(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 105474017 A
(43)申请公布日 2016.04.06

(21)申请号 201480043918.2

(22)申请日 2014.06.06

(30)优先权数据
61/832,302 2013.06.07 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2016.02.03

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2014/041405 2014.06.06

(87)PCT国际申请的公布数据
WO2014/197859 EN 2014.12.11

(71)申请人 建新公司
地址 美国马萨诸塞州

(72)发明人 W-L・庄 G・F・考克斯 X・K・张

(74)专利代理机构 北京市嘉元知识产权代理事务所(特殊普通合伙) 11484
代理人 张永新

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

权利要求书5页 说明书16页 附图3页

(54)发明名称

酸性鞘磷脂酶病症的标志物及其用途

(57)摘要

本发明提供筛选、诊断、监测和/或治疗酸性鞘磷脂酶(ASM)病症如尼曼-皮克(尼曼-皮克)病的方法。具体地,所述方法涵盖用于改进的ASM病症诊断和/或治疗的技术,举例来说使用酶替代疗法。

CN 105474017 A

1.一种治疗具有酸性鞘磷脂酶(ASM)病症的人受试者的方法,其包括:

(a)将具有第一浓度的用于治疗ASM病症的第一剂量的治疗剂施用至受试者;和

(b)如果在所述第一剂量施用后已确定所述受试者具有少于或等于参照水平的溶血-鞘磷脂(溶血-SPM)水平,则将具有等于或大于所述第一浓度的第二浓度的第二剂量的治疗剂施用至受试者。

2.权利要求1的方法,其进一步包括以渐增的剂量浓度重复步骤(a)-(b)的过程直至确定所述受试者具有大于参照水平的溶血-SPM水平。

3.权利要求1或2的方法,其中在所述受试者中确定溶血-SPM的水平包括:

(a)从所述受试者收集生物样品;

(b)在所述生物样品中测量溶血-SPM的水平;并

(c)将所述样品中的溶血-SPM的水平与参照水平比较。

4.权利要求1-3任一项的方法,其进一步包括如果确定所述受试者中溶血-SPM的水平大于参照水平,则维持所述剂量、降低所述剂量或中断所述治疗剂的施用。

5.权利要求1-4任一项的方法,其中在之前所述剂量后,将治疗剂的每个后续较高浓度剂量施用一、二、三、四、五、六或七天,或一、二、三或四周。

6.权利要求1-6任一项的方法,其中将治疗剂疗法的每个剂量施用至少两次。

7.权利要求1-6任一项的方法,其中如果在所述生物样品中溶血-SPM的水平大于约100-700ng/ml的参照水平,或至少是参照水平的约1.1-10倍高,或至少约3倍高,则检测到升高的溶血-SPM水平。

8.权利要求1-7任一项的方法,其中如果在所述生物样品中的溶血-SPM的水平比约400ng/ml的参照水平多,则检测到升高的溶血-SPM水平。

9.权利要求1-7任一项的方法,其中如果在所述生物样品中的溶血-SPM的水平比约500ng/ml的参照水平多,则检测到升高的溶血-SPM水平。

10.权利要求1-9任一项的方法,其中所述生物样品是全血。

11.权利要求10的方法,其中所述全血是干血斑。

12.权利要求1-11任一项的方法,其中所述生物样品是血清。

13.权利要求1-12任一项的方法,其中将所述治疗剂静脉内、皮内、皮下或肌内施用。

14.权利要求1-13任一项的方法,其中所述治疗剂包含重组人酸性鞘磷脂酶(rhASM)或修饰的rhASM。

15.权利要求1-14任一项的方法,其进一步包括施用维持剂量的治疗剂,其中所述维持剂量包含等于或少于未检测到升高的溶血-SPM水平的受试者所耐受的治疗剂最高浓度剂量的剂量。

16.权利要求15的方法,其中所述维持剂量是相比所述耐受的最高剂量浓度较低的治疗上有效的剂量。

17.权利要求15或16的方法,其中将所述维持剂量每二至四周施用至所述受试者。

18.权利要求1-17任一项的方法,其中所述ASM病症是NPD类型A或NPD类型C。

19.权利要求1-18任一项的方法,其中所述ASM病症是NPD类型B。

20.权利要求1-19任一项的方法,其中所述受试者在编码酸性鞘磷脂酶的基因中具有错义突变。

21.权利要求20的方法,其中所述突变是L302P、H421Y或R496L。

22.权利要求1-21任一项的方法,其中所述受试者在编码酸性鞘磷脂酶的基因中具有突变且所述突变是ΔR608。

23.一种治疗具有ASM病症的人受试者的方法,其包括:

(a)将重组人酸性鞘磷脂酶(rhASM)或修饰的rhASM的约0.03至约1.0mg/kg的第一剂量施用至人受试者;

(b)从所述受试者收集生物样品;

(c)在所述生物样品中测量溶血-鞘磷脂(溶血-SPM)的水平;

(d)将所述样品中的溶血-SPM的水平与参照水平比较;

(e)如果在施用所述第一剂量的rhASM或修饰的rhASM后在所述生物样品中溶血-SPM的水平少于或等于参照水平,则施用具有等于或大于所述第一浓度的浓度的第二剂量的rhASM或修饰的rhASM;和

(f)以渐增的剂量浓度重复步骤(a)-(e)的过程直至施用rhASM或修饰的rhASM的剂量后溶血-SPM的水平大于参照水平。

24.权利要求23的方法,其进一步包括如果溶血-SPM的水平大于所述参照水平,则维持所述剂量、降低所述剂量或中止rhASM或修饰的rhASM的施用。

25.权利要求23或24的方法,其中在之前所述剂量后,将每个后续较高浓度剂量施用一、二、三或四周。

26.权利要求23-25任一项的方法,其中将rhASM或修饰的rhASM的每种剂量施用至少两次。

27.权利要求23-26任一项的方法,其中如果在所述样品中溶血-SPM的水平大于约100-700ng/ml的参照水平,或至少是参照水平的约1.1-10倍高,或至少约3倍高,则检测到升高的溶血-SPM水平。

28.权利要求23-27任一项的方法,其中如果在所述样品中溶血-SPM的水平大于约400ng/ml的参照水平,则检测到升高的溶血-SPM水平。

29.权利要求23-27任一项的方法,其中如果在所述样品中溶血-SPM的水平大于约500ng/ml的参照水平,则检测到升高的溶血-SPM水平。

30.权利要求23-29任一项的方法,其中所述生物样品是全血。

31.权利要求30的方法,其中所述全血是干血斑。

32.权利要求23-29任一项的方法,其中所述生物样品是血清。

33.权利要求23-32任一项的方法,其中将所述rhASM或修饰的rhASM静脉内、皮内、皮下或肌内施用。

34.权利要求23-33任一项的方法,其进一步包括施用维持剂量,其中所述维持剂量包含等于或少于未检测到升高的溶血-SPM水平的受试者所耐受的最高浓度剂量的rhASM或修饰的rhASM剂量。

35.权利要求34的方法,其中所述维持剂量是相比所述耐受的最高剂量浓度较低的治疗上有效的rhASM或修饰的rhASM的剂量。

36.权利要求34或35的方法,其中将所述维持剂量每二至四周施用至所述受试者。

37.权利要求23-26任一项的方法,其中所述ASM病症是NPD类型A或NPD类型C。

38.权利要求23-26任一项的方法,其中所述ASM病症是NPD类型B。

39.一种在治疗ASM病症的疗法过程中监测受试者不良副作用的方法,所述方法包括将治疗剂的剂量施用至受试者以治疗ASM病症、在施用所述剂量的治疗剂后从所述受试者收集生物样品、测量所述样品中溶血-鞘磷脂(溶血-SPM)水平、将所述样品中溶血-SPM的水平与参照水平比较,且如果在所述样品中溶血-SPM的水平大于参照水平则检测到不良副作用。

40.权利要求39的方法,其中如果所述样品中溶血-SPM的水平大于约100-700ng/ml的参照水平,或至少是参照水平的约1.1-10倍高,或至少约3倍高,则检测到不良副作用。

41.权利要求39或40的方法,其中如果在所述生物样品中溶血-SPM的水平大于约400ng/ml,则检测到不良副作用。

42.权利要求39-41任一项的方法,其中如果在所述样品中溶血-SPM的水平大于约500ng/ml,则检测到不良副作用。

43.权利要求39-42任一项的方法,其中所述生物样品是全血。

44.权利要求43的方法,其中所述全血是干血斑。

45.权利要求39-42任一项的方法,其中所述生物样品是血清。

46.权利要求39-45任一项的方法,其中将所述治疗剂以渐增浓度的顺序剂量施用,其中通过测量每次剂量施用后生物样品中溶血-SPM的水平监测所述受试者的毒副作用。

47.权利要求46的方法,其中如果之前剂量施用后检测到大于参照水平的溶血-SPM水平,则不施用较高浓度剂量的治疗剂。

48.权利要求39-47任一项的方法,其中如果在治疗剂的所述剂量施用后在所述生物样品中溶血-SPM水平大于参照水平超过约1、6、12、18或24小时,或1-7天、一周或两周,则检测到不良副作用。

49.权利要求39-48任一项的方法,其中所述治疗剂是重组人酸性鞘磷脂酶(rhASM)或修饰的rhASM。

50.一种在受试者中诊断ASM病症的方法,所述方法包括从所述受试者中收集生物样品、测量所述样品中溶血-鞘磷脂(溶血-SPM)的水平、将所述样品中溶血-SPM的水平与参照水平比较,且如果在所述样品中溶血-SPM的水平大于参照水平则诊断ASM病症。

51.权利要求50的方法,其中所述ASM病症是NPD类型A或NPD类型C。

52.权利要求50或51的方法,其中所述ASM病症是NPD类型B。

53.权利要求50-52任一项的方法,其中所述受试者在编码酸性鞘磷脂酶的基因中具有错义突变。

54.权利要求53的方法,其中所述突变是L302P、H421Y或R496L。

55.权利要求50-54任一项的方法,其中所述受试者在编码酸性鞘磷脂酶的基因中具有突变且所述突变是ΔR608。

56.权利要求50-56任一项的方法,其中所述生物样品是全血。

57.权利要求56的方法,其中所述全血是干血斑。

58.权利要求50-56任一项的方法,其中所述生物样品是血清。

59.权利要求50-58任一项的方法,其中如果所述样品中溶血-SPM的水平大于约200-2000ng/ml的参照水平,或大于约200、400、525、575、700、900或2000ng/ml的参照水平,或至

少是参照水平的约1-10倍高，则检测到ASM病症。

60.权利要求50-59任一项的方法，其中如果在所述样品中溶血-SPM的水平大于约575ng/ml，则检测到ASM病症。

61.权利要求50-59任一项的方法，其中如果在所述样品中溶血-SPM的水平大于约900ng/ml，则检测到ASM病症。

62.权利要求50-61任一项的方法，如果诊断到ASM病症，则其进一步包括将酶替代疗法施用至所述受试者。

63.权利要求62的方法，其中所述酶替代疗法包括将rhASM或修饰的rhASM施用至所述受试者。

64.一种试剂盒，其包含用于收集含有溶血-SPM的生物样品的装置和用于使用所述试剂盒以测量在所述生物样品中的溶血-SPM水平的说明。

65.权利要求64的试剂盒，其进一步包含用于测量在所述生物样品中溶血-SPM水平的装置。

66.权利要求64或65的试剂盒，其中所述生物样品是血清或全血。

67.权利要求66的试剂盒，其中所述全血是干血斑。

68.权利要求64-67任一项的试剂盒，其中所述试剂盒进一步包含将所述样品中溶血-SPM的水平与参照水平比较并且如果在所述样品中溶血-SPM的水平大于参照水平则诊断ASM病症或在治疗ASM病症的过程中检测到副作用的说明。

69.一种治疗具有ASM病症的人受试者的方法，其包括：

(a)将具有第一浓度的用于治疗ASM病症的第一剂量的治疗剂施用至所述受试者；

(b)从所述受试者收集生物样品；

(c)在所述生物样品中测量溶血-鞘磷脂(溶血-SPM)的水平；

(d)将所述样品中溶血-SPM的水平与参照水平比较；和

(e)如果在所述生物样品中溶血-SPM的水平少于或等于参照水平，则施用具有等于或大于所述第一浓度的浓度的第二剂量的治疗剂。

70.一种校准在受试者中用于治疗ASM病症的治疗剂的剂量的方法，其包括：(a)施用具有第一浓度的用于治疗ASM病症的第一剂量的治疗剂后，从所述受试者收集生物样品，(b)测量在所述生物样品中的溶血-鞘磷脂(溶血-SPM)的水平，并(c)将所述样品中溶血-SPM的水平与参照水平比较，其中如果在所述生物样品中溶血-SPM的水平少于或等于所述参照水平，或少于参照水平的1.1-10倍，则可增加所述治疗剂的剂量，而如果大于参照水平，或至少是参照水平的约1.1-10倍高，则可降低所述治疗剂的剂量。

71.权利要求70的方法，其中所述生物样品是血液样品、血浆样品、血清样品和/或干血斑。

72.权利要求70或71的方法，其中如果在所述生物样品中溶血-SPM的水平少于或等于参照水平，则建议升高的剂量和/或将其施用至所述受试者并重复校准。

73.权利要求72的方法，其中以渐增的更高剂量重复所述校准直至在所述生物样品中溶血-SPM的水平匹配参照水平。

74.权利要求73的方法，其中将维持剂量施用至受试者，其中所述维持剂量是在校准过程中鉴定为导致溶血-SPM的水平等于参照水平的剂量的剂量。

75.权利要求70-74任一项的方法，其中所述治疗剂是重组人酸性鞘磷脂酶(rhASM)或修饰的rhASM。

76.一种确定用于在受试者中治疗ASM病症的治疗剂的有效剂量的方法，其包括：(a)施用具有第一浓度的用于治疗ASM病症的第一剂量的治疗剂后，从所述受试者收集生物样品，(b)测量所述生物样品中溶血-鞘磷脂(溶血-SPM)的水平，并(c)将所述样品中溶血-SPM的水平与参照水平比较，其中如果在所述生物样品中溶血-SPM的水平少于或等于所述参照水平，或少于参照水平的1.1-10倍，则可增加所述治疗剂的剂量，而如果大于参照水平，或如果至少是参照水平的约1.1-10倍高，则可降低所述治疗剂的剂量。

77.权利要求76的方法，其中所述生物样品是血液样品、血浆样品、血清样品和/或干血斑。

78.权利要求76或77的方法，其中所述治疗剂是重组人酸性鞘磷脂酶(rhASM)或修饰的rhASM。

79.一种检测受试者中用于治疗ASM病症的治疗剂超剂量的方法，其包括：(a)施用具有第一浓度的用于治疗ASM病症的第一剂量的治疗剂后，从所述受试者收集生物样品，(b)测量所述生物样品中溶血-鞘磷脂(溶血-SPM)的水平，并(c)将所述样品中溶血-SPM的水平与参照水平比较，其中如果在所述生物样品中溶血-SPM的水平大于所述参照水平，或如果在所述生物样品中溶血-SPM的水平大于所述参照水平的1.1-10倍高，则检测到超剂量。

80.权利要求79的方法，其中所述生物样品是血液样品、血浆样品、血清样品和/或干血斑。

81.权利要求79或80的方法，其中所述治疗剂是重组人酸性鞘磷脂酶(rhASM)或修饰的rhASM。

82.一种筛选受试者或受试者群体的ASM病症的方法，其包括：(a)施用具有第一浓度的用于治疗ASM病症的第一剂量的治疗剂后，从所述受试者收集生物样品，(b)测量所述生物样品中溶血-鞘磷脂(溶血-SPM)的水平，并(c)将所述样品中溶血-SPM的水平与参照水平比较，其中如果在所述生物样品中溶血-SPM的水平大于所述参照水平，则将受试者鉴定为具有或可能具有ASM病症。

83.权利要求82的方法，其中所述生物样品是血液样品、血浆样品、血清样品和/或干血斑。

84.权利要求82或83的方法，其中使用基因测试或ASM酶活性测试对具有升高的溶血-SPM水平的受试者的ASM病症进行进一步评估。

85.权利要求82-84任一项的方法，其进一步包括将用于治疗ASM病症的治疗剂施用至鉴定为具有或可能具有ASM病症的受试者。

86.权利要求82-85任一项的方法，其中所述治疗剂是重组人酸性鞘磷脂酶(rhASM)或修饰的rhASM。

87.权利要求82-86任一项的方法，其中如果在所述样品中溶血-SPM的水平大于约200-2000ng/ml的参照水平，或至少是参照水平的约1-10倍高，则将所述受试者鉴定为具有或可能具有ASM病症。

酸性鞘磷脂酶病症的标志物及其用途

[0001] 本申请要求保护2013年6月7日提交的美国临时申请号61/832,302的35U.S.C.§119下的优先权,其在本文通过提述以其全文并入。

[0002] 本公开涉及筛选、诊断、监测和/或治疗酸性鞘磷脂酶(ASM)病症如尼曼-皮克病(Niemann-Pick disease)的方法。

[0003] 酸性鞘磷脂酶(ASM)是溶酶体磷酸二酯酶,其将鞘磷脂(SPM),一种存在于脑、肝、肺、脾和淋巴结中的磷脂储存物质,水解为神经酰胺和磷酸胆碱。ASM活性的丧失可导致机体不能分解SPM。在具有ASM病症的患者中,SPM主要在巨噬细胞中积累,但也在肝细胞和其他细胞类型中,导致显著的肝脾肿大、血小板减少症、肺间质性疾病和冠状动脉疾病。SPM在血浆、全血或尿中并不显著升高,使其作为非侵入性生物标记的用途有限。

[0004] ASM病症的诊断目前需要侵入性测试且/或耗费时间的医疗检验,如疑似临床表征和症状的评估,肝或肺活检、在血液样品中对ASM活性进行测试(其中已报道了假阴性和假阳性病例)和/或基因测试(例如,SMPD1基因突变分析)。ASM病症的治疗可包括替代酶的施用。在高剂量,酶替代疗法可导致毒性或有害代谢物的产生。相应地,对开发改进的用于筛选、诊断和/或监测ASM病症治疗过程的方法存在需求。本文公开了非侵入性筛选、诊断、监测疗法的和/或调整用于治疗ASM病症的治疗剂的剂量方法,其包括在生物样品中测量溶血-SPM的水平(神经鞘氨醇磷酸胆碱(sphingosylphosphorylcholine)或溶血-鞘磷脂)。可将升高的溶血-SPM水平用于筛选或诊断ASM病症。升高的溶血-SPM水平也可用作一种或多种与过高剂量的酶替代疗法相关的毒性代谢物产生的信号或征兆,进而允许校准酶疗法以降低SPM的积聚同时避免所述疗法的有害副作用。升高的溶血-SPM水平还可用于监测ASM病症治疗过程的长期效力(例如,如果溶血-SPM水平在治疗过程未减少,这可表明治疗无效)。

[0005] 尼曼-皮克病(NPD)是一种遗传性常染色体隐性脂质贮积病症,通过SPM在细胞如巨噬细胞和神经元的溶酶体中损害正常细胞功能的过度积累表征。尼曼-皮克A型("NPD-A")是在婴儿中迅速进展的神经退行性疾病且通常导致在二至三岁内死亡。尼曼-皮克B型("NPD-B")导致肝脏和脾脏肿大,和呼吸窘迫,随后通常在成年早期发生死亡。其他尼曼-皮克病的类型,例如类型C("NPD-C"),也可能与SPM和/或溶血-SPM的积累相关。其在本文也称为ASM病症(ASMD)。这些尼曼-皮克病的形式在本文统称为尼曼-皮克病(NPD)。

[0006] NPD在德系犹太人(Ashkenazi Jewish)后裔中相比普通人群发生频率更高。估测在德系犹太人中NPD-A的发生率为约1/40,000,其中基因频率(q)为约1/200且杂合子携带频率(2pq)为1/100(Goodman,1979,in"Genetic Disorders Among The Jewish People",John Hopkins Univ.Press,Baltimore,pp.96-100)。NPD-B在德系犹太人群体中的杂合子携带率的频率较低。同上。在德系犹太人后裔的个体中,NPD A和B的组合杂合子携带频率估测为约1/70。同上。在不同国家进行的流行病学研究中,NPD A和B疾病的组合发生率在全球的数个国家新生儿中估测为1/167,000至1/250,000(Miekle等,1999JAMA 281(3):249-254;Poorthuis等,1999Hum.Genet.105:151-156;Pinto等,2004 Euro.J.Hum.Gene.12:87-92)。相信杂合子携带率为1/200个体至1/250个体。

[0007] 患有NPD-A或NPD-B的患者具有残留的ASM活性(约为正常的1至10%),但这不足以

预防鞘磷脂在溶酶体中的过度积累。此外，NPD-B的临床过程高度多变，且目前尚不能将疾病的严重性与残留ASM活性水平关联。尽管受NPD-A或NPD-B影响的患者的酶诊断可在血液样品中进行，但该诊断经常在侵入性方法如肝或肺活检之后进行。此外，专门的杂合子酶学检测已证明存在问题，特别是使用外周血白细胞作为酶的来源。一种可能性是在某些来源中中性鞘磷脂酶的出现和/或由突变等位基因导致的残留ASM活性的存在促成不能可靠地区别任一疾病亚型的携带者。即使使用培养的皮肤成纤维细胞(其不表达中性鞘磷脂酶)并未提供杂合体的明确结果。相应地，对用于精确检测、筛选、诊断和治疗ASM病症如NPD的可替换地方法存在需求。

[0008] 酶替代疗法(ERT)已用于治疗不同溶酶体贮积疾病。参见美国专利7,001,994和美国专利申请号2011/0052559，其讨论了泰萨二氏病(Tay-Sachs)、蓬佩病(Pompe)和尼曼-皮克病等的ERT，在本文以其全文通过提述并入。ERT尝试用外源提供的酶补充缺陷和/或不足的酶。在针对尼曼-皮克病的ERT的情况中，目的将是使受影响的个体能够处理鞘磷脂并避免其在溶酶体内的积聚。为有效起见，该疗法初始可需要足够大量的替代酶以分解积累的鞘磷脂，以及持续施用替代酶以避免随后鞘磷脂的再次积累。然而积累的鞘磷脂的代谢可导致毒性或有害代谢物的产生。因此，需要对ERT进行仔细协调以有效减少患者中积累的鞘磷脂而不产生升高的可能导致不良副作用的代谢物水平。

[0009] 如之前注意到的是，SPM在血浆、全血或尿中并未显著升高，使其作为非侵入性生物标记用于筛选、诊断或监测ASM病症的治疗的用途有限。如本文公开，溶血-SPM(神经鞘氨醇磷酸胆碱或溶血-鞘磷脂)，SPM的去酰化形式，在患有ASM病症和/或正在接受ASM病症治疗的患者的组织包括外周组织中显著升高，使其成为用于筛选、诊断和/或监测ASM病症治疗的潜在标志物。该二分法与许多其他可在血浆中检测到酰化和去酰化鞘糖脂两者的水平变化的溶酶体贮积症相反。给定改变的SPM水平在来自患有ASM病症或正在进行ASM病症治疗的患者的血浆中不能检测，可能已经预期到溶血-SPM将同样不适于筛选、诊断或监测治疗。然而，如本文公开，已发现溶血-SPM在来自不同组织包括外周组织如血浆的生物样品中可以以改变的水平检测。

[0010] 溶血-鞘脂类(溶血-SL)，其包含溶血-SPM，为鞘脂类的去酰化形式；数个研究已显示在某些溶酶体贮积症中有所升高。Galbiati等，"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)。溶血-SPM和其他溶血-SL产生的机制尚未完全阐明。缺乏鞘氨醇的同时升高表明相应的鞘脂类的去酰化是可能的生成途径。然而，目前仅有的已鉴定的鞘磷脂脱酰酶来自特应性皮炎受试者的角质层。Murata等，"Abnormal expression of sphingolipid acylase in atopic dermatitis:an etiologic factor for ceramide deficiency?",J.Invest.Dermatol.106:1242-1249(1996)。这种脱酰酶的表达在某些生理条件下似乎局限于所选细胞类型。来自胎盘、脑和尿的纯化的ASM已显示不水解溶血-SPM。Pentchev等，"The isolation and characterization of Sphingomyelinase from human placental tissue,"Biochim.Biophys.Acta.488:312-321(1977);Yamanaka和Suzuki,"Acid sphingomyelinase of human brain:purification to homogeneity,"J.Neurochem.38:1753-1764(1982);Quintern等，"Acid sphingomyelinase from human urine:purification and characterization," Biochim.Biophys.Acta.922:323-336(1987)。关于溶血-SPM的生物合成途径理解的缺乏进一步强调了预测其在患有ASM病症的患者中的先验表达水平的困难性。

[0011] 溶血-SPM在体外的血液中具有较短半衰期，这是由于其通过自体毒素(autotaxin)(一种具有溶血磷脂酶D活性的胞外酶)快速代谢成鞘氨醇-1-磷酸。Tokumura等，"Identification of human plasma lysophospholipase D,a lysophosphatidic acid-producing enzyme,as autotaxin,a multifunctional phosphodiesterase," J.Biol.Chem.277:39436-39442(2002)；Clair等，"Autotaxin hydrolyzes sphingosylphosphorylcholine to produce the regulator of migration, sphingosine-1-phosphate,"Cancer Res.63:5446-5453(2003)。除NPD-B患者的脾和肝和具有很少或无ASM活性且表现出严重的神经性疾病的NPD-A受试者的脑，在其他器官中并未报道存在溶血-SPM的水平。

[0012] 如本文公开，溶血-SPM可从来自患有ASM病症和/或正在针对ASM病症进行治疗的患者的生物样品(例如，取自外周组织的样品)中以改变的浓度检测到。改变的水平可反映治疗的瞬时效果(例如改变的溶血-SPM水平可充当用于响应ERT的急性毒性代谢物产生的标志物)。改变的水平还可在诊断上使用(例如，改变的溶血-SPM水平可充当诊断或筛选标志物以鉴定患有ASM病症的具有症状或症状发生前的受试者)。改变的水平也可用于监测对于ASM病症的治疗过程的长期效力(例如，如果溶血-SPM的水平在治疗过程中不降低，其可表明无效治疗)。相应地，本文公开的是使用新型生物标志物包括溶血-SPM(神经鞘氨醇磷酸胆碱或溶血-鞘磷脂)筛选、诊断、监测治疗进展和/或调整用于治疗ASM病症如NPD的治疗剂剂量的新方法。监测治疗过程可包括在治疗过程中检测一种或多种毒性标志物的水平的降低(例如溶血-SPM)，进而指明有效的治疗方案，或检测标志物水平随时间变化的缺乏，进而指明无效的方案。

[0013] 本文公开的方法也包括治疗患有酸性鞘磷脂酶(ASM)病症的人受试者的方法。一些方面，所述方法可包括将具有第一浓度的用于治疗ASM病症的第一剂量的治疗剂施用至受试者；和如果在所述第一剂量施用后已确定所述受试者具有少于或等于参照水平的溶血-SPM水平，则将具有等于或大于所述第一浓度的第二浓度的第二剂量的治疗剂施用至受试者。所述方法可包括在来自外周组织的生物样品中测量溶血-SPM和通过检测改变的溶血-SPM水平鉴定患有ASM病症的患者。所述方法还包括通过检测一种或多种作为用治疗剂(例如在患者组织中降低SPM水平的作用剂)治疗患者的结果而改变的毒性标志物包括溶血-SPM的水平来监测或调整对于患者ASM病症的治疗。所述方法允许对这些患者的非侵入性评估。

[0014] 本文公开的方法还可在一些实施方案中使用以筛选、诊断、监测治疗进展和/或调整对ASM病症如NPD的治疗。举例来说，所述方法包括通过测量毒性标志物(例如溶血-SPM)来调整给予患者的用于治疗ASM病症的治疗剂剂量，进而管理由治疗导致的毒性代谢物的水平。本文公开的方法可在某些实施方案中用于监测对于ASM病症治疗过程的长期效力(例如如果溶血-SPM的水平在治疗过程中未减少，其可表明无效治疗)。所述方法在某些实施方案中可用于筛选受试者(例如症状出现前的患者)升高的溶血-SPM作为ASM病症的初始征兆。随后对筛选中鉴定为具有升高的溶血-SPM的受试者可给予额外评估(例如ASM血液测

试、基因测试等)以诊断/确认ASM病症的诊断，而那些未展示升高的溶血-SPM的受试者将不被给予额外评估。该筛选方法可能潜在降低测试花销。

[0015] 本文公开的方法可包括在来自人受试者的生物样品中测量溶血-SPM并基于测量的溶血-SPM水平以优化的浓度施用用于治疗ASM病症的治疗剂(例如ERT、分子伴侣疗法和/或底物减少疗法)。在多个实施方案中，所述生物样品是外周样品。在一些实施方案中，所述生物样品可以是血浆、全血(例如干血斑)、血清和/或尿的样品。使用外周样品来测量溶血-SPM水平可避免对于侵入性方法如肝活检的需要。

附图说明

[0016] 图1A是展示在来自NPD-A和NPD-B患者的干血斑(DBS)中SPM浓度与来自正常对照样品的DBS中的平均浓度值的比率的点线图。图1B是展示来自NPD-A和NPD-B患者的DBS中溶血-SPM的浓度与来自正常对照样品的DBS中的平均浓度值的比率的点线图。

[0017] 图2是柱状图，展示在所示时间点(给药后1、2、4、6、24、48和72小时)来自ASM敲除小鼠的DBS中溶血-SPM浓度(纵轴)与0、3或20mg/kg rhASM单剂量施用5分钟后浓度相比的升高倍数。

[0018] 图3展示施用单剂量(10mg/kg)或减少剂量方案(debulking dosing regimen)(3mg/kg)随后为20mg/kg的rhASM剂量后，从野生型(C57BL/6)或ASM敲除型(ASMKO)小鼠获得的DBS中溶血-SPM(ng/ml)的浓度。血液样品在下列时间点提取:给药后5分钟、4小时、6小时、24小时和72小时。10mg/kg剂量组的动物在24小时时间点后不得不进行安乐死。

[0019] 图4的柱状图表明在26周时间段内在rhASM给药前、和施用rhASM剂量24、48和72小时后来自人尼曼-皮克患者DBS中溶血-SPM(ng/ml)的浓度。所述剂量(0.1、0.3、0.6、1、2或3mg/kg)和施用日期(第1天、第2、4、6、8、10、12、14和26周)在水平轴上表示。在26周，仅在给药前和给药后的24和48小时取样。

[0020] 一些例示性实施方案的说明

[0021] 根据本发明的公开提述内容将以一些例示性的实施方案详细阐述，其中的一些实例阐述于附图中。在可能之处，贯穿附图将使用相同的引用编号以指代相同或类似的部分。

[0022] 在本申请中，除非另外具体表明，否则单数的使用包括复数。在本申请中，除非另外表明，“或”的使用意为"和/或"。此外，术语"包括"的使用以及其他形式如"包含"和"含有"并非是限制性的。本文描述的任何范围将理解为包括终点和在终点间的全部值。

[0023] 本文使用的章节标题仅出于编排目的且不应理解为对主题的限制。在本申请中引用的全部文件或文件部分，包括但不限于专利、专利申请、文章、书和条约通过提述以其全文明确并入此处用于任何目的。

[0024] 本文公开的是筛选、诊断、监测治疗进展和/或调整用于治疗ASM病症如NPD的治疗剂的剂量的方法。"ASM病症"可涵盖任何伴有酸性鞘磷脂酶的降低表达或受损功能的病症。ASM病症还可涵盖任何其他与鞘磷脂在组织中的积累相关的病症。

[0025] 在一些实施方案中，所述方法可包括将具有第一浓度的用于治疗ASM病症的第一剂量的治疗剂施用至受试者;且随后如果在所述第一剂量施用后已确定所述受试者具有少于或等于参照水平(例如，来自不具有ASM病症的对照受试者的样品中的水平，或在治疗前于患者中测量的基线水平)的溶血-SPM水平，则将具有等于或大于所述第一浓度的第二浓

度的第二剂量的治疗剂施用至受试者。

[0026] 一些方面，所述方法包括收集和测量来自人受试者的生物样品中的溶血-鞘磷脂(溶血-SPM)。测量的溶血-SPM水平可用于筛选、诊断、监测治疗进展和/或调整用于治疗ASM病症的治疗剂的剂量。所述方法是基于溶血-SPM在来自具有ASM病症如NPD的患者的外周组织的生物样品中显著升高的发现，其允许对于这些患者的非侵入性评估，包括筛选和诊断ASM病症和对于ASM病症的疗法的监测/校准/管理。所述方法还基于以下发现：积累的ASM在治疗过程中的分解可导致为毒性或有害代谢物的产生传递信号的标志物(例如溶血-SPM)水平的升高，且这些代谢物的有害水平可通过以预防过多代谢物产生的剂量施用经设计以降低SPM水平的治疗剂(例如ERT、分子伴侣和/或底物减少疗法)的方法来避免。升高的溶血-SPM浓度的测量可用于检测这些代谢物的产生，且可用于校准疗法以避免代谢物过度升高的水平(例如毒性水平)的产生。在一些实施方案中，溶血-SPM在接受对于ASM病症治疗的患者中的水平决定剂量是否增加、减少、重复、延迟或中止。

[0027] 在具有ASM病症(例如NPD患者)的受试者中升高的溶血-SPM水平的检测可用作对于在治疗过程中不良副作用的监测方法的一部分。举例来说，所述方法可包括从受试者收集生物样品、测量样品中溶血-鞘磷脂(溶血-SPM)的水平，将测量的样品中溶血-SPM的水平与参照水平比较，且如果在所述样品中溶血-SPM的水平升高则检测到副作用。在一些实施方案中，如果溶血-SPM的水平与参照样品(例如，来自不具有ASM病症的对照受试者的样品中的参照水平)相比升高预先确定的量，或如果受试者中溶血-SPM的水平在治疗过程中增加预先确定的量(即在治疗前患者中测量的基线水平之上的增加，在本文也称作参照水平)，则测量的溶血-SPM水平可用作来自治疗的不良副作用的指示。在一些实施方案中，所述治疗是酶替代疗法(ERT)且ERT的剂量如下来管理：收集一种或多种来自患者的生物样品，测试每个样品的溶血-SPM的升高，并将ERT的剂量设置为不产生高于预先确定阈值的升高的溶血-SPM的水平。管理治疗剂的剂量可包括增加、降低或维持治疗剂的浓度和/或中止治疗。在一些实施方案中，一剂治疗剂施用后和/或在施用随后剂量的治疗剂之前的即刻，收集一种或多种生物样品。在一些实施方案中，如果生物样品中的溶血-SPM的水平(例如血液样品如血浆、血清或干血斑)大于约100-700ng/ml的参照水平(例如大于约100、200、250、300、400、500、600或700ng/ml或其间的任何浓度)，或如果生物样品中的溶血-SPM的水平在参照之上增加至少约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或10倍或更多(或其间的任何值)，则可检查到不良副作用。举例来说，增加可为至少约3倍。参照水平可以是例如来自不具有ASM病症的对照受试者的生物样品中的水平或在用治疗剂的剂量治疗前在患者中测量的基线水平。

[0028] 本文还公开了治疗具有ASM病症(例如NPD)的受试者的方法。在多个实施方案中，所述方法包括以渐增浓度的连续剂量施用用于治疗ASM病症的治疗剂(例如ERT、分子伴侣疗法和/或底物减少疗法)并在每次剂量后(例如给药后的1分钟、5分钟、10分钟、30分钟、或45分钟或1、2、3、4、5、10、12、15或20小时，或1天、2天、5天、1周、2周、3周或4周，或期间的任何时间段)或在下次给药之前的即刻，监测受试者生物样品中升高的溶血-SPM水平。对受试者的监测可包括从受试者收集生物样品、测量所述样品中的溶血-SPM的水平、将样品中的溶血-SPM的水平与参照水平(例如来自不具有ASM病症的供体的样品中的水平，或治疗前ASM患者中的水平)比较，和与参照水平比较检测所述样品中升高的溶血-SPM水平。在一些

实施方案中，参照水平是在来自不具有ASM病症的对照受试者的生物样品中测量的溶血-SPM的水平。在一些实施方案中，参照水平是在之前较低剂量的ERT施用后或施用任何ERT之前取自受试者的样品中测量的溶血-SPM的水平。在一些实施方案中，生物样品(例如血液样品如血清样品、血浆样品或干血斑)中升高的溶血-SPM水平是大于参照水平的水平，上述参照水平例如约100-700ng/ml。在一些实施方案中，生物样品中升高的溶血-SPM水平是比参照水平多至少约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或10倍，或更多(或其间的任何值)的水平。举例来说，所述水平为至少约3倍高。在一些实施方案中，如果在施用了之前的剂量后检测到升高的溶血-SPM水平，则不施用更高浓度剂量的ERT。

[0029] 除监测疗法和治疗方法，本文还公开了对受试者中的ASM病症(例如NPD)进行筛选和/或诊断的方法。在多个实施方案中，所述方法包括从受试者中收集生物样品、测量样品中溶血-SPM的水平，将所述样品中溶血-SPM的水平与参照水平比较，且如果所述样品中溶血-SPM的水平相对参照样品升高，则检测/诊断ASM病症。在一些实施方案中，参照样品是来自不具有ASM病症的对照受试者的样品。在一些实施方案中，如果生物样品中溶血-SPM的水平相比参照水平高至少约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或10倍或更多(或其间的任何值)，或比至少约200-2000ng/ml的参照水平高，如比至少约200ng/m、至少约250ng/ml、至少约300ng/ml、至少约400ng/ml、至少约500ng/ml、至少约525ng/ml、至少约575ng/ml、至少约700ng/ml和/或至少约900ng/ml的参照水平高(例如高于约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或2000ng/ml或其间的任何浓度)，则可对ASM病症进行筛选和/或诊断。在一些实施方案中，来自正常受试者的生物样品可包含范围在约25-200ng/ml的溶血-SPM水平(例如约25、50、75、100、125、150、175或200ng/ml，或其间的任何浓度)。

[0030] 溶血-SPM的测量

[0031] 对于溶血-SPM化学结构的讨论，参见例如Ito等，J.Biol.Chem.270:24370-4(1995)；还参见Caymen Chemical Co.产品编号10007947，如在其产品目录中提供：

[0032] https://www.caymanchem.com/app/template/Product.vm/catalog/10007947

[0033] 本文公开的方法涉及从多种生物样品中测量溶血-SPM，包括来自外周组织的样品。可使用任何用于收集、制备和定量来自生物样品中的溶血-SPM的水平的方法。生物样品中溶血-SPM的水平可使用光谱定量、如质谱、例如LC/MS/MS，或电磁频谱，例如UV-VIS、IR或NMR。在一些实施方案中，定量溶血-SPM的水平的方法可包括收集生物样品(例如通过动脉或静脉穿刺、组织活检、颊拭、尿样等)，检测溶血-SPM和/或将溶血-SPM与所述样品的其他组分分离(例如使用抗体、指示剂化学品、质谱如LC/MS/MS，或电磁频谱如UV-VIS、IR或NMR)，并将溶血-SPM的水平与参照样品中的水平比较。

[0034] 溶血-SPM水平可用本文描述的方法在来自多种组织的生物样品中测量。举例来说，可收集来自外周组织的生物样品，如血浆、全血(例如干血斑)、血清、皮肤和/或尿用于检测升高的溶血-SPM水平。也可使用来自其他组织的生物样品，例如脾、肺、心、肝、肾和/或脑组织。可使用来自两种或多种组织(例如2、3、4、5或更多种组织)的组合样品。在一些实施方案中，使用来自外周组织的生物样品可避免对侵入性方法如肝活检的需要。

[0035] 在一些实施方案中，在检测和/或测量样品中的溶血-SPM前，对生物样品进行一种

或多种预处理步骤。在一些实施方案中，所述样品通过离心、过滤、沉淀、透析或色谱，或通过这些预处理步骤的组合进行预处理。在其他实施方案中，所述样品通过冷冻、化学固定、石蜡包埋、脱水、透化和/或匀质化进行预处理，随后进行离心、过滤、沉淀、透析和/或色谱。在一些实施方案中，所述样品通过在评估溶血-SPM前去除来自样品中的一些细胞类型或去除来自样品中的碎片进行预处理。

[0036] 在多个实施方案中，生物样品使用用于定量或半定量一种或多种所述样品中的标志物的装置进行评估。举例来说，溶血-SPM的水平和/或样品中的其他标志物可定量或半定量地评估。在一些实施方案中，可使用用于定量生物样品中溶血-SPM和/或其他标志物的水平的装置如串联液相质谱(例如LC/MS/MS)。在一些实施方案中，可使用一种或多种抗体或其他检测剂以结合生物样品中的溶血-SPM和/或其他标志物。可应用一种或多种与检测剂反应的作用剂(例如显色剂)以发射可检测的信号，其信号的强度、密度、颜色等可用于半定量或定量确定样品中的溶血-SPM和/或其他标志物的水平(例如，通过比较来自一种或多种参照样品的信号)。也可使用用于定量生物样品中溶血-SPM和/或其他标志物的其他方法，例如免疫测试如ELISA、免疫沉淀和蛋白免疫印迹，以及荧光激活细胞分选(FACS)、荧光共振能量转移(FRET)、RT-PCR和/或Northern印迹方法。

[0037] 管理ASM病症的治疗

[0038] 在多个实施方案中，溶血-SPM水平可作为ASM病症疗法的一部分测量。举例来说，ASM病症可以是尼曼-皮克病(NPD)，例如NPD-A、NPD-B或NPD-C。用于ASM病症的疗法可包括施用一种或多种降低患者组织中SPM水平的治疗剂(例如ERT、分子伴侣疗法和/或底物减少疗法)。举例来说，可使用患者内剂量递增酶替代治疗(ERT)方法，如公开于美国申请号2011/0052559的ASM剂量递增方法，其在本文通过提述以其全文并入(参见举例来说，第[0063]-[0075]段，对剂量递增方法进行了描述)。

[0039] 在多个实施方案中，公开了通过监测用于ASM病症的剂量递增疗法过程中标志物如溶血-SPM来监测受试者不良副作用(例如毒性或有害水平的代谢物产生)的方法。所述方法可包括从受试者收集生物样品、测量样品中溶血-SPM的水平，将所述样品中溶血-SPM的水平与参照水平比较，和如果所述样品中溶血-SPM的水平与参照样品相比升高，则检测到不良副作用。施用治疗剂的剂量后或施用下一剂量之前，可收集并评估一种或多种样品。举例来说，可在施用治疗剂量后1分钟、5分钟、10分钟、30分钟或45分钟，或1、2、3、5、10、12、15或20小时，或1、2、3、4、5天，或1、2、3、4周，或其间的任何时间段，或使用下一剂量之前收集并评估样品。在一些实施方案中，所述参照样品是来自不具有ASM病症的对照受试者的样品。在一些实施方案中，所述参照样品是来自施用更高浓度剂量的治疗剂前(或施用任何治疗剂前)来自受试者的早期生物样品。在一些实施方案中，如果施用初始剂量或施用增加(例如更高浓度)剂量的治疗剂(例如更高浓度的ERT)后溶血-SPM的水平相比参照样品中的水平增加了预先确定的量或高于预先确定的阈值，则其可用作来自治疗的不良副作用的指示。在一些实施方案中，如果溶血-SPM的水平未增加或未增加到高于阈值水平，则可用作不良副作用并未发生的指示。

[0040] 在多个实施方案中，提供了针对ASM病症的疗法。所述疗法可包括施用一种或多种降低患者组织中SPM水平的治疗剂(例如ERT、分子伴侣疗法和/或底物减少疗法)。在一些实施方案中，所述疗法可包括ERT(例如ASM替代疗法)。所述疗法可包括在疗法过程中对受试

者升高的溶血-SPM水平进行监测和调整治疗剂的浓度(例如ERT的剂量浓度)以将溶血-SPM水平降低至预先确定的阈值水平以下。在一些实施方案中,监测包括每次治疗剂剂量后或施用每一后续剂量的治疗剂前,对样品的升高的溶血-SPM水平进行评估。在一些实施方案中,每次剂量后的监测是任选的,且在一些治疗剂剂量后或在一些后续的治疗剂剂量施用前周期性实施。

[0041] 在一些实施方案中,疗法可包括以顺序剂量的渐增浓度施用ERT(例如ASM替代疗法),在一些剂量后从患者收集生物样品(例如每次剂量后或每次后续剂量前)、检测样品中的溶血-SPM水平(例如使用LC/MS/MS),和在每次剂量后或下一剂量施用前对受试者升高的溶血-SPM水平进行监测。举例来说,可收集生物样品并在施用ERT剂量1分钟、5分钟、10分钟、30分钟或45分钟,或1、2、3、5、10、12、15或20小时,或1、2、3、4、5天,或1、2、3或4周后,或其间的任何时间段后,或施用下一剂量前对升高的溶血-SPM进行监测。监测受试者可包括从受试者收集生物样品、测量样品中溶血-SPM的水平,将样品中溶血-SPM的水平与参照水平比较,且如果样品中溶血-SPM的水平与参照水平相比升高了预先确定的量,则调整ERT的剂量。在一些实施方案中,参照样品是来自不具有ASM病症的对照受试者的样品。在一些实施方案中,参照样品是施用更高浓度剂量的ERT前(或施用任何ERT前)来自受试者的更早的生物样品。在一些实施方案中,如果受试者样品中溶血-SPM的水平增加预先确定的量和/或比参照阈值更高,则其可用作ERT剂量应该降低、延迟或终止以避免毒性或有害水平的代谢物产生的指示。在一些实施方案中,如果溶血-SPM的水平处于或低于阈值,则可施用相等或更高浓度的后续剂量。

[0042] 在多个实施方案中,提供了剂量递增疗法,包括将ERT以随时间渐增的剂量施用至受试者以减少积累的SPM而不产生由积累的SPM的快速水解导致的毒性或有害水平的代谢物。在一些实施方案中,在剂量递增疗法过程中对来自患者的生物样品的升高的溶血-SPM水平进行监测,因为升高的溶血-SPM将表明毒性或有害水平代谢物的产生。在一些实施方案中,如果检测到溶血-SPM水平高于阈值浓度,或检测到与之前样品中的水平相比溶血-SPM水平的大幅增加,则延迟或不施用增加剂量的ERT。ERT可通过任何适于实现治疗效果的途径施用,包括静脉内、皮内、皮下、腹膜内、肺内、局部、鼻内、颅内或肌内。

[0043] 在一些实施方案中,ERT可包括酸性鞘磷脂酶(ASM)如重组人ASM(rhASM)的施用,或ERT可包括修饰的ASM(例如修饰的rhASM)的施用。修饰的ASM可包含任何不显著改变其水解溶酶体鞘磷脂成为神经酰胺和磷酸胆碱的能力的对酶的任何修饰(例如,修饰的ASM展示至少约20、30、40、50、60、70、80、90、95、99、99.5或99.9%的未修饰ASM的酶活性,或其间任何百分数)。修饰的ASM的水解能力可通过本领域技术人员已知的技术评估,如描述于美国专利号4,039,388、4,082,781、5,686,240和7,563,591的那些,和国际公开号WO 2007/078806和WO 2006/058385的那些,其在本文以其全文通过提述并入。

[0044] 在一些实施方案中,ERT可包括重组人ASM(rhASM)或修饰rhASM的施用。本领域已知存在多种人ASM同种型,其全部可用于本文公开的方法。参见例如美国申请号2011/0052559,其在本文通过提述以其全文并入(参见例如第[108]-[0117]段和[0124]-[0127]段人ASM同种型及其酶偶联物和它们在ERT中的用途的讨论)。

[0045] 在一些实施方案中,将酶替代疗法以初始较低的、非毒性剂量施用至受试者,随后在接下来的施用中逐渐增加。受试者可耐受而不产生毒性或有害水平的代谢物的最高剂量

的酶(如通过例如监测毒性标志物如溶血-SPM水平来检测)则可用作维持剂量。可替换地,少于最高耐受剂量的治疗上有效的剂量可用作维持剂量。治疗上有效的剂量可包含在一轮或多轮施用后足以降低ASM受试者中积累的鞘磷脂浓度至少约5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95或99%(或其中任何百分数)的任何剂量。

[0046] ASM病症如NPD的治疗需要足够高剂量的治疗剂(例如ERT、分子伴侣疗法和/或底物减少疗法)以实现治疗剂在病理器官的充分分布(例如脾、肺、肝、心、肾和脑)。已显示在ASM敲除小鼠中静脉施用重组人ASM后,大多数的ASM活性分布至肝,在其他器官如脾、肝、肾和肺中检测到少量的ASM酶活活性。参见例如He等,Biochimia et Biophsyica Acta 1432:251-264(1999)。因此,具有升高浓度的治疗剂的剂量(例如高浓度的替代酶)对确保充分分布和递送至例如具有ASM病症如NPD的受试者中的肺、肝、心和肾是必须的。

[0047] ASM敲除型小鼠的研究也已证明酶替代疗法可以足够高的剂量导致毒性或以其他方式有害的鞘磷脂代谢物的产生。参见例如C.Nickerson,等,American Society of Human Genetics(2005);and J.Murray等,Society of Toxicology(2006)。不受理论限制,高剂量ASM向NPD受试者的施用可导致大量积累的鞘磷脂水解成为神经酰胺和磷酸胆碱。神经酰胺已知在细胞死亡中发挥作用且可以是促凋亡作用剂。参见例如Smith and Schuchman,FASEB 22:3419-3431(2008)。因此,神经酰胺可促成在ASM敲除小鼠和NPD受试者中观察到的毒性副作用。

[0048] 因此,需要校准和协调疗法(例如ERT、分子伴侣疗法和/或底物减少疗法)进而提供足够的治疗剂浓度以在整个病理器官中减少和预防溶酶体鞘磷脂的未来积累,同时也避免过度浓度的毒性代谢物的产生。在一些实施方案中,经由管理剂量递增方案提供协调,其通过评估一些剂量后或每次剂量后患者样品中毒性标志物如溶血-SPM的水平,且如果需要则如本文所述调整剂量方案来进行。管理治疗剂的剂量可包括增加、减少或维持治疗剂的浓度,和/或中止治疗。

[0049] 在多个实施方案中,治疗的剂量递增方法涉及施用一次或多次初始低剂量的治疗剂(例如替代酶)至受试者以降低积累在受试者中的鞘磷脂的量。治疗剂的剂量随后可以全身性的较高浓度施用直至达到由受试者耐受且治疗上有效的最高剂量。在一些实施方案中,治疗剂是替代酶(例如rhASM)且将其施用进而使得在一种或多种病理器官中的酶活性(例如患有ASM病症的患者中展示升高的SPM溶酶体水平的器官)为不患有ASM病症的受试者(例如健康受试者)的相应器官中的活性水平的至少约5%、6%、7%、8%、9%、10%、12%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、50%、75%、80%、85%、90%、95%(或其间的任何百分数)。

[0050] 在一些实施方案中,治疗ASM病症的方法可包括:(a)施用酶替代方案用于减少受试者中积累的鞘磷脂底物,其包括:(i)将初始低剂量的rhASM或修饰的rhASM施用至受试者;并(ii)施用逐渐更高剂量的rhASM或修饰的rhASM至受试者(剂量递增);(b)在步骤(a)(i)和(a)(ii)中施用的一些剂量后或每次剂量后,对受试者升高的溶血-SPM水平和/或一种或多种其他不良副作用的标志物进行监测(例如,使用LC/MS/MS以定量溶血-SPM的浓度);(c)检测到升高的溶血-SPM水平和/或检测到一种或多种其他不良副作用后,重复、减少和/或终止剂量递增方法。在一些实施方案中,所述方法进一步包括施用维持方案,所述维持方案包括施用等于或少于由受试者耐受的最高剂量的剂量作为维持剂量,且任选地进

一步包括在施用维持方案过程中监测升高的溶血-SPM水平。在一些实施方案中，rhASM或修饰的rhASM的初始剂量可为约0.03mg/kg至约1.0mg/kg，或约0.1mg/kg至约0.5mg/kg(剂量的浓度作为mg酶比kg体重测量)。在一些实施方案中，将增加的酶浓度的各后续剂量在之前剂量的约1、2、3、4、5、6或7天，或1、2、3、4或5周后施用。在一些实施方案中，增加的酶的后续剂量可以为约0.1-5mg/kg的浓度(例如约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或5mg/kg或其间的任何浓度)。

[0051] 在一些实施方案中，在施用下一更高浓度的剂量前，将给定浓度的替代酶的剂量施用至少两次(例如至少2、3、4或5次)。在一些实施方案中，逐渐更高的剂量可以比之前的剂量高约0.03mg/kg、0.05mg/kg、0.1mg/kg、0.2mg/kg、0.3mg/kg、0.4mg/kg、0.5mg/kg、0.6mg/kg、0.7mg/kg、0.8mg/kg、0.9mg/kg、1mg/kg、1.2mg/kg、1.5mg/kg、1.75mg/kg、2mg/kg、3mg/kg、4mg/kg或5mg/kg(或其间的任何值)。在一些实施方案中，逐渐更高的剂量可以比之前剂量高约0.03至约0.1mg/kg、约0.1mg/kg至约0.5mg/kg、约0.5mg/kg至约1mg/kg、约0.5mg/kg至约2mg/kg、约1mg/kg至约2mg/kg、约2mg/kg至约4mg/kg或约2mg/kg至约5mg/kg(或其间的任何值)。在一些实施方案中，由受试者耐受而不产生毒性或有害代谢物的最高剂量可以为约1.0mg/kg至约3.0mg/kg。在一些实施方案中，将所述最高耐受剂量随后作为维持剂量施用至人受试者。在一些实施方案中，大约每1至8周施用所述维持剂量(例如约每1、2、3、4、5、6、7或8周，或其间的任何时间段)。

[0052] 一旦确定最大耐受剂量(例如，不产生毒性或在其他方面有害的水平的代谢物的剂量)，其可用作维持剂量以在未来治疗受试者。维持剂量可每日、每周、每两周、每月、每两月或每季(或其间的任何时间间隔)施用。对于升高的溶血-SPM水平的监测可在施用维持方案的过程中实施，例如施用维持剂量后1、2、3、5、10、12、15或20小时，或1、2、3、4、5天，或1、2、3或4周，或其间的任何时间段实施。如果检测到升高的溶血-SPM水平(例如，比约100-700ng/ml的参照水平高，或比参照水平高至少约1.1-10倍)，则可降低或中止维持剂量。

[0053] 可将一些其他参数与溶血-SPM组合测量以在疗法的过程中(例如ERT过程中)监测受试者和/或作为疗法的一部分以确定可由受试者耐受的最大剂量。举例来说，所述受试者可进一步通过测量SPM水平、血浆神经酰胺水平和/或胆红素浓度监测。还可对受试者"急性期反应物"和为炎性响应的量度的炎性中介物的产生，和/或其他生化标志物进行监测。这些其他的生化标志物可包括但不限于CRP/hs-CRP、细胞因子(例如IL-8、IL-6)、降钙素和铁蛋白。在一些实施方案中，可监测上文列举的一种或多种参数以确保在将剂量升高至更高浓度前对疗法的稳定响应。在一些实施方案中，还可对受试者的一种或多种相关不良事件进行监测，其可包括全身症状(例如发热、恶心、呕吐、疼痛、肌肉痛和黄疸)。也可对标志物的组合进行监测(例如可监测溶血-SPM水平与胆红素和/或神经酰胺水平的组合)。公开了可与溶血-SPM组合监测的标志物的合适的阈值水平，举例来说，美国申请号2011/0052559，其在本文通过提述以其全文并入(参见，举例来说第[0067]-[0086]段)。

[0054] 在一些实施方案中，在每轮治疗施用后(例如施用后约1分钟、5分钟、10分钟、30分钟、45分钟，或1、2、3、4、5、6、8、10、12、18或24小时，或2、3、4、5、6或7天，或1、2、3或4周后或更久，或其间的任何时间段)，或施用更高浓度的治疗剂前，对经历剂量递增方案(例如ERT剂量递增方法)的受试者的毒性或有害副作用进行监测(例如通过监测一种或多种毒性标志物的水平，如溶血-SPM)。在一些实施方案中，每次维持剂量施用后(例如施用后约1、2、3、

4、5、6、8、10、12、18或24小时，或2、3、4、5、6或7天，或1、2、3或4周或更久，或其间的任何时间段)，或施用随后维持剂量的治疗剂前，对受试者进行监测。在一些实施方案中，受试者接受维持剂量一、二、三或更多年且对毒性或有害副作用定期监测。监测可包括对上文提及的毒性标志物的监测，以及对相关不良事件的监测。如果受试者经历不良事件或如果一种或多种监测的标志物表明有害的副作用(例如，如果检测到升高的溶血-SPM水平)，则可终止或调整维持剂量的施用(例如可施用降低浓度的ERT)进而降低或最小化不需要的副作用。

[0055] 在多个实施方案中，可通过测量来自施用ERT剂量后(例如施用rhASM或修饰的rhASM后)获得的生物样品的溶血-SPM水平对受试者的毒性和/或在其他方面有害的剂量的ERT进行监测。在一些实施方案中，所述方法可包括收集来自受试者的生物样品，测量所述样品中的溶血-SPM水平，将样品中的溶血-SPM的水平与参照水平比较，且如果样品中溶血-SPM的水平与参照样品相比升高或与参照样品相比升高特定的量，则检测到副作用。在一些实施方案中，较高浓度的下一剂量ERT仅在施用之前的剂量后生物样品中的溶血-SPM的水平未高于定义的阈值时施用。合适的阈值水平的实例描述于本文。在一些实施方案中，溶血-SPM水平也在施用维持剂量的过程中进行监测。在一些实施方案中，如果溶血-SPM的水平在施用维持剂量的过程中超越定义的阈值，则中止维持施用或施用不导致溶血-SPM水平在定义的阈值之上的较低剂量。

[0056] 在一些实施方案中，如果生物样品中溶血-SPM的水平比预先确定的参照水平高，则可检测到ERT的不良副作用。在一些实施方案中，如果生物样品中(例如血液样品)溶血-SPM的水平比约100-700ng/ml的参照水平高(例如高于约100、200、250、300、400、500、600或700ng/ml，或其间的任何浓度)，则可检测到不良副作用。在一些实施方案中，如果生物样品中(例如血液样品)溶血-SPM的水平比参照水平高约至少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或10倍，或更多(或其间的任何值)，则可检测到副作用。举例来说，所述增加可以为至少约3倍。

[0057] 在一些实施方案中，本文提供的用于治疗ASM病症的方法降低脾的体积，如通过本领域已知的技术例如MRI所评估。在一些实施方案中，所述方法降低肝鞘磷脂水平，如通过本领域已知的技术所评估，例如肝样品的生化分析和/或组织形态学分析。在一些实施方案中，所述方法增加运动能力，如通过本领域已知的技术所评估，例如通过循环测力学(cycle ergometry)的最大工作负荷，包括最大工作负荷的预测百分数、耗氧量峰值和/或二氧化碳的产生。在一些实施方案中，所述方法增加肺功能和/或改善肺清除，如通过本领域已知的技术所评估，例如DLco、FVC、FEV和/或TLC。在一些实施方案中，所述方法降低支气管肺泡灌洗(BAL)鞘磷脂。在一些实施方案中，所述方法改善肺外观，如通过本领域已知的技术所评估，例如高分辨率CT扫描和/或胸部X-射线。

[0058] 在多个实施方案中，本文提供的用于治疗ASM病症的方法减少肝、皮肤和/或血浆中的鞘磷脂浓度，和/或降低血清壳三糖酶、CCL18水平、溶血-SPM、神经酰胺和/或胆红素。在一些实施方案中，所述方法改善受试者的脂质概貌(例如减少的胆固醇)。在一些实施方案中，所述方法改善受试者中的一种或多种神经功能(例如精神运动功能、社会反应等)。在一些实施方案中，所述方法降低或改善ASM病症和/或一种或多种与所述病症相关的症状的严重性和/或持续时间。在一些实施方案中，所述方法预防与ASM病症相关的症状的再次发生。在一些实施方案中，所述方法增加治疗后受试者的生存率。

[0059] 对于ASM病症的筛选和/或诊断

[0060] 在多个实施方案中，本文公开了筛选和/或诊断ASM病症的方法。在一些实施方案中，所述ASM病症是尼曼-皮克病(NPD)。在一些实施方案中，所述病症是NPD A型、B型和/或C型。在一些实施方案中，可通过测量取自受试者的生物样品中溶血-SPM的水平筛选和/或诊断ASM病症(例如NPD)。

[0061] 在一些实施方案中，用于筛选和/或诊断受试者中ASM病症的方法可包括收集来自受试者的生物样品，测量样品中的溶血-SPM水平，将所述样品中的溶血-SPM水平与参照水平比较，且如果所述样品中溶血-SPM的水平与参照水平相比升高，则检测/诊断ASM病症。在一些实施方案中，参照水平是在来自不具有ASM病症的对照受试者的样品中测量的溶血-SPM水平。在一些实施方案中，如果在来自受试者的生物样品中溶血-SPM的水平高于预先确定的参照水平，则可检测/诊断ASM病症。在一些实施方案中，如果生物样品(例如血液样品)中溶血-SPM的水平高于至少约200-2000ng/ml的参照水平，如约200ng/ml、约300ng/ml、约400ng/ml、约500ng/ml、约525ng/ml、约575ng/ml和/或约700ng/ml的参照水平(例如高于约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或2000ng/ml，或其间任何浓度)，则可检测/诊断ASM病症。在一些实施方案中，如果生物样品(例如血液样品)中的溶血-SPM的水平比参照水平高约1-10倍的因数，则可检测/诊断ASM病症。

[0062] 来自多种组织的生物样品可与本文描述的筛选和诊断方法一起使用。举例来说，来自外周组织如血浆、全血(例如干血斑)、血清、皮肤和/或尿的生物样品可用于监测升高的溶血-SPM水平。也可使用来自其他组织的生物样品，例如脾、肺、肝、心、肾和/或脑组织。可使用来自两种或多种组织的组合(例如2、3、4、5或更多种组织)的样品。在一些实施方案中，ASM病症(例如NPD)可通过测量取自外周组织的生物样品中的溶血-SPM水平检测/诊断。在一些实施方案中，外周组织可以是血浆、全血(例如干血斑)、血清和/或尿。外周样品的使用可避免侵入性方法如肝活检的需要。

[0063] 在多个实施方案中，如果检测/诊断到ASM病症，则本文公开的筛选和/或诊断方法可进一步包括将治疗剂(例如，酶替代疗法)施用至受试者。在一些实施方案中，酶替代疗法包括将rhASM或修饰的rhASM施用至受试者。

[0064] 试剂盒

[0065] 在多个实施方案中，本文公开了试剂盒，其包含用于收集含有溶血-SPM和/或ASM病症其他标志物的生物样品的装置，和使用试剂盒以测量生物样品中溶血-SPM和/或其他ASM标志物的水平的说明。在一些实施方案中，用于收集生物样品的装置可包含测试管、注射器和/或其他用于保存流体样品的容器，和/或测试条、蘸棒等等。也可使用任何其他本领域已知的用于收集生物样品的装置。在一些实施方案中，所述生物样品是来自外周组织的样品，如血浆、全血(例如干血斑)、血清、皮肤和/或尿。也可收集来自其他组织的生物样品，例如脾、肺、心、肝、肾和/或脑组织，且所述试剂盒包含用于收集来自列举组织的样品的装置。也可使用来自两种或多种组织的组合的样品。

[0066] 在一些实施方案中，所述试剂盒可进一步包含用于测量生物样品中溶血-SPM和/或其他标志物的水平的装置。举例来说，所述试剂盒可包含抗体和/或可用于检测生物样品中溶血-SPM或其他标志物的其他检测剂。在一些实施方案中，所述检测剂包括于组织收集

装置中或在其上(例如,抗体或指示化学剂浸渍在测试条上),而在其他实施方案中,所述检测剂与收集装置分开提供。

[0067] 在一些实施方案中,试剂盒进可进一步包括用于定量或半定量样品中的溶血-SPM和/或其他标志物的水平的装置。举例来说,可提供与检测剂反应以发射可检测信号(其强度、密度、颜色等可用于定量或半定量地确定样品中的溶血-SPM和/或其他标志物的水平(例如通过比较来自一种或多种参照样品的信号))的作用剂(例如显色剂)。在一些实施方案中,所述装置可包括将与样品的其他组分分离的装置,所述分离例如使用液相层析和/或质谱。在一些实施方案中,所述用于定量样品中的溶血-SPM和/或其他标志物的水平的装置是光谱仪,如质谱,例如LC/MS/MS,或电磁频谱仪,例如UV-VIS、IR或NMR。

[0068] 在一些实施方案中,所述试剂盒可进一步包含比较样品中溶血-SPM和/或其他标志物的水平与参照水平和如果样品中溶血-SPM和/或其他毒性标志物的水平与一种或多种参照样品相比升高,则在对于ASM病症治疗的过程中检测到一种或多种代谢物的毒性水平和/或不良副作用存在的说明。在一些实施方案中,所述试剂盒可进一步包括如果样品中溶血-SPM的水平与参照样品中的水平相比升高,则将样品中的溶血-SPM的水平与参照样品中的水平比较和筛选和/或诊断ASM病症的说明。

[0069] 在一些实施方案中,所述试剂盒可用作ASM病症疗法和/或诊断的一部分。在一些实施方案中,ASM病症是NPD-A、NPD-B或NPD-C。

[0070] 受试者群体

[0071] 在多个实施方案中,如本文使用的受试者是针对ASM病症进行了筛选的人。在多个实施方案中,如本文使用的受试者是依据本文提供的方法诊断具有ASM病症或对ASM病症进行了治疗的受试者,是患有或诊断为患有导致过度的溶酶体SPM在一个或多个病理器官积累的病症的人。在一些实施方案中,所述受试者在编码酸性鞘磷脂酶的基因中具有一个或多个突变,例如缺失、移框、错义突变和/或无义突变。在具体的实施方案中,受试者具有NPD。在一个实施方案中,受试者具有NPD-A、NPD-B或NPD-C。

[0072] 在一些实施方案中,受试者在SMPD1基因中具有一个或多个突变。在一些实施方案中,所述突变是ΔR608(精氨酸608的缺失)。在一些实施方案中,所述突变是错义突变。在一些实施方案中,所述错义突变是L302P、H421Y或R496L。在其他实施方案中,所述突变是导致一个、两个、三个或更多氨基酸残基缺失的缺失。在特定的实施方案中,依据本文提供的方法治疗的ASM病症的受试者具有美国专利号2011/0052559中表1所示的一种或多种突变,其在本文通过提述以其全文并入。关于酸性鞘磷脂酶基因(称为SMPD1)的突变还参见Simonaro等,Am.J.Hum.Genet.71:1413-1419(2002)。

[0073] 在一些实施方案中,依据本文提供的方法筛选或诊断为ASM病症或治疗了ASM病症的受试者可内源性表达ASM,其具有正常(例如非突变的)人ASM例如ASM-1的活性的约2至5%、5至10%、5至15%、5至20%、5至30%、20%至30%或5至35%。在一些实施方案中,所述受试者内源性表达具有少于约35%、30%、25%、20%、15%、10%、5%、4%、3%、2%或1%的正常人ASM例如ASM-1的活性的ASM。参见例如美国专利号4.039,388、4,082,781、5,686,240和7,563,591,和国际公开号WO 2007/078806和WO 2006/058385,其在本文以其全文通过提述并入,其关于可用于测量ASM活性的技术;还参见描述于He等,Analytical Biochemistry 314:1 16-120(2003)中的基于荧光的高效液相色谱测试。

[0074] 在多个实施方案中，依据本文提供的方法筛选或诊断具有ASM病症或治疗了ASM病症的受试者可表现一种或多种NPD症状。NPD症状可包括但不限于腹胀、肝肿大、脾肿大、肝脾肿大、白细胞减少、肺部疾病、淋巴结肿大、组织化学特征性NPD泡沫细胞的存在、贫血(例如小红细胞性贫血)、血小板减少症、反复呕吐、慢性便秘、生长障碍(例如降低的线性增长(liner growth)和体重)、青春期延迟、反复擦伤、反复出血、致动脉粥样硬化性脂质谱(高胆固醇、甘油三酯或LDL，和/或低HDL)、疼痛(头痛、背部、肢体痛、腹痛)、疲劳、早饱、低耐力、骨质减少、神经系统表现和呼吸困难(例如间质性肺病和/或呼吸急促)。NPD的神经系统表现包括樱桃红斑、张力低下、肌肉无力、精神运动性迟滞、痉挛、社会反应迟钝、烦躁不安和/或突然发作。

[0075] 在一些实施方案中，依据本文提供的方法筛选或诊断具有ASM病症或治疗了ASM病症的受试者是人类婴儿。在其他实施方案中，受试者是人类儿童。在一些实施方案中，受试者是人类成人(18岁或更大)。在一些实施方案中，受试者是人类女性。在其他实施方案中，受试者是人类男性。在一些实施方案中，受试者是未怀孕的或未在哺乳期的人类女性。

实施例

[0076] 下列实施例作用在于阐述而非以任何方式限制本公开。

[0077] 实施例1:材料和方法

[0078] 用于本研究的全血获得自20例之前诊断的NPD-B受试者(按照书面知情同意书)以及20位健康成人(购自ProMedDx,LLC,Norton,MA)。将静脉血抽至包含EDTA的Vacutainer®管(Becton,Dickinson and Company,Franklin Lakes,NJ)，在冷冻包装上过夜运输，并保持在4℃。在收集的48小时内，通过涡旋管数次混合血液，并将75μL血每斑点样到Whatman 903®标本收集纸上，且在室温干燥至少4小时。

[0079] 为定量溶血-SPM，将1-O-十六烷基-(7,7,8,8-d4)-2-O-乙酰基-sn-甘油基-3-磷酸胆碱(血小板活化因子C16-d4;PAF C16-D4,Cayman Chemical Company,Ann Arbor,Michigan)用作内部标准。将3.2mm冲压的干血斑(DBS)提取至含有0.8ng内部标准的200μL甲醇/乙腈/水(80/15/5)中，涡旋30分钟，并超声10分钟。洗脱液通过在16,200g离心5分钟澄清，且随后将30μL注射入与Agilent 1 100 High Pressure Liquid Chromatography(HPLC)系统(Agilent,Palo Alto,CA)对接的API Qtrap 4000 LC/MS/MS(AB Sciex,Toronto,Canada)系统。使用甲醇/乙腈/水的混合物作为移动相在等梯度模式中用正相硅胶柱(normal-phase silica column)实施HPLC。以多重反应监测(MRM)模式实施质谱(MS)，并具有下列过渡:对于溶血-SPM，m/z 465.4>184.1且对于PAF C16-D4,528.5>184.1。为了定量SPM，将C12-SPM(Avanti Polar Lipids,Alabaster,Alabama)用作内部标准。提取和LC/MS/MS步骤与用于溶血-SPM的那些相似，除洗脱液在注射前320倍稀释且监测并总结了十二种SPM的同种型。

[0080] 实施例2:NPD的诊断

[0081] 尽管已知SPM水平在NPD-B受试者的肝和脾中可升高10倍，但NPD-B受试者血浆中的SPM水平并未明显升高，且与正常对照重叠。如图1A所示，NPD-A和NPD-B患者中SPM的水平并未显著升高，如通过来自NPD-A和NPD-B患者的干血斑(DBS)中的SPM浓度与来自正常对照样品的DBS中的平均浓度值的比率所示。SPM是细胞膜和脂蛋白的主要成分，且来自NPD受试

者的DBS中SPM的轻微上升可能与其已经具有的高水平和在循环中的快速逆转相关。

[0082] 与SPM不同的是，溶血-SPM水平在来自NPD-A和NPD-B受试者的DBS中明显升高。如附图1B所示，NPD-A和NPD-B患者中溶血-SPM的水平升高，如通过来自NPD-A和NPD-B患者的干血斑(DBS)中的溶血-SPM浓度与来自正常对照样品的DBS中的平均浓度值的比率所示。溶血-SPM水平不与DBS中残留的ASM活性的量或与收集时受试者的年龄相关。总之，溶血-SPM在来自NPD受试者的外周组织(DBS)中以区别于正常对照的水平增加。

[0083] 实施例3:小鼠中的剂量递增效果

[0084] 之前在ASM敲除小鼠(尼曼-皮克模型小鼠)中的研究证明了在使用的单剂量大于或等于10mg/kg前并未观察到毒性的临床症状。Nickerson等，"Dose Responsive Toxicological Findings Following Intravenous Administration of Recombinant Human Acid Sphingomyelinase(rhASM)to Acid Sphingomyelinase Knock-out(ASMKO) Mice,"American Society of Human Genetics 2005;和Murray等，"Elevations of Pro-Inflammatory Cytokines and Decreases in Cardiovascular Hemodynamics Following Intravenous Administration of Recombinant Human Acid Sphingomyelinase(rhASM) to Acid Sphingomyelinase Knock-out(ASMKO)Mice,"Society of Toxicology 2006。

[0085] 在目前的研究中，将单次静脉内剂量的rhASM以三种不同浓度的一种施用至ASM敲除小鼠:0mg/kg、3mg/kg(非毒性剂量、未观察到临床上明显的副作用)或20mg/kg(毒性剂量)。将3只雄性和3只雌性小鼠分配至每剂量组(共18只动物)且以表1所示的时间收集血液样品。

[0086] 表1

[0087]

组	治疗	剂量(mg/kg)	样品类型	样品收集时间点
1	rhASM	0	DBS	给药后5分钟和6、24、48和72小时
2		3		给药后5分钟和6、24、48和72小时
3		20		给药后5分钟和1、4、6和9小时

[0088] 定量来自DBS样品的溶血-SPM水平且表明水平随rhASM剂量浓度的增加而增加，对于3mg/kg和20mg/kg，治疗组的峰值约在给药后6小时。参见图2，柱状图表明在给药后的采样时间点，与给药后5分钟的浓度相比，三种剂量的DBS中溶血-SPM浓度的升高倍数。惊讶的是，响应rhASM毒性剂量(20mg/kg)的溶血-SPM的血浆浓度的增加倍数显著高于响应rhASM非毒性剂量(3mg/kg)的溶血-SPM的血浆浓度的增加倍数。该结果表明溶血-SPM可用作标志物用于计量在患有ASM病症的患者中降低积累的SPM水平的治疗剂的毒性效果。

[0089] 实施例4:单剂量和减少方案的比较

[0090] 干血斑从野生型(C57BL/6)或ASM敲除(ASMKO)小鼠获得，随后施用单剂量或减少剂量方案的rhASM。给予五只ASMKO小鼠10mg/kg rhASM的单剂量。五只C57BL/6和五只ASMKO小鼠使用3mg/kg rhASM的减少方案处理且随后给予20mg/kg的剂量。在以下列时间点取血样:给药后的5分钟、4小时、6小时、24小时和72小时。10mg/kg给药组的动物在24小时后的时间点不得不进行安乐死。

[0091] 全部70例血斑样品使用液体复合提取方法制备并通过LC/MS/MS分析。简要地，从每个样品卡穿孔获得单DBS斑并置于单个Eppendorf管中。随后将200微升80:15:5溶液(MeOH:ACN:H2O)添加至每管，之后涡旋30分钟、超声10分钟并离心以沉降任何颗粒物。将溶血-SPM校准曲线(无内部标准)用于确定每个样品中的溶血-SPM浓度。

[0092] 图3中的数据表明溶血-SPM水平仅在用10mg/kg的单(高)剂量rhASM治疗的ASMKO组中增加，与进行减少方案的ASMKO组相反。在如此高的剂量，预期至少50％的小鼠将在24至72小时间死亡，而全部小鼠应在减少方案下存活。这些结果表明溶血-SPM可用作标志物用于计量高剂量治疗剂的毒性效果。

[0093] 实施例5:人测试

[0094] 血液样品收集自用rhASM治疗的尼曼-皮克患者。代表性的样品示于图4。样品在26周的时间段内(第1天、第2、4、6、8、10、12、14和26周)在给药前、和在施用所示剂量(0.1、0.3、0.6、1、2或3mg/kg)的rhASM之后24、48和72小时收集。在26周，仅在给药前和在给药后24和48小时取样。溶血-SPM的水平以ng/ml测量。数据表明较高浓度的重复剂量后，溶血-SPM水平总体呈下降趋势，其中每次单独给药后在给药前和给药后72小时之间在溶血-SPM水平中具有波动。最早的给药后样品取自24小时后，在该时间可能已经观察不到施用后的溶血-SPM浓度的高峰(spike)。施用的剂量也可能已经低于观察到施用后溶血-SPM水平的显著高峰所需要的浓度。

[0095] 之前的实施例意在阐述且不以任何方式限制本公开。公开的装置和方法的其他实施方案通过考虑本说明书以及本文公开的装置和方法的实践对本领域的技术人员来说都是显而易见的。

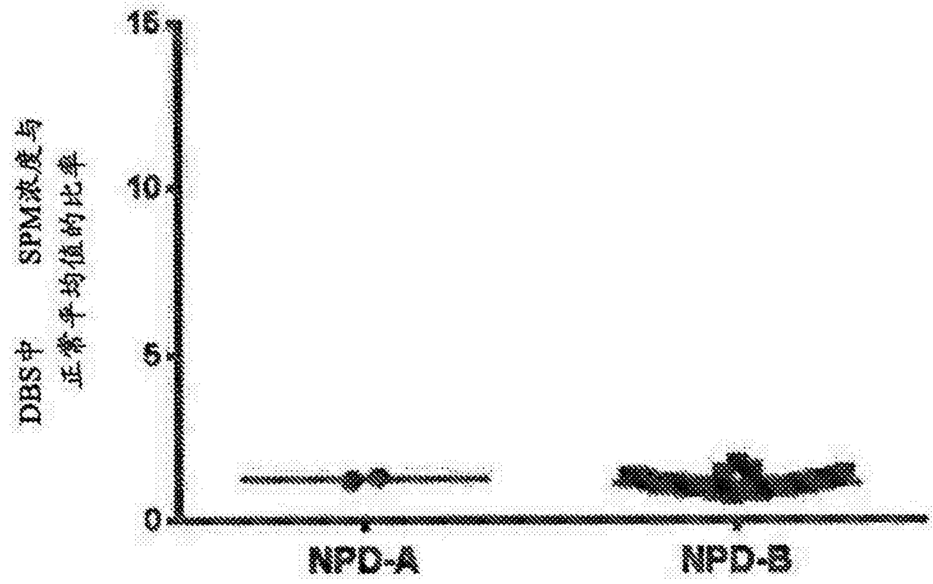
DBS中　SPM浓度与
正常平均值的比率
15
10
5
0
NPD-A
NPD-B

图1A

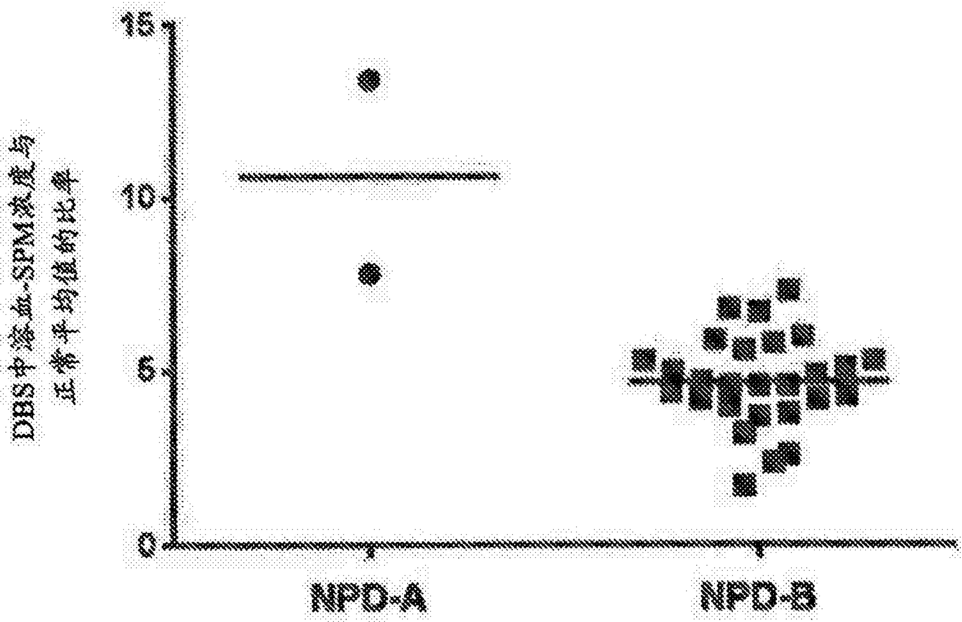
DBS中溶血-SPM浓度与
正常平均值的比率
15
10
5
0
NPD-A
NPD-B

图1B

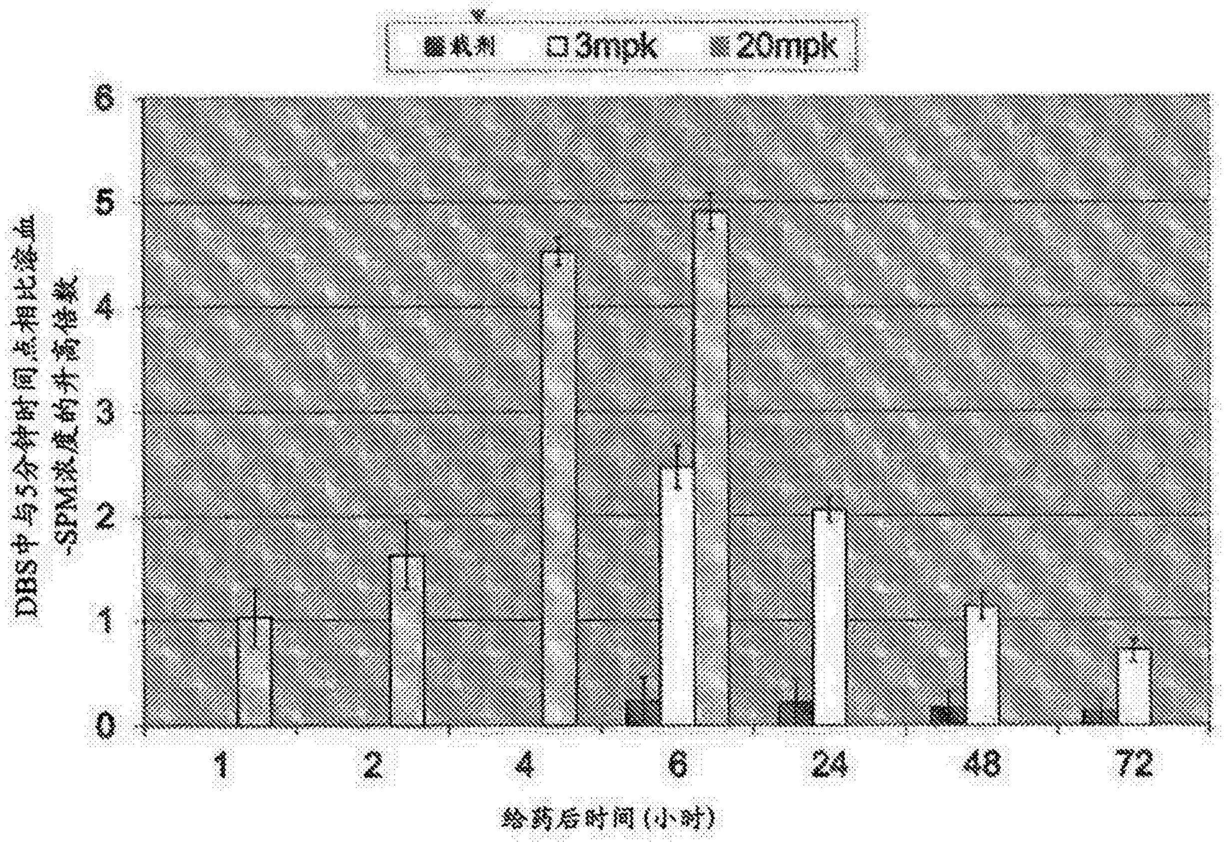
载剂
3mpk
20mpk
DBS中与5分钟时间点相比溶血-SPM浓度的升高倍数
0
1
2
3
4
5
6
1
2
4
6
24
48
72
给药后时间(小时)

图2

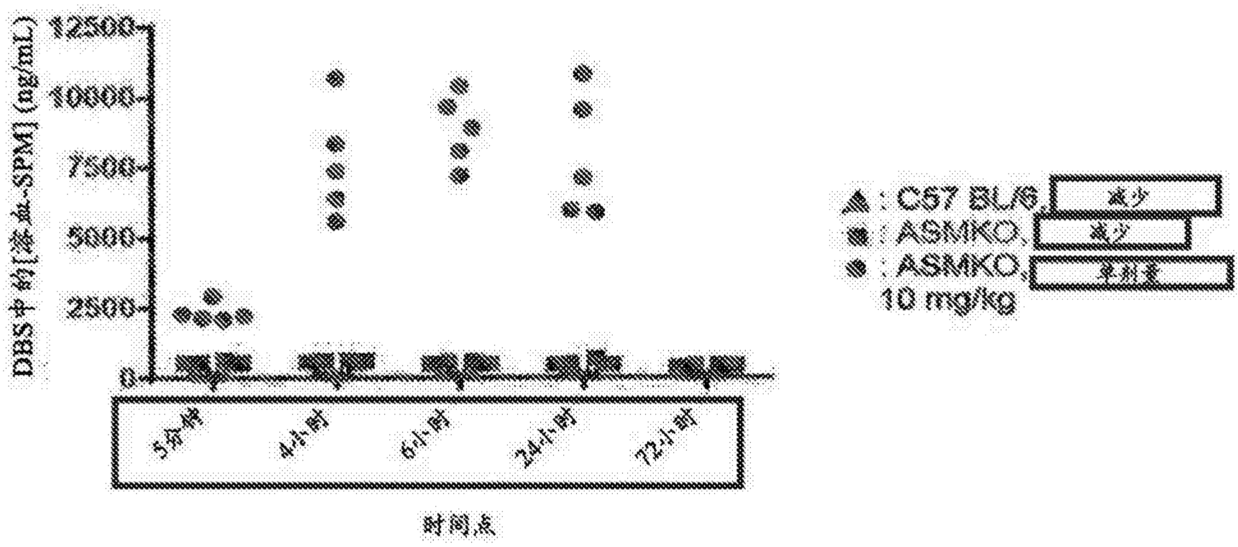
DBS中的[溶血-SPM] (ng/mL)
12500
10000
7500
5000
2500
0
5分钟
4小时
6小时
24小时
72小时
时间点
: C57 BL/6, 减少
: ASMKO, 减少
: ASMKO, 10 mg/kg 单剂量

图3

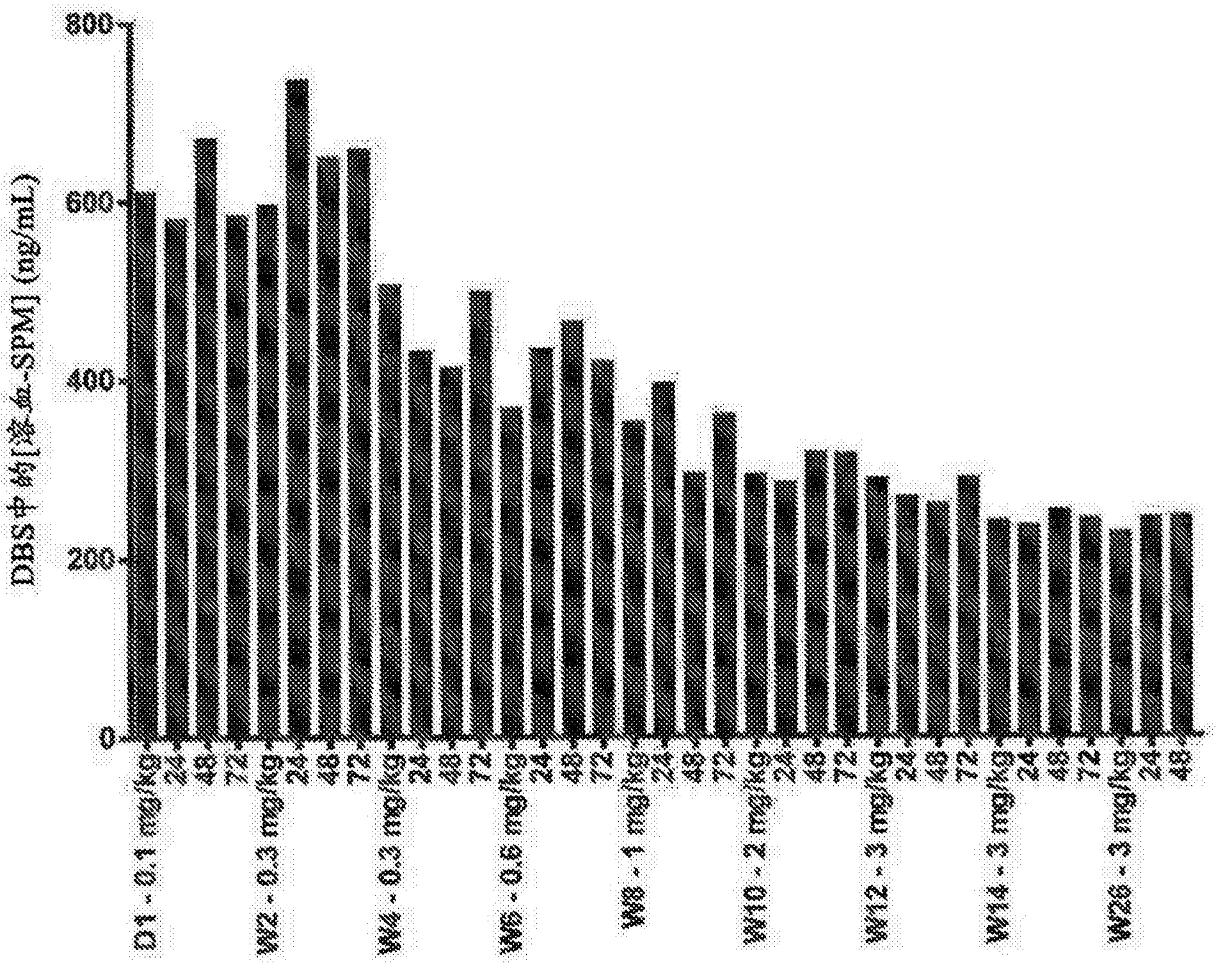
DBS中的[溶血-SPM] (ng/mL)
800
600
400
200
0
D1 - 0.1 mg/kg
24
48
72
W2 - 0.3 mg/kg
24
48
72
W4 - 0.3 mg/kg
24
48
72
W6 - 0.6 mg/kg
24
48
72
W8 - 1 mg/kg
24
48
72
W10 - 2 mg/kg
24
48
72
W12 - 3 mg/kg
24
48
72
W14 - 3 mg/kg
24
48
72
W26 - 3 mg/kg
24
48

图4