



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 115920016 A

(43) 申请公布日 2023.04.07

(21) 申请号 202211006580.6

A61K 47/60 (2017.01)

(22) 申请日 2016.11.09

A61P 13/02 (2006.01)

(30) 优先权数据

A61P 19/10 (2006.01)

14/935,690 2015.11.09 US

A61P 17/14 (2006.01)

(62) 分案原申请数据

A61P 27/02 (2006.01)

201680076275.0 2016.11.09

A61K 31/205 (2006.01)

(71) 申请人 科罗拉多州立大学董事会法人团体

地址 美国科罗拉多州

(72) 发明人 J·P·克劳斯 T·马伊坦

E·布布利尔

(74) 专利代理机构 隆天知识产权代理有限公司

72003

专利代理人 吴小瑛

(51) Int.Cl.

权利要求书1页 说明书62页

A61K 38/51 (2006.01)

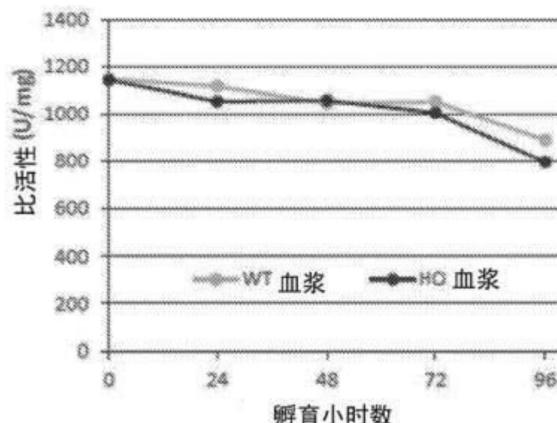
序列表16页 附图55页

(54) 发明名称

用于治疗高胱氨酸尿症的组合物和方法

(57) 摘要

本申请提供了使用修饰的人胱硫醚 β 合酶(CBS)治疗高胱氨酸尿症及相关疾病和病症的酶替代疗法的组合物和方法。



1. 一种治疗受试者的高胱氨酸尿症的方法,所述方法包括向受试者施用包含分离的人截短胱硫醚 β 合酶(htCBS)突变体多肽的组合物,其中所述分离的htCBS多肽突变体已被PEG化,并且其中所述分离的htCBS突变体多肽至少一周一次以约0.01至约10mg/kg之间的剂量施用。
2. 根据权利要求1所述的方法,其中PEG是低分子量线性PEG。
3. 根据权利要求1所述的方法,其中PEG是高分子量四臂分支PEG。
4. 根据权利要求1所述的方法,其中所述剂量是选自约0.05、约0.1、约0.5、约1和约5mg/kg的量。
5. 根据权利要求1所述的方法,其中所述剂量是约0.4mg/kg。
6. 根据权利要求1所述的方法,其中分离的htCBS突变体多肽与甜菜碱共同施用。
7. 根据权利要求1所述的方法,其中在所述分离的htCBS突变体多肽之前施用甜菜碱。
8. 根据权利要求1所述的方法,其中至少一周两次施用所述htCBS突变体多肽。
9. 根据权利要求1所述的方法,其中所述受试者是人。
10. 根据权利要求1所述的方法,其中所述分离的htCBS突变体多肽被选自由ME-200GS、ME-200MAOB、ME-400MA、GL4-400MA和ME-050GS组成的组中的至少一者PEG化。

用于治疗高胱氨酸尿症的组合物和方法

[0001] 本申请是申请日为2016年11月9日、申请号为201680076275.0、发明名称为“用于治疗高胱氨酸尿症的组合物和方法”的分案申请。

[0002] 相关申请的交叉援引

[0003] 本申请要求于2015年11月9日提交的美国申请号14/935,690的优先权；该申请的内容通过引用的方式以其整体并入本文。

[0004] 序列表

[0005] 本申请连同电子格式的序列表一起提交。命名为2016-11-08_Sequence Listing_2089.1003PCT2.txt的序列表文件创建于2016年11月8日，大小为26.2千字节。电子格式的序列表的信息通过引用的方式以其整体并入本文。

发明领域

[0006] 本发明整体上涉及使用胱硫醚 β 合酶(CBS)或其修饰形式(例如人截短CBS(htCBS)或其变体)的酶替代疗法(ERT)，以显著降低血清高半胱氨酸(Hcy)浓度，并恢复其下游代谢物如胱硫醚和半胱氨酸的水平。此外，采用CBS、htCBS或其修饰形式如htCBS突变体C15S的ERT可用于治疗诸如高胱氨酸尿症和高半胱氨酸重甲基化病症的疾病。

[0007] 发明背景

[0008] 胱硫醚 β 合酶(CBS)是转硫作用途径中的第一种酶，催化丝氨酸和高半胱氨酸(Hcy)缩合成胱硫醚，其然后被胱硫醚 γ 裂解酶(CGL)水解成半胱氨酸。在系统生物学中，生物系统的稳健性被定义为其在面对干扰时正常发挥作用的能力，并且系统中要素的冗余是实现这种稳健性的机制之一(Kitano, H. 2004, Nature Reviews Genetics, 5:826-837)。然而，生物转硫系统似乎大量缺乏组分的冗余，使得该系统容易发生突变干扰。例如，CBS酶是可以将高半胱氨酸加工成胱硫醚的唯一组分。有限的系统冗余部分地以高半胱氨酸存在，可以集中到该途径中的第一个代谢物，可以可选地通过重甲基化途径转化为甲硫氨酸，从而缓解高半胱氨酸负荷。此外，下游产物半胱氨酸可直接从饮食中获得。然而，这些途径在它们维持正常代谢物水平的能力方面是有限的，并且缺少CBS功能对不进行治疗的人类患者具有有害的后果。CBS失活导致胱硫醚 β 合酶缺陷型高胱氨酸尿症(CBSDH)，更常被称为典型高胱氨酸尿症。

[0009] 针对CBSDH的治疗选择有限，并且目前的治疗选择降低了高半胱氨酸，但不倾向于使胱硫醚(Cth)或半胱氨酸(Cys)正常化，因此这些治疗选择可能不足以提供稳健且有效的治疗选择。因此，本领域仍然需要用于具有高胱氨酸尿症的个体的更有效的治疗策略。

[0010] 本发明通过提供用于治疗CBSDH的组合物和使用这些组合物来治疗CBSDH的方法来满足这种需求。

发明内容

[0011] 本公开提供了适用于酶替代疗法的组合物，其包含人截短胱硫醚 β 合酶(htCBS)

及其变体，其也可以被PEG化(PEGylated)。htCBS组合物可以用 于降低高半胱氨酸水平并提高下游代谢物胱硫醚和半胱氨酸的水平，可以 用于治疗诸如高胱氨酸尿症(例如CBS-DH)和高半胱氨酸重甲基化病症的状 况和疾病，并且它们也可用于改善肝脏病理。

[0012] 本文提供了通过向受试者施用包含分离的htCBS或htCBS突变体多肽 的组合物来治疗受试者的高胱氨酸尿症的方法。htCBS或htCBS突变体多 肽可以用低分子量或高分子量PEG进行PEG化。在某些实施方案中，htCBS 或htCBS突变体多肽可以用具有多种几何形状和不同的用于缀合的化学成 分的PEG分子进行PEG化。在一些实施方案中，htCBS或htCBS突 变体 多肽可以以0.01至10mg/kg之间的剂量施用，并且可以每周施用至少一次。htCBS或 htCBS突变体多肽可以以5至7.5mg/kg之间的剂量施用，并且可 以每周施用至少两次。进一步地，htCBS或htCBS突变体多肽可以与甜菜 碱或其他已知的CBS-DH疗法共同施用。

[0013] 本文提供了通过向受试者施用包含htCBS或htCBS突变体多肽的组合 物在受试者 中增加代谢物(诸如但不限于胱硫醚和半胱氨酸)的量的方法。htCBS或htCBS突变体多肽可以用低分子量或高分子量PEG进行PEG化。在一些实施方案中，htCBS或htCBS突变体多肽可以以0.01至10mg/kg 之间的剂量施用，并且可以每周施用至少一次。htCBS或htCBS突变体多 肽可以以5至7.5mg/kg之间的剂量施用，并且可以每周施用至少两次。进 一步地， htCBS或htCBS突变体多肽可以与甜菜碱共同施用。胱硫醚的量 可以增加至0.005-0.35μM。半胱氨酸的量可以增加至高于140μM(例如，在200μM至400μM之间)。

[0014] 本文提供了通过向受试者施用包含htCBS或htCBS突变体多肽的组合 物而在受试者中降低代谢物(诸如但不限于高半胱氨酸、甲硫氨酸S-腺苷高 半胱氨酸和S-腺苷甲硫氨酸)的量的方法。htCBS或htCBS突变体多肽可以 用低分子量或高分子量PEG进行PEG化。在一些实施方案中，htCBS或 htCBS突变体多肽可以以0.01至10mg/kg之间的剂量施用。例如，剂量为 约0.4mg/kg。htCBS或htCBS突变体多肽可以以5至7.5mg/kg之间的剂 量施用，并且可以每周施用至少两次。进一步地，htCBS或htCBS突变体 多肽可以与甜菜碱共同施用。高半胱氨酸的量可以降低至小于100μM(例 如约10μM)。甲硫氨酸的量可以降低至小于50μM (例如约30μM)。S-腺 苷高半胱氨酸的量可以降低至小于0.14μM(例如约0.015μM)。

[0015] 本文提供了通过向受试者施用包含htCBS或htCBS突变体多肽的组合 物来治疗受试者的肝脏疾病的方法。htCBS或htCBS突变体多肽可以用低 分子量或高分子量PEG进行PEG化。在一些实施方案中，htCBS或htCBS 突变体多肽可以以0.01至10mg/kg之间的剂量施用，并且可以每周施用至 少一次。例如，剂量为约0.4mg/kg。htCBS或htCBS突变体多肽可以以5 至7.5mg/kg之间的剂量施用，并且可以每周施用至少两次。

[0016] 本发明的某些实施方案提供了治疗受试者的高胱氨酸尿症的方法，所 述方法包括向受试者施用包含分离的人截短胱硫醚β合酶(htCBS) 突变体多 肽的组合物的步骤，所述突变体多肽包含在SEQ ID NO:3的15位氨基酸 处的突变，使得分离的htCBS突变体多肽被ME-200GS PEG分子PEG化。

[0017] 在一些实施方案中，突变是丝氨酸取代半胱氨酸(C15S)。在一些实施 例中，受试者是人。在一些实施方案中，组合物以选自约0.01mg/kg至约10mg/kg范围内的剂量施用。例如，剂量为约0.4mg/kg。

[0018] 在一些实施方案中，所述疾病、病症或状况选自骨质疏松症、脱发、头发稀疏或眼部缺陷，所述方法包括向受试者施用包含分离的人截短胱硫 醚β合酶(htCBS) 突变体多肽

的组合物,所述突变体多肽包含在SEQ ID NO: 3的15位氨基酸处的突变,其中所述分离的htCBS多肽突变体已经用 ME-200GS PEG分子PEG化。

[0019] 根据以下描述、附图、实施例和权利要求,本发明组合物和方法等的 其他实施方案将变得显而易见。根据前述和以下描述可以理解,本文描述 的每个特征以及两个或更多这样特征的每种组合都包括在本公开的范围 内,只要包括在这样的组合中的特征不相互矛盾即可。另外,可以从本发 明的任何实施方案中明确排除任何特征或特征的组合。在下面的描述和权 利要求中阐述了本发明的其他方面和优点,特别是当结合附随的实施例和附图进行考虑时。

[0020] 附图简要说明

[0021] 图1A-1B显示血浆中和体内的酶保留。图1A显示血浆中的酶保留时 间得到维持,表明体内活性的快速丧失是清除的结果。图1B显示PEG化 的htCBS在体内的酶保留时间增强。图1B中的小鼠#1和小鼠#2也在国际 专利公开号W02014120770中作为图1B描述,其内容通过引用的方式以 其整体并入本文。

[0022] 图2显示重复施用未PEG化的htCBS未导致H0小鼠的高半胱氨酸或 胱硫醚水平发生变化。

[0023] 图3显示采用命名为ME200MAB的所选线性20kDa PEG分子的PEG 化时间进程。

[0024] 图4A-4D显示长期重复注射PEG化的htCBS显著影响高半胱氨酸、胱硫醚和半胱氨酸的血浆和组织水平。

[0025] 图5A-5H说明PEG化的htCBS突变体(也被称为PEGC15S) 和PEG化 的htCBS防止蛋白质聚集,主要形成二聚体并表现出可重现的PEG化图谱。图5A也在国际专利公开号 W02014120770中作为图5A描述,其内容通过 引用的方式以其整体并入本文。图5B也在国际专利公开号W02014120770 中作为图5B描述,其内容通过引用的方式以其整体并入本文。图 5C也在 国际专利公开号W02014120770中作为图5C描述,其内容通过引用的方 式以其整体并入本文。图5F也在国际专利公开号W02014120770中作为图 6A描述,其内容通过引用的方式以其整体并入本文。图5G也在国际专利 公开号W02014120770中作为图7A和图7B描述,其 内容通过引用的方式 以其整体并入本文。图5H也在国际专利公开号W02014120770中作为图 6C描述,其内容通过引用的方式以其整体并入本文。

[0026] 图6A-6C显示在注射后1、4和24小时 ,PEG化的htCBS突变体(也 被称为PEGC15S) 对高半胱氨酸及其代谢物的作用。

[0027] 图7A-7B显示用PEG化的htCBS突变体(也被称为PEGC15S) 和甜菜 碱治疗协同降低 并维持了H0小鼠的低的高半胱氨酸水平及其对胱硫醚水 平的作用。

[0028] 图8A-8B显示PEG化的htCBS突变体(也被称为PEGC15S) 施用拯救 了CBS完全敲除 小鼠免于早期致死并且改善肝脏病理。

[0029] 图9A-9B显示用马来酰亚胺PEG分子(ME-200MAOB或ME-400MA) 或NHS酯PEG分子 (ME-200GS) PEG化的C15S的不同PEG化物质的谱图。

[0030] 图10A-10E显示向H0小鼠单次皮下(SC) 注射20NHS PEG-htCBS C15S (用ME-200GS PEG PEG化的htCBS C15S) 或400MA PEG-htCBS C15S(用 ME-400MA PEG PEG化的htCBS C15S) 后的比活性和血浆代谢物水平和 CBS活性。

[0031] 图11A-11C显示施用用ME-200GS、ME-200MAOB或ME-400MA PEG 化的C15S后,K0小

鼠的存活率和代谢物水平的变化。

[0032] 图12A-12E显示在连续施用用ME-200MAOB、ME-400MA或 ME-200GS PEG化的C15S的I278T-/-纯合小鼠组中,完全预防和延迟面部 脱毛的发作。

[0033] 图13A-13B显示与PBS治疗的K0小鼠和健康对照相比,在20NHS PEG-htCBS C15S治疗的K0小鼠中,肝脏疾病得到改善。

[0034] 图14A-14B显示如通过电子显微镜术观察的图13A-13B中的肝脏样 品。

[0035] 图15A-15D显示使用不同型号的ALZET®渗透泵在H0小鼠中连续施 用20NHS PEG-htCBS C15S对血浆中的CBS活性和含硫氨基酸代谢物的影 响。

[0036] 图16A-16G显示在K0小鼠中连续长期施用20NHS PEG-htCBS C15S 的双能量X射线吸收测定法 (DEXA或DXA) 研究的结果。

[0037] 图17A-17F显示在I278T小鼠中连续长期施用20NHS PEG-htCBS C15S的双能量X射线吸收测定法 (DEXA或DXA) 研究的结果。

[0038] 图18A-18B显示在连续长期施用20NHS PEG-htCBS C15S后,并与健 康杂合对照和受影响的纯合对照比较,在I278T小鼠中使用NMR代谢组学 分析的选定肝脏代谢物的浓度。

[0039] 图19A-19E显示在I278T小鼠中施用20NHS PEG-htCBS C15S对眼部 缺陷的作用。

[0040] 图20A-20D显示用20NHS PEG-htCBS治疗并且维持接受常规饮食或 代谢物限制性 饮食的I278T小鼠中的血浆代谢物水平。

[0041] 图21A-21B显示4 (IV) 、8 (SC) 和24 (SC) mg/kg的IV或SC推注剂量 后,20NHS-htCBS C15S在雄性和雌性大鼠中的比活性。图21C显示对于 接受以8mg/kg剂量共计9次注射的个体野生型Sprague Dawley大鼠,在 初次注射后以及在稳态水平下20NHS PEG-htCBS C15S 的比活性。

[0042] 图22A-22B显示在以2或6mg/kg的剂量单次IV或SC注射后,在野 生型食蟹猴 (*Macaca fascicularis*) 中Cth的血浆浓度和20NHS PEG-htCBS C15S的比活性。

[0043] 图23A-23B显示在以1、3或10mg/kg剂量多次SC施用20NHS PEG-htCBS C15S后,在 野生型食蟹猴 (*Macaca fascicularis*) 中胱硫醚 (Cth) 的比活性和血浆水平。

[0044] 图24A-24G显示基于本文的小鼠、大鼠 和猴模型的结果估算20NHS PEG-htCBS在人 体中的有效剂量的异速缩放比例 (allometric scaling) 结果。

[0045] 发明详述

[0046] 本文提供了用于治疗胱硫醚β合酶缺陷型高胱氨酸尿症 (CBSHD) 的组 合物和方法。作为非限制性实例,可以通过CBS或其变体的酶替代法来治 疗CBSHD。

[0047] CBS的失活导致胱硫醚β合酶缺陷型高胱氨酸尿症 (CBSHD),更常被 称为典型高胱 氨酸尿症。CBSHD是一种常染色体隐性遗传病症,其特征在 于血浆总高半胱氨酸 (tHcy) 和 甲硫氨酸水平明显升高以及胱硫醚和半胱氨 酸浓度大幅降低;它是最常见的含硫氨基酸 缺陷。如果不治疗,CBSHD导 致各种不同器官系统的疾病、病症和/或状况以及严重的表型 变化。CBSHD 的疾病、病症和/或状况的非限制性实例包括智力迟钝,精神障碍,中枢神 经系统问题(包括癫痫发作),易患血栓栓塞并发症导致未经治疗和部分治疗 的个体的高死 亡率的心血管疾病,和一系列影响眼睛系统(例如渐进性近视 和晶状体脱位、晶状体异位) 和骨骼系统(例如marfanoid体质、骨质疏松症、脊柱侧凸、细金黄色毛发和薄的脆弱皮肤) 的结缔组织病症。

[0048] 与CBSDH相关的致病性突变的性质在功能上存在三分法。一组突变 被归类为“吡多辛响应性”，其中CBS酶功能可以通过高剂量维生素B₆疗法 部分恢复。这种治疗可能是有效的，但并不总是能够缓解这些个体的病理 事件，并且随着时间的推移，这些事件中有一些甚至会在这些个体中发生。在临床环境中，“维生素B6响应性”被定义为在对个体给予口服剂量为 100-500mg的B6后24小时Hcy相对降低20%，这意味着B6响应个体可 能仍然具有异常高的高半胱氨酸水平。第二组功能性突变用“C末端CBS 突变体”表示，它们对S-腺苷甲硫氨酸的翻译后上调的应答能力有缺陷。具 有这类突变的个体通常缺少智力迟钝和结缔组织方面的表型。在40岁之前 在特发性血栓事件之后测量血浆Hcy水平之后，检测这种类型 (Maclean et al., 2002, Hum.Mutat.19:641-55)。最后一组CBSDH突变是“典型高胱氨酸尿症”，其代表了该疾病的最严重的形式。对于后两组的个体，单独的维生 素B₆疗法不能有效降低血清Hcy水平。这些突变组可能显示出表型差异，但可以进行类似的治疗。

[0049] 最常见的突变CBS等位基因是833T>C (I278T)，其与吡多辛响应性高 胱氨酸尿症有关。因此，B₆响应个体约占高胱氨酸尿症患者群体的一半 (Barber and Spaeth, 1969; Mudd et al., 1985)。然而，在这些B₆响应个体中，许多只是部分响应者，并且结合B₆无响应个体，需要另外的治疗选择。不 幸地，这样的治疗选择目前仅限于通过遵循补充有半胱氨酸(现在是必需的) 的严格低蛋白质饮食来减少甲硫氨酸的摄入以及通过使用甜菜碱(N, N,N- 三甲基甘氨酸) (一种能够使高半胱氨酸重甲基化为甲硫氨酸的甲基供体) 来降低高半胱氨酸的浓度。因此，使用CBS(例如，本文所述的PEG化的 htCBS) 的酶替代疗法 (ERT) 可能是对B₆部分响应和无响应患者的最佳疗法。

[0050] 由于CBS功能障碍，CBSDH患者的高半胱氨酸(Hcy) 水平显著改变。在健康个体中，总Hcy水平在~5-15μM的范围内 (Stabler et al., 2002, Metabolism, 51:981-988) ，其中 98%为二硫化物的形式或与蛋白质结合。只 有2%的tHcy作为游离的(非蛋白质结合的) 还原的高半胱氨酸存在，其可以 作为CBS的底物 (Mansoor et al., 1992, Anal.Biochem.200: 218-229; Mudd et al., 2000, Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.20:1704-1706)。这种平衡在 CBSDH患者中被显著改变，其中游离的还原的高半胱氨酸达到在这些患者 中观察到的 tHcy值(最高至~400μM)的10-25% (Mansoor et al., 1993, Metabolism, 42:1481-1485)。

[0051] 较高的tHcy水平(例如大于野生型水平的54倍) 还可能导致疾病、病症 和/或状况，诸如但不限于小鼠面部脱毛、骨质疏松症和平均存活降低。作 为非限制性实例，具有比野生型高至少54倍的tHcy的模型小鼠展现了几 种疾病、病症和/或状况，包括面部脱毛、骨质疏松症和平均存活降低。然 而，在tHcy水平约为正常值30倍的小鼠中没有观察到这样的迹象，因此 高半胱氨酸升高可能仅在高于阈值水平的水平下才是致病的 (Gupta et al., 2009, FASEB J.23:883-893)。在人体中进行的一项CBSDH的多中心观察研 究中，发现尽管各种治疗组合不能恢复CBSDH患者的正常高半胱氨酸水 平，并且B6无响应者继续显示出高于正常群体上限3-5倍的高半胱氨酸水 平，这些患者的血栓栓塞风险显著降低 (Yap et al., 2001, Arterioscler.Thromb. Vasc.Biol.21, 2080-2085)。总体来说，这些数据表明，为了改善CBSDH的 临床表现，如果tHcy低于阈值水平，tHcy的不完全减少可能足以治疗疾 病。

[0052] 虽然低甲硫氨酸饮食可以有效地在患者中建立和维持高半胱氨酸水平 的某些代 谢控制，但其作用可能因缺少饮食依从性而受到阻碍，尤其是在 晚期诊断的患者中，导致

伴随症状发展的高半胱氨酸伴随增加,特别是在 儿童中(Walter et al., 1998, Eur.J.Pediatr.157Suppl 2,S71-76)。不能遵循饮 食依从性导致血清Hcy增高;血管和结缔组织的并发症复发,包括致命和 失能事件;以及严重的副作用如脑水肿(因血清Met浓度过高)或严重营养 不良(因缺少必需氨基酸)的风险。最有效的治疗策略是增加酶的活性,如在 向维生素B₆响应性高胱氨酸尿症给予吡多辛时所明显的。由于突变状态,这种策略不可能用于维生素B₆无响应个体。甜菜碱可以有助于在依从性较 差的患者中实现代谢控制,并且其与饮食相联合可以代表最佳可用治疗。然而,目前对B6无响应者的疗法不增加胱硫醚,并且可能要保证补充半胱 氨酸以维持适当的水平。因此在这些个体中酶活性的增加可能取决于外源 酶的递送,即酶替代疗法(ERT)。

[0053] 相当多的证据提示胱硫醚的一种可能的功能,这与其在转硫中作为中 间体的作用无关。通过对CBS缺陷型高胱氨酸尿症的特定转基因小鼠模型 的研究,已经表明了胱硫醚的积极作用。在这种典型高胱氨酸尿症模型中, 小鼠cbs基因失活并在人CBS启动子的控制下低水平表达人CBS转基因后 存活;因此它被称为“仅人”(HO)。HO小鼠表现出Hcy、甲硫氨酸、S-腺昔 甲硫氨酸和S-腺昔高半胱氨酸的血浆和组织水平都严重升高,并伴随着半胱氨酸的血浆和肝脏水平降低。然而,相比于以前的典型高胱氨酸尿症的 CBS敲除模型(也被称为CBS敲除小鼠 (KO),其遭受严重的生长迟缓和肝 病,大多数在出生后三周内死亡,即使是在当母亲接受甜菜碱的时候(Maclean et al., 2010b.Mol.Genet.Metab.101, 153-162)),该模型即使是在母亲用甜 菜碱治疗时也遭受严重的生长迟缓和肝病,导致肝脏脂肪变性、纤维化以 及出生后三周内新生儿死亡,HO小鼠表现出轻度肝病,并且约90%的HO 小鼠活至少6个月(Maclean et al., 2012,J.Biol.Chem.287,31994-32005,其 内容通过引用的方式以其整体并入本文)。尾部出血测定指出,HO小鼠处 于高凝状态,该高凝状态被甜 菜碱治疗以当其发生于人体时重复该疾病的 方式而改善(Maclean et al., 2010b.Mol.Genet.Metab.101, 153-162;其内容 通过引用的方式以其整体并入本文)。HO小鼠具有高的tHcy水平,但仅具 有较小的后果。在这两种鼠模型之间代谢物水平具有较小的 差异或者没有 差异,胱硫醚水平除外,与KO($\sim 1\mu M$)相比,其在HO小鼠中显著升高($\sim 10 \mu M$)。因此,已经表明胱硫醚可以对由长期内质网应激诱导的肝脏和肾脏 脂质堆积、组织损伤和凋亡细胞死亡发挥保护作用。

[0054] 胱硫醚可以作为半胱氨酸前药在对乙酰氨基酚诱导肝损伤的小鼠模型 中发挥保 护作用。在实验中使用CGL灭活化合物D,1-2-氨基-4-戊炔酸以通 过阻断胱硫醚转化成半胱氨酸而诱导高胱硫醚血症(hypercystathionemia), 观察到胱硫醚在不能将该化合物转化成半胱氨酸的a23细胞中发挥显著的 保护作用,表明观察到的保护作用不是胱硫醚作为 半胱氨酸合成前体的结 果。

[0055] 胱硫醚对于功能正常的脑可能是重要的。可能胱硫醚特异性地堆积在 正常的哺乳动物脑中以充当细胞保护剂,并且取消其合成可能通过增加神 经组织对升高的Hcy和/ 或其衍生物的毒性损伤的敏感性而促成高胱氨酸尿 症中的智力迟钝(Maclean et al., 2012,J.Biol.Chem.287,31994-32005)。脑 内胱硫醚的浓度存在相当大的区域差异,并且 白质中的浓度高于灰质,表 明在髓鞘形成中可能具有作用。发现胱硫醚在人脑和猴脑的枕 叶中的水平 高于在低等动物物种的全脑中的水平,并且已表明胱硫醚在灵长类动物中 的作用比在啮齿动物脑中的作用更为重要(Volpe and Laster, 1972,Biol. Neonate 20,

385-403;其内容通过引用的方式以其整体并入本文)。

[0056] 许多间接证据支持胱硫醚或其衍生物可能的生理学作用。在灵长类动物的脑和中枢神经系统(CNS)中,CBS和CGL的相对活性水平之间似乎存在不平衡,导致胱硫醚的堆积。类似地,在胚胎发育过程中,CBS在多种组织(如心脏和肺)中表达,这些组织在成体组织中不表达任何可检测的CBS。一系列数据表明CGL在哺乳动物早期发育过程中不表达。例如,在人肝脏样品中,CGL活性仅在出生后组织中检测到,而在胎儿、早产儿和足月新生儿的肝组织中的活性基本上是检测不到的。总的来说,这些结果表明,在发育的某些阶段以及在成体神经组织中,CBS特异性表达产生胱硫醚,这不同于其作为中间体在半胱氨酸合成中的作用(Maclean et al., 2012, J.Biol.Chem.287,31994-32005;其内容通过引用的方式以其整体并入本文)。结合在哺乳动物发育期间发生了胱硫醚 γ 裂解酶(CGL)和CBS表达的严格控制这一知识,这些观察结果一起表明胱硫醚除了是半胱氨酸的前体之外还可能具有保护作用。

[0057] 从胱硫醚的半胱氨酸生物合成由CGL催化。胱硫醚存在于细胞内部,并且认为不作为血浆蛋白质存在。因此,认为在注射本文所述的PEG化的 人截短(htCBS)酶后产生的胱硫醚也可以充当CGL的细胞内底物。此外,有可能的是,降低的tHcy水平可能妨碍半胱氨酸-高半胱氨酸加合物(其可在尿中被快速清除)的形成,从而在血浆中产生更高水平的游离半胱氨酸(Gupta et al., 2014,FASEB J.28:781-790)。

[0058] 现在将在下文中更全面地描述本发明的各个方面。然而,这些方面可以以许多不同的形式来体现,并且不应该被解释为限于本文中阐述的实施方案;相反,提供这些实施方案是为了使本公开详尽和完整,并将其范围充分传达给本领域技术人员。

[0059] CBS酶

[0060] CBS基因存在于人21号染色体上的q22.3处(Skovby et al., Hum.Genet. 65:291-294 (1984); Munke et al., Am.J.Hum.Genet. 42:550-559 (1988);其内容通过引用的方式以其整体并入本文)。编码人CBS的核酸序列及其编码的氨基酸序列可通过GenBank登记号L19501获得,并且这些序列也公开于美国专利号5,523,225中,其通过引用的方式以其整体并入本文。编码CBS的基因组DNA的核酸序列也可通过序列数据库如GenBank和University of Colorado-Denver网页(Kraus Laboratory)公共获得。

[0061] 尽管不希望受到理论的束缚,但由CBS基因编码的蛋白质作为同型四聚体来催化高半胱氨酸转化为胱硫醚,这是转硫途径的第一步。编码的蛋白质被S-腺苷甲硫氨酸变构活化并使用磷酸吡哆醛作为辅因子。已经发现了这个基因的多个可替代的剪接转录物变体。

[0062] CBS通过在转甲基、转硫和重甲基化途径的交叉点起作用来控制硫从甲硫氨酸到半胱氨酸的单向流动。它催化 β 置换反应,在该反应中丝氨酸以吡哆醛5'-磷酸(PLP)依赖性方式与高半胱氨酸缩合形成胱硫醚(Miles and Kraus, 2004, J.Biol.Chem.279:29871-29874;其内容通过引用的方式以其整体并入本文)。然后可以通过胱硫醚 γ 裂解酶(CGL)将胱硫醚转化成半胱氨酸。因此,CBS酶的正常功能对于调节半胱氨酸和甲硫氨酸代谢是关键的(Mudd et al., 2001, "Disorders of Transsulfuration." In the Metabolic and molecular bases of inherited disease.C.R.Scriver, A.L.Beudet, W.S.Sly, V.D., C.B., K.K.W., and V.B., eds. (New York:McGraw-Hill), pp.2007-2056;其内容通过引用

的方式以其整体并入本文),并且因此,受损的CBS活性或缺乏 CBS活性导致CBS缺陷型高胱氨酸尿症(CBSDH)的生物化学和临床表现。

[0063] CBS的失活导致胱硫醚β合酶缺陷型高胱氨酸尿症(CBSDH),更常被 称为典型高胱氨酸尿症。Carson和Neill于1962年首次描述了典型高胱氨酸尿症(Carson and Neill, 1962. Arch. Dis. Child 37:505-513;其内容通过引用 的方式以其整体并入本文),并且其被认为是含硫氨基酸代谢的最常见的先 天性错误。此后不久发现高胱氨酸尿症(一种胱硫醚β合酶(CBS)酶缺乏症) 的根本原因(Mudd et al., 1964, Science 143:1443-1445;其内容通过引用的方式以其整体并入本文)。

[0064] 错义突变代表胱硫醚β合酶(CBS) 缺陷的最常见原因。许多这些突变导 致错误折叠的蛋白质,其缺乏生物学功能。化学分子伴侣(例如乙醇、二甲 基亚砜或三甲胺-N-氧化物)的存在有时可减轻或甚至恢复蛋白质折叠和突 变体蛋白质的活性。对八种CBS突变体 酶(P49L、P78R、A114V、R125Q、 E176K、P422L、I435T和S466L)进行纯化和表征,并且可以用 化学分子伴 侣通过改善它们的蛋白质折叠而被挽救。被血红素完全饱和的四聚体突变 体酶具有与野生型CBS相同或更高的比活性。热稳定性测量证明纯化的突 变体具有与野生型 CBS相同或更高的热稳定性。对S-腺苷-1-甲硫氨酸刺激 或热活化的响应不同。R125Q和 E176K对两种刺激缺乏响应,表明它们的 特定构象不能达到活化状态。粗提取物(特别是 DnaJ) 中分子伴侣的水平增 加表明化学分子伴侣对CBS突变体的折叠具有相当间接的作用 (Majtan, et al., 2010, J. Biol. Chem. 285 (21) :15866-15873;其内容通过引用的方式以其 整体并入本文)。

[0065] 已经测试了以前在大肠杆菌(E.coli) 中测试的27个CBS突变的错误折 叠程度,用于分子伴侣在哺乳动物CHO-K1细胞的更允许折叠条件下挽救 这些突变的构象的能力。与细菌中的表达相比,哺乳动物细胞中突变的表 达使中值活性增加16倍并使四聚体的量增加3.2倍。随后,测试了选择的 七种突变对具有分子伴侣样活性的三种化合物的响应。氨基 氧乙酸和4-苯 基丁酸仅表现出弱作用。相比之下,对于七种突变中的五种突变(p.A114V、 p.K102N、p.R125Q、p.R266K和p.R369C),精氨酸血红素大幅增加了突变 体CBS蛋白质四聚体的形成(最多至六倍),并挽救了催化活性(最多至九 倍)。对突变p.R125Q观察到精氨酸 血红素的最大作用,该突变对维生素 B6的体内治疗无响应。而且,p.R125Q突变的血红素响 应性在来源于对这 种基因变体为纯合的患者的成纤维细胞中得到证实。基于这些数据,提 出了一组不同的血红素响应性CBS突变,并且CBS的血红素袋被预测为设 计高胱氨酸尿症的新疗法的重要靶标(Melenovska, et al., 2014, J. Inherit. Metab. Dis. 38 (2);其内容通过引用的方式以其整体并入本文)。

[0066] 在生物化学上,CBSDH的特征在于高度升高的高半胱氨酸、甲硫氨酸 和S-腺苷高 半胱氨酸(也被称为“SAH”或“AdoHcy”)的血液水平,伴有低水 平的半胱氨酸和胱硫醚。未经治疗的高胱氨酸尿症的一些临床表现包括血 栓栓塞、结缔组织问题(如眼睛晶状体脱 位、marfanoid特征和骨质疏松症)、认知损害和其他体征Kraus, J., and Kozich, V. (2001). “Cystathione beta-synthase and its deficiency.” In Homocysteine in health and disease. J.D. Carmel R, ed. (New York:Cambridge University Press) , pp.223-243;Mudd et al., 2001, “Disorders of Transsulfuration.” In the Metabolic and molecular bases of inherited disease.C.R.Scriver,A.L.Beudet,W.S.Sly,V.D. ,

C.B., K.K.W., and V.B., eds. (New York:McGraw-Hill), pp.2007-2056)。

[0067] 最初治疗高胱氨酸尿症的尝试采用饮食限制来减少甲硫氨酸摄入,从而避免了毒性高半胱氨酸的积聚(Komrower et al., 1966, Arch. Dis. Child 41:666-671)。后来发现补充PLP-辅因子前体吡多辛(维生素B₆)可以缓解略少于一半患者的临床表现,其中一部分为仅部分响应者(Barber and Spaeth, 1969. J. Pediatr. 75:463-478; Mudd et al., 1985, Am. J. Hum. Genet. 37:1-31)。“B₆响应者”需要在他们的余生中服用维生素B₆补充剂。在许多情况下,即使完全B6响应患者也需要更温和的蛋白质限制饮食才能实现代谢控制((Picker, J.D., and Levy, H.L. (2004). Homocystinuria Caused by Cystathione Beta-Synthase Deficiency. In GeneReviews. R.A. Pagon, M.P. Adam, T.D. Bird, C.R. Dolan, C.T. Fong, and K. Stephens, eds. (Seattle (WA) :University of Washington, Seattle; 其中每一篇的内容通过引用的方式以其整体并入本文)。剩余部分即无响应者接受极其受限的饮食,许多患者对该饮食的依从性差(Walter et al., 1998, Eur. J. Pediatr. 157 Suppl 2, S71-76; 其内容通过引用的方式以其整体并入本文)。该饮食与不含甲硫氨酸但富含半胱氨酸的氨基酸混合物以及甜菜碱联合,甜菜碱可以充当甜菜碱-高半胱氨酸甲基转移酶(BHMT)的甲基供体,以由高半胱氨酸产生二甲基甘氨酸和甲硫氨酸(Finkelstein, 1990, J. Nutr. Biochem. 1:228-237)。谷胱甘肽由半胱氨酸合成,因此添加半胱氨酸对于减少氧化应激可能是重要的。大多数患者也用三甲基甘氨酸和正常剂量的叶酸补充剂治疗。这与严格的饮食结合,通过降低高半胱氨酸水平来改善代谢控制。

[0068] 使用甜菜碱(N,N,N-三甲基甘氨酸)以通过促进高半胱氨酸转变回甲硫氨酸,即独立于叶酸衍生物(其主要在肝脏和肾脏中有活性)增加通过重甲基化途径的通量,来减少高半胱氨酸的浓度。然后通过并入到体内蛋白质逐渐除去一小部分重新形成的甲硫氨酸。未转化为蛋白质的甲硫氨酸转化为S-腺苷甲硫氨酸,其继续再次形成高半胱氨酸。因此,如果要除去的甲硫氨酸的量很小,甜菜碱是最有效的。因此,治疗包括甜菜碱和低甲硫氨酸饮食。在典型高胱氨酸尿症中,血浆甲硫氨酸水平通常升高到高于30微摩尔/L的正常范围,应该监测其浓度,因为可能达到潜在毒性水平(高于400微摩尔/L)。

[0069] 长期以来一直在寻找CBS-DH的替代治疗策略,以为B₆无响应者和部分响应者提供改善代谢异常、减少循环中毒性高半胱氨酸的累积并增加胱硫醚和半胱氨酸的水平的治疗。这种代谢变化可以逆转或延迟CBS-DH症状的发作,并使这组受影响的个体享用不受限制或仅轻度限制的饮食,并显著改善他们的生活质量。为了提供这些益处,疗法必须改善造成这种状况的核心缺陷,即异常的CBS水平和/或功能。因此,以酶替代疗法(ERT)的形式全身性引入CBS应该有益于高胱氨酸尿症患者。

[0070] 不受理论束缚,认为由于CBS施用而使细胞外高半胱氨酸的显著降低产生了浓度梯度,触发从细胞内到细胞外空间的高半胱氨酸通量,在此所施用的酶可以进一步处理它,并且因此细胞外CBS可以充当高半胱氨酸“槽”。

[0071] 作为四聚体存在的包含四种相同单体的天然人CBS的结构和活化模式可能难以作为ERT使用。这种形式的酶具有高聚集趋势,这对纯化工作造成较大的限制(Kraus and Rosenberg, 1983, Arch. Biochem. Biophys. 222:44-52; 其内容通过引用的方式以其整体并入本文)。此外,CBS活化需要S-腺苷甲硫氨酸(SAM)与C末端尾结合,以减轻其C末端调节区

域对酶 施加的自动抑制。

[0072] 提供截短的重组人CBS (htCBS) (SEQ ID NO:3), 其中C末端调节区 已被去除。在一个实施方案中, htCBS可以是突变的, 其中在15位氨基酸 处的半胱氨酸已被改变为丝氨酸 (htCBS突变体或C15S) (SEQ ID NO:13)。

[0073] 在一个实施方案中, PEG化的htCBS或PEG化的htCBS突变体酶在 体内改善该酶的药代动力学和药效学性质。与小分子不同, 治疗性蛋白质 通过肠胃外途径递送, 并且治疗功效可能极大地受到其吸收、分布、代谢 和排泄 (“ADME”) 的影响 (Vugmeyster et al., 2012, World Journal of Biological Chemistry 3:73-92; 其内容通过引用的方式以其整体并入本文)。高分子量 化合物(如酶)具有有限的组织穿透能力, 因此主要存在于血浆中, 直到它们 通过至少一种机制从循环中移除。

[0074] 在一个实施方案中, 施用htCBS或htCBS突变体进行ERT在血浆中维 持高活性, 持续的时间足以对含硫氨基酸代谢产生稳定且显著的作用。增 强ERT功效可能需要对蛋白质进行额外的修饰, 以增加体内保留时间。这 可以通过PEG化 (即将聚乙二醇 (PEG) 部分添加到蛋白质表面上) 来实现, 以 延长在受试者中的保留时间。发现PEG化使蛋白质水解、免疫应答和抗原 性最小, 同时增加蛋白质稳定性和大小, 并减少肾脏排泄 (Kang et al., 2009, Expert opinion on emerging drugs 14:363-380; 其内容通过引用的方式以其整 体并入本文)。

[0075] 自胱硫醚的半胱氨酸生物合成仅由CGL催化。胱硫醚只存在于细胞内 部, 并且不是作为血浆蛋白质存在。因此, 认为注射本文所述的PEG化的 htCBS或PEG化的htCBS突变体酶后产生的胱硫醚也可以充当CGL的细 胞内底物。此外, 并且不是相互排斥, 也可能降低的 tHcy水平也可以阻止 半胱氨酸-高半胱氨酸加合物 (其可在尿中被快速清除) 的形成, 在血 浆中产 生更高水平的游离半胱氨酸, 如最近提出的 (Gupta et al., 2014, FASEB J. 28, 781-790)。在没有半胱氨酸补充的情况下使半胱氨酸水平正常化是目前描述 的htCBS和 htCBS突变体在ERT中的另一个潜在优势。

[0076] 在一个实施方案中, 在施用PEG化的htCBS或PEG化的htCBS突变 体酶后可以观察 到半胱氨酸水平的正常化。除了代谢物水平发生变化之外, 可以预测htCBS或htCBS突变体施用的另一个积极作用为对受影响的 CBSDH患者的肝脏疾病和存活产生显著影响。

[0077] 使用PEG化的htCBS的方法

[0078] 在一个实施方案中, 本文所述的组合物和方法可以用于治疗CBS-DH。有三组与 CBSDH相关的致病性突变: (1) 吡多辛响应性突变, (2) C末端CBS 突变体和 (3) 典型高胱氨酸 尿症。

[0079] 在一个实施方案中, htCBS和htCBS突变体酶替代可以用于治疗 CBS-DH。htCBS和 htCBS突变体酶可以通过本领域已知的方法或本文所述 的方法进行PEG化。作为一个非限制性实例, PEG可以是低分子量 (例如2 kDa) PEG或高分子量 (例如40kDa) 四臂分支PEG。例如, 将htCBS或htCBS 突变体多肽用以下PEG分子之一进行PEG化: ME-200MAOB、ME-400MA、 ME-050GS、GL4-400MA和ME-200GS。例如, htCBS或htCBS突变体多 肽PEG缀合物是20NHS PEG-htCBS C15S缀合物。

[0080] 在一个实施方案中, 本文所述的PEG化的htCBS或PEG化的htCBS 突变体以及使用 该PEG化的htCBS或PEG化的htCBS突变体的方法可以 用于治疗具有吡多辛响应性突变的受

试者。PEG化的htCBS或PEG化的 htCBS突变体可以单独使用或与目前的疗法(例如维生素B6或甜菜碱)联合 使用以治疗具有毗多辛响应性突变的受试者。作为一个非限制性实例,PEG化的htCBS或PEG化的htCBS突变体可以用于减轻或减少具有毗多辛响应 性突变的受试者的病理事件。作为一个非限制性实例,PEG化的htCBS或 PEG化的htCBS突变体可以用于治疗具有毗多辛响应性突变的受试者,其 对维生素B6疗法具有部分响应。作为一个非限制性实例,PEG化的htCBS 或PEG化的htCBS突变体可以用于治疗具有毗多辛反应性突变的受试者, 其对维生素B6疗法无响应。

[0081] 在一个实施方案中,本文所述的PEG化的htCBS或PEG化的htCBS 突变体以及使用该PEG化的htCBS或PEG化的htCBS突变体的方法可以 用于治疗具有C末端CBS突变的受试者。PEG化的htCBS或PEG化的 htCBS突变体可以单独使用或与目前的疗法(例如维生素B6或甜菜碱)联合 使用以治疗具有C末端CBS突变的受试者。作为一个非限制性实例,PEG 化的htCBS或PEG化的htCBS突变体可以用于降低具有C末端CBS突变 的受试者的血清Hcy水平。作为一个非限制性实例,PEG化的htCBS或PEG化的htCBS突变体可以用于治疗具有C末端CBS突变的受试者, 其对维生素B6疗法具有部分响应。作为一个非限制性实例,PEG化的htCBS 或PEG化的htCBS突变体可以用于治疗具有C末端CBS突变的受试者, 其对维生素B6 疗法无响应。

[0082] 在一个实施方案中,本文所述的PEG化的htCBS或PEG化的htCBS 突变体以及使用该PEG化的htCBS或PEG化的htCBS突变体的方法可以 用于治疗具有典型高胱氨酸尿症的受试者。PEG化的htCBS或PEG化的 htCBS突变体可以单独使用或与目前的疗法(例如维生素B6或甜菜碱)联合 使用以治疗具有典型高胱氨酸尿症的受试者。作为一个非限制性实例,PEG 化的htCBS或PEG化的htCBS突变体可以用于降低具有典型高胱氨酸尿症 的患者的血清Hcy水平。作为一个非限制性实例,PEG化的htCBS或PEG 化的htCBS突变体可以用于治疗具有典型高胱氨酸尿症的受试者, 其对维 生素B6疗法具有部分响应。作为一个非限制性实例,PEG化的htCBS 或PEG化的htCBS突变体可以用于治疗具有典型高胱氨酸尿症的受试者, 其对维生素B6疗法无响应。在某些实施方案中,所述受试者是人、大鼠、 小鼠和非人灵长类动物。在某些实施方案中,使用20NHS PEG-htCBS C15S 来治疗选自骨质疏松症、头发稀疏或眼部缺陷的至少一种疾病、病症、状 况或临床症状。

[0083] 在一个实施方案中,本文所述的组合物和方法可以用于减少与CBS-DH 相关的症状、疾病或病症。该症状、疾病或病症可以是在器官系统中或是 严重的表型变化。来自CBS-DH的疾病、病症和/或状况的非限制性实例包 括智力迟钝,精神障碍,中枢神经系统问题(包括癫痫),易患血栓栓塞并发 症导致未经治疗和部分治疗的个体的高死亡率的心血管疾病,和一系列影 响眼睛系统(例如渐进性近视和晶状体脱位、晶状体异位)和骨骼系统(例如 marfanoid体质、骨质疏松症、脊柱侧凸、细金黄色毛发和薄的脆弱皮肤) 的结缔组织病症。

[0084] 在一个实施方案中,本文所述的组合物和方法可以用于治疗疾病、病 症和/或状况,诸如但不限于血栓栓塞、结缔组织问题,如眼睛晶状体脱位、marfanoid特征、骨质疏松症和认知损害。

[0085] 在一个实施方案中,本文所述的PEG化的htCBS或PEG化的htCBS 突变体酶可以减 少肝脏疾病的影响和/或治疗肝脏疾病。肝脏疾病可以在具 有CBS-DH的患者中。因此,治疗

肝脏疾病和/或减少肝脏疾病的影响可以 增加CBSDH患者的存活率。作为一个非限制性实例,PEG化的htCBS或 PEG化的htCBS突变体可以用于减少肝实质损伤。

[0086] 在一个实施方案中,PEG化的htCBS或PEG化的htCBS突变体可以 用于增加胱硫醚以及治疗肝脏疾病或损伤或减少肝脏疾病或损伤的影响。

[0087] 在一个实施方案中,使用htCBS或PEG化的htCBS突变体酶的本文所 述的组合物和方法(例如酶替代疗法(ERT))可改善表征高胱氨酸尿症的疾病 表现和代谢异常。在一些实施方案中,PEG化的htCBS或PEG化的htCBS 突变体酶调节毒性代谢物至少24小时、至少48小时或至少72小时。在另 外的实施方案中,PEG化的htCBS或PEG化的htCBS突变体酶改善疾病表现至少3个月、6个月、12个月或24个月。

[0088] 在一个实施方案中,使用PEG化的htCBS或PEG化的htCBS突变体 酶的ERT为CBSDH患者提供有效的治疗,以允许预防和治疗高胱氨酸尿 症和/或改善高胱氨酸尿症的症状,并且减轻维持这种严格的蛋白质排除饮 食的需要。或者,对受试者施用PEG化的htCBS C15S,并且受试者接受 蛋白质排除饮食或Met限制饮食。

[0089] 在一个实施方案中,PEG化的htCBS或PEG化的htCBS突变体可以 用于增加胱硫醚并治疗高胱氨酸尿症受试者的智力迟钝或减少高胱氨酸尿 症受试者的智力迟钝的影响。胱硫醚的量可以在脑的区域或面积中增加, 诸如但不限于枕叶灰质和白质。

[0090] 在一个实施方案中,PEG化的htCBS或PEG化的htCBS突变体可以 用于增加高胱氨酸尿症受试者的脑中神经组织的敏感性。胱硫醚的量可以 在脑的区域或面积中增加, 诸如但不限于枕叶灰质和白质。

[0091] 在一个实施方案中,PEG化的htCBS或PEG化的htCBS突变体可以 用于延长具有CBSDH的受试者的生命。

[0092] 在一个实施方案中,PEG化的htCBS或PEG化的htCBS突变体用作 用于治疗高胱氨酸尿症的CBS酶替代疗法(ERT)的一部分。PEG化的htCBS 和htCBS突变体的施用可以不必将缺陷性酶引入到其天然细胞内区室中。

[0093] 在一个实施方案中,PEG化的htCBS或PEG化的htCBS突变体的施 用使高半胱氨酸水平减少了5%、10%、15%、20%、25%、30%、33%、35%、40%、45%、50%、52%55%、60%、65%、67%、69%、70%、74%、75%、76%、77%、80%、85%、90%、95%或大于95%。作为一个非限制性实例, 高半胱氨酸的减少可以为减少约69%。作为一个非限制性实例, 高半胱氨 酸的减少可以为减少约67%。作为一个非限制性实例,高半胱氨酸的减少 可以为减少约52%。作为一个非限制性实例,高半胱氨酸的减少可以为减 少约33%。

[0094] 在一个实施方案中,PEG化的htCBS或PEG化的htCBS突变体可以 在传统的甜菜碱治疗之前、之后或同时施用。联合疗法可以对高半胱氨酸 水平产生协同效应。

[0095] 在一个实施方案中,向受试者施用PEG化的htCBS或PEG化的htCBS 突变体可以改变含硫氨基酸的细胞外和细胞内平衡。

[0096] 在一个实施方案中,细胞外和细胞内平衡的改变可以是血浆高半胱氨 酸的减少, 诸如但不限于减少约5%、10%、15%、20%、25%、30%、33%、35%、40%、45%、50%、52% 55%、60%、65%、67%、69%、70%、74%、75%、76%、77%、80%、85%、90%、95%或大于 95%。作为一个非限制 性实例,血浆高半胱氨酸的减少可以是减少约75%。

[0097] 在一个实施方案中,细胞外和细胞内平衡的改变可以是胱硫醚的增加, 诸如但不

限于增加约10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、110%、1120%、130%、140%、150%、160%、170%、180%、190%、200%、210%、220%、230%、240%、250%、260%、270%、280%、290%、300%、310%、320%、330%、340%、350%、360%、370%、380%、390%、400%、410%、420%、430%、440%、450%、460%、470%、480%、490%、500%、510%、520%、530%、540%、550%、560%、570%、580%、590%、600%、610%、620%、630%、640%、650%、660%、670%、680%、690%、700%、710%、720%、730%、740%、750%、760%、770%、780%、790%、800%、810%、820%、830%、840%、850%、860%、870%、880%、890%、900%、910%、920%、930%、940%、950%、960%、970%、980%、990%、1000%或大于1000%。作为一个非限制性实例，胱硫醚的增加可以为约900%。

[0098] 在一个实施方案中，细胞外和细胞内平衡的改变可以是半胱氨酸浓度 的标准化，其反映了肝脏的组织病理学改变得到改善和存活增加。

[0099] 在一个实施方案中，PEG化的htCBS或PEG化的htCBS突变体可以 用于降低具有CBSDH的受试者的tHcy水平。tHcy水平可以降低至野生型 水平的1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20 21、22、23、24、15、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、1-5、1-10、1-20、1-30、1-40、1-50、2-5、2-10、2-20、2-30、2-40、2-50、3-5、3-10、3-20、3-30、3-40、3-50、4-6、4-10、4-20、4-30、4-40、4-50、5-7、5-10、5-20、5-30、5-40、5-50、6-8、6-10、6-20、6-30、6-40、6-50、7-10、7-20、7-30、7-40、7-50、8-10、8-20、8-30、8-40、8-50、9-10、9-20、9-30、9-40、9-50、10-20、10-30、10-40、10-50、20-30、20-40、20-50、30-40、30-50或40-50倍。作为一个非限制性实例，tHCY 水平降低至野生型水平的约30倍。作为一个非限制性实例，tHCY 水平降 低至野生型水平的约3-5倍。

[0100] 在一个实施方案中，PEG化的htCBS或PEG化的htCBS突变体可以 用于降低tHcv水平，并因此治疗与高tHcy水平相关的疾病、病症和/或状 况或减轻与高tHcy水平相关的疾病、病症和/或状况的影响(例如比野生型 水平高54倍)的作用。与高tHcy水平相关的疾病、病症和/或状况的非限 制性实例包括面部脱毛、骨质疏松症、眼睛晶状体脱位和平均存活降低。

[0101] 在一个实施方案中，本文所述的PEG化的htCBS或PEG化的htCBS 突变体可以用于在不补充半胱氨酸的情况下使半胱氨酸水平正常化。

[0102] 在一个实施方案中，本文所述的PEG化的htCBS或PEG化的htCBS 突变体可以与甜菜碱联合使用以降低受试者的高半胱氨酸的浓度。使用该 联合疗法，受试者的高半胱氨酸可以降低约5%、10%、15%、20%、25%、30%、33%、35%、40%、45%、50%、52%55%、60%、65%、67%、69%、70%、74%、75%、76%、77%、80%、85%、90%、95%或大于95%。作为 一个非限制性实例，高半胱氨酸可以降低77%。作为一个非限制性实例，高半胱氨酸可以降低76%。作为一个非限制性实例，高半胱氨酸可以减少 74%。作为一个非限制性实例，高半胱氨酸可以减少40%。

[0103] 在一个实施方案中，本文所述的PEG化的htCBS或PEG化的htCBS 突变体可以用于引起诸如代谢物水平增加和/或降低的变化。

[0104] 在一个实施方案中，本文所述的PEG化的htCBS或PEG化的htCBS 突变体可以用于

引起诸如代谢物水平增加的变化。作为一个非限制性实例，代谢物可以是胱硫醚和半胱氨酸，其可以增加5%、10%、15%、20%、25%、30%、33%、35%、40%、45%、50%、52%、55%、60%、65%、67%、69%、70%、74%、75%、76%、77%、80%、85%、90%、95%、100%、110%、1120%、130%、140%、150%、160%、170%、180%、190%、200%、210%、220%、230%、240%、250%、260%、270%、280%、290%、300%、310%、320%、330%、340%、350%、360%、370%、380%、390%、400%、410%、420%、430%、440%、450%、460%、470%、480%、490%、500%、510%、520%、530%、540%、550%、560%、570%、580%、590%、600%、610%、620%、630%、640%、650%、660%、670%、680%、690%、700%、710%、720%、730%、740%、750%、760%、770%、780%、790%、800%、810%、820%、830%、840%、850%、860%、870%、880%、890%、900%、910%、920%、930%、940%、950%、960%、970%、980%、990%、1000%或大于1000%。作为一个非限制性实例，胱硫醚的量可以增加至高于0.008、0.01、0.015、0.020、0.025、0.03、0.035、0.04、0.045、0.05、0.055、0.06、0.065、0.07、0.075、0.08、0.085、0.09、0.095、0.1、0.15、0.2、0.25、0.3或0.35 μM，或者胱硫醚可以增加至0.05至0.35μM之间。作为一个非限制性实例，半胱氨酸的量可以增加至高于140、150、160、170、180、190、200、210、220、230、240、250、260、270、280、290、300、310、320、330、340、350、360、370、380、390、400，或者半胱氨酸可以增加至200μM至400μM之间。

[0105] 在一个实施方案中，本文所述的PEG化的htCBS或PEG化的htCBS 突变体可以用于引起诸如代谢物水平降低的变化。作为一个非限制性实例，代谢物可以是高半胱氨酸、甲硫氨酸和S-腺苷高半胱氨酸，其可以降低了5%、10%、15%、20%、25%、30%、33%、35%、40%、45%、50%、52%、55%、60%、65%、67%、69%、70%、74%、75%、76%、77%、80%、85%、90%、95%、99%或100%。作为一个非限制性实例，高半胱氨酸的量可以降低至约100、95、90、85、80、75、70、65、60、55、50、45、40、35、30、25、20、15、10、5、4、3、2或1μM。作为一个非限制性实例，甲硫氨酸的量可以降低至约50、45、40、35、30、25、20、15、10、5、4、3、2或1μM。作为一个非限制性实例，S-腺苷高半胱氨酸的量降低至约0.15、0.14、0.13、0.12、0.11、0.10、0.095、0.09、0.085、0.08、0.075、0.07、0.065、0.06、0.055、0.05、0.045、0.04、0.035、0.03、0.025、0.02、0.015、0.01、0.009、0.008、0.007、0.006、0.005、0.004、0.003、0.002、0.001或小于0.001μM。

[0106] 在一个实施方案中，本文所述的PEG化的htCBS或PEG化的htCBS 突变体可以用于降低受试者的高半胱氨酸、甲硫氨酸、S-腺苷甲硫氨酸和S-腺苷高半胱氨酸的水平。

[0107] 在一个实施方案中，PEG化的htCBS或PEG化的htCBS突变体可以用于增加受试者的半胱氨酸和胱硫醚的水平。

[0108] 在另一方面，本发明涉及一种重组生产和纯化人胱硫醚合酶的方法。该方法包括将编码人CBS酶或其截短或突变的变体的核酸序列克隆到表达载体中的步骤。作为一个非限制性实例，酶和方法可以如国际公开 WO2014120770中所述，其内容通过引用的方式并入本文，并且具体如在 SEQ ID NO:01、SEQ ID NO:02、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO: 13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15和SEQ ID NO:16中所述。

[0109] 施用和给药

[0110] 在一个实施方案中，可以通过肠胃外施用将PEG化的htCBS或PEG化的htCBS突变

体施用于受试者。

[0111] 在一个实施方案中,可以通过皮下(SC)、静脉内(IV)或腹膜内(IP)注射 将PEG化的htCBS或PEG化的htCBS突变体施用于受试者。作为一个非 限制性实例,可以通过皮下施用将PEG化的htCBS或PEG化的htCBS突 变体施用于受试者。作为一个非限制性实例,可以通过静脉内施用将PEG 化的htCBS或PEG化的htCBS突变体施用于受试者。作为一个非限制性实 例,可以通过腹膜内施用将PEG化的htCBS或PEG化的htCBS突变体施 用于受试者。作为一个非限制性实例,可以通过渗透泵将PEG化的htCBS 或PEG化的htCBS突变体施用于受试者。

[0112] 在一个实施方案中,PEG化的htCBS或PEG化的htCBS突变体可以 施用于受试者至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20次或多于20次。

[0113] 在一个实施方案中,可以每1分钟、2分钟、3分钟、4分钟、5分钟、六(6)分钟、7分钟、8分钟、9分钟、10分钟、15分钟、20分钟、25分钟、30分钟、35分钟、40分钟、45分钟、50分钟、55分钟、每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、每1天、2天、3天、4天、5天、6天、每1周、每两周、3周、每1月、2个月、每1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、每1 年、13个月、14个月、15 个月、16个月、17个月或18个月重复施用PEG 化的htCBS或PEG化的htCBS突变体。

[0114] 在一个实施方案中,PEG化的htCBS或PEG化的htCBS突变体的施 用可以是间隔若干分钟、若干小时、若干天或若干周的一系列给药。一系 列中给药的数量可以是2次、3次、4 次、5次或6次。作为一个非限制性 实例,受试者被施用3次间隔24小时的给药。作为另一个非限制性实例, 受试者被施用5次间隔12小时的给药。

[0115] 在一个实施方案中,PEG化的htCBS或PEG化的htCBS突变体的施 用可以遵循在第一系列给药和第二系列给药之间具有一定间隔的系列给药 的给药方案。给药之间的间隔可以是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、一周、2周、3周、一个月、2个月、一季度、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。一系列中给药的数量可以为2剂、3剂、4剂、5剂或6 剂。作为一个非限制性实例,受试者可以被施用第一系列的5次间隔12小 时的给药,然后在第一给药之后14天对受试者施用第二系列的5次间隔12小时的给药。作为另一个非限制性实例,在8周时间内向受试者施用两 个系列的给药,其中第一系列是一周两次持续两周的一种给药,第二系列 的给药是一周三次,持续6周。

[0116] 在一个实施方案中,可以在受试者已施用甜菜碱之后施用至少一次 PEG化的htCBS或PEG化的htCBS突变体。甜菜碱施用和PEG化htCBS 之间的时间可以是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、1个月、2个月、一季度、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。作为一个非限制性实例,PEG化的htCBS可以在受试者施用甜菜碱之后14 天施用。作为另一个非限制性

实例,受试者可以在受试者施用甜菜碱之后 施用两次给药。PEG化的htCBS或PEG化的htCBS突变体可以在甜菜碱 施用之后14天和15天施用。

[0117] 在一个实施方案中,PEG化的htCBS或PEG化的htCBS突变体可以 与甜菜碱联合施用于受试者。该联合可以施用至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15次或超过15次。

[0118] 在一个实施方案中,PEG化的htCBS或PEG化的htCBS突变体可以 在受试者初次接受甜菜碱之后与甜菜碱联合施用于受试者。联合治疗与最 初甜菜碱给药之间的时间可以是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、1 个月、2个月、一季度、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。作为一个非限制性实例,该联合可以在受试者首次施用甜菜 碱之后14天施用。作为另一个非限制性实例,受试者可以在受试者首次施 用甜菜碱之后施用两次给药。可以在甜菜碱施用之后14天和15天施用该 联合。

[0119] 在一个实施方案中,施用于受试者的PEG化htCBS或PEG化的htCBS 突变体的剂量可以为5至8mg/kg,如5mg/kg、5.5mg/kg、6mg/kg、6.5 mg/kg、7mg/kg、7.5mg/kg或8mg/kg。在某些实施方案中,剂量选自约2 mg/kg至约24mg/kg的范围。例如,剂量为约2mg/kg、约6mg/kg、约8 mg/kg、约10mg/kg或约24mg/kg。在某些实施方案中,剂量选自约0.01 至约10mg/kg 的范围。例如,剂量为约0.4mg/kg。在某些实施方案中,PEG 化的htCBS或PEG化的htCBS突变体多肽施用于接受甲硫氨酸限制饮食的 受试者。或者,将PEG化的htCBS或PEG化的htCBS突变体多肽施用于 不接受甲硫氨酸限制饮食的受试者。

[0120] 在一个实施方案中,PEG化的htCBS或PEG化的htCBS突变体多肽 可以与另一种治疗CBSDH的治疗共同施用。如本文所用,“共同施用”意为 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PEG化的 htCBS、PEG化的htCBS突变体、甜菜碱或维生素B6。共同施用是指同时 施用两种或更多种组分或施用之间有一定的时间间隔,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天或多于3天。

[0121] 定义

[0122] 如在本说明书中所使用的,除非上下文另外明确规定,单数形式“a”和 “an” 和 “the”包括复数指示物。因此,例如,提及的“聚合物”包括单个聚 合物以及两种或更多种相同或不同的聚合物,提及的“赋形剂”包括单个赋 形剂以及两种或更多种相同或不同的赋形剂等等。

[0123] 在提供值的范围的情况下，预期在该范围的上限与下限之间的每个中间值以及该所述范围中的任何其他所述的值或中间值都包含在本公开中并且被明确公开。例如，如果描述了 $1\mu\text{m}$ 至 $8\mu\text{m}$ 的范围，则预期还明确公开 $2\mu\text{m}$ 、 $3\mu\text{m}$ 、 $4\mu\text{m}$ 、 $5\mu\text{m}$ 、 $6\mu\text{m}$ 和 $7\mu\text{m}$ 以及大于或等于 $1\mu\text{m}$ 的值的范围和小于或等于 $8\mu\text{m}$ 的值的范围。

[0124] “编码序列”是指编码(i)被翻译成蛋白质的氨基酸序列的mRNA；或(ii)功能性RNA，如干扰RNA或反义分子的核酸(例如基因)的那部分。

[0125] 当针对例如细胞、核酸、多肽、表达盒或载体使用时，“重组”是指材料或对应于自然或天然形式的材料已通过引入新的部分或改变现有的部分而被修饰，或者与其相同但是由合成材料产生或衍生。例如，重组细胞表达在天然(非重组)形式的细胞内未发现的基因(即“外源核酸”)或表达因其原因以不同水平表达(通常表达不足或完全不表达)的天然基因。

[0126] 重组技术可包括例如使用编码蛋白质或反义序列的重组核酸如cDNA，插入到表达系统如表达载体中；将所得到的构建体引入到细胞中，并且该细胞在适当时表达核酸和蛋白质。重组技术还包括在一个表达盒或载体中将核酸连接到来自不同来源的编码或启动子序列，用于融合蛋白的表达、蛋白质的组成型表达或蛋白质的诱导型表达。

[0127] 术语“受试者”、“个体”或“患者”在本文中可互换使用，并且是指脊椎动物，优选哺乳动物。哺乳动物包括但不限于人。

[0128] “相关的”是指与疾病、状况或表型的发展或表现同时发生。相关可以是由于但不限于负责管家功能的基因，其改变可为各种疾病和病症提供了基础；作为特定疾病、状况或表型涉及的途径的一部分的那些；以及间接导致疾病、状况或表型的表现的那些。

[0129] “生理条件”或“生理溶液”是指具有与完整哺乳动物细胞或活的哺乳动物的组织空间或器官中的条件基本上相似的离子强度、pH和温度的含水环境。通常，生理条件包括具有约 150mM NaCl、pH 6.5-7.6和约22-37摄氏度的温度的含水溶液。通常，生理条件是适合用于生物大分子分子间缔合的结合条件。例如， 150mM NaCl、pH 7.4和37摄氏度下的生理条件通常是合适的。

[0130] “药学上可接受的赋形剂或载体”是指可以任选地包含在本发明的组合物中并且不会对患者造成显著的不良毒理学作用的赋形剂。特别地，在本发明中，这是指可以与活性化合物(这里是指PEG化的htCBS)联合被摄入到哺乳动物受试者体内而对受试者没有显著的不良毒理学作用的赋形剂。

[0131] 如本文所用的术语“赋形剂”或“媒介物”是指其本身不是治疗剂，用作递送治疗剂的载体并且适合施用于受试者(例如哺乳动物)或者加入到药物组合物中以改善其处理或储存性质或允许或促进将剂量单位的组合物形成离散制品(如适用于口服施用的胶囊或片剂)的任何物质。赋形剂和媒介物包括本领域已知的任何这样的材料，例如无毒且不以有害方式与组合物的其他组分相互作用的任何液体、凝胶、溶剂、液体稀释剂、增溶剂等。施用可意指口服施用、吸入、经肠施用、进食或通过静脉注射接种。赋形剂可以包括标准的药物赋形剂，并且还可以包括可以用于制备用于人类和/或动物消费的食物和饮料、饲料或饵剂或其他食物的任何组分。

[0132] “渗透剂”、“药物”或“药理学活性剂”或任何其他类似的术语意指适合于通过本领域中以前已知的方法和/或通过本公开中教导的方法施用的任何化学或生物材料或化

合物,包括肽,其诱导期望的生物学或药理学作用,所述作用可以包括但不限于(1)对生物体具有预防作用并且防止不希望的生物学作用,如防止感染,(2)缓解由于疾病引起的状况,例如,缓解因疾病引起的疼痛或炎症,和/或(3)缓解、减少或完全消除生物体的疾病。作用可以是局部的,如提供局部麻醉作用,或者其可以是全身性的。本公开不是针对新型渗透剂或新的活性成分种类。相反,它仅限于现有技术中存在的或以后可以确定为活性剂并且适合于通过本公开递送的物质或渗透剂的递送方式。

[0133] 术语“约”,特别是在提及给定量时,意为包含±5%的偏差。

[0134] “可选的”或“可选地”意为随后描述的情况可以存在或发生或者可以不存在或不发生,使得描述包括该情况存在或发生的情形以及该情况不存在或不发生的情形。

[0135] “基本上不存在”或“基本上不含”某个特征或实体意指几乎完全或完全不存在该特征或实体。例如,对于施用PEG化的htCBS的受试者来说,基本上不存在可观察的副作用意指这样的副作用是检测不到的,或者发生的程度仅为可忽略的,例如当与对未经治疗的患者观察到的相同副作用的频率或强度相比时,达到减少约50%或更多的频率或程度。

[0136] 与本发明组合物有关的术语“药理学有效量”或“治疗有效量”是指活性剂(或含有该活性剂的组合物)的无毒但足够在待治疗的受试者的血流中或作用部位(例如细胞内)提供所需水平的量,和/或足够提供期望的生理学、生物物理学、生物化学、药理学或治疗响应(如改善高胱氨酸尿症的表现)的量。所需的确切量将因受试者而异,并将取决于许多因素,如活性剂、组合物的活性、使用的递送装置、组合物的物理特性、预期的患者使用(即每天施用的给药次数)以及患者考虑因素,如受试者的种类、年龄和一般状况,正在治疗的状况的严重程度、受试者服用的其他药物、施用模式等。基于本文提供的信息,本领域技术人员可容易地确定这些因素和考虑因素。基于本文提供的信息,本领域普通技术人员使用常规实验可以确定在任何个体情况中适当的“有效”量。

[0137] 术语“生物学活性”是指本领域技术人员通常认为归属于核酸或蛋白质的任何生物学活性。生物学活性的实例是酶活性、二聚化、折叠或结合另一种蛋白质或核酸分子的能力等。

[0138] 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。

[0139] 如本文所用,“变体”是如通过公共序列数据库如GenBank中的序列所例证的,与野生型核酸或氨基酸序列不相同但在该序列的整个长度上具有明显的同源性(例如,80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性)的核酸、蛋白质或多肽。如本文所用,“蛋白质、多肽或其肽片段”意指全长蛋白质或其具有长度通常为至少5、6、7、8、9、10、11、12、13、14或15个氨基酸的氨基酸序列的部分,但是二肽、三肽和四肽也被本发明考虑和涵盖。

[0140] 如本文所用,“突变体”是被设计或工程改造以改变与糖基化、蛋白质稳定和/或配体结合有关的性质或功能的突变蛋白质。

[0141] 如本文所用,相对于给定细胞、多肽、核酸、性状或表型的术语“天然”或“野生型”是指其通常在自然界中发现的形式。

[0142] 如本文所用,术语“蛋白质”、“多肽”、“寡肽”和“肽”具有其常规含义并且可互换

使用以表示通过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、脂化、十四烷基化、泛素化等)。此外,本文所述的多肽不限于特定的长度。该定义中包括的有D-氨基酸和L-氨基酸,以及D-氨基酸和L-氨基酸的混合物。该术语也不是指或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子序列。多肽还可以是指包含基本上负责多肽的免疫原性并且能够引发免疫应答的表位(即抗原决定簇)的氨基酸子序列。

[0143] “对应于……的位置”是指核酸分子或蛋白质中相对于另一参考核酸分子或蛋白质中的位置的感兴趣的位置(即碱基编号或残基编号)。对应的位置可以通过比较和比对序列以使匹配的核苷酸或残基的数量最大化例如使得序列之间的同一性为大于90%、大于95%、大于96%、大于97%、大于98%或大于99%来确定。然后对感兴趣的位置给出在参考核酸分子中分配的编号。例如,如果Gene-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,然后鉴定出与2073对齐的位置。由于各种等位基因可以具有不同的长度,所以命名为2073的位置可以不是核苷酸2073,而是位于“对应于”参考序列中该位置的位置。

[0144] “序列同一性百分比”和“百分比同源性”在本文中可互换使用,是指多核苷酸和多肽之间的比较,并且通过在比较窗口中比较两个最佳对齐的序列来确定,其中与用于两个序列的最佳比对的参考序列(其不包含添加或缺失)相比,比较窗口中的多核苷酸或多肽序列的部分可以包含添加或缺失(即空位)。百分比可以通过如下步骤计算:确定两个序列中出现相同的核酸碱基或氨基酸残基的位置的数目以得到匹配位置的数目,用匹配位置的数目除以比较窗口中位置的总数,并将结果乘以100得到序列同一性的百分比。或者,百分比可以通过如下步骤计算:确定两个序列中出现相同的核酸碱基或氨基酸残基或者核酸碱基或氨基酸残基与空位对齐的位置的数目以得到匹配位置的数目,用匹配位置的数目除以比较窗口中位置的总数,并将结果乘以100得到序列同一性的百分比。本领域技术人员可以理解有许多已建立的算法可用于比对两个序列。可以例如通过Smith&Waterman,Adv. Appl. Math. 2:482 (1981) 的局部同源性算法、通过Needleman&Wunsch,J. Mol. Biol. 48:443 (1970) 的同源性比对算法、通过Pearson&Lipman,Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444 (1988) 的寻找相似性方法、通过这些算法的计算机化实施(GCG Wisconsin Software Package中的GAP、BESTFIT、FASTA 和TFASTA)或通过目视检查(通常参见Current Protocols in Molecular Biology,F.M.Ausubel et al.,eds.,Current Protocols,a joint venture between Greene Publishing Associates, Inc. and John Wiley&Sons, Inc., (1995 Supplement) (Ausubel)),来进行用于比较的序列的最佳比对。适用于确定百分比序列同一性和序列相似性的算法的实例是BLAST和BLAST 2.0算法,其分别描述在Altschul et al.(1990) J. Mol. Biol. 215:403-410和Altschul et al.(1977) Nucleic Acids Res. 3389-3402中。用于进行BLAST分析的软件可通过国家生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information)网站公开获得。该算法涉及首先通过识别查询序列中的长度W的短字段来识别高得分序列对(HSP),在与数据库序列中相同长度的字段比对时,其匹配或满足一些正值阈值分数T。T被称为邻近字段评分阈值(Altschul et al., 同上)。这些初始邻近字段命中用作“种子”,来启动查找包含它们的更

长的 HSP的搜索。然后沿着每个序列在两个方向上延伸字段命中,只要累积比 对分数可以增加即可。对于核苷酸序列,使用参数M(对于一对匹配残基的 奖励分数;总是>0) 和N(对于错配残基的罚分;总是<0) 来计算累积分数。对于氨基酸序列,使用评分矩阵来计算累积分数。当发生以下情况时,字 段命中在每个方向上的延伸停止:累计比对分数从其达到的最大值下降了 数量X;由于累积一个或多个负得分残基比对,累积分数为0或以下;或 者到达任一序列的末端。BLAST算法参数W、T和X确定比对的灵敏度和 速度。BLASTN程序(用于核苷酸序列) 使用以下默认值:字长(W) 为11、期 望值(E) 为10、M=5、N=-4,以及两条链的比较。对于氨基酸序列,BLASTP 程序使用以下默认值:字长(W) 为3、期望值(E) 为10和BLOSUM62评分 矩阵(参见Henikoff&Henikoff, Proc.Natl.Acad.Sci.USA 89:10915 (1989))。

[0145] 尽管上述算法和程序全部都适用于确定序列比对和%序列同一性,但 出于本文公开的目的,通常使用GCG Wisconsin Software package (Accelrys, Madison WI) 中的 BESTFIT或GAP程序,使用提供的默认参数来确定%序 列同一性。

[0146] 术语“NH₂末端修饰”可以用于指本文描述的肽。如果存在的话,本发 明肽化合物的对应于氨基末端的末端可以是“游离”形式(例如H₂N-) ,或者 可以用式R²C(O)-或R²(O)₂-的基团酰化,其中R²如前面所定义的。在一 个实施方案中,R²选自(C₁-C₆) 烷基、(C₅-C₁₀) 芳基、(C₆-C₁₆) 芳基烷基、5-10 元杂芳基或6-16元杂芳基烷基。

[0147] 在另一个实施方案中,氨基末端可以被设计为赋予化合物指定性质如 低抗原性的封闭基团“封闭”。这种封闭基团的非限制性实例包括聚亚烷基 氧化物聚合物如聚乙二醇(PEG)。可用于赋予化合物、特别是肽和蛋白质特 定性质的各种聚合物是本领域中已知的,适合于将这些聚合物连接于化合 物的化学方法也是已知的。具体的非限制性实例可以在美国专利号 5,643,575;5,730,990;5,902,588;5,919,455;6,113,906;6,153,655;和 6,177,087中找到,其公开内容通过引用的方式并入本文。

[0148] 术语“羧基末端修饰”可以与本文描述的肽关联使用。如果存在的话,肽化合物的对应于C-末端的末端可以为未衍生化的羧基的形式,作为游离 酸或作为盐如无机或有机离子的钠盐、钾盐、钙盐、镁盐或其他盐,或者 可以为衍生化的羧基的形式,如酯、硫酯或酰胺。化合物的这种衍生化形 式可以通过使具有羧基末端的化合物与适当的醇、硫醇或胺反应来制备。作为举例而非限制,合适的醇、硫醇或胺包括式R²OH的醇、式R²SH的硫 醇和式R²NH₂、R²R²NH或NH₃⁺的胺,其中每个R²彼此独立地如前所定义。

[0149] 术语“L或D型氨基酸”可以与本文所述的肽关联使用。如本领域技术 人员将认识到的,包含本发明化合物的各种Xⁿ残基就它们的C_a碳可以是 L-构型或D-构型。在一个实施方案中,特定化合物的所有C_a碳具有相同的 构型。在本发明的一些实施方案中,所述化合物包含关于一个或多个C_a碳 的特定手性和/或包括在指定位置的非肽键以赋予所述化合物指定性质。例 如,众所周知,全部或部分由D-氨基酸组成的肽比其相应的L-肽对应物对蛋白酶更具抗性。因此,在一个实施方案中,化合物是全部或部分由D-氨 基酸组成的肽。或者,针对蛋白酶具有良好稳定性的化合物可以包括在指 定位置处具有反极性的肽键的肽 类似物。例如,针对胰蛋白酶样蛋白酶具 有稳定性的化合物包括在每个L-Arg或L-Lys残基之前具有反极性的肽键 的肽类似物;针对胰凝乳蛋白酶样蛋白酶具有稳定性的化合物包括在每个 小的和中等大小的L-脂肪族残基或L-非极性残基之前具有反极性肽键的肽 类似物。在另一个实施方案中,针对蛋白酶具有稳定性的化合物包括完全 由反极性肽键组成

的肽类似物。针对蛋白酶具有稳定性的其他实施方案对于本领域技术人员将是显而易见的。本文描述了化合物的另外的具体实施 方案。

[0150] 如本文所用,术语“长期施用”是指在6周或更长的时间周期内施用与 PEG部分缀合的CBS酶、htCBS或htCBS突变体(例如具有C15S突变)。

[0151] 如本文所用,术语“连续施用”是指在整个研究过程中经由SC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)。

[0152] 如本文所用,术语“I278T”、“I278T纯合”或“I278T-/-纯合”小鼠是指这样一种小鼠模型:其中内源小鼠cbs基因已被敲除并且将在CBS等位基因 中具有与高胱氨酸尿症相关的最常见突变833T>C(I278T) 的人CBS转基因 作为锌诱导型启动子控制下的cDNA克隆插入在整合到小鼠基因组的质粒 上。

[0153] 本发明提供了由以下编号的项定义的技术方案:

[0154] 1.一种治疗受试者的高胱氨酸尿症的方法,所述方法包括向受试者施 用包含分离的人截短胱硫醚β合酶(htCBS) 突变体多肽的组合物,其中所述 分离的htCBS多肽突变体 已被PEG化,并且其中所述分离的htCBS突变体 多肽至少一周一次以约0.01至约10mg/kg之间的剂量施用。

[0155] 2.根据项1所述的方法,其中PEG是低分子量线性PEG。

[0156] 3.根据项1所述的方法,其中PEG是高分子量四臂分支PEG。

[0157] 4.根据项1所述的方法,其中所述剂量是选自约0.05、约0.1、约0.5、约1和约5mg/kg的量。

[0158] 5.根据项1所述的方法,其中所述剂量是约0.4mg/kg。

[0159] 6.根据项1所述的方法,其中分离的htCBS突变体多肽与甜菜碱共同 施用。

[0160] 7.根据项1所述的方法,其中在所述分离的htCBS突变体多肽之前施 用甜菜碱。

[0161] 8.根据项1所述的方法,其中至少一周两次施用所述htCBS突变体多 肽。

[0162] 9.根据项1所述的方法,其中所述受试者是人。

[0163] 10.根据项1所述的方法,其中所述分离的htCBS突变体多肽被选自 由ME-200GS、ME-200MAOB、ME-400MA、GL4-400MA和ME-050GS组 成的组中的至少一者PEG化。

[0164] 11.一种增加受试者中胱硫醚和/或半胱氨酸的方法,所述方法包括向 受试者施 用包含分离的人截短胱硫醚β合酶(htCBS) 突变体多肽的组合物,其中所述分离的htCBS突 变体多肽已被PEG化,并且至少一周一次以约 0.01至约10mg/kg之间的剂量施用。

[0165] 12.根据项11所述的方法,其中所述htCBS突变体多肽至少一周两次 施用。

[0166] 13.根据项11所述的方法,其中所述受试者是人。

[0167] 14.根据项11所述的方法,其中PEG是低分子量线性PEG。

[0168] 15.根据项11所述的方法,其中PEG是高分子量四臂分支PEG。

[0169] 16.根据项11所述的方法,其中所述分离的htCBS突变体多肽被选自 由ME-200GS、ME-200MAOB、ME-400MA、GL4-400MA和ME-050GS组 成的组中的至少一者PEG化。

[0170] 17.根据项11所述的方法,其中所述剂量是选自约0.05、约0.1、约 0.5、约1和约 5mg/kg的量。

[0171] 18.根据项11所述的方法,其中所述剂量是约0.4mg/kg。

[0172] 19.根据项11所述的方法,其中胱硫醚的量增加至高于0.008μM。

- [0173] 20. 根据项19所述的方法,其中胱硫醚的量增加至0.005-0.35 μ M之间。
- [0174] 21. 根据项19所述的方法,其中半胱氨酸的量增加至高于140 μ M。
- [0175] 22. 根据项19所述的方法,其中半胱氨酸的量增加至200 μ M至400 μ M之间。
- [0176] 23. 根据项11所述的方法,其中分离的htCBS突变体多肽与甜菜碱共同施用。
- [0177] 24. 根据项11所述的方法,其中在施用所述分离的htCBS突变体多肽之前施用甜菜碱。
- [0178] 25. 一种降低受试者中高半胱氨酸、甲硫氨酸和/或S-腺苷高半胱氨酸的方法,所述方法包括向受试者施用包含分离的人截短胱硫醚 β 合酶(htCBS)突变体多肽的组合物,其中所述分离的htCBS突变体多肽已被PEG化,并且至少一周一次以0.01至10mg/kg之间的剂量施用。
- [0179] 26. 根据项25所述的方法,其中PEG是低分子量线性PEG。
- [0180] 27. 根据项25所述的方法,其中PEG是高分子量四臂分支PEG。
- [0181] 28. 根据项25所述的方法,其中所述剂量是选自约0.05、约0.1、约0.5、约1和约5mg/kg的量。
- [0182] 29. 根据项25所述的方法,其中所述剂量是约0.4mg/kg。
- [0183] 30. 根据项25所述的方法,其中高半胱氨酸的量为小于100 μ M。
- [0184] 31. 根据项30所述的方法,其中高半胱氨酸的量为约10 μ M。
- [0185] 32. 根据项30所述的方法,其中甲硫氨酸的量为小于50 μ M。
- [0186] 33. 根据项32所述的方法,其中甲硫氨酸的量为约30 μ M。
- [0187] 34. 根据项32所述的方法,其中S-腺苷高半胱氨酸的量被降低至小于0.14 μ M。
- [0188] 35. 根据项34所述的方法,其中S-腺苷高半胱氨酸的量被降低至约0.015 μ M。
- [0189] 36. 根据项25所述的方法,其中分离的htCBS与甜菜碱共同施用。
- [0190] 37. 根据项25所述的方法,其中在所述分离的htCBS突变体多肽之前施用甜菜碱。
- [0191] 38. 一种治疗肝脏疾病的方法,所述方法包括向受试者施用包含分离的人截短胱硫醚 β 合酶(htCBS)突变体多肽的组合物,其中所述分离的htCBS突变体多肽已被PEG化,并且其中所述分离的htCBS突变体多肽至少一天一次以0.01至10mg/kg之间的剂量施用至少4周。
- [0192] 39. 根据项38所述的方法,其中PEG是低分子量线性PEG。
- [0193] 40. 根据项38所述的方法,其中PEG是高分子量四臂分支PEG。
- [0194] 41. 根据项38所述的方法,其中所述剂量是选自约0.05、约0.1、约0.5、约1和约5mg/kg的量。
- [0195] 42. 根据项38所述的方法,其中所述剂量是约0.4mg/kg。
- [0196] 43. 根据项38所述的方法,其中减少了对肝实质的损害。
- [0197] 44. 一种治疗受试者的高胱氨酸尿症的方法,所述方法包括向受试者施用包含分离的人截短胱硫醚 β 合酶(htCBS)突变体多肽的组合物,所述分离的htCBS突变体多肽包含在SEQ ID NO:3的第15位氨基酸处的突变,其中所述分离的htCBS突变体多肽已被ME-200GS PEG分子PEG化。
- [0198] 45. 根据项44所述的方法,其中所述突变是丝氨酸取代半胱氨酸。
- [0199] 46. 根据项44所述的方法,其中所述受试者是人。

[0200] 47. 根据项44所述的方法,其中所述组合物以选自约0.1mg/kg至约 24mg/kg范围内的剂量施用。

实施例

[0201] 以下实施例在本质上是说明性的,并且不以任何方式为限制性目的。

[0202] 实施例1. 实验过程

[0203] A. 在PET29A (+) 载体中构建序列优化的截短的人CBS

[0204] 如以前在国际公开号W02014120770中所描述的(其公开内容通过引用的方式以其整体并入本文),由GenScript USA Inc (NJ, USA) 针对细菌表达 优化了全长(551aa)人CBS编码序列,并在用EcoRV限制酶消化后克隆到 pUC57载体中。然后使用引物A1和A2通过PCR扩增CBS序列,以产生 编码截短的酶(aa 1-413)的序列。然后用限制酶NcoI和XhoI消化PCR产物, 并将其连接到用相同酶消化的pET-28a (+) 载体中。与CBS野生型序列相比, 克隆到pET-28a (+) 的最佳NcoI位点导致G突变为C。使用引物B1和B2 的定点诱变试剂盒 (Stratagene, CA, USA) 被用于重新产生野生型序列 (htCBS)。使用相同的策略通过使用引物C1和C2来产生C15S突变体(T突 变成A; htCBSC15)。所有序列均通过测序验证。截短的CBS的表达被 pET-28a (+) 载体中的上游T7启动子控制,其需要转化到DE3细菌中并通过 IPTG诱导。表1描述了引物及其序列标识符。

[0205] 表1. 引物

[0206]

引物名称	SEQ ID NO.
A1	7
A2	8
B1	9
B2	10
C1	11
C2	12
pKK-F (SphI)	5
pKK-R (Kpn I)	6

[0207] B. 表达和纯化

[0208] 将包含编码截短的人CBS的序列的pET-28a (+) 载体转化到DE3细菌 (即大肠杆菌BL-21 (DE3) 或HMS174 (DE3)) 中,并使来自卡那霉素抗性克隆 的细菌在275RPM的旋转振荡器在37℃下于5ml含有30μg/ml卡那霉素 的Luria-Bertani (LB) 培养基中生长过夜。将1ml过夜培养物加入到含有30 ug/ml卡那霉素的100ml极品肉汤 (TB) 培养基中并生长过夜。然后将10ml 加入到含有0.001% 硫胺素-HCl pH 8.0、0.0025% 吡多辛-HCl pH 8.0、0.3mM δ-ALA pH 8.0、150μM氯化铁、30ug/ml卡那霉素的1升TB培养基中。然后将培养物在275RPM的旋转振荡器上在30℃下培养直至OD₆₀₀达到 ~0.6-0.7的值,并通过加入1mM IPTG诱导蛋白表达。继续发酵另外16 小时。通过在4 ℃、6000RCF离心10分钟收获细胞,用冰冷的 0.9%NaCl 洗涤,如上所述重新离心,并在-80℃下冷冻。然后将4.45ml裂解缓冲液 (20mM NaH₂PO₄, pH=7.2, 40mM NaCl, 0.1mM PLP) /克沉淀物加入到细 胞沉淀物中,将细胞沉淀物在Dounce匀浆器中匀浆,并用溶菌酶(最终2 mg/ml) 处理,在摇摆平台上于4℃孵育1小时,

超声处理以降低粘度，并以53000RCF离心。然后将包含可溶性部分的上清液储存在-80°C。通过多步色谱程序处理裂解物。核心过程由阴离子交换捕获柱(DEAE Sepharose-FF)然后为亲和柱组成。这达到约90%的纯度。通过使用一个或两个精制色谱步骤实现>99%的最终纯度。将最终的柱洗脱液渗透到PBS中。

[0209] C. 酶活性测定

[0210] 通过用C¹⁴-标记的丝氨酸作为底物的放射性同位素测定来确定CBS活性。将10μl(共计490ng)在稀释缓冲液(0.1M Tris-HCl pH=8.6, 1mM DTT, 10μM PLP, 0.5mg/ml BSA)中的纯htCBS或10μl血浆加入到85μl含有0.1 M Tris-HCl pH=8.6、10mM L-丝氨酸、0.5mM PLP、0.5mg/ml BSA和0.3 μCi(对于纯酶)或0.45μCi(对于血浆)L-[C¹⁴(U)]-丝氨酸的反应混合物。样品在37°C下孵育5min, 通过加入5μl 0.2M Hcy(10mM最终浓度)开始反应。在37°C下孵育30min后, 将20μl等分的测定混合物施加到3级CHR Whatman (NJ, USA)纸上。所得混合物的测定启动和取样交错进行, 使得每个反应时间为30分钟。使用下行纸色谱法从标记底物(Ser)分离放射性产物(Cth)。通过过夜下行纸色谱法在2-丙醇/甲酸/H₂O(75:5:7:18.9v/v)中将反应中形成的C¹⁴-胱硫醚自C¹⁴-丝氨酸分离。通过将色谱图切割成条, 浸没在5ml Opti-fluor闪烁混合液(PerkinElmer, MA, USA)中并在Beckman LS-3801闪烁计数器中计数, 来确定标志物胱硫醚区域中的放射性(通过用茚三酮染色标记物道来检测)。使用不含酶的样品作为空白来监测背景放射性, 然后将其从每个样品中扣除。对于纯酶, 比活性值表示为酶单位(产生1μmol胱硫醚/小时的酶的量)/mg CBS, 对于血浆样品表示为单位/μl血浆。在药代动力学(PK)研究中, 这已被表示为:mU/μl血浆。

[0211] D. 凝胶内活性测定

[0212] 使用Native Page (Bio-Rad, CA, USA) 分离蛋白质样品。然后将凝胶在染色溶液(100mM Tris-HCl pH=8, 20mM L-半胱氨酸, 50mM 2-巯基乙醇, 0.1mM PLP和0.2硝酸铅)中孵育15-30分钟。通过将凝胶浸没在7%乙酸中停止反应。

[0213] E. 代谢物浓度的测定

[0214] 如以前在(Allen et al., 1993, Metabolism, 42:1448-1460)中所述, 通过稳定同位素稀释液相色谱质谱法测定血浆代谢物高半胱氨酸、胱硫醚和半胱氨酸。如在(Maclean et al., 2010b. Mol. Genet. Metab. 101, 153-162)中所述进行总非蛋白质结合的高半胱氨酸和其他氨基硫醇以及组织中氨基酸的测量。通过稳定同位素稀释液相色谱质谱法测定代谢物。

[0215] F. PEG化

[0216] 聚乙二醇分子购自NOF Corporation (Tokyo, 日本)。根据制造商的说明进行PEG化。例如, 在4°C下在100mM磷酸盐缓冲液pH=6.5中过夜进行PEG马来酰亚胺衍生物与htCBS(5mg/ml)的SH基团的偶联。PEG分子与CBS蛋白质之间的摩尔比为10:1或5:1。

[0217] 或者, PEG化通过使20kDa NHS-酯PEG (ME-200GS)与htCBS C15S(具有C15S突变的截短人CBS)缀合来实现。下面的方案概述了PEG化程序。

[0218] 将色谱法纯化的htCBS C15S在100mM磷酸钠缓冲液pH 7.2中进行缓冲液交换和配制, 并浓缩至至少10mg/ml。将酶等分试样储存在-80°C, 并在偶尔混合的情况下在37/42°C水浴中解冻。将酶等分试样旋转以除去产生的泡沫(如果有的话), 并保存在冰上直到需要时。

[0219] PEG化摩尔比为1:10(每htCBS C15S亚基),其转化为431mg ME-200GS/100mg htCBS C15S。在无菌的不含内毒素的50ml Falcon管中 混合计算量的蛋白质、水和2x缓冲液(仅当酶浓度高于10mg/ml时才需要)。例如,20mg/ml的200mg htCBS C15S的PEG化需要10ml蛋白质、12ml 无菌水和10ml 100mM Na-P pH7.2缓冲液。该管含有的总体积为32ml并将其保持在冰上。在单独的试管中,通过混合、涡旋或任选在37/42°C水浴中加温短时间,使862mg ME-200GS PEG溶解于无菌水或DMSO中。PEG迅速溶解成清澈的、高度粘稠的溶液。通过倾倒或移液将稀释的酶快速地转移到含有溶解的PEG的管中。将管密封严实并立即涡旋10-15秒以产生均匀的混合物。将管在室温下在摇摆平台上孵育4-6小时或在4°C下过夜。

[0220] G. 酶储存

[0221] 使用PBS pH7.4配制PEG化的htCBS C15S并浓缩至约至少5mg/ml,并且通常至10至25mg/ml的浓度。该酶在-80°C下以(1.2ml)等分试样储存。对于每个给药日,通过将PBS稀释到1mg/ml的最终浓度来制备单次使用的新鲜酶溶液。抛弃给药完成后剩余的任何溶液。

[0222] H. 动物程序

[0223] 所有动物程序均得到University of Colorado-Denver IACUC(其是AAALAC认可的(#00235)、公共卫生服务保证的(#A 3269-01)和USDA许可的(#84-R-0059)机构)的批准。从Jackson Laboratory (ME, USA) 获得C576BL/6J和CBS敲除(KO)小鼠。仅人(H0)小鼠之前在实验室产生(Maclean et al., 2010b. Mol. Genet. Metab. 101, 153-162)。保持动物接受挤出的标准饮食2918(Harlan, CA, USA),无限制地获得食物和水。

[0224] 常规分析代表性幼仔的纯合性。使用用于下颌下出血的单次使用刺血针将血液收集到具有凝胶的Capject T-MLHG肝素锂(12.5IU)管(Terumo Medical Corporation, NJ, USA)中。然后将管以1200G离心10min,然后将血浆收集到1.5ml管并在-80°C下储存。

[0225] 基因型分型:常规分析代表性幼仔纯合性qPCR。由DNeasy血液和组织试剂盒(Qiagen, Hilden, 德国)产生尾部活组织检查物。通过NanoDrop 1000(Thermo Scientific, DE, USA)监测DNA质量。使用Applied Biosystem (CA, USA)的基因表达反应混合物(物品#4369016),将20ng DNA样品一式三份地进行单重(single-plex)运行。使用标准曲线法在Applied Biosystem的 7500Fast Instrument上进行扩增。使用Applied Biosystems的Tert(物品 #4458366)或Tfrc(物品#4458368)拷贝数参考测定作为纯合一拷贝校准物。使用Applied Biosystem的测定Mr00299300来检测Neo基因。

[0226] 将野生型Sprague Dawley大鼠饲养在笼中并保持在标准条件下,无限制地获得食物和水。

[0227] 野生型食蟹猴(Macaca fascicularis)被饲养在性别隔离的围栏中,无限制地获得食物和水。连续监测和控制12小时明/暗循环、温度和湿度。每日提供为自然听觉背景声音和视觉自然视频丰富度的形式的额外环境丰富度。在研究之前对所有猴子进行一般健康筛选。

[0228] I. 样品收集

[0229] 在注射PEG化形式的htCBS(如20NHS PEG-htCBS C15S)之后,使用设计用于下颌下采样的一次性刺血针在不同时间点将血液从意识清醒的研究动物的下颌下静脉收集到

具有凝胶的Capject T-MLHG肝素锂管(12.5IU) (Terumo Medical Corporation, NJ, USA) 中。以1200G离心10分钟后从血 液样品中收集血浆，并在-80°C下储存在1.5mL试管中。

[0230] J. 药代动力学

[0231] 使用非隔室曲线剥离模型计算药代动力学(PK)参数，该模型将曲线分 解成对应于酶在血液中的时间过程期间发生的吸收、分布和消除阶段的一 系列指数项。曲线剥离法假设药物的处置阶段遵循表观一级动力学，这被 半对数图的末端部分的线性证明。使用被称为PK Solutions 2.0 (Summit Solutions, Montrose, CO) 的建模程序，使用平均血浆酶活性对每种施用途 径进行这些计算。通过将SC或IP途径的曲线下面积(AUC)除以IV施用后观察到的AUC来计算生物利用度。

[0232] K. 制备用于NHS PEG化作图的样品

[0233] 用HPLC水 (ThermoFisher) 将每个样品(300μg) (包括未PEG化的CBS 对照) 稀释至 80μL。然后将样品与0.24M CAPS缓冲液 (Sigma) pH 11.5按 1:1 (v/v) 混合，并在37°C下孵育 22小时以除去PEG。将脱PEG化的样品 转移至Amicon Ultra 30K离心过滤器 (Millipore) ， 并加入320μL 8M胍HCl 溶液 (Sigma)。过滤器以13,000rpm旋转10分钟。该过程重复两次以 将样 品缓冲液交换成8M胍HCl并除去残留的游离PEG。

[0234] 将样品与1M Tris HCl (pH 7.5) 合并至最终浓度为100mM Tris。将样品 用10mM DTT (Sigma) 在56°C下还原45分钟并冷却。加入碘乙酰胺至最 终浓度为30mM，并将样品在室温下暗处孵育1小时。然后用50mM Tris (pH 7.5) 溶液稀释样品以达到1M的胍浓度。使用还原/烷基化的样品进行 Asp-N内肽酶消化。

[0235] 向100μg还原和烷基化的样品中加入2μg Asp-N(酶:蛋白质比例=1:50 (w:w))。 在37°C过夜进行消化。

[0236] L. 制备用于组织病理学分析的样品

[0237] 在第17-19天处死PBS注射的或PEG化的htCBS缀合物(如20NHS PEG-htCBS C15S) 处理的KO小鼠，并处理肝脏样品用于通过光学显微镜术 进行组织学分析。组织学评估以设盲模式进行。取出肝脏并用4%多聚甲醛 的PBS (pH 7.4) 溶液固定24小时。修整用于组织学的组织块，用乙醇系列 脱水，然后用丙酮、丙酮-二甲苯混合物和二甲苯脱水，然后包埋在石蜡中。平行地，用多聚甲醛固定的小的组织块(约4mm x 2mm) 在用干冰冷却的石 油醚中快速冷冻，并储存于-50°C用于检测非极性脂质。将4μm厚的石蜡 切片在二甲苯中脱石蜡并且在异丙醇步骤之后用乙醇(96%、70%、60%) 再 水化。组织切片用苏木精和伊红(H&E) 染色以评价组织病理学变化。进行 Masson三色染色以检测纤维化。使用Oil Red O染色检测在10μm厚并用Leica Cryomicrotome (CM 1850) 切割的固定冷冻切片中的非极性脂质，来验证脂肪变性。观察这些切片并用配备有Olympus数码相机 (DP70) 的Nikon 光学显微镜 (E800) 拍照。

[0238] 对于电子显微镜术，通过将其切割成1-2mm厚的薄片并在固定后浸没 到3%戊二醛中，对每个肝脏的三分之一进行处理，用于电子显微镜术。随 后将样品包埋到Epon-Araldite混合物中，双重染色，并使用JEOL 1200电 子显微镜在3000x放大倍数下检查。

[0239] M. 双能量X射线吸收测定法(DEXA)

[0240] 使用专门设计用于扫描小动物如小鼠的PIXImus II DEXA扫描仪 (GE Lunar Medical Systems) 进行DEXA分析。该机器能够在最终组织提取程序 之前快速且高效地测

定小鼠的身体组成(瘦体重、脂肪量和骨密度)。在 DEXA测量之前使小鼠禁食4小时以除去胃肠道的食物。然后使用IP推注 60mg/kg氯胺酮和15mg/kg甲苯噻嗪麻醉小鼠，并将其置于DEXA机器中的托盘上。测量完成后(3~5分钟)，将小鼠从DEXA机器中取出并用于最终程序，如组织提取。

[0241] N. 制备用于通过显微镜术观察的眼部样品

[0242] 用在1x PBS pH 7.4中的4%多聚甲醛(4%PFA)对小鼠进行灌注固定以保存眼球壁。小心地手术摘除眼睛，浸没在4%PFA中，并在视神经正下方的眼球后部小心地形成小孔，以允许固定剂渗透到眼睛内部并在4°C下固定该结构过夜。使用滤过的1x PBS pH 7.4将样品洗涤3次。清洗后，小心地将眼球后部切开到睫状上皮的水平以暴露睫状小带。将样品置于8% BSA封闭溶液中振荡2小时。封闭后，将在4%BSA中以1:50稀释的MAGP1 抗体(Sigma)加入到样品中并在4°C下储存过夜。第二天，使用1x PBS pH 7.4 将样品洗涤6次，并将Alexa 488二抗(1:200, Invitrogen)加入到样品中，并在室温下振荡孵育2小时。将样品洗涤6次并用甲基绿(核染色)复染15 分钟。

[0243] 将含有4%琼脂糖的溶液加热，倒入到盖玻片玻璃皮氏培养皿中，并在室温下固化。固化的凝胶用作眼睛的成像室。在凝胶中形成小孔以作为眼睛的保护室。为了观察睫状小带，用1x PBS填充室，并将染色的眼部样品 放置在孔中，使透镜的后表面接触凝胶床。使用倒置LSM 510共聚焦显微 镜在10x放大倍数和0.7x变焦下生成三维图像。

[0244] 实施例2.htCBS保留时间

[0245] A. 未修饰的htCBS表现出在循环中的保留时间短

[0246] 施用于循环的药理学活性物质的药代动力学性质受到ADME天然机制 的影响极大。注射分子的快速清除可能极大地影响治疗功效，因此需要更长的循环半衰期，这可以转化成较小的施用频率或较小的剂量，这又使副作用最小化。为了测定血浆循环中htCBS的药代动力学，经由皮下(SC)、静脉内(IV)或腹膜内(IP)途径向C57BL/6J小鼠注射5mg/kg的单剂量。经由 IV或IP途径施用htCBS在注射后前4小时期间表现出最高的比活性值(观察到的峰值血浆水平分别高达123和76mU/μL；表2显示曲线下面积(AUC) 值)。由血浆样品计算的药代动力学参数(表2)显示htCBS的半衰期为2.7 小时，表明在大约6个半衰期(少于20小时)后，htCBS水平应该是检测不到的。

[0247] 对于SC途径，htCBS的生物利用度为50%，表明SC递送可能是这种治疗方法的临床选择。SC和IP的较慢的表观半衰期(表2)可以通过在消除阶段期间发生缓慢吸收阶段从而延长平均停留时间和表观半衰期来解释，然而，为了本发明目的，更长的半衰期是期望的，因此测试了htCBS的PEG 化衍生物。

[0248] 表2.药代动力学参数

[0249]	药代动力学参数	单位	IP	SC	IV
	给药量	Mg/Kg	5	5	5
	AUC (0-t) (观察面积)	mU·hr/μL	932.4	500.9	1011
	生物利用度	%	92%	50%	-
	E半衰期	hr	4.3	6.1	2.7
	C _{max} (观察)	Mu/μL	75.9	34.5	-
	MRT (面积)	hr	7.9	9.5	4.9

[0250] 体内htCBS活性的快速下降可能归因于促进了从循环清除，并且也可能归因于一旦被引入到循环中的环境中htCBS的酶活性丧失。为了测试后者，将htCBS在37°C下在野生型或H0小鼠的小鼠血浆中体外孵育达96 小时，每24小时测量一次活性。如图1A所示，在任一小鼠模型的血浆中，达72小时的孵育没有记录到显著的活性丧失。孵育96小时后记录到25% 的中等的活性丧失。此外，如图1B所示，来自SC注射动物的血浆的蛋白 质印迹(WB) 分析显示htCBS的量随着时间而减少，因此，清除导致了循环 中htCBS活性的快速丧失，而不是血浆中的活性丧失。

[0251] B.htCBS的PEG化增强了体内血浆半衰期

[0252] 为了测定PEG分子对药代动力学CBS的影响，用低分子量(2kDa)线 性PEG和高分子量(40kDa)四臂分支PEG(分别命名为ME020MA和 GL4-400MA)对htCBS进行PEG化。如表3所示，PEG化不影响酶的比活 性。表3显示了PEG化和未PEG化的htCBS的考马斯染色的SDS-PAGE 结果及相应的比活性值，表明PEG化不影响酶的活性。如A(n=4-5) 中所述 对小鼠SC 注射ME200MA-或GL4-400MA-PEG化的htCBS，与未PEG化 的htCBS进行比较。

[0253] 表3.活性

[0254]

测试的htCBS	比活性
Non-PEG CBS	1193
ME-200MA CBS	1184
GL4-400MA CBS	1075

[0255] 经由SC和IV途径向C57BL/6J小鼠施用剂量为5mg/kg体重 (BW) 的 PEG化的htCBS (PEGhtCBS)，并在不同的时间点监测CBS活性。每种注 射途径使用两个实验组(每组n=5)。注射后在0、1、8和24小时时从第1 组以及在1、4、10和48小时时从第2组收集血液。

[0256] 如针对GL4-400MA PEGhtCBS的图1B(下面的图)所示，与未PEG化 的对应物相比，PEG化的蛋白质在血浆中的活性显著延长。如表4所示，采用ME020MA和GL4-400MA PEG化，半衰期从未PEG化的htCBS的2.7 小时分别增加到16.7和30.4小时。

[0257] 表4.药代动力学建模结果

[0258]

药代动力学建模结果		用 ME020MA PEG 化 的 htCBS		用 GL400MA PEG 化 的 htCBS	
参数	单位	SC	IV	SC	IV
给药量	Mg/Kg	5	5	5	5
AUC(0-t) (观察面积)	Mu·hr/µL	1637.0	3193.2	2286.3	2836.5
生物利用度	%	51.2%	-	80.6%	-
E半衰期	hr	15.1	16.7	20.1	30.4
c _{max} (观察)	Mu/µL	54.6	-	64.9	-
MRT (面积)	hr	27.0	25.7	37.0	43.1

[0259] 这意味着对于PEG化形式，单次给药后暴露时间将是5到10倍。另 外，SC施用后生

物利用度的范围为50至80%，表明SC途径对于临床研究是合理的。

[0260] 实施例3.施用htCBS和高半胱氨酸、胱硫醚和半胱氨酸的血清水平

[0261] htCBS用于CBSDH的最终目标是降低毒性tHcy负荷,提高胱硫醚和半胱氨酸水平。预期这些变化可以预防、逆转或延迟CBSDH症状的发作。然而,长期以来高胱氨酸尿症研究一直由于缺少合适的动物模型而受到阻碍。完全敲除小鼠基因的小鼠在出生后2-3周内死亡。H0(仅人)小鼠与其他基因敲除小鼠不同,除了小鼠基因被敲除之外,它们表达低水平的人基因,这允许其存活至成年期(Maclean et al., 2010b. Mol. Genet. Metab. 101, 153-162)。H0小鼠表现出Hcy、甲硫氨酸、S-腺苷甲硫氨酸和S-腺苷高半胱氨酸的严重升高,并伴随着半胱氨酸的血浆和肝脏水平降低。因此,这些小鼠表现出如下特性:在几个方面,当其发生于人体时重复该疾病。

[0262] A.htCBS施用不改善tHcy和胱硫醚浓度

[0263] 在第1周和第3周(治疗组之间10天)连续5天以5mg/kg施用未PEG化的htCBS的H0小鼠证明血清高半胱氨酸水平没有变化。图2显示H0小鼠的平均高半胱氨酸和胱硫醚水平。未PEG化的htCBS缺少这种代谢调节进一步证实了通过共价连接聚乙二醇分子来修饰htCBS的必要性。

[0264] 如国际公开号W02014120770(其内容通过引用的方式以其整体并入本文)中所述测试了几种不同的PEG化学物质(参见表5),数据表明用低于20kDa PEG进行PEG化的CBS显示出的血浆中活性丧失比用更高分子量PEG的CBS更快速。因此,选择被称为ME200MAOB的线性20kDa PEG用于进一步分析。图3呈现考马斯染色的SDS-PAGE,其显示采用ME200MAOB进行htCBS PEG化的时间过程。通过加入PEG引发PEG化反应,并且在指定的时间点从管中取出样品以进行分析。

[0265] 表5.PEG化学物质评价

[0266]

PEG分子	结构	靶向基团	大小(kDa)
ME020MA	线性	-SH	2
ME050GS	线性	-NH ₂ , -OH, -SH	5
ME200GS	线性	-NH ₂ , -OH, -SH	20
ME200MAOB	线性	-SH	20
ME400MA	线性	-SH	40
GL2400MA	2臂	-SH	40
GL4400MA	4臂	-SH	40
GL2800MA	4臂	-SH	80

[0267] B.重复PEGhtCBS施用改善了tHcy和胱硫醚浓度并恢复了正常的半胱氨酸水平

[0268] 使用H0小鼠监测PEGhtCBS施用的长期作用。以7.5mg/kg的剂量将PEGhtCBS酶施用于8只H0小鼠,头两周每周两次(星期一和星期四),然后每周三次(星期一、星期三和星期五)持续6周。在注射后24小时(星期二)和72小时(星期一)收集血液样品(图4A-4C)。图4A显示血浆tHcy从时间0时的212μM减少至注射后24小时平均值在62-103μM范围内,并且在最后的每周注射后72小时在141-189μM的范围内。从第28天开始,注射后72小时的值显著低于时间0时的值($P \leq 0.02$)。胱硫醚和半胱氨酸水平也受到积极影响。胱硫醚从6μM增加至高达30μM,注射后24小时半胱氨酸持续高于200μM(图4C)。有趣的是,从第24天开始,

与治疗的前三周相比,胱硫醚浓度的波动明显小得多。除分析血浆代谢物水平外,还分析来自注射小鼠的肝脏、肾脏和脑组织样品,以测定非蛋白质结合的高半胱氨酸(游离形式和二硫键连接形式)的水平。如图4D所示,在长期注射动物中,展示出肝脏、肾脏和脑组织分别减少了44%、63%和47%。因此,长期重复注射PEGhtCBS显著影响高半胱氨酸、胱硫醚和半胱氨酸的血浆水平。

[0269] 实施例4.htCBS突变体(C15S)显示出优先的聚集和PEG化图谱

[0270] A.C15S突变的htCBS显示无聚集和统一的PEG化图谱

[0271] 尽管以前报道了与全长蛋白质相比,htCBS酶不易聚集(Frank et al., 2006, Biochemistry 45:11021-11029),它仍然形成四聚体和更高的聚集体。这可能刺激免疫防御机制并导致例如淀粉样沉积(D'Souza et al., 2014, "Amyloid:the international journal of experimental and clinical investigation. The official journal of the International Society of Amyloidosis"21:71-75),也影响纯化、处理和同一性。图5A(以前作为W02014120770的图5A公开,其内容通过引用的方式以其整体并入本文)描绘了考马斯染色的天然PAGE,显示不同批次的htCBS显示不同的二聚体/四聚体比例,具有不同程度的更高聚集体。图5B(以前作为W02014120770的图5B公开,其内容通过引用的方式以其整体并入本文)是凝胶内活性测定,表明这些聚集体显示CBS活性。图5C(以前作为W02014120770的图5C公开,其内容通过引用的方式以其整体并入本文)显示聚集导致不一致的PEG化产物。PEG化得到两个不同的条带,可能反映了不同程度的PEG化,因为聚集可能起到掩盖可用PEG化位点的作用。因此,由于批次28的更明显的聚集(图5A),其PEG化在SDS-PAGE上产生更明显的下方带,即较少的PEG化(图5C),而包含四聚体和二聚体的批次112的PEG化(图5A)与批次28相比产生更明显的上方带(图5C)。图5D显示考马斯染色的天然凝胶,表明与还原剂三(2-羧基乙基)磷化氢(TCEP)一起孵育的这两个酶批次将许多四聚体和更高聚集体转化为二聚体形式。这些数据提示,聚集是由htCBS表面上暴露的半胱氨酸驱动的。因此,认为TCEP处理也导致更广泛的PEG化,因为从更高分子量形式产生更多的二聚体,导致在htCBS的表面上暴露出另外的PEG化位点。确实,如图5E所示,与不存在TCEP的PEG化相比,TCEP处理后,在考马斯染色的SDS-PAGE上的上方/下方PEG化带之间的比例显著向上方带移动。因此,认为htCBS聚集至少部分地由分子内二硫桥的形成驱动。因此,C15突变为丝氨酸,产生C15S htCBS突变体;之前表明C15是CBS表面上最具反应性的半胱氨酸(Frank et al., 2006, Biochemistry 45:11021-11029)。图5F(以前作为W02014120770的图6A公开,其内容通过引用的方式以其整体并入本文)描述了考马斯染色的天然凝胶,其中观察到htCBS有两个主要带(二聚体和四聚体),而C15S htCBS突变体显示出单带,其如预期的那样不受用TCEP处理影响。通过HPLC尺寸排阻色谱法(HPLC-SEC)进一步证实了这一观察结果。在Yarra SEC-3000(300*7.8mm)尺寸排阻柱(Phenomenex, CA, USA)上分离CBS制备物。该柱在室温下以1ml/min的流速在100mM磷酸钠pH=6.8中校准和运行。HPLC-SEC分析,图5G(以前作为W02014120770的图7A和图7B的一部分公开,其内容通过引用的方式以其整体并入本文)显示了htCBS C15S(图5G,左图)和htCBS的二聚体/四聚体比率(图5G,右图)的差异。二聚体的C15S htCBS突变体的单峰在8.62min洗脱,而在7.9min洗出htCBS的主峰,对应于四聚体。图5H显示考马斯染色的SDS-PAGE凝胶,显示不同批次之间的htCBS C15S PEG化的再现性以及与htCBS的比较。在C15S htCBS中不存在聚集

体导 致不同批次之间更加一致的PEG化图谱,几乎只有一个PEG化带出现在 SDS-PAGE上。在体内和体外PEGhtCBS和PEGC15S之间的直接比较表明 性能没有差异。

[0272] 在注射后1、4和24小时也测试了PEGC15S对代谢物的作用(图6A- 图6C)。测量用7.5mg/kg PEGC15S或PBS(n=5)注射的K0小鼠在注射后 1、4和24小时的tHcy(图6A)、胱硫醚(图6B)和半胱氨酸(图6C)水平。数据表示为平均值±SEM,并且使用不配对的Student's t检验在两组之间比 较每个时间点.*p=0.05,**p≤0.01和***p≤0.001。仅在注射后24小时观 察到对tHcy和半胱氨酸的作用(图6A和图6C),然而在注射后1小时和4 小时已经观察到胱硫醚的显著增加(图6B)。

[0273] 实施例5.PEGC15S和甜菜碱在体内协同起作用

[0274] 为了评价甜菜碱和联合疗法的作用,进行了甜菜碱、PEGC15S和甜菜 碱+PEGC15S组合的治疗,并比较了转硫途径的代谢物。

[0275] 在实验的18天时间内,用在饮用水中的2%甜菜碱来治疗甜菜碱和甜 菜碱+PEGC15S组,后一组在第14和15天时用7.5mg/kg PEGC15S注射。PEGC15S单一治疗组保持接受常规水并且也在第14和15天注射。如图7A 所示,甜菜碱治疗14天导致甜菜碱治疗组的tHcy降低29%和32%。甜菜 碱单一治疗组保持这些tHcy水平至第18天。在甜菜碱的背景下注射 PEGC15S导致在第15、16、17和18天分别为74%、77%、76% 和40%的 更为明显的减少。单独用PEGC15S治疗导致在第15、16、17和18天分别 减少69%、67%、52% 和33%。根据这些数据,在有或无甜菜碱治疗的情 况下注射PEGC15S远优于单独的甜菜碱治疗。另外,甜菜碱+PEGC15S的 组合优于单独用PEGC15S治疗。如图7B所示,这两组之间的差异在第二 次注射后48小时(在第17天)变为统计学显著的。因此,PEGC15S与甜菜 碱的组合允许保持较 低的tHcy水平更长的时间。

[0276] 在实验的18天时间内,甜菜碱单独治疗没有导致胱硫醚的增加。相比 之下,对用 PEGC15S(伴随或不伴随甜菜碱)治疗的两个组观察到增加。有趣的是,PEGC15S与甜菜碱的组合导致增加,该增加在第16天开始并持 续,并且显著低于接受PEGC15S单一疗法的组。这是由于以下事实造成的: 单独用PEGC15S治疗引起高半胱氨酸与丝氨酸缩合形成胱硫醚。与甜菜碱 联合引起一些可用的高半胱氨酸通过重甲基化途径产生甲硫氨酸,因此对 于PEGC15S较少的高半胱氨酸可以用于被转化成胱硫醚。

[0277] 实施例6.PEGC15S挽救K0小鼠免于早期死亡并改善肝脏疾病

[0278] A.减少早期死亡

[0279] 大多数完全CBS敲除小鼠 (K0) 在出生后2-3周内死亡。绘制每周两次 用PEGC15S注射的K0小鼠相对于注射PBS的小鼠的Kaplan Meyer存活 曲线。使小鼠保持接受甜菜碱水直至第21天,测试注射的酶挽救K0幼仔 的能力。用PEGC15S或PBS每周两次注射K0幼仔。所有小鼠接受在饮 用水中的甜菜碱直到第21天(断奶日)。如图8A所示,在第21天,在注射 PBS组中只有18%的小鼠存活,与此相对的,用酶注射的小鼠有93%存活。注射PBS的动物均未存活到第24天,而注射酶组则记录86%的存活率。从第24天开始,注射酶的动物的数量也 开始下降,第29天的存活率为45%, 第35天的存活率为33%,但是观察到使用不同的PEG分子和给药方案对 这些结果的影响很大,如下面的其他实施例中所示(例如图11A和11C)。

[0280] B.肝脏疾病

[0281] 以前证明了K0小鼠遭受严重的肝损伤(Maclean et al., 2010a, Mol.

Genet. Metab 101, 163-171; Watanabe et al., 1995, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. A. 92: 1585-1589)。KO小鼠的延长存活率可能因此与CBS治疗后肝病的改善相关。因此,进行了用PEGC15S注射35天的动物的肝脏切片的组织学分析。在第36天处死动物并通过光学显微镜术处理肝脏样品用于组织学分析。注射PBS的动物不能存活至第35天,但是在死亡后立即从两只动物取得肝脏样品并进行处理。实验以设盲方式进行。取出肝脏并用含4%多聚甲醛的PBS (pH 7.4) 溶液固定24小时。修整用于组织学的组织块,先用乙醇系列、然后用丙酮、丙酮-二甲苯混合物和二甲苯脱水,然后包埋在石蜡中。平行地,用多聚甲醛固定的小组织块(约4mm x 2mm)在用干冰冷却的石油醚中快速冷冻,并储存在-50°C用于检测非极性脂质。将4μm厚的石蜡切片在二甲苯中脱石蜡,并且在异丙醇步骤之后用乙醇(96%、70%、60%)再水化。组织切片用苏木精和伊红(H&E)染色以评价组织病理学变化。进行Masson三色染色用于检测纤维化。使用Oil Red O染色以检测在10μm厚并用Leica Cryomicrotome (CM 1850) 切割的固定冷冻切片中的非极性脂质,来验证脂肪变性。观察这些切片并用配备有Olympus数码相机(DP70) 的Nikon光学显微镜(E800)拍照。

[0282] 图8B显示在第35天处死的两只注射PEGC15S的KO小鼠的肝脏组织学与第17天和第24天死亡的两只注射PBS的KO动物的肝脏组织学(苏木精和伊红染色)。肝实质的低倍视图(图8B,左栏)显示了在注射PEGC15S的KO-1和KO-2中具有稍微不规则的肝细胞平板的中度变化以及轻度至中度脂肪变性,与注射PBS的KO中肝细胞的大面积带状坏死(图8B,KO-3,用箭头标记)和具有多发性分散性坏死的弥散性脂肪变性(图8B,KO-4,用箭头标记坏死)形成对比。插图中显示对肝细胞细胞质中非极性脂质的特异性染色。更高倍视图(右栏)表明在注射PEGC15S的KO中存在频繁的有丝分裂(用箭头标记并在插图中详细显示)和具有明显核仁的扩大的多形核。注射PBS的KO的肝实质的更高倍视图证明融合的肝细胞坏死及稀疏的炎性浸润(图8B,KO-3,用箭头标记)或伴有明显的再吸收性炎性反应的多发性分散性坏死(图8B,KO-4,用箭头标记)。在注射PBS的KO中剩余的肝实质显示出小泡性和大泡性脂肪变性。(PT=门静脉管道,CV=中央静脉)。

[0283] 注射PBS的动物出现严重肝病,其特征在于明显的小泡性到大泡性脂肪变性和显著的肝细胞死亡,具有极小的纤维化或无纤维化。在一只动物中发现遍及整个肝小叶分散的肝细胞的多发性单或寡细胞坏死,伴有明显的炎性再吸收反应,而在另一只动物中主要是显示以下特征:主要在门静脉区域中出现肝细胞的大面积融合性坏死,及稀疏的炎性浸润。两只动物的肝实质再生的迹象都很小。两只注射PEGC15S的动物显示出肝脏中的中度变化,具有实质损伤的微小迹象,但具有明显的再生,并且被检查者正确地识别是接受治疗。最显著的特征是指示肝实质再生的变化(肝小叶的结构略微不规则,肝细胞的嗜碱性细胞质,频繁的有丝分裂和具双核的肝细胞,具有明显核仁的核多形性和扩大)。整体形态与肝细胞的增殖、转录和翻译增加一致。此外,检测到罕见的肝细胞局灶性坏死和小泡类型的轻度脂肪变性,并且纤维化极小。

[0284] 实施例7.20NHS PEG-htCBS C15S的生物化学表征

[0285] 在研究体内施用分子的作用之前测定20NHS PEG-htCBS C15S的生物化学特性。

[0286] A.N-末端测序和完整质量分析

[0287] 使用N末端测序分析五批未修饰的htCBS C15S。对于所有批次获得的序列都是相同的,并且与参考序列相比,它们都缺少最初的甲硫氨酸残基。观察到htCBS C15S的N末端

是PSETP,而不是如在野生型CBS序列中发现的MPSETP。

[0288] 由htCBS C15S的解卷积质谱确定的完整质量通过在5个批次中鉴定仅一个在45290Da的主要峰证实了N末端测序的结果。该值与没有N-末端 甲硫氨酸的htCBS C15S单体的分子量(理论分子量:45289.7Da)相匹配。

[0289] 通过软件Geneious 9.1.5(免费版),使用Geneious比对类型“具有端基 空位的全局比对”和Cost Matrix Blosum62比较人、大鼠、猴子和小鼠的htCBS C15S的蛋白质序列,来进一步进行序列比对。结果证实20NHS PEG-htCBS C15S的N末端是PSETP而不是如在人、猴子、大鼠和小鼠的 野生型截短的CBS序列中发现的MPSETP。观察到htCBS C15S与截短的猴CBS具有96%的序列同一性,包括1个空位(在起始密码子处)。在本文 使用的htCBS C15S和基于UniProtKB/Swiss-Prot:Q58H57的截短的猴CBS 中观察到序列之间的以下差异:氨基酸位置(基于序列的比对)18R→L(本文使用的htCBS C15S→截短的猴序列),位置25K→Q,位置32S→L,位 置34E→G,位置69A→V,位置71A→E,位置90V→I,位置133D→A, 位置157A→T,位置242Q→R,位置354V→M和位置403T→V。

[0290] 观察到htCBS C15S与截短的大鼠CBS具有84%的序列同一性,包括 5个空位(在大鼠序列中)。从本文使用的htCBS C15S和基于 UniProtKB/Swiss-Prot:P32232的截短的大鼠CBS观察到序列之间的以下 差异:氨基酸位置(基于序列的比对)4E→G(本文使用的 htCBS C15S→截 短的大鼠序列),位置6P→S,位置8A→C,位置10V→D,位置12P→S, 位置13T→A,位置15S→C,位置17-24HRSGPHSA→QDLEVQPE,位置 26S→Q,位置32-34SPE→ASG,位置38-42AKEPL→R---V,位置45R→S, 位置48A→T,位置60-62ASE→MAD,位置66H→Y,位置69A→V,位 置71A→T,位置82K→R,位置86D→N,位置94K→R,位置96G→S, 位置98-99KF →NA,位置133D→A,位置161R→K,位置175S→M,位 置235T→D,位置238D→E,位置248L→V,位置255V→A,位置276 R→K,位置300T→A,位置318T→A,位置322K→R,位置329-331 EEA→DDS,位置333T→A,位置340和350A→S,位置353-354TV→AM, 位置365Q→K,位置383T →S,位置389R→K,位置397L→M,位置401 D→-,位置403-404TE→SV,和位置406K→R。

[0291] 观察到htCBS C15S与截短的大鼠CBS具有84%的序列同一性,包括 5个空位(在小鼠序列中)。从本文使用的htCBS C15S和基于 UniProtKB/Swiss-Prot:Q91W9的截短的小鼠CBS观察到序列之间的以下 差异:氨基酸位置(基于序列的比对)4E→G(本文使用的htCBS C15S→截 短的小鼠序列),位置6P→S,位置8A→C,位置10V→D,位置12-13 PT→SA,位置 15-21SPHRSGP→GFQHLD,位置24A→E,位置26-27 GS→RQ,位置32-34SPE→PSG,位置37-42EAKPL→DR---V,位置48 A→T,位置59-62PASE→AMAD,位置66H→Y,位置69-71APA→VLT, 位置82K→R,位置86D→N,位置96G→S,位置98-99KF→NA,位置 133D→A,位置161R→K,位置175S→M,位置235T→D,位置238D→E, 位置255V→A,位置276R→K,位置300T→A,位置318T→A,位置330-331 EA→DS,位置333T→A,位置350A→S,位置353-354TV→AM,位置 383T→S,位置389R→K,位置397L→M,位置401D→-,位置403-404 TE→SV,位置406K→R,和位置411H→R。

[0292] 以上结果显示,与本文实施例中使用的用20NHS PEG-htCBS C15S PEG化的htCBS C15S相比而言,大鼠和小鼠序列具有许多相同的差异。截短的猴序列与20NHS PEG-htCBS C15S的序列具有最大的相似性。

[0293] B.PEGC15S的NHS酯PEG化作图

[0294] 对三个批次的20NHS PEG-htCBS C15S的PEG化位点作图:RC-6-67A (6.3mg/ml)、RC-6-67B (6.7mg/ml) 和RC-8-14 (3.8mg/ml)。将样品在碱中 去PEG化,还原并烷基化,用Asp-N内肽酶消化并通过LC/UV/MS分析。

[0295] 在以下条件下进行反向色谱法:进样量为33 μ g,流动相A为0.1% TFA (ThermoFisher) 的水溶液,流动相B为0.1%TFA (ThermoFisher) 的乙腈 (Burdick and Jackson) 溶液,使用XBridge BEH130 C18 3.5 μ m,4.6x150mm 柱(Waters),柱温为60°C。表6显示了高效液相色谱法(HPLC)的梯度。

[0296] 表6.HPLC梯度

[0297]

时间 (min)	溶剂B%	流速 (mL/min)
0	3	0.5
6	3	0.5
51	25	0.5
87	34	0.5
98	45	0.5
99	98	0.5
104	98	0.5
105	3	0.5
120	3	0.5

[0298] 使用安捷伦校准调谐混合物,在LC/UV/MS之前,将ESI-QTOF质谱 仪(Agilent,型号6538) 设置为高分辨率4GHz和正离子模式,MS扫描范围 为330至3200m/z。电压设置如下:碰撞电压-250V,锥孔电压-65V和八 极RF电压750V。气体温度为350°C。在可以进行测试之前,将所有质量 都校准到±1ppm以内。还通过参考标准品的连续输注,贯穿所有 LC/MS/MS 实验中,采用动态质量轴校准。使用锁定质量离子:922.009798。

[0299] 平行地处理未PEG化的htCBS C15S蛋白质作为对照。对于四个样品 中的每一个,观察到肽图谱覆盖了97.8%的氨基酸序列,包括所有30个赖 氨酸残基。对于这三个批次,基于1-2个PEG接头的质量添加,12个肽被 鉴定为已被PEG化,并且估计PEG化程度在4.5至 5.5PEGs/CBS亚基的 范围内。

[0300] 首先在通过LC/MS/MS在PEG化的htCBS C15S的PEG化位点占据分 析中优化的条件 (pH 11.5,37°C,22小时) 下,使样品脱PEG化。脱PEG 化之后,以前的PEG化位点留下具有式 C₅H₆O₃ (单同位素分子量为 114.0317Da) 的接头,其可通过肽作图鉴定。如上所述将脱PEG化的样品 还原、烷基化、用Asp-N内肽酶消化,并通过LC/UV/MS分析。

[0301] 使用以下算式估计PEG化的程度:每个肽的PEG数量 = (丰度(1*接头) +2x丰度(2*接头)) / (丰度(无接头)+丰度(1*接头)+丰度(2*接头))。表7 提供了LC/UV/MS的结果。

[0302] 表7.通过估计的PEG/肽测量的三个样品中的PEG化程度

	估计的 PEG/肽		
肽	RC-6-67A	RC-6-67B	RC-8-14
[0303]	2-34	1.06	1.24
	9-34	0.84	0.98
	35-46	0.17	0.18
	47-78	0.26	0.31
	79-85	0.02	0.03
	86-106	0.54	0.61
	198-220	0.02	0.03
[0304]	245-248	0.39	0.48
	270-301	0.27	0.29
	321-327	0.21	0.21
	388-400	0.04	0.05
	401-413	0.59	0.71

[0305] 在所有三个20NHS PEG-htCBS C15S批次中, 赖氨酸25、30、211、247、271和405-406被明确鉴定为在一定程度上被PEG化。赖氨酸72和 75; 82和83; 94、97-98和102; 322和325; 和394和398中的任一组在 相同的肽内, 并且本文的分析不能确定哪个赖氨酸被PEG化至何种程度。

[0306] 还观察到对Asp-N内肽酶(Asp和Glu的N-末端)不具特异性的一些肽 切割, 例如 107A-K 119和333A-K 348, 其可能归因于在脱PEG化过程中 蛋白质的碱性水解。对于某些肽观察到显著百分比的脱酰胺, 这可能也归 因于用于脱PEG化反应的碱性条件。

[0307] 实施例8. 马来酰亚胺PEG化的生物化学表征

[0308] 进行SDS-PAGE和天然PAGE凝胶来比较与ME-400MA和ME-200GS 缀合的htCBS的PEG化模式的重现性。当使用ME-400MA的马来酰亚胺 PEG分子时, 结果显示离散的PEG-CBS物质之间的比例可变并且显示不完 全的PEG化。NHS酯PEG ME-200GS的可变PEG化程度在SDS-PAGE(图 9A) 和天然PAGE凝胶(图9B) 上产生了不可分离的PEG化物质的高分子量 “糊化”。

[0309] 与用ME-200GS PEG化htCBS C15S不同, 观察到用ME-400MA PEG 化htCBS C15S在天然PAGE上分离时产生三种轮廓分明的物质(图9B)。用 ME-200GS PEG化的htCBS C15S中, 观察到最重的物质与第二物质共洗脱。最重的物质的确切身份还未被确定, 因为与其他物质相比较这种物质的量 相对较少并且没有分离使其无法进行详细的药效学(PD) 表征。第二物质被 鉴定为携带1个与天然二聚体中的每个亚基连接的PEG, 也被称为均一 PEG化(homoPEGylated) 物质。已经观察到最轻的PEG化物质每个二聚体 仅携带1个PEG, 也被称为异质PEG化(heteroPEGylated) 或半PEG化物质。

[0310] A.PEGC15S的马来酰亚胺PEG化作图

[0311] 肽作图的第一个步骤是描绘用ME-400MAPEG化的htCBS C15S的两个样品:RC-6-13POOL1和RC-6-13POOL2中的每个含有半胱氨酸的肽。RC-6-13POOL1 (BSL样品#1127) 代表均一PEG化的物质(最可能在相同的 残基上PEG化)。RC-6-13POOL2 (BSL样品#1128) 代表半PEG化的物质, 因此在SDS-PAGE上观察到大约相等比例的PEG化的带和未修饰的带。这个实施例确定了当最易接近的半胱氨酸(C15)被丝氨酸置换时ME-400MA 的连接位置。

[0312] 对参考蛋白质(UnPEG RC-6-09DIAFILTRATE) 和同时对两种PEG化的 蛋白质(RC-6-13POOL1/RC-6-13POOL2) 进行Lys-C消化。从还原/烷基化的LC/MS肽图谱鉴定了8个含半胱氨酸的肽。如下表8所示, 在所有三种 样品中7个含半胱氨酸的肽产生相似的相对丰度, 表明这7个半胱氨酸肽 不可能已被PEG化。

[0313] 在两种PEG化的样品中的每一种中均观察到仅一个含半胱氨酸的肽具有显著降低的相对丰度。表8提供了每个样品中未PEG化的肽的相对丰度。

[0314] 表8.未PEG化的含cys的Lys-C肽的相对丰度

[0315]

肽	参考蛋白质相对丰度	1127相对丰度	1128相对丰度
40-72	0.40	0.36	0.40
103-108	0.05	0.04	0.04
109-119	0.07	0.06	0.07
120-172	0.15	0.13	0.14
212-247	0.21	0.20	0.21
272-322	0.25	0.08	0.17
326-359	0.14	0.12	0.13
360-384	0.12	0.11	0.12

[0316] 观察到肽272-322含有两个半胱氨酸残基。在位于Lys-C肽272-322 上的Cys272 和/或Cys275处观察到PEG化的残基。为了进一步区分Cys272 和/或Cys275是否被PEG化, 将两个残基分离到不同的肽上, 用试剂2-硝 基-5-硫代氰基苯甲酸 (NTCB) 处理参考物 (UnPEG RC-6-09DIAFILTRATE) 和两种PEG化的蛋白质 (RC-6-13POOL1/RC-6-13POOL2)。由于NTCB切割N端形成游离半胱氨酸残基, PEG化的半胱氨酸不形成氰基化终产物和 因此阻断切割。

[0317] 从NTCB处理的C8 LC-MS肽图谱中鉴定了七个含半胱氨酸的肽。由 于与酶消化相比化学消化效率相对较低, 色谱图中的目标肽峰较小, 并且 还观察到副反应(结果未显示)。使用手动离子搜索来定位和定量半胱氨酸相 关肽峰。与参考蛋白质相比, 在RC-6-13POOL1样品中仅一个含半胱氨酸 的肽显示出显著降低。鉴定为残基244-271的肽表示位点272被阻断, 从 而降低了244-271肽的产量。对于RC-6-13-POOL2样品, 两个含半胱氨酸的肽显示出相对丰度的降低;但是, 这两者之间的比例是接近的。可能这 两个半胱氨酸都参与PEG化, 或者峰丰度太低而不能得出确凿的结论。表 9中的结果提供了证据证明PEG化残基在Cys272上,但是并没有完全排除 Cys275为PEG化的位置。

[0318] 表9.Cys272和Cys275的PEG化比较

	参考蛋白质			1127 RC-6-13 POOL1			1128 RC-6-13 POOL2		
	肽(氨基酸残基)	Δ 质量 ppm	相对丰度	Δ 质量 ppm	相对丰度	参考物与样品的比例	Δ 质量 ppm	相对丰度	参考物与样品的比例
[0319]	52-102	-1.25	0.006	-1.92	0.0054	1.2	1.45	0.0054	1.2
	103-108	-0.57	0.002	-1.86	0.0014	1.6	-3.00	0.0024	1.0
	244-271	1.28	0.003	-0.90	0.0011	2.7	1.73	0.0021	1.4
	275-345	0.76	0.001	0.64	0.0006	1.6	0.93	0.0007	1.4
	370-413	0.67	0.045	-1.28	0.037	1.2	0.31	0.040	1.1

[0320] 实施例9. 在H0小鼠中400MA PEG-htCBS C15S和20NHS PEG-htCBS C15S的药代动力学和药效学

[0321] 该实施例表征并比较用20kDa线性NHS酯活化的PEG (ME-200GS) 或40kDa线性马来酰亚胺活化的PEG (ME-400MA) PEG化的htCBS C15S 的药代动力学 (PK) 和药效学 (PD) 性质。将每种PEGC15S在DEAE琼脂糖凝胶上纯化并使用切向流过滤 (TFF) 在 BioMax® 100盒上在1x无菌PBS中进行缓冲液交换。

[0322] 将用ME-400MA修饰的htCBS C15S (400MA PEG-htCBS C15S) 浓缩至 7mg/ml。将用ME-400MA修饰的均一PEG化的htCBS C15S (峰1) 浓缩至 4.3mg/ml，并将用ME-400MA修饰的半/异质PEG化的htCBS C15S (峰2) 浓缩至5.1mg/ml。将用ME-200GS修饰的htCBS C15S (20NHS PEG-htCBS C15S) 浓缩至6mg/ml。

[0323] 对于20NHS PEG-htCBS C15S, 对H0小鼠以5、10或15mg/kg的剂量SQ施用或以10mg/kg的剂量IV施用。对于400MA-htCBS C15S,H0 小鼠SC或IV接受单剂量为10mg/kg的以下三种形式之一: (i) 所有物质的混合物, 其中未尝试分离个体形式(混合), (ii) 均一PEG化的物质(峰1) 和(iii) 异质/半PEG化的物质(峰2)。

[0324] 在这个实施例中使用雄性和雌性H0小鼠, 并且每个组含有3至4只 小鼠。对于每种施用途径, 使用指定为“A”和“B”的两组小鼠以使从任何一只小鼠获取的血液体积最小化。对于SC给药, 在注射后0.5、3、24 和72小时时从A组收集血液, 并在注射后1、6、48和96小时时从B组 收集血液。对于IV给药, 在注射后0.25、1、6和48小时时从A组收集血 液, 并在注射后0.5、3、24和72小时时从B组收集血液。

[0325] A.药代动力学

[0326] 在表10中对ME-200GS缀合物以及在表11中对ME-400MA缀合物列出了根据时间-活性曲线计算的PK参数。对于静脉内组, 半对数曲线是线性的, 因此证实了所有形式的htCBS C15S酶均以一级动力学从血浆中清除 (数据未显示)。

[0327] 通过将SC或IP途径的曲线下面积 (AUC) 除以IV施用后观察的AUC 来计算生物利用度。表10提供了IV和SC施用20NHS PEG-htCBS C15S 后的PK参数。

[0328] 表10. 用20NHS PEG-htCBS C15S进行实验的PK参数

PK 参数	单位	SC	SC	SC	IV
[0329] 给药量	Mg/Kg	5	10	15	10
	AUC(0-t) (观察面积)	mU·hr/µL	3062±158	4788±626	5754±160
AUC/剂量		612	479	384	
[0330] 生物利用度	%	82.6%	64.6%	51.6%	NA
	E 半衰期	hr	137±95	17.5±1.27	22.0±1.7
	A 半衰期	hr	5.3±1.1	12.7±0.6	11.9±1.2
	c _{max} (观察)	mU/µL	51.3±3.7	89.9±10.2	104.2±11.3
	c _{max} /剂量		10.3	9.0	6.9
	MRT (面积)	hr	194±128	44.8±1.7	49.0±1.4
	CL (观察面积)	µL/hr	1636±86	2113±280	2609±72
	达到稳态的时间*	hr		343	
	在 SS 的峰*	mU/µL		162	
	在 SS 的谷*	mU/µL		85	

[0331] *表示该值是针对10mg/kg剂量、48小时给药间隔和17.5小时半衰期 建模的。

[0332] 对于20NHS PEG-htCBS C15S, 5、10和15mg/kg剂量的曲线下面积 分别为3062、4788和5754。在5mg/kg 20NHS PEG-htCBS C15S SC给药 组中, 血管外(SC)给药后到达体循环的htCBS C15S酶的部分为82.6%, 但 在10和15mg/kg给药组中降低至64.6%和51.6%。因此, 所述增加小于在 AUC、c_{max} 和生物利用度的增加比例中反映的剂量比例。这些结果很可能 是由于20NHS PEG-htCBS C15S的总吸收量随剂量增加而略有下降。

[0333] IV给药组中的消除半衰期为48小时, 这意味着每48小时清除血浆中 一半的药物浓度。当在对数标度上绘制浓度随时间变化的图且相关系数 为>0.98时, 数据是完全线性的, 表明这是20NHS PEG-htCBS C15S的消除 半衰期的接近估计值。SC给药组的半衰期测定结果是可变的, 范围从17.5 至137小时。缓慢的两相吸收/分配相使这些估计值出乎意料。对于20NHS PEG-htCBS C15S, 单个酶分子的平均循环时间 (MRT) 计算为在44至194 小时的范围内。

[0334] 假设给药间隔为48小时和半衰期为17.5小时, 从10mg/kg SC数据集 建模达到稳态(恒定的峰和谷水平)的时间。估计达到绝对稳态的时间为343 小时(即在大约7次每2天SC注射后), 但是到144小时峰和谷血浆水平的 变化非常接近于稳态水平。在稳态下, 在每两天一次SC施用10mg/kg剂 量后, 峰和谷水平被模拟为162和85mU/µL。然而, 在注射后144 小时即 在3次每2天SC施用PEG化的酶后达到非常相似的水平。

[0335] 在图10A中比较了代表均一PEG化的物质(每个htCBS二聚体2个PEG 部分)的峰1、代表半PEG化的物质(每个htCBS C15S二聚体1个PEG部 分)的峰2的400MA PEG-htCBS C15S的血浆水平。混合物用带有表示收集 点的正方形的实线表示。峰1用带有表示收集点的圆

圈的虚线表示,峰2 用带有表示收集点的菱形的虚线表示。

[0336] 表11提供了SC和IV施用10mg/kg 400MA PEG-htCBS C15S后计算 的PK参数。

[0337] 表11.用400MA PEG-htCBS C15S进行的实验的PK参数

药代动力学参数	单位	SC 混合的	SC 峰 1	SC 峰 2	IV 混合的
给药量	Mg/Kg	10	10	10	10
AUC(0-t) (观察面 积)	mU·hr/µL	3805±656	5193±519	4201±436	6888±268
生物利用度	%	55.2%	NA	NA	NA
[0338]	E 半衰期	hr	83.1±47	22.0±5.3	104.9±122.3
	A 半衰期	hr	9.4±14.8	12.1±1.26	6.3±5.5
	Tmax (或 IV 的 Cp0)	hr	10.5	24	18±10
	c _{max} (观察)	mU/µL	75.8±12.3	94.6±8.6	75.8±14.5
	MRT (面积)	hr	99.3±54.0	50.6±2.57	135±129
	CL (观察面积)	µL/hr	2698±534	1939±205	2398±259
					1453±57.6

[0339] 观察到对混合的400MA PEG-htCBS C15S计算的生物利用度为55.2%。T_{max}是c_{max}(最初峰血浆水平)的时间。根据IV数据集计算的消除半衰期为 39小时。对于被指定为峰1(半PEG化的) 和峰2(均一PEG化的)的PEG 化的个体物质,PK参数没有明显不同。

[0340] B.ME-200GS和ME-400MA PEG化形式的htCBS C15S的比较

[0341] 对于本文中比较的两种PEG化形式的htCBS C15S (ME-200GS和 ME-400MA),观察到PK参数不是明显不同的。还观察到每种酶的10mg/kg IV和SC给药的比活性相对于时间的曲线是类似的,如图10B所示。IV 给药后的活性用实线显示,SC给药后的活性用虚线显示。圆圈 (IV) 和三角 形 (SC) 代表对施用20NHS PEG-htCBS C15S的小鼠的收集时间,而钻石形 (IV) 和正方形 (SC) 代表对施用400MA-htCBS C15S的小鼠的收集时间。

[0342] 但是,图10C中描绘的代谢物曲线显示20NHS PEG-htCBS C15S在单 次10mg/kg SC给药后在使高半胱氨酸(圆圈) 和半胱氨酸(正方形) 血浆水 平正常化方面更有效。在图10C的图表中用三角形表示的胱硫醚水平在两 种缀合物之间没有显著差异。通常,响应遵循通过活性测定法测量的血浆 水平。

[0343] 观察到与对400MA PEG-htCBS C15S的响应相比,对20NHS PEG-htCBS C15S的响应出现得更快速,并且持续的时间更长。观察到这两 种PEG化酶在SC施用后在大致相同的程度上改善Hcy和Cys的血浆水平 持续6小时,并观察到与施用400MA PEG-htCBS C15S后从24小时起逐渐 正常化并且在72小时时完全回复到注射前水平相比,施用20NHS PEG-htCBS C15S后Hcy血浆水平保持下降达72小时。两种PEG化酶的 Cys血浆水平反映了类似的模式。

[0344] 观察到剂量增加没有显著改善任一形式的CBS的PD曲线,表明该酶 的最大功效不仅仅由其血浆浓度水平决定,而是还受诸如酶动力学、底物 利用度和浓度等因素的影响。

[0345] 观察到与400MA PEG-htCBS C15S相比,20NHS PEG-htCBS C15S在 SC施用后产生最有利的曲线。具体而言,与400MA PEG-htCBS C15S的循环半衰期为39小时相比,20NHS PEG-htCBS C15S的循环半衰期为47小时(即半衰期长20%),并且等量(10mg/kg)的SC施用后,与混合物的生物利用度为55.2%相比,20NHS PEG-htCBS C15S的生物利用度为64.6%(即生物利用度高17%)。

[0346] C. 不同剂量的20NHS PEG-htCBS C15S的比较

[0347] 观察到PD响应通常与血浆峰值水平成正比,并随半衰期成比例地降低。然而,观察到峰值响应的剂量关系接近5mg/kg的最大水平,使得如通过高半胱氨酸和胱硫醚水平确定的,10或15mg/kg的剂量的峰值功效几乎没有增加,如图10D所示。在每个消除阶段中观察到消除的波浪谱,其在每条曲线中相同,使得血浆活性在48小时达到谷并且随后在72小时恢复(或为相似的),却在96小时再次下降。在SC给药htCBS C15S后观察到的这种不寻常的消除模式可能是由于由早期快速和后期较慢的吸收阶段组成的双相吸收阶段的清除。

[0348] 观察到20NHS PEG-htCBS C15S的剂量增加显示出10mg/kg的剂量与5mg/kg相比血浆中CBS活性高出约2倍,但是对于更高的15mg/kg的剂量则不是线性的,这在图10E中示出。对于每种代谢物,10和15mg/kg剂量组的PD响应之间存在明显的差异。事实上,观察到较高剂量组中的许多时间点产生的响应倾向于低于5mg/kg剂量组的响应。随着20NHS PEG-htCBS C15S的剂量增加而观察到较低的生物利用度(每单位剂量的吸收减少)并不能解释这些差异。总之,观察到5至10mg/kg之间的单剂量在H0小鼠模型中产生最大功效响应。

[0349] 实施例10. 在H0小鼠中长期施用PEGC15S的药效学

[0350] 该实施例评估和比较在H0小鼠中长期外源性施用ME-200MA0B、ME-200GS、GL4-400MA、ME-400MA或ME-050GS PEG化的htCBS C15S的药效学和潜在的免疫原性应答。当将人蛋白质工程化到小鼠基因组中并在新生动物中表达时(如H0小鼠的情况),免疫应答更可能与人类应答具有临床相关性。参见Guidance for Industry, Immunogenic assessment of therapeutic protein products, CEBR(August 2014)。H0小鼠表达少量的人CBS蛋白,并且与完全敲除或野生型小鼠相比,其对PEG htCBS酶的适应性免疫应答可能更类似于人类患者。

[0351] 在一组实验中,评价用ME-200MA0B、ME-200GS、GL4-400MA或ME-400MA PEG化的htCBS C15S。使用六组H0小鼠进行这些研究:两组接受200MA0B PEG-htCBS C15S(组1和3),一组接受20NHS PEG-htCBS C15S(组4),一组接受GL4-400MA PEG-htCBS C15S(组5),以及两组接受400MA PEG-htCBS C15S(组6和7)。在这些研究中使用雄性和雌性两种H0小鼠(每组共计n=6至8只小鼠)。

[0352] 对于组1,在第1、2、3、4和5天(第1周)和第15、16、17、18和19天(第3周),小鼠接受2轮5次每天皮下注射200MA0B PEG-htCBS C15S。该实验的剂量是5mg/kg/天。在这个实验中包括盐水对照组(第2组)。所有其他组在第1、2、3、4和5天(第1周);第15、16、17、18和19天(第3周);和第29、30、31、32和33天(第5周)接受3轮5次每天皮下注射。这些实验的剂量是7.5mg/kg/天。

[0353] 在单独一组实验中,评价用ME-200MA0B或ME050GS PEG化的htCBS C15S。两组雄性

和雌性H0小鼠(1M/5F)在第1、2、3、4和5天(第1周),第15、16、17、18和19天(第3周),和第29、30、31、32和33天(第5周)接受3轮5次每天皮下注射200MA0B PEG-htCBS C15S(第8组)或050GS PEG-htCBS(第9组)。剂量为7.5mg/kg/天。

[0354] 在所有的实验中,每个5天给药周期之后是10天的“清除期”。在给药周(1、3和5)的星期一、星期三和星期五以及每个10天的清除期的第1天(星期一)使用下颌下采血针采集血液。所有采血程序和皮下注射均在下午3点进行以避免由于白天变化造成的人为现象。在进行血液采集和注射这二者的日子,在酶施用之前进行血液采集程序。

[0355] 通过在基线和治疗后定量与转硫途径相关的代谢物高半胱氨酸、胱硫醚和半胱氨酸的血浆水平,来评估H0小鼠对每种PEG化的htCBS C15S缀合物的药效学响应。如实施例1所述通过稳定同位素稀释液相色谱质谱法(LC/MS)进行定量。对于每个剂量周,与基线值相比计算高半胱氨酸、胱硫醚和半胱氨酸的最大百分比变化。

[0356] ME-200MA0B:用200MA0B PEG-htCBS C15S(组1、3和8)进行三项独立研究。在组1中,在给药第一周期间,观察到血浆Hcy水平与基线水平相比下降了68%,但在之间间隔10天清除期的第三周期间在第二系列200MA0B PEG-htCBS C15S注射期间,观察到与基线水平相比仅下降24%(表12)。在第二轮注射期间,Cth和Cys两者水平的升高衰减表明类似的功效下降(表13和表14)。进行第二项研究(组3)以确定采用不同组的首次接受实验(*naïve*)的H0小鼠是否能观察到功效衰减。在第一个注射周期期间,观察到组3中的总Hcy水平下降至低于基线82%。在第3周和第5周期间第2个和第3个注射周期期间,观察到Hcy水平仅下降至基线值的57%和50%。类似地,在给药第一周,观察到施用于组8的另一批次的200MA0B PEG-htCBS C15S的血浆Hcy水平与基线水平相比降低了80%,但是在给药第3周期间仅降低了基线值的61%。在给药第5周期间,观察到血浆Hcy水平降至基线值的50%(表12)。与第1周相比,在第3周和第5周注射(表13和表14)期间Cys水平的升高衰减表明类似的功效下降。在组1、3和8组中观察到类似的功效衰减趋势,尽管观察到组1的应答衰减幅度比组3和组8更显著。

[0357] ME-200GS:观察到在实验组4中施用20NHS PEG-htCBS C15S在第一周给药期间血浆HCY水平与基线水平相比降低了77%,在第三周给药期间降低了70%,以及在给药第五周期间降低了66%(表12)。在第三和第五周给药(表13和表14)期间,与第一周相比,Cth和Cys水平的升高减弱显示了类似的功效下降。然而,对于20NHS PEG-htCBS C15S,在第3周和第5周给药期间观察到的功效下降与其他PEG htCBS C15S缀合物相比是最少的,并且在统计学上不是显著的。

[0358] GL4-400MA:在组5中施用GL4-400MA-htCBS C15S使得在第一周给药期间血浆Hcy水平与基线水平相比平均降低75%,而在第三周给药期间仅降低41%,以及在第5周给药期间仅降低34%(表12)。在第3周和第5周给药(表13和表14)期间,与第1周相比,Cth和Cys水平的升高衰减显示了类似的功效下降。

[0359] ME-400MA:用400MA PEG-htCBS C15S进行两个独立的实验(组6和7)。在组6中,观察到Hcy水平的降低百分比在第1周中与基线水平相比为73%,并且随后在第3周和第5周给药期间分别下降至65%和59%。组7的功效下降幅度更大,如在三轮给药期间Hcy水平的降低减弱所示(表12)。对于组6和组7,在Cth和Cys水平变化中观察到功效衰减的类似趋势(表13和表14)。

[0360] ME-050GS: 在组9中观察到施用050GS PEG-htCBS C15S在第1周给药期间使血浆Hcy水平与基线水平相比降低了75%，但是在第3周给药期间与基线水平相比仅降低了59%。在给药第5周期间，观察到Hcy血浆水平降低至基线水平的42% (表12)。在第3周和第5周给药(表13和表14)期间，与第1周相比，Cth和Cys水平的升高衰减显示了类似的效果下降。

[0361] 表12、表13和表14显示了在每轮皮下注射不同形式的PEG化的htCBS C15S后，血浆高半胱氨酸、胱硫醚和半胱氨酸代谢物水平的百分比变化。在这些表格中，基线值表示为平均值±平均值的标准误差(SEM)(用 μM 表示)，并且变化表示为每个5天给药周期(第1、3和5周)相对于基线的平均最大百分比变化。n.d.代表“未测定”。表12提供了用PEGC15S长期治疗后总高半胱氨酸的百分比变化。

[0362] 表12. 在H0小鼠中PEGC15S治疗后总Hcy水平的变化

研究		基线(μM)	谷时的百分比降低		
组	PEG 部分	第 0 天	第 1 周	第 3 周	第 5 周
[0363]	1 ME-200MA0B	155.3±15.7	68%	24%	n.d.
	2 盐水	176.1±20.9	-8%	-8%	n.d.
	3 ME-200MA0B	239.9±26.2	82%	57%	50%
	4 ME-200GS	164.4±15.9	77%	70%	66%
	5 GL4-400MA	169.7±14.4	75%	41%	34%
	6 ME-400MA	134.0±22.2	73%	65%	59%
	7 ME-400MA	239.1±11.4	75%	52%	42%
	8 ME-200MA0B	224.0±14.0	80%	61%	50%
	9 ME-050GS	192.1±17.1	75%	59%	42%

[0364] 表13提供了用PEGC15S长期治疗后胱硫醚的百分比变化。

[0365] 表13. 在H0小鼠中PEGC15S治疗后胱硫醚水平的变化

研究		基线(μM)	峰时的百分比增加		
组	PEG 部分	第 0 天	第 1 周	第 3 周	第 5 周
[0366]	1 ME-200MA0B	4.1±0.2	796%	508%	n.d.
	2 盐水	4.5±0.4	-1%	-19%	n.d.
	3 ME-200MA0B	4.8±0.4	700%	866%	335%
	4 ME-200GS	5.0±0.6	676%	492%	432%
	5 GL4-400MA	3.2±0.3	715%	723%	449%
	6 ME-400MA	5.0±0.5	383%	329%	365%
	7 ME-400MA	4.1±0.4	696%	649%	443%

[0367]	8	ME-200MA0B	3.6±0.4	1023%	764%	1100%
	9	ME-050GS	4.0±0.5	978%	795%	833%

[0368] 表14提供了用PEGC15S长期治疗后半胱氨酸的百分比变化。

[0369] 表14. 在H0小鼠中PEGC15S治疗后半胱氨酸水平的变化

研究		基线(μM)	峰时的百分比增加			
组	PEG 部分	第 0 天	第 1 周	第 3 周	第 5 周	
[0370]	1	ME-200MA0B	170.7±8.5	36%	16%	n.d.
	2	盐水	166.2±8.7	-18%	5%	n.d.
	3	ME-200MA0B	149.5±7.0	72%	38%	32%
	4	ME-200GS	147.3±10.0	59%	61%	51%
	5	GL4-400MA	114.5±8.6	98%	48%	52%
	6	ME-400MA	184.3±16.1	17%	6%	8%
	7	ME-400MA	122.8±4.5	72%	44%	44%
	8	ME-200MA0B	123.8±7	77%	77%	58%
	9	ME-050GS	128.5±11.9	71%	75%	36%

[0371] 这些研究的结果显示在所有组中血浆Hcy水平降低与血浆Cth和Cys 增加相呼应，表明代谢物响应于PEG-C15S治疗而正常化。在所有组中，在第一周给药期间观察到最大功效。如表12所示，观察到所有实验组的 Hcy水平均显著降低(约68%至约82%)低于基线。如表13和表14所示，在 第1周期间Cth和Cys水平的峰值百分比增加也是最大的。在随后的第3周以及更后面的第5周期间的PEG-C15S注射周期期间，药物学响应的幅 度下降。总体而言，对20NHS PEG-htCBS C15S观察到最高和最持久的药 效学响应。

[0372] 在给药第3周期间施用的第二轮PEG化的htCBS C15S期间，对除了 20NHS PEG-htCBS C15S之外的所有研究的缀合物均观察到衰减的功效。在第5周期间进行的第三个给药周期期间观察到与第3周相比功效进一步 下降。尽管在这些研究中没有直接测量抗体形成，但重复施用后功效的这 种缓慢下降是适应性免疫的典型指征。因此，对衰减的可能解释是针对用ME-200MA0B、MA-400ME、GL4-400MA或ME-050GS PEG化的htCBS C15S的免疫应答。

[0373] 在所测试的缀合物中，观察到20NHS PEG-htCBS C15S具有最稳健和 长期的功效。猜测ME-200GS与其他PEG相比更能够有效地掩盖htCBS C15S上的免疫原性表位。因此，观察到20NHS PEG-htCBS C15S形式是测 试的各种PEG化的htCBS C15S缀合物的最有效且最少免疫原性的形式。

[0374] 实施例11. 用ME-200MA0B、ME-400MA或ME-200GS PEG化的htCBS C15S挽救K0小鼠免于早期死亡

[0375] 在本文所述的K0小鼠模型中进行存活研究以比较各种PEG化的 htCBS C15S缀合物的功效。

[0376] A.K0幼仔的存活直到第21/35天

[0377] 对每周三次注射7.5mg/kg用ME-200MA0B (n=24)、ME-400MA (n=31=13F+18M) 或 ME-200GS (n=28=14F+14M) PEG化的htCBS C15S K0小鼠以及作为对照的注射PBS的一组K0 小鼠 (n=44),绘制Kaplan Meyer存活曲线。使哺乳期的母鼠保持接受甜菜碱水,在断奶后,使幼仔(第 21天)接受不含甜菜碱的常规水。测试注射的酶挽救K0幼仔的能力。

[0378] 如图11A所示,在第21天,在注射PBS组中只有约20%的小鼠存活,与此相对照,注射200MA0B PEG-htCBS C15S (C15S/ME-200MA) 的组中有 约92%的小鼠存活,注射400MA PEG-htCBS C15 (C15S/400MA) 或20NHS PEG-htCBS C15S (C15S/200GS) 的组中有约97%的小鼠存活。

[0379] B. 周末清除(谷值)后和末次注射后24小时(峰值)的代谢物水平

[0380] 使用实施例1中的实验程序,在周末清除(谷值)后和末次注射后24小时(峰值)测量约4-5周龄的存活K0小鼠的代谢物水平。

[0381] 将测量的水平与类似处理的健康K0+/-同窝出生仔鼠中的水平进行比较,如图11B所示。400MA PEG-htCBS C15S治疗的K0小鼠的血浆Hcy 水平的范围为给药后72小时的 $256 \pm 8\mu\text{M}$ (ME-400MA) (每种代谢物最左侧的柱) 至给药后24小时的 $145 \pm 6\mu\text{M}$ (ME-400MA 24h) (每种代谢物从左侧起 第2个柱)。20NHS PEG-htCBS C15S治疗的K0小鼠的血浆Hcy水平的范围为给药后72小时的 $179 \pm 10\mu\text{M}$ (ME-200GS) (左侧起第3个柱) 到给药后24小时的 $96 \pm 8\mu\text{M}$ (ME-200GS 24h) (左侧起第4个柱)。因此,这两种htCBS C15S缀合物的最大响应在给药后24小时观察到,并且观察到在给药后72 小时下降。观察到用任一缀合物治疗使毒性 Hcy的血浆水平显著 ($p < 0.001$) 降低了约一半。相比之下,在这两个时间点观察到治疗的健康杂合同窝出生仔鼠的高半胱氨酸血浆水平为约 $5\mu\text{M}$ 。

[0382] 在用PEG化的htCBS C15S缀合物治疗的K0小鼠中观察到Cth水平 在57至77 μM 范围内。这些血浆水平比在未经治疗的杂合小鼠中观察到的 血浆水平高大约12倍。观察到Cth的峰血浆水平和谷血浆水平之间的差异 很小,这证明了酶对胱硫醚水平的药效学作用可以持续超过72小时和/或 Cth与其中观察到较大差异的其他代谢物相比可以更缓慢地从血浆中清除。在400MA PEG-htCBS C15S治疗的和20NHS PEG-htCBS C15S治疗的K0 小鼠中都观察到给药后72小时Cys的血浆水平与健康杂合同窝出生仔鼠 (151 ± 6) 相比分别显著 ($p < 0.001$) 降低至 83 ± 4 和 $106 \pm 6\mu\text{M}$ 。对于两种缀合物 均观察到在经过治疗的K0小鼠中在给药后24小时Cys的血浆水平增加,表明循环硫代谢物的部分正常化。观察到Cys的血浆水平在400MA PEG-htCBS C15S施用后24小时增加至 $157 \pm 6\mu\text{M}$,在20NHS PEG-htCBS C15S施用后24 小时增加至 $176 \pm 6\mu\text{M}$ 。与健康杂合对照相比,K0小鼠中的甲硫氨酸血浆水平略微升高,并且在谷水平和峰水平之间没有显著变化。

[0383] C. 最初或连续治疗后的寿命

[0384] 经过最初35天(5周)的长时间治疗以预防K0小鼠的新生儿致死率后,将用20NHS PEG-htCBS C15S治疗的K0小鼠分成两组。一组 (5W) 除最初 治疗外停止接受任何治疗,而另一组 (CONT) 以相同的方案继续直至120日 龄 ($7.5\text{mg/kg, SC, 一周3次}$)。

[0385] 观察这些K0幼仔组的存活长达4个月并绘制在图11C中。连续施用 20NHS PEG-htCBS C15S (C15S/ME-200GS) 的所有K0小鼠存活至少119 天,如图11C所示。在最初35天后终止治疗导致119日龄时存活率为约 85%。

[0386] D. CBS治疗的K0小鼠vs.+/-健康小鼠的总重量和重量增加

[0387] 测定以7.5mg/kg的剂量每周三次施用20NHS PEG-htCBS C15S的K0 小鼠(雄性n=16和雌性n=11)的总重量和重量增加量,并与经类似治疗的+/- 健康同窝出生仔鼠(雄性n=14和雌性n=13)进行比较。在从第21天断奶后 至第36天,测量小鼠的总重量和重量增加。

[0388] 尽管20NHS PEG-htCBS C15S治疗的K0雄性小鼠在第21天具有最高的总重量(约10g),但观察到杂合雄性小鼠从第23天至第35天具有最大的 总重量,范围为约10.5g至约18g。20NHS PEG-htCBS C15S治疗的K0 雌性小鼠在第23天后具有最低的总重量,范围为约10g至约14g。

[0389] 健康雄性小鼠(n=14)在第23天开始具有最大的重量增加量,范围为约 2g至约9.5g。20NHS PEG-htCBS C15S治疗的K0雄性小鼠(n=16)和20NHS PEG-htCBS C15S治疗的K0雌性小鼠(n=11)的重量增加量显著低于两个对照组的重量增加量。

[0390] 实施例12.PEG化的htCBS C15S在I278T小鼠模型中延迟、预防和逆转面部脱毛

[0391] 观察到高胱氨酸尿症的I278T-/-纯合小鼠模型除了典型的代谢物图谱 外,还表现出特定的表型性状,如面部脱毛,这与其他高胱氨酸尿症小鼠 模型不同。面部脱毛定义为脸部和头部的毛发损失。面部脱毛的发作为约 90天(W12),通常在约120日龄(W17)时完全发展。

[0392] 猜测面部脱毛与高胱氨酸尿症和相关代谢图谱有关;因此,酶替代疗 法(ERT;PEG-CBS)的施用应该通过减缓进展、阻止/延迟发作和/或逆转已 经造成的损害来挽救这种表型。

[0393] A. 延迟面部脱毛的发作

[0394] 将没有显示任何面部脱毛体征的3W龄小鼠分成2组。第一组(n=3只 雄性)以7.5mg/kg每周三次注射200MA0B PEG-htCBS C15S,持续6周时间。在实验前记录身体外观并每周监测一次,然后在6W注射方案后每两 周监测一次。在实验前和末次注射后(即6W注射方案后)24小时检查代谢 物水平。

[0395] 在图12A中观察到从3W龄开始施用200MA0B PEG-htCBS C15S持续 6周时间延迟面部脱毛的发作。观察到I278T影响(-/-)或健康(+/-)小鼠在该 鼠龄时难以区分,并且-/-小鼠没有面部毛发损失的体征。没有观察到未经 治疗的I278T+/-健康杂合小鼠在19W时患有面部毛发损失,在34W时仅 有轻度毛发损失,这与未经治疗的I278T-/-影响的纯合小鼠不同,观察到 其到38W时面部脱毛已完全发展。通常,面部脱毛在12W时变得明显,并在17W龄时完全发展。

[0396] 观察到200MA0B PEG-htCBS C15S施用6周(在注射期间小鼠的年龄为 4W-10W)使脱毛的发作延迟的时间与治疗持续时间(6周)大约相同,如 I278T-/-影响纯合小鼠被观察到在4M龄时没有显示面部脱毛的体征并且 在7M龄处才具有初始体征所证明的。这些结果提供证据表明在I278T小 鼠中施用200MA0B PEG-htCBS C15S 6周延迟了面部脱毛的发作。

[0397] B. 完全防止面部脱毛发展

[0398] 第二组(n=3;2只雄性,1只雌性)从3W龄至41周龄连续皮下注射施 用7.5mg/kg 200MA0B PEG-htCBS C15S。最初每周一次监测重量。在实验 之前记录身体外观,并在最初的6W注射方案后每周或每两周监测一次。在实验前和最初6W注射方案的末次注射后24小时检查代谢物水平,然后 每周或每两周一次。

[0399] 观察到向I278T-/-纯合小鼠连续施用200MA0B PEG-htCBS C15S完全 防止在W19、W24、W31和W35龄时观察的小鼠中面部脱发的发作和发展，如图12B所示。这样治疗的小鼠的身体外观类似于对健康I278T+/-杂合小 鼠通常观察到的那些，并且与未经治疗的I278T-/-对照和仅治疗6周时间 的I278T-/-纯合小鼠在W36龄或更大时的身体外观显著不同。

[0400] 图12C中的代谢物测量显示连续施用200MA0B PEG-htCBS C15S导致 Hcy水平与治疗前水平(约300 μ M)相比显著降低，并稳定在约100 μ M的 总Hcy水平(中线)。治疗使Cys水平(顶线)正常化(从约130 μ M至约240 μ M) 并且始终维持在约230 μ M的水平。

[0401] C.一旦面部脱毛已完全发展(developed),表型的逆转/正常化

[0402] 将至少120D(W17) 龄且具有可见的完全发展的面部脱毛的I278T小鼠 分成两组。A 组(n=6;3只雄性和3只雌性) 每周3次注射400MA PEG-htCBS C15S,B组(n=4;2只雄性和2只雌性) 每周3次注射20NHS PEG-htCBS C15S,直到约1岁龄时。在治疗开始之前测定代谢物水平,并在研究期间 在注射后24小时测量,并且最初每周一次然后每两周一次监测重量和身体 外观。

[0403] 为了逆转I278T-/-纯合小鼠的面部脱毛(另称为表型的正常化),开始已 经完全表达面部脱毛表型的小鼠的治疗。开始研究时动物的年龄范围为 W24到W28龄,这超出了典型的脱毛发作年龄(120D或W17)。

[0404] 一周3次连续施用任一种PEG-CBS缀合物显著改善面部脱毛,如图 12D所示。尽管与未经治疗的I278T+/-未受影响的杂合对照相比,它没有 完全正常化。观察到20NHS PEG-htCBS C15S比400MA PEG-htCBS C15S 表现得更好,因为所有用20NHS PEG-htCBS C15S治疗的动物都对治疗有 响应(4只中有4只),而采用400MA PEG-htCBS C15S的6只动物中只有 5 只对治疗有响应。另外,对小鼠的主观观察结果表明,施用20NHS PEG-htCBS C15S的小鼠的小鼠皮毛的厚度和光泽度更好。

[0405] 此外,图12E中的代谢物测量显示,虽然两种PEG-CBS分子均是有效 的,但观察到 20NHS PEG-htCBS C15S(组B) 比400MA PEG-htCBS C15S (组A) 更大幅度地降低了Hcy水平 和增加了Cys水平。

[0406] D.结论

[0407] 无论PEG部分如何,施用PEG-CBS导致面部脱毛的改善,面部脱毛 是如上所述的对未经治疗的I278T-/-纯合小鼠典型的表型性状。ERT施用6 周导致面部脱毛的发作延迟。在面部脱毛发作之前向小鼠连续ERT施用完 全防止其发展,并且这样的动物与未受影响的健康I278T+/-杂合小鼠没有 差别。向具有已经完全发展的面部脱毛的小鼠连续ERT施用导致其身体外 观的显著改善。在所有情况下,对面部脱毛的正面作用伴随着血浆代谢物 水平的至少部分(Hcy) 或完全(Cys) 正常化或者由血浆代谢物水平的至少部 分(Hcy) 或完全(Cys) 正常化引起。

[0408] 实施例13.20NHS PEG-htCBS C15S改善K0小鼠的肝脏疾病

[0409] 对来自K0小鼠的肝脏切片进行组织学分析,并与年龄匹配的+/-健康 对照小鼠的肝脏进行比较,所述K0小鼠从2日龄开始一周三次皮下(SC) 注射7.5mg/kg 20NHS PEG-htCBS C15S或PBS并且在17-19日龄时安乐 死。

[0410] A.光学显微镜术

[0411] 在第17-19天处死动物并处理肝脏样品通过光学显微镜术进行组织学 分析。观察到如图13A所示的注射PBS的K0小鼠的肝实质具有轻微不规 则的肝小叶结构,伴有中度至重度脂肪变性、局灶性肝细胞坏死和再吸收 性炎症反应,如箭头所示。观察到健康杂合小鼠和20NHS PEG-htCBS C15S 治疗的K0小鼠的肝实质具有规则的肝脏结构和最小的细胞核大小不均 (anizokaryosis),也在图13A中显示。

[0412] 通过图13A所示的相同的肝脏切片的更高放大倍数提供的更详细的细 节在图13B 中显示,其中插图显示对脂质的Oil Red O染色。观察到注射 PBS的K0小鼠具有小泡性和大 泡性脂肪变性、细胞核大小不均、肝细胞 局灶性坏死和再吸收性炎症反应。这些特征用箭 头指出。观察到20NHS PEG-htCBS C15S治疗的K0小鼠的肝实质具有最小的细胞核大小不 均,如 20NHS PEG-htCBS C15S治疗的K0小鼠和健康杂合小鼠的细胞核均具有 规则的大小 和形状并具有良好的染色质和不明显的核仁所证实的。使用Oil Red O染色可检测在经治 疗的小鼠和健康小鼠的肝细胞的细胞质中看到的 离散脂滴(参见图13B中的插图)。

[0413] B.电子显微镜术

[0414] 还使用电子显微镜以3000x放大倍数观察来自健康杂合 (+/-) 小鼠、PBS 治疗的K0 小鼠和400MA PEG-htCBS C15S治疗的K0小鼠的肝脏组织。捕获的电子显微镜图像显示在 图14A中。在图14A中,黑色箭头表示粗面 内质网 (ER),白色箭头表示线粒体 (MT)。黑色星号 表示细胞溶质糖原,双 黑色星号表示细胞核。白色星号表示脂滴。

[0415] 观察到+/-小鼠具有双核肝细胞,其具有正常的细胞质组成和正常形态 的细胞 核。观察到粗面ER的潴泡纤细并且有规则的组织,并且观察到MT 具有正常的大小和形状。 观察到细胞核是规则且正染的,并具有不明显的 核仁。

[0416] 观察到PBS治疗的K0小鼠具有脂肪变性、增加的细胞质细胞器数量 以及肝细胞的 不规则深染细胞核。观察到细胞质富含细胞器并含有许多脂 滴(白色星号) 和水肿MT。观察 到细胞核具有粗染色质、不规则的轮廓以及 明显的核仁。

[0417] 观察到400MA PEG-htCBS C15S治疗的小鼠在肝细胞中具有正常的细 胞质组成和 规则的正染细胞核。与+/-小鼠一样,观察到ER的潴泡纤细并 且有规则的组织,MT具有正常 的大小和形状,并且细胞核外观正常且具 有细染色质。

[0418] 如图14B所示,放大倍数为8000x的电子显微镜图像更详细地证实了 这些发现。在 图14B中,黑色箭头表示内质网 (ER),白色箭头表示线粒体 (MT)。黑色星号表示细胞溶质糖 原。观察到400MA PEG-htCBS C15S治疗 的小鼠和+/-小鼠具有纤细的并且正常组织的粗面 ER潴泡和规则的MT。观察到PBS治疗的K0小鼠富含潴泡和囊泡。观察到ER潴泡具有可变增 加的宽度。观察到MT是多形性的并且肿胀,并具有组织紊乱的脊。

[0419] C.比较18-19日龄的K0小鼠的血浆和组织中的代谢物水平

[0420] 在野生型小鼠 (对照)、未经治疗的纯合-/-受影响的K0小鼠和400MA PEG-htCBS C15S治疗的K0小鼠组中测量血浆和组织代谢物。治疗组从2 日龄开始每周3次以7.5mg/kg 的剂量皮下注射施用400MA PEG-htCBS C15S。末次注射后24小时收获血浆和组织。表15显 示血浆中的Hcy、Cys、Cth和Met的水平。

[0421] 表15.血浆中的代谢物水平 [$\mu\text{M} \pm \text{SEM}$]

基因型	治疗	高半胱氨酸	胱硫醚	半胱氨酸	甲硫氨酸
野生型	无	10.1±0.7	2.8±0.1	237.9±9.2	87.7±5.6
KO ⁺⁻	无	11.7±0.7	1.7±0.1	236.8±2.7	93.4±12.6
KO	无*	261.4±12.9	0.06±0.02	95.9±8.1	483.7±51.7
KO	20NHS PEG-htCBS C15S**	52.8±6.8	133.2±9.1	211.7±11.5	99.2±5.4
* vs. **, p值		0.0001	0.001	0.0001	0.0018

[0423] 表16显示在肝脏组织中Hcy、Cys、Cth和Met的水平。

[0424] 表16. 肝脏组织中的代谢物水平 [nmols/g±SEM]

基因型	治疗	高半胱氨酸	胱硫醚	半胱氨酸	甲硫氨酸
野生型	无	9.2±0.4	24.9±7.8	257.8±13.7	39.2±2.1
KO ⁺⁻	无	8.9±5.2	28.5±19.3	326.7±147.9	26.9±9.8
KO	无*	63.4±8.6	0.48±0.1	110.6±13.0	511.0±66.8
KO	20NHS PEG-htCBS C15S**	22.4±3.4	18.9±1.8	205.2±27.4	25.5±3.4
* vs. **, p值		0.01	0.0005	0.0355	0.0019

[0426] 表17显示在肾脏组织中Hcy、Cys、Cth和Met的水平。

[0427] 表17. 肾脏组织中的代谢物水平 [nmols/g±SEM]

	治疗	高半胱氨酸	胱硫醚	半胱氨酸	甲硫氨酸
	无	5.58±0.18	6.67±1.01	225.6±10.8	61.2±13.2
	无	0.92±0.04	5.38±2.10	370.8±102.6	65.9±6.2
	无*	30.6±7.1	0.47±0.06	239.8±34.5	466.2±112.8
	20NHS PEG-htCBS C15S**	6.76±4.42	256.0±77.5	282.8±17.1	53.3±2.9
		0.0460	0.0300	0.3285	0.0216

[0429] 表18显示在脑组织中Hcy、Cys、Cth和Met的水平。

[0430] 表18. 脑组织中的代谢物水平 [nmols/g±SEM]

基因型	治疗	高半胱氨酸	胱硫醚	半胱氨酸	甲硫氨酸
野生型	无	4.0±0.9	69.0±18.3	55.0±3.6	61.6±1.4
KO ⁺⁻	无	0.17±0.02	34.3±5.0	54.3±1.5	56.6±11.2
KO	无*	24.8±7.5	1.3±0.3	51.4±1.4	616.0±71.1
KO	20NHS PEG-htCBS C15S**	1.1±0.1	8.5±1.1	56.8±3.0	68.6±4.7
* vs. **, p值		0.0388	0.0027	0.1760	0.0015

[0432] 实施例14. 在H0小鼠中使用ALZET®渗透泵连续施用20NHS PEG-htCBS C15S的作用

[0433] ALZET®渗透泵在新鲜和首次接受实验的H0小鼠中长时间地提供稳定、可控的20NHS PEG-htCBS C15S递送。使用四种不同型号的微渗透ALZET®泵施用用ME-200GS PEG化的htCBS C15S,所述泵每小时连续地分配一定体积的酶而不是反复皮下注射:1002型(0.25μl/h)、2002型(0.5 μl/h)、2004型(0.25μl/h)和2006型(0.15μl/h)。

[0434] 为了减轻疼痛,在植入ALZET®泵的手术之前和之后48小时,还对手术前和手术后的动物任意施用在水瓶中的TYLENOL®(2mg/ml)。此外,动物每24小时皮下接受5mg/kg的卡洛芬,持续到手术后48小时。对于手术期间的麻醉,通过吸入施用5%异氟烷并在手术期间维持在2-3%。当小鼠被麻醉时,它们在生物安全柜中在无菌条件下各自接受植入的医疗级ALZET®渗透泵。将泵皮下植入在颈部腹侧的松弛皮肤区域。在植入泵之前,将小鼠剃毛并且用BETADINE®使皮肤区域准备好。泵植入需要用无菌剪刀造成小的手术切口(5mm)。切口用创伤夹闭合,在皮肤完全愈合1周后将创伤夹取出。对于1002型和2002型泵,在1、3、6、9、12、15、19和20天采集血液样品。在泵的指定生命周期(对于2004型和2006型分别为4周和6周)结束时,通过手术将2004型和2006型泵取出。因此,对每种泵调整了血液样本的采集:对于在研究第30天被取出的2004型在1、3、5、12、19、26、31、32、33和36天采集,对于在研究第44天被取出的2006型在1、3、5、12、19、26、33、40、45、46、47和50天采集。血浆样品用于测定血浆中的CBS活性并测量Hcy、Cth和Cys水平。

[0435] 1002型和2002型施用的酶是浓度为21μg/μl且比活性为673.9+13.2 U/mg的20NHS PEG-htCBS C15S。在这些实验中,1002型历时14天的平均泵送速率为 $0.25 \pm 0.01 \mu\text{l/hr}$,平均填充体积为 $110.7 \pm 6.5 \mu\text{l}$ 。酶的施用速率为 $5.25 \mu\text{g/hr}$ 的酶,其相当于 $126 \mu\text{g}/\text{天}$ 或约 $3.5 \mu\text{U}/\text{hr}$,等于 $85 \mu\text{U}/\text{天}$ 。

[0436] 2002型历时14天的平均泵送速率为 $0.48 \pm 0.02 \mu\text{l/hr}$,平均填充体积为 $207 \pm 7 \mu\text{l}$ 。施用速率为 $0.5 \mu\text{g/hr}$ 的酶,相当于 $252 \mu\text{g}/\text{天}$ 或约 $7 \mu\text{U}/\text{hr}$,等于 $168 \mu\text{U}/\text{天}$ 。

[0437] 图15A是比较植入1002型或2002型ALZET®渗透泵的H0小鼠之间的血浆Hcy和Cys水平的图。观察到两组的血浆中代谢物水平的部分重叠。图15B是比较采用1002型或2002型ALZET®渗透泵连续施用后20NHS PEG-htCBS C15S在血浆中的比活性的图。观察到植入2002型泵的H0小鼠的血浆中的CBS活性与植入1002型的小鼠相比大致加倍。然而,植入2002型泵的小鼠的血浆中CBS活性的两倍量导致与植入1002型泵并具有与2002型相比大致一半的血浆CBS活性的小鼠所实现的类似的血浆代谢物改善。

[0438] 2004型和2006型施用的酶为浓度为 $18 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ 并且比活性为 $623.2 \pm 16.4 \text{ U/mg}$ 的ME-200GS PEG化的htCBS C15S。2004型历时28天的平均泵送速率为 $0.23 \pm 0.01 \mu\text{l/hr}$,平均填充体积为 $237.7 \pm 4.6 \mu\text{l}$ 。酶的施用速率为 $4.5 \mu\text{g/hr}$ 的酶,相当于 $108 \mu\text{g}/\text{天}$ 或约 $2.8 \mu\text{U}/\text{hr}$,等于 $67 \mu\text{U}/\text{天}$ 。2004型ALZET®渗透泵在30天时被取出。

[0439] 2006型历时42天的平均泵送速率为 $0.15 \pm 0.01 \mu\text{l/hr}$,平均填充体积为 $237.2 \pm 3.0 \mu\text{l}$ 。酶的施用速率为 $2.7 \mu\text{g/hr}$ 的酶,相当于 $65 \mu\text{g}/\text{天}$ 或约 $1.7 \mu\text{U}/\text{hr}$,等于 $40 \mu\text{U}/\text{天}$ 。2006型ALZET®渗透泵在44天时被取出。

[0440] 图15C和图15D分别显示比较了已经采用2004型或2006型ALZET®渗透泵施用20NHS PEG-htCBS C15S的小鼠的血浆中的代谢物水平和CBS活性的图。尽管2004型比2006型泵分配的酶多67%,但观察到两组小鼠具有相似的血浆代谢物图谱。在20NHS PEG-

htCBS C15S治疗的小鼠中观察到Hcy的血浆水平大幅减少,而Cys血浆水平仅有适度增加。

[0441] 实施例15.在K0和I278T小鼠中长期连续施用20NHS PEG-htCBS C15S预防骨质疏松症

[0442] 使用实施例1中的方案,使用双能量X射线吸收测定法(DEXA)分析在 K0和I278T中长期连续施用20NHS PEG-htCBS C15S的作用。

[0443] A.K0小鼠的骨矿化和身体组成

[0444] 通过DEXA分析以下三组小鼠的骨矿物质密度(BMD)和骨矿物质含量(BMC):+/-健康杂合对照($n=4M+6F$)、受影响的K0对照($n=5M+13F$)和 20NHS PEG-htCBS C15S(C15S/ME-200GS)治疗的K0小鼠($n=6M+15F$)。20NHS PEG-htCBS C15S治疗的小鼠从第2天至约5个月每周三次皮下(SC) 施用7.5mg/kg。所有-/-K0小鼠治疗持续最初的5W(2至35日龄)以防止 新生儿致死。

[0445] 图16A、图16B、图16C、图16D和图16E分别是比较三组小鼠的BMD (g/cm^2)、BMC (g)、总质量(g)、瘦体重(g)和脂肪含量(%)的图。表19提供了用于确定治疗组与两个对照组相比的差异的显著性的P值。

[0446] 表19.在K0小鼠中DEXA测定的参数的P值

	BMD	BMC	总质量	瘦体重	脂肪含量
+/-健康vs.-/-受影响的	<0.001	0.011	0.045	0.675	<0.001
+/-健康对照vs.治疗的	0.006	0.609	0.749	0.160	0.071
-/-受影响对照vs.治疗的	<0.001	<0.001	0.027	0.049	0.045

[0448] P值为0.05被设定为确定显著性的阈值。治疗组具有显著高于两个对照组的BMD。治疗组还具有比敲除对照显著更高的BMC、总质量、瘦体重和脂肪含量。因此,用20NHS PEG-htCBS C15S治疗K0小鼠完全防止了严重的骨质疏松症并改善了身体组成(总质量、瘦体重&脂肪含量)。

[0449] B.K0小鼠的血浆代谢物

[0450] 在20NHS PEG-htCBS C15S治疗的K0小鼠中,在整个研究过程中每两周一次测量Hcy、Cth和Cys的血浆水平,并示于图16F中。在第41天首次采集血液样品(未显示实时零点,而是显示注射后72小时的代谢物水平),然后在第45天开始每两周一次采集样品。观察到Hcy的水平(中线)从第45天的约180 μM 降低至第45天的约90 μM ,并在整个研究期间保持稳定在这些水平。Cys的水平(顶线)用治疗从第45天的小于100 μM 正常化至第45天的约200 μM ,并在研究过程中维持。在整个研究期间,Cth的水平(底线)在50 μM 附近振荡。

[0451] 如上所述使用相同的小鼠/组测定血浆代谢物。在向20NHS PEG-htCBS C15S治疗的K0小鼠(每种代谢物的右侧柱)末次注射后24小时测定代谢物 Hcy、Cth、Cys和Met的终点水平,并与未经治疗的健康+/- (左侧柱) 和受 影响的K0小鼠(中间柱)进行比较,如图16G所示。表20提供了用于确定 治疗组与两个对照组相比代谢物水平差异的显著性的P值。

[0452] 表20.K0小鼠的代谢物水平变化的P值

	Hcy	Cth	Cys	Met
+/-健康对照vs.-/-受影响对照	<0.001	<0.001	<0.001	0.133
+/-健康对照vs.-/-治疗的	<0.001	<0.001	0.024	0.039
-/-受影响对照vs.-/-治疗的	0.005	0.005	0.005	0.005

[0454] P值为0.01被设定为确定显著性的阈值。与未经治疗的K0小鼠相比，在接受20NHS PEG-htCBS C15S的K0小鼠中，观察到Hcy的水平显著下降，观察到Cth水平显著增加，Cys水平正常化。观察到Met水平在未经治疗的K0小鼠中略微升高，但在各组之间没有显著性差异。

[0455] 因此，观察到向K0小鼠连续长期施用20NHS PEG-htCBS C15S与未经治疗的K0小鼠相比显著改善了Hcy、Cth和Cys血浆水平。Cys的血浆水平正常化(即与健康+/-小鼠值无显著差异)为健康+/-小鼠值。观察到代谢物数据与通过DEXA确定的表型相关。

[0456] C.I278T小鼠的骨矿化和身体组成

[0457] 通过DEXA对以下三组I278T小鼠分析骨矿物质密度(BMD)和骨矿物质量(BMC)：+/-健康杂合对照(n=10M+11F)、-/-受影响的纯合I278T对照(n=6M+8F)和20NHS PEG-htCBS C15S治疗的I278T小鼠(n=6M+6F)。从6月龄直至13月龄，每周3次对20NHS PEG-htCBS C15S(C15S/ME-200GS)治疗的I278T小鼠皮下(SC)施用7.5mg/kg。图17A、图17B、图17C、图17D和图17E分别是比较三组小鼠的BMD(g/cm²)、BMC(g)、总质量(g)、瘦体重(g)和脂肪含量(%)的图。表21提供了用于确定治疗组与对照组相比的差异的显著性的P值。

[0458] 表21.在I278T小鼠中DEXA测定的参数的P值

	BMD	BMC	总质量	瘦体重	脂肪含量
+/-健康vs.-/-受影响的	<0.001	<0.001	<0.001	0.001	<0.001
+/-健康对照vs.-/-治疗的	0.473	0.832	<0.001	0.037	<0.001
-/-受影响对照vs.-/-治疗的	<0.001	<0.001	0.027	0.331	<0.001

[0460] P值为0.05被设定为确定显著性的阈值。与健康杂合小鼠相比，在受影响的I278T小鼠中所有的DEXA测定参数都显著降低。与未经治疗的I278T小鼠相比，用20NHS PEG-htCBS C15S治疗I278T小鼠导致除瘦体重之外的所有参数得到显著修正。事实上，观察到骨矿化(BMD)值在健康杂合对照和20NHS PEG-htCBS C15S治疗的I278T小鼠之间是无法区分的。因此，用20NHS PEG-htCBS C15S治疗I278T小鼠还防止了严重的骨质疏松症并改善了身体组成(总质量、瘦体重&脂肪含量)。

[0461] D.I278T小鼠的血浆代谢物

[0462] 如上所述使用相同的小鼠/组测定血浆代谢物并相互比较。代谢物Hcy、Cth、Cys和Met的血浆水平在图17F中示出。-/-健康对照的代谢物水平用左侧柱表示，-/-受影响对照的代谢物水平用中间柱表示。20NHS PEG-htCBS C15S治疗的小鼠的每种代谢物的水平用右侧柱表示。表22显示用于确定+/-健康对照、-/-受影响对照和20NHS PEG-htCBS C15S治疗的I278T小鼠之间血浆代谢物水平差异的显著性的P值。

[0463] 表22:血浆代谢物变化的P值

	Hcy	Cth	Cys	Met
+/-健康vs.-/-受影响的	<0.001	0.667	<0.001	0.021
+/-健康对照vs.治疗的	<0.001	<0.001	<0.001	0.140
-/-受影响对照vs.治疗的	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

[0465] P值为0.01被设定为确定显著性的阈值。与未经治疗的受影响的I278T对照相比，在接受20NHS PEG-htCBS C15S的I278T小鼠中观察到Hcy的水平显著降低，观察到Cth水平显著增加，并且Cys水平得到显著改善但未正常化。在未经治疗的受影响的I278T小鼠中

Met水平略微升高,并且 在治疗后在I278T小鼠中显著正常化至+/-杂合小鼠水平。

[0466] 这些结果与使用K0小鼠的DEXA研究中的结果类似,除了在治疗的 I278T组中未观察到Cys水平正常化至+/-水平。因此,与未经治疗的-/-纯 合受影响的小鼠相比,向I278T小鼠连续长期施用20NHS PEG-htCBS C15S 显著改善了Hcy、Cth、Cys以及Met血浆水平。观察到这些代谢物数据证 实了通过DEXA评估的表型。

[0467] 因此,在K0和I278T两种小鼠模型中,长期连续施用20NHS PEG-htCBS C15S预防骨质疏松症并改善身体组成,并且有效改善与高胱氨酸尿症相关的代谢物水平。

[0468] 实施例16.连续长期施用200MA0B PEG-htCBS C15S改善I278T小鼠的肝脏代谢和功能,减少炎症并使血浆脂质正常化

[0469] 观察到向I278T小鼠施用200MA0B PEG-htCBS C15S以改善肝脏葡萄 糖代谢、氧化还原状态和甲基化潜力以及脂质代谢。观察到肝脏功能不受 影响,并且通过治疗观察到炎症性细胞因子和血浆脂质正常化。

[0470] A. 长期施用200MA0B PEG-htCBS C15S对I278T小鼠的肝脏功能和脂 质代谢的作用

[0471] 在用200MA0B PEG-htCBS C15S长期治疗后,在I278T小鼠中测量血 浆生物标志物以分析肝脏功能、炎症和血浆脂质水平。分析三组I278T小 鼠:+/-健康杂合对照(n=3)、-/-受影响的纯合对照(n=3) 和200MA0B PEG-htCBS C15S治疗的I278T小鼠(n=3)。200MA0B PEG-htCBS C15S治 疗的小鼠从6月龄直至13月龄每周3次皮下(SC) 施用7.5mg/kg。在血浆中 测量丙氨酸转氨酶(ALT)、天冬氨酸转氨酶(AST) 和碱性磷酸酶(ALP) 的酶活性;细胞因子IL-12(p40)、IL-12(p20)、IL-13、G-CSF、MCP-1和TNF- α 的浓度;以及血浆脂质(总胆固醇、HDL和LDL胆固醇和甘油三酯) 的浓度 (结果未显示)。观察到肝脏功能不受影响,因为AST、ALT和ALP血浆活 性在参考范围内。观察到炎症性细胞因子特别是IL-12(p40) 和IL-13在未 经治疗的I278T小鼠中升高而对于治疗组则正常化。血浆脂质组显示未经 治疗的I278T小鼠与健康+/-对照相比具有显著更高的总胆固醇、HDL和 LDL胆固醇,但具有显 著降低的甘油三酯。在200MA0B PEG-htCBS C15S 治疗的I278T小鼠中脂质图谱完全正常化。

[0472] B. 长期施用200MA0B PEG-htCBS C15S对I278T小鼠的肝脏代谢的作 用

[0473] 除了上述生物标志物之外,还进行核磁共振(NMR) 代谢组学以分析相 同小鼠的肝 脏组织,来研究用200MA0B PEG-htCBS C15S长期治疗对I278T 小鼠的作用。将来自肝脏组织的代谢物提取到亲水性和亲脂性溶剂中,并 使用NMR分别定量。

[0474] 亲水部分中的糖原、葡萄糖、谷胱甘肽(GSH)、总谷胱甘肽和甲基基团 的浓度显示 在图18A中。左侧柱表示+/-健康对照的浓度,中间柱表示-/-受 影响对照的浓度。20NHS PEG-htCBS C15S治疗的小鼠的浓度用右侧柱表 示。对于疏水部分,在图18B中显示了总不饱和脂肪酸(UFA)、多不饱和 脂肪酸(PUFA)、t-脂肪酸、 $(CH_2)_n$ 脂质和总脂质。左侧柱表示 +/-健康对照 的浓度,中间柱表示-/-受影响对照的浓度。20NHS PEG-htCBS C15S治疗 的小鼠的浓度用右侧柱表示。观察到向I278T小鼠施用200MA0B PEG-htCBS C15S改善了肝脏葡萄糖代谢、氧化还原状态和甲基化潜力以及 脂质代谢。

[0475] 实施例17.用20NHS PEG-htCBS C15S长期治疗改善I278T小鼠的眼睛缺陷

[0476] 在I278T(+/-) 健康杂合对照小鼠、未经治疗的-/-受影响的纯合对照小 鼠和

20NHS PEG-htCBS C15S治疗的-/-纯合I278T小鼠中测量血浆中代谢物水平的变化。20NHS PEG-htCBS C15S (C15S/ME-200GS) 治疗的小鼠从2日龄直至4月龄每周3次皮下(SC) 施用7.5mg/kg。从6周到4个月的血浆代谢物水平变化显示在图19A中。由于小鼠从2日龄开始接受治疗,在注射后72小时开始测量水平。

[0477] 如所预期的那样,未经治疗的纯合I278T对照与健康杂合对照相比具有显著升高的Hcy水平和降低的Cys水平,如图19A所示。未经治疗的纯合I278T小鼠中的Hcy水平在研究期间在大约400μM至440μM波动,这证明了由于缺少功能性CBS而导致的Hcy连续累积。在20NHS PEG-htCBS C15S治疗的I278T小鼠中,Hcy水平从230μM降低至约70μM,并在整个研究的剩余时间维持在该水平。另外,在整个研究期间20NHS PEG-htCBS C15S的活性导致血浆Cth累积至大约50μM,并且更重要的是导致血浆Cys水平正常化至大约230μM,在整个研究中维持在该水平。

[0478] 对来自I278T小鼠的眼睛进行分析并在三组之间进行比较。分别在图19B和图19C中比较健康的杂合对照和未经治疗的-/-受影响的I278T对照,观察到未经治疗的纯合对照具有更少且更薄的小带纤维,其终止于恰好在子午行上方的晶状体赤道处,并且不在晶状体的后表面上生长。在如图19D 和图19E所示的来自20NHS PEG-htCBS C15S治疗的小鼠的样品中,观察到在晶状体背面上富集小带纤维密度和小带纤维“再生长”体征。这些观察结果证明,用20NHS PEG-htCBS C15S长期治疗对I278T纯合小鼠的眼睛缺陷具有积极作用。

[0479] 实施例18.施用20NHS PEG-htCBS C15S和Met限制饮食的组合使I278T小鼠的Hcy水平正常化

[0480] 在I278T小鼠中进行饮食研究并分析它们。10周龄小鼠的血浆代谢物: +/- I278T(对照)、-/- I278T(阴性对照),和用20NHS PEG-htPBS (OT-58)治疗的-/-小鼠。每组进一步分成亚组:一组接受常规饮食(8.2g/kg Met TD.01084饮食+锌水)(REG),另一组接受甲硫氨酸限制饮食(0.5g/kg Met TD.110591饮食+甜菜碱水)(MRD)。治疗开始于W5龄时。

[0481] 图20A显示了6组中的Hcy水平。在接受REG饮食的-/-小鼠中观察到高水平的Hcy(356μM,其与上文使用I278T小鼠的实验一致)。在接受REG饮食的治疗组中观察到Hcy的水平显著降低(51μM)。在接受MRD饮食的-/-小鼠中也观察到相对高水平的Hcy(41μM),其通过OT-58治疗(2 μM,相比于在接受MRD的+/-中为4μM)正常化。

[0482] 图20B显示了6组中的Cth的水平。在接受两种饮食的-/-OT-58治疗的小鼠中观察到高水平的Cth,REG饮食为113μM,MRD饮食为10μM,并且该水平由于底物可用性而在接受REG饮食的小鼠中更高。对于剩余组观察到REG与MRD饮食之间的相似趋势,这证明了高水平的Cth(特别是在接受REG的-/-中)起因于饮食。

[0483] 图20C显示了6组中Cys的水平。观察到Cys水平仅在接受REG饮食的-/-小鼠中大幅降低,而观察到MRD饮食和/或OT-58治疗使血浆Cys水平正常化。

[0484] 图20D显示了6组中Met的水平。在接受REG饮食的-/-小鼠中观察到血浆Met水平高(1313μM),这是以前在接受标准饮食的I278T小鼠中没有观察到的。如此高的Met水平在以前仅在D17-19未经治疗的CBS KO小鼠中观察到。在接受PBS注射的接受REG饮食的-/-I278T小鼠中的高Met水平可能是由于在该实验中用作对照饮食的REG饮食中的Met含量与动物设施提供的STD饮食相比较高。

[0485] 然而,观察到在接受REG饮食的-/-小鼠中的OT-58治疗大幅降低Met 的水平(201 μ M至66 μ M),尽管其没有使该水平正常化。观察到接受MRD 饮食的小鼠的Met水平是正常的或低于正常水平,显示治疗的轻微作用。

[0486] 因此,观察到Met限制饮食与施用20NHS PEG-htCBS C15S的组合使 I278T小鼠的代谢物水平正常化。在高胱氨酸尿症受试者中20NHS PEG-htCBS C15S (OT-58) 与无限制(不仅仅是放宽松的) 饮食共同施用导致 Hcy减少至50 μ M。

[0487] 实施例19:20NHS PEG-htCBS C15S在大鼠中的药代动力学

[0488] A.单剂量药代动力学

[0489] 为了评估20NHS PEG-htCBS C15S在大鼠中的药代动力学,通过血管 内 (IV) 或皮下 (SC) 途径向野生型Sprague Dawley大鼠注射单剂量的20NHS PEG-htCBS C15S。使用与表23中所示相同或非常相似的研究设计将三个 单独的单剂量PK研究组合起来。调整第三(重复剂量) PK研究(组7-9)的设计以允许在第一剂量之后提取数据,并且因此允许它们与单剂量PK研究(组1-6)组合。在表23中列出的指定时间收集血浆,并使用实施例1中详 述的方法分析CBS活性。

[0490] 表23.设计使用20NHS PEG-htCBS C15S对Sprague Dawley大鼠的单剂 量(组1-6) 和重复剂量(组7-9)的PK研究

组	大鼠 (nM/nF)	途径	剂量 (mg/kg)	采样 (首次注射后的小时)
1	2M/2F	IV	4	0, 0.083, 0.167, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 12, 24, 72, 120
2		SC	8	0, 0.5, 2. 4, 8, 12, 24, 48, 72, 96, 120, 168
3		SC	24	
4	3M/0F	IV	4	0, 0.083, 0.167, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 12, 24, 72, 120
5		SC	8	0, 0.5, 2. 4, 8, 12, 24, 48, 72, 96, 120, 168
6		SC	24	
7	3M/3F (主要)+ 3M/3F (恢复)	SC	4	主要组: 0, 24, 48, 240, 264, 288, 312, 336, 360, 384, 408
8		SC	8	
9		SC	24	恢复组: 0, 8, 12, 32, 38, 404, 432, 476, 527, 577

[0492] 在单次IV或SC推注剂量为4 (IV)、8 (SC) 和24mg/kg (SC) 后,20NHS PEG-htCBS C15S 在雄性和雌性大鼠中的比活性显示在图21A和图21B中。经由IV注射向雄性和雌性大鼠施用20NHS PEG-htCBS C15S的结果几乎是 重叠的。然而,在经由SC途径单次施用8或24mg/kg 的20NHS PEG-htCBS C15S后,在雄性和雌性之间观察到实质性差异。根据图21A (4mg/kg IV) 和图21B (8mg/kg和24mg/kg SC) 的结果计算的雄性和雌性的IV和SC途 径的PK参数显示在表24中。SC的20NHS PEG-htCBS C15S在大鼠中的 生物利用度具有强性别依赖性,雄性 (19-21%) 比雌性(约36%)吸收更少,并 且与在H0小鼠中观察到的生物利用度(52-83%) 相比,在大鼠中的生物利 用度大幅降低。

[0493] 表24.20NHS PEG-htCBS C15S在Sprague Dawley大鼠中的PK参数

PK 参数	单位	SC 雄性	SC 雌性	SC 雄性	SC 雌性	IV 雄性	IV 雌性
剂量	mg/kg	8	8	24	24	4	4
AUC _{0-t} (观察面积)	mU·h/μl	2703	4505	9269	13135	7231	6165
AUC _{0-t} /剂量	mU·h/μl/(mg/kg)	338	563	386	547	1808	1541
生物利用度	%	18.7	36.5	21.3	35.5	100	100
[0494] t _{1/2-A}	h	14.6	8.9	13.6	13.0	N/A	N/A
t _{1/2-E}	h	44.2	40.1	51.2	41.1	40.0	34.8
t _{max} (观察)	h	48	24	38	48	N/A	N/A
c _{max}	mU/μl	32.7	58.2	110.0	166.3	N/A	N/A
c _{p0}	mU/μl	N/A	N/A	N/A	N/A	182.1	186.2
c _{max} /剂量	mU/μl/(mg/kg)	4.1	7.3	4.6	6.9	N/A	N/A
MRT (面积)	h	65.6	76.8	66.1	79.8	52.9	45.5

[0495] B. 重复剂量药代动力学

[0496] 为了进一步评价大鼠作为进行长期毒性研究的物种,在接受共计9次 每48小时 4mg/kg (低)、8mg/kg (中) 或24mg/kg (高) 20NHS PEG-htCBS C15S SC注射的三组Sprague Dawley大鼠中,测定20NHS PEG-htCBS C15S 的药代动力学。研究设计在表23中概述。该实验进行24天。收集血浆并 使用实施例1中详述的方法分析CBS活性。

[0497] 如图21C所示,以中剂量8mg/kg为例说明随时间绘制的重复剂量PK 研究的CBS比活性(对低剂量 (4mg/kg) 以及高剂量 (24mg/kg) 组观察到类似 的现象)。箭头表示注射。在血浆中未观察到CBS活性的积累,并且在观察 前6次注射后观察到峰CBS活性的大幅下降。观察到大鼠不能够在血浆中 实现预测的CBS活性稳态水平的这种出乎意料的现象在雄性 中比在雌性中 更显著,很可能是由于它们的生物利用度降低(参见上文的单剂量PK数据)。在随后的20NHS PEG-htCBS C15S施用中CBS活性的大幅减弱可能是由于 免疫应答,这证明 大鼠不是适合长期毒性研究的物种。

[0498] 实施例20. 20NHS PEG-htCBS C15S在猴中的药代动力学和药效学 为了评价用于 长期毒性研究的非人灵长类动物模型以及经由异速缩放 比例(allometric scaling) 估算 人类有效剂量,在野生型食蟹猴(Macaca fascicularis) 中进行20NHS PEG-htCBS C15S的 药代动力学和药效学研究。

[0499] A. 20NHS PEG-htCBS C15S在猴中的单剂量药代动力学和药效学

[0500] 对于单剂量PK研究,分别使用三个实验组其中每组4只 (n=2M+2F) 猴子进行实验。第一组经由IV注射接受2mg/kg 20NHS PEG-htCBS C15S。在IV注射后0、0.083、0.16、0.25、0.5、1、2、4、8、24、72、120和192 小时收集血液。第二组和第三组经由SC注射接受2mg/kg 或6mg/kg 20NHS PEG-htCBS C15S。在SC注射后0、1、2、4、8、24、48、72、96、120、192、240 和336小时收集血液。使用实施例1中描述的方法对收集的血浆 分析CBS活性并测定含硫氨基酸代谢物(高半胱氨酸、胱硫醚和半胱氨酸) 水平。

[0501] 在接受单次2mg/kg剂量IV施用或2mg/kg或6mg/kg剂量SC施用 20NHS PEG-htCBS C15S后,猴的CBS比活性随时间变化曲线显示在图22A 中。表25总结了单次注射后对IV和SC施用计算的PK参数。20NHS PEG-htCBS C15S在猴中的生物利用度经计算约为80%,这与在SC剂量为 5mg/kg的H0小鼠中的生物利用度(83%)几乎相同。来自猴血浆的20NHS PEG-htCBS C15S的消除半衰期根据IV数据集计算为67小时,根据SC数据集计算为73小时。 c_{max} 在2mg/kg的SC剂量下计算为40.8mU/ μ L,在6 mg/kg的SC剂量下计算为114.9mU/ μ L。

[0502] 表25列出了在猴中用20NHS PEG-htCBS C15S进行的单剂量实验获得 的PK参数。

[0503] 表25.在向食蟹猴单次IV和SC注射20NHS PEG-htCBS C15S后的PK 参数

PK 参数	单位	SC	SC	IV
剂量	mg/kg	2	6	2
AUC0-t (观察面积)	mU·h/ μ l	5263±299	15743±629	5942±156
AUC0-t/剂量	mU·h/ μ l/(mg/kg)	2761±160	2727±119	2971±78
生物利用度	%	80.8±4.7	79.9±3.5	100
t1/2-A	h	7.9±1.0	9.7±1.0	N/A
t1/2-E	h	72.9±1.1	72.8±1.7	66.7±1.2
tmax (观察)	h	26.2±2.6	32.4±2.4	N/A
c_{max}	mU/ μ l	40.8±2.0	114.9±7.5	N/A
cp0	mU/ μ l	N/A	N/A	96.5±2.8
c_{max}/剂量	mU/ μ l/(mg/kg)	20.4±1.0	19.2±1.3	N/A
MRT (面积)	h	116.3±2.4	116.2±5.0	89.9±2.4
CL (观察面积)	μ l/h/kg	N/A	N/A	933±53

[0506] 由于被注射的猴子是健康的野生型并且具有天然低的Hcy水平(3-5 μ M,相比之下高胱氨酸尿症的小鼠模型为150-500 μ M),20NHS PEG-htCBS C15S的单次IV或SC剂量后的药效学作用是没有预期的。在被注射的猴 子中没有观察到血浆Hcy和Cys水平的显著变化。然而,观察到与初始水 平相比,在IV施用后8小时以及在SC施用后8和48小时,Cth的血浆水平具有显著的峰值,这证明了即使在不受影响的健康猴中也存在PD作用 (图22B)。Cth血浆水平的峰值可能来源于20NHS PEG-htCBS C15S的施用,因为CBS是唯一已知形成Cth的酶。另外,CBS酶通常不在血浆中循环和 发挥功能。观察到施用的20NHS PEG-htCBS C15S在血浆中形成的Cth比 Cys或Hcy清除得更慢。因此,在多剂量研究中进一步监测代谢物(特别是Cth)以确定观察到的PD作用是否更显著或呈剂量依赖性。

[0507] B. 20NHS PEG-htCBS C15S在猴中的重复剂量药代动力学和药效学

[0508] 进行重复剂量实验,其中三个组的4只猴子(主要亚组中为1M+1F以 及恢复亚组中为1M+1F)接受共计6次连续的每72小时1mg/kg (低)、3 mg/kg (中) 或10mg/kg (高) 20NHS PEG-htCBS C15S的SC剂量。在首次注 射后0、32、72、104、144、176、216、248、288、320、360、392和408 小时从主要亚组中的猴收集血液,而恢复亚组中的动物额外在首次注射后 432、456、480、528和696小时的时间时采血。收集血浆并使用实施例1 中描述的方法分析CBS活

性和含硫氨基酸(高半胱氨酸、胱硫醚、半胱氨酸、羊毛硫氨酸(lanthionine)和高羊毛硫氨酸)水平。

[0509] 在6次连续的每3天SC注射后,低(1mg/kg)、中(3mg/kg)和高(10mg/kg)剂量组的20NHS PEG-htCBS C15S比活性随时间变化曲线显示于图23A。向食蟹猴皮下施用20NHS PEG-htCBS C15S在每3天一次给予6次剂量历时16天后导致CBS活性的可预测和剂量依赖性血浆水平。与大鼠重复剂量PK研究的结果相反,在向野生型猴重复施用20NHS PEG-htCBS C15S后未检测到CBS活性的减弱。随后每次施用该酶导致血浆中CBS活性的完全可预测的积累,并且在头三次剂量后基本上达到稳态水平。观察到进一步给药维持稳定状态,其中消除速率等于吸收速率,这导致恒定的峰血浆水平值和谷值血浆水平。对于范围为36至39mU/ μ l这些的剂量,稳态下的平均峰血浆浓度($c_{\text{max-ss}}$)正常化,范围为36至39mU/ μ l,对于范围为23至28mU/ μ l这些的剂量,稳态下的谷值血浆水平($c_{\text{min-ss}}$)正常化,稳态($c_{\text{min-ss}}$)范围为23至28mU/ μ l。观察到20NHS PEG-htCBS C15S的消除速率对数线性的,因此符合一级动力学,使得半数血浆20NHS PEG-htCBS C15S活性降低一半所需的时间是恒定的(数据未显示)。在第16天最后一次剂量后,估算恢复动物的消除半衰期为49至64小时,即与20NHS PEG-htCBS C15S的单次SC剂量后在猴中观察到的半衰期(73小时)相似,这证明多剂量不会改变消除速率。

[0510] 即使在未受影响的健康猴子中(参见单剂量猴数据),也发现胱硫醚(一种生物标志物)的血浆水平指示20NHS PEG-htCBS C15S的活性。对于低(1 mg/kg)、中(3mg/kg)和高(10mg/kg)剂量,接受6次间隔72小时的注射的猴的结果显示在图23B中。Cth水平与血浆中20NHS PEG-htCBS C15S活性的峰值和谷值具有良好的相关性,并观察到也是剂量依赖性的。对高半胱氨酸和半胱氨酸,剂量组之间未观察到明显的差异(数据未显示)。

[0511] 除了由CBS产生的硫醚胱硫醚之外,还有两种硫醚羊毛硫氨酸和高羊毛硫氨酸被选择作为硫化氢产生的替代标志并在选定的时间点在来自重复剂量研究的猴血浆样品中测量之。硫化氢是许多生理过程中新兴的重要的信号分子,因此近年来已被广泛研究用于治疗应用。

[0512] 表26显示在经由SC途径以不同的剂量重复施用20NHS PEG-htCBS C15S后野生型猴的胱硫醚、羊毛硫氨酸和高羊毛硫氨酸的血浆水平。报告了首次注射后0小时(给药前)、176小时和392小时的代谢物水平。数据以单位为 μ M的平均值±平均值的标准误差(SEM)(n=4)表示。

[0513] 表26.在重复施用20NHS PEG-htCBS C15S后猴的硫醚胱硫醚、羊毛硫氨酸和高羊毛硫氨酸的血浆水平

代谢物	1 mg/kg			3 mg/kg			10 mg/kg		
	0 h	176 h	392 h	0 h	176 h	392 h	0 h	176 h	392 h
胱硫醚	982 ±72	4010 ±236	4272 ±333	982 ±72	5629 ±284	5893 ±390	982 ±72	7098 ±12	9318 ±288
羊毛硫氨酸	25±2	46±9	69±7	25±2	103±7	109±9	25±2	281±43	353±38
高羊毛硫氨酸	38±5	64±7	72±5	38±5	64±4	60±10	38±5	50±3	53±4

[0515] 观察到向野生型猴重复施用20NHS PEG-htCBS C15S增加了胱硫醚和羊毛硫氨酸

的血浆水平,但是没有显著影响高羊毛硫氨酸的水平。观察到 胱硫醚和羊毛硫氨酸的增加与剂量成正比,并且观察到羊毛硫氨酸的剂量 依赖性比胱硫醚更加突出。

[0516] C.LC/MS/MS C15S活性测定

[0517] 已经对猴和人血浆样品开发和验证了使用LC/MS/MS开发的生物分析 方法,用于使用胱硫醚M+8 ($^{13}\text{C}_2\text{D}_6$) 作为内标来测定作为CBS活性产物的 胱硫醚M+4,该方法因此可用于在来自药代动力学和毒理学研究以及临床 试验的样品中测定CBS活性。基本上如实施例 1所述但具有以下修改来进 行酶测定。使用氘代D,L-高半胱氨酸M+4以在反应混合物中引发与未标记 的L-丝氨酸的反应。在37°C下孵育30min后,通过使用6N HCl酸化使酶 反应停止,并使用EZ:faast试剂盒 (Phenomenex,USA) 来提取标记的反应 产物(胱硫醚M+4)。简单来说,将50μl样品 (校准标准品, QC样品或酶促 反应) 与100μl内标溶液 (胱硫醚M+8, 0.25ng/μl) 和250μl水在冰上在管中 混合并避光保存。混合物用MCX卡套色谱柱 (Waters) 提取。将洗脱的介质 (6N氨的甲醇溶液) 在45°C下蒸发至干。按照试剂盒制造商的方案,将干的 残余物溶解在EZ:faast试剂盒的洗脱液介质中,衍生化和液-液萃取。固相 萃取采用萃取板自动化以提高通量并节省时间。无论酶的来源如何 (在血浆 样品或对照中存在的 htCBS C15S或C15S/ME-200GS或血浆样品中的痕量 的内源性猴/人CBS),都观察到可测量的胱硫醚M+4浓度。由于在所限制 的浓度范围 (5.00至1500nM) 的较高部分才能测定,因此对校准范围给予了 很多关注。

[0518] 下面的表12-14显示通过使用D,L-高半胱氨酸M+4作为底物的 LC/MS/MS以及通过使用L-[^{13}C -U]-丝氨酸作为底物的放射性测定法测定 的C15S/ME-200GS比活性的比较。酶的比活性以mU/μl表示。“n.d.”代表 “未测定”。表27显示来自用2mg/kg的单剂量IV注射的食蟹猴的一组血 浆样品中的C15S/ME-200GS比活性的比较。

[0519] 表27. 在2mg/kg的单次IV剂量之后,在猴血浆样品中通过两种测定法测 定的C15S/ME-200GS比活性的比较

[0520]

时间 (h)	LC/MS/MS测定	放射性测定	差值 (%)
0.083	88.865	95.741	7.182
0.167	81.065	90.049	9.977
0.25	80.315	88.891	9.648
0.5	81.815	85.342	5.243
1	75.415	80.992	6.887
2	71.765	78.984	9.140
4	67.415	77.809	13.359
8	61.715	70.357	12.283
24	47.815	55.865	14.411
72	28.915	31.601	8.500
120	17.180	18.908	9.142
192	8.490	9.182	7.534

[0521] 表28显示来自用2mg/kg的单剂量SC注射的食蟹猴的一组血浆样品 中的C15S/ME-200GS比活性的比较。

[0522] 表28. 在2mg/kg单次SC剂量之后,在猴血浆样品中通过两种测定法测 定的C15S/

ME-200GS比活性的比较

[0523]	时间(h)	LC/MS/MS 测定	放射性测定	差值(%)
[0524]	1	n.d.	2.842	n.d.
	2	6.479	5.801	11.694
	4	11.108	11.207	0.884
	8	19.913	22.164	10.155
	24	n.d.	40.293	n.d.
	48	32.538	36.658	11.238
	72	27.888	30.670	9.069
	96	20.768	23.536	11.758
	120	16.958	18.608	8.866
	192	9.063	9.496	4.551
	240	5.908	5.963	0.915
	336	2.273	2.441	6.900

[0525] 表29显示来自用6mg/kg的单剂量SC注射的食蟹猴的一组血浆样品 中C15S/ME-200GS比活性的比较(涉及实施例20)。

[0526] 表29.在6mg/kg的单次SC剂量后,在猴血浆样品中通过两种测定法测 定的C15S/ME-200GS比活性的比较

[0527]	时间 (h)	LC/MS/MS测定	放射性测定	差值 (%)
[0528]	1	3.065	3.739	18.029
	2	7.640	9.180	16.778
	4	18.365	22.263	17.877
	8	41.090	50.194	18.138
	24	85.190	111.081	23.308
	48	86.090	109.292	21.229
	72	74.840	95.722	21.815
	96	59.940	73.072	17.971
	120	56.340	56.427	0.154
	192	24.190	31.513	23.238
	240	14.440	19.203	24.801
	336	4.784	5.807	17.608

[0528] 实施例21.从动物的PK/PD数据外推至人

[0529] 在大多数情况下,由于受体或酶靶标的物种特异性序列差异,引起药 效学反应所需的药物的血浆水平在物种间是不同的。例如,由于靶蛋白序 列的物种差异性,针对人蛋 白质的抗体可能对于鼠和人的靶蛋白质具有非 常不同的亲和力。在20NHS PEG-htCBS C15S的情况下,生物学靶标是氨 基酸Hcy,其在物种间是相同的。此外,药物向靶组织的分

布可能因物种而异，并且由于物种特异性生物分布可能通过药物血浆水平不能容易地进行预测。然而，20NHS PEG/C15S的“靶组织”是血浆，导致根据血浆中药代动力学参数的物种间比较预测外推的人值具有高确定度。

[0530] 本文的研究在使用7.5mg/kg的SC剂量的小鼠中进行，并且剂量响应研究证明5mg/kg的剂量在调节生物标志物:Hcy、Cth和Cys的血浆水平方面的功效最大。使用5mg/kg的剂量并且针对人类(70kg)和小鼠(0.025kg)之间的体表面积差异校正，估算0.4mg/kg的剂量是有效的人体等效剂量(HED)。在该剂量下，小鼠的峰血浆水平为50mU/ μ L，AUC为3060 mU·h/mL。由于20NHS PEG-htCBS C15S活性的底物(Hcy和丝氨酸)在物种间是相同的，并且作用位点是血池本身，这些参数提供了对在20NHS PEG-htCBS临床试验中功效所需的目标人血浆水平的准确估计。

[0531] 在CBSDH鼠科动物模型、正常的Sprague Dawley大鼠和正常的食蟹猴中在不同剂量水平下单次和多次SC注射后进行药代动力学研究。另外，在所有3种物种中在IV施用20NHS PEG-htCBS C15S后进行单剂量药代动力学研究，以评价SC施用后所有3种物种的生物利用度。在SC给药后的 小鼠、大鼠和猴模型中的剂量校正的药代动力学参数生物利用度(F%)的总结在表中提供。

[0532] 表30. 物种间OT-58 (htCBS C15S ME-200GS) 的PK参数和根据体表面积缩放对人预测的值

参数: 单位:	T _{1/2} h	AUC/剂量 (mU·h/mL)/(mg/kg)	C _{max} /剂量 (mU/ μ L)/(mg/kg)	t _{max} h	F%
物种/性别					
小鼠/两种性别	20	612	10	24	83%
大鼠/雄性	48	363 (1452)*	4.4 (17)**	35	20%
大鼠/雌性	41	555 (1233)*	7.1 (16)**	29	36%
猴/两种性别	73	2744	20	29	81%
对人预测的值	177	7474	34	NA	NA

[0533] [0534] *表示大鼠的平均AUC/剂量被校正至80%生物利用度，等于1343 (mU·h/mL) / (mg/kg)。**表示大鼠的平均C_{max}/剂量被校正至80%生物利用度，等于16.5 (mU/ μ L) / (mg/kg)。

[0535] 根据这些结果，20NHS PEG-htCBS C15S在所有3种物种中在SC施用后被缓慢吸收至血流中。在单次SC注射后，物种间的吸收半衰期是相似的，在小鼠中为5-12小时，在大鼠中为10-16小时，以及猴子中为8-10小时，这导致在个体动物中T_{max}值的范围为24小时至48小时。消除半衰期(T_{1/2})在小鼠中为20小时，在大鼠中为44.5小时，在猴子中为73小时。在小鼠(5mg/kg剂量)和猴(在1、3或10mg/kg的剂量下)两种模型中，SC使用后吸收到血液中的20NHS PEG-htCBS C15S的百分比(F%)均为>80%。然而，在雄性大鼠中吸收到血液中的20NHS PEG-htCBS C15S仅为20%，在雌性大鼠中为36%。在表30中，将大鼠的AUC/剂量和C_{max}/剂量校正至80%生物利用度(表30中的括号值)以允许在相同的F%下进行种间比较。

[0536] 假设在所有3个物种(小鼠、大鼠和猴)中生物利用度为80%，基于体表面积缩放

进行种间比较,以确定对数体重和各种PK参数(AUC/剂量、C_{max}/剂量和T_{1/2})的对数之间是否存在线性相关性。这些参数的线性相关性表明,将20NHS PEG-htCBS C15S的药代动力学参数按体表面积缩放,因此可能预示着人体值。线性相关性允许根据临床前数据预测临床剂量和给药方案。

[0537] 观察到20NHS PEG-htCBS C15S在物种间的药代动力学参数AUC、C_{max}和T_{1/2}的线性相关性。如图24A(AUC/剂量)、图24B(C_{max}/剂量)和图24C(T_{1/2})所示,观察到每种物种的对数体重与其针对剂量校正的相关PK参数之间的优良线性相关性。通过对每个参数外推至人(70kg)的对数体重,计算人类受试者的AUC/剂量、C_{max}/剂量和T_{1/2}。表30中提供了预测的人体值。

[0538] 外推/预测的在人体中的半衰期约为175小时或7.3天。根据小鼠的有效剂量(5mg/kg)通过异速缩放比例计算预测的人体有效剂量在70kg的人中为0.4mg/kg。使用预测的人C_{max}34mU/ μ L(每mg/kg)和48至72小时的T_{max}范围,构建在人体中的单剂量PK曲线的假想曲线,其在图24D中示出。E截距为43.079mg/ μ L,半衰期为176.737小时。出于比较的目的,在图24D中还显示了来自小鼠和猴的数据。表31提供了对人估算的外推浓度。

[0539] 表31.人的外推浓度

[0540]

时间(小时)	浓度(mg/ μ L)
0	0
1	0.9
2	2
4	4.3
8	8
20	20
48	33.3
72	34
96	28
240	16.7
336	12
408	8.5

[0541] 根据从图24D导出的PK参数,假设在人体中为一级动力学而建模多剂量PK曲线,其在图24E中示出。

[0542] A.在人体中假想的重复剂量PK曲线

[0543] 图24F显示了每周一次以1mg/kg的SC剂量施用时在接近稳态血浆水平期间预测的20NHS PEG-htCBS C15S在人体中的PK值以及预测的在稳态期间的峰水平和谷水平(浅灰色)。图24G显示每周两次以1mg/kg的SC剂量施用时在接近稳态血浆水平期间预测的20NHS PEG-htCBS C15S在人体中的PK值,以及在该给药间隔时预测的在人体中的峰水平和谷水平(浅灰色)。表32比较了每周一次和每周两次以0.33、0.66和1mg/kg的SC剂量施用时预测的20NHS PEG-htCBS C15S在人体中的峰血浆水平和谷血浆水平(假设人体中的生物利用度为80%)。

[0544] 表32.预测的在人体中的血浆水平(假设80%的生物利用度)

人用剂量	1 mg/kg		0.66 mg/kg		0.33 mg/kg	
给药间隔	1x/wk (168h)	2x/wk (84h)	1x/周 (168h)	2x/周 (84h)	1x/周 (168h)	2x/周 (84h)
初始 Cmax, mU/ μ L	34	34	22.6	22.6	11.3	11.3
峰@ SS, mU/ μ L	67.9	123	45.2	82	22.6	41
@ SS, mU/ μ L	46.2	109	30.8	69	15.4	34.5
C1min	22.3	29.0				
Tmax @ SS (hr)	38.2	27.4				

[0545] [0546] 根据这些计算,预测一周一次向人类患者SC施用0.66mg/kg剂量的 20NHS PEG-htCBS C15S导致在稳态下血浆水平范围为31至45mU/ μ L。类似地,预测每周两次施用0.33的剂量(约8次剂量后)导致稳态下血浆 水平范围为35至41mU/ μ L。这些预测假设了如在小鼠和猴中都观察到80% 的皮下生物利用度。还预期这些剂量的20NHS PEG-htCBS C15S产生在有 效的血浆水平范围内的峰血浆水平和谷血浆水平,与小鼠的血浆水平相似 (峰值水平为50mU/ μ L)。另外,这些剂量对应于从单独0.4mg/kg的鼠科动 物研究预测的人有效剂量。临床前物种间的体重和PK参数的线性相关性 允许异速缩放比例(体表面积缩放),以通过比较物种间的值来预测人体中的 PK参数AUC、Cmax和消除半衰期。

[0547] [0547] 观察到预测在人体中的有效剂量的两种方法(直接来自小鼠数据和3个 物种间的异速缩放比例)在有效剂量预测(HED)方面是一致的。因此,假设 80%的生物利用度,每周两次施用0.33mg/kg或每周一次施用0.66mg/kg 的提议剂量可能是人体临床试验中的有效剂量。

[0548] [0548] 相关技术的前述示例及与其有关的限制旨在是示例性的而非排他性 的。在阅读说明书和研究附图后,相关技术的其他限制对于本领域的技术 人员将变得显而易见。

[0549] [0549] 尽管上文已经讨论了多个示例性方面和实施方案,但是本领域技术人 员将获知其的某些修改、置换、添加以及子组合。因此,以下所附权利要 求和下文中引入的权利要求旨在被解释为包括在其真实精神和范围内的所有这些修改、置换、添加和子组合。

[0550] [0550] 在本申请中引用或描述的所有专利、专利申请、专利公开、科学论文 等特此通过引用的方式以其整体并入,以便更全面地描述本申请所属领域 的状态。

```
<?xml version="1.0" encoding="UTF-8"?>
<!DOCTYPE ST26SequenceListing PUBLIC "-//WIPO//DTD Sequence Listing
1.3//EN" "ST26SequenceListing_V1_3.dtd">
<ST26SequenceListing dtdVersion="V1_3"
fileName="790116_43101CN1_SEQUENCE_LISTING.xml" softwareName="WIPO
Sequence" softwareVersion="2.1.2" productionDate="2022-08-15">
    <ApplicantFileReference>790116.43101CN1</ApplicantFileReference>
    <EarliestPriorityApplicationIdentification>
        <IPOfficeCode>US</IPOfficeCode>

    <ApplicationNumberText>61/758138</ApplicationNumberText>
        <FilingDate>2013-01-29</FilingDate>
    </EarliestPriorityApplicationIdentification>
    <ApplicantName languageCode="cn">科罗拉多州立大学董事会法人团体 (
The Regents of the University of Colorado, a body corporate) </ApplicantName>
    <InventionTitle languageCode="cn">用于治疗高胱氨酸尿症的组合物和方法
</InventionTitle>
    <SequenceTotalQuantity>16</SequenceTotalQuantity>
    <SequenceData sequenceIDNumber="1">
        <INSDSeq>
            <INSDSeq_length>1656</INSDSeq_length>
            <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
            <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
            <INSDSeq_feature-table>
                <INSDFeature>

                    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>

                    <INSDFeature_location>1..1656</INSDFeature_location>
                        <INSDFeature_quals>
                            <INSDQualifier>

                                <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>

                                <INSDQualifier_value>genomic DNA</INSDQualifier_value>
                                    </INSDQualifier>
                                    <INSDQualifier
id="q1">

                                <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>

                                <INSDQualifier_value>人 (Homo sapiens) </INSDQualifier_value>
                                    </INSDQualifier>
                                    </INSDFeature_quals>

```


[0003]

```

<INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
                                </INSDQualifier>
                                <INSDQualifier
id="q2">

                                <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>

                                <INSDQualifier_value>人 (Homo sapiens) </INSDQualifier_value>
                                                </INSDQualifier>
                                                </INSDFeature_quals>
                                            </INSDFeature>
                                        </INSDSeq_feature-table>

                                <INSDSeq_sequence>MPSETPQAEVGPTGCPHRSGPHSAKGSLEKGSPEDKEAKEPLWIR
PDAPSRCTWQLGRPASESPHHHTAPAKSPKILPDLKKIGDTPMVRINKIGKKFGLKCELLAKC
EFFNAGGSVKDRISLRMIEDAERDGTLPGDTIIEPTSGNTIGLALAAAVERGYRCIIVMPEKM
SSEKVDVLRALGAEIVRTPTNARFDSPESHVGVAWRLKNEIPNSHILDQYRNASNPLAHYDT
TADEILQQCDGKLDMLVASVGTGGITGIARKLKEKCPGCRIGVDPEGSILAEPPEELNQTEQT
TYEVEGIGYDFIPTVLDRTVVDKWFKNDEEAFTFARMLIAQEGLLCGGSAGSTVAVAVKAA
QELQEGQRCSVILPDSVRNYMTKFLSDRWMLQKGFLKEEDLTEKKPWVWHLRVQELGLSA
PLTVLPTITCGHTIEILREKGFDQAPVVDEAGVILGMVTLGNMLSSLLAGKVQPSDQVGKVIYK
QFKQIRLTDTLGRLSHILEMDHFALVVHEQIQYHSTGKSSQRQMVFVVTайдЛНФВААQE
RDQK</INSDSeq_sequence>
                                </INSDSeq>
                            </SequenceData>
                            <SequenceData sequenceIDNumber="3">
                                <INSDSeq>
                                    <INSDSeq_length>413</INSDSeq_length>
                                    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
                                    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
                                    <INSDSeq_feature-table>
                                        <INSDFeature>

                                <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>

                                <INSDFeature_location>1..413</INSDFeature_location>
                                                <INSDFeature_quals>
                                                    <INSDQualifier>

                                <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>

                                <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
                                                </INSDQualifier>
                                                <INSDQualifier>

```

```

id="q3">

<INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>

<INSDQualifier_value>合成构建体 (synthetic construct) </INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_quals>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>

<INSDSeq_sequence>MPSETPQAEVGPTGCPHRSGPHSAKGSLEKGSPEDKEAKEPLWIR
PDAPSRCTWQLGRPASESPHHHTAPAKSPKILPDILKKIGDTPMVRINKIGKKFGLKCELLAKC
EFFNAGGSVKDRISLRMIEDAERDGTLPKGDTIIEPTSGNTGIGLALAAAVRGYRCIIVMPEKM
SSEKVDVLRALGAEIVRTPTNARFDSPESHVGVAWRLKNEIPNSHILDQYRNASNPLAHYDT
TADEILQQCDGKLDMLVASVGTGGTITGIARKLKEKCPGCRIIGVDPEGSILAEPPEELNQTEQT
TYEVEGIGYDFIPTVLDRTVVDKWFKNDEEAFTFARMLIAQEGLLCGGSAGSTVAVAVKAA
QELQEGQRCVVILPDSVRNYMTKFLSDRWMLQKGFLKEEDLTEKKPWVWHLR</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="4">
<INSDSeq>
<INSDSeq_length>1242</INSDSeq_length>
<INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>
<INSDFeature>

<INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>

<INSDFeature_location>1..1242</INSDFeature_location>
<INSDFeature_quals>
<INSDQualifier>

<INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>

<INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
<INSDQualifier>

id="q4">

<INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>

<INSDQualifier_value>合成构建体 (synthetic construct) </INSDQualifier_value>

```



```
<INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>

<INSDQualifier_value>合成构建体 (synthetic construct) </INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_quals>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>

<INSDSeq_sequence>cgtagaattcaccttgcggcatgctgat</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="6">
<INSDSeq>
<INSDSeq_length>35</INSDSeq_length>
<INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>
<INSDFeature>

<INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>

[0006] <INSDFeature_location>1..35</INSDFeature_location>
<INSDFeature_quals>
<INSDQualifier>

<INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>

<INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
<INSDQualifier
id="q6">

<INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>

<INSDQualifier_value>合成构建体 (synthetic construct) </INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_quals>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>

<INSDSeq_sequence>tacgggtacctaaccggagggtgccaccaccaggc</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
```

```
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="7">
    <INSDSeq>
        <INSDSeq_length>29</INSDSeq_length>
        <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
        <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
        <INSDSeq_feature-table>
            <INSDFeature>

            <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>

            <INSDFeature_location>1..29</INSDFeature_location>
                <INSDFeature_quals>
                    <INSDQualifier>

                    <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>

                    <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
                        </INSDQualifier>
                    <INSDQualifier
id="q7">

[0007]   <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>

        <INSDQualifier_value>合成构建体 (synthetic construct) </INSDQualifier_value>
            </INSDQualifier>
            </INSDFeature_quals>
        </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>

    <INSDSeq_sequence>agtgcgccatggcgtcagaaaccccgag</INSDSeq_sequence>
        </INSDSeq>
    </SequenceData>
    <SequenceData sequenceIDNumber="8">
        <INSDSeq>
            <INSDSeq_length>31</INSDSeq_length>
            <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
            <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
            <INSDSeq_feature-table>
                <INSDFeature>

                <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>

                <INSDFeature_location>1..31</INSDFeature_location>
```

```

<INSDFeature_quals>
  <INSDQualifier>

<INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
  </INSDQualifier>
  <INSDQualifier
id="q8">

<INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>

<INSDQualifier_value>合成构建体 (synthetic construct) </INSDQualifier_value>
  </INSDQualifier>
  </INSDFeature_quals>
  </INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>

<INSDSeq_sequence>atcgcgctcgagtttagcgccagggtgccaccac</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
[0008] <SequenceData sequenceIDNumber="9">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>30</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>

<INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>

<INSDFeature_location>1..30</INSDFeature_location>
  <INSDFeature_quals>
    <INSDQualifier>

<INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
  </INSDQualifier>
  <INSDQualifier
id="q9">

<INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>

```

```

<INSDQualifier_value>合成构建体 (synthetic construct) </INSDQualifier_value>
    </INSDQualifier>
        </INSDFeature_quals>
            </INSDFeature>
        </INSDSeq_feature-table>

<INSDSeq_sequence>ggagatataccatgccgtcagaaacccgc</INSDSeq_sequence>
    </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="10">
    <INSDSeq>
        <INSDSeq_length>30</INSDSeq_length>
        <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
        <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
        <INSDSeq_feature-table>
            <INSDFeature>

<INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>

<INSDFeature_location>1..30</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
        <INSDQualifier>
[0009]
    <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>

    <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
        </INSDQualifier>
        <INSDQualifier
id="q10">

    <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>

    <INSDQualifier_value>合成构建体 (synthetic construct) </INSDQualifier_value>
        </INSDQualifier>
        </INSDFeature_quals>
            </INSDFeature>
        </INSDSeq_feature-table>

<INSDSeq_sequence>gcggggttctgacggcatggtatatctcc</INSDSeq_sequence>
    </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="11">
    <INSDSeq>
        <INSDSeq_length>23</INSDSeq_length>

```

```

<INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>

<INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>

<INSDFeature_location>1..23</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
        <INSDQualifier>

<INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>

<INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
    </INSDQualifier>
    <INSDQualifier
id="q11">

<INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>

<INSDQualifier_value>合成构建体 (synthetic construct) </INSDQualifier_value>
[0010]                                </INSDQualifier>
                                         </INSDFeature_quals>
                                         </INSDFeature>
                                         </INSDSeq_feature-table>

<INSDSeq_sequence>tgggtccgacgggtagccgcac</INSDSeq_sequence>
    </INSDSeq>
    </SequenceData>
    <SequenceData sequenceIDNumber="12">
        <INSDSeq>
            <INSDSeq_length>23</INSDSeq_length>
            <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
            <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
            <INSDSeq_feature-table>
                <INSDFeature>

<INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>

<INSDFeature_location>1..23</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_quals>
        <INSDQualifier>

<INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>

```

```
<INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
                            </INSDQualifier>
                            <INSDQualifier
id="q12">

                            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>

                            <INSDQualifier_value>合成构建体 (synthetic construct) </INSDQualifier_value>
                                            </INSDQualifier>
                                            </INSDFeature_quals>
                                            </INSDFeature>
                                        </INSDSeq_feature-table>

                            <INSDSeq_sequence>gtgcggctaccgtcgaccca</INSDSeq_sequence>
                                            </INSDSeq>
                        </SequenceData>
                        <SequenceData sequenceIDNumber="13">
                            <INSDSeq>
                                <INSDSeq_length>413</INSDSeq_length>
                                <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
                                <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
                                <INSDSeq_feature-table>
                                    <INSDFeature>

                            <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>

                            <INSDFeature_location>1..413</INSDFeature_location>
                                            <INSDFeature_quals>
                                                <INSDQualifier>

                            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>

                            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
                                            </INSDQualifier>
                                            <INSDQualifier
id="q14">

                            <INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>

                            <INSDQualifier_value>截短的人C15S突变CBS多肽</INSDQualifier_value>
                                            </INSDQualifier>
                                            <INSDQualifier
id="q13">
```

```

<INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>

<INSDQualifier_value>合成构建体 (synthetic construct) </INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_quals>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>

<INSDSeq_sequence>MPSETPQAEVGPTGSPHRSGPHSAKGSLEKGSPEDKEAKEPLWIR
PDAPSRCTWQLGRPASESPHHHTAPAKSPKILPDILKKIGDTPMVRINKIGKKFGLKCELLAKC
EFFNAGGSVKDRISLRMIEDAERDGTLKPGDTIIEPTSGNTGIGLALAAAVRGYRCIIVMPEKM
SSEKVDVLRALGAEIVRTPTNARFDSPESHVGVAWRLKNEIPNSHILDQYRNASNPLAHYDT
TADEILQQCDGKLDMLVASVGTGGTITGIARKLKEKCPGCRIIGVDPEGSILAEEPELNQTEQT
TYEVEGIGYDFIPTVLDRTVVDKWFKNDEEAFTFARMLIAQEGLLCGGSAGSTVAVAVKAA
QELQEGQRCVVILPDSVRNYMTKFLSDRWMLQKGFLKEEDLTEKKPWVWHLR</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="14">
<INSDSeq>
<INSDSeq_length>1242</INSDSeq_length>
<INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>
<INSDFeature>

[0012] <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>

<INSDFeature_location>1..1242</INSDFeature_location>
<INSDFeature_quals>
<INSDQualifier>

<INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
<INSDQualifier id="q16">

<INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>

<INSDQualifier_value>截短的人C15S突变CBS核苷酸</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>

```

```

<INSDQualifier
id="q15">

<INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>

<INSDQualifier_value>合成构建体 (synthetic construct) </INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_quals>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>

<INSDSeq_sequence>atgccgtcagaaccccgaggcagaagtgggtccgacggtagccgcaccgt
agcggtccgcattctgcaaaaggcagtctggaaaagggtccccgaagataaagaagccaaagaaccgtgtg
gattcgtccggacgcaccgtcacgttacctggcagctgggtcgatccgcaccatcaccatacg
gctccggcggaaaagtccggaaaattctggatccgtgaagaaaattggtgacaccccgatggatcaacaa
aatcggcaaaaaattcggtctgaaatgcgaactgtggctaaatgtgaattttcaatgcggcggtccgtgaaag
atcgatatctactgcgcattgaagatgctgaacgcgcacggcaccctgaaaccgggtgatacgattatcgaacc
gacctctggcaacacgggtatcggtctggactggcggcggcagtcgttgcattatcgatggc
aaaaaaaaatgagctctgaaaatgttgcgtctggcggaaattgtcgatccgcacatgc
gcttcgacagtccggatccatgtgggttgcattggcgcctgaaaacgaaatccgaattcgacattctggat
cagtatcgtaacgcttagcaatccgtggcgcattacgataccacggccgacgaaatcctgcagcaatgtgatggca
aactggacatcggtcgctctgtgggtaccggcggtaccattacgggcattacggcgttgcattatcgatggc
ccggcgtcgcatccgtgtggatccggaaaggcagtattctggcggaaaccggaaagaactgaaccagaccg
aaaaaccacgtatgaagttgaaggcatcggttacgattttatccgaccgtctggatcgacgttgcggatccgttgc
ggttcaaagcaatgacaaagcggcttacccgttgcacgtatgcgttgcggatccgttgc
tcagcagggtcgacggcgtcgcagtggcagttaaagctgcgcaggactgcaagaaggcttgcgttgc
ctggattctgttgcactacatgacccaaattctgagtgaccgttgcgtcaaaaaggcttgcgttgc
gaagatcgaccgagaaaaaccgtgggtggcacctgcgctaa</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="15">
<INSDSeq>
<INSDSeq_length>1656</INSDSeq_length>
<INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>
<INSDFeature>

<INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>

<INSDFeature_location>1..1656</INSDFeature_location>
<INSDFeature_quals>
<INSDQualifier>

```

<INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>

<INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>

</INSDQualifier>

<INSDQualifier id="q18">

<INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>

<INSDQualifier_value>全长人C15S突变CBS核苷酸</INSDQualifier_value>

</INSDQualifier>

<INSDQualifier id="q17">

<INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>

<INSDQualifier_value>合成构建体 (synthetic construct) </INSDQualifier_value>

</INSDQualifier>

</INSDFeature_quals>

</INSDFeature>

</INSDSeq_feature-table>

[0014] <INSDSeq_sequence>atgccgtcagaaccccgaggcagaagtgggtccgacggtagccgcaccgt
 agcggtccgcattctgcaaaaggcagtctggaaaaagggtccccgaaagataaagaagccaaagaaccgttg
 gattcgtccggacgcaccgtcacgttacctggcagctgggtcgccgcaagcgaatctccgcatcaccatacg
 gctccggcggaaaagtccggaaaattctggcggatatcctgaagaaaatttgtgacaccccgatggttcgatcaacaa
 aatcggcaaaaaattcggtctgaaatgcgaactgctggctaatgtgaattttcaatgcggcggtccgtgaaag
 atcgttatctactgcgcatgtgaagatgctgaacgcgacggcaccctgaaaccgggtgatacgttattatgcgacc
 gacctctggcaacacgggtatcggtctggcactggcggcggcagtcgtggatcgctgcattatcgatggc
 gaaaaaaaaatgagctctgaaaaagttgatgtcctcgctgtggatccggcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgc
 gcttcgacagtccggaatcccatgtgggtgttgcattggcgcctgaaaaacgaaatccgaaattcgacattctggat
 cagtatcgtaacgcgttagcaatccgtggcgcattacgataccacggccgacgaaatccgcgcgttgcgttgc
 aactggacatgtggtcgttgcgtgggtaccggcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgc
 cccggcgtcgcatcggtgtggatccggaaaggcagtattctggcggaaaccggaaagaactgaaccagaccg
 aacaaaccacgtatgaagttgaaaggcatcggttacgatccgcacgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgc
 gttcaaaagcaatgacgaaagaagcccttacctcgacgtatcgatcgatcgatcgatcgatcgatcgatcg
 tcagcagggtcgacggcgtcgactggcagttaaagctgcgcaggactcgatcgatcgatcgatcgatcgatcg
 ctggcggattctgttcgcaactacatgaccaaattctgactgtgaccgttgcgttgcgttgcgttgcgttgc
 gaagatctgaccgagaaaaaccgtgggtggcacctgcgcgtgcaggactgggtctgtccgcaccgttgc
 cgttctgcccgcaccatcactgcggccatcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgc
 acgaaggcaggcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgc
 gagcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgc
 acatcctggaaatggaccatttcgcgtgggtgtgcacgaacagattcaataccatagcaccggcaatcatcg
 cggccaaatggcttgggtcgacggccattgtcgatcgatcgatcgatcgatcgatcgatcgatcgatcg

```

a</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="16">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>551</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>

<INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>

<INSDFeature_location>1..551</INSDFeature_location>
  <INSDFeature_quals>
    <INSDQualifier>

<INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>

<INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
  </INSDQualifier>
<INSDQualifier>
[0015] id="q20">

<INSDQualifier_name>note</INSDQualifier_name>

<INSDQualifier_value>全长人C15S突变CBS多肽</INSDQualifier_value>
  </INSDQualifier>
<INSDQualifier>
id="q19">

<INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>

<INSDQualifier_value>合成构建体 (synthetic construct) </INSDQualifier_value>
  </INSDQualifier>
    <INSDFeature_quals>
      </INSDFeature>
    </INSDFeature_quals>
  </INSDSeq_feature-table>

<INSDSeq_sequence>MPSETPQAEVGPTGSPHRSGPHSAKGSLEKGSPEDKEAKEPLWIR
PDAPSRCTWQLGRPASESPHHHTAPAKSPKILPDLKKIGDTPMVRINKIGKKFGLKCELLAKC
EFFNAGGSVKDRISLRMIEDAERDGTLPKGDTIIEPTSGNTGIGLALAAAVRGYRCIIVMPEKM
SSEKVDVLRALGAEIVRTPTNARFDSPESHVGVAWRLKNEIPNSHILDQYRNASNPLAHYDT
TADEILQQCDGKLDMVASVGTGGITGIARKLKEKCPGCRIIGVDPEGSILAEPPEELNQTEQT

```

[0016]

TYEVEGIGYDFIPTVLDRTVVDKWFKNDEEAFTFARMLIAQEGLLCGGSAGSTVAVAVKAA
QELQEGQRCVVILPDSVRNYMTKFLSDRWMLQKGFLKEEDLTEKKPWWWHLRVQELGLSA
PLTVLPTITCGHTIEILREKGFDQAPVVDEAGVILGMVTLGNMLSSLLAGKVQPSDQVGKVIYK
QFKQIRLTDTLGRLSHILEMDHFALVVHEQIQYHSTGKSSQRQMVFVVAIDLLNFVAAQE
RDQK</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
</ST26SequenceListing>

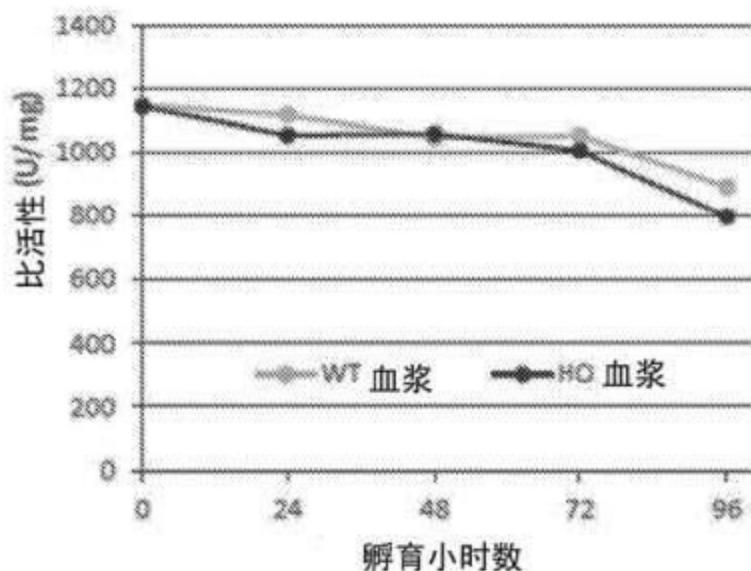


图1A

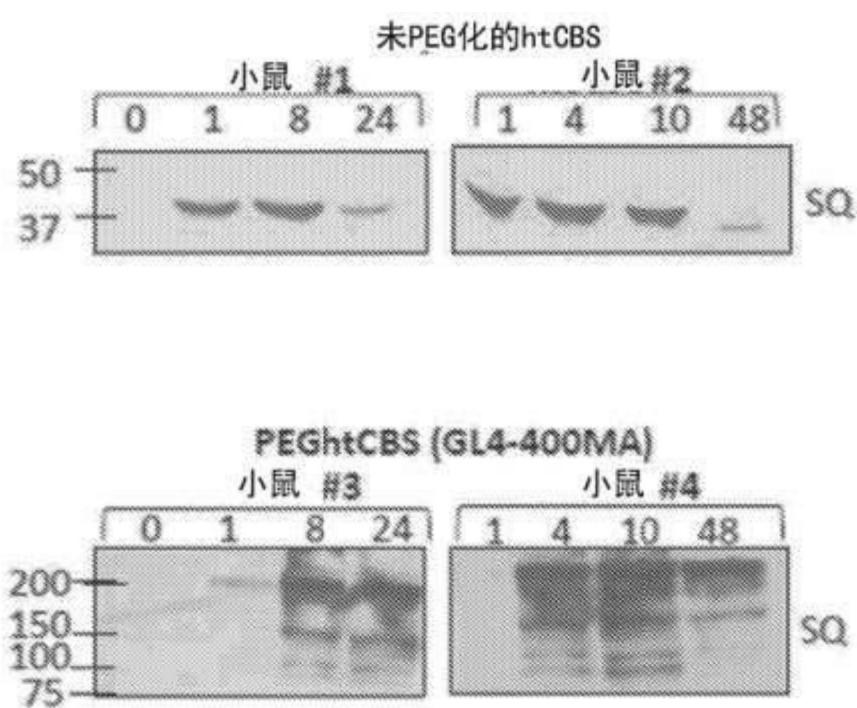


图1B

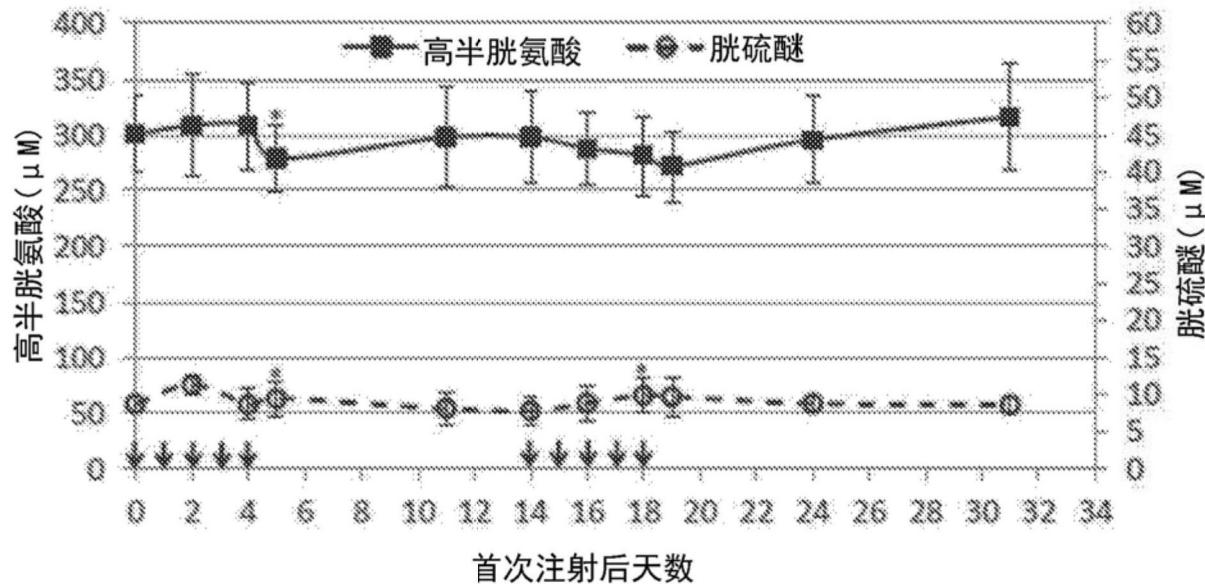


图2

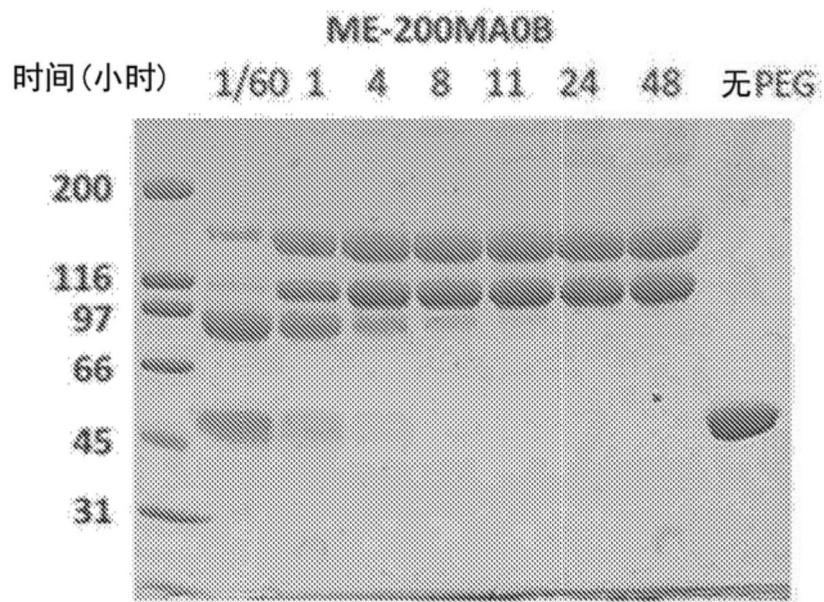


图3

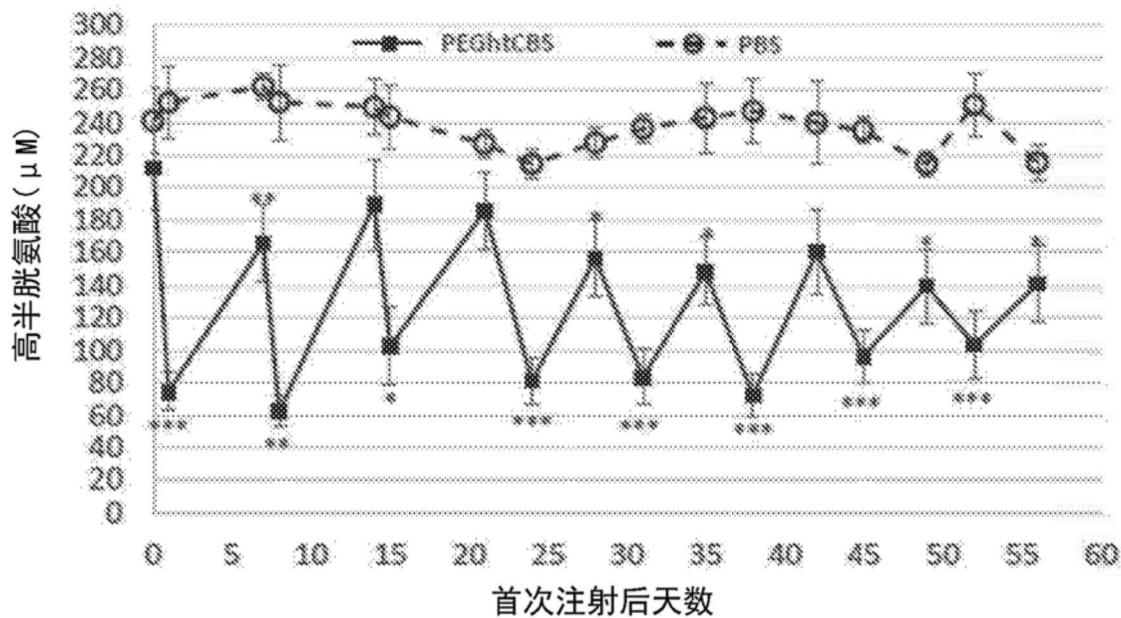


图4A

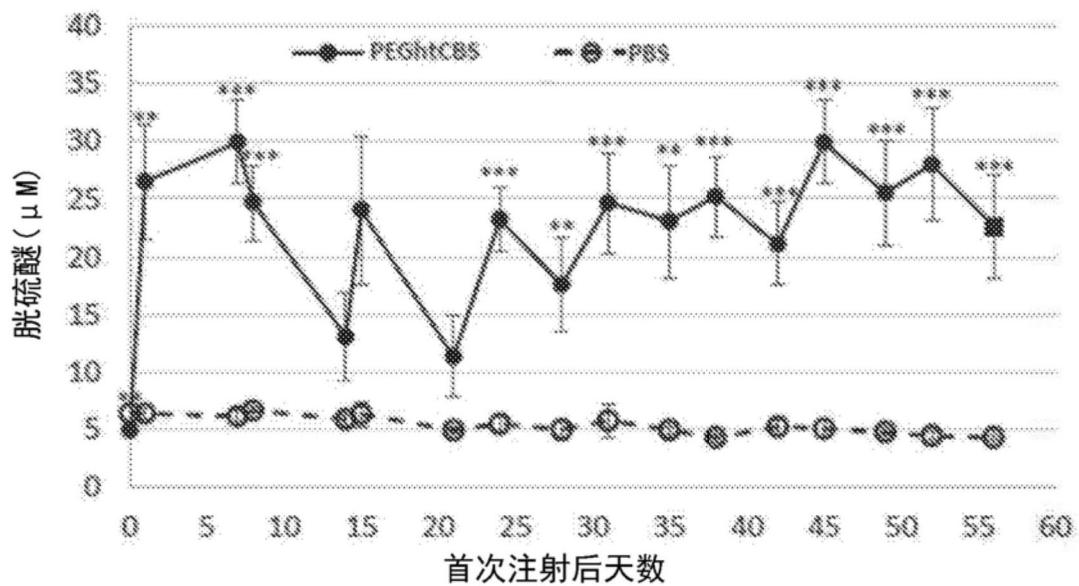


图4B

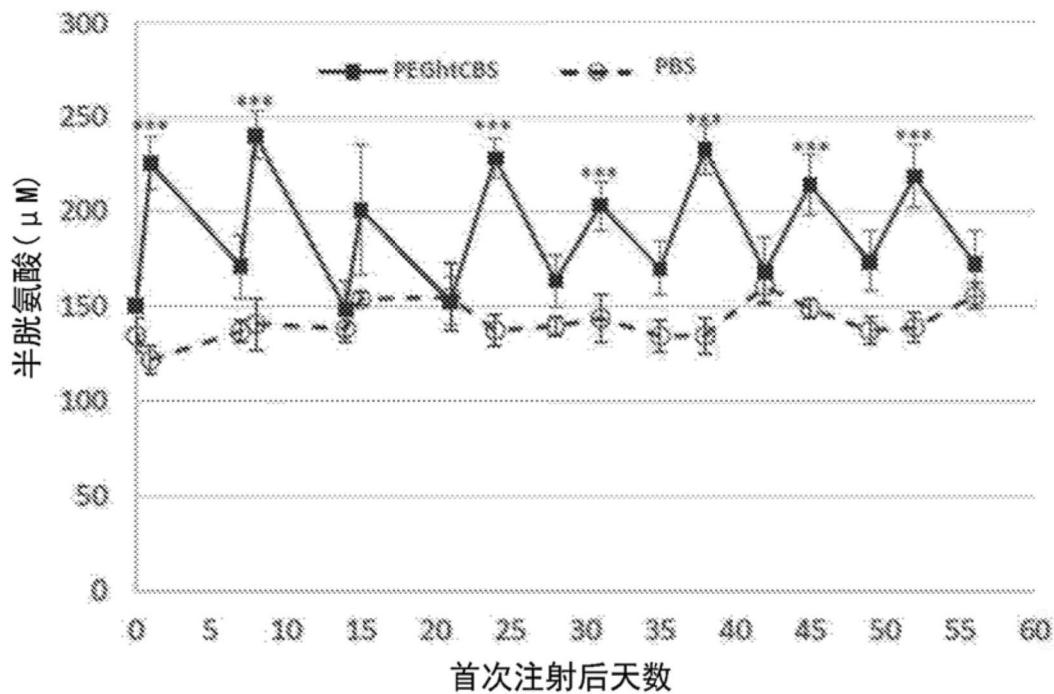


图4C

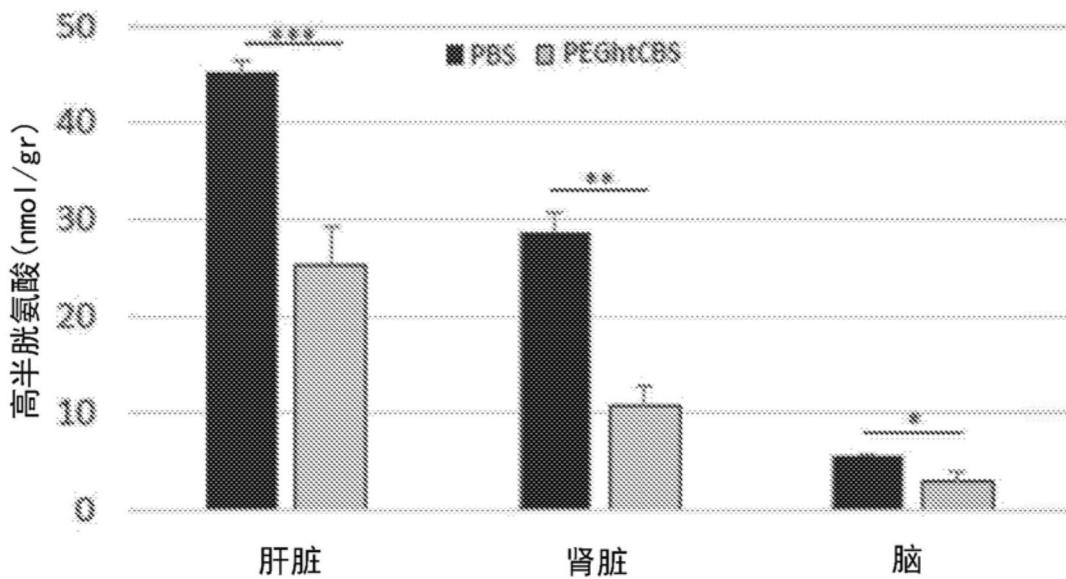
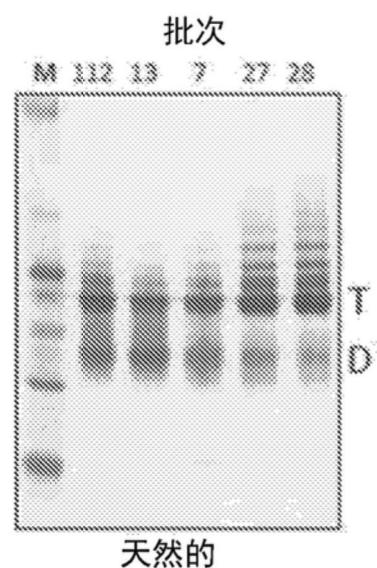
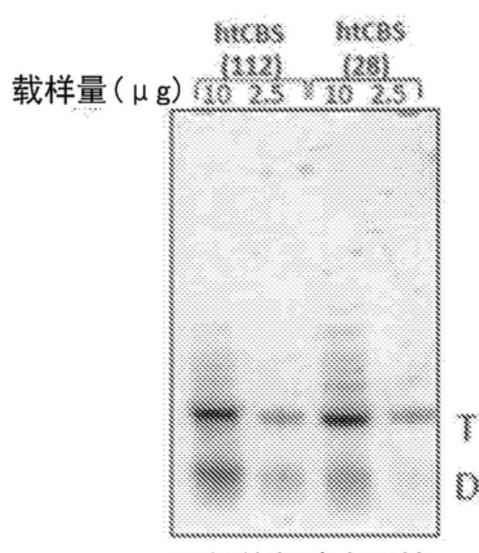


图4D



天然的

图5A



天然的凝胶内活性

图5B

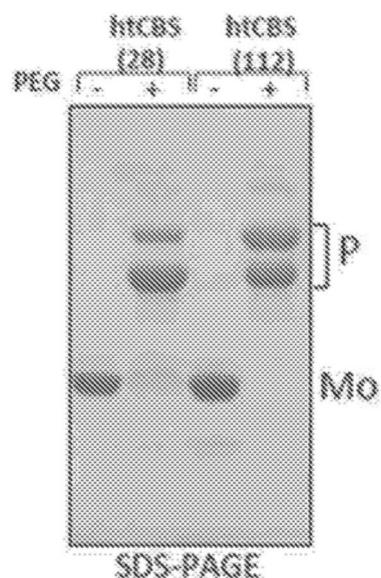


图5C

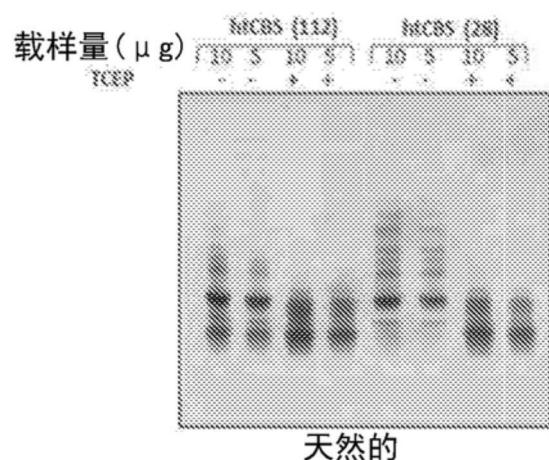


图5D

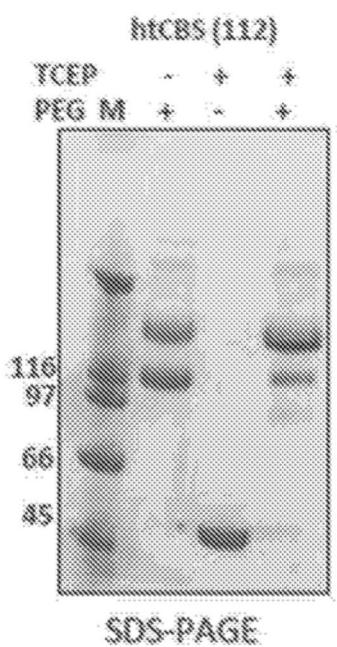


图5E

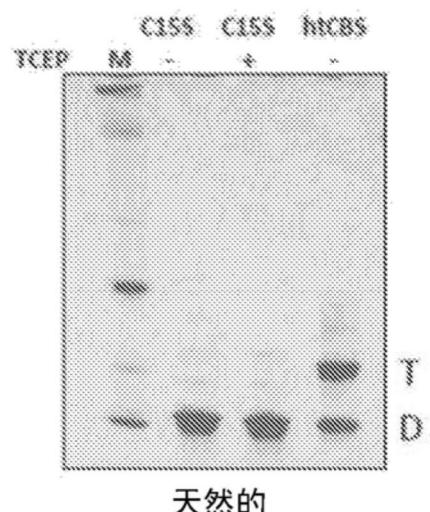


图5F

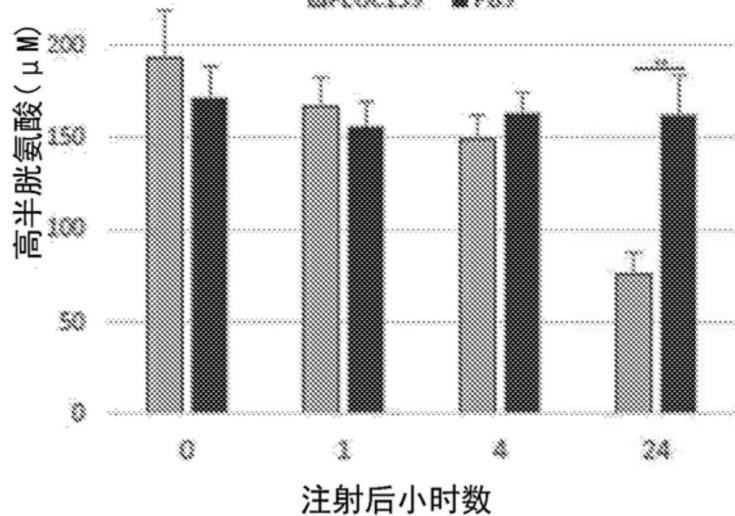
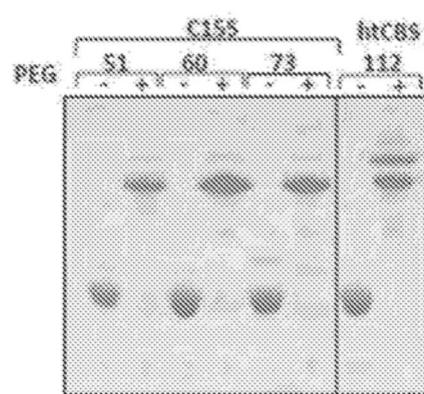
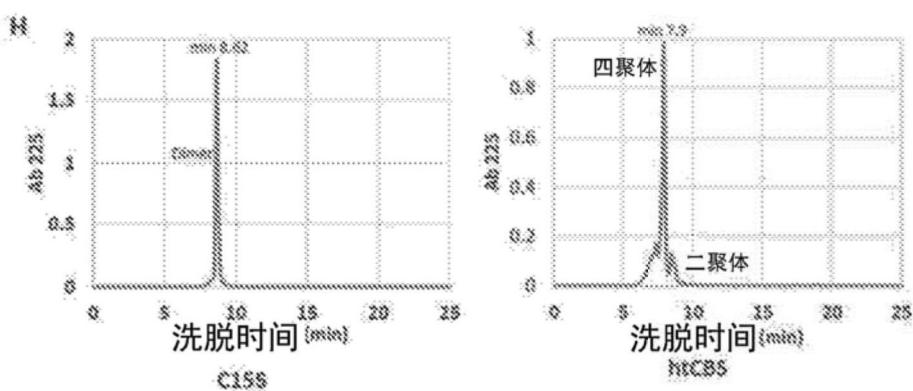


图 6A

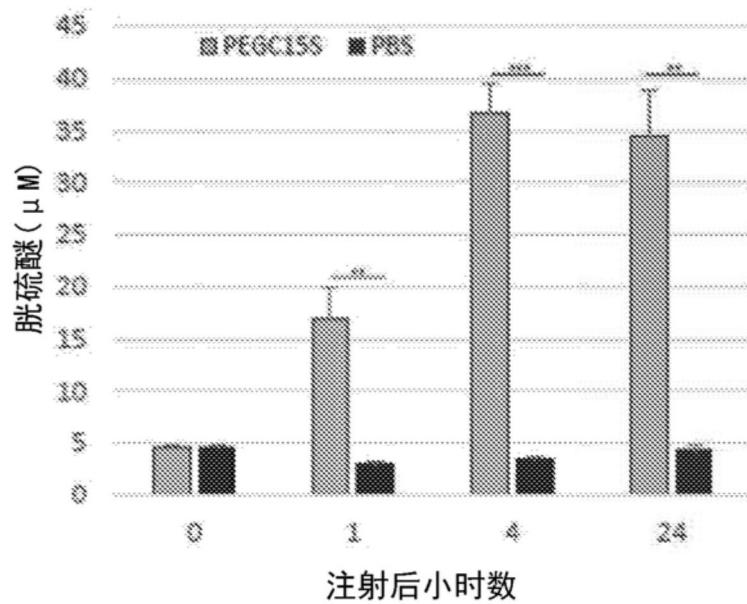


图 6B

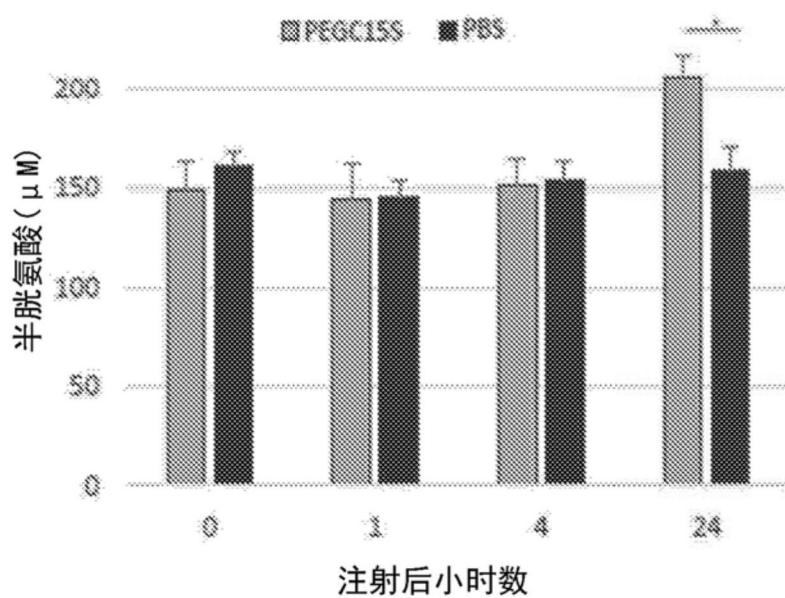


图 6C

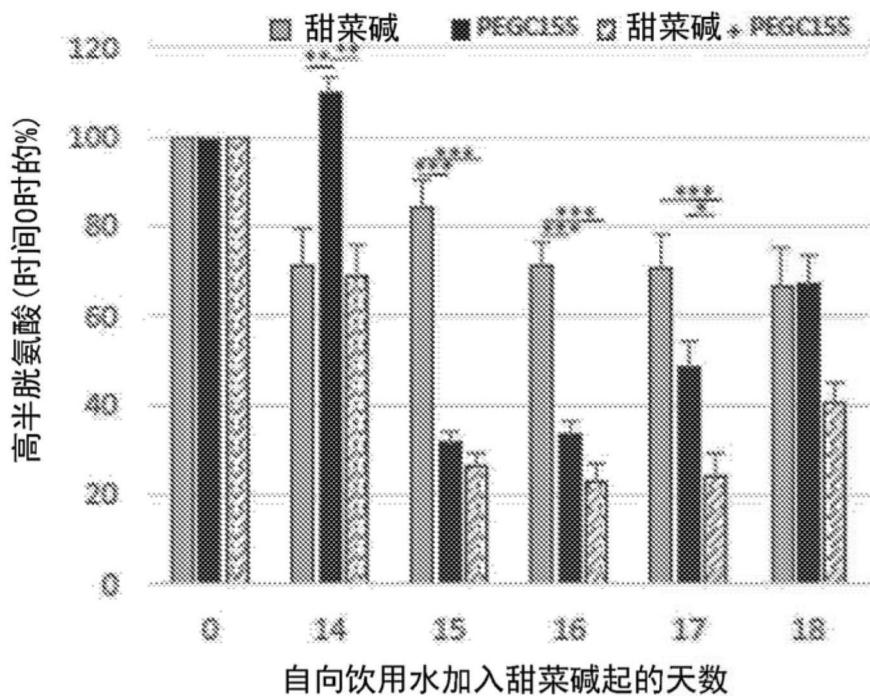


图7A

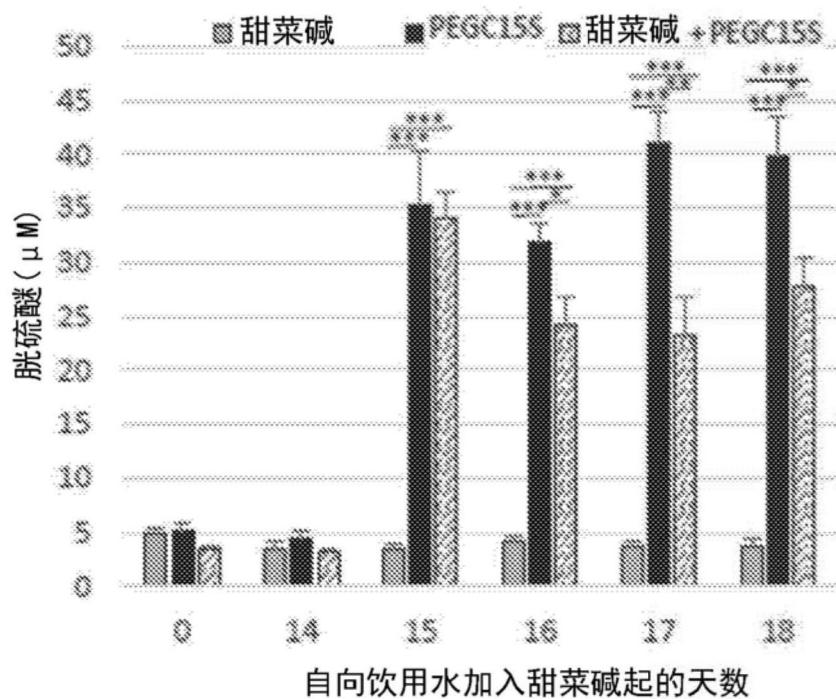


图7B

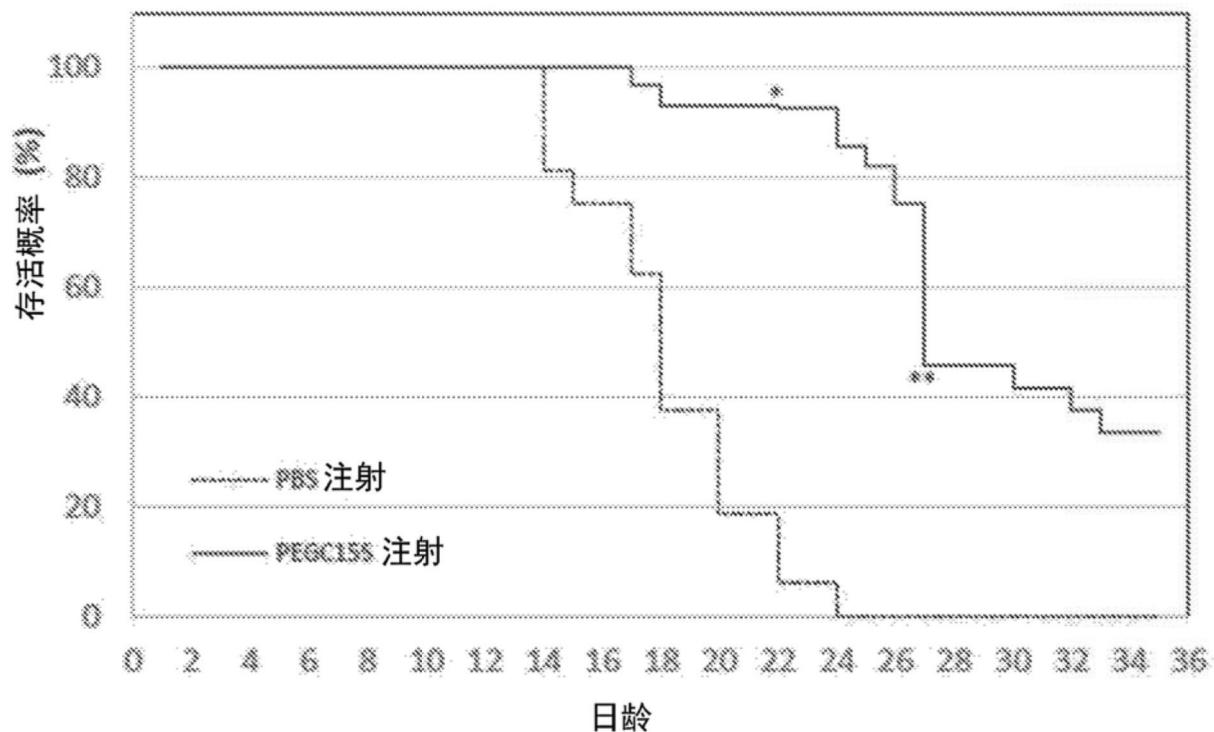


图8A

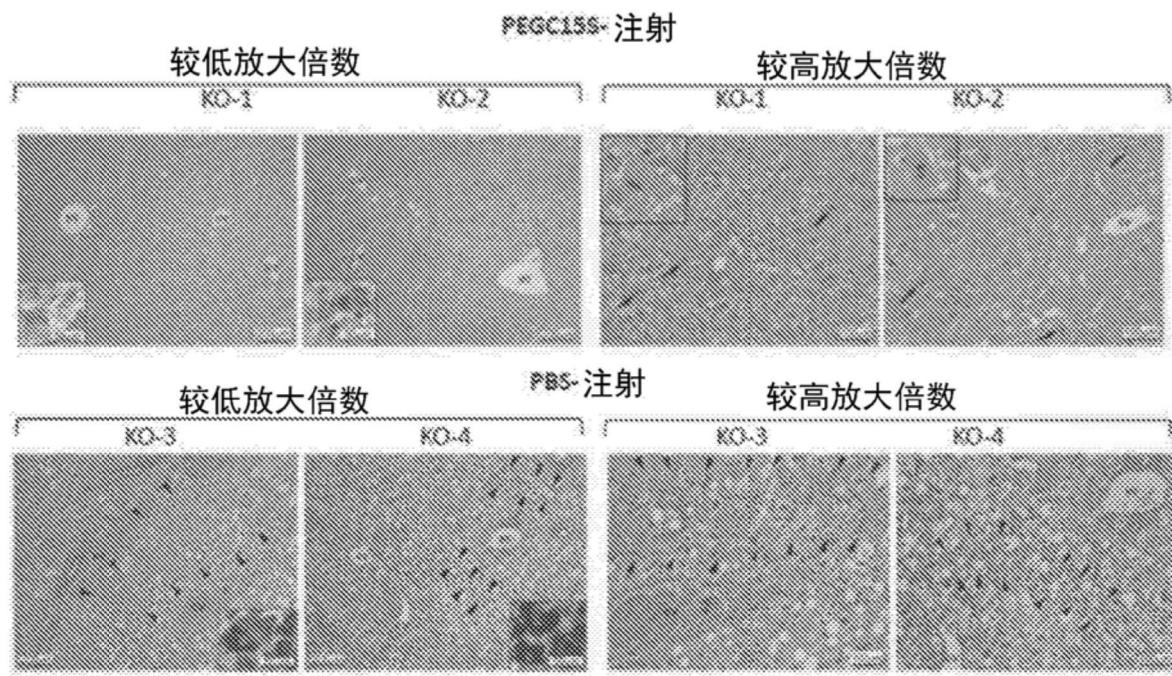


图8B

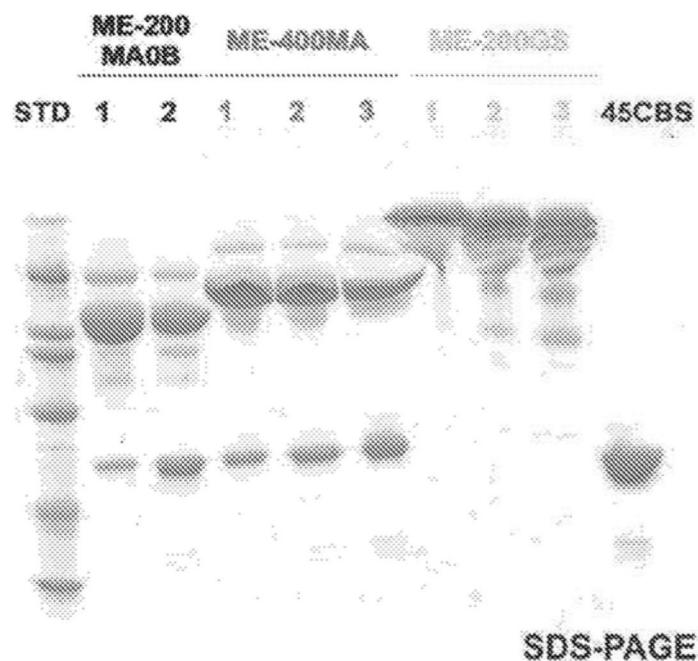


图9A

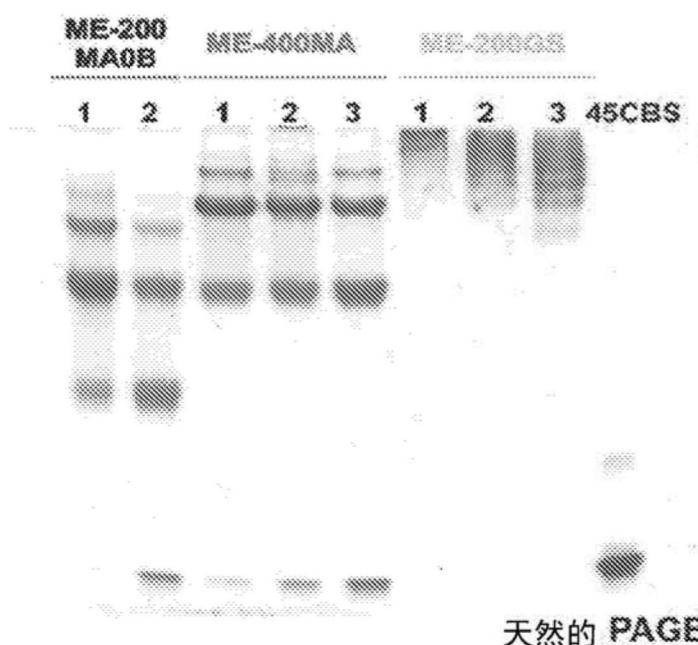


图9B

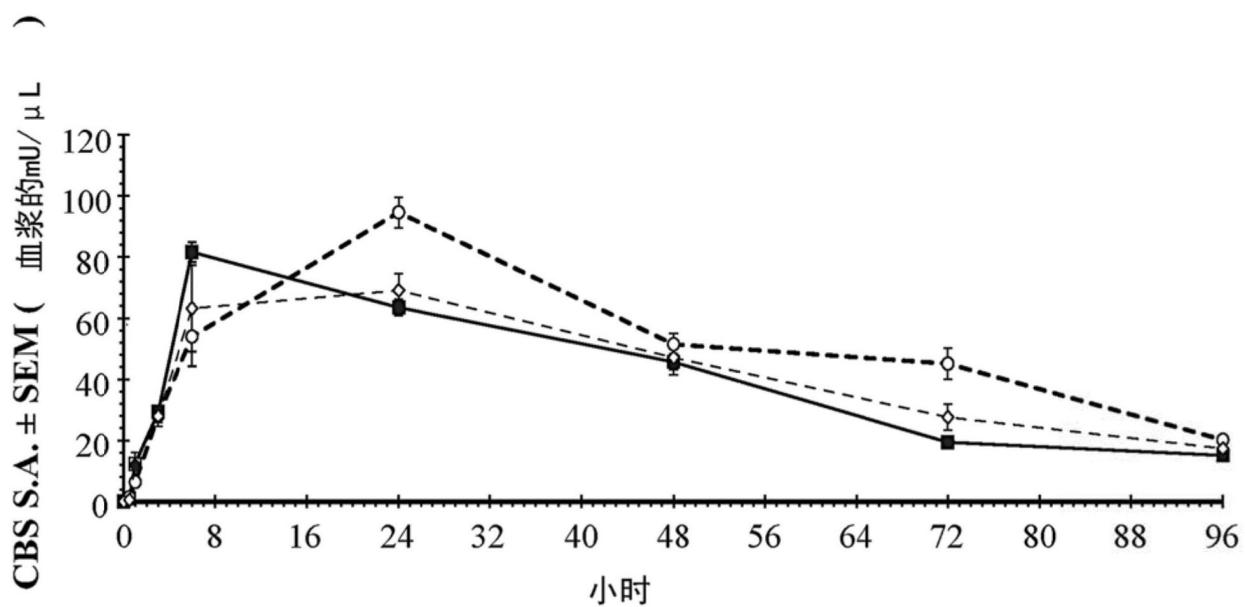


图10A

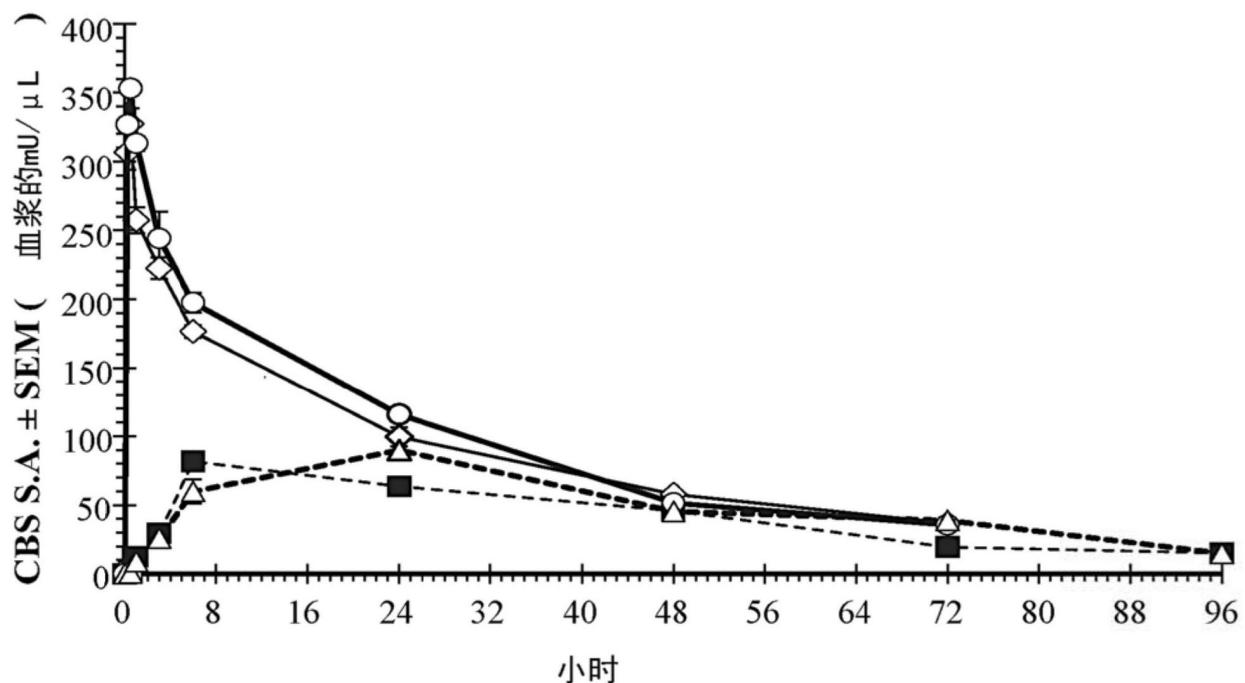


图10B

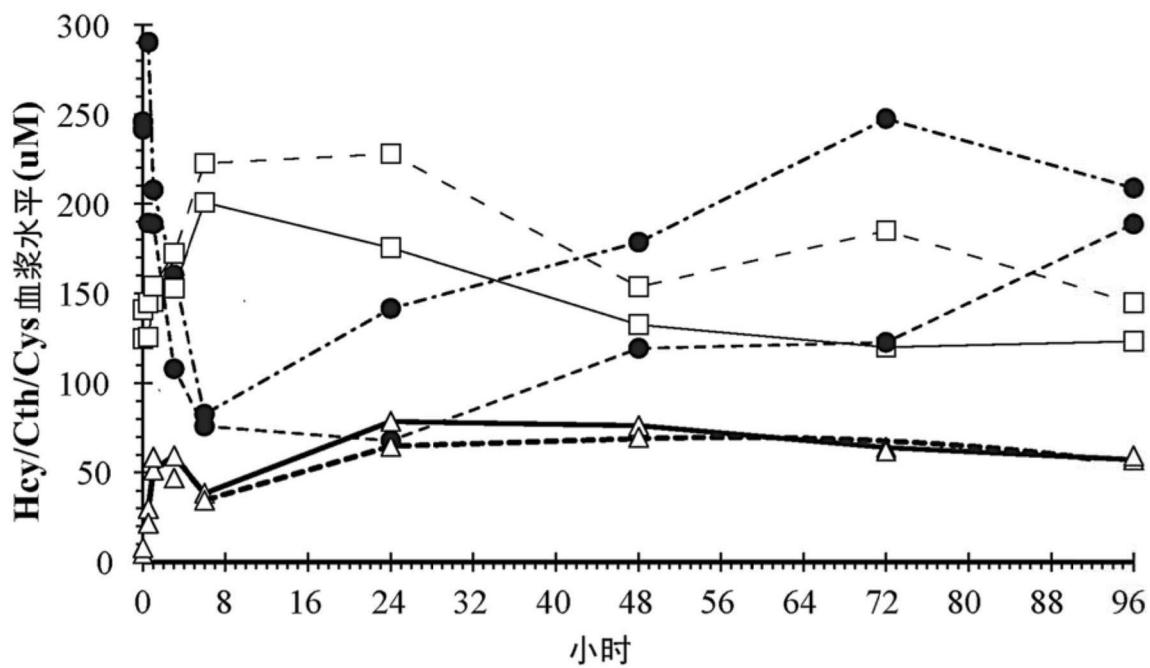


图10C

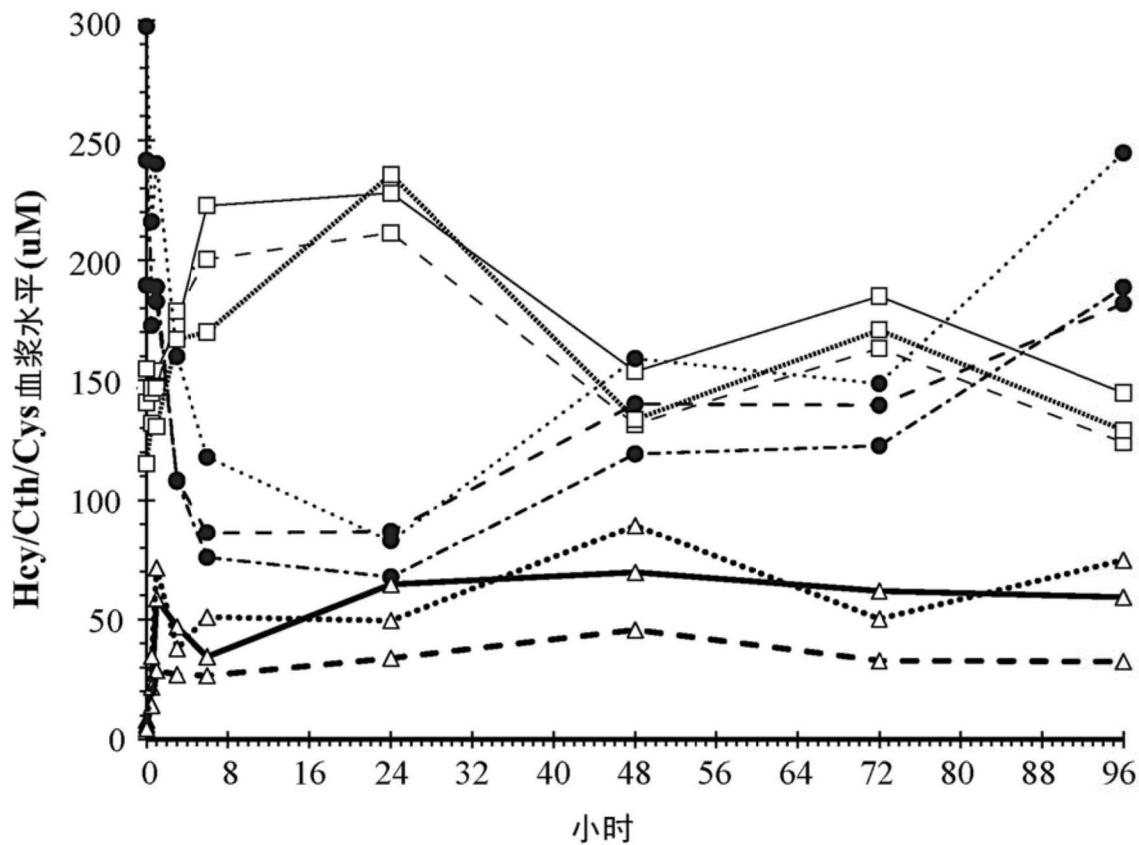


图10D

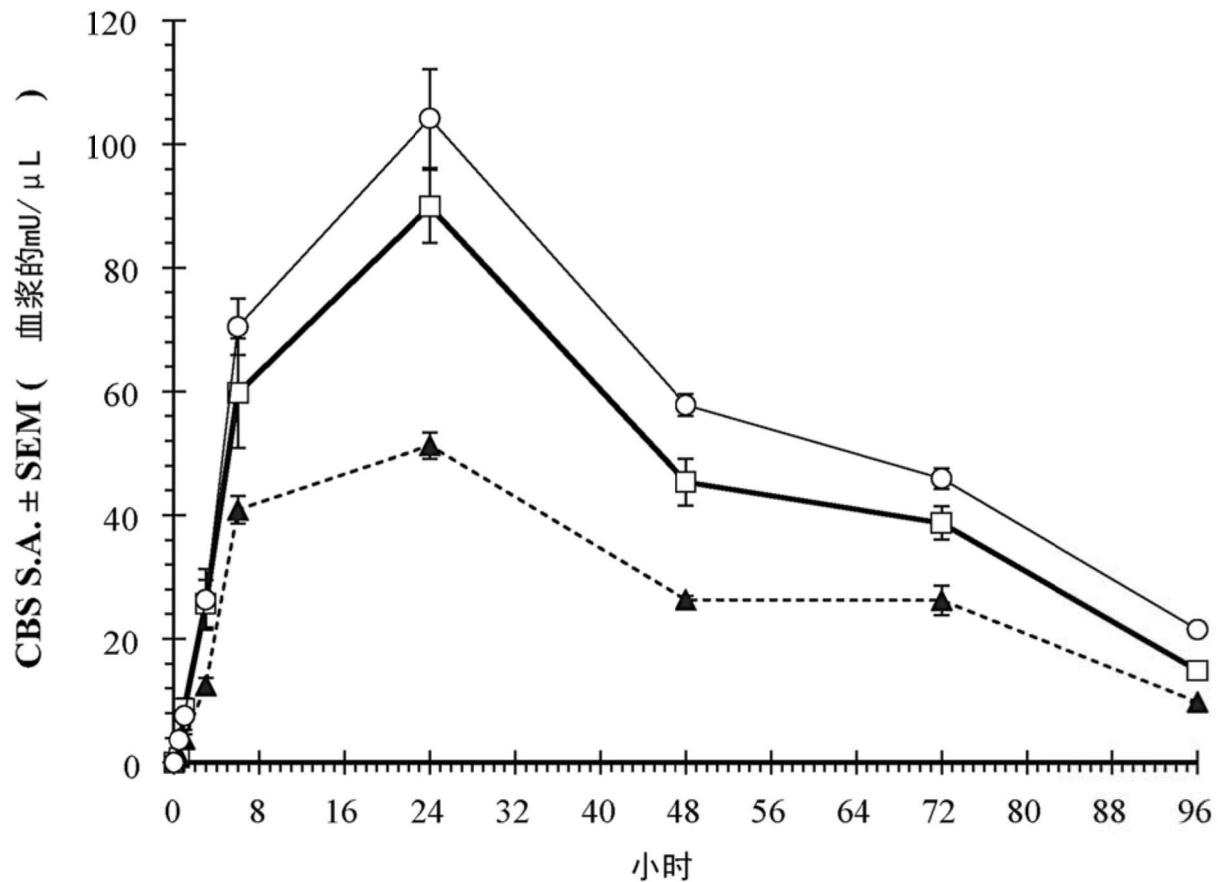


图10E

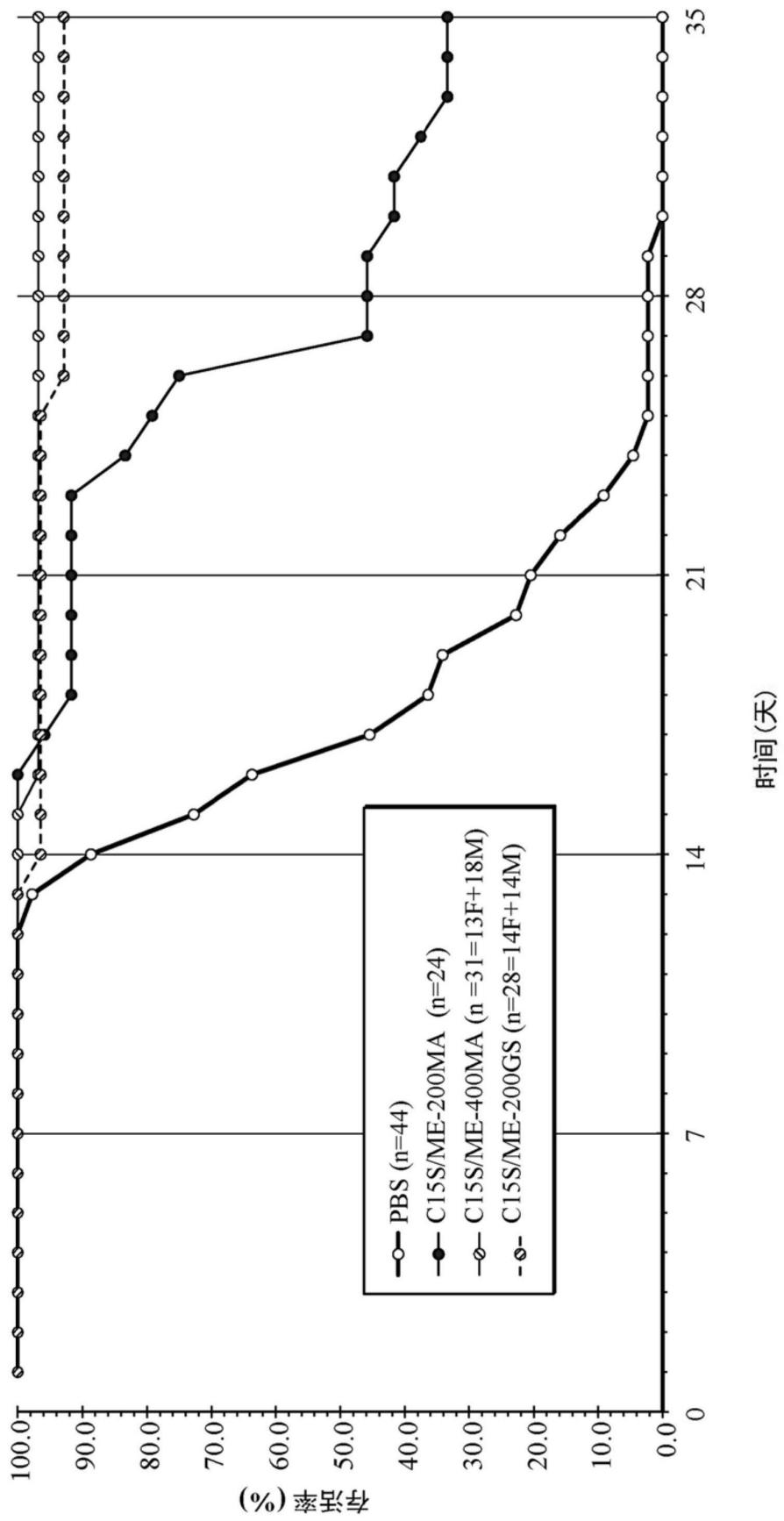


图11A

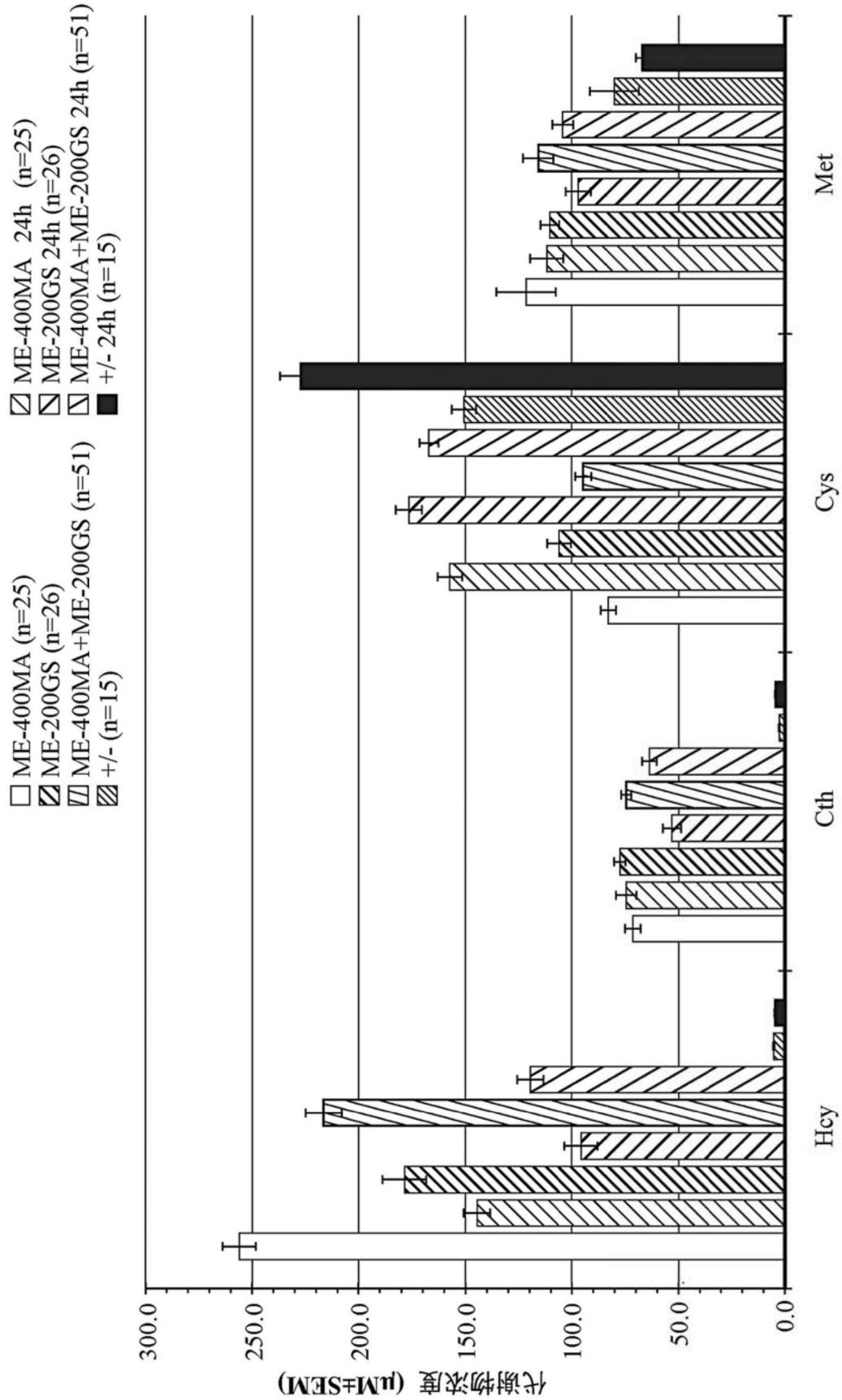


图11B

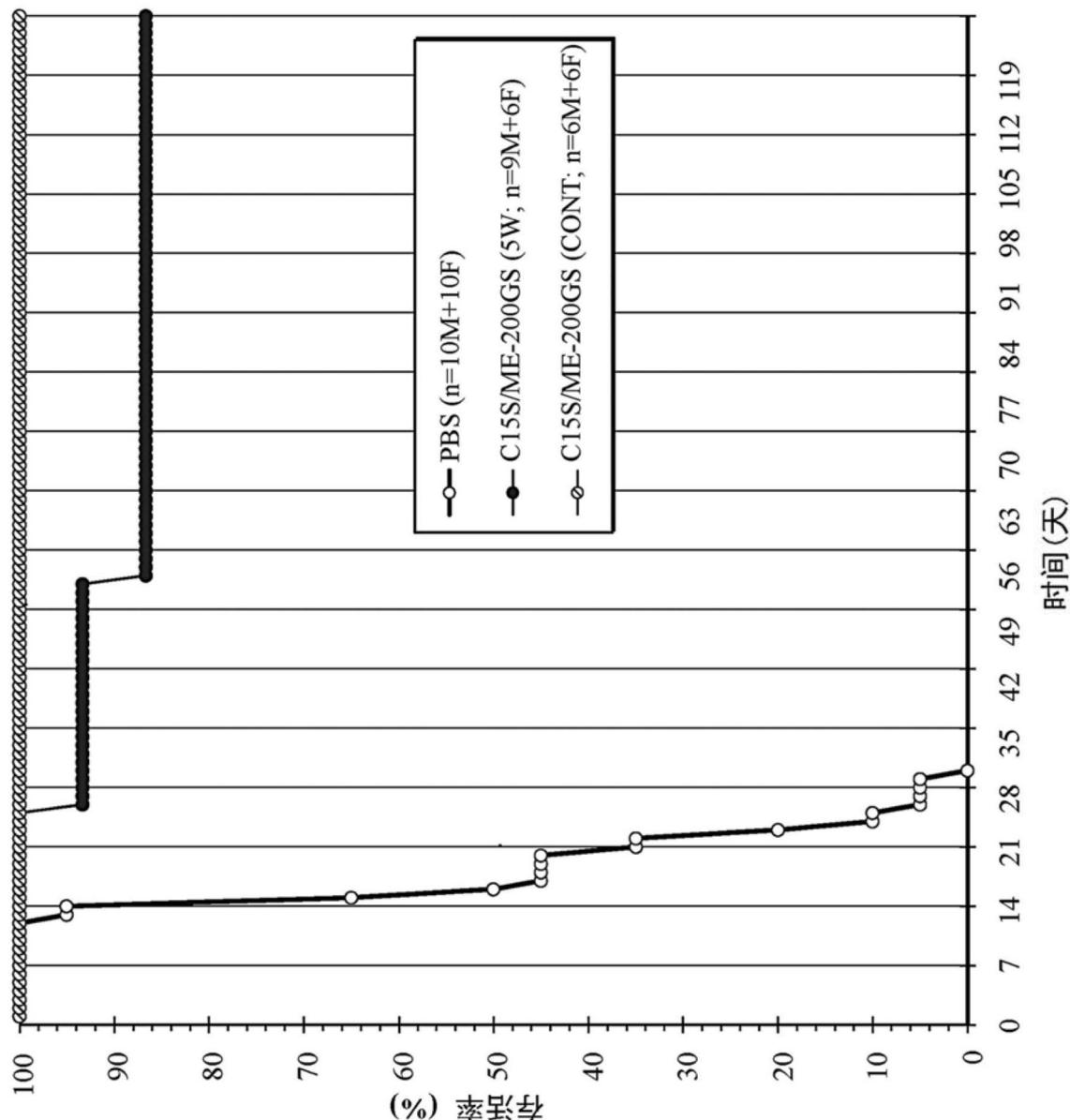


图11C

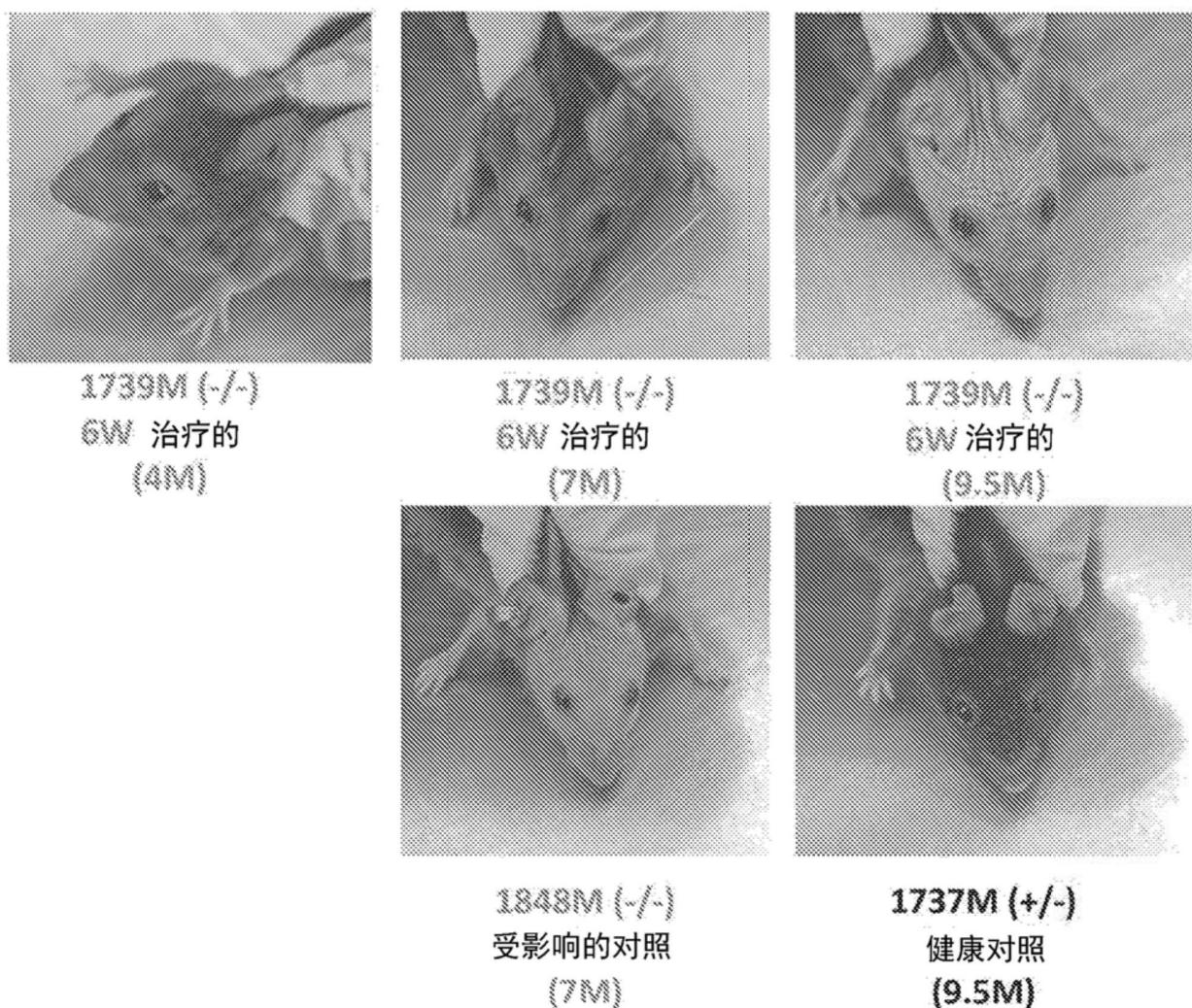
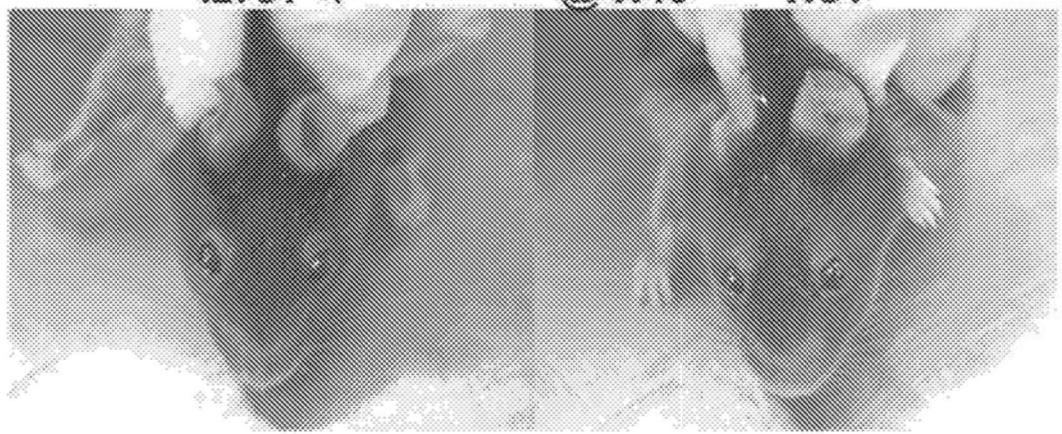


图12A

I278T +/- 未经治疗的 @ W19 和 W34



I278T +/- PEG htCBS (20MA)- 从4W龄时连续治疗的 @ W19, W24, W31 and W35



I278T +/- 未经治疗的 @ W38



图12B

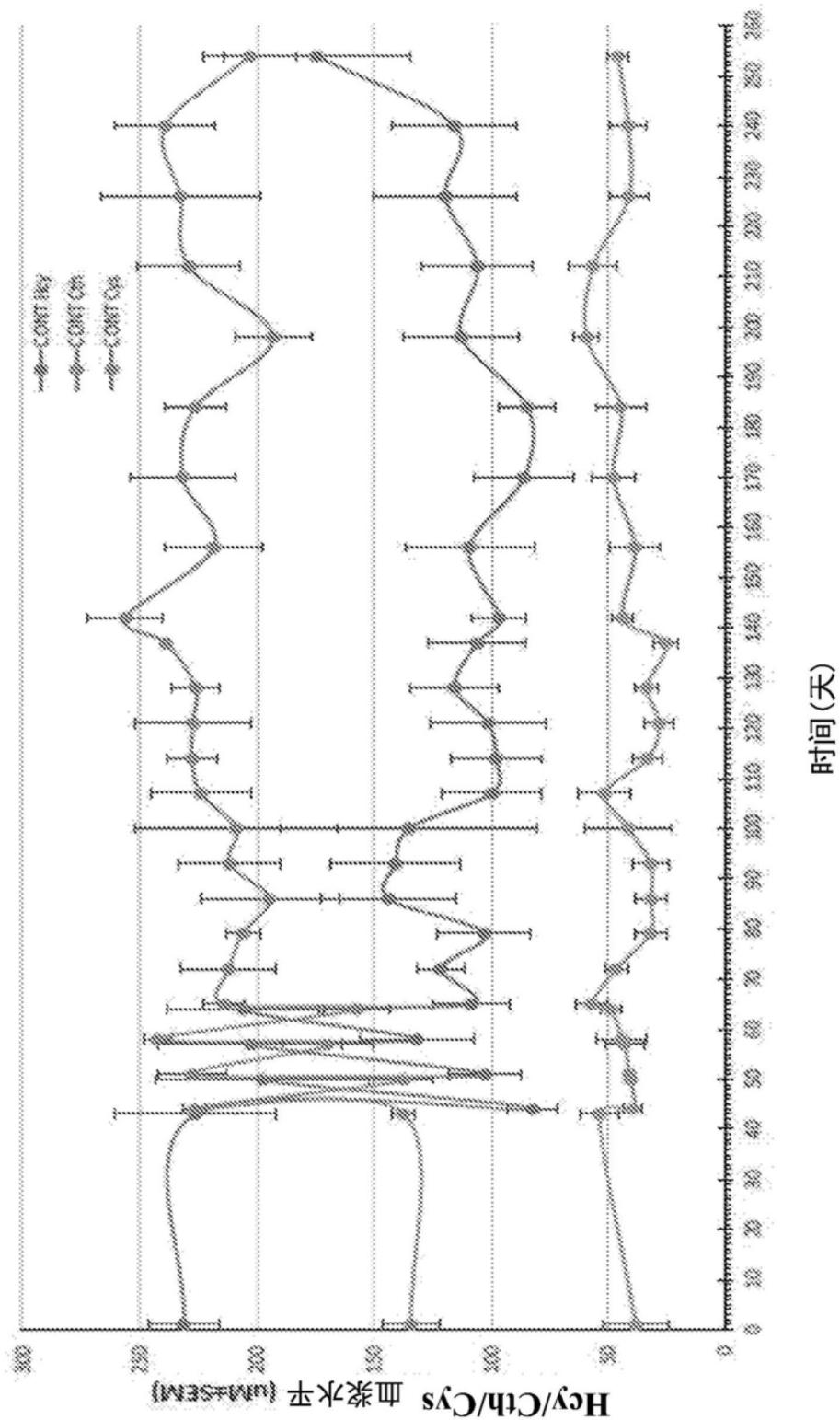


图12C

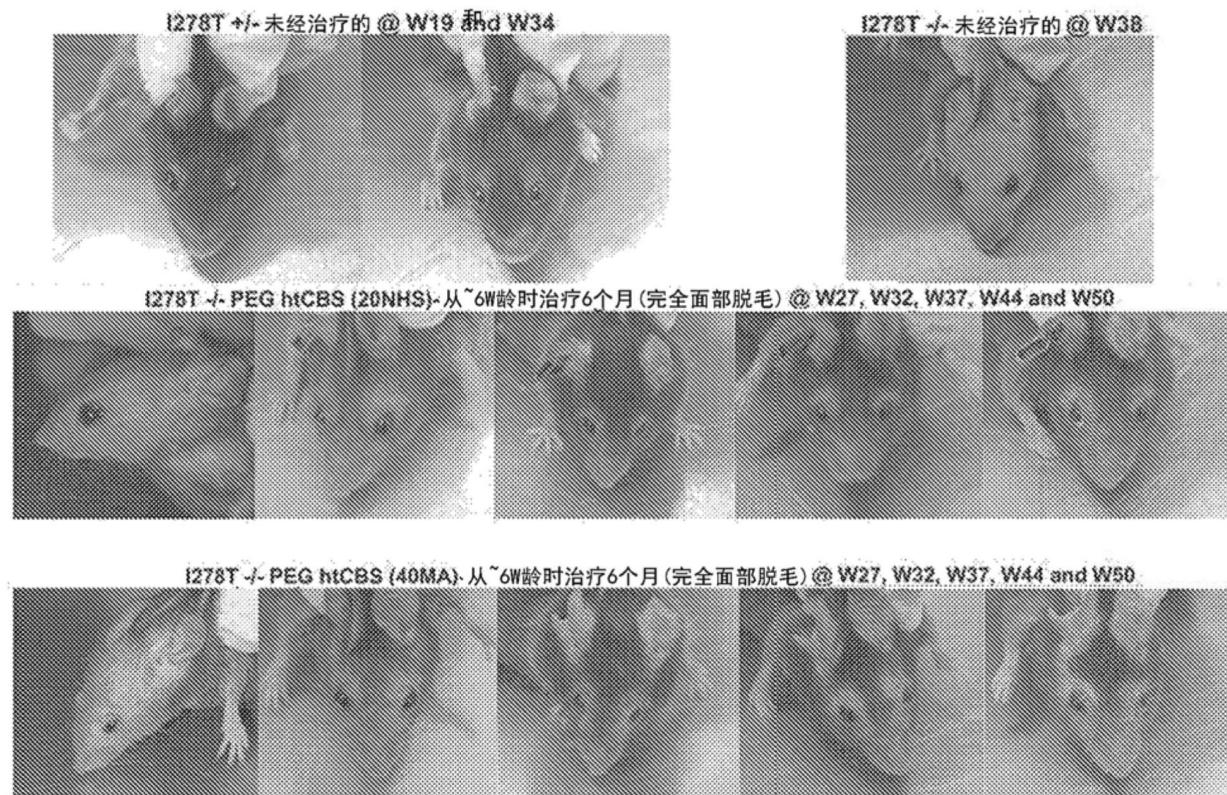


图12D

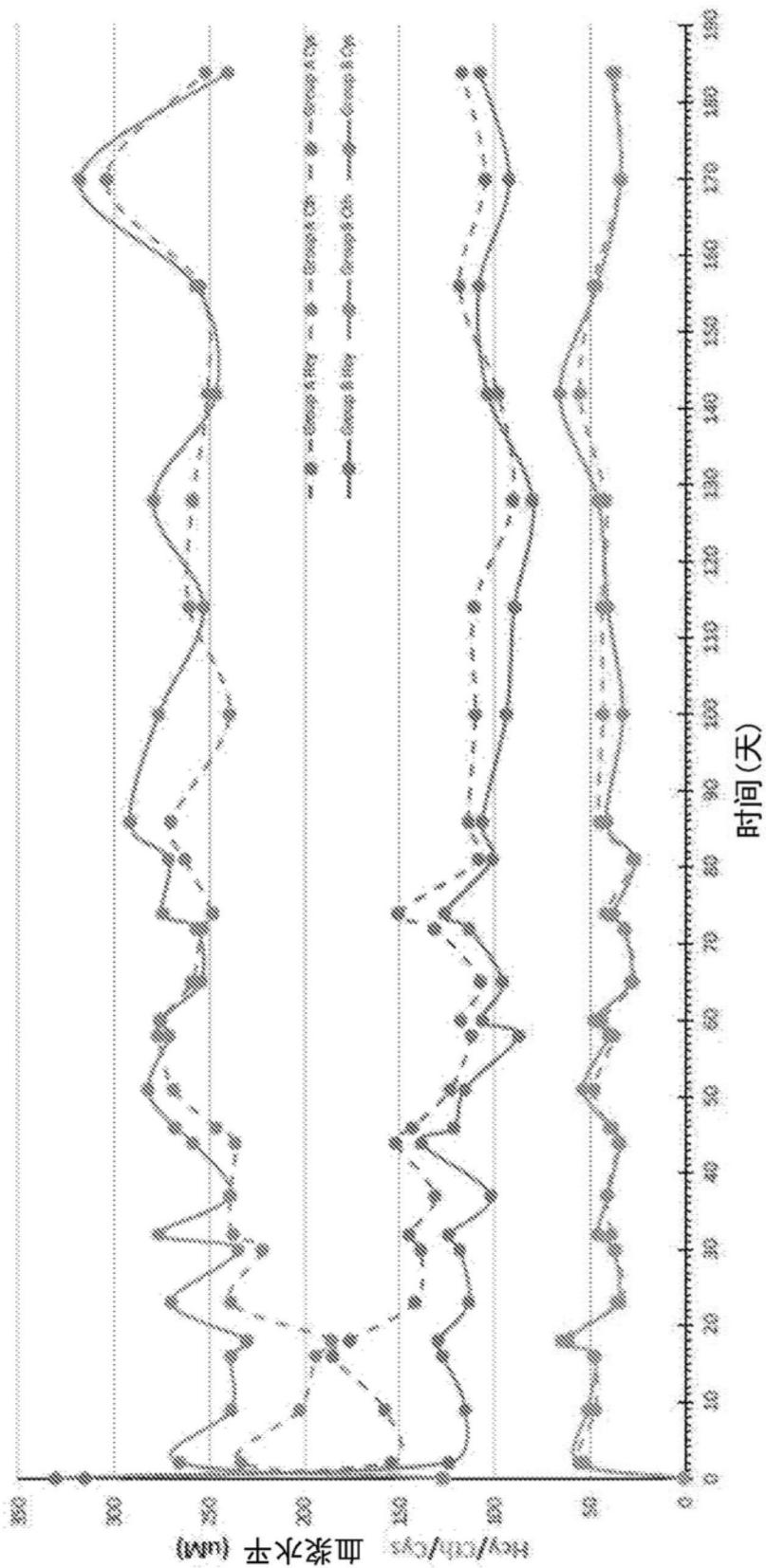
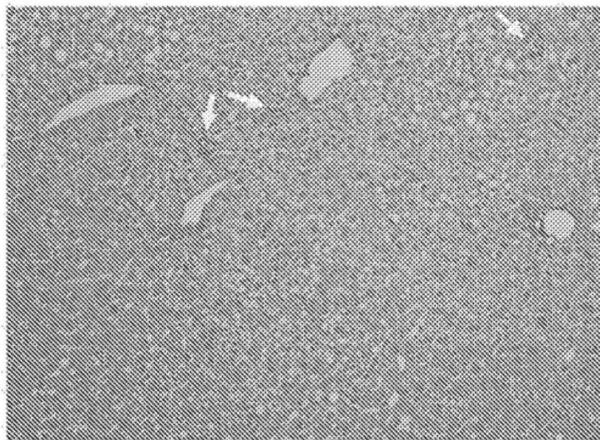
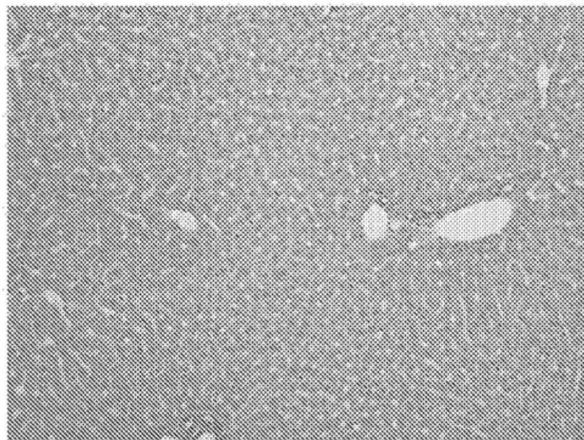


图12E

KO1982 (-/-) PBS注射的
中度至重度肝病



KO2276 (-/-) 20NHS C15S/ME-200GS注射的
轻度变化



KO1985 (+/-) 健康对照
最小变化

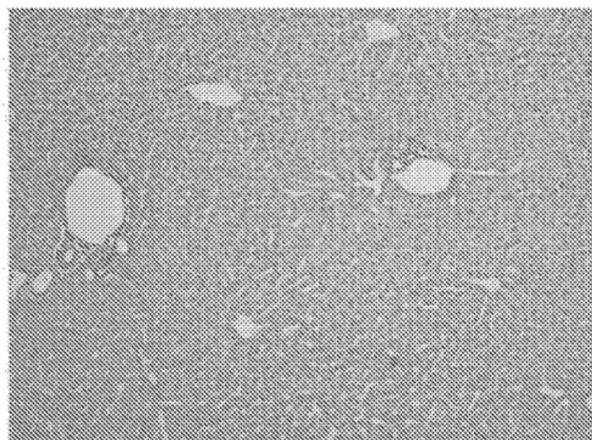
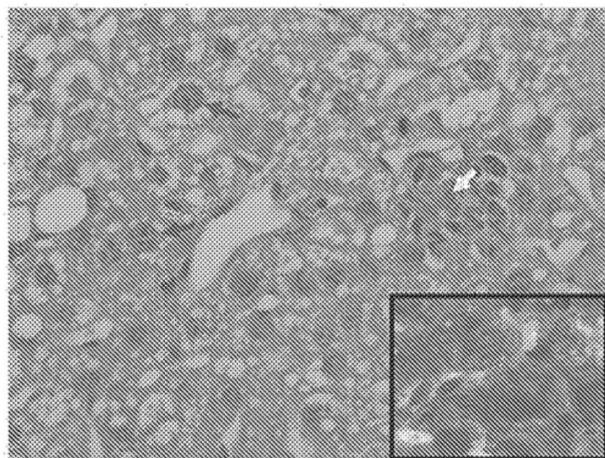
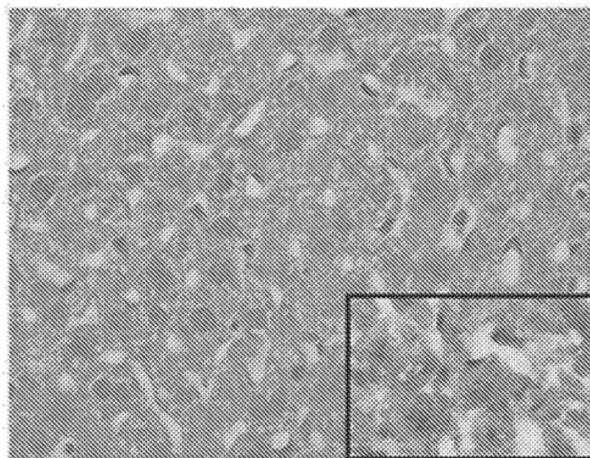


图13A

KO1982 (-/-) PBS 注射的
中度至重度肝病



KO2276 (-/-) 20NHS PEG-CBS 注射的
轻度变化



KO1985 (+/-) 健康对照
最小变化

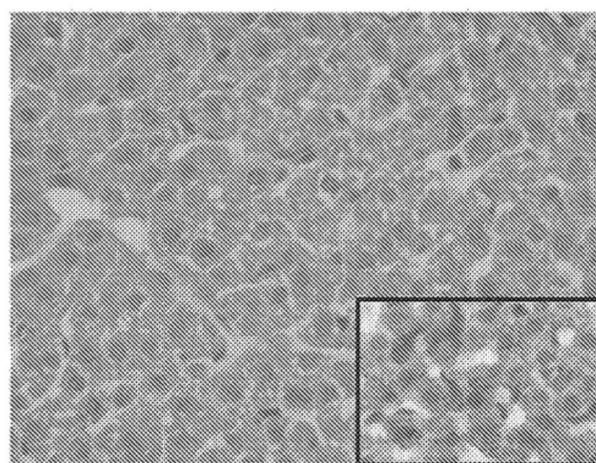


图13B

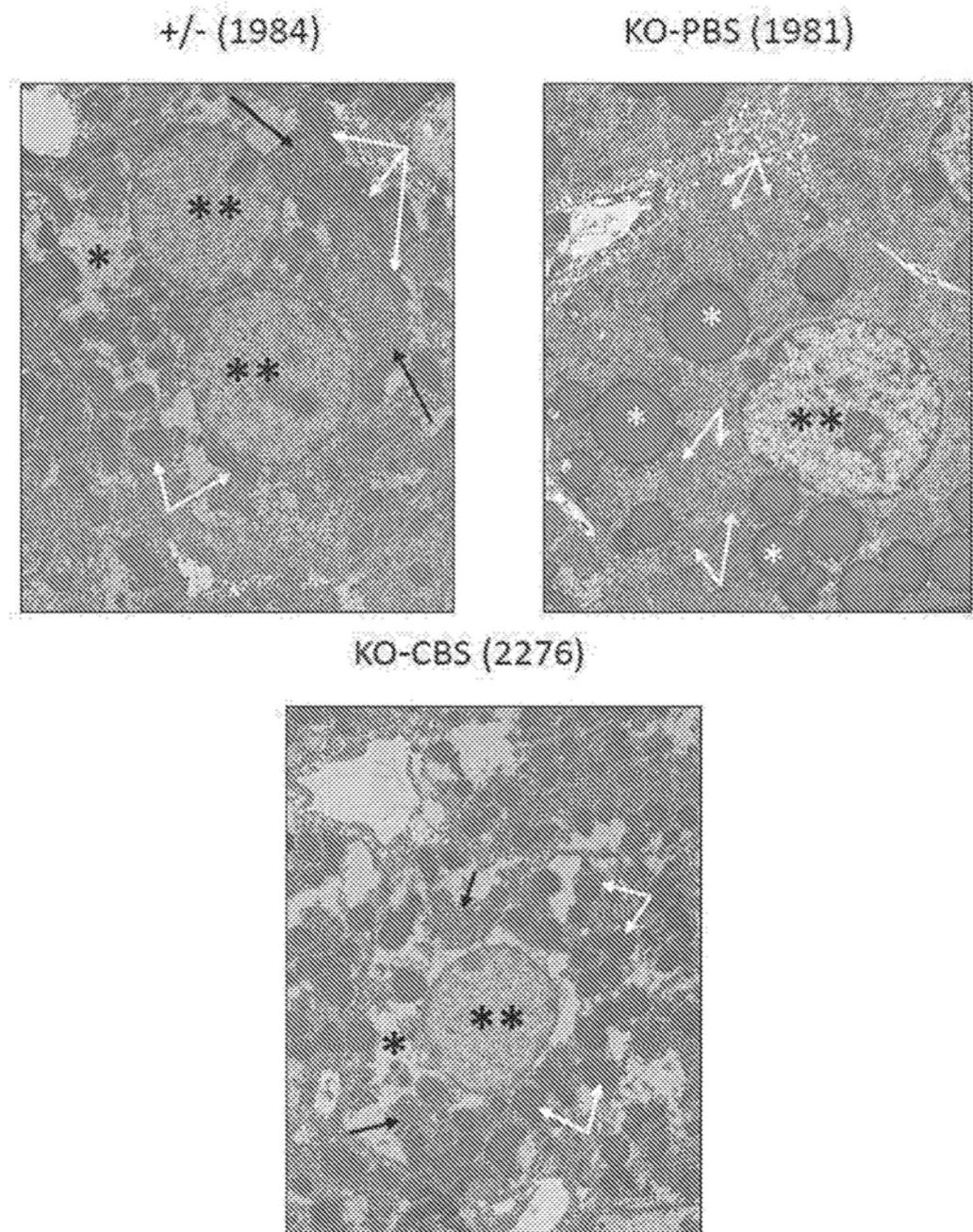
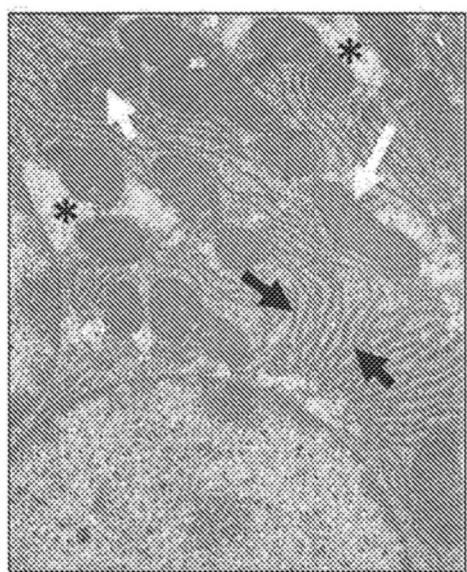
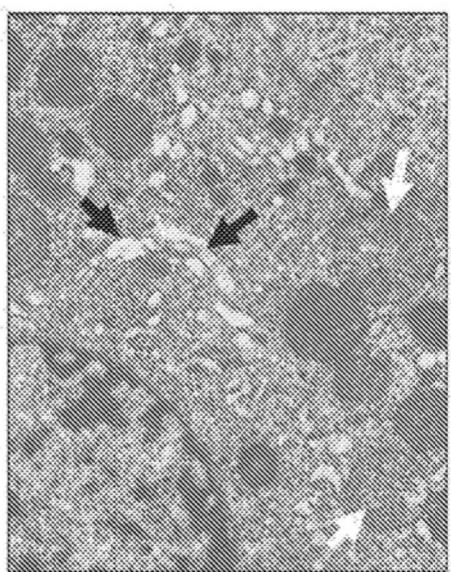


图14A

+/- (1984)



KO-PBS (1981)



KO-CBS (2276)

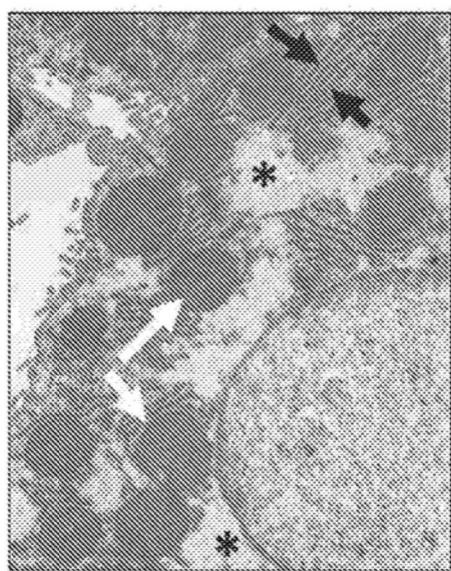


图14B

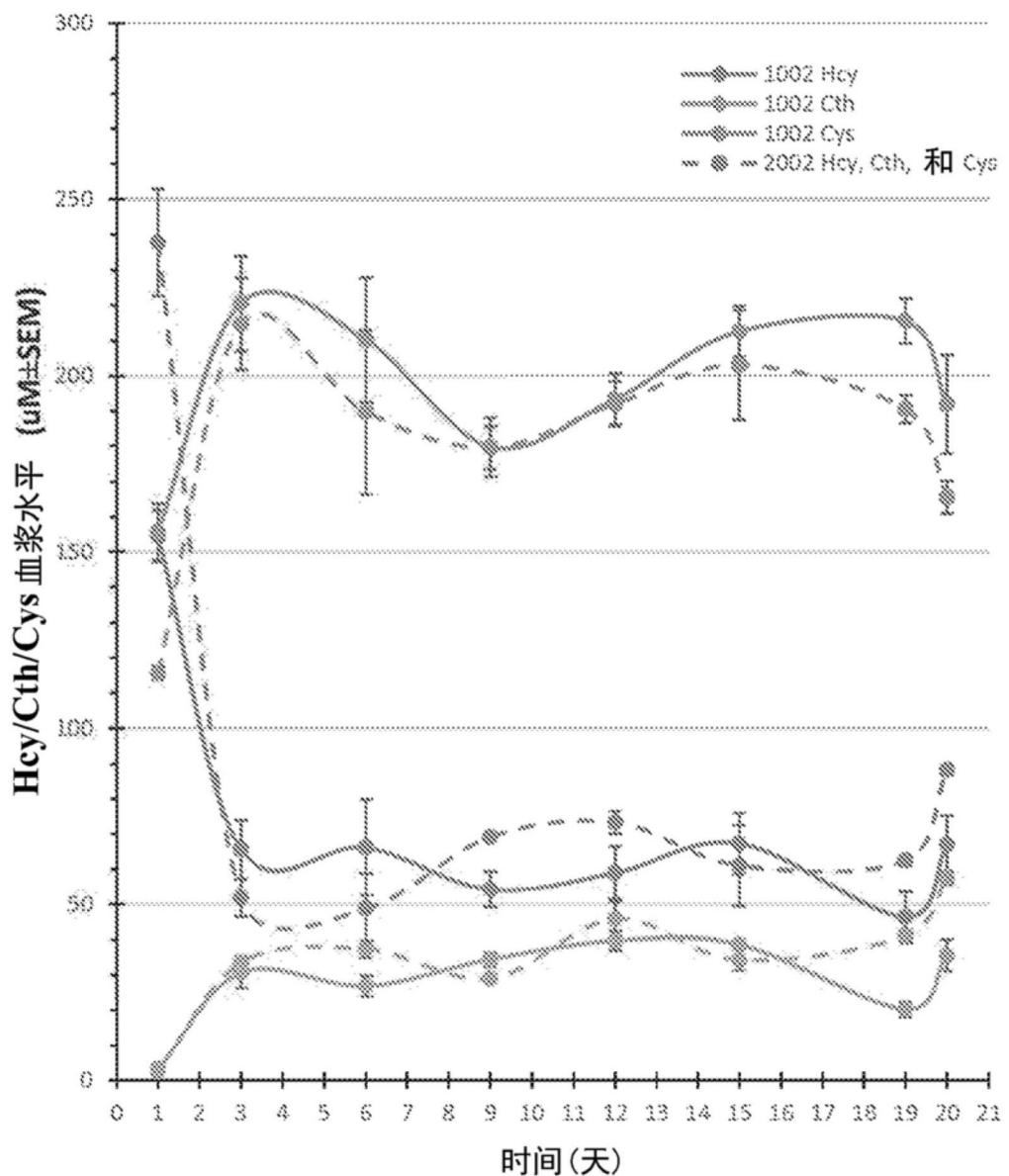


图15A

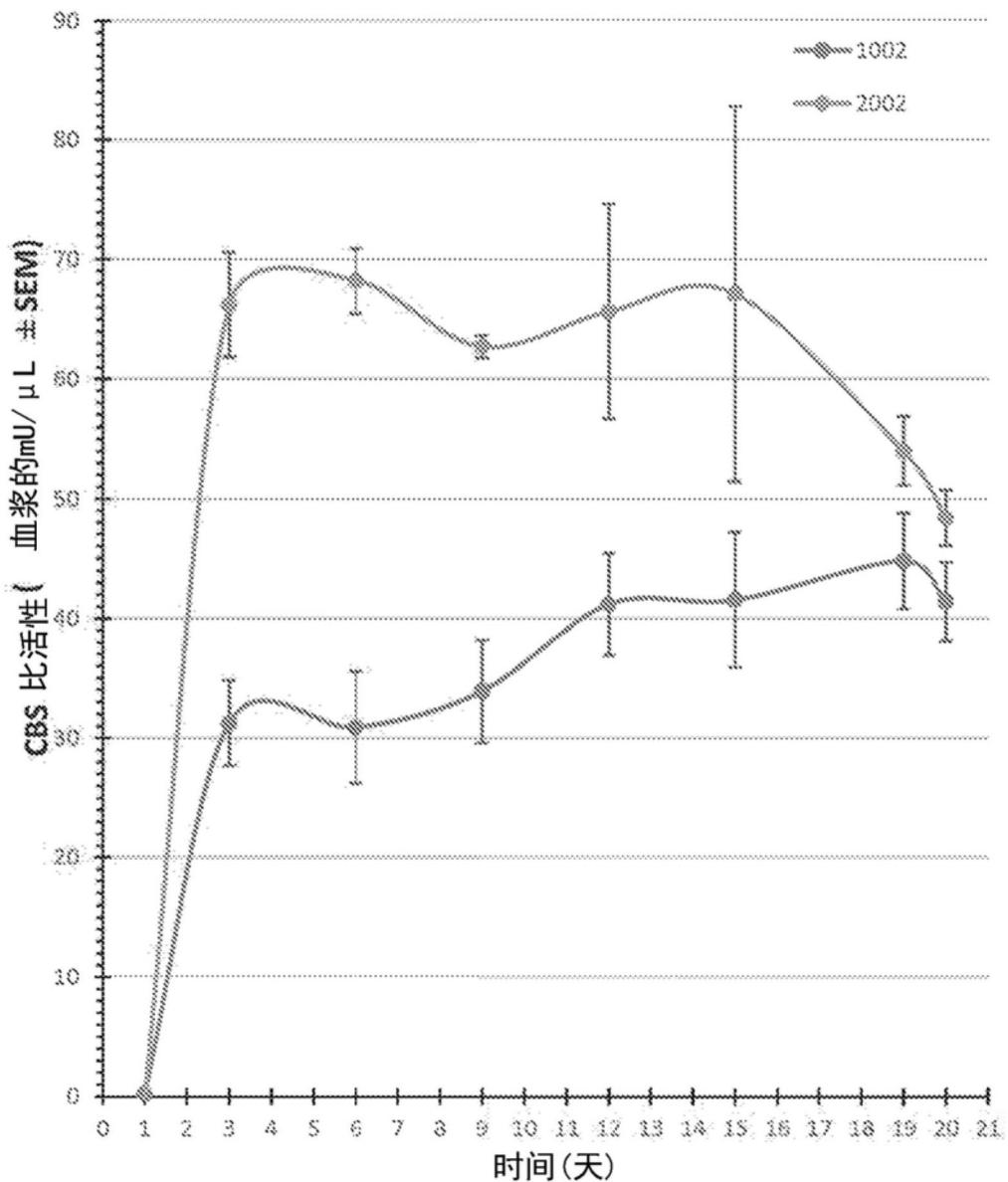


图15B

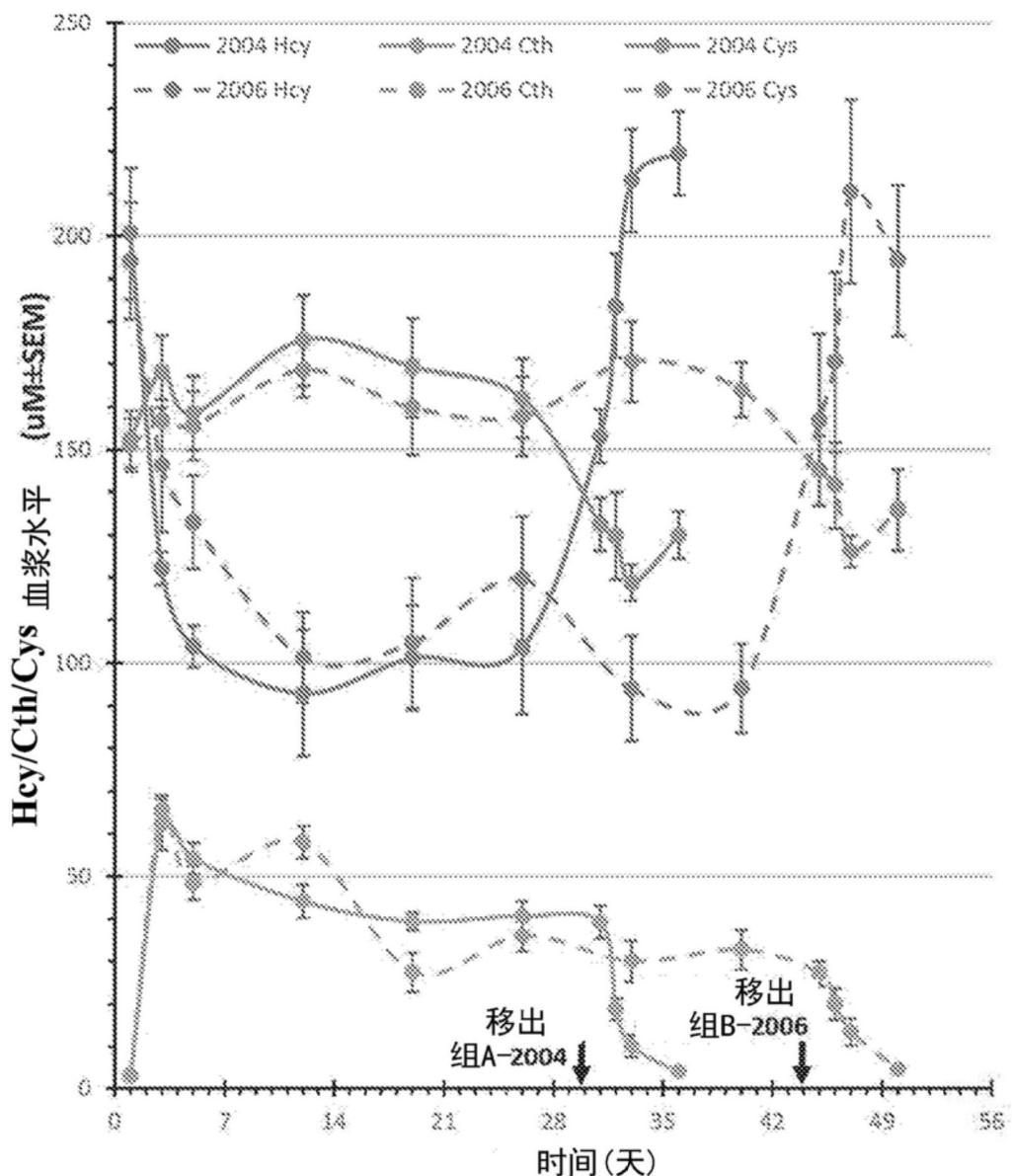


图15C

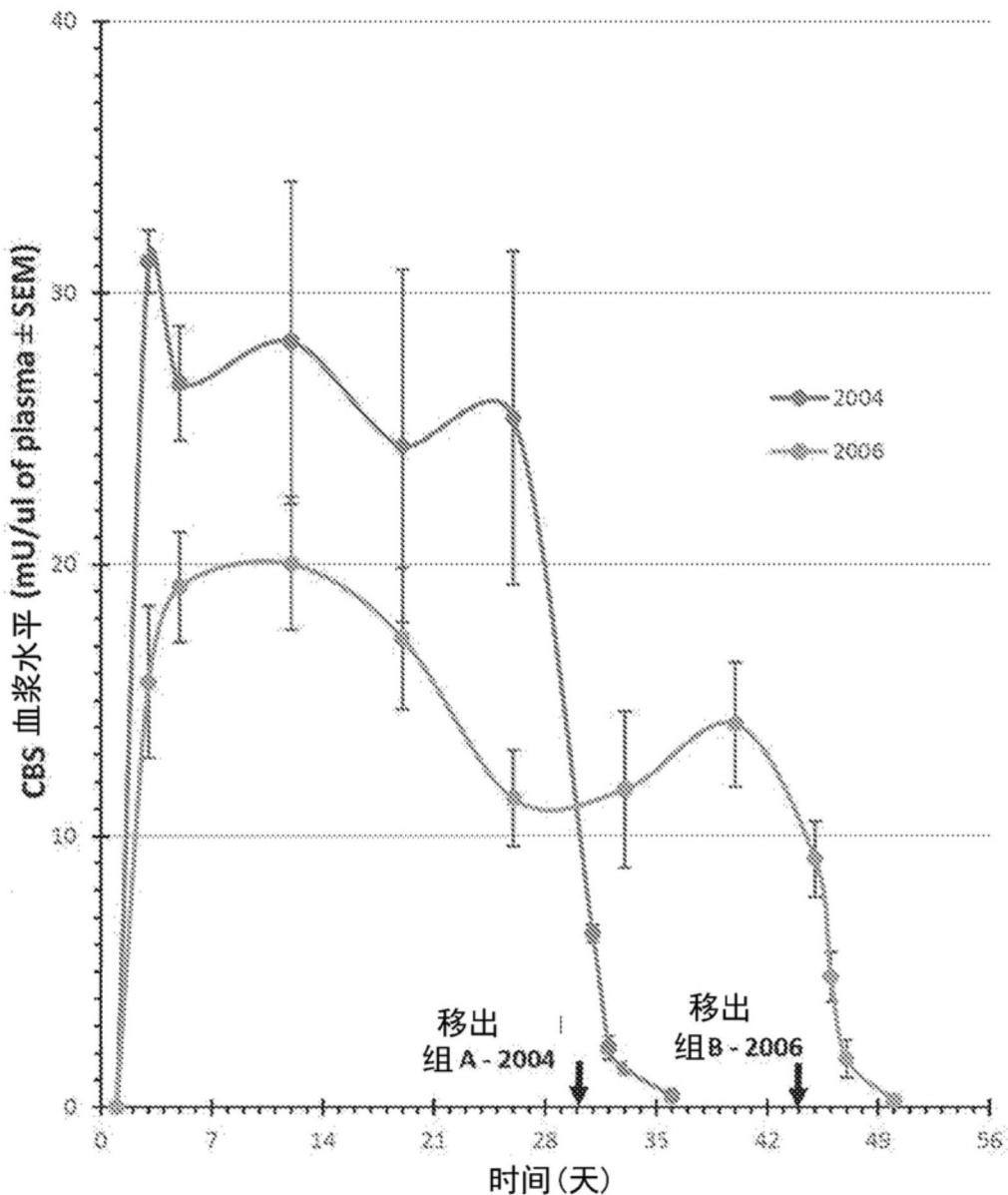


图15D

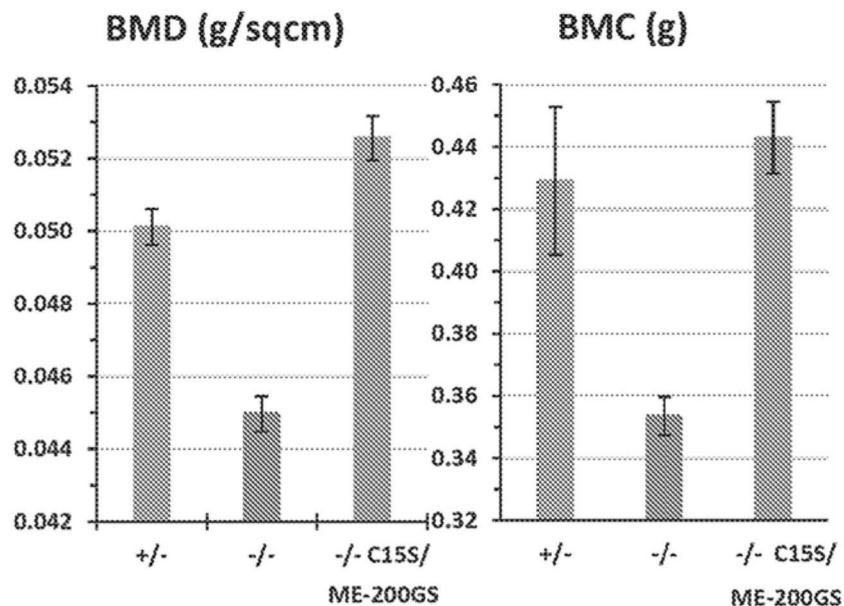


图16A

图16B

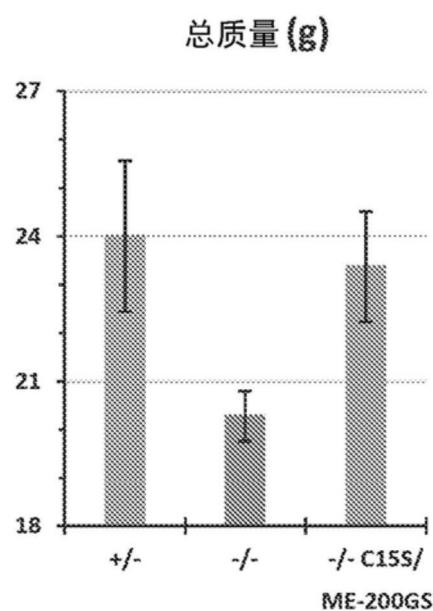


图16C

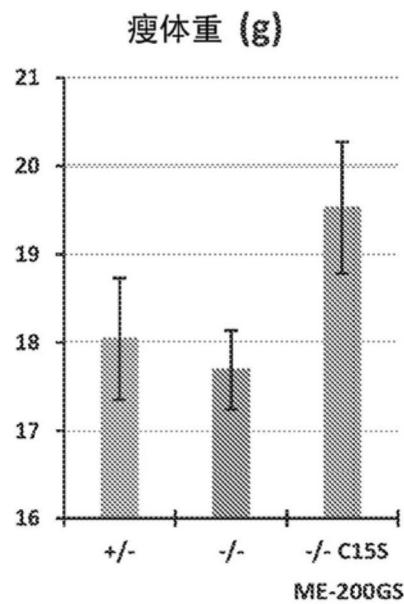


图16D

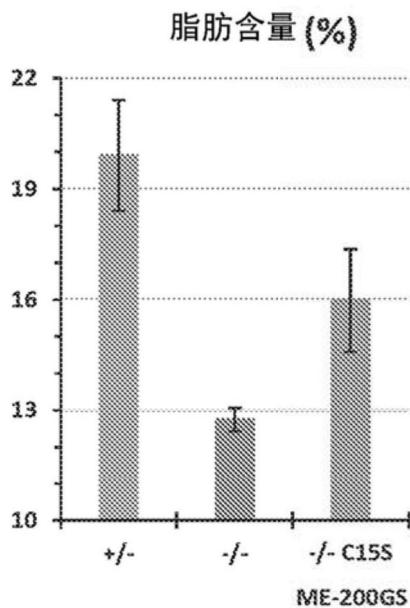


图16E

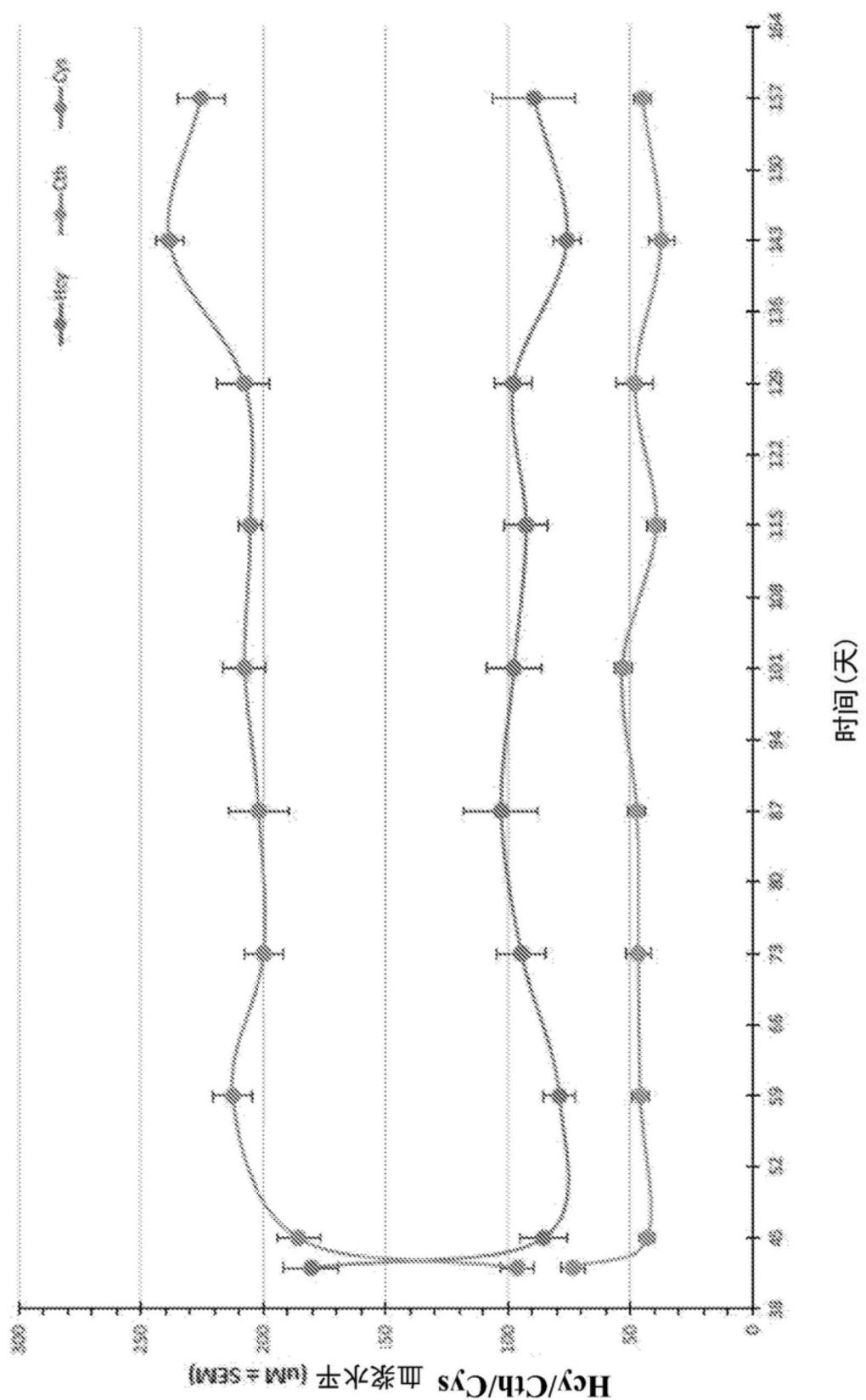


图16F

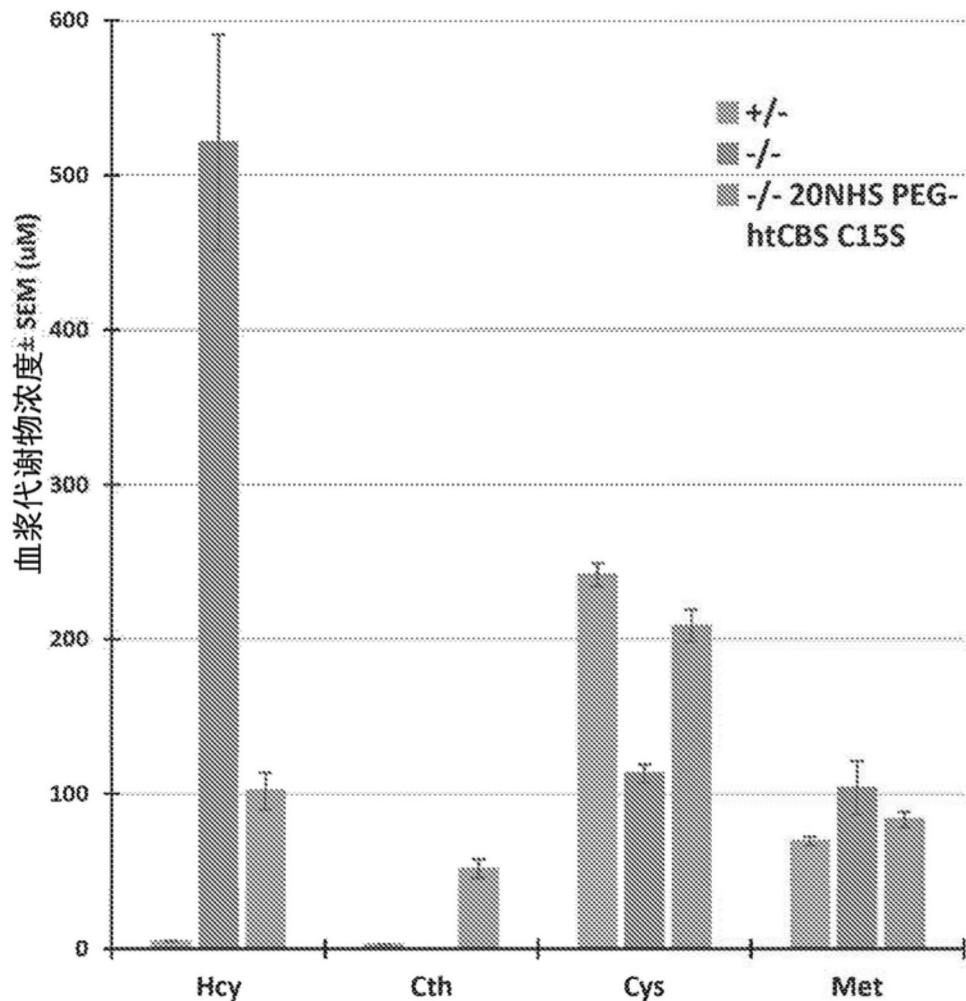


图16G

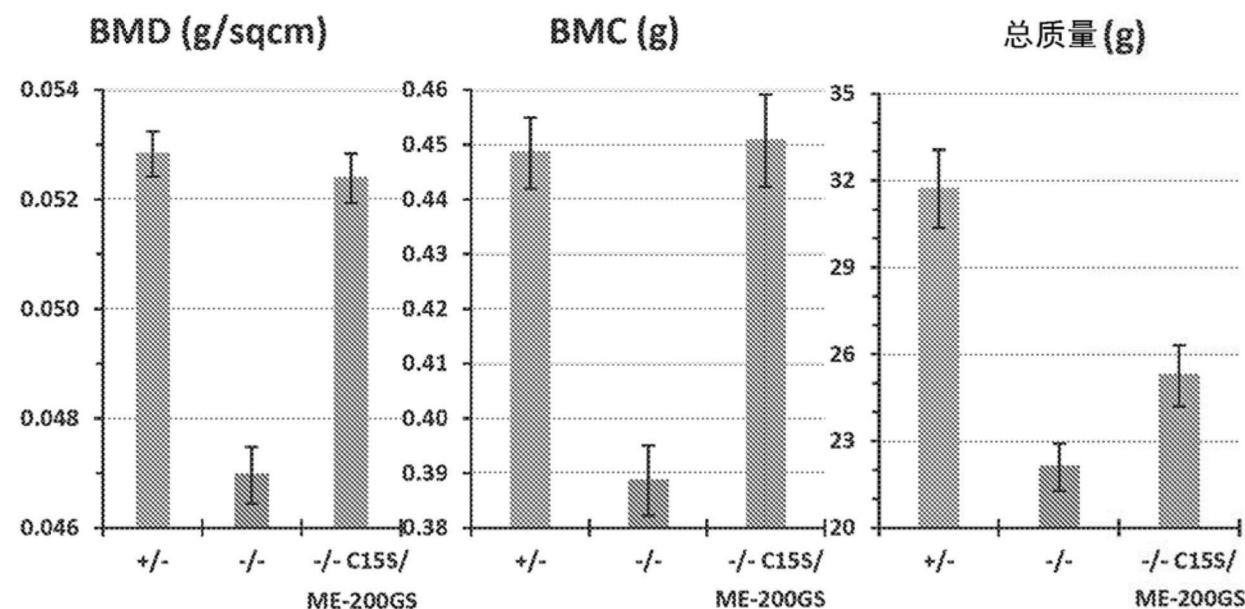


图17A

图17B

图17C

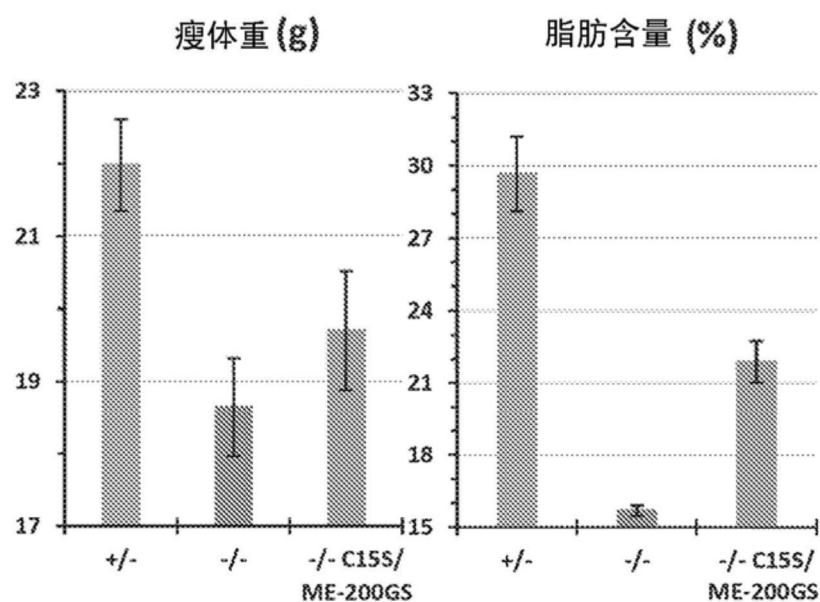


图17D

图17E

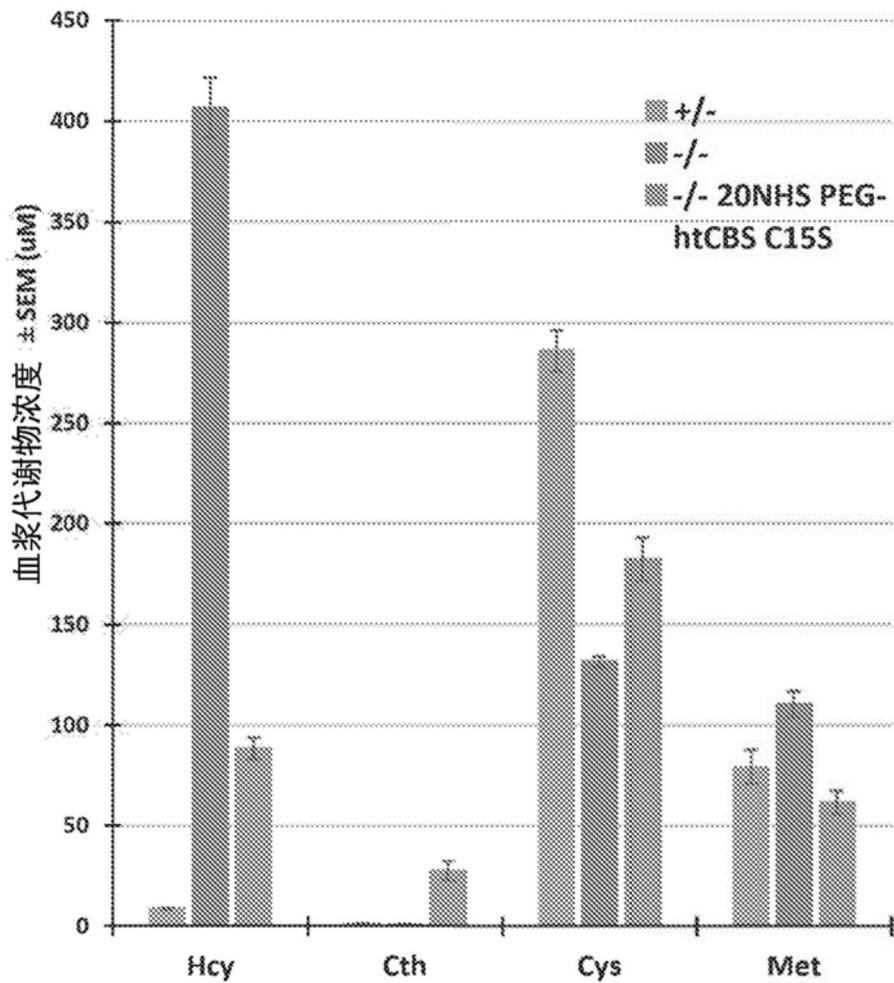


图17F

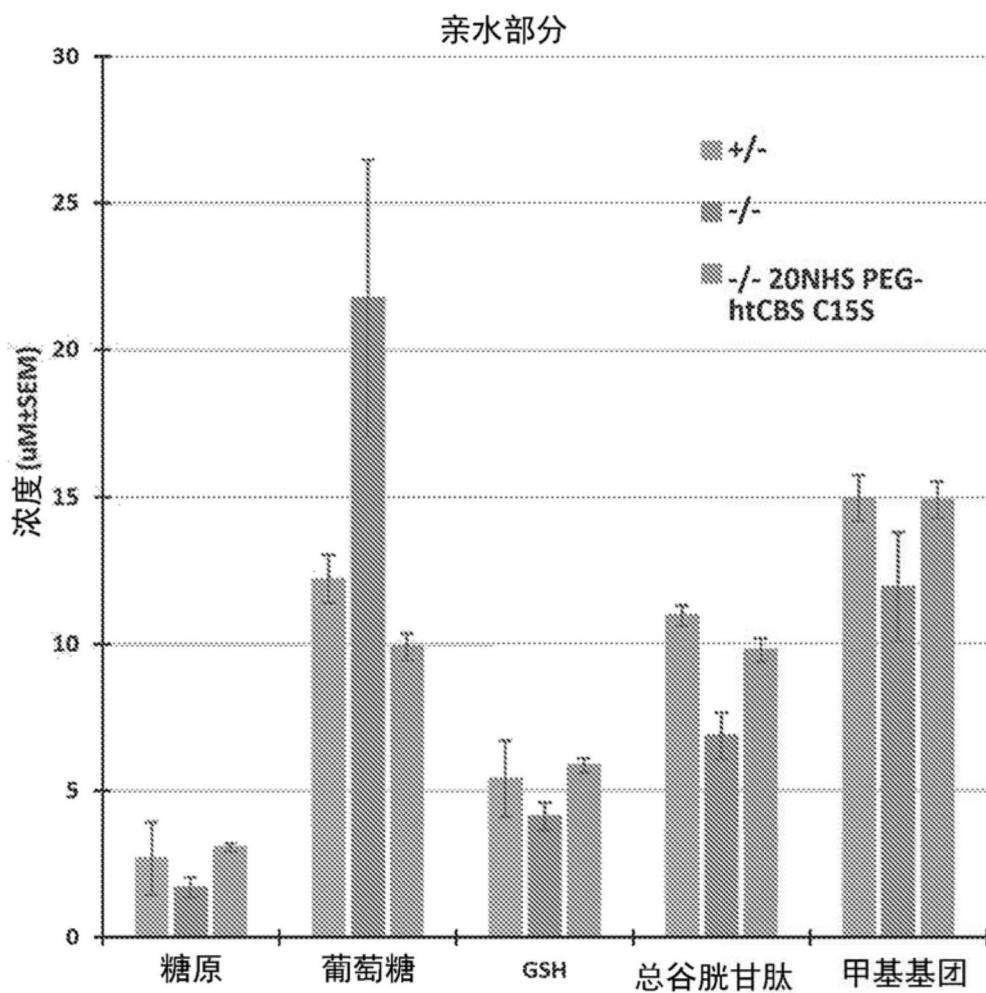


图18A

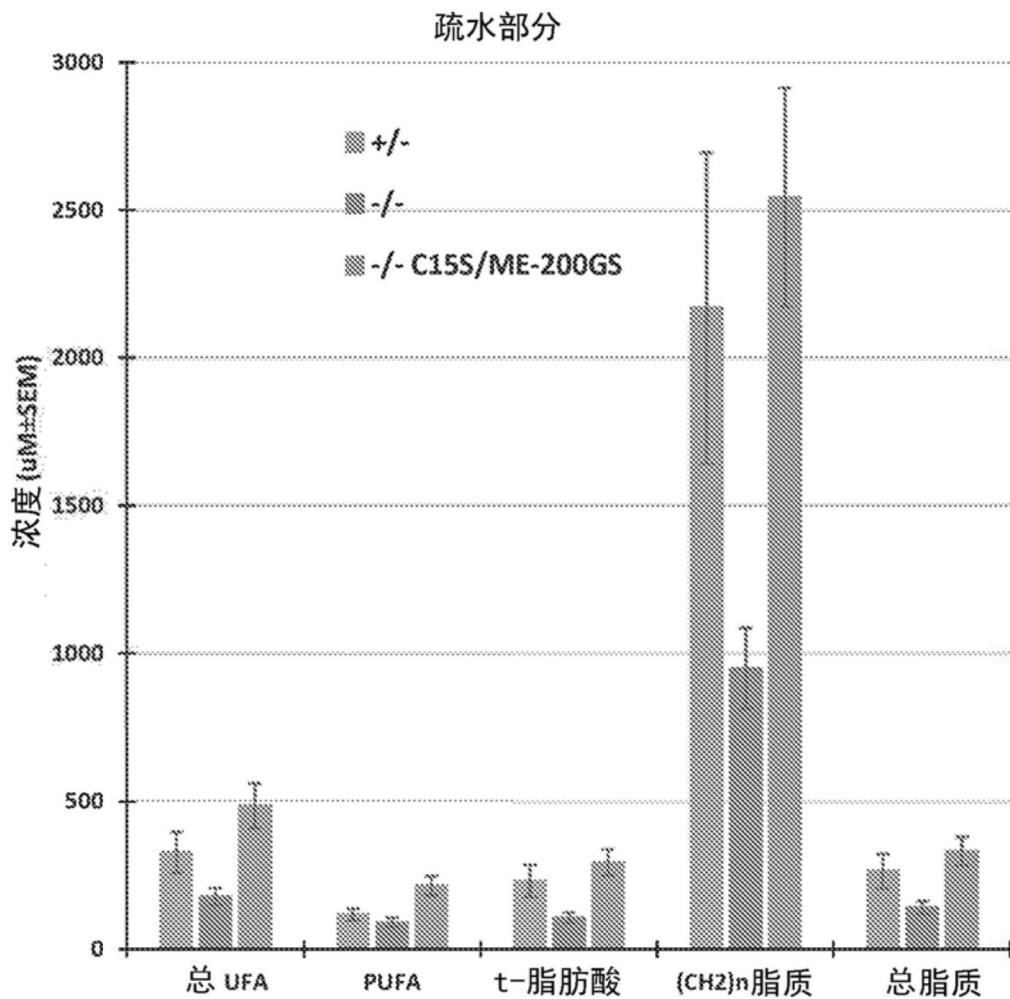


图18B

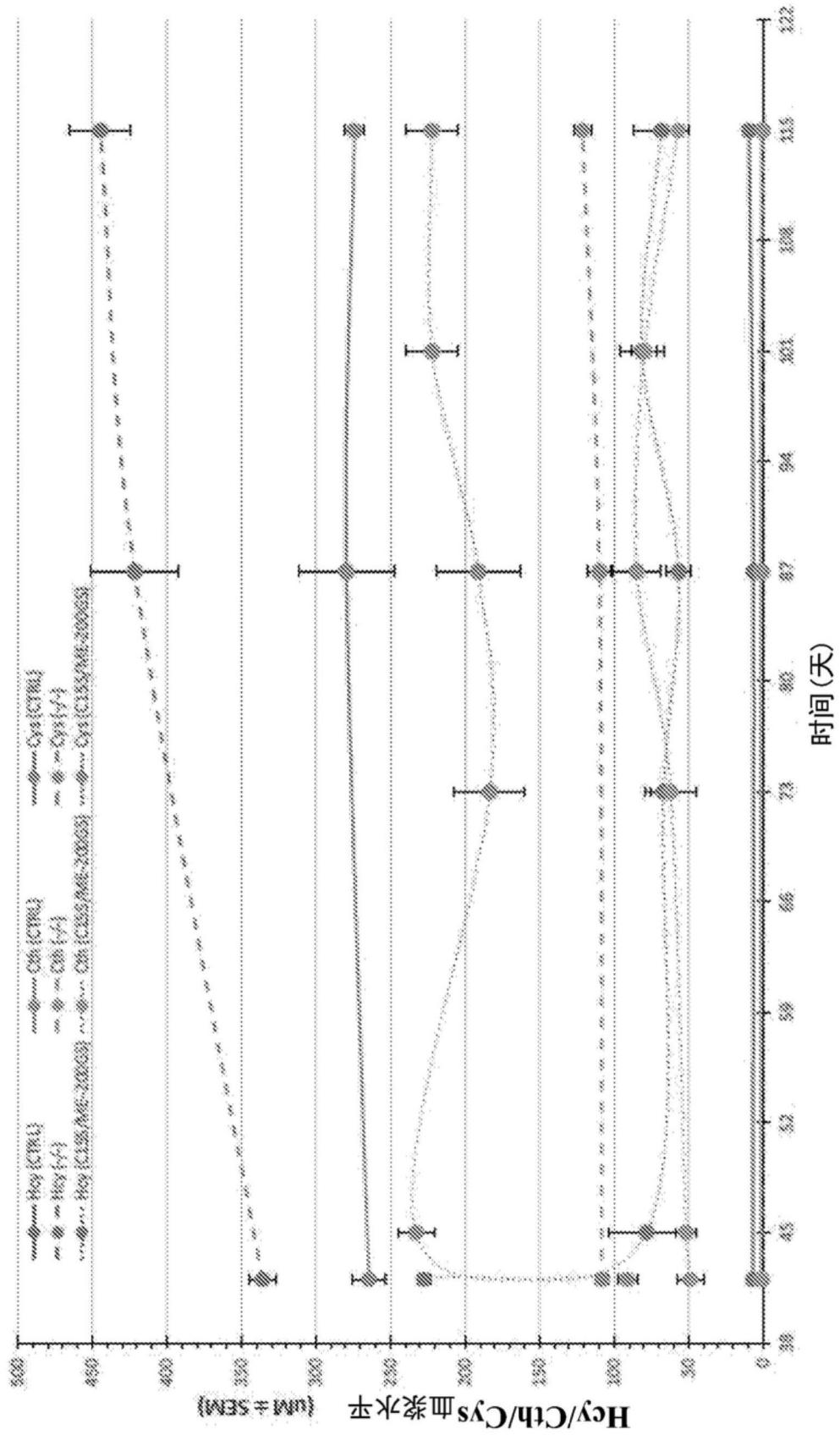


图19A

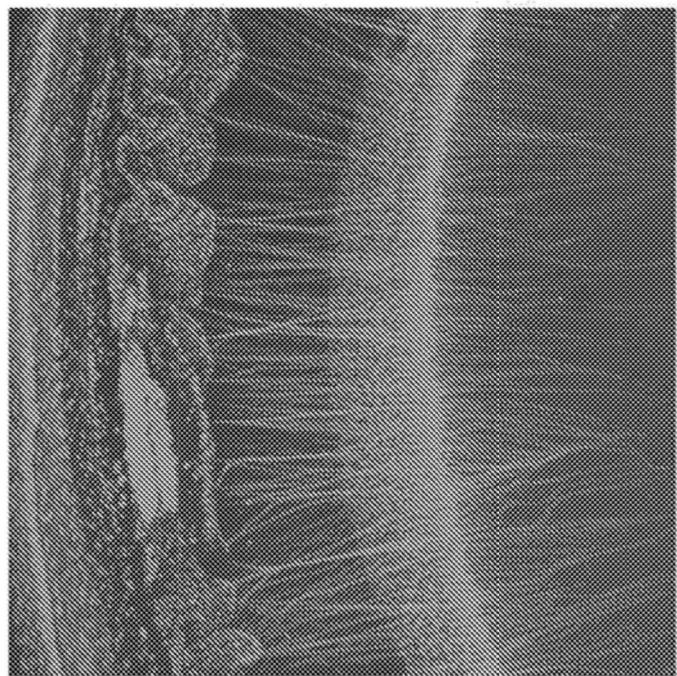


图19B

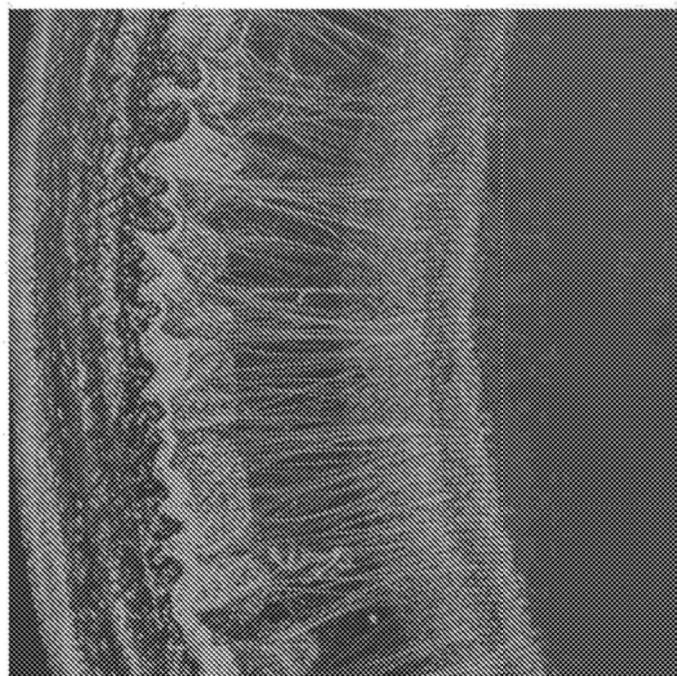


图19C

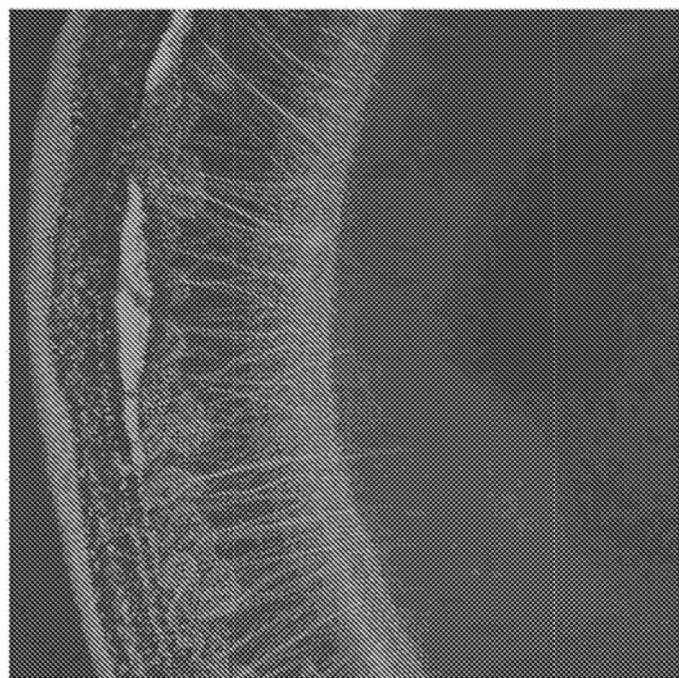


图19D



图19E

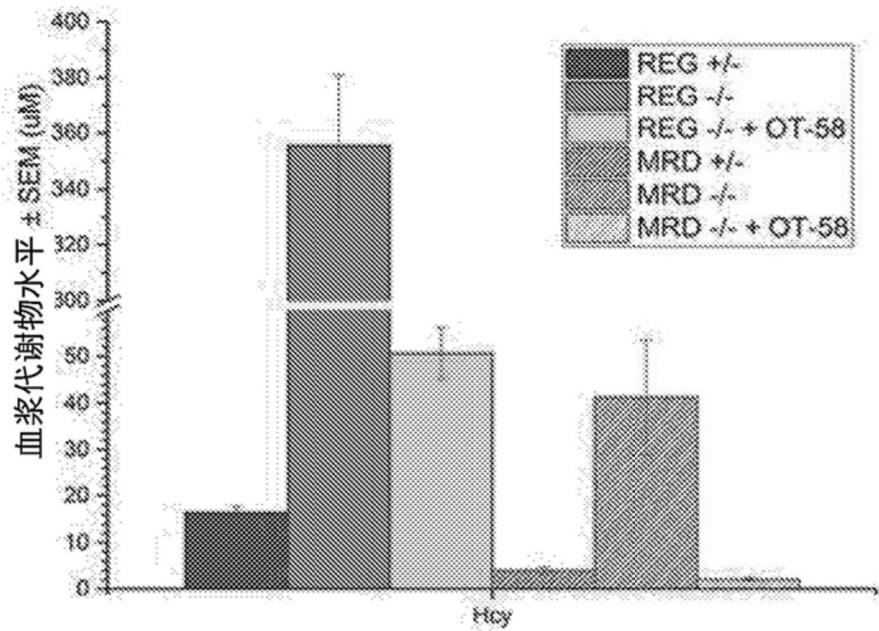


图20A

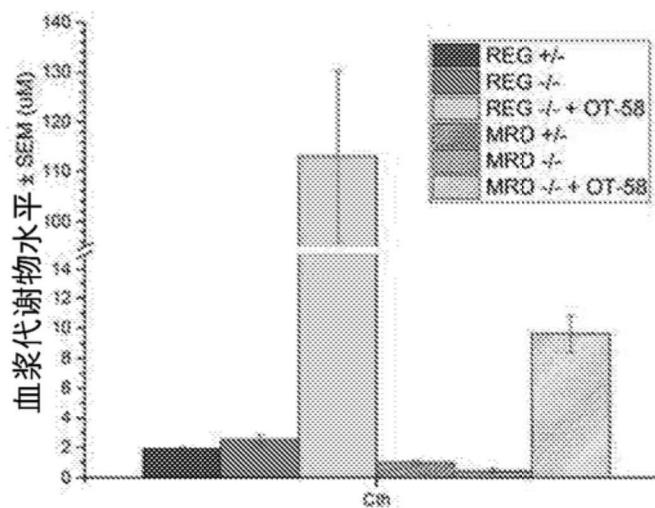


图20B

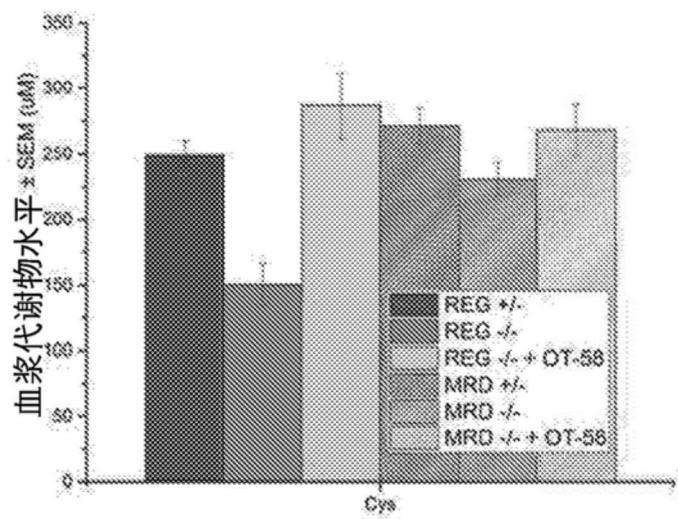


图20C

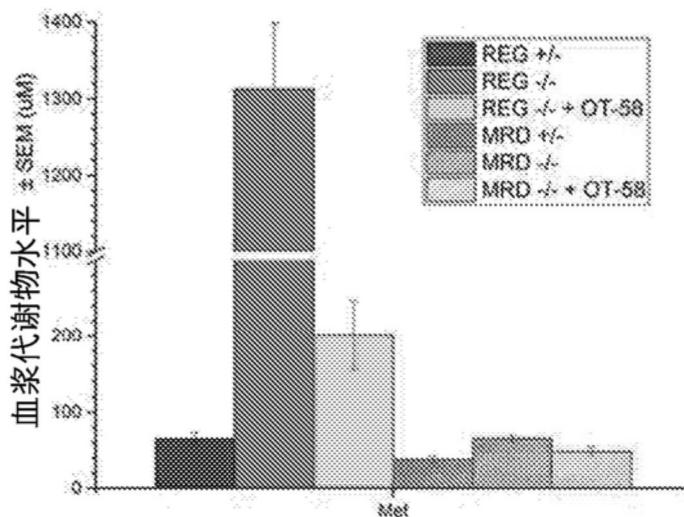


图20D

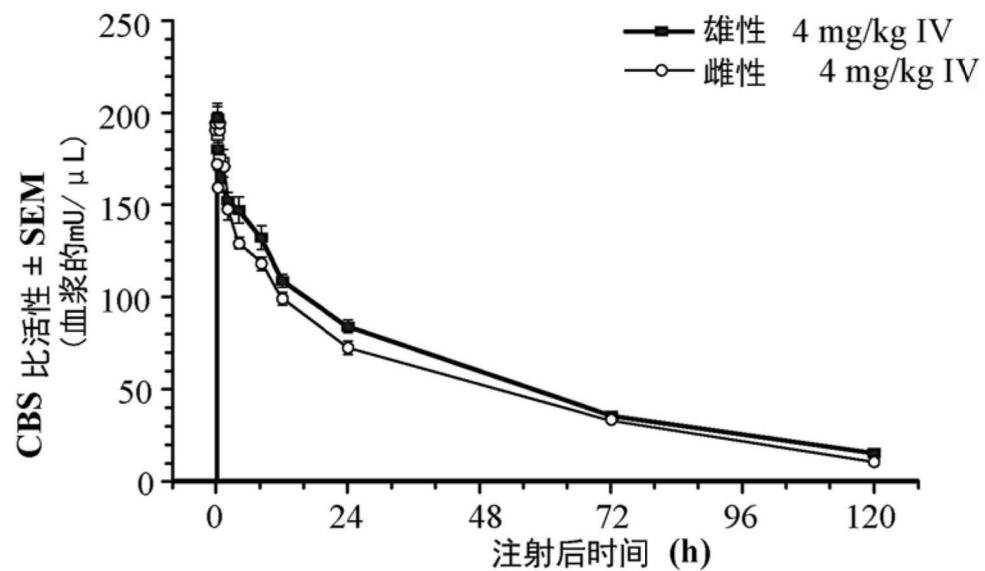


图21A

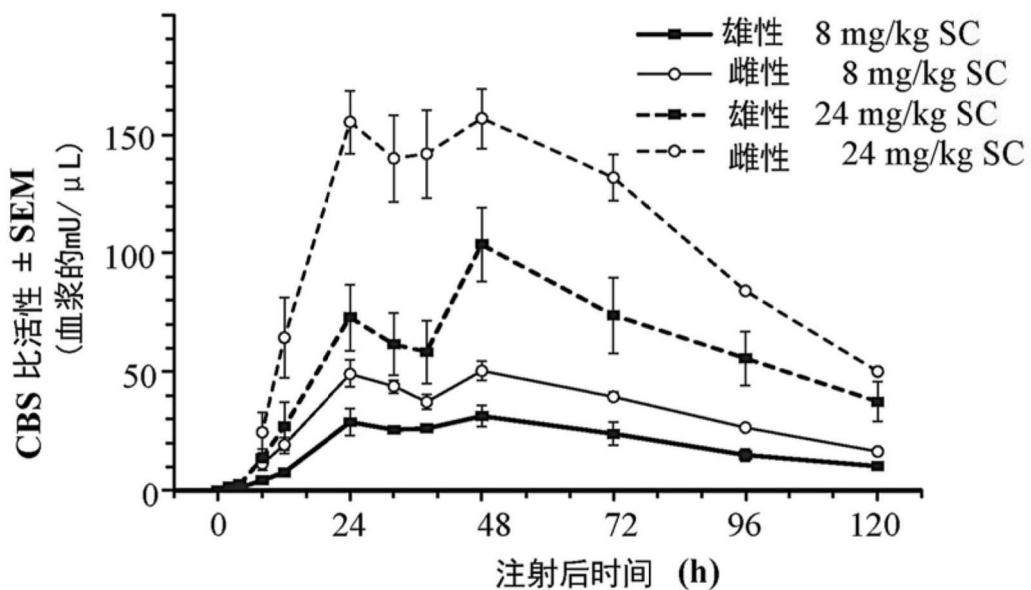


图21B

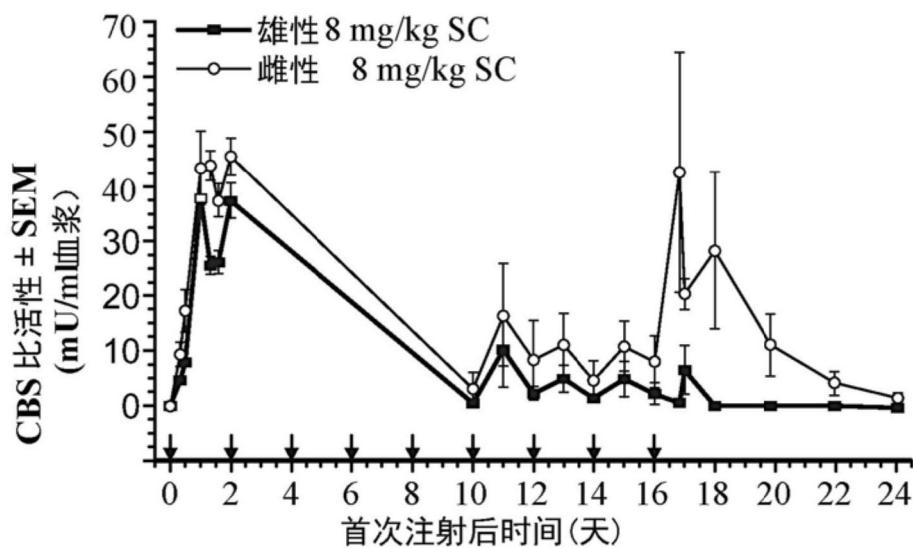


图 21C

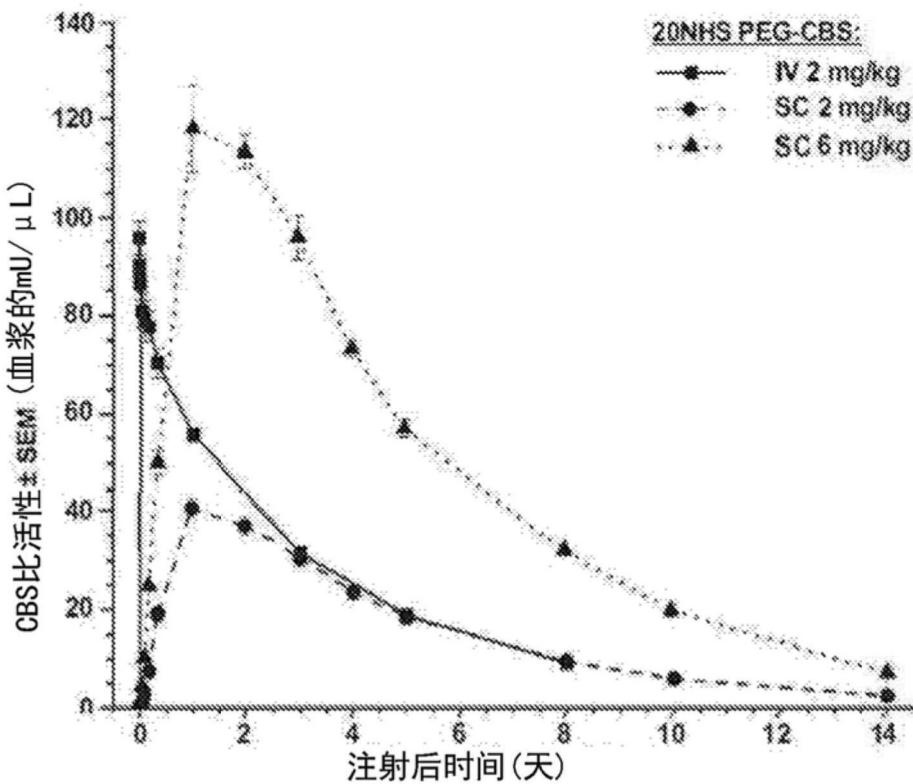


图 22A

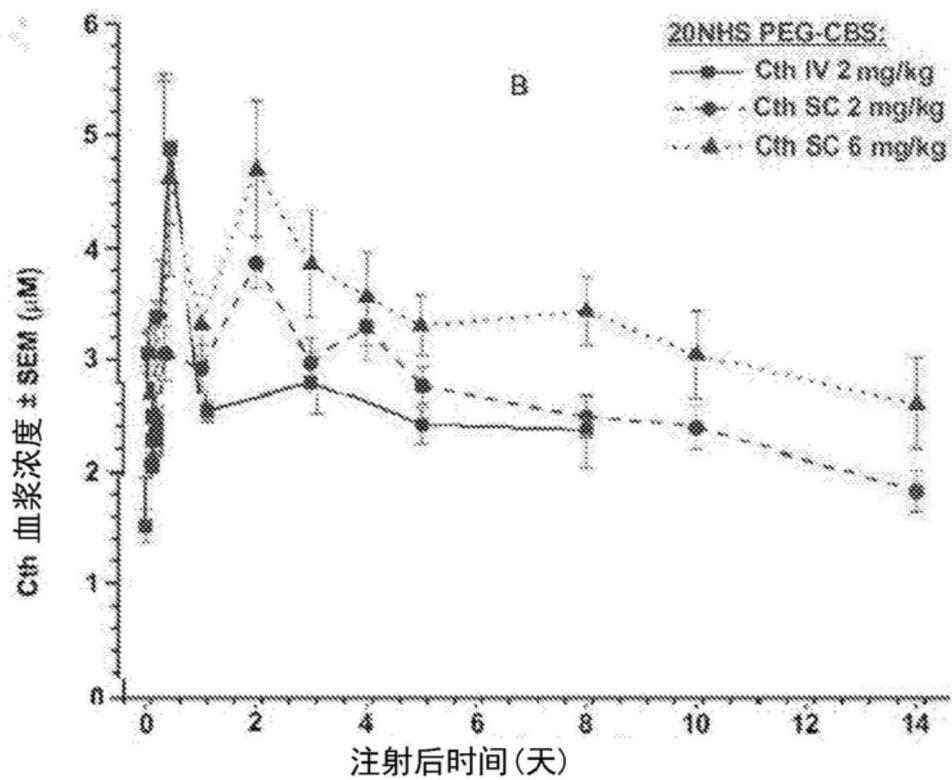


图22B

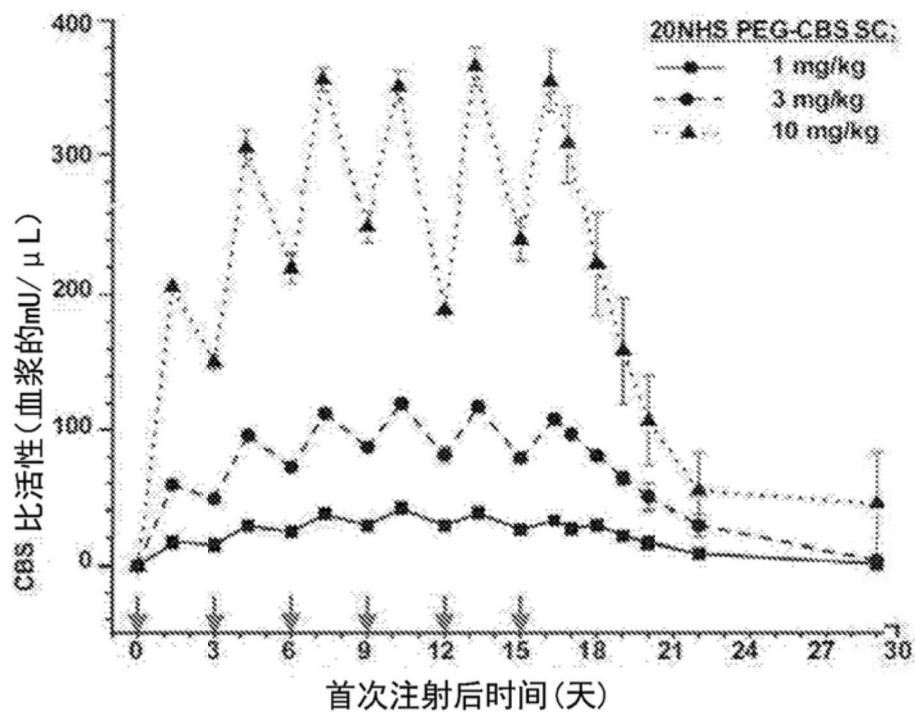


图23A

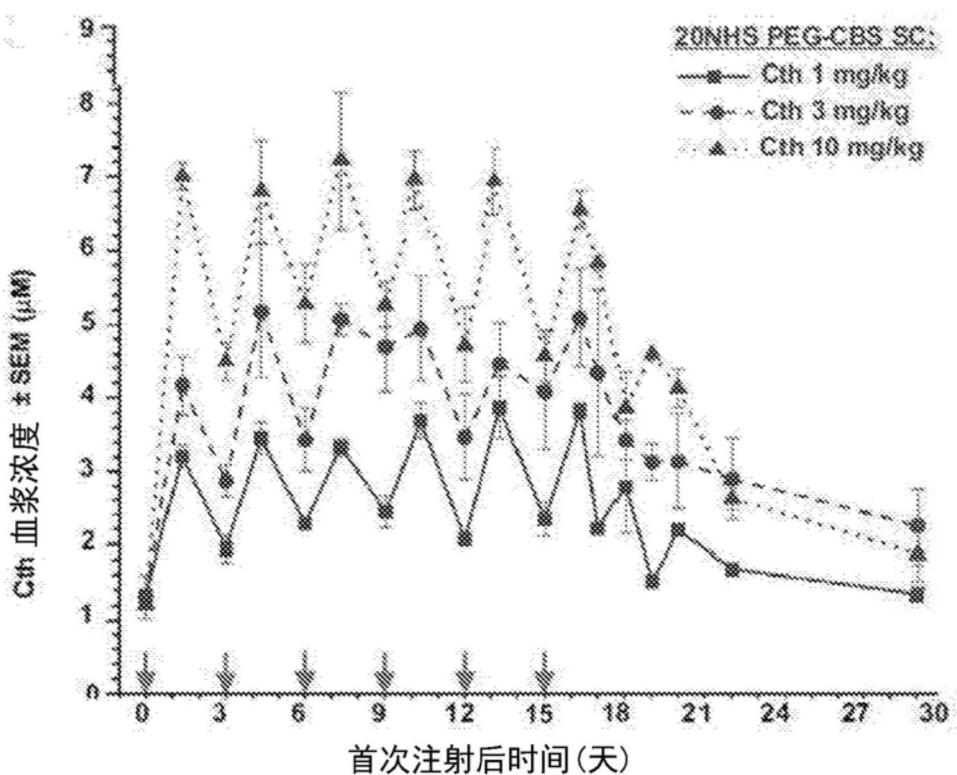


图23B

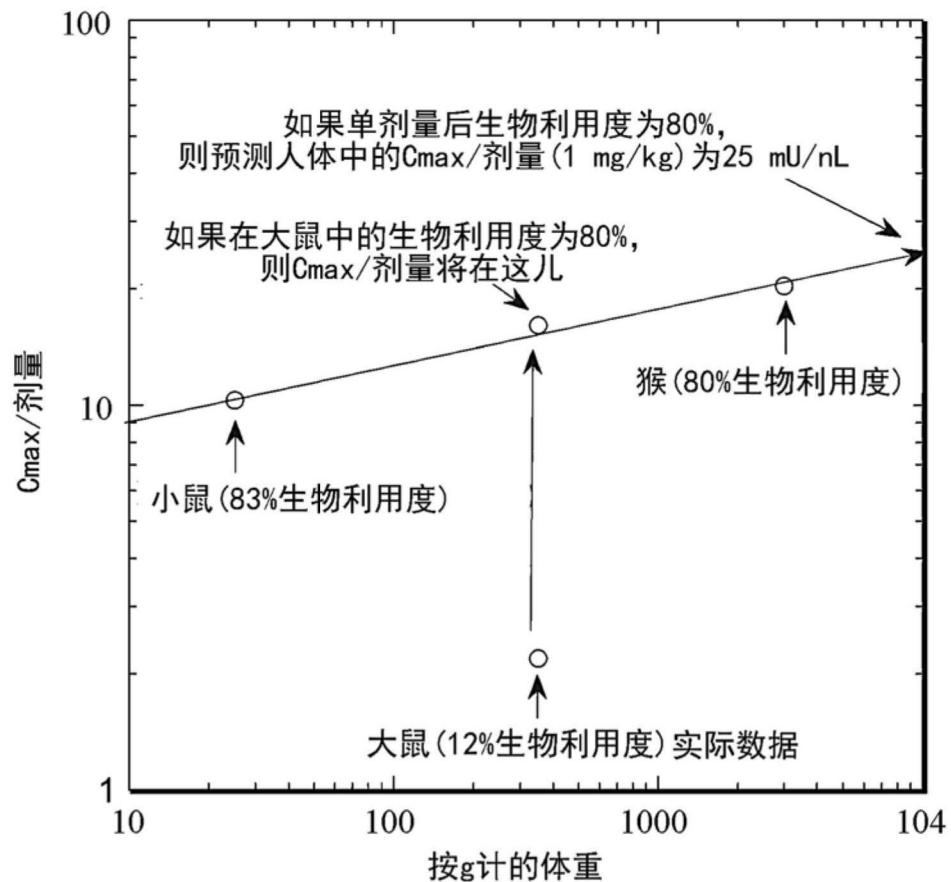


图24A

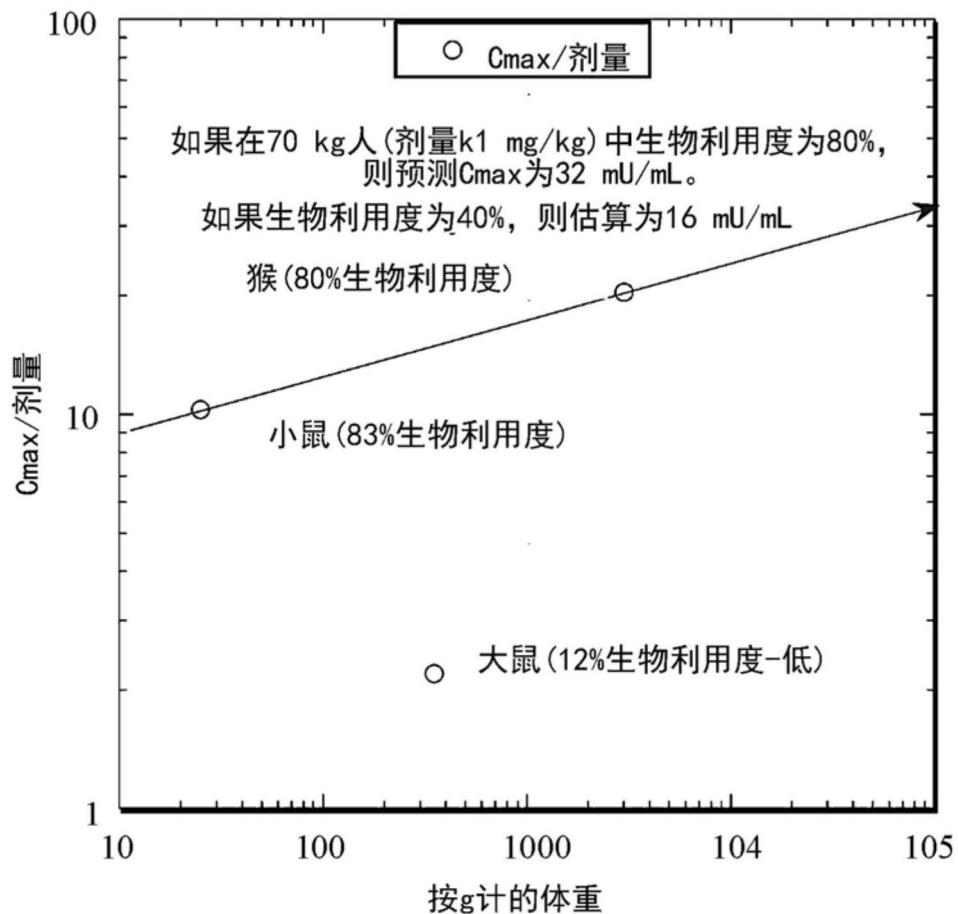


图24B

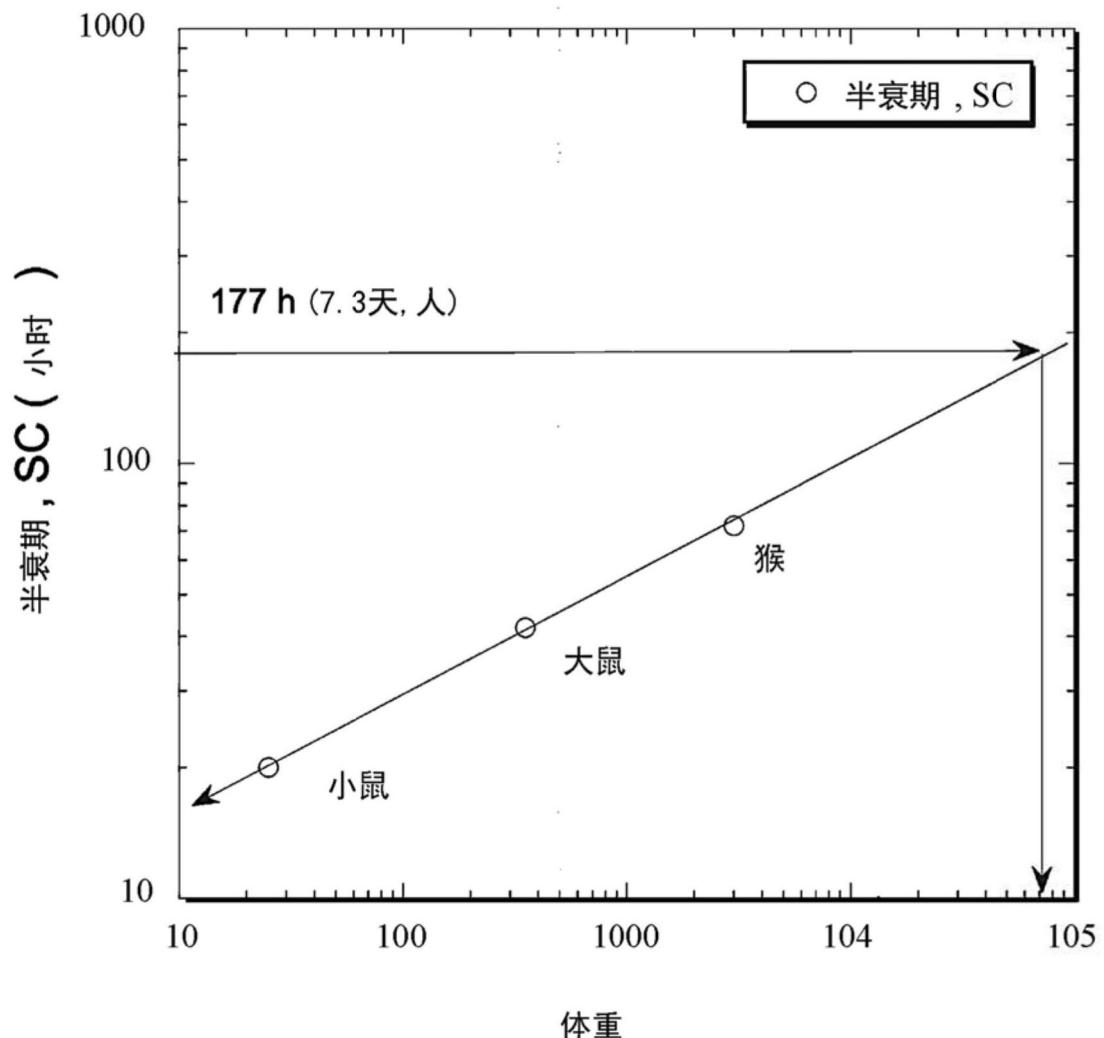


图24C

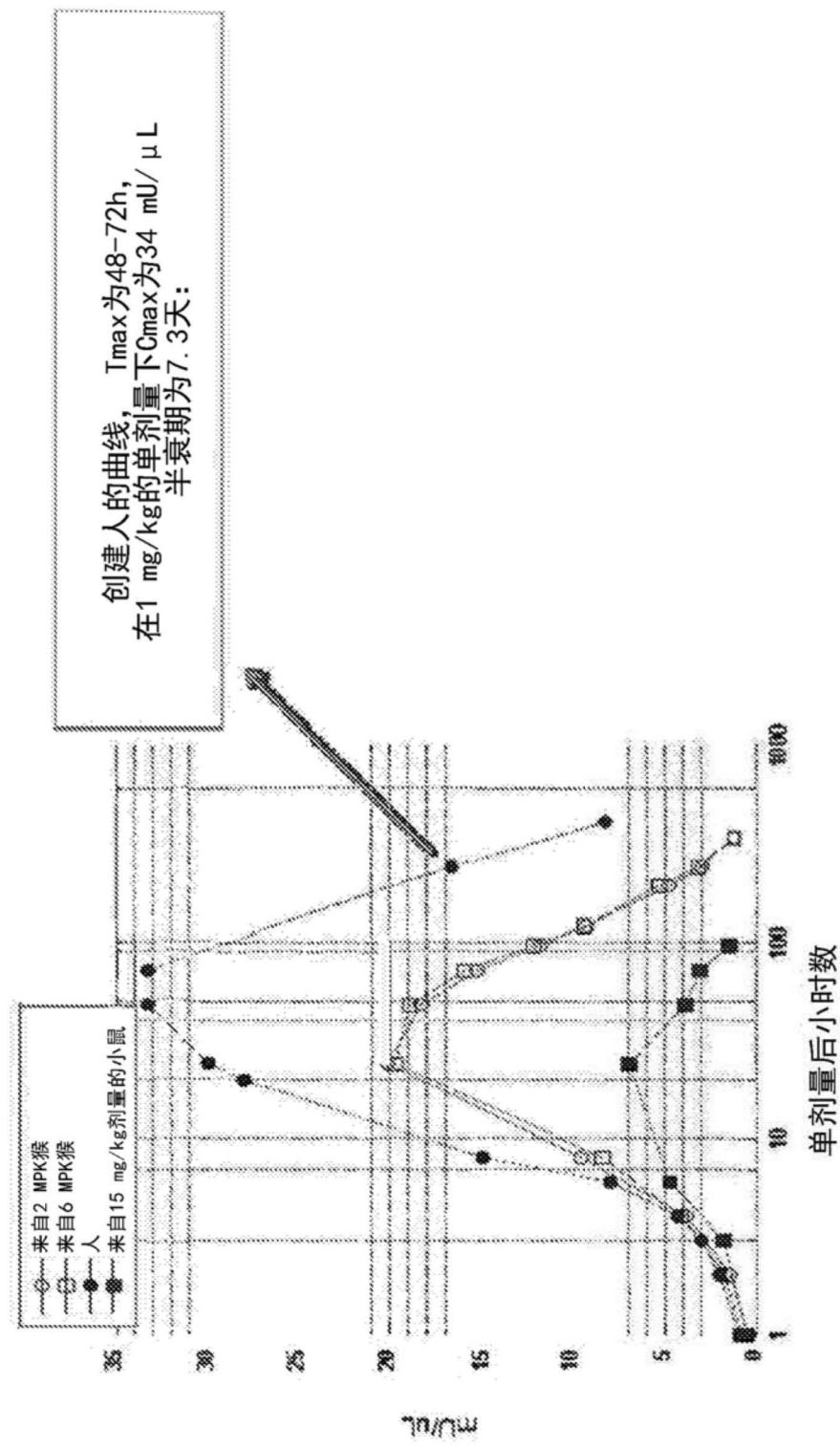


图 24D

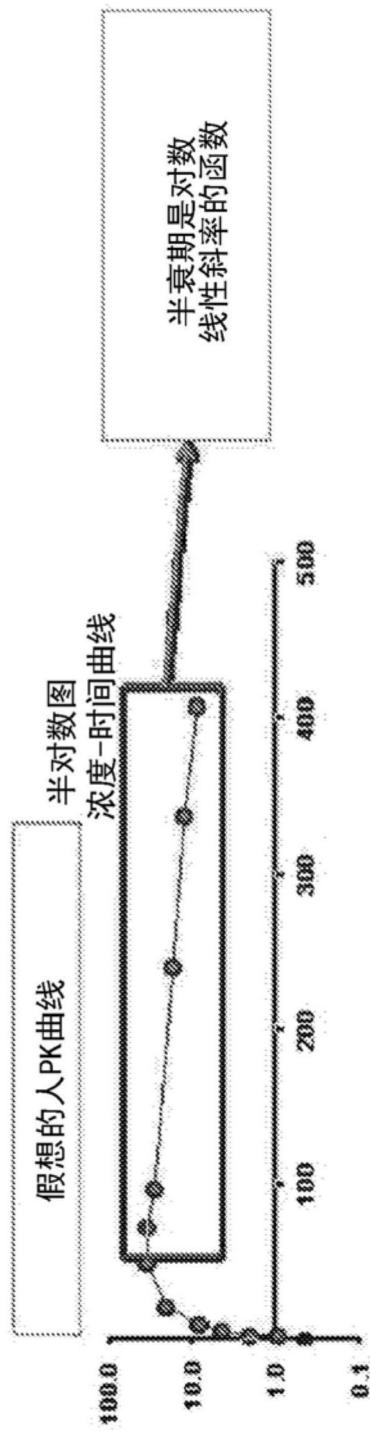


图24E

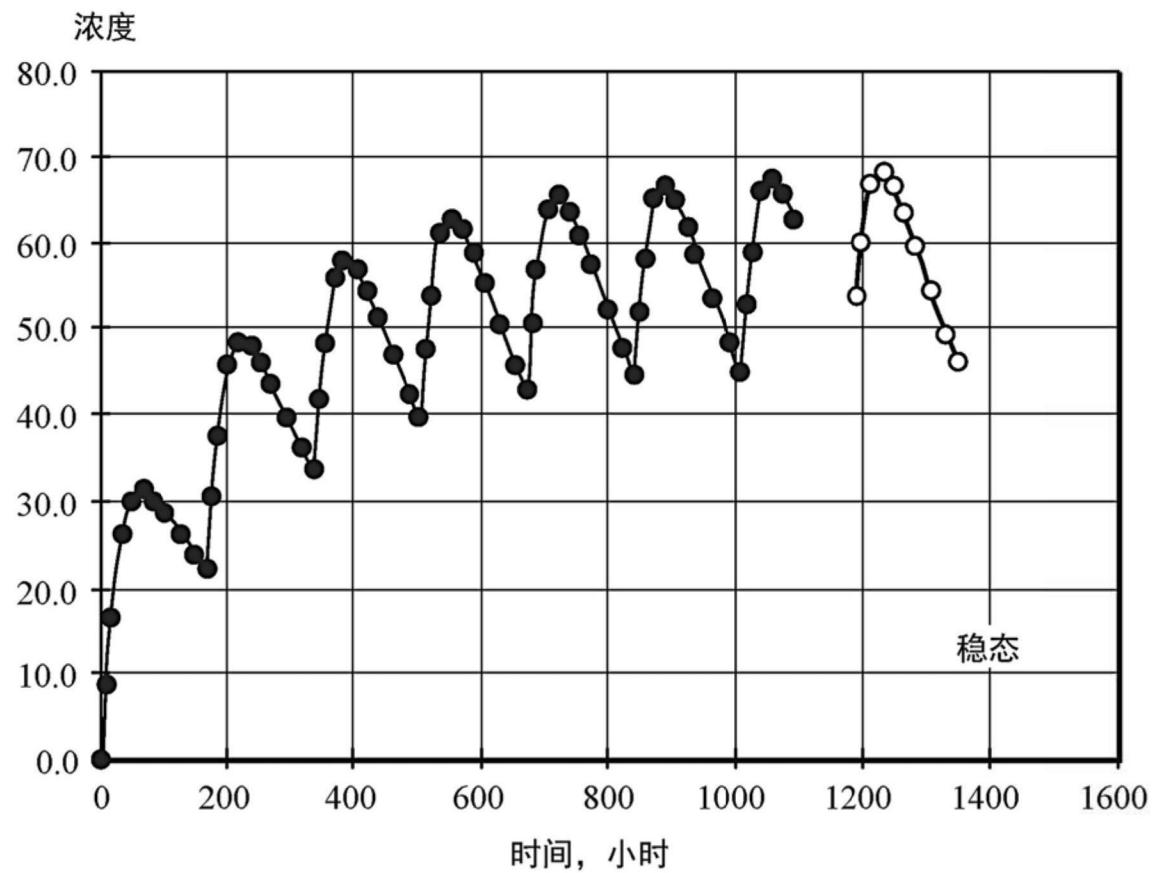


图24F

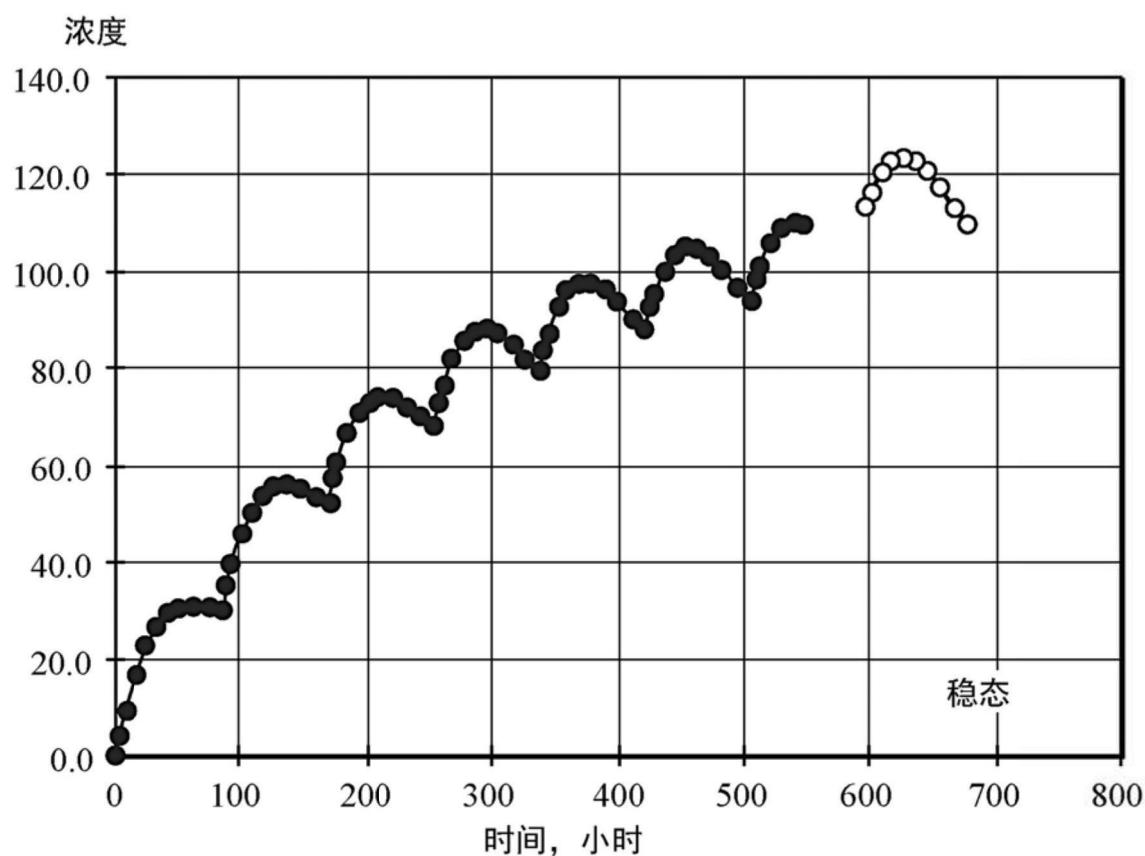


图24G