用HCU的鼠模型的研究中,通过用CBS ET治疗使tHcy水平正常化与骨质疏松预防相关(参见Majtan等人.“酶替代预防鼠高胱氨酸尿症中的新生儿死亡、肝损伤和骨质疏松(Enzyme replacement prevents neonatal death,liver damage,and osteoporosis in murine homocystinuria)”,《美国实验生物学学会联合会杂志》2017,其据此通过引用整体并入本文)。

[0328] 导致患有HCU的患者中低BMD和骨骼脆性的确切机制尚未完全了解(参见Weber等人.《分子遗传学和代谢》2016;117:351-354;Lim JS,Lee DH.“患有由CBS缺乏症引起的良好控制的高胱氨酸尿症的儿童的骨矿物质密度和身体成分的变化(Changes in bone mineral density and body composition of children with well-controlled homocystinuria caused by CBS deficiency)”.《国际骨质疏松》2013;24:2535-2538,两者均据此通过引用整体并入)。然而,患有HCU的患者中的许多结缔组织障碍类似于在马凡氏综合征中所看到的那些,马凡氏综合征是一种由原纤蛋白-1基因中的突变引起的结缔组织障碍并且其特征在于包括长骨伸长和骨质疏松型骨折的特征(参见Hubmacher等人.《生物化学》2011;50:5322-5332;Hubmacher等人.《生物化学杂志》,2010;285:1188-1198,两者均据此通过引用整体并入)。升高的Hcy水平被认为通过两种不同的途径导致骨脆性和骨折(参见Behera等人.《细胞生理学杂志》2016,其据此通过引用整体并入本文)。第一种通过受损的原纤蛋白组装体导致在儿童期和青春期期间骨量增加的减少。第二种途径通过减少的胶原交联形成导致受损的骨重建,导致脆骨症(参见Behera等人《细胞生理学杂志》2016;Kang等人.《临床研究杂志(J Clin Invest)》1973;52:2571-2578,两者均据此通过引用整体并入)。总之,这些数据表明,在儿童期和青春期(骨骼生长的关键时期)期间的骨量增加在患有HCU的患者中是不足的,并且这对峰值骨量的获得造成负面影响。

[0329] 此外,在老年群体中,Hcy水平与骨折的风险之间存在密切关系(参见van Meurs等人.《新英格兰医学杂志》2004;350:2033-2041;McLean等人.《新英格兰医学杂志》2004;350:2042-2049;其各自据此通过引用整体并入)。来自两项国际、前瞻性、基于人群的研究(包括2,406名年龄大于或等于55岁的受试者)的结果表明,最高年龄特定四分位数中的同型半胱氨酸水平与骨折的风险增加1.9倍相关(参见van Meurs等人.《新英格兰医学杂志》2004;350:2033-2041,其据此通过引用整体并入)。增加的同型半胱氨酸水平是一般群体中老年男性和女性的骨质疏松性骨折的强有力且独立的风险因素,其幅度与已确定的骨折(低骨矿物质密度、认知障碍、近期跌倒)和心血管疾病的风险因素相似(参见van Meurs等人.《新英格兰医学杂志》2004;350:2033-2041,其据此通过引用整体并入)。此外,一项针对1,999名受试者的美国前瞻性研究(HOPE-2试验亚研究)发现,与最低四分位数的血清tHcy

水平相比，最高四分位数的血清tHcy水平与女性髋部骨折风险增加1.9倍和男性风险增加4倍相关(参见Sawka等人.《内科医学档案》2007年10月22日;167(19):2136-9,其据此通过引用整体并入)。tHcy水平与骨折风险之间的关联与BMD和其他骨折潜在风险因素无关(参见van Meurs等人.《新英格兰医学杂志》2004;350:2033-2041;McLean等人.《新英格兰医学杂志》2004;350:2042-2049;Sawka等人.《内科医学档案》2007年10月22日;167(19):2136-9,其各自据此通过引用整体并入)。与这些结果一致，一项针对433名年龄>65岁的中风患者的研究发现，每1000人年髋部骨折的年龄调整的发病率从Hcy水平最低四分位数的2.89到最高四分位数的27.87几乎呈线性增长()。总之，这些结果表明，增加的Hcy水平是老年男性和女性中的骨质疏松性骨折的强有力且独立的风险因素。

[0330] 导致患有HCU的患者中低BMD和骨骼脆性的确切机制尚未完全了解(参见Weber等人.《分子遗传学和代谢》2016;117:351-354;Lim JS,Lee DH.“患有由CBS缺乏症引起的良好控制的高胱氨酸尿症的儿童的骨矿物质密度和身体成分的变化”.《国际骨质疏松》2013;24:2535-2538,两者均据此通过引用整体并入)。然而，患有HCU的患者的许多结缔组织障碍类似于在马凡氏综合征中所看到的那些，马凡氏综合征是一种由原纤蛋白-1基因中的突变引起的结缔组织障碍并且其特征在于包括长骨伸长和骨质疏松型骨折的特征(参见Brenton等人.《骨与关节外科杂志-英国卷(J Bone Joint Surg Br)》1972;54:277-298;Hubmacher等人.《生物化学》2011;50:5322-5332;Hubmacher等人.《生物化学杂志》2010;285:1188-1198,其各自据此通过引用整体并入)。

[0331] 在健康个体中，原纤蛋白-1与胶原蛋白和弹性蛋白聚合物一起聚集以形成ECM,即用于骨形成、稳态和修复的结构支架(参见Olivieri等人.《纤维生成组织修复(Fibrogenesis Tissue Repair)》2010;3:24,其据此通过引用整体并入)。研究表明，升高的tHcy水平可以导致原纤蛋白-1片段的结构修饰，其阻止多聚化并导致原纤蛋白-1降解(参见Hubmacher等人.《生物化学杂志》2005;280:34946-34955;Hubmacher等人.《生物化学杂志》2010;285:1188-1198,两者均据此通过引用整体并入)。通过纤连蛋白的同型半胱氨酸化进一步削弱了这一过程，从而阻止原纤蛋白-1多聚化所必需的纤连蛋白-原纤蛋白复合物的形成(参见Hubmacher等人.《生物化学》2011;50:5322-5332,其据此通过引用整体并入)。这些发现表明，升高的Hcy水平对ECM的形成具有不利影响。

[0332] 在健康个体中，原纤蛋白集合体(即微原纤维)通过储存和激活转化生长因子-β(TGF-β)和骨形态发生蛋白(BMP)，在骨矿化中发挥重要作用(参见Nistala等人.《纽约科学院年报(Ann N Y Acad Sci)》1192:253-256;Nistala等人.《生物化学杂志》2010;285:34126-34133,两者均据此通过引用整体并入)。TGF-β和BMP的受损的激活可能导致在马凡氏综合征和HCU中观察到的骨骼表型，并且还可能降低骨矿物质含量，如在轻度形式的HCU中观察到的(参见Herrmann等人.《临床化学(Clin Chem)》2005;51:2348-2353,其据此通过引用整体并入)。此外，存在体内和体外证据表明，Hcy可能通过减少的胶原交联形成而削弱骨强度(参见Kang等人.《临床研究杂志》1973;52:2571-2578,其据此通过引用整体并入)。总之，这些数据表明，在儿童期和青春期(骨骼生长的关键时期)期间的骨量增加在患有HCU的患者中是不足的，并且这可能对峰值骨量的获得造成负面影响。

[0333] 除了对骨沉积的影响之外，升高的Hcy水平通过增加破骨细胞(OC)活性和降低成骨细胞(OB)活性来增加骨重塑的速率(参见Behera等人.《细胞生理学杂志》2016;Herrmann

等人.《临床化学》2005;51:2348-2353;Vacek等人.《临床化学实验室医学》2013;51:579-590;Vijayan等人.《内分泌学杂志(J Endocrinol)》2017;233:243-255,其各自据此通过引用整体并入)。OB和OC活性之间的不平衡可导致骨骼脆弱和骨折发生率增加。导致Hcy介导的OB活性降低的机制被认为包括减少的骨血流量(降低的NO可用性的结果)(参见Tyagi等人.《血管健康和风险管理(Vasc Health RiskManag)》2011;7:31-35,其据此通过引用整体并入本文)和OB凋亡率的增加(参见Behera等人.《细胞生理学杂志》2016;Kim等人.《骨(Bone)》2006;39:582-590,两者均据此通过引用整体并入)。导致OC活性增强的机制被认为包括细胞内ROS水平的增加,其通过增加的基质金属蛋白酶(MMP)活性来增强OC分化和OC活性(参见Vacek等人.《临床化学实验室医学》2013;51:579-590,其据此通过引用整体并入)和抑制OC凋亡(参见Behera等人.《细胞生理学杂志》2016;Herrmann等人.《临床化学》2005;51:2348-2353;Koh等人.《骨与矿物质研究杂志(JBone Miner Res)》2006;21:1003-1011,其各自据此通过引用整体并入)。事实上,最近一项对喂食高Hcy饮食的CD1小鼠的研究表明,短期(7天)Hcy施用与组织矿物质密度(TMD)的损失和OC数量的增加有关,而长期Hcy施用(30天)导致OC重编程、凋亡和矿化,这恢复了TMD但损害了组织生物力学特性(参见Vijayan等人.《内分泌学杂志》2017;233:243-255,其据此通过引用整体并入)。

[0334] 因此,升高的Hcy水平可以通过两种截然不同的途径导致骨脆性和骨折(参见Behera等人.《细胞生理学杂志》2016,其据此通过引用整体并入)。第一种通过受损的ECM形成和抑制原纤蛋白-1相关的TGF-β和BMP的激活,导致儿童期和青春期期间的骨量增加的减少。第二种途径通过增加的OC和降低的OB活性导致受损的骨重塑,从而导致脆骨症。

[0335] 升高的Hcy水平与骨微环境中增加的氧化应激有关。增加的ROS会诱导成骨细胞凋亡,从而减少成骨细胞的生成。氧化应激的这种增加通过产生超氧阴离子进一步降低NO的可用性,这也可能降低骨血流量和血管生成。由这一过程产生的ROS通过单核细胞融合激活破骨细胞的生成,进一步导致BMD的丧失,从而导致骨质疏松。

[0336] 最近在新生CBS敲除(KO)小鼠中进行的一项研究(以没有Met限制的标准啮齿动物食物供养)发现,使用重组PEG化的人截短的CBS(PEG-CBS)皮下施用CBS ET持续5个月防止了这些动物的骨矿物质密度的降低,并且还可以使这些值在以后治疗的动物的生命中正常化(参见Majtan等人.“酶替代预防鼠高胱氨酸尿症中的新生儿死亡、肝损伤和骨质疏松”.《美国实验生物学学会联合会杂志》2017,其据此通过引用整体并入)。在这项研究中,表征KO模型和HCU患者的身体成分的变化被阻止。在血浆和组织两者中,tHcy和Cys水平被正常化,Cth水平被增加,并且SAM/SAH比率被改善。

[0337] Hcy降低对骨骼结果的影响的支持性证据来自对25名患有HCU的爱尔兰患者的25年调查(参见Yap等人.《遗传代谢疾病杂志》1998;21:738-747,其据此通过引用整体并入)。在本研究中,在由NBS鉴定的三名治疗非依从性患者中的一名中以及在四名诊断较晚(两岁时)的患者中的一名中出现了骨质疏松(通过放射学检查而不是DXA诊断)。对早期治疗(从6周龄开始)具有依从性的18名患者均未出现骨质疏松的体征。

[0338] 在韩国对五名HCU患者(3名男孩和3名女孩)进行了一项小型研究,所有患者均在年幼时被诊断出(3名在NBS期间,2名在7岁时),且在3.4年内具有良好的代谢控制(参见Lim等人.《国际骨质疏松》2013;24:2535-2538,其据此通过引用整体并入)。诊断时平均血浆tHcy水平为34.3±52.6(13-78.6)μmol/l。血浆Met为716±1347.6(24.3-1566)μmol/l,并

且治疗包含用吡哆醇、甜菜碱和叶酸补充低Met饮食。所有患者的身体成分测量值和BMD均在韩国群体的正常范围内，并且未观察到骨骼形态随时间的显著变化。三名患者(60％)具有轻度T-L脊柱侧凸(Cobb角7.3°、7.6°和10.3°)，并且在三名患者中报告了四次骨折。其中，两起是由运动损伤引起的，一起是由交通事故引起的。通过放射线照相术检测到两例轻度腰椎压缩性骨折，并记录了严重背痛病史。接受早期诊断的患者比接受后期诊断的患者显示较少的骨骼异常。然而，本研究显示，即使接受通过NBS的早期诊断的患者(其依从饮食治疗并且具有仅轻微至中度升高的tHcy水平)在儿童期也已经表现出骨骼异常和多发性骨折。

[0339] 总之，这些发现表明早期降低Hcy的治疗对患有HCU的患者的骨骼结果有益。应当注意，在治疗依从性患者中，tHcy水平降低但未正常化，并且虽然在这些患者中出现较少的骨骼异常，但在这个主要是年轻的患者组中发现显著的负面临床结果(骨质疏松和骨折)。

[0340] 目前的研究表明，HCU患者中的BMD和Z评分与血浆tHcy和膳食蛋白质摄入之间呈正相关，表明不足的蛋白质摄入可能在增加这些患者的骨骼脆性中起作用。血浆tHcy水平<100μM的患者具有比水平>100μM的患者大得多的骨骼脆性(实施例6;图2)。在所有三个测试的骨部位处的血浆tHcy水平与BMD之间存在正相关(皮尔逊(Pearson)的r＝0.33至0.51;p<0.03;表8)。此外，较高的BMD与较高的总膳食蛋白质摄入相关。事实上，长期限制总蛋白质摄入以控制tHcy水平可能会增加患者的骨骼脆性。

[0341] 如本文所述，通过双能X射线吸收法(DXA)评估的BMD和Z评分(参见实施例6)可以作为评估HCU患者中的治疗的疗效的可靠终点。因此，如本文所述的包括酶疗法的治疗方法可以用于放松HCU患者限制性饮食，允许患者的增加的蛋白质消耗并改善患者的骨骼脆性结果。如本文所述，ET与BMD和Z评分评估相结合，可以用于确定患者对宽松饮食的耐受性和/或对受限饮食的需求。

[0342] C.血管并发症

[0343] HCU与血管疾病之间的关系于1985年首次在由纯合的HCU引起的Hcy水平中度至重度升高的患者的流行病学研究中得到证实(参见Mudd等人.《美国人类遗传学杂志》1985;37:1-31，其据此通过引用整体并入)。

[0344] 血栓栓塞是HCU患者发病和过早死亡的主要原因(参见Mudd等人.《美国人类遗传学杂志》1985;37:1-31;Karaca等人.《基因(Gene)》2014;534:197-203;Yap S.《遗传代谢疾病杂志》2003;26:259-265，其各自据此通过引用整体并入)。患有未治疗的HCU的患者中血栓栓塞事件的总体发生率为每年大约10％(参见Cattaneo M.《血栓形成和止血研讨会(Semin Thromb Hemost)》2006;32:716-723，其据此通过引用整体并入)，且风险在手术后和在怀孕期间或在怀孕后立即增加(参见Mudd等人.《美国人类遗传学杂志》1985;37:1-31;Novy等人.《血栓形成和止血(Thromb Haemost)》2010;103:871-873，两者均据此通过引用整体并入)。血栓栓塞可影响任何血管，但静脉血栓形成(特别是CSVT)在患有HCU的患者中比动脉血栓形成更常见(参见Mudd等人.《美国人类遗传学杂志》1985;37:1-31;Karaca等人.《基因》2014;534:197-203;Eslamiyeh等人.《伊朗儿童神经病学杂志(Iran Child Neurol)》2015;9:53-57;Saboul等人.《儿童神经病学杂志》2015;30:107-112，其各自据此通过引用整体并入)。脑血管意外(尤其是CSVT)已经在婴儿中描述(参见Mahale等人.《儿科神经病学杂志(J PediatrNeurosci)》.2017年4月-6月;12(2):206-207，其据此通过引用整

体并入),尽管更典型地出现在年轻人中(参见Yap等人.《动脉硬化血栓血管生物学》2001;21:2080-2085,其据此通过引用整体并入)。

[0345] 血栓栓塞事件的风险到16岁时为大约25%,并且到29岁时为大约50%。1999年,Hankey等人报告,HCU的所有三种遗传原因(HCU、MTHFR缺乏症和维生素B_{12}缺乏)都与过早发生心血管(CV)疾病的高风险有关,在30岁之前影响所有纯合子的一半(参见Hankey等人.《柳叶刀》1999;354:407-413,其据此通过引用整体并入)。所有三种障碍共同的唯一生化变化是升高的血清Hcy水平(通常大于100μmol/L)(参见Faeh等人.《瑞士医学周刊(Swiss MedWkly)》2006;136:745-756,其据此通过引用整体并入)。几份报告描述了降低tHcy水平的治疗如何显著降低HCU患者中血管事件(发病的主要原因)的发生率(参见Yap等人.《遗传代谢疾病杂志》2001;24:437-447;Wilcken DE,Wilcken B.“高胱氨酸尿症的血管疾病的自然史和治疗效果(The natural history of vascular disease in homocystinuria andthe effects oftreatment)”.《遗传代谢疾病杂志》1997;20:295-300,两者均据此通过引用整体并入)。此后,许多其他研究表明,HCU患者中的血管事件尤其是静脉血栓形成的风险增加(参见Karaca等人.《基因》2014;534:197-203;Kelly等人.《神经病学》2003;60:275-279;Lussana等人.《血栓形成研究(Thromb Res)》2013;132:681-684;Magner等人.《遗传代谢疾病杂志》2011;34:33-37,其各自据此通过引用整体并入)。

[0346] 升高的血浆tHcy水平是患有伴有和不伴有HCU的冠状动脉疾病的患者中血管疾病的风险因素和死亡率的强预测因子(参见Mudd等人.《美国人类遗传学杂志》1985;37:1-31;Karaca等人.《基因》2014;534:197-203;Kelly等人.《神经病学》2003;60:275-279;Faeh等人.《瑞士医学周刊》2006;136:745-756;Boushey等人.《美国医学会杂志》1995;274:1049-1057;Clarke R等人.《美国医学会杂志》2002;288:2015-2022;Hankey等人.《柳叶刀》1999;354:407-413;Khan等人.《中风(Stroke)》2008;39:2943-2949;Graham等人.欧洲协同行动项目(The European Concerted Action Project).《美国医学会杂志》1997;277:1775-1781;Clarke等人.《新英格兰医学杂志》1991;324:1149-1155;Clarke等人.《爱尔兰医学科学杂志(Ir J Med Sci)》1992;161:61-65;Woodward等人.《血液凝固和纤维蛋白溶解(Blood Coagul Fibrinolysis)》2006;17:1-5;Refsum等人.《医学年度评论(Annu Rev Med)》1998;49:31-62;Yoo等人.《中风》1998;29:2478-2483;Selhub等人.《新英格兰医学杂志》1995;332:286-291;Wald等人.《英国医学杂志(BMJ)》2002;325:1202;Bautista等人.《临床流行病学杂志(J Clin Epidemiol)》2002;55:882-887;Brattstrom等人.《动脉粥样硬化》1990;81:51-60;Lussana等人.《血栓形成研究》2013;132:681-684;Casas等人.《柳叶刀》2005;365:224-232;McCully KS.《美国病理学杂志(Am J Pathol)》1969;56:111-128;Magner等人.《遗传代谢疾病杂志》2011;34:33-37;Wilcken等人.《临床研究杂志》1976;57:1079-1082;Nygard等人.《新英格兰医学杂志》1997;337:230-236;其各自据此通过引用整体并入)。尽管有证据表明tHcy水平与CV风险之间存在关系(参见Boushey等人.《美国医学会杂志》1995;274:1049-1057,其据此通过引用整体并入),但tHcy与中风/外周动脉疾病之间的关系相当强(参见Clarke等人.《美国医学会杂志》2002;288:2015-2022;Khan等人.《中风》2008;39:2943-2949;Wald等人.《英国医学杂志》2002;325:1202;Casas等人.《柳叶刀》2005;365:224-232;Brattstrom等人.《止血(Haemostasis)》1989;19补刊1:35-44;其各自据此通过引用整体并入)。尽管在一般群体中进行的大型研究(NORVIT、HOPE-2、VITATOPS)

最初得出结论,降低Hcy水平对主要血管事件和复发性心血管疾病具有较小的影响,但对数据的进一步、更具体的分析已明确显示了tHcy减少对中风的临床益处。

[0347] 有相当多的证据表明,在tHcy水平轻度升高的一般群体中,降低Hcy可降低中风风险(参见Saposnik等人.《中风》2009;40:1365-1372;Huo等人.《美国医学会杂志》2015;313:1325-1335;Lonn等人.《新英格兰医学杂志》2006;354:1567-1577;Hankey等人.《柳叶刀神经病学》2012;11:512-520;Spence JD,《柳叶刀神经病学》2007年9月;6(9):830-8,其各自据此通过引用整体并入)。在5,552名患者的HOPE-2研究中(参见Saposnik等人.《中风》2009;40:1365-1372,其据此通过引用整体并入),tHcy水平的轻微降低(3mmol/L相对于安慰剂)导致中风发生率的显著降低(27%相对风险降低,1.3%绝对风险降低),表明即使tHcy水平的小幅降低也可以是有益的。这种效应在基线Hcy位于上四分位数的具有4.3%绝对风险降低的患者中最为明显。虽然尚不清楚降低Hcy是否会影响具有轻度升高的tHcy和无HCU的患者的总体CV结果(参见Marti-Carvajal等人.《Cochrane系统综述数据库》2015;1:CD006612,其据此通过引用整体并入),但其血管益处已在患有HCU的患者中得到一致证实(参见Yap等人.《遗传代谢疾病杂志》1998;21:738-747;Eslamiyeh等人.《伊朗儿童神经病学杂志》2015;9:53-57;Saboul等人.《儿童神经病学杂志》2015;30:107-112;Yap等人.《动脉硬化血栓血管生物学》2001;21:2080-2085;Woods等人.《英国医学杂志病例报告(BMJ Case Rep)》2017;Wilcken等人.《遗传代谢疾病杂志》1997;20:295-300;Yap等人.《血栓形成和止血研讨会》2000;26:335-340;Ruhoy等人.《儿科神经病学(PediatrNeurol)》2014;50:108-111,其各自据此通过引用整体并入)。

[0348] 1.机制

[0349] 许多研究已经表明,升高的Hcy水平通过氧化应激相关机制促进动脉粥样硬化或血栓形成的发展(参见Faverzani等人.《细胞分子神经生物学》2017;Nowak等人.《动脉硬化血栓血管生物学》2017;37:e41-e52;Vanzin等人.《分子遗传学代谢》,2011;104:112-117;Vanzin等人.《基因》2014;539:270-274;Vanzin等人.《细胞分子神经生物学》2015;35:899-911;其各自据此通过引用整体并入),包括通过NF-κB的炎症和免疫激活(参见Rodriguez-Ayala等人.《动脉粥样硬化(Atherosclerosis)》2005;180:333-340;van Guldener等人.《当前的高血压报告(Curr Hypertens Rep)》2003;5:26-31,两者均据此通过引用整体并入)。导致血栓形成的内侧损伤被认为是由以下引起的:Hcy介导的内皮功能障碍(参见Jiang等人.《动脉硬化血栓血管生物学》2005;25:2515-2521;Hossain等人.《生物化学杂志》2003;278:30317-30327;Cai等人;《血液(Blood)》2000;96:2140-2148;Zhang等人;《生物化学杂志》2001;276:35867-35874;Papapetropoulos等人.《美国国家科学院院刊》2009;106:21972-21977;Szabo等人.《英国药理学杂志》2011;164:853-865;Chiku等人.《生物化学杂志》2009;284:11601-11612;Wang等人.《抗氧化剂和氧化还原信号》2010;12:1065-1077;Saha等人.《美国实验生物学学会联合会杂志》2016;30:441-456;Ebbing等人.《美国医学会杂志》2008;300:795-804;Bonaa等人.《新英格兰医学杂志》2006;354:1578-1588;Marti-Carvajal等人.《Cochrane系统综述数据库》2015;1:CD006612;Celermajer等人.《美国心脏病学会杂志(JAm Coll Cardiol)1993;22:854-858;Rubba等人.《代谢》1990;39:1191-1195;其各自据此通过引用整体并入)、增强的凝血途径(参见Spence JD.《国际中风杂志(Int J Stroke)》2016年10月;11(7):744-7;Fryer等人.《动脉硬化血栓形成

(Arterioscler Thromb)》1993;13:1327-1333;Lentz等人.《临床研究杂志》1991;88:1906-1914;其各自据此通过引用整体并入)和增加的血管扩张。这种促血栓形成机制类似于在马凡氏患者中观察到的机制(参见Kelly等人.《神经病学》2003;60:275-279;Tripathi P.《国际心血管论坛杂志(International Cardiovascular Forum J)》2016;6:13;van Guldener等人.《当前的高血压报告》2003;5:26-31;Hackam等人.《美国医学会杂志》2003;290:932-940;Baumbach等人.《循环研究(Circ Res)》2002;91:931-937;Evangelisti等人.《国际心脏病学杂志(Int J Cardiol)》2009;134:251-254;de Valk等人.《中风》1996;27:1134-1136,其各自据此通过引用整体并入)。

[0350] 来自27项研究(超过4,000名患者)的数据的荟萃分析得出的tHcy水平与CV风险之间的因果关系显示CV、脑血管和外周血管的动脉粥样硬化的分级风险,使得Hcy 5μM的增加时女性风险增加80%,男性风险增加60%(参见Boushey等人.《美国医学会杂志》1995;274:1049-1057,其据此通过引用整体并入)。来自涉及5073例缺血性心脏病(IHD)事件和1113例中风的30项前瞻性或回顾性研究的数据的荟萃分析发现,比正常(校正回归稀释偏倚)Hcy水平(大约3μmol/L)低25%与11%(优势比(OR),0.89;95%CI,0.83至0.96)的较低IHD风险和19%(OR,0.81;95%CI,0.69至0.95)的较低的中风风险相关(参见Clarke R等人.《美国医学会杂志》2002;288:2015-2022,其据此通过引用整体并入)。

[0351] 在患有和未患有预先存在的血管疾病的患者中进行的一项研究表明,在1/21患有MI的受试者(5%)、14/37名患有主动脉-髂动脉疾病(aorto-iliac disease)的受试者(38%)和17/53名患有脑血管疾病的受试者(32%)中,在Met负荷后血浆Hcy增加(超过可比健康对照组受试者中的最高值)。这表明Hcy水平与外周动脉疾病(PAD)和中风之间的联系比Hcy水平与MI之间的联系大得多(参见Brattstrom等人.《止血》1989;19补刊1:35-44,其据此通过引用整体并入)。在一项前瞻性研究中描述了Hcy水平与中风之间的独立分级关联,该研究在来自同一社区的457名中风患者和179名对照受试者的英国队列中进行(参见Khan等人.《中风》2008;39:2943-2949)。在患有小血管疾病(SVD)的患者中观察到最高的Hcy水平(16.2μmol/L相对于在没有中风的对照受试者中的11.8μmol/L,在对年龄、性别、血管风险因素、维生素水平和肾功能进行调整后$p<0.001$)。在SVD病例中,在患有融合性脑白质疏松症的腔隙性梗死的个体中观察到最高Hcy水平。此外,在Hcy水平与脑白质疏松症严重程度之间存在相关性($r=-0.225$;$p<0.001$)。

[0352] 这些发现得到了孟德尔(Mendelian)随机分配研究的进一步支持,证明了调节Hcy代谢的MTHFR多态性与中风风险之间的遗传关联(参见Casas等人.《柳叶刀》2005;365:224-232,其据此通过引用整体并入)。对关于Hcy水平和MTHFR TT和CC多态性与中风风险之间关系的所有相关研究进行的文献搜索,确定了111项研究,包括15,635名没有心血管疾病(CVD)的个体。TT和CC纯合子之间Hcy水平的加权平均差异为1.93μmol/L(95%CI 1.38至2.47)。基于来自前瞻性研究的先前荟萃分析的结果,其中血浆Hcy水平的5μmol/L增加对应于1.59(1.29至1.96)的中风的OR,具有TT基因型的健康个体中Hcy水平的1.93μmol/L增加将导致1.20(1.10至1.31)的中风的预期OR(参见Wald等人.《英国医学杂志》2002;325:1202,其据此通过引用整体并入)。与该结果一致,Khan等人报告了TT相对于CC纯合子,中风的OR为1.26(1.14至1.40)($p=0.29$),而与年龄组、种族或地理位置无关。总之,这些结果表明升高的Hcy水平在一般群体的中风发病机制中具有致病作用。

[0353] 在患有杂合HCU的患者中血清Hcy是否中度升高是典型的,因为血管疾病已在比在一般人群中进行的研究小得多的研究中进行了检查。根据Mudd等人,在杂合HCU(到<50岁时为5%)引起的tHcy水平轻度升高的患者中的血管事件的风险与一般群体中相似(参见Mudd等人.《美国人类遗传学杂志》1981;33:883-893,其据此通过引用整体并入)。与此一致,在患有纯合和杂合HCU的个体中进行的超声研究发现,年龄小至四岁的纯合儿童的全身动脉的内皮功能受损,而在杂合成人中内皮功能在很大程度上未受影响(参见Celermajer等人.《美国心脏病学会杂志》1993;22:854-858,其据此通过引用整体并入)。

[0354] 尽管一项类似研究显示在纯合子和杂合子中均有过早动脉疾病的体征,但患有纯合障碍的个体在更年轻时(19岁相对于45岁)出现体征,且疾病严重程度显著更高(参见Rubba等人.《代谢》1990;39:1191-1195,其据此通过引用整体并入)。

[0355] 总的来说,在HCU患者中的观察结果与来自以前的研究的观察结果一致,其中血管风险随着Hcy水平的升高而增加(参见Boushey等人.《美国医学会杂志》1995;274:1049-1057;Clarke等人.《美国医学会杂志》2002;288:2015-2022;Khan等人.《中风》2008;39:2943-2949;其各自据此通过引用整体并入)。

[0356] 这些结果表明,升高的Hcy水平是CV疾病的风险因素。此外,降低Hcy水平已经显示可显著降低一般群体和患有HCU的患者的中风的风险。

[0357] 研究表明,由HCU引起的升高的Hcy水平可通过各种机制导致动脉粥样硬化和/或血栓形成的发展。这些包括诸如氧化应激的诱导的分子事件及其下游效应,诸如激活NF-κB(活化的B细胞的核因子κ轻链增强子)——一种调节促炎和其他损伤相关基因的转录因子。各种Hcy介导的调节血管壁的理化性质的作用,诸如导致内皮功能障碍或动脉僵硬度的作用,可能会导致高血压、血栓形成或其他血管异常的发展。最后,有证据表明通过Hcy可直接诱导凝血途径,这是导致血栓形成的更直接途径(参见Faverzani等人.《细胞和分子神经生物学(Cell Mol Neurobiol)》2017;Hainsworth等人.《生物化学与生物物理学学报(Biochim Biophys Acta)》,2016;1862:1008-1017;Ganguly等人.《营养杂志《Nutr J》》2015;14:6;Tripathi P.“同型半胱氨酸在心血管疾病中的分子和生化方面(Molecular and biochemical aspects ofhomocysteine in cardiovascular diseases)”.《国际心血管论坛杂志》2016;6:13;Fryer等人.《动脉硬化血栓形成》1993;13:1327-1333;其各自据此通过引用整体并入)。在对动脉粥样硬化的分子和生化机制进行简要描述后,以下小节将回顾导致具有升高的tHcy水平的个体(包括患有HCU的患者)的血管疾病的潜在机制。

[0358] 2.动脉粥样硬化

[0359] 在最充分研究的导致血栓形成并因此导致血管阻塞的病症中,动脉粥样硬化是一种影响冠状动脉、脑和外周循环的进行性炎性疾病(参见Libby等人.《循环(Circulation)》2005;111:3481-3488,其据此通过引用整体并入)。在其早期阶段,血管损伤导致内皮细胞(EC)活化、单核细胞募集到内膜以及巨噬细胞活化。形成炎性动脉粥样硬化病变(脂肪条纹),包含单核细胞衍生的、载脂巨噬细胞(泡沫细胞)和T淋巴细胞。进行性脂质积聚形成由纤维帽包围的脂质核。在晚期阶段期间,活化的巨噬细胞分泌酶,其削弱纤维帽,导致斑块破裂、出血或血栓形成以及缺血性发作/急性冠状动脉综合征。斑块破裂使组织因子暴露于动脉腔内的血液,允许其与凝血因子VII/VIIa形成复合物。这一过程启动了凝血级联,导致血栓形成。破裂的斑块可以导致附壁或闭塞性血栓形成,分别导致部分或完全阻塞。附壁血

栓形成会导致诸如不稳定型心绞痛的缺血性症状,而闭塞性血栓形成会导致诸如MI和中风的急性冠状动脉事件。细胞因子参与动脉粥样硬化的所有阶段,并对其发病机制具有深远影响(参见Ramji等人《细胞因子和生长因子评论》2015;26:673-685,其据此通过引用整体并入)。除了继发于动脉粥样硬化之外,血栓形成也可以在没有斑块形成的情况下被激活,例如,作为心房纤维性颤动的结果或通过直接激活凝血级联。

[0360] 3.氧化应激

[0361] 对具有升高的Hcy水平的患者的研究表明,治疗的患者,尤其是未治疗的患者,易受氧化应激的影响,如通过反映各种组织中的脂质、蛋白质和DNA氧化损伤的改变的生物标记物所证明(参见Vanzin等人.《分子遗传学和代谢》2011;104:112-117;Vanzin等人.《基因》2014;539:270-274;Vanzin等人.《细胞和分子神经生物学》2015;35:899-911,其各自据此通过引用整体并入)。氧化应激(被定义为氧化还原稳态失衡)在动脉粥样硬化及其相关血栓形成等血管病变中起关键作用,其中涉及低密度脂蛋白的氧化修饰、内皮活化和血管炎性反应的启动(参见Nowak等人.《动脉硬化血栓血管生物学》2017;37:e41-e52,其据此通过引用整体并入)。氧化应激可以由ROS(例如超氧化物(O^{2-})和羟基(HO^{-})自由基及过氧化氢(H_2O_2))的增加的水平和/由或组织抗氧化剂(例如超氧化物歧化酶、过氧化氢酶(catalase)和谷胱甘肽过氧化物酶)的降低的水平引起(参见Faverzani等人.《细胞和分子神经生物学》2017;Nowak等人.《动脉硬化血栓血管生物学》2017;37:e41-e52,两者均据此通过引用整体并入)。在健康个体中,ROS是作为正常氧化代谢的副产物产生的。然而,此外,ROS的产生是由吸烟、饮酒、高胆固醇血症、高血压、糖尿病和升高的Hcy水平等CV风险因素触发的。

[0362] 在分子水平上,存在Hcy可导致增加的氧化应激的多种方式,一些已在前面讨论过。例如,免疫原性同型半胱氨酸化蛋白在血管壁中的积聚会促进炎症,从而通过活化的吞噬细胞产生ROS(O^{2-}))。另一个潜在机制是Hcy诱导的NMDA受体激活,触发导致ROS产生的信号传导通路。在心脏微血管EC中,Hcy诱导NADPH氧化酶(细胞表面酶)水平升高,尤其是在活化细胞中,产生高水平的O^{2-}。近期研究(参见Chen等人.《科学报告》2017年7月31日;7(1):6932,其据此通过引用整体并入)表明,在缺血大鼠脑中,Hcy诱导线粒体功能障碍,预期结果是ROS产生增加。Hcy还被认为会降低有益血管舒张剂NO的生物利用度。O^{2-}与NO反应以生成活性氮物种过氧亚硝酸盐,并且事实上,还报告了Hcy诱导的酪氨酸硝化的增加,酪氨酸硝化是过氧亚硝酸盐诱导的蛋白质损伤的指标(参见Tyagi等人.《血管健康和风险管理》2011;7:31-35,其据此通过引用整体并入)。更广泛地说,涉及Hcy的硫醇-硫醇相互作用预计会干扰细胞氧化还原状态,例如,潜在地降低还原型谷胱甘肽的可用性,并且甚至损害蛋白质的组装和折叠。

[0363] 在一项针对HCU患者的治疗之前和之后的研究中,用吡哆醇、叶酸、甜菜碱和维生素B_{12}补充剂的治疗减轻了患者的脂质氧化损伤,但未改变巯基含量或总抗氧化状态,这两项指标均为组织抗氧化能力。然而,在巯基基团含量与Hcy水平之间存在显著的负相关,并且在脂质过氧化产物丙二醛的水平与Hcy的水平之间存在正相关。这表明Hcy在HCU中观察到的氧化损伤中具有潜在的机制作用(参见Vanzin等人.《分子遗传学和代谢》2011;104:112-117,其据此通过引用整体并入)。在未治疗和治疗的HCU患者的血浆中观察到改变的脂质概况,特别是高密度脂蛋白的降低的水平和促炎脂质物种的富集(参见Vanzin等人.《细胞和分子神经生物学》2015;35:899-911,其据此通过引用整体并入)。在另一项研究中,在

HCU患者中报告了比在健康个体中明显更多的DNA损伤(参见Vanzin等人.《基因》2014;539:270-274,其据此通过引用整体并入)。总之,这些发现表明氧化应激在与升高的Hcy水平相关的血管损伤的发病机制中。未发现在Met水平与任何氧化应激相关参数之间存在相关性,这表明Met及其衍生物对HCU中的氧化损伤贡献很小(参见Vanzin等人.《分子遗传学和代谢》2011;104:112-117,其据此通过引用整体并入)。

[0364] 在众多其他分子效应中,氧化应激与NF-κB的激活有关,NF-κB是一组调节促炎基因(诸如细胞因子)的表达的转录因子,已知参与动脉粥样硬化和血栓形成的起始和进展(参见Rodriguez-Ayala等人.《动脉粥样硬化》2005;180:333-340,其据此通过引用整体并入)。体外研究表明,用Hcy治疗EC通过产生ROS来激活NF-kβ(参见van Guldener等人.《当前的高血压报告》2003;5:26-31,其据此通过引用整体并入)。除了调节基因表达,通过氧化应激对细胞大分子的化学修饰还可以直接影响脉管系统的结构和功能,并具有其他局部效应或全身效应,如本节其余部分所述。

[0365] 4.血管壁的变化

[0366] 内皮功能障碍通常被定义为调节血管收缩和舒张的内皮相关因子之间的失衡。在这些因素中,NO或"内皮源性舒张因子"最为著名,而硫化氢(H_2S)是最近描述的另一种因素(参见Jiang等人.《动脉硬化血栓血管生物学》2005;25:2515-2521,其据此通过引用整体并入)。几项体外研究检查了Hcy对内皮功能的影响,尽管使用非常高水平的Hcy(参见Jiang等人.《动脉硬化血栓血管生物学》2005;25:2515-2521;Hossain等人.《生物化学杂志》2003;278:30317-30327;Cai等人.《血液》2000;96:2140-2148;Zhang等人.《生物化学杂志》2001;276:35867-35874;其各自据此通过引用整体并入)。一项此类研究报告了用Hcy治疗的人脐静脉内皮细胞(HUVEC)中的未折叠蛋白应答和程序性细胞死亡,尽管Hcy浓度比在Hcy水平严重升高的患者中观察到的高几倍(参见Zhang等人.《生物化学杂志》2001;276:35867-35874,其据此通过引用整体并入)。在其他报告中,Cthγ-裂解酶(CGL)(一种参与Cth代谢的酶)在Hcy水平升高的患者中产生过量H_2S(参见Papapetropoulos等人.《美国国家科学院院刊》2009;106:21972-21977;Szabo C等.《英国药理学杂志(Br JPharmacol)》2011;164:853-865;Chiku等人.《生物化学杂志》2009;284:11601-11612,其各自据此通过引用整体并入)。这一观察结果很重要,因为据报告,增加的H_2S水平会显著增加侧支血管生长、毛细血管密度和局部组织血流量(参见Wang等人.《抗氧化剂和氧化还原信号》2010;12:1065-1077,其据此通过引用整体并入)。然而,在体外,高Hcy水平(0.002至2mM)并未显著影响EC增殖或磷-eNOS水平(参见Saha等人."胱硫醚β-合酶通过蛋白质S-巯基化(S-sulfhydration)调节内皮功能(Cystathionine beta-synthase regulates endothelial function via protein S-sulfhydration)".《美国实验生物学学会联合会杂志》2016;30:441-456,其据此通过引用整体并入)。总体而言,这些结果表明了Hcy在内皮功能障碍中的可能作用,但由于体外测试的较高Hcy水平,尚不清楚Hcy是否直接影响体内EC。

[0367] 在最近的一项药理学和遗传学研究中,EC中CBS功能的丧失与细胞H_2S减少50%和谷胱甘肽减少400%以及伴随的细胞ROS水平增加有关(参见Saha等人.《美国实验生物学学会联合会杂志》2016;30:441-456,其据此通过引用整体并入)。EC中CBS沉默会损害对血管内皮生长因子(VEGF)的表型和信号传导反应,而通过血管内皮生长因子受体-2(VEGFR-2)和神经纤毛蛋白-1(NRP-1)(调节诸如血管生成的内皮功能的主要受体)的减少的转录会加

剧这种效应。VEGFR-2和NRP-1的转录下调是由转录因子特异性蛋白1(Sp1)(H_2S的一个巯基化靶点)的降低的稳定性介导的。在CBS沉默的EC中补充H_2S(而非谷胱甘肽)恢复了Sp1水平和Sp1与VEGFR-2启动子的结合,以及增加了VEGFR-2和NRP-1的表达和VEGF依赖性细胞增殖和迁移。这表明,CBS介导的蛋白质S-巯基化对维持血管健康和功能很重要,支持了先前的观察,即患有HCU的患者表现出内皮功能障碍(见Celermajer等人.《美国心脏病学会杂志》1993;22:854-858;Rubba等人.《代谢》1990;39:1191-1195,两者均据此通过引用整体并入)并提出除了在具有由其他原因引起的Hcy水平升高的个体中观察到的血管损伤的类型之外,HCU患者还遭受另外的和不同类型的血管损伤的可能性。

[0368] 内皮功能失调或对血管收缩性的其他影响可导致血压(BP)异常。血浆Hcy水平与BP直接相关,并且使用叶酸降低Hcy与降低的BP相关(参见Tripathi P.“心血管疾病中同型半胱氨酸的分子和生化方面”.《国际心血管论坛杂志》2016;6:13;Hackam等人.《美国医学会杂志》2003;290:932-940,两者均据此通过引用整体并入)。虽然导致这些影响的机制尚不清楚,但Hcy水平与收缩压的相关性比与舒张压BP的相关性更强。这表明升高的Hcy水平会增加动脉僵硬度。动脉僵硬度在很大程度上由平滑肌细胞(SMC)的数量和功能、ECM中胶原蛋白:弹性蛋白的比率、胶原蛋白的质量和内皮功能决定(参见Tripathi P.“心血管疾病中同型半胱氨酸的分子和生化方面”.《国际心血管论坛杂志》2016;6:13,其据此通过引用整体并入)。

[0369] 由于增加的SMC增殖、胶原蛋白生成和弹性蛋白纤维形成,高水平的Hcy可能与增加的动脉僵硬度相关(参见van Guldener等人.《当前的高血压报告》2003;5:26-31,其据此通过引用整体并入)。然而,Hcy也可能通过削弱胶原交联来降低动脉僵硬度。在对小型猪进行的一项研究中,饮食诱导的Hcy升高导致了“巨动脉综合征”,伴有高搏动动脉、收缩期(而非舒张期)高血压和伴有主动脉扩张的导管动脉长期反应性充血(参见van Guldener等人.“同型半胱氨酸和血压(Homocysteine and bloodpressure)”.《当前的高血压报告》2003;5:26-31,其据此通过引用整体并入)。还存在动脉壁弹性层的碎裂,其与主动脉僵硬度相关。

[0370] 与这些发现一致,在对有和没有HCU的小鼠进行的研究发现,与在喂食对照饮食的CBS+/+($324\pm18m^2$)小鼠中相比,脉管壁的横截面积在喂食对照饮食($437\pm22M^2$)的CBS+/-小鼠和喂食高Met饮食的CBS+/+($442\pm36m^2$)和CBS+/-($471\pm46m^2$)小鼠中显著更大($p<0.05$)(参见Baumbach等人.“胱硫醚β-合酶缺乏小鼠中脑小动脉的结构(Structure ofcerebral arterioles in cystathionine beta-synthase-deficient mice)”.《循环研究》2002;91:931-937,其据此通过引用整体并入)。

[0371] 在最大血管舒张期间,接受对照饮食的CBS+/-小鼠以及接受高Met饮食的CBS+/+和CBS+/-小鼠的脑小动脉中的应力-应变曲线移至接受对照饮食的CBS+/+小鼠的曲线的右侧。这表明在血浆tHcy水平升高的小鼠中脑小动脉扩张性更强。这些结果表明,升高的Hcy水平会诱发脑血管肥大并改变脑血管力学,这两种效应都可能导致血栓形成的发生率增加,例如中风,即使没有动脉粥样硬化(参见Baumbach等人.《循环研究》2002;91:931-937,其据此通过引用整体并入)。

[0372] 升高的Hcy对血管舒张作用的进一步支持来自对5名患有HCU且tHcy水平在193.6至342μmol/L范围内的意大利患者的研究(参见Evangelisti等人.《国际心血管杂志》2009;

134:251-254,其据此通过引用整体并入)。患者表现出轻度心脏瓣膜脱垂和/或反流和结缔组织表现的体征。

[0373] 5.血栓形成

[0374] 升高的Hcy水平与深静脉血栓形成、脑窦血栓形成和视网膜静脉血栓形成的较高的风险相关(参见Spence JD.《柳叶刀神经病学》2007年9月;6(9):830-8,其据此通过引用整体并入),尽管多项研究未能发现与MI的风险的关联。与这些结果一致,额外的尽管较小的研究表明,HCU与血栓形成有关,但不一定与动脉粥样硬化有关。患有家族性高胆固醇血症(FH)和HCU的患者的血管成像显示,虽然FH患者表现出颈动脉的弥漫性和局灶性增厚以及内皮功能障碍导致血流量减少,但HCU患者在其颈动脉中很少具有斑块,并且在大脑中动脉中的中膜厚度(IMT)和血流速度方面与健康对照受试者相似(参见Rubba等人.《中风》1994;25:943-950,其据此通过引用整体并入)。本研究表明,在HCU中,在血栓形成事件之前可能不需要典型的动脉粥样硬化病变,并且导致血栓形成的内侧损害也可能由动脉扩张引起。

[0375] 对这一观察结果的支持来自一项研究,该研究比较了13名患有经酶促证实的杂合HCU的患者的颈动脉粥样硬化和股动脉粥样硬化的患病率(由IMT和踝臂指数确定),并与12名具有正常的Met负荷测试结果的健康受试者进行了比较(参见de Valk等人.《中风》1996;27:1134-1136,其据此通过引用整体并入)。在各组之间在五个动脉段中的每一个的平均IMT值、IMT频率分布或IMT方面未观察到显著差异。这些结果可能通过以下事实来解释:即杂合个体太年轻(均<50岁)以至于不能发生血管结构变化。然而,这些数据也表明,升高的Hcy水平可能主要影响凝血级联,至少在较年轻的患者中影响凝血级联。实际上,三例不相关的HCU患者的病例报告发现,一名患者因腔内血栓形成而经历中风,另一名患者经历心脏或动脉血栓栓塞,也没有颅颈动脉粥样硬化的证据(参见Kelly等人.《神经病学》2003;60:275-279,其据此通过引用整体并入)。

[0376] 与这些观察结果一致,向HUVEC和CV1 EC中添加Hcy会使抗凝剂、蛋白C和血栓调节蛋白不可逆失活(参见Lentz等人.《临床研究杂志》1991;88:1906-1914,其据此通过引用整体并入)。此外,向培养的人EC中添加Hcy会以时间和浓度依赖的方式增加促凝血组织因子活性(参见Fryer等人.《动脉硬化血栓形成》1993;13:1327-1333,其据此通过引用整体并入)。

[0377] 在两项研究中,Hcy通过涉及其游离硫醇基团的机制来增强凝血途径。总之,这些数据支持这样的假设,即血管凝血机制的扰动导致患有HCU的患者的血管风险增加,并且这可能在Hcy对动脉粥样硬化的影响变得明显之前在HCU患者中发挥了更早的作用。

[0378] 在HCU患者和一般群体中,降低血浆Hcy水平降低血管并发症(尤其是中风)的风险

[0379] 最近的分析已经发现,在一般群体中,在升高的tHcy与中风风险之间具有很强的联系(参见Saposnik等人.《中风》2009;40:1365-1372;Spence JD.“降低同型半胱氨酸以用于中风预防:揭示证据的复杂性(Homocysteine lowering for stroke prevention: Unravelling the complexity ofthe evidence)”《国际中风杂志》2016年10月;11(7):744-7;Hankey等人.《柳叶刀神经病学》2012;11:512-520,其各自据此通过引用整体并入)。

[0380] 过去,在Hcy水平升高的患者中,降低Hcy的干预的益处似乎喜忧参半,其中一些研究显示血管风险的降低(参见Yap等人.《遗传代谢疾病杂志》1998;21:738-747;Yap等人.

《动脉硬化血栓血管生物学》2001;21:2080-2085;Wilcken等人.《遗传代谢疾病杂志》1997;20:295-300;Yap等人.《血栓形成和止血研讨会》2000;26:335-340;Saposnik等人.《中风》2009;40:1365-1372;Huo等人.《美国医学会杂志》2015;313:1325-1335;Hankey等人.《柳叶刀神经病学》2012;11:512-520,其各自据此通过引用整体并入)并且其他数据未显示益处(参见Marti-Carvajal等人.《Cochrane系统综述数据库》2015;1:CD006612;Ebbing等人.《美国医学会杂志》2008;300:795-804;Bonaa等人.《新英格兰医学杂志》2006;354:1578-1588;Liem等人.《心脏(Heart)》2005;91:1213-1214;Toole等人.《美国医学会杂志》2004;291:565-575;在维生素预防中风(VITATOPS)试验中患有近期短暂性脑缺血发作或中风的患者的B族维生素:一项随机、双盲、平行、安慰剂对照试验(参见《柳叶刀神经病学》2010;9:855-865;Albert等人.《美国医学会杂志》2008;299:2027-2036,其各自据此通过引用整体并入)。这些试验中的许多试验测试了降低Hcy的维生素干预,主要是B族维生素(B_6和B_{12})和叶酸补充。因此,研究结果会受到混杂因素的影响,诸如受试者是否居住在实施叶酸强化的地区,是否具有使他们更易受钴胺素毒性影响的肾功能不全,是否具有与不良吸收相关的维生素B_{12}缺乏症(这在老年人中相对常见),或者是否在接受抗血小板药物治疗。这些最近的分析考虑了这些混杂因素,并得出结论,当考虑到这些关键变量时,升高的tHcy会增加一般群体的中风的风险(参见Mudd等人.《动脉硬化血栓血管生物学》2000;20:1704-1706;Spence JD.《国际中风杂志》2016年10月;11(7):744-7;Spence JD,《临床化学实验室医学》2013年3月1日;51(3):633-7,其各自据此通过引用整体并入)。

[0381] 即使在没有HCU的个体中,降低Hcy的疗法也降低中风的风险。在HOPE-2(心脏结果预防评估2)试验中,5,522名年龄≥55岁、有血管疾病或糖尿病史以及至少一个附加CV风险因素的成年人被随机分配服用维生素补充(叶酸、维生素B_6和维生素B_{12})或安慰剂持续5年(参见Saposnik等人.《中风》2009;40:1365-1372,其据此通过引用整体并入)。在两组中平均基线Hcy浓度均为11.5μmol/L,并且在基线时每日服用含>0.2mg叶酸的维生素补充剂的患者从本研究中排除。总体而言,Hcy降低(平均3.0μmol/L相对于安慰剂)与中风的相对风险显著降低27%(绝对降低1.3%)(HR,0.75;95%CI,0.59至0.97)和缺血性中风(HR,0.81;95%CI,0.60至1.09)和出血性中风(HR,0.80;95%CI,0.32至2.02)的无显著减少相关。在子组分析中,在基线Hcy水平处于最高四分位数的患者中,中风的相对风险降低最多(绝对风险降低4.3%)。在年龄<69岁的患者、来自未进行叶酸食物强化的地区的患者以及在招募时未接受抗血小板或降脂药物的患者中治疗益处最大。因此,HOPE-2试验报告在接受B族维生素相对于安慰剂的个体中,中风的发生率降低(危险比(HR)0.75;95%CI,0.59至0.97),而在两个治疗组中MI的风险相似(RR 0.98;95%CI,0.85至1.14)(参见Saposnik等人.《中风》2009;40:1365-1372;Lonn E,YusufS,Arnold MJ等人."在血管疾病中用叶酸和B族维生素降低同型半胱氨酸(Homocysteine lowering with folic acid and B vitamins in vascular disease)".《新英格兰医学杂志》2006;354:1567-1577,两者均据此通过引用整体并入)。

[0382] 与来自HOPE-2试验(VITATOPS试验的一个亚分析)的结果一致,在该试验中,8,164名患有近期中风或短暂性脑缺血发作的患者被随机分配接受用B族维生素或安慰剂的双盲治疗持续3.4年的中位时间,发现B族维生素显著降低了基线时未接受抗血小板疗法的患者的主要综合结果(中风、MI或来自血管原因的死亡)(17%相对于使用安慰剂的21%;HR

0.76,0.60至0.96)。在接受抗血小板疗法的个体中未观察到B族维生素的显著影响(参见Hankey等人.“抗血小板疗法和B族维生素对患有先前中风或短暂性脑缺血发作的患者的影响:VITATOPS的事后亚分析,一项随机、安慰剂对照试验(Antiplatelet therapy and the effects of B vitamins in patients with previous stroke or transient ischemic attack:a post-hoc sub-analysis ofVITATOPS,a randomized,placebo-controlled trial)”.《柳叶刀神经病学》2012;11:512-520,其据此通过引用整体并入)。在本研究中,无论患者是否接受抗血小板疗法(对于两个治疗组p<0.0001),tHcy水平均从基线时的12.4至13.7μmol/L显著降低至维生素疗法后的9.9至10.5μmol/L(参见Hankey等人.《柳叶刀神经病学》2012;11:512-520,其据此通过引用整体并入)。

[0383] 炎性级联被认为有助于缺血性中风的发病机制。来自Framingham后代研究的3,224名参与者的报告(参见Shoamanesh等人.《神经病学》2016年9月;87(12):1206-11,其据此通过引用整体并入)发现,tHcy的升高的水平和其他三种炎性标记物与缺血性中风的风险密切相关,并提高了Framingham中风风险评分的预测能力。

[0384] 对来自VISP和VITATOPS研究的数据的荟萃分析发现,以前未暴露于高剂量氰钴胺素的肾功能正常的患者从包括高剂量氰钴胺素在内的维生素疗法中显著获益(0.78,0.67至0.90;相互作用p=0.03),而包括高剂量氰钴胺素(维生素B的一种形式)在内的维生素疗法对肾功能受损的个体的中风风险没有影响(RR 1.04,95%CI 0.84至1.27)(参见Spence JD.《柳叶刀神经病学》2007年9月;6(9):830-8,其据此通过引用整体并入)。这些结果表明,氰钴胺素(已知具有肾毒性,与氰化物蓄积相关)在肾功能显著受损的患者中具有潜在的混杂效应(参见Spence JD.《临床化学实验室医学》2013年3月1日;51(3):633-7,其据此通过引用整体并入)。与此一致,在DIVINe试验(在肾病中维生素的糖尿病干预)中,高剂量B族维生素(包括1000μg的氰钴胺素)是有害的,会加剧eGFR的下降(参见Spence JD.《国际中风杂志》2016年10月;11(7):744-7;House等人.《美国医学会杂志》2010;303:1603-1609,两者均据此通过引用整体并入)。总之,这些发现支持使用不含氰化物的B族维生素,诸如甲基钴胺素,而不是氰钴胺素,以降低中风高风险的个体(尤其是肾功能不全的个体)的Hcy水平。

[0385] 根据来自CSPPT((中国中风一级预防试验)的结果,氰钴胺素和氰化物毒性在先前的试验中被进一步牵连,作为存在肾损害的混杂因素(参见Huo等人.JAMA.2015年4月7日;313(13):1325-35,其据此通过引用整体并入)。在CSPPT中,用肾功能损害显示的治疗益处与在DIVINe、VISP和VITOPS试验中观察到的益处缺乏相反,这可能是由于在后面的试验中的氰钴胺素治疗。

[0386] 因为在中国叶酸强化尚未实施,所以可以在那里的大量群体中研究叶酸补充对降低tHcy水平的作用。CSPPT是一项在20,702名患有高血压但无中风或MI史的成人中进行的随机双盲试验,其表明叶酸可显著降低首次中风(2.7%相对于在没有叶酸情况下3.4%,HR 0.79;95%CI 0.68至0.93)、首次缺血性中风(2.2%相对于在没有叶酸情况下2.8%,HR 0.76;95%CI 0.64至0.91)和复合CV事件(CV死亡、MI和中风;3.1%相对于在没有叶酸情况下3.9%,HR 0.80;95%CI 0.69至0.92)的风险。相比之下,两组在出血性中风的风险、全因死亡或AE的频率方面没有显著差异。在CSPPT的一项亚研究中(参见Xu等人.《美国医学会杂志·内科学(JAMA Intern Med.)》2016年10月1日;176(10):1443-1450,其据此通过引用整体并入),有或没有肾损害(eGFR低于60mL/min/1.73m^2)的受试者均受益于叶酸,并且该亚

研究进一步证实,用叶酸治疗的组比不接受叶酸的组具有更大的血清Hcy下降(分别为1.9相对于0.2μmol/L,p<0.001)。

[0387] 分析了涉及74,422名参与者的15项随机对照试验的2017年Cochrane综述(参见Martí-Carvajal等人.《Cochrane系统综述数据库》2017年8月17日;8:CD006612,其据此通过引用整体并入)报告了使用B族维生素降低Hcy对中风的影响存在小幅差异,但对MI、任何原因导致的死亡或AE没有影响。与安慰剂/标准护理相比,在一般群体中,降低Hcy的干预与非致死性或致死性中风的降低的发生率相关(4.33%相对于对照组的5.1%;RR 0.90,95% CI 0.82至0.99),但对非致死性或致死性MI(7.1%相对于安慰剂组的6.0%;相对风险(RR)1.02,95%CI 0.95至1.10)或任何原因导致的死亡(11.7%相对于安慰剂组的12.3%;RR 1.01,95%CI 0.96至1.06)的发生率没有影响。这一综述是对三个早期版本(2009年、2013年和2015年)的更新,这些版本之前的结论是,没有证据支持降低Hcy干预对CV事件的影响,尽管2015年的综述表明中风的降低的发生率的趋势不显著(参见Marti-Carvajal.《Cochrane系统综述数据库》2015;1:CD006612,其据此通过引用整体并入)。随着额外的试验已经变得可用,降低Hcy干预对中风的证据的强度变得更有力。

[0388] 本综述中包括的研究使用各种维生素补充方案作为降低Hcy的疗法(参见Martí-Carvajal等人.《Cochrane系统综述数据库》2017年8月17日;8:CD006612,其据此通过引用整体并入)。2017年的综述在2015年综述的基础上增加了三项新的试验。在所有试验中,10项试验使用吡哆醇加维生素B_9(叶酸)和B_{12},5项试验仅使用维生素B9,并且10项试验中的1项使用5-甲基四氢叶酸替代叶酸。一些试验包括合用药物(对照组和维生素治疗组)、7项使用降脂,1项使用抗高血压药剂。总体而言,降低Hcy的治疗导致平均tHcy水平相对较小的下降。此外,在叶酸强化的群体中进行了三项研究,并且在混合群体中进行了两项研究(一些受试者接受强化饮食,而其他受试者不接受强化饮食),这可能掩盖了Hcy降低效应。考虑到可能影响此类研究的混杂因素,毫不奇怪的是,早期综述未鉴定维生素治疗方案的任何显著的CV效应,并且在最新综述中仅报告了对中风的中度效应。还值得注意的是,在Cochrane综述中包括的研究中,没有调查升高的Hcy水平的许多潜在原因(参见Marti-Carvajal等人.《Cochrane系统综述数据库》2015;1:CD006612,其据此通过引用整体并入)。在患有HCU的患者中和在比一般群体年轻的群体中,可能存在影响血管风险的病理生理学的额外因素。值得注意的是,即使Hcy水平的适度降低与中风风险的降低显著相关。

[0389] 从这些分析中的几个中得出的一个有趣的问题是,为什么一些研究表明Hcy水平对中风有影响,但对MI无影响。与此问题相关,Spence(参见Spence JD.《柳叶刀神经病学》2007年9月;6(9):830-8,其据此通过引用整体并入)指出了MI与脑梗死之间的关键差异,其中脑梗死与血栓形成/栓塞事件密切相关,但在几乎所有MI事件中,原位血栓形成继发于冠状动脉中的斑块破裂。因此,Spence得出结论,相当一部分中风与血栓形成过程有关,这可能与升高的tHcy有关。

[0390] 升高的tHcy水平不仅在心源性中风中而且在动脉粥样硬化性梗死和腔隙性梗死中可能很重要。一项针对用抗凝疗法治疗的患有房颤的老年患者的研究发现,高水平的tHcy(>90百分位)与缺血性并发症增加4.7倍相关(参见Poli等人.《美国心脏病学会杂志》2009;54:999-1002,其据此通过引用整体并入)。另一项针对患有隐源性缺血性中风的患者的研究发现,卵圆孔未闭(脑梗死的风险因素)患者的血浆tHcy水平显著高于无卵圆孔未闭

患者(分别为8.9±3μmol/L相对于7.9±2.6μmol/L;p=0.021)(参见Ozdemir等人.《神经科学杂志》2008;275:121-127,其据此通过引用整体并入)。在审查这些发现时,Spence(参见Spence JD.“降低同型半胱氨酸以用于中风预防:揭示证据的复杂性”.《国际中风杂志》2016年10月;11(7):744-7,其据此通过引用整体并入)表明,Hcy主要影响红色血栓(一种带有截留红血球的网状聚合物,其在淤滞状态下形成)的形成,但腔隙性梗死和颈动脉斑块也与tHcy显著相关,因为经颅多普勒显示在患有微栓子的患者中tHcy的水平也显著较高(16.2mmol/L相对于10.1mmol/L),并且大多数此类微栓子被认为是血小板聚集物,其通过双重抗血小板疗法减少(参见Spence JD.“降低同型半胱氨酸以用于中风预防:揭示证据的复杂性”.《国际中风杂志》2016年10月;11(7):744-7,其据此通过引用整体并入)。

[0391] 一项在32名用吡哆醇、叶酸和羟钴胺素治疗的HCU患者(年龄在9至66岁之间)中进行的总计539个患者年的研究报告了在治疗期间的两起血管事件(一起致命性肺栓塞和一起MI)(参见Wilcken等人.《遗传代谢疾病杂志》1997;20:295-300,其据此通过引用整体并入)。根据Mudd等人的流行病学研究,在未接受治疗的同一时期内,预计会发生21起事件(RR 0.09(95%CI 0.02至0.38);p=0.0001)。第二项研究(在来自3个国家的、年龄在2.5至70岁之间的84名患者中进行)报告了在治疗的1314个患者年期间的5例静脉栓塞(VE)、1例肺栓塞、2例MI和2例腹主动脉瘤(参见Yap等人.《血栓形成和止血研讨会》2000;26:335-340,其据此通过引用整体并入)。根据Mudd等人(参见Mudd等人.《美国人类遗传学杂志》1985;37:1-31,其据此通过引用整体并入),在未治疗的患者中预期有53例VE(RR 0.091(95%CI 0.043至0.190);p<0.001)。

[0392] 这些结果的支持性证据来自对158例患有HCU的患者的大型国际多中心观察性研究(参见Yap等人.《动脉硬化血栓血管生物学》2001;21:2080-2085,其据此通过引用整体并入),大多数年龄在10至30岁之间。在本研究中,在12名治疗的个体中观察到17例血管事件,包括3例肺栓塞、2例MI、5例深静脉血栓形成、3例脑血管意外、1例短暂性脑缺血发作、1例矢状窦血栓形成和2例腹主动脉瘤。在没有治疗的情况下,在相似群体中预计会发生112例血管事件(RR 0.09(95%CI 0.036至0.228);p<0.0001)。本研究还强调,与一般群体相比,即使治疗和广泛随访的年轻成年HCU患者也遭受较差的临床结果。

[0393] 升高的血浆tHcy水平是血管疾病的风险因素以及患有伴有和无CBSD的CAD的患者的死亡率的强有力预测因素(参见Mudd等人.《美国人类遗传学杂志》1985;37:1-31;Karaca等人.《基因》2014;534:197-203;Kelly等人.《神经病学》2003;60:275-279;Faeh等人.《瑞士医学周刊》2006;136:745-756;Boushey等人.《美国医学会杂志》1995;274:1049-1057;Clarke等人.《美国医学会杂志》2002;288:2015-2022;Hankey等人.《柳叶刀》,1999;354:407-413;Khan等人.《中风》2008;39:2943-2949;Graham等人.《美国医学会杂志》1997;277:1775-1781;Clarke等人.《新英格兰医学杂志》1991;324:1149-1155;Clarke等人.《爱尔兰医学科学杂志》1992;161:61-65;Woodward等.《血液凝固和纤维蛋白溶解》2006;17:1-5;Refsum等人.《医学年度评论》1998;49:31-62;Yoo等人.《中风》1998;29:2478-2483;Selsun等人.《新英格兰医学杂志》1995;332:286-291;Wald等人.《英国医学杂志》2002;325:1202;Bautista等人.《临床流行病学杂志》2002;55:882-887;Brattstrom等人.《动脉粥样硬化》1990;81:51-60;Lussana等人.《血栓形成研究》2013;132:681-684;Casas等人.《柳叶刀》2005;365:224-232;McCully KS.《美国病理学杂志》1969;56:111-128;Magner等人.《遗传

代谢疾病杂志》2011;34:33-37;Wilcken等人.《临床研究杂志》1976;57:1079-1082;Nygard等人.《新英格兰医学杂志》1997;337:230-236;其各自据此通过引用整体并入)。

[0394] 关于tHcy水平与CV风险之间的因果关系的证据(参见Boushey等人.《美国医学会杂志》1995;274:1049-1057,其据此通过引用整体并入),证明了在tHcy与中风或PAD之间最强的关系(参见Clarke等人.《美国医学会杂志》2002;288:2015-2022;Khan等人.《中风》2008;39:2943-2949;Wald等人.《英国医学杂志》2002;325:1202;Casas等人.《柳叶刀》2005;365:224-232;Brattstrom等人.《止血》1989;19补刊1:35-44,其各自据此通过引用整体并入),包括患有纯合和杂合CBS突变的患者(参见Rubba等人.《代谢》1990;39:1191-1195,其据此通过引用整体并入)。

[0395] 将升高的Hcy与血管损伤潜在联系的机制是变化且复杂的。几项研究涉及氧化应激(参见Faverzani等人.《细胞和分子神经生物学》2017;Nowak等人.《动脉硬化血栓血管生物学》2017;37:e41-e52;Vanzin等人.《分子遗传学和代谢》2011;104:112-117;Vanzin等人.《基因》2014;539:270-274;Vanzin等人.《脂质,细胞和分子神经生物学(Lipid,Cell Mol Neurobiol)》2015;35:899-911,其各自其据此通过引用整体并入),包括通过经由NF-κB的炎性/免疫激活(参见Rodriguez-Ayala等人.《动脉粥样硬化》2005;180:333-340;van Guldener等人.《当前的高血压报告》2003;5:26-31,两者均据此通过引用整体并入)。虽然此类炎性过程是动脉粥样硬化的特征,但在患有HCU的患者中,典型的动脉粥样硬化病变不需要先于血栓形成事件(参见Rubba等人.《中风》1994;25:943-950;de Valk等人.《中风》1996;27:1134-1136,两者均据此通过引用整体并入)。相反,导致血栓形成的内侧损害被认为是由以下引起的:Hcy介导的内皮功能障碍(参见Marti-Carvajal等人.《Cochrane系统综述数据库》2015;1:CD006612;Celermajer等人.《美国心脏病学会杂志》1993;22:854-858;Rubba等人.《代谢》1990;39:1191-1195;Jiang等人.《动脉硬化血栓血管生物学》2005;25:2515-2521;Hossain等人.《生物化学杂志》2003;278:30317-30327;Cai等人.《血液》2000;96:2140-2148;Zhang等人.《生物化学杂志》2001;276:35867-35874;Papapetropoulos等人.《美国国家科学院院刊》2009;106:21972-21977;Szabo等人.《英国眼科杂志》2011;164:853-865;Chiku等人.《生物化学杂志》2009;284:11601-11612;Wang等人.《抗氧化剂和氧化还原信号》2010;12:1065-1077;Saha S等人.《美国实验生物学学会联合会杂志》2016;30:441-456;Ebbing等人.《美国医学会杂志》2008;300:795-804;Bonaa等人.《新英格兰医学杂志》2006;354:1578-1588,其各自据此通过引用整体并入)、增强的凝血途径(参见Spence JD.《国际中风杂志》2016年10月;11(7):744-7;Fryer等人.《动脉硬化血栓形成》1993;13:1327-1333;Lentz等人.《临床研究杂志》1991;88:1906-1914,其各自据此通过引用整体并入)和增加的血管扩张,类似于在马凡氏患者中涉及的血栓形成过程(参见Kelly等人.《神经病学》2003;60:275-279;Tripathi P.“同型半胱氨酸在心血管疾病中的分子和生化方面”.《国际心血管论坛杂志》2016;6:13;van Guldener等人.《当前的高血压报告》2003;5:26-31;Hackam等人.《美国医学会杂志》2003;290:932-940;Baumbach等人.《循环研究》2002;91:931-937;Evangelisti等人.《国际心脏病学杂志》2009;134:251-254;de Valk等人.《中风》1996;27:1134-1136,其各自据此通过引用整体并入)。与患有HCU的患者的内皮功能障碍的观察结果一致,药理学和遗传学研究提示CBS介导的蛋白S-巯基化与血管健康和功能的维持有关(参见Celermajer等人.《美国心脏病学会杂志》1993;22:854-858;Rubba

等人.《代谢》1990;39:1191-1195,两者均据此通过引用整体并入)。因此,HCU患者的血管损伤的机制可能比患有CV疾病的一般群体的血管损伤机制更为多样。

[0396] 相当多的证据表明,降低Hcy有利于在有和无HCU的个体中对抗中风风险(参见Saposnik等人.《中风》2009;40:1365-1372;Huo等人.《美国医学会杂志》2015;313:1325-1335;Lonn等人.《新英格兰医学杂志》2006;354:1567-1577;Hankey等人.《柳叶刀神经病学》2012;11:512-520;Spence JD.《柳叶刀神经病学》2007年9月;6(9):830-8;其各自据此通过引用整体并入)。尽管在一般群体中进行的研究中,平均基线Hcy水平相对较低,但中风发生率的降低与降低Hcy的干预显著相关,这表明即使tHcy水平的小幅下降也带来益处。

[0397] 相关试验的更新的综述支持降低Hcy的治疗在中风中的有益作用(参见Martí-Carvajal等人.《Cochrane系统综述数据库》2017年8月17日;8:CD006612,其据此通过引用整体并入)。混杂因素,诸如是否存在叶酸强化、维生素B_{12}缺乏症或肾功能不全,使患者易受高剂量氰钴胺的影响,或受试者是否在服用抗血小板药物,使试验结果模糊不清。最近的分析表明,当考虑到此类因素时,在一般群体中tHcy与中风风险之间的联系很强(参见Spence JD,《临床化学实验室医学》2013年3月1日;51(3):633-7,其据此通过引用整体并入)。然而,重要的是,在tHcy水平远高于一般群体的患有HCU的患者中,Hcy降低的血管益处已得到一致证实(参见Yap等人.《遗传代谢疾病杂志》1998;21:738-747;Eslamiyeh等人.《伊朗儿童神经病学杂志》2015;9:53-57;Saboul等人.《儿童神经病学杂志》2015;30:107-112;Yap等人.《动脉硬化血栓血管生物学》2001;21:2080-2085;Woods等人.《英国医学杂志病例报告2017》2017;Wilcken等人.《遗传代谢疾病杂志》1997;20:295-300;Yap等人.《血栓形成和止血研讨会》2000;26:335-340;Ruhoy等人.《儿科神经病学》2014;50:108-111,其各自其据此通过引用整体并入)。

[0398] 这些发现表明,升高的Hcy水平是患有和没有HCU的患者发生CV疾病(尤其是中风)的风险因素,并且通过长期的降低Hcy的疗法可以降低CV或脑血管风险。

[0399] 血栓栓塞是HCU患者的发病和过早死亡的主要原因(参见Mudd等人.《美国人类遗传学杂志》1985;37:1-31;Karaca等人.《基因》2014;534:197-203;Yap S.《遗传代谢疾病杂志》2003;26:259-265,其各自据此通过引用整体并入)。在患有未治疗的HCU的患者中血栓栓塞事件的总体发生率为每年约10%(参见Cattaneo M.《血栓形成和止血研讨会》2006;32:716-723,其据此通过引用整体并入),其中在手术后和在怀孕期间或怀孕后风险增加(参见Mudd等人.《美国人类遗传学杂志》1985;37:1-31;Novy等人.《血栓形成和止血》2010年;103:871-873,两者均据此通过引用整体并入)。血栓栓塞可影响任何血管,但在患有HCU的患者中,静脉血栓形成(特别是脑窦静脉血栓形成(CSVT))比动脉血栓形成更常见(参见Mudd等人.《美国人类遗传学杂志》1985;37:1-31;Karaca等人.《基因》2014;534:197-203;Eslamiyeh h等人.《伊朗儿童神经病学杂志》2015;9:53-57;Saboul等人.《儿童神经病学杂志》2015;30:107-112,其各自据此通过引用整体并入)。

[0400] 对629名未经治疗的HCU患者的研究表明,在观察到的253例血管事件(发生在158名患者中)中,81例(32%)为脑血管意外,130例(51%)影响外周静脉(其中32例导致肺栓塞),10例(4%)导致心肌梗塞(MI),28例(11%)影响外周动脉,并且4例(2%)不属于这些类别(参见Mudd等人.《美国人类遗传学杂志》1985;37:1-31,其据此通过引用整体并入)。脑血管意外,尤其是CSVT,已经在婴儿中被描述(参见Mahale等人.《儿科神经病学杂志》2017年4

月-6月;12(2):206-207,其据此通过引用整体并入),尽管更典型地出现在年轻人中(参见Yap等人.《动脉硬化血栓血管生物学》2001;21:2080-2085,其据此通过引用整体并入)。据报道,脑血管事件与患者的吡哆醇应答类别仅有微弱相关。

[0401] 在年龄<20岁的患者中血管事件的风险为约30%,到30岁时上升至50%。然而,症状可以在任何年龄出现,并且已经在6个月大的婴儿中描述了致命的血栓形成(参见Cardo等人.《发育医学和儿童神经病学(Dev Med ChildNeurol)》1999;41:132-135,其据此通过引用整体并入)。在10岁以后,预计每25年发生一次血管事件。一般来说,儿童中HCU的最初症状是认知症状,表现为在出生后第一年或第二年期间的发育迟缓和/或晶状体脱位/高度近视。相比之下,成年人更有可能出现血管事件。

[0402] D.饮食对表型结果的影响

[0403] 在一些实施方式中,使用I278T小鼠(一种HCU的小鼠模型)来评估使用20NHS PEG-CBS对HCU进行酶治疗对与人类患者相关的临床终点的长期影响。在正常甲硫氨酸摄入量(REG)和Met受限的饮食(MRD)以及单独MRD的背景下,20NHS PEG-CBS的疗效。使用20NHS PEG-CBS治疗可导致血浆同型半胱氨酸浓度降低90%,并纠正与HCU相关的学习/认知、内皮功能障碍、止血、骨矿化和身体成分表型。在某些实施方式中,以MRD归一化血浆Hcy为背景,用20NHS PEG-CBS进行治疗。在I278T小鼠中,已观察到单独的MRD使血浆Hcy降低67%,并纠正HCU表型。然而,在I278T小鼠和野生型对照中,MRD增加了焦虑并降低了骨矿物质含量。因此,20NHS PEG-CBS对于具有REG或Met受限的饮食的背景的受试者的HCU治疗非常有效。事实上,与Met受限的饮食相比,在正常Met摄入的背景下使用20NHS PEG-CBS的ET表现相同或产生更好的结果。

[0404] 总之,单独的MRD有效地纠正HCU的多种症状,尽管未能将血浆Hcy浓度降低到低于推荐的水平并且导致焦虑增加和骨矿化减少。另一方面,如本文所述,使用20NHS PEG-CBS的酶疗法可将血浆Hcy浓度降低到低于100μM,并纠正所有监测到的HCU的症状。此外,20NHS PEG-CBS在Met限制下仍能保持效力,产生完全归一化的血浆生化概况。通过将这些数据外推至人类患者,结果确定20NHS PEG-CBS作为单个终身疗法可以有效地预防和纠正HCU的临床症状。此外,使用20NHS PEG-CBS治疗应允许放宽Met/饮食限制,并且因此进而显著改善HCU患者及其家人的生活质量。

[0405] E.神经系统并发症

[0406] 研究表明,由低Met饮食、叶酸/B维生素补充和/或吡哆醇和甜菜碱疗法诱导的Hcy水平的早期降低可以预防并且有时可以逆转各种神经系统障碍的进展,并允许患有HCU的患者的正常IQ发育(参见El Bashir等人.《JIMD报告》2015;21:89-95;Yap等人.《遗传代谢疾病杂志》2001;24:437-447;MechAW,FarahA.“在对MTHFR C677T或A1298C多态性呈阳性的患有MDD的患者中,在用减少的B族维生素的疗法期间临床应答与同型半胱氨酸减少的相关性:一项随机、双盲、安慰剂对照研究(Correlation ofclinical response with homocysteine reduction during therapy with reduced B vitamins in patients with MDD who are positive for MTHFR C677T or A1298C polymorphism:a randomized,double-blind,placebo-controlled study)”.《临床精神病学杂志(J Clin Psychiatry)》2016;77:668-671;Grobe H.《欧洲儿科杂志》1980;135:199-203;其各自据此通过引用整体并入)。在患有HCU的患者的病例研究中提供了进一步的证据,其中Hcy水平的

显著降低(甚至正常化)导致CNS结果的完全或部分纠正(参见Yap等人.《遗传代谢疾病杂志》2001;24:437-447;Brenton等人.《儿童神经病学杂志》2014;29:88-92;Rezazadeh等人.《儿童神经病学公开(ChildNeurol Open)》2014;1:2329048X14545870;Kaeser等人.《神经病学、神经外科和精神病学杂志(JNeurol Neurosurg Psychiatry)》1969;32:88-93;Colafrancesco等人.《欧洲儿科杂志》2015;174:1263-1266;Yokoi等人.《国际儿科》2008;50:694-695;Li等人.《病理学》1999;31:221-224,其各自据此通过引用整体并入)。

[0407] 在HCU患者和一般群体中,Hcy的升高的水平与CNS症状(包括认知症状、神经退行性疾病、癫痫发作、肌张力障碍、精神病、认知障碍、痴呆和抑郁症)之间的关联已有充分记录(参见Morris等人.《遗传代谢疾病杂志》2017;40:49-74;Abbott等人.《美国医学遗传学杂志》1987;26:959-969;Mudd等人.“转硫障碍”.在:Scriver CL,BeaudetAL,Sly WS,Valle D等人.《遗传性疾病的代谢和分子基础》.第7版,纽约:McGraw Hill;2001;1279-1327;Hidalgo等人.《欧洲儿童和青少年精神病学(Eur ChildAdolesc Psychiatry)》2014;23:235-238;Smith等人.《公共科学图书馆·综合(PLoS One)》2010;5:e12244;Seshadri等人.《新英格兰医学杂志》2002;346:476-483;Bottiglieri等人.《神经病学、神经外科和精神病学杂志》2000;69:228-232;Bjelland等人.《普通精神病学档案(Arch Gen Psychiatry)》2003;60:618-626;Tolmunen等人.《美国临床营养学杂志》2004;80:1574-1578;Kaeser等人.《神经病学、神经外科和精神病学杂志》1969;32:88-93;Golimbet等人.《精神病学研究》2009;170:168-171;Clarke等人.《神经病学档案》1998;55:1449-1455;Permoda-Osip等人.《神经心理生物学(Neuropsychobiology)》2014;69:107-111;Oliveira等人.《英国医学杂志病例报告2016》;2016;Troen等人.《美国国家科学院院刊》2008;105:12474-12479;Sudduth等人.《脑血流与代谢杂志(J Cereb Blood Flow Metab)》2013;33:708-715;Hainsworth等人.《生物化学与生物物理学学报》,2016;1862:1008-1017;Herrmann等人.《临床化学实验室医学》2011;49:435-441;Kim等人.《营养学杂志》2007;137:2093-2097;Selhub等人.《美国临床营养学杂志》2000;71:614S-620S;McCaddon等人.《痴呆症和老年认知障碍(Dement Geriatr Cogn Disord)》2001;12:309-313;Smallwood等人.Neuropathol Appl Neurobiol2012;38:337-343;Beydoun等人.《BMC公共卫生(BMC Public Health)》,2014;14:643;Gortz等.《神经科学杂志(J.Neurol Sci)》2004;218:109-114;“健康质量O.维生素B12与认知功能:一项循证分析(Health Quality O.Vitamin B12 and cognitive function:an evidence-based analysis)”.《安大略省卫生技术评估系列(Ont.Health Technol.Assess.Ser.)》13(23),1e45.2013.参考类型:在线来源;Salagre等人.《欧洲精神病学(Eur Psychiatry)》2017;43:81-91,其各自据此通过引用整体并入)。在Hcy水平升高的个体中导致CNS障碍的机制被认为与tHcy介导的神经元损伤有关(参见Mudd等人.“转硫障碍”.在:Scriver CL,BeaudetAL,SlyWS,Valle D编辑.《遗传性疾病的代谢和分子基础》.第7版,纽约:McGraw Hill;2001;1279-1327;Hainsworth等人.《生物化学与生物物理学学报》,2016;1862:1008-1017;Stefanello等人.《代谢性脑病(Metab Brain Dis)》2007;22:172-182;Toborek等人.《动脉粥样硬化》1995;115:217-224,其各自据此通过引用整体并入)、由Hcy介导的氧化应激引起的血管内皮损伤(参见Vivitsky等人.《美国生理学杂志,调节、综合和比较生理学(Am J Physiol Regul IntegrComp Physiol)》2004;287:R39-R46,其据此通过引用整体并入),神经元损失(参见Yeganeh等人.《分子神经科学杂志(J Mol

Neurosci)》2013;50:551-557;Heider等人.《神经传输杂志》补刊2004;1-13,两者均据此通过引用整体并入)和减弱的神经网络活性(参见Gortz等人.《神经科学杂志》2004;218:109-114,其据此通过引用整体并入)。抑郁症和惊厥被认为至少部分是由Hcy介导的脑腺苷水平降低以及随后的去甲肾上腺素和多巴胺的水平降低引起的(参见Mech等人.《临床精神病学杂志》2016;77:668-671;Domagala等人.《血栓形成研究》1997;87:411-416;Vivitsky等人.《美国生理学杂志,调节、综合和比较生理学》2004;287:R39-R46;Folstein等人.《美国精神病学杂志》2007;164:861-867,其各自据此通过引用整体并入)。

[0408] 这些发现表明,在患有HCU的患者中,Hcy水平与CNS障碍的增加的风险之间存在强相关性。早期降低Hcy的疗法对于患有早发性HCU的儿童的正常发育以及在晚年被诊断为HCU的患者中纠正或改善CNS障碍至关重要。

[0409] 在63名HCU患者中进行的一项研究发现,51%的患者患有精神障碍,包括焦虑症和发作性抑郁症(10%)、慢性行为障碍(例如攻击性和药物或酒精滥用)(17%)、慢性强迫症(5%)和人格障碍(19%)(参见Abbott等人.《美国医学遗传学杂志》1987;26:959-969,其据此通过引用整体并入)。精神病可能是青春期的表现体征(参见Hidalgo等人.《欧洲儿童和青少年精神病学》2014;23:235-238,其据此通过引用整体并入)。

[0410] 如果未经治疗,大约90%的吡哆醇无应答患者存在学习困难(参见Mudd等人.《美国人类遗传学杂志》1985;37:1-31,其据此通过引用整体并入),其中IQ通常在10至138的范围内,在吡哆醇无应答个体中平均为57,相比之下,在未治疗的吡哆醇应答患者中为79,并且在具有良好的依从性的治疗的吡哆醇应答患者中为105(参见Yap等人.《遗传代谢疾病杂志》2001;24:437-447,其据此通过引用整体并入)。到12岁时,20%的无应答患者会出现癫痫发作,并且据报道有几例与基底节梗死无关的运动障碍,包括多肌阵挛、肌张力障碍和帕金森病(参见Morris等人.《遗传代谢疾病杂志》2017;40:49-74;Rezazadeh等人.《儿童神经病学公开》2014;1:2329048X14545870,两者均据此通过引用整体并入)。

[0411] Schimke等人在1965年首次描述了HCU与神经精神症状之间的联系(参见Schimke等人.《美国医学会杂志》1965;193:711-719,其据此通过引用整体并入)。后来,一项报告超过50%的CBS缺乏症患者的精神病理学的研究支持了这种关联(参见Abbott等人.《美国医学遗传学杂志》1987;26:959-969,其据此通过引用整体并入)。从那时起,许多流行病学研究表明,即使在轻微的血浆tHcy升高与CNS障碍(包括认知症状和神经退行性疾病)的风险之间也存在积极的剂量依赖性关系(参见Morris等人.《遗传代谢疾病杂志》2017;40:49-74;Seshadri等人.《新英格兰医学杂志》2002;346:476-483;Clarke等人.《神经病学档案(Arch Neurol)》1998;55:1449-1455;Hainsworth等人.《生物化学与生物物理学学报》2016;1862:1008-1017;Herrmann等人.《临床化学实验室医学》2011;49:435-441;Kim J等人.《营养学杂志》2007;137:2093-2097;Selhub等人.《美国临床营养学杂志》2000;71:614S-620S;McCaddon等人.《痴呆症和老年认知障碍》2001;12:309-313;Smallwood等人.Neuropathol Appl Neurobiol 2012;38:337-343;Beydoun等人.《BMC公共卫生》2014;14:643;其各自据此通过引用整体并入)。一般而言,Hcy水平严重升高(50至200

[0412] μM/L)的患者倾向于表现出急性神经元功能障碍,包括癫痫发作和精神病,而更中度的Hcy水平(15至50μM/L)与认知障碍和痴呆有关(参见Mudd等人.“转硫障碍”.在:Scriver CL,Beaudet AL,Sly WS,Valle D编辑.《遗传性疾病的代谢和分子基础》.第7版,

纽约:McGraw Hill;2001;1279-1327;Gortz等人.《神经科学杂志》2004;218:109-114,两者均据此通过引用整体并入)。

[0413] 升高的Hcy水平被广泛认为是认知障碍(参见Smith等人.《公共科学图书馆·综合》2010;5:e12244;Seshadri等人.《新英格兰医学杂志》2002;346:476-483,两者均据此通过引用整体并入)、痴呆的发作(参见"健康质量O.维生素B12和认知功能:一项循证分析".《安大略省卫生技术评估系列》13(23),1e45.2013.参考类型:在线来源,其据此通过引用整体并入)和阿尔茨海默氏病(参见Seshadri等人.《新英格兰医学杂志》2002;346:476-483,其据此通过引用整体并入)的强有力且独立的风险因素。此外,增加的Hcy水平(>15μmol/L)显示存在于高达90%的患有抑郁症的患者中(参见Bottiglieri等人.《神经病学、神经外科和精神病学杂志》2000;69:228-232;Bjelland等人.《普通精神病学档案》2003;60:618-626,两者均据此通过引用整体并入),其中tHcy水平处于上三分位的男性患抑郁症的可能性比处于最低三分位的男性高超过两倍(参见Tolmunen等人.《美国临床营养学杂志》2004;80:1574-1578,其据此通过引用整体并入)。在精神分裂症、多发性硬化、帕金森病、纤维肌痛/慢性疲劳综合征的病例中,通常报道升高的Hcy水平(参见Kaeser等人.《神经病学、神经外科和精神病学杂志》1969;32:88-93;Golimbet等人.《精神病学研究》2009;170:168-171;Clarke等人.《神经病学档案》1998;55:1449-1455;其各自据此通过引用整体并入)和无脑血管疾病的复发性肌张力障碍(参见Sinclair等人.《运动障碍性疾病(Mov Disord)》2006;21:1780-1782,其据此通过引用整体并入)。描述了CBS基因的T833C多态性与双相情感障碍之间的可能关联(参见Permoda-Osip等人.《神经心理生物学》2014;69:107-111,其据此通过引用整体并入),并且最近的荟萃分析表明了在患有双相性疾病的个体中升高的Hcy水平与躁狂/情感愉快之间的关系(参见Salagre等人.《欧洲精神病学》2017;43:81-91,其据此通过引用整体并入)。最近在患有HCU的18岁男子中描述了第一个已知的与HCU相关的周围神经病病例(参见Oliveira等人.《英国医学杂志病例报告2016》;2016,其据此通过引用整体并入本文),并且在17岁的先前未诊断的HCU的患者中描述了致命的精神病病例(参见Hidalgo等人.《欧洲儿童和青少年精神病学》2014;23:235-238,其据此通过引用整体并入)。

[0414] Hcy水平与痴呆之间关系的直接证据来自动物研究,在这些研究中,Hcy施用与脑部病变的发展有关(参见Troen等人.《美国国家科学院院刊》2008;105:12474-12479;Sudduth等人.《脑血流与代谢杂志》2013;33:708-715,其各自据此通过引用整体并入)。在第一项此类研究中,Hcy水平升高(由维生素B缺乏饮食诱导)的雄性C57BL6小鼠具有显著受损的空间学习和记忆,海马微血管明显稀疏,无伴随的胶质增生或神经变性(参见Troen等人.《美国国家科学院院刊》2008;105:12474-12479,其据此通过引用整体并入)。海马毛细血管总长度与Morris水迷宫逃避潜伏期($r=-0.757$,$p<0.001$)和血浆tHcy($r=-0.631$,$p<0.007$)负相关。喂食富含Met饮食的小鼠表现出相似但不太明显的效应。这些发现表明,升高的Hcy水平与脑微血管稀疏有关,在没有神经退行性变或在神经退行性变之前,脑微血管稀疏会导致认知功能障碍。这可能解释了升高的Hcy水平与人类认知下降之间的联系。

[0415] 在第二项研究中,健康小鼠喂食缺乏叶酸、维生素B_6和B_{12}的饮食,并补充Met以诱导中度升高的Hcy水平(血浆tHcy为82.93±3.56μmol/L)。这些小鼠具有空间记忆缺陷,如采用为期两天的径向臂水迷宫所评估的(参见Sudduth等人.《脑血流与代谢杂志》2013;33:

708-715,其据此通过引用整体并入)。MRI和组织学检查显示显著的微出血率。还观察到神经炎症以及与脑出血的发病机制相关的两种酶MMP2和MMP9的增加的表达和活性。这表明升高的Hcy水平与血管性痴呆(诸如阿尔茨海默病)之间的联系。

[0416] 在人类中,白质的变化(血管损伤的迹象)经常与升高的Hcy水平相关,在患有HCU的个体(参见El Bashir等人.《JIMD报告》2015;21:89-95;Vatanavicharn等人.《遗传代谢疾病杂志》2008;31补刊3:477-481;Brenton等人.《儿童神经病学杂志》2014;29:88-92;Ruhoy等人.《儿童神经病学》2014;50:108-111;其各自据此通过引用整体并入)和没有HCU的个体(参见Hogervorst等人.《神经病学档案》2002;59:787-793;Kloppenborg等人.《神经学》2014;82:777-783;其各自据此通过引用整体并入)中都是如此。然而,这些变化并不总是与中风的证据相关。此外,对HCU患者的脑成像研究通常显示萎缩或静脉闭塞的体征(参见Vatanavicharn等人.《遗传代谢疾病杂志》2008;31补刊3:477-481,其据此通过引用整体并入)。

[0417] 扫描显示在大脑半球(主要是顶枕区)的皮质下白质和在较小程度上较深白质的弥漫性对称性异常增强信号

[0418] 1.机制

[0419] 升高的Hcy水平影响神经健康的确切机制尚不清楚。几项动物研究表明,在升高的tHcy水平与神经毒性以及伴随的神经和精神损伤之间存在关联。

[0420] 一项早期研究表明,在运动皮层中具有钴诱导损伤的大鼠中,非常高的腹腔内剂量的Hcy诱导了全身性惊厥性癫痫持续状态(参见Mudd等人.“转硫障碍”.在:Scriver CL,Beaudet AL,Sly WS,Valle D编辑.《遗传病的代谢和分子基础》第7版,纽约:McGraw Hill;2001;1279-1327,其据此通过引用整体并入)。通过添加Met和维生素B来增强癫痫发作,并且有一些证据表明吡哆醛5'-磷酸酯和Hcy在阻断突触后g-氨基丁酸受体方面的协同作用。此外,啮齿动物新皮质组织的Hcy处理导致腺苷以AdoHcy的形式被捕获(参见Heinecke等人.《生物化学杂志》1987;262:10098-10103,其据此通过引用整体并入)。作者指出,腺苷在大脑活动中主要是一种抑制剂,并且与高水平Hcy相关的惊厥状况和精神变化可能是由脑腺苷的水平降低介导的。

[0421] Hcy与大脑中的神经毒性和形态学变化有关(参见Hainsworth等人.《生物化学与生物物理学学报》2016;1862:1008-1017,其据此通过引用整体并入)。例如,对大鼠和兔子的研究表明,神经元损伤是由Hcy介导的氧化应激的指标硫代丁酸反应性物质(TBARS)的增加引起的(参见Stefanello等人.《代谢性脑病》2007;22:172-182;Toborek等人.《动脉粥样硬化》1995;115:217-224,两者均据此通过引用整体并入)。在口服施用Met负荷后,在人类中也观察到类似的血浆TBARS的增加(参见Domagala等人.《血栓形成研究》1997;87:411-416,其据此通过引用整体并入)。此外,在升高的Hcy水平的鼠模型中的研究表明,在患有HCU的患者中由氧化应激引起的细胞损伤可能被增强,因为降低的Cys水平导致低水平的神经元谷胱甘肽——一种由谷氨酸、Cys和甘氨酸合成的重要抗氧化剂(参见Vivitsky等人.《美国生理学杂志,调节、综合和比较生理学》2004;287:R39-R46,其据此通过引用整体并入)。

[0422] 将体内Hcy注射到大鼠脑左室产生剂量依赖性神经元损失(参见Yeganeh等人.《分子神经科学杂志》2013;50:551-557,其据此通过引用整体并入本文),并且来自大鼠的中脑

被盖神经元与Hcy的孵育导致更少和更短的多巴胺能神经突(参见Heider等人.《神经传输杂志》补刊2004;1-13,其据此通过引用整体并入)。在这两项研究中,通过Hcy与NMDA和代谢型谷氨酸受体的拮抗剂的共同施用减弱了Hcy的作用,表明Hcy诱导的神经元损伤是由谷氨酸受体介导的。这种途径的进一步证据来自一项研究,在该研究中,施用Hcy导致大鼠脑突触体中的剂量依赖性脂质过氧化(参见Jara-Prado等人.《神经毒性研究(Neurotox Res)》2003;5:237-243,其据此通过引用整体并入)。这种作用再次通过施用NMDA受体拮抗剂被抑制。

[0423] 对自发活动的胚胎大鼠皮质神经元的研究表明,高于严重升高的Hcy范围的Hcy水平导致神经网络活性的剂量依赖性抑制(参见Gortz等人.《神经科学杂志》2004;218:109-114,其据此通过引用整体并入)。在这项研究中观察到的效应与临床无关,因为在患有HCU的患者中从未达到如此高的Hcy水平。然而,同型半胱氨酸亚磺酸和同型半胱氨酸(氧化形式的Hcy经常在Hcy水平升高的患者中发现)的适度升高具有相似的效果。在每种情况下,对神经网络的损伤被2-氨基-5-磷酸戊酸抑制,再次暗示NMDA受体是这种Hcy诱导的神经元功能障碍的介质。这些结果表明,与升高的Hcy水平相关的神经元功能障碍可能是由氧化形式的Hcy引起的,而不是由Hcy本身引起的。

[0424] 在患有马凡氏综合征和其他结缔组织障碍的患者中缺乏认知症状、惊厥和其他CNS障碍表明HCU患者的神经系统障碍不是由原纤蛋白或胶原蛋白的缺陷引起的(参见Mudd等人.“转硫障碍”.在:Scriver CL,BeaudetAL,SlyWS,Valle D编辑.《遗传性疾病的代谢和分子基础》第7版,纽约:McGraw Hill;2001;1279-1327,其据此通过引用整体并入)。在患有未治疗的HCU的患者中,SAM水平的升高和SAH水平的降低会抑制髓鞘合成所需的转甲基作用,从而导致进一步的神经损伤(参见Mudd等人.“转硫障碍”.在:Scriver CL,BeaudetAL,SlyWS,Valle D编辑.《遗传性疾病的代谢和分子基础》第7版,纽约:McGraw Hill;2001;1279-1327,其据此通过引用整体并入)。减少的髓鞘合成也可能是由患有HCU的患者中由于增加的再甲基化率导致的低水平丝氨酸引起的(参见Orendac等人.《遗传代谢疾病杂志》2003;26:761-773,其据此通过引用整体并入)。最后,Hcy代谢通过提供甲基基团以用于产生去甲肾上腺素和多巴胺而在单胺类的合成中发挥关键作用(参见Mech等人.《临床精神病学杂志》2016;77:668-671;Folstein等人.《美国精神病学杂志》2007;164:861-867,两者均据此通过引用整体并入)。实际上,“抑郁症的同型半胱氨酸假说(homocysteine hypothesis of depression)”(参见Folstein等人.《美国精神病学杂志》2007;164:861-867,其据此通过引用整体并入)指出,由升高的Hcy水平导致的低水平的去甲肾上腺素和多巴胺是抑郁症的主要原因。

[0425] 大鼠脑活检的电子显微镜检查显示在喂食高Hcy饮食8周的动物中的脑血管结构改变。这些改变与高血浆tHcy水平有关(参见Lee等人.《营养学杂志》2005;135:544-548,其据此通过引用整体并入)。消耗膳食叶酸持续另外的8周可将血浆tHcy降至正常水平,并显著降低受损血管的发生率。这表明,使用叶酸补充降低Hcy,可能会减轻实验性诱导的升高的Hcy水平对血管内皮的有害影响。

[0426] 一项被设计成评估在由于至少一种MTHFR多态性(N=330)导致的患有重度抑郁症障碍(MDD)和HCU的成年患者中作为单一疗法的减少的B族维生素的疗效和安全性的研究发现,联合减少的B族维生素的治疗显著降低了131名治疗的患者(82.4%)的tHcy水平(这一

亚组中的平均减少量为25%;p<0.001),而安慰剂治疗的患者显示tHcy水平的小幅升高(参见Mech等人.《临床精神病学杂志》2016;77:668-671,其据此通过引用整体并入)。到第8周,治疗的患者在蒙哥马利阿斯伯格抑郁症量表评分(Montgomery Asberg-Depression Rating Scale)(MADRS)上平均降低12个百分点,并且42%达到完全缓解(p<0.001)。在大多数应答者中,进一步的临床改善与tHcy水平的显著降低相关。尽管本研究不是在患有HCU的患者中进行的,但它证明了降低Hcy在患有抑郁症的个体中有明显益处,支持了"抑郁症的Hcy假说(Hcy hypothesis ofdepression)"(参见Folstein等人.《美国精神病学杂志》2007;164:861-867,其据此通过引用整体并入)。

[0427] 在一项对12名晚期诊断患者的研究中,首次证明了降低Hcy的疗法在患有与HCU相关的精神症状的个体中的益处(参见Grobe H.《欧洲儿科杂志》1980;135:199-203,其据此通过引用整体并入)。这些患者中的3例从未得到有效治疗,并具有严重的心理障碍,伴有早产死亡。其余8例患者年龄范围为1至26岁(平均13岁),并且均具有精神症状,包括烦躁、ADHD、冷漠和精神错乱。用吡哆醇治疗或用低Met饮食加补充L-胱氨酸治疗2至9年与行为和智力发育的显著改善相关,与生化正常化相关。作者强调,由于在他们的研究中观察到了HCU相关后遗症的可逆性和改善,因此需要治疗所有患者,无论诊断时的年龄和既往治疗如何。

[0428] 使用来自爱尔兰筛选项目的最新数据来比较23名吡哆醇无应答的患有HCU的个体(339个患者治疗年)的智力与10名未受影响的同胞对照的智力(参见Yap等人.《遗传代谢疾病杂志》2001;24:437-447,其据此通过引用整体并入)。在鉴定的23例患者中,19例经NBS被诊断为HCU并在生命早期(在出生后6周内)接受治疗,2例为晚期检测(年龄2.2岁和2.9岁),并且2例在评估时未接受治疗。所有患者均用不含Met、补充半胱氨酸的合成氨基酸混合物治疗,并根据需要用维生素B_{12}和叶酸补充剂治疗。在过去5年中,甜菜碱被用作对饮食依从性差的早期治疗患者和所有具有晚期检测的HCU的患者的辅助治疗。

[0429] 总体上,早期治疗组的19名患者中有13名(平均年龄14.4岁;范围为4.4至24.9)对治疗依从(由终生血浆fHcy中位值<11μmol/L定义)且无并发症,而具有差的依从性的其余6例(平均年龄19.9岁;范围为13.8-25.5)出现并发症。平均总量表IQ(FIQ)在依从性组中为105.8(范围为84至120),而在差的依从性组中为80.8(范围为40至103)。平均年龄为19.4岁(范围为9.7至32.9岁)的对照组(n=10)具有102的平均FIQ(范围为76至116)。两名晚期检测的患者(年龄为18.9岁和18.8岁)分别具有80和102的FIQ,而两名未治疗的患者(年龄为22.4岁和11.7岁)分别具有52和53的FIQ。除FIQ外,在依从性、早期治疗的个体与其未受影响的同胞(对照)之间没有显著差异,FIQ在受影响的同胞中显著较高(p=0.0397)。尽管数量相对较少,但这些结果表明,通过良好的生化控制进行早期治疗可预防认知症状。

[0430] 在一项病例对照研究中获得了类似的结果,该研究报告了在卡塔尔的32例HCU和25例同胞对照中的神经发育、教育和认知结果(参见El Bashir等人.《JIMD报告》2015;21:89-95,其据此通过引用整体并入)。本研究中受试者的平均年龄为11.2岁(范围为0.6至29岁),并且56%为男性。与未受影响的同胞相比,受影响的个体具有较低的总IQ(特别是在短期记忆、定量推理和视觉空间域方面),并且大量青少年和成人病例具有医学合并症以及行为和情感问题。其中,9例(28%)HCU由NBS诊断,并在出生后第一个月接受治疗。其余在年龄14至240个月大被诊断。通过NBS诊断的患者的治疗期tHcy和Met水平显著优于临床诊断的

患者,可能是因为患者在生命早期对饮食和药物的依从性更好。在早期诊断的患者与临床诊断的患者之间观察到了IQ的显著差异。尽管在各组之间在语言领域、特殊学校出勤率和课堂上获得额外支持机会方面的差异不具有统计学意义,但“临床检测的”组报告的困难明显更多。

[0431] 虽然此处研究的患者数量很少,但在出生时诊断出的儿童与在幼儿时诊断出的儿童之间存在显著差异。在临床诊断的组中115μmol/L的平均tHcy水平与不良临床结果和非常低的IQ相关。

[0432] 降低Hcy的治疗对HCU患者的精神病理学的益处的进一步证据来自对自1963年以来在波士顿儿童医院(Boston Children's Hospital)就诊的所有患有HCU的患者的数据的回顾性图表审查(未发表的数据由M.Almuqbil等人提供)。总体上,鉴定了19例患有HCU的患者,除HCU外,由于可能存在混杂的甲基丙二酸血症(也与心理缺陷相关),因此将其中3例排除在分析之外。在其余16例患者中,7例(6例患有HCU,1例患有钴胺素(Cbl)缺乏症)对早期治疗具有良好的依从性(4例接受单独饮食,2例接受饮食加甜菜碱,1例接受Cbl)。这些患者中的6例除轻度认知障碍外,无明显精神症状。相比之下,9名患者(7名患有吡哆醇无应答性HCU,2名患有CblG缺乏症)对治疗具有较差或不同依从性(2名接受甜菜碱和饮食,1名接受单独的饮食,3名接受B族维生素,2名接受叶酸和甜菜碱)。所有7例患有HCU和依从性差的患者均有精神问题,包括抑郁症(n=4)、偏执经历(n=2)、偏执和妄想性精神病(n=1)、焦虑和情绪调节障碍(n=1)和ADHD,这些症状随着良好的代谢控制而改善(n=1)。两例CblG病例均是明显焦虑或激动的。年龄、性别和认知水平在精神疾病受影响的个体和未受影响的个体之间似乎没有显著差异。这些结果表明,良好的代谢控制(Hcy和/或Met降低)有可能延迟并可能预防HCU患者的精神和行为病症的发作。然而,本研究未确定不良控制的HCU是否会导致精神病理学,或伴有精神病理学的合并症本身是否会妨碍治疗结果的良好依从性。

[0433] 升高的Hcy水平与CNS症状(包括认知症状、神经退行性疾病、癫痫发作、肌张力障碍、精神病、认知障碍、痴呆和抑郁症)之间的关联已在患有和未患有HCU的个体中得到充分记录(参见Morris等人.《遗传代谢疾病杂志》2017;40:49-74;Abbott等人.《美国医学遗传学杂志》1987;26:959-969;Mudd等人.“转硫障碍”.在:Scriver CL,BeaudetAL,Sly WS,Valle D编辑.《遗传性疾病的代谢和分子基础》第7版,纽约:McGraw Hill;2001;1279-1327;Hidalgo等人.《欧洲儿童和青少年精神病学》2014;23:235-238;Schimke等人.《美国医学会杂志》1965;193:711-719;Smith等人.《公共科学图书馆·综合》2010;5:e12244;Seshadri等人.《新英格兰医学杂志》2002;346:476-483;Bottiglieri等人.《神经病学、神经外科和精神病学杂志》2000;69:228-232;Bjelland等人.《普通精神病学档案》2003;60:618-626;Tolmunen等人.《美国临床营养学杂志》2004;80:1574-1578;Kaeser等人.《神经病学、神经外科和精神病学杂志》1969;32:88-93;Golimbet等人.《精神病学研究》2009;170:168-171;Clarke等人.《神经病学档案》1998;55:1449-1455;Sinclair等人.《运动障碍性疾病》2006;21:1780-1782;Permoda-Osip等人.《神经心理生物学》2014;69:107-111;Oliveira等人.《英国医学杂志病例报告2016》2016;Troen等人.《美国国家科学院院刊》2008;105:12474-12479;Sudduth等人.《脑血流与代谢杂志》2013;33:708-715;Hainsworth等人.《生物化学与生物物理学学报》2016;1862:1008-1017;Herrmann等人.《临床化学实验室医学》2011;49:435-441;Kim等人.《营养学杂志》2007;137:2093-2097;Selhub等人.《美

国临床营养学杂志》2000;71:614S-620S;McCaddon等人.《痴呆症和老年认知障碍》2001;12:309-313;Smallwood等人.Neuropathol Appl Neurobiol 2012;38:337-343;Beydoun等人.《BMC公共卫生》2014;14:643;Gortz等人.《神经科学杂志》2004;218:109-114;“健康质量O.维生素B12与认知功能:一项循证分析”.《安大略省卫生技术评估系列》13(23),1e45.2013.参考类型:在线来源;Salagre等人.《欧洲精神病学》2017;43:81-91,其各自据此通过引用整体并入)。在Hcy水平升高的个体中导致CNS障碍的机制被认为与tHcy介导的神经元损伤有关(参见Mudd等人.“转硫障碍”.在:Scriver CL,BeaudetAL,SlyWS,Valle D编辑.《遗传性疾病的代谢和分子基础》.第7版,纽约:McGraw Hill;2001;1279-1327;Hainsworth等人.《生物化学与生物物理学学报》2016;1862:1008-1017;Stefanello等人.《代谢性脑病》2007;22:172-182;Toborek等人.《动脉粥样硬化》1995;115:217-224,其各自据此通过引用整体并入)、由Hcy介导的氧化应激引起的血管内皮损伤(参见Vivitsky等人.《美国生理学杂志,调节、综合和比较生理学》2004;287:R39-R46,其据此通过引用整体并入)、神经元损失(参见Yeganeh等人.《分子神经科学杂志》2013;50:551-557;Heider等人.《神经传输杂志》补刊2004;1-13,两者均据此通过引用整体并入)和减弱的神经网络活性(参见Gortz等人.《神经科学杂志》2004;218:109-114,其据此通过引用整体并入)。抑郁症和惊厥被认为至少部分是由Hcy介导的脑腺苷水平降低以及随后的去甲肾上腺素和多巴胺的水平降低引起的(参见Mech等人.《临床精神病学杂志》2016;77:668-671;Domagala等人.《血栓形成研究》1997;87:411-416;Vivitsky等人.《美国生理学杂志,调节、综合和比较生理学》2004;287:R39-R46;Folstein等人.《美国精神病学杂志》2007;164:861-867,其各自据此通过引用整体并入)。

[0434] 在HCU的动物模型中(参见Lee等人.《营养学杂志》2005;135:544-548,其据此通过引用整体并入)和在患有HCU的患者(参见El Bashir等人.《JIMD报告》2015;21:89-95;Yap等人.《遗传代谢疾病杂志》2001;24:437-447;Mech等人.《临床精神病学杂志》2016;77:668-671;Grobe H.《欧洲儿科杂志》1980;135:199-203,其各自据此通过引用整体并入)中的大量研究已经表明,由低Met饮食、叶酸/B维生素补充和/或吡哆醇/甜菜碱疗法诱导的Hcy水平的早期降低可以预防,并且有时逆转各种神经障碍的进展。通过在患有HCU的患者中进行的一系列6个病例研究提供了进一步的证据,其中Hcy水平的显著降低(甚至正常化)导致CNS结果的完全或部分纠正(参见Yap等人.《遗传代谢疾病杂志》2001;24:437-447;Brenton等人.《儿童神经病学杂志》2014;29:88-92;Rezazadeh等人.《儿童神经病学公开》2014;1:2329048X14545870;Kaeser等人.《神经病学、神经外科和精神病学杂志》1969;32:88-93;Colafrancesco等人.《欧洲儿科杂志》2015;174:1263-1266;Yokoi等人.《国际儿科》2008;50:694-695;Li等人.《病理学》1999;31:221-224,其各自据此通过引用整体并入)。

[0435] 这些发现表明,在HCU患者和一般群体中,Hcy水平与CNS障碍的增加的风险之间存在很强的相关性。早期降低Hcy的疗法对于患有早发性HCU的儿童的正常发育以及在晚年被诊断为HCU的患者中纠正或改善CNS障碍至关重要。

[0436] IX.定义

[0437] 如在本说明书中所使用的,单数形式“一(a)”、“一(an)”和“所述(the)”包括复数引用,除非上下文另有明确指示。

[0438] 在提供值的范围的情况下,意在该范围的上限和下限与该范围内的任何其他所述

或中间值之间的每个中间值都包含在本公开中并且被特别公开。例如，如果规定1μm至8μm的范围，则旨在还应明确公开2μm、3μm、4μm、5μm、6μm和7μm，以及大于或等于1μm的数值的范围和小于或等于8μm的数值的范围。

[0439] 如本文所用，“共同施用(co-administered)”或“共同施用(co-administration)”是指施用两种或更多种治疗组分，包括药物组合物。

[0440] 如本文所使用的，“药物产品”是指药物组合物的剂型，其包括具有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的PEG化的人截短的CBS蛋白(例如20NHS PEG-CBS)的药物物质。

[0441] 如本文所用的，“药物物质”是指具有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的PEG化的CBS蛋白(例如20NHS PEG-CBS)。

[0442] 如本文所用的，“负面临床结果”是指由疾病、障碍或病症引起的不期望的表型结果。

[0443] 如本文所使用的，“重组”当用于提及例如细胞、核酸、多肽、表达盒或载体时，是指通过引入新的部分或改变现有的部分而修饰的材料或与该材料的天然或自然形式相对应的材料，或与其相同但由合成材料产生或衍生的材料。例如，重组细胞表达未在细胞的天然(非重组)形式中发现的基因(即，“外源核酸”)，或表达以不同水平表达的天然基因，通常是表达不足或根本不表达。

[0444] 重组技术可以包括，例如，使用重组核酸诸如编码蛋白质的cDNA或反义序列用于插入表达系统诸如表达载体；将所得的构建体引入到细胞中，并且如果合适，细胞表达核酸和蛋白质。重组技术还涵盖将核酸与来自不同来源的编码序列或启动子序列连接到一个表达盒或载体中，用于表达融合蛋白、组成型表达蛋白或诱导型表达蛋白。

[0445] 如本文所使用的，术语“受试者”、“个体”或“患者”可互换使用，并且是指脊椎动物，优选地哺乳动物。哺乳动物包括但不限于人类。

[0446] 如本文所使用的，术语“非遗传定义的”，如在提及受试者、患者和/或患者的群体时所使用的，是指一个或多个不具有或未被诊断为具有胱硫醚β-合酶的遗传定义的缺陷症(例如，在一个或多个CBS基因等位基因中不具有错义或功能丧失突变)的受试者。例如，具有升高的tHcy水平的非遗传定义的受试者是这样的受试者，其具有的tHcy水平高于基于年龄、性别、饮食和其他因素预期的正常范围，但不具有或未被诊断为具有一个或多个CBS基因等位基因的遗传缺陷；即不具有遗传定义的HCU。

[0447] 如本文所使用的，“相关的”是指与疾病、病症或表型的发展或表现相符合。关联可能是由于，但不限于，负责管家功能的基因，其改变可为多种疾病和病症提供基础，这些是参与特定疾病、病症或表型的途径的一部分，以及那些间接促成疾病、病症或表型的表现的基因。

[0448] 如本文所使用的，“药学上可接受的赋形剂”或“药学上可接受的载体”是指可以任选地被包括在本公开的组合物中且不会对患者造成显著的不良毒理学效应的赋形剂。特别地，在本发明的情况下，这是指可以与活性化合物(此处为PEG化的htCBS或“20NHS PEG-CBS”)一起被摄入哺乳动物受试者体内而对受试者没有显著的不良毒理作用的赋形剂。

[0449] 如本文所使用的，术语“佐剂”、“稀释剂”或“载体”是指任何物质，其本身不是治疗剂，用作用于递送治疗剂的载体，且适合于向受试者(例如，哺乳动物)施用，或添加到药物组合物中以改善其处理或储存性质，或允许或促进组合物的剂量单位形成为适合于口服施

用的离散制品，诸如胶囊或片剂。术语“佐剂”、“稀释剂”或“载体”涵盖“赋形剂”，包括“药学上可接受的赋形剂”、“媒介物”、“溶剂”等，如本文所用的那些术语。赋形剂和媒介物包括本领域中已知的任何此类材料，例如任何液体、凝胶、溶剂、液体稀释剂、增溶剂等，其是无毒的，并且不会以有害的方式与组合物的其他组分相互作用。施用可以指口服施用、吸入、肠内施用、喂养或通过静脉注射接种。赋形剂可以包括标准药物赋形剂，并且也可以包括可以用于制备人类和/或动物消费的食物和饮料、饲料或诱饵制剂或其他食品的任何组分。

[0450] 如本文所使用的，“药物”或“活性剂”或任何其他类似术语是指任何化学或生物材料或化合物，包括肽，其适合于通过本领域中先前已知的方法和/或通过本公开中教导的方法施用，其诱导所需的生物或药理作用，其可以包括但不限于(1)对生物体具有预防作用，并防止不期望的生物作用，诸如防止感染，(2)缓解由疾病引起的病症，例如，缓解由疾病引起的疼痛或炎症，和/或(3)从缓解、减少或完全消除生物体的疾病。该作用可以是局部的，诸如提供局部麻醉作用，或者它可以是全身性的。

[0451] 如本文所使用的，术语“约”，尤其是指给定量，意在包括正或负5％的偏差。

[0452] 如本文所使用的，如与本发明组合物相关的术语“治疗有效量”是指无毒性但足够量的活性剂(或含有活性剂的组合物)以在待治疗的受试者的血流中或作用部位(例如，细胞内)提供所需的水平，和/或提供所需的生理、生物物理、生物化学、药理学或治疗应答，诸如改善高胱氨酸尿症的表现。所需的确切量将因受试者而异，并且将取决于许多因素，诸如活性剂、组合物的活性、所用的递送装置、组合物的物理特性、预期的患者用途(即每天施用的剂量数)，以及患者的考虑因素诸如受试者的物种、年龄和一般状况、所治疗病症的严重程度、受试者服用的额外药物、施用方式等。基于本文提供的信息，本领域技术人员可以容易地确定这些因素和考虑。基于本文提供的信息，本领域普通技术人员可以使用常规实验来确定任何个别情况下的适当“有效”量。

[0453] 如本文所使用的，术语“核酸”可以是RNA的形式或DNA的形式，并且包括信使RNA、合成RNA和DNA、cDNA和基因组DNA。DNA可以是双链的或单链的，并且如果是单链的，可以是编码链或非编码(反义，互补)链。

[0454] 如本文所使用的，“突变体”是被设计或工程改造以改变与糖基化、蛋白质稳定化和/或配体结合相关的性质或功能的突变蛋白质。

[0455] 如本文所使用的，相对于给定的细胞、多肽、核酸、性状或表型，术语“天然”或“野生型”是指通常在自然界中发现的形式。

[0456] 如本文所使用的，术语“蛋白质”、“多肽”、“寡肽”和“肽”具有其常规含义，并且可互换使用，以表示由酰胺键共价连接的至少两个氨基酸的聚合物，而不考虑长度或翻译后修饰(例如，糖基化、磷酸化、脂质化、肉豆蔻化、泛素化等)。此外，本文描述的多肽不限于特定长度。在此定义内包括D-氨基酸和L-氨基酸，以及D-氨基酸和L-氨基酸的混合物。此术语也不指或不排除多肽的表达后修饰，例如糖基化、乙酰化、磷酸化等，以及本领域中已知的其他修饰，包括天然存在的和非天然存在的。多肽可以是完整的蛋白质或其亚序列。多肽也可以指包含表位的氨基酸亚序列，即基本上负责多肽的免疫原性质并能够引起免疫应答的抗原决定簇。

[0457] 如本文所使用的，“对应于……的位置”等是指相对于另一参照核酸分子或蛋白质中的位置，核酸分子或蛋白质中的目标位置(即，碱基数或残基数)。可以通过比较和比对序

列以最大化匹配核苷酸或残基的数量来确定相应的位置，例如，使得序列之间的同一性大于90％、大于95％、大于96％、大于97％、大于98％或大于99％。然后给目标位置分配参考核酸分子中的编号。例如，如果基因-X中的特定多态性出现在SEQ ID NO:X的核苷酸2073处，为了鉴定另一个等位基因或分离物中的相应核苷酸，比对序列，然后鉴定与2073对齐的位置。由于各种等位基因可能具有不同的长度，指定2073的位置可能不是核苷酸2073，而是在“对应于”参考序列中的位置的位置。

[0458] 如本文所使用的，术语“长期施用”是指在6周或更长的时间内施用与PEG部分缀合的CBS酶、htCBS或htCBS突变体(例如，具有C15S突变)。术语“长期连续治疗”是指在整个研究过程中通过皮下注射或植入的渗透泵重复施用与PEG部分缀合的CBS酶、htCBS或htCBS突变体(例如，具有C15S突变)。

[0459] 本文描述了通过使用本文描述的药物产品的酶疗法(ET)治疗高胱氨酸尿症和/或CBS缺乏症的方法，所述药物产品包括PEG化的人截短的CBS蛋白，其中在氨基酸位置15处半胱氨酸突变为丝氨酸。

[0460] 本公开的一个或多个实施方式的细节在以下随附说明中阐述。尽管在本公开的实践或测试中可以使用类似于或等同于本文所述的材料和方法的任何材料和方法，但是现在描述优选的材料和方法。通过描述，本公开的其他特征、目的和优点将变得明显。在说明书中，单数形式也包括复数形式，除非上下文另有明确规定。除非另有定义，否则本文使用的所有技术术语和科学术语具有与本公开所属领域的普通技术人员通常理解的相同的含义。在冲突的情况下，将以本说明书为准。

[0461] 通过以下非限制性实施例来进一步说明本公开。

[0462] 实施例

[0463] 实施例1.自然史研究概述和患者特征

[0464] CBS-HCY-NHS-01是HCU的正在进行的、多中心(8个地点)、国际性、观察性、前瞻性的自然史研究(“NHS”)，该研究招募了55名儿科患者(5-17岁)和成年患者(>18岁)，以在当前的临床管理实践下表征患者在3年内的HCU的临床病程，从而了解高胱氨酸尿症如何随时间推移而发展，并为患有高胱氨酸尿症的患者确定新的治疗方法。CBS-HCY-NHS-01研究了总Hcy(tHcy)和相关硫代谢物的血浆浓度的范围，以及该疾病的临床后遗症的可变性。进行了评估患者特征、认知障碍和骨骼异常的中期分析。在表1中提供了观察到的患者特征。

[0465] 表1.患者人口统计和基线特征

[0466]

患者特征	所有患者中的患病率
入选时年龄，中位数[范围] 儿科（<18 岁），N（%） 成人（≥18 岁），N（%）	21.0 [5-53] 23（42%） 32（58%）
性别：男/女，%	55%/45%
种族/民族，N（%） 白种人 非裔美国人	 51（93%） 3（6%）

[0467]

西班牙裔或拉丁裔 非西班牙裔	6（11%） 46（84%）
成人重量，中位数[范围]，kg	80.5 [55-138]
成人身高，中位数[范围]，cm	176 [148-200]
BMI，中位数[范围]，kg/m^2	21.5 [15.0-49.5]
在<1 岁时诊断，N（%） 是 否	 28（51%） 25（46%）
有 HCU 的家族史，N（%） 是 否	 20（36%） 35（64%）
成年患者的最高教育水平 一些高中生 高中毕业生 一些大学/大学毕业生 硕士 专业学位 未知	 14% 21% 41% 14% 3% 7%
诊断时的 tHcy，† 中位数[范围]，μM 成人（≥18 岁） 儿科（<18 岁）	 100 [5-364] 144 [35-298]
天然蛋白质受限饮食，N（%） 成人（≥18 岁） 儿科（<18 岁）	38（93%） 20（91%） 18（95%）
不含 Met 的 L-氨基酸混合物，N（%） 成人（≥18 岁） 儿科（<18 岁）	32（58%） 15（47%） 17（74%）
B 族维生素补充剂，N（%） 成人（≥18 岁） 儿科（<18 岁）	40（83%） 19（76%） 21（91%）
甜菜碱补充剂，N（%） 成人（≥18 岁） 儿科（<18 岁）	41（85%） 21（84%） 20（87%）
学习时间，中位数[范围]，月	12.2 [0.03$^{\$}$-24.8]

[0468] †历史tHcy数据仅适用于33名患者，自我报告。

[0469] $一名受试者仅经历了访问1。

[0470] 在本自然史研究中纳入55例患有HCU的患者。在中期分析时，研究的中位时间为12.2个月。该疾病对两种性别的影响相似(55％男性，45％女性)。研究中的HCU患者年龄较小(中位年龄：21.0岁)；42％为儿科患者(<18岁)，并且58％为成年患者。这一群体的中位BMI位于正常范围(21.5kg/m2)。半数患者(51％；65％的儿科；41％的成人)在出生后第一年(<1岁)被诊断出。36％的患者有HCU的家族史。中位血浆tHcy水平为95μM(儿科患者为74μm；成年患者为104μM)，与潜在治疗不足的疾病一致。95％的儿科患者具有大于正常值上限(ULN)的tHcy，并且82％的儿科患者的tHcy水平>50μM(82％)。几乎半数(45％)儿科患者的tHcy水平>100μM。所有(100％)成年患者的tHcy水平均高于ULN，93％患者的tHcy水平>50μM，并且77％患者的tHcy>100μM(77％)。根据每次临床访视前记录的3天饮食日记，大多数患者(93％；95％儿科；91％成人)正在遵循天然的蛋白质受限饮食，并且大多数人正在服用不

含Met的L-氨基酸混合物(58%;74%儿科;47%成人)。大多数患者(83%;91%儿科;76%成人)正在服用B族维生素补充剂。大多数患者(85%;87%儿科;84%成人)正在服用甜菜碱(表1)。

[0471] 实施例2.NHS-眼科缺陷

[0472] 历史上,患者常因晶状体异位而被诊断出。在迄今为止进行的最大规模回顾性调查中,85%的HCU患者到20岁时已经发展此病症(Mudd SH等人.“胱硫醚β-合酶缺乏症引起的高胱氨酸尿症的自然史(The natural history of homocystinuria due to cystathionine beta-synthase deficiency)”.《美国人类遗传学杂志》1985;37(1):1-31)。相比之下,在这一管理群体中,只有19%的成人和9%的儿科患者患有这种病症(参见表2),这表明受限饮食、B族维生素和甜菜碱补充剂可以有效缓解眼科缺陷,尽管存在潜在的治疗不足的疾病,如通过中位血浆tHcy水平所证明的。

[0473] 表2.眼科缺陷

[0474]

	所有患者 N=55	儿科 (5-17 岁) N=23	成人 (≥18 岁) N=32
任何眼部缺陷	38 (69%)	16 (70%)	22 (69%)
晶状体异位/晶状体错位	8 (15%)	2 (9%)	6 (19%)
白内障	6 (11%)	2 (9%)	4 (13%)
视网膜变性	1 (2%)	0 (0%)	1 (3%)
视网膜色素变性	1 (2%)	1 (4%)	0 (0%)
远视	11 (28%)	7 (30%)	4 (13%)
近视	25 (63%)	9 (39%)	16 (50%)

[0475] 实施例3.NHS-CBS基因突变

[0476] 对研究参与者的CBS基因的突变的分析显示,在48名患者中鉴定了26种独特的突变,其中16名患者明显为纯合子,32名患者明显为复合杂合子。使用如Ogino,Shuji等人.“分子诊断学中的标准突变命名法:实践和教育挑战(Standard mutation nomenclature in molecular diagnostics:practical and educational challenges)”.《分子诊断学杂志》9.1(2007):1-6(其公开内容通过引用整体并入本文)中描述的基因突变的标准命名法,将DNA突变和产生的CBS突变蛋白显示在表3中。遗传定义的HCU患者包括具有CBS基因的突变的患者,包括但不限于表3所示的任何突变。

[0477] 表3.CBS基因的患者突变

[0478]

DNA	蛋白质
c.689del	p.Leu230Argfs*39
c.209+1G>A	p.(?)
c.1126G>A	p.Asp376Asn
c.752T>A	p.Leu251Gln
c.808_810del	p.Glu270del
c.442G>A	p.Gly148Arg
c.536_553del	p.Asp179_Leu184del
c.700G>A	p.Asp234Asn
c.1106G>C	p.Arg369Pro
c.325T>C	p.Cys109Arg
c.361C>T	p.Arg121Cys
c.1006C>T	p.Arg336Cys
c.785C>T	p.Thr262Met
c.1058C>T	p.Thr353Met
c.1039G>A	p.Gly347Ser
c.770C>T	p.Thr257Met
c.153_165del	p.Arg51Serfs*27
c.1224-2A>C	p.(?)
c.919G>A	p.Gly307Ser
c.1330G>A	p.Asp444Asn
c.833T>C	p.Ile278Thr
c.1152G>C	p.Lys384Asn
c.1339C>T	p.Pro447Ser
c.488A>G	p.Tyr163Cys
c.624G>A	p.Trp208*
c.738del	p.Lys274Serfs*2
c.1136G>A	p.Arg379Gln
c.1397C>A	p.?
c.162G>A	p.Trp54Ter
c.19dupC	p.Gln7ProfsX30
c.302T>C	p.Leu101Pro
c.362G>A	Arg121His
c.667-14_667-7delCTCTTTCT	p?
c.685C>A	p.Pro229Thr
c.816T>A	pCys272ter

[0479]

c.829-78_1146-273delins469	p.?
c.982G>A	p.?

[0480] 实施例4.NHS-tHcy水平

[0481] 在每次访视时测定tHcy水平(表4)。大多数患者(96%)的血浆tHcy水平是>12岁的14μM的ULN和0-12岁的9.6μM的ULN的5至40倍。受试者内部可变性中等。总体而言,在整个研究中,访视1时tHcy水平低的患者倾向于具有低tHcy水平(反之亦然)(皮尔逊R=0.6294)。在一些患者中观察到的较大的访视间可变性可能归因于访视之间饮食/疗法依从性的变

化,这突出表明了在维持患者对受限饮食和膳食补充剂的依从性方面的挑战。

[0482] 表4.研究期间的tHcy水平

[0483]

患者	N	中位数(μM)	最小值(μM)	最大值(μM)
所有	52	95	2	402
儿科(<18岁)	22	74	2	361
成人(≥18岁)	30	104	10	402

[0484] 实施例5.NHS-其他代谢指标

[0485] 在研究期间确定了各种实验室值(参见图1和表5)。尽管大多数患者遵循标准护理(蛋白质受限饮食、B族维生素、补充剂、甜菜碱),但仍观察到高tHcy和Met以及低胱硫醚和总半胱氨酸水平,这是该疾病的标志。在11%的患者(14%的儿科,10%的成人)中观察到甲硫氨酸水平>1000μM,并且在33%的患者(36%的儿科,33%的成人)中观察到甲硫氨酸水平≥600μM。正如大多数患者服用这些补充剂所预期的那样,观察到高甜菜碱、维生素B12和B6水平。在76%的患者中观察到二甲基甘氨酸(DMG)水平高于ULN,这可能导致一些患者中的急性心肌梗死的更高的风险(Svingen等人2013)。在37%的患者(52%儿科;28%成人)中观察到ALT水平高于ULN。在43%的患者(74%儿科,21%成人)中观察到肌酐水平低于正常值下限(LLN),并且可能是由于蛋白质限制引起的低肌肉质量。在35%的测试的患者中观察到hsCRP水平高于ULN(N=40;仅在≥13岁的患者中测试,仅在≥18岁的患者中观察)。在28%的患者中观察到低蛋白C活性水平,并且在31%的患者中观察到低纤维蛋白原水平(N=29;两者仅在≥13岁的患者中进行测试,仅在≥18岁的患者中观察)。

[0486] 观察到以下的正常水平:AST(89%的患者)(所有测试的患者);抗凝血酶III(83%的患者)和载脂蛋白A(93%的患者)(只有≥13岁的患者测试这些实验室参数);骨特异性碱性磷酸酶(97%的患者)、血清CTX(95%的患者)和P1NP(87%的患者)(只有>18岁的患者测试这些实验室参数)。

[0487] 在图1中提供了额外的实验室值,其中条形表示具有高/正常/低实验室值的患者的数目。

[0488] 表5.选定的异常实验室值(所有实验室范围都经过年龄调整)

[0489]

	所有患者	儿科 (<18 岁)	成人 (≥18 岁)
tHcy>ULN	51 (98%)	21 (95%)	30 (100%)
tHcy>50 μM	46 (88%)	18 (82%)	28 (93%)
tHcy>100 μM	33 (63%)	10 (45%)	23 (77%)
甲硫氨酸>ULN	45 (88%)	20 (91%)	23 (85%)
甲硫氨酸>1,000 μM	6 (11%)	3 (14%)	3 (10%)
甲硫氨酸≥600 μM	18 (33%)	8 (36%)	10 (33%)
胱硫醚<LLN	48 (94%)	20 (95%)	26 (93%)
DMG >ULN	41 (79%)	19 (86%)	20 (71%)
ALT >ULN	20 (37%)	12 (52%)	8 (28%)
肌酐<LLN	23 (43%)	17 (74%)	6 (21%)
hsCRP*>ULN	14 (35%)	0 (0%) **	13 (45%) **
hsCRP*>2x ULN	10 (25%)	0 (0%) **	9 (31%) **
蛋白 C 活性* <LLN	8 (28%)	0 (0%)	8 (28%)
纤维蛋白原* <LLN	9 (31%)	0 (0%)	9 (31%)

[0490] *仅在≥13岁的患者中测试了hsCRP、蛋白C活性和纤维蛋白原。

[0491] **一名患者的年龄缺失。

[0492] 表5和图1表明，除tHcy外，甲硫氨酸、胱硫醚、DMG、ALT、肌酐、hsCRP、蛋白C活性、纤维蛋白原、ALT-SGPT、甜菜碱、胱硫醚、血浆维生素B6、总半胱氨酸和维生素B12等可用作疾病严重程度或进展的代谢指标，或以其他方式指示个体中的疾病严重程度或进展。这些患者特征表明，尽管在卓越中心进行观察和治疗，并开具天然蛋白质受限饮食和/或不含Met的L-氨基酸混合物和补充剂，但许多患者具有是tHcy的ULN的5至40倍的血浆tHcy值、高硫氨酸血症(≥6000μM)(在33％的患者中观察到：36％儿科，33％成人)、眼部缺陷、炎症体征、蛋白质代谢和/或肝功能异常。这些数据表明，当前的饮食和治疗干预效果不佳和/或大多数患者无法保持依从性，导致高tHcy水平，即使是在经常在卓越中心接受监测的患者中也是如此。特别是，这些数据还指出，甜菜碱不会导致HCU中的tHcy水平的适当控制，因此，与普遍观点相反，甜菜碱本身不足以治疗HCU。此外，本研究鉴定了新的CBS基因突变(表3)和新的实验室标记物或疾病严重程度或疾病进展的代谢指标(表5和图1)，预计这些标记物或指标可用于诊断HCU病、监测疾病进展、监测患者依从性和对治疗的反应、评估生活质量、调整疗法以适合特定患者概况，以及用于临床试验以确定新治疗的疗效。

[0493] 实施例6.NHS—骨骼脆性

[0494] 在基线和1年时，使用全息或通用电气/月球密度计(General Electric/Lunar densitometers)，通过双能X射线吸收法(DXA)在三个部位(髋部、腰椎和全身)处评估了骨质量密度(BMD)。计算每个部位的BMD和Z评分(相对于参考组的平均BMD值的标准偏差数，按年龄和性别归一化)。-1至-2.5之间的Z评分表示骨量减少，而低于-2.5的Z评分表示骨质疏松。测量血浆中的tHcy水平，并根据3天的食物记录来计算中位总蛋白质摄入(g/天)。总蛋白质摄入被定义为来自饮食的总天然蛋白质和来自不含Met的L-氨基酸混合物的蛋白质(如果由患者服用)的总和。使用皮尔逊相关系数(R)来计算BMD与tHcy或膳食蛋白质之间的相关性。表6示出了与不同Z评分相关的百分位等级。

[0495] 表6.Z评分和百分位等级

[0496]

百分位	Z 评分
5	-1.65
10	-1.29
15	-1.04
20	-0.84
25	-0.68
30	-0.53
25	-0.39
40	-0.26
45	-0.13
50	0
55	0.13
60	0.26
65	0.39
70	0.53
75	0.68
80	0.84
85	1.04
90	1.29

[0497]

95	1.65

[0498] 43名患者的骨密度数据可用。对于成人和儿科患者在所有身体部位处中位Z评分均为

[0499] 负值(表7),表明骨骼脆性。46%的成人和53%的儿科患者在至少一个部位的骨密度低于

[0500] 第15百分位(Z评分≤-1)(表7)。对于每位患者,BMD结果和Z评分在12个月内保持

[0501] 稳定(N=15-20;在每个位置处在第1次就诊和第3次就诊的BMD之间的相关性:皮尔逊

[0502] 的R=0.94至0.97;p<0.0001)。

[0503] 表7.按DXA扫描位置的Z评分结果的汇总

[0504]

	髋部			脊柱			身体		
	所有患者	成人	儿科	所有患者	成人	儿科	所有患者	成人	儿科
N	43	24	19	42	23	19	37	19	18
平均值	-0.76	-0.60	-0.97	-0.52	-0.63	-0.39	-0.72	-0.81	-0.62
SD	1.32	1.38	1.26	1.30	1.44	1.15	1.37	1.36	1.20
中位数	-0.9	-0.75	-1.00	-0.65	-0.80	-0.50	-0.8	-1.00	-0.65
范围	-2.6至3.0	-2.4至3.0	-2.6至1.9	-3.2至3.2	-3.2至3.2	-2.3至1.9	-3.0至2.2	-3.0至2.2	-2.9至1.3
N(%)具有Z评分≤-1.0的患者	21 (48.8%)	11 (45.8%)	10 (52.6%)	14 (33.3%)	10 (43.5%)	4 (21.1%)	17 (45.9%)	10 (52.6%)	7 (38.9%)

[0505] 血浆tHcy水平<100μM的患者比水平>100μM的患者具有大得多的骨骼脆性(图2)。在三个部位处的血浆tHcy水平与BMD之间均存在正相关(皮尔逊R=0.33至0.51;p<0.03;表8)。这些数据表明,BMD随着总膳食蛋白质摄入的增加而改善,如由所有三个部位处的BMD与

总膳食蛋白质摄入之间的正相关所示(皮尔逊的R＝0.55至0.76;p<0.011;表8)。在所有三个部位处的BMD与C-反应蛋白(hsCRP)——一种炎症的标记物之间存在正相关(皮尔逊的R＝0.36至0.39;p<0.051;表8),提示炎症可能与高tHcy或增加的蛋白质15摄入相关。

[0506] 表8.BMD与其他参数之间的相关性

[0507]

BMD	N(所有，成人，儿科)	所有受试者	成人	儿科
与 tHcy 的皮尔逊相关性				
髋部	45, 26, 19	0.3340（p=0.0249）	0.1545（p=0.4510）	0.4963（p=0.0307）
脊柱	41, 24, 17	0.4784（p=0.0016）	0.5001（p=0.0128）	0.5005（p=0.0408）
身体	38, 19, 19	0.5095（p=0.0011）	0.4772（p=0.0388）	0.3939（p=0.0952）

[0508]

与 hsCRP 的皮尔逊相关性				
髋部	33, 26, 7	0.3597（p=0.0398）	0.3398（p=0.0894）	0.3334（p=0.4649）
脊柱	30, 24, 6	0.3611（p=0.0500）	0.2875（p=0.1732）	0.6717（p=0.1440）
身体	26, 19, 7	0.3925（p=0.0473）	0.2999（p=0.2122）	0.2123（p=0.6476）
与总膳食蛋白的皮尔逊相关性				
髋部	24, 11, 13	0.7566（p<0.0001）	0.7268（p=0.0113）	0.6843（p=0.0099）
脊柱	22, 10, 12	0.6870（p=0.0004）	0.7073（p=0.0221）	0.5532（p=0.0621）

[0509] 这些数据表明,尽管年龄相对较轻,但大多数HCU患者仍具有骨骼脆性,这证实了过去的研究(Parrot F等人.《遗传代谢疾病杂志》.“晚期诊断的成人高胱胺酸尿症患者的骨质疏松(Osteoporosis in late-diagnosed adult homocystinuric patients)”2000;23:338-40;Weber DR等人.“低骨矿物质密度是患有高胱氨酸尿症的患者中常见的表现(Low bone mineral density is a common finding inpatients with homocystinuria)”.《医学遗传学基础代谢(Med Genet Metab.)》2016;117:351-4)。对于每个患者,BMD结果和Z评分在12个月内保持稳定。因此,通过DXA评估的BMD和Z评分可以被认为是可靠的终点,以评估未来对HCU患者的临床试验中研究治疗的疗效。这一群体的骨骼健康与较高的总膳食蛋白质摄入和较高的tHcy水平相关,这表明,通过长期限制他们的总蛋白质摄入来控制他们的tHcy水平,患者的骨骼脆性可能会增加。

[0510] 一般而言,HCU患者比健康群体具有更大的骨骼脆性。然而,如上所述,在患者中,较高的tHcy水平与骨量正相关。因此,具有升高的tHcy水平的受试者(包括非遗传定义的CBS缺乏症受试者)的骨骼症状可以使用本文所述的方法进行治疗,以减轻与升高的tHcy水平相关的骨骼症状。

[0511] 实施例7.NHS-认知

[0512] 先前的研究已经证明作为HCU中的智力功能的关键预测因子的终生总Hcy(tHcy)之间的关联(Al-DewikN等人.“卡塔尔人群中经典高胱氨酸尿症的自然史,包括临床、生化和分子特征(Natural history,with clinical,biochemical and molecular characterization,of classical homocystinuria in the Qatari population)”.《遗传代谢疾病杂志》2019;4月10日;Yap S等人.“患有胱硫醚β-合酶缺乏症引起的吡哆醇无应答性高胱氨酸尿症的早期治疗个体的智力(The intellectual abilities of early-treated individuals with pyridoxine-nonresponsive homocystinuria due to cystathionineβ-synthase deficiency)”.《遗传代谢疾病杂志》2001;24(4):437-47)。当前文献中缺少对认知优势或缺陷的概况的描述,以及对HCU的近端生物标记物和认知能力是否相关的探索。

[0513] 执行功能是指一套自上而下的精神过程,这些过程费力且需要注意力和专注力(DiamondA.“执行功能(Executive functions)”.《心理学年度评论(Annu Rev Psychol.)》2013;64:135-68)。执行功能对身体健康的变化特别敏感,并且是评估与HCU严重程度的生物标记物关联的良好候选者。与整体智力不同,执行功能可以通过干预来改善(Diamond2013)。认知功能在基线时和每6个月使用年龄归一化的NIH工具箱认知成套工具(NIH Toolbox Cognition Battery)(NIHCB)进行评估,该成套工具评估语言、工作记忆、情景记忆、处理速度、定势转换和抑制性控制(Weintraub S等人.“使用NIH工具箱进行认知评估(Cognition assessment using the NIH Toolbox)”《神经病学》2013:80(11):S54-64;Weintraub等人.“NIH工具箱认知成套工具(CB):介绍和儿科数据(NIH Toolbox Cognition Battery(CB):introduction andpediatric data)”.《儿童研究学会专论(Monogr Soc Res ChildDev.)》2013;78(4):1-15)。分析使用了来自就诊的中位评分。可获得来自1至5次就诊的患者数据。测量血浆中的tHcy水平。使用皮尔逊相关系数(r)来计算认知功能与tHcy、Cys和Met之间的相关性。

[0514] 51例患者的认知功能数据是可用的。HCU患者的总体认知功能受到严重影响(第20百分位的中位总认知复合;成人的第21百分位和儿科患者的第14百分位)。受影响的认知领域包括流体认知复合、执行功能、记忆和处理速度。流体认知复合是对记忆、执行功能和处理速度的总结评分。它包括新的学习和信息处理的能力。在本研究中,发现中位流体认知复合在第10百分位。执行功能代表了对自动应答倾向的抑制和基于任务需求转换行为的能力。它包括设置移位和抑制性控制。发现本研究中的中位执行功能在设置移位的第18个百分位和抑制性控制的第9个百分位。记忆表示在短期缓冲区中保存信息和操作信息的能力,以及获取、存储和检索信息的能力。它包括工作记忆和情景记忆。本研究中的中位记忆被发现位于工作记忆的第24个百分位和情景记忆的第32个百分位。处理速度代表了接受信息的精神效率。在本研究中,发现中位处理速度位于第24个百分位。

[0515] 语言处理功能(接受性词汇和单词阅读)和反映过去学习和知识的认知的区域(晶体认知复合)均在正常范围内。

[0516] NIH工具箱结果在每次就诊中是一致的(对于大多数患者,CV<10%)。类内相关性(ICC)在0.73(抑制性控制)至0.89(总认知复合)的范围内,其中ICC为0.64的情景记忆除外。NIH工具箱的原始验证认为0.4至0.74的ICC是足够的,并且高于0.75的ICC是极好的。图3显示了测试的认知功能的NIH工具箱中位和四分位数评分。

[0517] 确定认知与其他参数之间的相关性。tHcy水平与总体认知(总体认知复合)呈负相关(r=-0.32;p=0.023;表9);即tHcy水平越高,认知评分越低。抑制性控制是受tHcy水平影响最大的域(r=-0.33;p=0.019;表9)。

[0518] 虽然HCU患者的整体认知功能普遍受到严重影响(r=-0.32;p=0.023;表9),但损伤随着tHcy水平的增加而增加。在所有认知区域中,tHcy水平>100μM的患者总体上比tHcy≤100μM的患者认知差得多。当比较tHcy≤100μM的患者与tHcy>100μM的患者时,抑制性控制和接受性词汇的域显示出最具统计学意义的差异(图4)。相反,血浆Met水平与总体认知呈负相关(r=-0.28;p=0.049;表9),表明tHcy和Met水平应尽可能保持接近正常值。Cys水平与总体认知呈正相关(r=0.37;p=0.008;表9)。

[0519] 表9.认知与其他参数之间的相关性

[0520]

认知区域	皮尔逊参数	血浆 tHcy	血浆 Cys	血浆 Met
设置移位	r	-0.2787	0.1547	-0.2001
	p	0.0476	0.2783	0.1591
	n	51	51	51
抑制性控制	r	-0.3288	0.2223	-0.1987
	p	0.0185	0.117	0.1622
	n	51	51	51
处理速度测试	r	-0.1526	0.0565	0.0620
	p	0.2852	0.6939	0.6659
	n	51	51	51
情景记忆	r	-0.1372	0.3245	-0.3374
	p	0.337	0.0202	0.0155
	n	51	51	51
流体认知复合	r	-0.28554	0.24182	-0.23209
	p	0.042	0.087	0.101
	n	51	51	51
总认知复合	r	-0.3181	0.36741	-0.27767
	p	0.0229	0.008	0.0485
	n	51	51	51

[0521] 血浆tHcy水平较低的患者在执行功能的测量方面表现更好,扩展了先前的研究,该研究表明控制tHcy水平对于将智力功能维持在平均范围内至关重要(Walter JH等人."胱硫醚β-合酶缺乏症的治疗策略:Willink生化遗传学部门过去30年的经验(Strategies for the treatment of cystathionineβ-synthase deficiency:the experience of the Willink Biochemical Genetics Unit over the past 30years)".《欧洲儿科杂志》1998;157(2):S71-6;Yap等人2001,Al-Dewik等人2019)。

[0522] 本研究表明,NIH工具箱是一种可靠的工具,已证明其在评估患有HCU的患者随时间推移的认知功能(包括跟踪对干预的反应)方面的潜在价值。

[0523] 本研究的结果对HCU的管理具有现实意义。神经心理学评估显示为HCU患者的医疗护理的重要组成部分,并且执行功能的评估(包括应答抑制)应作为这些评估的一部分被包括在内。对于患有HCU的儿童,应考虑给予与具有其他执行功能问题(诸如ADHD)的儿童类似的支持。

[0524] HCU的特定认知缺陷的鉴定为未来关注受HCU影响的神经系统的研究提供线索。例如,背侧前扣带回皮层激活与监控冲突信息(侧抑制任务的应答抑制的核心要素)相关(Botvinick MM等人."冲突监控与前扣带回皮层:一项更新(Conflict monitoring and anterior cingulate cortex:an update)").《认知科学的趋势(Trends Cog Sci.)》2004;8(12):539-46)。

[0525] tHcy水平与认知症状之间的显著相关性表明,tHcy水平是认知损害的可靠指标。因此,可以使用本文所述的方法来治疗具有升高的tHcy水平的受试者(包括非遗传定义的CBS缺乏症受试者)中的认知症状,以减轻与升高的tHcy水平相关的认知症状。

[0526] 实施例8.tHcy定量方法的验证

[0527] 目前用于定量代谢物(诸如同型半胱氨酸、甲硫氨酸、半胱氨酸和其他与CBS缺乏症有关的物质)的程序,包括在前面实施例和表5及图1中所述的程序,要求在分析前从全血液样品中分离血浆。这增加了对复杂设备和专业技术知识的需求,以便从来自受试者的血液样品开始分析任何给定的代谢物。需要廉价和高效的经验证的方法来收集和制备用于定

量分析的患者血液样品。此类经验证的方法将减少诊断患有CBS缺乏症的患者所需的成本和时间，例如，通过使患者能够在家中采集血液样品，而无需检测机构。这些方法还将允许各受试者和医疗专家能够更有效地实时监测疾病状况，并通过能够在家提交多个样品来跟踪治疗。此外，此类经验证的诊断和诊断方法可以允许受试者在无需医疗专业人员帮助的情况下可靠地自行取样以监测代谢物水平。居家采样涉及采集和处理血液样品以用于定量分析，例如，使用诸如手指穿刺和血浆分离装置(PSD)的装置。目前血浆总同型半胱氨酸的定量标准基于由LC-MS/MS测得的tHcy水平。因此，需要替代的诊断方法来采集和制备全血液样品，以供LC-MS/MS分析。一种此类替代方法涉及采集干血斑点(“DBS”)。可替代地或附加地，可以使用PSD。使用DBS和PSD方法收集和分析代谢物水平的方法描述于例如WO2014150900和US20120318971中，其公开内容通过引用整体并入本文。然而，这些替代方法从未经过验证，并且未评估其在家庭使用应用中的可靠性和实用性，例如由各受试者进行的家庭取样或家庭测试。因此，使用如在WO2014150900中所述的PSD方法来测量受试者总同型半胱氨酸水平，并与传统的血浆分离LC-MS/MS方法进行比较。结果在表10中提供，其中“PSD方法”指在WO2014150900中描述的PSD方法，并且“LC-MS/MS方法”指传统的血浆分离LC-MS/MS方法。

[0528] 表10.使用PSD方法验证tHcy定量

[0529]

血浆 tHcy（μM）	
PSD 方法	LC-MS/MS 方法
173	118
20.6	31.6
10.7	8.9
86.6	139
18.2	13.2
169	94.7
13.4	10.2
91.1	82.4
55.8	30.1
17.2	12.1
53.4	52.6
88.8	61.1
104	58.9
140	133
373	652
44	31.7
104	83.9
402	491
299	203
391	364
104	81.1
37.4	32
127	133
66.7	69.2

[0530] 进行简单的线性回归分析以评估使用PSD方法和传统LC-MS/MS方法测试的样品之

间的相关性。最佳拟合线的斜率为1.096(1/斜率＝0.912)，其中斜率的标准误差为0.0804(斜率的95％置信区间为0.9302至1.263)。这些结果显示出很强的相关性，并验证了在量化来自单独的受试者的血液样品的tHcy的PSD方法。

[0531] 等同物和范围

[0532] 本领域技术人员将认识到或能够仅使用常规实验来确定根据本文所述的公开的特定实施方式的许多等同物。本公开的范围不旨在限于以上描述，而是如所附权利要求中所述。

[0533] 在权利要求中，冠词如“一(a)”、“一(an)”和“所述(the)”可以表示一个或多于一个，除非有相反的说明或以其他方式从上下文中显而易见。如果一个、多于一个或所有的组成员存在于给定的产品或工艺中、在给定的产品或工艺中使用或以其他方式与给定的产品或过程相关，则包括组中的一个或多个成员之间的“或”的权利要求或描述被视为满足，除非有相反的指示或以其他方式从上下文中显而易见。本公开包括其中恰好一个组成员存在于给定的产品或工艺中、在给定的产品或工艺中使用或以其他方式与给定的产品或过程相关的实施方式。本公开包括其中多于一个或整个组成员存在于给定的产品或工艺中、在给定的产品或工艺中使用或以其他方式与给定的产品或过程相关的实施方式。

[0534] 还应注意，术语“包含”旨在是开放式的，并且允许但不要求包括额外的要素或步骤。当在本文中使用术语“包含”时，术语“由……组成”因此也被涵盖和公开。

[0535] 给出范围的情况下，包括终点。此外，应当理解，除非另有说明或以其他方式从上下文和本领域普通技术人员的理解中显而易见，否则在本公开的不同实施方式中，表示为范围的值可以采用所述范围内的任何特定值或子范围，直到所述范围下限的十分之一单位，除非上下文另有明确说明。

[0536] 此外，应当理解，落入现有技术中的本公开的任何特定实施方式都可以明确地从任何一个或多个权利要求中排除。由于此类实施方式被认为是本领域普通技术人员已知的，因此即使在本文中没有明确阐述排除，也可以将它们排除。本公开的组合物的任何特定实施方式(例如，任何抗生素、治疗或活性成分；任何生产方法；任何使用方法；等等)可以出于任何原因被排除在任何一个或多个权利要求之外，无论是否与现有技术的存在相关。

[0537] 应当理解，已经使用的词语是描述性的词语，而不是限制性的词语，并且在不脱离本公开更广泛方面的真实范围和精神的情况下，可以在所附权利要求的范围内进行改变。

[0538] 虽然已经相对于所描述的几个实施方式以某种长度和某种特殊性描述了本公开，但是并不意味着本公开应当限于任何此类细节或实施方式或任何特定的实施方式，而是应当参考所附权利要求来解释本公开，以便鉴于现有技术提供对此类权利要求的最广泛的可能解释，并且因此有效地包括本公开的预期范围。

序列表

<110> M•塞洛斯-莫拉

E•M•布布利尔

F•格拉文

<120> 用于治疗升高的同型半胱氨酸水平的胱硫醚β-合成酶酶疗法

<130> 2089.1006PCT

<140> PCT/USXXXX/XXXXXX

<141> 2020-09-03

<150> 62/983,862

<151> 2020-03-02

<150> 62/895,230

<151> 2019-09-03

<160> 5

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 412

<212> PRT

<213> 智人

<400> 1

Pro Ser Glu Thr Pro Gln Ala Glu Val Gly Pro Thr Gly Ser Pro His
1 5 10 15
Arg Ser Gly Pro His Ser Ala Lys Gly Ser Leu Glu Lys Gly Ser Pro
20 25 30
Glu Asp Lys Glu Ala Lys Glu Pro Leu Trp Ile Arg Pro Asp Ala Pro
35 40 45
Ser Arg Cys Thr Trp Gln Leu Gly Arg Pro Ala Ser Glu Ser Pro His
50 55 60
His His Thr Ala Pro Ala Lys Ser Pro Lys Ile Leu Pro Asp Ile Leu
65 70 75 80
Lys Lys Ile Gly Asp Thr Pro Met Val Arg Ile Asn Lys Ile Gly Lys
85 90 95
Lys Phe Gly Leu Lys Cys Glu Leu Leu Ala Lys Cys Glu Phe Phe Asn
100 105 110
Ala Gly Gly Ser Val Lys Asp Arg Ile Ser Leu Arg Met Ile Glu Asp
115 120 125
Ala Glu Arg Asp Gly Thr Leu Lys Pro Gly Asp Thr Ile Ile Glu Pro
130 135 140
Thr Ser Gly Asn Thr Gly Ile Gly Leu Ala Leu Ala Ala Ala Val Arg

145 150 155 160
Gly Tyr Arg Cys Ile Ile Val Met Pro Glu Lys Met Ser Ser Glu Lys
165 170 175
Val Asp Val Leu Arg Ala Leu Gly Ala Glu Ile Val Arg Thr Pro Thr
180 185 190
Asn Ala Arg Phe Asp Ser Pro Glu Ser His Val Gly Val Ala Trp Arg
195 200 205
Leu Lys Asn Glu Ile Pro Asn Ser His Ile Leu Asp Gln Tyr Arg Asn
210 215 220
Ala Ser Asn Pro Leu Ala His Tyr Asp Thr Thr Ala Asp Glu Ile Leu
225 230 235 240
Gln Gln Cys Asp Gly Lys Leu Asp Met Leu Val Ala Ser Val Gly Thr
245 250 255
Gly Gly Thr Ile Thr Gly Ile Ala Arg Lys Leu Lys Glu Lys Cys Pro
260 265 270
Gly Cys Arg Ile Ile Gly Val Asp Pro Glu Gly Ser Ile Leu Ala Glu
275 280 285
Pro Glu Glu Leu Asn Gln Thr Glu Gln Thr Thr Tyr Glu Val Glu Gly
290 295 300
Ile Gly Tyr Asp Phe Ile Pro Thr Val Leu Asp Arg Thr Val Val Asp
305 310 315 320
Lys Trp Phe Lys Ser Asn Asp Glu Glu Ala Phe Thr Phe Ala Arg Met
325 330 335
Leu Ile Ala Gln Glu Gly Leu Leu Cys Gly Gly Ser Ala Gly Ser Thr
340 345 350
Val Ala Val Ala Val Lys Ala Ala Gln Glu Leu Gln Glu Gly Gln Arg
355 360 365
Cys Val Val Ile Leu Pro Asp Ser Val Arg Asn Tyr Met Thr Lys Phe
370 375 380
Leu Ser Asp Arg Trp Met Leu Gln Lys Gly Phe Leu Lys Glu Glu Asp
385 390 395 400
Leu Thr Glu Lys Lys Pro Trp Trp Trp His Leu Arg
405 410

<210> 2
<211> 551
<212> PRT
<213> 智人
<400> 2
Met Pro Ser Glu Thr Pro Gln Ala Glu Val Gly Pro Thr Gly Cys Pro

1 5 10 15
His Arg Ser Gly Pro His Ser Ala Lys Gly Ser Leu Glu Lys Gly Ser
20 25 30
Pro Glu Asp Lys Glu Ala Lys Glu Pro Leu Trp Ile Arg Pro Asp Ala
35 40 45
Pro Ser Arg Cys Thr Trp Gln Leu Gly Arg Pro Ala Ser Glu Ser Pro
50 55 60
His His His Thr Ala Pro Ala Lys Ser Pro Lys Ile Leu Pro Asp Ile
65 70 75 80
Leu Lys Lys Ile Gly Asp Thr Pro Met Val Arg Ile Asn Lys Ile Gly
85 90 95
Lys Lys Phe Gly Leu Lys Cys Glu Leu Leu Ala Lys Cys Glu Phe Phe
100 105 110
Asn Ala Gly Gly Ser Val Lys Asp Arg Ile Ser Leu Arg Met Ile Glu
115 120 125
Asp Ala Glu Arg Asp Gly Thr Leu Lys Pro Gly Asp Thr Ile Ile Glu
130 135 140
Pro Thr Ser Gly Asn Thr Gly Ile Gly Leu Ala Leu Ala Ala Ala Val
145 150 155 160
Arg Gly Tyr Arg Cys Ile Ile Val Met Pro Glu Lys Met Ser Ser Glu
165 170 175
Lys Val Asp Val Leu Arg Ala Leu Gly Ala Glu Ile Val Arg Thr Pro
180 185 190
Thr Asn Ala Arg Phe Asp Ser Pro Glu Ser His Val Gly Val Ala Trp
195 200 205
Arg Leu Lys Asn Glu Ile Pro Asn Ser His Ile Leu Asp Gln Tyr Arg
210 215 220
Asn Ala Ser Asn Pro Leu Ala His Tyr Asp Thr Thr Ala Asp Glu Ile
225 230 235 240
Leu Gln Gln Cys Asp Gly Lys Leu Asp Met Leu Val Ala Ser Val Gly
245 250 255
Thr Gly Gly Thr Ile Thr Gly Ile Ala Arg Lys Leu Lys Glu Lys Cys
260 265 270
Pro Gly Cys Arg Ile Ile Gly Val Asp Pro Glu Gly Ser Ile Leu Ala
275 280 285
Glu Pro Glu Glu Leu Asn Gln Thr Glu Gln Thr Thr Tyr Glu Val Glu
290 295 300
Gly Ile Gly Tyr Asp Phe Ile Pro Thr Val Leu Asp Arg Thr Val Val
305 310 315 320

Asp Lys Trp Phe Lys Ser Asn Asp Glu Glu Ala Phe Thr Phe Ala Arg
325 330 335
Met Leu Ile Ala Gln Glu Gly Leu Leu Cys Gly Gly Ser Ala Gly Ser
340 345 350
Thr Val Ala Val Ala Val Lys Ala Ala Gln Glu Leu Gln Glu Gly Gln
355 360 365
Arg Cys Val Val Ile Leu Pro Asp Ser Val Arg Asn Tyr Met Thr Lys
370 375 380
Phe Leu Ser Asp Arg Trp Met Leu Gln Lys Gly Phe Leu Lys Glu Glu
385 390 395 400
Asp Leu Thr Glu Lys Lys Pro Trp Trp Trp His Leu Arg Val Gln Glu
405 410 415
Leu Gly Leu Ser Ala Pro Leu Thr Val Leu Pro Thr Ile Thr Cys Gly
420 425 430
His Thr Ile Glu Ile Leu Arg Glu Lys Gly Phe Asp Gln Ala Pro Val
435 440 445
Val Asp Glu Ala Gly Val Ile Leu Gly Met Val Thr Leu Gly Asn Met
450 455 460
Leu Ser Ser Leu Leu Ala Gly Lys Val Gln Pro Ser Asp Gln Val Gly
465 470 475 480
Lys Val Ile Tyr Lys Gln Phe Lys Gln Ile Arg Leu Thr Asp Thr Leu
485 490 495
Gly Arg Leu Ser His Ile Leu Glu Met Asp His Phe Ala Leu Val Val
500 505 510
His Glu Gln Ile Gln Tyr His Ser Thr Gly Lys Ser Ser Gln Arg Gln
515 520 525
Met Val Phe Gly Val Val Thr Ala Ile Asp Leu Leu Asn Phe Val Ala
530 535 540
Ala Gln Glu Arg Asp Gln Lys
545 550

<210> 3
<211> 1656
<212> DNA
<213> 智人
<400> 3

atgccgtcag aaaccccgca ggcagaagtg ggtccgacgg gttgcccgca ccgtagcggt 60
ccgcattctg caaaaggcag tctggaaaaa ggttccccgg aagataaaga agccaaagaa 120
ccgctgtgga ttcgtccgga cgcaccgtca cgctgtacct ggcagctggg tcgtccggca 180
agcgaatctc cgcatcacca tacggctccg gcgaaaagtc cgaaaattct gccggatatc 240

ctgaagaaaa ttggtgacac cccgatggtt cgtatcaaca aaatcggcaa aaaattcggt 300
ctgaaatgcg aactgctggc taaatgtgaa tttttcaatg cgggcggttc cgtgaaagat 360
cgtatctcac tgcgcatgat tgaagatgct gaacgcgacg gcaccctgaa accgggtgat 420
acgattatcg aaccgacctc tggcaacacg ggtatcggtc tggcactggc ggcggcagtc 480
cgtggttatc gctgcattat cgtgatgccg gaaaaaatga gctctgaaaa agttgatgtc 540
ctgcgtgctc tgggcgcgga attgttcgt accccgacga atgcccgctt cgacagtccg 600
gaatcccatg tgggtgttgc atggcgcctg aaaaacgaaa tcccgaattc gcacattctg 660
gatcagtatc gtaacgctag caatccgctg gcgcattacg ataccacggc cgacgaaatc 720
ctgcagcaat gtgatggcaa actggacatg ctggtcgctt ctgtgggtac cggcggtacc 780
attacgggca tcgcgcgtaa actgaaagaa aaatgcccgg gctgtcgcat tatcggtgtg 840
gatccggaag gcagtattct ggcggaaccg gaagaactga accagaccga acaaaccacg 900
tatgaagttg aaggcatcgg ttacgatttt attccgaccg tcctggatcg cacggtggtt 960
gacaaatggt tcaaaagcaa tgacgaagaa gcctttacct tcgcacgtat gctgatcgct 1020
caggaaggtc tgctgtgcgg tggttcagca ggttcgacgg tcgcagtggc agttaaagct 1080
gcgcaggaac tgcaagaagg tcaacgttgt gtcgtgattc tgccggattc tgttcgcaac 1140
tacatgacca aatttctgag tgaccgttgg atgctgcaaa aaggcttcct gaaagaagaa 1200
gatctgaccg agaaaaaacc gtggtggtgg cacctgcgcg tgcaggaact gggtctgtcc 1260
gcaccgctga ccgttctgcc gaccatcacg tgcggccata cgattgaaat cctgcgtgaa 1320
aaaggttttg atcaggcccc ggttgtcgac gaagcaggcg tgattctggg tatggttacc 1380
ctgggtaaca tgctgagttc cctgctggcg ggcaaagtgc aaccgagcga tcaggttggt 1440
aaagtcatct acaaacaatt caaacagatt cgtctgaccg atacgctggg ccgcctgtcg 1500
cacatcctgg aaatggacca tttcgcgctg gttgtgcacg aacagattca ataccatagc 1560
accggcaaat catcgcagcg ccaaatggtc tttggtgtcg tgacggccat tgatctgctg 1620
aatttcgtgg ccgcacaaga acgtgaccag aaataa 1656

<210> 4
<211> 413
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列的描述：合成的多肽
<400> 4

Met Pro Ser Glu Thr Pro Gln Ala Glu Val Gly Pro Thr Gly Cys Pro
1 5 10 15
His Arg Ser Gly Pro His Ser Ala Lys Gly Ser Leu Glu Lys Gly Ser
20 25 30
Pro Glu Asp Lys Glu Ala Lys Glu Pro Leu Trp Ile Arg Pro Asp Ala
35 40 45
Pro Ser Arg Cys Thr Trp Gln Leu Gly Arg Pro Ala Ser Glu Ser Pro
50 55 60

His His His Thr Ala Pro Ala Lys Ser Pro Lys Ile Leu Pro Asp Ile
65 70 75 80
Leu Lys Lys Ile Gly Asp Thr Pro Met Val Arg Ile Asn Lys Ile Gly
85 90 95
Lys Lys Phe Gly Leu Lys Cys Glu Leu Leu Ala Lys Cys Glu Phe Phe
100 105 110
Asn Ala Gly Gly Ser Val Lys Asp Arg Ile Ser Leu Arg Met Ile Glu
115 120 125
Asp Ala Glu Arg Asp Gly Thr Leu Lys Pro Gly Asp Thr Ile Ile Glu
130 135 140
Pro Thr Ser Gly Asn Thr Gly Ile Gly Leu Ala Leu Ala Ala Ala Val
145 150 155 160
Arg Gly Tyr Arg Cys Ile Ile Val Met Pro Glu Lys Met Ser Ser Glu
165 170 175
Lys Val Asp Val Leu Arg Ala Leu Gly Ala Glu Ile Val Arg Thr Pro
180 185 190
Thr Asn Ala Arg Phe Asp Ser Pro Glu Ser His Val Gly Val Ala Trp
195 200 205
Arg Leu Lys Asn Glu Ile Pro Asn Ser His Ile Leu Asp Gln Tyr Arg
210 215 220
Asn Ala Ser Asn Pro Leu Ala His Tyr Asp Thr Thr Ala Asp Glu Ile
225 230 235 240
Leu Gln Gln Cys Asp Gly Lys Leu Asp Met Leu Val Ala Ser Val Gly
245 250 255
Thr Gly Gly Thr Ile Thr Gly Ile Ala Arg Lys Leu Lys Glu Lys Cys
260 265 270
Pro Gly Cys Arg Ile Ile Gly Val Asp Pro Glu Gly Ser Ile Leu Ala
275 280 285
Glu Pro Glu Glu Leu Asn Gln Thr Glu Gln Thr Thr Tyr Glu Val Glu
290 295 300
Gly Ile Gly Tyr Asp Phe Ile Pro Thr Val Leu Asp Arg Thr Val Val
305 310 315 320
Asp Lys Trp Phe Lys Ser Asn Asp Glu Glu Ala Phe Thr Phe Ala Arg
325 330 335
Met Leu Ile Ala Gln Glu Gly Leu Leu Cys Gly Gly Ser Ala Gly Ser
340 345 350
Thr Val Ala Val Ala Val Lys Ala Ala Gln Glu Leu Gln Glu Gly Gln
355 360 365
Arg Cys Val Val Ile Leu Pro Asp Ser Val Arg Asn Tyr Met Thr Lys

370 375 380
Phe Leu Ser Asp Arg Trp Met Leu Gln Lys Gly Phe Leu Lys Glu Glu
385 390 395 400
Asp Leu Thr Glu Lys Lys Pro Trp Trp Trp His Leu Arg
405 410

<210> 5
<211> 413
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列的描述：合成的
截短的人C15S突变体CBS多肽
<400> 5
Met Pro Ser Glu Thr Pro Gln Ala Glu Val Gly Pro Thr Gly Ser Pro
1 5 10 15
His Arg Ser Gly Pro His Ser Ala Lys Gly Ser Leu Glu Lys Gly Ser
20 25 30
Pro Glu Asp Lys Glu Ala Lys Glu Pro Leu Trp Ile Arg Pro Asp Ala
35 40 45
Pro Ser Arg Cys Thr Trp Gln Leu Gly Arg Pro Ala Ser Glu Ser Pro
50 55 60
His His His Thr Ala Pro Ala Lys Ser Pro Lys Ile Leu Pro Asp Ile
65 70 75 80
Leu Lys Lys Ile Gly Asp Thr Pro Met Val Arg Ile Asn Lys Ile Gly
85 90 95
Lys Lys Phe Gly Leu Lys Cys Glu Leu Leu Ala Lys Cys Glu Phe Phe
100 105 110
Asn Ala Gly Gly Ser Val Lys Asp Arg Ile Ser Leu Arg Met Ile Glu
115 120 125
Asp Ala Glu Arg Asp Gly Thr Leu Lys Pro Gly Asp Thr Ile Ile Glu
130 135 140
Pro Thr Ser Gly Asn Thr Gly Ile Gly Leu Ala Leu Ala Ala Ala Val
145 150 155 160
Arg Gly Tyr Arg Cys Ile Ile Val Met Pro Glu Lys Met Ser Ser Glu
165 170 175
Lys Val Asp Val Leu Arg Ala Leu Gly Ala Glu Ile Val Arg Thr Pro
180 185 190
Thr Asn Ala Arg Phe Asp Ser Pro Glu Ser His Val Gly Val Ala Trp
195 200 205

Arg Leu Lys Asn Glu Ile Pro Asn Ser His Ile Leu Asp Gln Tyr Arg
210 215 220
Asn Ala Ser Asn Pro Leu Ala His Tyr Asp Thr Thr Ala Asp Glu Ile
225 230 235 240
Leu Gln Gln Cys Asp Gly Lys Leu Asp Met Leu Val Ala Ser Val Gly
245 250 255
Thr Gly Gly Thr Ile Thr Gly Ile Ala Arg Lys Leu Lys Glu Lys Cys
260 265 270
Pro Gly Cys Arg Ile Ile Gly Val Asp Pro Glu Gly Ser Ile Leu Ala
275 280 285
Glu Pro Glu Glu Leu Asn Gln Thr Glu Gln Thr Thr Tyr Glu Val Glu
290 295 300
Gly Ile Gly Tyr Asp Phe Ile Pro Thr Val Leu Asp Arg Thr Val Val
305 310 315 320
Asp Lys Trp Phe Lys Ser Asn Asp Glu Glu Ala Phe Thr Phe Ala Arg
325 330 335
Met Leu Ile Ala Gln Glu Gly Leu Leu Cys Gly Gly Ser Ala Gly Ser
340 345 350
Thr Val Ala Val Ala Val Lys Ala Ala Gln Glu Leu Gln Glu Gly Gln
355 360 365
Arg Cys Val Val Ile Leu Pro Asp Ser Val Arg Asn Tyr Met Thr Lys
370 375 380
Phe Leu Ser Asp Arg Trp Met Leu Gln Lys Gly Phe Leu Lys Glu Glu
385 390 395 400
Asp Leu Thr Glu Lys Lys Pro Trp Trp Trp His Leu Arg
405 410

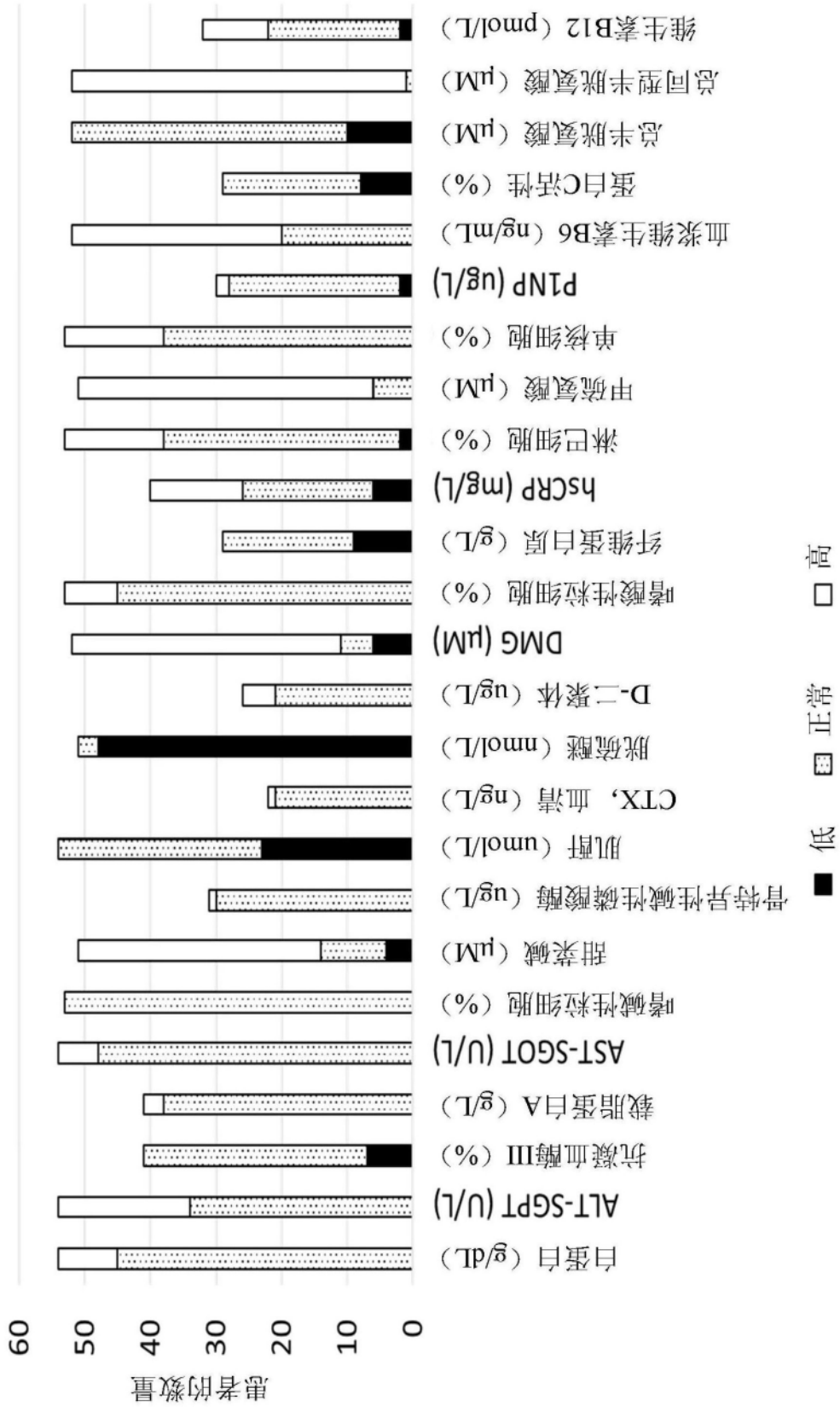

患者的数量
0
10
20
30
40
50
60
白蛋白（g/dL）
ALT-SGPT (U/L)
抗凝血酶III（%）
载脂蛋白A（g/L）
AST-SGOT (U/L)
嗜碱性粒细胞（%）
甜菜碱（μM）
骨特异性碱性磷酸酶（ug/L）
肌酐（umol/L）
CTX，血清（ng/L）
胱硫醚（nmol/L）
D-二聚体（ug/L）
DMG (μM)
嗜酸性粒细胞（%）
纤维蛋白原（g/L）
hsCRP (mg/L)
淋巴细胞（%）
甲硫氨酸（μM）
单核细胞（%）
P1NP (ug/L)
血浆维生素B6（ng/mL）
蛋白C活性（%）
总半胱氨酸（μM）
总同型半胱氨酸（μM）
维生素B12（pmol/L）
正常
高
低

图1

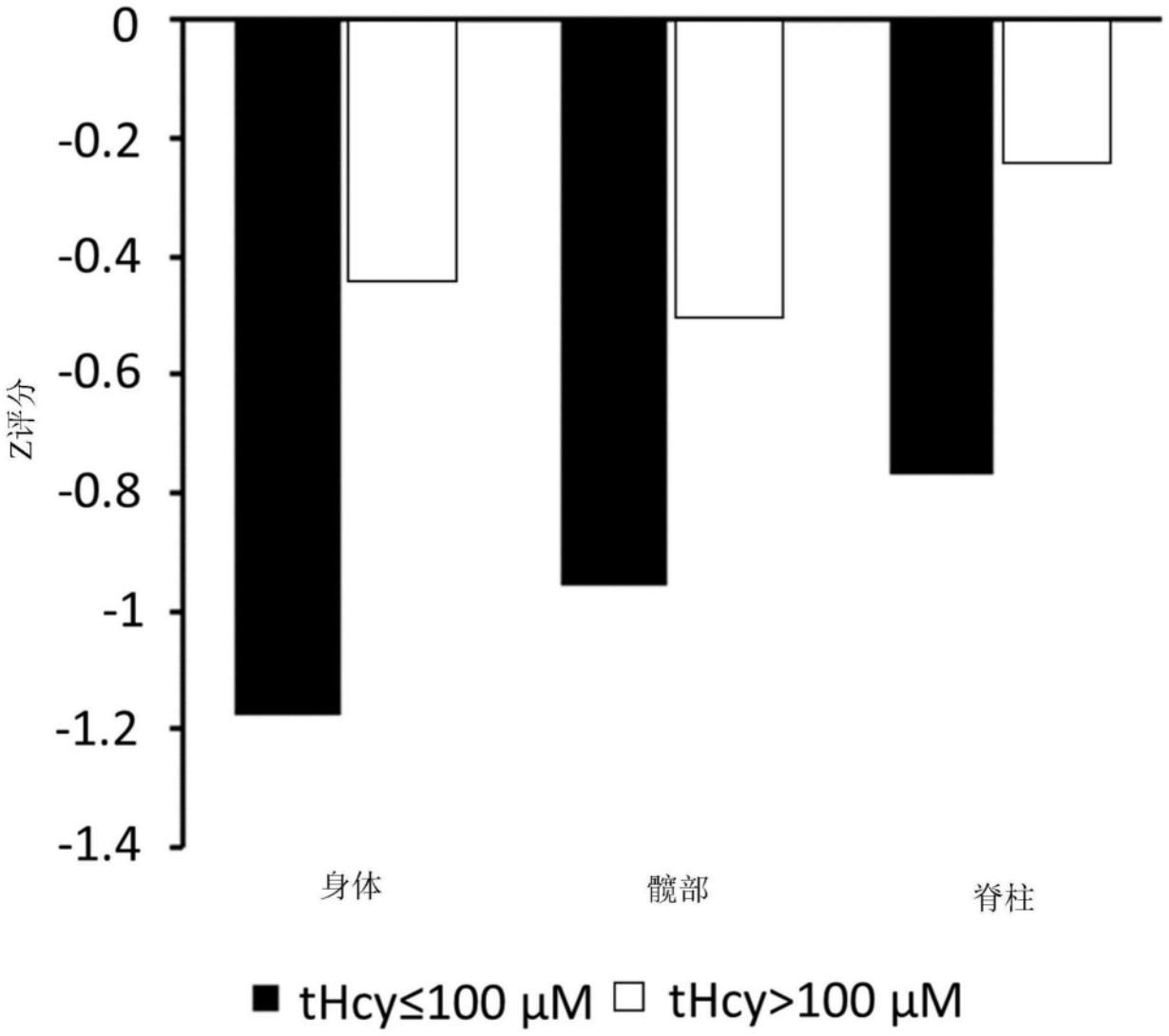


图2

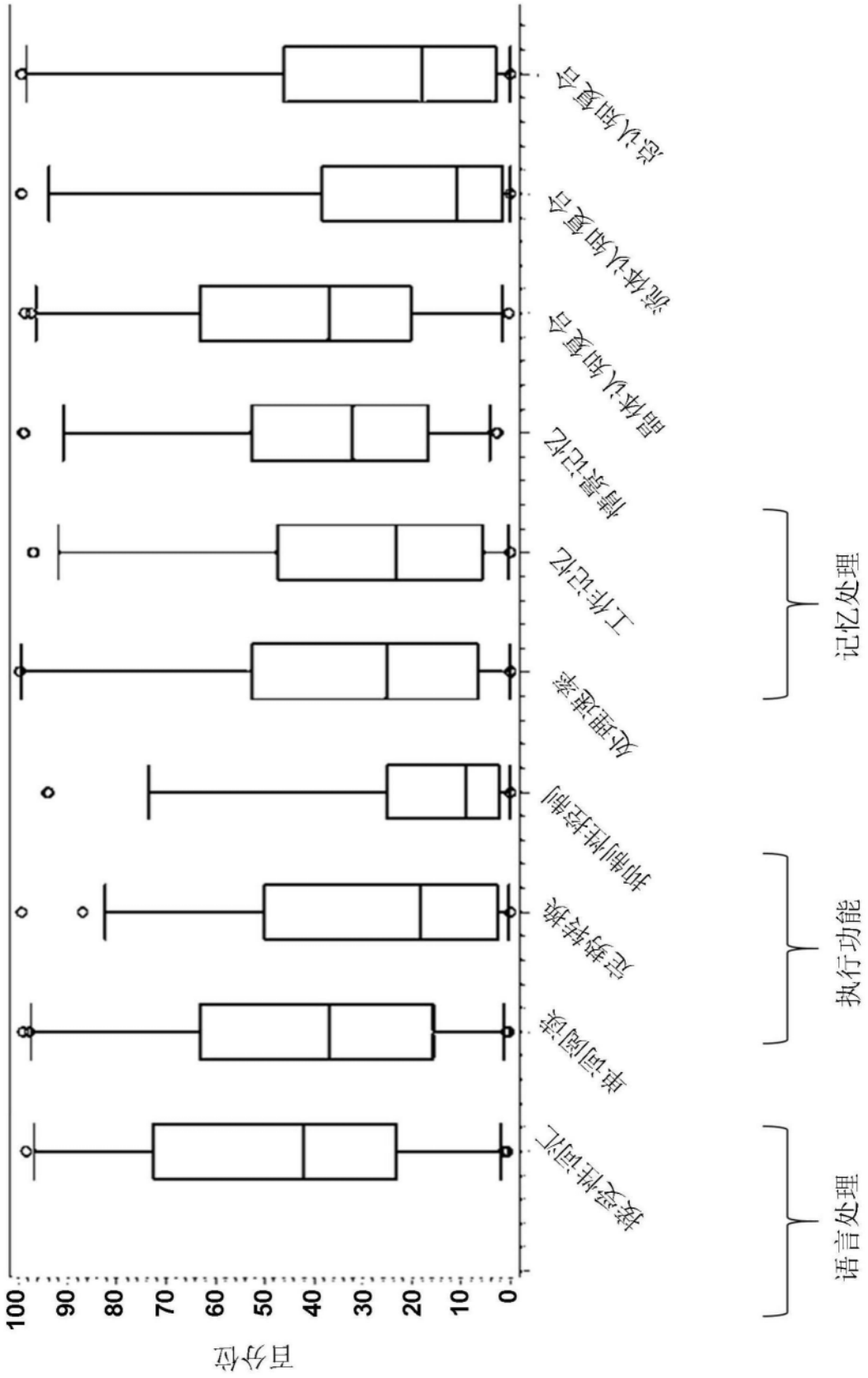

总认知复合
流体认知复合
晶体认知复合
情景记忆
工作记忆
处理速率
抑制性控制
定势转换
单词阅读
感觉性词汇
百分位
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
记忆处理
执行功能
语言处理

图3

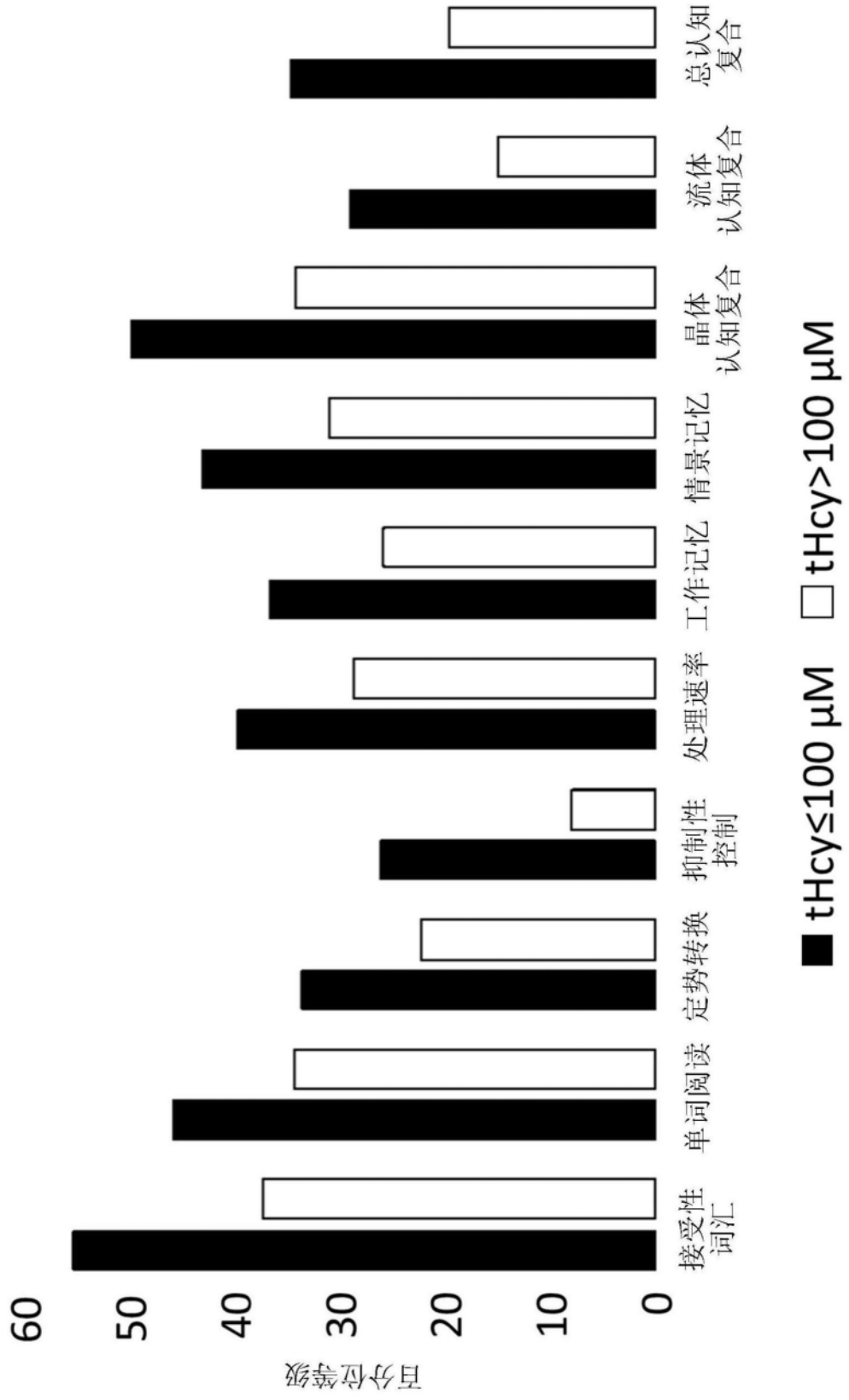

百分位等级
60
50
40
30
20
10
0
接受性词汇
单词阅读
定势转换
抑制性控制
处理速率
工作记忆
情景记忆
晶体认知复合
流体认知复合
总认知复合
■ tHcy≤100 μM
□ tHcy>100 μM

图4