



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 112888439 A

(43) 申请公布日 2021.06.01

(21) 申请号 201980069272.8

(74) 专利代理机构 北京律诚同业知识产权代理有限公司 11006

(22) 申请日 2019.01.16

代理人 徐金国 吴启超

(30) 优先权数据

62/719,962 2018.08.20 US

(51) Int.Cl.

A61K 31/445 (2006.01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2021.04.20

A61P 3/00 (2006.01)

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2019/013761 2019.01.16

(87) PCT国际申请的公布数据

W02020/040806 EN 2020.02.27

(71) 申请人 阿米库斯治疗学公司

地址 美国新泽西州

(72) 发明人 埃尔弗里达·本杰明

权利要求书6页 说明书23页
序列表8页 附图6页

(54) 发明名称

治疗在GLA基因中具有突变的患者的法布里病的方法

(57) 摘要

提供了治疗诊断患有法布里病的患者的方法和在诊断患有或疑似患有法布里病的患者中增强α-半乳糖苷酶A的方法。某些方法包括向患者施用治疗有效剂量的α-半乳糖苷酶A的药学伴侣,其中所述患者在编码α-半乳糖苷酶A的核酸序列中具有突变。还描述了药学伴侣用于治疗法布里病的用途和用于治疗法布里病的组合物。

atgcagctgaggaatcccgagctccacctgggctgtgctctggctctgcgggttccctggcctc
gtgctctgggacatccctggcgctagggccctcgataacggactggccggaccgccacaatg
ggatggctccactgggaaaggttcatgtgcaatctggactgtcaggaggaaccgactcctgc
atcagcgaaaagctctcatggagatggccgagctgatggtgagcgagggtggaaggacgccc
ggctacgagtatctgtgcatcgatgactgctggatggccctcaaggggactccgaaggcagg
ctgcaggctgatccccaaaggtttcccaacggaatccggcagctcgccaactacgtgattcc
aaggcctcaagctcggcatctacgcccagctgggcaacaaacatgcccggatccccggc
agctcggctactacgacatcgaagccagacatctgctgattggggagtggactgctgaag
ttcgacggctgtactcggatccctggaaaacctggccgagcgtacaaaacatgctccctc
ggcctgaaccggacagggcaggtccatcgtgtacagctgaggtggccctgtacatgtggct
ttccagaagcccaactacacagagatcaggcagtaactgcaaccactggaggaaactctgctgac
atcgacgactcctggaagagcatcaagagcatcctggactggaccagcttcaaccaggagagg
atcgtggcgtggctggaccggaggctggaacgaccccgatctgctggtgattggcaacttc
ggactgagctggaaccagcaggtgaccagatggccctgtggccattatggccgctccctg
ttcatgtccaaacgacctgaggcaatcagcccccaggccaaggctctgctgcaggacaaggat
gtgatcgccatcaaccggaccctgggcaagcagggtaccagctgaggcaaggagataac
ttcgaggtgtgggagggccctgtccgactggcttggccgtggccatgatcaatcggcag
gagatcggcgaccggctcctaacattgctgtggccagcctgggaaaaggagtgcctgc
aaccccgctgcttcatcaccagctgctccccgtgaagcggaggctggctctatgagtgg
accagcaggtgaggtccatataatcctaccggcagcctcctccagctcgagaatacc
atgcagatgagcctcaaggatctgctgtga

1. 一种治疗有需要的人类患者的法布里病的方法,所述方法包括给所述患者施用治疗有效剂量的米加司他或其盐,其中所述患者具有选自下组的 α -半乳糖苷酶A突变,该组由以下组成:D33H、G35A、Y88S、T194A、W204G、Y216S、Q250K和R392T。

2. 如权利要求1所述的方法,其中所述米加司他或其盐每隔一天施用给所述患者。

3. 如权利要求1所述的方法,其中每隔一天给所述患者施用药约100mg至约150mg游离碱当量的所述米加司他或其盐。

4. 如权利要求1所述的方法,其中每隔一天给所述患者施用药约123mg游离碱当量的所述米加司他或其盐。

5. 如权利要求1所述的方法,其中每隔一天给所述患者施用药约123mg的米加司他游离碱。

6. 如权利要求1所述的方法,其中每隔一天给所述患者施用药约150mg的米加司他盐酸盐。

7. 如权利要求1-6中任一项所述的方法,其中口服施用所述米加司他或其盐。

8. 如权利要求1-6中任一项所述的方法,其中所述米加司他或其盐通过注射施用。

9. 如权利要求1-8中任一项所述的方法,其中所述米加司他或其盐增强 α -半乳糖苷酶A活性。

10. 如权利要求1-9中任一项所述的方法,其中所述患者是男性。

11. 如权利要求1-9中任一项所述的方法,其中所述患者是女性。

12. 如权利要求1-11中任一项所述的方法,其中所述突变是D33H。

13. 如权利要求1-11中任一项所述的方法,其中所述突变是G35A。

14. 如权利要求1-11中任一项所述的方法,其中所述突变是Y88S。

15. 如权利要求1-11中任一项所述的方法,其中所述突变是T194A。

16. 如权利要求1-11中任一项所述的方法,其中所述突变是W204G。

17. 如权利要求1-11中任一项所述的方法,其中所述突变是Y216S。

18. 如权利要求1-11中任一项所述的方法,其中所述突变是Q250K。

19. 如权利要求1-11中任一项所述的方法,其中所述突变是R392T。

20. 如权利要求1-19中任一项所述的方法,其中所述突变被公开于药理学参考表中。

21. 如权利要求20所述的方法,其中所述药理学参考表在批准用于治疗法布里病的米加司他产品的产品标签中提供。

22. 如权利要求20所述的方法,其中所述药理学参考表在GALAFOLD®的产品标签中提供。

23. 如权利要求20所述的方法,其中所述药理学参考表在网站上提供。

24. 如权利要求23所述的方法,其中所述网站是www.galafoldamenabilitytable.com或www.fabrygenevariantsearch.com中的一个或多个。

25. 一种增强诊断为或怀疑患有法布里病的患者中的 α -半乳糖苷酶A的方法,所述方法包括给所述患者施用治疗有效剂量的米加司他或其盐,其中所述患者具有选自下组的 α -半乳糖苷酶A突变,该组由以下组成:D33H、G35A、Y88S、T194A、W204G、Y216S、Q250K和R392T。

26. 如权利要求25所述的方法,其中所述米加司他或其盐每隔一天施用给所述患者。

27. 如权利要求25所述的方法,其中每隔一天给所述患者施用药约100mg至约150mg游离

碱当量的所述米加司他或其盐。

28. 如权利要求25所述的方法,其中每隔一天给所述患者施用约123mg游离碱当量的所述米加司他或其盐。

29. 如权利要求25所述的方法,其中每隔一天给所述患者施用约123mg的米加司他游离碱。

30. 如权利要求25所述的方法,其中每隔一天给所述患者施用约150mg的米加司他盐酸盐。

31. 如权利要求25-30中任一项所述的方法,其中口服施用所述米加司他或其盐。

32. 如权利要求25-30中任一项所述的方法,其中所述米加司他或其盐通过注射施用。

33. 如权利要求25-32中任一项所述的方法,其中所述患者是男性。

34. 如权利要求25-32中任一项所述的方法,其中所述患者是女性。

35. 如权利要求25-34中任一项所述的方法,其中所述突变是D33H。

36. 如权利要求25-34中任一项所述的方法,其中所述突变是G35A。

37. 如权利要求25-34中任一项所述的方法,其中所述突变是Y88S。

38. 如权利要求25-34中任一项所述的方法,其中所述突变是T194A。

39. 如权利要求25-34中任一项所述的方法,其中所述突变是W204G。

40. 如权利要求25-34中任一项所述的方法,其中所述突变是Y216S。

41. 如权利要求25-34中任一项所述的方法,其中所述突变是Q250K。

42. 如权利要求25-34中任一项所述的方法,其中所述突变是R392T。

43. 如权利要求25-42中任一项所述的方法,其中所述突变被公开于药理学参考表中。

44. 如权利要求43所述的方法,其中所述药理学参考表在批准用于治疗法布里病的米加司他产品的产品标签中提供。

45. 如权利要求43所述的方法,其中所述药理学参考表在 GALAFOLD[®]的产品标签中提供。

46. 如权利要求43所述的方法,其中所述药理学参考表在网站上提供。

47. 如权利要求46所述的方法,其中所述网站是www.galafoldamenabilitytable.com或www.fabrygenevariantsearch.com中的一个或多个。

48. 一种治疗有需要的人类患者的法布里病的方法,所述方法包括给所述患者施用治疗有效剂量的米加司他或其盐,其中所述患者具有选自下组的 α -半乳糖苷酶A突变,该组由以下组成:N53K、Q57R、S62delinsLA、M96V、R112L、D155E、N228D、Q330P、V339A、K391E和N408Y。

49. 如权利要求48所述的方法,其中所述米加司他或其盐每隔一天施用给所述患者。

50. 如权利要求48所述的方法,其中每隔一天给所述患者施用约100mg至约150mg游离碱当量的所述米加司他或其盐。

51. 如权利要求48所述的方法,其中每隔一天给所述患者施用约123mg游离碱当量的所述米加司他或其盐。

52. 如权利要求48所述的方法,其中每隔一天给所述患者施用约123mg的米加司他游离碱。

53. 如权利要求48所述的方法,其中每隔一天给所述患者施用约150mg的米加司他盐酸

盐。

54. 如权利要求48-53中任一项所述的方法,其中口服施用所述米加司他或其盐。

55. 如权利要求48-53中任一项所述的方法,其中所述米加司他或其盐通过注射施用。

56. 如权利要求48-55中任一项所述的方法,其中所述米加司他或其盐增强 α -半乳糖苷酶A活性。

57. 如权利要求48-56中任一项所述的方法,其中所述患者是男性。

58. 如权利要求48-56中任一项所述的方法,其中所述患者是女性。

59. 如权利要求48-58中任一项所述的方法,其中所述突变是N53K。

60. 如权利要求48-58中任一项所述的方法,其中所述突变是Q57R。

61. 如权利要求48-58中任一项所述的方法,其中所述突变是S62delinsLA。

62. 如权利要求48-58中任一项所述的方法,其中所述突变是M96V。

63. 如权利要求48-58中任一项所述的方法,其中所述突变是R112L。

64. 如权利要求48-58中任一项所述的方法,其中所述突变是D155E。

65. 如权利要求48-58中任一项所述的方法,其中所述突变是N228D。

66. 如权利要求48-58中任一项所述的方法,其中所述突变是Q330P。

67. 如权利要求48-58中任一项所述的方法,其中所述突变是V339A。

68. 如权利要求48-58中任一项所述的方法,其中所述突变是K391E。

69. 如权利要求48-58中任一项所述的方法,其中所述突变是N408Y。

70. 如权利要求48-69中任一项所述的方法,其中所述突变被公开于药理学参考表中。

71. 如权利要求70所述的方法,其中所述药理学参考表在批准用于治疗法布里病的米加司他产品的产品标签中提供。

72. 如权利要求70所述的方法,其中所述药理学参考表在GALAFOLD[®]的产品标签中提供。

73. 如权利要求70所述的方法,其中所述药理学参考表在网站上提供。

74. 如权利要求73所述的方法,其中所述网站是www.galafoldamenabilitytable.com或www.fabrygenevariantsearch.com中的一个或多个。

75. 一种增强诊断为或怀疑患有法布里病的患者中的 α -半乳糖苷酶A的方法,所述方法包括给所述患者施用治疗有效剂量的米加司他或其盐,其中所述患者具有选自下组的 α -半乳糖苷酶A突变,该组由以下组成:N53K、Q57R、S62delinsLA、M96V、R112L、D155E、N228D、Q330P、V339A、K391E和N408Y。

76. 如权利要求75所述的方法,其中所述米加司他或其盐每隔一天施用给所述患者。

77. 如权利要求75所述的方法,其中每隔一天给所述患者施用药100mg至约150mg游离碱当量的所述米加司他或其盐。

78. 如权利要求75所述的方法,其中每隔一天给所述患者施用药123mg游离碱当量的所述米加司他或其盐。

79. 如权利要求75所述的方法,其中每隔一天给所述患者施用药123mg的米加司他游离碱。

80. 如权利要求75所述的方法,其中每隔一天给所述患者施用药150mg的米加司他盐酸盐。

81. 如权利要求75-80中任一项所述的方法,其中口服施用所述米加司他或其盐。
82. 如权利要求75-80中任一项所述的方法,其中所述米加司他或其盐通过注射施用。
83. 如权利要求75-82中任一项所述的方法,其中所述患者是男性。
84. 如权利要求75-82中任一项所述的方法,其中所述患者是女性。
85. 如权利要求75-84中任一项所述的方法,其中所述突变是N53K。
86. 如权利要求75-84中任一项所述的方法,其中所述突变是Q57R。
87. 如权利要求75-84中任一项所述的方法,其中所述突变是S62delinsLA。
88. 如权利要求75-84中任一项所述的方法,其中所述突变是M96V。
89. 如权利要求75-84中任一项所述的方法,其中所述突变是R112L。
90. 如权利要求75-84中任一项所述的方法,其中所述突变是D155E。
91. 如权利要求75-84中任一项所述的方法,其中所述突变是N228D。
92. 如权利要求75-84中任一项所述的方法,其中所述突变是Q330P。
93. 如权利要求75-84中任一项所述的方法,其中所述突变是V339A。
94. 如权利要求75-84中任一项所述的方法,其中所述突变是K391E。
95. 如权利要求75-84中任一项所述的方法,其中所述突变是N408Y。
96. 如权利要求75-95中任一项所述的方法,其中所述突变被公开于药理学参考表中。
97. 如权利要求96所述的方法,其中所述药理学参考表在批准用于治疗法布里病的米加司他产品的产品标签中提供。
98. 如权利要求96所述的方法,其中所述药理学参考表在GALAFOLD®的产品标签中提供。
99. 如权利要求96所述的方法,其中所述药理学参考表在网站上提供。
100. 如权利要求99所述的方法,其中所述网站是www.galafoldamenabilitytable.com或www.fabrygenevariantsearch.com中的一个或多个。
101. 一种治疗有需要的人类患者的法布里病的方法,所述方法包括给所述患者施用治疗有效剂量的米加司他或其盐,其中所述患者具有选自下组的 α -半乳糖苷酶A突变,该组由以下组成:V22G、N34H、G80V、Q107R、Y152D、A156S、L189F、W204L、S238G、I239M、A257V、P259Q、N320H、P323T、E338V、P380L和T412P。
102. 如权利要求101所述的方法,其中所述米加司他或其盐每隔一天施用给所述患者。
103. 如权利要求101所述的方法,其中每隔一天给所述患者施用约100mg至约150mg游离碱当量的所述米加司他或其盐。
104. 如权利要求101所述的方法,其中每隔一天给所述患者施用约123mg游离碱当量的所述米加司他或其盐。
105. 如权利要求101所述的方法,其中每隔一天给所述患者施用约123mg的米加司他游离碱。
106. 如权利要求101所述的方法,其中每隔一天给所述患者施用约150mg的米加司他盐酸盐。
107. 如权利要求101-106中任一项所述的方法,其中口服施用所述米加司他或其盐。
108. 如权利要求101-106中任一项所述的方法,其中所述米加司他或其盐通过注射施用。

109. 如权利要求101-108中任一项所述的方法,其中所述米加司他或其盐增强 α -半乳糖苷酶A活性。

110. 如权利要求101-109中任一项所述的方法,其中所述患者是男性。

111. 如权利要求101-109中任一项所述的方法,其中所述患者是女性。

112. 如权利要求101-111中任一项所述的方法,其中所述突变是V22G。

113. 如权利要求101-111中任一项所述的方法,其中所述突变是N34H。

114. 如权利要求101-111中任一项所述的方法,其中所述突变是G80V。

115. 如权利要求101-111中任一项所述的方法,其中所述突变是Q107R。

116. 如权利要求101-111中任一项所述的方法,其中所述突变是Y152D。

117. 如权利要求101-111中任一项所述的方法,其中所述突变是A156S。

118. 如权利要求101-111中任一项所述的方法,其中所述突变是L189F。

119. 如权利要求101-111中任一项所述的方法,其中所述突变是W204L。

120. 如权利要求101-111中任一项所述的方法,其中所述突变是S238G。

121. 如权利要求101-111中任一项所述的方法,其中所述突变是I239M。

122. 如权利要求101-111中任一项所述的方法,其中所述突变是A257V。

123. 如权利要求101-111中任一项所述的方法,其中所述突变是P259Q。

124. 如权利要求101-111中任一项所述的方法,其中所述突变是N320H。

125. 如权利要求101-111中任一项所述的方法,其中所述突变是P323T。

126. 如权利要求101-111中任一项所述的方法,其中所述突变是E338V。

127. 如权利要求101-111中任一项所述的方法,其中所述突变是P380L。

128. 如权利要求101-111中任一项所述的方法,其中所述突变是T412P。

129. 如权利要求101-128中任一项所述的方法,其中所述突变被公开于药理学参考表中。

130. 如权利要求129所述的方法,其中所述药理学参考表在批准用于治疗法布里病的米加司他产品的产品标签中提供。

131. 如权利要求129所述的方法,其中所述药理学参考表在GALAFOLD[®]的产品标签中提供。

132. 如权利要求129所述的方法,其中所述药理学参考表在网站上提供。

133. 如权利要求132所述的方法,其中所述网站是www.galafoldamenabilitytable.com或www.fabrygenevariantsearch.com中的一个或多个。

134. 一种增强诊断为或怀疑患有法布里病的患者中的 α -半乳糖苷酶A的方法,所述方法包括给所述患者施用治疗有效剂量的米加司他或其盐,其中所述患者具有选自下组的 α -半乳糖苷酶A突变,该组由以下组成:V22G、N34H、G80V、Q107R、Y152D、A156S、L189F、W204L、S238G、I239M、A257V、P259Q、N320H、P323T、E338V、P380L和T412P。

135. 如权利要求134所述的方法,其中所述米加司他或其盐每隔一天施用给所述患者。

136. 如权利要求134所述的方法,其中每隔一天给所述患者施用药100mg至约150mg游离碱当量的所述米加司他或其盐。

137. 如权利要求134所述的方法,其中每隔一天给所述患者施用药123mg游离碱当量的所述米加司他或其盐。

138. 如权利要求134所述的方法,其中每隔一天给所述患者施用药123mg的米加司他游离碱。

139. 如权利要求134所述的方法,其中每隔一天给所述患者施用药150mg的米加司他盐酸盐。

140. 如权利要求134-139中任一项所述的方法,其中口服施用所述米加司他或其盐。

141. 如权利要求134-139中任一项所述的方法,其中所述米加司他或其盐通过注射施用。

142. 如权利要求134-141中任一项所述的方法,其中所述患者是男性。

143. 如权利要求134-141中任一项所述的方法,其中所述患者是女性。

144. 如权利要求134-143中任一项所述的方法,其中所述突变是V22G。

145. 如权利要求134-143中任一项所述的方法,其中所述突变是N34H。

146. 如权利要求134-143中任一项所述的方法,其中所述突变是G80V。

147. 如权利要求134-143中任一项所述的方法,其中所述突变是Q107R。

148. 如权利要求134-143中任一项所述的方法,其中所述突变是Y152D。

149. 如权利要求134-143中任一项所述的方法,其中所述突变是A156S。

150. 如权利要求134-143中任一项所述的方法,其中所述突变是L189F。

151. 如权利要求134-143中任一项所述的方法,其中所述突变是W204L。

152. 如权利要求134-143中任一项所述的方法,其中所述突变是S238G。

153. 如权利要求134-143中任一项所述的方法,其中所述突变是I239M。

154. 如权利要求134-143中任一项所述的方法,其中所述突变是A257V。

155. 如权利要求134-143中任一项所述的方法,其中所述突变是P259Q。

156. 如权利要求134-143中任一项所述的方法,其中所述突变是N320H。

157. 如权利要求134-143中任一项所述的方法,其中所述突变是P323T。

158. 如权利要求134-143中任一项所述的方法,其中所述突变是E338V。

159. 如权利要求134-143中任一项所述的方法,其中所述突变是P380L。

160. 如权利要求134-143中任一项所述的方法,其中所述突变是T412P。

161. 如权利要求134-160中任一项所述的方法,其中所述突变被公开于药理学参考表中。

162. 如权利要求161所述的方法,其中所述药理学参考表在批准用于治疗法布里病的米加司他产品的产品标签中提供。

163. 如权利要求161所述的方法,其中所述药理学参考表在 GALAFOLD[®] 的产品标签中提供。

164. 如权利要求161所述的方法,其中所述药理学参考表在网站上提供。

165. 如权利要求164所述的方法,其中所述网站是www.galafoldamenabilitytable.com或www.fabrygenevariantsearch.com中的一个或多个。

治疗在GLA基因中具有突变的患者的法布里病的方法

技术领域

[0001] 本发明的原理和实施例总体上涉及药理学伴侣用于治疗法布里病的用途,特别是在具有 α -半乳糖苷酶 (GLA) 基因突变或变体的患者中。

背景技术

[0002] 许多人类疾病由导致蛋白质氨基酸序列变化的突变引起,所述变化降低蛋白质稳定性并且可能阻止其正确折叠。蛋白质通常在称为内质网或ER的细胞的特定区域折叠。细胞具有质量控制机制,其确保蛋白质在它们可以从ER移动到细胞中的适当目的地(一个通常称为蛋白质运输的过程)之前被折叠成它们正确的三维形状。错误折叠的蛋白质通常在最初保留在ER中后通过质量控制机制消除。在某些情况下,错误折叠的蛋白质可以在被消除之前积累在ER中。错误折叠的蛋白质在ER中的保留打断了它们的正确运输,并且所得的降低的生物活性可能导致细胞功能受损并最终导致疾病。另外,错误折叠的蛋白质在ER中的积累可能导致对细胞的各种类型的压力,这也可能促成细胞的功能障碍和疾病。

[0003] 此类突变可能导致溶酶体贮积障碍 (LSD),其特征在于由于编码溶酶体酶的基因突变而导致的溶酶体酶缺乏。由而发生的疾病导致那些酶的底物的病理性积累,所述底物包括脂质、碳水化合物和多糖。尽管有与每种LSD相关的许多不同的突变基因型,但是许多突变是错义突变,其可能导致产生较不稳定的酶。这些较不稳定的酶有时通过ER相关的降解途径过早降解。这导致溶酶体中的酶缺乏以及底物的病理性积累。此类突变酶有时在相关领域中被称作“折叠突变体”或“构象突变体”。

[0004] 法布里病是一种由GLA基因突变导致的LSD,该基因编码酶 α -半乳糖苷酶A (α -Gal A)。 α -Gal A是鞘糖脂代谢所需的。突变导致底物球形三酰神经酰胺 (GL-3) 积累在各种组织和器官中。患有法布里病的男性是半合子,因为这些疾病基因在X染色体上编码。法布里病估计会影响40,000和60,000名男性中的1名,并且在女性中发生频率较低。

[0005] 已经有几种治疗法布里病的途径。用于治疗法布里病的一种批准的疗法是酶替代疗法 (ERT),其典型地涉及静脉内输注纯化形式的相应野生型蛋白质。两种 α -Gal A产品目前可用于治疗法布里病:阿加糖酶 α (Replagal[®], 希雷人基因治疗公司 (Shire Human Genetic Therapies)) 和阿加糖酶 β (Fabrazyme[®]; 赛诺菲健赞公司 (Sanofi Genzyme Corporation))。然而,ERT有几个缺点。ERT的主要并发症之一是所输注蛋白质的快速降解,这导致需要大量的昂贵的高剂量输注。ERT具有若干另外的警告,例如难以大规模生产、纯化和储存正确折叠的蛋白质;获得糖基化的天然蛋白质;产生抗蛋白质免疫应答;以及蛋白质无法穿过血脑屏障以减轻中枢神经系统病状(即,低生物利用度)。另外,替代酶不能以足够的量渗透心脏或肾脏,以减少肾足细胞或心肌细胞中的底物积累,这在法布里病状中表现突出。

[0006] 治疗一些酶缺乏的另一种方法涉及使用小分子抑制剂来减少缺陷型酶蛋白的天然底物的产生,从而改善病状。已经针对包括糖鞘脂贮积障碍在内的一类约40种LSD具体描

述了这种“底物减少”方法。提出用作疗法的小分子抑制剂特异性地抑制参与糖脂合成的酶,从而减少需要由缺陷酶分解的细胞糖脂的量。

[0007] 治疗法布里病的第三种方法是用所谓的药理学伴侣(PC)进行治疗。此类PC包括 α -Gal A的小分子抑制剂,其可以与 α -Gal A结合以增加突变酶和相应的野生型的稳定性。然而,用于PC疗法的患者应该有顺从性突变或变体,该突变或变体有潜力被稳定并且折叠成允许运输出ER的构象。

[0008] 因此,即使通过检测血浆或外周白细胞(WBC)中缺陷型 α -Gal A活性来诊断法布里病,如果有可能的话,预测具体的法布里患者是否会对PC的治疗有响应是非常困难的。因此,仍然需要确定响应PC的新的GLA突变或变体,并使具有这些突变或变体的法布里患者可用新的治疗方法。

发明内容

[0009] 本发明的一个方面涉及治疗被诊断患有法布里病的患者的方法。所述方法包括向患者施用治疗有效剂量的 α -Gal A的药理学伴侣,其中患者具有编码 α -Gal A的核酸序列的错义突变。在一个或多个实施例中,所述突变是D33H、G35A、Y88S、T194A、W204G、Y216S、Q250K或R392T。在一个或多个实施例中,所述突变是N53K、Q57R、S62delinsLA、M96V、R112L、D155E、N228D、Q330P、V339A、K391E或N408Y。在一个或多个实施例中,所述突变是V22G、N34H、G80V、Q107R、Y152D、A156S、L189F、W204L、S238G、I239M、A257V、P259Q、N320H、P323T、E338V、P380L或T412P。在各种实施例中,这些突变是相对于SEQ ID NO:2。在一个或多个实施例中,所述突变是相对于SEQ ID NO:2的D33H。在一个或多个实施例中,所述突变是相对于SEQ ID NO:2的G35A。在一个或多个实施例中,所述突变是相对于SEQ ID NO:2的Y88S。在一个或多个实施例中,所述突变是相对于SEQ ID NO:2的T194A。在一个或多个实施例中,所述突变是相对于SEQ ID NO:2的W204G。在一个或多个实施例中,所述突变是相对于SEQ ID NO:2的Y216S。在一个或多个实施例中,所述突变是相对于SEQ ID NO:2的Q250K。在一个或多个实施例中,所述突变是相对于SEQ ID NO:2的R392T。在一个或多个实施例中,所述突变是相对于SEQ ID NO:2的N53K。在一个或多个实施例中,所述突变是相对于SEQ ID NO:2的Q57R。在一个或多个实施例中,所述突变是相对于SEQ ID NO:2的S62delinsLA。在一个或多个实施例中,所述突变是相对于SEQ ID NO:2的M96V。在一个或多个实施例中,所述突变是相对于SEQ ID NO:2的R112L。在一个或多个实施例中,所述突变是相对于SEQ ID NO:2的D155E。在一个或多个实施例中,所述突变是相对于SEQ ID NO:2的N228D。在一个或多个实施例中,所述突变是相对于SEQ ID NO:2的Q330P。在一个或多个实施例中,所述突变是相对于SEQ ID NO:2的V339A。在一个或多个实施例中,所述突变是相对于SEQ ID NO:2的K391E。在一个或多个实施例中,所述突变是相对于SEQ ID NO:2的N408Y。在一个或多个实施例中,所述突变是相对于SEQ ID NO:2的V22G。在一个或多个实施例中,所述突变是相对于SEQ ID NO:2的N34H。在一个或多个实施例中,所述突变是相对于SEQ ID NO:2的G80V。在一个或多个实施例中,所述突变是相对于SEQ ID NO:2的Q107R。在一个或多个实施例中,所述突变是相对于SEQ ID NO:2的Y152D。在一个或多个实施例中,所述突变是相对于SEQ ID NO:2的A156S。在一个或多个实施例中,所述突变是相对于SEQ ID NO:2的L189F。在一个或多个实施例中,所述突变是相对于SEQ ID NO:2的W204L。在一个或多个实施例中,所述突变是相对

于SEQ ID NO:2的S238G。在一个或多个实施例中,所述突变是相对于SEQ ID NO:2的I239M。在一个或多个实施例中,所述突变是相对于SEQ ID NO:2的A257V。在一个或多个实施例中,所述突变是相对于SEQ ID NO:2的P259Q。在一个或多个实施例中,所述突变是相对于SEQ ID NO:2的N320H。在一个或多个实施例中,所述突变是相对于SEQ ID NO:2的P323T。在一个或多个实施例中,所述突变是相对于SEQ ID NO:2的E338V。在一个或多个实施例中,所述突变是相对于SEQ ID NO:2的P380L。在一个或多个实施例中,所述突变是相对于SEQ ID NO:2的T412P。在一些实施例中,药理伴侣包含米加司他或其盐。在一个或多个实施例中,米加司他或其盐的剂量为约100mg至约150mg游离碱当量(FBE)。在一些实施例中,米加司他的盐是米加司他盐酸盐。在一个或多个实施例中,该剂量为每隔一天约150mg的米加司他盐酸盐或等效剂量的米加司他或其除了盐酸盐以外的盐。在一些实施例中,该米加司他或其盐是口服或通过注射施用。这些实施例可以彼此组合或与本发明的其他实施例组合,例如涉及在诊断患有或疑似患有法布里病的患者中增强 α -Gal A的方法、 α -Gal A的药理学伴侣用来制造用于治疗被诊断患有法布里病的患者的药物的用途或用于治疗被诊断患有法布里病的患者的 α -Gal A的药理学伴侣的实施例,连同涉及顺从性突变、合适的PC及其剂量、配制品和施用途径的实施例。

[0010] 本发明的另一方面涉及在诊断患有或疑似患有法布里病的患者中增强 α -Gal A的方法。所述方法包括向患者施用治疗有效剂量的 α -Gal A的药理学伴侣,其中患者具有编码 α -Gal A的核酸序列中的错义突变。在一个或多个实施例中,所述突变是D33H、G35A、Y88S、T194A、W204G、Y216S、Q250K或R392T。在一个或多个实施例中,所述突变是N53K、Q57R、S62delinsLA、M96V、R112L、D155E、N228D、Q330P、V339A、K391E或N408Y。在一个或多个实施例中,所述突变是V22G、N34H、G80V、Q107R、Y152D、A156S、L189F、W204L、S238G、I239M、A257V、P259Q、N320H、P323T、E338V、P380L或T412P。在各种实施例中,这些突变是相对于SEQ ID NO:2。在一个或多个实施例中,所述突变是相对于SEQ ID NO:2的D33H。在一个或多个实施例中,所述突变是相对于SEQ ID NO:2的G35A。在一个或多个实施例中,所述突变是相对于SEQ ID NO:2的Y88S。在一个或多个实施例中,所述突变是相对于SEQ ID NO:2的T194A。在一个或多个实施例中,所述突变是相对于SEQ ID NO:2的W204G。在一个或多个实施例中,所述突变是相对于SEQ ID NO:2的Y216S。在一个或多个实施例中,所述突变是相对于SEQ ID NO:2的Q250K。在一个或多个实施例中,所述突变是相对于SEQ ID NO:2的R392T。在一个或多个实施例中,所述突变是相对于SEQ ID NO:2的N53K。在一个或多个实施例中,所述突变是相对于SEQ ID NO:2的Q57R。在一个或多个实施例中,所述突变是相对于SEQ ID NO:2的S62delinsLA。在一个或多个实施例中,所述突变是相对于SEQ ID NO:2的M96V。在一个或多个实施例中,所述突变是相对于SEQ ID NO:2的R112L。在一个或多个实施例中,所述突变是相对于SEQ ID NO:2的D155E。在一个或多个实施例中,所述突变是相对于SEQ ID NO:2的N228D。在一个或多个实施例中,所述突变是相对于SEQ ID NO:2的Q330P。在一个或多个实施例中,所述突变是相对于SEQ ID NO:2的V339A。在一个或多个实施例中,所述突变是相对于SEQ ID NO:2的K391E。在一个或多个实施例中,所述突变是相对于SEQ ID NO:2的N408Y。在一个或多个实施例中,所述突变是相对于SEQ ID NO:2的V22G。在一个或多个实施例中,所述突变是相对于SEQ ID NO:2的N34H。在一个或多个实施例中,所述突变是相对于SEQ ID NO:2的G80V。在一个或多个实施例中,所述突变是相对于SEQ ID NO:2的Q107R。在一个或多

个实施例中,所述突变是相对于SEQ ID NO:2的Y152D。在一个或多个实施例中,所述突变是相对于SEQ ID NO:2的A156S。在一个或多个实施例中,所述突变是相对于SEQ ID NO:2的L189F。在一个或多个实施例中,所述突变是相对于SEQ ID NO:2的W204L。在一个或多个实施例中,所述突变是相对于SEQ ID NO:2的S238G。在一个或多个实施例中,所述突变是相对于SEQ ID NO:2的I239M。在一个或多个实施例中,所述突变是相对于SEQ ID NO:2的A257V。在一个或多个实施例中,所述突变是相对于SEQ ID NO:2的P259Q。

在一个或多个实施例中,所述突变是相对于SEQ ID NO:2的N320H。在一个或多个实施例中,所述突变是相对于SEQ ID NO:2的P323T。在一个或多个实施例中,所述突变是相对于SEQ ID NO:2的E338V。在一个或多个实施例中,所述突变是相对于SEQ ID NO:2的P380L。在一个或多个实施例中,所述突变是相对于SEQ ID NO:2的T412P。在一些实施例中,药理伴侣包含米加司他或其盐。在一个或多个实施例中,米加司他或其盐的剂量为约100mg至约150mg FBE。在一些实施例中,米加司他的盐是米加司他盐酸盐。在一个或多个实施例中,该剂量为每隔一天约150mg的米加司他盐酸盐或等效剂量的米加司他或其除了盐酸盐以外的盐。在一些实施例中,该米加司他或其盐是口服或通过注射施用。这些实施例可以彼此组合或与本发明的其他实施例组合,例如涉及治疗患有法布里病的患者的方法、 α -Gal A的药理学伴侣用来制造用于治疗被诊断患有法布里病的患者的药物的用途或用于治疗被诊断患有法布里病的患者的 α -Gal A的药理学伴侣的实施例,连同涉及顺从性突变、合适的PC及其剂量、配制品和施用途径的实施例。

[0011] 本发明的另一方面涉及 α -Gal A的药理学伴侣用来制造用于治疗被诊断患有法布里病的患者的药物的用途,其中患者具有编码 α -Gal A的核酸序列的错义突变。在一个或多个实施例中,所述突变是D33H、G35A、Y88S、T194A、W204G、Y216S、Q250K或R392T。在一个或多个实施例中,所述突变是N53K、Q57R、S62delinsLA、M96V、R112L、D155E、N228D、Q330P、V339A、K391E或N408Y。在一个或多个实施例中,所述突变是V22G、N34H、G80V、Q107R、Y152D、A156S、L189F、W204L、S238G、I239M、A257V、P259Q、N320H、P323T、E338V、P380L或T412P。在各种实施例中,这些突变是相对于SEQ ID NO:2。在一个或多个实施例中,所述突变是相对于SEQ ID NO:2的D33H。在一个或多个实施例中,所述突变是相对于SEQ ID NO:2的G35A。在一个或多个实施例中,所述突变是相对于SEQ ID NO:2的Y88S。在一个或多个实施例中,所述突变是相对于SEQ ID NO:2的T194A。在一个或多个实施例中,所述突变是相对于SEQ ID NO:2的W204G。在一个或多个实施例中,所述突变是相对于SEQ ID NO:2的Y216S。在一个或多个实施例中,所述突变是相对于SEQ ID NO:2的Q250K。在一个或多个实施例中,所述突变是相对于SEQ ID NO:2的R392T。在一个或多个实施例中,所述突变是相对于SEQ ID NO:2的N53K。在一个或多个实施例中,所述突变是相对于SEQ ID NO:2的Q57R。在一个或多个实施例中,所述突变是相对于SEQ ID NO:2的S62delinsLA。在一个或多个实施例中,所述突变是相对于SEQ ID NO:2的M96V。在一个或多个实施例中,所述突变是相对于SEQ ID NO:2的R112L。在一个或多个实施例中,所述突变是相对于SEQ ID NO:2的D155E。在一个或多个实施例中,所述突变是相对于SEQ ID NO:2的N228D。在一个或多个实施例中,所述突变是相对于SEQ ID NO:2的Q330P。在一个或多个实施例中,所述突变是相对于SEQ ID NO:2的V339A。在一个或多个实施例中,所述突变是相对于SEQ ID NO:2的K391E。在一个或多个实施例中,所述突变是相对于SEQ ID NO:2的N408Y。在一个或多个实施例中,所述突变是相对于SEQ

ID NO:2的V22G。在一个或多个实施例中,所述突变是相对于SEQ ID NO:2的N34H。在一个或多个实施例中,所述突变是相对于SEQ ID NO:2的G80V。在一个或多个实施例中,所述突变是相对于SEQ ID NO:2的Q107R。在一个或多个实施例中,所述突变是相对于SEQ ID NO:2的Y152D。在一个或多个实施例中,所述突变是相对于SEQ ID NO:2的A156S。在一个或多个实施例中,所述突变是相对于SEQ ID NO:2的L189F。在一个或多个实施例中,所述突变是相对于SEQ ID NO:2的W204L。在一个或多个实施例中,所述突变是相对于SEQ ID NO:2的S238G。在一个或多个实施例中,所述突变是相对于SEQ ID NO:2的I239M。在一个或多个实施例中,所述突变是相对于SEQ ID NO:2的A257V。在一个或多个实施例中,所述突变是相对于SEQ ID NO:2的P259Q。在一个或多个实施例中,所述突变是相对于SEQ ID NO:2的N320H。在一个或多个实施例中,所述突变是相对于SEQ ID NO:2的P323T。在一个或多个实施例中,所述突变是相对于SEQ ID NO:2的E338V。在一个或多个实施例中,所述突变是相对于SEQ ID NO:2的P380L。在一个或多个实施例中,所述突变是相对于SEQ ID NO:2的T412P。在一些实施例中,药理伴侣包含米加司他或其盐。在一个或多个实施例中,米加司他或其盐的剂量为约100mg至约150mg FBE。在一些实施例中,米加司他的盐是米加司他盐酸盐。在一个或多个实施例中,该剂量为每隔一天约150mg的米加司他盐酸盐或等效剂量的米加司他或其除了盐酸盐以外的盐。在一些实施例中,该米加司他或其盐是口服或通过注射施用。这些实施例可以彼此组合或与本发明的其他实施例组合,例如涉及治疗患有法布里病的患者的方法、在诊断患有或疑似患有法布里病的患者中增强 α -Gal A的方法、或用于治疗被诊断患有法布里病的患者的 α -Gal A的药理学伴侣的实施例,连同涉及顺从性突变、合适的PC及其剂量、配制品和施用途径的实施例。

[0012] 本发明的另一方面涉及 α -Gal A的药理学伴侣,用于治疗被诊断患有法布里病的患者,其中患者具有编码 α -Gal A的核酸序列的错义突变。在一个或多个实施例中,所述突变是D33H、G35A、Y88S、T194A、W204G、Y216S、Q250K或R392T。在一个或多个实施例中,所述突变是N53K、Q57R、S62delinsLA、M96V、R112L、D155E、N228D、Q330P、V339A、K391E或N408Y。在一个或多个实施例中,所述突变是V22G、N34H、G80V、Q107R、Y152D、A156S、L189F、W204L、S238G、I239M、A257V、P259Q、N320H、P323T、E338V、P380L或T412P。在各种实施例中,这些突变是相对于SEQ ID NO:2。在一个或多个实施例中,所述突变是相对于SEQ ID NO:2的D33H。在一个或多个实施例中,所述突变是相对于SEQ ID NO:2的G35A。在一个或多个实施例中,所述突变是相对于SEQ ID NO:2的Y88S。在一个或多个实施例中,所述突变是相对于SEQ ID NO:2的T194A。在一个或多个实施例中,所述突变是相对于SEQ ID NO:2的W204G。在一个或多个实施例中,所述突变是相对于SEQ ID NO:2的Y216S。在一个或多个实施例中,所述突变是相对于SEQ ID NO:2的Q250K。在一个或多个实施例中,所述突变是相对于SEQ ID NO:2的R392T。在一个或多个实施例中,所述突变是相对于SEQ ID NO:2的N53K。在一个或多个实施例中,所述突变是相对于SEQ ID NO:2的Q57R。在一个或多个实施例中,所述突变是相对于SEQ ID NO:2的S62delinsLA。在一个或多个实施例中,所述突变是相对于SEQ ID NO:2的M96V。在一个或多个实施例中,所述突变是相对于SEQ ID NO:2的R112L。在一个或多个实施例中,所述突变是相对于SEQ ID NO:2的D155E。在一个或多个实施例中,所述突变是相对于SEQ ID NO:2的N228D。在一个或多个实施例中,所述突变是相对于SEQ ID NO:2的Q330P。在一个或多个实施例中,所述突变是相对于SEQ ID NO:2的V339A。在一个或多个实施例中,所

述突变是相对于SEQ ID NO:2的K391E。在一个或多个实施例中,所述突变是相对于SEQ ID NO:2的N408Y。在一个或多个实施例中,所述突变是相对于SEQ ID NO:2的V22G。在一个或多个实施例中,所述突变是相对于SEQ ID NO:2的N34H。在一个或多个实施例中,所述突变是相对于SEQ ID NO:2的G80V。在一个或多个实施例中,所述突变是相对于SEQ ID NO:2的Q107R。在一个或多个实施例中,所述突变是相对于SEQ ID NO:2的Y152D。在一个或多个实施例中,所述突变是相对于SEQ ID NO:2的A156S。在一个或多个实施例中,所述突变是相对于SEQ ID NO:2的L189F。在一个或多个实施例中,所述突变是相对于SEQ ID NO:2的W204L。在一个或多个实施例中,所述突变是相对于SEQ ID NO:2的S238G。在一个或多个实施例中,所述突变是相对于SEQ ID NO:2的I239M。在一个或多个实施例中,所述突变是相对于SEQ ID NO:2的A257V。在一个或多个实施例中,所述突变是相对于SEQ ID NO:2的P259Q。

在一个或多个实施例中,所述突变是相对于SEQ ID NO:2的N320H。在一个或多个实施例中,所述突变是相对于SEQ ID NO:2的P323T。在一个或多个实施例中,所述突变是相对于SEQ ID NO:2的E338V。在一个或多个实施例中,所述突变是相对于SEQ ID NO:2的P380L。在一个或多个实施例中,所述突变是相对于SEQ ID NO:2的T412P。在一些实施例中,药理伴侣包含米加司他或其盐。在一个或多个实施例中,米加司他或其盐的剂量为约100mg至约150mg FBE。在一些实施例中,米加司他的盐是米加司他盐酸盐。在一个或多个实施例中,该剂量为每隔一天约150mg的米加司他盐酸盐或等效剂量的米加司他或其除了盐酸盐以外的盐。在一些实施例中,该米加司他或其盐是口服或通过注射施用。这些实施例可以彼此组合或与本发明的其他实施例组合,例如涉及治疗患有法布里病的患者的方法、在诊断患有或疑似患有法布里病的患者中增强 α -Gal A的方法或 α -Gal A的药理学伴侣用来制造用于治疗被诊断患有法布里病的患者的药物的用途的实施例,连同涉及顺从性突变、合适的PC及其剂量、配制品和施用途径的实施例。

[0013] 下面列出了不同实施例。应当理解,下面列出的实施例可以不仅如下所列进行组合,而且可以根据本发明的范围以其他合适的组合进行组合。

附图说明

[0014] 图1A-E显示人野生型GLA基因的完整DNA序列(SEQ ID NO:1);

[0015] 图2显示了野生型 α -Gal A蛋白(SEQ ID NO:2);并且

[0016] 图3显示了编码野生型 α -Gal A蛋白的核酸序列(SEQ ID NO:3)。

具体实施方式

[0017] 在描述本发明的若干示例性实施例之前,应当理解,本发明不限于以下描述中列出的构建或方法步骤的细节。本发明能够有其他的实施例,并且能够以不同的方式实施或进行。

[0018] 本发明的不同方面涉及鉴定将对药理学伴侣的治疗有响应的法布里患者中的新的GLA突变。本发明的其他方面也涉及对这些法布里患者的治疗。例如,出人意料地发现, α -Gal A中的错义突变D33H、G35A、Y88S、T194A、W204G、Y216S、Q250K、R392T、N53K、Q57R、S62delinsLA、M96V、R112L、D155E、N228D、Q330P、V339A、K391E、N408Y、V22G、N34H、G80V、Q107R、Y152D、A156S、L189F、W204L、S238G、I239M、A257V、P259Q、N320H、P323T、E338V、P380L

或T412P导致的低 α -Gal A活性在暴露于药理学伴侣时可增加。推而广之,具有这些突变的患者将对药理伴侣的治疗有响应。

[0019] 定义

[0020] 在本说明书中使用的术语在本发明的上下文中以及在使用每个术语的特定上下文中通常具有其在本领域中的普通含义。某些术语在下文或在本说明书的其他地方讨论,以向从业者提供描述本发明的组合物和方法以及如何制备和使用它们的另外指导。

[0021] 术语“法布里病”是指由于缺乏溶酶体 α -Gal A活性而导致的鞘糖脂分解代谢的X连锁先天错误。这种缺陷导致底物球形三酰神经酰胺(“GL-3”,也称为Gb₃或神经酰胺己三糖苷)和相关的鞘糖脂在心脏、肾脏、皮肤和其他组织的血管内皮溶酶体中积累。该酶的另一底物是血浆球丙糖酰基鞘氨醇(“血浆溶血Gb₃”)。

[0022] “携带者”是一名女性,其具有一个有缺陷型 α -Gal A基因的X染色体和一个有正常基因的X染色体,并且其中一种或多种细胞类型中存在正常等位基因的X染色体失活。携带者通常被诊断为患有法布里病。

[0023] “患者”是指已经被诊断为患有或疑似患有特定疾病的受试者。患者可以是人或动物。

[0024] “法布里患者”是指已经被诊断为患有或疑似患有法布里病并且具有如下进一步定义的突变的 α -Gal A的个体。法布里病的特征标记能以相同的发生率出现在男性半合子和女性携带者中,但是女性受到的影响通常不太严重。

[0025] 人 α -半乳糖苷酶A(α -Gal A)是指由人GLA基因编码的酶。包括内含子和外显子的 α -Gal A的完整DNA序列可以在GenBank登录号X14448.1中得到,并显示在图1A-E(SEQ ID NO:1)中。人 α -Gal A酶由429个氨基酸组成,并可以在GenBank登录号X14448.1和U78027中获得,并示于图2(SEQ ID NO:2)。仅包括SEQ ID NO:1的编码区(即外显子)的核酸序列示于图3(SEQ ID NO:3)中。

[0026] 术语“突变蛋白质”包括在编码所述蛋白质的基因中具有突变的蛋白质,所述突变导致所述蛋白质在通常存在于ER中的条件下不能达到稳定构象。不能达到稳定构象导致大量的酶被降解,而不是被转运到溶酶体。这样一种突变有时称为“构象突变体”。此类突变包括但不限于错义突变以及框内小缺失和插入。如本文所用,缺失用缩写“del”表示,插入用缩写“ins”表示。因此,核苷酸变化“c.184_185insTAG”是指核苷酸184和185之间的核苷酸序列TAG的插入,蛋白质序列变化“S62delinsLA”是指位置62处的氨基酸S(丝氨酸)的缺失和氨基酸序列LA(亮氨酸和丙氨酸)的插入。

[0027] 如本文在一个实施例中所用,术语“突变 α -Gal A”包括在编码 α -Gal A的基因中具有突变的 α -Gal A,所述突变导致所述酶在通常存在于ER中的条件下不能达到稳定构象。不能达到稳定构象导致大量的酶被降解,而不是被转运到溶酶体。

[0028] 如本文所用,术语“特异性药理学伴侣”(“SPC”)或“药理学伴侣”(“PC”)是指特异性地结合蛋白质并具有一种或多种以下作用的任何分子,包括小分子、蛋白质、肽、核酸、碳水化合物等:(i) 增强所述蛋白质的稳定分子构象的形成;(ii) 诱导所述蛋白质从ER运输到另一个细胞位置(优选地天然细胞位置),即防止所述蛋白质的ER相关的降解;(iii) 防止错误折叠的蛋白质的聚集;和/或(iv) 恢复或增强所述蛋白质的至少部分野生型功能和/或活性。特异性地结合例如 α -Gal A的化合物意味着它与酶结合并对酶而不是相关或不相关的

酶的群组施加伴侣效应。更具体地,这个术语不是指代内源伴侣例如BiP,或指代对不同蛋白质表现非特异性伴侣活性的非特异性试剂例如甘油、DMSO或氘化水,即化学伴侣。在本发明的一个或多个实施例中,PC可以是可逆的竞争性抑制剂。在一个实施例中,PC是米加司他或其盐。在另一个实施例中,PC是米加司他游离碱(例如123mg的米加司他游离碱)。在又一个实施例中,PC是米加司他的盐(例如150mg的盐酸米加司他)。

[0029] 酶的“竞争性抑制剂”可以指代在结构上类似于酶底物的化学结构和分子几何形状以在与底物大致相同的位置结合酶的化合物。因此,抑制剂与底物分子竞争相同的活性位点,从而增加 K_m 。如果足够的底物分子可用于取代抑制剂,竞争性抑制通常是可逆的,即竞争性抑制剂可以可逆地结合。因此,酶抑制的量取决于抑制剂浓度、底物浓度以及抑制剂和底物对活性位点的相对亲和力。

[0030] 如本文所用,术语“特异性地结合”是指药理学伴侣与蛋白质例如 α -Gal A的相互作用,特别是与所述蛋白质的氨基酸残基的相互作用,所述氨基酸残基直接参与接触药理学伴侣。药理学伴侣特异性地结合靶蛋白(例如, α -Gal A),以对所述蛋白质而不是相关或不相关的蛋白质的群组施加伴侣效应。与任何给定的药理学伴侣相互作用的蛋白质的氨基酸残基可以在或可以不在蛋白质的“活性位点”内。可以通过常规结合测定或通过结构研究(例如,共结晶、NMR等)评估特异性结合。 α -Gal A的活性位点是底物结合位点。

[0031] “缺陷型 α -Gal A活性”是指来自患者的细胞中的 α -Gal A活性,与(使用相同的方法)不患有或没有疑似患有法布里或任何其他疾病(尤其是血液病)的正常个体中的活性相比,其低于正常范围。

[0032] 如本文所用,术语“增强 α -Gal A活性”或“增加 α -Gal A活性”是指相对于在不与对 α -Gal A具有特异性的药理学伴侣接触的细胞(优选是相同细胞类型或相同细胞,例如,在较早的时间)中的量,在与对 α -Gal A具有特异性的药理学伴侣接触的细胞中增加采用稳定构象的 α -Gal A的量。这个术语还指代相对于在不与对蛋白质具有特异性的药理学伴侣接触的情况下的 α -Gal A的运输,增加 α -Gal A向与对 α -Gal A具有特异性的药理学伴侣接触的细胞中的溶酶体中的运输。这些术语同时指代野生型和突变 α -Gal A。在一个实施例中,细胞中 α -Gal A的量的增加是通过测量来自已经用PC处理的细胞的裂解物中人工底物的水解来测量。水解的增加表明 α -Gal A活性增加。

[0033] 术语“ α -Gal A活性”是指细胞中野生型 α -Gal A的正常生理功能。例如, α -Gal A活性包括GL-3的水解。

[0034] “响应者”是被诊断为患有或疑似患有溶酶体贮积障碍(例如像法布里病)的个体,响应于接触PC,其细胞分别表现出足够增加的 α -Gal A活性和/或症状的减轻或替代标记的增强。法布里替代标记的增强的非限制性实例是溶血 GB_3 和美国专利申请公开号US 2010-0113517中公开的那些,将其通过引用以其全文特此并入。

[0035] 在US 2010/0113517中披露的法布里病的替代标记的改善的非限制性实例包括细胞(例如,成纤维细胞)和组织中 α -Gal A水平或活性的增加;GL-3积累的减少;高半胱氨酸和血管细胞粘附分子-1(VCAM-1)的血浆浓度降低;心肌细胞和瓣膜纤维细胞内GL-3积累减少;血浆溶血 GB_3 的降低;心脏肥大(尤其是左心室肥大)的减少,瓣膜功能不全和心律失常改善;蛋白尿改善;脂质(如CTH、乳糖神经酰胺、神经酰胺)的尿浓度降低,并且葡萄糖神经酰胺和鞘磷脂的尿浓度增加;肾小球上皮细胞中无层状包涵体(斑马体);肾功能改善;少汗症

的减轻;无血管角质瘤;以及听力异常(如高频感觉神经性听力损失、进行性听力损失、突发性耳聋或耳鸣)的改善。神经症状的改善包括短暂性脑缺血发作(TIA)或中风的预防;以及自身表现为肢端感觉异常(四肢灼痛或刺痛)的神经性疼痛的改善。可以针对法布里病进行评估的另一种类型的临床标记是有害的心血管表现的发生率。法布里病的常见心脏相关征象和症状包括左心室肥大、瓣膜疾病(尤其是二尖瓣脱垂和/或反流)、早发性冠状动脉疾病、心绞痛、心肌梗塞、传导异常、心律失常、充血性心力衰竭。

[0036] 实现一个或多个上述反应的剂量是“治疗有效剂量”。

[0037] 短语“药学上可接受的”是指分子实体和组合物是生理上可耐受的并且当施用人时通常不会产生不良反应。在一些实施例中,如本文所用,术语“药学上可接受的”是指由联邦或州政府的管理机构批准的或者在美国药典或其他普遍认可的药典中列出的用于在动物体内、更特别是在人体内使用。就药物载体而论的术语“载体”是指与化合物一起施用的稀释剂、辅助剂、赋形剂或媒介物。此类药物载体可以是无菌液体,例如水和油类。优选地应用水或水溶液盐溶液以及右旋糖和甘油水溶液作为载体,特别是用于可注射溶液。合适的药物载体描述于由E.W.Martin编辑的“Remington's Pharmaceutical Sciences[雷明顿药物科学]”,第18版或其他版本中。

[0038] 如本文所用,术语“分离的”意味着将参比材料从其通常发现的环境中去除。因此,分离的生物材料可以不含细胞组分,即发现或产生所述材料的细胞的组分。在核酸分子的情况下,分离的核酸包括PCR产物、凝胶上的mRNA条带、cDNA或限制性片段。在另一个实施例中,分离的核酸优选地从可以在其被发现的染色体上切除,并且更优选地不再与非调节性非编码区连接,或与位于当在染色体中发现时由分离的核酸分子包含的基因上游或下游的其他基因连接。在又一个实施例中,分离的核酸缺少一个或多个内含子。分离的核酸包括插入质粒、粘粒、人工染色体等中的序列。因此,在一个特定实施例中,重组核酸是分离的核酸。分离的蛋白质可以与其在细胞中结合的其他蛋白质或核酸或两者结合,或者如果其是膜结合蛋白质则与细胞膜结合。将分离的细胞器、细胞或组织从其在生物体中发现的解剖部位去除。分离的材料可以是但不必是纯化的。

[0039] 术语“约”和“大约”通常意指在给定测量的性质或精度的情况下测量的量的可接受的误差程度。典型的示例性误差程度在给定值或值范围的20%以内、优选地在10%以内、更优选地在5%以内。可替代地,特别是在生物系统中,术语“约”和“大约”可以意指在给定值的一个数量级内、优选地在10倍或5倍内、更优选地在2倍内的值。除非另有说明,本文给出的数字量是近似的,意味着当没有明确说明时,可以推断出术语“约”或“大约”。

[0040] 术语“酶替代疗法”或“ERT”是指将非天然的经纯化的酶引入缺乏这种酶的个体。施用的蛋白质可以从自然来源或通过重组表达而获得(如下文更详细描述)。所述术语也指代将经纯化的酶引入个体,所述个体原本需要或受益于施用经纯化的酶,例如所述个体遭受酶不足。所引入的酶可以是在体外产生的经纯化的重组酶,或从离体组织或体液(例如像胎盘或动物奶)或从植物纯化的蛋白质。

[0041] 如本文所用,术语“游离碱当量”或“FBE”是指米加司他或其盐中存在的米加司他的量。换句话说,术语“FBE”意指一个量的米加司他游离碱,抑或由米加司他的盐提供的当量的量的米加司他游离碱。例如,由于盐酸盐的重量,150mg的米加司他盐酸盐仅提供和123mg的游离碱形式的米加司他所提供的同样多的米加司他。预期其他盐具有不同的转换

因子,这取决于盐的分子量。

[0042] 除非有相反的确切说明,术语“米加司他”涵盖米加司他游离碱或其药学上可接受的盐(例如,米加司他HCl)。

[0043] 术语“突变”和“变体”(例如,如在“顺从性突变或变体”中)是指基因或染色体的核苷酸序列的变化。在此提及的两个术语典型地一起使用-例如,如在“突变或变体”中-是指前一句中所述的核苷酸序列的变化。如果出于一些原因仅叙述了两个术语中的一个,则那个缺失的术语旨在包括在内,并且人们应该这样理解。此外,术语“顺从性突变”和“顺从性变体”是指顺从PC疗法的突变或变体,例如顺从米加司他疗法的突变。特定类型的顺从性突变或变体是“HEK测定顺从性突变或变体”,其是根据本文所描述的体外HEK测定中的标准确定为顺从米加司他疗法的突变或变体。

[0044] 法布里病

[0045] 法布里病是一种罕见的、进行性的和破坏性的X连锁溶酶体贮积障碍。GLA基因的突变导致溶酶体酶 α -Gal A(其是鞘糖脂代谢所需的)的缺乏。从生命的早期开始, α -Gal A活性的降低导致鞘糖脂(包括GL-3和血浆溶血Gb₃)的积累,并且导致法布里病的症状和生命限制性后遗症,包括疼痛、胃肠道症状、肾衰竭、心肌病、脑血管事件和早期死亡。早期开始疗法和终身治疗提供了减慢疾病进展和延长预期寿命的机会。

[0046] 法布里病涵盖广泛的疾病严重程度和发病年龄,尽管它传统上被分为2种主要表型,即“经典型”和“迟发型”。经典型表型主要已经归于具有不可检测的至低的 α -Gal A活性和肾、心脏和/或脑血管表现的更早发作的男性。迟发型表型主要已经归于具有更高残留 α -Gal A活性和这些疾病表现的更晚发作的男性。杂合性女性携带者通常表达迟发型表型,但是取决于X染色体失活的模式,也可以显示经典型表型。

[0047] 已经鉴定出超过1,000种导致法布里病的GLA突变。大约60%是错义突变,导致 α -Gal A酶中的单氨基酸取代。错义GLA突变通常导致异常折叠的和不稳定形式的 α -Gal A的产生,并且大多数与经典型表型相关。内质网中的正常细胞质量控制机制阻断了这些异常蛋白质转运到溶酶体上,并且将这些异常蛋白质作为过早降解和消除的目标。许多错义突变形式是米加司他(α -Gal A特异性药理学伴侣)的靶标。

[0048] 法布里病的临床表现具有广泛的严重程度,并且与患者的残留 α -GAL水平大致相关。大多数目前治疗的患者被称为经典型法布里病患者,其中大多数是男性。这些患者经历各种器官(包括肾脏、心脏和脑)的疾病,其中疾病症状首先出现在青春期,并且通常严重程度不断进展,直到生命的第四或第五个十年死亡为止。许多最近的研究表明,存在大量未确诊的男性和女性,他们具有一系列通常首次出现在成年期的法布里病症状,例如心脏或肾功能受损和中风。患有这种类型的法布里病(称为迟发型法布里病)的个体与经典型法布里病患者相比倾向于具有更高的残留 α -GAL水平。患有迟发型法布里病的个体通常在成年期首次经历疾病症状,并且疾病症状通常集中在单个器官,例如左心室的扩大或进行性肾衰竭。另外,迟发型法布里病也可能以未知原因的中风形式出现。

[0049] 法布里病患者具有进行性肾脏损害,并且未经治疗的患者到生命的第五个十年之前表现出末期肾损害。 α -Gal A活性的缺乏导致GL-3和相关的鞘糖脂在许多细胞类型(包括肾脏中的细胞)中积累。GL-3积累在足细胞、上皮细胞以及远端小管和亨利氏环的管状细胞中。肾功能损害可以表现为蛋白尿和肾小球滤过率降低。

[0050] 由于法布里病罕见,涉及多个器官,发病年龄范围广,并且是异质性的,正确诊断是一个挑战。医疗保健专业人员中的意识较低,并且误诊频繁。一旦患者有症状,加上突变分析,法布里病的诊断最常基于血浆或外周白细胞(WBC)中降低的 α -Gal A活性来证实。在女性中,诊断甚至更具挑战性,因为携带者女性的酶鉴定由于携带者的一些细胞中的随机X染色体失活而不太可靠。例如,一些肯定携带者(受经典型影响的男性的女儿)具有从正常到非常低活性范围的 α -Gal A酶活性。由于携带者在白细胞中可以具有正常的 α -Gal A酶活性,所以仅通过遗传学检验鉴定 α -Gal A突变提供了精确的携带者标识和/或诊断。

[0051] 此外,如上所述,法布里病的发病年龄、进展和严重程度至少部分依赖于与溶酶体中酶活性相关的底物积累速率。因此,完全缺乏残留活性可对应于快速的底物积累,并因此是该疾病的更严重形式(具有早期发作和快速进展)。然而,至少量的残留活性可足以降解大量的底物。这进而会导致疾病更轻,发病更迟且因为缓慢的底物积累而进展更慢。考虑到这些因素,认为酶活性甚至适度的增加也可以降低严重临床表型的影响。数据表明,对于大多数LSD,正常活性的仅1%至6%被估计为足以延缓或预防疾病发病或产生更温和的疾病形式。也就是说,活性上仅小的增加可对底物水平具有显著影响,并因此对疾病严重程度和疾病进展速率具有显著影响。相反,预期体外未显示响应的突变体溶酶体酶也不会体内响应。

[0052] 在一个或多个实施例中,被认为顺从米加司他的突变形式或变体形式的 α -Gal A被定义为,当突变形式的 α -Gal A在HEK-293细胞中表达时(称为“HEK测定”),根据良好实验室规范(Good Laboratory Practice, GLP)验证的体外测定(GLP HEK或米加司他顺从性测定(Migalastat Amenability Assay)),显示 ≥ 1.20 倍的相对增加(+10 μ M米加司他)和 $\geq 3.0\%$ 野生型的绝对增加(+10 μ M米加司他)。此类突变或变体在本文中也称为“HEK测定顺从性”突变或变体。

[0053] 已经提供以前的筛选方法,其在开始治疗之前评估酶增强。例如,使用HEK-293细胞的测定已经在临床试验中用于预测给定的突变是否响应于药理学伴侣(例如,米加司他)治疗。在这个测定中,建立了cDNA构建体。相应的 α -Gal A突变形式在HEK-293细胞中瞬时表达。然后将细胞±米加司他(17nM至1mM)孵育4至5天。之后,在细胞裂解物中使用合成的荧光底物(4-MU- α -Gal)或通过蛋白质印迹测量 α -Gal A水平。这已经针对已知的导致疾病的错义或小的框内插入/缺失突变进行。在美国专利号8,592,362中列出了使用这些方法以前鉴定为响应于PC(例如米加司他)的突变,将该专利通过引用以其整体特此并入。

[0054] HEK测定顺从性突变至少包括药理学参考表中列出的那些突变(例如,美国或国际产品标签中针对米加司他产品例如GALAFOLD[®]所述的那些突变)。如本文所用,“药理学参考表”是指任何可公开访问的书面或电子记录,包括在米加司他产品(例如, GALAFOLD[®])包装内的产品标签中或在医疗保健提供者可访问的网站中,其传达特定突变或变体是否对米加司他(例如, GALAFOLD[®]) PC疗法有应答,并且不一定限于以表格形式呈现的书面记录。在本发明的一个实施例中,“药理学参考表”因此是指包括一种或多种顺从性突变或变体的任何信息仓库。在另一个实施例中,“药理学参考表”是指包括本文所公开的新颖突变或变体(即D33H、G35A、Y88S、T194A、W204G、Y216S、Q250K、R392T、N53K、Q57R、S62delinsLA、M96V、R112L、D155E、N228D、Q330P、V339A、K391E、N408Y、V22G、N34H、

G80V、Q107R、Y152D、A156S、L189F、W204L、S238G、I239M、A257V、P259Q、N320H、P323T、E338V、P380L或T412P)的顺从性突变或变体的更新存储库。用于HEK测定顺从性突变的示例性药理学参考表可以在 GALAFOLD[®] 批准使用的各个国家的 GALAFOLD[®] 的产品特征和/或处方信息的总结中找到,或者在例如www.galafoldamenabilitytable.com或者www.fabrygenevariantsearch.com等网站上找到,其各自通过引用以其全文特此结合。

[0055] 然而,由于只有某些突变顺从于米加司他的治疗,因此需要鉴定新的突变并确定这些突变是否顺从于米加司他的治疗。如下实例所述,几种新的突变已被鉴定并确定为顺从于米加司他疗法的突变。这些突变包括D33H、G35A、Y88S、T194A、W204G、Y216S、Q250K、R392T、N53K、Q57R、S62delinsLA、M96V、R112L、D155E、N228D、Q330P、V339A、K391E、N408Y、V22G、N34H、G80V、Q107R、Y152D、A156S、L189F、W204L、S238G、I239M、A257V、P259Q、N320H、P323T、E338V、P380L和T412P。

[0056] 因此,在一个或多个实施例中,米加司他用于治疗法布里病和/或增强具有选自下组的 α -Gal A突变的患者的 α -Gal A活性,该组由以下组成:D33H、G35A、Y88S、T194A、W204G、Y216S、Q250K和R392T。在一个或多个实施例中,米加司他用于治疗法布里病和/或增强具有选自下组的 α -Gal A突变的患者的 α -Gal A活性,该组由以下组成:N53K、Q57R、S62delinsLA、M96V、R112L、D155E、N228D、Q330P、V339A、K391E和N408Y。在一个或多个实施例中,米加司他用于治疗法布里病和/或增强具有选自下组的 α -Gal A突变的患者的 α -Gal A活性,该组由以下组成:V22G、N34H、G80V、Q107R、Y152D、A156S、L189F、W204L、S238G、I239M、A257V、P259Q、N320H、P323T、E338V、P380L和T412P。在一个或多个实施例中,患者具有突变D33H。在一个或多个实施例中,患者具有突变G35A。在一个或多个实施例中,患者具有突变Y88S。在一个或多个实施例中,患者具有突变T194A。在一个或多个实施例中,患者具有突变W204G。在一个或多个实施例中,患者具有突变Y216S。在一个或多个实施例中,患者具有突变Q250K。在一个或多个实施例中,患者具有突变R392T。在一个或多个实施例中,患者具有突变N53K。在一个或多个实施例中,患者具有突变Q57R。在一个或多个实施例中,患者具有突变S62delinsLA。在一个或多个实施例中,患者具有突变M96V。在一个或多个实施例中,患者具有突变R112L。在一个或多个实施例中,患者具有突变D155E。在一个或多个实施例中,患者具有突变N228D。在一个或多个实施例中,患者具有突变Q330P。在一个或多个实施例中,患者具有突变V339A。在一个或多个实施例中,患者具有突变V339A。在一个或多个实施例中,患者具有突变K391E。在一个或多个实施例中,患者具有突变N408Y。在一个或多个实施例中,患者具有突变V22G。在一个或多个实施例中,患者具有突变N34H。在一个或多个实施例中,患者具有突变G80V。在一个或多个实施例中,患者具有突变Q107R。在一个或多个实施例中,患者具有突变Y152D。在一个或多个实施例中,患者具有突变A156S。在一个或多个实施例中,患者具有突变L189F。在一个或多个实施例中,患者具有突变W204L。在一个或多个实施例中,患者具有突变S238G。在一个或多个实施例中,患者具有突变I239M。在一个或多个实施例中,患者具有突变A257V。在一个或多个实施例中,患者具有突变P259Q。在一个或多个实施例中,患者具有突变N320H。在一个或多个实施例中,患者具有突变P323T。在一个或多个实施例中,患者具有突变E338V。在一个或多个实施例中,患者具有突变P380L。在一个或多个实施例中,患者具有突变T412P。在各种实施例中,这些 α -Gal A突变相对于SEQ ID NO:2中所示的氨基酸序列。

[0057] 与这些新颖突变相关的示例性核苷酸变化显示在下面的表1中：

表1: 新颖米加司他顺从性突变

核苷酸变化	核苷酸变化	蛋白质序列变化
c.97G>C	c.G97C	D33H
c.104G>C	c.G104C	G35A
c.263A>C	c.A263C	Y88S
c.580A>G	c.A580G	T194A
c.610T>G	c.T610G	W204G
c.647A>C	c.A647C	Y216S
c.748C>A	c.C748A	Q250K
c.1175G>C	c.G1175C	R392T
c.159C>G 或 c.159C>A	c.C159G 或 c.C159A	N53K
c.170A>G	c.A170G	Q57R
c.184_185insTAG	c.184_185insTAG	S62delinsLA
c.286A>G	c.A286G	M96V
c.335G>T	c.G335T	R112L
c.465T>A 或 c.465T>G	c.T465A 或 c.T465G	D155E
c.682A>G	c.A682G	N228D
c.989A>C	c.A989C	Q330P
c.1016T>C	c.T1016C	V339A
c.1171A>G	c.A1171G	K391E

c.1222A>T	c.A1222T	N408Y
c.65T>G	c.T65G	V22G
c.100A>C	c.A100C	N34H
c.239G>T	c.G239T	G80V
c.320A>G	c.A320G	Q107R
c.454T>G	c.T454G	Y152D
c.466G>T	c.G466T	A156S
c.567G>C 或 c.567G>T	c.G567C 或 c.G567T	L189F
c.611G>T	c.G611T	W204L
c.712A>G	c.A712G	S238G
c.717A>G	c.A717G	I239M
c.770C>T	c.C770T	A257V
c.776C>A	c.C776A	P259Q
c.958A>C	c.A958C	N320H
c.967C>A	c.C967A	P323T
c.1013A>T	c.A1013T	E338V
c.1139C>T	c.C1139T	P380L
c.1234A>C	c.A1234C	T412P

[0058] 因此,在各种实施例中,米加司他用于治疗法布里病和/或增强具有选自下组的GLA突变的患者的 α -Gal A活性,该组由以下组成:c.97G>C、c.104G>C、c.263A>C、c.580A>G、c.610T>G、c.647A>C、c.748C>A和c.1175G>C。在一些实施例中,米加司他用于治疗法布里病和/或增强具有选自下组的GLA突变的患者的 α -Gal A活性,该组由以下组成:c.159C>G或c.159C>A、c.170A>G、c.184_185insTAG、c.286A>G、c.335G>T、c.465T>A或c.465T>G、c.682A>G、c.989A>C、c.1016T>C、c.1171A>G和c.1222A>T。在一些实施例中,米加司他用于治疗法布里病和/或增强具有选自下组的GLA突变的患者的 α -Gal A活性,该组由以下组成:c.65T>G、c.100A>C、c.239G>T、c.320A>G、c.454T>G、c.466G>T、c.567G>C或c.567G>T、c.611G>T、c.712A>G、c.717A>G、c.770C>T、c.776C>A、c.958A>C、c.967C>A、c.1013A>T、c.1139C>T、和c.1234A>C。在一个或多个实施例中,患者具有GLA突变c.97G>C。在一个或多个实施例中,患者具有GLA突变c.104G>C。在一个或多个实施例中,患者具有GLA突变c.263A>C。在一个或多个实施例中,患者具有GLA突变c.580A>G。在一个或多个实施例中,患者具有GLA突变c.610T>G。在一个或多个实施例中,患者具有GLA突变c.647A>C。在一个或多个实施例中,患者具有GLA突变c.748C>A。在一个或多个实施例中,患者具有GLA突变c.1175G>C。在一个或多个实施例中,患者具有GLA突变c.159C>G或c.159C>A。在一个或多个实施例中,患者具有GLA突变c.170A>G。在一个或多个实施例中,患者具有GLA突变c.184_185insTAG。在一个或多个实施例中,患者具有GLA突变c.286A>G。在一个或多个实施例中,患者具有GLA突变c.335G>T。在一个或多个实施例中,患者具有GLA突变c.465T>A或c.465T>G。在一个或多个实施例中,患

者具有GLA突变c.682A>G。在一个或多个实施例中,患者具有GLA突变c.989A>C。在一个或多个实施例中,患者具有GLA突变c.1016T>C。在一个或多个实施例中,患者具有GLA突变c.1171A>G。在一个或多个实施例中,患者具有GLA突变c.1222A>T。在一个或多个实施例中,患者具有GLA突变c.65T>G。在一个或多个实施例中,患者具有GLA突变c.100A>C。在一个或多个实施例中,患者具有GLA突变c.239G>T。在一个或多个实施例中,患者具有GLA突变c.320A>G。在一个或多个实施例中,患者具有GLA突变c.454T>G。在一个或多个实施例中,患者具有GLA突变c.466G>T。在一个或多个实施例中,患者具有GLA突变c.567G>C或c.567G>T。在一个或多个实施例中,患者具有GLA突变c.611G>T。在一个或多个实施例中,患者具有GLA突变c.712A>G。在一个或多个实施例中,患者具有GLA突变c.717A>G。在一个或多个实施例中,患者具有GLA突变c.770C>T。在一个或多个实施例中,患者具有GLA突变c.776C>A。在一个或多个实施例中,患者具有GLA突变c.958A>C。在一个或多个实施例中,患者具有GLA突变c.967C>A。在一个或多个实施例中,患者具有GLA突变c.1013A>T。在一个或多个实施例中,患者具有GLA突变c.1139C>T。在一个或多个实施例中,患者具有GLA突变c.1234A>C。在各种实施例中,这些GLA突变相对于SEQ ID NO:3所示的核酸序列。

[0059] 此外,本发明的各种实施例提供了用于治疗在编码 α -Gal A的基因中具有突变的患者中的法布里病的PC,其中所述患者被鉴定为在由SEQ ID NO:1和/或SEQ ID NO:3中所示的核酸序列编码的人 α -Gal A中具有错义突变。本发明的另一方面涉及治疗被诊断患有法布里病的患者的方法。在一个或多个实施例中,所述方法包括向患者施用治疗有效剂量的 α -Gal A的PC。在另外的实施例中,患者在编码 α -Gal A的核酸序列中具有错义突变。本发明的另一方面涉及在诊断患有或疑似患有法布里病的患者中增强 α -Gal A的方法。在一个或多个实施例中,所述方法包括向患者施用治疗有效剂量的 α -Gal A的PC,其中患者具有由相对于SEQ ID NO:1和/或SEQ ID NO:3具有错义突变的核酸序列编码的突变型 α -Gal A。这些用途和方法的细节和另外的实施例如下。涉及治疗患有法布里病的患者的方法、在诊断患有或疑似患有法布里病的患者中增强 α -Gal A的方法、 α -Gal A的药学伴侣用来制造用于治疗被诊断患有法布里病的患者的药物的用途或用于治疗被诊断患有法布里病的患者的 α -Gal A的药学伴侣的实施例中任一项(其中该患者被鉴定为在由SEQ ID NO:1和/或SEQ ID NO:3所列的核酸序列编码的人 α -Gal A中具有错义突变)可以与本发明的任何其他实施例组合,例如涉及PC及其合适的剂量的实施例。

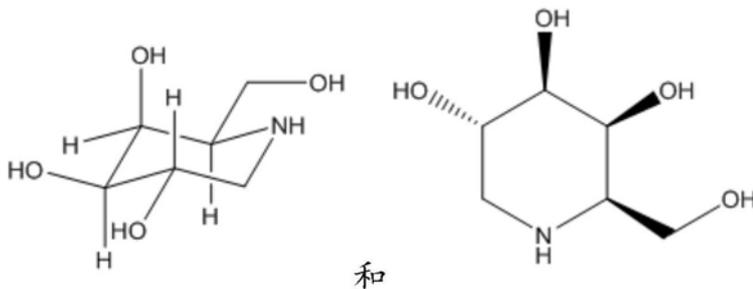
[0060] 在一个或多个实施例中,患者可能在其GLA基因中具有其他突变。例如,内含子区域可能存在可能影响或不影响所得 α -Gal A酶的突变。因此,在一个或多个实施例中,患者具有由与SEQ ID NO:1具有至少95%、96%、97%、98%、99%、99.1%、99.2%、99.3%、99.4%、99.5%、99.6%、99.7%、99.8或99.9%同一性的核酸序列编码的突变型 α -Gal A。此外,患者可在GLA基因的编码区中具有一个或多个另外的突变。因此,在一个或多个实施例中,患者具有由与SEQ ID NO:3具有至少95%、96%、97%、98%、99%、99.1%、99.2%、99.3%、99.4%、99.5%、99.6%、99.7%、99.8或99.9%同一性的核酸序列编码的突变型 α -Gal A。此外,在一个或多个实施例中,患者相对于SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:3具有1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20或30个突变。还应注意,SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:3中的一些核酸突变可导致所得蛋白质的氨基酸不发生变化,因为各种氨基酸由多个核酸序列编码。再次,这些实施例中的任何一个可以与本发明的任何其他实施例组合,例如涉及顺从性突变、PC

及其合适的剂量的实施例。

[0061] 药理学伴侣

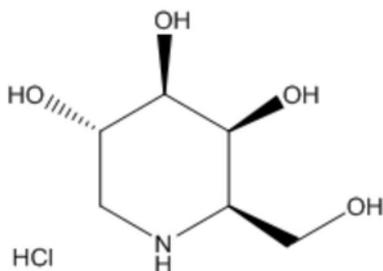
[0062] 与LSD相关的酶的小分子抑制剂的结合可以增加突变酶和相应的野生型酶的稳定性(参见美国专利号6,274,597;6,583,158;6,589,964;6,599,919;6,916,829和7,141,582,全部通过引用并入本文)。特别地,葡萄糖和半乳糖的小分子衍生物(其是若干靶溶酶体酶的特异性的选择性竞争性抑制剂)的施用有效地增加了体外细胞中酶的稳定性,并且因此增加了酶到溶酶体的运输。因此,通过增加溶酶体中酶的量,酶底物的水解预期会增加。这种策略背后的原有理论如下:因为突变酶蛋白在ER中不稳定(Ishii等人, Biochem.Biophys.Res.Comm.[生物化学与生物物理学研究通讯]1996;220:812-815),酶蛋白在正常转运途径(ER→高尔基体→内体→溶酶体)中受阻并过早降解。因此,结合突变酶并增加其稳定性的化合物可以充当酶的“伴侣”,并且增加可以离开ER并移动到溶酶体的量。另外,由于一些野生型蛋白质的折叠和运输是不完全的,并且在一些情况下,一些野生型蛋白质的多达70%在达到其最终细胞位置之前被降解,伴侣可以用于稳定野生型酶,并且增加可以离开ER并被运输到溶酶体的酶的量。

[0063] 在一个或多个实施例中,所述药理学伴侣包含米加司他或其盐。化合物米加司他(也称为1-脱氧半乳糖野尻霉素(1-DGJ)或(2R,3S,4R,5S)-2-(羟甲基)哌啶-3,4,5-三醇)是具有以下化学式的化合物:



米加司他游离碱

[0064] 如本文所讨论,米加司他的药学上可接受的盐也可以用于本发明。当使用米加司他的盐时,调整所述盐的剂量,这样使得由患者接受的米加司他的剂量与使用米加司他游离碱时接受的量是相当的。米加司他的药学上可接受的盐的一个实例是米加司他HCl:



米加司他 HCl

[0065] 米加司他是一种低分子量亚氨基糖,并且是GL-3末端半乳糖的类似物。体外和体内药理学研究已经证明,米加司他充当药理学伴侣,以高亲和力选择性地且可逆地结合野生型 α -Gal A和特定突变形式的 α -Gal A的活性位点。米加司他结合稳定了内质网中这些突变形式的 α -Gal A,从而有助于其正确地运输到溶酶体上,在溶酶体上米加司他的解离允许

α -Gal A降低GL-3和其他底物的水平。

[0066] 在一个具体实施例中,PC包含米加司他或其盐。在另外的实施例中,PC包含米加司他盐酸盐。

[0067] α -Gal A的这些PC中任一个都可以与本发明的任何其他实施例组合使用,例如涉及治疗患有法布里病的患者的方法、在诊断患有或疑似患有法布里病的患者中增强 α -Gal A的方法、 α -Gal A的药学伴侣用来制造用于治疗被诊断患有法布里病的患者的药物的用途或用于治疗被诊断患有法布里病的患者的 α -Gal A的药学伴侣的实施例,连同涉及PC的合适剂量、顺从性突变以及对在编码 α -Gal A的核酸序列中具有某些突变的法布里患者的治疗的实施例。

[0068] 给药、配制品和施用

[0069] 在一个或多个实施例中,以每隔一天一次(也称为“QOD”)的频率向法布里患者施用米加司他或其盐。在不同实施例中,本文所述的剂量涉及米加司他盐酸盐或当量剂量的米加司他或其不是盐酸盐的盐。在一些实施例中,这些剂量涉及米加司他的游离碱。在替代性实施例中,这些剂量涉及米加司他的盐。在另外的实施例中,米加司他的所述盐是米加司他盐酸盐。米加司他或米加司他的盐的施用在本文中被称为“米加司他疗法”。

[0070] 米加司他或其盐的有效量可以在约100mg FBE至约150mg FBE的范围内。示例性剂量包括约100mg FBE、约105mg FBE、约110mg FBE、约115mg FBE、约120mg FBE、约123mg FBE、约125mg FBE、约130mg FBE、约135mg FBE、约140mg FBE、约145mg FBE或约150mg FBE。

[0071] 再次,应当注意,150mg的米加司他盐酸盐相当于123mg的游离碱形式的米加司他。因此,在一个或多个实施例中,所述剂量是以每隔一天一次的频率施用的150mg的米加司他盐酸盐或当量剂量的米加司他或其不是盐酸盐的盐。如上所述,这个剂量被称为123mg FBE的米加司他。在另外的实施例中,所述剂量是以每隔一天一次的频率施用的150mg的米加司他盐酸盐。在其他实施例中,所述剂量是以每隔一天一次的频率施用的123mg的米加司他游离碱。

[0072] 在不同实施例中,该有效量为约122mg、约128mg、约134mg、约140mg、约146mg、约150mg、约152mg、约159mg、约165mg、约171mg、约177mg或约183mg的米加司他盐酸盐。

[0073] 因此,在不同实施例中,米加司他疗法包括以每隔一天一次的频率施用123mg FBE,例如每隔一天施用150mg的米加司他盐酸盐。

[0074] 米加司他或其盐的施用可以持续某一段时间。在一个或多个实施例中,米加司他或其盐施用至少28天的持续时间,例如至少30、60或90天,或至少3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、16、20、24、30或36个月,或至少1、2、3、4或5年。在不同实施例中,米加司他疗法是至少6个月(例如至少6、7、8、9、10、11、12、16、20、24、30或36个月,或至少1、2、3、4或5年)的长期米加司他疗法。

[0075] 根据本发明的米加司他或其盐的施用可以是以适合于任何施用途径的配制品形式,但是优选地以口服剂型(例如片剂、胶囊剂或溶液剂)施用。作为一个实例,向患者口服施用胶囊剂,每个胶囊剂含有150mg米加司他盐酸盐或当量剂量的米加司他或其不是盐酸盐的盐。

[0076] 在一些实施例中,口服施用PC(例如,米加司他或其盐)。在一个或多个实施例中,通过注射施用PC(例如,米加司他或其盐)。PC可以伴有药学上可接受的载体,这可以取决于

施用方法。

[0077] 在一个或多个实施例中,PC(例如,米加司他或其盐)作为单一疗法施用,并且可以呈适合于任何施用途径的形式,包括例如以片剂或胶囊剂或液体剂的形式口服,或以注射用无菌水溶液形式施用。在其他实施例中,PC以干燥的冻干粉末的形式被提供,以在重建期间或之后立即添加到替代酶的配制品中,以防止在施用前在体外进行酶聚集。

[0078] 当PC(例如,米加司他或其盐)被配制用于口服施用,片剂或胶囊剂可以通过常规手段用药学上可接受的赋形剂来制备,这些赋形剂是例如粘合剂(例如,预糊化玉米淀粉、聚乙烯吡咯烷酮或羟丙基甲基纤维素);填充剂(例如,乳糖、微晶纤维素或磷酸氢钙);润滑剂(例如,硬脂酸镁、滑石或二氧化硅);崩解剂(例如,马铃薯淀粉或羟基乙酸淀粉钠);或湿润剂(例如,十二烷基硫酸钠)。片剂可以通过本领域公知的方法包衣。用于口服施用的液体制剂可以采取例如溶液、糖浆或悬浮液的形式,或者它们可以作为干燥的产品(在使用前用水或其他合适的媒介物构建)而存在。此类液体制剂可以通过常规手段用药学上可接受的添加剂来制备,这些添加剂是例如助悬剂(例如,山梨糖醇糖浆、纤维素衍生物或氢化的可食用脂肪);乳化剂(例如,卵磷脂或阿拉伯胶);非水性媒介物(例如,杏仁油、油状酯、乙醇或分馏的植物油);以及防腐剂(例如,对羟基苯甲酸甲酯或对羟基苯甲酸丙酯或山梨酸)。适当时,制剂还可以含有缓冲盐、调味剂、着色剂和甜味剂。可以适当地配制用于口服施用的制剂以使活性伴侣化合物可控制地释放。

[0079] 适合于肠胃外/注射使用的PC(例如,米加司他或其盐)的药物配制品通常包括无菌水溶液(在水溶性的情况下)、或者分散体以及用于临时制备无菌可注射溶液或分散体的无菌粉末。在所有情况下,该形式必须是无菌的且必须具有达到容易注射的程度的流动性。它在生产和储存条件下必须是稳定的并且必须抗微生物(例如细菌和真菌)的污染作用而保存。载体可以是含有例如以下的溶剂或分散介质:水、乙醇、多元醇(例如,甘油、丙二醇和聚乙二醇等)、其合适的混合物以及植物油。可以例如通过使用包衣(例如卵磷脂)、在分散体的情况下通过维持所需颗粒大小以及通过使用表面活性剂来维持适当的流动性。防止微生物的作用可以通过不同的抗细菌剂以及抗真菌剂(例如,对羟基苯甲酸酯、氯丁醇、苯酚、苜醇、山梨酸等)来实现。在许多情况下,包括等渗剂(例如,糖类或氯化钠)将是合理的。可以通过在组合物中使用延迟吸收的试剂(例如,单硬脂酸铝和明胶)来实现可注射组合物的延长吸收。

[0080] 按照需要,可以通过将经纯化的酶(若有的话)和PC(例如,米加司他或其盐)以需要的量掺入具有以上列举的各种其他成分的适当溶剂中,随后进行过滤或最终灭菌来制备无菌可注射溶液。通常,通过将各种灭菌的活性成分掺入无菌媒介物中来制备分散体,该无菌媒介物含有基础分散介质以及来自以上列举的那些的所需其他成分。在用于制备无菌可注射溶液的无菌粉末的情况下,优选的制备方法是真空干燥和冷冻干燥技术,这从其之前的无菌过滤溶液产生活性成分加上任何另外的所需成分的粉末。

[0081] 所述配制品可以含有赋形剂。可以被包括在所述配制品中的药学上可接受的赋形剂是:缓冲剂,例如柠檬酸盐缓冲剂、磷酸盐缓冲剂、乙酸盐缓冲剂、碳酸氢盐缓冲剂、氨基酸、尿素、醇、抗坏血酸和磷脂;蛋白质,例如血清白蛋白、胶原和明胶;盐,例如EDTA或EGTA和氯化钠;脂质体;聚乙烯吡咯烷酮;糖,例如右旋糖酐、甘露糖醇、山梨糖醇和甘油;丙二醇和聚乙二醇(例如,PEG-4000、PEG-6000);甘油;甘氨酸或其他氨基酸;以及脂质。与配制品

一起使用的缓冲剂体系包括柠檬酸盐；乙酸盐；碳酸氢盐；以及磷酸盐缓冲剂。磷酸盐缓冲剂是一个优选的实施例。

[0082] 伴侣化合物的施用途可以是口服的或肠胃外的，包括静脉内、皮下、动脉内、腹膜内、眼内、肌内、经颊、经直肠、经阴道、眼眶内、脑内、真皮内、颅内、脊柱内、心室内、鞘内、脑池内、囊内、肺内、鼻内、经粘膜、经皮或经由吸入。

[0083] 伴侣化合物的上述肠胃外配制品的施用可以通过周期性注射制剂的推注，或者可以从储库通过静脉内或腹膜内施用来施用，该储库可以是外部的（例如，静脉注射袋）或内部的（例如，生物可蚀性植入物）。

[0084] 涉及药物配制品和施用的实施例可以与本发明的任何其他实施例组合，例如涉及治疗法布里病患者的方法、 α -Gal A的药理学伴侣用于制造用于治疗被诊断患有法布里病的患者的药物的用途或用于治疗被诊断患有法布里病的患者的 α -Gal A的药理学伴侣的实施例，连同涉及顺从性突变、PC及其适合的剂量的实施例。

[0085] 在一个或多个实施例中，PC（例如，米加司他或其盐）与ERT组合施用。通过输注的方式，通过外源地引入野生型或具有生物学功能的酶，ERT增加了蛋白质的量。已经针对许多遗传障碍开发了这种疗法，这些遗传障碍包括如上引用的LSD（例如法布里病）。输注后，预期外源酶通过非特异性或受体特异性机制被组织吸收。通常，吸收效率不高，并且外源蛋白质的循环时间短。另外，外源蛋白质是不稳定的，并且经受快速的细胞内降解，而且在随后治疗的情况下具有不利免疫反应的可能。在一个或多个实施例中，将伴侣与替代酶（例如，替代 α -Gal A）同时施用。在一些实施例中，将伴侣与替代酶（例如，替代 α -Gal A）共配制。

[0086] 在整个说明书中对“一个实施例”、“某些实施例”、“不同实施例”、“一个或多个实施例”或“实施例”的引用意味着与所述实施例相联系地描述的具体的特征、结构、材料或特性被包括在本发明的至少一个实施例中。因此，在整个说明书的多个位置中出现的短语如“在一个或多个实施例中”、“在某些实施例中”、“在不同实施例中”、“在一个实施例中”或“在实施例中”不一定是指本发明的同一实施例。此外，在一个或多个实施例中，具体的特征、结构、材料或特性能以任何合适的方式进行组合。

[0087] 尽管已经参照具体实施例描述了本发明的发明，但是应当理解这些实施例仅仅说明本发明的原理和应用。对本领域技术人员而言应当清楚的是，在不脱离本发明的精神和范围的情况下，可以对本发明的方法和设备进行多种修改和变化。因此，意图是本发明包括在所附权利要求及其等效物的范围内的修改和变化。

实例：米加司他对 α -Gal A突变的影响

[0088] 在由指示的 α -Gal A突变形式瞬时转染的并在不存在或存在 $10\mu\text{M}$ 米加司他的情况下孵育5天的HEK-293细胞制备的裂解物中测量 α -Gal A活性。 α -Gal A活性可表示为每毫克蛋白质每小时释放的游离4-MU的纳摩尔（ $\text{nmol}/\text{mg}/\text{hr}$ ）。基线 α -Gal A活性和用 $10\mu\text{M}$ 米加司他孵育后的 α -Gal A活性另外地表示为基线野生型 α -Gal A活性的百分比（%WT）。用于计算这些百分比的野生型 α -Gal A活性是在没有米加司他的情况下孵育的野生型转染的细胞的裂解物中测量的平均活性（平行测量）。

[0089] 新颖突变D33H、G35A、Y88S、T194A、W204G、Y216S、Q250K和R392T的 α -Gal A活性测试结果显示在下面的表2中：

表2:米加司他对 α -Gal A活性的影响

α -Gal A 突变形式	D33H	G35A	Y88S	T194A	W204G	Y216S	Q250K	R392T
基线 α -Gal A 活性 (nmol/mg/hr)	12925 \pm 915	19688 \pm 1062	1510 \pm 52	3751 \pm 287	BLD	635 \pm 64	4389 \pm 500	30058 \pm 1487
10 μ M 米加司他 α -Gal A 活性 (nmol/mg/hr)	24908 \pm 1775	31694 \pm 1949	5542 \pm 376	10315 \pm 459	1695 \pm 198	11238 \pm 751	11325 \pm 1111	36679 \pm 1896
曼-惠特尼 (Mann-Whitney) U p 值	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0014

基线 α -Gal A 活性 (% WT)	36.1 \pm 2.4	51.1 \pm 3.2	3.8 \pm 0.2	10.8 \pm 0.7	N/A	2.0 \pm 0.2	16.1 \pm 1.5	104.6 \pm 6.8
10 μ M 米加司他 α -Gal A 活性 (% WT)	68.8 \pm 4.3	82.1 \pm 5.6	14.1 \pm 1.3	30.5 \pm 2.0	6.5 \pm 0.7	34.7 \pm 1.8	41.6 \pm 3.1	125.9 \pm 6.2
绝对增加 (% WT)	32.7	31.0	10.3	19.7	6.5	32.7	25.5	21.3
相对增加	1.93	1.61	3.67	2.75	NC	17.70	2.58	1.22

[0090] 新颖突变N53K、Q57R、S62delinsLA、M96V、R112L、D155E、N228D、Q330P、V339A、K391E和N408Y的 α -Gal A活性测试结果显示在下面的表3中：

表3:米加司他对 α -Gal A活性的影响

α -Gal A 突变形式	基线 α -Gal A 活性 (nmol/mg/hr)	10 μ M 米加司他 α -Gal A 活性 (nmol/mg/hr)	曼-惠特尼 (Mann-Whitney) U p 值	基线 α -Gal A 活性 (% WT)	10 μ M 米加司他 α -Gal A 活性 (% WT)	绝对增加 (% WT)	相对增加
N53K	5143 \pm 419	13895 \pm 1270	0.0001	14.6 \pm 1.0	38.6 \pm 2.5	24.0	2.70
Q57R	20289 \pm 995	26357 \pm 916	0.0001	80.9 \pm 3.8	105.0 \pm 3.0	24.0	1.30
S62delinsLA	159 \pm 27	8115 \pm 810	0.0001	0.4 \pm 0.1	21.3 \pm 1.7	20.9	50.92
M96V	5458 \pm 489	14612 \pm 1009	0.0001	14.0 \pm 1.2	38.1 \pm 2.4	24.2	2.68
R112L	BLD	2364 \pm 296	0.0001	N/A	7.5 \pm 1.1	7.5	NC
D155E	1738 \pm 78	6619 \pm 337	0.0001	5.3 \pm 0.3	19.8 \pm 1.0	14.5	3.81
N228D	6264 \pm 654	25816 \pm 2273	0.0001	15.0 \pm 1.5	63.2 \pm 5.4	48.2	4.12
Q330P	5593 \pm 320	12375 \pm 664	0.0001	21.5 \pm 1.6	45.8 \pm 1.9	24.4	2.21
V339A	18918 \pm 2287	25174 \pm 2895	0.0339	48.8 \pm 3.3	65.6 \pm 4.2	16.8	1.33
K391E	7853 \pm 735	15979 \pm 1367	0.0001	20.4 \pm 2.0	40.4 \pm 2.9	20.0	2.03
N408Y	11158 \pm 1707	23273 \pm 2965	0.0001	40.9 \pm 4.9	85.5 \pm 7.7	44.6	2.09

[0091] 新颖突变V22G、N34H、G80V、Q107R、Y152D、A156S、L189F、W204L、S238G、I239M、A257V、P259Q、N320H、P323T、E338V、P380L和T412P的 α -Gal A活性测试结果显示在下面的表4中：

表4:米加司他对 α -Gal A活性的影响

α -Gal A 突变形式	基线 α -Gal A 活性 (nmol/mg/hr)	10 μ M 米加司他 α -Gal A 活性 (nmol/mg/hr)	曼-惠特尼 (Mann-Whitney) U p 值	基线 α -Gal A 活性 (% WT)	10 μ M 米加司他 α -Gal A 活性 (% WT)	绝对增加 (% WT)	相对增加
V22G	4663 \pm 557	7150 \pm 700	0.0067	15.5 \pm 1.8	24.6 \pm 2.8	9.0	1.53
N34H	BLD	1414 \pm 100	0.0001	N/A	3.6 \pm 0.2	3.6	NC
G80V	765 \pm 56	2434 \pm 333	0.0001	2.1 \pm 0.1	6.4 \pm 0.6	4.3	3.18
Q107R	24590 \pm 1705	31193 \pm 2248	0.0206	88.3 \pm 7.0	109.8 \pm 8.4	21.5	1.27
Y152D	2397 \pm 346	6594 \pm 294	0.0001	6.0 \pm 0.9	16.7 \pm 1.1	10.7	2.75
A156S	24479 \pm 1666	31597 \pm 2293	0.0111	66.7 \pm 5.0	85.1 \pm 5.3	18.4	1.29
L189F	22405 \pm 1496	27388 \pm 1605	0.0266	69.3 \pm 3.9	84.6 \pm 3.8	15.3	1.22
W204L	16126 \pm 2360	32649 \pm 3037	0.0002	36.9 \pm 3.8	84.3 \pm 5.9	47.4	2.02
S238G	5898 \pm 877	25106 \pm 1611	0.0001	18.7 \pm 2.1	86.4 \pm 7.2	67.7	4.26
I239M	4849 \pm 622	24827 \pm 3056	0.0001	13.9 \pm 1.7	69.3 \pm 6.9	55.5	5.12
A257V	16412 \pm 1096	30313 \pm 1981	0.0001	55.5 \pm 3.3	99.9 \pm 4.6	44.4	1.85
P259Q	13658 \pm 1388	25935 \pm 2020	0.0001	37.6 \pm 3.4	73.6 \pm 5.0	36.1	1.90
N320H	8554 \pm 344	22149 \pm 1050	0.0001	20.6 \pm 1.3	52.9 \pm 3.1	32.2	2.59
P323T	24566 \pm 1350	29631 \pm 1144	0.0008	59.0 \pm 4.2	71.3 \pm 4.1	12.3	1.21
E338V	11903 \pm 541	21807 \pm 845	0.0001	30.1 \pm 1.7	54.8 \pm 2.2	24.7	1.83
P380L	1424 \pm 60	4248 \pm 369	0.0001	3.4 \pm 0.2	10.6 \pm 1.0	7.1	2.98
T412P	639 \pm 25	7159 \pm 459	0.0001	1.7 \pm 0.2	18.6 \pm 1.2	16.9	11.21

[0092] 在表2-4中,计算了平均值 \pm 平均值标准误差(SEM)的值。nmol/mg/hr表示“每mg蛋白质每小时释放的游离4-MU的纳摩尔”。WT表示“野生型”。NC表示“不可计算”。N/A表示“不适用”。

[0093] 基线和10 μ M米加司他 α -Gal A活性:使用单尾曼-惠特尼U检验确定在不存在和存在10 μ M米加司他的情况下孵育的裂解物之间的 α -Gal A活性差异;在10 μ M米加司他时, $p < 0.05$ 的增加被认为是显著的。“BLD”表示平均 α -Gal A活性低于检测限(< 142 nmol/mg/hr)。

[0094] 基线 α -Gal A活性(%WT) = (无米加司他情况下的突变型转染细胞裂解物中的 α -Gal A活性 \div 无米加司他情况下的野生型转染细胞裂解物中的 α -Gal A活性)*100。

[0095] 10 μ M米加司他 α -GalA活性(%WT) = (与10 μ M米加司他孵育的突变型转染细胞裂解物中的 α -Gal A活性 \div 无米加司他情况下的野生型转染细胞裂解物中的 α -Gal A活性)*100。

[0096] 绝对增加(%WT) = 10 μ M米加司他 α -Gal A活性(%WT)减去基线 α -Gal A活性(%WT)。

[0097] 相对增加为突变型转染细胞裂解物中的10 μ M米加司他 α -Gal A活性 \div 不与米加司他孵育的突变型转染细胞裂解物中的基线 α -Gal A活性。

[0098] 从表2可以看出,新颖 α -Gal A突变D33H、G35A、Y88S、T194A、W204G、Y216S、Q250K和R392T显示出对米加司他孵育的符合顺应性标准的体外响应。因此,预期具有这些突变的患

者可使用本文所述的米加司他治疗。

[0099] 从表3可以看出,新颖 α -Gal A突变D33H、G35A、Y88S、T194A、W204G、Y216S、Q250K和R392T显示出对米加司他孵育的符合顺应性标准的体外响应。因此,预期具有这些突变的患者可使用本文所述的米加司他治疗。

[0100] 从表4可以看出,新颖 α -Gal A突变V22G、N34H、G80V、Q107R、Y152D、A156S、L189F、W204L、S238G、I239M、A257V、P259Q、N320H、P323T、E338V、P380L和T412P显示出对米加司他孵育的符合顺应性标准的体外响应。因此,预期具有这些突变的患者可使用本文所述的米加司他治疗。

[0101] 本文提及的专利和科学文献建立了本领域技术人员可用的知识。本文引用的所有美国专利和公开或未公开的美国专利申请均通过引用而并入。本文引用的所有公开的外国专利和专利申请均通过引用特此并入。本文引用的所有其他公开的参考文献、文件、手稿和科学文献均通过引用特此并入。

[0102] 尽管已经参照本发明的优选实施例具体显示和描述了本发明,但是本领域技术人员应当理解,在不脱离所附权利要求所涵盖的本发明的范围的情况下,可以在形式和细节上进行各种改变。

序列表

- <110> 阿米库斯治疗学公司
 <120> 治疗在GLA基因中具有突变的患者的法布里病的方法
 <130> AT18-005-PCT
 <150> US 62/719,962
 <151> 2018-08-20
 <160> 3
 <170> PatentIn 3.5版
 <210> 1
 <211> 12436
 <212> DNA
 <213> 智人
 <400> 1

```

cccttctgta ggggcagaga ggttctactt cttactgcg tctcctggga aggccatcag 60
gactgctggc taaagtggga accaggactc tttgtgagtt aagaatttgt gtattttatat 120
gtgtgttata cacatttttt aaaaaactgt aacgacatca gtttgagcag tcgtctccgg 180
gtgggtgaatt atgtgtatth ttaaatttta tactatattg ttatttttca aatgttcgaa 240
attgaatatg tagattgttg ttatcagcag aaaaataaac attattcaaa tactctattc 300
agtaaagtaa tttattgggc gcctttgtca agcacgcatt tgcctagatg tgactctaca 360
gataaaattc acttggggcc tccccttaca gacaatcagg cagtggagac tgagtgcctg 420
aatggataga ccagcactca gaccactatt ttcagtatct gttttttetta actcagggcc 480
gtggttttca aacgtttttc gccttacggt cacccttagg gtcccccgag accggccccg 540
acagacagat atacaaaaac acatacacag tcatgagcgt ccaccatttc cccaccaggc 600
gcagcacagg cggcttcccg gcactgagat gggggggagg agggagagag cgcgaggggg 660
gaggggaaag cagagaacga aagaggcgga ggcgggcccc gaaccccgct ctggtcttca 720
tcatcaccac ccctgggtcc ccagttcca cccacacacc aacctctaac gataccgggt 780
aattttcctc cttcttccct caaacggcta tagcgagac gtagacgacg accagaacta 840
cttctgctca cgtaagcgag taatcacgtg agcgcctacg tcatgtgaga tctcggtcac 900
gtgagcaact ctcggcttaa actcgggatc actaaggtgc cgcacttctt tctggtatgg 960
aaatagggcg ggtcaatata aagaaaggaa gagggtgatt ggtagcgga acgtctttacg 1020
tgactgatta ttggtctacc tctggggata accgtcccag ttgccagaga aacaataacg 1080
tcattattta ataagtcac ggtgattggg ccgcccctga ggttaattctt aaaagcccag 1140
gttaccgcg gaaatttatg ctgtccggtc accgtgaaa tgcagctgag gaaccagaa 1200
ctacatctgg gctgcgcgct tgcgcttgc ttcttgccc tcgtttctg ggacatccct 1260
ggggctagag cactggacaa tggattggca aggacgcta ccatgggctg gctgcactgg 1320
gagcgcttca tgtgcaacct tgactgccag gaagagccag attcttgcac caggtatcag 1380
atattgggta ctcccctccc tttgcttttc catgtgtttg ggtgtgtttg gggaactgga 1440
gagtctcaac gggaacagtt gagcccagg gagagctccc ccaccgact ctgctgctgc 1500

```

ttttttatcc ccagcaaact gtcccgaatc aggactagcc ctaaactttc tctgtgtgac 1560
 ctttcctggg atgggagtc ccagcagcggc cctgtttct ttctctctct ctctctctct 1620
 cgttctcctt ctctttctct ttctcttctt tcctctctct ttctctctct ccctgcccgg 1680
 ttctcttttt tcaactgctcc ttgcagagca gggccacccc ataggcagtg tgcccaaagt 1740
 agccctgccc ggttctattc agacccttct tgtgaacttc tgctcttcct ctgccgggtg 1800
 ctaaccgtta gaacatctag ggtgggtagg aggaatgggg aactaagatt cgtgccattt 1860
 tttctccttt tggggtcgtg gatttctcgg cagtatctcg agggagttag agagaccata 1920
 aggtcgctga gatctctccc acctcgccca tgagcgtggc atcaggctgg aaggttgaca 1980
 tggaggaact ttatacattt acacctttgc gtgagggttg aggctggatt agataggtat 2040
 tgaacataatc tgaccctcac aatccttata tgtaaattgg gattacaacc ttttaatttc 2100
 agggagctga caaaaaaaaa ctgaaaaata gttcttatct cacacaggtg agttttcaag 2160
 gagataacct atttaaagta catagcacag cgcttgacca ttcaactgcg cttacagagc 2220
 aaatgttcaa tgggaaaatg aatgtaaate tacaatctg aatgaatatg tgtatTTTTT 2280
 tggagagagg atatttacct ttcttcaaat tctcaaaggg ctctgtgatt taaaaaggt 2340
 taggaatcac tgatagatgt tggtaaaagg tggcagtcac agtacatttc tgtgtccata 2400
 agttattcct atgaatatct ttatagataa agtcaggatg ttggtcagac atcacagaag 2460
 aaattggcct tgtaagtttc atgtgaccct gtggtacagt atgtgtggca attttgccca 2520
 tcacggattt ttttttattg gtatttgcac ctgattataa aactaatgca tgatcattgc 2580
 aaaaaatgta gataaagaag agcaaaatga aaataaagat ttccccccac cgttccacca 2640
 ccagaaata atcatggttt aaatgttaat atacaacctt acaattgttt tctatataaa 2700
 tgaaaacata gatttcttta tttcattatt ttccataaaa aatgatcat gtttatgtca 2760
 tgtttggtc atggcaagac cctggcacc agtctgggct caaattctgc ctcatgttta 2820
 cttagccctg tgacattggg taaattacac ttttttttt ttttttttt tgagacgggg 2880
 tctcgctctg tcgccaggc tggagtgcag tggcacgac tcggctcact gcaagtccgc 2940
 ctctgggtt cacgccattc ttctgcctca gcctcccag tagctgggac tacaggcgc 3000
 tgccaccacg cctggctctt ttttttttt ttttttttt tagtacagac ggggtttcac 3060
 catgttagcc aggggtgtct caatctctg acctcgtgat tcgcccgcct cagcctccca 3120
 aagtgtggt gtgagccacc gtgccagcc ttacttttt ttttgagagg ggttctcact 3180
 ctgtcaccca ggttgagtg cagtggcgcg atctctgctc agtgcaact ccacctccg 3240
 ggtttaagca gttctctgt cgtagtctcc tgagtagctg ggattacagg cacaccacca 3300
 cggccagcta atttttgtat tttcagtaga gacgggttt accatgttgc ccaagctggt 3360
 ctggaactcc tggcctcaag tgatctgccc gccttggcct ccagagtgct tgggattaca 3420
 ggtgtgagcc accgcaccg gcctttttt ttttttttag tctatcatac cttgcaaata 3480
 cagtgttct tcctatgtgt tggttttgat atttatgtaa tcaaacacat cagtttttcc 3540
 tttctgatt ctgactttgg ggtcatgctg agaaagtct ttctacctg aagataatac 3600
 agtatatacg tttcttacta gtatTTTTT ggatTTTTT aatattttaa tctttagtc 3660
 atctgaactt gttcttctat cagaaatgcc acatttaata aataataagt cccatggtat 3720
 cagatggctg gaaggacct tttcgaaact ttgtttaatt ccattaatct gtgtattctt 3780
 attctaatac taatagttcc aactagctt ctttatctt tttttcttt ttttttttt 3840

ttttgagctg gagtttcgct cttgttgccc aggctggagt acaatgtcac gatctcggtt 3900
caccgcaacc tccgcctccc aggttcaagc aattctcctg cctcatcctc gcgagtagct 3960
ggaattacag gcatgcgcca ccacgcctag ctatthttgta tttttagtag agatggggtt 4020
tctccatggt ggtcaggctg gtctcaact cccagcctca ggtgatctgc ctgcctcggc 4080
ctcccaaaat gctgttatta caggcgtgag ccaccacgcc cagccttcat cttttaatga 4140
atgtacatgt atgtaatctt ttaggtgaac tttttgtaat gttgtgccaa gttccttaa 4200
aagccctttt ggaagctggg caggtggcca cgctgtaat cccagcattt tgggagtctg 4260
aggcaggtgg atcacttgag gccaggagtt caagactagc ctaccacaaa tgcaaaacc 4320
tgtctctact aaagatacaa aaattagccg gatgcgatgg cacatgcctg taatctcagc 4380
tactcgggag gctgaggtag aagaatcgct tgaaccgggg aggcagaggt tgcagtgagc 4440
aagatggcgc cactgcactc cagcctgggt gacagagga gactccatct caaaaaaaaa 4500
aaaaaaaaaa aagataaaaa ggaaacetaa gtactcttgg gctttgttaa ggattttgtt 4560
aaatatacaa aggattgcag ggaaaattaa cttatthttta atattgagta tgcttatcca 4620
agagcaaaaat aatatttctc catttattca aatcatttag gagcatcata gttttaacat 4680
atgggccttg cacgtatctt aaatttatct ctaggcattt taggttgttc agttgttctt 4740
gtgaatggga tctthttctc caaataggat tattgttgat atctgttgat tatgttaact 4800
ttgtagtttc tgactttact gaactgtctt cttagatcta atactcttht caatttcatc 4860
atatathttct cattcctatt ttgtttgggg tttttagggc gggaatatta acgggataag 4920
agagacaaaa gaaaatctgg aaaaacaatt cattttacct tacattgctt gtgattacta 4980
ccacactatt actgggttgg aaaaaattgt gaaatcccaa ggtgcctaataaatgggagg 5040
tacctaagtg ttcatthtaat gaattgtaat gattattgga atthctcttht cagtgagaag 5100
ctcttcatgg agatggcaga gctcatggtc tcagaaggct ggaaggatgc aggttatgag 5160
tacctctgca ttgatgactg ttggatggct ccccaagag attcagaagg cagacttcag 5220
gcagaccctc agcgcctthc tcatgggatt cgccagctag ctaattatgt gagthttatag 5280
ataatgttct tgttcatthca gaggactgta agcacttctg tacagaagct tgtthtagaaa 5340
cagccctcat ggccgggcgt ggtggctcac gctgtaatcc caacacttht ggaggccgag 5400
gcgggtggat cacctgaggt caagagthca agaccagcct ggccaacatg gtgaaaccc 5460
aactctatta aaagtacaaa aaattagctg gcatggtgg tgaacgcctg taaccccagc 5520
tacttgggag gctgaggcag gagaatcgct tgaaccagc aggtggaagt thcagtgagc 5580
tgagatcacg ccattgcaact cttagcctggg caacaaaaga gaaactccat ctcaaaaaaa 5640
aaaacaagga aaaaaagaaa cagcctcat gacacttaga aagtagaata gctggctgtt 5700
atctgaacat tgaattgtaa ggcttatcag gtggacttht cattccatca gcagacaatt 5760
thttthtttht thttthtttg agatggagtc thattctgtc thccaggctg gagggcagtg 5820
gtgcgatctc ggctcaactc aagctccacc thctgggttc atgccattct cctgcctcag 5880
cctcccaagt agctgggacc acaggcacc gccaccatgc ccagttaatt thttgtatth 5940
ttagtagaga cggggtthca ccatgtthag caagatggtc tcatctctct gacctctgta 6000
tccgccacc thggcctccc aaagtgtctg gattacagc atgagccacc gcgcctagcc 6060
tacaatgtt thgtaatagc thttgaggcc catctthgag thctcttht gctaaaacca 6120
ctgaactctc taggaggaaa aaggaactg gthcttgaca tatgtgtgca tgtatthcca 6180

tataaccttt aggaagctat tgcaatgta ctataaacta gaattttaga agatagaagg 6240
aaaatattct ggagatcatt gaagagaaat ggagtccaac actagttaaa gatgatgaag 6300
acagatTTTT ttttttgacg gagtctcgct ctgtcgccca ggctggagtg cagtggcaca 6360
atctcagctc actgcaaccc tccacctctt gggttcaagt gattctcctg cctcagcctc 6420
ccaagtagct gggactacag gcgcacacca ccacgcccg ctaatttttg tatttttagt 6480
agagacaagg tttcaccata ttcgccaggc tggctcga ctcctgacct tgtaatccgc 6540
ccaccttggc ctcccaaagt gctgggatta caggcatgag ccaccacgcc cggccgatga 6600
agacagatTT tattcagtac taccacagta gaggaaagag ccaagttaa ttccaaatac 6660
aacaagaca ggtggagatt tatagccaat gagcagattg agggggtcag tggatggaat 6720
atttaagaag acatcaaggg tagggagctt cttgctaaag cttcatgtac ttaacaaga 6780
agggtggggg atgaggaaa ttgatcagat atcaatggtg gcagtattga cttagcagga 6840
ttcttgctaa gaggtcttgc taggacagac ataggaagcc aagggtggagg tctagtcgaa 6900
aagaaggctc atcagagaag tctaactaaa gtttggtea gaagagtctt tgtcaaggta 6960
aatctatcat ttccctcaaa aggtaatttt caggatccca tcaggaagat tagcatggct 7020
gctagctttc tctcagttc tgggctatag ctacatgcc tagtttgaac tagctcagca 7080
gaactggggg atttattctt tgtcttcaa caaactcatc tggatgattt tgggggtttg 7140
tggggaaaag cccccaatac ctggtgaagt aacctgtct cttccccag cctggaatgg 7200
ttctctcttt ctgctacctc acgattgtgc ttctacaatg gtgactcttt tctcctctt 7260
catttcaggt tcacagcaaa ggactgaagc tagggattta tgcagatggt gaaataaaa 7320
cctgcgcagg ctccctggg agttttgat actacgacat tgatgccag acctttgctg 7380
actggggagt agatctgcta aaatttgatg gttgttactg tgacagttt gaaaatttgg 7440
cagatggtaa tgtttcattc cagagattta gccacaaagg aaagaacttt gaggccatgg 7500
tagctgagcc aaagaaccaa tcttcagaat ttaaatacc ctgtcacaat actggaata 7560
attattctcc atgtgccaga gctccatct cttctcttc agttcattaa ttaattaatt 7620
aattcatgta aatccatgc atacctaacc atagctaata ttgtgactt ataattcaag 7680
agggtcttaa gaggtaatta gtaattgtaa ctctctataa catcatttag gggagtccag 7740
gttgcaatc ggtcacagag aaagaagcat cttcattcct gccttctc aatatacaca 7800
ccatctctgc actacttctt cagaacaatc ccagcagtct gggaggtact ttacacaatt 7860
taagcacaga gcaactgcct gtcctgctg ctagttaaa catgaacctt ccaggtagcc 7920
tcttcttaaa atatacagcc ccagctgggc atgatggctc atgcctgtaa tcttagcact 7980
ttgggaggct gaggcgggtg gattacttga ggtaggagt tcgagaccac cctggccaac 8040
atggtgaaac ccatctctta gtaaaaatac aaaaattagc tgactttggt ggcacatgcc 8100
tgtaatccca gctacttggg aagctgagac agaagagtea cttgaacctg ggaacagag 8160
gttgtagtga gccaagatcg caccactgca ctccacctg gatgacagac tgaacccat 8220
ctcaaaaaat taaaataaaa taaaataaaa taactatata tatagccca gctggaaatt 8280
catttctttc cttatttta cccattgttt tctcatacag gttataagca catgtccttg 8340
gccctgaata ggactggcag aagcattgtg tactctgtg agtggcctct ttatatgtg 8400
ccctttcaaa aggtgagata gtgagcccag aatccaatag aactgtactg atagatagaa 8460
cttgacaaca aaggaaacca aggtctcctt caaagtcaa cgttacttac tatcatccta 8520

ccatctctcc caggttccaa ccacttctca ccatccccac tgctgtaatt atagcctaag 8580
ctaccatcac ctggaaagtc atccttgtgt ctcccccttt atttcacat tcatgtcctg 8640
tctatcaaca gtccttccac cagtatctct aaaatatctc ctgaatcagc ccacttcctt 8700
ccatcttcac tacatgcacc ctggccttcc aagctactat cggctctcaa ccagactgct 8760
gggaccacct gatctctctg ctccactct gtctcaacc ccatctatth tccaagcagc 8820
actagagtta tcatattaaa atgtaaataat cagttttttt tttaaagaaa aaaaccctga 8880
gacttaacag agttataaaa aatataaatg tcatcatcag ttccctgctt aaaaccctta 8940
actcgcttcc aattgcactt ggaatgaaac caaactgcac tgatccagcc cttgcctgcc 9000
tccccaaagt ccaaggggtc atggctcttt ccttggtac actggttttc tttctgtccc 9060
tcaacactgc aagcctattg ctgccccagg gcctttacac ttgctttttt tctgcctaga 9120
acagttcttc cccaaagatt tttaaagggc cgggctcctt aacattgaag tcgcagacca 9180
aacgccacat atgcagacag ttcttcteta actactttaa aatagcctc tgtccattca 9240
ttcttcatca cattaacctg ttttaattttc ttctcagagc tccacactat ttggaagtat 9300
ttgttgactt gttaccatgt ctccccacta gagtgttaagt ttcatgaggg caggacctt 9360
gtctgacttt gactgtatct ctgcgatatg gttaagtgtt aaatagttat ttatggaatg 9420
aatccctatt attccctcat tatctctgca aaatagtctt ttttctcaac atcttaaacc 9480
tgatatccca cctgcctatc taaaaacttt ttttttgca cagagtctca ctgtcaccca 9540
ggctagagtg cagtggcgcc atctcggtc actgcaacct ccgcctccc ggtttaagcg 9600
attctcttgc ctgacctc cagtagctgg gattatagcc gtgcgtacc acatctggct 9660
aatttttgta ttttagtag agatggtttc accatgttgg ccaggcttgt ctggaactcc 9720
tgacctcaga tgatccacct gcctcgccct cccaaagtgc tgggattaca ggcattagcc 9780
accgtgcca gcctctacaa actttttatt ccattaacaa actatatgct gggatttaag 9840
ttttcttaat acttgatgga gtccatgta attttcgagc ttttaatttt actaagacca 9900
ttttagttct gattatagaa gtaaattaac ttttaaggat ttcaagttat atggcctact 9960
tctgaagcaa acttcttaca gtgaaaattc attataaggg ttttagacctc cttatggaga 10020
cgttcaatct gtaaaactcaa gagaaggcta caagtgcctc ctttaaactg ttttcatctc 10080
acaaggatgt tagtagaaag taaacagaag agtcatatct gttttcacag cccaattata 10140
cagaaatccg acagtactgc aatcactggc gaaattttgc tgacattgat gattcctgga 10200
aaagtataaa gagtatcttg gactggacat cttttaacca ggagagaatt gttgatgttg 10260
ctggaccagg gggttggaaat gaccagata tggtaaaaac ttgagccctc cttgttcaag 10320
accctgcggt aggcttgttt cctatthtga cattcaagggt aaatacagggt aaagttcctg 10380
ggaggaggct ttatgtgaga gtacttagag caggatgctg tggaaagtgg tttctccata 10440
tgggtcatct aggtaacttt aagaatgttt cctcctctct tgtttgaatt atttcattct 10500
ttttctcagt tagtgattgg caactttggc ctgagctgga atcagcaagt aactcagatg 10560
gccctctggg ctatcatggc tgetccttta ttcatgteta atgacctccg acacatcagc 10620
cctcaagcca aagctctcct tcaggataag gacgtaattg ccatcaatca ggacccttg 10680
ggcaagcaag ggtaccagct tagacaggta aataagagta tatatthttaa gatggcttta 10740
tatacccaat accaactttg tcttgggect aaatctatth ttttcccttg ctcttgatgt 10800
tactatcagt aataaagctt cttgctagaa acattactth atttccaaa taatgctaca 10860

ggatcatttt aatttttcct acaagtgtt gatagttctg acattaagaa tgaatgcaa 10920
 actaacaggg ccacttatca ctagtgtcta agcaaccaca ctttcttggg ttttcaggga 10980
 gacaactttg aagtgtggga acgacctctc tcaggcttag cctgggctgt agctatgata 11040
 aaccggcagg agattgggtg acctcgctct tataccatcg cagttgcttc cctgggtaaa 11100
 ggagtggcct gtaatcctgc ctgcttcac acacagctcc tccctgtgaa aaggaagcta 11160
 gggttctatg aatggacttc aaggtaaga agtcacataa atcccacagg cactgttttg 11220
 cttcagctag aaaatacaat gcagatgtca ttaaaagact tactttaaaa tgtttatttt 11280
 attgccaact actacttctt gtccacttt ttctccattc actttaaaag ctcaaggcta 11340
 ggtggctcat gcctgtaate ccagcacttt gggaggctga ggcgggcaga tcacctgagg 11400
 tcgggacttt gagaccgcc tggacaacat ggtgaaacce ctttctaata aaaaataata 11460
 aaattagcca ggtgtgggtg cgcacctgtg gtcccagcta ctctgggggc tgaggcatga 11520
 gaatcgcttg aaccggggag tggaggttgc attgagctga gatcatgcca cctcactcca 11580
 gcctgggcaa caaagattcc atctcaaaaa aaaaaaaaaa gccaggcaca gtggctcatg 11640
 cctggaatcc cagcactttt ggaagctgag gcaggcagat cacttgaggt taggatttca 11700
 agaccagcct ggctaacata gtaaagccct gtcttacta aaaatacaaa aattagccag 11760
 gtatgggtggc gagcttctgt agccccagct actcaggaga ctgaggcagg agaactcatt 11820
 gaaccgggga agtggggggg tgcagtgacc caagatcacg ccaactgcatt ccagcctggg 11880
 caacagagca agactccatc tcaaaaaaaaa aagttctatt tccttgaata aaatthtccg 11940
 aagtttaaac ttttaggaata aaactattaa acccgtattt actcatccag ataccacacc 12000
 cccttggtga gattctctcc caattatcaa aatgtgtagc atatttaact accaagagct 12060
 aaacatcatt aagactgaaa tgtattaaga aggatgtata ggccaggcac ggtgtctcac 12120
 gcctgtaate ccaacacttt gggaggccaa gtcgggcgga tcacgaggtc aggagatgga 12180
 gaccatcctg gccaacatgg tgaaaccccc tcttactaa aaatacaaaa attagccagg 12240
 cagggtggcag gcacctgtaa tcccagctac tccagaggct gaggcaggac aatcacttga 12300
 acctgggagg cagaggctgc agtgagctga gttgtacca attgcactcc agcctaggtta 12360
 acgagcaaca ctccatctca aaaaaagaaa aaaaaaaga tgtataattt ggaactgtta 12420
 agaggcattt taaaga 12436

<210> 2

<211> 429

<212> PRT

<213> 智人

<400> 2

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

50	55	60
Ser Glu Lys Leu Phe Met	Glu Met Ala Glu Leu Met Val Ser Glu Gly	
65	70	75
Trp Lys Asp Ala Gly Tyr Glu Tyr Leu Cys Ile Asp Asp Cys Trp Met		80
	85	90
Ala Pro Gln Arg Asp Ser Glu Gly Arg Leu Gln Ala Asp Pro Gln Arg		95
	100	105
Phe Pro His Gly Ile Arg Gln Leu Ala Asn Tyr Val His Ser Lys Gly		110
	115	120
Leu Lys Leu Gly Ile Tyr Ala Asp Val Gly Asn Lys Thr Cys Ala Gly		125
	130	135
Phe Pro Gly Ser Phe Gly Tyr Tyr Asp Ile Asp Ala Gln Thr Phe Ala		140
145	150	155
Asp Trp Gly Val Asp Leu Leu Lys Phe Asp Gly Cys Tyr Cys Asp Ser		160
	165	170
Leu Glu Asn Leu Ala Asp Gly Tyr Lys His Met Ser Leu Ala Leu Asn		175
	180	185
Arg Thr Gly Arg Ser Ile Val Tyr Ser Cys Glu Trp Pro Leu Tyr Met		190
	195	200
Trp Pro Phe Gln Lys Pro Asn Tyr Thr Glu Ile Arg Gln Tyr Cys Asn		205
	210	215
His Trp Arg Asn Phe Ala Asp Ile Asp Asp Ser Trp Lys Ser Ile Lys		220
225	230	235
Ser Ile Leu Asp Trp Thr Ser Phe Asn Gln Glu Arg Ile Val Asp Val		240
	245	250
Ala Gly Pro Gly Gly Trp Asn Asp Pro Asp Met Leu Val Ile Gly Asn		255
	260	265
Phe Gly Leu Ser Trp Asn Gln Gln Val Thr Gln Met Ala Leu Trp Ala		270
	275	280
Ile Met Ala Ala Pro Leu Phe Met Ser Asn Asp Leu Arg His Ile Ser		285
	290	295
Pro Gln Ala Lys Ala Leu Leu Gln Asp Lys Asp Val Ile Ala Ile Asn		300
305	310	315
Gln Asp Pro Leu Gly Lys Gln Gly Tyr Gln Leu Arg Gln Gly Asp Asn		320
	325	330
Phe Glu Val Trp Glu Arg Pro Leu Ser Gly Leu Ala Trp Ala Val Ala		335
	340	345
Met Ile Asn Arg Gln Glu Ile Gly Gly Pro Arg Ser Tyr Thr Ile Ala		350
	355	360
		365

Val Ala Ser Leu Gly Lys Gly Val Ala Cys Asn Pro Ala Cys Phe Ile
 370 375 380
 Thr Gln Leu Leu Pro Val Lys Arg Lys Leu Gly Phe Tyr Glu Trp Thr
 385 390 395 400
 Ser Arg Leu Arg Ser His Ile Asn Pro Thr Gly Thr Val Leu Leu Gln
 405 410 415
 Leu Glu Asn Thr Met Gln Met Ser Leu Lys Asp Leu Leu
 420 425

<210> 3

<211> 1290

<212> DNA

<213> 智人

<400> 3

atgcagctga ggaatcccga gctccacctg ggctgtgctc tggctctgcg gttcctggcc 60
 ctcgtgtcct gggacatccc tggcgctagg gccctcgata acggactggc ccggaccccc 120
 acaatgggat ggctccactg ggaaaggttc atgtgcaatc tggactgtca ggaggaacct 180
 gactcctgca tcagcgaaaa gctcttcatg gagatggccg agctgatggt gagcgagggc 240
 tggaaggacg ccggctacga gtatctgtgc atcgatgact gctggatggc ccctcaaagg 300
 gactccgaag gcaggctgca ggctgatccc caaaggttcc cccacggaat ccggcagctc 360
 gccaaactacg tgcattccaa gggcctcaag ctcggcattc acgccgacgt gggcaacaaa 420
 acatgcgccg gattccccgg cagcttcggc tactacgaca tcgacgcca gacattcgct 480
 gattggggag tggacctgct gaagtctgac ggctgttact gcgattccct ggaaaacctg 540
 gccgacggct acaaacacat gtcctcgc ctgaaccgga caggcaggtc catcgtgtac 600
 agctgctgagt ggcccctgta catgtggcct ttccagaagc ccaactacac agagatcagg 660
 cagtactgca accactggag gaactctgct gacatcgacg actcctggaa gagcatcaag 720
 agcatcctgg actggaccag cttcaaccag gagaggatcg tggacgtggc tggacccgga 780
 ggctggaacg accccgatat gctggtgatt ggcaacttcg gactgagctg gaaccagcag 840
 gtgaccacga tggcccctgt ggccattatg gccgctcccc tgttcatgtc caacgacctg 900
 aggcacatca gccccaggc caaggctctg ctgcaggaca aggatgtgat cgccatcaac 960
 caggaccccc tgggcaagca gggctaccag ctgaggcaag gagataactt cgaggtgtgg 1020
 gagaggcccc tgtccggact ggcttgggccc gtggccatga tcaatcggca ggagatcggc 1080
 ggacccccgt cctacacat tgctgtggcc agcctgggaa aaggagtgcg ctgcaacccc 1140
 gcctgcttca ttaccagct gctccccgtg aagcgggaagc tgggcttcta tgagtggacc 1200
 agcaggctga ggtcccatat caatcctacc ggcaccgtcc tectccagct cgagaatacc 1260
 atgcagatga gcctcaagga tctgctgtga 1290

```

cccttctgtaggggcagagaggttctacttcattactgcgtctcctgggaaggccatcag      60
gactgctggctaaagtgggaaccaggactcttctgtgagttagaatttgtgtatttatat      120
gtgtgttatacacatttttttaaaaaactgtaacgacatcaggttgagcagtcgtctccgg      180
gtggtgaattatgtgtattttttaaatTTTatactatattgttatTTTTTcaaTgttcgaa      240
attgaatatgtagattgTTgttatcagcagaaaaataaacattattcaaatactctattc      300
agtaaagtaatttattggggcgcctttgtcaagcacgcatttgcctagatgtgactctaca      360
gataaaattcacttggggcctccccttacagacaatcaggcagtgagagactgagtgcctg      420
aatggatagaccagcactcagaccactatTTTTcagtatctgTTTTTcttaactcagggcc      480
gtggtTTTTcaaacgTTTTTcgccttacggtcacccttagggTcccccgagaccggcccag      540
acagacagatatacaaaaaacacatacacagtcattgagcgtccaccattccccaccaggc      600
gcagcacaggcggcttccccggcactgagatgggggggaggaggggagagagcgcgaggggg      660
gaggggaaagcagagaacgaaagaggcggaggcggccccgaacccccgctctggtcttca      720
tcatcaccacccctgggtccccagttcccacccacacaccaacctctaacgataccgggt      780
aatTTTTcctccttcttccctcaaacggctatagcagagacggttagacgacgaccagaacta      840
cttctgctcacgtaagcagtaatcacgtgagcgcctacgtcatgtgagatctcggtcac      900
gtgagcaactctcggttaaaactcgggatcactaaggTgcccgcacttcttctggtatgg      960
aaatagggcgggtcaatatcaagaaaggaagagggtgattgggttagcggaaacgtcttacg      1020
tgactgattattgggtctaacctctggggataaacgTcccagTtgccagagaaacaataacg      1080
tcattatTTaataagtcattcggtgattggTccgccccctgaggTtaattcttaaagcccag      1140
gttaccgcgggaaatTTatgctgtccggTcaaccgtgacaatgcagctgaggaaccagaa      1200
ctacatctgggctgcgcgcttgcgcttccgcttctggccctcgtttcctgggacatccct      1260
ggggctagagcactggacaatggattggcaaggacgcctaccatgggctggctgcaactgg      1320
gagcgttcatgtgcaaccttgactgccaggaagagaccagattcctgcatcaggTatcag      1380
atattgggtactcccttccctttgcttttccatgtgtttgggtgtgtttggggaactgga      1440
gagtctcaacgggaacagTtgagcccaggggagagctccccacccgactctgctgctgc      1500
TTTTTtatccccagcaaacTgtcccgaaTcaggactagccctaaactTTctctgtgtgac      1560
cttTcctgggatgggagTccggccagcggccccctgTTtctTTctctctctctctctctct      1620
cgtTctccttctctTTctctTTctctTTctctTTctctTTctctTTctctTTctctTTcctgcccgg      1680
ttctctTTTTTcactgctcctTgcagagcagggccaccccattaggcagTgtgcccAAagT      1740
agccctgcccggTtctattcagacccttctTgtgaaacttctgctcttctctgcccggTg      1800
ctaaccgttagaacatctagggtgggtaggaggaatggggaactaagattcgtgccattt      1860
TTTTcctTTTTggggTcgtggattTctcggcagTatctcaggggagTtagagagaccata      1920
aggTcgtgagatctctcccacctgcgccatgagcgtggcatcaggctggaaggTtgaca      1980
TggaggaactTTatacattTcacactTTgcgtgagggTtgaggctggattagataggTat      2040
TgaacatatctgaccctcacaatccttatctgTaaatTgggattacaacctTTtaattTc      2100
agggagctgacaaaaaaaaatctgaaaaatagTtcttatctcacacaggtgagTTTTcaag      2160
gagataacctatTTaaagtacatagcacagcgtTgaccattcaactgcgcttacagagc      2220
aaatgtTcaatgggaaaatgaatgTaaatctacaaatctgaatgaatatgtgtatTTTTc      2280
TggagagaggatattTaccTTTctTcaaatTctcaaagggtctctgtgattTaaaaaaggT      2340
taggaatcactgatagatgtTggTaaaaggTggcagTcacagTacattTctgtgtccata      2400
agTtatTcctatgaatatctTtatagataaaagTcaggatgtTggTcagacatcacagaag      2460
aaatTggcctTgTaaGTTTcatgtgacctgtggtacagTatgtgtggcaattTTgocca      2520
TcacggatTTTTTTTTattTggtattTgcatctgattataaaactaatgcatgatcattTc      2580
aaaaaTgtagataaagaagagcaaaatgaaaataaagattTccccccaccgTtccacca      2640
ccagaaataatcatggTtTaaatgTtaatatacaacctTacaattgtTTTctatataaa      2700
TgaaaacatagatTTctTTattTcattTTTTccataaaaaatggatcatgtTtatgtca      2760
TgtTTggctaatggcaagacctTggcaccagTctgggctcaaatTctgcctcattTgtT      2820
cttagccctgtgacattgggtaaattacactTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTgagacgggg      2880

```

图1A

```

tctcgctctgtcgcccaggctggagtgacgtggcagcatctcggctcactgcaagtcggc 2940
ctcctgggttcacgccattcttctgcctcagcctcccagtagctgggactacaggcgcc 3000
tgccaccaacgcctggctcttttttttttttttttttttttttagtacagacggggttcac 3060
catgtagccagggtgggtctcaatctcctgaacctcgtgattcgcccgcctcagcctccca 3120
aagtgetgggtgtgagccacogtggccagccttacttttttttttttgagaggggggtctact 3180
ctgtcacccaggttggagtgacgtggcgcatctctgctcagtgcaaaactccacctcccg 3240
ggtttaagcagttctcctgtcgtagctctcctgagtagctgggattacaggcacaccacca 3300
cggccagctaatttttgtattttcagtagagacgggtttcaccatgttgcccaagctggt 3360
ctcgaactcctggcctcaagtgatctgcccgccttggcctcccagagtgctgggattaca 3420
ggtgtgagccaccgcaccocggcctctttttcttttttagtctatcataccttgcaaata 3480
cagtggttcttctctatgtgttgggttttgatatttatgtaataaaacacatcagttttcc 3540
ttctgattttctgactttggggcatgctgagaaagtcttttctacctgaagataatac 3600
agtatatacgtttcttactagtatttttgtggatttttaaaatatttaaatcttttagtcc 3660
atctgaaacttgttcttctatcagaaatgccacatttaataaataaataagtcccattggt 3720
cagatggctggaaggacctctttcgaaactttgtttaattccattaatctgtgtattctt 3780
attcctaatgctaatagttccacactagcttctcttatctttttttcttttttttttttt 3840
ttttgagctggagtttctcctcttgttggccaggtggagtagcaatgtcacgatctcgggt 3900
caccgcaacctccgctcccaggttcaagcaattctcctgcctcactcctcgcgagtagct 3960
ggaattacaggcatgcccaccacgcctagctattttgtattttttagtagagatgggggt 4020
tctccatggttggcaggtctcaaacctcccagcctcaggtgatctgcctgcctcggc 4080
ctcccaaaatgctgttattacaggcgtgagccaccacgcccagccttcatcttttaataga 4140
atgtacatgtatgtaatcttttaggtgaactttttgtaatgttgtgccaagttccttaaa 4200
aagccttttggagctgggcaggtggccaagcctgtaatcccagcattttgggagctctg 4260
aggcaggtggatcacttgaggccaggagttcaagactagcctagccaaaatgcaaaaacc 4320
tgtctctactaaagatacaaaaattagccggatgcatggcagatgcccagatgctgtaatctcagc 4380
tactcgggaggctgaggtagaagaatcgcttgaaccggggaggcagaggttgcagtgagc 4440
aagatggcgccactgcactccagcctgggtgacagaggggagactccatctcaaaaaaaaa 4500
aaaaaaaaaaaaagataaaaaaggaaacctaaagtaactcttgggctttgttaaggattttgtt 4560
aaatatacaaaaggattgcagggaaaatttaacttatttttaataattgagtagcttatcca 4620
agagcaaaaataatatttctccatttattcaaatcatttaggagcatcattagtttaaacat 4680
atgggccttgcacgtatcttaaaatttatctctagggcattttagggtgttcagttgttctt 4740
gtgaatgggatctttttctccaaataggattattgttgatctctgttgattatgtaact 4800
ttgtagtttctgactttactgaactgtcttcttagatctaatactcttttcaatttcate 4860
atataatttctcattcctattttgtttgggggtttttagggcgggaataattaacgggataag 4920
agagacaaaagaaaatctggaaaaacaattcattttaccttacattgcttgtgattacta 4980
ccacactattactgggttggaaaaaattgtgaaatcccagggtgcttaataaatgggagg 5040
tacctaagtggttcatttaataatgtaatgattattggaatttctctttcagtgagaag 5100
ctcttcatggagatggcagagctcatggctcagaaggctggaaggatgcaggttatgag 5160
tacctctgcattgatgactgttggatggctccccaaagagattcagaaggcagacttcag 5220
gcagaccctcagcgtttctcctcatgggattcggccagctagctaattatgtgagtttatag 5280
ataatgttcttgttcatcagaggactgtaagcacttctgtacagaagcttgtttagaaa 5340
cagcctcatggccggcggtgggtggctcacgctgtaatcccacactttgggaggccgag 5400
gcccgtggatcacctgaggtcaagagttcaagaccagcctggccaacatggtgaaacccc 5460
aactctattaaaagtacaaaaaattagctgggcatggtgggtgaacgcctgtaaccccagc 5520
tacttgggaggctgaggcaggagaatcgcttgaacccaggaggtggaagtttcagtgagc 5580
tgagatcacgccattgcaactctagcctgggcaacaaaagagaaactccatctcaaaaaaa 5640
aaaacaaggaaaaaaagaaacagccctcatgacacttagaaagtagaatagctggctgtt 5700
atctgaacattgaattgtaaggcttatcaggtggactttgcattccatcagcagacaatt 5760

```

图1B

tctatcaacagtccttccaccagtatctctaaaatatctcctgaatcagcccacttcctt	8700
ccatcttcactacatgcacctggccttccaagctactatcggctctcaaccagactget	8760
gggaccacctgatctctctgcttccaactctgtctcaacecccatctattttccaagcagc	8820
actagagttatcatattaaaatgtaaatatcagtttttttttaagaaaaaacctga	8880
gacttaacagagttataaaaaatataaatgtcatcatcagttccctgcttaaaaccctta	8940
actcgcttccaattgcacttgggaatgaaaccaaactgcactgatccagcccttgctgcc	9000
tccccaaagtccaaggggtcatggctcttccctggctacactggttttctttctgtccc	9060
tcaacactgcaagcctattgctgccccagggcctttacaacttgctttttttctgctaga	9120
acagttcttccccaaagatttttaagggccgggctccttaacattgaagtcgcagacca	9180
aacgccacatatagcagacagttcttctctaaactctttaaataagccctctgtccattca	9240
ttcttcatcacattaacctgtttaattttcttctcagagctccacactatttggaagtat	9300
ttgttgacttggtaccatgtctccccactagagtgtaagtttcatgagggcagggacctt	9360
gtctgactttgactgtatctctgcataatgggttaagtggttaaatagttatttatggaatg	9420
aatccctattattccctcattatctctgcaaaaatagctttttttctcaacatcttaaac	9480
tgatatcccacctgctatctacaaaacttttttttggagacagagctcactgtcaccca	9540
ggctagagtgagtgccgcatctcggctcactgcaacctccgctcccgggtttaagcg	9600
attctcttgccctcagccctcccagtagctgggattataggcgtgcgctaccacatctggct	9660
aatttttgtattttttagtagagatggtttaccatggttggccagggcttgtctogaactcc	9720
tgacctcagatgatccacctgctcggcctcccaaagtgtgggattacagggcatgagcc	9780
accgtgccagcctctacaaaactttttattccattaacaaaactatagctgggatttaag	9840
ttttcttaataacttgatggagtcctatgtaattttcagagcttttaattttactaagacca	9900
ttttagttctgattatagaagtaaattaactttaagggatttcaagttatatggcctact	9960
tctgaagcaaaccttcttacagtgaaaattcattataaggggttagacctccttatggaga	10020
cgttcaatctgtaaacctcaagagaaggctacaagtgccctcctttaaacctgttttcatctc	10080
acaaggatgttagtagaaaagtaaacagaagagtcataatctgttttcacagcccaattata	10140
cagaaatccgacagtactgcaatcactggcgaaaattttgctgacattgatgattcctgga	10200
aaagtataaagagtatcttggactggacatcttttaaccaggagagaattggttgatggtg	10260
ctggaccagggggttggaaatgaccagatataggtaaaaacttgagccctccttggtcaag	10320
accttgcggtaggtctgtttcctattttgacattcaaggtaaaatacaggtaaagtctctg	10380
ggaggaggctttatgtgagagtaacttagagcaggatgctgtggaaagtggtttctccata	10440
tgggtcatctaggtaaccttaagaatgtttcctcctctcttgtttgaattatttcattct	10500
ttttctcagttagtgattggcaactttggcctcagctggaatcagcaagtaactcagatg	10560
gccctctgggctatcatggctgctcctttattcatgtctaatagacctccgacacatcagc	10620
cctcaagccaaagctctccttcaggataaaggacgtaattgcccataatcaggacccttg	10680
ggcaagcaagggtagcagcttagacaggtaaataagagtatataattttaagatggcttta	10740
tataccaataccaactttgtcttgggectaaatctattttttcccttgctcttgatgt	10800
tactatcagtaataaagcttcttgctagaaaacattactttatttccaaaataatgctaca	10860
ggatcatttttaatttttctacaagtgcttgatagttctgacattaagaatgaatgcca	10920
actaacagggccacttatacactagttgctaaagcaaccacactttcttggttttccagga	10980
gacaacttgaagtggtggaaacgacctctctcaggcttagcctgggctgtagctatgata	11040
aaccggcaggagattggtggacctcgctcttataccatcgcagttgcttccctgggtaaa	11100
ggagtggcctgtaatcctgctgcttcatcacacagctcctccctgtgaaaaggaagcta	11160
gggttctatgaatggacttcaagggttaagaagtcacataaaatcccacaggaactgttttg	11220
cttcagctagaaaatacaatgcagatgctattaaaagacttactttaaaatgtttatttt	11280
attgccaaactactacttctgtccacctttttctccattcactttaaaagctcaaggcta	11340
ggtggctcatgctgtaatcccagcactttgggaggtgagggggcagatcacctgagg	11400
togggactttgagaccocgctggacaacatggtgaaaccccatttctaataaaaaatataa	11460
aaattagccaggtgtggtggcgacctgtggtccagctactctgggggctgaggcatga	11520

图1D

```

gaatcgcttgaacccgggagtgagggttgcaattgagctgagatcatgccacctcactcca      11580
gcctgggcaacaaagattccatctcaaaaaaaaaaaaaaaaaagccaggcacagtggctcatg      11640
cctggaatcccagcacttttggaaagctgaggcaggcagatcacttgaggtaggatttca      11700
agaccagcctggctaacaatagtaaagcctgtctctactaaaaatacaaaaattagccag      11760
gtatggtggcgagcttctgtagccccagctactcaggagactgaggcaggagaatcactt      11820
gaacccgggaagtgggggggtgcagtgaccaagatcacgccactgcattccagcctggg      11880
caacagagcaagactccatctcaaaaaaaaaaagtctatctccttgaataaaattttccg      11940
aagtttaaacctttaggaataaaaactatataaacccgtatcttactcatccagatacccacc      12000
cccttggtgagattctctcccaattatcaaaatgtgtgtagcatatttaactaccaagagct      12060
aaacatcattaagactgaaatgtattaagaaggatgtataggccaggcacgggtgtctcac      12120
gocctgtaatcccaacactttggggaggccaagtccggcgatcacgaggtcaggagatgga      12180
gaccatcctggccaacatggtgaaacccccctctctactaaaaatacaaaaattagccagg      12240
caggtggcaggcacctgtaatcccagctactccagaggctgaggcaggacaatcacttga      12300
acctgggaggcagaggctgcagtgagctgagggtgtaccaattgcactccagcctaggta      12360
acgagcaacactccatctcaaaaaaagaaaaaaaaaaaaaagatgtataatttggaaactgta      12420
agaggcattttaaaga      12436
    
```

图1E

```

MQLRNPELHL  GCALALRFLA  LVSWDIPGAR  ALDNGLARTP  TMGWLHWERF  MCNLDCQEER  60
DSCISEKLFM  EMAELMVSEG  WKDAGYEYLC  IDDCWMAPQR  DSEGRQLQADP  QRFPHGIRQL  120
ANYVHSKGLK  LGIYADVGNK  TCAGFPGSFG  YYDIDAQTFA  DWGVDLLKFD  GCYCDSLENL  180
ADGYKHMSLA  LNRTGRSIVY  SCEWPLYMWP  FQKPNYTEIR  QYCNHWRNFA  DIDDSWKSJK  240
SILDWTSFNQ  ERIVDVAGPG  GWNDPDLVI  GNFGLSWNQQ  VTQMALWAIM  AAPLFMSNDL  300
RHISPOAKAL  LQDKDVIAIN  QDPLGKQGYQ  LRQGDNFEVW  ERPLSGLAWA  VAMINRQEIG  360
GPRSYTIAVA  SLGKGVACNP  ACFITQLLPV  KRKLGFEYEW  SRLRSHINPT  GTVLLQLENT  420
MQMSLKDLL      429
    
```

图2

```
atgcagctgaggaatcccgagctccacctgggctgtgctctggctctgcggttctctggcctc  
gtgtcctgggacatccctggcgctagggccctcgataacggactggcccggacccccacaatg  
ggatggctccactgggaaaggttcatgtgcaatctggactgtcaggaggaaccogactcctgc  
atcagcgaaaagctcttcatggagatggccgagctgatggtgagcgagggctggaaggacgcc  
ggctacgagtatctgtgcatcgatgactgctggatggcccctcaaagggactccgaaggcagg  
ctgcaggctgatccccaaaggtttccccacggaatccggcagctcgccaactacgtgcattcc  
aagggcctcaagetcggcattacgcccgaogtgggcaacaaaacatgcgcccggattccccggc  
agcttcggctactacgacatcgacgcccagacattogctgattggggagtggacctgctgaag  
ttcgacggctgttactgcgattccctggaaaacctggccgacggctacaaacacatgtccctc  
gccctgaaccggacaggcaggtccatcgtgtacagctgcgagtgggcccctgtacatgtggcct  
ttccagaagcccaactacacagagatcaggcagtaactgcaaccactggaggaacttcgctgac  
atcgacgactcctggaagagcatcaagagcatcctggactggaccagcttcaaccaggagagg  
atcgtggacgtggctggacccggaggctggaacgaccccgatatgctggtgattggcaacttc  
ggactgagctggaaccagcaggtgaccagatggcccctgtgggccattatggccgctcccctg  
ttcatgtccaacgacctgaggcacatcagccccaggccaaggctctgctgcaggacaaggat  
gtgatcgccatcaaccaggaccccctgggcaagcagggtaccagctgaggcaaggagataac  
ttcgaggtgtgggagaggcccctgtccggactggcttgggcccgtggccatgatcaatcggcag  
gagatcggcggaccccggctcctacaccattgctgtggccagcctgggaaaaggagtgcctgc  
aaccgccctgcttcattaccagctgctcccgtgaagcggaaagctgggcttctatgagtgg  
accagcaggctgaggtcccataatcaatcctaccggcaccgtcctcctccagctcgagaatacc  
atgcagatgagcctcaaggatctgctgtga
```

图3