



## (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента  
2020.05.29

(21) Номер заявки  
201592265

(22) Дата подачи заявки  
2014.06.06

(51) Int. Cl. G01N 33/92 (2006.01)

(54) СПОСОБЫ КОНТРОЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ПАЦИЕНТА, ИМЕЮЩЕГО  
АССОЦИИРОВАННОЕ С КИСЛОЙ СФИНГОМИЕЛИНАЗОЙ (ASM) НАРУШЕНИЕ

(31) 61/832,302

(32) 2013.06.07

(33) US

(43) 2016.04.29

(86) PCT/US2014/041405

(87) WO 2014/197859 2014.12.11

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:  
ДЖЕНЗИМ КОРПОРЕЙШН (US)

(72) Изобретатель:  
Чуан Вэй-Лин, Кокс Джеральд Ф.,  
Чжан Кс. Кейт (US)

(74) Представитель:  
Медведев В.Н. (RU)

(56) McGovern M., Wasserstein M.P., Kirmse B., Duvall L., Schiano T., Thurberg B.L., Richards S., Cox G.F.: "A phase 1 trial of recombinant human acid sphingomyelinase (rhASM) enzyme replacement therapy in adults with ASM deficiency (ASMD)", 12 November 2012 (2012-11-12), XP002728855, Retrieved from the Internet: URL: <http://www.nnpdf.org/documents/niemannpickposterICIEM09FINAL.pdf> [retrieved on 2014-08-21] (introduction)(methods and study design, upper diagram) (conclusions)(results, left table in second row)(results, first table)

& SAVIC R. AND SCHUCHMANN E.H.: "Use of Acid Sphingomyelinase for Cancer Treatment", THE ROLE OF SPHINGOLIPIDS IN CANCER DEVELOPMENT AND THERAPY, vol. 117, 1 January 2013 (2013-01-01), pages 91-115, XP009179780,

MIRANDA S.R. ET AL.: "Infusion of recombinant human acid sphingomyelinase into Niemann-Pick disease mice leads to visceral, but not neurological, correction of the pathophysiology", FASEB JOURNAL, FED. OF

AMERICAN SOC. FOR EXPERIMENTAL BIOLOGY, US, vol. 14, no. 13, 1 October 2000 (2000-10-01), pages 1988-1995, XP002691898, ISSN: 0892-6638, DOI: 10.1096/FJ.00-0014COM (p 1989, col 2, para 3)(p 1990, col 2, last para to p 1992, col 1, para 2)(p 1989, col 2, para 3) (p 1992, col 1, last para)(p 1992, col 1, last para); abstract; figures 1,2

Horinouchi K., Erlich S., Perl D.P., Ferlitz K., Bisgaier C.L., Sandhoff K., Desnick R.J., Stewart C.L., Schuchmann E.H.: "1995 Nature Publishing Group <http://www.nature.com/ng/journal/v10/n3/pdf/ng0795-288.pdf> [retrieved on 2014-08-22] (abstr; p 292, col 1-2, bridging para)

WASSERSTEIN ET AL.: "Acid sphingomyelinase deficiency: Prevalence and characterization of an intermediate phenotype of Niemann-Pick disease", JOURNAL OF PEDIATRICS, MOSBY-YEAR BOOK, ST. LOUIS, MO, US, vol. 149, no. 4, 27 September 2006 (2006-09-27), pages 554-559, XP005843654, ISSN: 0022-3476, DOI: 10.1016/J.JPEDI.2006.06.034 p 555, col 2, last para

WO-A2-2011025996

HE X. ET AL.: "Characterization of human acid sphingomyelinase purified from the media of overexpressing Chinese hamster ovary cells", BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA. PROTEIN STRUCTURE AND MOLECULAR ENZYMOLOGY, ELSEVIER, AMSTERDAM; NL, vol. 1432, no. 2, 13 July 1999 (1999-07-13), pages 251-264, XP004278820, ISSN: 0167-4838, DOI: 10.1016/S0167-4838(99)00069-2 the whole document

CHUANG WEI-LIEN ET AL.: "Lyso-sphingomyelin is elevated in dried blood spots of Niemann-Pick B pati", MOLECULAR GENETICS AND METABOLISM, ACADEMIC PRESS, AMSTERDAM, NL, vol. 111, no. 2, 7 December 2013 (2013-12-07), pages 209-211, XP028821355, ISSN: 1096-7192, DOI: 10.1016/J.YMGME.2013.11.012 the whole document

(57) Изобретение относится к способу контроля лечения пациента, имеющего ассоциированное с кислой сфингомиелиназой (ASM) нарушение, включающему (а) введение пациенту в эффективном количестве терапевтического средства, которое представляет собой рекомбинантную кислую сфингомиелиназу человека (rhASM); и (б) определение уровня лизосомного сфингомиелина (лизосомного SPM) в биологическом образце, полученном от пациента через три или более дней после стадии (а), перед введением последующей дозы, где снижение уровня лизосомного SPM по сравнению с референтным уровнем показывает эффективность терапевтического средства, где референтный уровень представляет собой исходный уровень лизосомного SPM субъекта перед

лечением на стадии (а). Изобретение обеспечивает неинвазивную оценку таких пациентов, включая скрининг и диагностику ассоциированного с ASM нарушения.

035342 B1

035342 B1

---

Настоящая заявка испрашивает приоритет согласно 35 U.S.C. § 119 предварительной заявки на патент США 61/832302, поданной 7 июня 2013 г., которая включена в данный документ с помощью ссылки во всей своей полноте.

Настоящее раскрытие относится к способам скрининга, диагностики, контроля и/или лечения ассоциированных с кислой сфингомиелиназой (ASM) нарушений, таких как болезнь Ниманна-Пика.

Кислая сфингомиелиназа (ASM) представляет собой лизосомный фермент фосфодиэстеразу, которая гидролизует сфингомиелин (SPM), фосфолипидное соединение, скопления которого встречаются в головном мозге, печени, легких, селезенке и лимфатических узлах, до церамида и фосфорилхолина. Потеря активности ASM может в результате приводить к неспособности организма расщеплять SPM. У пациентов с ассоциированными с ASM нарушениями SPM накапливается преимущественно в макрофагах, но также в гепатоцитах и других типах клеток, что приводит к выраженной гепатоспленомегалии, тромбоцитопении, интерстициальному заболеванию легких и ишемической болезни сердца. SPM существенно не повышается в плазме, цельной крови или моче, что ограничивает его использование в качестве неинвазивного биомаркера.

Диагностика ассоциированного с ASM нарушения в настоящее время требует инвазивного тестирования и/или длительного медицинского обследования, такого как оценка предполагаемых клинических признаков и симптомов, биопсия печени или легких, тестирование активности ASM в образце крови (при этом были описаны ложные отрицательные и положительные случаи) и/или генетическое тестирование (например, анализ мутации гена SMPD1). Лечение ассоциированных с ASM нарушений может включать введение замещающего фермента. В высоких дозах ферментозаместительная терапия может приводить к образованию токсических или вредных метаболитов. Соответственно существует потребность в разработке усовершенствованных способов скрининга, диагностики и/или контроля курса лечения ассоциированного с ASM нарушения. В настоящем документе раскрываются способы неинвазивного скрининга, диагностики, контроля терапии и/или индивидуального подбора дозы терапевтического средства для лечения ассоциированного с ASM нарушения, включающие измерение уровня лизосомного SPM (сфингозилфосфорилхолина или лизосомного сфингомиелина) в биологическом образце. Повышенные уровни лизосомного SPM можно использовать для скрининга или диагностики ассоциированного с ASM нарушения. Повышенные уровни лизосомного SPM можно также использовать в качестве сигнала или признака образования одного или нескольких токсических метаболитов, связанных с чрезмерно высокой дозой при ферментозаместительной терапии, создавая, таким образом, возможность для подбора точной дозы при ферментной терапии, чтобы снизить накопление SPM, избегая при этом вредных побочных эффектов данной терапии. Повышенные уровни лизосомного SPM можно также использовать для контроля долговременной эффективности курса лечения ассоциированного с ASM нарушения (например, если уровни лизосомного SPM не снижаются в течение курса лечения, это может служить признаком неэффективного лечения).

Болезнь Ниманна-Пика (NPD) является наследственным, аутосомно-рецессивным нарушением накопления липидов, характеризующимся избыточным накоплением SPM в лизосомах клеток, таких как макрофаги и нейроны, что нарушает нормальные функции клеток. Болезнь Ниманна-Пика типа А ("NPD-A") представляет собой быстро прогрессирующее нейродегенеративное заболевание у младенцев и обычно приводит к смерти в возрасте от двух до трех лет. Болезнь Ниманна-Пика типа В ("NPD-B") приводит к увеличению печени и селезенки и респираторному дистрессу с летальным исходом, как правило, наступающим к старшему юношескому возрасту. Другие типы болезни Ниманна-Пика, например тип С ("NPD-C"), также могут ассоциироваться с накоплением SPM и/или лизосомного SPM. В данном документе они также относятся к ассоциированным с ASM нарушениям (ASMD). В данном документе эти формы болезни Ниманна-Пика в совокупности относятся к болезни Ниманна-Пика (NPD).

Наиболее часто NPD встречается среди индивидуумов, происходящих от евреев-ашкеназов, чем в общей популяции. Предполагается, что частота распространения NPD-A среди евреев-ашкеназов составляет приблизительно 1 на 40000, с частотой гена (q) приблизительно 1 на 200 и частотой гетерозиготных носителей (2 pq) 1 на 100 (Goodman, 1979, in "Genetic Disorders Among The Jewish People", John Hopkins Univ. Press, Baltimore, pp. 96-100). Встречаемость гетерозиготных носителей NPD-B в популяции евреев ашкеназов является менее частой. Id. Было определено, что суммарная частота гетерозиготных носителей NPD А и В составляет приблизительно 1 на 70 среди индивидуумов, происходящих от евреев ашкеназов. Id. В эпидемиологических исследованиях, проведенных в различных странах, установлено, что суммарная частота возникновения заболевания NPD А и В в нескольких странах мира варьирует от 1 на 167000 до 1 на 250000 новорожденных (Mickle et al., 1999 JAMA 281 (3) :249-254; Poorthuis et al. , 1999 Hum. Genet. 105:151-156; Pinto et al. , 2004 Euro. J. Hum. Gene. 12:87-92). Предполагается, что частота гетерозиготных носителей варьирует от 1 на 200 до 1 на 250 индивидов.

Пациенты с NPD-A или NPD-B обладают остаточной активностью ASM (приблизительно 1-10% от нормы), но этого не достаточно для предупреждения избыточного накопления сфингомиелина в лизосомах. Более того, клиническое течение NPD-B является чрезвычайно изменчивым, и в настоящее время невозможно связать тяжесть заболевания с уровнем остаточной активности ASM. Хотя ферментную диагностику с использованием NPD-A или NPD-B можно выполнять в образцах крови, этой диагностике

часто предшествуют инвазивные процедуры, такие как биопсия печени или легких. Кроме того, ферментное обнаружение облигатных гетерозигот оказалось проблематичным, особенно использование лейкоцитов периферической крови в качестве источника ферментов. Одним возможным объяснением является то, что присутствие нейтральных сфингомиелиназ в некоторых источниках и/или присутствие остаточной активности ASM, образующейся в результате действия мутантных аллелей, способствовало невозможности надежно разграничить носителей каждого подтипа заболевания. Даже использование культивированных фибробластов кожи, которые не экспрессируют нейтральную сфингомиелиназу, не обеспечило точных результатов у гетерозигот. Соответственно требуются альтернативные способы точного обнаружения, скрининга, диагностики и лечения ассоциированных с ASM нарушений, таких как NPD.

Заместительную ферментотерапию (ERT) использовали для лечения разных лизосомных болезней накопления (см., например, патент США № 7001994 и заявку на патент США № 2011/0052559, описывающие ERT для болезни Тея-Сакса, Помпе и Ниманна-Пика среди прочих, которые включены в данный документ во всей своей полноте). ERT стремится восполнить недостающий и/или дефектный фермент с помощью вводимого экзогенно фермента. В случае ERT для болезни Ниманна-Пика целью было бы предотвратить возможность пораженному индивидууму перерабатывать сфингомиелин и предупредить его накопление в лизосомах. Чтобы быть эффективной, такая терапия может изначально потребовать достаточно большого количества заместительного фермента для разрушения накопленного сфингомиелина, а также непрерывного введения заместительного фермента для предотвращения повторного накопления сфингомиелина. Метаболизм накопленного сфингомиелина может, однако, приводить к образованию токсических или вредных метаболитов. Таким образом, требуется тщательная согласованность в отношении ERT, чтобы эффективно уменьшать у пациента объем накопленного сфингомиелина без образования повышенных уровней метаболитов, которые могут привести к нежелательным побочным эффектам.

Как отмечено ранее, уровень SPM значительно не повышается в плазме крови, цельной крови или моче, что ограничивает его применение в качестве неинвазивного биомаркера для скрининга, диагностики или контроля лечения ассоциированного с ASM нарушения. Как раскрывается в данном документе, уровень лизосомного SPM (сфингозилфосфорилхолина или лизосомного сфингомиелина), деацилированной формы SPM, значительно повышается в тканях, в том числе в периферических тканях, у пациентов, страдающих ассоциированным с ASM нарушением и/или проходящих лечение от ассоциированного с ASM нарушения, что делает его потенциальным маркером для скрининга, диагностики и/или контроля лечения ассоциированного с ASM нарушения. Эта двойственность существует в противоположность многим другим лизосомным нарушениям накопления, при которых измененные уровни ацилированного и деацилированного гликофинголипидов можно выявить в плазме. С учетом того, что измененные уровни SPM не поддаются выявлению в плазме пациентов, страдающих ассоциированным с ASM нарушением или проходящих лечение от ассоциированного с ASM нарушения, можно было бы ожидать, что лизосомный SPM будет подобным образом непригоден для скрининга, диагностики или контроля лечения. Однако, как раскрыто в данном документе, было обнаружено, что лизосомный SPM можно выявлять при измененных уровнях в биологических образцах из различных тканей, в том числе периферических тканей, таких как плазма крови.

Лизосомные сфинголипиды (лизосомные SL), которые включают лизосомный SPM, являются деацилированными формами сфинголипидов; некоторые, как было показано, повышаются при определенных лизосомных нарушениях накопления. Galbiati et al., "Combined hematopoietic and lentiviral gene-transfer therapies in newborn Twitcher mice reveal contemporaneous neurodegeneration and demyelination in Krabbe disease," *J. Neurosci. Res.* 87: 1748-1759 (2009). Механизм, с помощью которого образуются лизосомный SPM и другой лизосомный SL, полностью не исследован. Отсутствие сопутствующего повышения сфингозина указывает на то, что деацилирование соответствующего сфинголипида является вероятным путем образования. Однако единственная деацилаза сфингомиелина, выявленная к настоящему времени, происходит из рогового слоя субъекта с атопическим дерматитом. Murata et al., "Abnormal expression of sphingomyelin acylase in atopic dermatitis: an etiologic factor for ceramide deficiency?," *J. Invest. Dermatol.* 106: 1242-1249 (1996). Экспрессия данной деацилазы, по-видимому, ограничена выбранными типами клеток при определенных физиологических условиях. Было показано, что очищенная ASM из плаценты, головного мозга и мочи не гидролизует лизосомный SPM (Pentchev et al., "The isolation and characterization of sphingomyelinase from human placental tissue," *Biochim. Biophys. Acta.* 488: 312-321 (1977); Yamanaka and Suzuki, "Acid sphingomyelinase of human brain: purification to homogeneity," *J. Neurochem.* 38: 1753-1764 (1982); Quintern et al., "Acid sphingomyelinase from human urine: purification and characterization," *Biochim. Biophys. Acta.* 922: 323-336 (1987)). Отсутствие понимания относительно биосинтетического пути для лизосомного SPM дополнительно подчеркивает сложность прогнозирования уровня экспрессии априори у пациентов, страдающих ассоциированным с ASM нарушением.

Лизосомный SPM имеет короткий период полужизни в крови *in vitro* в связи со своим быстрым метаболизмом до сфингозин-1-фосфата посредством аутоксина, экзофермента с активностью лизофосфолипазы D. Tokumura et al., "Identification of human plasma lysophospholipase D, a lysophosphatidic acid-producing enzyme, as autotaxin, a multifunctional phosphodiesterase," *J. Biol. Chem.* 277: 39436-39442 (2002);

Clair et al., "Autotaxin hydrolyzes sphingosylphosphorylcholine to produce the regulator of migration, sphingosine-1-phosphate," *Cancer Res.* 63: 5446-5453 (2003). Кроме селезенки и печени пациентов с NPD-B и головного мозга субъектов с NPD-A, которые имеют активность проявления ASM от незначительной до отсутствующей и проявляют тяжелое нейропатическое заболевание, сообщения об уровне лизосомного SPM в других органах отсутствуют.

Как раскрывается в данном документе, лизосомный SPM можно выявить при измененных концентрациях в биологических образцах (например, образцах, полученных из периферических тканей) пациентов, страдающих от ассоциированных с ASM нарушений и/или проходящих лечение от ассоциированных с ASM нарушений. Измененный уровень может отражать временный эффект лечения (например, измененные уровни лизосомного SPM могут служить в качестве маркера образования метаболитов острой токсичности в ответ на ERT). Измененные уровни можно также использовать в диагностике (например, измененные уровни лизосомного SPM могут служить в качестве диагностического маркера или маркера скрининга для выявления симптоматического или предсимптоматического субъекта, страдающего от ассоциированного с ASM нарушения). Измененные уровни можно также использовать для контроля долгосрочной эффективности курса лечения ассоциированного с ASM нарушения (например, если уровни лизосомного SPM не снижаются в течение курса лечения, это может указывать на неэффективное лечение). Соответственно в данном документе раскрыты новые способы скрининга, диагностики, контроля хода лечения и/или коррекции дозы терапевтического средства для лечения ассоциированных с ASM нарушений, таких как NPD, с помощью новых биомаркеров, в том числе лизосомного SPM (сфингозил-фосфорилхолина или лизосомного сфингомиелина). Контроль курса лечения может включать выявление снижения уровня одного или нескольких маркеров токсичности (например, лизосомного SPM) в ходе курса лечения, свидетельствуя тем самым об эффективности схемы лечения или выявляя отсутствие изменения уровня маркера в динамике, свидетельствуя тем самым о неэффективности схемы лечения.

Способы, раскрытые в данном документе, также включают способы лечения пациента с ассоциированным с кислой сфингомиелиназой (ASM) нарушением.

В частности, предложен способ контроля лечения пациента, имеющего ассоциированное с кислой сфингомиелиназой (ASM) нарушение, включающий:

(а) введение пациенту в эффективном количестве терапевтического средства, которое представляет собой рекомбинантную кислую сфингомиелиназу человека (rhASM); и

(б) определение уровня лизосомного сфингомиелина (лизосомного SPM) в биологическом образце, полученном от пациента через три или более дней после стадии (а), перед введением последующей дозы, где снижение уровня лизосомного SPM по сравнению с референтным уровнем показывает эффективность терапевтического средства, где референтный уровень представляет собой исходный уровень лизосомного SPM субъекта перед лечением на стадии (а). В некоторых вариантах осуществления изобретения стадия (а) дополнительно включает повторное введение указанного терапевтического средства пациенту.

В различных аспектах изобретения биологический образец представляет собой цельную кровь, пятно высушенной крови, плазму или сыворотку крови.

В одном варианте осуществления изобретения ассоциированное с ASM нарушение представляет собой болезнь Ниманна-Пика типа В. В другом варианте осуществления изобретения ассоциированное с ASM нарушение представляет собой болезнь Ниманна-Пика типа А.

В некоторых вариантах осуществления изобретения стадии (а) и (б) повторяют несколько раз, при этом каждую последующую дозу терапевтического средства вводят через две недели после предыдущей дозы.

В одном из вариантов осуществления изобретения эффективное количество указанного терапевтического средства составляет от 0,03 до 3 мг/кг. В еще одном варианте осуществления изобретения первую дозу указанного терапевтического средства, которую получает пациент, вводят в количестве 0,1 мг/кг. В еще одном варианте осуществления изобретения предложенный способ включает введение пациенту поддерживающей дозы указанного терапевтического средства в количестве 1, 2 или 3 мг/кг. В одном из вариантов осуществления изобретения указанное терапевтическое средство вводят внутривенно.

Кроме того, предложен способ контроля лечения пациента, имеющего болезнь Ниманна-Пика типа А или типа В, где указанный способ включает

введение пациенту первой дозы рекомбинантной кислой сфингомиелиназы человека (rhASM) в количестве от 0,03 до 1,0 мг/кг и последующих доз в увеличивающейся концентрации до достижения 3 мг/кг;

введение поддерживающих доз указанному пациенту в количестве 1, 2 или 3 мг/кг и

измерение уровня лизосомного сфингомиелина (лизосомного SPM) в биологическом образце, отобранном у указанного пациента (а) в течение 24 ч, (б) в течение 48 ч или (с) 72 или более часов после введения дозы, но перед введением последующей дозы;

причем каждую дозу вводят через две недели после предыдущей дозы, и

где повышенный уровень лизосомного SPM на стадии (а) или (б), или пониженный уровень лизосомного SPM на стадии (с) по сравнению с референтным уровнем указывает на то, что терапия rhASM

является эффективной, а референтный уровень представляет собой исходный уровень лизосомного SPM пациента перед введением первой дозы rhASM.

В некоторых вариантах осуществления изобретения до начала лечения было определено, что у пациента повышен уровень лизосомного SPM по сравнению со здоровым контролем.

В одном из вариантов осуществления изобретения биологический образец представляет собой пятно высушенной крови.

В одном варианте осуществления изобретения пациентом является взрослый пациент. В другом варианте осуществления изобретения пациентом является педиатрический пациент.

Способы, раскрытые в данном документе, также можно использовать в некоторых вариантах осуществления для скрининга, диагностики, контроля хода лечения и/или коррекции лечения ассоциированного с ASM нарушения, такого как NPD. Например, способы включают коррекцию дозы терапевтического средства, которое вводят пациенту для лечения ассоциированного с ASM нарушения, с помощью измерения маркера токсичности (например, лизосомного SPM) для контроля уровней токсических метаболитов, образующихся в результате лечения. Способы, раскрытые в данном документе, можно использовать в некоторых вариантах осуществления для контроля долговременной эффективности курса лечения ассоциированного с ASM нарушения (например, если уровни лизосомного SPM не снижаются в течение курса лечения, это может свидетельствовать о неэффективности лечения). Способы также можно использовать в некоторых вариантах осуществления для скрининга субъектов (например, пациентов, которые являются предсимптоматическими) в отношении повышенного лизосомного SPM в качестве исходного признака ассоциированного с ASM нарушения. Субъектов, выявленных при скрининге как имеющих повышенный лизосомный SPM, затем можно подвергнуть дополнительному обследованию (например, исследование крови на ASM, генетическое тестирование и т.д.) для диагностики/подтверждения диагноза ассоциированного с ASM нарушения, тогда как субъекты, которые не проявляли повышенного лизосомного SPM, не получили бы дополнительного обследования. Такой способ скрининга может потенциально снизить затраты на тестирования.

Способы, раскрытые в данном документе, могут включать измерение лизосомного SPM в биологическом образце от человека-субъекта и введение терапевтического средства для лечения ассоциированного с ASM нарушения (например, ERT, терапия шаперонами и/или субстратредуцирующая терапия) при оптимизированных концентрациях, исходя из измеренных уровней лизосомного SPM. Согласно различным вариантам осуществления биологический образец представляет собой периферическую кровь. Согласно определенным вариантам осуществления биологический образец представляет собой образец плазмы крови, цельной крови (например, пятно высушенной крови), сыворотки крови и/или мочи. Использование образца периферической ткани для измерения уровней лизосомного SPM может исключить необходимость инвазивных процедур, таких как биопсия печени.

#### **Описание графических материалов**

На фиг. 1А представлен график, показывающий отношение концентрации SPM в пятне высушенной крови (DBS) от пациентов с NPD-A и NPD-B к среднему значению концентрации в DBS нормальных контрольных образцов. На фиг. 1В представлен график, показывающий отношение концентрации лизосомного SPM в DBS от пациентов с NPD-A и NPD-B к среднему значению концентрации в DBS нормальных контрольных образцов.

На фиг. 2 представлена гистограмма, показывающая кратность повышения концентраций лизосомного SPM (вертикальная ось) в DBS от нокаутированных по ASM мышей в указанные точки времени (через 1, 2, 4, 6, 24, 48 и 72 ч после введения дозы) по сравнению с концентрацией через 5 мин после введения однократной дозы rhASM по 0,3 или 20 мг/кг.

На фиг. 3 показана концентрация лизосомного SPM (нг/мл) в DBS, полученной от мышей дикого типа (C57BL/6) или нокаутированных по ASM (ASMKO) мышей, после введения однократной дозы (10 мг/кг) или режима дозирования для снижения целевого анализита (3 мг/кг) с последующей дозой rhASM 20 мг/кг. Образцы крови получали в следующие точки времени: 5 мин, 4, 6, 24 и 72 ч после введения дозы. Животных в группе дозирования 10 мг/кг подвергали эвтаназии после точки времени 24 ч.

На фиг. 4 представлена гистограмма, показывающая концентрацию лизосомного SPM (нг/мл) в DBS от пациента с болезнью Ниманна-Пика, отобранной до введения дозы и через 24, 48 и 72 ч после введения дозы rhASM в течение 26-недельного периода. Дозы (0,1, 0,3, 0,6, 1, 2 или 3 мг/кг) и дата введения (1 день, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 и 26 неделя) указаны на горизонтальной оси. В 26 недель образцы получали только до введения дозы и через 24 и 48 ч после введения дозы.

#### **Описание определенных иллюстративных вариантов осуществления**

Ниже будет выполнен подробный обзор определенных иллюстративных вариантов осуществления в соответствии с настоящим раскрытием, определенные примеры которых показаны в сопроводительных графических материалах. По мере возможности в графических материалах будут использоваться одинаковые ссылочные номера для обозначения одинаковых или подобных частей.

В данной заявке использование единственного числа включает множественное число, если специально не указано иное. В данной заявке использование "или" означает "и/или", если не указано иное. Кроме того, использование выражения "включающий", а также других форм, таких как "включает" и

"включенный," не является ограничивающим. Любой диапазон, описанный в данном документе, будет пониматься, как включающий конечные точки и все значения между конечными точками.

Названия разделов, используемые в данном документе, представлены лишь для организационных целей и не предполагают ограничивать описываемый объект изобретения. Все документы или части документов, цитируемые в данной заявке, включающие без ограничений патенты, заявки на патенты, статьи, книги и монографии, специально включены в данный документ посредством ссылки во всей их полноте для любой цели.

В данном документе раскрыты способы скрининга, диагностики, контроля хода лечения и/или коррекции дозы терапевтического средства для лечения ассоциированного с ASM нарушения, такого как NPD. "Ассоциированное с ASM нарушение" может охватывать любое нарушение, ассоциированное со сниженной экспрессией или нарушенной функцией кислой сфингомиелиназы. Ассоциированное с ASM нарушение может также охватывать любое другое нарушение, связанное с накоплением сфингомиелина в ткани.

Согласно некоторым вариантам осуществления способы могут включать введение субъекту первой дозы терапевтического средства с первой концентрацией для лечения ассоциированного с ASM нарушения; а затем введение субъекту второй дозы терапевтического средства со второй концентрацией, которая равна первой концентрации или больше нее, если определяли, что субъект имеет уровень лизосомного SPM, который меньше референтного (например, уровня в образце от контрольного субъекта, который не имеет ассоциированного с ASM нарушения, или исходного уровня, измеренного у пациента перед лечением) уровня или равен ему после введения первой дозы.

Согласно определенным аспектам способы включают отбор биологического образца у человека-субъекта и измерение лизосомного сфингомиелина (лизосомного SPM). Измеренный уровень лизосомного SPM можно использовать для скрининга, диагностики, контроля хода лечения и/или коррекции дозы терапевтического средства для лечения ассоциированного с ASM нарушения. Способы основаны на выявлении того, что лизосомный SPM значительно повышен в биологических образцах из периферических тканей пациентов с ассоциированными с ASM нарушениями, такими как NPD, что обеспечивает неинвазивную оценку таких пациентов, в том числе скрининг и диагностику ассоциированного с ASM нарушения и контроль/подбор точной дозы для терапии/ведение терапии ассоциированного с ASM нарушения. Способы также основаны на выявлении того, что при лечении расщепление накопленной ASM может приводить к повышенным уровням маркеров (например, лизосомного SPM), которые сигнализируют об образовании токсичных или вредных метаболитов, и что этих токсичных уровней метаболитов можно избежать при помощи способа введения терапевтического средства, разработанного для снижения уровня SPM (например, ERT, терапия шаперонами и/или субстратредуцирующая терапия), в дозах, которые предупреждают избыточное образование метаболитов. Измерение повышенной концентрации лизосомного SPM можно использовать для выявления образования таких метаболитов и можно использовать для подбора точной дозы для терапии с целью избежать образования чрезмерно повышенных уровней метаболитов (например, токсических уровней). Согласно определенным вариантам осуществления уровень лизосомного SPM у пациента, получающего лечение от ассоциированного с ASM нарушения, определяет, является ли доза повышенной, пониженной, необходимо ли ее повторить, отложить или отменить.

Выявление повышенных уровней лизосомного SPM у субъекта с ассоциированным с ASM нарушением (например, у пациентов с NPD) можно использовать в комплексе способа контроля нежелательного побочного эффекта при лечении. Например, способ может включать отбор у субъекта биологического образца, измерение уровня лизосомного сфингомиелина (лизосомного SPM) в образце, сравнение измеренного в образце уровня лизосомного SPM с референтным уровнем и обнаружение нежелательного побочного эффекта, если уровень лизосомного SPM в образце повышен. Согласно некоторым вариантам осуществления, если уровень лизосомного SPM повышен на предварительно определенное количество в сравнении с референтным образцом (например, референтным уровнем в образце от контрольного субъекта, который не имеет ассоциированного с ASM нарушения) или если уровень лизосомного SPM повышается у субъекта на предварительно определенное количество на протяжении времени в ходе лечения (т.е. повышение по отношению к исходному уровню, измеренному у пациента до лечения, также обозначенному в данном документе как референтный уровень), то измеренный уровень лизосомного SPM можно использовать в качестве показателя нежелательного побочного эффекта, возникающего в результате лечения. Согласно некоторым вариантам осуществления лечение представляет собой ферментозаместительную терапию (ERT), и дозировку ERT контролируют путем отбора у пациента одного или нескольких биологических образцов, тестирования каждого образца в отношении повышения лизосомного SPM и установления дозы ERT на уровне, который не приводит к повышению уровней лизосомного SPM выше предварительно определенного порогового значения. Контроль дозы терапевтического средства может включать повышение, снижение или поддержание концентрации терапевтического средства и/или прекращение лечения. Согласно определенным вариантам осуществления один или несколько биологических образцов отбирают после введения дозы терапевтического средства и/или непосредственно перед введением последующей дозы терапевтического средства. Согласно некоторым вариантам осуществления нежелательный побочный эффект можно обнаружить, если уровень лизосомного SPM в биологиче-

ском образце (например, образце крови, таком как плазма крови, сыворотка крови или пятно высушенной крови) превышает референтный уровень на приблизительно 100-700 нг/мл (например, выше на приблизительно 100, 200, 250, 300, 400, 500, 600 или 700 нг/мл, или любую концентрацию в данном диапазоне), или если уровень лизосомного SPM в биологическом образце повышен по меньшей мере в 1,1, 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 5,5, 6, 6,5, 7, 7,5, 8, 8,5, 9, 9,5 или 10 раз или более (или любое значение в данном диапазоне) по отношению к референтному уровню. Например, повышение может быть по меньшей мере приблизительно 3-кратным. Референтным уровнем может быть, например, уровень в образце от контрольного субъекта без ассоциированного с ASM нарушения или исходный уровень, измеренный у пациента перед лечением дозой терапевтического средства.

В данном документе также раскрыты способы лечения субъекта, имеющего ассоциированное с ASM нарушение (например, NPD). Согласно различным вариантам осуществления способ включает введение терапевтического средства для лечения ассоциированного с ASM нарушения (например, ERT, терапия шаперонами и/или субстратредуцирующая терапия) в последовательных дозах с возрастающей концентрацией и контроль субъекта в отношении повышенных уровней лизосомного SPM в биологическом образце после каждой дозы (например, через 1, 5, 10, 30 или 45 мин, или 1, 2, 3, 4, 5, 10, 12, 15 или 20 ч, или 1 день, 2 дня, 5 дней, 1 неделю, 2, 3 или 4 недели после введения дозы, или любого периода времени в данном диапазоне), или непосредственно перед следующей дозой. Контроль субъекта может включать отбор у субъекта биологического образца, измерение уровня лизосомного SPM в образце, сравнение уровня лизосомного SPM в образце с референтным уровнем (например, уровнем в образце от донора, который не имеет ассоциированного с ASM нарушения, или уровнем у пациента с ASM до лечения), и обнаружение в образце повышенного уровня лизосомного SPM по сравнению с референтным уровнем. Согласно некоторым вариантам осуществления референтный уровень представляет собой уровень лизосомного SPM, измеренный в биологическом образце от контрольного субъекта, который не имеет ассоциированного с ASM нарушения. Согласно некоторым вариантам осуществления референтный уровень представляет собой уровень лизосомного SPM, измеренный в образце от субъекта, полученном после применения начальной, более низкой дозы ERT или перед применением любой ERT. Согласно некоторым вариантам осуществления повышенным уровнем лизосомного SPM в биологическом образце (например, образце крови, таком как образец сыворотки крови, образец плазмы крови или пятно высушенной крови) является уровень, который превышает референтный уровень, например, на приблизительно 100-700 нг/мл. Согласно некоторым вариантам осуществления повышенным уровнем лизосомного SPM в биологическом образце (например, образце крови) является уровень, который превышает референтный уровень по меньшей мере в приблизительно 1,1, 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 5,5, 6, 6,5, 7, 7,5, 8, 8,5, 9, 9,5 или 10 раз или более (или любое значение в данном диапазоне). Например, уровень может превышать по меньшей мере в приблизительно 3 раза. Согласно некоторым вариантам осуществления дозу с более высокой концентрацией ERT не вводят, если повышенный уровень лизосомного SPM выявляют после введения предыдущей дозы.

Кроме контроля терапии и терапевтических способов, в данном документе раскрыты способы скрининга и/или диагностики ассоциированного с ASM нарушения у субъекта (например, NPD). Согласно некоторым вариантам осуществления способ включает отбор биологического образца у субъекта, измерение уровня лизосомного SPM в образце, сравнение уровня лизосомного SPM в образце с референтным уровнем и обнаружение/диагностику ассоциированного с ASM нарушения, если уровень лизосомного SPM в образце повышен по отношению к референтному образцу. Согласно некоторым вариантам осуществления референтным образцом является образец от контрольного субъекта, который не имеет ассоциированного с ASM нарушения. Согласно некоторым вариантам осуществления ассоциированное с ASM нарушение можно подвергнуть скринингу и/или диагностировать, если уровень лизосомного SPM в биологическом образце (например, в образце крови, таком как образец плазмы крови, образец сыворотки или пятно высушенной крови) выше, чем референтный уровень в приблизительно 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 5,5, 6, 6,5, 7, 7,5, 8, 8,5, 9, 9,5 или 10 раз или более (или любое значение в данном диапазоне), или выше, чем референтный уровень по меньшей мере на приблизительно 200-2000 нг/мл, например по меньшей мере на приблизительно 200 нг/мл, по меньшей мере на приблизительно 250 нг/мл, по меньшей мере на приблизительно 300 нг/мл, по меньшей мере на приблизительно 400 нг/мл, по меньшей мере на приблизительно 500 нг/мл, по меньшей мере на приблизительно 525 нг/мл, по меньшей мере на приблизительно 700 нг/мл и/или по меньшей мере на приблизительно 900 нг/мл (например, выше на приблизительно 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 525, 550, 575, 600, 625, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950, 1000, 1050, 1100, 1150, 1200, 1300, 1400, 1500, 1600, 1700, 1800, 1900 или 2000 нг/мл или любую концентрацию между ними). Согласно некоторым вариантам осуществления биологический образец от нормального субъекта может содержать уровень лизосомного SPM в диапазоне приблизительно 25-200 нг/мл (например, приблизительно 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175 или 200 нг/мл или в любой концентрации в данном диапазоне).

Измерение лизосомного SPM.

Описание химической структуры лизосомного SPM, см., например, Ito et al., *J. Biol. Chem.* 270: 24370-4 (1995); см. также Cayman Chemical Co., п/п 10007947, как предлагается в их каталоге на:

<https://www.caymanchem.com/app/template/Product.vm/catalog/10007947>.

Способы, раскрытые в данном документе, включают измерение лизосомного SPM в разных биологических образцах, в том числе образцах из периферических тканей. Можно использовать любые способы отбора, получения и количественного определения уровня лизосомного SPM в биологическом образце. Уровень лизосомного SPM в биологическом образце можно количественно определить с помощью спектрометра, такого как масс-спектрометр, например LC/MS/MS, или электромагнитный частотный спектрометр, например UV-VIS, IR или NMR. Согласно некоторым вариантам осуществления способ количественного определения уровня лизосомного SPM может включать отбор биологического образца (например, с помощью пункции артерии или вены, биопсии тканей, буккального мазка, отбора образца мочи и т.д.), выявление и/или отделение лизосомного SPM от других компонентов образца (например, с помощью антитела, химического индикатора, масс-спектрометра, такого как LC/MS/MS, или электромагнитного частотного спектрометра, такого UV-VIS, IR или NMR) и сравнение уровня лизосомного SPM с уровнем в референтном образце.

Уровни лизосомного SPM можно измерить в биологических образцах из различных тканей с помощью способов, описанных в данном документе. Например, с целью выявления повышенных уровней лизосомного SPM можно отбирать биологические образцы из периферических тканей, таких как плазма, цельная кровь (например, пятно высушенной крови), сыворотка крови, кожа и/или моча. Можно также использовать биологические образцы из других тканей, например ткани селезенки, легкого, сердца, печени, почки и/или головного мозга. Можно использовать образцы из комбинаций двух или более тканей (например, 2, 3, 4, 5 или более тканей). Согласно некоторым вариантам осуществления использование биологического образца из периферической ткани может исключить необходимость инвазивных процедур, таких как биопсия печени.

Согласно некоторым вариантам осуществления биологический образец подвергают одной или нескольким стадиям предварительной обработки перед выявлением и/или измерением в образце лизосомного SPM. Согласно определенным вариантам осуществления образец предварительно обрабатывают с помощью центрифугирования, фильтрации, осаждения, диализа или хроматографии или с помощью комбинации таких стадий предварительной обработки. Согласно другим вариантам осуществления образец предварительно обрабатывают путем замораживания, химической фиксации, заливки в парафин, дегидратирования, пермеабилзации и/или гомогенизации с последующим центрифугированием, фильтрацией, осаждением, диализом и/или хроматографией. Согласно определенным вариантам осуществления образец предварительно обрабатывают путем удаления клеток определенного типа из образца или удаления дебриса из образца перед определением лизосомного SPM.

Согласно различным вариантам осуществления биологический образец оценивают с использованием устройства для количественного или полуколичественного определения уровня одного или нескольких маркеров в образце. Например, уровень лизосомного SPM и/или других маркеров в образце можно определять количественно или полуколичественно. Согласно некоторым вариантам осуществления можно использовать устройство для количественного определения уровня лизосомного SPM и/или других маркеров в биологическом образце, такого как жидкостная тандемная хромато-масс-спектрометрия (например, LC/MS/MS). Согласно некоторым вариантам осуществления можно использовать одно или несколько антител или других средств детектирования для связывания лизосомного SPM и/или других маркеров в биологическом образце. Можно использовать одно или несколько средств (например, средство для колориметрии), которые вступают в реакцию со средством для детектирования, с целью испускания определяемого сигнала, силу, интенсивность, цвет и т.д. которого можно использовать для полуколичественного или количественного определения в образце уровня лизосомного SPM и/или других маркеров (например, путем сравнения сигнала от одного или нескольких референтных образцов). Можно использовать дополнительные способы количественного определения лизосомного SPM и/или других маркеров в биологическом образце, например иммунологические анализы, такие как ELISA, иммунопреципитация и вестерн-блоттинг, а также методики сортировки флуоресцентно-активированных клеток (FACS), резонансного переноса энергии флуоресценции (FRET), ПЦР с обратной транскрипцией и/или нозерн-блоттинга.

Ведение лечения ассоциированного с ASM нарушения.

Согласно различным вариантам осуществления уровни лизосомного SPM можно измерять в комплексе терапии ассоциированного с ASM нарушения. Например, ассоциированное с ASM нарушение, может представлять собой болезнь Ниманна-Пика (NPD), например NPD-A, NPD-B или NPD-C. Терапия ассоциированного с ASM нарушения может включать введение одного или нескольких терапевтических средств, которые снижают уровни SPM в тканях пациента (например, ERT, терапия шаперонами и/или субстратредуцирующая терапия). Например, можно применять способ интраиндивидуальной заместительной ферментотерапии (ERT) с эскалацией дозы, такой как способы с эскалацией дозы ASM, раскрытые в заявке США № 2011/0052559, которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте (см., например, абзацы [0063]-[0075], в которых описаны протоколы эскалации дозы).

Согласно различным вариантам осуществления раскрыт способ контроля субъекта в отношении нежелательного побочного эффекта (например, образования токсических или вредных уровней метабо-

литов) путем контроля маркера, такого как лизосомный SPM, во время терапии с эскалацией дозы ассоциированного с ASM нарушения. Способ может включать отбор биологического образца у субъекта, измерение в образце уровня лизосомного SPM, сравнение в образце уровня лизосомного SPM с референтным уровнем и выявление нежелательного побочного эффекта, если уровень лизосомного SPM в образце повышен по сравнению с референтным образцом. Можно отбирать и оценивать один или несколько образцов после введения дозы терапевтического средства или перед введением следующей дозы. Например, образцы можно отбирать и оценивать через 1, 5, 10, 30 или 45 мин, или через 1, 2, 3, 5, 10, 12, 15 или 20 ч, или через 1, 2, 3, 4, 5 дней, или через 1, 2, 3 или 4 недели после введения терапевтической дозы, или любого периода времени в данных диапазонах, или перед введением следующей дозы. Согласно некоторым вариантам осуществления референтным образцом является образец от контрольного субъекта, который не имеет ассоциированного с ASM нарушения. Согласно некоторым вариантам осуществления референтный образец представляет собой более ранний полученный биологический образец от субъекта перед введением дозы с более высокой концентрацией терапевтического средства (или перед введением любого терапевтического средства). Согласно некоторым вариантам осуществления, если уровень лизосомного SPM повышается на предварительно определенное количество или выше предварительно определенного порогового значения после введения начальной дозы или после введения повышенной (т.е. в более высокой концентрации) дозы терапевтического средства (например, с более высокой концентрацией ERT) по сравнению с уровнем в референтном образце, то это можно использовать в качестве признака нежелательного побочного эффекта, возникающего в результате лечения. Согласно определенным вариантам осуществления, если уровень лизосомного SPM не повышен или не повышается выше порогового уровня, то это можно использовать в качестве признака, указывающего на отсутствие возникновения нежелательного побочного эффекта.

Согласно различным вариантам осуществления предложена терапия ассоциированного с ASM нарушения. Данная терапия может включать введение одного или нескольких терапевтических средств, которые снижают уровень SPM в тканях пациента (например, ERT, терапия шаперонами и/или субстрат-редуцирующая терапия). Согласно определенным вариантам осуществления терапия может включать ERT (например, заместительную терапию ASM). Терапия может включать контроль субъекта в отношении повышенных уровней лизосомного SPM во время терапии и коррекцию концентрации терапевтического средства (например, концентрации дозы ERT) для снижения уровней лизосомного SPM ниже предварительно определенного порогового уровня. Согласно некоторым вариантам осуществления контроль включает исследование образца в отношении повышенных уровней лизосомного SPM после каждой дозы терапевтического средства или перед введением каждой последующей дозы терапевтического средства. Согласно определенным вариантам осуществления контроль после каждой дозы является необязательным и проводится периодически после определенных доз терапевтического средства или перед введением определенной последующей дозы терапевтического средства.

Согласно некоторым вариантам осуществления терапия может включать применение ERT (например, заместительной терапии ASM) в последовательных дозах в возрастающей концентрации, (отбор у пациента биологических образцов после определенных доз (например, после каждой дозы или перед каждой последующей дозой), выявление лизосомного SPM в образце (например, с помощью LC/MS/MS) и контроль субъекта в отношении повышенных уровней лизосомных SPM после каждой дозы или перед введением следующей дозы. Например, биологические образцы можно отбирать и подвергать контролю в отношении повышенного SPM через 1, 5, 10, 30 или 45 мин, или через 1, 2, 3, 5, 10, 12, 15 или 20 ч, или через 1, 2, 3, 4, 5 дней, или через 1, 2, 3 или 4 недели после введения дозы ERT, или в любой период времени в данных диапазонах, или перед введением следующей дозы. Контроль субъекта может включать отбор у субъекта биологического образца, измерение в образце уровня лизосомного SPM, сравнение в образце уровня лизосомного SPM с референтным уровнем и коррекцию дозы ERT, если уровень лизосомного SPM в образце повышен на предварительно определенное количество по сравнению с референтным образцом. Согласно некоторым вариантам осуществления референтным образцом является образец от контрольного субъекта, который не имеет ассоциированного с ASM нарушения. Согласно некоторым вариантам осуществления референтный образец представляет собой ранее полученный биологический образец от субъекта перед введением дозы с более высокой концентрацией ERT (или перед введением любой концентрации ERT). Согласно некоторым вариантам осуществления, если уровень лизосомного SPM повышается на предварительно определенное количество в образце субъекта и/или превышает референтное пороговое значение, то это можно использовать в качестве указания того, что дозу ERT следует снизить, отложить ее введение или отменить во избежание образования токсических или вредных уровней метаболита. Согласно некоторым вариантам осуществления, если уровень лизосомного SPM находится на уровне или ниже порогового значения, то можно вводить последующую дозу равной или более высокой концентрации.

Согласно некоторым вариантам осуществления предложена терапия с эскалацией дозы, включающая введение субъекту ERT в увеличивающихся дозах в течение времени для снижения объема накопленного SPM без образования токсических или вредных уровней метаболитов, образующихся в результате быстрого гидролиза накопленного SPM. Согласно некоторым вариантам осуществления биологиче-

ские образцы от пациента контролируют в отношении повышенных уровней лизосомного SPM в ходе терапии с эскалацией дозы, поскольку повышенный лизосомный SPM будет указывать на образование токсических или вредных уровней метаболита. Согласно некоторым вариантам осуществления, если выявляют уровни лизосомного SPM выше пороговой концентрации или выявляют значительное увеличение уровней лизосомного SPM по сравнению с уровнями в предыдущем образце, то введение повышенной дозы ERT откладывают или ее не вводят. ERT можно вводить при помощи любого способа, подходящего для достижения терапевтического эффекта, в том числе внутривенно, внутрикочно, подкожно, интраперитонеально, внутрилегочно, местно, интраназально, интракраниально или внутримышечно.

Согласно некоторым вариантам осуществления ERT может включать введение кислой сфингомилиназы (ASM), такой как рекомбинантная ASM (rhASM) человека, или ERT может включать введение модифицированной ASM (например, модифицированной rhASM). Модифицированная ASM может содержать любую модификацию фермента, которая незначительно изменяет его способность гидролизовать лизосомный сфингомиелин до церамида и фосфорилхолина (например, модифицированная ASM проявляет по меньшей мере 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 95, 99, 99,5 или 99,9% активности фермента немодифицированной ASM или любой процент между ними в данном диапазоне). Гидролитическую способность модифицированной ASM можно определять с помощью методик, известных специалисту в данной области, таких как описанные в патентах США №№ 4039388, 4082781, 5686240 и 7563591, и международных публикаций №№ WO 2007/078806 и WO 2006/058385, которые включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

Согласно некоторым вариантам осуществления ERT может включать введение рекомбинантной ASM человека (rhASM) или модифицированной rhASM. Существуют различные изоформы ASM человека, известные в данной области, все из которых можно использовать в способах, раскрытых в данном документе (см., например, заявку на патент США № 2011/0052559, которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте (см., например, описание изоформ ASM человека и конъюгатов их ферментов и их использование в ERT в абзацах [108]-[0117] и [0124]-[0127])).

Согласно некоторым вариантам осуществления заместительную ферментотерапию применяют у субъекта при первичной низкой нетоксичной дозе, которую затем повышают при последующих введениях. Наивысшую дозу фермента, которую субъект может переносить без образования токсических или вредных уровней метаболита (как выявляют, например, с помощью контроля уровней маркера токсичности, такого как лизосомный SPM), можно затем применять в качестве поддерживающей дозы. В качестве альтернативы терапевтически эффективную дозу, которая меньше наивысшей переносимой дозы, можно применять в качестве поддерживающей дозы. Терапевтически эффективная доза предусматривать любую дозу, которая является достаточной для снижения у субъекта с ASM концентрации накопленного сфингомиелина по меньшей мере приблизительно на 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 или 99% (или любой процент в данном диапазоне) после одного или нескольких курсов введения.

Лечение ассоциированных с ASM нарушений, таких как NPD, требует достаточно высоких доз терапевтического средства (например, ERT, терапия шаперонами и/или субстратредуцирующая терапия) для достижения соответствующего распределения терапевтического средства в пораженных органах (например, селезенке, легких, печени, сердце, почке и головном мозге). Было показано, что после внутривенного введения рекомбинантной ASM человека у нокаутированных по ASM мышей большая часть активной ASM распределяется в печени, при этом небольшие уровни ферментативной активности ASM выявляли в других органах, таких как селезенка, сердце, печень, почка и легкое (см., например, He et al., *Biochimica et Biophysica Acta* 1432: 251-264 (1999)). Таким образом, для обеспечения соответствующего распределения и доставки, например, в легкие, печень, сердце и почки у субъектов с нарушением, обусловленным ASM, таким как NPD, могут потребоваться дозы с повышенной концентрацией терапевтического средства (например, высокие концентрации заместительного фермента).

Исследования у нокаутированных по ASM мышей также показали, что заместительная ферментотерапия может при достаточно высоких дозах приводить к образованию токсических или в ином отношении вредных метаболитов сфингомиелина (см., например, C. Nickerson, et al., *American Society of Human Genetics* (2005); и J. Murray et al., *Society of Toxicology* (2006)). Не вдаваясь в теорию, введение субъектам с NPD высоких доз ASM может приводить к гидролизу больших количеств накопленного сфингомиелина в церамид и фосфорилхолин. Церамид, как известно, играет роль в гибели клеток и может быть проапоптотическим средством (см., например, Smith and Schuchman, *FASEB* 22: 3419-3431 (2008)). Таким образом, церамид может способствовать возникновению токсических побочных эффектов, наблюдаемых у нокаутированных по ASM мышей и у субъектов с NPD.

Таким образом, подбор точной дозы для терапии и согласования видов терапии (например, ERT, терапия шаперонами и/или субстратредуцирующая терапия) необходим для обеспечения достаточной концентрации терапевтического средства, чтобы уменьшить или предупредить дополнительное накопление лизосомного сфингомиелина в пораженных органах, предотвращая в то же время образование избыточных концентраций токсических метаболитов. Согласно некоторым вариантам осуществления данная согласованность обеспечивается посредством контроля протокола эскалации дозы с помощью определе-

ния в образце от пациента уровней маркера токсичности, такого как лизосомный SPM, после определенных доз или после каждой дозы и при необходимости коррекции режима дозирования, как описано в данном документе. Контроль дозы терапевтического средства может включать повышение, снижение или поддержание концентрации терапевтического средства и/или прекращение лечения.

Согласно различным вариантам осуществления способ лечения с эскалацией дозы включает введение субъекту одной или нескольких начальных низких доз терапевтического средства (например, заместительного фермента) для снижения количества сфингомиелина, который накопился у субъекта. Дозу терапевтического средства затем можно вводить в систематически более высоких концентрациях до тех пор, пока не будет достигнута наивысшая доза, которая переносится субъектом, и является терапевтически эффективной. Согласно некоторым вариантам осуществления терапевтическое средство представляет собой заместительный фермент (например, rhASM) и его вводят таким образом, что ферментативная активность в одном или нескольких пораженных органах (например, органе, который проявляет повышенные лизосомные уровни SPM у пациента, страдающего ассоциированным с ASM нарушением) составляет по меньшей мере 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 75, 80, 85, 90, 95% (или любой процент в данном диапазоне) от уровня активности в соответствующем органе у субъекта, который не страдает ассоциированным с ASM нарушением (например, здорового субъекта).

Согласно некоторым вариантам осуществления способ лечения ассоциированного с ASM нарушения может включать (a) применение ферментозаместительной схемы для снижения накопленного субстрата сфингомиелина у субъекта, включающее (i) введение субъекту начальной низкой дозы rhASM или модифицированной rhASM и (ii) введение субъекту последовательно более высоких доз rhASM или модифицированной rhASM (эскалация дозы); (b) контроль субъекта в отношении повышенных уровней лизосомного SPM и/или в отношении одного или нескольких дополнительных маркеров нежелательного побочного эффекта после определенных доз или после каждой дозы, которую вводят на стадиях (a)(i) и (a)(ii) (например, с помощью LC/MS/MS для количественного определения концентрации лизосомного SPM); (c) повторение, снижение и/или отмену протокола с эскалацией дозы после выявления повышенных уровней лизосомного SPM и/или после выявления одного или нескольких дополнительных нежелательных побочных эффектов. Согласно определенным вариантам осуществления способ дополнительно включает применение поддерживающей схемы, включающей введение дозы в качестве поддерживающей дозы, которая равна наивысшей переносимой субъектом дозе или меньше нее, и необязательно дополнительный контроль в отношении повышения уровней лизосомного SPM в ходе применения поддерживающей схемы. Согласно определенным вариантам осуществления начальная доза rhASM или модифицированного rhASM может варьировать от приблизительно 0,03 до приблизительно 1,0 мг/кг или от приблизительно 0,1 до приблизительно 0,5 мг/кг (концентрацию дозы измеряют в мг фермента на кг веса тела). Согласно некоторым вариантам осуществления каждую последующую дозу с повышенной концентрацией фермента вводят через приблизительно 1, 2, 3, 4, 5, 6 или 7 дней или 1, 2, 3, 4 или 5 недель после предыдущей дозы. Согласно некоторым вариантам осуществления последующая доза с повышенной концентрацией фермента может составлять от приблизительно 0,1 до 5 мг/кг (например, приблизительно 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5 или 5 мг/кг или любая концентрация в данном диапазоне).

Согласно некоторым вариантам осуществления дозу заместительного фермента при заданной концентрации вводят по меньшей мере дважды (например, по меньшей мере 2, 3, 4, или 5 раз) перед введением следующей дозы с более высокой концентрацией. Согласно определенным вариантам осуществления последовательно более высокая доза может быть на приблизительно 0,03, 0,05, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 1,2, 1,5, 1,75, 2, 3, 4 или 5 мг/кг выше, чем предыдущая доза (или любое значение в данном диапазоне). Согласно некоторым вариантам осуществления последовательно более высокая доза может быть на от приблизительно 0,03 до приблизительно 0,1 мг/кг, от приблизительно 0,1 до приблизительно 0,5 мг/кг, от приблизительно 0,5 до приблизительно 1 мг/кг, от приблизительно 0,5 до приблизительно 2 мг/кг, от приблизительно 1 до приблизительно 2 мг/кг, от приблизительно 2 до приблизительно 4 мг/кг или от приблизительно 2 до приблизительно 5 мг/кг выше, чем предыдущая доза (или любое значение в данном диапазоне). Согласно определенным вариантам осуществления наивысшая доза, переносимая субъектом без образования токсических или вредных метаболитов, может составлять от приблизительно 1,0 до приблизительно 3,0 мг/кг. Согласно некоторым вариантам осуществления наивысшую переносимую дозу последовательно вводят человеку-субъекту в качестве поддерживающей дозы. Согласно некоторым вариантам осуществления поддерживающую дозу вводят приблизительно каждые 1-8 недель (например, каждые 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 недель или любой период времени в данном диапазоне).

Сразу после выявления максимальной переносимой дозы (например, дозы, которая не приводит к образованию токсических или в ином отношении вредных уровней метаболитов) ее можно использовать в качестве поддерживающей дозы для лечения субъекта в дальнейшем. Поддерживающую дозу можно вводить ежедневно, еженедельно, дважды в неделю, ежемесячно, дважды в месяц или ежеквартально (или с любым интервалом времени между ними). Контроль в отношении повышения уровней лизосомного SPM можно проводить при введении согласно поддерживающей схемы лечения, например через 1, 2, 3, 5, 10, 12, 15 или 20 ч, или 1, 2, 3, 4, 5 дней, или 1, 2, 3 или 4 недели после введения поддерживающей

дозы, или любого периода времени между ними. Если выявляют повышенные уровни лизосомного SPM (например, уровни, выше референтного уровня на приблизительно 100-700 нг/мл или уровни по меньшей мере в приблизительно 1,1-10 раз выше референтного уровня), то поддерживающую дозу снижают или отменяют.

Определенные другие параметры можно измерять в комбинации с лизосомным SPM для контроля субъекта в ходе терапии (например, в ходе ERT) и/или в комплексе терапии для определения максимальной дозы, которую может переносить субъект. Например, субъекта можно дополнительно подвергать контролю путем измерения уровней SPM, уровней церамида плазмы крови и/или концентраций билирубина. Субъекта также можно подвергать контролю в отношении образования "реактантов острой фазы" и медиаторов воспаления, которые представляют собой показатель воспалительной реакции, и/или в отношении других биохимических маркеров. Эти другие биохимические маркеры могут включать без ограничений CRP/hs-CRP, цитокины (например, IL-8, IL-6), кальцитонин и ферритин. Согласно некоторым вариантам осуществления по одному или нескольким параметрам, перечисленным выше, можно проводить контроль, чтобы убедиться в стабильном ответе на терапию перед повышением дозы до более высокой концентрации. Согласно некоторым вариантам осуществления субъекта также можно контролировать в отношении одного или нескольких соответствующих нежелательных явлений, которые могут включать системные симптомы (например, лихорадку, тошноту, рвоту, боль, миалгию и желтуху). Комбинации маркеров также можно контролировать (например, можно контролировать уровни лизосомного SPM в комбинации с уровнями билирубина и/или церамида). Подходящие пороговые уровни маркеров, которые можно контролировать в комбинации с лизосомным SPM, раскрыты, например, в заявке США № 2011/0052559, которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте (см., например, абзацы [0067]-[0086]).

Согласно некоторым вариантам осуществления субъекта, подвергнутого лечению согласно протоколу с эскалацией дозы (например, протоколу с эскалацией дозы ERT), контролируют в отношении токсических или вредных побочных эффектов (например, с помощью контроля уровней одного или нескольких маркеров токсичности, таких как лизосомный SPM) после каждого курса введения терапевтического средства (например, через приблизительно 1, 5, 10, 30 или 45 мин, или 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 12, 18, или 24 ч, или 2, 3, 4, 5, 6 или 7 дней, или 1, 2, 3 или 4 недели или более после введения, или любого периода времени между ними) или перед введением более высокой концентрации терапевтического средства. Согласно некоторым вариантам осуществления субъекта контролируют после каждого введения поддерживающей дозы (например, через приблизительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 12, 18 или 24 ч, или 2, 3, 4, 5, 6 или 7 дней, или 1, 2, 3 или 4 недели или более после введения, или любого периода времени между ними), или перед введением последующей поддерживающей дозы терапевтического средства. Согласно некоторым вариантам осуществления субъект получает поддерживающую дозу в течение одного, двух, трех или более лет, и его периодически контролируют в отношении токсических или вредных побочных эффектов. Контроль может включать контроль маркеров токсичности, упомянутых выше, а также контроль соответствующих нежелательных явлений. Если субъект испытывает нежелательное явление или если один или несколько из контролируемых маркеров свидетельствует о вредном побочном эффекте (например, если выявлен повышенный уровень лизосомного SPM), то введение поддерживающей дозы можно завершать или корректировать (например, можно вводить пониженную концентрацию ERT) для снижения или сведения к минимуму нежелательного побочного эффекта.

Согласно различным вариантам осуществления субъекта можно контролировать в отношении токсической и/или в ином отношении вредной дозы ERT с помощью измерения уровней лизосомного SPM в биологическом образце, полученном после введения дозы ERT (например, после введения rhASM или модифицированного rhASM). Согласно некоторым вариантам осуществления способ может включать отбор биологического образца у субъекта, измерение в образце уровня лизосомного SPM, сравнение в образце уровня лизосомного SPM с референтным уровнем и выявление нежелательного побочного эффекта, если уровень лизосомного SPM в образце повышен по сравнению с референтным образцом или повышен на определенное количество по сравнению с референтным образцом. Согласно некоторым вариантам осуществления следующую дозу ERT в более высокой концентрации вводят, если только уровень лизосомного SPM в биологическом образце не выше определенного порогового значения после введения предыдущей дозы. В данном документе описаны примеры подходящих пороговых уровней. Согласно некоторым вариантам осуществления уровни лизосомного SPM также контролируют при введении поддерживающей дозы. Согласно некоторым вариантам осуществления, если уровень лизосомного SPM превышает определенное пороговое значение при введении поддерживающей дозы, то введение поддерживающей дозы прекращают или вводят более низкую дозу, которая не приводит к уровню лизосомного SPM выше определенного порогового значения.

Согласно некоторым вариантам осуществления можно выявить нежелательный побочный эффект ERT, если уровень лизосомного SPM в биологическом образце выше предварительно определенного референтного уровня. Согласно некоторым вариантам осуществления можно выявить нежелательный побочный эффект, если уровень лизосомного SPM в биологическом образце (например, образце крови) выше референтного уровня на приблизительно 100-700 нг/мл (например, выше чем на приблизительно

100, 200, 250, 300, 400, 500, 600 или 700 нг/мл или любую концентрацию в данном диапазоне). Согласно некоторым вариантам осуществления можно выявить нежелательный побочный эффект, если уровень лизосомного SPM в биологическом образце (например, образце крови) выше референтного уровня по меньшей мере в приблизительно 1,1, 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 5,5, 6, 6,5, 7, 7,5, 8, 8,5, 9, 9,5 или 10 раз или более (или любое значение в данном диапазоне). Например, повышение может быть по меньшей мере приблизительно 3-кратным.

Согласно некоторым вариантам осуществления способы лечения ассоциированного с ASM нарушения, предложенные в данном документе, уменьшают объем селезенки, что определено с помощью методик, известных в данной области, например MRI. Согласно определенным вариантам осуществления способы уменьшают уровни сфингомиелина в печени, что определено с помощью методик, известных в данной области, например биохимического анализа и/или гистоморфометрического анализа образцов печени. Согласно некоторым вариантам осуществления способы повышают способность переносить физическую нагрузку, что определено с помощью методик, известных в данной области, например максимальной рабочей нагрузки с использованием велоэргометрии, в том числе процента расчетной максимальной нагрузки, пикового потребления кислорода и/или выработки диоксида углерода. Согласно некоторым вариантам осуществления способы повышают функцию легких и/или улучшают легочный клиренс, что определено с помощью методик, известных в данной области, например DLco, FVC, FEV и/или TLC. Согласно определенным вариантам осуществления способы снижают сфингомиелин в бронхоальвеолярном лаваже (BAL). Согласно определенным вариантам осуществления способы улучшают внешний вид легких, как определено с помощью методик, известных в данной области, например СТ-исследования высокой разрешающей способности и/или рентгенографии грудной клетки.

Согласно различным вариантам осуществления способы лечения нарушений, обусловленных ASM, которые предложены в данном документе, снижают концентрацию сфингомиелина в печени, коже и/или плазме крови и/или снижают сывороточную хитотриозидазу, уровни CCL18, лизосомный SPM, церамид и/или билирубин печени. Согласно некоторым вариантам осуществления способы улучшают липидограмму у субъекта (например, снижение холестерина). Согласно некоторым вариантам осуществления способы улучшают у субъекта одну или несколько неврологических функций (например, психомоторную функцию, социальную восприимчивость и т.д.). Согласно некоторым вариантам осуществления способы снижают или облегчают тяжесть и/или продолжительность ассоциированного с ASM нарушения и/или одного или нескольких симптомов, ассоциированных с данным нарушением. Согласно некоторым вариантам осуществления способы предупреждают рецидив симптома, обусловленного ассоциированным с ASM нарушением. В некоторых вариантах осуществления способы повышают уровень выживаемости субъектов после лечения.

Скрининг и/или диагностика ассоциированного с ASM нарушения.

Согласно различным вариантам осуществления, раскрытым в данном документе, предложены способы скрининга и/или диагностики ассоциированного с ASM нарушения. Согласно некоторым вариантам осуществления ассоциированное с ASM нарушение представляет собой болезнь Ниманна-Пика (NPD). Согласно некоторым вариантам осуществления нарушение представляет собой NPD типа А, типа В и/или типа С. Согласно некоторым вариантам осуществления ассоциированное с ASM нарушение (например, NPD) можно подвергать скринингу и/или диагностировать путем измерения уровней лизосомного SPM в биологическом образце, полученном от субъекта.

Согласно некоторым вариантам осуществления способ скрининга или диагностики ассоциированного с ASM нарушения может включать отбор у субъекта биологического образца, измерение уровня лизосомного SPM в образце, сравнение уровня лизосомного SPM в образце с референтным уровнем и выявление/диагностику ассоциированного с ASM нарушения, если уровень лизосомного SPM в образце повышен по сравнению с референтным уровнем. Согласно некоторым вариантам осуществления референтный уровень представляет собой уровень лизосомного SPM, измеренный в образце от контрольного субъекта, который не имеет ассоциированного с ASM нарушения. Согласно некоторым вариантам осуществления ассоциированное с ASM нарушение можно выявить/диагностировать, если уровень лизосомного SPM в биологическом образце от субъекта выше, чем предварительно определенный референтный уровень. Согласно некоторым вариантам осуществления ассоциированное с ASM нарушение можно выявить/диагностировать, если уровень лизосомного SPM в биологическом образце (например, образце крови) выше референтного уровня по меньшей мере на приблизительно 200-2000 нг/мл, например выше приблизительно 200 нг/мл, выше приблизительно 300 нг/мл, выше приблизительно 400 нг/мл, выше приблизительно 500 нг/мл, выше приблизительно 525 нг/мл, выше приблизительно 575 нг/мл и/или выше приблизительно 700 нг/мл (например, выше приблизительно 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 525, 550, 575, 600, 625, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950, 1000, 1050, 1100, 1150, 1200, 1300, 1400, 1500, 1600, 1700, 1800, 1900 или 2000 нг/мл или любой концентрации в данном диапазоне). Согласно некоторым вариантам осуществления ассоциированное с ASM нарушение можно выявить/диагностировать, если уровень лизосомного SPM в биологическом образце (например, образце крови) выше референтного уровня в приблизительно 1-10 раз.

Биологические образцы из различных тканей можно использовать в способах скрининга и диагно-

стики, описанных в данном документе. Например, с целью контроля повышенных уровней лизосомного SPM можно отбирать биологические образцы из периферических тканей, таких как плазма крови, цельная кровь (например, пятно высушенной крови), сыворотка крови, кожа и/или моча. Можно также использовать биологические образцы из других тканей, например ткани селезенки, легкого, печени, сердца, почки и/или головного мозга. Можно использовать образцы из комбинаций двух или более тканей (например, 2, 3, 4, 5 или более тканей). Согласно некоторым вариантам осуществления ассоциированное с ASM нарушение (например, NPD) можно выявить/диагностировать путем измерения уровней лизосомного SPM в биологическом образце, отобранном из периферической ткани. Согласно определенным вариантам осуществления периферическую тканью может являться плазма крови, цельная кровь (например, сухая капля крови), сыворотка крови и/или моча. Использование периферического образца может исключить необходимость инвазивных процедур, таких как биопсия печени.

Согласно различным вариантам осуществления способы скрининга и/или диагностики, раскрытые в данном документе, дополнительно включают введение субъекту терапевтического средства (например, согласно ферментозаместительной терапии), если выявлено/диагностировано ассоциированное с ASM нарушение. Согласно некоторым вариантам осуществления ферментозаместительная терапия включает введение субъекту rhASM или модифицированной rhASM.

Набор.

Согласно различным вариантам осуществления в данном документе раскрыт набор, содержащий устройство для отбора биологического образца, содержащего лизосомный SPM и/или другие маркеры ассоциированного с ASM нарушения, и инструкции по применению устройства для измерения в биологическом образце уровня лизосомного SPM и/или других маркеров. Согласно некоторым вариантам осуществления устройство для отбора биологического образца может содержать тестовую пробирку, шприц и/или другую емкость для хранения жидкого образца и/или тест-полоску, индикаторную полоску и т.д. Также можно применять любое другое устройство, известное в данной области, для отбора биологического образца. Согласно некоторым вариантам осуществления биологический образец представляет собой образец из периферической ткани, такой как плазма крови, цельная кровь (например, пятно высушенной крови, сыворотка крови, кожа и/или моча. Также можно отбирать биологические образцы из других тканей, например из ткани селезенки, легкого, сердца, печени, почки и/или головного мозга, при этом набор содержит устройство для отбора образца из перечисленных тканей. Можно использовать образцы из комбинации двух или более тканей.

Согласно некоторым вариантам осуществления набор может дополнительно содержать устройство для измерения лизосомного SPM и/или других маркеров в биологическом образце уровня. Например, набор может включать антитело и/или другие средства для детектирования, которые можно применять для выявления в биологическом образце лизосомного SPM или других маркеров. Согласно некоторым вариантам осуществления средство для выявления включено в состав устройства для отбора тканей или нанесено на его поверхность (например, антитело или химический индикатор, которыми пропитана тест-полоска), тогда как согласно другим вариантам осуществления средство для детектирования представлено отдельно от устройства для отбора.

Согласно некоторым вариантам осуществления набор может дополнительно содержать устройство для количественного или полуколичественного определения в образце уровня лизосомного SPM и/или других маркеров. Например, может быть предложено средство (например, средство для колориметрии), которое вступает в реакцию со средством для детектирования, с целью испускания определяемого сигнала, силу, интенсивность, цвет и т.д. которого можно использовать для полуколичественного или количественного определения в образце уровня лизосомного SPM и/или других маркеров (например, путем сравнения сигнала от одного или нескольких референтных образцов). Согласно некоторым вариантам осуществления устройство может содержать устройство для отделения лизосомного SPM от других компонентов образца, например, с помощью жидкостной хроматографии и/или масс-спектрометрии. Согласно некоторым вариантам осуществления устройство для количественного определения в образце лизосомного SPM и/или других маркеров представляет собой спектрометр, такой как масс-спектрометр, например LC/MS/MS, или электромагнитный частотный спектрометр, например UV-VIS, IR или NMR.

Согласно некоторым вариантам осуществления набор может дополнительно содержать инструкции по сравнению в образце уровня лизосомного SPM и/или других маркеров с референтным уровнем и для выявления наличия токсических уровней одного или нескольких метаболитов и/или нежелательного побочного эффекта во время лечения ассоциированного с ASM нарушения, если уровни лизосомного SPM и/или маркеров токсичности в образце повышены по сравнению с одним или несколькими референтными образцами. Согласно некоторым вариантам осуществления набор может дополнительно содержать инструкции для сравнения уровня лизосомного SPM в образце с уровнем в референтном образце и для скрининга и/или диагностики ассоциированного с ASM нарушения, если уровень лизосомного SPM в образце повышен по сравнению с уровнем в референтном образце.

Согласно некоторым вариантам осуществления набор можно применять в комплексе терапии и/или диагностики ассоциированного с ASM нарушения. Согласно некоторым вариантам осуществления ассоциированное с ASM нарушение представляет собой NPD-A, NPD-B или NPD-C.

### Группы субъектов.

Согласно различным вариантам осуществления субъектом, как используется в данном документе, является человек, которого подвергают скринингу в отношении ассоциированного с ASM нарушения. Согласно различным вариантам осуществления субъектом, как используется в данном документе, является субъект, у которого диагностировано ассоциированное с ASM нарушение или который проходит лечение от ассоциированного с ASM нарушения в соответствии со способами, предложенными в данном документе, человек, который имеет или у которого диагностировано нарушение, приводящее к избыточному накоплению лизосомного SPM в одном или нескольких пораженных органах. Согласно некоторым вариантам осуществления субъект имеет одну или несколько мутаций в гене, кодирующем кислую сфингомиелиназу, например делецию, сдвиг рамки, миссенс-мутацию и/или нонсенс-мутацию. Согласно конкретным вариантам осуществления субъект имеет NPD. Согласно одному варианту осуществления субъект имеет NPD-A, NPD-B или NPD-C.

Согласно некоторым вариантам осуществления субъект имеет одну или несколько мутаций в гене SMPD1. Согласно определенным вариантам осуществления мутация представляет собой ΔR608 (делеция аргинина 608). Согласно некоторым вариантам осуществления мутация представляет собой миссенс-мутацию. Согласно определенным вариантам осуществления миссенс-мутация представляет собой L302P, H421Y или R496L. Согласно другим вариантам осуществления мутация представляет собой делецию, которая приводит к делеции одного, двух, трех или более аминокислотных остатков. Согласно конкретным вариантам осуществления субъект, проходящий лечение от ассоциированного с ASM нарушения, в соответствии со способами, представленными в данном документе, имеет одну или несколько мутаций, показанных в табл. 1 в заявке на патент США № 2011/0052559, которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте (см. также Simonaro et al., *Am. J. Hum. Genet.* 71: 1413-1419 (2002) в отношении мутаций в гене кислой сфингомиелиназы (обозначен как SMPD1).

Согласно определенным вариантам осуществления субъект, которого подвергают скринингу в отношении ассоциированного с ASM нарушения, или у которого диагностировано ассоциированное с ASM нарушение, или который проходит лечение от ассоциированного с ASM нарушения в соответствии со способами, представленными в данном документе, может эндогенно экспрессировать ASM, но с приблизительно 2-5%, 5-10%, 5-15%, 5-20%, 5-30%, 20-30% или 5-35% активности нормальной (например, немутировавшей) ASM человека, например ASM-1. Согласно некоторым вариантам осуществления субъект эндогенно экспрессирует ASM с менее чем 35, 30, 25, 20, 15, 10, 5, 4, 3, 2 или 1% от активности нормальной ASM человека, например ASM-1 (см., например, патенты США №№ 4039388, 4082781, 5686240 и 7563591 и международные публикации №№ WO 2007/078806 и WO 2006/058385, которые включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте), в отношении методик, которые можно использовать для измерения активности ASM см. также анализ на основе флуоресцентной, высокоэффективной жидкостной хроматографии, описанный в He et al., *Analytical Biochemistry* 314: 116-120 (2003).

Согласно различным вариантам осуществления субъект, которого подвергают скринингу в отношении ассоциированного с ASM нарушения, или у которого диагностировано нарушение, обусловленное ASM, или который проходит лечение от нарушения, обусловленного ASM, в соответствии со способами, представленными в данном документе, может проявлять один или несколько симптомов NPD. Симптомы NPD могут включать без ограничений вздутый живот, гепатомегалию, спленомегалию, гепатоспленомегалию, нейтропению, заболевание легких, лимфоаденопатию, присутствие гистохимически характерных для NPD пенистых клеток, анемию (например, микроцитарную анемию), тромбоцитопению, периодическую рвоту, хронический запор, нарушение роста (например, сниженный линейный рост и масса тела), задержку полового созревания, рецидивирующие гематомы, рецидивирующие кровотечения, атерогенную липидограмму (высокий уровень холестерина, триглицериды или ЛПНП и/или низкий уровень ЛПВП), боль (головную боль, боль в спине, конечностях, животе), утомление, чувство быстрого насыщения, низкую выносливость, остеопению, неврологические проявления и затруднения дыхания (например, интерстициальное заболевание легких и/или одышку). Неврологические проявления NPD включают симптом вишневого косточки, гипотонию, мышечную слабость, задержку психомоторного развития, спастичность, социальную невосприимчивость, раздражительность и/или судороги.

Согласно определенным вариантам осуществления субъектом, которого подвергают скринингу в отношении ассоциированного с ASM нарушения, или у которого диагностировано ассоциированное с ASM нарушение, или который проходит лечение от ассоциированного с ASM нарушения в соответствии со способами, представленными в данном документе, может быть младенец. Согласно другим вариантам осуществления субъектом является ребенок. Согласно определенным вариантам осуществления субъектом является взрослый (18 лет или старше). Согласно определенным вариантам осуществления субъектом является женщина. Согласно определенным вариантам осуществления субъектом является мужчина. Согласно определенным вариантам осуществления субъектом является женщина, которая не беременна или не вскармливает грудью.

### Примеры

Следующие примеры служат для иллюстрации и ни в коем случае не для ограничения настоящего

раскрытия.

Пример 1. Материалы и методики.

Цельную кровь, использованную в данном исследовании, получали от 20 субъектов, у которых ранее диагностировали NPD-B, после письменного информированного согласия, и от 20 здоровых взрослых людей (приобретали в ProMedDx, LLC, Нортон, Майами). Венозную кровь отбирали в пробирки Vacutainer® (Becton, Dickinson and Company, Франклин Лейке, Нью-Джерси), содержащие EDTA, помещали на охлаждающие пакеты на ночь и хранили при 4°C. В течение 48 ч после отбора кровь смешивали путем нескольких переворачиваний, и каплю крови в 75 мкл капали на бумагу Whatman 903® для отбора образцов и сушили при комнатной температуре в течение по меньшей мере 4 ч.

Для количественного определения лизосомного SPM в качестве внутреннего стандарта использовали 1-0-гексадецил-(7,7,8,8-d4)-2-0-ацетил-sn-глицерил-3-фосфорилхолин (фактор активации тромбоцитов C16-d4; PAF C16-D4, Cayman Chemical Company, Энн Арбор, Мичиган). Полученные путем перфорации диски с пятнами высушенной крови (DBS) диаметром 3,2 мм экстрагировали в 200 мкл раствора метанол/ацетонитрил/вода (80/15/5), содержащего 0,8 нг внутреннего стандарта, перемешивали вихревым способом в течение 30 мин и подвергали воздействию ультразвука в течение 10 мин. Элюент удаляли центрифугированием в течение 5 мин при 16200 g, а затем 30 мкл вводили в систему LC/MS/MS API Qtrap 4000 (AB Sciex, Торонто, Канада), соединенную с системой жидкостной хроматографии высокого давления 1100 (HPLC) (Agilent, Пало-Альто, Калифорния). HPLC проводили с использованием капиллярной кварцевой колонки с нормальными фазами в изократическом режиме с использованием смеси метанол/ацетонитрил/вода в качестве подвижной фазы. Масс-спектрометрию (MS) проводили в режиме контроля множественных реакций (MRM) с использованием следующих переходов: масса/заряд 465,4>184,1 для лизосомного SPM и 528,5>184,1 для PAF C16-D4. Для количественного определения SPM в качестве внутреннего стандарта использовали C12-SPM (Avanti Polar Lipids, Алабама). Процедуры экстракции и LC/MS/MS были подобны тем, которые использовали для лизосомного SPM, за исключением того, что элюент разбавляли в 320 раз перед введением, а 12 изоформ SPM подвергали контролю и обобщали.

Пример 2. Диагностика NPD.

Несмотря на то, что уровни SPM, как известно, повышены в более чем 10 раз в печени и селезенке у субъектов с NPD-B, уровни SPM в плазме крови у субъектов с NPD-B существенно не повышены и перекрываются с таковыми от нормальных контрольных групп. Как показано на фиг. 1A, уровень SPM у пациентов с NPD-A и NPD-B не был значительно повышен, что показано по отношению концентрации SPM в высушенных пятнах крови (DBS) от пациентов с NPD-A и NPD-B к среднему значению концентрации в DBS от нормальных контрольных образцов. SPM является основным компонентом клеточных мембран и липопротеинов, и небольшое повышение SPM в DBS от субъектов с NPD может быть связано с его уже высокими уровнями и ускоренным оборотом в кровотоке.

В отличие от SPM уровни лизосомного SPM были определенно повышены в DBS от субъектов с NPD-A и NPD-B. Как показано на фиг. 1B, уровень лизосомного SPM у пациентов с NPD-A и NPD-B был повышен, что показано по отношению концентрации лизосомного SPM в высушенных пятнах крови (DBS) от пациентов с NPD-A и NPD-B к среднему значению концентрации в DBS, полученных из нормальных контрольных образцов. Уровень лизосомного SPM не был связан с количеством остаточной активности ASM в DBS или с возрастом субъектов при отборе. В заключение необходимо отметить, что лизосомный SPM повышен в периферической ткани (DBS) от субъектов с NPD при уровнях, которые отличаются от таковых в нормальных контрольных группах.

Пример 3. Эффект эскалации дозы у мыши.

Предыдущие исследования у нокаутированных по ASM мышей (мышинная модель болезни Нимана-Пика) показали, что клинических симптомов токсичности не наблюдали до тех пор, пока не использовали однократные дозы, выше или равные 10 мг/кг (Nickerson et al., "Dose Responsive Toxicological Findings Following Intravenous Administration of Recombinant Human Acid Sphingomyelinase (rhASM) to Acid Sphingomyelinase Knock-out (ASMKO) Mice," American Society of Human Genetics 2005 и Murray et al., "Elevations of Pro-Inflammatory Cytokines and Decreases in Cardiovascular Hemodynamics Following Intravenous Administration of Recombinant Human Acid Sphingomyelinase (rhASM) to Acid Sphingomyelinase Knock-out (ASMKO) Mice," Society of Toxicology 2006).

В настоящем исследовании нокаутированным по ASM мышам вводили внутривенно разовую дозу rhASM при одной из трех следующих концентраций: 0, 3 (нетоксичная доза, клинически видимых нежелательных побочных эффектов не наблюдали) или 20 мг/кг (токсичная доза). 3 самцов и 3 самок мышей включали в группу для каждой дозы (всего 18 животных), и образцы крови отбирали в точки времени, указанные в таблице.

Группа	Лечение	Доза (мг/кг)	Тип образца	Точки времени отбора образцов
1		0		Через 5 минут и 6, 24, 48 и 72 часа после введения дозы
2	rhASM	3	DBS	Через 5 минут и 6, 24, 48 и 72 часа после введения дозы
3		20		Через 5 минут и 1, 4, 6 и 9 часа после введения дозы

Количественно определяли уровни лизосомного SPM в образцах DBS, и было показано, что уровни повышались с увеличением концентраций дозы rhASM, достигая максимума для групп лечения 3 и 20 мг/кг в пределах 6 ч после введения дозы (см. фиг. 2, где изображена гистограмма, показывающая кратность повышения концентраций лизосомного SPM в DBS для трех доз в точках времени отбора образцов после введения доз по сравнению с концентрацией через 5 мин после введения дозы). К нашему удивлению кратность увеличения в плазме концентрации лизосомного SPM в ответ на токсичную дозу (20 мг/кг) rhASM была заметно выше, чем кратность повышения в плазме концентрации лизосомного SPM в ответ на нетоксичную дозу (3 мг/кг) rhASM. Этот результат указывает на то, что лизосомный SPM применим в качестве маркера для измерения токсичных эффектов терапевтического средства, которое снижает уровень SPM, накопленного у пациента с ассоциированным с ASM нарушением.

Пример 4. Сравнение схемы с введением однократной дозы и схемы для снижения целевого аналита.

Высушенные пятна крови получали от мышей дикого типа (C57BL/6) или нокаутированных по ASM (ASMKO) мышей после применения схемы с введением однократной дозы rhASM или схемы с введением rhASM для снижения целевого аналита. Пять мышей ASMKO получали однократную дозу rhASM 10 мг/кг. Пять мышей C57BL/6 и пять мышей ASMKO обрабатывали с использованием схемы для снижения целевого аналита по 3 мг/кг rhASM, а затем вводили дозу 20 мг/кг. Образцы крови отбирали в следующие точки времени: 5 мин, 4, 6, 24 и 72 ч после введения дозы. Животных в группе дозирования 10 мг/кг подвергали эвтаназии после точки времени 24 ч.

Все 70 образцов пятен крови подготавливали с использованием процедуры липидной мультиплексной экстракции и анализировали с помощью LC/MS/MS. Вкратце, одиночные пятна DBS вытаскивали посредством перфорации из каждой карточки с образцами и помещали в отдельные пробирки Эппендорфа. Затем в каждую пробирку добавляли 200 мкл раствора 80:15:5 (MeOH:ACN:H<sub>2</sub>O) перед тем, как ее содержимое перемешивали на вихревой мешалке в течение 30 мин, воздействовали ультразвуком в течение 10 мин и центрифугировали до осаждения любых взвешенных частиц. Калибровочную кривую лизосомного SPM (без внутреннего стандарта) использовали для определения концентрации лизосомного SPM в каждом образце.

Данные на фиг. 3 показывают, что уровни лизосомного SPM повышались только в группе ASMKO, которую обрабатывали путем введения однократной (высокой) дозы rhASM при 10 мг/кг в противоположность группе ASMKO, которую обрабатывали при помощи схемы для снижения целевого аналита. При такой высокой дозе ожидается, что по меньшей мере 50% мышей погибнут в интервале от 24 до 72 ч, в то время как по схеме введения для снижения целевого аналита все мыши должны выжить. Эти результаты указывают на то, что лизосомный SPM можно применять в качестве маркера для измерения токсичного эффекта высокой дозы терапевтического средства.

Пример 5. Тестирование на людях.

Образцы крови отбирали у пациентов с болезнью Ниманна-Пика, которых подвергали лечению с использованием rhASM. Типичный пример показан в фиг. 4. Образцы отбирали до введения дозы и через 24, 48 и 72 ч после введения указанной дозы (0,1, 0,3, 0,6, 1, 2 или 3 мг/кг) rhASM в течение 26-недельного периода (1 день, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 и 26 неделя). В 26 недель отбирали образцы только до введения дозы и в 24 и 48 ч после введения дозы. Уровни лизосомного SPM измеряли в нг/мл. Данные показывают общую тенденцию к снижению уровней лизосомных SPM после повторных доз при более высоких концентрациях, с отклонениями в уровне лизосомного SPM между точками времени до введения дозы и через 72 ч после введения дозы после каждой отдельной дозы. Наиболее ранний образец после введения дозы отбирали через 24 ч, к этому времени пик концентрации лизосомного SPM после введения мог не наблюдаться. Вводимые дозы также могли находиться ниже концентрации, необходимой для наблюдения значимого пика уровня лизосомного SPM после введения.

Предыдущие примеры, как предполагается, иллюстрируют и никоим образом не ограничивают настоящее раскрытие. Другие варианты раскрытых устройств и способов будут очевидны специалистам в данной области при рассмотрении описания и практического использования устройств и способов, раскрытых в данном документе.

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ контроля лечения пациента, имеющего ассоциированное с кислой сфингомиелиназой (ASM) нарушение, включающий:

(а) введение пациенту в эффективном количестве терапевтического средства, которое представляет собой рекомбинантную кислую сфингомиелиназу человека (rhASM); и

(b) определение уровня лизосомного сфингомиелина (лизосомного SPM) в биологическом образце, полученном от пациента через три или более дней после стадии (а), перед введением последующей дозы, где снижение уровня лизосомного SPM по сравнению с референтным уровнем показывает эффективность терапевтического средства, где референтный уровень представляет собой исходный уровень лизосомного SPM субъекта перед лечением на стадии (а).

2. Способ по п.1, в котором стадия (а) дополнительно включает повторное введение указанного терапевтического средства пациенту.

3. Способ по любому из предшествующих пунктов, где биологический образец представляет собой цельную кровь, пятно высушенной крови, плазму или сыворотку крови.

4. Способ по любому из пп.1-3, где ассоциированное с ASM нарушение представляет собой болезнь Ниманна-Пика типа В.

5. Способ по любому из пп.1-3, где ассоциированное с ASM нарушение представляет собой болезнь Ниманна-Пика типа А.

6. Способ по любому из предшествующих пунктов, где стадии (а) и (b) повторяют несколько раз, при этом каждую последующую дозу терапевтического средства вводят через две недели после предыдущей дозы.

7. Способ по любому из предшествующих пунктов, где эффективное количество указанного терапевтического средства составляет от 0,03 до 3 мг/кг.

8. Способ по п.6, где первую дозу указанного терапевтического средства, которую получает пациент, вводят в количестве 0,1 мг/кг.

9. Способ по п.8, включающий введение пациенту поддерживающей дозы указанного терапевтического средства в количестве 1, 2 или 3 мг/кг.

10. Способ по любому из предшествующих пунктов, где указанное терапевтическое средство вводят внутривенно.

11. Способ контроля лечения пациента, имеющего болезнь Ниманна-Пика типа А или типа В, где указанный способ включает

введение пациенту первой дозы рекомбинантной кислой сфингомиелиназы человека (rhASM) в количестве от 0,03 до 1,0 мг/кг и последующих доз в увеличивающейся концентрации до достижения 3 мг/кг;

введение поддерживающих доз указанному пациенту в количестве 1, 2 или 3 мг/кг; и

измерение уровня лизосомного сфингомиелина (лизосомного SPM) в биологическом образце, отобранном у указанного пациента (а) в течение 24 ч, (b) в течение 48 ч или (с) 72 или более часов после введения дозы, но перед введением последующей дозы;

причем каждую дозу вводят через две недели после предыдущей дозы, и

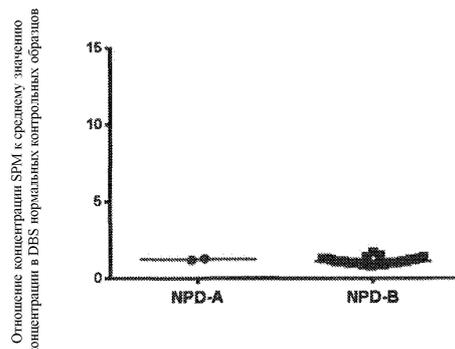
где повышенный уровень лизосомного SPM на стадии (а) или (b) или пониженный уровень лизосомного SPM на стадии (с) по сравнению с референтным уровнем указывает на то, что терапия rhASM является эффективной, а референтный уровень представляет собой исходный уровень лизосомного SPM пациента перед введением первой дозы rhASM.

12. Способ по п.11, где до начала лечения было определено, что у пациента повышен уровень лизосомного SPM по сравнению со здоровым контролем.

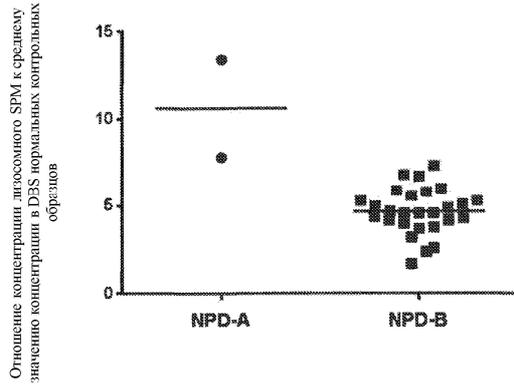
13. Способ по п.11 или 12, где биологический образец представляет собой пятно высушенной крови.

14. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором пациентом является взрослый пациент.

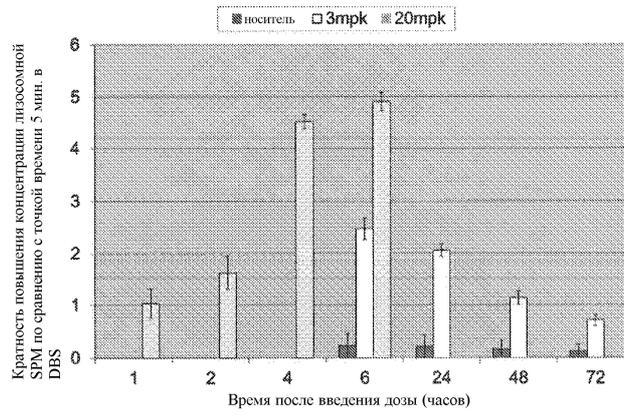
15. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором пациентом является педиатрический пациент.



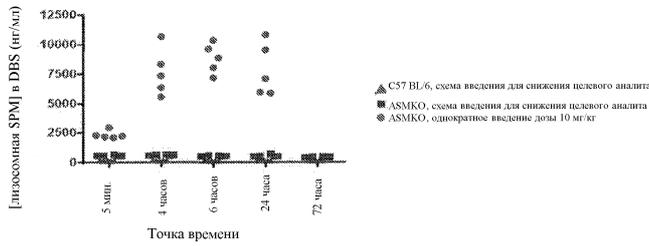
Фиг. 1А



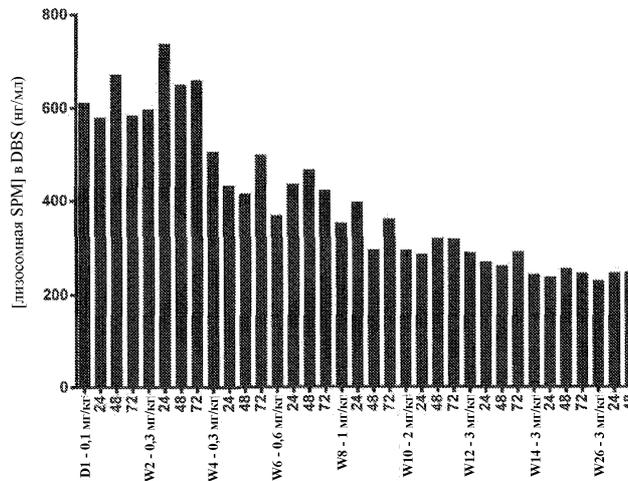
Фиг. 1В



Фиг. 2



Фиг. 3



Фиг. 4