



# (12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104582770 B

(45)授权公告日 2019.01.29

(21)申请号 201380031825.3

(22)申请日 2013.05.31

(65)同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 104582770 A

(43)申请公布日 2015.04.29

(30)优先权数据  
61/654,519 2012.06.01 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日  
2014.12.16

(86)PCT国际申请的申请数据  
PCT/US2013/043608 2013.05.31

(87)PCT国际申请的公布数据  
W02013/181530 EN 2013.12.05

(73)专利权人 西奈山伊坎医学院  
地址 美国纽约州  
专利权人 耶达研究与发展有限公司

(72)发明人 爱德华·H·舒克曼  
埃里希·古尔宾斯  
安东尼·福特曼 耶·佩兹妮-琼

(74)专利代理机构 北京商专永信知识产权代理  
事务所(普通合伙) 11400  
代理人 郭玥 葛强

(51)Int.Cl.  
A61M 11/00(2006.01)  
A61P 31/00(2006.01)

(56)对比文件  
US 2008/0199450 A1,2008.08.21,权利要求1-7、说明书[0008]、[0015]、[0061]段,附图图1-图22.

CN 101479288 A,2009.07.08,全文.  
CN 1688316 A,2005.10.26,全文.  
CN 102368905 A,2012.03.07,全文.

US 2010/0285139 A1,2010.11.11,说明书[0003]-[0171]段,附图1-7.

Katrin Anne Becker等.Acid Sphingomyelinase Inhibitors Normalize Pulmonary Ceramide and Inflammation in Cystic Fibrosis.《AMERICAN JOURNAL OF RESPIRATORY CELL AND MOLECULAR BIOLOGY》.2010,第42卷(第6期),

审查员 梁维乐

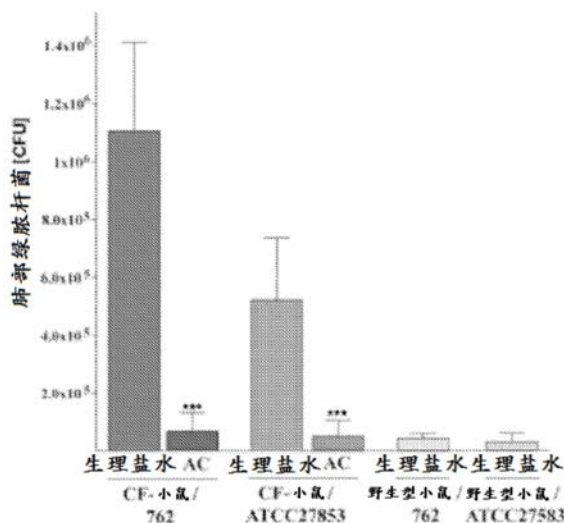
权利要求书1页 说明书16页 附图2页

## (54)发明名称

在感染的治疗和预防中的神经酰胺水平

## (57)摘要

本发明涉及一种用于治疗或预防具有囊性纤维化、COPD和/或开放性伤口的受试者的病原体感染的方法。所述方法涉及选择具有囊性纤维化、COPD和/或开放性伤口的受试者,并且在有效减少神经酰胺并治疗或预防所述病原体感染的条件下,向所述所选受试者施用神经酰胺酶。所述方法还涉及对囊性纤维化、COPD和/或开放性伤口患者使用神经酰胺酶与用于减少感染、减少神经酰胺或改善肺功能的其它药物的组合。



1. 神经酰胺酶在制备用于改善具有囊性纤维化、COPD和/或开放性伤口的受试者的病原体清除率的药物中的用途,所述改善包括:

选择具有囊性纤维化、COPD和/或开放性伤口的受试者,并且

在有效减少神经酰胺并且改善所述受试者的假单胞菌病原体的病原体清除率的条件下,向所述受试者施用治疗有效量的所述药物。

2. 如权利要求1所述的用途,其中所述受试者是基于相较于不具有所述囊性纤维化、COPD和/或开放性伤口的受试者的参考水平有所升高的神经酰胺水平来选择。

3. 如权利要求1所述的用途,其中所述选择是基于肺上皮细胞、鼻上皮细胞、粘液和/或从开放性伤口部位分离的细胞中的神经酰胺水平。

4. 如权利要求1所述的用途,其中所述施用是在有效使所述受试者的呼吸道上皮细胞、粘液或在开放性伤口部位处的细胞中的神经酰胺水平正常化的条件下进行。

5. 如权利要求1所述的用途,其中所述神经酰胺酶是酸性神经酰胺酶。

6. 如权利要求1所述的用途,其中将降低神经酰胺水平的一种或多种另外的药剂与所述药物组合施用。

7. 如权利要求6所述的用途,其中所述一种或多种另外的药剂选自一种或多种另外的神经酰胺减少剂、一种或多种酸性鞘磷脂酶抑制剂、一种或多种用于减少感染的药剂及其组合。

8. 如权利要求7所述的用途,其中所述一种或多种另外的药剂是一种或多种用于减少感染的药剂,并且选自抗生素、阻断病原体与肺上皮细胞的结合的试剂、用于降低粘液粘度的试剂、用于增强缺失的蛋白质的功能的伴侣试剂及其组合。

9. 如权利要求7所述的用途,其中所述药物与所述一种或多种另外的药剂同时、分开或依序施用。

10. 如权利要求1所述的用途,其中所述施用是经口、鼻内、腹膜内、静脉内、皮下或通过气雾剂吸入进行。

11. 如权利要求1所述的用途,其中所述施用是局部施用。

12. 如权利要求10所述的用途,其中所述施用是通过气雾剂吸入进行。

13. 如权利要求1所述的用途,其中所述神经酰胺酶以0.001mg/kg至500mg/kg的量施用。

14. 如权利要求1所述的用途,其中所述假单胞菌病原体是绿脓杆菌。

15. 如权利要求1所述的用途,其中所述药物是在感染发作之前施用。

16. 如权利要求1所述的用途,其中所述药物是在感染发作之后施用。

17. 如权利要求1所述的用途,其中所述受试者患有囊性纤维化。

18. 如权利要求1所述的用途,其中所述受试者患有COPD。

19. 如权利要求1所述的用途,其中所述受试者具有开放性伤口。

## 在感染的治疗和预防中的神经酰胺水平

[0001] 本申请要求2012年6月1日提交的美国临时专利申请序列号61/654,519的权益,该申请以引用的方式整体并入本文中。

### 发明领域

[0002] 本发明涉及使具有囊性纤维化、慢性阻塞性肺病(Chronic Obstructive Lung Disease, COPD)和/或开放性伤口的受试者体内的神经酰胺水平正常化以预防和/或治疗病原体感染。

### [0003] 发明背景

[0004] 囊性纤维化(Cystic Fibrosis, “CF”)是欧洲和美国最常见的常染色体隐性病症,在西方国家中每2500个新生儿就有一人患病。它是一种由CF跨膜传导调控蛋白(CF transmembrane conductance regulator protein, “CFTR”)的突变引起的疾病。尽管这一基因突变导致了若干呼吸道、生殖道和胃肠道并发症,但在这些受试者中发病和死亡的主要原因是绿脓杆菌(*Pseudomonas aeruginosa*) (“*P.aeruginosa*”)的长期肺定殖的破坏性作用。医疗记录指示,有约80%的患有CF的受试者到25岁时将成为绿脓杆菌的宿主。参见Cystic Fibrosis Foundation Subject Registry: Annual Data Report (2010)。除对于绿脓杆菌的易感性增加外,CF肺还以慢性炎症和进行性纤维化为特征。目前,介导CF疾病标志(即,感染易感性、炎症及纤维化)的分子机制有待确定。

[0005] 上皮细胞的绿脓杆菌感染是由病原体与细胞表面接触来起始。已经鉴别出绿脓杆菌的若干结合分子,包括CFTR、纤连蛋白、 $\alpha 5\beta 1$ -整合素及糖脂(包括神经节苷脂-GM1)。参见Pier等,“Role Of Mutant CFTR In Hypersusceptibility Of Cystic Fibrosis Subjects To Lung Infections,”*Science*.271,64-67(1996);Schroeder等,“CFTR Is A Pattern Recognition Molecule That Extracts *Pseudomonas aeruginosa* LPS From The Outer Membrane Into Epithelial Cells And Activates NF-kappa B Translocation,”*Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*99,第6907-6912页(2002);deBentzmann等,“Asialo GM1Is A Receptor For *Pseudomonas aeruginosa* Adherence To Regenerating Respiratory Epithelial Cells,”*Infect.Immun.*64(5),第1582-1588页(1996);deBentzmann等,“*Pseudomonas aeruginosa* Adherence To Remodeling Respiratory Epithelium,”*Eur.Respir.J.*9,第2145-2150页(1996);Roger等,“Fibronectin And  $\alpha 5\beta 1$ -integrin Mediate Binding Of *Pseudomonas aeruginosa* To Repairing Airway Epithelium,”*Eur.Respir.J.*13,第1301-1309页(1999);Saiman等,“*Pseudomonas aeruginosa* Pili Bind To AsialoGM1Which Is Increased On The Surface Of Cystic Fibrosis Epithelial Cells,”*J.Clin.Invest.*92,第1875-1880页(1993);以及Davies等,“Reduction In The Adherence Of *Pseudomonas aeruginosa* To Native Cystic Fibrosis Epithelium With Anti-AsialoGM1Antibody And Neuraminidase Inhibition,”*Eur.Respir.J.*13,第565-570页(1999)。

[0006] 因此,鉴别在CF中特异性改变并且涉及这些受试者对绿脓杆菌的高感染易感性的

绿脓杆菌上皮细胞受体是开发针对CF—和伴随的病原体感染的新预防和治疗策略的一个重要考虑因素。这些分子将是防止病原体与CF受试者中的支气管上皮细胞的初始接触并由此极早预防感染的理想靶标。

[0007] 当前治疗和预防罹患某种疾病或病状的受试者的疾病发病的方法会引起毒性和功效问题。

[0008] 本发明是针对例如通过用一种独特的膜脂质介导的机制校正体内细菌病原体与支气管上皮细胞的主要结合分子的异常表达来克服本领域中的这些不足。

## 发明概要

[0009] 本发明一方面针对一种用于治疗或预防具有囊性纤维化、慢性阻塞性肺病 (COPD) 和/或开放性伤口的受试者的病原体感染的方法。所述方法涉及选择具有囊性纤维化、COPD 和/或开放性伤口的受试者,并且在有效减少神经酰胺并治疗或预防所选受试者的病原体感染的条件下,向所选受试者施用神经酰胺酶。

[0010] 本发明另一方面涉及向所述受试者施用神经酰胺酶与用以减少神经酰胺或减少感染的其它药剂的组合。这些药剂可以包括但不限于抗生素、用于降低粘液粘度的试剂、用于增强囊性纤维化跨膜蛋白 (CFTR) 的功能的伴侣剂 (chaperone agent), 或酸性鞘磷脂酶抑制剂。

[0011] 本发明另一方面涉及基于受试者的细胞、组织或流体中神经酰胺的水平,和/或内源性神经酰胺酶的水平来选择所述受试者。

[0012] 附图简述

[0013] 图1A和1B示出了石蜡包埋的小鼠肺切片。图1A是用Cy3-抗神经酰胺抗体染色并且然后通过共聚焦显微术分析的野生型小鼠、CerS2缺陷型小鼠及囊性纤维化小鼠肺的代表性切片。图1B是在小鼠单次吸入酸性神经酰胺酶 (acid ceramidase, “AC”) 之后2小时,用相同抗体染色的野生型小鼠、CerS2缺陷型小鼠及囊性纤维化小鼠肺的代表性切片。结果是每组至少6只小鼠的代表性结果。

[0014] 图2证实,重组酸性神经酰胺酶防止积累神经酰胺的小鼠肺中的绿脓杆菌感染。使用了两个小鼠模型。一个 (CerS2-/-) 是敲除了产生神经酰胺的酶,即神经酰胺合成酶2的基因。另一个 (Cftr-/-) 在囊性纤维化跨膜蛋白基因中具有突变并且是囊性纤维化的模型。野生型小鼠、CerS2-/-小鼠或Cftr-/-小鼠单次吸入生理盐水 (浅灰色) 或酸性神经酰胺酶 (深灰色),然后用绿脓杆菌进行感染。两小时之后,将其处死并且测定小鼠肺中残留的绿脓杆菌的滴度。

[0015] 图3示出了在用 $1 \times 10^8$ 个菌落形成单位 (CFU) 的绿脓杆菌菌株762或ATCC 27853进行鼻内感染之前30至45分钟吸入含100 $\mu$ g AC的0.8mL 0.9%NaCl的小鼠的结果。在感染后4小时取出肺,将其均质化,在5mg/mL皂素中溶解10分钟,并洗涤。将等分试样接种于LB板上并使其生长过夜。对LB板上的CFU进行计数以确定肺中绿脓杆菌细菌的数量。示出了四次独立实验的平均值 $\pm$ 标准差。

[0016] 发明详述

[0017] 在实施本发明时,使用了分子生物学、蛋白质生物化学、细胞生物学、免疫学、微生物学及重组DNA中的许多常规技术。这些技术是众所周知的并且分别解释于例如以下文献

中:Current Protocols in Molecular Biology,第I-III卷,Ausubel编(1997);Sambrook等,Molecular Cloning:A Laboratory Manual,第二版(Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,New York(1989));DNA Cloning:A Practical Approach,第I和II卷,Glover编(1985);Oligonucleotide Synthesis,Gait编(1984);Nucleic Acid Hybridization,Hames和Higgins编(1985);Transcription and Translation,Hames和Higgins编(1984);Animal Cell Culture,Freshney编(1986);Immobilized Cells and Enzymes( IRL Press,1986);Perbal,A Practical Guide to Molecular Cloning;Meth.Enzymol.丛书,(Academic Press,Inc.,1984);Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells,Miller和Calos编(Cold Spring Harbor Laboratory,New York(1987));以及Meth.Enzymol.,第154和155卷,Wu和Grossman,以及Wu编,所有这些文献都以引用的方式整体并入本文中。用于检测和测量多肽基因表达产物的水平(即,基因翻译水平)的方法是本领域中众所周知的并且包括使用多肽检测方法,如抗体检测和定量技术。也参见Strachan和Read,Human Molecular Genetics,第二版。(John Wiley and Sons,Inc.,New York(1999),该文献以引用的方式整体并入本文中。

[0018] 应了解,本发明的某些方面、模式、实施方案、变化形式及特征于下文以各种细节水平进行描述,以便提供对于本发明技术的实质性了解。如本说明书中使用的某些术语的定义提供于下。除非另作定义,否则本文使用的所有科技术语都具有与本发明所属领域的普通技术人员通常所了解相同的含义。

[0019] 潜在的疾病状况可以使受试者易患上急性和/或慢性病原体感染。如本文所使用,“疾病状况”是指受试者罹患的任何种类或起源的病理性疾病或病症。因此,疾病状况包括由以下疾病和/或术语标识的主题,包括但不限于,例如呼吸道疾病、肺病、囊性纤维化(“CF”)、慢性阻塞性肺病(“COPD”)、肺气肿、哮喘、肺纤维化、慢性支气管炎、肺炎、肺高压、肺癌、肉状瘤病、坏死性肺炎、石棉沉着病、曲霉肿、曲霉病、急性侵袭型肺不张、嗜酸性粒细胞肺炎、胸膜积液、尘肺病、肺孢子虫病、气胸、肺放线菌病、肺泡蛋白沉积症、肺炭疽、肺动静脉畸形、肺水肿、肺栓塞、肺组织细胞增多病X(嗜酸性肉芽肿)、肺诺卡氏菌病、肺结核、肺静脉闭塞病、类风湿性肺病和/或开放性伤口。这些疾病通常表现为受试者对病原体感染的易感性增加,即,与未罹患疾病状况的受试者相比较。

[0020] 举例来说,具有CF、COPD和/或开放性伤口的受试者可能对于获得性急性和/或慢性病原体感染(如例如细菌、病毒、真菌、原生动物和/或朊病毒病原体感染)具有较高易感性。细菌病原体包括但不限于,炭疽芽孢杆菌(*Bacillus anthracis*)、百日咳博德特氏杆菌(*Bordetella pertussis*)、伯氏疏螺旋菌(*Borrelia burgdorferi*)、空肠弯曲菌(*Campylobacter jejuni*)、砂眼披衣菌(*Chlamydia trachomatis*)、肉毒杆菌(*Clostridium botulinum*)、破伤风梭菌(*Clostridium tetani*)、白喉杆菌(*Corynebacterium diphtheriae*)、大肠杆菌(*Escherichia coli*)、肠出血性大肠杆菌(enterohemorrhagic *E. coli*)、肠产毒素型大肠杆菌(enterotoxigenic *E. coli*)、B型和非分型流感嗜血杆菌(*Haemophilus influenzae* type B and non-typable)、幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*)、嗜肺军团菌(*Legionella pneumophila*)、单核细胞增生李斯特菌(*Listeria monocytogenes*)、分枝杆菌属某种(*Mycobacterium* spp.)、麻风杆菌(*Mycobacterium leprae*)、结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*)、淋病奈瑟氏菌(*Neisseria*

gonorrhoeae)、脑膜炎奈瑟氏菌(*Neisseria meningitidis*)、肺炎球菌属某种(*Pneumococcus* spp.)、绿脓杆菌(*Pseudomonas aeruginosa*)、立克次体(*Rickettsia*)、沙门氏菌属某种(*Salmonella* spp.)、志贺氏菌属某种(*Shigella* spp.)、葡萄球菌属某种(*Staphylococcus* spp.)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、链球菌属某种(*Streptococcus* spp.)、肺炎链球菌(*Streptococcus pneumoniae*)、产脓链球菌(*Streptococcus pyogenes*)、B族链球菌(*Streptococcus B*)、A群β溶血性链球菌(Group A beta hemolytic *Streptococcus*)、变形链球菌(*Streptococcus mutans*)、梅毒螺旋菌(*Treponema pallidum*)、霍乱弧菌(*Vibrio cholerae*)及鼠疫耶尔森氏菌(*Yersinia pestis*)。在一些实施方案中,病原体感染是假单胞菌感染。在一些实施方案中,该假单胞菌感染是绿脓杆菌感染。

[0021] 病毒病原体包括但不限于, RNA病毒、DNA病毒、腺病毒科(例如,哺乳动物腺病毒和禽腺病毒)、疱疹病毒科(例如,单纯疱疹病毒1、单纯疱疹病毒2、单纯疱疹病毒5及单纯疱疹病毒6)、光滑病毒科(leviviridae)(例如,光滑病毒(levivirus)、肠杆菌噬菌体MS2、异型小病毒(allolevirus))、痘病毒科(poxyviridae)(例如,脊椎动物痘病毒科(chordopoxyvirinae)、副痘病毒(parapoxvirus)、禽痘病毒(avipoxvirus)、羊痘病毒属(capripoxvirus)、兔痘病毒属(leporipoxvirus)、猪痘病毒属(suipoxvirus)、软疣痘病毒属(molluscipox virus)及昆虫痘病毒科(entomopoxyvirinae))、乳多空病毒科(例如,多瘤病毒和乳头瘤病毒)、副黏液病毒科(例如,副粘液病毒、副流感病毒1、麻疹病毒属(mobilivirus)如麻疹病毒、德国麻疹病毒属(rubulavirus)(如腮腺炎病毒)、肺病毒科(pneumonoviridae)(例如,肺病毒属、人呼吸道合胞病毒)、偏肺病毒(例如,禽肺炎病毒和人偏肺病毒)、小核糖核酸病毒科(例如,肠病毒、鼻病毒、肝病毒属如人甲型肝炎病毒、心病病毒属及口蹄疫病毒属)、呼肠弧病毒科(例如,正呼肠弧病毒、环状病毒、轮状病毒、多面体病毒(cypo virus)、fijivirus、植物呼肠弧病毒属和水稻病毒属)、逆转录病毒科(例如,哺乳动物B型逆转录病毒、哺乳动物C型逆转录病毒、禽C型逆转录病毒、D型逆转录病毒群、BLV-HTLV逆转录病毒、慢病毒属(如人免疫缺陷病毒1和人免疫缺陷病毒2;以及泡沫病毒(spumavirus))、黄病毒科(例如,丙型肝炎病毒)、肝脱氧核糖核酸病毒科(例如,乙型肝炎病毒)、披膜病毒科(例如,甲病毒属如辛德毕斯病毒(sindbis virus),及风疹病毒属如风疹病毒)、炮弹病毒科(rhabdoviridae)(例如,水泡病毒属、狂犬病病毒属、暂时热病毒(ephemera virus)、弹状病毒属(cytorhabdovirus)及胞核弹状病毒属(nucleorhabdovirus))、沙状病毒科(例如,沙状病毒、淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒、伊皮病毒(Ippy virus)及拉萨病毒(lassa virus))以及冠状病毒科(例如,冠状病毒和环曲病毒(torovirus))、巨细胞病毒(单核细胞增多症)、登革病毒(Dengue virus)(登革热、休克综合症)、爱泼斯坦-巴尔病毒(Epstein-Barr virus)(单核细胞增多症、伯基特氏淋巴瘤(Burkitt's lymphoma))、1型人T细胞淋巴性营养型病毒(T细胞白血病)、A型、B型及C型流感(呼吸道疾病)、日本脑炎病毒(肺炎、脑病)、脊髓灰质炎病毒(瘫痪)、鼻病毒(感冒)、德国麻疹病毒(Rubella virus)(胎儿畸形)、痘苗病毒(全身感染)、黄热病毒(黄疸病、肾衰竭及肝衰竭)及水痘-带状疱疹病毒(鸡痘)。

[0022] 致病真菌包括但不限于,曲霉属(*Aspergillus*) (例如,烟曲霉(*Aspergillus fumigatus*))、芽生菌属(*Blastomyces*)、念珠菌属(*Candida*) (例如,白色念珠菌(*Candida*

albicans))、球孢子菌属(Coccidioides)、隐球菌属(Cryptococcus)、组织胞浆菌属(Histoplasma)、须霉属(Phycomyces)、体癣(Tinea corporis)、甲白癣(Tinea unguis)、申克氏孢子丝菌(Sporothrix schenckii)及卡氏肺孢菌(Pneumocystis carinii)。致病性原生动物包括但不限于,锥虫属某种(Trypanosome spp.)、利什曼原虫属某种(Leishmania spp.)、疟原虫属某种(Plasmodium spp.)、内阿米巴属某种(Entamoeba spp.)及贾第鞭毛虫属某种(Giardia spp.)如蓝氏贾第鞭毛虫(Giardia lamblia)。

[0023] 由于促成罹患疾病状况的受试者对于病原体感染的易感性增加的分子机制尚未充分了解,故关于细胞贴附和内化来阐述例如绿脓杆菌的病理学是预防和治疗易于获得这些感染的受试者的重要考虑因素。

[0024] 整合素是用于协调与例如贴附和粘附有关的细胞过程的受体分子。然而,整合素不在正常的健康支气管上皮细胞的内腔表面处特征性表达,并且上皮细胞-层紧密连接防止支气管病原体与上皮细胞中通常驻留整合素的基底侧极接触。

[0025] 如本文所使用,术语“升高的水平”或“较高水平”是指比来自对照受试者或正常受试者的可比较的样品中通常所观察到的水平(即,参考值或对照水平或正常化水平)高的可测量标记物、分子或蛋白质(如例如神经酰胺)的水平。在一些实施方案中,“对照水平”(即,正常水平)是指预期通常在来自没有疾病状况的受试者的样品中所观察到的范围。对照水平可以作为“参考水平”用于比较目的,如下文进一步详述。因此,“升高的水平”是指超过对照水平范围的水平。被认可作为“升高的水平”或“对照水平”的范围取决于多种因素。熟练从业人员能够考虑相关因素并确定本发明的“对照值”和“升高的值”的适当参考范围。举例来说,可以使用来自对照受试者和被诊断患有CF的受试者的一系列样品来确定作为“正常”水平或“对照”水平的范围以及相较于对照范围或水平“升高”或“较高”的范围。

[0026] 神经酰胺酶是能够将神经酰胺水解成脂肪酸和鞘氨基醇碱(sphingoid base)(鞘氨醇)的酶,该鞘氨基醇碱参与细胞增殖和细胞内信号转导。在酶活化之后,神经酰胺酶促进神经酰胺水解成单个脂肪酸和鞘氨醇组分。参见Gatt,“Enzymic Hydrolysis and Synthesis of Ceramide,”J.Biol.Chem.238:3131-3(1963);Gatt,“Enzymatic Hydrolysis of Sphingolipids.1.Hydrolysis and Synthesis of Ceramides by an Enzyme from Rat Brain,”J.Biol.Chem.241:3724-31(1966);Hassler和Bell,“Ceramidase:Enzymology and Metabolic Roles,”Adv.Lip.Res.26:49-57(1993),所有这些文献都以引用的方式整体并入本文中。细胞中不存在从头合成以产生鞘氨醇的路径,因此,鞘氨醇只能按照神经酰胺酶的酶作用由神经酰胺水解来产生。

[0027] 本发明一方面是针对一种用于治疗或预防具有囊性纤维化、COPD和/或开放性伤口的受试者的病原体感染的方法。本发明的这一方法涉及选择具有囊性纤维化、COPD和/或开放性伤口的受试者,并且在有效减少神经酰胺并治疗或预防所选受试者的病原体感染的条件下,向所选受试者施用神经酰胺酶。

[0028] 如本文所描述,“开放性伤口”是指上皮层(即,皮肤)被撕破、切破和/或刺破的一类损伤。在一些实施方案中,开放性伤口是指损害皮肤真皮并且同时增加获得感染的几率的锐器损伤。术语“开放性伤口”也涵盖烧伤。

[0029] 本发明的方法另外涉及基于相较于不具有囊性纤维化、COPD和/或开放性伤口的受试者的参考水平有所升高的神经酰胺水平,选择受试者。如本文所使用,术语“参考水平”

是指出于比较目的而引起关注的某种物质(例如,神经酰胺)的水平。在一些实施方案中,参考水平可以是来自健康(无疾病和/或无病原体)受试者对照群的样品的水平或浓度的平均值表示的蛋白质的水平或浓度。在其它实施方案中,参考水平可以是同一受试者在不同时间(例如在采用本发明之前)的水平,如在受试者发生疾病、疾病状况和/或病原体感染之前、起始疗法(例如神经酰胺酶疗法)之前或在该疗法早期测定的水平。

[0030] 比较受试者的神经酰胺水平与参考水平的示例性方法包括但不限于,基于一种或多种蛋白质测定(如下文进一步描述)的结果,比较所检测的神经酰胺水平的差异。在一些实施方案中,神经酰胺水平在如本文所描述的疾病状况存在下较高。受试者或样品中所检测的神经酰胺水平低于参考水平将指示,该受试者可能不需要神经酰胺酶疗法和/或该受试者可能未患上如本文所描述的疾病状况。

[0031] 本发明的方法另外涉及基于肺上皮细胞、鼻上皮细胞、粘液和/或从开放性伤口部位分离的细胞中的神经酰胺水平,选择受试者。在一些实施方案中,施用是在有效使受试者的呼吸道上皮细胞、粘液或开放性伤口部位处的细胞中的神经酰胺水平正常化的条件下进行的。在一些实施方案中,神经酰胺酶是一种酸性神经酰胺酶(acid ceramidase,“AC”),包括但不限于,下表1中所列的AC。

[0032] 酸性神经酰胺酶(N-酰基鞘氨醇脱酰基酶,I.U.B.M.B.酶编号EC 3.5.1.23)是负责神经酰胺分解代谢的一种特殊的神经酰胺酶。由于涉及到人遗传病症法伯脂肪肉芽肿病(Farber Lipogranulomatosis),故AC是神经酰胺酶家族最广泛研究的成员之一。已经从若干来源纯化出该蛋白质,并且已经获得人和小鼠cDNA和基因。参见Bernardo等,“Purification,Characterization,and Biosynthesis of Human Acid Ceramidase,”*J.Biol.Chem.*270:11098-102(1995);Koch等,“Molecular Cloning and Characterization of a Full-length Complementary DNA Encoding Human Acid Ceramidase.Identification of the First Molecular Lesion Causing Farber Disease,”*J.Biol.Chem.*271:33110-5(1996);Li等,“Cloning and Characterization of the Full-length cDNA and Genomic Sequences Encoding Murine Acid Ceramidase,”*Genomics* 50:267-74(1998);Li等,“The Human Acid Ceramidase Gene(ASAH):Chromosomal Location,Mutation Analysis,and Expression,”*Genomics* 62:223-31(1999),所有这些文献都以引用的方式整体并入本文中。

[0033] 如以上所描述,AC是催化神经酰胺水解成鞘氨醇和游离脂肪酸的一种神经酰胺酶。参见Bernardo等,“Purification,Characterization,and Biosynthesis of Human Acid Ceramidase,”*J.Biol.Chem.*270(19):11098-102(1995),该文献以引用的方式整体并入本文中。成熟AC是由 $\alpha$ 亚基(约13kDa)和 $\beta$ 亚基(约40kDa)构成的一种约50kDa的蛋白质。参见Bernardo等,“Purification,Characterization,and Biosynthesis of Human Acid Ceramidase,”*J.Biol.Chem.*270(19):11098-102(1995),该文献以引用的方式整体并入本文中。它是由AC前体蛋白裂解产生的(参见Ferlinz等,“Human Acid Ceramidase:Processing,Glycosylation,and Lysosomal Targeting,”*J.Biol.Chem.*276(38):35352-60(2001),该文献以引用的方式整体并入本文中),其为Asah1基因(NCBI UniGene GeneID No.427,以引用的方式整体并入本文中)的产物。

[0034] 此外,AC的功能和/或活性与周围的pH直接相关。事实上,AC通常见于具有约4.5的

酸性pH值的溶酶体内,并且在不存在AC活性的法伯脂肪肉芽肿病患者中,神经酰胺在溶酶体内积累。

[0035] 此外,近期的研究已经显示,增加细胞内区室pH使AC活性/功能降低多达90%。参见 **Teichgräber** 等,“Ceramide Accumulation Mediate Inflammation,Cell Death And Infection Susceptibility In Cystic Fibrosis,”*Nat Med.*14(4),第382-391页(2008),该文献以引用的方式整体并入本文中。在一些方面,这些结果模拟了法伯氏病,该疾病是由AC缺乏引起并且导致神经酰胺的积累。参见He等,“Purification And Characterization Of Recombinant,Human Acid Ceramidase,”*J.Biol.Chem.*278,32978-32986(2003),该文献以引用的方式整体并入本文中。此外,在pH 5.9下,已经显示AC具有相反的活性—产生神经酰胺,而非消耗神经酰胺。参见以上相同文献。这一活性与Asm功能削弱(增加囊泡pH水平)相结合可以引起神经酰胺的净积累。参见 **Teichgräber** 等,“Ceramide Accumulation Mediate Inflammation,Cell Death And Infection Susceptibility In Cystic Fibrosis,”*Nat Med.*14(4),第382-391页(2008),该文献以引用的方式整体并入本文中。

[0036] 其它研究已经显示,肺泡巨噬细胞中CFTR的缺乏导致溶酶体pH值从pH 4.5转变为至少pH 5.9。参见Di等,“CFTR Regulates Phagosome Acidification In Macrophages And Alters Bactericidal Activity,”*Nat.Cell Biol.*8,933-944(2006),该文献以引用的方式整体并入本文中。因此,至少是由于预期AC不会使具有增加的溶酶体pH的CF受试者中升高的神经酰胺水平降低,本发明意外地起到了预防和/或治疗CF受试者的病原体感染的作用。此外,预期AC不会作用于肺上皮细胞膜中积累的神经酰胺。

[0037] 可以用于本发明的上下文中的AC包括但不限于,下表1中所陈述的那些。在本发明的所有方面,AC相对于所治疗的组织、细胞和/或受试者可以是同源的(即,源自于相同物种)或异源的(即,源自于不同物种)。

[0038] 表1. 示例性酸性神经酰胺酶家族成员

<b>智人</b>		<b>秀丽隐杆线虫</b>	
UniProt	Q13510, Q9H715, Q96AS2	UniProt	O45686
OMIM	228000	IntAct	O45686
NCBI Gene	427	NCBI Gene	173120
NCBI RefSeq	NP_808592, NP_004306	NCBI RefSeq	NP_493173
NCBI RefSeq	NM_177924, NM_004315	NCBI RefSeq	NM_060772
NCBI UniGene	427	NCBI UniGene	173120
NCBI Accession	Q13510, AAC73009	NCBI Accession	O45686, CAB05556
<b>小家鼠</b>		<b>斑马鱼</b>	
UniProt	Q9WV54, Q3U8A7, Q78P93	UniProt	Q5XJR7
NCBI Gene	11886	NCBI Gene	450068
NCBI RefSeq	NP_062708	NCBI RefSeq	NP_001006088
NCBI RefSeq	NM_019734	NCBI RefSeq	NM_001006088
NCBI UniGene	11886	NCBI UniGene	450068
NCBI Accession	AK151208, AK034204	NCBI Accession	AAH83231, CB360968
<b>原鸡</b>		<b>褐家鼠</b>	
UniProt	Q5ZK58	UniProt	Q6P7S1, Q9EQJ6
NCBI Gene	422727	NCBI Gene	84431
NCBI RefSeq	NP_001006453	NCBI RefSeq	NP_445859
NCBI RefSeq	NM_001006453	NCBI RefSeq	NM_053407
NCBI UniGene	422727	NCBI UniGene	84431
NCBI Accession	CAG31885, AJ720226	NCBI Accession	AAH61540, AF214647
<b>黑猩猩</b>			
NCBI Gene	464022		
NCBI RefSeq	XP_519629		
NCBI RefSeq	XM_519629		
NCBI UniGene	464022		

[0039]

[0040] 在一些实施方案中,在治疗之前,测定神经酰胺的水平和/或AC浓度和/或活性。适于测定神经酰胺浓度和/或神经酰胺水平或活性的测定对于熟练从业人员是显而易见的。适合的方法包括例如活性测定(参见Eliyahu等,“Acid Ceramidase is a Novel Factor Required for Early Embryo Survival,”FASEB J.21(7):1403-9(2007),该文献以引用的方式整体并入本文中),以及众所周知的技术,如用于测定样品中存在的神经酰胺酶蛋白质的相对量和/或活性的蛋白质印迹法(其中较高的神经酰胺酶蛋白质量与较高的神经酰胺酶活性水平相关)。参见Eliyahu等,“Acid Ceramidase is a Novel Factor Required for Early Embryo Survival,”FASEB J.21(7):1403-9(2007),该文献以引用的方式整体并入本文中。

[0041] 如本文所使用,术语“测定”是指用于检测给定体液样品中神经酰胺和/或神经酰胺酶的存在或不存在的一种测定。还包括了测量样品中某种物质的量的定量测定。如本文所使用,术语“样品”是以其最广泛的意义上使用。在一种意义上,该术语拟包括从生物样品获得的样本或培养物。体液样品选自血清、滑液、脑脊髓液及腹膜液。其中特别值得关注的样品是血清。本领域技术人员将认识到,还可以使用血浆、或全血、或全血的亚组分。生物流体样品可以从动物(包括人)获得,并且包括血液产品,如血浆、血清等。在一些实施方案中,样品含有一定水平的神经酰胺或神经酰胺酶,其可以通过本文所描述的方法和本领域中众所周知的方法容易地确定。

[0042] 免疫测定从其最简单并且最直接的含义上说,是涉及抗体与抗原之间的结合的结合测定。已知许多类型和型式的免疫测定并且全部都适用于检测例如神经酰胺水平。免疫测定的实例是酶联免疫吸附剂测定(“ELISA”)、酶联免疫斑点测定(“ELISPOT”)、放射免疫测定(“RIA”) (参见Ferlinz等,“Human Acid Ceramidase:Processing,Glycosylation, and Lysosomal Targeting,”J.Biol.Chem.276(38):35352-60(2001),该文献以引用的方

式整体并入本文中)、放射免疫沉淀测定(“R IPA”)、免疫珠粒捕获测定、斑点印迹法、凝胶迁移测定、流式细胞术、免疫组织化学、荧光显微镜检术、蛋白质阵列、多重珠粒阵列、磁力捕获、体内成像、荧光共振能量转移(“FRET”)以及光脱色荧光恢复/定位技术(fluorescence recovery/localization after photobleaching,“FRAP/FLAP”)。各种有用的免疫检测方法的步骤已经描述于科技文献中,如例如Maggio等,Enzyme-Immunoassay (1987)以及Nakamura等,“Enzyme Immunoassays:Heterogeneous and Homogeneous Systems,Handbook of Experimental Immunology,”第1卷:Immunochemistry,27.1-27.20 (1986),各自以引用的方式整体并入本文中。

[0043] 一般来说,免疫测定涉及使怀疑含有所关注分子或蛋白质(如神经酰胺和/或神经酰胺酶)的样品与针对所关注分子或蛋白质的抗体在有效允许形成免疫复合物的条件下接触。就这一点来说,熟练从业人员将能够评估给定样品中所关注的特定分子或蛋白质的存在和或水平。

[0044] 免疫测定可以包括用于对样品中所关注的分子或蛋白质进行检测或定量的方法,这些方法一般涉及在结合过程期间对所形成的任何免疫复合物的检测或定量。一般来说,免疫复合物形成的检测是本领域中众所周知的并且可以通过应用多种方法实现。这些方法一般是基于标记或标记物的检测,如任何放射性标签、荧光标签、生物标签或酶标签,或者任何其它已知的标记。参见例如,美国专利号3,817,837、3,850,752、3,939,350、3,996,345、4,277,437、4,275,149及4,366,241,各案以引用的方式整体并入本文中。

[0045] 一种用于检测总蛋白质的特别有效的非特异性测定是布拉福德蛋白质测定(Bradford protein assay)。参见Bradford,M.M.,“A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Proteins Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding,”Anal.Biochem.72:248-254 (1976),该文献以引用的方式整体并入本文中。

[0046] 布拉福德蛋白质测定使用了考马斯蓝G(Coomassie Blue G;C.I.#42655) (100mg)溶解于50mL甲醇中得到的染料原液。将该溶液添加到100mL的85% $H_3PO_4$ 中,并且用水稀释到200mL,产生深红色。该测定的最终试剂浓度为0.5mg/mL的考马斯蓝G、25%的甲醇及42.5%的 $H_3PO_4$ 。布拉福德测定的测定试剂是通过用4份蒸馏 $H_2O$ 稀释1份染料原液来制备。所得颜色应为褐色,pH值为1.1。对于标准测定,使用浓度为0 $\mu$ g/mL、250 $\mu$ g/mL、500 $\mu$ g/mL、750 $\mu$ g/mL及1500 $\mu$ g/mL的牛血清白蛋白(“BSA”),在与有待测定的样品相同的缓冲液中制备一系列蛋白质标准品。吸光度对于标准测定程序是在595nm下读取,并且对于微量测定是在450nm下读取(Dynex Technologies,Chantilly,VA),并且在595nm下的吸光度与在450nm下的吸光度的比率用于标准曲线计算。参见Zor等,“Linearization of the Bradford Protein Assay Increases Its Sensitivity:Theoretical and Experimental Studies,”Anal.Biochem.236:302-308 (1996),该文献以引用的方式整体并入本文中。

[0047] 在一些实施方案中,本发明的方法是通过施用AC前体蛋白,然后利用细胞将其转化成活性酸性神经酰胺酶蛋白质来进行。确切地说,AC前体蛋白经历自身蛋白质水解裂解而成为活性形式(由 $\alpha$ 亚基和 $\beta$ 亚基构成)。通过细胞内环境促进该过程,并且基于各物种在AC前体蛋白裂解位点处的高度保守的序列,预期该过程会在大多数(如果不是全部)细胞类型中发生。适合的酸性神经酰胺酶前体蛋白包括以上表1中所陈述的那些。如熟练从业人员

将显而易见的,该前体蛋白可以任选地包含在细胞所暴露的培养基中。因此涵盖该前体蛋白被所关注的宿主受试者或细胞吸收并且转化成活性酸性神经酰胺酶的实施方案。

[0048] 用于施用本发明的蛋白质或多肽试剂(例如AC)的又一种方法涉及根据Heartlein等的美国专利号5,817,789(以引用的方式整体并入本文中)制备嵌合蛋白。该嵌合蛋白可以包括配体结构域和多肽试剂(例如AC、AC前体蛋白)。该配体结构域对位于靶细胞上的受体具有特异性。因此,当将该嵌合蛋白递送到受试者、细胞和/或培养基时,该嵌合蛋白将被内化。

[0049] 取决于某种物质(例如神经酰胺和/或神经酰胺酶)的水平或活性,可以根据本发明的方法,施用一种或多种另外的药剂与神经酰胺酶(例如AC)的组合。在一些实施方案中,该一种或多种另外的药剂选自一种或多种另外的神经酰胺减少剂、一种或多种酸性鞘磷脂酶抑制剂、一种或多种用于减少感染的药剂及其组合。适用于减少感染的药剂包括抗生素(例如,吸入性妥布霉素(inhaled Tobramycin,TOBI)、阻断病原体与肺上皮细胞的结合的试剂、用于降低粘液粘度的试剂(例如阿法链道酶(Dornase alfa),Pulmozyme)、用于增强缺失的蛋白质的功能的伴侣试剂(例如依伐卡托(Ivacaftor),Kalydeco)及其组合。在一些实施方案中,神经酰胺酶(例如AC)是与该一种或多种另外的药剂同时、分开或依序施用。

[0050] 如本文所使用,术语“同时”治疗性使用是指通过相同途径并且在相同时间或基本上相同的时间施用至少两种活性成分。如本文所使用,术语“分开”治疗性使用是指在相同时间或基本上相同的时间通过不同途径施用至少两种活性成分。如本文所使用,术语“依序”治疗性使用是指在不同时间施用至少两种活性成分,该施途径是相同或不同的。更确切地说,依序使用是指一种活性成分的完全施用是在另一种或其它活性成分开始施用之前进行。因此,有可能一种活性成分是在施用另一种或多种活性成分之前经数分钟、数小时或数天施用。在这一情形中不存在同时治疗。

[0051] 施用可以经由向受试者全身施用或经由向受影响的组织、器官和/或细胞靶向施用来实现。治疗剂(即,AC、AC前体蛋白、编码AC/AC前体蛋白的核酸)可以与一种或多种有助于该治疗剂迁移到靶组织、器官或细胞(和/或被其吸收)的药剂一起施用到非靶向区域。另外地和/或替代地,如本领域普通技术人员将显而易见的,治疗剂本身可以经过修饰以有助于其运输至所希望的组织、器官或细胞(并且被其吸收)。

[0052] 用于递送药剂的任何适合方法都可以用于实施本发明的这一方面。通常,治疗剂将在媒介物中施用给患者,该媒介物将治疗剂递送到靶细胞、组织或器官。示例性施用途包括但不限于,通过气管内接种、吸入、气道滴注、雾化、喷雾、鼻内滴注、口服或鼻饲滴注、腹膜内注射、血管内注射、经局部、透皮、不经肠、皮下、静脉内注射、动脉内注射(如经由肺动脉)、肌肉内注射、胸膜内滴注、经室内、经病灶内、通过施加到粘膜(如鼻粘膜、咽喉粘膜、支气管粘膜、生殖器粘膜和/或肛门粘膜)或植入持续释放媒介物。

[0053] 在一些实施方案中,神经酰胺酶(例如AC)是经口、局部、鼻内、腹膜内、静脉内、皮下或通过气雾剂吸入来施用的。在一些实施方案中,神经酰胺酶(例如AC)是经气雾剂吸入来施用的。在一些实施方案中,神经酰胺酶和/或另外的药剂可以并入适于施用(如本文所描述)的药物组合物中。

[0054] 本发明的药剂(例如AC)可以与例如惰性稀释剂或可吸收的可食用载剂经口施用,或其可以装入硬壳或软壳胶囊中,或其可以被压缩成片剂,或其可以直接地并入饮食的食

物中。对于口服治疗性施用,这些活性化合物可以与赋形剂合并,并且以片剂、胶囊、酞剂、悬浮液、糖浆等形式使用。这些组合物和制剂应当含有至少0.1%的药剂。在这些组合物中药剂的百分含量当然可以变化,并且宜在单位重量的约2%至约60%之间。这些在治疗上有用的组合物中药剂的量应使得能获得适合剂量。

[0055] 片剂、胶囊等还可以含有粘合剂,如黄芪胶、阿拉伯胶、玉米淀粉或明胶;赋形剂,如磷酸氢钙;崩解剂,如玉米淀粉、马铃薯淀粉或褐藻酸;润滑剂,如硬脂酸镁;及甜味剂,如蔗糖、乳糖或糖精。当单位剂型是胶囊时,除以上类型的材料外,其还可以含有液体载剂,如脂肪油。

[0056] 这些药剂(例如AC)还可以不经肠施用。该药剂的溶液或悬浮液可以在适当地混有表面活性剂(如羟丙基纤维素)的水中制备。还可以在甘油、液体聚乙二醇及其混合物中于油中制备分散液。说明性油是石油、动物、植物或合成来源的那些,例如花生油、大豆油或矿物油。一般来说,水、生理盐水、右旋糖水溶液和相关糖溶液,以及二醇类如丙二醇或聚乙二醇,是优选的液体载剂,特别适用于可注射溶液。在常规储存和使用条件下,这些制剂含有防腐剂以防止微生物生长。

[0057] 适于注射使用的药物形式包括无菌水溶液或分散液,以及供即时制备无菌可注射溶液或分散液的无菌粉末。在所有情形中,该形式必须为无菌的并且流动性必须达到易于注射的程度。其必须在制造和储存条件下稳定,并且能防止如细菌和真菌等微生物的污染作用。该载剂可以为含有例如水、乙醇、多元醇(例如,甘油、丙二醇和液体聚乙二醇)、其适合混合物以及植物油的溶剂或分散介质。

[0058] 根据本发明的药剂(例如AC)还可以呈气雾剂形式直接施用到气道。对于以气雾剂形式使用,可以将呈溶液或悬浮液形式的本发明化合物与适合的推进剂(例如烃类推进剂,如丙烷、丁烷或异丁烷)和常规佐剂一起包装于加压气雾剂容器中。本发明的物质也可以呈非加压形式施用。

[0059] 示范性递送装置包括但不限于,喷雾器、雾化器、脂质体(包括主动和被动药物递送技术)(Wang和Huang,“pH-Sensitive Immunoliposomes Mediate Target-cell-specific Delivery and Controlled Expression of a Foreign Gene in Mouse,”*Proc.Nat’l Acad.Sci.USA* 84:7851-5(1987);Bangham等,“Diffusion of Univalent Ions Across the Lamellae of Swollen Phospholipids,”*J.Mol.Biol.*13:238-52(1965);Hsu的美国专利号5,653,996;Lee等的美国专利号5,643,599;Holland等的美国专利号5,885,613;Dzau和Kaneda的美国专利号5,631,237;以及Loughrey等的美国专利号5,059,421;Wolff等,“The Use of Monoclonal Anti-Thy1IgG1for the Targeting of Liposomes to AKR-A Cells in Vitro and in Vivo,”*Biochim.Biophys.Acta* 802:259-73(1984),各文献以引用的方式整体并入本文中)、透皮贴片、植入物、可植入或可注射蛋白质储集型组合物、及注射器。也可以采用本领域技术人员已知的其它递送系统来实现治疗剂向所希望的器官、组织或细胞的所希望的递送。

[0060] 施用可以按所需频率进行并且持续一段适于针对病原体提供有效预防或功效的时间。举例来说,施用可以用单次持续释放剂量的制剂或用多次日剂量进行。

[0061] 待施用的剂量当然将取决于治疗方案而变化。一般来说,施用一种药剂以达到有效改善病原体清除率的量。因此,治疗有效量可以是能够至少部分预防和/或治疗病原体感

染的量。这包括但不限于,延迟感染的发作。获得有效量所需的剂量可以取决于该药剂、制剂及施用该药剂的个体而变化。

[0062] 本发明的药剂或组合物的剂量、毒性及治疗功效可以通过例如用于测定LD<sub>50</sub>(使50%的群体死亡的剂量)和ED<sub>50</sub>(对50%的群体治疗有效的剂量)的标准药物程序,在细胞培养物或实验动物中测定。有毒作用与治疗作用之间的剂量比率是治疗指数并且其可以表示为比率LD<sub>50</sub>/ED<sub>50</sub>。展现高治疗指数的化合物可为所希望的。尽管可以使用展现有毒副作用的组合物,但应小心设计递送系统,使该递送系统将这些组合物靶向受影响组织的部位,以便使对于未感染细胞的潜在损害减到最小,并由此降低副作用。

[0063] 因此,在一些实施方案中,神经酰胺酶是以治疗有效量施用。如本文所使用,术语药剂、蛋白质、化合物和/或组合物的“治疗有效量”、“有效量”或“药物有效量”是足以实现所希望的治疗和/或预防作用的量,例如,引起预防或减少与所治疗的疾病相关的症状的量。

[0064] 施用给受试者的本发明的药剂或组合物的有效量将取决于疾病的类型和严重性以及取决于个体的特征(如一般健康状况、年龄、性别、体重及耐药性)。其还将取决于疾病的程度、严重性及类型。熟练从业人员将能够根据这些和其它因素确定适当剂量。本发明的组合物还可以与一种或多种另外的治疗性化合物组合施用。

[0065] 通常,该治疗剂将以药物制剂形式施用,该药物制剂包括该治疗剂和任何药学上可接受的佐剂、载剂、赋形剂和/或稳定剂,并且可以呈固体或液体形式,如片剂、胶囊、散剂、溶液、悬浮液或乳液。这些组合物优选含有按重量计约0.01至约99%,更优选按重量计约2至约60%的治疗剂以及佐剂、载剂和/或赋形剂。在一些实施方案中,有效量的范围为约0.001mg/kg至约500mg/kg受试者体重。在一些实施方案中,该药剂的有效量的范围为0.05mg/kg至约30mg/kg,约0.1mg/kg至约30mg/kg,约1mg/kg至约25mg/kg,约1mg/kg至约20mg/kg,或为约1或2mg/kg至约15mg/kg。

[0066] 本发明的药剂(例如AC)可以在各种时间施用。在一些实施方案中,神经酰胺酶(例如AC)是在感染发作之前施用。在其它实施方案中,神经酰胺酶(例如AC)是在感染发作之后施用。另外,根据本发明的一些实施方案,神经酰胺酶(例如AC)可以在感染发作之前和之后施用。

[0067] 本发明另一方面涉及监测一种疗法在具有病原体感染及潜在疾病状况的受试者体内的有效性的方法。该方法包括选择受试者;提供在该疗法之前来自所选受试者的体液样品中的基线神经酰胺水平;并且用该疗法治疗该病原体感染,该疗法例如可以为治疗性施用神经酰胺酶,如例如AC。该方法另外包括对该疗法之后来自所选受试者的体液样品中的疗法后神经酰胺水平进行检测;将该基线神经酰胺水平与该疗法后神经酰胺酶水平相比较;并且基于该比较和/或该病原体感染的病理学来鉴别该疗法是否有效。

[0068] 在本发明另一方面,提供了使用或施用本发明的药剂的试剂盒或试剂系统。这些试剂盒将含有试剂组合,包括根据本文公开的方法进行测定所需的特定元件。该试剂系统是以商业包装形式、以容许各试剂的相容性的组合物或混合物形式、以测试装置配置,或更通常以测试用试剂盒形式(即,容纳必要试剂,并且优选地包括有关测定性能的书面说明书的一个或多个容器、装置等的包装组合)呈现。该试剂盒可以适合于任何测定的配置并且可以包括用于执行本文所描述的各种测定型式中的任一种的组合物。

[0069] 适用于所公开的方法的试剂可以呈溶液形式储存或可以为冻干的。当冻干时，一些或所有试剂可以容易地储存于微量滴定板各孔中以便在复水之后使用。预期本领域中已知用于冻干试剂的任何方法都将适于制备可用于所公开的方法的干燥试剂。

[0070] 现在已经大体上描述本发明，通过参照以下实施例将更容易地了解本发明，除非具体说明，否则这些实施例以实例说明而提供并且不打算作为对本发明的限制。

## 实施例

[0071] 实施例1—小鼠。

[0072] 由原始Cftr<sup>TgH(neoim)Hgu</sup>突变小鼠近亲交配产生B6.129P2(CF/3)-Cftr<sup>TgH(neoim)Hgu</sup> (“CF<sup>MHH</sup>”)同类小鼠，该突变小鼠是通过在Cftr基因的外显子10中进行插入诱变而产生。参见Charizopoulou等，“Instability Of The Insertional Mutation In Cftr<sup>TgH(neoim)Hgu</sup> Cystic Fibrosis Mouse Model,” BMC Genet.5,第6页(2004)，该文献以引用的方式整体并入本文中。然后，使这一同类Cftr<sup>MHH</sup>品系回交得到B6背景。这些小鼠仍表达较低水平的CFTR，并因此可以喂食标准小鼠饮食。其展现正常发育，而且还展示CF特有的肺部病变。这些小鼠在本文中称为“CF”小鼠。参见Teichgräber等，“Ceramide Accumulation Mediate Inflammation, Cell Death And Infection Susceptibility In Cystic Fibrosis,” Nat Med.14(4),第382-391页(2008)；Wolbeling等，“Head-out Spirometry Accurately Monitors the Course of Pseudomonas aeruginosa Lung Infection in Mice,” Respiration 80:340-6(2010)，这些文献以引用的方式整体并入本文中。使用同基因B6小鼠作为对照。

[0073] 对于一些实验，使Cftr<sup>tm1Unc-Tg(FABPCFTR)</sup>小鼠 (“Cftr<sup>-/-</sup>”，购自Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME)与C57BL/6小鼠回交超过10代。这些小鼠在除肠以外的所有器官中都完全缺乏Cftr，其中它们在脂肪酸结合蛋白 (“FABP”) 启动子控制下表达人CFTR。该转基因防止肠阻塞并且能够用正常饮食进行喂养。再次使用B6小鼠作为对照。在采用Cftr<sup>-/-</sup>和Cftr<sup>MHH</sup>两种品系的实验中未观察到显著差异。

[0074] 对于其它实验，使用了缺乏神经酰胺合成酶2的小鼠。这些小鼠 (CerS2<sup>-/-</sup>) 是通过破坏CerS2小鼠基因的第二个内含子产生的。其无法存活超过约16个月，并且在大多数组织中积累C16神经酰胺 (Pewzner-Jung等，“A Critical Role of Ceramide Synthase 2 in Liver Homeostasis I. Alterations in The Lipid Metabolic Pathway,” J Biol. Chem.285:10902(2010)，该文献以引用的方式整体并入本文中)。

[0075] 在德国杜伊斯堡-埃森大学 (University of Duisburg-Essen, Germany) 校立医院的动物园中，将小鼠圈养于独立的笼子内并使其繁殖。根据欧洲联盟实验动物科学协会 (Federation of European Laboratory Animal Science Associations) 2002年的推荐，针对一组常见鼠类病原体反复对其进行评价。这些小鼠无所有病原体。对这些动物执行的程序获得了德国杜塞尔多夫的杜塞尔多夫市政府行政部门 (Bezirksregierung Duesseldorf) 的批准。

[0076] 实施例2—抗体和试剂。

[0077] 所有神经酰胺染色都是使用单克隆小鼠抗神经酰胺抗体克隆S58-9 (Glycobiotech) 进行，通过Cy3-驴抗小鼠IgM F(ab)<sub>2</sub>片段 (Jackson#715-166-020) 或Cy5偶

联的驴抗小鼠IgM抗体(Jackson#715-176-020)进行观测。在中国仓鼠卵巢(“CHO”)细胞中产生重组人酸性神经酰胺酶并如先前所描述,将其从培养基中纯化出来。He等,J Biol.Chem.278:32978-86(2003),该文献以引用的方式整体并入本文中。

[0078] 实施例3—细菌。

[0079] 使用了实验室菌株美国典型培养物保藏中心(American Type Culture Collection)27853绿脓杆菌和先前所描述的临床用绿脓杆菌分离株(“762”)。将细菌从冷冻储备液接种到新制的胰蛋白酶大豆琼脂板(TSA;Becton Dickinson)上,使其在37℃下生长14-16小时,并将其再悬浮于40mL的37℃温热的胰蛋白酶大豆肉汤(Becton Dickinson)中达到在550nm下光学密度为0.225。然后,在125rpm振荡下,在37℃下将细菌悬浮液孵育1小时,以获得处于早期对数生长期的细菌。参见Grassmé等,“Host Defense Against *Pseudomonas aeruginosa* Requires Ceramide-Rich Membrane Rafts,”Nat Med.9(3):322-330(2003),该文献以引用的方式整体并入本文中。然后将细菌洗涤两次并使其再悬浮于补充有10mM HEPES的温热的RPMI-1640培养基(Invitrogen)(RPMI+HEPES)中。通过分光光度测定法对细菌的最终浓度进行定量。

[0080] 实施例4—体内免疫组织化学。

[0081] 为了对鼠类支气管上皮细胞进行免疫组织化学评价,利用颈椎脱臼法处死小鼠并立即在低压下经由右心灌注冰冷的生理盐水,持续两分钟。随后向心脏灌注4%的PBS缓冲的PFA,持续10至15分钟。在最初清除血液并固定之后,取出肺并将其另外固定于4%PFA中,保持24-36小时。使用乙醇至二甲苯梯度对该组织进行连续脱水,然后将其包埋于石蜡中。

[0082] 然后,将样品切成7 $\mu$ m切片,使其脱蜡,再水合并并在37℃下用胃蛋白酶(Invitrogen)处理15分钟。然后,用水和PBS对其进行洗涤,并在室温下用PBS和0.05% Tween 20(Sigma)以及1%FCS阻断10分钟。然后,在室温下,在H/S+1%FCS中用一抗对样品进行连续染色,保持45分钟。在染色之间,样品用PBS+0.05%Tween 20洗涤两次并且用PBS洗涤一次。组织接下来在暗处于H/S+1%FCS中用荧光偶联的二抗标记,保持30分钟。再用PBS+0.05%Tween 20洗涤组织两次,用PBS洗涤一次,最后包埋于Mowiol中。如以下所描述,使用共聚焦显微镜评价样品。

[0083] 实施例5—吸入和体内感染。

[0084] 如以上所描述来制备绿脓杆菌,并将其再悬浮于RPMI-1640加10mM HEPES中以达到在20 $\mu$ L培养基中最终浓度为 $1 \times 10^8$ CFU。然后,使用涂覆塑料的30号针进行接种,将针插入鼻中2mm。感染之后2小时,对小鼠肺中的细菌数量进行定量。处死小鼠并取出肺,将其均质化并于5mg/mL皂素中溶解以释放出细胞内细菌。然后在无菌PBS中洗涤样品,稀释并一式两份将其接种于TSA板上,保持12小时。对细菌数量进行计数并且其代表全肺样品中细菌的数量。这一感染模式比其它肺感染模型(如气管内感染)更准确地评价粘膜纤毛清除率。参见Teichgräber等,“Ceramide Accumulation Mediate Inflammation,Cell Death And Infection Susceptibility In Cystic Fibrosis,”Nat Med.14(4):382-391(2008); Zhang等,“Kinase Suppressor Of Ras-1Protects Against Pulmonary *Pseudomonas aeruginosa* Infections,”Nat Med.17(3):341-346(2011),这些文献以引用的方式整体并入本文中。

[0085] 实施例6—统计学。

[0086] 数据表示为算术平均值±标准差,并且如所指示的进行统计学分析。由于所有值都呈正态分布,故应用单因素方差分析(ANOVA)。显著性在附图中以星号指示。

[0087] 实施例7—共聚焦显微镜术和讨论。

[0088] 用装备有100x油浸镜头的Leica TCS-SP5共聚焦显微镜检查样品并用Leica LCS软件(Leica Microsystems)分析图像。所有比较样品都用相同设置进行测量。

[0089] CF受试者和小鼠的肺中神经酰胺增加(图1A),并且此为CF小鼠易感染绿脓杆菌的一个重要因素。参见Grassmé等,“CFTR-dependent Susceptibility Of The Cystic Fibrosis-Host To Pseudomonas aeruginosa,”*Int J Med Microbiol.*300(8):578-83(2010),该文献以引用的方式整体并入本文中。先前的研究证实,酸性鞘磷脂酶的药理学抑制或酸性鞘磷脂酶基因的遗传杂合性足以使小鼠CF肺中的神经酰胺水平正常化。参见Becker等,“Acid Sphingomyelinase Inhibitors Normalize Pulmonary Ceramide And Inflammation In Cystic Fibrosis,”*Am J Respir Cell Mol Biol.*42(6):716-24(2010),该文献以引用的方式整体并入本文中。

[0090] 此外,CF<sup>MHH</sup>Cftr缺陷型小鼠吸入酸性神经酰胺酶,该酶水解神经酰胺。这一吸入校正了CF小鼠支气管上皮细胞中的神经酰胺水平(图1B)。溶剂(即,0.9%NaCl)的吸入不影响神经酰胺水平。

[0091] 在另一个实施例中,使Cftr<sup>-/-</sup>小鼠、CerS2小鼠或正常小鼠吸入生理盐水或酸性神经酰胺酶,然后使其感染绿脓杆菌(图2)。相对于正常小鼠,CF<sup>MHH</sup>Cftr缺陷型小鼠和CerS2小鼠在其肺中积累神经酰胺。吸入之后两小时,将其处死并对肺中残留的细菌进行定量。野生型小鼠有效地清除绿脓杆菌,而吸入生理盐水的Cftr<sup>-/-</sup>小鼠或CerS2<sup>-/-</sup>小鼠无法清除并且具有大量的残留细菌。相比之下,吸入酸性神经酰胺酶的Cftr<sup>-/-</sup>小鼠或CerS2<sup>-/-</sup>小鼠像正常小鼠一样,具有极低的细菌滴度。

[0092] 天然CF气道中不规则性的鉴别为CF受试者感染的预防提供了一个新颖观念。本实施例提供了抵抗感染以及治疗使患有CF的受试者死亡的主导原因的若干方法。

[0093] 实施例8—吸入AC防止假单胞菌感染。

[0094] 在用 $1 \times 10^8$ 个菌落形成单位(CFU)的绿脓杆菌菌株762或ATCC 27853进行鼻内感染之前30至45分钟,使小鼠吸入含100微克重组酸性神经酰胺酶(AC)的0.8mL 0.9%NaCl。在感染后4小时取出肺,将其均质化,在5mg/mL皂素中溶解10分钟,并洗涤。将等分试样接种于LB板上并使其生长过夜。对LB板上的CFU进行计数以测定肺中绿脓杆菌细菌的数量。示出了四次独立实验的平均值±标准差。

[0095] 单次吸入AC防止CF小鼠感染两种不同的绿脓杆菌菌株(图3)。临床菌株762最初是从尿道感染获得,而菌株ATCC 27853是一种实验室菌株。仅吸入生理盐水被用作对照。

[0096] 使CF小鼠吸入重组酸性神经酰胺酶(100微克于0.8mL 0.9% NaCl中)。使用生理盐水作为对照。在所有情形中,小鼠在吸入之前30-45分钟,吸入临床绿脓杆菌菌株762,然后在4小时之后将其处死。在感染后4小时取出肺,将其均质化,在5mg/mL皂素中溶解10分钟,并洗涤。将等分试样接种于LB板上并使其生长过夜。对LB板上的CFU进行计数以测定肺中绿脓杆菌细菌的数量。

[0097] CF小鼠吸入重组酸性神经酰胺酶防止感染绿脓杆菌临床菌株762达到类似的程度(图3)。

[0098] 尽管在本文中已经详细描绘并描述了优选实施方案,但相关领域的技术人员应显而易见的是,在不偏离本发明的精神的情况下可以作出各种修改、添加、取代等,并因此,这些都被视为在如所附权利要求书中所界定的本发明的范围内。

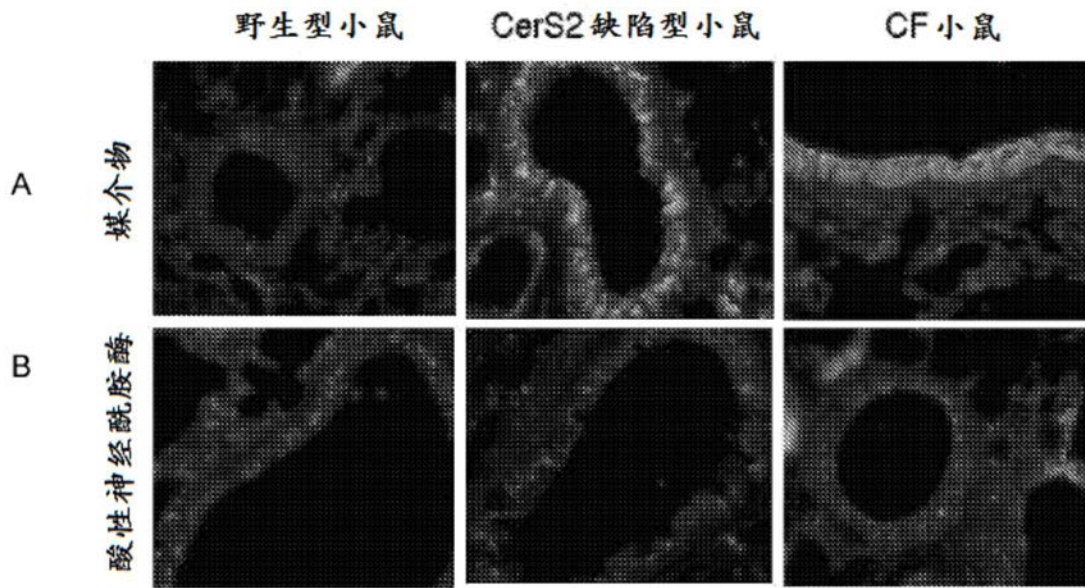


图1A-1B

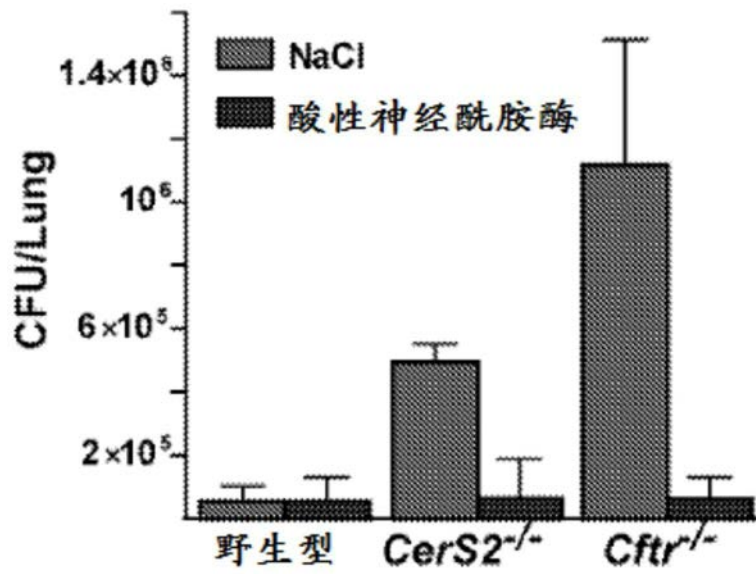


图2

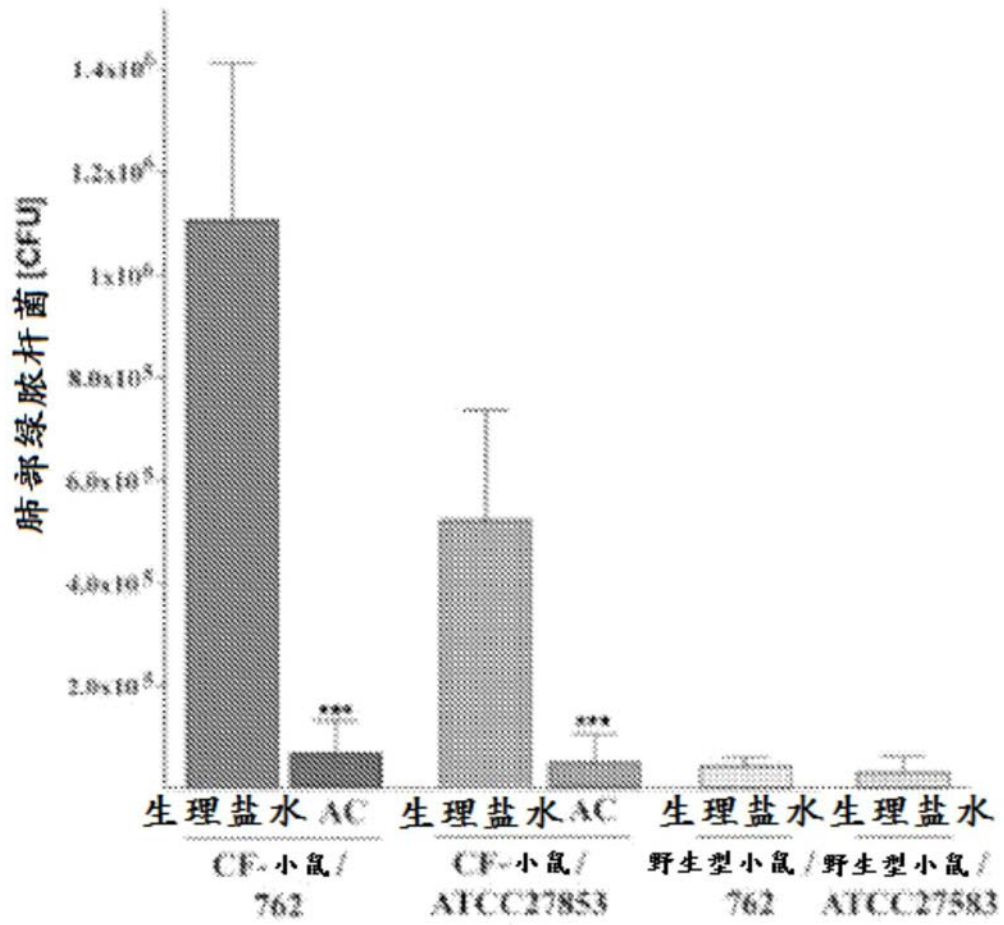


图3