



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2021년08월24일

(11) 등록번호 10-2292298

(24) 등록일자 2021년08월17일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/92 (2006.01) **A61K 38/46** (2006.01)
 (52) CPC특허분류
G01N 33/92 (2013.01)
A61K 38/465 (2013.01)
 (21) 출원번호 10-2021-7007269(분할)
 (22) 출원일자(국제) 2014년06월06일
 심사청구일자 2021년04월02일
 (85) 번역문제출일자 2021년03월10일
 (65) 공개번호 10-2021-0031541
 (43) 공개일자 2021년03월19일
 (62) 원출원 특허 10-2016-7000011
 원출원일자(국제) 2014년06월06일
 심사청구일자 2019년05월16일
 (86) 국제출원번호 PCT/US2014/041405
 (87) 국제공개번호 WO 2014/197859
 국제공개일자 2014년12월11일
 (30) 우선권주장
 61/832,302 2013년06월07일 미국(US)
 (56) 선행기술조사문헌
 Neurochemical Reserach, 1999, Vol. 24, pp
 199-205.
 KR1020120081077 A
 WO2013072060 A2

(73) 특허권자
젠자임 코포레이션
 미국 메사추세츠주 02142 캠프리지 50 비니 스트리트
 (72) 발명자
추앙, 웨이-리엔
 미국 08807 뉴저지주 브릿지워터 코포레이트 드라이브 55
콕스, 제럴드, 에프.
 미국 08807 뉴저지주 브릿지워터 코포레이트 드라이브 55
장, 엑스., 케이트
 미국 08807 뉴저지주 브릿지워터 코포레이트 드라이브 55
 (74) 대리인
양영준, 임근실

전체 청구항 수 : 총 13 항

심사관 : 차명훈

(54) 발명의 명칭 산 스핑고미엘리나제 장애에 대한 마커 및 이의 용도

(57) 요약

본 개시는 산 스핑고미엘리나제(ASM) 장애, 예컨대 니만-픽(Niemann-Pick)병의 스크리닝, 진단, 모니터링 및/또는 치료 방법을 제공한다. 특히 방법은, 예를 들어 효소 대체 요법을 이용한, ASM 장애의 개선된 진단 및/또는 치료 기법을 포함한다.

(52) CPC특허분류

C12Y 301/04012 (2013.01)

G01N 2405/08 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

인간 대상체에서 산 스핑고미엘리나제(ASM) 결핍을 치료하는 방법에 사용하기 위한 치료제이며, 상기 방법은

(a) 재조합 인간 산 스핑고미엘리나제(rhASM)를 0.03 또는 0.1 mg/kg의 출발 용량 및 용량 농도 3 mg/kg에 도달 할 때까지 증가되는 후속 용량으로 포함하는 치료제가 대상체에게 정맥으로 투여되고,

(b) 용량 투여 후 (i) 24 시간 이내, (ii) 48 시간 이내, 또는 (iii) 72 시간 이상에서 대상체로부터 수집된 생물학적 샘플 중에서 라이소-스핑고미엘리나제 (라이소-SPM)의 수준을 측정하는 것을 포함하며, 여기서 각각의 용량은 이전 용량 후 2주에 투여되고, 참조 수준에 비해 라이소-SPM의 수준이 감소한 것이 상기 치료제의 효능을 나타내는 것인,

치료제.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 방법의 단계 (a)가 대상체에게 치료제를 반복적으로 투여하는 것을 포함하는 것인 치료제.

청구항 3

제1항에 있어서, 참조 수준이 상기 치료제를 사용한 임의의 치료 이전의 대상체의 기준선 라이소-SPM 수준인 치료제.

청구항 4

제1항에 있어서, 생물학적 샘플이 후속 투여 이전에 수집되는 것인 치료제.

청구항 5

제1항에 있어서, 생물학적 샘플이 전혈, 건조 혈반(dried blood spot), 혈장, 또는 혈청인 치료제.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, ASM 결핍이 니만-픽병(Niemann-Pick Diseases) B형인 치료제.

청구항 7

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, ASM 결핍이 니만-픽병(Niemann-Pick Diseases) A형인 치료제.

청구항 8

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 방법이 대상체에게 투여된 치료제의 최고 용량 농도 이하의 용량 농도로, 치료제의 유지 용량을 투여하는 단계를 포함하는 것인 치료제.

청구항 9

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 치료제의 하나 이상의 용량 농도가 적어도 2회 투여되는 것인 치료제.

청구항 10

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 대상체가 수용하는 치료제의 제1 용량이 0.1 mg/kg으로 투여되는 것인 치료제.

청구항 11

제10항에 있어서, 상기 방법이 1, 2, 또는 3 mg/kg의 치료제 유지 용량을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는

것인 치료제.

청구항 12

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 대상체가 성인 환자인 치료제.

청구항 13

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 대상체가 소아 환자인 치료제.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 출원은 그 전문이 참조로 본원에 포함된, 2013년 6월 7일에 출원한 미국 가출원 제61/832,302호의 35 U.S.C. § 119 하의 우선권의 이익을 청구한다.

배경 기술

[0002] 본 개시는 산 스펡고미엘리나제(ASM) 장애, 예컨대 니만-픽(Niemann-Pick)병의 스크리닝, 진단, 모니터링 및/또는 치료 방법에 관한 것이다.

[0003] 산 스펡고미엘리나제(ASM)는 뇌, 간, 폐, 비장 및 림프절에서 발견되는 인지질 저장 물질인 스펡고미엘린(SPM)을 세라마이드 및 포스포티콜린으로 가수분해하는 라이소좀 포스포디에스테라제 효소이다. ASM 활성 상실은 신체의 SPM 분해 불능으로 이어질 수 있다. ASM 장애를 갖는 환자에서, SPM은 대식구에 주로 축적되지만 또한 간 세포 및 다른 세포 유형 내에도 축적되어, 현저한 간비장비대, 혈소판감소증, 간질 폐 질환 및 관상 동맥 질환을 일으킨다. SPM은 혈장, 전혈 또는 소변에서는 크게 상승되지 않아 비침습적 바이오마커로서의 용도가 제한된다.

[0004] 현재 ASM 장애의 진단은 침습적 평가 및/또는 시간을 소모하는 의료 검사, 예컨대 추정되는 임상 징후 및 증상의 상승 평가, 간 또는 폐 생검, 혈액 샘플 중의 ASM 활성에 대한 평가(위음성 및 위양성 사례가 보고됨) 및/또는 유전적 평가(예로, *SMPD1* 유전자 돌연변이 분석)를 필요로 한다. ASM 장애의 치료에는 대체 효소의 투여가 포함될 수 있다. 고용량에서, 효소 대체 요법은 독성 또는 유해 대사물질의 생산을 일으킬 수 있다. 따라서, ASM 장애에 대한 치료 경과 동안 스크리닝, 진단 및/또는 모니터링을 위한 개선된 방법을 개발하는 것이 필요하다. 본원에는 생물학적 샘플 중의 라이소-SPM(스펙고실포스포티콜린 또는 라이소-스펙고미엘린)의 수준을 측정하는 단계를 포함하는, ASM 장애를 치료하기 위한 비침습적 스크리닝, 진단, 모니터링 방법, 및/또는 치료제의 용량 조정 방법이 개시된다. 상승된 수준의 라이소-SPM은 ASM 장애를 스크리닝하거나 진단하기 위해 이용될 수 있다. 상승된 수준의 라이소-SPM은 또한 과도하게 높은 용량의 효소 대체 요법과 연관된 하나 이상의 독성 대사물질의 생산 신호 또는 지표로서 사용되어 요법의 유해한 부작용을 배제하면서 SPM의 축적을 감소시키는 효소 요법의 교정을 허용할 수 있다. 상승된 수준의 라이소-SPM은 또한 ASM 장애를 위한 치료 경과의 장기 유효성을 모니터링하기 위해 사용될 수 있다(예로, 라이소-SPM 수준이 치료 경과에 걸쳐 감소하지 않는 경우, 이는 효과적이지 않은 치료를 시사할 수 있음).

[0005] 니만-픽병(NPD)은 정상 세포 기능이 손상된 세포, 예컨대 대식구 및 뉴런의 라이소좀에서 SPM의 과다 축적을 특징으로 하는, 선천성 상염색체 열성 지질 저장 장애이다. 니만-픽 A형("NPD-A")은 유아에서 급속히 진행되는 신경변성 질환이며 전형적으로 2 내지 3살 내에 사망으로 이어진다. 니만-픽 B형("NPD-B")은 간 및 비장의 비대 및 호흡 곤란으로 이어지며 일반적으로 초기 성인기 사망으로 이어진다. 다른 유형의 니만-픽병, 예로 C형("NPD-C")은 또한 SPM 및/또는 라이소-SPM의 축적과 연관될 수 있다. 이들은 또한 본원에서 ASM 장애(ASMD)로 불린다. 상기 유형의 니만-픽병이 본원에서 니만-픽병(NPD)으로 총칭된다.

[0006] NPD는 일반 모집단에서보다 독일·폴란드·러시아계 유대인들 간에 보다 빈번히 일어난다. 독일·폴란드·러시아계 유대인 중 NPD-A의 발생률은 약 1/40,000으로 유전자 빈도(q)는 약 1/200이며, 이종접합체 보인자 빈도(2pg)는 1/100으로 추산된다[Goodman, 1979, in "Genetic Disorders Among The Jewish People", John Hopkins Univ. Press, Baltimore, pp. 96-100]. 독일·폴란드·러시아계 유대인 모집단에서는 NPD-B의 이종접합체 보인자 발생률이 덜 빈번하다[상기 문헌]. NPD A 및 B에 대해 조합된 이종접합체 보인자 빈도는 독일·폴란드·러시아계 유대인 후손인 개인들 중에서 약 1/70으로 추산되었다[상기 문헌]. 다양한 국가에서 수행된 역학 연구에서, 세계 몇몇 국가에서의 NPD A 및 B 질환의 조합 발생률은 신생아에서 1/167,000 내지 1/250,000 범위

로 추산된다[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]. 이중접합체 보인율은 개인에서 1/200 내지 1/250 범위로 여겨진다.

[0007] NPD-A 또는 NPD-B를 갖는 환자는 잔여 ASM 활성(정상의 약 1% 내지 10%)을 갖지만, 이는 라이소좀에서 스펡고미엘린의 과다 축적을 방지하기에 충분하지 않다. 또한, NPD-B의 임상 경과를 매우 가변적이며, 현재는 질환 중증도와 잔여 ASM 활성 수준을 연관시킬 수 없다. NPD-A 또는 NPD-B를 갖는 이환 환자의 효소 진단이 혈액 샘플에서 수행될 수 있지만, 상기 진단에는 종종 침습적 절차, 예컨대 간 또는 폐 생검이 선행된다. 또한, 특히 효소 원인으로 말초 백혈구를 이용하는 절대 이중접합체의 효소적 검출이 문제가 되는 것으로 입증되었다. 하나의 가능성은 일부 원천에서 중성 스펡고미엘리나제의 발생 및/또는 돌연변이체 대립유전자에서 생성되는 잔여 ASM 활성의 존재가 질환 아형에 대한 보인자를 신뢰성 있게 구별하지 못하는 데 기여했다는 것이다. 중성 스펡고미엘리나제를 발현하지 않는 배양된 피부 섬유아세포의 이용도 이중접합체로 모호하지 않은 결과를 제공하지 못했다. 따라서 ASM 장애, 예컨대 NPD를 정확하게 검출, 스크리닝, 진단 및 치료하기 위한 대안적 방법이 필요하다.

[0008] 효소 대체 요법(ERT)이 다양한 라이소좀 저장 질환을 치료하기 위해 이용되었다. 예로, 다른 것들 중에서도 테이-삭스(Tay-Sachs), 폼페(Pompe) 및 니만-픽병에 대한 ERT를 논의하는, 이들의 전문이 본원에 포함된 미국 특허 제7,001,994호 및 미국 특허 출원 제2011/0052559호를 참고하라. ERT는 외인적으로 공급된 효소를 이용한 결핍 및/또는 결함 효소를 보충하고자 시도한다. 니만-픽병에 대한 ERT의 경우, 목표는 이환 개인이 스펡고미엘린을 가공할 수 있도록 하고 라이소좀 내에 그 축적을 배제하는 것일 것이다. 효과적이 되기 위해, 이러한 요법은 초기에 축적된 스펡고미엘린을 분해하기 위해 충분히 다량의 대체 효소뿐만 아니라 스펡고미엘린의 후속 재축적을 배제하기 위해 대체 효소의 연속 투여를 필요로 할 수 있다. 그러나 축적된 스펡고미엘린의 대사는 독성 또는 유해한 대사물질을 생산할 수 있다. 따라서 유해 부작용을 일으킬 수 있는 상승된 수준의 대사물질을 생산하지 않고 환자에서 축적된 스펡고미엘린을 효과적으로 감량하기 위해 ERT의 주의 깊은 조정이 필요하다.

[0009] 이전에 주지된 바와 같이, SPM은 혈장, 전혈 또는 소변에서 크게 상승되지 않아서 ASM 장애에 대한 치료를 스크리닝, 진단 또는 모니터링하기 위한 비침습적 바이오마커로서의 용도를 제한한다. 본원에서 논의된 바와 같이, SPM의 탈아실화 형태인 라이소-SPM(스펙고실포스포릴콜린 또는 라이소-스펙고미엘린)은 ASM 장애를 겪고 있거나 치료받고 있는 환자에서 말초 조직을 포함하는 조직에서 크게 상승되어, ASM 장애에 대한 스크리닝, 진단 및/또는 모니터링 치료를 위한 잠재적 마커가 되게 한다. 이러한 이분법은 아실화된 및 탈아실화된 글리코스펙고지질 모두의 변경된 수준이 혈장에서 검출 가능한 여러 다른 라이소좀 저장 장애와 대비된다. 변경된 수준의 SPM이 ASM 장애를 겪고 있거나 치료받고 있는 환자의 혈장 중에 검출 불가능한 경우, 라이소-SPM은 치료의 스크리닝, 진단 또는 모니터링에 적합하지 않을 수 있음이 예상될 수 있다. 그러나 본원에 개시된 바와 같이, 라이소-SPM은 말초 조직, 예컨대 혈액 혈장을 포함하는 다양한 조직으로부터의 생물학적 샘플에서 변경된 수준으로 검출될 수 있음이 확인되었다.

[0010] 라이소-SPM이 포함되는 라이소-스펙고지질(라이소-SL)은 스펡고지질의 탈아실화된 형태이다; 몇몇은 특정 라이소좀 저장 장애에서 상승된 것으로 나타났다[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)]. 라이소-SPM 및 다른 라이소-SL이 생산되는 기전은 완전히 규명되지 않았다. 스펡고신의 동시 상승 부재는 해당 스펡고지질의 탈아실화가 가능한 생성 경로임을 제시한다. 그러나 현재까지 확인된 유일한 스펡고미엘린 탈아실화제는 아토피성 피부염 대상체의 각질층에서 유래된다[Murata et al., "Abnormal expression of sphingomyelinase acylase in atopic dermatitis: an etiologic factor for ceramide deficiency?", *J. Invest. Dermatol.* 106: 1242-1249(1996)]. 상기 탈아실라제의 발현은 특정한 생리 조건 하에 선택된 세포 유형에 제한되는 것으로 나타난다. 태반, 뇌 및 소변으로부터 정제된 ASM은 라이소-SPM을 가수분해하지 않는 것으로 나타났다[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)]. 라이소-SPM에 대한 생합성 경로에 관한 이해의 부재는 ASM 장애를 겪고 있는 환자에서 실험적으로 그 발현 수준을 예측하는데 대한 어려움을 더 강조한다.

[0011] 라이소-SPM은 라이소포스포리파제 D 활성을 갖는 외효소인 오토타신을 통한 스펡고신-1-포스페이트로의 그 신속한 대사로 인해, 시험관 내 혈액 중 짧은 반감기를 갖는다[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)]. NPD-B 환자의 비장 및 간, 그리고 ASM 활성이 거의 내지 전혀 갖지 않고 중증 신경병리 질환을 나타내는 NPD-A 대상체의 뇌 이외에서는 다른 기관 내 라이소-SPM 수준에 대한 보고가 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0012] 본원에서 개시된 바와 같이, 라이소-SPM은 ASM 장애를 겪고 있고/있거나 치료받고 있는 환자로부터의 생물학적 샘플(예로, 말초 조직에서 채취한 샘플) 중 변경된 농도로 검출될 수 있다. 변경된 수준은 치료의 일시적 효과를 반영할 수 있다(예로, 변경된 라이소-SPM 수준은 ERT에 반응하여 급성 독성 대사물질의 생산에 대한 마커로 작용할 수 있음). 변경된 수준은 또한 진단적으로 이용될 수 있다(예로, 변경된 라이소-SPM 수준은 ASM 장애를 겪고 있는 증상성 또는 전-증상성 대상체를 확인하기 위한 진단 또는 스크리닝 마커로 작용할 수 있음). 변경된 수준은 또한 ASM 장애에 대한 치료 경과의 장기 유효성을 모니터링하기 위해 이용될 수 있다(예로, 라이소-SPM 수준이 치료 경과에 걸쳐 감소되지 않는 경우, 이는 효과적이지 않은 치료를 시사할 수 있음). 따라서 라이소-SPM(스핑고실포스포티콜린 또는 라이소-스핑고미엘린)을 포함하는 신규한 바이오마커를 이용한 ASM 장애, 예컨대 NPD의 치료를 위한 치료의 진행 스크리닝, 진단, 모니터링 및/또는 치료제의 용량 조정의 신규 방법이 본원에 개시된다. 치료 경과의 모니터링에는 치료 경과에 걸친 하나 이상의 독성 마커(예로, 라이소-SPM)의 수준 감소를 검출하는 단계가 포함되어 효과적인 치료 방식을 시사하거나 경시적인 마커 수준의 변화 부재를 검출함으로써 효과적이지 않은 방식을 시사할 수 있다.

[0013] 본원에 개시된 방법에는 또한 산 스핑고미엘리나제(ASM) 장애를 갖는 인간 대상체의 치료 방법이 포함된다. 특정 양태에서, 방법은 제1 농도를 갖는 ASM 장애를 치료하기 위한 치료제의 제1 용량을 대상체에 투여하는 단계; 및 대상체가 제1 용량의 투여 후 참조 수준 이하인 라이소-SPM 수준을 갖는 것으로 결정된 경우, 제1 농도 이상의 제2 농도를 갖는 치료제의 제2 용량을 대상체에 투여하는 단계를 포함할 수 있다. 방법에는 말초 조직으로부터의 생물학적 샘플 중의 라이소-SPM의 측정 단계 및 변경된 라이소-SPM 수준을 검출함으로써 ASM 장애를 겪고 있는 환자의 확인 단계가 포함될 수 있다. 방법에는 또한 치료제, 예로 환자의 조직에서 SPM 수준을 감소시키는 제제를 이용한 환자의 치료 결과 변경된, 라이소-SPM을 포함하는 하나 이상의 독성 마커 수준을 검출함으로써 ASM 장애에 대한 환자의 치료 모니터링 또는 조정 단계가 포함된다. 방법은 이러한 환자의 비침습적 평가를 허용한다.

[0014] 본원에 개시된 방법은 또한 일부 구현예에서 ASM 장애, 예컨대 NPD에 대한 치료의 진행 스크리닝, 진단, 모니터링 및/또는 치료 조정을 위해 이용될 수 있다. 예를 들어, 방법에는 치료로 야기되는 독성 대사물질의 수준을 관리하기 위해 독성 마커(예로, 라이소-SPM)를 측정함으로써 ASM 장애를 치료하기 위해 환자에게 주어진 치료제 용량을 조정하는 단계가 포함된다. 본원에 개시된 방법은, 일부 구현예에서 ASM 장애에 대한 치료 경과의 장기 유효성을 모니터링하기 위해 이용될 수 있다(예로, 라이소-SPM 수준이 치료 경과에 걸쳐 감소되지 않는 경우, 이는 효과적이지 않은 치료를 시사할 수 있음). 방법은 또한, 일부 구현예에서 ASM 장애의 초기 징후로서 상승된 라이소-SPM에 대해 대상체(예로, 전증상성 환자)를 스크리닝하기 위해 이용될 수 있다. 이어서 스크리닝에서 상승된 라이소-SPM을 갖는 것으로 확인된 대상체에는 상승된 라이소-SPM을 나타내지 않은 대상체에게 추가 평가가 제공되지 않지만, ASM 장애의 진단을 진단/확인하기 위한 추가 평가(예로, ASM 혈액 평가, 유전 평가 등)가 제공될 수 있다. 이러한 스크리닝 방법은 평가 비용을 감소시킬 수 있다.

[0015] 본원에 개시된 방법에는 인간 대상체로부터의 생물학적 샘플 중의 라이소-SPM의 측정 단계 및 라이소-SPM의 측정된 수준에 기반한 최적화된 농도에서 ASM 장애(예로, ERT, 샤페론 요법, 및/또는 기질 감소 요법)를 치료하기 위한 치료제의 투여 단계가 포함될 수 있다. 다양한 구현예에서, 생물학적 샘플은 말초 샘플이다. 특정 구현예에서, 생물학적 샘플은 혈액, 진혈(예로, 건조 혈반(blood spot), 혈청 및/또는 소변의 샘플일 수 있다. 라이소-SPM 수준을 측정하기 위한 말초 샘플의 이용은 침습적 절차, 예컨대 간 생검에 대한 필요성을 배제할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0016] 도 1a는 정상 대조군 샘플로부터 DBS 중 평균 농도값에 대한 NPD-A 및 NPD-B 환자로부터의 건조 혈반(DBS) 중 SPM 농도의 비를 나타내는 그래프이다. 도 1b는 정상 대조군 샘플로부터의 DBS 중 평균 농도값에 대한 NPD-A 및

NPD-B 환자로부터의 DBS 중 라이소-SPM 농도의 비를 나타내는 그래프이다.

도 2는 0, 3, 또는 20 mg/kg rhASM의 단회 용량 투여 5분 후 농도에 대비한, 나타낸 시점(투여 후 1 시간, 2 시간, 4 시간, 6 시간, 24 시간, 48 시간 및 72 시간)에서의 ASM 녹아웃 마우스로부터의 DBS 중 라이소-SPM 농도(수직선)에서의 배율 상승을 나타내는 히스토그램이다.

도 3은 단회 용량(10 mg/kg) 또는 20 mg/kg rhASM 용량이 이어지는 감량 투여 방식(3 mg/kg)의 투여 후 야생형(C57BL/6) 또는 ASM 녹아웃(ASMKO) 마우스로부터 수득된 DBS 중 라이소-SPM(ng/ml)의 농도를 나타낸다. 혈액 샘플을 하기 시점에 채취하였다: 투여 후 5 분, 4 시간, 6 시간, 24 시간 및 72 시간. 10 mg/kg 투여군의 동물은 24 시간 시점 후 안락사시켜야 했다.

도 4는 26 주 기간에 걸쳐 투여 전 그리고 rhASM 용량 투여 후 24 시간, 48 시간 및 72 시간에 수집된 인간 니만-픽 환자로부터의 DBS 중 라이소-SPM의 농도(ng/ml)를 나타내는 히스토그램이다. 용량(0.1 mg/kg, 0.3 mg/kg, 0.6 mg/kg, 1 mg/kg, 2 mg/kg, 또는 3 mg/kg) 및 투여일(1 일, 2 주, 4 주, 6 주, 8 주, 10 주, 12 주, 14 주 및 26 주)을 수평축에 나타낸다. 26 주째에는 샘플을 투여 전 그리고 투여 후 24 시간 및 48 시간 후에만 채취하였다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0017] 이제 본 개시에 따른 특정한 예시적 구현예를 상세히 참조할 것이며, 그 구체예가 첨부 도면에 예시된다. 가능한 경우, 동일 참조 번호는 도면에 걸쳐 동일하거나 유사한 부품을 나타내기 위해 사용될 것이다.
- [0018] 본 출원에서 구체적으로 달리 나타내지 않는 한, 단수의 이용에는 복수가 포함된다. 본 출원에서 달리 나타내지 않는 한, "또는"의 이용은 "및/또는"을 의미한다. 또한, 용어 "포함되는"뿐만 아니라 다른 형태, 예컨대 "포함된다" 및 "포함된"의 이용은 제한하는 것이 아니다. 본원에 기재된 임의 범위는 종결점 및 종결점 사이의 모든 값을 포함하는 것으로 이해될 것이다.
- [0019] 본원에서 사용된 섹션 제목은 단지 구성 목적을 위한 것이며, 기재된 요지를 제한하는 것으로 간주되어서는 안 된다. 비제한적으로 특허, 특허 출원, 기사, 서적 및 조약을 포함하는 본 출원에서 언급된 모든 문헌 또는 문헌 부분은 본원에서 명시적으로 모든 목적에 대해 이들의 전문이 참조로 포함된다.
- [0020] ASM 장애, 예컨대 NPD를 치료하기 위한 치료의 진행 스크리닝, 진단, 모니터링 및/또는 치료제의 용량 조정 방법이 본원에 개시된다. "ASM 장애"는 산 스펡고미엘리나제의 감소된 발현 또는 손상된 기능과 연관된 임의 장애를 포괄할 수 있다. ASM 장애는 또한 조직 내 스펡고미엘린의 축적과 연관된 임의의 다른 장애를 포괄할 수 있다.
- [0021] 일부 구현예에서, 방법은 ASM 장애를 치료하기 위한 제1 농도를 갖는 치료제의 제1 용량을 대상체에 투여하는 단계; 이어서 대상체가 제1 용량의 투여 후 참조 수준(예로, ASM 장애를 갖지 않는 대조군 대상체로부터의 샘플 중의 수준 또는 치료 전 환자에서 측정된 기준선 수준) 이하인 라이소-SPM 수준을 갖는 것으로 결정된 경우, 제1 농도 이상의 제2 농도를 갖는 치료제의 제2 용량을 대상체에 투여하는 단계를 포함할 수 있다.
- [0022] 특정 양태에서, 방법은 인간 대상체로부터의 생물학적 샘플 중의 라이소-스펙고미엘린(라이소-SPM)을 수집하고 측정하는 단계를 포함한다. 라이소-SPM의 측정된 수준은 ASM 장애를 치료하기 위해 치료의 진행을 스크리닝, 진단, 모니터링하고/하거나 치료제의 용량을 조정하기 위해 사용될 수 있다. 방법은 라이소-SPM이 ASM 장애, 예컨대 NPD를 갖는 환자의 말초 조직으로부터의 생물학적 샘플에서 크게 상승되어, ASM 장애의 스크리닝 및 진단 그리고 ASM 장애에 대한 모니터링/교정/관리 요법을 포함하는 이러한 환자의 비침습적 평가를 허용한다는 발견에 기반한다. 방법은 치료 동안 측정된 ASM의 분해가 독성 또는 유해한 대사물질의 생산을 신호하는 상승된 수준의 마커(예로, 라이소-SPM)로 이어질 수 있고, 이러한 유해한 수준의 대사물질이 과다 대사물질 생산을 방지하는 용량에서 SPM 수준을 감소시키도록 설계된 치료제의 투여 방법(예로, ERT, 샤페론 요법 및/또는 기질 감소 요법)에 의해 배제될 수 있다는 발견에 기반한다. 라이소-SPM의 상승된 농도의 측정이 이러한 대사물질의 생산을 검출하기 위해 이용될 수 있고, 과다하게 상승된 수준의 대사물질(예로, 독성 수준)의 생산을 배제하기 위한 요법을 교정하기 위해 이용될 수 있다. 특정 구현예에서, ASM 장애에 대한 치료를 받고 있는 환자에서 라이소-SPM의 수준은 용량이 증가되거나 감소되거나 반복되거나 지연되거나 또는 중단되는지를 결정한다.
- [0023] ASM 장애를 갖는 대상체(예로, NPD 환자)에서 상승된 라이소-SPM 수준의 검출은 치료 동안 유해 부작용에 대한 모니터링 방법의 일환으로 사용될 수 있다. 예를 들어, 방법은 대상체로부터 생물학적 샘플을 수집하는 단계, 샘플 중의 라이소-스펙고미엘린(라이소-SPM) 수준을 측정하는 단계, 샘플 중의 라이소-SPM의 측정된 수준을 참

조 수준과 비교하는 단계 및 샘플 중의 라이소-SPM의 수준이 상승되는 경우, 유해 부작용을 검출하는 단계를 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 라이소-SPM 수준이 참조 샘플(예로, ASM 장애를 갖지 않는 대조군 대상체로부터의 샘플 중의 참조 수준)에 비해 소정량만큼 상승된 경우, 또는 라이소-SPM 수준이 치료 경과 동안 경시적으로 대상체에서 소정량만큼 증가(즉, 본원에서 참조 수준으로도 불리는, 치료 전 환자에서 측정된 기준선 수준에 비해 증가)하는 경우, 라이소-SPM의 측정된 수준은 치료로부터 유해 부작용의 지표로 이용될 수 있다. 일부 구현예에서, 치료는 효소 대체 요법(ERT)이고, ERT의 투여량은 환자로부터 하나 이상의 생물학적 샘플을 수집하고, 라이소-SPM의 상승에 대해 각각의 샘플을 평가하고, 소정 역치를 초과하여 상승된 라이소-SPM 수준을 생성하지 않는 수준으로 ERT 용량을 설정하여 관리된다. 치료제의 용량 관리에는 치료제의 농도 증가, 감소 또는 유지 및/또는 치료 중단이 포함될 수 있다. 특정 구현예에서, 하나 이상의 생물학적 샘플은 치료제의 용량 투여 후 및/또는 치료제의 후속 용량의 투여 직전에 수집된다. 일부 구현예에서, 유해 부작용은 생물학적 샘플(예로, 혈액 샘플, 예컨대 혈장, 혈청, 또는 건조 혈반) 중 라이소-SPM 수준이 참조 수준보다 약 100 ng/ml 내지 700 ng/ml(예로, 약 100 ng/ml, 200 ng/ml, 250 ng/ml, 300 ng/ml, 400 ng/ml, 500 ng/ml, 600 ng/ml, 또는 700 ng/ml 초과, 또는 이들 사이의 임의 농도) 더 높은 경우, 또는 생물학적 샘플 중의 라이소-SPM 수준이 참조 수준보다 적어도 약 1.1 배, 1.5 배, 2 배, 2.5 배, 3 배, 3.5 배, 4 배, 4.5 배, 5 배, 5.5 배, 6 배, 6.5 배, 7 배, 7.5 배, 8 배, 8.5 배, 9 배, 9.5 배, 또는 10 배 초과(또는 이들 사이의 임의 값)만큼 증가하는 경우, 검출될 수 있다. 예를 들면, 증가는 적어도 약 3 배일 수 있다. 참조 수준은, 예로 ASM 장애를 갖지 않는 대조군 대상체로부터의 샘플 중의 수준 또는 치료제 용량을 이용한 치료 전 환자에서 측정된 기준선 수준일 수 있다.

[0024] 또한 본원에는 ASM 장애(예로, NPD)를 갖는 대상체의 치료 방법이 개시된다. 다양한 구현예에서, 방법은 증가하는 농도의 순차적 용량으로 ASM 장애를 치료하기 위한 치료제(예로, ERT, 샤페론 요법, 및/또는 기질 감소 요법)를 투여하는 단계 및 각각의 투여 후(투여 후, 예로 1 분, 5 분, 10 분, 30 분 또는 45 분, 또는 1 시간, 2 시간, 3 시간, 4 시간, 5 시간, 10 시간, 12 시간, 15 시간 또는 20 시간 또는 1 일, 2 일, 5 일, 1 주, 2 주, 3 주 또는 4 주 또는 이들 사이의 임의 시기) 또는 다음 용량 직전에 생물학적 샘플 중의 상승된 라이소-SPM 수준에 대해 대상체를 모니터링하는 단계를 포함한다. 대상체의 모니터링은 대상체로부터 생물학적 샘플을 수집하는 단계, 샘플 중의 라이소-SPM 수준을 측정하는 단계, 샘플 중의 라이소-SPM 수준을 참조 수준(예로, ASM 장애를 갖지 않는 공여자로부터의 샘플 중의 수준 또는 치료 전 ASM 환자에서의 수준)과 비교하는 단계 및 참조 수준에 비해 샘플 중의 상승된 라이소-SPM 수준을 검출하는 단계를 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 참조 수준은 ASM 장애를 갖지 않는 대조군 대상체로부터의 생물학적 샘플에서 측정된 라이소-SPM 수준이다. 일부 구현예에서, 참조 수준은 초기의 더 저용량 ERT 투여 후 또는 임의의 ERT 투여 전에 채취한 대상체로부터의 샘플에서 측정된 라이소-SPM 수준이다. 일부 구현예에서, 생물학적 샘플(예로, 혈액 샘플, 예컨대 혈청 샘플, 혈장 샘플, 또는 건조 혈반) 중 라이소-SPM의 상승된 수준은, 예로 참조 수준보다 약 100 ng/ml 내지 700 ng/ml 더 높은 수준이다. 일부 구현예에서, 생물학적 샘플(예로, 혈액 샘플) 중 라이소-SPM의 상승된 수준은 참조 수준보다 적어도 약 1.1 배, 1.5 배, 2 배, 2.5 배, 3 배, 3.5 배, 4 배, 4.5 배, 5 배, 5.5 배, 6 배, 6.5 배, 7 배, 7.5 배, 8 배, 8.5 배, 9 배, 9.5 배, 또는 10 배 초과(또는 이들 사이의 임의 값) 더 높은 수준이다. 예를 들어, 수준은 적어도 약 3 배만큼 더 클 수 있다. 일부 구현예에서, 라이소-SPM의 상승된 수준이 이전 용량의 투여 후 검출되는 경우, 더 높은 농도의 ERT 용량은 투여되지 않는다.

[0025] 모니터링 요법 및 치료 방법에 부가하여, 대상체에서 ASM 장애(예로, NPD)의 스크리닝 및/또는 진단 방법이 본원에 개시된다. 다양한 구현예에서, 방법은 대상체로부터 생물학적 샘플을 수집하는 단계, 샘플 중의 라이소-SPM 수준을 측정하는 단계, 샘플 중의 라이소-SPM 수준을 참조 수준과 비교하는 단계 및 샘플 중의 라이소-SPM 수준이 참조 샘플에 대해 상승되는 경우, ASM 장애를 검출/진단하는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 참조 샘플은 ASM 장애를 갖지 않는 대조군 대상체로부터의 샘플이다. 일부 구현예에서, ASM 장애는 생물학적 샘플(예로, 혈액 샘플, 예컨대 혈장 샘플, 혈청 샘플, 또는 건조 혈반) 중 라이소-SPM 수준이 참조 수준보다 적어도 약 1 배, 1.5 배, 2 배, 2.5 배, 3 배, 3.5 배, 4 배, 4.5 배, 5 배, 5.5 배, 6 배, 6.5 배, 7 배, 7.5 배, 8 배, 8.5 배, 9 배, 9.5 배, 또는 10 배 초과(또는 이들 사이의 임의 값)만큼 더 높거나 적어도 약 200 ng/ml 내지 2000 ng/ml, 예컨대 적어도 약 200 ng/ml, 적어도 약 250 ng/ml, 적어도 약 300 ng/ml, 적어도 약 400 ng/ml, 적어도 약 500 ng/ml, 적어도 약 525 ng/ml, 적어도 약 575 ng/ml, 적어도 약 700 ng/ml 및/또는 적어도 약 900 ng/ml(예로, 약 200 ng/ml, 250 ng/ml, 300 ng/ml, 350 ng/ml, 400 ng/ml, 450 ng/ml, 500 ng/ml, 525 ng/ml, 550 ng/ml, 575 ng/ml, 600 ng/ml, 625 ng/ml, 650 ng/ml, 700 ng/ml, 750 ng/ml, 800 ng/ml, 850 ng/ml, 900 ng/ml, 950 ng/ml, 1000 ng/ml, 1050 ng/ml, 1100 ng/ml, 1150 ng/ml, 1200 ng/ml, 1300 ng/ml, 1400 ng/ml, 1500 ng/ml, 1600 ng/ml, 1700 ng/ml, 1800 ng/ml, 1900 ng/ml, 또는 2000 ng/ml 초과, 또는 이

들 사이의 임의 농도) 참조 수준보다 더 높은 경우, 스크리닝되고/되거나 진단될 수 있다. 일부 구현예에서, 정상 대상체로부터의 생물학적 샘플은 약 25 ng/ml 내지 200 ng/ml 범위(예로, 약 25 ng/ml, 50 ng/ml, 75 ng/ml, 100 ng/ml, 125 ng/ml, 150 ng/ml, 175 ng/ml, 또는 200 ng/ml, 또는 이들 사이의 임의 농도)의 라이소-SPM 수준을 함유할 수 있다.

[0026] 라이소-SPM의 측정

[0027] 라이소-SPM의 화학 구조의 논의를 위해, 예로 [Ito et al., J. Biol. Chem. 270: 24370-4(1995)]를 참고하라; 또한 다음 주소에서 이들의 카탈로그에 제공되는 [Cayman Chemical Co. Item Number 10007947]도 참고하라: <https://www.caymanchem.com/app/template/Product.vm/catalog/10007947>.

[0028] 본원에 개시된 방법에는 말초 조직으로부터의 샘플을 포함하는 다양한 생물학적 샘플로부터의 라이소-SPM의 측정 단계가 관여된다. 생물학적 샘플로부터 라이소-SPM 수준을 수집하고, 제조하고, 정량하기 위한 임의 방법이 이용될 수 있다. 생물학적 샘플 중의 라이소-SPM 수준은 분광측정기, 예컨대 질량 분광측정기, 예로 LC/MS/MS, 또는 전자기적 주파수 분광측정기, 예로 UV-VIS, IR, 또는 NMR을 이용해서 정량될 수 있다. 일부 구현예에서, 라이소-SPM 수준의 정량 방법은 생물학적 샘플(예로, 동맥 또는 정맥 천자, 조직 생검, 볼 면봉채집, 소변 샘플 등)을 수집하는 단계, 샘플의 다른 성분으로부터 라이소-SPM을 검출하고/하거나 분리하는 단계(예로 항체, 지시 약 화학물질, 질량 분광측정기, 예컨대 LC/MS/MS, 또는 전자기적 주파수 분광측정기, 예컨대 UV-VIS, IR, 또는 NMR을 이용) 및 라이소-SPM 수준을 참조 샘플 중의 수준과 비교하는 단계를 포함할 수 있다.

[0029] 라이소-SPM 수준은 본원에 기재된 방법으로 다양한 조직으로부터의 생물학적 샘플 중에서 측정될 수 있다. 예를 들어, 말초 조직으로부터의 생물학적 샘플, 예컨대 혈장, 전혈(예로, 건조 혈반), 혈청, 피부, 및/또는 소변이 상승된 라이소-SPM 수준의 검출에서 사용하기 위해 수집될 수 있다. 다른 조직, 예로 비장, 폐, 심장, 간, 신장 및/또는 뇌 조직으로부터의 생물학적 샘플도 사용될 수 있다. 둘 이상의 조직의 조합(예로, 2, 3, 4, 5 이상의 조직)으로부터의 샘플이 사용될 수 있다. 일부 구현예에서, 말초 조직으로부터의 생물학적 샘플의 사용은 침습적 절차, 예컨대 간 생검에 대한 필요성을 배제할 수 있다.

[0030] 일부 구현예에서, 생물학적 샘플은 라이소-SPM의 샘플 중에서 검출 및/또는 측정 전에 하나 이상의 전처리 단계를 거친다. 특정 구현예에서, 샘플은 원심분리, 여과, 침전, 투석 또는 크로마토그래피에 의해 또는 이러한 전처리 단계의 조합에 의해 전처리된다. 다른 구현예에서, 샘플은 냉동, 화학적 고정, 파라핀 임베딩, 탈수, 투과화 및/또는 균질화에 이어 원심분리, 여과, 침전, 투석 및/또는 크로마토그래피에 의해 전처리된다. 특정 구현예에서, 샘플은 샘플로부터 특정 유형의 세포를 제거하거나 라이소-SPM의 평가 전에 샘플로부터 파편을 제거함으로써 전처리된다.

[0031] 다양한 구현예에서, 생물학적 샘플은 샘플 중 하나 이상의 마커 수준을 정량하거나 반정량하기 위한 장치를 이용하여 평가된다. 예를 들어, 샘플 중의 라이소-SPM 및/또는 다른 마커의 수준은 정량적으로 또는 반정량적으로 평가될 수 있다. 일부 구현예에서, 생물학적 샘플 중의 라이소-SPM 및/또는 다른 마커 수준을 정량하기 위한 장치, 예컨대 직렬 액체 크로마토그래피-질량 분광측정(예로, LC/MS/MS)이 이용될 수 있다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 항체 또는 다른 검출 제제가 생물학적 샘플 중의 라이소-SPM 및/또는 다른 마커에 결합하기 위해 이용될 수 있다. 그 강도, 세기, 색상 등이 샘플 중의 라이소-SPM 및/또는 다른 마커 수준을 반정량적으로 또는 정량적으로 결정하기 위해(예로, 하나 이상의 참조 샘플로부터의 신호에 대비하여) 이용될 수 있는 검출 가능한 신호를 방출하는 검출 제제와 반응하는 하나 이상의 제제(예로, 비색 제제)가 적용될 수 있다. 생물학적 샘플 중의 라이소-SPM 및/또는 다른 마커를 정량하기 위한 추가 방법, 예로 면역분석, 예컨대 ELISA, 면역침전 및 웨스턴 블롯뿐만 아니라 형광-활성화 세포 정렬(FACS), 형광 공명 에너지 전달(FRET), RT-PCR 및/또는 노던 블롯 방법이 이용될 수 있다.

[0032] ASM 장애의 치료 관리

[0033] 다양한 구현예에서, 라이소-SPM 수준이 ASM 장애에 대한 요법의 일환으로 측정될 수 있다. 예를 들어, ASM 장애는 니만-픽병(NPD), 예로 NPD-A, NPD-B, 또는 NPD-C일 수 있다. ASM 장애에 대한 요법은 환자의 조직에서 SPM 수준을 감소시키는 하나 이상의 치료제(예로, ERT, 샤페론 요법, 및/또는 기질 감소 요법) 투여를 포함할 수 있다. 예를 들어, 환자 내 용량 증량 효소 대체 요법(ERT), 예컨대 그 전문이 본원에 참조로 포함되는 미국 출원 제2011/0052559호에 개시된 ASM 용량-증량 방법(예를 들어, 용량 증량 프로토콜을 기재한 단락 [0063] 내지 [0075])이 이용될 수 있다.

[0034] 다양한 구현예에서, ASM 장애에 대한 용량 증량 요법 동안 마커, 예컨대 라이소-SPM의 모니터링에 의해 유해 부

작용(예로, 독성 또는 유해한 수준의 대사물질 생산)에 대해 대상체를 모니터링하기 위한 방법이 개시된다. 방법은 대상체로부터 생물학적 샘플을 수집하는 단계, 샘플 중의 라이소-SPM 수준을 측정하는 단계, 샘플 중의 라이소-SPM 수준을 참조 수준과 비교하는 단계 및 샘플 중의 라이소-SPM 수준이 참조 샘플에 비해 상승되는 경우, 유해 부작용을 검출하는 단계를 포함할 수 있다. 하나 이상의 샘플이 치료제 용량의 투여 후 또는 다음 용량의 투여 전에 수집되고 평가될 수 있다. 예를 들어, 샘플은 치료 용량의 투여 후 1 분, 5 분, 10 분, 30 분 또는 45 분, 또는 1 시간, 2 시간, 3 시간, 5 시간, 10 시간, 12 시간, 15 시간 또는 20 시간 또는 1 일, 2 일, 3 일, 4 일, 5 일 또는 1 주, 2 주, 3 주, 4 주 또는 이들 사이의 임의의 시기에 또는 다음 용량의 투여 전에 수집되고 평가될 수 있다. 일부 구현예에서, 참조 샘플은 ASM 장애를 갖지 않는 대조군 대상체로부터의 샘플이다. 일부 구현예에서, 참조 샘플은 더 높은 농도의 치료제 용량의 투여 전(또는 임의의 치료제의 투여 전) 대상체로부터의 초기 생물학적 샘플이다. 일부 구현예에서, 라이소-SPM 수준이 초기 용량의 투여 후 또는 참조 샘플에서의 수준에 비해 증가된(즉 더 높은 농도의) 치료제 용량(예로 더 높은 농도의 ERT)의 투여 후 소정량만큼 또는 소정 역치를 초과하여 증가하면, 이것은 치료로부터의 유해 부작용의 지표로 이용될 수 있다. 특정 구현예에서, 라이소-SPM 수준이 증가하지 않거나 역치 수준을 초과하여 증가하지 않는 경우, 유해 부작용이 일어나지 않았음의 지표로 이용될 수 있다.

[0035] 다양한 구현예에서, ASM 장애에 대한 요법이 제공된다. 요법은 환자 조직 중 SPM 수준을 감소시키는 하나 이상의 치료제(예로, ERT, 사페론 요법, 및/또는 기질 감소 요법) 투여를 포함할 수 있다. 특정 구현예에서, 요법은 ERT(예로, ASM 대체 요법)를 포함할 수 있다. 요법은 요법 동안 상승된 수준의 라이소-SPM에 대해 대상체를 모니터링하는 단계 및 소정 역치 수준 미만으로 라이소-SPM 수준을 감소시키기 위해 치료제의 농도(예로, ERT 용량의 농도)를 조정하는 단계를 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 모니터링은 각각의 치료제 용량 후 또는 각각의 치료제의 후속 용량의 투여 전에 상승된 수준의 라이소-SPM에 대해 샘플을 평가하는 단계를 포함한다. 특정 구현예에서, 각각의 용량 후 모니터링은 선택적이며, 치료제의 특정 용량 후 또는 치료제의 특정한 후속 용량의 투여 전에 주기적으로 수행된다.

[0036] 일부 구현예에서, 요법은 증가하는 농도의 순차적 용량으로 ERT(예로, ASM 대체 요법)를 투여하는 단계, 특정 용량 후(예로 각각의 용량 후 또는 각각의 후속 용량 전) 환자로 부터 생물학적 샘플을 수집하는 단계, 샘플 중의 라이소-SPM 수준을 검출하는 단계(예로, LC/MS/MS 이용) 및 각각의 용량 이후 또는 다음 용량의 투여 전에 상승된 라이소-SPM 수준에 대해 대상체를 모니터링하는 단계를 포함할 수 있다. 예를 들어, 생물학적 샘플은 ERT 용량이 투여된 후 1 분, 5 분, 10 분, 30 분, 또는 45 분, 또는 1 시간, 2 시간, 3 시간, 5 시간, 10 시간, 12 시간, 15 시간, 또는 20 시간, 또는 1 일, 2 일, 3 일, 4 일, 5 일, 또는 1 주, 2 주, 3 주, 또는 4 주에 또는 이들 사이의 임의의 시기에 또는 다음 용량의 투여 전에 상승된 라이소-SPM에 대해 수집되고 모니터링될 수 있다. 대상체를 모니터링하는 단계는 대상체로부터 생물학적 샘플을 수집하는 단계, 샘플 중의 라이소-SPM 수준을 측정하는 단계, 샘플 중의 라이소-SPM 수준을 참조 수준과 비교하는 단계 및 샘플 중의 라이소-SPM 수준이 참조 샘플에 비해 소정량만큼 상승되는 경우, ERT 용량을 조정하는 단계를 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 참조 샘플은 ASM 장애를 갖지 않는 대조군 대상체로부터의 샘플이다. 일부 구현예에서, 참조 샘플은 더 높은 농도의 ERT 용량의 투여 전(또는 임의의 ERT 투여 전) 대상체로부터의 초기의 생물학적 샘플이다. 일부 구현예에서, 라이소-SPM 수준이 대상체 샘플에서 소정량만큼 증가하고/하거나 참조 역치보다 높은 경우, 이는 ERT 투여량이 독성 또는 유해한 수준의 대사물질 생산을 배제하기 위해 감소되거나, 지연되거나 또는 종료되어야 한다는 지표로 이용될 수 있다. 일부 구현예에서, 라이소-SPM 수준이 역치 이하인 경우, 동등 이상인 농도의 후속 용량이 투여될 수 있다.

[0037] 다양한 구현예에서, 축적된 SPM의 급속한 가수분해로 생성되는 독성 또는 유해한 수준의 대사물질을 생산하지 않으면서 축적된 SPM을 감량하기 위해 경시적으로 증가하는 용량으로 대상체에 ERT를 투여하는 단계를 포함하는 용량 증량 요법이 제공된다. 일부 구현예에서, 상승된 라이소-SPM이 독성 또는 유해한 수준의 대사물질의 생산을 시사할 것이므로, 환자로 부터의 생물학적 샘플이 용량 증량 요법 동안 상승된 수준의 라이소-SPM에 대해 모니터링된다. 일부 구현예에서, 역치 농도를 초과하는 라이소-SPM 수준 또는 이전 샘플에서의 수준에 비해 라이소-SPM 수준의 큰 증가가 검출되는 경우, 증가된 용량의 ERT는 지연되거나 투여되지 않는다. ERT는 정맥내, 피내, 피하, 복강내, 폐내, 국소, 비강내, 두개내 또는 근육내를 포함하는 치료 효과를 달성하기 적합한 임의의 경로에 의해 투여될 수 있다.

[0038] 일부 구현예에서, ERT는 산 스펅고미엘리나제(ASM), 예컨대 재조합 인간 ASM(rhASM)의 투여를 포함할 수 있거나, ERT는 개질된 ASM(예로, 개질된 rhASM)의 투여를 포함할 수 있다. 개질된 ASM은 라이소좀 스펅고미엘린을 세라마이드 및 포스포티콜린으로 가수분해하는 그 능력을 크게 변경시키지 않는 효소의 임의의 개질을 포함할

수 있다(예로, 개질된 ASM은 개질되지 않은 ASM의 효소 활성의 적어도 약 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99%, 99.5%, 또는 99.9% 또는 이들 사이의 임의 백분율을 나타냄). 개질된 ASM의 가수분해력은 당업자에게 공지된 기법, 예컨대 이들의 전문이 본원에 참조로 포함된 미국 특허 제4,039,388호, 제4,082,781호, 제5,686,240호 및 제7,563,591호 그리고 국제 공개 WO 2007/078806호 및 WO 2006/058385호에 기재된 것들에 의해 평가될 수 있다.

[0039] 일부 구현예에서, ERT는 재조합 인간 ASM(rhASM) 또는 개질된 rhASM의 투여를 포함할 수 있다. 당분야에 공지된 다양한 인간 ASM 이소형이 존재하며, 그 전체가 본원에 개시된 방법에서 이용될 수 있다. 예로, 그 전문이 본원에 참조로 포함되는 미국 출원 제2011/0052559호를 참고하라(예로, 인간 ASM 이소형 및 이들의 효소 콘주게이트 그리고 이들의 ERT에서의 용도에 관한 논의는 단락 [108] 내지 [0117] 및 [0124] 내지 [0127]에서 참고하라).

[0040] 일부 구현예에서, 효소 대체 요법은 초기의 낮은, 저독성 용량으로, 이어서 후속 투여에서 증량되며 대상체에 투여된다. 이어서 대상체가 독성 또는 유해한 수준의 대사물질들을 생산하지 않고(예로, 독성 마커, 예컨대 라이소-SPM의 수준을 모니터링하여 검출됨) 관용할 수 있는 효소의 최고 용량이 유지 용량으로 이용될 수 있다. 대안적으로, 최고 관용 용량 미만의 치료 유효 용량이 유지 용량으로 이용될 수 있다. 치료 유효 용량은 1회 이상의 투여 후 ASM 대상체에서 축적된 스펅고미엘린의 농도를 적어도 약 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 또는 99%(또는 이들 사이의 임의 백분율)만큼 감소시키기 충분한 임의 용량을 포함할 수 있다.

[0041] ASM 장애, 예컨대 NPD의 치료는 병리 기관(예로 비장, 폐, 간, 심장, 신장 및 뇌)에서 치료제의 적절한 분포를 달성하기 위해 충분히 높은 용량의 치료제(예로, ERT, 샤페론 요법, 및/또는 기질 감소 요법)를 필요로 한다. ASM 녹아웃 마우스에서 재조합 인간 ASM의 정맥내 투여 후, 대부분의 ASM 활성은 간으로 분포되며, 소량의 ASM 효소 활성이 다른 기관, 예컨대 비장, 심장, 간, 신장 및 폐에서 검출됨을 나타내었다. 예로, [He et al., *Biochimica et Biophysica Acta* 1432: 251-264(1999)]를 참고하라. 따라서 상승된 농도의 치료제(예로 고농도의 대체 효소)를 갖는 용량이 ASM 장애, 예컨대 NPD를 갖는 대상체에서, 예로 폐, 간, 심장 및 신장으로의 적절한 분포 및 전달을 보장하기 위해 필요할 수 있다.

[0042] ASM 녹아웃 마우스에서의 연구는 또한 효소 대체 요법이 충분히 높은 용량에서 스펅고미엘린의 독성 또는 다르게 유해한 대사물질의 생산을 일으킬 수 있음을 나타내었다. 예로 [C. Nickerson, et al., *American Society of Human Genetics*(2005); 및 J. Murray et al., *Society of Toxicology*(2006)]을 참고하라. 이론에 구애받지 않고, NPD 대상체에 대한 고용량 ASM의 투여는 다량의 축적된 스펅고미엘린의 세라마이드 및 포스포틸콜린으로의 가수분해를 일으킬 수 있다. 세라마이드는 세포사에서 역할을 담당하는 것으로 알려져 있고, 친-아포토시스 제일 수 있다. 예로, [Smith and Schuchman, *FASEB* 22: 3419-3431(2008)]을 참고하라. 따라서 세라마이드는 ASM 녹아웃 마우스 및 NPD 대상체에서 관찰된 독성 부작용에 기여할 수 있다.

[0043] 따라서 과다 농도의 독성 대사물질의 생산을 배제하면서도 병리 기관에 걸쳐 라이소좀 스펅고미엘린을 감량하고 추가 축적을 방지하기 위해 충분한 농도의 치료제를 제공하기 위한 요법(예로, ERT, 샤페론 요법, 및/또는 기질 감소 요법)의 교정 및 조정이 필요하다. 일부 구현예에서, 상기 조정은 특정 용량 후 또는 매 용량 후 환자 샘플 중의 독성 마커, 예컨대 라이소-SPM 수준을 평가하고, 필요한 경우 본원에 기재된 투여 방식을 조정하여 용량-증량 프로토콜의 관리를 통해 제공된다. 치료제의 용량 관리에는 치료제 농도의 증가, 감소 또는 유지 및/또는 치료 중단이 포함될 수 있다.

[0044] 다양한 구현예에서, 치료의 용량 증량 방법에는 대상체에 축적된 스펅고미엘린의 양을 감소시키기 위해 대상체에 하나 이상의 초기, 저용량 치료제(예로 대체 효소)의 투여가 관여된다. 이어서 대상체에 의해 관용되고 치료에 유효한 최고 용량에 도달될 때까지, 치료제 용량이 전신으로 좀 더 높은 농도로 투여될 수 있다. 일부 구현예에서, 치료제는 하나 이상의 병리 기관(예로, ASM 장애를 겪고 있는 환자에서 SPM의 상승된 라이소좀 수준을 나타내는 기관) 중 효소 활성이 ASM 장애를 겪지 않는 대상체(예로, 건강한 대상체)에서 해당 기관 중 활성의 활성 수준의 적어도 약 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 12%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 50%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%(또는 이들 사이의 임의 백분율)가 되도록 투여된다.

[0045] 일부 구현예에서, ASM 장애의 치료 방법은 (a) (i) 대상체에 초기 저용량의 rhASM 또는 개질된 rhASM을 투여하는 단계; 및 (ii) 대상체에 더 높은 후속 용량의 rhASM 또는 개질된 rhASM을 투여하는(용량 증량) 단계를 포함하는, 대상체에서 축적된 스펅고미엘린 기질의 감량을 위한 효소 대체 방식으로 투여하는 단계; (b) 특정 용량 후, 또는 단계 (a)(i) 및 (a)(ii)에서 투여된 각각의 용량 후, 상승된 라이소-SPM 수준에 대해 및/또는 유해 부작용의 하나 이상의 추가 마커에 대해 대상체를 모니터링하는 단계(예로, LC/MS/MS를 이용해서 라이소-SPM 농도

를 정량함); (c) 상승된 라이소-SPM 수준이 검출된 후 및/또는 하나 이상의 추가적인 유해 부작용이 검출된 후 용량 증량 프로토콜을 반복, 감소 및/또는 종료하는 단계를 포함할 수 있다. 특정 구현예에서, 방법에는 대상체에 의해 관용되는 최고 용량 이하의 용량을 유지 용량으로 투여하는 단계를 포함하는 유지 방식으로 투여하는 단계 및 선택적으로 유지 방식으로의 투여 동안 상승된 라이소-SPM 수준에 대해 추가 모니터링하는 단계가 추가로 포함된다. 특정 구현예에서, 초기 용량의 rhASM 또는 개질된 rhASM은 약 0.03 mg/kg 내지 약 1.0 mg/kg, 또는 약 0.1 mg/kg 내지 약 0.5 mg/kg 범위일 수 있다(용량의 농도는 체중 kg에 대한 효소 mg으로 측정됨). 일부 구현예에서, 증가된 효소 농도의 각각의 후속 용량이 이전 용량 후 약 1 일, 2 일, 3 일, 4 일, 5 일, 6 일, 또는 7 일, 또는 1 주, 2 주, 3 주, 4 주, 또는 5 주에 투여된다. 일부 구현예에서, 증가된 효소의 후속 용량은 약 0.1 mg/kg 내지 5 mg/kg 농도(예로, 약 0.1 mg/kg, 0.2 mg/kg, 0.3 mg/kg, 0.4 mg/kg, 0.5 mg/kg, 0.6 mg/kg, 0.7 mg/kg, 0.8 mg/kg, 0.9 mg/kg, 1 mg/kg, 1.5 mg/kg, 2 mg/kg, 2.5 mg/kg, 3 mg/kg, 3.5 mg/kg, 4 mg/kg, 4.5 mg/kg, 또는 5 mg/kg, 또는 이들 사이의 임의 농도)일 수 있다.

[0046] 일부 구현예에서, 주어진 농도의 대체 효소 용량은 다음 번 더 높은 농도의 용량이 투여되기 전에 적어도 2회(예로, 적어도 2회, 3회, 4회 또는 5회) 투여된다. 특정 구현예에서, 더 높은 후속 용량은 이전 용량보다 대략 0.03 mg/kg, 0.05 mg/kg, 0.1 mg/kg, 0.2 mg/kg, 0.3 mg/kg, 0.4 mg/kg, 0.5 mg/kg, 0.6 mg/kg, 0.7 mg/kg, 0.8 mg/kg, 0.9 mg/kg, 1 mg/kg, 1.2 mg/kg, 1.5 mg/kg, 1.75 mg/kg, 2 mg/kg, 3 mg/kg, 4 mg/kg 또는 5 mg/kg(또는 이들 사이의 임의 값) 더 높을 수 있다. 일부 구현예에서, 더 높은 후속 용량은 이전 용량보다 약 0.03 mg/kg 내지 약 0.1 mg/kg, 약 0.1 mg/kg 내지 약 0.5 mg/kg, 약 0.5 mg/kg 내지 약 1 mg/kg, 약 0.5 mg/kg 내지 약 2 mg/kg, 약 1 mg/kg 내지 약 2 mg/kg, 약 2 mg/kg 내지 약 4 mg/kg, 또는 약 2 mg/kg 내지 약 5 mg/kg(또는 이들 사이의 임의 값) 더 높을 수 있다. 특정 구현예에서, 독성 또는 유해한 대사물질을 생산하지 않고 대상체에 의해 관용되는 최고 용량은 약 1.0 mg/kg 내지 약 3.0 mg/kg일 수 있다. 일부 구현예에서, 최고 관용 용량이 유지 용량으로 인간 대상체에 이후에 투여된다. 일부 구현예에서, 유지 용량은 약 1 주 내지 8 주마다(예로, 약 1 주, 2 주, 3 주, 4 주, 5 주, 6 주, 7 주, 또는 8 주 마다, 또는 이들 사이의 임의 시간 간격마다) 투여된다.

[0047] 최대 관용 투여량(예로, 독성 또는 다르게 유해한 수준의 대사물질을 생산하지 않는 용량)이 확인되면, 앞으로 대상체를 치료해나갈 유지 용량으로 이용될 수 있다. 유지 용량은 매일, 매주, 2주 1회, 매달, 2개월 1회 또는 3개월 1회(또는 이들 사이의 임의의 시간 간격으로) 투여될 수 있다. 상승된 라이소-SPM 수준에 대한 모니터링은 유지 방식으로의 투여 동안, 예로 유지 용량의 투여 후 1 시간, 2 시간, 3 시간, 5 시간, 10 시간, 12 시간, 15 시간, 또는 20 시간, 또는 1 일, 2 일, 3 일, 4 일, 5 일, 또는 1 주, 2 주, 3 주, 또는 4 주 또는 이들 사이의 임의 시간 간격으로 수행될 수 있다. 상승된 라이소-SPM 수준(예로, 참조 수준보다 약 100 ng/ml 내지 700 ng/ml 더 높은 수준, 또는 참조 수준보다 적어도 약 1.1 배 내지 10 배 더 높은 수준)이 검출되는 경우, 유지 용량이 감소되거나 중단될 수 있다.

[0048] 특정한 다른 파라미터가 요법 동안(예로, ERT 동안) 대상체를 모니터링하기 위해 및/또는 대상체에 의해 관용될 수 있는 최대 용량을 결정하기 위한 요법의 일환으로 라이소-SPM과 조합되어 측정될 수 있다. 예를 들어, 대상체는 SPM 수준, 혈장 세라마이드 수준, 및/또는 빌리루빈 농도를 측정함으로써 추가로 모니터링될 수 있다. 대상체는 또한 "급성 상 반응물질" 및 염증 반응의 척도인 염증성 매개물질의 생산에 대해 및/또는 다른 생화학적 마커에 대해 모니터링될 수 있다. 이러한 다른 생화학적 마커에는 비제한적으로 CRP/hs-CRP, 사이토카인(예로, IL-8, IL-6), 칼시토닌 및 페리티닌이 포함될 수 있다. 일부 구현예에서, 상기 열거된 하나 이상의 파라미터는 더 높은 농도로 용량을 증가시키기 전에 요법에 대한 안정한 반응을 확인하기 위해 모니터링될 수 있다. 일부 구현예에서, 대상체는 또한 하나 이상의 관련 유해 사례에 대해 모니터링될 수 있고, 여기에는 항상적 증상(예로 열, 오심, 구토, 통증, 근육통 및 황달)이 포함될 수 있다. 마커의 조합도 모니터링될 수 있다(예로, 빌리루빈 및/또는 세라마이드 수준과 조합된 라이소-SPM 수준이 모니터링될 수 있음). 라이소-SPM과 조합되어 모니터링될 수 있는 마커에 대해 적합한 역치 수준은, 예를 들어 그 전문가 본원에 참조로 포함된 미국 출원 제 2011/0052559호에 개시된다(예를 들어 단락 [0067] 내지 [0086] 참고).

[0049] 일부 구현예에서, 용량 증량 프로토콜(예로, ERT 용량 증량 프로토콜)을 겪고 있는 대상체는 매회 치료 투여 후(예로 투여 후 약 1 분, 5 분, 10 분, 30 분, 또는 45 분, 또는 1 시간, 2 시간, 3 시간, 4 시간, 5 시간, 6 시간, 8 시간, 10 시간, 12 시간, 18 시간, 또는 24 시간, 또는 2 일, 3 일, 4 일, 5 일, 6 일, 또는 7 일, 또는 1 주, 2 주, 3 주, 또는 4 주 이상, 또는 이들 사이의 임의 시간 간격) 또는 더 높은 농도의 치료제 투여 전에, 독성 또는 유해한 부작용에 대해 모니터링된다(예로, 하나 이상의 독성 마커, 예컨대 라이소-SPM의 수준 모니터링에 의해). 일부 구현예에서, 대상체는 유지 용량의 각각의 투여 후(예로, 투여 후 약 1 시간, 2 시간, 3

시간, 4 시간, 5 시간, 6 시간, 8 시간, 10 시간, 12 시간, 18 시간, 또는 24 시간, 또는 2 일, 3 일, 4 일, 5 일, 6 일, 또는 7 일, 또는 1 주, 2 주, 3 주, 또는 4 주 이상, 또는 이들 사이의 임의의 시간 간격) 또는 치료제의 후속 유지 용량의 투여 전에 모니터링된다. 일부 구현예에서, 대상체는 1 년, 2 년, 3 년 이상 동안 유지 용량을 수여받으며, 독성 또는 유해한 부작용에 대해 주기적으로 모니터링된다. 모니터링은 상기 언급된 독성 마커의 모니터링뿐만 아니라 관련 유해 사례에 대한 모니터링을 포함할 수 있다. 대상체가 유해 사례를 경험하는 경우 또는 하나 이상의 모니터링된 마커가 유해한 부작용을 시사하는 경우(예로, 라이소-SPM의 상승된 수준이 검출되는 경우), 바람직하지 못한 부작용을 감소시키거나 최소화하기 위해 유지 용량의 투여가 중단되거나 조정될 수 있다(예로, 감소된 농도의 ERT가 투여될 수 있음).

[0050] 다양한 구현예에서, 대상체는 ERT 용량 투여 후(예로 rhASM 또는 개질된 rhASM의 투여 후) 수득된 생물학적 샘플로부터 라이소-SPM 수준을 측정하여 독성 및/또는 다르게 유해한 용량의 ERT에 대해 모니터링될 수 있다. 일부 구현예에서, 방법은 대상체로부터 생물학적 샘플을 수집하는 단계, 샘플 중의 라이소-SPM 수준을 측정하는 단계, 샘플 중의 라이소-SPM 수준을 참조 수준과 비교하는 단계 및 샘플 중의 라이소-SPM 수준이 참조 샘플에 비해 상승되거나 참조 샘플에 비해 특정량만큼 상승된 경우, 유해 부작용을 검출하는 단계를 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 더 높은 농도의 다음 ERT 용량은 생물학적 샘플 중의 라이소-SPM 수준이 이전 용량의 투여 후 정의된 역치를 초과하지 않는 경우에만 투여된다. 적합한 역치 수준의 예가 본원에 기재된다. 일부 구현예에서, 라이소-SPM 수준은 또한 유지 용량의 투여 동안 모니터링된다. 일부 구현예에서, 라이소-SPM 수준이 유지 용량의 투여 동안 정의된 역치를 초과하는 경우, 유지 투여가 중단되거나 정의된 역치를 초과하는 라이소-SPM 수준을 일으키지 않는 더 낮은 용량이 투여된다.

[0051] 일부 구현예에서, ERT의 유해 부작용은 생물학적 샘플 중의 라이소-SPM 수준이 소정 참조 수준보다 높은 경우, 검출될 수 있다. 일부 구현예에서, 유해 부작용은 생물학적 샘플(예로, 혈액 샘플) 중 라이소-SPM 수준이 참조 수준보다 약 100 ng/ml 내지 700 ng/ml 초과(예로, 약 100 ng/ml, 200 ng/ml, 250 ng/ml, 300 ng/ml, 400 ng/ml, 500 ng/ml, 600 ng/ml, 또는 700 ng/ml, 또는 이들 사이의 임의의 농도 초과)인 경우, 검출될 수 있다. 일부 구현예에서, 유해 부작용은 생물학적 샘플(예로, 혈액 샘플) 중 라이소-SPM 수준이 참조 수준보다 적어도 약 1.1 배, 1.5 배, 2 배, 2.5 배, 3 배, 3.5 배, 4 배, 4.5 배, 5 배, 5.5 배, 6 배, 6.5 배, 7 배, 7.5 배, 8 배, 8.5 배, 9 배, 9.5 배, 또는 10 배(또는 이들 사이의 임의의 값)만큼 더 높은 경우, 검출될 수 있다. 예를 들어, 증가는 적어도 약 3 배일 수 있다.

[0052] 일부 구현예에서, 본원에 제공된 ASM 장애의 치료 방법은 당분야에 공지된 기술, 예로 MRI에 의해 평가되는 비장 부피를 감소시킨다. 특정 구현예에서, 방법은 당분야에 공지된 기술, 예로 간 샘플의 생화학적 분석 및/또는 조직형태측정 분석에 의해 평가되는 간 스펅고미엘린 수준을 감소시킨다. 일부 구현예에서, 방법은 당분야에 공지된 기술, 예로 예측 최대 작업부하 백분율, 피크 산소 소비량 및/또는 이산화탄소 생성량을 포함하는 사이클 작업량측정에 의한 최대 작업부하에 의해 평가되는 운동능을 증가시킨다. 일부 구현예에서, 방법은 당분야에 공지된 기술, 예로 DLco, FVC, FEV₁, 및/또는 TLC에 의해 평가되는 폐 기능을 증가시키고/시키거나 폐 청소율을 개선한다. 특정 구현예에서, 방법은 기관지 폐포 세척액(BAL) 스펅고미엘린을 감소시킨다. 특정 구현예에서, 방법은 당분야에 공지된 기술, 예로 고해상 CT 스캔 및/또는 흉부 X-선에 의해 평가되는 폐 외관을 개선한다.

[0053] 다양한 구현예에서, 본원에 제공된 ASM 장애를 치료하기 위한 방법은 간, 피부, 및/또는 혈장에서 스펅고미엘린 농도를 감소시키고/시키거나 혈청 키토포트리오시다제, CCL18 수준, 라이소-SPM, 세라마이드 및/또는 빌리루빈을 감소시킨다. 일부 구현예에서, 방법은 대상체의 지질 프로필을 개선한다(예로, 콜레스테롤 감소). 일부 구현예에서, 방법은 대상체에서 하나 이상의 신경 기능을 개선한다(예로, 정신운동 기능, 사회 반응성 등). 일부 구현예에서, 방법은 ASM 장애의 중증도 및/또는 기간 및/또는 장애와 연관된 하나 이상의 증상을 감소시키거나 완화시킨다. 일부 구현예에서, 방법은 ASM 장애와 연관된 증상의 재발을 방지한다. 일부 구현예에서, 방법은 치료 후 대상체의 생존율을 증가시킨다.

[0054] **ASM 장애에 대한 스크리닝 및/또는 진단**

[0055] 다양한 구현예에서, ASM 장애를 스크리닝하고/하거나 진단하는 방법이 본원에 개시된다. 일부 구현예에서, ASM 장애는 니만-픽병(NPD)이다. 일부 구현예에서, 장애는 NPD A형, B형 및/또는 C형이다. 일부 구현예에서, ASM 장애(예로, NPD)는 대상체로부터 채취한 생물학적 샘플 중의 라이소-SPM 수준을 측정하여 스크리닝되고/되거나 진단될 수 있다.

[0056] 일부 구현예에서, 대상체에서 ASM 장애를 스크리닝하고/하거나 진단하는 방법은 대상체로부터 생물학적 샘플을 수집하는 단계, 샘플 중의 라이소-SPM 수준을 측정하는 단계; 샘플 중의 라이소-SPM 수준을 참조 수준과 비교하

는 단계; 그리고 샘플 중의 라이소-SPM 수준이 참조 수준에 비해 상승되는 경우, ASM 장애를 검출/진단하는 단계를 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 참조 수준은 ASM 장애를 갖지 않는 대조군 대상체로부터의 샘플에서 측정된 라이소-SPM 수준이다. 일부 구현예에서, ASM 장애는 대상체로부터의 생물학적 샘플 중의 라이소-SPM 수준이 소정 참조 수준보다 높은 경우, 검출/진단될 수 있다. 일부 구현예에서, ASM 장애는 생물학적 샘플(예로, 혈액 샘플) 중 라이소-SPM 수준이 참조 수준보다 적어도 약 200 ng/ml 내지 2000 ng/ml 초과, 예컨대 약 200 ng/ml 초과, 약 300 ng/ml 초과, 약 400 ng/ml 초과, 약 500 ng/ml 초과, 약 525 ng/ml 초과, 약 575 ng/ml 초과, 및/또는 약 700 ng/ml 초과(예로, 약 200 ng/ml, 250 ng/ml, 300 ng/ml, 350 ng/ml, 400 ng/ml, 450 ng/ml, 500 ng/ml, 525 ng/ml, 550 ng/ml, 575 ng/ml, 600 ng/ml, 625 ng/ml, 650 ng/ml, 700 ng/ml, 750 ng/ml, 800 ng/ml, 850 ng/ml, 900 ng/ml, 950 ng/ml, 1000 ng/ml, 1050 ng/ml, 1100 ng/ml, 1150 ng/ml, 1200 ng/ml, 1300 ng/ml, 1400 ng/ml, 1500 ng/ml, 1600 ng/ml, 1700 ng/ml, 1800 ng/ml, 1900 ng/ml, 또는 2000 ng/ml, 또는 이들 사이의 임의 농도 초과)인 경우, 검출/진단될 수 있다. 일부 구현예에서, ASM 장애는 생물학적 샘플(예로, 혈액 샘플) 중 라이소-SPM 수준이 참조 수준보다 약 1 배 내지 10 배 만큼 더 높은 경우, 검출/진단될 수 있다.

[0057] 다양한 조직으로부터의 생물학적 샘플은 본원에 기재된 스크리닝 및 진단 방법과 함께 이용될 수 있다. 예를 들어, 말초 조직, 예컨대 혈장, 전혈(예로, 건조 혈반), 혈청, 피부, 및/또는 소변으로부터의 생물학적 샘플은 상승된 라이소-SPM 수준을 모니터링하기 위해 이용될 수 있다. 다른 조직으로부터의 생물학적 샘플, 예로 비장, 폐, 간, 심장, 신장 및/또는 뇌 조직이 또한 이용될 수 있다. 둘 이상의 조직의 조합(예로, 2, 3, 4, 5 이상의 조직)으로부터의 샘플이 이용될 수 있다. 일부 구현예에서, ASM 장애(예로, NPD)는 말초 조직으로부터 채취된 생물학적 샘플 중의 라이소-SPM 수준을 측정하여 검출/진단될 수 있다. 특정 구현예에서, 말초 조직은 혈장, 전혈(예로, 건조 혈반), 혈청, 및/또는 소변일 수 있다. 말초 샘플의 이용은 침습적 절차, 예컨대 간 생검의 필요성을 배제할 수 있다.

[0058] 다양한 구현예에서, 본원에 개시된 스크리닝 및/또는 진단 방법은 ASM 장애가 검출/진단되는 경우, 대상체에 치료제(예로, 효소 대체 요법)를 투여하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 효소 대체 요법은 대상체에 rhASM 또는 개질된 rhASM를 투여하는 단계를 포함한다.

[0059] **키트**

[0060] 다양한 구현예에서, 라이소-SPM 및/또는 ASM 장애의 다른 마커를 함유하는 생물학적 샘플을 수집하기 위한 장치 및 생물학적 샘플에서 라이소-SPM 및/또는 다른 마커의 수준을 측정하기 위해 키트를 이용하는 지침을 포함하는 키트가 본원에 개시된다. 일부 구현예에서, 생물학적 샘플을 수집하기 위한 장치는 유체 샘플 및/또는 평가 스트립, 덤스틱 등을 저장하기 위한 시험관, 주사기 및/또는 다른 용기를 포함할 수 있다. 생물학적 샘플을 수집하기 위해 당분야에 공지된 임의의 다른 장치가 또한 이용될 수 있다. 일부 구현예에서, 생물학적 샘플은 말초 조직으로부터의 샘플, 예컨대 혈장, 전혈(예로, 건조 혈반), 혈청, 피부, 및/또는 소변이다. 다른 조직으로부터의 생물학적 샘플, 예로 비장, 폐, 심장, 간, 신장, 및/또는 뇌 조직도 수집될 수 있으며, 키트는 기재된 조직으로부터 샘플을 수집하기 위한 장치를 포함한다. 둘 이상의 조직의 조합으로부터의 샘플이 이용될 수 있다.

[0061] 일부 구현예에서, 키트는 생물학적 샘플 중의 라이소-SPM 및/또는 다른 마커 수준을 측정하기 위한 장치를 추가로 포함할 수 있다. 예를 들어, 키트에는 생물학적 샘플 중의 라이소-SPM 또는 다른 마커를 검출하기 위해 이용될 수 있는 항체 및/또는 다른 검출 체계가 포함될 수 있다. 일부 구현예에서, 검출 체계는 조직 수집 장치 중 또는 상에 포함되는 반면(예로, 평가 스트립 상에 함침된 항체 또는 지시약 화합물질), 다른 구현예에서 검출 장치는 수집 장치로부터 별도로 제공된다.

[0062] 일부 구현예에서, 키트는 샘플 중의 라이소-SPM 및/또는 다른 마커의 수준을 정량하거나 반정량하기 위한 장치를 추가로 포함할 수 있다. 예를 들어, 그 강도, 세기, 색상 등이 샘플 중의 라이소-SPM 및/또는 다른 마커의 수준을 정량적으로 또는 반정량적으로 결정하기 위해(예로, 하나 이상의 참조 샘플로부터의 신호와 비교하여) 이용될 수 있는 검출 가능한 신호를 방출하기 위하여 검출 체계와 반응하는 체계(예로, 비색 체계)가 제공될 수 있다. 일부 구현예에서, 장치는, 예로 액체 크로마토그래피 및/또는 질량 분광측정을 이용하여 샘플의 다른 성분으로부터 라이소-SPM을 분리하기 위한 장치를 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 샘플 중의 라이소-SPM 및/또는 다른 마커의 수준을 정량하기 위한 장치는 분광측정기, 예컨대 질량 분광측정기, 예로 LC/MS/MS, 또는 전자기적 주파수 분광측정기, 예로 UV-VIS, IR, 또는 NMR이다.

[0063] 일부 구현예에서, 키트는 샘플 중의 라이소-SPM 및/또는 다른 마커의 수준을 참조 수준과 비교하고, 샘플 중의 라이소-SPM 및/또는 다른 독성 마커의 수준이 하나 이상의 참조 샘플에 비해 상승되는 경우, ASM 장애에 대한

치료 동안 하나 이상의 대사물질의 독성 수준 및/또는 유해 부작용의 존재를 검출하기 위한 지침을 추가로 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 키트는 샘플 중의 라이소-SPM 수준을 참조 샘플에서의 수준과 비교하고, 샘플 중의 라이소-SPM 수준이 참조 샘플에서의 수준에 비해 상승되는 경우, ASM 장애를 스크리닝하고/하거나 진단하기 위한 지침을 추가로 포함할 수 있다.

[0064] 일부 구현예에서, 키트는 ASM 장애에 대한 요법의 일환으로 및/또는 이를 진단하기 위해 이용될 수 있다. 일부 구현예에서, ASM 장애는 NPD-A, NPD-B, 또는 NPD-C이다.

[0065] 대상체 모집단

[0066] 다양한 구현예에서, 본원에서 이용되는 대상체는 ASM 장애에 대해 스크리닝되고 있는 인간이다. 다양한 구현예에서, 본원에서 이용되는 대상체는 본원에 기재된 방법에 따라 ASM 장애로 진단받거나 치료받은 대상체이거나, 하나 이상의 병리 기관에서 라이소좀 SPM의 과다 축적을 일으키는 장애를 갖거나 갖는 것으로 진단받은 인간이다. 일부 구현예에서, 대상체는 산 스핑고미엘리나제를 인코딩하는 유전자에서의 하나 이상의 돌연변이, 예로 결실, 틀리동, 미스센스 돌연변이, 및/또는 논센스 돌연변이를 갖는다. 특정 구현예에서, 대상체는 NPD를 갖는다. 하나의 구현예에서, 대상체는 NPD-A, NPD-B, 또는 NPD-C를 갖는다.

[0067] 일부 구현예에서, 대상체는 *SMPD1* 유전자에 하나 이상의 돌연변이를 갖는다. 특정 구현예에서, 돌연변이는 Δ R608(아르기닌 608의 결실)이다. 일부 구현예에서, 돌연변이는 미스센스 돌연변이이다. 특정 구현예에서, 미스센스 돌연변이는 L302P, H421Y 또는 R496L이다. 다른 구현예에서, 돌연변이는 1, 2, 3 이상의 아미노산 잔기의 결실을 일으키는 결실이다. 특정 구현예에서, 본원에 제공된 방법에 따라 ASM 장애에 대해 치료받은 대상체는 본원에 그 전문이 참조로 포함되는 미국 출원 제2011/0052559호의 표 1에 나타난 하나 이상의 돌연변이를 갖는다. 산 스핑고미엘리나제 유전자(*SMPD1*로 명명됨)에서의 돌연변이에 대해서는 [Simonaro et al., *Am. J. Hum. Genet.* 71: 1413-1419(2002)]를 또한 참고하라.

[0068] 특정 구현예에서, 본원에 제공된 방법에 따라 ASM 장애에 대해 스크리닝되거나 진단되거나 치료받고 있는 대상체는 ASM을 내인적으로 발현할 수 있지만, 인간 ASM, 예로 ASM-1의 정상(예로, 돌연변이되지 않은) 활성의 약 2% 내지 5%, 5% 내지 10%, 5% 내지 15%, 5% 내지 20%, 5% 내지 30%, 20% 내지 30%, 또는 5% 내지 35%를 갖는다. 일부 구현예에서, 대상체는 정상 인간 ASM, 예로 ASM-1의 활성의 35%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 5%, 4%, 3%, 2% 또는 1% 미만으로 ASM을 내인적으로 발현한다. 예로, ASM 활성을 측정하기 위해 이용될 수 있는 기법에 대해서는 이들의 전문이 본원에 참조로 포함된 미국 특허 제4,039,388호, 제4,082,781호, 제5,686,240호 및 제7,563,591호 그리고 국제 공개 WO 2007/078806호 및 WO 2006/058385호를 참고하라; 또한 문헌[He et al., *Analytical Biochemistry* 314: 116-120(2003)]에 기재된 형광-기반 고성능 액체 크로마토그래피 분석을 참고하라.

[0069] 다양한 구현예에서, 본원에 제공된 방법에 따라 ASM 장애에 대해 스크리닝되거나 진단받거나 치료받고 있는 대상체는 NPD의 하나 이상의 증상을 나타낼 수 있다. NPD 증상에는 비제한적으로 복부 팽만, 간비대, 비장비대, 간비장비대, 호중구감소증, 폐 질환, 임파종병증, 조직화학적으로 특징적인 NPD 거품 세포의 존재, 빈혈(예로, 소적혈구 빈혈), 혈소판감소증, 재발성 구토, 만성 변비, 성장 부전(예로, 감소된 라이너 성장 및 체중), 사춘기 지연, 재발성 타박상, 재발성 출혈, 죽종형성 지질 프로파일(고 콜레스테롤, 트리글리세리드, 또는 LDL, 및/또는 저 HDL), 통증(두통, 요통, 수족통, 복통), 피로, 조기 포만감, 지구력 저하, 골감소증, 신경적 소견 및 호흡 곤란(예로, 간질 폐 질환 및/또는 숨참)이 포함될 수 있다. NPD의 신경적 소견에는 선흥색 반점, 근긴장 저하, 근육 쇠약, 정신운동 지연, 강직, 사회적 반응 부재, 과민성 및/또는 마비가 포함된다.

[0070] 특정 구현예에서, 본원에 제공된 방법에 따라 ASM 장애에 대해 스크리닝되거나 진단받거나 치료받고 있는 대상체는 인간 유아이다. 다른 구현예에서, 대상체는 인간 소아이다. 특정 구현예에서, 대상체는 인간 성인(18세 이상)이다. 특정 구현예에서, 대상체는 인간 여성이다. 다른 구현예에서, 대상체는 인간 남성이다. 특정 구현예에서, 대상체는 임신 중이 아니거나 수유 중이 아닌 인간 여성이다.

[0071] 실시예

[0072] 하기 실시예는 본 개시를 예시하기 위한 것이며, 어떻게든 제한하려는 것이 아니다.

[0073] 실시예 1: 재료 및 방법

[0074] 연구에서 이용된 전혈은 서면 동의 후 이전에 진단받은 NPD-B 대상체 20명 및 건강한 성인 20명(ProMedDx, LLC, Norton, MA에서 구입)으로부터 입수하였다. 정맥혈을 EDTA를 함유하는 Vacutainer® 튜브(Becton, Dickinson

and Company, Franklin Lakes, NJ) 내로 인취하고, 하룻밤 동안 저온 팩 상에 운송하고, 4℃에서 유지하였다. 수집 48 시간 내에 튜브를 몇 번 뒤집어서 혈액을 혼합하고, 스왑 당 혈액 75 μ l를 Whatman 903® 시료 수집지 상에 스왑팅하고, 적어도 4 시간 동안 실온에서 건조하였다.

[0075]

라이소-SPM을 정량하기 위해, 1-O-헥사데실-(7,7,8,8-d4)-2-O-아세틸-sn-글리세릴-3-포스포릴콜린(혈소판 활성화 인자 C16-d4, PAF C16-D4, Cayman Chemical Company, Ann Arbor, Michigan)을 내부 표준으로 이용하였다. 건조 혈반(DBS) 3.2 mm 펀치를 0.8 ng 내부 표준을 함유하는 200 μ l 메탄올/아세트니트릴/물(80/15/5) 중에 추출하고, 30 분 동안 볼텍싱하고, 10분 동안 초음파 분쇄하였다. 용출액을 16,200 g에서 5 분 동안 원심분리로 제거한 뒤 30 μ l를 Agilent 1100 고압 액체 크로마토그래피(HPLC) 시스템(Agilent, Palo Alto, CA)과 계면화된 API Qtrap 4000 LC/MS/MS(AB Sciex, Toronto, Canada) 시스템 내로 주입하였다. 이동상으로 메탄올/아세트니트릴/물의 혼합물을 이용해서 동용매 방식으로 일반상 실리카 칼럼으로 HPLC를 수행하였다. 하기 전이를 이용해서, 질량 분광측정(MS)을 다중 반응 모니터링(MRM) 방식으로 수행하였다: 라이소-SPM에 대해 m/z 465.4>184.1 및 PAF C16-D4에 대해 528.5>184.1. SPM을 정량하기 위해, C12-SPM(Avanti Polar Lipids, Alabaster, Alabama)을 내부 표준으로 이용하였다. 주입 전에 용출액을 320배 희석하고 SPM의 12개 이소형을 모니터링하고 요약한 것을 제외하고, 추출 및 LC/MS/MS 절차는 라이소-SPM에 대해 이용된 것과 유사하였다.

[0076]

실시예 2: NPD의 진단

[0077]

SPM 수준은 NPD-B 대상체의 간 및 비장에서 10배 보다 더 상승된 것으로 알려졌지만, NPD-B 대상체의 혈장 중 SPM 수준은 크게 상승되지 않았고 정상 대조군의 것과 중첩되었다. 도 1a에 나타난 바와 같이, 정상 대조군 샘플로부터의 DBS 중 평균 농도값에 대한 NPD-A 및 NPD-B 환자로부터의 건조 혈반(DBS) 중 SPM 농도의 비로 나타낸 바와 같이 NPD-A 및 NPD-B 환자에서의 SPM 수준은 크게 상승되지 않았다. SPM은 세포막 및 지단백질의 구성 분이며, NPD 대상체로부터의 DBS 중 SPM의 약간의 상승은 이미 그 높은 수준 및 순환 중 신속한 턴오버에 관련 될 수 있다.

[0078]

SPM와는 달리, 라이소-SPM 수준은 NPD-A 및 NPD-B 대상체로부터의 DBS 중 명확히 상승되었다. 도 1b에 나타난 바와 같이, 정상 대조군 샘플로부터의 DBS 중 평균 농도값에 대한 NPD-A 및 NPD-B 환자로부터의 건조 혈반(DBS) 중 라이소-SPM 농도의 비로 나타낸 바와 같이 NPD-A 및 NPD-B 환자 중 라이소-SPM 수준은 상승되었다. 라이소-SPM 수준은 수집 시 DBS 중 잔여 ASM 활성화량 또는 대상체 연령에 관련되지 않았다. 결론적으로, 라이소-SPM은 정상 대조군과 구별될 수 있는 수준으로 NPD 대상체로부터의 말초 조직(DBS)에서 증가된다.

[0079]

실시예 3: 마우스에서의 용량 증량 효과

[0080]

ASM 녹아웃 마우스(니만-픽 모델 마우스)에서의 이전 연구는 10 mg/kg 이상의 단회 용량을 이용할 때까지 임상 적 독성 증상이 관찰되지 않았음을 나타내었다[Nickerson et al., "Dose Responsive Toxicological Findings Following Intravenous Administration of Recombinant Human Acid Sphingomyelinase(rhASM) to Acid Sphingomyelinase Knock-out(ASMKO) Mice," *American Society of Human Genetics* 2005; 및 Murray et al., "Elevations of Pro-Inflammatory Cytokines and Decreases in Cardiovascular Hemodynamics Following Intravenous Administration of Recombinant Human Acid Sphingomyelinase(rhASM) to Acid Sphingomyelinase Knock-out(ASMKO) Mice," *Society of Toxicology* 2006].

[0081]

현재 연구에서, ASM 녹아웃 마우스에 0 mg/kg, 3 mg/kg(무독성 용량, 임상적으로 뚜렷한 유해 사례가 관찰되지 않음), 또는 20 mg/kg(독성 용량)의 상이한 3 농도 중 하나인 rhASM의 단회 정맥내 용량을 투여하였다. 3 마리 용성 및 3 마리 자성 마우스를 각각의 투여군에 배정하였고(총 18 마리 동물), 혈액 샘플을 표 1에 나타난 시점에 수집하였다.

표 1

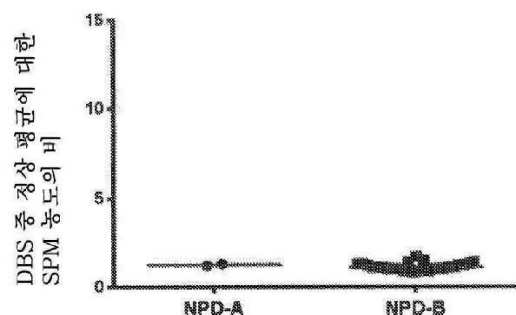
[0082]

군	치료	용량(mg/kg)	샘플 유형	샘플 수집 시점
1	rhASM	0	DBS	투여 후 5 분 및 6 시간, 24 시간, 48 시간 및 72 시간
2		3		투여 후 5 분 및 6 시간, 24 시간, 48 시간 및 72 시간
3		20		투여 후 5 분 및 1 시간, 4 시간, 6 시간 및 9 시간

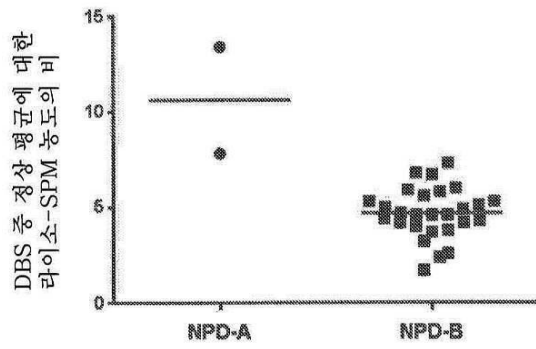
- [0083] DBS 샘플로부터의 라이소-SPM 수준을 정량하였고, 수준은 rhASM 용량 농도 증가와 함께 증가하며 3 mg/kg 및 20 mg/kg 치료군에 있어서 투여 후 6 시간 경에 피크를 이루는 것으로 나타났다. 투여 후 5 분에서의 농도 대비, 샘플링된 투여 후 시점에서의 3 용량에 대해 DBS 중 라이소-SPM 농도의 배율 상승을 나타내는 히스토그램인 **도 2**를 참고하라. 놀랍게도, rhASM의 독성 용량(20 mg/kg)에 반응한 라이소-SPM의 혈장 농도 중 배율 증가는 rhASM의 무독성 용량(3 mg/kg)에 반응한 라이소-SPM의 혈장 농도에서의 배율 증가보다 현저히 더 높았다. 이 결과는 라이소-SPM이 ASM 장애를 갖는 환자에서 축적된 SPM 수준을 감소시키는 치료제의 독성 효과를 평가하기 위한 마커로서 유용함을 제시한다. **실시예 4: 단회 용량 및 감량 방식의 비교**
- [0084] 건조 혈반을 rhASM의 단회 용량 또는 감량 투여 방식의 투여 후 야생형(C57BL/6) 또는 ASM 녹아웃(ASMKO) 마우스로부터 수득하였다. 5 마리 ASMKO 마우스에 단회 용량의 10 mg/kg rhASM을 제공하였다. 5 마리 C57BL/6 및 5 마리 ASMKO 마우스를 3 mg/kg rhASM의 감량 방식을 이용하여 처리한 뒤 20 mg/kg 용량을 제공하였다. 혈액 샘플을 투여 후 5 분, 4 시간, 6 시간, 24 시간 및 72 시간에 채취하였다. 10 mg/kg 투여군의 동물은 24 시간 시점 후 안락사시켜야 했다.
- [0085] 모든 70 개 혈반 샘플을 지질 멀티플렉스 추출 절차를 이용해서 제조하고 LC/MS/MS로 분석하였다. 간략하게, 하나의 DBS 스왑을 각각의 샘플 카드로부터 펀칭하고, 개별 에펜도르프 튜브 내에 넣었다. 이어서 80:15:5 용액 (MeOH:ACN:H₂O) 200 μ l를 각 튜브에 첨가한 뒤 30 분 동안 볼텍싱하고, 10 분 동안 초음파 분쇄하고, 원심분리하여 임의의 입상물질을 회전 침강시켰다. 라이소-SPM 교정 곡선(내부 표준 없이 제조)을 이용하여 각 샘플 중의 라이소-SPM의 농도를 결정하였다.
- [0086] **도 3**의 데이터는 라이소-SPM 수준이 감량 방식을 거친 ASMKO 군과는 대조적으로 10 mg/kg의 단회(고) 용량의 rhASM을 이용하여 처리된 ASMKO 군에서만 증가하였음을 나타낸다. 이처럼 고용량에서는, 마우스의 적어도 50%가 24 시간 내지 72 시간에 사망할 것으로 예상되는 반면, 감량 방식 하에서는 모든 마우스가 생존해야 한다. 이들 결과는 라이소-SPM이 고용량 치료제의 독성 효과를 평가하기 위한 마커로서 유용할 수 있음을 제시한다.
- [0087] **실시예 5: 인간 평가**
- [0088] 혈액 샘플을 rhASM으로 치료받고 있는 니만-픽 환자로부터 수집하였다. 대표적 실시예를 **도 4**에 나타낸다. 샘플을 26 주 기간(1 일, 2 주, 4 주, 6 주, 8 주, 10 주, 12 주, 14 주 및 26 주)에 걸쳐 투여 전, 그리고 rhASM의 나타난 용량(0.1 mg/kg, 0.3 mg/kg, 0.6 mg/kg, 1 mg/kg, 2 mg/kg, 또는 3 mg/kg)의 투여 후 24 시간, 48 시간 및 72 시간에 수집하였다. 26 주째에는 샘플을 투여 전 및 투여 후 24 시간 및 48 시간에만 채취하였다. 라이소-SPM 수준을 ng/ml로 측정하였다. 데이터는 투여 전 및 각각의 개별 용량 후 72 시간의 투여 후 시점 간에 라이소-SPM 수준 변동과 함께 더 높은 농도의 반복 투여 후 라이소-SPM 수준에서 일반적인 하향 경향을 나타낸다. 최초 투여 후 샘플은 투여 후 라이소-SPM 농도의 스파이크가 관찰되지 않을 수 있는 24 시간 후 채취하였다. 투여된 투여량은 투여 후 라이소-SPM 수준에서 유의미한 스파이크를 관찰하기 위해 필요한 농도 미만이었을 수도 있다.
- [0089] 선행 실시예는 본 개시를 예시하기 위한 것이며, 어떤 방식으로든 제한하려는 것이 아니다. 개시된 장치 및 방법의 다른 구현에는 명세서 및 본원에 개시된 장치 및 방법의 실시를 고려하여 당업자에게 자명할 것이다.

도면

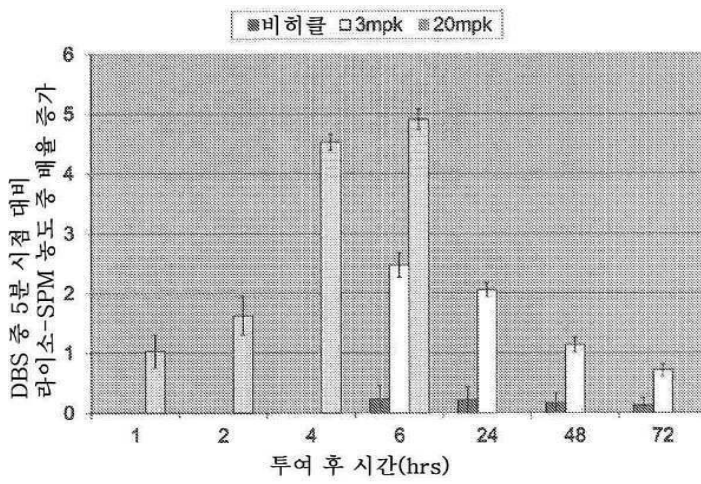
도면1a



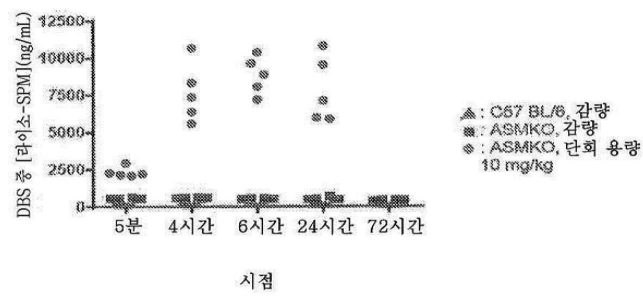
도면1b



도면2



도면3



도면4

