



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 103764824 B

(45)授权公告日 2018.04.24

(21)申请号 201280037341.5

(22)申请日 2012.06.20

(65)同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 103764824 A

(43)申请公布日 2014.04.30

(30)优先权数据  
61/498,946 2011.06.20 US  
61/569,452 2011.12.12 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日  
2014.01.27

(86)PCT国际申请的申请数据  
PCT/US2012/043369 2012.06.20

(87)PCT国际申请的公布数据  
W02012/177778 EN 2012.12.27

(73)专利权人 西奈山医学院  
地址 美国纽约州

(72)发明人 爱德华·H·舒克曼  
凯洛格拉·M·西蒙娜罗  
加里·E·斯特赖克  
海伦·维拉萨拉

(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.  
G12N 13/00(2006.01)

(56)对比文件  
US 20080292618 A1,2008.11.27,说明书第  
23、35-36、127、129、146、169段。  
US 20110091442 A1,2011.04.21,说明书第  
5-2-、49、52、58、62-64、120、123、126、129段。  
US 20100160253 A1,2010.06.24,说明书第  
34、48段。  
Calogera M. Simonaro et  
al.Involvement of the Toll-like receptor  
4 pathway and use of TNF-alpha  
antagonists for treatment of the  
mucopolysaccharidoses.《PNAS》.2010,第107卷  
(第1期),摘要、第225页左栏第1段至第226页左  
栏第1段。(续)

审查员 李娟娟

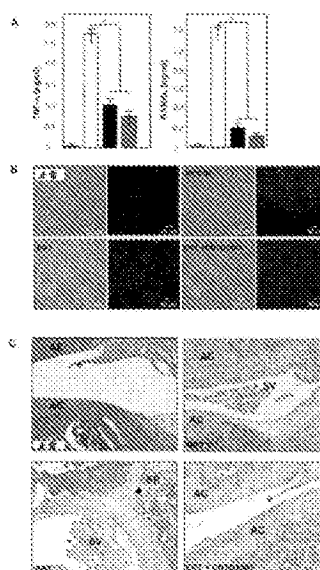
权利要求书3页 说明书26页 附图12页

(54)发明名称

粘多糖贮积症和其它溶酶体病症的抗TNF- $\alpha$ 疗法

(57)摘要

本发明涉及通过施用用于酶替代疗法的试剂和用于抗TNF- $\alpha$ 疗法的试剂;通过施用戊聚糖聚硫酸酯疗法;或通过施用底物减少疗法和抗TNF- $\alpha$ 疗法治疗患有溶酶体病症的受试者的方法。本发明进一步涉及通过施用用于抗TNF- $\alpha$ 疗法的试剂,减少通过酶替代疗法治患有溶酶体病症的受试者的炎性细胞因子的方法。



CN 103764824 B

[接上页]

**(56)对比文件**

Julie Bielicki et al. Advantages of using same species enzyme for replacement therapy in a feline model of mucopolysaccharidosis type VI.《THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY》.1999,第

274卷(第51期),摘要、36335页右栏第4段、36336页左栏第1段、36340页右栏第1段、36342页左栏第2段.

bazian. Ultra orphan drugs for lysosomal storage disorders.《Ultra orphan drugs for lysosomal storage disorders Online Report》.2009,第3页.

1. 用于酶替代疗法的试剂和戊聚糖聚硫酸酯 (PPS) 在制备用于治疗患有溶酶体贮积症的受试者的药物中的用途, 其中所述治疗包括:

选择患有溶酶体贮积症的受试者并且

在治疗所选受试者的溶酶体贮积症有效的条件下, 向所选受试者施用所述药物。

2. 根据权利要求1所述的用途, 其中用于酶替代疗法的所述试剂选自阿糖脑苷酶、伊米苷酶、葡糖脑苷脂酶 $\alpha$ 、拉罗尼酶、半乳糖苷酶 $\beta$ 、加硫酶、重组阿葡糖苷酶 $\alpha$ 、N-乙酰半乳糖胺-6硫酸酯酶和艾度硫酸酯酶。

3. 根据权利要求1所述的用途, 其中所述治疗进一步包括:

施用附加疗法。

4. 根据权利要求3所述的用途, 其中所述附加疗法选自骨髓移植、伴侣疗法和基因疗法。

5. 根据权利要求1所述的用途, 其中所述溶酶体贮积症选自神经鞘脂贮积症、粘多糖贮积病(粘多糖贮积症)、糖蛋白贮积症、粘脂贮积症、II型糖原贮积症和蜡样脂褐质沉积症。

6. 根据权利要求1所述的用途, 其中所述溶酶体贮积症为神经鞘脂贮积症, 所述神经鞘脂贮积症为尼曼-匹克病。

7. 根据权利要求1所述的用途, 其中所述溶酶体贮积症为粘多糖贮积症, 所述粘多糖贮积症为MPS I (赫尔勒/施艾氏综合征)、MPS II (亨特氏综合征)、MPS VI (马-拉综合征)、MPS III (沙费利波综合征)、MPS IV (莫基奥综合征)或MPS VII (Sly病)。

8. 根据权利要求1所述的用途, 其中所述施用经口服、通过吸入、通过鼻内滴注、局部、经皮、肠胃外、皮下、静脉内注射、动脉内注射、肌肉注射、胸膜内、腹膜内或通过敷用到黏膜上进行。

9. 根据权利要求1所述的用途, 其中所述治疗进一步包括:

重复所述施用。

10. 根据权利要求1所述的用途, 其中所述受试者为婴幼儿或青少年。

11. 根据权利要求1所述的用途, 其中所述受试者为成人。

12. 根据权利要求1所述的用途, 其中所述受试者具有与溶酶体贮积症相关的骨骼病理。

13. 戊聚糖聚硫酸酯 (PPS) 在制备用于减少通过酶替代疗法治疗的患有溶酶体贮积症的受试者的炎性细胞因子的药物中的用途, 其中所述减少炎性细胞因子包括:

在减少所述受试者的所述炎性细胞因子有效的条件下, 向所选受试者施用所述药物。

14. 根据权利要求13所述的用途, 其中所述减少炎性细胞因子进一步包括:

选择具有与溶酶体贮积症相关的骨骼病理的受试者接受所述施用。

15. 根据权利要求13所述的用途, 其中用于酶替代疗法的所述试剂选自阿糖脑苷酶、伊米苷酶、葡糖脑苷脂酶 $\alpha$ 、拉罗尼酶、半乳糖苷酶 $\beta$ 、加硫酶、重组阿葡糖苷酶 $\alpha$ 、N-乙酰半乳糖胺-6硫酸酯酶和艾度硫酸酯酶。

16. 根据权利要求13所述的用途, 其中所述减少炎性细胞因子进一步包括:

施用附加疗法。

17. 根据权利要求16所述的用途, 其中所述附加疗法选自骨髓移植、伴侣疗法和基因疗法。

18. 根据权利要求13所述的用途,其中所述溶酶体贮积症选自神经鞘脂贮积症、粘多糖贮积病(粘多糖贮积症)、糖蛋白贮积症、粘脂贮积症、II型糖原贮积症和蜡样脂褐质沉积症。

19. 根据权利要求13所述的用途,其中所述溶酶体贮积症为神经鞘脂贮积症,所述神经鞘脂贮积症为尼曼-匹克病。

20. 根据权利要求13所述的用途,其中所述溶酶体贮积症为粘多糖贮积症,所述粘多糖贮积症为MPS I (赫尔勒/施艾氏综合征)、MPS II (亨特氏综合征)、MPS VI (马-拉综合征)、MPS III (沙费利波综合征)、MPS IV (莫基奥综合征)或MPS VII (S1y综合征)。

21. 根据权利要求13所述的用途,其中所述施用经口服、通过吸入、通过鼻内滴注、局部、经皮、肠胃外、皮下、静脉内注射、动脉内注射、肌内注射、胸膜内、腹膜内或通过敷用到黏膜上进行。

22. 根据权利要求13所述的用途,其中所述减少炎性细胞因子进一步包括:  
重复所述施用。

23. 根据权利要求13所述的用途,其中所述受试者为婴幼儿或青少年。

24. 根据权利要求13所述的用途,其中所述受试者为成人。

25. 戊聚糖聚硫酸酯(PPS)在制备用于治疗患有溶酶体贮积症的受试者的药物中的用途,其中所述治疗包括:

选择患有溶酶体贮积症的受试者并且

在治疗所选受试者的溶酶体贮积症有效的条件下,向所选受试者施用所述药物。

26. 根据权利要求25所述的用途,其中所述治疗进一步包括:  
施用附加疗法。

27. 根据权利要求26所述的用途,其中所述附加疗法选自骨髓移植、伴侣疗法和基因疗法。

28. 根据权利要求25所述的用途,所述溶酶体贮积症选自神经鞘脂贮积症、粘多糖贮积病(粘多糖贮积症)、糖蛋白贮积症、粘脂贮积症、II型糖原贮积症和蜡样脂褐质沉积症。

29. 根据权利要求25所述的用途,其中所述溶酶体贮积症为神经鞘脂贮积症,所述神经鞘脂贮积症为尼曼-匹克病。

30. 根据权利要求25所述的用途,其中所述溶酶体贮积症为粘多糖贮积症,所述粘多糖贮积症为MPS I (赫尔勒/施艾氏综合征)、MPS II (亨特氏综合征)、MPS VI (马-拉综合征)、MPS III (沙费利波综合征)、MPS IV (莫基奥综合征)或MPS VII (S1y病)。

31. 根据权利要求25所述的用途,其中所述施用经口服、通过吸入、通过鼻内滴注、局部、经皮、肠胃外、皮下、静脉内注射、动脉内注射、肌内注射、胸膜内、腹膜内或通过敷用到黏膜上进行。

32. 根据权利要求25所述的用途,其中所述治疗进一步包括:  
重复所述施用。

33. 根据权利要求25所述的用途,其中所述受试者为婴幼儿或青少年。

34. 根据权利要求25所述的用途,其中所述受试者为成人。

35. 根据权利要求25所述的用途,其中所述受试者具有与溶酶体贮积症相关的骨骼病理。

36. 根据权利要求1所述的用途,其中所述溶酶体贮积症选自唾液酸贮积病和甲基丙二酸尿症。

37. 根据权利要求13所述的用途,其中所述溶酶体贮积症选自唾液酸贮积病和甲基丙二酸尿症。

38. 根据权利要求25所述的用途,其中所述溶酶体贮积症选自唾液酸贮积病和甲基丙二酸尿症。

## 粘多糖贮积症和其它溶酶体病症的抗TNF- $\alpha$ 疗法

[0001] 本申请要求2011年6月20日提交的美国临时专利申请序列号61/498,946和2011年12月12日提交的美国临时专利申请序列号61/569,452的权益,二者均据此通过引用整体并入。

[0002] 本发明是在美国国立卫生研究院授予的授权编号1R01DK087185下受政府支持而进行。政府具有本发明的某些权利。

### 技术领域

[0003] 本发明涉及粘多糖贮积症和其它溶酶体病症的抗TNF- $\alpha$ 疗法。

[0004] 发明背景

[0005] 溶酶体贮积症表示一类40种以上的不同遗传性疾病并且由溶酶体中存在的酶异常引起。患有溶酶体贮积症的个体根据所涉特定病症和特殊基因型呈现出许多临床症状。溶酶体贮积症相关的临床症状可对患病个体及其家人有破坏性的影响。例如,网状内皮组织疾病、中枢神经系统功能障碍、行为问题和严重智力迟钝是许多溶酶体贮积症的特征。在称为粘多糖贮积症(MPS)的特定溶酶体贮积症类别中,其它临床症状可包括骨骼异常、脏器肿大、角膜混浊和变形特征。

[0006] 粘多糖贮积症(MPS)是一类导致葡糖胺聚糖(GAG)分解代谢有缺陷的11种不同的酶缺乏。Neufeld等,“The Mucopolysaccharidoses,”在METABOLIC AND MOLECULAR BASIS OF INHERITED DISEASE 3421-3452中(Scriber等编辑,McGraw-Hill)(2001)。由于这些遗传性酶缺陷,葡糖胺聚糖(GAG)在MPS患者的溶酶体和其它细胞内隔室以及细胞外结缔组织基质中逐渐累积。不出所料,在结缔组织器官,包括软骨、皮肤和骨中这些酶缺乏的主要临床后果最明显。主要临床特征包括面容和颅发育粗糙且异常、肢体短小、退行性关节炎、气管和心脏瓣膜缺陷,和在一些情况下的神经系统牵连。患者通常天生没有可见的MPS临床特征,但是可发展进行性的临床牵连。在严重的情况下,患病儿童可能需要固定的医疗管理,但是仍然常常在青春期之前死亡。

[0007] 另一种类型的溶酶体贮积症,尼曼-匹克病(Niemann-Pick disease),也称为鞘磷脂沉积病,包括一类特征在于网状内皮系统的泡沫细胞浸润的病症。尼曼-匹克病中的泡沫细胞变得充满神经鞘磷脂并且,在较小程度上,充满其它膜脂质包括胆固醇。在A和B型疾病中尼曼-匹克病是由酶酸性神经鞘磷脂酶的失活引起,B型中残留酶活性更多(见Kolodny等,“Storage Diseases of the Reticuloendothelial System,”在NATHAN AND OSKI'S HEMATOLOGY OF INFANCY AND CHILDHOOD 第5版,第2卷中,1461-1507(David G. Nathan和Stuart H.Orkin编辑,W.B.Saunders Co.)(1998))。尼曼-匹克病中主要器官系统的病理生理学可简要总结如下。脾是A和B型患者受最广泛牵连的器官。肺部在不同程度上受牵连,并且B型患者的肺病理是由于慢性支气管肺炎致命性的主要原因。肝牵连可变,但是严重患病患者可能患有危及生命的肝硬化、门静脉高血压和腹水。对淋巴结的牵连根据疾病的严重程度可变。中枢神经系统牵连区分了尼曼-匹克病的主要类型。虽然大部分B型患者未经历中枢神经系统牵连,但这是A型患者的特征。在尼曼-匹克病中肾脏受中度牵连。

[0008] 已经评估了几种方法对这些溶酶体贮积症的治疗,包括骨髓移植和酶替代疗法。已经证实骨髓移植在不同程度上有效,但是,当单独施用,对骨和关节的作用有限。Clarke,LA,“The Mucopolysaccharidoses:A Success of Molecular Medicine,”*Expert Rev.Mol.Med.*10:e1 (2008)。其也受到免疫抑制和骨髓性药剂的有害副作用及移植物抗宿主病的发生妨碍。尽管这些复杂因素常常仍然显著,但是使用脐带血已经部分减轻了这些复杂因素。酶替代疗法牵涉静脉内输注重组酶,通常每周一次或两周一次。Clarke,LA,“The Mucopolysaccharidoses:A Success of Molecular Medicine,”*ExpertRev.Mol.Med.*10:e1 (2008)。在很大程度上,酶替代疗法的有效性依赖于易于递送至网状内皮组织器官(例如,肝脏、脾),但是较少递送至其它器官的输注酶的生物学分布。对于MPS病症而言,酶替代疗法可用于3种类型:MPS I(赫尔勒/施艾氏综合征(Hurler/Schie Syndrome))(Wraith等,“Mucopolysaccharidosis Type II(Hunter Syndrome):A Clinical Review and Recommendations For Treatment in the Era of Enzyme Replacement Therapy,”*Eur.J.Pediatr.*167:267-77 (2008);Cox-Brinkman等,“Ultrastructural Analysis of Dermal Fibroblasts in Mucopolysaccharidosis Type I:Effects of Enzyme Replacement Therapy and Hematopoietic Cell Transplantation,”*Ultrastruct.Pathol.*34:126-32 (2010);Coppa等,“Effect of 6 Years of Enzyme Replacement Therapy on Plasma and Urine Glycosaminoglycans in Attenuated MPS I Patients,”*Glycobiology*20:1259-73 (2010));MPS II(亨特氏综合征(Hunter Syndrome))(Glamuzina等,“Treatment of Mucopolysaccharidosis Type II(Hunter Syndrome)With Idursulfase:The Relevance of Clinical Trial End Points,”*J.Inherit.Metab.Dis.*(2011));和MPS VI(马-拉综合征(Maroteaux-Lamy Syndrome))(Decker等,“Enzyme Replacement Therapy for Mucopolysaccharidosis VI:Growth and Pubertal Development in Patients Treated With Recombinant Human N-Acetylgalactosamine 4-Sulfatase,”*J.Pediatr.Rehabil.Med.*3:89-100 (2010);Valayannopoulos等,“Mucopolysaccharidosis VI Orphanet,”*J.Rare Dis.*12:5 (2010);McGill等,“Enzyme Replacement Therapy for Mucopolysaccharidosis VI From 8 Weeks of Age-A Sibling Control Study,”*Clin.Genet.*77:492-498 (2010))。已经在酶替代疗法后注意到生活质量显著改善,包括活动性、呼吸和关节灵活性改善。然而,很少或没有证据证明酶替代疗法直接影响MPS患者的软骨和骨病,因此认为这些积极临床效应主要源自软组织变化(例如,腱)。还对MPS病症评估了其它实验疗法,包括基因疗法(Cotugno等,“Different Serum Enzyme Levels are Required to Rescue the Various Systemic Features of the Mucopolysaccharidoses,”*Hum.Gene Ther.*21:555-69 (2010);Herati等,“Radiographic Evaluation of Bones and Joints in Mucopolysaccharidosis I and VII Dogs After Neonatal Gene Therapy,”*Mol.Genet.Metab.*95:142-51 (2008))和使用与细胞特异性靶向序列融合的重组酶(Lu等,“Expression in CHO Cells and Pharmacokinetics and Brain Uptake in the Rhesus Monkey of an IgG-Iduronate-2-Sulfatase Fusion Protein,”*Biotechnol.Bioeng.*(2011);Osborn等,“Minicircle DNA-Based Gene Therapy Coupled With Immune Modulation Permits Long-term Expression of  $\alpha$ -L-Iduronidase in Mice With Mucopolysaccharidosis Type I,”

Mol. Ther. 19:450-60 (2011))。

[0009] 戊聚糖聚硫酸酯 (PPS) 是FDA批准口服药,其在几种疾病,包括溶酶体贮积症和更具体地MPS病症(本申请)以及关节炎、糖尿病、椎间盘退变和年龄相关的神经退行性疾病的动物模型中具有有效的抗炎和临床效应。当前批准PPS用于间质性膀胱炎患者,并且已经通过临床试验证明了其安全性。PPS抑制白细胞募集并且干扰趋化因子、细胞因子和生长因子的一些功能,从而减少炎症和活性氧簇 (ROS)。

[0010] 据信肿瘤坏死因子 $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 在各种病症中起重要作用,所述病症包括(例如)炎症(例如类风湿性关节炎)、克罗恩氏病 (Crohn's disease)、溃疡性结肠炎和多发性硬化。已经非常详细地研究了TNF- $\alpha$ 和受体CD120a、CD120b。呈其生物活性形式的TNF- $\alpha$ 为三聚体并且相邻亚基形成的沟对于细胞因子-受体相互作用很重要。已经研发了几种拮抗细胞因子作用的策略并且当前用于治疗各种疾病状态。

[0011] 对TNF- $\alpha$ 具有足够特异性和选择性的TNF- $\alpha$ 抑制剂可能是预防或治疗病症的有效预防或治疗性药物化合物,其中已经暗示TNF- $\alpha$ 为病原体。已经描述了借助于TNF- $\alpha$ 抗体治疗中毒性休克 (Rathjen等的欧洲专利No. 0486526)、肿瘤消退、抑制细胞毒性 (Rathjen等的美国专利No. 6,448,380, Rathjen等的美国专利No. 6,451,983, Rathjen等的美国专利No. 6,498,237)、自身免疫性疾病例如RA和克罗恩氏病 (Feldmann等的欧洲专利No. 0663836, Aggarwal等的美国专利No. 5,672,347, Le等的美国专利No. 5,656,272)、移植物抗宿主反应 (Aggarwal等的美国专利No. 5,672,347)、细菌性脑膜炎 (Hector等的欧洲专利No. 0585705) 的方法。先前的工作还已揭示了在MPS动物模型中炎症对软骨和骨病的重要影响,并且表明对敲除小鼠中Toll样受体4 (TLR4) 信号的基因抑制或TNF抑制剂与NagIzyme联合使用明显改善了软骨和骨病。然而目前没有可用药物对治疗溶酶体贮积症,特别是粘多糖贮积症和尼曼-匹克病完全有效。虽然在动物模型中有效,但是TNF抑制剂是可能导致显著副作用的静脉内用药,并且可能难以实现对MPS患者的长期使用。

[0012] 本发明目的是克服本领域的这些和其它不足。

[0013] 发明概述

[0014] 本发明的第一方面涉及治疗患有溶酶体贮积症的受试者的方法。这种方法包括选择患有溶酶体贮积症的受试者并且在治疗所选受试者的溶酶体贮积症有效的条件下,向所选受试者施用用于酶替代疗法的试剂和用于抗TNF- $\alpha$ 治疗的试剂。

[0015] 本发明的第二方面涉及减少通过酶替代疗法治患有溶酶体贮积症的受试者的炎性细胞因子的方法。这种方法包括在减少所述受试者的炎性细胞因子有效的条件下,向受试者施用用于抗TNF- $\alpha$ 治疗的试剂。

[0016] 本发明的第三方面涉及治疗患有溶酶体贮积症的受试者的方法。这种方法包括选择患有溶酶体贮积症的受试者并且在治疗所选受试者的溶酶体贮积症有效的条件下,向所选受试者施用戊聚糖聚硫酸酯 (PPS)。

[0017] 本发明的第四方面涉及治疗有与溶酶体贮积症相关的骨骼病理的受试者的方法。所述方法包括选择有与溶酶体贮积症相关的骨骼病理的受试者并且在治疗受试者的溶酶体贮积症有效的条件下,向所选受试者施用用于底物减少疗法的试剂和用于抗TNF- $\alpha$ 治疗的试剂。

[0018] 虽然酶替代疗法 (ERT) 可用于几种溶酶体贮积症,但是这种治疗对骨骼系统的益

处非常有限。先前的工作已经表明了Toll样受体4/TNF- $\alpha$ 炎性途径在粘多糖贮积症(MPS)骨骼病理中的重要性,并且因此,本发明检查了在VI型MPS的大鼠模型中联合抗TNF- $\alpha$ 疗法与ERT的附加益处。这样做时,用Naglazyme<sup>®</sup>(重组人N-乙酰基-半乳糖胺-4-硫酸酯酶)或通过联合方法使用Naglazyme<sup>®</sup>和大鼠特异性抗TNF- $\alpha$ 药物CNT01081处理MPS VI大鼠8个月。两种方法均导致TNF- $\alpha$ 和核因子 $\kappa$ -B配体的受体激活剂(RANKL)的血清水平明显降低,并且联合治疗减少了关节软骨中的TNF- $\alpha$ 。对培养的关节软骨细胞的分析表明,联合疗法还恢复了胶原蛋白IIA1表达,并且减少了凋亡标志PARP的表达。通过ERT改善了运动活性和活动性,并且这些通过联合治疗显著增强。通过联合疗法改善了MPS VI动物的气管畸形,并且骨长度有适度改善。气管中的神经酰胺水平明显降低。MicroCT(显微CT)分析并未证明来自任一治疗对骨微结构的任何显著积极效应,骨生长板也没有组织学改善。本发明的结果证明,联合ERT与抗TNF- $\alpha$ 疗法改善了治疗效果并且导致显著临床益处,并且抗TNF- $\alpha$ 疗法一起改善了经改善的治疗效果并且也导致显著临床益处。结果还进一步验证了TNF- $\alpha$ 、RANKL和其它炎性分子作为溶酶体贮积症(包括MPS病症)的生物标志的有用性。

[0019] 过去几年,本发明的研究人员一直在研究MPS动物模型中的关节和骨病理,长期目标是研发单独或连同ERT、BMT或基因疗法一起的改进疗法(Simonaro等,“Bone Marrow Transplantation in Newborn Rats With Mucopolysaccharidosis Type VI: Biochemical, Pathological, and Clinical Findings,” Transplantation 63:1386-93 (1997); Simonaro等,“Articular Chondrocytes From Animals With a Dermatan Sulfate Storage Disease Undergo a High Rate of Apoptosis and Release Nitric Oxide and Inflammatory Cytokines: A Possible Mechanism Underlying Degenerative Joint Disease in the Mucopolysaccharidoses,” Lab Invest. 81:1319-1328 (2001); Simonaro等,“Joint and Bone Disease in Mucopolysaccharidosis VI and VII: Identification of New Therapeutic Targets and Biomarkers Using Animal Models,” Pediatr. Res. 57:701-707 (2005),其全部据此通过引用整体并入)。作为这项正在进行的研究的一部分,已经鉴定了MPS动物模型中的许多异常,包括MPS关节软骨细胞的死亡(凋亡)增加、MPS滑膜成纤维细胞过度增殖和MPS生长板的组织破坏。研究人员已经发现,向正常关节软骨细胞的培养基中添加GAG诱导凋亡和炎性标志的释放,表明GAG贮积本身可能是MPS病症中的引发性、促炎性事件(Simonaro等,“Mechanism of Glycosaminoglycan-Mediated Bone&Joint Disease: Implications for the Mucopolysaccharidoses&Other Connective Tissue Diseases,” Amer. J. Path. 172:112-122 (2008),其据此通过引用整体并入)。MPS细胞中的GAG贮积还导致Toll样受体4(TLR4)信号途径的激活,引起TNF- $\alpha$ 和其它炎性细胞因子的释放。

[0020] 因此,本发明使MPS小鼠(MPS VII, Sly疾病)与TLR4敲除小鼠交配,并且发现双敲除MPS动物的TNF- $\alpha$ 、IL1- $\beta$ 、RANKL和其它细胞因子明显减少,骨生长改善且骨生长板更加有组织并且软骨细胞死亡减少(Simonaro等,“Involvement of the Toll-Like Receptor 4 Pathway and Use of TNF-Alpha Antagonists for Treatment of the Mucopolysaccharidoses,” Proc. Natl. Acad. Sci. 107:222-7 (2010),其据此通过引用整体并入)。这使研究人员在MPS VI大鼠中使用CNT01081, Remicade<sup>®</sup>的大鼠特异性等效物, FDA

批准的用于关节炎和其它炎症性疾病中的抗TNF- $\alpha$ 单克隆抗体对抗TNF- $\alpha$ 疗法进行初步分析(Weaver,AL,“Efficacy and Safety of the Anti-TNF Biologic Agents,”*Mod.Rheumatol.*14:101-112(2004),其据此通过引用整体并入)。在该研究中,发现CNT0181治疗降低了MPS VI动物的炎性细胞因子水平,并且还减少了凋亡性关节软骨细胞的数量。然而,对骨生长没有影响或运动活性没有临床改善。在本发明中,已经在MPS VI大鼠中扩展了那些发现并且评估了抗TNF- $\alpha$ 和联合ERT/抗TNF- $\alpha$ 方法。发现抗TNF- $\alpha$ 方法和联合ERT/抗TNF- $\alpha$ 方法提供了胜过单独ERT的几种益处。这些包括步态和运动活性改善、气管更薄、畸形更少及骨适度更长。在关节软骨中胶原蛋白IIA1表达也恢复,并且凋亡减少。

[0021] 本申请基于的基本前提是:(a)溶酶体贮积症例如MPS所需的新疗法将改善对软骨和骨(包括脊柱)的治疗;(b)必须在人类使用之前在适当动物模型中验证这些疗法;和(c)治疗时疾病的严重程度将对功效有重大影响。

[0022] 本发明还提出,PPS可能是MPS的首种口服药,并且也可能是对这些病症中的软骨和骨病有重大影响的首种治疗。这种假设基于:(a)证明炎症在MPS软骨和骨病的病理生理学上的重要作用的先前研究;(b)PPS对炎症和软骨形成的已知效应;和(c)在一种MPS(MPS VI,马-拉病)的大鼠模型中使用PPS的早期初步数据。考虑到PPS已经通过安全试验并且经FDA批准,也可基于本发明提出的动物模型研究“快速跟踪”其在MPS患者中的用途。需要注意的是,因为预计PPS不会增强残留酶活性或导致MPS患者的GAG减少,所以在这些病症中其使用可与ERT联合。PPS也可单独用于治疗溶酶体贮积症。PPS是肝素样GAG分子。因此,预计不会为是GAG贮积病的MPS病症或其它溶酶体贮积症提供益处。实际上,在本发明的教导之前,可能已经预计到PPS会使这些病症恶化。本发明首次教导,尽管事实是PPS为GAG样分子,但是其的确对MPS和其它溶酶体贮积症提供了实质性益处。

[0023] 总之,对软骨和骨病的治疗表示了溶酶体贮积症例如MPS中未满足的重要医疗需要,并且本发明可对溶酶体贮积症患者,特别是患有MPS的患者的治疗和照料有重大且迅速的影响。

[0024] 附图简述

[0025] 图1A-1C说明了ERT和联合ERT/抗TNF- $\alpha$ 疗法在MPS VI大鼠中的抗炎作用。图1A中,MPS VI大鼠接受ERT(黑色)或联合ERT/抗TNF- $\alpha$ (灰色)治疗8个月(n=8只/组)。使用抗TNF- $\alpha$ 的抗体(CNT01081)进行抗TNF- $\alpha$ 疗法。最后一次注射2天后使动物安乐死并收集血清。还收集年龄匹配(37周)的正常(浅灰色)和未经治疗的MPS VI(白色)血清,并且使用免疫测定试剂盒测定TNF- $\alpha$ 和RANKL水平(见以下实施例)。如先前所示,未经治疗的MPS VI动物这两种炎症标志的水平明显升高,并且二者通过ERT或联合治疗显著减少(\*p<0.005)。在两种治疗方法之间未观察到显著差异。图1B中,未经治疗的MPS VI大鼠与正常动物相比,表现出关节软骨中TNF- $\alpha$ 免疫染色(红色)明显提高,其通过ERT适度减少并且通过联合治疗标准化。图1C中,在未经治疗的MPS VI和经ERT治疗的滑膜中,有绒毛(SV)形成和滑膜浸润至软骨下骨(箭头,SB)的增生性滑膜(\*)明显。虽然贮积细胞仍存在,但是经联合疗法治疗的动物表现出明显更少的关节炎。

[0026] 图2A-2B示出了未经治疗和经治疗的MPS VI大鼠的运动活性和步态分析。图2A中,MPS VI大鼠接受ERT(箱形)或联合ERT/抗TNF- $\alpha$ (圆形)治疗8个月(n=8只/组)。使用抗体CNT01081进行抗TNF- $\alpha$ 疗法。最后一次注射2天后,它们接受3个不同速度下的加速转棒分

析,并且将其表现与未经治疗、年龄和性别匹配的MPS VI动物(三角形)做比较。在10RPM下,两组经治疗的大鼠留在转棒上的时间最长(180秒),明显比未经治疗的动物长( $p < 0.005$ )。速度越高这种趋势变得越明显,并且ERT和联合组之间也存在显著区别( $p < 0.005$ )。绘制了单个动物的时间,并且用水平线指出每一组的平均值。图2B中,治疗后动物还接受了步态分析。使用两种不同颜色的食用色素标记大鼠走过管道的前爪和后爪,并且由爪印测量了脚步间的距离和脚步角度。每只大鼠测试至少3次,并且图2A-2B中示出了平均爪印值的总结。可以看出,对于ERT和联合治疗动物而言,后爪移动角度从 $60^\circ$ (未经治疗)分别减小到 $45^\circ$ (与未经治疗相比 $p = 0.004$ )和 $30^\circ$ (与未经治疗相比 $p = 0.0001$ )。另外,动物每一步可移动其前爪的距离从2.8cm(未经治疗)增加到4.2cm并且在联合治疗组( $p = 0.03$ )中显著地增加到5.1cm。在ERT组中动物移动其后爪的距离不变,并且在联合组中仅适度增加(从4.9至5.1cm)。

[0027] 图3A-3C示出了未经治疗和经治疗的MPS VI大鼠的骨长度和微结构。图3A中,MPS VI大鼠接受ERT(黑色)或联合ERT/抗TNF- $\alpha$ (灰色)治疗8个月( $n = 8$ 只/组)。用抗体CNT01081进行TNF- $\alpha$ 疗法。最后一次注射2天后使动物安乐死,并且收集股骨和胫骨进行microCT分析。将结果与未经治疗、年龄和性别匹配的MPS VI大鼠(白色)比较,并且将值表示为正常对照的百分比。ERT并未增加股骨或胫骨的长度,而联合组分别导致~6和14%的增加。需要注意的是,与未经治疗的MPS VI组中的74和77%相比,联合治疗组中的胫骨和股骨平均为正常的~88和84%。图3B示出了冠状面的microCT分析。在未经治疗和经治疗的MPS VI大鼠中,干骺端骨中的骨小梁密度减小,长骨体生长板变形并且断裂,并且相对于正常股骨,骺骨小梁紊乱。检测到由于联合疗法的轻微改善。图3C是对股骨中间骨干区域的microCT分析,显示轴位有皮层下骨小梁浸润至髓隙。虽然在治疗后注意到骨小梁浸润有所减少,但是这些不可通过定量度量确认。

[0028] 图4A-4B说明了未经治疗和经治疗的MPS VI大鼠的气管缺损。图4A中,在研究结束时(37周龄)从经治疗(用抗体CNT01081)和未经治疗的MPS VI和正常动物收集气管。如该代表性图所说明,未经治疗的MPS VI大鼠的气管明显增厚并且异常、萎陷,内部开口狭窄、扁平。这些异常通过ERT未改变,但是通过联合治疗明显改善,导致气管变圆,横切面面积几乎统计标准化。图4B是对气管的免疫组织化学分析,显示在未经治疗和经ERT治疗的动物(红色)的上皮细胞中,促炎性和促凋亡神经鞘脂(神经酰胺)的表达增加,与炎症性疾病的发生一致。来自联合治疗组的气管显示出几乎正常的神经酰胺表达。

[0029] 图5A-5B示出了来自未经治疗和经治疗的MPS VI大鼠的关节软骨细胞中的蛋白质表达。图5A中,MPS VI大鼠接受ERT或联合ERT/抗TNF- $\alpha$ 治疗8个月( $n = 8$ 只/组)。使用抗体CNT01081进行抗TNF- $\alpha$ 疗法。最后一次注射2天后使动物安乐死,并且分离和处理关节软骨细胞进行蛋白质印迹(图5A)。如该代表性实验所示,单独ERT增加胶原蛋白X的表达,并且在更适度的程度上增加胶原蛋白IIA1的表达。除胶原蛋白IIA1表达水平更加明显外,在联合治疗组中看到类似观察结果。为确认这些观察结果,对来自未经治疗、经ERT治疗和联合治疗动物的关节软骨部分进行了胶原蛋白IIA1的免疫荧光显微分析(图5B)。如图5B所示,与正常类似,在联合治疗组中存在更高的胶原蛋白IIA1表达(红色)。还通过蛋白质印迹检查了经治疗和对照动物中凋亡标志PARP的表达,并且仅通过联合治疗减少。另外,通过两种治疗方法减少了在MPS VI中升高的聚蛋白多糖酶(aggreacanase)ADAMT S5的水平。

[0030] 图6A-6D示出了经PPS治疗的MPS VI大鼠的结果。维持MPSVI大鼠正常供水(图6A)或含有25mg/天PPS的水(n=6只/组)(图6B)。治疗开始时动物为6月龄,并且进行治疗3个月。在治疗结束时拍摄颅骨和吻部图像。示出了代表性图像。图6C中示出了吻长,而图6D中示出了颅骨长度。还由每只动物的放射照片确定了颅骨长度和宽度测量,并用柱状图示出了数据(图6C、6D)。白色=正常9月龄,灰色=正常供水的MPS VI大鼠;蓝色=接受了PPS的MPS VI大鼠。 $*=p<0.01$ 。

[0031] 图7A-7F示出了正常大鼠(图7A、7D)、经PPS治疗的MPS VI大鼠(图7C、7F)和未经PPS治疗的MPS VI大鼠(图7B、7E)的颅骨放射照片(图7A、7B、7C)和microCT图像(图7D、7E、7F)。维持MPS VI大鼠正常供水或含有25mg/天PPS的水(n=6只/组)。治疗开始时动物为6月龄,并且进行治疗3个月。上图示出了放射照片(图7A、7B、7C),并且下图为microCT图像(图7D、7E、7F)。与未经治疗的MPS VI相比,在经PPS治疗的MPS VI大鼠中发现更长的吻部和更薄的颅骨。放射照片中的线供参考。由这些放射照片测量了图6A-6D中示出的关于颅骨长度和宽度的定量数据。

[0032] 图8A-8F示出了正常大鼠(图8A、8B)、经PPS治疗的MPS VI大鼠(图8E、8F)和未经PPS治疗的MPS VI大鼠(图8C、8D)的示出牙列变化的microCT图像。维持MPS VI大鼠正常供水或含有25mg/天PPS的水(n=6只/组)。治疗开始时动物为6月龄,并且进行治疗3个月。未经治疗的MPS VI大鼠具有长得太大导致与正常大鼠相比牙齿排列异常的门牙(箱形)。通过PPS治疗矫正了下颌和不整齐。

[0033] 图9描绘了用和未用PPS的MPS VI大鼠的转棒分析。保持6月龄的MPS VI大鼠用或不用PPS3个月(n=6只/组),并且在处死之前使用加速转棒装置分析。灰色=正常供水的MPS VI大鼠;蓝色=接受了PPS的MPS VI大鼠。注意到经治疗的MPS VI大鼠可留在转棒上的时间比未经治疗的大鼠长2倍以上。 $*=p<0.02$ 。

[0034] 图10A-10B说明了经PPS治疗和未经治疗的大鼠的免疫组织化学分析。图10A是经PPS治疗的MPS VI大鼠中肝脏和脾的免疫组织化学分析,与未经治疗、年龄匹配的9月龄MPS动物相比,显示出TNF- $\alpha$ 表达降低。图10B中,在经PPS治疗的动物中血清TNF水平也降低。

[0035] 图11A-11C示出了经治疗和未经治疗的MPS VI大鼠中的血清炎症标志。在6个月(浅灰色)、1个月(深灰色)或产前(黑色)开始用PPS治疗3组MPS VI大鼠。在9月龄时处死所有动物。因此治疗持续时间分别为3个月、8个月或9.75个月。通过ELISA测定测量几种炎症标志的血清水平,并且与正常(阴影)或未经治疗的MPS VI动物(白色)比较。N=6只/组。图11A中示出了炎症标志MIP-1 $\alpha$ 的血清水平,而图11B中示出了标志Rantes的水平并且图11C中示出了TNF- $\alpha$ 的水平。与未经治疗的MPS VI大鼠相比,所有治疗组的这些炎症标志的水平显著降低( $<0.001$ )。

[0036] 图12A-12C示出了在1月龄时MPS VI大鼠的治疗结果。图12A和12B中,1月龄MPS VI大鼠维持正常供水或含有25mg/天PPS的水8个月(n=6只/组)。示出了代表性图像。箭头指出了未经治疗的动物中眼部卟啉分泌、宽大的颅骨和吻部及小耳朵,在经治疗的动物中明显改善。图12C中,在加速转棒装置上测试动物。在20RPM下经治疗的MPS VI大鼠可留在转棒上的时间比未经治疗的大鼠长2倍以上。另外,在高达35RPM(正常的60%)的速度下仅正常和经治疗的大鼠能够留在转棒上。

[0037] 图13说明了经PPS治疗的MPS VI大鼠的气管。在6个月、1个月和产前开始用PPS治

疗第1、2和3组动物。在9个月时将其处死并分离气管。图像显示,与正常的相比,未经治疗的MPS VI大鼠的气管萎陷,并且这在所有PPS治疗组中有所改善。

[0038] 图14A-14C示出了对经治疗(6月龄)和未经治疗的MPS VI大鼠的脊椎病的评估。图14A示出了正常对照(左侧)和MPS VI(右侧)动物的藏红(Safranin)-O/快绿染色。图14B说明了腰椎运动节段的生物力学结果,表明MPS动物具有较低中性区刚度和压缩蠕变时间常数,并且表示胶原蛋白完整性和GAG功能削弱。图14C示出了对照、MPS和经治疗(T)组的矢状面放射照片,表明对于MPS而言椎间盘高度指数(DHI,定义为通过2相邻椎骨的平均高度标准化的椎间盘高度)高于对照,并且对骨骼成熟动物(6月龄)的PPS治疗并不影响该参数,引起早期干预。

[0039] 图15示出了对经PPS治疗的MPS VI大鼠中的关节软骨细胞的分析。在6个月、1个月和产前开始用PPS治疗第1、2和3组动物。在9个月时将其处死,分离并培养关节软骨细胞3周。然后通过蛋白质印迹法对其分析。注意到,与正常相比,在MPS VI大鼠软骨细胞中炎症标志TNF- $\alpha$ 、p38和Cox-2升高,并且在经治疗的MPS VI大鼠中这些水平降至正常。ADAMTS-5是在未经治疗的MPS VI大鼠软骨细胞中也升高并且在MPS VI治疗组中减少的降解蛋白聚糖的聚蛋白多糖酶。

[0040] 图16示出了经PPS治疗的尼曼-匹克病小鼠的转棒分析。在1月龄时开始用PPS治疗1月龄尼曼-匹克病小鼠(酸性神经鞘磷脂酶敲除型)持续3个月(25mg/kg/天)。然后使用设为20RPM的加速转棒装置对其分析。经PPS治疗的NPD小鼠表现得明显比未经治疗的NPD小鼠更好( $p < 0.01$ )。两组仍显著低于野生型。

[0041] 发明详述

[0042] 本发明的第一方面涉及一种治疗患有溶酶体贮积症的受试者的方法。这种方法包括选择患有溶酶体贮积症的受试者并且在治疗所选受试者的溶酶体贮积症有效的条件下,向所选受试者施用用于酶替代疗法的试剂和用于抗TNF- $\alpha$ 治疗的试剂。

[0043] 根据本发明所述的溶酶体贮积症是其中由于溶酶体酶缺乏而发生溶酶体酶底物存在或积累,以致产生不良影响(例如,底物异常积累或异常底物生成)的任何病症。可生成异常量的溶酶体酶(例如,酶可能在受试者中根本不表达,可能低水平表达或可能高水平表达)或可能(例如)由于突变或不适当的蛋白质折叠而功能异常。根据本发明所述的溶酶体酶是细胞溶酶体隔室内所含的,使其中所含细胞副产物代谢的任何水解酶。如本文所使用的底物指一种或多种溶酶体酶的溶酶体底物。未对要通过本发明的方法治疗的溶酶体贮积症强加特殊限制,只要溶酶体贮积症是本领域同样公认的病症。

[0044] 本发明的溶酶体贮积症可细分为下列疾病状态:神经鞘脂贮积症、粘多糖贮积症、糖蛋白贮积症、粘脂贮积症、II型糖原贮积症、蜡样脂褐质沉积症和属于“其它”类别的疾病状态(Caillaud等,“Gene Therapy in Lysosomal Diseases,”*Biomed.Pharmacother.*54:505-12(2000);Nathan和Oski,*Hematology of Infancy and Childhood*,第35章,W.B.Saunders(2003),二者据此通过引用整体并入)。几乎所有溶酶体贮积症均为常染色体隐性。对此两个著名的例外是为X连锁的法布里病(Fabry's Disease)和亨特氏综合征(Hunter's Syndrome)(Blazar等的美国专利申请20070009500,其据此通过引用整体并入)。

[0045] 本发明的溶酶体贮积症可包括但不限于神经鞘脂贮积症、粘多糖贮积病(粘多糖贮积症)、糖蛋白贮积症、粘脂贮积症、II型糖原贮积症、蜡样脂褐质沉积症和其它溶酶体蛋

白功能异常。更具体地,所述病症可为但不限于GM1神经节苷脂沉积症(Landing病)、GM2神经节苷脂沉积症变型B/B1(戴撒氏病(Tay-Sach's disease))和变型O(山德霍夫氏病(Sandhoff's disease))、异染性脑白质病变、克拉伯病(Krabbe's disease)、法布里病、高歇氏病(Gaucher's disease)、尼曼-匹克病(A、B、C)、法布里病、沃尔曼氏病(Wolman's disease)、奥斯汀氏病(Austin's disease)、I型粘多糖贮积症(赫尔勒氏病(Hurler's disease)或赫尔勒氏综合征)、施艾氏症(Scheie's disease)、赫尔勒-施艾氏症(Hurler-Scheie's disease)、II型(亨特氏症(Hunter's disease))、III型(沙费利波氏症(Sanfilippo's disease)、IIIA-D型、IV型(莫基奥氏症(Morquio's disease))、IVA和B型、VI型(马-拉氏症(Maroteaux-Lamy's disease))、VII型(Sly病)、IX型、致密性成骨不全症、天冬氨酰葡萄糖胺尿症、岩藻糖苷贮积症、 $\alpha$ -甘露糖苷贮积症、 $\beta$ -甘露糖苷贮积症、Schindler病(Schindler's disease)、Kanzaki病(Kanzaki's disease)、粘脂贮积症I型(唾液酸贮积症)、IB型(半乳糖唾液酸贮积症)及II、III和IV型(粘脂贮积症)、II型糖原贮积症(特征在于庞普氏病(Pompe's disease))、桑-哈二氏症(Santavuori-Haltia disease)、詹-比二氏病(Jansky-Bielshowsky disease)、贝敦氏症(Batten disease)、库夫斯病(Kufs disease)、特征在于CLN5、CLN6、CLN7和CLN8基因座突变的疾病状态和/或其它溶酶体贮积病,例如唾液酸贮积病(婴幼儿形式,扎拉病(Salla disease))和甲基丙二酸尿症(Blazar等的美国专利公布No.2007/0009500;Okamura等的美国专利No.7,951,545,二者据此通过引用整体并入)。

[0046] 在本发明的一个实施方案中,溶酶体贮积症为神经鞘脂贮积症,其中神经鞘脂贮积症为尼曼-匹克病,神经鞘磷脂积累的一种疾病。B型尼曼-匹克病是由于酸性神经鞘磷脂酶阻碍而C型尼曼-匹克病是由于胆固醇酯化缺陷。神经鞘脂贮积症的其它实例包括下列疾病,但是不限于这些疾病:GM1神经节苷脂沉积症(Landing病; $\beta$ -半乳糖苷酶缺乏)、GM2神经节苷脂沉积症变型B/B1(戴撒氏病;氨基己糖苷酶A缺乏)和变型O(山德霍夫氏病,己糖胺酶A和B缺乏)、异染性脑白质病变(芳基硫酸酯酶A缺乏)、克拉伯病(半乳糖神经酰胺酶缺乏)、法布里病( $\alpha$ -半乳糖苷酶缺乏)、高歇氏病( $\beta$ -葡萄糖苷酶缺乏)、尼曼-匹克病(A、B、C;神经鞘磷脂酶缺乏)、法布里病(神经酰胺酶缺乏)、沃尔曼氏病(酸性脂肪酶缺乏)和奥斯汀氏病(多种硫酸酯酶缺乏)。(Blazar等的美国专利公布No.2007/0009500,其据此通过引用整体并入)。

[0047] 在本发明的另一实施方案中,溶酶体贮积症为粘多糖贮积症。如本文所使用的术语粘多糖贮积症(MPS)指特征在于溶酶体中GAG积累和贮积的溶酶体贮积症的一个亚类。在一个特定实施方案中,根据本发明所述的粘多糖贮积症可包括MPS I(赫尔勒/施艾氏综合征)、MPS II(亨特氏综合征)、MPS VI(马-拉综合征)、MPS III(沙费利波综合征(Sanfilippo Syndrome))、MPS IV(莫基奥综合征(Morquio Syndrome))和/或MPS VII(Sly病)。表1中列出的可通过本发明的方法治疗的I-IX型粘多糖贮积症和缺乏酶类别的另外的实例包括以下表1所列实例(Okamura等的美国专利No.7,951,545,其据此通过引用整体并入)。

[0048] 表1-粘多糖贮积症的类别

	类别名称	缺乏的酶
[0049]		
	IH Hurler 综合征	$\alpha$ -L-艾杜糖醛酸酶
	IS Scheie 综合征	$\alpha$ -L-艾杜糖醛酸酶
	IH/S Hurler-Scheie 综合征	$\alpha$ -L-艾杜糖醛酸酶
	IIA 重度亨特氏综合征	硫代艾杜糖醛酸硫酸酯酶
	IIB 轻度亨特氏综合征	硫代艾杜糖醛酸硫酸酯酶
	IIIA 沙费利波综合征 A	硫酸乙酰肝素 N-硫酸酯酶
	IIIB 沙费利波综合征 B	N-乙酰基- $\alpha$ -D-氨基葡萄糖苷酶
	IIIC 沙费利波综合征 C	乙酰基-CoA- $\alpha$ -氨基葡萄糖苷 N-乙酰基转
[0050]		移酶
	IIID 沙费利波综合征 D	N-乙酰氨基葡萄糖-6-硫酸酯酶
	IVA 莫基奥综合征 A	N-乙酰半乳糖胺-6-硫酸酯酶
	IVB 莫基奥综合征 B	$\beta$ -半乳糖苷酶
	VIA 重度马-拉综合征	N-乙酰半乳糖胺-4-硫酸酯酶
	VIB 中度马-拉综合征	N-乙酰半乳糖胺-4-硫酸酯酶
	VII $\beta$ -葡糖苷酸酶缺乏	$\beta$ -葡糖苷酸酶

[0051] 根据本发明所述的糖蛋白贮积症包括下列疾病,但是不限于这些疾病:天冬氨酰葡萄糖胺尿症(N-乙酰基 $\beta$ -氨基葡萄糖苷酶缺乏)、岩藻糖苷贮积症( $\alpha$ -岩藻糖苷酶缺乏)、 $\alpha$ -甘露糖苷贮积症( $\alpha$ -甘露糖苷酶缺乏)、 $\alpha$ -甘露糖苷贮积症( $\beta$ -甘露糖苷酶缺乏)、Schindler病和Kanzaki病(对于Schindler病和Kanzaki病而言, $\alpha$ -N-乙酰氨基半乳糖苷酶或 $\alpha$ -半乳糖苷酶B)(Blazar等的美国专利公布No.2007/0009500,其据此通过引用整体并入)。

[0052] 本发明的粘脂贮积症包括但不限于疾病:I型(唾液酸贮积症; $\alpha$ -神经氨酸酶缺乏)、IB型(半乳糖唾液酸贮积症;组织蛋白酶A缺乏)及II、III和IV型(粘脂贮积症;N-乙酰氨基葡萄糖-1-磷酸转移酶)。例如,II型糖原贮积症特征在于庞普氏病( $\alpha$ -1,4-葡糖苷酶或酸性麦芽糖酶缺乏)(Blazar等的美国专利公布No.2007/0009500,其据此通过引用整体并入)。

[0053] 本发明的蜡样脂褐质沉积症包括但不限于桑-哈二氏症(棕榈酰蛋白硫酯酶缺乏)、詹-比二氏病(三肽基肽酶I缺乏)、贝敦氏症(CLN3蛋白质缺乏)、库夫斯病和特征在于CLN5、CLN6、CLN7和CLN8基因座突变的疾病状态(Blazar等的美国专利公布No.2007/0009500,其据此通过引用整体并入)。

[0054] 其它溶酶体贮积病包括但不限于唾液酸贮积病(婴幼儿形式,扎拉病;唾液酸载体缺乏)和甲基丙二酸尿症(维生素B12载体蛋白缺乏)(Blazar等的美国专利公布No.2007/0009500,其据此通过引用整体并入)。

[0055] 如本文所使用的术语酶替代疗法指替代患有溶酶体贮积症的受试者的缺乏或有缺陷的酶的任何药物或疗法。

[0056] 根据本发明所述的酶替代疗法(“ERT”)牵涉施用(优选静脉内)外源生成的天然或重组酶。施用后,肝脏分泌替代酶进入体循环。相邻和远离细胞主要通过几乎所有细胞表面存在的甘露糖-6-磷酸盐受体重捕分泌的酶(Suzuki,K. “Lysosomal Diseases,” 在 GREENFIELD’S NEUROPATHOLOGY 653-735 中(Graham,D.I.,Lantos,P. K. 编辑,Arnold:London) (2002),其据此通过引用整体并入)。局部施用的酶可补充缺陷细胞中酶群体的至少一部分。然而,这些酶通常具有短循环和细胞内半衰期,并且疗法需要定期肠胃外施用相对大量的相关酶(Blazar等的美国专利公布No.2007/0009500,其据此通过引用整体并入)。在 Hurler 动物模型中已经建立了酶替代疗法原理论证(Shull等,“Enzyme Replacement in a Canine Model of Hurler Syndrome,”Proc.Natl.Acad.Sci.USA91:12937-12941 (1994),其据此通过引用整体并入)。其他人已经研发了待收集供治疗用的足够量的重组酶的细胞培养表达的有效方法(Kakkis等,“Overexpression of the Human Lysosomal Enzyme  $\alpha$ -L-Iduronidase in Chinese Hamster Ovary Cells,”Prot.Express.Purif.5:225-232 (1994),其据此通过引用整体并入)。在本发明的一个实施方案中,酶替代疗法可包括但不限于阿糖脑苷酶(Alglucerase)、伊米苷酶(Imiglucerase)、葡糖脑苷脂酶 $\alpha$ (Velaglucerase Alfa)、拉罗尼酶(Laronidase)、半乳糖苷酶 $\beta$ (Agalsidase Beta)、加硫磺酶(Galsulfase)、重组阿葡糖苷酶 $\alpha$ (Alglucosidase Alfa)、N-乙酰半乳糖胺-6硫酸酯酶和艾度硫酸酯酶(Idursulfase)。

[0057] 酶替代疗法在治疗某些溶酶体贮积病时特别有效。例如,高歇氏病和法布里病治疗中的酶替代已经对扭转这些疾病的非神经性症状有效(Weinreb等,“Effectiveness of Enzyme Replacement Therapy in 1028 Patients With Type 1 Gaucher Disease After 2 to 5 Years of Treatment: A Report From the Gaucher Registry,”Am.J. Med.113:112-119 (2002); Schiffman等,“Enzyme Replacement Therapy in Fabry Disease: A Randomized Controlled Trial,”JAMA 285:2743-2749 (2001),二者据此通过引用整体并入)。然而,在许多溶酶体贮积病,例如I型粘多糖贮积症(即,MPS-1H; 赫尔勒综合征)中,酶的替代可对输注供体患者产生有效免疫原性反应。进一步地,全身施用的酶不能够进入发育中后期出现的部位,例如CNS和骨骼系统。因此,酶替代疗法对矫正与这些代谢贮积病中的许多相关的神经系统表现和骨骼缺陷无效(Blazar等的美国专利公布No.2007/0009500,其据此通过引用整体并入)。

[0058] 如本文所使用的术语抗TNF- $\alpha$ 疗法指替代患有溶酶体贮积症的受试者的缺乏或有缺陷的TNF- $\alpha$ 的任何药物或疗法。在本发明的一个实施方案中,用于抗TNF- $\alpha$ 疗法的试剂选自英夫利昔单抗(Infliximab)、阿达木单抗(Adalimumab)、依那西普(Etanercept)、戈利木单抗(Golimumab)和那他珠单抗(Natalizumab)。在另一实施方案中,用于抗TNF- $\alpha$ 疗法的试剂为戊聚糖聚硫酸酯(PPS)。

[0059] 为了本发明这个和其它方面的目的,目标受试者涵盖任何动物,优选哺乳动物,更优选人。在为了预防治疗患者患溶酶体贮积症的目的施用本发明组合物的情况下,目标受试者涵盖有染上溶酶体贮积症风险的任何受试者。特别易感的受试者包括婴幼儿和青少年以及免疫力低下的成人。在为了治疗受试者的溶酶体贮积症的目的施用本发明组合物的情

况下,目标受试者群体涵盖感染任何类型的溶酶体贮积症的任何受试者。特别适合的受试者包括有感染风险的受试者或感染了MPS I、MPS II、MPS III、MPS IV、MPS VI或MPS VII的受试者。具体而言,粘多糖贮积症通常在新生儿(即,婴幼儿)中无症状,但是其发作通过在婴幼儿期或儿童期,包括身高增长停止、骨发育异常及面容、皮肤和头发发育异常在内的表现变得清晰。在一些情况下,虽然受试者在新生儿期间正常,但是在几年内智力迟钝逐渐发展。因此,在未表现出临床综合征的新生儿早期和婴幼儿期对粘多糖贮积症等的诊断和治疗可能通过早期酶替代疗法、基因治疗或骨髓移植预防智力迟钝等。相应地,可对新生儿和婴幼儿进行粘多糖贮积症诊断和治疗(Okamura等的美国专利No.7,951,545,其据此通过引用整体并入)。在本发明的一个实施方案中,受试者可为婴幼儿或青少年。在另一实施方案中,受试者可为成人。

[0060] 如本文所使用,有效量指提供期望的局部或全身作用的量。例如,有效剂量是足以实现有益或期望临床或非临床结果的量。用于酶替代疗法的试剂和用于抗TNF- $\alpha$ 疗法的试剂的治疗有效量可根据标准程序测定,这考虑到了许多因素,包括(例如)组合物中这些活性剂的浓度、施用模式和频率、待治疗(或预防)的溶酶体贮积症的严重程度和受试者详情,例如年龄、体重及总体健康和免疫状况。例如,在国际协调会议(International Conference on Harmonization)的出版物和REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES(Mack Publishing Company1990)中可找到通用指南,其据此通过引用整体并入。临床医师可施用酶替代疗法或抗TNF- $\alpha$ 疗法,直至达到提供期望或所需预防或治疗作用的剂量。可通过常规测定容易地监测这种疗法的进展。

[0061] 酶替代治疗剂和抗TNF- $\alpha$ 治疗剂的治疗有效量通常为至少1mg组合物/kg体重(mg/kg),包括每个剂量或每天至少2mg/kg、至少5mg/kg、至少25mg/kg、至少50mg/kg、至少100mg/kg、至少150mg/kg、至少200、至少250mg/kg、至少500mg/kg、至少750mg/kg和至少1000mg/kg。通常多次施用酶替代疗法和抗TNF- $\alpha$ 疗法。单剂量间隔可为每周一次、每月一次或每年一次。如通过测量受试者的抗体血液水平所示,间隔也可无规律。可选地,酶替代疗法和抗TNF- $\alpha$ 疗法可作为持续释放制剂施用,在这种情况下需要较低频率施用。施用剂量和频率可根据治疗是预防性还是治疗性而变化。在预防性应用中,在长时间内以相对稀少的间隔施用相对低的剂量。在治疗性应用中,有时需要相对短的间隔的相对高剂量,直至减少或终止疾病的进展,并且优选直至受试者显示出疾病症状的部分或完全改善。在本发明的一个实施方案中,重复所述施用。

[0062] 根据治疗的溶酶体贮积症的性质,本发明的酶替代治疗剂和抗TNF- $\alpha$ 治疗剂可作为联合疗法的一部分,连同另一活性剂一起施用。在本发明的一个实施方案中,所述方法包括施用附加疗法。根据本发明所述附加疗法的示例性形式包括但不限于骨髓移植、伴侣疗法和基因疗法。具体而言,骨髓移植是治疗溶酶体贮积症的治疗方法。骨髓移植用来自健康的免疫相容供体的干细胞重构患者的造血系统以建立终生酶源(Steward,C.G.,“Bone Marrow Transplantation for Genetic Diseases,”在BLOOD CELL BIOCHEMISTRY.VOLUME8: HEMATOPOIESIS AND GENE THERAPY13-56中(Fairbairn,L.J.,Testa,N.G.编辑,New York:KlewerAcademic/Plenum Publishers.) (1999),其据此通过引用整体并入)。多年来已经通过移植治疗了成百上千的溶酶体贮积症患者。例如,已有报道称,通过骨髓移植治疗非神经性高歇氏病导致症状几乎完全逆转(Hoogerbrugge等,“Allogeneic Bone Marrow

Transplantation for Lysosomal Storage Diseases. The European Group for Bone Marrow Transplantation,” *Lancet* 345:1398-1402 (1995); 见Blazar等的美国专利公布 No.2007/0009500, 二者据此通过引用整体并入)。

[0063] 根据本发明的基因疗法指通过外源基因施用改变内源基因表达的方法。如本文所使用, 基因疗法也指通过向有需要的个体的体细胞或干细胞中引入与缺陷或缺失基因相对应的功能基因, 替换编码缺陷蛋白的缺陷基因或替换缺失基因。基因疗法可通过体外方法实现, 其中从个体的体内去除分化或体干细胞, 接着使用病毒载体作为基因递送媒介物将正常拷贝的缺陷基因引入外植细胞中。另外, 体内直接基因转移技术使用各种病毒载体、脂质体、蛋白质DNA复合物或裸DNA将基因原位转移至个体的细胞中以便实现治疗效果。见Fan的美国专利No.7,446,098, 其据此通过引用整体并入。

[0064] 可用于本发明的基因疗法的类型和方法在本领域中众所周知 (Fairbairn等, “Long-Term In Vitro Correction of  $\alpha$ -L-Iduronidase Deficiency (Hurler Syndrome) in Human Bone Marrow,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93:2025-2030 (1996); Kolodny等, “Storage Diseases of the Reticuloendothelial System,” 在NATHAN AND OSKI’S HEMATOLOGY OF INFANCY AND CHILDHOOD中, 第5版第2卷, 第1461-1507页 (Nathan和Orkin编辑, W.B. Saunders Co.) (1998); Medin等, “Correction in Trans for Fabry Disease: Expression, Secretion, and Uptake of  $\alpha$ -Galactosidase A in Patient-Derived Cells Driven by a High-Titer Recombinant Retroviral Vector,” *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:7917-7922 (1996); Pauly等, “Complete Correction of Acid  $\alpha$ -Glucosidase Deficiency in Pompe Disease Fibroblasts in Vitro, and Lysosomally Targeted Expression in Neonatal Rat Cardiac and Skeletal Muscle,” *Gene Therapy* 5:473-480 (1998); Zaretsky等, “Retroviral Transfer of Acid  $\alpha$ -Glucosidase cDNA to Enzyme-Deficient Myoblasts Results in Phenotypic Spread of the Genotypic Correction by Both Secretion and Fusion,” *Human Gene Therapy* 8:1555-1563 (1997), 其全部据此通过引用整体并入本文; 同样见W01998/041240, 其据此通过引用整体并入本文)。根据本发明的基因疗法的常用体内和体外施用方法是使用病毒载体递送基因。已知许多种类的病毒, 并且许多已经广泛研究用于基因疗法的目的。最常用的病毒载体包括源自腺病毒、腺相关病毒 (AAV) 和逆转录病毒, 包括慢病毒例如人免疫缺陷病毒 (HIV) 的病毒载体。见Meeker的W099/57296、W099/41399和美国专利公布No.2011/0142818, 其全部据此通过引用整体并入。为对替换基因例如葡萄糖脑苷脂酶或SNCA基因的抑制RNA (siRNA) 考虑到了根据本发明的基因疗法。见Fan的美国专利No.7,446,098, 其据此通过引用整体并入。

[0065] 本发明的酶替代疗法和抗TNF- $\alpha$ 疗法可单剂量或根据多剂量方法施用。例如, 施用相对少剂量的治疗组合物, 例如一个或两个剂量。在包括通常在几天或几周内牵涉多个剂量的常规疗法的实施方案中, 可每天进行1、2或3次或更多次酶替代疗法或抗TNF- $\alpha$ 疗法一段时间, 例如至少5天、10天或甚至14天或更多天。然而, 本领域的普通技术人员可选择并调节治疗组合物和抗生素的不同剂量、剂量时间和相对量。在一个实施方案中, 重复所述施用。

[0066] 本发明的试剂可经口服、通过吸入、通过鼻内滴注、局部、经皮、肠胃外、皮下、静脉内注射、动脉内注射、肌内注射、胸膜内、腹膜内或通过敷用到黏膜上施用。最典型的施用途

径是静脉内注射。

[0067] 可配制本发明的药剂用于肠胃外施用。可于适当混有表面活性剂例如羟丙基纤维素的水中制备所述试剂的溶液或悬浮液。也可于甘油、液体聚乙二醇及其于油中的混合物中制备分散体。说明性油为石油、动物、植物或合成来源的油，例如花生油、大豆油或矿物油。一般地，水、盐水、含水右旋糖和相关糖溶液及二醇，例如丙二醇或聚乙二醇是优选的液体载体，特别是对于可注射液而言。在普通储存和使用条件下，这些制剂含有防腐剂以防止微生物生长。

[0068] 适合注射使用的药物制剂包括无菌水溶液或分散体和临时制备无菌注射液或分散体的无菌粉末。在所有情况下，所述形式必须无菌并且流动性必须达到易于注射的程度。在生产和储存条件下必须稳定并且必须保护其免受微生物，例如细菌和真菌的污染作用。载体可为含有(例如)水、乙醇、多元醇(例如，甘油、丙二醇和液体聚乙二醇)、其适合混合物和植物油的溶剂或分散介质。

[0069] 当期望全身递送本发明的药剂时，可将其配制用于通过注射，例如通过推注射或连续输注进行肠胃外施用。供注射的制剂可呈单位剂量形式，例如与添加的防腐剂一起存在于安瓿或多剂量容器中。所述组合物可于油或含水媒介物中呈诸如悬浮液、溶液或乳液的形式，并且可含有配方剂，例如悬浮剂、稳定剂和/或分散剂。

[0070] 也可使用输液泵设备，例如Medtronic, Northridge, CA描述的输液泵设备实现本发明试剂的腹膜内或鞘内施用。此类设备允许连续输注所需化合物，避免多次注射和多次操作。

[0071] 除前述制剂外，也可将所述试剂配制成贮库制剂。也可用适合的聚合或疏水性材料(例如于可接受的油中的乳液)或离子交换树脂或如微溶性衍生物，例如微溶性盐配制此类长效制剂。

[0072] 技术人员已知的任何方法均可用于监测粘多糖贮积症状态和本发明疗法的有效性。疾病状态的临床监测可包括但不限于器官体积(例如，肝脏、脾)、血红蛋白、红细胞计数、血细胞比容、血小板减少、恶病质(消瘦)和血浆几丁质酶水平(例如壳三糖酶)。已知由患有溶酶体贮积病的受试者的巨噬细胞生成高水平的壳三糖酶，几丁质酶家族的酶(见Guo等, "Elevated Plasma Chitotriosidase Activity in Various Lysosomal Storage Disorders," *J. Inher. Metab. Dis.* 18-717-722 (1995); den Tandt等, "Marked Increase of Methylumbelliferyl-tetra-N-acetylchitotetraoside Hydrolase Activity in Plasma From Gaucher Disease Patients," *J. Inher. Metab. Dis.* 19, 344-350 (1996); Dodelson de Kremer等, "Plasma Chitotriosidase Activity in Argentinian Patients With Gaucher Disease, Various Lysosomal Diseases and Other Inherited Metabolic Disorders," *Medicina (Buenos Aires)* 57, 677-684 (1997); Czartoryska等, "Changes in Serum Chitotriosidase Activity With Cessation of Replacement Enzyme (Cerebrosidase) Administration in Gaucher Disease," *Clin. Biochem.* 33, 147-149 (2000); Czartoryska等, "Serum Chitotriosidase Activity in Gaucher Patients on Enzyme Replacement Therapy (ERT)," *Clin. Biochem.* 31, 417-420 (1998); Mistry等, "A Practical Approach to Diagnosis and Management of Gauchers Diseases," *Baillieres Clin. Haematol.* 10, 817-838 (1997); Young等, "Plasma Chitotriosidase

Activity in Gaucher Disease Patients who Have Been Treated Either by Bone Marrow Transplantation or by Enzyme Replacement Therapy With Alglucerase,” *J. Inher. Metab. Dis.* 20, 595-602 (1997); Hollak等, “Marked Elevation of Plasma Chitotriosidase Activity. A Novel Hallmark of Gaucher Disease,” *J. Clin. Invest.* 93, 1288-1292 (1994), 其全部据此通过引用整体并入)。

[0073] 在本发明的一个实施方案中, 受试者具有与溶酶体贮积症相关的骨骼病理。与溶酶体贮积症相关的骨骼病理包括但不限于骨长度、骨干宽度扩大、骨生长板宽度、组织矿物质密度、气管周长、运动功能、关节软骨细胞、步态分析, 和通过炎症标志例如神经酰胺水平、TNF- $\alpha$ 水平、RANKL水平和胶原蛋白表达。轻度骨骼病理可包括关节僵硬和肝脾大。骨骼病理的这些实例可用作监测上述溶酶体贮积症进展或消退状态的标志。

[0074] 测量标志和监测溶酶体贮积症状态的方法在本领域中众所周知并且包括但不限于免疫组织化学、免疫印迹分析、血清免疫测定和蛋白质印迹分析。

[0075] 本发明的第二方面涉及减少通过酶替代疗法治患有溶酶体贮积症的受试者的炎性细胞因子的方法。这种方法包括在减少受试者的炎性细胞因子有效的条件下, 向受试者施用用于抗TNF- $\alpha$ 治疗的试剂。

[0076] 可通过本发明的方法减少的炎性细胞因子包括但不限于TNF- $\alpha$ 、RANKL和IL1- $\beta$ 。具体而言, 可通过本发明的方法减少TNF- $\alpha$ 。TNF- $\alpha$ 是由活化巨噬细胞和淋巴细胞生成, 但是也在内皮细胞和其它细胞类型中表达的多效性细胞因子。TNF- $\alpha$ 是炎症、免疫和病理生理反应的主要介体。(Grell等, “The Transmembrane Form of Tumor Necrosis Factor is the Prime Activating Ligand of the 80kDa Tumor Necrosis Factor Receptor,” *Cell* 1183:793-802 (1995), 其据此通过引用整体并入)。存在两种不同形式的TNF, 26kDa膜表达形式和源自26kDa形式的蛋白水解性裂解的可溶性17kDa细胞因子。可溶性TNF多肽为157个氨基酸长并且为原代生物活性分子。TNF- $\alpha$ 通过与高亲和力细胞表面受体的相互作用发挥其生物效应。已经克隆并表征了两种不同的膜TNF- $\alpha$ 受体。有指定为p55TNF-R的55kDa种类和指定为p75TNF-R的75kDa种类 (Corcoran等, “Characterization of Ligand Binding by the Human p55 Tumour-Necrosis-Factor Receptor. Involvement of Individual Cysteine-Rich Repeats,” *Eur. J. Biochem.* 223:831-840 (1994), 其据此通过引用整体并入)。所述两种TNF受体在氨基酸水平上表现出28%相似性。这限于胞外结构域并且由各自约40个氨基酸的4个重复半胱氨酸富集基序组成。每个基序在保守位置上含有4-6个半胱氨酸。Dayhoff分析显示在每个受体的前3个重复序列中亚基间相似性最高。这种特征结构与许多其它受体和细胞表面分子所共有, 包括TNF-R/神经生长因子受体超家族 (Corcoran等, “Characterization of Ligand Binding by the Human p55 Tumour-Necrosis-Factor Receptor. Involvement of Individual Cysteine-Rich Repeats,” *Eur. J. Biochem.* 223:831-840 (1994), 其据此通过引用整体并入)。

[0077] 在一个实施方案中, 所述方法包括选择有与上述溶酶体病症相关的骨骼病理的受试者接受所述施用。

[0078] 这第二方面根据前述方面进行。以上描述了与本发明这个方面相关的施用模式和治疗有效剂量。

[0079] 本发明的第三方面涉及治疗患有溶酶体贮积症的受试者的方法。这种方法包括选

择患有溶酶体贮积症的受试者并且在治疗所选受试者的溶酶体贮积症有效的条件下,向所选受试者施用戊聚糖聚硫酸酯(PPS)。

[0080] 根据本发明的戊聚糖聚硫酸酯包括由分子量在1,500–6,000道尔顿范围内的 $\beta$ -D-吡喃木糖残基构成的硫酸化、半合成多糖及其药学上可接受的盐。在The Merck Index,第11版,Merck&Co, Inc., Rahway, N. J. (1989), 第7093页;Parsons的美国专利No. 5,180,715;Striker等的美国专利No. 5,643,892;和Cartt等的美国专利公布No. 2001/0034328中描述了所述化合物,其全部据此通过引用整体并入。

[0081] 应意识到,常常将戊聚糖聚硫酸酯配制成盐,例如戊聚糖聚硫酸钠、戊聚糖聚硫酸钙或戊聚糖聚硫酸钾。戊聚糖可从植物、微生物天然获得或合成。相应地,本申请从头到尾提到戊聚糖聚硫酸酯可指视情况天然获得、合成或半合成获得的戊聚糖聚硫酸酯及其各种盐。

[0082] 根据本发明的戊聚糖聚硫酸酯可用作碱金属盐或碱土金属盐,例如包括钙或钠盐,或过渡金属例如铜和锌及贵金属例如铂。相应地,特定络合离子可选自碱金属(例如 $\text{Na}^+$ 和 $\text{K}^+$ )、碱土金属(例如 $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Zn}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ 、 $\text{Ba}^{2+}$ 以及 $\text{Ag}^+$ 、 $\text{pb}^{2+}$ 、 $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Au}^{2+}$ 、 $\text{pd}^{2+}$ 、 $\text{pd}^{4+}$ 、 $\text{pd}^{4+}$ 、 $\text{pd}^{2+}$ )、三价金属离子和季铵化合物络合物。后一种化合物的实例为氯化吡啶、四烷基氯化铵、氯化胆碱、西吡氯铵、N-十六烷基-N,N,N-三烷基氯化铵或其衍生物。这些中最优选的是二价碱土金属,优选钙和镁并且最优选钙络合物。在美国专利No. 5,668,116中详细描述了多糖聚硫酸酯-金属络合物的制备;同样见Cullis-hill等的美国专利公布No. 2009/0111771,其据此通过引用整体并入。

[0083] 这第三方面根据前述方面进行。以上描述了与本发明这个方面相关的施用模式和治疗有效剂量。

[0084] 本发明的第四方面涉及治疗有与溶酶体贮积症相关的骨骼病理的受试者的方法。所述方法包括选择有与溶酶体贮积症相关的骨骼病理的受试者并且在治疗受试者的溶酶体贮积症有效的条件下,向所选受试者施用用于底物减少疗法的试剂和用于抗TNF- $\alpha$ 治疗的试剂。

[0085] 底物减少疗法,如本文所定义,是旨在减少细胞中物质的合成并且从而提供与溶酶体贮积病中可用的酶活性降低的平衡的治疗方法。

[0086] 在美国和欧洲国家现已批准Zavesca<sup>®</sup>(美格鲁特(miglustat))用于高歇氏病,并且有以相同代谢途径治疗其它溶酶体贮积病的潜力。已经研究了Cystagon<sup>®</sup>(半胱胺)作为婴幼儿神经元蜡样脂褐质沉积症的底物减少疗法。Zavesca和Cystagon是被认为通过血脑屏障的小分子。这种类型的疗法适用于有一些残留酶活性的患者,并且其需要与合成和异化过程的良好平衡(Keimel等的美国专利公布No. 2005/0208090,其据此通过引用整体并入)。在一个实施方案中,用于底物减少疗法的试剂为美格鲁特或Eliglustat。

[0087] 在一个实施方案中,根据前述方面施用附加疗法,但是附加疗法也可为如上所述的酶替代疗法。

[0088] 这第四方面根据前述方面进行。以上描述了与本发明这个方面相关的施用模式和治疗有效剂量。

[0089] 现已一般性描述了本发明,通过参考以举例说明的方式提供,并且除非另外说明,并非旨在限制本发明的下列实施例将更容易地理解本发明。

## 实施例

[0090] 提供了下列实施例以说明本发明的实施方案,但是决非旨在限制其范围。

[0091] 实施例1-材料和方法

[0092] 动物-本发明的研究人员和其它人先前已经描述了MPS VI大鼠并且广泛使用(Yoshida等,“Arylsulfatase B-Deficient Mucopolysaccharidosis in Rats,” J.Clin.Invest.91:1099-1104(1993);Kunieda等,“Mucopolysaccharidosis Type VI in Rats:Isolation of cDNAs Encoding Arylsulfatase B,Chromosomal Localization of the Gene,and Identification of the Mutation,”Genomics29:582-587(1995),其据此通过引用整体并入)。由杂合交配对建立繁殖集落,并且使用既定方法对尾夹DNA(tail clip DNA)进行基因分型(Kunieda等,“Mucopolysaccharidosis Type VI in Rats:Isolation of cDNAs Encoding Arylsulfatase B,Chromosomal Localization of the Gene,and Identification of the Mutation,”Genomics29:582-587(1995),其据此通过引用整体并入)。使用二氧化碳吸入进行大鼠的安乐死。所有动物方法均通过西奈山研究院动物护理和使用委员会(Mount Sinai Institutional Animal Care and Use Committee)(许可证编号#08-0108)批准,并且根据NIH指导方针进行。

[0093] MPSVI大鼠的治疗-Naglazyme<sup>®</sup>(重组人N-乙酰基半乳糖胺-4-硫酸酯酶)从BioMarin Pharmaceutical Inc.获得,并且CNT01081来自Centocor Ortho Biotech Inc.。将21天龄(症状发生前)的MPS VI大鼠分为2组(n=8只/组),并且接受ERT或联合ERT/抗TNF- $\alpha$ 疗法。接受单独ERT的动物静脉内(尾静脉)注射1mg/kg的Naglazyme<sup>®</sup>,每周一次。接受联合疗法的动物也静脉内注射3mg/kg的CNT01081,每周两次(每3天一次)。治疗总共进行32周。每2周收集一次血清做TNF- $\alpha$ 和RANKL分析(见下文)。对于每个组而言,在最后一次注射2周后(37周龄)处死经治疗的动物。在整个研究中使用年龄匹配的正常大鼠和未经治疗的MPS VI大鼠作为对照。

[0094] 从对照和经治疗的MPS VI大鼠收集气管、股骨和胫骨,并置于磷酸盐缓冲盐水中以分离成纤维细胞样滑膜细胞(FLS)和关节软骨细胞,或固定在中性缓冲10%福尔马林(Sigma Chemical)中做组织学、microCT分析和免疫组织化学(见下文)。于8%甲酸(Sigma Chemical)中为固定的骨脱钙5天,石蜡包埋并且切片(5 $\mu$ m)做后续染色。如先前所述建立原代FLS和关节软骨细胞培养(Simonaro等,“Joint and Bone Disease in Mucopolysaccharidosis VI and VII:Identification of New Therapeutic Targets and Biomarkers Using Animal Models,”Pediatr.Res.57:701-707(2005);Simonaro等,“Mechanism of Glycosaminoglycan-Mediated Bone&Joint Disease:Implications for the Mucopolysaccharidosis&Other Connective Tissue Diseases,”Amer.J.Path.172:112-122(2008),二者据此通过引用整体并入),并且通过蛋白质印迹法评估了炎症和凋亡标志的表达。

[0095] MicroCT图像采集-使用eExplore Locus SP PreClinical Specimen microCT系统(GE Healthcare;London,Ontario,Canada)获得来自于年龄匹配的正常、未经治疗和经治疗的MPS VI大鼠的37周龄股骨的三维图像。在14.4 $\mu$ m体素尺寸下进行扫描。扫描方法由5小

时扫描内的3600次图像采集组成(采集参数:80kVp、80uA、曝光时间3秒[~69kJ]、0.010”铝光束过滤器)。在所有扫描中均包括装有空气、水和羟磷灰石的校准模体(SB3:Gamex RMI, Middleton,WI,USA)以调节独立扫描期间固有的X射线衰减的可变性。

[0096] 骨长度和气管测量-在研究结束时(37周龄)进行肢体和气管测量。使用Microview软件由microCT图像测量每根股骨的长度。使用较大转子作为股骨的近边,而将远端髁的宽度视为远边。因此,沿骨的纵轴粗略计算每根股骨的长度。为了验证,用数显卡尺测量身体股骨和胫骨长度以及气管的宽度。使用标准学生t检验分析比较两个治疗组(ERT和联合ERT/CNT01081)的平均值。

[0097] 皮质骨分析-将每张股骨microCT图像的代表性中间骨干区分开做分析。由骨小梁形成和骨干宽度扩大所示,感兴趣体积(VOI)受近端第三转子的初始外观和远端干骺端的外观限制。分析区域不受测量尺寸限制以调节骨长度的变化。从残留骨小梁手动分割皮质骨并且独立设定阈值以区分骨和非骨体素。采用Micro View软件量化形态学性状。

[0098] 进一步处理microCT图像以量化每个样品内皮质骨的组织矿物质密度(TMD)。TMD仅表示骨体素的平均矿物质值,用羟磷灰石(HA)密度等效值表示,与包括非骨体素的骨矿物质密度(BMD)形成对比。通过使用装有空气、水和HA的校准模体(Gamex RMI, Middleton, WI, USA)将骨体素的灰度值由亨氏单位(Hounsfield unit)(HU)转化为矿物值(mg/cc的HA)计算TMD。将TMD定义为平均骨体素HU值除以HA模体的平均HU值乘以1130mg/cc(HA的密度)。

[0099] 骨小梁分析-使用MicroView图像处理软件从股骨的远端干骺端的4mm区域取出小梁VOI。将远边定义为长骨生长部的初始外观。作为明显近端界标的替代,选择标准距离(4mm)以涵盖小梁VOI。在连续轴向切片中从皮质骨分割骨小梁以生成小梁VOI的三维表示。设定每个小梁VOI的阈值以区别骨与非骨体素。以对皮质骨的相同方式,包括每次扫描中的相同校准模体,由microCT扫描计算骨小梁的TMD。使用Microview软件测量微结构性状,包括骨小梁体积分数、骨小梁表面积-体积比和小梁数量、厚度和间距。对整个VOI求所有值的平均值。

[0100] 运动功能-将年龄匹配的37周龄正常和未经治疗的MPS VI和经治疗的MPS VI大鼠置于8系列加速转棒(IITC Life Science)上进行如先前所述的评估(Cotugno等,“Different Serum Enzyme Levels are Required to Rescue the Various Systemic Features of the Mucopolysaccharidoses,”Hum.Gene Ther.21:555-69(2010),其据此通过引用整体并入)。在实际记录之前使动物在棒上准备连续2天。将转棒设为在3min内速度从10rpm升高到30rpm,并且记录潜伏期至从棒上落下的平均值。通过用变量组的单因素方差分析(ANOVA)分析结果。

[0101] 运动性分析-使用无毒染料为经治疗和对照动物的前爪和后爪染上两种不同颜色。训练大鼠连续2天走过隧道,在吸墨纸上留下它们的爪印。第3天,测量几个参数:纵向上左前爪和右前爪之间的距离、形成的角度及右前爪和右后爪之间的距离。对于统计分析,使用多变量方差分析(MANOVA),接着通过对所有试验时间点的事后Bonferroni调整(post hoc Bonferroni adjustment)评估群体差异。

[0102] 关节软骨、滑膜和生长板组织学和免疫组织化学-固定、包埋、切片来自37周龄正常、未经治疗的MPS VI和经治疗的MPS VI大鼠的股骨,并且用甲苯胺蓝染色并且也进行了H&E.免疫组织化学研究。对于免疫组织化学而言,用4%多聚甲醛/PBS固定切片,用0.5%

Triton-X-100透性化,阻断并且在4℃下用原代兔抗小鼠多克隆胶原蛋白IIA1型(兔多克隆sc-28887,Santa Cruz Biotechnology)和TNF- $\alpha$ 抗体(山羊多克隆sc-1348,Santa Cruz Biotechnology)孵育过夜。用PBS冲洗几次后,使用荧光二抗,驴抗山羊IgG-Cy-3(711-165-152,Jackson Laboratory)实现可视化。用1mg/ml双苯甲亚胺赫斯特染料(bis-benzimide Hoechst dye)(Sigma-Aldrich)为细胞核染色10min,冲洗并且用抗漂白封固介质封固切片。用共聚焦激光扫描显微镜(Carl Zeiss510Meta)可视化载玻片并拍照。

[0103] 气管免疫组织化学-如上所述固定、包埋、切片并制备来自37周龄的正常、未经治疗的MPS VI和经治疗的MPS VI大鼠的气管。用原代小鼠单克隆抗神经酰胺抗体(MID15B4,Alexis Corporation)孵育切片过夜并且使用荧光二抗,驴抗山羊IgG-Cy-3(711-165-152,Jackson Laboratory)实现可视化。用共聚焦激光扫描显微镜(Carl Zeiss510Meta)可视化载玻片并拍照。

[0104] 免疫印迹分析-使用软骨连续酶消化法收集来自37周龄的正常、未经治疗和经治疗的MPS VI大鼠的关节软骨细胞,沉淀并且溶解进行如先前所述的免疫印迹分析(Simonaro等,“Mechanism of Glycosaminoglycan-Mediated Bone&Joint Disease: Implications ofr the Mucopolysacchafidoses&Other Connective Tissue Diseases,” Amer.J.Path.172:112-122(2008),其据此通过引用整体并入)。用兔多克隆抗胶原蛋白IIA1型(sc-8784-R,Santa Cruz Biotechnology)、兔多克隆抗胶原蛋白X型(AB58632,Abcam)、兔多克隆抗ADAMTS5(sc-28887,Santa Cruz Biotechnology)、兔多克隆抗PARP(sc-7150,Santa Cruz Biotechnology)和兔多克隆抗GAPDH(sc-25778,Santa Cruz Biotechnology)孵育膜作为负载对照。结合抗体被与HRP(NA934V),GE Healthcare)偶联的二抗识别。使用增强化学发光检测试剂(Amersham Biosciences)实现抗体复合物的检测。

[0105] 血清免疫测定-使用大鼠超灵敏Biosource Elisa试剂盒(Invitrogen and ALPCO Diagnostics),根据生产商的方法通过免疫测定评估年龄匹配的正常、未经治疗和经治疗的MPS VI大鼠的血清TNF- $\alpha$ 和RANKL。所有测定均进行三次。

[0106] 数据表示和统计分析-所有实验独立重复至少3次。对两组间的数据进行学生t检验分析、用变量组的单因素方差分析(ANOVA)、多变量方差分析(MANOVA),接着是事后Bonferroni调整。 $P < 0.05$ 时将结果视为显著。使用Sigma Stat3.1(Systat Software)进行统计。图表示来自三次实验的综合数据的平均数 $\pm$ 平均数标准误差(SEM)。

[0107] 实施例2-粘多糖贮积症中抗TNF- $\alpha$ 疗法对酶替代疗法的影响

[0108] 通过ERT(1mg/kg每周一次)或通过ERT和抗TNF- $\alpha$ 疗法的联合方法(3mg/kg,每周两次)治疗21周龄MPS VI大鼠。二者均静脉施用(尾静脉)。动物总共治疗8个月(即,32个剂量的ERT和64个剂量的抗TNF- $\alpha$ )。使用正常和未经治疗的MPS VI同窝出生仔畜作为对照(n=8只/组)。使用抗TNF- $\alpha$ 的大鼠特异性单克隆抗体CNT01081(Centocor的赠品)进行抗TNF- $\alpha$ 疗法。**Naglazyme**<sup>®</sup>(BioMarin的赠品)是人类形式的重组N-乙酰基半乳糖胺-4-硫酸酯酶,MPS VI中缺乏的酶,并且用于ERT。在最后治疗2周后(即,37周龄)处死动物。

[0109] 图1A总结了研究结束时TNF- $\alpha$ 和RANKL的血清水平。与正常动物相比,在未经治疗的MPS VI大鼠中两种炎症标志均大大升高,并且两种治疗方法均导致显著减少。虽然在统计上无差异,但是在联合治疗组中效果稍微增强。图1B示出了关节软骨TNF- $\alpha$ 的免疫组织化学染色。未经治疗的MPS VI动物的软管TNF- $\alpha$ 升高,这通过ERT适度减少而通过联合治疗减

少更多。图1C示出了来自对照和经治疗的MPS VI大鼠的膝盖的横截面图。在未经治疗的MPS VI大鼠中滑膜(\*)为增生性,导致滑膜绒毛(SV)形成。与炎症和绒毛形成明显减轻的联合治疗相比,ERT并未减轻滑膜炎症。注意到,在来自两个治疗组的关节软骨(AC)以及软骨下骨(SB)中贮积仍很明显。ERT图像中的粗体箭头指示滑膜侵入SB,表明了炎症。

[0110] 实施例3-酶替代疗法和抗TNF- $\alpha$ 疗法对运动活性、步态、骨病和关节疾病的影响

[0111] 还评估了这些治疗对运动活性和步态的影响。在加速转棒装置上(图2A),ERT和联合治疗动物在最低速度(10RPM)下留在转棒上的时间最长(180秒),与未经治疗的MPS VI动物(平均70秒)形成对比。在较高速度(20和30RPM)下,观察到联合治疗与ERT组相比显著改善。图2B示出了这些动物的步态模式的代表性图像。总的来说,经ERT治疗的动物比未经治疗的MPS VI动物走得更快更远,迈步更协调,并且这通过联合疗法得到改善。例如,后爪移动角度从60°(未经治疗的MPS VI)减小到45°(ERT)和30°(联合),并且前爪距离从2.8cm(未经治疗)增加到4.2cm(ERT)和5.1cm(联合)。

[0112] 使用MicroCT分析评估经治疗和未经治疗的MPS VI及正常动物中的股骨和胫骨长度。如图3A所示,在37周龄时,未经治疗的MPS VI动物的股骨平均仅为正常同窝出生仔畜股骨的约77%。在ERT组中未观察到改善,而在接受了联合治疗的动物中,股骨长约6%(正常的约83%)。未经治疗的MPS VI大鼠的胫骨类似地为正常的约74%,并且这些通过联合疗法改善约14%,达正常的约88%。在ERT组中未观察到改善。虽然一贯观察到由于联合治疗骨长度的这些改善,但是将所有经治疗的小鼠(雄性和雌性)分组在一起时,这些改善在雄性动物中更突出并且未达到统计显著性。

[0113] 尽管对骨长度的这些积极影响,但对于任一治疗组而言骨微结构的极少数变化是明显的。图3B和3C示出了远端股骨的microCT图像。在未经治疗的MPS VI动物中,干骺端骨中的骨小梁密度减小,长骨体生长板变形并且断裂,并且相对于正常股骨,骺骨小梁紊乱(图3B)。检测到由于联合治疗的轻微改善。

[0114] 进行定量分析以进一步研究未经治疗和经治疗的MPS VI大鼠的骨小梁的形态学变化。集合紧邻长骨生长部近端的远端干骺端的代表性感兴趣体积(VOI)并且在组间做比较。生成骨小梁结构的三维图像以确保仅包括骨小梁。从每个VOI,取出TMD(骨小梁矿物质密度)和BV(骨体积)/TV(骨小梁体积)。两种治疗方法均对骨小梁TMD或BV/TV无统计相关的影响。

[0115] 收集了股骨中间骨干区域的microCT图像。取出远端出现第三转子处的轴向横截面并且并置代表性样品做比较(图3C)。肉眼检查时,未经治疗的MPS VI大鼠表现出更多的皮层下骨小梁浸润至髓隙。虽然这种肉眼所见在各种样品中一致,但是骨小梁密度的明显增加并未通过定量度量确证。未由任一治疗引起骨小梁生长的明显逆转。

[0116] 为中间骨干VOI计算皮质骨形态的定量度量。集合皮质骨的平均横截面皮质面积、总面积和TMD的值以说明尺寸和矿化。与正常相比,在MPS VI大鼠中皮质面积低22%( $p=0.002$ ),未影响总面积或TMD。因此,相对皮质面积降低15%( $p=0.015$ ),表示MPS VI大鼠中的皮质骨厚度大量损失,对骨干股骨的总厚度或矿化无损失。需要注意的是,经ERT或联合治疗治疗的大鼠的股骨表现出更大的皮质面积和相对皮质面积,总面积或TMD无显著变化。添加抗TNF- $\alpha$ 疗法未增大ERT疗法的积极效应。总的来说,这些发现缺乏统计显著性。

[0117] 计算稳健性作为股骨结构的最终度量。定义为相对于长度的横截面尺寸,稳健性

捕获水平和垂直生长之间的关系。发现MPS VI股骨比正常的更稳健,与其“短而肥”的外观一致。虽然联合疗法使稳健性降低5% ( $p=0.25$ ),适度(虽然不显著)改善,但是经治疗未展示显著改善。

[0118] 在未经治疗的MPS VI大鼠中,萎陷且增厚的气管很明显(图4A),与在MPS患者中观察到的气管异常一致(Semenza等,“Respiratory Complications of Mucopolysaccharide Storage Disorders,”*Medicine*67:209-19(1988),其据此通过引用整体并入)。肉眼检查时,在联合治疗,而非ERT后观察到显著的气管改善。与正常的比较时,来自未经治疗的MPS VI大鼠的气管具有在统计上更小的横截面面积( $2.9 \pm 0.6 \text{mm}^2$  比对  $7.5 \pm 0.8 \text{mm}^2$ ;  $p=0.0002$ )。来自经ERT治疗的动物的气管适度但显著地改善( $3.6 \pm 0.5 \text{mm}^2$ ; 与未经治疗的相比  $p=0.02$ ),而在联合治疗组中横截面面积几乎加倍, $6.0 \pm 0.8 \text{mm}^2$  (与未经治疗的相比  $p=0.003$ )。

[0119] 实施例4-粘多糖贮积症关节软骨细胞中的神经酰胺染色

[0120] 神经酰胺是牵涉于炎症、凋亡和感染的诱导的信号神经鞘脂,并且已经证实在MPS关节软骨细胞中积累(Simonaro等,“Involvement of the Toll-Like Receptor4 Pathway and Use of TNF-Alpha Antagonists for Treatment of the Mucopolysaccharidoses,”*Proc.Natl.Acad. Sci.*107:222-7(2010),其据此通过引用整体并入)。神经酰胺也在来自有呼吸道并发症的几种疾病的气管中积累,并且在软骨体内平衡中起重要作用(Becker等,“Accumulation of Ceramide in the Trachea and Intestine of Cystic Fibrosis Mice Causes Inflammation and Cell Death,”*Biochem.Biophys.Res.Commun.*17:368-74(2010),其据此通过引用整体并入),导致在MPS VI大鼠的气管中检查到神经酰胺。如图4B中所见,在未经治疗和经ERT治疗的MPS VI大鼠气管的上皮细胞中观察到浓烈的神经酰胺染色,并且在来自接受了联合治疗的动物的气管中减少至正常。

[0121] 实施例5-骨生长板的组织学分析

[0122] 为进一步检查这些疗法的作用,进行骨生长板的组织学分析。由于大空泡细胞,MPS VI大鼠生长板比野生型同窝出生仔畜的生长板更厚。另外,在MPS动物中生长板的正常柱形组织破坏,促成异常骨形成(Simonaro等,“Involvement of the Toll-Like Receptor4 Pathway and Use of TNF-Alpha Antagonists for Treatment of the Mucopolysaccharidoses,”*Proc.Natl.Acad. Sci.*107:222-7(2010);Metcalf等,“Mechanism of Shortened Bones in Mucopolysaccharidosis VII,”*Mol.Genet.Metab.*97:202-211(2009),二者据此通过引用整体并入)。两种治疗方法对MPS VI生长板组织学均无明显影响。

[0123] 实施例6-关节软骨细胞中的胶原蛋白表达

[0124] 最后,从经治疗和未经治疗的MPS VI动物收集关节软骨细胞以评估胶原蛋白表达和凋亡标志的变化。在MPS VI大鼠中胶原蛋白IIA1和X的水平比正常低,并且经治疗与未经治疗的MPS VI动物相比各自升高(图5A)。如该蛋白质印迹中所显见,联合治疗导致更强的胶原蛋白IIA1表达,这一发现通过软骨切片中的免疫组织染色确认(图5B)。这与证实抗TNF- $\alpha$ 疗法减少了MPS VI大鼠的关节软骨细胞中的TUNEL染色的先前工作一致(Simonaro等,“Involvement of the Toll-Like Receptor4 Pathway and Use of TNF-Alpha Antagonists for Treatment of the Mucopolysaccharidoses,”*Proc.Natl.Acad. Sci.*107:222-7(2010),其据此通过引用整体并入)。通过ERT和联合治疗减少了基质降解

酶,聚蛋白多糖酶ADAMTS5的表达,而仅通过联合治疗方法减少在来自MPS VI大鼠的软骨细胞中升高的凋亡标志PARP(Simonaro等,“Articular Chondrocytes From Animals With a Dermatan Sulfate Storage Disease Undergo a High Rate of Apoptosis and Release Nitric Oxide and Inflammatory Cytokines:A Possible Mechanism Underlying Degenerative Joint Disease in the Mucopolysaccharidoses,”*LabInvesti.*81:1319-1328(2001),其据此通过引用整体并入)。

[0125] 实施例7-酶替代疗法在粘多糖贮积症中的作用

[0126] 尽管事实是ERT对MPS患者提供了明显的临床益处,包括关节活动性、运动性和呼吸改善(Decker等,“Enzyme Replacement Therapy for Mucopolysaccharidosis VI: Growth and Pubertal Development in Patients Treated With Recombinant Human N-Acetylgalactosamine4-Sulfatase,”*J. Pediatr.Rehabil.Med.*3:89-100(2010); Miebach,E,“Enzyme Replacement Therapy in Mucopolysaccharidosis Type I.Treatment of Mucopolysaccharidosis Type II(Hunter syndrome)with Idursulfase:The Relevance of Clinical Trial End Points,”*Acta Paediatr.:Suppl.*94:58-60(2005),二者据此通过引用整体并入),这种治疗对软骨和骨的有效性极其有限。这可归因于由于其血管供给不足不可容易地到达这些组织的输注重组酶的生物分布,和靶细胞(例如,软骨细胞)包埋在妨碍药物递送的基质中的事实。因此认为在ERT后MPS患者的关节活动性改善涉及软组织变化(例如,腱),而非对软骨和骨的直接作用。另外,即使在早龄期已经向MPS动物的关节间隙直接注射了重组酶时,对骨和软骨的作用已经非常有限(Auclair等,“Long-Term Intra-Articular Administration of Recombinant Human N-Acetylgalactosamine4-Sulfatase in Feline Mucopolysaccharidosis VI,”*Mol.Gen.Metab.*91:352(2007),其据此通过引用整体并入)。因此,仍非常需要改善ERT在这些组织中的结果。

[0127] 实施例8-抗TNF- $\alpha$ 疗法在粘多糖贮积症中的作用

[0128] 申请人的先前工作已经证明了在MPS动物模型中TLR4炎症途径在软骨和骨病理中的重要性(Simonaro等,“Involvement of the Toll-Like Receptor4Pathway and Use of TNF-Alpha Antagonists for Treatment of the Mucopolysaccharidoses,”*Proc.Natl.Acad. Sci.*107:222-7(2010),其据此通过引用整体并入)。因为未批准直接TLR4抑制剂供临床使用,所以在MPS VI大鼠模型中用TLR4途径的下游产物评估抗TNF- $\alpha$ 疗法的有效性。在人类中,使用抗TNF- $\alpha$ 抗体(例如,**Remicade**<sup>®</sup>(英夫利昔单抗))治疗几种常见炎症性疾病,包括类风湿性关节炎、牛皮癣性关节炎和克罗恩氏病(Klaasen等,“Body Mass Index and Clinical Response to Infliximab in Rheumatoid Arthritis,”*Arthritis Rheum.*63:359-64(2011);Rodgers等,“Etanercept,Infliximab and Adalimumab for the Treatment of Psoriatic Arthritis:A Systematic Review and Economic Evaluation,”*HealthTechnol.Assess.*15:1-329(2011);Rutella等,“Infliximab Therapy Inhibits Inflammation-Induced Angiogenesis in the Mucosa of Patients With Crohn’s Disease,”*Am.J.Gastroenterol.*(2011),其全部据此通过引用整体并入)。发现通过这种抗TNF- $\alpha$ 疗法治疗MPS VI大鼠减轻了炎症和关节软骨细胞凋亡,但是未显著改善骨生长或活动性(Simonaro等,“Involvement of the Toll-Like

Receptor4Pathway and Use of TNF-Alpha Antagonists for Treatment of the Mucopolysaccharidoses,”*Proc.Natl.Acad. Sci.*107:222-7 (2010),其据此通过引用整体并入)。

[0129] 实施例9-联合酶替代疗法和抗TNF- $\alpha$ 疗法在粘多糖贮积症中的作用

[0130] 在当前研究中,评估了联合ERT与抗TNF- $\alpha$ 疗法的有效性以确定单独ERT是否有任何临床/病理益处。使用大鼠特异性单克隆抗体对抗TNF- $\alpha$  (CNT01081),并且对于ERT使用人重组N-乙酰基-半乳糖胺-4-硫酸酯酶(Naglazyme<sup>®</sup>)。已知在静脉注射后,在MPS VI大鼠和猫中发生对这种人类酶的免疫反应,虽然这些反应通常不严重。免疫抑制可用于将这种反应减到最低限度(Connor,V,“Anti-TNF Therapies:A Comprehensive Analysis of Adverse Effects Associated With Immunosuppression,”*Rheumatol.Int.*31:327-37 (2011),其据此通过引用整体并入),但是因为在该研究中已经施用了抗TNF- $\alpha$ 疗法,所以未对本发明的实验设计添加已知免疫抑制剂(附加复合治疗)。对于一些ERT疗法而言,对输注酶的免疫反应可严重限制其有效性,并且联合抗TNF- $\alpha$ 疗法与ERT的一种潜在益处可能是将这种反应减到最低限度并且避免对附加免疫抑制的需要。然而,必须小心平衡这种潜在益处与增加感染的潜在风险,并且因此在受控临床试验中谨慎评估。

[0131] 有趣的是,来自当前研究的其中一项初步观察是,单独的ERT大幅降低了几种炎症标志,包括TNF- $\alpha$ 和RANKL的血清水平。这些细胞因子的血清水平反映了这些动物的总体炎症状态,而非任何特定器官或组织,并且假设在ERT后这些分子的循环水平降低很可能是由于已知重组酶易于接近的器官(例如,肝脏)中所述疗法的有效性。先前已经证实,MPS中炎症性疾病在很大程度上由GAG贮积导致,并且在ERT后这些器官中GAG的减少可能导致全身TNF- $\alpha$ 释放减少(Simonaro等,“Involvement of the Toll-Like Receptor4Pathway and Use of TNF-Alpha Antagonists for Treatment of the Mucopolysaccharidoses,”*Proc.Natl.Acad.Sci.*107:222-7 (2010),其据此通过引用整体并入)。在ERT后,这些动物中TNF- $\alpha$  (和其它炎性分子)的循环水平大幅降低的事实还表明,这种疗法可能对所述酶不易接近的其它器官(例如,软骨)有积极、次级抗炎作用,提供附加利益。对溶酶体贮积症患者的整个酶替代疗法治疗过程中,常规性测量炎症、毒性等的血清标志。见Simonaro等,“Involvement of the Toll-Like Receptor4Pathway and Use of TNF-Alpha Antagonists for Treatment of the Mucopolysaccharidoses,”*Proc.Natl.Acad. Sci.*107:222-7 (2010),其据此通过引用整体并入。预计接受酶替代疗法的MPS患者有正常或接近正常的TNF- $\alpha$ 水平。基于细胞因子血清结果,似乎单独的酶替代疗法有效。同样,本领域中用酶替代疗法治疗溶酶体贮积症患者的专家在本发明的结果之前不会考虑向治疗方案增加TNF- $\alpha$ 。

[0132] 通过运动活性的两种度量,在加速转棒装置上的表现和步态分析,评估经治疗的MPS VI动物的临床改善。ERT改善了这些终点,但是联合这种疗法与抗TNF- $\alpha$ 治疗有明显的附加益处。假设ERT对这些表现型的积极效应很可能是由于关节中的软组织变化,而非酶向软骨或骨的直接递送。虽然明显这在经ERT治疗的MPS患者中是积极益处,但是因为MPS VI大鼠未展现出肝脏和脾明显增大,所以ERT后运动活性和步态改善也不可归因于器官尺寸减小。

[0133] 重要的是,联合ERT/CTN01018治疗对这些临床终点的附加益处明显,并且尽管事

实是两个治疗组中血清TNF- $\alpha$ 和RANKL的减少相似仍然发生。实际上,在接受了联合治疗的动物的软骨中观察到在ERT组中未观察到的几种变化。例如,接受了联合疗法的MPS VI大鼠的气管比未经治疗或经ERT治疗的动物明显更薄且更宽,并且在关节胶原蛋白中胶原蛋白IIA1表达升高。气管中神经酰胺也减少,表明炎症减轻,并且在关节软骨细胞中PARP表达(表示细胞凋亡)减少。

[0134] 另外,通过联合疗法明显减轻了滑膜的炎症,导致绒毛更少且滑膜组织更少浸润至下层骨中。这些变化是由于CTN01018对这些组织的直接作用,还是由TNF- $\alpha$ 全身减少引起的间接作用仍然未知。对气管形态的影响特别值得注意,表明MPS患者中与气管病理相关的呼吸道并发症可受益于联合ERT/抗TNF- $\alpha$ 疗法的积极效应(Semenza等,“Respiratory Complications of Mucopolysaccharide Storage Disorders,”*Medicine*67:209-19 (1988);Shinhar等,“Airway Management in Mucopolysaccharide Storage Disorders,”*Arch.Otolaryngol.Head NeckSurg.*130:233-237 (2004),二者据此通过引用整体并入)。CTN01018是抗TNF- $\alpha$ 的抗体。同样,其具有预计不会达到主要是无血管的软骨组织例如气管的分子量和生物分布。

[0135] 尽管经治疗的MPS VI动物的关节和气管中有这些积极变化,在骨中明显的效应极少。通过联合治疗轻微改善了股骨和胫骨长度,但是生长板组织学未改善。与先前在MPSVII/TLR4双敲除动物中观察到的相比,骨长度的这些变化非常适度(Simonaro等,“Involvement of the Toll-Like Receptor4 Pathway and Use of TNF-Alpha Antagonists for Treatment of the Mucopolysaccharidoses,”*Proc.Natl.Acad.Sci.*107:222-7 (2010),其据此通过引用整体并入),其中生长板组织的明显改善显而易见,连同骨明显更长。然而,应认识到两次实验之间的几个重要差异,包括啮齿动物模型和疾病不同,并且事实是在MPSVII小鼠研究中,产生了在整个研究中展现出的TLR4途径的完全敲除,而在当前研究中大鼠在约3周时开始接受用全身抗TNF- $\alpha$ 疗法治疗。

[0136] 总的来说,这些结果表明联合抗TNF- $\alpha$ 疗法与ERT在MPS动物的软骨和骨中提供了未预料到的附加益处,产生了更好的临床结果。几种抗TNF- $\alpha$ 药物可用于其它炎症病状的临床使用(例如,**Remicade**<sup>®</sup>等)的事实可利于这种疗法在MPS患者中的实施。然而,在MPS患者中长期使用这些疗法也可能具有有害影响,并且为测定这种联合治疗方法的安全性和功效,小心控制的临床试验将是必须的。第二个重要发现是,单独的ERT减轻了TNF- $\alpha$ 相关炎症,提供了MPS疾病中GAG贮积直接活化这个途径的附加证据。实际上,ERT的一般抗炎作用很可能对酶不能到达的器官产生积极、次级益处。最后,此处报道的数据进一步验证了TNF- $\alpha$ 、RANKL和其它炎症标志可用作生物标志以监测疗法在MPS疾病中的效应的事实。目前,在这些病症中广泛使用的唯一生物标志是尿中的GAG释放,并且这些简单血清测定可能具有大量附加益处。

[0137] 实施例10-在戊聚糖聚硫酸酯方面抗TNF- $\alpha$ 疗法对酶替代疗法的影响的初步研究

[0138] 为了研发“原理论证”数据,用PPS治疗6只6月龄的MPS VI大鼠3个月。6月龄的MPS VI大鼠患有确定的骨、软骨和炎症性疾病,因此这项初步研究的特定目标是评估PPS是否可减缓或逆转患有晚期疾病的MPS动物的任何临床或病理结果。如图6A-6D中可见,经治疗的9月龄MPS VI动物的面容与未经治疗的MPS VI对照动物明显不同。如图7A-7F所示,拍摄正常大鼠(图7A、7D)、经PPS治疗的MPS VI大鼠(图7C、7F)和未经PPS治疗的MPS VI大鼠(图7B、

7E)的颅骨放射照片和microCT图像。经治疗的动物的颅骨(图7C、7F)更长,在MPS VI中通常由于眼窝异常而凸出的眼部与正常的一样凹进去,并且眼部卟啉分泌明显更少。示出的图像表示对这些动物的大体观察结果。颅骨放射照片确认了这些观察结果,并且显示尽管在老龄时开始治疗,治疗组(即,经PPS治疗的组)中的颅骨和吻部仍明显更长(图7A-7F)。

[0139] 如图8A-8F所示,microCT图像进一步支持这些观察结果。经PPS治疗(图8E、8F)和未经PPS治疗(图8C、8D)的MPS VI大鼠显示出牙列变化。与经PPS治疗(图8E、8F)的MPS VI大鼠相比,未经PPS治疗(图8C、8D)的MPS VI大鼠展示出长得太大导致与正常大鼠(图8A-8F)相比牙齿排列异常的门牙(箱形)。图8A、8B中示出了正常大鼠的MicroCT图像。未经治疗的MPS VI大鼠具有长得太大导致与正常大鼠相比牙齿排列异常的门牙(箱形)(图8C、8D)。通过PPS治疗矫正了下颚和不整齐(图8E、8F)。

[0140] 还在处死之前立即使用加速转棒装置研究动物。如图9可见,用PPS治疗3个月的MPS VI大鼠留在转棒上的时间明显比未经治疗的对照动物更长。假设这反映了治疗组中关节活动性增强和/或炎症和疼痛减轻。另外,免疫组织化学分析显示,在肝脏和脾中TNF水平降低,而在血液中这种细胞因子的水平类似降低(图10A-10B)。ELISA测定显示,经治疗的MPS VI大鼠中的血清炎症标志显著低于未经治疗的MPS VI大鼠中的炎症标志水平(图11A-11C)。图11A中示出了炎症标志MIP-1 $\alpha$ 的血清水平,而图11B中示出了标志Rantes的水平并且图11C中示出了TNF- $\alpha$ 的水平。

[0141] 还开始对1月龄MPS VI大鼠的PPS治疗,并且与对较大动物观察到的相似,通过转棒表现评估,对面容、颅骨长度、眼部和鼻分泌物及运动性有显著影响(图12A-12C)。未经PPS治疗的MPS VI大鼠的气管与正常气管相比,显示出气管萎陷,而这在所有PPS治疗组中均改善(图13)。

[0142] 最后,评估了经治疗(6月龄)和未经治疗的MPS VI大鼠的脊椎病。这些研究已经证明了可在PPS治疗期间遵循的几个重要和临床相关终点。在组织学上,与对照椎间盘相比,MPS VI椎间盘具有丰富的、扩大的空泡状核和环纹细胞以及增厚的环层、髓核中的病灶性缺陷和椎间盘高度增加(图14A)。在生物力学上,与正常脊髓节段相比,拉-压循环(蠕变)试验显示,MPS VI运动节段的中性区(447.9%;图14B)和抗拉刚度(110.0%)显著降低。蠕变试验还显示MPS VI样品中的时间常数明显更小(82.8%;图14B)。未经PPS治疗的MPS VI大鼠中的关节软骨细胞显示出与正常相比升高的TNF- $\alpha$ 、p38和Cox-2,但是那些水平在经治疗的MPS VI大鼠中降至正常(图15)。ADAMTS-5是在未经治疗的MPS VI大鼠软骨细胞中也升高并且在MPS VI治疗组中减少的降解蛋白聚糖的聚蛋白多糖酶(图15)。转棒分析说明,用PPS治疗3个月的1月龄尼曼-匹克病小鼠(酸性神经鞘磷脂酶敲除型)表现得明显比未经治疗的尼曼-匹克病小鼠更好(图16)。

[0143] 总的来说,MPS VI动物展示出可能与MPS群体中观察到的脊椎病理的发展和进展相关的脊椎运动节段生物力学和椎间盘结构的实质性变化。髓核和纤维环的完整性对维持脊椎节段的正常生物力学功能很重要。如中性区刚度降低所示,MPS VI大鼠中这些结构相当大的缺陷可能与生物力学降低相关。时间常数(蠕变时间)减少还显示,椎间水运输和保持能力改变,如对MPS VII犬模型所报道那样,这很可能与功能异常的GAG有关,但是也可部分与端板渗透性和胶原蛋白功能的改变相关。

[0144] 需要注意的是,尽管PPS对颅骨和吻部长度、转棒表现和炎症有积极效应(图6A-

6D、9、10A-10B、12A-12C),其仍未恢复患有晚期疾病、经治疗的MPS VI动物增大的椎间盘高度指数(DHI)(图14C)。这个发现显示了早期筛选和干涉对MPS的这种(和可能其它)参数对治疗的重要性,和根据年龄和疾病进展仔细评估药物治疗的作用的需要。

[0145] 因为PPS是GAG样多糖,所以预计不会在MPS GAG贮积症中在治疗上有效。因此令人惊讶地未预料到在MPS VI动物中的积极结果。另外,因为已知PPS不会穿过血脑屏障,所以预计在尼曼-匹克病小鼠模型中不会有积极神经学效应(与图16中表现出的效应一样)。

[0146] 虽然本文已经详细描绘和描述了优选实施方案,但是对于相关领域的技术人员而言显而易见的是,在不背离本发明精神的前提下可做修改、增加、替代等并将这些视为在如下列权利要求所定义的本发明范围内。

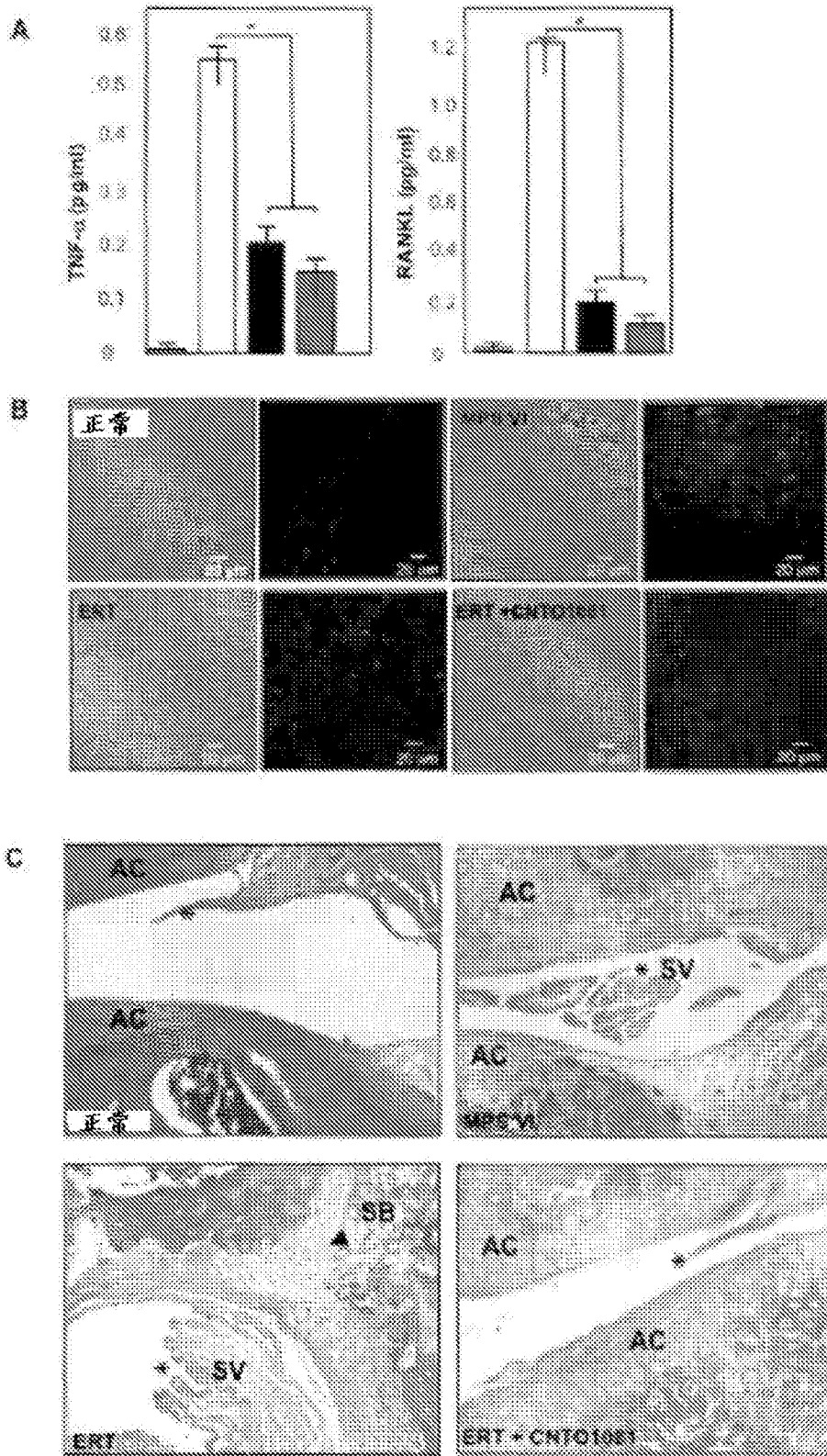


图1A-1C

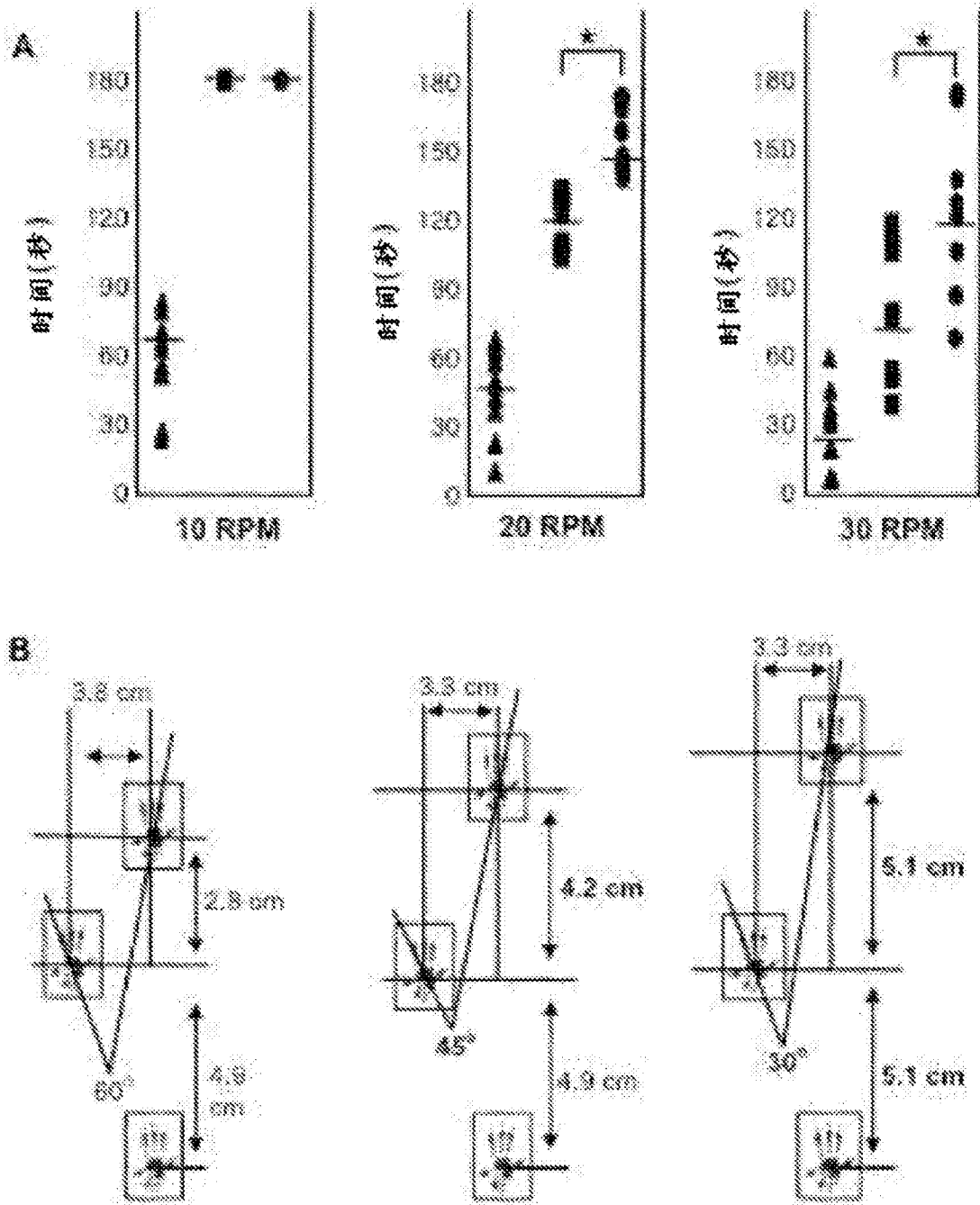


图2A-2B

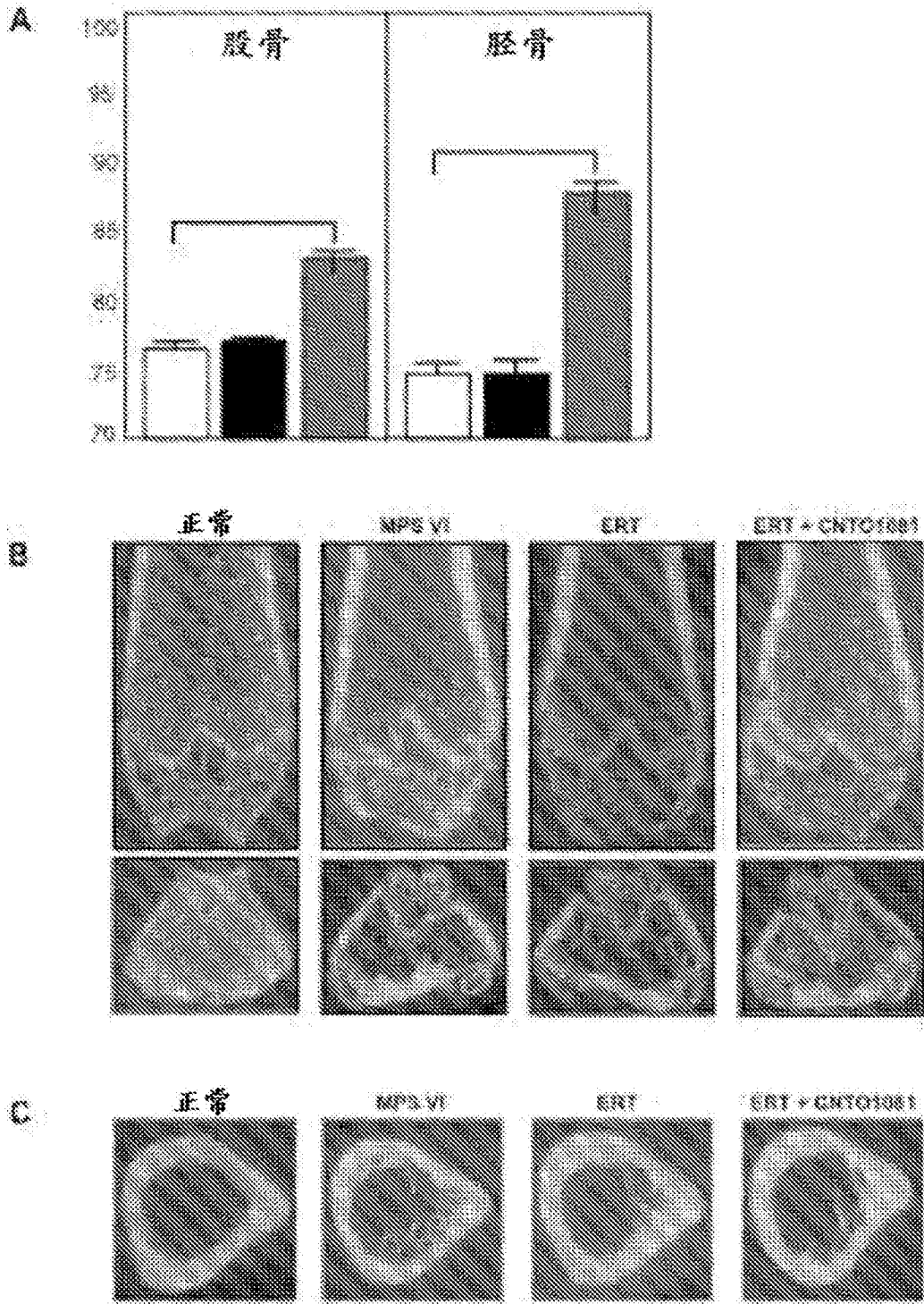


图3A-3C

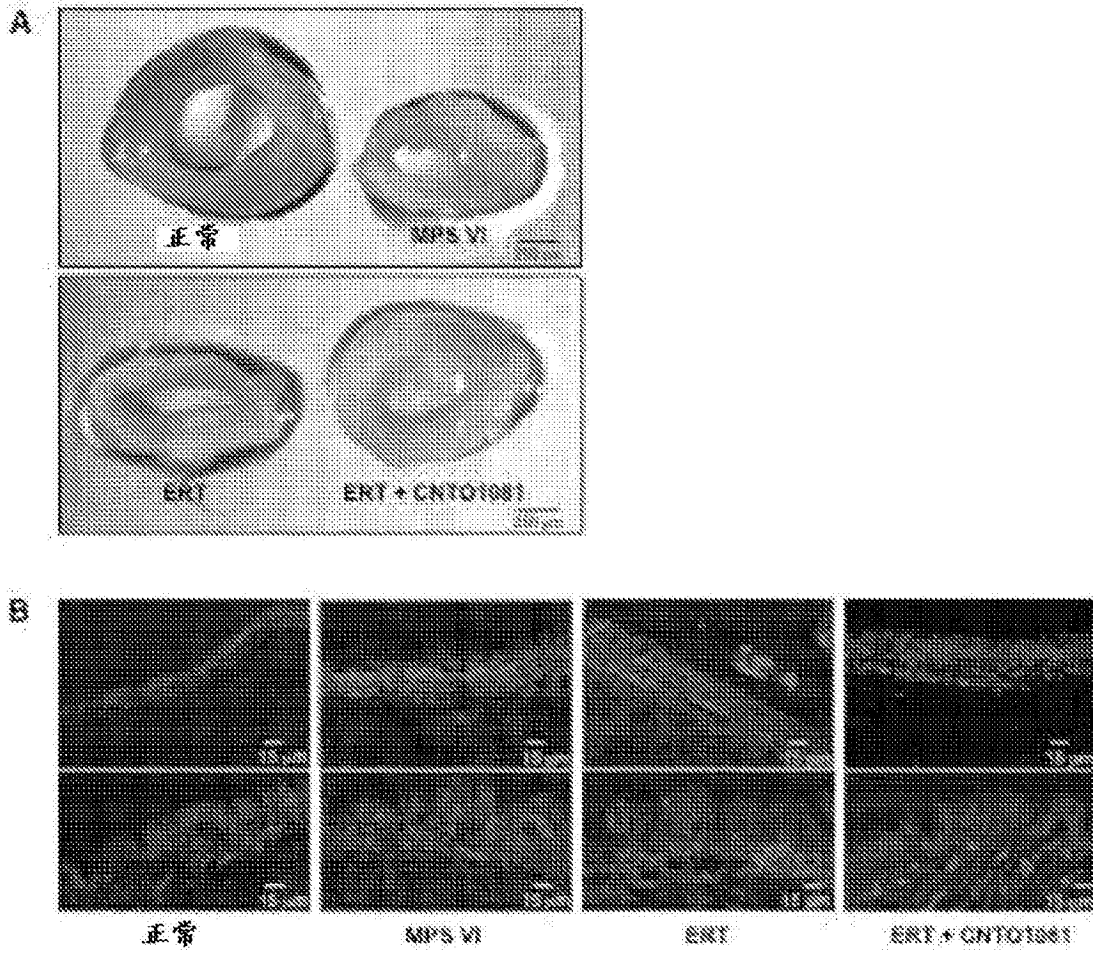


图4A-4B

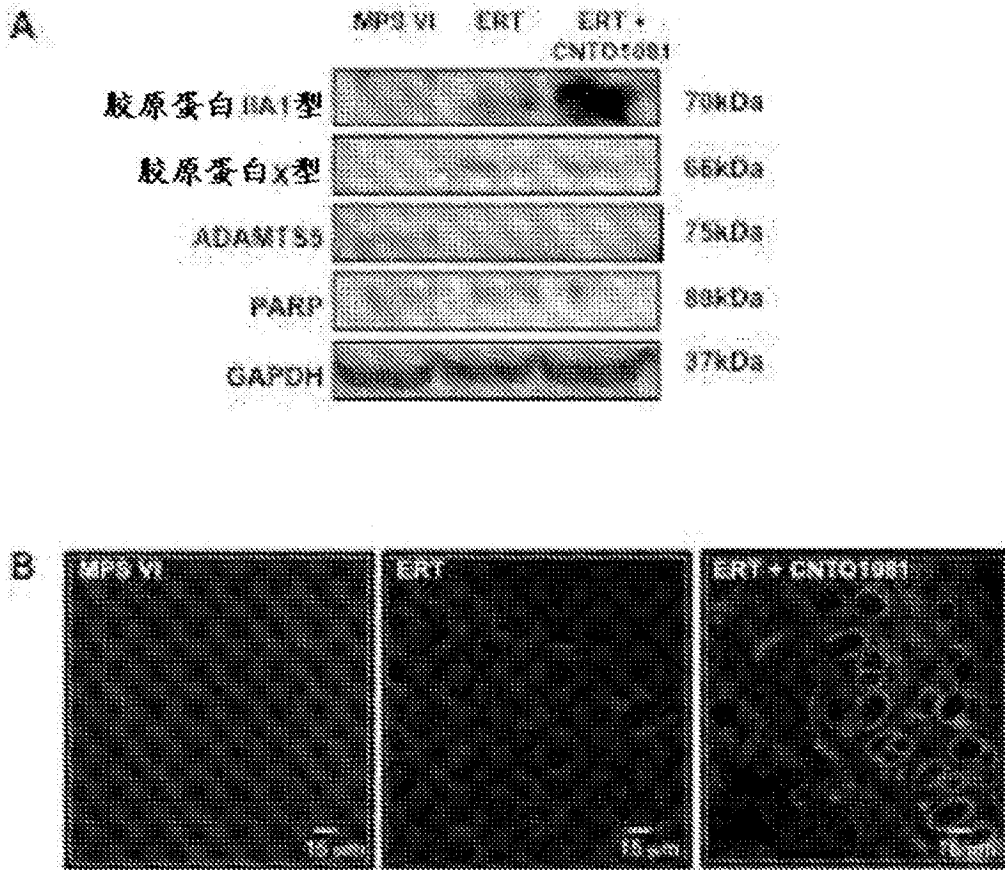


图5A-5B

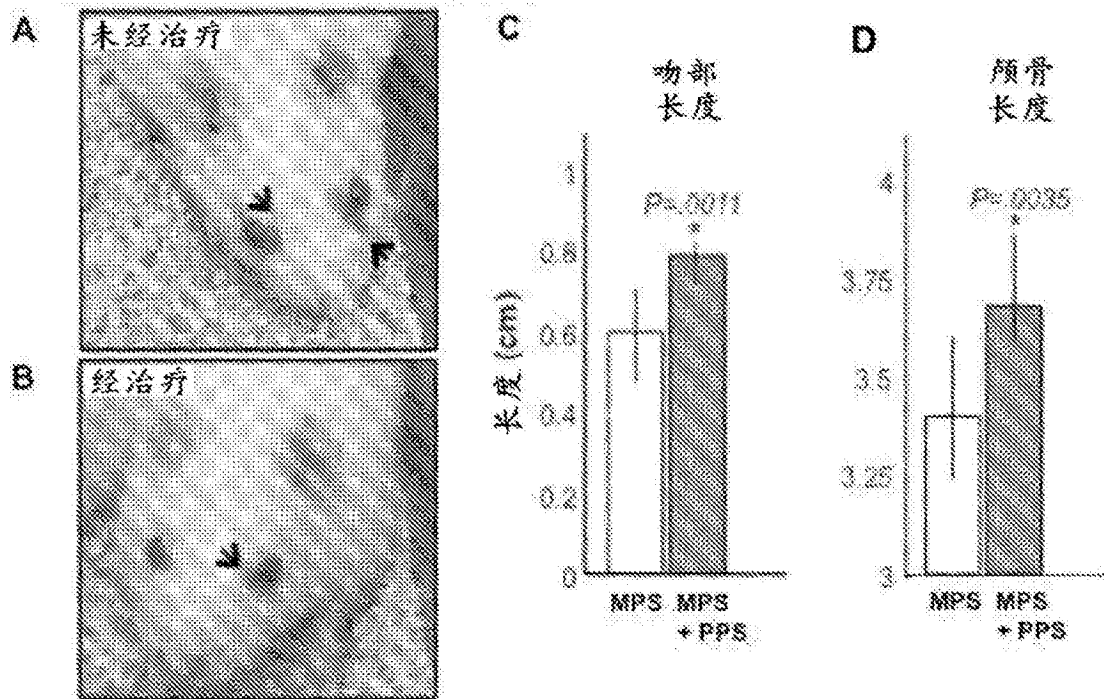


图6A-6D

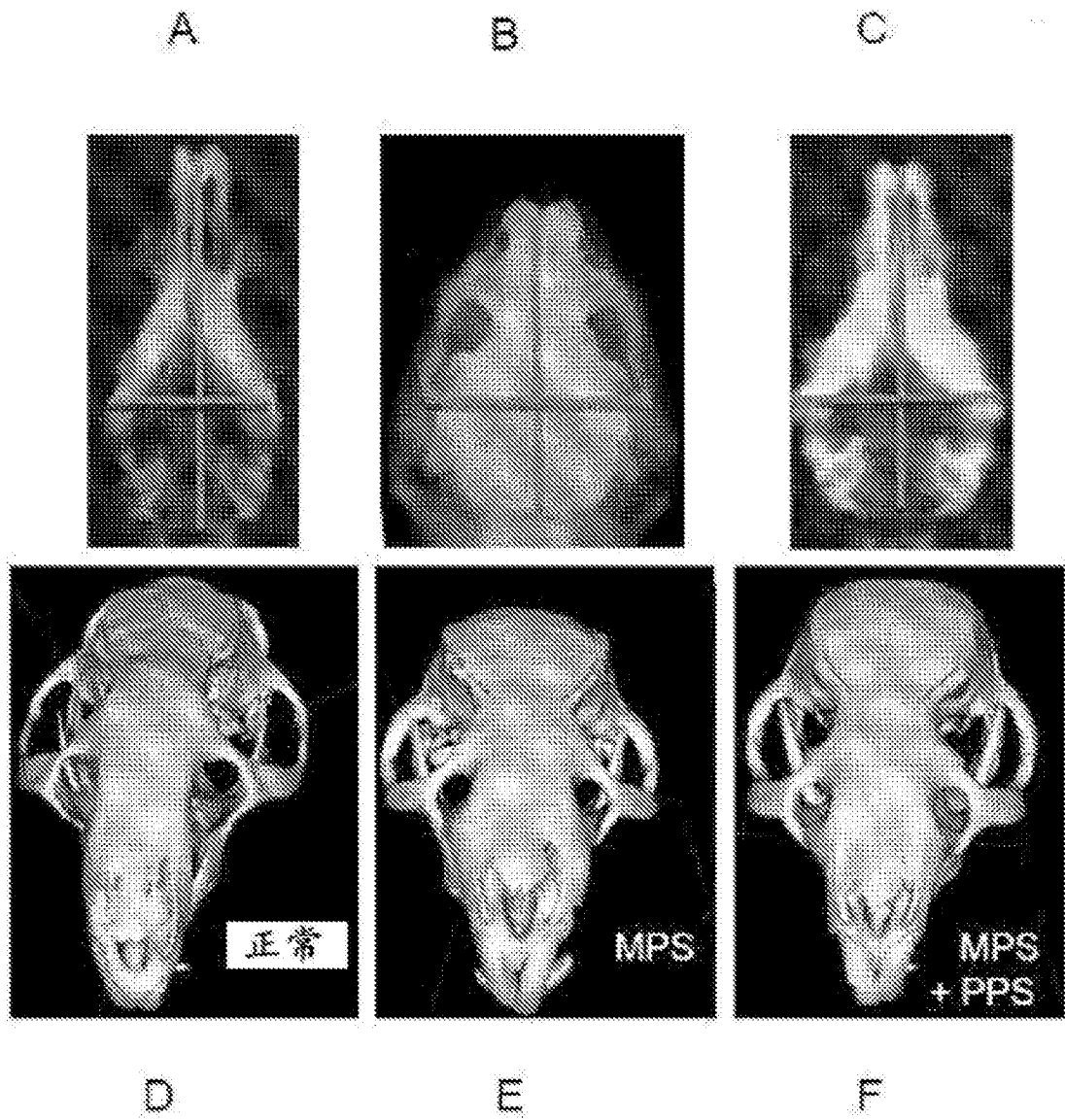


图7A-7F

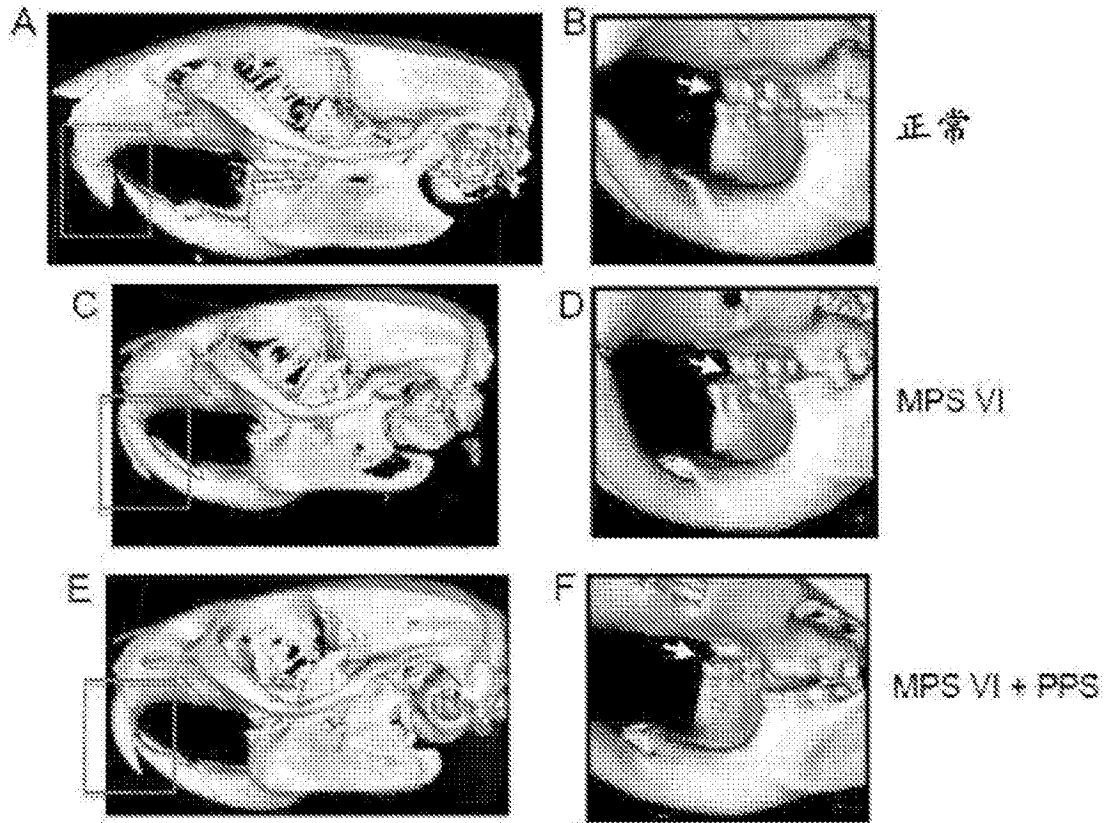


图8A-8F

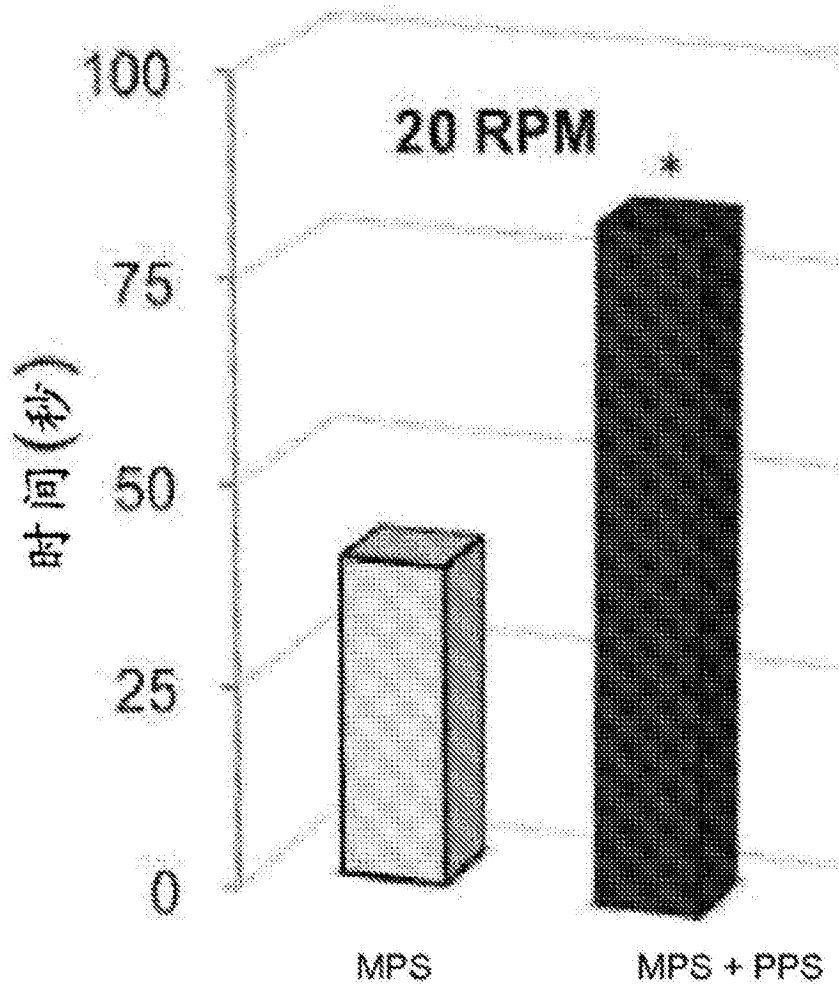


图9

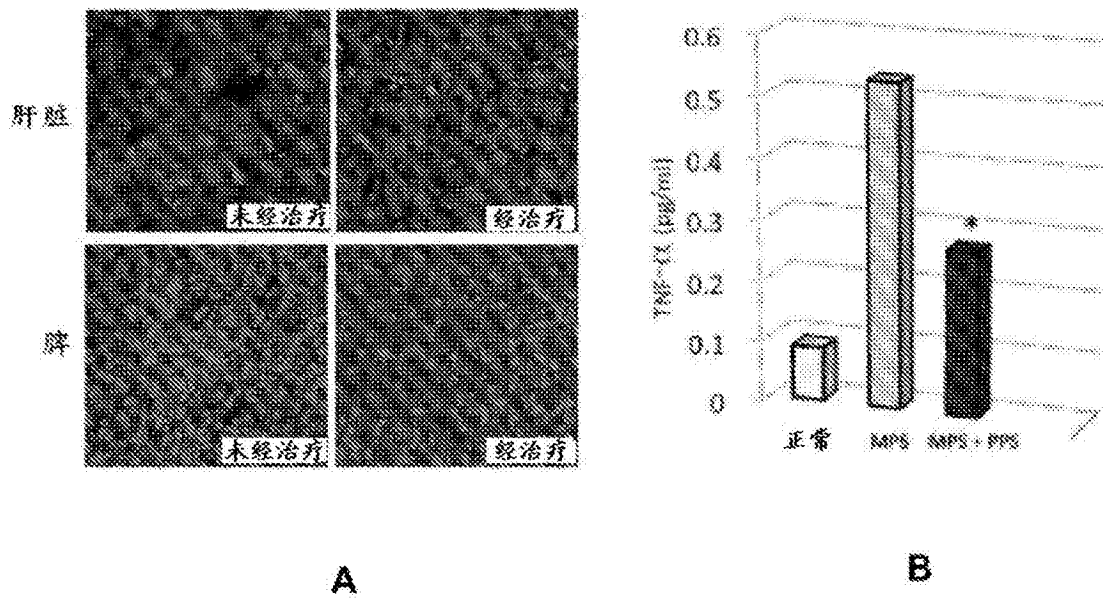


图10A-10B

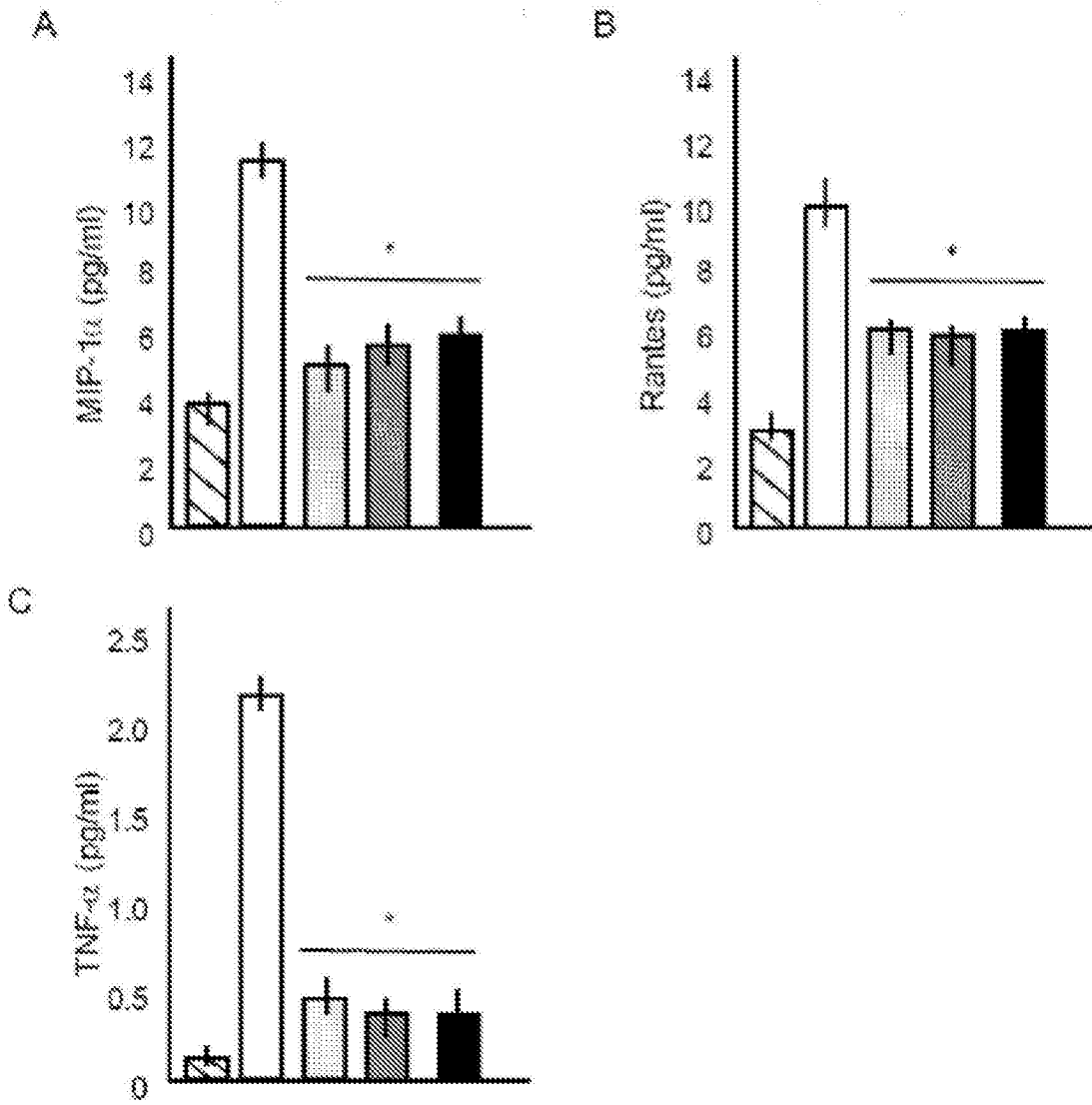


图11A-11C

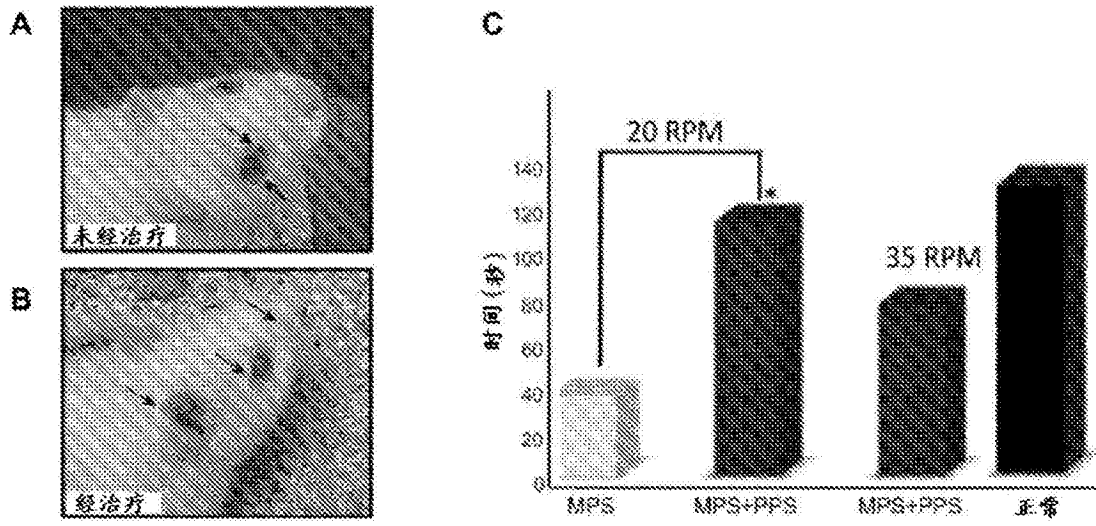


图12A-12C

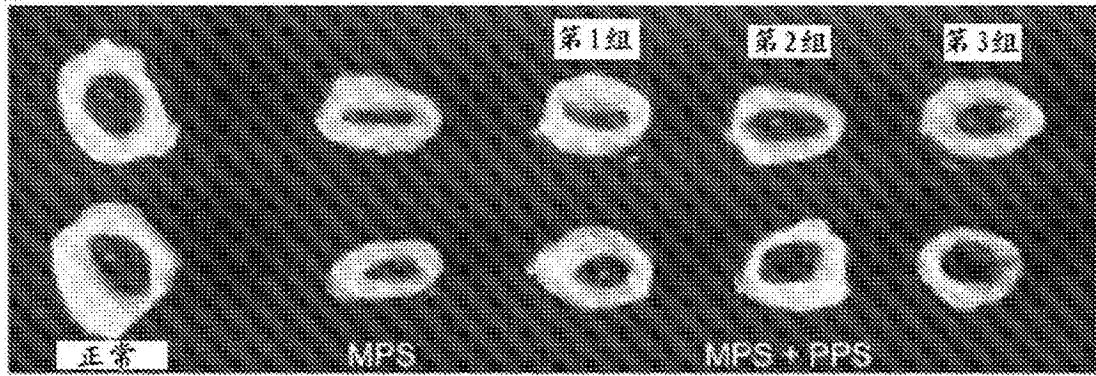


图13

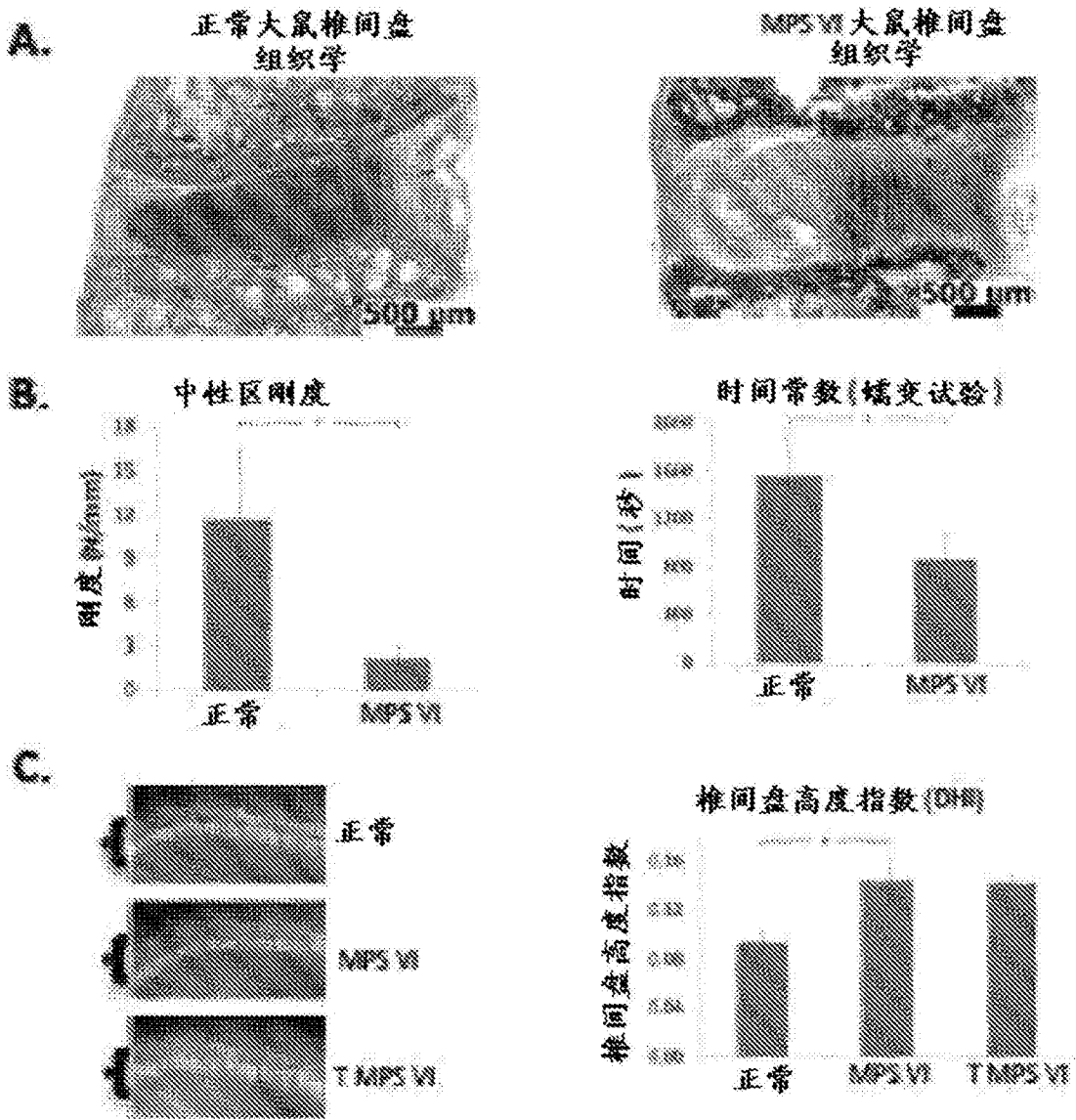


图14A-14C

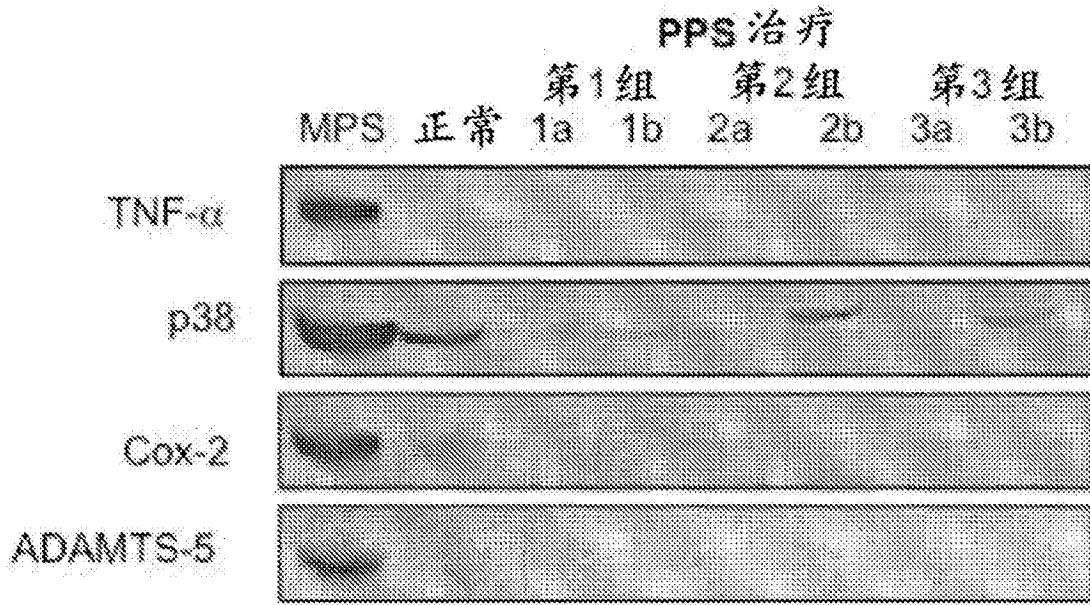


图15

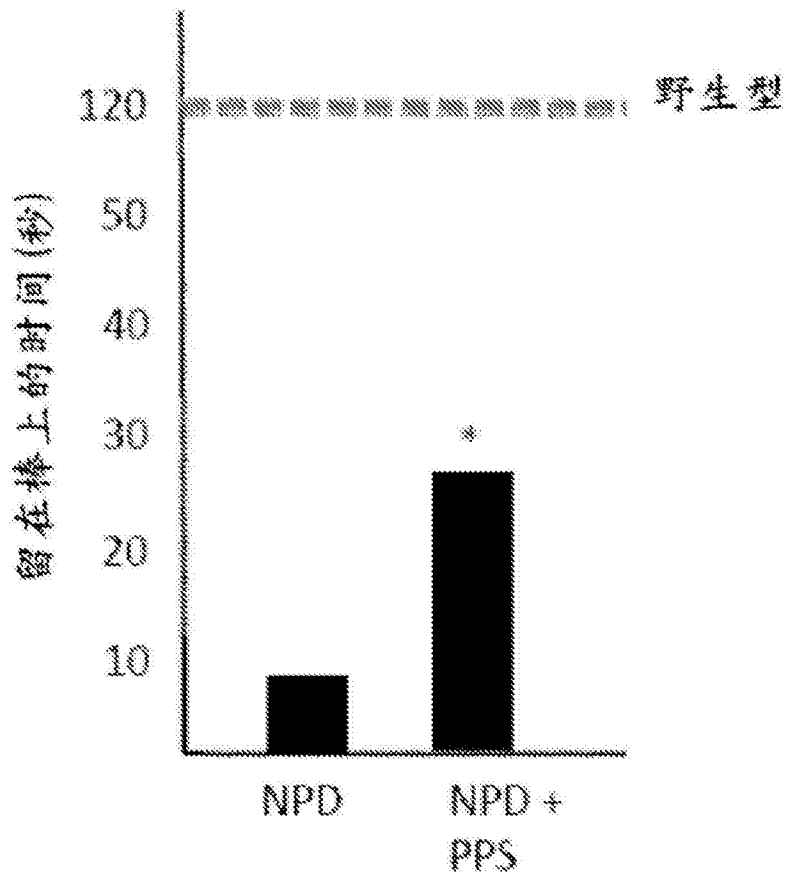


图16