



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **120591** (13) **C2**  
(51) МПК  
**G01N 33/92** (2006.01)

МІНІСТЕРСТВО РОЗВИТКУ  
ЕКОНОМІКИ, ТОРГІВЛІ ТА  
СІЛЬСЬКОГО ГОСПОДАРСТВА  
УКРАЇНИ

## (12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД

(21) Номер заявки:	а 2016 00158	(72) Винахідник(и):	Чуан Вей-Лін (US), Кокс Джеральд Ф. (US), Чжан Кс. Кейт (US)
(22) Дата подання заявки:	06.06.2014	(73) Власник(и):	ДЖЕНЗІМ КОРПОРЕЙШН, 500 Kendall Street, Cambridge, MA 02142, United States of America (US)
(24) Дата, з якої є чинними права на винахід:	10.01.2020	(74) Представник:	Бочаров Максим Анатолійович, реєстр. №367
(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	61/832,302	(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:	McGovern M. et al. A phase 1 trial of recombinant human acid sphingomyelinase (rhASM) enzyme replacement therapy in adults with ASM deficiency (ASMD Niemann-Pick B). Molecular genetics and metabolism, 2011, Vol. 102, P. S28 Miranda Silvia R. P. 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, 2000, Vol. 14, No. 13, P. 1988-1995 Horinouchi K. et al. Acid sphingomyelinase deficient mice: a model of types A and B Niemann-Pick disease. Nature, 1995, Vol. 10, P. 288 - 293 Wasserstein M. P. et al. Acid sphingomyelinase deficiency: Prevalence and characterization of an intermediate phenotype of Niemann-Pick disease. Journal of pediatrics, Vol. 149, No. 4, P. 554 - 559 WO 2011025996 A2, 03.03.2011 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 ezymology, 1999, Vol. 1432, No. 2, P. 251 - 226 Chuang Wei-Lien et al. Lyso-sphingomyelin is elevated in dried blood spots of Niemann-Pick B pati. Molecular genetics and metabolism, 2013, Vol. 111, No. 2, P. 209 - 211
(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	07.06.2013		
(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку:	US		
(41) Публікація відомостей про заявку:	11.04.2016, Бюл.№ 7		
(46) Публікація відомостей про видачу патенту:	10.01.2020, Бюл.№ 1		
(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ	PCT/US2014/041405, 06.06.2014		

## (54) СПОСІБ КОНТРОЛЮ ЛІКУВАННЯ ДЕФІЦИТУ КИСЛОЇ СФІНГОМІЕЛІНАЗИ (ASM) У ПАЦІЄНТА

### (57) Реферат:

Винахід стосується способу контролю лікування дефіциту кислотої сфінгомелінази (ASM), у пацієнта, що включає введення пацієнту терапевтичного засобу, який являє собою рекомбінантну кислоту сфінгомеліназу людини (rhASM), в діапазоні доз від 0,03 до 3 мг/кг; і отримання рівня лізосомального сфінгомеліну (лізосомальний SPM) в біологічному зразку у пацієнта, взятому через три або більше днів після введення, де зниження рівня лізосомального SPM порівняно з посиляльним рівнем вказує на ефективність терапевтичного засобу, і де посиляльний рівень являє собою базовий рівень лізосомального SPM у пацієнта перед лікуванням.

UA 120591 C2



[0001] Дана заявка встановлює пріоритет відповідно до 35 U.S.C. § 119 попередньої заявки на патент США 61/832302, поданої 7 червня 2013 р., яка включена у даний документ за допомогою посилання в повному обсязі.

[0002] Дане розкриття стосується способів скринінгу, діагностики, контролю і/або лікування асоційованих з кислотою сфінгомеліназою (ASM) порушень, таких як хвороба Німана-Піка.

[0003] Кислота сфінгомеліназа (ASM) являє собою лізосомальний фермент фосфодіестеразу, яка гідролізує сфінгомелін (SPM), сполуку, яка запасає та являє собою фосфоліпід, присутню у головному мозку, печінці, легенях, селезінці та лімфатичних вузлах, до цераміду та фосфорилхоліну. Втрата активності ASM може у результаті призводити до нездатності організму розщеплювати SPM. У пацієнтів з асоційованими з ASM порушеннями SPM накопичується переважно в макрофагах, але також в гепатоцитах та інших типах клітин, що призводить до вираженої гепатоспленомегалії, тромбоцитопенії, інтерстиціального захворювання легень та ішемічної хвороби серця. SPM суттєво не підвищується у плазмі крові, цільній крові або сечі, що обмежує його використання як неінвазивного біомаркера.

[0004] Діагностування асоційованого з ASM порушення у даний час потребує інвазивного дослідження і/або тривалого медичного обстеження, як, наприклад оцінка передбачуваних клінічних ознак та симптомів, біопсія печінки або легень, дослідження активності ASM в зразку крові (при цьому було описано хибні негативні та позитивні випадки) і/або генетичне дослідження (наприклад, аналіз мутації гена SMPD1). Лікування асоційованих з ASM порушень може включати введення замінного ферменту. У високих дозах ферментозамісна терапія може призводити до утворення токсичних або шкідливих метаболітів. Відповідно, існує потреба у розробці удосконалених способів скринінгу, діагностики і/або контролю курсу лікування асоційованого з ASM порушення. У даному документі розкриваються способи неінвазивних скринінгу, діагностики, контролю терапії і/або коректування дози терапевтичного засобу для лікування асоційованого з ASM порушення, які включають вимірювання рівня лізосомального SPM (сфінгозилфосфорилхоліну або лізосомального сфінгомеліну) в біологічному зразку. Підвищені рівні лізосомального SPM можна використовувати для скринінгу або встановлення діагнозу асоційованого з ASM порушення. Підвищені рівні лізосомального SPM також можна використовувати як сигнал або ознаку утворення одного або декількох токсичних метаболітів, пов'язаних з надмірно високою дозою при ферментозамісній терапії, що утворює, таким чином, можливість для підбору точної дози при ферментній терапії для зменшення накопичення SPM, уникаючи при цьому шкідливих побічних ефектів даної терапії. Підвищені рівні лізосомального SPM також можна використовувати для контролю довготривалої ефективності курсу лікування асоційованого з ASM порушення (наприклад, якщо рівні лізосомального SPM не знижуються протягом курсу лікування, це може вказувати на неефективне лікування).

[0005] Хвороба Німана-Піка (NPD) являє собою спадкове, аутосомно-рецесивне порушення накопичення ліпідів, яке характеризується надмірним накопиченням SPM у лізосомах клітин, таких як макрофаги та нейрони, що порушує нормальне функціонування клітин. Хвороба Німана-Піка типу А ("NPD-A") являє собою нейродегенеративне захворювання із швидким прогресуванням у немовлят, і зазвичай воно призводить до смерті у віці від двох до трьох років. Хвороба Німана-Піка типу В ("NPD-B") призводить до збільшення печінки та селезінки і до розладу дихання з летальним кінцем, що, як правило, настає у старшому підлітковому віці. Інші типи хвороби Німана-Піка, наприклад, тип С ("NPD-C"), також можуть асоціюватися з накопиченням SPM і/або лізосомального SPM. В даному документі вони також стосуються асоційованих з ASM порушень (ASMD). В даному документі ці форми хвороби Німана-Піка у сукупності називаються хворобою Німана-Піка (NPD).

[0006] Найчастіше NPD спостерігається серед індивідуумів, які походять від євреїв ашкеназів, ніж у загальній популяції. Припускається, що частота поширення NPD-A серед євреїв ашкеназів становить приблизно 1 на 40000, з частотою гена (q) приблизно 1 на 200 та частотою гетерозиготних носіїв (2 pq) 1 на 100 (Goodman, 1979, in "Genetic Disorders Among The Jewish People", John Hopkins Univ. Press, Baltimore, pp. 96-100). Зустрічальність гетерозиготних носіїв NPD-B у популяції євреїв ашкеназів є меншою. Id. Було визначено, що сумарна частота гетерозиготних носіїв NPD A та B становить приблизно 1 на 70 серед індивідуумів, які походять від євреїв ашкеназів. Id. В епідеміологічних дослідженнях, проведених у різних країнах, встановлено, що сумарна зустрічальність захворювання NPD A та B у декількох країнах світу варіює від 1 на 167000 до 1 на 250000 новонароджених (Miekle 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). Передбачається, що частота зустрічальності гетерозиготних носіїв варіює від 1 на 200 до 1 на 250 індивідуумів.

[0007] Пацієнти або з NPD-A, або з NPD-B мають залишкову активність ASM (приблизно 1-10 % від норми), але цього недостатньо для попередження надмірного накопичення сфінгомієліну в лізосомах. Більше того, клінічний перебіг NPD-B є надзвичайно мінливим, і у даний час неможливо пов'язати тяжкість захворювання з рівнем залишкової активності ASM.

Хоча діагностування пацієнтів, уражених або NPD-A, або NPD-B, за рівнем ферментів можна проводити за допомогою зразків крові, цьому діагностуванню часто передують інвазивні процедури, такі як біопсія печінки або легенів. Крім того, виявлення за рівнем ферментів облігатних гетерозигот було визнано проблематичним, особливо з використанням лейкоцитів периферичної крові як джерела ферментів. Одним можливим поясненням є те, що присутність нейтральних сфінгомієліназ у деяких джерелах і/або присутність залишкової активності ASM, що утворюється в результаті дії мутантних алелів, сприяла неможливості надійного розмежування носіїв кожного підтипу захворювання. Навіть використання культивованих фібробластів шкіри, які не експресують нейтральну сфінгомієліназу, не забезпечило точних результатів у гетерозигот. Відповідно, існує потреба в альтернативних способах точного виявлення, скринінгу, діагностики та лікування асоційованих з ASM порушень, таких як NPD.

[0008] Ферментозамісну терапію (ERT) використовували для лікування різних лізосомальних захворювань накопичення. Див., наприклад, патент США 7001994 і заявку на патент США № 2011/0052559, в яких описана ERT для хвороб Тея-Сакса, Помпе та Німана-Піка, серед інших, які включено у даний документ в повному обсязі. При ERT намагаються компенсувати недостатній і/або дефектний фермент за допомогою ферменту, який вводять екзогенно. У випадку ERT для хвороби Німана-Піка основною метою було б надання можливості ураженому індивідууму переробляти сфінгомієлін та запобігати його накопиченню в лізосомах. Для того, щоб вона була ефективною, для такої терапії можуть з самого початку вимагатися достатньо великі кількості замінного ферменту для руйнування накопиченого сфінгомієліну, а також безперервне введення замінного ферменту для запобігання повторному накопиченню сфінгомієліну. Проте, метаболізм накопиченого сфінгомієліну може призводити до утворення токсичних або шкідливих метаболітів. Таким чином, потрібна точна узгодженість відносно ERT для того, щоб ефективно зменшувати у пацієнта об'єму накопиченого сфінгомієліну без утворення підвищених рівнів метаболітів, які можуть призвести до небажаних побічних ефектів.

[0009] Як було відзначено раніше, рівень SPM значно не підвищується у плазмі крові, цільній крові або сечі, що обмежує його застосування як неінвазивного біомаркера для скринінгу, встановлення діагнозу або контролю лікування асоційованого з ASM порушення. Як розкривається у даному документі, рівень лізосомального SPM (сфінгозилфосфорилхоліну або лізосомального сфінгомієліну), деацильованої форми SPM, значно підвищується у тканинах, у тому числі у периферичних тканинах, у пацієнтів, що страждають на асоційовані з ASM порушення і/або проходять лікування від асоційованих з ASM порушень, що робить його потенційним маркером для скринінгу, діагностики і/або контролю лікування асоційованого з ASM порушення. Ця двоїстість існує на протигагу багатьом іншим лізосомальним порушенням накопичення, при яких змінені рівні як ацильованих, так і деацильованих глікосфінголіпідів можна виявити у плазмі крові. З огляду на те, що змінені рівні SPM не піддаються виявленню у плазмі крові пацієнтів, які страждають на асоційовані з ASM порушення або проходять лікування від асоційованих з ASM порушень, можна було б очікувати, що лізосомальний SPM буде подібним чином непридатним для скринінгу, діагностування або контролю лікування. Проте, як розкрито у даному документі, було знайдено, що лізосомальний SPM можна виявляти при змінених рівнях у біологічних зразках з різних тканин, у тому числі, периферичних тканин, таких як плазма крові.

[0010] Лізосомальні сфінголіпіди (лізосомальні SL), які включають лізосомальний SPM, являють собою деацильовані форми сфінголіпідів; деякі, як було показано, підвищуються при певних лізосомальних порушеннях накопичення. 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). Механізм, за допомогою якого утворюється лізосомальний SPM та інший лізосомальний SL, повністю не досліджений. Відсутність супутнього підвищення рівня сфінгозину вказує на те, що деацильовання відповідного сфінголіпіду являє собою можливий шлях утворення. Проте єдина деацилаза сфінгомієліну, яку виявлено до даного часу, походить з рогового шару суб'єкта з atopічним 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). Експресія даної деацилази, очевидно, обмежена вибраними типами клітин при певних фізіологічних умовах. Було показано, що очищена ASM з плаценти, головного мозку та сечі не гідролізує лізосомальний 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). Відсутність розуміння відносно біосинтетичного шляху для лізосомального SPM додатково підкреслює складність прогнозування рівня експресії апіорі у пацієнтів, які страждають на асоційовані з ASM порушення.

[0011] Лізосомальний SPM має короткий період напівжиття в крові *in vitro* у зв'язку з його швидким метаболізмом до сфінгозин-1-фосфату за допомогою аутотаксину, екзоферменту з активністю лізофосфоліпази 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). Окрім як у селезінці та печінці пацієнтів з NPD-B і головному мозку суб'єктів з NPD-A, активність ASM в яких від незначної до відсутньої та в яких проявляється тяжке нейропатичне захворювання, повідомлення про рівень лізосомального SPM в інших органах відсутні.

[0012] Як розкривається у даному документі, лізосомальний SPM можна виявити при змінених концентраціях в біологічних зразках (наприклад, зразках, одержаних з периферичних тканин) пацієнтів, які страждають на асоційовані з ASM порушення і/або проходять лікування від асоційованих з ASM порушень. Змінений рівень може відображати тимчасовий ефект лікування (наприклад, змінені рівні лізосомального SPM можуть служити як маркер утворення метаболітів гострої токсичності у відповідь на ERT). Змінені рівні можна також використовувати у діагностиці (наприклад, змінені рівні лізосомального SPM можуть служити як діагностичний маркер або маркер скринінгу для виявлення суб'єкта, який страждає на асоційоване з ASM порушення, з проявом симптомів або ще без прояву симптомів). Змінені рівні також можна використовувати для контролю довготривалої ефективності курсу лікування асоційованого з ASM порушення (наприклад, якщо рівні лізосомального SPM не знижуються протягом курсу лікування, це може вказувати на неефективне лікування). Відповідно, в даному документі розкриті нові способи скринінгу, діагностики, контролю процесу лікування і/або коректування дози терапевтичного засобу для лікування асоційованих з ASM порушень, таких як NPD, за допомогою нових біомаркерів, у тому числі, лізосомального SPM (сфінгозилфосфорилхоліну або лізосомального сфінгомієліну). Контроль курсу лікування може включати виявлення зниження рівня одного або декількох маркерів токсичності (наприклад, лізосомального SPM) під час курсу лікування, що вказує таким чином на ефективність схеми лікування, або виявлення відсутності зміни рівня маркера у динаміці, що вказує таким чином на неефективність схеми лікування.

[0013] Способи, розкриті у даному документі, також включають способи лікування людини-суб'єкта з асоційованим з кислотою сфінгомеліназою (ASM) порушенням. Відповідно до певних аспектів способи можуть включати введення суб'єкту першої дози терапевтичного засобу з першою концентрацією для лікування асоційованого з ASM порушення та введення суб'єкту другої дози терапевтичного засобу з другою концентрацією, що дорівнює першій концентрації або більша неї, якщо було визначено, що суб'єкт має рівень лізосомального SPM, який менший референтного рівня або дорівнює йому після введення першої дози. Способи можуть включати вимірювання лізосомального SPM в біологічних зразках з периферичних тканин та виявлення пацієнта, який страждає на асоційоване з ASM порушення, шляхом виявлення змінених рівнів лізосомального SPM. Способи також включають контролювання або коректування лікування пацієнта відносно асоційованого з ASM порушення шляхом виявлення рівня одного або декількох маркерів токсичності, у тому числі лізосомального SPM, які змінені у результаті лікування пацієнта терапевтичним засобом, наприклад, засобом, який знижує рівень SPM в тканинах пацієнта. Способи забезпечують неінвазивне обстеження таких пацієнтів.

[0014] Способи, розкриті у даному документі, також можна використовувати у деяких варіантах здійснення для скринінгу, встановлення діагнозу, контролю процесу лікування і/або коректування лікування асоційованого з ASM порушення, такого як NPD. Наприклад, способи включають коректування дози терапевтичного засобу, який вводять пацієнту для лікування асоційованого з ASM порушення, за допомогою вимірювання маркера токсичності (наприклад, лізосомального SPM) для контролю рівнів токсичних метаболітів, що утворюються в результаті лікування. Способи, розкриті у даному документі, можна використовувати у деяких варіантах здійснення для контролю довготривалої ефективності курсу лікування асоційованого з ASM порушення (наприклад, якщо рівні лізосомального SPM не знижуються протягом курсу лікування, це може вказувати на неефективність лікування). Способи також можна

використовувати у деяких варіантах здійснення для скринінгу суб'єктів (наприклад, пацієнтів, які не мають проявів симптомів) відносно підвищеного лізосомального SPM як вихідної ознаки асоційованого з ASM порушення. Суб'єктів, виявлених під час скринінгу як таких, що мають підвищений рівень лізосомального SPM, потім можна піддавати додатковому обстеженню (наприклад, дослідження крові на ASM, генетичне дослідження тощо) для встановлення діагнозу/підтвердження діагнозу асоційованого з ASM порушення, у той час як суб'єкти, у яких не проявився підвищений рівень лізосомального SPM, не отримують додаткового обстеження. Такий спосіб скринінгу може потенційно знизити витрати на дослідження.

[0015] Способи, розкриті в даному документі, можуть включати вимірювання лізосомального SPM в біологічному зразку від людини-суб'єкта і введення терапевтичного засобу для лікування асоційованого з ASM порушення (наприклад, засобу для ERT, засобу для терапії шаперонами і/або засобу для субстрат-редукуючої терапії) при оптимізованих концентраціях, виходячи з вимірювань рівнів лізосомального SPM. Відповідно до різних варіантів здійснення біологічний зразок являє собою зразок периферичної тканини. Відповідно до певних варіантів здійснення біологічний зразок може бути зразком плазми крові, цільної крові (наприклад, пляма висушеної крові), сироватки крові і/або сечі. Використання зразка периферичної тканини для вимірювання рівнів лізосомального SPM може виключити необхідність інвазивних процедур, таких як біопсія печінки.

#### ОПИС ГРАФІЧНИХ МАТЕРІАЛІВ

[0016] На фіг. 1A представлений графік, який показує відношення концентрації SPM у плямах висушеної крові (DBS) від пацієнтів з NPD-A та NPD-B до середнього значення концентрації в DBS нормальних контрольних зразків. На фіг. 1B представлений графік, який показує відношення концентрації лізосомального SPM в DBS від пацієнтів з NPD-A та NPD-B до середнього значення концентрації в DBS нормальних контрольних зразків.

[0017] На фіг. 2 представлено гістограму, яка показує кратність підвищення концентрацій лізосомального SPM (вертикальна вісь) в DBS від нокаutowаних по ASM мишей у вказані точки часу (через 1, 2, 4, 6, 24, 48 і 72 години після введення дози) у порівнянні з концентрацією через 5 хвилин після введення разової дози rhASM у 0, 3 або 20 мг/кг.

[0018] На фіг. 3 показано концентрацію лізосомального SPM (нг/мл) в DBS, отриманій від мишей дикого типу (C57BL/6) або від нокаutowаних по ASM (ASMKO) мишей, після введення разової дози (10 мг/кг) або режиму дозування для зниження об'єму (3 мг/кг) з наступною дозою rhASM 20 мг/кг. Зразки крові отримували у наступні точки часу: 5 хвилин, 4 години, 6 годин, 24 години і 72 години після введення дози. Тварин у групі дозування 10 мг/кг піддавали евтаназії після точки часу 24 години.

[0019] На фіг. 4 представлено гістограму, яка показує концентрацію лізосомального SPM (нг/мл) в DBS від пацієнта-людини з хворобою Німана-Піка, яка зібрана до введення дози і через 24, 48 і 72 години після введення дози rhASM протягом 26-тижневого періоду. Дози (0,1, 0,3, 0,6, 1, 2 або 3 мг/кг) і дата введення (1 день, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 і 26 тиждів) вказані на горизонтальній осі. На 26 тижні зразки одержували лише до введення дози і через 24 та 48 годин після введення дози.

#### ОПИС ВИЗНАЧЕНИХ ІЛЮСТРАТИВНИХ ВАРІАНТІВ ЗДІЙСНЕННЯ

[0020] Нижче буде виконаний детальний огляд певних ілюстративних варіантів здійснення відповідно до даного розкриття, певні приклади яких показані у супровідних графічних матеріалах. По можливості, у графічних матеріалах будуть використані однакові номери посилання для позначення однакових або подібних частин.

[0021] У даній заявці використання однини включає множину, якщо спеціально не вказано інше. У даній заявці використання "або" означає "і/або", якщо не вказано інше. Крім того, використання виразу "що включає", а також інших форм, таких як "включає" і "включений", не є обмежувальним. Будь-який діапазон, описаний у даному документі, буде розумітися як такий, що включає кінцеві точки та усі значення між кінцевими точками.

[0022] Назви розділів, використовувані у даному документі, представлені лише з організаційною метою, і не передбачаються як такі, що обмежують описуваний об'єкт винаходу. Усі документи або частини документів, що цитуються у даній заявці, включаючи без обмеження патенти, заявки на патенти, статті, книжки та монографії, безумовно включені у даний документ за допомогою посилання у повному обсязі для будь-якої мети.

[0023] У даному документі розкриті способи скринінгу, діагностики, контролю процесу лікування і/або коректування дози терапевтичного засобу для лікування асоційованого з ASM порушення, такого як NPD. "Асоційоване з ASM порушення" може охоплювати будь-яке порушення, асоційоване зі зниженою експресією або порушеною функцією кислоти

сфінгомієлінази. Асоційоване з ASM порушення може також охоплювати будь-яке інше порушення, асоційоване з накопиченням сфінгомієліну у тканині.

[0024] Відповідно до деяких варіантів здійснення способи можуть включати введення суб'єкту першої дози терапевтичного засобу з першою концентрацією для лікування асоційованого з ASM порушення; а потім введення суб'єкту другої дози терапевтичного засобу з другою концентрацією, яка дорівнює першій концентрації або більша неї, якщо визначено, що суб'єкт має рівень лізосомального SPM, який менший референтного (наприклад, рівня в зразку від контрольного суб'єкта, який не має асоційованого з ASM порушення, або вихідного рівня, виміряного у пацієнта перед лікуванням) або дорівнює йому після введення першої дози.

[0025] Відповідно до певних аспектів способи включають забір у людини-суб'єкта біологічного зразка та вимірювання лізосомального сфінгомієліну (лізосомального SPM) у ньому. Вимірний рівень лізосомального SPM можна використовувати для скринінгу, встановлення діагнозу, контролю процесу лікування і/або коректування дози терапевтичного засобу для лікування асоційованого з ASM порушення. Способи базуються на виявленні того, що лізосомальний SPM значно підвищений у біологічних зразках з периферичних тканин пацієнтів з асоційованими з ASM порушеннями, такими як NPD, що забезпечує неінвазивне обстеження таких пацієнтів, у тому числі, скринінг та діагностику асоційованого з ASM порушення і контроль/підбирання точної дози/ведення терапії асоційованого з ASM порушення. Способи також базуються на виявленні того, що розщеплення накопиченої ASM при лікуванні може призводити до підвищених рівнів маркерів (наприклад, лізосомального SPM), які сигналізують про утворення токсичних або шкідливих метаболітів, і що цих шкідливих рівнів метаболітів можна уникнути за допомогою способу введення терапевтичного засобу, розробленого для зниження рівнів SPM (наприклад, засобу для ERT, засобу для терапії шаперонами і/або засобу для субстрат-редукуючої терапії), в дозах, які попереджають надмірне утворення метаболітів. Вимірювання підвищеної концентрації лізосомального SPM можна використовувати для виявлення утворення таких метаболітів і можна використовувати для підбирання точної дози для терапії з метою уникнути утворення надмірно підвищених рівнів метаболітів (наприклад, токсичних рівнів). Відповідно до певних варіантів здійснення за допомогою рівня лізосомального SPM у пацієнта, який отримує лікування від асоційованого з ASM порушення, визначають, чи є доза підвищеною, зниженою, чи необхідно її повторити, відкласти введення або відмінити.

[0026] Виявлення підвищених рівнів лізосомального SPM у суб'єкта з асоційованим з ASM порушенням (наприклад, у пацієнтів з NPD) можна використовувати як частину способу контролю небажаного побічного ефекту при лікуванні. Наприклад, спосіб може включати забір у суб'єкта біологічного зразка, вимірювання рівня лізосомального сфінгомієліну (лізосомального SPM) в зразку, порівняння виміряного в зразку рівня лізосомального SPM з референтним рівнем та виявлення небажаного побічного ефекту, якщо рівень лізосомального SPM в зразку підвищений. Відповідно до деяких варіантів здійснення, якщо рівень лізосомального SPM підвищений на попередньо визначену кількість у порівнянні з референтним зразком (наприклад, референтним рівнем в зразку від контрольного суб'єкта, який не має асоційованого з ASM порушення) або якщо рівень лізосомального SPM підвищується у суб'єкта на попередньо визначену кількість протягом часу в процесі лікування (тобто підвищення відносно вихідного рівня, виміряного у пацієнта до лікування, також позначеного у даному документі як референтний рівень), то вимірний рівень лізосомального SPM можна використовувати як ознаку небажаного побічного ефекту, що виникає у результаті лікування. Відповідно до деяких варіантів здійснення лікування являє собою ферментозамісну терапію (ERT), і дозу засобу для ERT контролюють шляхом забору в пацієнта одного або декількох біологічних зразків, дослідження кожного зразка відносно підвищення лізосомального SPM і встановлення дози засобу для ERT на рівні, який не призводить до підвищення рівнів лізосомального SPM вище попередньо визначеного порогового значення. Контроль дози терапевтичного засобу може включати підвищення, зниження або підтримку концентрації терапевтичного засобу і/або припинення лікування. Відповідно до певних варіантів здійснення один або декілька біологічних зразків збирають після введення дози терапевтичного засобу і/або безпосередньо перед введенням наступної дози терапевтичного засобу. Відповідно до деяких варіантів здійснення небажаний побічний ефект можна виявити, якщо рівень лізосомального SPM в біологічному зразку (наприклад, зразку крові, такому як плазма крові, сироватка крові або пляма висушеної крові) перевищує референтний рівень на приблизно 100-700 нг/мл (наприклад, вище на приблизно 100, 200, 250, 300, 400, 500, 600 або 700 нг/мл або будь-яку концентрацію у даному діапазоні) або якщо рівень лізосомального SPM в біологічному зразку підвищений у щонайменше 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 або 10 раз або більше

(або будь-яке значення у даному діапазоні) відносно референтного рівня. Наприклад, підвищення може бути щонайменше приблизно 3-кратним. Референтним рівнем може бути, наприклад, рівень в зразку від контрольного суб'єкта без асоційованого з ASM порушення або вихідний рівень, виміряний у пацієнта перед лікуванням дозою терапевтичного засобу.

[0027] У даному документі також розкриті способи лікування суб'єкта, який має асоційоване з ASM порушення (наприклад, NPD). Відповідно до різних варіантів здійснення спосіб включає введення терапевтичного засобу для лікування асоційованого з ASM порушення (наприклад, засобу для ERT, засобу для терапії шаперонами і/або засобу для субстрат-редукувальної терапії) у послідовних дозах зі збільшенням концентрації та контроль суб'єкта відносно підвищених рівнів лізосомального SPM в біологічному зразку після кожної дози (наприклад, через 1 хвилину, 5 хвилин, 10 хвилин, 30 хвилин, або 45 хвилин, або 1, 2, 3, 4, 5, 10, 12, 15 або 20 годин, або 1 день, 2 дні, 5 днів, 1 тиждень, 2 тижні, 3 тижні або 4 тижні після введення дози або будь-якого періоду часу в даному діапазоні) або безпосередньо перед наступною дозою. Контроль суб'єкта може включати забір у суб'єкта біологічного зразка, вимірювання рівня лізосомального SPM в зразку, порівняння рівня лізосомального SPM в зразку з референтним рівнем (наприклад, рівнем в зразку від донора, який не має асоційованого з ASM порушення, або рівнем у пацієнта з ASM до лікування) та виявлення в зразку підвищеного рівня лізосомального SPM у порівнянні з референтним рівнем. Відповідно до деяких варіантів здійснення референтний рівень являє собою рівень лізосомального SPM, виміряний в біологічному зразку від контрольного суб'єкта, який не має асоційованого з ASM порушення. Відповідно до деяких варіантів здійснення референтний рівень являє собою рівень лізосомального SPM, виміряний в зразку від суб'єкта, отриманому після введення більш ранньої, нижчої дози засобу для ERT або перед застосуванням будь-якої ERT. Відповідно до деяких варіантів здійснення підвищеним рівнем лізосомального SPM в біологічному зразку (наприклад, зразку крові, такому як зразок сироватки крові, зразок плазми крові або пляма висушеної крові) є рівень, який перевищує референтний рівень, наприклад, на приблизно 100-700 нг/мл. Відповідно до деяких варіантів здійснення підвищеним рівнем лізосомального SPM в біологічному зразку (наприклад, зразку крові) є рівень, який перевищує референтний рівень щонайменше в приблизно 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 або 10 раз або більше (або будь-яке значення у даному діапазоні). Наприклад, рівень може перевищувати щонайменше приблизно в 3 рази. Відповідно до деяких варіантів здійснення дозу засобу для ERT з більш високою концентрацією не вводять, якщо підвищений рівень лізосомального SPM виявляють після введення попередньої дози.

[0028] Крім контролю терапії та терапевтичних способів, у даному документі розкриті способи скринінгу і/або діагностики у суб'єкта асоційованого з ASM порушення (наприклад, NPD). Відповідно до деяких варіантів здійснення спосіб включає забір у суб'єкта біологічного зразка, вимірювання рівня лізосомального SPM в зразку, порівняння рівня лізосомального SPM в зразку з референтним рівнем та виявлення/діагностику асоційованого з ASM порушення, якщо рівень лізосомального SPM у зразку підвищений відносно референтного зразка. Відповідно до деяких варіантів здійснення референтним зразком є зразок від контрольного суб'єкта, який не має асоційованого з ASM порушення. Відповідно до деяких варіантів здійснення відносно асоційованого з ASM порушення можна проводити скринінг і/або діагностувати його, якщо рівень лізосомального SPM в біологічному зразку (наприклад, у зразку крові, такому як зразок плазми крові, зразок сироватки крові або пляма висушеної крові) вище референтного рівня у приблизно 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 або 10 раз або більше (або будь-яке значення у даному діапазоні) або вище референтного рівня щонайменше приблизно на 200-2000 нг/мл, наприклад, щонайменше приблизно на 200 нг/мл, щонайменше приблизно на 250 нг/мл, щонайменше приблизно на 300 нг/мл, щонайменше приблизно на 400 нг/мл, щонайменше приблизно на 500 нг/мл, щонайменше приблизно на 525 нг/мл, щонайменше приблизно на 575 нг/мл, щонайменше приблизно на 700 нг/мл і/або щонайменше приблизно на 900 нг/мл (наприклад, вище приблизно на 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 або 2000 нг/мл або будь-яку концентрацію в даному діапазоні). Відповідно до деяких варіантів здійснення біологічний зразок від нормального суб'єкта може характеризуватися рівнем лізосомального SPM у діапазоні приблизно 25-200 нг/мл (наприклад, приблизно 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175 або 200 нг/мл або будь-якою концентрацією в даному діапазоні).

Вимірювання лізосомального SPM



[0029] Опис хімічної структури лізосомального SPM, див., наприклад, Ito et al., J. Biol. Chem. 270: 24370-4 (1995); див. також Cayman Chemical Co., номер виробу 10007947, як пропонується у їхньому каталозі на:

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

[0030] Способи, розкриті в даному документі, включають вимірювання лізосомального SPM в різних біологічних зразках, у тому числі зразках з периферичних тканин. Можна використовувати будь-які способи забору, отримання та кількісного визначення рівня лізосомального SPM в біологічному зразку. Рівень лізосомального SPM в біологічному зразку можна кількісно визначити за допомогою спектрометра, такого як мас-спектрометр, наприклад, LC/MS/MS, або електромагнітний частотний спектрометр, наприклад, UV-VIS, IR або NMR. Відповідно до деяких варіантів здійснення способів кількісного визначення рівня лізосомального SPM може включати забір біологічного зразка (наприклад, за допомогою пункції артерії або вени, біопсії тканин, букального мазка, забору зразка сечі тощо), виявлення і/або відділення лізосомального SPM від інших компонентів зразка (наприклад, за допомогою антитіла, хімічного індикатора, мас-спектрометра, такого як LC/MS/MS, або електромагнітного частотного спектрометра, такого як UV-VIS, IR або NMR) та порівняння рівня лізосомального SPM з рівнем у референтному зразку.

[0031] Рівні лізосомального SPM можна вимірювати у біологічних зразках різних тканин за допомогою способів, описаних у даному документі. Наприклад, з метою виявлення підвищених рівнів лізосомального SPM можна збирати біологічні зразки з периферичних тканин, таких як плазма крові, цільна кров (наприклад, пляма висушеної крові), сироватка крові, шкіра і/або сеча. Можна також використовувати біологічні зразки з інших тканин, наприклад, тканини селезінки, легені, серця, печінки, нирки і/або головного мозку. Можна використовувати зразки з комбінацій двох або більше тканин (наприклад, 2, 3, 4, 5 або більше тканин). Відповідно до деяких варіантів здійснення використання біологічного зразка з периферичної тканини може виключати необхідність інвазивних процедур, таких як біопсія печінки.

[0032] Відповідно до деяких варіантів здійснення біологічний зразок піддають одній або декільком стадіям попередньої обробки перед виявленням і/або вимірюванням в зразку лізосомального SPM. Відповідно до певних варіантів здійснення зразок попередньо обробляли шляхом центрифугування, фільтрації, осадження, діалізу або хроматографії або за допомогою комбінації таких стадій попередньої обробки. Відповідно до інших варіантів здійснення зразок попередньо обробляли шляхом заморожування, хімічної фіксації, заливання у парафін, дегідратації, пермеабілізації і/або гомогенізації з наступним центрифугуванням, фільтрацією, осадженням, діалізом і/або хроматографією. Відповідно до певних варіантів здійснення зразок попередньо обробляли шляхом видалення клітин певного типу зі зразка або шляхом видалення дебрису зі зразка перед оцінюванням рівня лізосомального SPM.

[0033] Відповідно до різних варіантів здійснення біологічний зразок оцінюють з використанням пристрою для кількісного або напівкількісного визначення рівня одного або декількох маркерів в зразку. Наприклад, рівень лізосомального SPM і/або інших маркерів в зразку можна визначати кількісно або напівкількісно. Відповідно до деяких варіантів здійснення можна використовувати пристрій для кількісного визначення рівня лізосомального SPM і/або інших маркерів в біологічному зразку, такий як пристрій для рідинної тандемної хромато-мас-спектрометрії (наприклад, LC/MS/MS). Відповідно до деяких варіантів здійснення можна використовувати одне або декілька антитіл або інших засобів детектування для зв'язування лізосомального SPM і/або інших маркерів в біологічному зразку. Можна використовувати один або декілька засобів (наприклад, засіб для колориметрії), які вступають в реакцію із засобом для детектування з метою випромінювання визначуваного сигналу, потужність, інтенсивність, колір тощо якого можна використовувати для напівкількісного або кількісного визначення в зразку рівня лізосомального SPM і/або інших маркерів (наприклад, шляхом порівняння сигналу від одного або декількох референтних зразків). Можна використовувати додаткові способи кількісного визначення лізосомального SPM і/або інших маркерів в біологічному зразку, наприклад, імунологічні аналізи, такі як ELISA, імунопреципітація та вестерн-блотинг, а також методики сортування флуоресцентно-активованих клітин (FACS), резонансного перенесення енергії флуоресценції (FRET), ПЛР із зворотною транскрипцією і/або нозерн-блотингу.

Ведення лікування асоційованого з ASM порушення

[0034] Відповідно до різних варіантів здійснення рівні лізосомального SPM можна вимірювати в ході терапії асоційованого з ASM порушення. Наприклад, асоційоване з ASM порушення, може являти собою хворобу Німана-Піка (NPD), наприклад, NPD-A, NPD-B або NPD-C. Терапія асоційованого з ASM порушення може включати введення одного або декількох терапевтичних засобів, які знижують рівні SPM у тканинах пацієнта (наприклад, засіб для ERT,

засіб для терапії шаперонами і/або засіб для субстрат-редукувальної терапії). Наприклад, можна застосовувати спосіб інтраіндивідуальної ферментозамісної терапії (ERT) з ескалацією дози, такий як спосіб з ескалацією дози ASM, розкритий у заявці США № 2011/0052559, яку включено у даний документ за допомогою посилання у повному обсязі (див., наприклад, абзаци [0063] - [0075], в яких описані протоколи ескалації дози).

[0035] Відповідно до різних варіантів здійснення розкритий спосіб контролю суб'єкта відносно небажаного побічного ефекту (наприклад, утворення токсичних або шкідливих рівнів метаболітів) шляхом контролю маркера, такого як лізосомальний SPM, під час терапії з ескалацією дози асоційованого з ASM порушення. Спосіб може включати забір у суб'єкта біологічного зразка, вимірювання в зразку рівня лізосомального SPM, порівняння рівня лізосомального SPM в зразку з референтним рівнем та виявлення небажаного побічного ефекту, якщо рівень лізосомального SPM в зразку підвищений у порівнянні з референтним зразком. Можна збирати та оцінювати один або декілька зразків після введення дози терапевтичного засобу або перед введенням наступної дози. Наприклад, зразки можна збирати та оцінювати через 1 хвилину, 5 хвилин, 10 хвилин, 30 хвилин або 45 хвилин, або через 1, 2, 3, 5, 10, 12, 15 або 20 годин, або через 1, 2, 3, 4, 5 днів, або через 1, 2, 3 або 4 тижні після введення терапевтичної дози, або будь-якого періоду часу в даних діапазонах, або перед введенням наступної дози. Відповідно до деяких варіантів здійснення референтним зразком є зразок від контрольного суб'єкта, який не має асоційованого з ASM порушення. Відповідно до деяких варіантів здійснення референтний зразок являє собою більш ранній отриманий біологічний зразок від суб'єкта перед введенням дози терапевтичного засобу з більш високою концентрацією (або перед введенням будь-якого терапевтичного засобу). Відповідно до деяких варіантів здійснення, якщо рівень лізосомального SPM підвищується на попередньо визначену кількість або вище попередньо визначеного порогового значення після введення початкової дози або після введення підвищеної (тобто, у більш високій концентрації) дози терапевтичного засобу (наприклад, з більш високою концентрацією засобу для ERT) у порівнянні з рівнем у референтному зразку, то це можна використовувати як ознаку небажаного побічного ефекту, що виникає в результаті лікування. Відповідно до певних варіантів здійснення, якщо рівень лізосомального SPM не підвищений або не підвищується вище порогового рівня, то це можна використовувати як ознаку, що вказує на відсутність виникнення небажаного побічного ефекту.

[0036] Відповідно до різних варіантів здійснення запропонована терапія асоційованого з ASM порушення. Дана терапія може включати введення одного або декількох терапевтичних засобів, які знижують рівень SPM у тканинах пацієнта (наприклад, засобу для ERT, засобу для терапії шаперонами і/або засобу для субстрат-редукувальної терапії). Відповідно до певних варіантів здійснення терапія може включати ERT (наприклад, ASM-замісну терапію). Терапія може включати контроль суб'єкта відносно підвищених рівнів лізосомального SPM під час терапії та коректування концентрації терапевтичного засобу (наприклад, концентрації дози засобу для ERT) для зниження рівнів лізосомального SPM нижче попередньо визначеного порогового рівня. Відповідно до деяких варіантів здійснення контроль включає оцінювання зразка відносно підвищених рівнів лізосомального SPM після кожної дози терапевтичного засобу або перед введенням кожної наступної дози терапевтичного засобу. Відповідно до певних варіантів здійснення контроль після кожної дози є обов'язковим і проводиться періодично після визначених доз терапевтичного засобу або перед введенням визначеної наступної дози терапевтичного засобу.

[0037] Відповідно до деяких варіантів здійснення терапія може включати введення засобу для ERT (наприклад, ASM-замісної терапії) у послідовних дозах у зростаючій концентрації, забір у пацієнта біологічних зразків після визначених доз (наприклад, після кожної дози або перед кожною наступною дозою), виявлення рівня лізосомального SPM в зразку (наприклад, за допомогою LC/MS/MS) та контроль суб'єкта відносно підвищених рівнів лізосомального SPM після кожної дози або перед введенням наступної дози. Наприклад, біологічні зразки можна збирати та піддавати контролю відносно підвищеного рівня лізосомального SPM через 1 хвилину, 5 хвилин, 10 хвилин, 30 хвилин або 45 хвилин, або через 1, 2, 3, 5, 10, 12, 15 або 20 годин, або через 1, 2, 3, 4, 5 днів, або через 1, 2, 3 або 4 тижні після введення дози засобу для ERT, або у будь-який період часу в даних діапазонах, або перед введенням наступної дози. Контроль суб'єкта може включати забір у суб'єкта біологічного зразка, вимірювання в зразку рівня лізосомального SPM, порівняння рівня лізосомального SPM в зразку з референтним рівнем та коректування дози засобу для ERT, якщо рівень лізосомального SPM в зразку підвищений на попередньо визначену кількість у порівнянні з референтним зразком. Відповідно до деяких варіантів здійснення референтним зразком є зразок від контрольного суб'єкта, який не має асоційованого з ASM порушення. Відповідно до деяких варіантів здійснення

референтний зразок являє собою більш ранній отриманий біологічний зразок від суб'єкта перед введенням дози засобу для ERT з більш високою концентрацією (або перед введенням будь-якого засобу для ERT). Відповідно до деяких варіантів здійснення, якщо рівень лізосомального SPM підвищується на попередньо визначену кількість в зразку від суб'єкта і/або перевищує

5 референтне порогове значення, то це можна використати як ознаку того, що дозу засобу для ERT потрібно знизити, відкласти її введення або відмінити для уникнення утворення токсичних або шкідливих рівнів метаболіту. Відповідно до деяких варіантів здійснення, якщо рівень лізосомального SPM перебуває на рівні або нижче порогового значення, то можна вводити наступну дозу, що відповідає цій концентрації або з більш високою концентрацією.

10 [0038] Відповідно до деяких варіантів здійснення запропоновано терапію з ескалацією дози, яка включає введення суб'єкту засобу для ERT у збільшуваних дозах протягом часу для зниження об'єму накопиченого SPM без утворення токсичних або шкідливих рівнів метаболітів, які утворюються в результаті швидкого гідролізу накопиченого SPM. Відповідно до деяких варіантів здійснення біологічні зразки від пацієнта контролюють відносно підвищених рівнів

15 лізосомального SPM під час терапії з ескалацією дози, через те, що підвищений лізосомальний SPM буде вказувати на утворення токсичних або шкідливих рівнів метаболіту. Відповідно до деяких варіантів здійснення, якщо виявляють рівні лізосомального SPM вище порогової концентрації або виявляють значне підвищення рівнів лізосомального SPM у порівнянні з рівнями у попередньому зразку, то введення підвищеної дози засобу для ERT відкладають або

20 її не вводять. Засіб для ERT можна вводити за допомогою будь-якого шляху, придатного для досягнення терапевтичного ефекту, у тому числі внутрішньовенно, внутрішньошкірно, підшкірно, інтраперитонеально, внутрішньолегеново, місцево, інтраназально, інтракраніально або внутрішньом'язово.

25 [0039] Відповідно до деяких варіантів здійснення ERT може включати введення кислій сфінгомієлінази (ASM), такої як рекомбінантна ASM людини (rhASM), або ERT може включати введення модифікованої ASM (наприклад, модифікованої rhASM). Модифікована ASM може містити будь-яку модифікацію ферменту, яка несуттєво змінює його здатність гідролізувати лізосомальний сфінгомієлін до кераміду та фосфорилхоліну (наприклад, модифікована ASM проявляє щонайменше 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 95, 99, 99,5 або 99,9 % активності ферменту

30 немодифікованої ASM або будь-який відсоток в даному діапазоні). Гідролітичний потенціал модифікованої ASM можна визначати за допомогою методик, відомих спеціалісту в даній галузі, таких як описані в патентах США №№ 4039388, 4082781, 5686240 і 7563591, та міжнародних публікаціях №№ WO 2007/078806 і WO 2006/058385, які включені у даний документ за допомогою посилання у повному обсязі.

35 [0040] Відповідно до деяких варіантів здійснення ERT може включати введення рекомбінантної ASM людини (rhASM) або модифікованої rhASM. Існують різні ізоформи ASM людини, відомі в даній галузі, усі з яких можна використовувати у способах, розкритих у даному документі. Див., наприклад, заявку на патент США №2011/0052559, яку включено у даний документ за допомогою посилання у повному обсязі (див., наприклад, опис ізоформ ASM

40 людини та кон'югатів їхніх ферментів та їхнє використання в ERT в абзацах [108] - [0117] та [0124] - [0127]).

[0041] Відповідно до деяких варіантів здійснення засіб для ферментозамісної терапії вводять суб'єкту при початковій низькій нетоксичній дозі, яку потім підвищують при наступних введеннях. Найвищу дозу ферменту, яку суб'єкт може переносити без утворення в нього токсичних або шкідливих рівнів метаболіту (як виявляють, наприклад, за допомогою контролю

45 рівнів маркера токсичності, такого як лізосомальний SPM), можна потім застосовувати як підтримувальну дозу. Як альтернатива, терапевтично ефективну дозу, яка менша найвищої переносимої дози можна застосовувати як підтримувальну дозу. Терапевтично ефективна доза може включати в себе будь-яку дозу, яка є достатньою для зниження в суб'єкта з асоційованим з ASM порушенням концентрації накопиченого сфінгомієліну щонайменше приблизно на 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 або 99 % (або будь-який відсоток в даному діапазоні) після одного або декількох курсів введення.

[0042] Лікування асоційованих з ASM порушень, таких як NPD, потребує достатньо високих доз терапевтичного засобу (наприклад, засобу для ERT, засобу для терапії шаперонами і/або

55 засобу для субстрат-редукуючої терапії) для досягнення відповідного розподілу терапевтичного засобу в уражених органах (наприклад, селезінці, легенях, печінці, серці, нирці та головному мозку). Було показано, що після внутрішньовенного введення рекомбінантної ASM людини у нокаутів по ASM мишей більшу частину активності ASM виявляють в печінці, при цьому невеликі кількості ферментативної активності ASM виявляли в інших органах, таких як селезінка, серце, печінка, нирка та легень. Див., наприклад, He et al., *Biochimica et Biophysica*

60

Акта 1432: 251-264 (1999). Таким чином, для забезпечення відповідного розподілу та доставки, наприклад, в легеню, печінку, серце та нирку суб'єкта з асоційованим з ASM порушенням, таким як NPD, можуть бути потрібні дози з підвищеною концентрацією терапевтичного засобу (наприклад, високі концентрації замінного ферменту).

[0043] Дослідження на нокаутуваних по ASM мишах також показали, що ферментозамісна терапія може при достатньо високих дозах призводити до утворення токсичних або в іншому відношенні шкідливих метаболітів сфінгомієліну. Див., наприклад, C. Nickerson, et al., American Society of Human Genetics (2005); та J. Murray et al., Society of Toxicology (2006). Без заглиблення в теорію, введення суб'єктам з NPD високих доз ASM може приводити до гідролізу великих кількостей накопиченого сфінгомієліну в церамід і фосфорилхолін. Церамід, як відомо, відіграє роль у загибелі клітин та може бути проапоптотичним засобом. Див., наприклад, Smith and Schuchman, FASEB 22: 3419-3431 (2008). Таким чином, церамід може сприяти виникненню токсичних побічних ефектів, які спостерігають у нокаутуваних по ASM мишей та у суб'єктів з NPD.

[0044] Таким чином, підбір точної дози засобу для терапії та узгодження виду терапії (наприклад, ERT, терапія шаперонами і/або субстрат-редуквальна терапія) необхідні для забезпечення достатньої концентрації терапевтичного засобу, щоб знизити об'єм накопиченого або запобігти додатковому накопиченню лізосомального сфінгомієліну в уражених органах, що попереджує у той же час утворення надмірних концентрацій токсичних метаболітів. Відповідно до деяких варіантів здійснення дана узгодженість забезпечується шляхом контролю протоколу ескалації дози за допомогою визначення в зразку від пацієнта рівнів маркеру токсичності, такого як лізосомальний SPM, після певних доз або після кожної дози, та за необхідності, коректування режиму дозування, який описано в даному документі. Контроль дози терапевтичного засобу може включати підвищення, зниження або підтримку концентрації терапевтичного засобу і/або припинення лікування.

[0045] Відповідно до різних варіантів здійснення способів лікування з ескалацією дози включає введення суб'єкту однієї або декількох початкових, низьких доз терапевтичного засобу (наприклад, замінного ферменту) для зниження кількості сфінгомієліну, який накопичився у суб'єкта. Дозу терапевтичного засобу потім можна вводити у систематично більш високих концентраціях доти, доки не буде досягнута найвища доза, яка переноситься суб'єктом та є терапевтично ефективною. Відповідно до деяких варіантів здійснення терапевтичний засіб являє собою замінний фермент (наприклад, rhASM) та його вводять таким чином, що ферментативна активність в одному або декількох уражених органах (наприклад, органі, у якому проявляються підвищені лізосомальні рівні SPM у пацієнта, що страждає на асоційоване з ASM порушення) становить щонайменше 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, 10 %, 12 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 50 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % (або будь-який відсоток в даному діапазоні) від рівня активності у відповідному органі у суб'єкта, який не страждає на асоційоване з ASM порушення (наприклад, у здорового суб'єкта).

[0046] Відповідно до деяких варіантів здійснення способів лікування асоційованого з ASM порушення може включати: (a) застосування ферментозамісної схеми для зниження об'єму накопиченого субстрату сфінгомієліну у суб'єкта, яке включає: (i) введення суб'єкту початкової низької дози rhASM або модифікованої rhASM та (ii) введення суб'єкту послідовно більш високих доз rhASM або модифікованої rhASM (ескалація дози); (b) контроль суб'єкта відносно підвищених рівнів лізосомального SPM і/або відносно одного або декількох додаткових маркерів небажаного побічного ефекту після певних доз або після кожної дози, яку вводять на стадіях (a)(i) та (a)(ii) (наприклад, за допомогою LC/MS/MS для кількісного визначення концентрації лізосомального SPM); (c) повторення, зниження дози і/або відміну протоколу з ескалацією дози після виявлення підвищених рівнів лізосомального SPM і/або після виявлення одного або декількох додаткових небажаних побічних ефектів. Відповідно до певних варіантів здійснення способу додатково включає застосування підтримувальної схеми, що включає введення дози як підтримувальної дози, яка дорівнює найвищій дозі, яку переносить суб'єкт, або менша неї, та необов'язково додатковий контроль відносно підвищених рівнів лізосомального SPM під час застосування підтримувальної схеми. Відповідно до певних варіантів здійснення початкова доза rhASM або модифікованої rhASM може варіювати від приблизно 0,03 мг/кг до приблизно 1,0 мг/кг або від приблизно 0,1 мг/кг до приблизно 0,5 мг/кг (концентрацію дози вимірюють в мг ферменту на кг ваги тіла). Відповідно до деяких варіантів здійснення кожну наступну дозу з підвищеною концентрацією ферменту вводять через приблизно 1, 2, 3, 4, 5, 6 або 7 днів або 1, 2, 3, 4 або 5 тижнів після попередньої дози. Відповідно до деяких варіантів здійснення наступна доза з підвищеною концентрацією ферменту може становити від приблизно 0,1 до 5 мг/кг

(наприклад, приблизно 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 або 5 мг/кг або будь-яку концентрацію в даному діапазоні).

[0047] Відповідно до деяких варіантів здійснення дози замісного ферменту у певній концентрації вводять щонайменше двічі (наприклад, щонайменше 2, 3, 4 або 5 разів) перед введенням наступної дози з більш високою концентрацією. Відповідно до певних варіантів здійснення послідовно більш висока доза може бути на приблизно 0,03 мг/кг, 0,05 мг/кг, 0,1 мг/кг, 0,2 мг/кг, 0,3 мг/кг, 0,4 мг/кг, 0,5 мг/кг, 0,6 мг/кг, 0,7 мг/кг, 0,8 мг/кг, 0,9 мг/кг, 1 мг/кг, 1,2 мг/кг, 1,5 мг/кг, 1,75 мг/кг, 2 мг/кг, 3 мг/кг, 4 мг/кг або 5 мг/кг вищою, ніж попередня доза (або будь-яке значення у даному діапазоні). Відповідно до деяких варіантів здійснення послідовно більш висока доза може бути на від приблизно 0,03 до приблизно 0,1 мг/кг, від приблизно 0,1 мг/кг до приблизно 0,5 мг/кг, від приблизно 0,5 мг/кг до приблизно 1 мг/кг, від приблизно 0,5 мг/кг до приблизно 2 мг/кг, від приблизно 1 мг/кг до приблизно 2 мг/кг, від приблизно 2 мг/кг до приблизно 4 мг/кг або від приблизно 2 мг/кг до приблизно 5 мг/кг вищою, ніж попередня доза (або будь-яке значення у даному діапазоні). Відповідно до певних варіантів здійснення найвища доза, яка переноситься суб'єктом без утворення токсичних або шкідливих метаболітів, може становити від приблизно 1,0 мг/кг до приблизно 3,0 мг/кг. Відповідно до деяких варіантів здійснення найвищу переносиму дозу послідовно вводять людині-суб'єкту як підтримувальну дозу. Відповідно до деяких варіантів здійснення підтримувальну дозу вводять приблизно кожні 1-8 тижнів (наприклад, кожні 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 або 8 тижнів або будь-який період часу в даному діапазоні).

[0048] Відразу ж після виявлення максимальної переносимої дози (наприклад, дози, яка не призводить до утворення токсичних або в іншому відношенні шкідливих рівнів метаболітів), її можна використовувати як підтримувальну дозу для лікування суб'єкта в подальшому. Підтримувальну дозу можна вводити щодня, щотижня, раз на два тижні, щомісяця, раз на два місяці або щокварталу (або з будь-яким інтервалом часу між ними). Контроль відносно підвищення рівнів лізосомального SPM можна проводити при введенні згідно з підтримувальною схемою лікування, наприклад, через 1, 2, 3, 5, 10, 12, 15 або 20 годин, або 1, 2, 3, 4, 5 днів, або 1, 2, 3 або 4 тижні після введення підтримувальної дози або будь-який період часу між ними. Якщо виявляють підвищені рівні лізосомального SPM (наприклад, рівні, що вище референтного рівня на приблизно 100-700 нг/мл, або рівні щонайменше в приблизно 1,1-10 раз вище референтного рівня), то підтримувальну дозу знижують або відміняють.

[0049] Певні інші параметри можна вимірювати в комбінації з лізосомальним SPM для контролю суб'єкта під час терапії (наприклад, під час ERT) і/або як частину терапії для визначення максимальної дози, яку може переносити суб'єкт. Наприклад, суб'єкта можна додатково піддавати контролю шляхом вимірювання рівнів SPM, рівнів кераміду плазми крові і/або концентрацій білірубину. Суб'єкта також можна піддавати контролю відносно утворення "реактантів гострої фази" та медіаторів запалення, які являють собою показник запальних реакцій, і/або відносно інших біохімічних маркерів. Ці інші біохімічні маркери можуть включати без обмежень CRP/hs-CRP, цитокіни (наприклад, IL-8, IL-6), кальцитонін та феритин. Відповідно до деяких варіантів здійснення за одним або декількома параметрами, переліченими вище, можна проводити контроль для того, щоб упевнитися в стабільній відповіді на терапію перед підвищенням дози до більш високої концентрації. Відповідно до деяких варіантів здійснення суб'єкта також можна контролювати відносно одного або декількох відповідних небажаних явищ, які можуть включати системні симптоми (наприклад, лихоманку, нудоту, блювання, біль, міалгію та жовтяницю). Комбінації маркерів також можна контролювати (наприклад, можна контролювати рівні лізосомального SPM у комбінації з рівнями білірубину і/або кераміду). Придатні порогові рівні маркерів, які можна контролювати разом з лізосомальним SPM, розкриті, наприклад, у заявці США № 2011/0052559, яка включена в даний документ шляхом посилання у повному обсязі (див., наприклад, абзаци [0067] - [0086]).

[0050] Відповідно до деяких варіантів здійснення суб'єкта, якого піддавали лікуванню згідно з протоколом з ескалацією дози (наприклад, протоколу з ескалацією дози засобу для ERT), контролюють відносно токсичних або шкідливих побічних ефектів (наприклад, за допомогою контролю рівнів одного або декількох маркерів токсичності, таких як лізосомальний SPM) після кожного курсу введення терапевтичного засобу (наприклад, через приблизно 1 хвилину, 5 хвилин, 10 хвилин, 30 хвилин, або 45 хвилин, або 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 12, 18 або 24 години, або 2, 3, 4, 5, 6 або 7 днів, або 1, 2, 3 або 4 тижні або більше після введення або через будь-який період часу між ними) або перед введенням більш високої концентрації терапевтичного засобу. Відповідно до деяких варіантів здійснення суб'єкта контролюють після кожного введення підтримувальної дози (наприклад, через приблизно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 12, 18 або 24 години, або 2, 3, 4, 5, 6 або 7 днів, або 1, 2, 3 або 4 тижні або більше після введення або через будь-

який період часу між ними), або перед введенням наступної підтримувальної дози терапевтичного засобу. Відповідно до деяких варіантів здійснення суб'єкт отримує підтримувальну дозу протягом одного, двох, трьох або більше років, та його періодично контролюють відносно токсичних або шкідливих побічних ефектів. Контроль може включати контроль маркерів токсичності, згаданих вище, а також контроль відповідних небажаних явищ. Якщо суб'єкт зазнає небажаного явища або якщо один або декілька з контрольованих маркерів вказують на шкідливий побічний ефект (наприклад, якщо виявлено підвищений рівень лізосомального SPM), то введення підтримувальної дози можна завершити або скоректувати (наприклад, можна вводити знижену концентрацію засобу для ERT) для зниження або зведення до мінімуму небажаного побічного ефекту.

[0051] Відповідно до різних варіантів здійснення суб'єкта можна контролювати відносно токсичної і/або в іншому відношенні шкідливої дози засобу для ERT за допомогою вимірювання рівнів лізосомального SPM в біологічному зразку, отриманому після введення дози засобу для ERT (наприклад, після введення rhASM або модифікованої rhASM). Відповідно до деяких варіантів здійснення спосіб може включати забір у суб'єкта біологічного зразка, вимірювання в зразку рівня лізосомального SPM, порівняння рівня лізосомального SPM в зразку з референтним рівнем та виявлення небажаного побічного ефекту, якщо рівень лізосомального SPM в зразку підвищений у порівнянні з референтним зразком або підвищений на певну кількість у порівнянні з референтним зразком. Відповідно до деяких варіантів здійснення наступну дозу засобу для ERT у більш високій концентрації вводять, якщо тільки рівень лізосомального SPM в біологічному зразку не вищий визначеного порогового значення після введення попередньої дози. У даному документі описані приклади відповідних порогових рівнів. Відповідно до деяких варіантів здійснення рівні лізосомального SPM також контролюють при введенні підтримувальної дози. Відповідно до деяких варіантів здійснення, якщо рівень лізосомального SPM перевищує визначене порогове значення при введенні підтримувальної дози, то введення підтримувальної дози припиняють або вводять більш низьку дозу, яка не приводить до рівня лізосомального SPM вище визначеного порогового значення.

[0052] Відповідно до деяких варіантів здійснення можна виявити небажаний побічний ефект ERT, якщо рівень лізосомального SPM в біологічному зразку вищий попередньо визначеного референтного рівня. Відповідно до деяких варіантів здійснення можна виявити небажаний побічний ефект, якщо рівень лізосомального SPM в біологічному зразку (наприклад, зразку крові) вищий референтного рівня на приблизно 100-700 нг/мл (наприклад, вище на приблизно 100, 200, 250, 300, 400, 500, 600 або 700 нг/мл або будь-якої концентрації у даному діапазоні). Відповідно до деяких варіантів здійснення можна виявити небажаний побічний ефект, якщо рівень лізосомального SPM в біологічному зразку (наприклад, зразку крові) вищий референтного рівня щонайменше в приблизно 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 або 10 раз або більше (або будь-якого значення у даному діапазоні). Наприклад, підвищення може бути щонайменше приблизно 3-кратним.

[0053] Відповідно до деяких варіантів здійснення способи лікування асоційованого з ASM порушення, запропоновані в даному документі, зменшують об'єм селезінки, що визначено за допомогою методик, відомих в даній галузі, наприклад, MRI. Відповідно до певних варіантів здійснення способи зменшують рівні сфінгомієліну в печінці, що визначено за допомогою методик, відомих в даній галузі, наприклад, біохімічного аналізу і/або гістоморфометричного аналізу зразків печінки. Відповідно до деяких варіантів здійснення способи підвищують здатність переносити фізичне навантаження, що визначено за допомогою методик, відомих в даній галузі, наприклад, максимального робочого навантаження з використанням велоергометрії, у тому числі, відсотка розрахункового максимального навантаження, пікового споживання кисню і/або вироблення діоксиду вуглецю. Відповідно до деяких варіантів здійснення способи підвищують функцію легенів і/або покращують легеневий кліренс, що визначено за допомогою методик, відомих в даній галузі, наприклад, DLco, FVC, FEV і/або TLC. Відповідно до певних варіантів здійснення способи знижують сфінгомієлін у бронхоальвеолярному лаважі (BAL). Відповідно до певних варіантів здійснення способи поліпшують зовнішній вигляд легенів, що визначено за допомогою методик, відомих в даній галузі, наприклад, СТ-дослідження високої розрізнявальної здатності і/або рентгенографії грудної клітки.

[0054] Відповідно до різних варіантів здійснення способи лікування асоційованих з ASM порушень, які запропоновано в даному документі, знижують концентрацію сфінгомієліну в печінці, шкірі і/або плазмі крові і/або знижують сироваткову хітотриозидазу, рівні CCL18, лізосомальний SPM, керамід і/або білірубін. Відповідно до деяких варіантів здійснення способи поліпшують у суб'єкта ліпідограну (наприклад, знижують холестерин). Відповідно до деяких

варіантів здійснення способи поліпшують у суб'єкта одну або декілька неврологічних функцій (наприклад, психомоторну функцію, соціальну сприйнятливість тощо). Відповідно до деяких варіантів здійснення способи знижують або полегшують тяжкість і/або тривалість асоційованого з ASM порушення і/або одного або декількох симптомів, асоційованих з даним порушенням.

5 Відповідно до деяких варіантів здійснення способи попереджають рецидив симптому, обумовленого асоційованим з ASM порушенням. Відповідно до деяких варіантів здійснення способи підвищують рівень виживання суб'єктів після лікування.

Скринінг і/або діагностика асоційованого з ASM порушення

10 [0055] Відповідно до різних варіантів здійснення в даному документі розкриті способи скринінгу і/або діагностики асоційованого з ASM порушення. Відповідно до деяких варіантів здійснення асоційоване з ASM порушення являє собою хворобу Німана-Піка (NPD). Відповідно до деяких варіантів здійснення порушення являє собою NPD типу А, типу В і/або типу С. Відповідно до деяких варіантів здійснення відносно асоційованого з ASM порушення (наприклад, NPD) можна проводити скринінг і/або діагностувати його шляхом вимірювання

15 рівнів лізосомального SPM в біологічному зразку, отриманому від суб'єкта.

[0056] Відповідно до деяких варіантів здійснення спосіб скринінгу або діагностики асоційованого з ASM порушення може включати забір у суб'єкта біологічного зразка, вимірювання рівня лізосомального SPM в зразку, порівняння рівня лізосомального SPM в зразку з референтним рівнем та виявлення/діагностику асоційованого з ASM порушення, якщо рівень

20 лізосомального SPM в зразку підвищений у порівнянні з референтним рівнем. Відповідно до деяких варіантів здійснення референтний рівень являє собою рівень лізосомального SPM, виміряний в зразку від контрольного суб'єкта, який не має асоційованого з ASM порушення. Відповідно до деяких варіантів здійснення асоційоване з ASM порушення можна виявити/діагностувати, якщо рівень лізосомального SPM в біологічному зразку від суб'єкта

25 вище, ніж попередньо визначений референтний рівень. Відповідно до деяких варіантів здійснення асоційоване з ASM порушення можна виявити/діагностувати, якщо рівень лізосомального SPM в біологічному зразку (наприклад, зразку крові) вище референтного рівня щонайменше приблизно на 200-2000 нг/мл, наприклад, вище на приблизно 200 нг/мл, вище на приблизно 300 нг/мл, вище на приблизно 400 нг/мл, вище на приблизно 500 нг/мл, вище на

30 приблизно 525 нг/мл, вище на приблизно 575 нг/мл і/або вище на приблизно 700 нг/мл (наприклад, вище на приблизно 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 або 2000 нг/мл або будь-яку концентрацію у даному діапазоні). Відповідно до деяких варіантів здійснення асоційоване з ASM порушення можна виявити/діагностувати, якщо рівень

35 лізосомального SPM в біологічному зразку (наприклад, зразку крові) вище референтного рівня в приблизно 1-10 разів.

[0057] Біологічні зразки з різних тканин можна використовувати у способах скринінгу та діагностики, описаних у даному документі. Наприклад, з метою контролю підвищених рівнів лізосомального SPM можна використовувати біологічні зразки з периферичних тканин, таких як

40 плазма крові, цільна кров (наприклад, пляма висушеної крові), сироватка крові, шкіра і/або сеча. Можна також використовувати біологічні зразки з інших тканин, наприклад, тканини селезінки, легені, печінки, серця, нирки і/або головного мозку. Можна використовувати зразки з комбінацій двох або більше тканин (наприклад, 2, 3, 4, 5 або більше тканин). Відповідно до деяких варіантів здійснення асоційоване з ASM порушення (наприклад, NPD), можна виявити/діагностувати

45 шляхом вимірювання рівнів лізосомального SPM в біологічному зразку, відібраному з периферичної тканини. Відповідно до певних варіантів здійснення периферичною тканиною може бути плазма крові, цільна кров (наприклад, пляма висушеної крові), сироватка крові і/або сеча. Використання зразка з периферичної тканини може усунути необхідність інвазивних процедур, таких як біопсія печінки.

50 [0058] Відповідно до різних варіантів здійснення способи скринінгу і/або діагностики, розкриті у даному документі, можуть додатково включати введення суб'єкту терапевтичного засобу (наприклад, засобу для ферментозамісної терапії), якщо виявлено/діагностовано асоційоване з ASM порушення. Відповідно до деяких варіантів здійснення ферментозамісна терапія включає введення суб'єкту rhASM або модифікованої rhASM.

55 Набір

[0059] Відповідно до різних варіантів здійснення у даному документі розкритий набір, що містить пристрій для забору біологічного зразка, який містить лізосомальний SPM і/або інші маркери асоційованого з ASM порушення, та інструкції по застосуванню набору для вимірювання рівня лізосомального SPM і/або інших маркерів в біологічному зразку. Відповідно

60 до деяких варіантів здійснення пристрій для забору біологічного зразка може містити тестову

пробірку, шприц і/або іншу ємність для зберігання рідкого зразка, і/або тест-смужку, індикаторну смужку тощо. Також для забору біологічного зразка можна застосовувати будь-який інший пристрій, відомий у даній галузі. Відповідно до деяких варіантів здійснення біологічний зразок являє собою зразок з периферичної тканини, такої як плазма крові, цільна кров (наприклад, 5 пляма висушеної крові), сироватка крові, шкіра і/або сеча. Також можна збирати біологічні зразки з інших тканин, наприклад, з тканини селезінки, легені, серця, печінки, нирки і/або головного мозку, при цьому набір містить пристрій для забору зразка з перерахованих тканин. Можна використовувати зразки з комбінації двох або більше тканин.

[0060] Відповідно до деяких варіантів здійснення набір може додатково містити пристрій для вимірювання рівня лізосомального SPM і/або інших маркерів у біологічному зразку. Наприклад, 10 набір може включати антитіло і/або інші засоби для детектування, які можна застосовувати для виявлення у біологічному зразку лізосомального SPM або інших маркерів. Відповідно до деяких варіантів здійснення засіб для детектування включений до складу пристрою для забору тканин або нанесений на його поверхню (наприклад, антитіло або хімічний індикатор, якими просочена 15 тест-смужка), у той час як відповідно до інших варіантів здійснення засіб для детектування представлений окремо від пристрою для забору.

[0061] Відповідно до деяких варіантів здійснення набір може додатково містити пристрій для кількісного або напівкількісного визначення у зразку рівня лізосомального SPM і/або інших 20 маркерів. Наприклад, може бути запропонований засіб (наприклад, засіб для колориметрії), який вступає в реакцію із засобом для детектування з метою випромінювання визначуваного сигналу, потужність, інтенсивність, колір тощо якого можна використовувати для кількісного або напівкількісного визначення в зразку рівня лізосомального SPM і/або інших маркерів (наприклад, шляхом порівняння сигналу від одного або декількох референтних зразків). Відповідно до деяких варіантів здійснення пристрій може передбачати пристрій для відділення 25 лізосомального SPM від інших компонентів зразка, наприклад, за допомогою рідинної хроматографії і/або мас-спектрометрії. Відповідно до деяких варіантів здійснення пристрій для кількісного визначення в зразку лізосомального SPM і/або інших маркерів являє собою спектрометр, такий як мас-спектрометр, наприклад, LC/MS/MS, або електромагнітний частотний спектрометр, наприклад, UV-VIS, IR або NMR.

[0062] Відповідно до деяких варіантів здійснення набір може додатково містити інструкції 30 для порівняння рівня лізосомального SPM і/або інших маркерів в зразку з референтним рівнем та для виявлення наявності токсичних рівнів одного або декількох метаболітів і/або небажаного побічного ефекту під час лікування асоційованого з ASM порушення, якщо рівні лізосомального SPM і/або маркерів токсичності в зразку підвищені у порівнянні з одним або декількома 35 референтними зразками. Відповідно до деяких варіантів здійснення набір може додатково містити інструкції для порівняння рівня лізосомального SPM в зразку з рівнем у референтному зразку та для скринінгу і/або встановлення діагнозу асоційованого з ASM порушення, якщо рівень лізосомального SPM в зразку підвищено у порівнянні з рівнем у референтному зразку.

[0063] Відповідно до деяких варіантів здійснення набір можна застосовувати як частину 40 терапії і/або встановлення діагнозу асоційованого з ASM порушення. Відповідно до деяких варіантів здійснення асоційоване з ASM порушення являє собою NPD-A, NPD-B або NPD-C.

#### Групи суб'єктів

[0064] Відповідно до різних варіантів здійснення суб'єктом, як використовується в даному документі, є людина, яку піддають скринінгу відносно асоційованого з ASM порушення. 45 Відповідно до різних варіантів здійснення суб'єктом, як використовується в даному документі, є суб'єкт, у якого діагностовано асоційоване з ASM порушення або який проходить лікування від асоційованого з ASM порушення відповідно до способів, запропонованих в даному документі, людина, яка має або у якої діагностоване порушення, що призводить до надмірного накопичення лізосомального SPM в одному або декількох уражених органах. Відповідно до 50 деяких варіантів здійснення суб'єкт має одну або декілька мутацій у гені, що кодує кислу сфінгомієліназу, наприклад, делецію, зсув рамки, місенс-мутацію і/або нонсенс-мутацію. Відповідно до конкретних варіантів здійснення суб'єкт має NPD. Відповідно до одного варіанту здійснення суб'єкт має NPD-A, NPD-B або NPD-C.

[0065] Відповідно до деяких варіантів здійснення суб'єкт має одну або декілька мутацій в 55 гені SMPD1. Відповідно до певних варіантів здійснення мутація являє собою  $\Delta R608$  (делецію аргініну 608). Відповідно до деяких варіантів здійснення мутація являє собою місенс-мутацію. Відповідно до певних варіантів здійснення місенс-мутація являє собою L302P, H421Y або R496L. Відповідно до інших варіантів здійснення мутація являє собою делецію, яка приводить у результаті до делеції одного, двох, трьох або більше амінокислотних залишків. Відповідно до 60 конкретних варіантів здійснення суб'єкт, який проходить лікування від асоційованого з ASM



порушення, відповідно до способів, представлених в даному документі, має одну або декілька мутацій, показаних у таблиці 1 в заявці на патент США № 2011/0052559, яка включена в даний документ за допомогою посилання у повному обсязі. Див. також Simonaro et al., Am. J. Hum. Genet. 71: 1413-1419 (2002) відносно мутацій у гені кислій сфінгомієлінази (позначений як SMPD1).

[0066] Відповідно до певних варіантів здійснення суб'єкта, якого піддають скринінгу відносно асоційованого з ASM порушення, або у якого діагностовано асоційоване з ASM порушення, або який проходить лікування від асоційованого з ASM порушення відповідно до способів, представлених в даному документі, може ендogenно експресувати ASM, але з приблизно 2-5 %, 5-10 %, 5-15 %, 5-20 %, 5-30 %, 20 %-30 % або 5-35 % активності нормальної (наприклад, немутованої) ASM людини, наприклад, ASM-1. Відповідно до деяких варіантів здійснення суб'єкт ендogenно експресує ASM з менше ніж 35 %, 30 %, 25 %, 20 %, 15 %, 10 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 % або 1 % від активності нормальної ASM людини, наприклад, ASM-1. Див., наприклад, патенти США №№ 4039388, 4082781, 5686240 і 7563591 та міжнародні публікації №№ WO 2007/078806 і WO 2006/058385, які включено в даний документ шляхом посилання у повному обсязі, відносно методик, які можна використовувати для вимірювання активності ASM; див. також аналіз на основі флуоресцентної високоефективної рідинної хроматографії, описаний в He et al., Analytical Biochemistry 314: 116-120 (2003).

[0067] Відповідно до різних варіантів здійснення у суб'єкта, якого піддають скринінгу відносно асоційованого з ASM порушення, або у якого діагностовано асоційоване з ASM порушення, або який проходить лікування від асоційованого з ASM порушення відповідно до способів, представлених в даному документі, може проявлятися один або декілька симптомів NPD. Симптоми NPD можуть включати без обмежень здуття живота, гепатомегалію, спленомегалію, гепатоспленомегалію, нейтропенію, захворювання легенів, лімфоаденопатію, присутність гістохімічно характерних для NPD пінистих клітин, анемію (наприклад, мікроцитарну анемію), тромбоцитопенію, періодичне блювання, хронічний запор, порушення росту (наприклад, знижені лінійний ріст та вага тіла), затримку статевого дозрівання, рецидивні гематоми, рецидивні кровотечі, атерогенну ліпідограну (високий рівень холестерину, тригліцеридів або ЛПНГ і/або низький рівень ЛПВГ), біль (головний біль, біль у спині, кінцівках, животі), втому, почуття швидкого насичення, низьку витривалість, остеопенію, неврологічне проявлення та утруднення дихання (наприклад, інтерстиціальне захворювання легенів і/або задишку). Неврологічні прояви NPD включають симптом вишневої кісточки, гіпотонію, м'язову слабкість, затримку психомоторного розвитку, спастичність, соціальну несприйнятливність, дратівливість і/або судоми.

[0068] Відповідно до певних варіантів здійснення суб'єктом, якого піддають скринінгу відносно асоційованого з ASM порушення, або у якого діагностовано асоційоване з ASM порушення, або який проходить лікування від асоційованого з ASM порушення відповідно до способів, представлених у даному документі, може бути немовля. Відповідно до інших варіантів здійснення суб'єктом є дитина. Відповідно до певних варіантів здійснення суб'єктом є доросла людина (18 років або старше). Відповідно до певних варіантів здійснення суб'єктом є жінка. Відповідно до певних варіантів здійснення суб'єктом є чоловік. Відповідно до певних варіантів здійснення суб'єктом є жінка, яка не вагітна або не вигодовує груддю.

#### ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

1. Спосіб контролю лікування дефіциту кислій сфінгомієлінази (ASM) у пацієнта, що включає:

(a) введення пацієнту терапевтичного засобу, який являє собою рекомбінантну кислоту сфінгомієліназу людини (rhASM), в діапазоні доз від 0,03 до 3 мг/кг; і

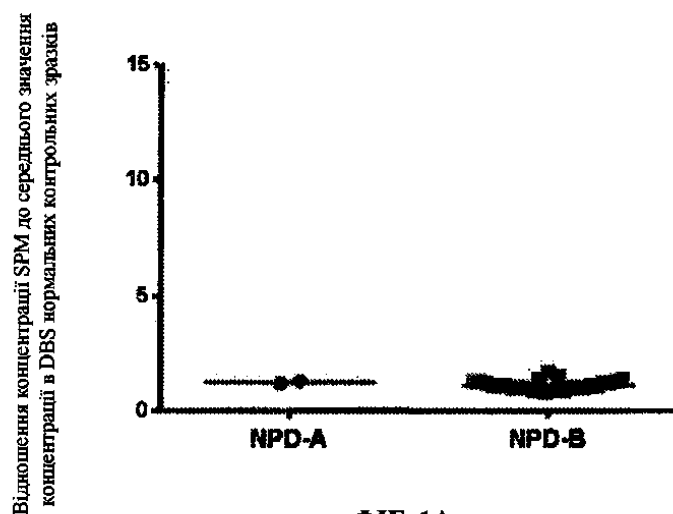
(b) отримання рівня лізосомального сфінгомієліну (лізосомальний SPM) в біологічному зразку у пацієнта, взятому через три або більше днів після стадії (a), де зниження рівня лізосомального SPM порівняно з посилювальним рівнем вказує на ефективність терапевтичного засобу, і де посилювальний рівень являє собою базовий рівень лізосомального SPM у пацієнта перед лікуванням на стадії (a).

2. Спосіб за п. 1, при якому стадія (a) включає повторне введення терапевтичного засобу пацієнту.

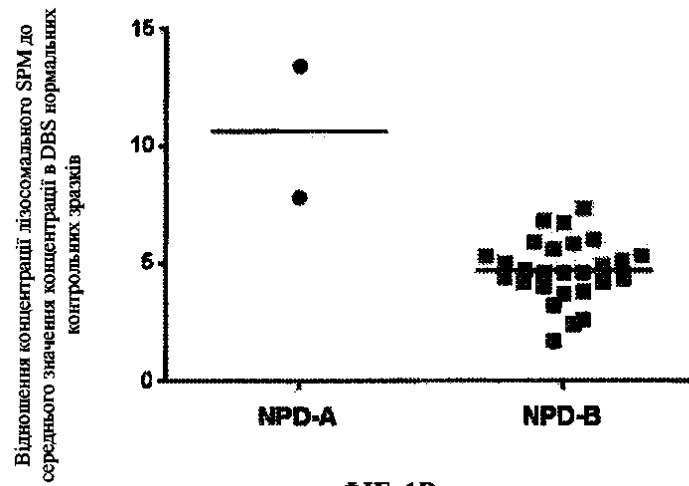
3. Спосіб за п. 1 або 2, що додатково включає: (c) введення додаткових доз терапевтичного засобу пацієнту.

4. Спосіб за будь-яким з попередніх пунктів, при якому посилювальний рівень є базовим рівнем лізосомального SPM у пацієнта перед будь-яким лікуванням терапевтичним засобом.

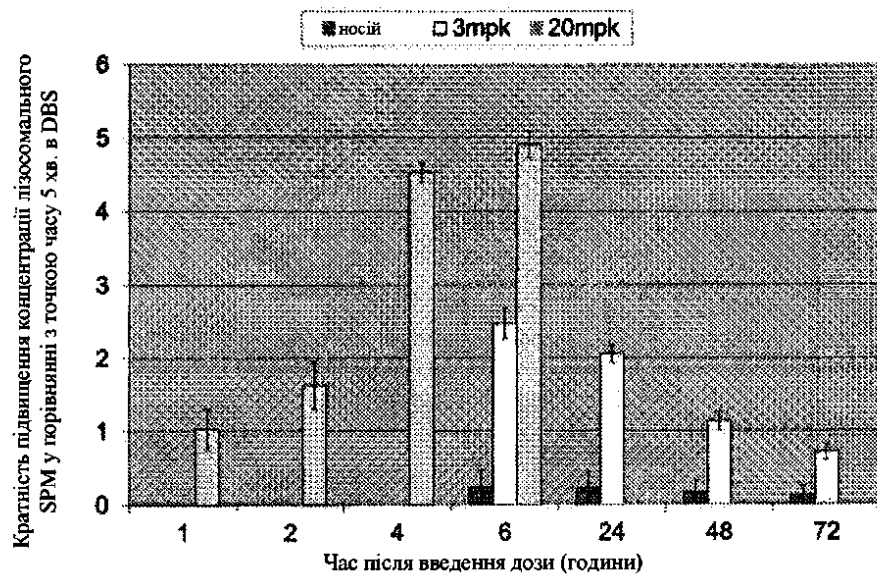
5. Спосіб за будь-яким з попередніх пунктів, при якому перед введенням наступної дози збирають біологічний зразок.
6. Спосіб за будь-яким з попередніх пунктів, при якому біологічний зразок є цільною кров'ю, висохлою плямою крові, плазмою або сироваткою.
- 5 7. Спосіб за будь-яким з пп. 1-6, при якому дефіцитом ASM є хвороба Німана-Піка типу В.
8. Спосіб за будь-яким з пп. 1-6, при якому дефіцитом ASM є хвороба Німана-Піка типу А.
9. Спосіб за будь-яким з попередніх пунктів, що включає введення підтримувальної дози терапевтичного засобу в дозі, концентрація якої дорівнює або менша концентрації максимальної дози терапевтичного засобу, що вводиться пацієнту.
- 10 10. Спосіб за будь-яким з попередніх пунктів, при якому кожен подальшу дозу терапевтичного засобу вводять через два тижні після попередньої дози.
11. Спосіб за будь-яким з попередніх пунктів, при якому одну або більше концентрацій доз терапевтичного засобу вводять двічі.
12. Спосіб за будь-яким з попередніх пунктів, при якому першу дозу терапевтичного засобу, яку
- 15 отримує пацієнт, вводять при 0,1 мг/кг.
13. Спосіб за п. 12, що включає введення пацієнту підтримуючої дози терапевтичного засобу при 1, 2 або 3 мг/кг.
14. Спосіб за будь-яким з попередніх пунктів, при якому терапевтичний засіб вводять пацієнту внутрішньовенно.
- 20 15. Спосіб контролю лікування хвороби Німана-Піка типу А або типу В у пацієнта, який включає: введення пацієнту внутрішньовенно початкової дози рекомбінантної кислоти сфінгомієлінази людини (rhASM) при 0,03 або 0,1 мг/кг і подальших доз, які підвищуються в концентрації дози до досягнення 3 мг/кг;
- введення пацієнту підтримувальних доз при 1, 2 або 3 мг/кг; і
- 25 вимірювання рівня лізосомального сфінгомієліну (лізосомальний SPM) в біологічній пробі, взятій у пацієнта (а) протягом 24 годин, (b) протягом 48 годин або (c) через 72 або більше годин після введення дози;
- при цьому кожен дозу вводять через два тижні після попередньої дози; і
- де підвищення рівня лізосомального SPM на стадії (а) або (b) або зниження рівня
- 30 лізосомального SPM на стадії (c) порівняно з посиляльним рівнем вказує на ефективність rhASM, і де посиляльний рівень являє собою базовий рівень лізосомального SPM у пацієнта перед введенням початкової дози rhASM.
16. Спосіб за п. 15, при якому пацієнт визначений до початку лікування як такий, що має підвищений рівень лізосомального SPM порівняно зі здоровим контролем.
- 35 17. Спосіб за п. 15 або 16, при якому біологічний зразок є цільною кров'ю, висохлою плямою крові, плазмою або сироваткою.
18. Спосіб за будь-яким з пп. 15-17, при якому перед введенням наступної дози збирають біологічний зразок.
19. Спосіб за будь-яким з попередніх пунктів, при якому пацієнт є дорослим.
- 40 20. Спосіб за будь-яким з попередніх пунктів, при якому пацієнт є дитиною.



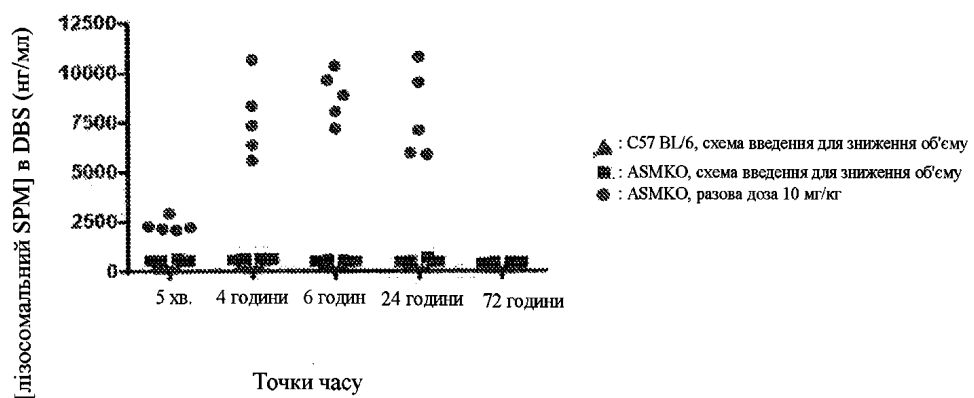
ФІГ. 1А



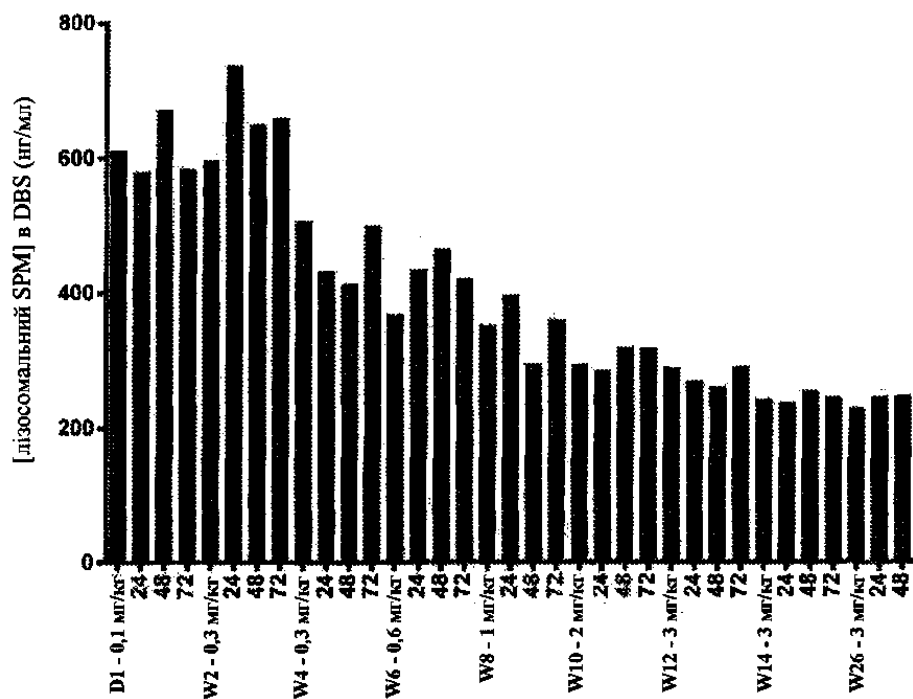
ФІГ. 1В



ФІГ. 2



ФІГ. 3



ФІГ. 4

Комп'ютерна верстка О. Рябко

Міністерство розвитку економіки, торгівлі та сільського господарства України,  
вул. М. Грушевського, 12/2, м. Київ, 01008, Україна

ДП "Український інститут інтелектуальної власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601