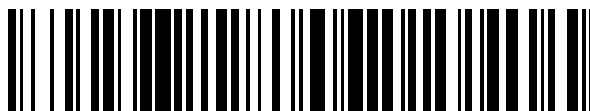


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 738 859**

51 Int. Cl.:

A61K 38/43 (2006.01)

A61P 3/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.08.2010 PCT/US2010/047057**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.03.2011 WO11025996**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.08.2010 E 10812683 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.05.2019 EP 2470199**

54 Título: **Terapia de sustitución de la enzima de aumento de la dosis para el tratamiento de la deficiencia de esfingomielinasa ácida**

30 Prioridad:

28.08.2009 US 238113 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

27.01.2020

73 Titular/es:

**ICAHN SCHOOL OF MEDICINE AT MOUNT SINAI
(50.0%)**

**One Gustave L. Levy Place
New York, NY 10029, US y
GENZYME CORPORATION (50.0%)**

72 Inventor/es:

**SCHUCHMAN, EDWARD, H.;
DESNICK, ROBERT, J.;
COX, GERALD, F.;
ANDREWS, LAURA, P. y
MURRAY, JAMES, M.**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 738 859 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Terapia de sustitución de la enzima de aumento de la dosis para el tratamiento de la deficiencia de esfingomielinasa ácida

1. Introducción

- 5 La invención se refiere a la terapia de sustitución de la enzima de aumento de la dosis que utiliza la esfingomielinasa ácida (ASM) para el tratamiento de sujetos humanos que tienen deficiencia de esfingomielinasa ácida (ASMD) y, en particular, las manifestaciones no neurológicas de la Enfermedad de Niemann-Pick (NPD) y, en ciertas realizaciones, NPD de tipo B.

2. Antecedentes

- 10 La esfingomielinasa ácida, E.C.3.1.4.12, (ASM) es una enzima fosfodiesterasa lisosomal que hidroliza la esfingomielina, una sustancia de almacenamiento de fosfolípidos que se encuentra en el cerebro, el hígado, los pulmones, el bazo y los ganglios linfáticos, a ceramida y fosforilcolina. Las deficiencias en la actividad de la ASM dan como resultado la incapacidad del cuerpo para descomponer la esfingomielina, causando una forma de la enfermedad de almacenamiento lisosomal denominada enfermedad de Niemann-Pick.

- 15 La enfermedad de Niemann-Pick es un trastorno hereditario autosómico recesivo del almacenamiento de lípidos que se caracteriza por la acumulación excesiva de esfingomielina en los lisosomas de células tales como los macrófagos y las neuronas, que afectan la función celular normal. La Niemann-Pick de Tipo A es una enfermedad neurodegenerativa rápidamente progresiva en bebés y generalmente da como resultado la muerte dentro de los dos o tres años de edad. La Niemann-Pick de Tipo B da como resultado el agrandamiento del hígado y el bazo, y la dificultad respiratoria con la muerte generalmente como consecuencia de la edad adulta temprana. Estas dos formas de enfermedad de Niemann-Pick que están asociadas con deficiencias de ASM se denominan colectivamente en la presente memoria como enfermedad de Niemann-Pick, o deficiencia de ASM (ASMD). Otros tipos de enfermedad de Niemann-Pick, por ejemplo, de Tipo C, no implican mutaciones en el gen ASM y no son generalmente atribuibles a la función de ASM. La naturaleza de los defectos bioquímicos y moleculares que subyacen a la notable heterogeneidad clínica de los subtipos A y B sigue siendo desconocida. Si bien los pacientes con ambos subtipos tienen actividad residual de la ASM (alrededor del 1 a 10% de lo normal), el análisis bioquímico no puede distinguir los dos fenotipos de manera confiable. Además, el curso clínico de la NPD de tipo B es muy variable, y actualmente no es posible correlacionar la gravedad de la enfermedad con el nivel de actividad residual de la ASM.

- 20 NPD se produce más frecuentemente entre individuos de ascendencia judía Ashkenazi que en la población general. Se estima que la incidencia de la enfermedad de Tipo A entre los judíos Ashkenazi es de aproximadamente 1 en 40000, una frecuencia genética (q) de aproximadamente 1 en 200 y una frecuencia portadora heterocigota (2 pq) de 1 en 100 (Goodman, 1979, en "Genetic Disorders Among The Jewish People", John Hopkins Univ. Press, Baltimore, pp. 96-100). La incidencia de portadores heterocigotos de NPD de tipo B en la población judía Ashkenazi es menos frecuente (Goodman, a continuación). La frecuencia de portadores heterocigotos combinados para NPD de los tipos A y B se ha estimado en alrededor de 1 en 70 entre los individuos de ascendencia judía Ashkenazi. Aunque el diagnóstico enzimático de los pacientes afectados con NPD de tipo A o B se puede realizar de manera confiable (Spence y Callahan, a continuación), la detección enzimática de heterocigotos obligados ha demostrado ser problemática, particularmente utilizando leucocitos periféricos como fuente de enzimas. Presumiblemente, la aparición de esfingomielinasas neutras en algunas fuentes y/o la presencia de actividad de la ASM residual resultante del alelo mutante ha contribuido a la incapacidad de discriminar de manera confiable los portadores para cualquier subtipo de enfermedad. Incluso el uso de fibroblastos de piel cultivados, que no expresan la esfingomielinasa neutra, no ha proporcionado resultados inequívocos con heterocigotos. En estudios epidemiológicos realizados en países individuales, la incidencia combinada de la enfermedad de Niemann-Pick A y B en varios países del mundo se estima que varía de 1 en 167000 a 1 en 250000 recién nacidos (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). La tasa del portador heterocigoto se cree que varía de 1 en 200 a 1 en 250 individuos.

- 25 La terapia de sustitución enzimática se ha utilizado para otras enfermedades de almacenamiento lisosomal. La terapia de sustitución enzimática intenta complementar la actividad enzimática deficiente con la enzima suministrada de forma exógena. En el caso de la terapia de sustitución enzimática para la enfermedad de Niemann-Pick, el objetivo sería permitir que el individuo afectado procese la esfingomielina y evite su acumulación dentro de los lisosomas. Para ser eficaz, dicha terapia inicialmente requeriría una cantidad suficientemente grande de la enzima de sustitución para descomponer la esfingomielina acumulada, así como la administración continua de la enzima de sustitución para evitar una mayor acumulación de esfingomielina.

3. Compendio

- 55 En resumen, la presente invención proporciona una esfingomielinasa ácida (ASM) para uso en un método para tratar una deficiencia de esfingomielinasa ácida en un sujeto humano, en donde el método comprende administrar ASM:

(a) en un régimen para reducir el sustrato de esfingomielina acumulado que comprende:

(i) administrar una dosis inicial no tóxica, baja de ASM, en donde dicho intervalo de dosis inicial es de 0,05 mg/kg a 0,275 mg/kg de ASM;

5 (ii) administrar dosis sucesivamente más altas de ASM y controlar al sujeto para uno o más efectos secundarios adversos después de cada dosis sucesiva según lo indicado por la alta concentración de bilirrubina total, la alta concentración de ceramida plasmática, la alta concentración de proteína C reactiva plasmática (CRP), o una reacción adversa que tiene una relación casual con el tratamiento, en donde dicha dosis sucesivamente más alta es de 0,1 a 1,0 mg/kg más alta que la dosis anterior o de 0,1 a 0,5 mg/kg más alta que la dosis anterior; y

10 (b) en un régimen de mantenimiento que comprende la administración de una dosis igual o inferior a la dosis máxima tolerada por el sujeto como dosis de mantenimiento para el sujeto, en donde dicha dosis máxima tolerada por el sujeto humano es de 1 mg/kg a 3 mg/kg.

Además, la presente invención proporciona una esfingomielinasa ácida (ASM) para su uso en un método para tratar una deficiencia de esfingomielinasa ácida en un sujeto humano, en donde el método comprende administrar ASM en un régimen de dosis de escalado en las siguientes dosis secuenciales:

15 (a) 0,1 mg/kg,

(b) 0,3 mg/kg, y

(c) 0,6 mg/kg,

en donde cada dosis se administra al menos dos veces, y cada dosis se administra a intervalos de dos semanas, y en donde el sujeto se controla por los efectos secundarios tóxicos antes de aumentar la dosis al siguiente nivel.

20 La invención se refiere a la terapia de sustitución enzimático de aumento de la dosis para el tratamiento de sujetos humanos que tienen ASMD, particularmente sujetos que tienen manifestaciones no neurológicas de NPD, y en realizaciones particulares, NPD del tipo B. Más particularmente, la enzima, ASM, se administra a dichos pacientes a una dosis inicial baja y no tóxica que luego se aumenta en las administraciones posteriores. La dosis más alta de ASM tolerada por el paciente puede utilizarse después como una dosis de mantenimiento. Alternativamente, una
25 dosis terapéuticamente eficaz menor que la dosis más alta tolerada puede utilizarse como una dosis de mantenimiento.

La invención se basa, en parte, en el descubrimiento de que las dosis de ASM que serían necesarias para eliminar el sustrato de esfingomielina acumulado en sujetos humanos, es decir, pacientes con ASMD o pacientes con
30 Niemann-Pick, producen efectos secundarios tóxicos (incluyendo los signos clínicos de toxicidad). Esto es especialmente sorprendente en la forma menos grave de ASMD, pacientes con NPD de tipo B que son deficientes pero que tienen al menos algo de actividad enzimática.

Más particularmente, el tratamiento de NPD necesitaría dosis suficientemente altas para lograr una distribución adecuada de la enzima ASM en órganos de patología (por ejemplo, en particular, el hígado, bazo, pulmones,
35 corazón, riñón y cerebro). Los estudios en un modelo de ratón knockout de la ASM (ratones ASKMO) mostraron que la mayoría de la ASM humana recombinante (rhASM) administrada se distribuye en el hígado y el bazo, donde reduce el sustrato, pero en mucho menor grado en pulmón, corazón y cerebro (Miranda et al. FASEB 2000, 14:1988; véase también, la Figura 9B de He et al., 1999, Biochimica et Biophysica Acta 1432:251-264). En estudios posteriores que utilizaron dosis más altas de rhASM en el modelo de ratón ASMKO, el sustrato se redujo y no se observó toxicidad a dosis $\leq 3,0$ mg/kg; de hecho, no se observaron síntomas clínicos de toxicidad hasta que se
40 utilizaron dosis ≥ 10 mg/kg. Véase, "Dose Responsive Toxicological Findings Following Intravenous Administration of Recombinant Human Acid Sphingomyelinase (rhASM) to Acid Sphingomyelinase knock-out (ASKMO) Mice. C. Nickerson, J. Murray, A. Vitsky, M. Hawes, S. Ryan, P. Ewing, B. Thurberg, L. Andrews. Dept Pharm/Tox, Pathology, Genzyme Corp., Framingham, MA., American Society of Human Genetics 2005; y Elevations of Pro-Inflammatory Cytokines and Decreases in Cardiovascular Hemodynamics Following Intravenous Administration of Recombinant
45 Human Acid Sphingomyelinase (rhASM) to Acid Sphingomyelinase Knock-out (ASKMO) Mice. J. Murray, A.M. D'Angona, C. Nickerson, A. Vitsky, M. Hawes, S. Ryan, P. Ewing, B. Thurberg, L. Andrews. Dept. Pharmacology/Toxicology & Pathology, Genzyme Corp., Framingham, MA., Society of Toxicology 2006.

Basándonos en estos datos de ASKMO, tratamos a sujetos humanos con ASMD no neuronopáticos con una dosis máxima conservadora de 1,0 mg/kg de rhASM como se describe en la sección 6, a continuación. De manera
50 bastante inesperada, la toxicidad en los sujetos humanos, incluyendo la aparición de sucesos adversos relacionados con síntomas clínicos, se observó utilizando dosis tan bajas como 0,3 mg/kg. Este resultado fue especialmente sorprendente, ya que la enzima ASM está ausente en el modelo de ratón Knock out que debería reflejar una afección más grave que en estos sujetos humanos que tienen al menos cierta actividad enzimática y una enfermedad relativamente leve.

- Si bien no se pretende que esté limitado por ninguna teoría, los efectos secundarios tóxicos que se producen con el tratamiento con ASM pueden deberse a la descomposición del sustrato de esfingomielina almacenado en el paciente con ASMD y la liberación del producto, ceramida que es pro-apoptótica e induce la respuesta de una citoquina pro inflamatoria e hiperbilirrubinemia. Para abordar este problema, hemos desarrollado un régimen para permitir la administración segura de altas dosis de la enzima ASM necesaria para lograr una distribución adecuada en los órganos de la patología. Según este régimen, el tratamiento inicial con ASM a dosis muy bajas se utiliza para lograr una degradación lenta del sustrato almacenado que se acompaña de menos efectos secundarios. A medida que se agota el sustrato en el sujeto (ya que el sustrato de almacenamiento se “reduce”), la dosis se puede ir aumentando de manera segura.
- Según este protocolo, una dosis baja, no tóxica, de la enzima ASM se administra inicialmente a un paciente con una enfermedad NPD y la dosis se incrementa con el tiempo. A medida que aumenta la dosis de la enzima ASM, se puede controlar al paciente para determinar la concentración total de bilirrubina, la producción de reactantes de fase aguda, la producción de mediadores inflamatorios y los sucesos adversos relacionados. La administración de una dosis baja de ASM y el aumento de la dosis facilitan la reducción de la esfingomielina acumulada. Una vez que el paciente está reducido, se pueden administrar al paciente de manera segura dosis más altas para asegurar una distribución adecuada de la enzima ASM a los órganos objetivo (por ejemplo, hígado, bazo, pulmones, corazón, riñón, cerebro, médula ósea, esqueleto, articulaciones, etc.). En ciertas realizaciones, la dosis máxima tolerada por el paciente puede utilizarse como la dosis de mantenimiento. En algunas realizaciones, en función de la afección de un paciente, la dosis de mantenimiento puede aumentar o disminuir con el tiempo.
- En ciertas realizaciones, el tratamiento del paciente se controla midiendo los niveles de esfingomielina plasmática, los niveles de ceramida plasmática, la producción de “reactantes de fase aguda” y los mediadores inflamatorios que son una medida de las respuestas inflamatorias, concentraciones de bilirrubina (total, directa, e indirecta), y/u otros marcadores bioquímicos para asegurar una respuesta estable antes de aumentar la dosis al siguiente nivel. Estos marcadores incluyen, pero no se limitan a, proteína C reactiva (CRP) o CRP de alta sensibilidad (hs-CRP), citoquinas (por ejemplo, IL-8, IL-6), calcitonina y ferritina. En realizaciones específicas, el paciente se puede controlar por uno o más sucesos adversos relacionados, que pueden incluir, pero no se limitan a, síntomas constitucionales (por ejemplo, fiebre, náuseas, vómitos, dolor, mialgia) e ictericia.
- Se prefieren dosis menores de 1 mg/kg para iniciar el tratamiento. La dosis inicial se aumenta sucesivamente hasta que se alcanza una dosis terapéutica. Dicho aumento de la dosis puede utilizarse para determinar la dosis más alta tolerada. Por ejemplo, una vez que el paciente está reducido del sustrato de esfingomielinasa acumulado, la dosis puede aumentarse aún más hasta que se observe toxicidad. La dosis de mantenimiento se puede ajustar en consecuencia, y se puede reajustar de forma continua y periódica en función del estado del paciente.
- En general, la presente invención se refiere a una ASM para su uso en un método para tratar un sujeto humano que tiene una deficiencia de esfingomielinasa ácida, comprendiendo el método: (a) un régimen para reducir el sustrato de esfingomielina acumulada en el sujeto humano que comprende: (i) administrar una dosis inicial baja, no tóxica de ASM al sujeto humano; (ii) administrar sucesivamente dosis más altas de ASM al sujeto humano, y controlar al sujeto por uno o más efectos secundarios adversos después de cada dosis sucesiva como se indica por la elevada bilirrubina o un suceso adverso relacionado; y (b) un régimen de mantenimiento que comprende administrar una dosis igual a o menor que la dosis más alta tolerada por el sujeto como la dosis de mantenimiento para el sujeto.
- Además, la presente invención se refiere a una ASM para su uso en un método para tratar un sujeto humano que tiene una deficiencia de esfingomielinasa ácida, comprendiendo el método administrar rhASM en un régimen de dosis escalonada a las siguientes dosis secuenciales: 0,1 mg/kg; 0,3 mg/kg, 0,6 mg/kg; y 1,0 mg/kg, en donde cada dosis de rhASM se administra al menos dos veces, y cada dosis se administra a intervalos de dos semanas, y en donde el paciente se controla por efectos secundarios tóxicos antes de aumentar la dosis al siguiente nivel.
- En otra realización específica, se describe en la presente memoria una esfingomielinasa ácida (ASM) para su uso en un método para tratar una deficiencia de esfingomielinasa ácida en un sujeto humano preparada para administrarse: (a) en un régimen para reducir un sustrato de esfingomielinasa acumulado que comprende: (i) administrar una dosis inicial baja, no tóxica que varía de 0,05 mg/kg a 0,275 mg/kg de esfingomielinasa ácida (ASM); (ii) administrar dosis sucesivamente más altas de ASM de aproximadamente 0,1 a 1,0 mg/kg o aproximadamente de 0,1 a 0,5 mg/kg más altas que las dosis anteriores, y controlar el sujeto por uno o más efectos secundarios adversos después de cada dosis sucesiva como se indica por la bilirrubina elevada o un suceso adverso relacionado; y (b) en un régimen de mantenimiento que comprende administrar una dosis igual a o menor de la dosis más alta tolerada por el sujeto como dosis de mantenimiento para el sujeto en donde dicha dosis más alta tolerada por el sujeto humano es de 1 mg/kg a 3 mg/kg.
- En otra realización específica, se describe en la presente memoria una ASM recombinante humana para su uso en un método para tratar una deficiencia de esfingomielinasa ácida en un sujeto humano preparada para administrarse un régimen de dosis escalonada a las siguientes dosis secuenciales: 0,1 mg/kg; 0,3 mg/kg; 0,6 mg/kg; y 1,0 mg/kg, en donde cada dosis se administra al menos dos veces, y cada dosis se administra a intervalos de dos semanas, y en donde el sujeto se controla por efectos secundarios tóxicos antes de aumentar la dosis al siguiente nivel.

3.1 Terminología

- 5 Como se utilizan en la presente memoria, los términos “aproximadamente” y “aproximadamente” se utilizan indistintamente en el contexto de un valor dado para referirse a un intervalo alrededor de un valor dado, en donde el valor resultante es sustancialmente el mismo que el valor dado expresamente. En una realización específica, “aproximadamente” significa dentro del 10%, 15%, 25% de un valor o intervalo dado.
- Como se utiliza en la presente memoria, el término “humano anciano” se refiere a un humano de 65 años o mayor.
- Como se utiliza en la presente memoria, el término “adulto humano” se refiere a un humano que tiene 18 años o más.
- 10 Como se utiliza en la presente memoria, el término “niño humano” se refiere a un humano que tiene de 1 a 18 años de edad.
- Como se utiliza en la presente memoria, el término “bebé humano” se refiere a un recién nacido a un humano de 1 año de edad.
- Como se utiliza en la presente memoria, el término “niño humano” se refiere a un humano que tiene de 1 a 3 años de edad.
- 15 Como se utiliza en la presente memoria, el término “suceso adverso” se refiere a “cualquier acontecimiento médico desfavorable en un paciente o sujeto de investigación clínica a quien se le administró un producto farmacéutico” como se define en la terminología estándar del Clinical Data Interchange Standards Consortium Study Data Tabulation Model v.3.1.1. Un suceso adverso relacionado” es un suceso adverso que tiene una relación casual con el tratamiento.
- 20 Como se utiliza en la presente memoria, el término “dosis de mantenimiento” y similares se refiere a una dosis administrada a pacientes con ASMD para mantener el efecto terapéutico deseado. En realizaciones específicas, la dosis de mantenimiento mantiene uno, dos, tres, cuatro o más los siguientes efectos terapéuticos deseados: (i) una reducción en el volumen del bazo según se evalúa mediante técnicas conocidas en la técnica, por ejemplo MRI; (ii) una reducción en los niveles de esfingomielina hepática según lo evaluado por técnicas conocidas en la técnica, por ejemplo, análisis bioquímico y/o análisis histomorfométrico de muestras de hígado; (iii) un aumento en la capacidad de ejercicio según lo evaluado por técnicas conocidas en la técnica, por ejemplo, la máxima carga de trabajo por ergometría del ciclo, incluyendo el porcentaje de carga máxima predicha, el consumo máximo de oxígeno y la producción de dióxido de carbono; (iv) un aumento en la función pulmonar según lo evaluado por técnicas conocidas en la técnica, por ejemplo, las técnicas descritas en American Thoracic Society, 1991, Am. Rev. Respir. Dis. 144: 1202-1218, tal como la capacidad de difusión (DLco), el porcentaje predicho de la capacidad vital forzada (FVC) según lo medido, por ejemplo, mediante técnicas espirométricas, el volumen espiratorio forzado dentro de 1 segundo (FEV₁) según lo medido, por ejemplo, mediante técnicas espirométricas, y capacidad pulmonar total; (v) una disminución en la esfingomielina del lavado alveolar bronquial (BAL); (vi) una disminución en el volumen hepático según lo evaluado por técnicas conocidas en la técnica, por ejemplo, MRI; (vii) una mejora en la apariencia pulmonar según lo evaluado por técnicas conocidas en la técnica, por ejemplo, tomografía computarizada de alta resolución (CT) o radiografía de tórax; (viii) una disminución en la concentración de esfingomielina en el hígado, la piel, el plasma y la mancha de sangre seca (DBS), como se mide, por ejemplo, por espectrometría de masas en tándem; (ix) una reducción o mejora de la gravedad de la ASMD y/o un síntoma asociado con la misma; (x) una reducción en la duración de un síntoma asociado con la ASMD; (xi) la prevención en la recurrencia de un síntoma asociado con la ASMD; (xii) una reducción en la hospitalización del sujeto; (vi) reducción de la duración de la hospitalización; (xiii) un aumento en la supervivencia del sujeto; (xiv) una reducción de la mortalidad; (xv) una disminución en la tasa de hospitalización; (xvi) una reducción en el número de síntomas asociados con la ASMD; (xvii) un aumento en la supervivencia sin síntomas de los pacientes con ASMD; (xviii) una mejora en la función neurológica (por ejemplo, función psicomotora, capacidad de respuesta social, etc.); (xix) una mejora en el aclaramiento pulmonar medido, por ejemplo, por el recuento y perfil de células BAL; (xx) una disminución en los niveles séricos de quitotriosidasa; (xxi) una disminución en los niveles séricos del ligando 18 (CCL 18) de la quimiocina (c-c); (xxii) una mejora en el perfil lipídico (por ejemplo, HDL, LDL, colesterol, triglicéridos, y relación colesterol total:HDL); y (xxiii) mejora de la calidad de vida según lo evaluado por, por ejemplo, un cuestionario. En ciertas realizaciones, la dosis de mantenimiento es la dosis máxima o máxima tolerada por un paciente.
- 40
- 45
- 50 En algunas realizaciones, la dosis de mantenimiento es una dosis de entre 1 mg/kg a 3 mg/kg, 1 mg/kg a 2,5 mg/kg, 1 mg/kg a 2,75 mg/kg, 1,5 mg/kg a 2,5 mg/kg, 1,5 mg/kg a 2,75 mg/kg, 2 mg/kg a 2,5 mg/kg, 2 mg/kg a 2,75 mg/kg, 2,5 mg/kg a 2,75 mg/kg, o 2,5 mg/kg a 3 mg/kg de ASM. En algunos aspectos, la dosis de mantenimiento es una dosis de entre 0,5 mg/kg a 1,5 mg/kg, 0,75 mg/kg a 1,25 mg/kg, 3 mg/kg a 4 mg/kg, 3 mg/kg a 5 mg/kg, 4 mg/kg a 5 mg/kg, 2 mg/kg a 5 mg/kg o 5 mg/kg a 10 mg/kg de ASM. En ciertos aspectos de la descripción, la dosis de mantenimiento es una dosis de entre 5 mg/kg a 15 mg/kg, 10 mg/kg a 15 mg/kg, 10 mg/kg a 20 mg/kg, 15 mg/kg a 20 mg/kg, 20 mg/kg a 30 mg/kg, 25 mg/kg a 50 mg/kg, 30 mg/kg a 40 mg/kg, 30 mg/kg a 45 mg/kg o 40 mg/kg a 50 mg/kg de ASM. En algunas realizaciones, la dosis de mantenimiento es 1 mg/kg, 1,1 mg/kg, 1,2 mg/kg, 1,25 mg/kg, 1,3 mg/kg, 1,4 mg/kg, 1,5 mg/kg, 1,75 mg/kg, o 2 mg/kg de ASM. En ciertas realizaciones, la dosis de mantenimiento
- 55

es 2,5 mg/kg, 2,75 mg/kg, o 3 mg/kg de ASM. En algunos aspectos, la dosis de mantenimiento es 0,75 mg/kg, 0,80 mg/kg, 0,85 mg/kg, 0,90 mg/kg, 0,95 mg/kg, 3,25 mg/kg, 3,5 mg/kg, 3,75 mg/kg, 4 mg/kg, 4,25 mg/kg, 4,5 mg/kg, 4,75 mg/kg, 5 mg/kg, 5,5 mg/kg, 6 mg/kg, 6,5 mg/kg, 7 mg/kg, 7,5 mg/kg, 8 mg/kg, 8,5 mg/kg, 9 mg/kg, 9,5 mg/kg o 10 mg/kg de ASM. En algunos aspectos descritos en la presente memoria la dosis de mantenimiento es 11 mg/kg, 12 mg/kg, 13 mg/kg, 14 mg/kg, 15 mg/kg, 20 mg/kg, 25 mg/kg, 30 mg/kg, 35 mg/kg, 40 mg/kg, 45 mg/kg o 50 mg/kg de ASM. En algunos otros aspectos, la dosis de mantenimiento es al menos 1 mg/kg, al menos 2 mg/kg, al menos 3 mg/kg, al menos 4 mg/kg, al menos 5 mg/kg, al menos 6 mg/kg, al menos 7 mg/kg, al menos 8 mg/kg de ASM siendo la dosis más alta 10 mg/kg de ASM. En ciertos otros aspectos la dosis de mantenimiento es al menos 10 mg/kg, al menos 15 mg/kg, al menos 20 mg/kg, al menos 25 mg/kg, al menos 30 mg/kg, o al menos 35 mg/kg de ASM siendo la dosis más alta 50 mg/kg.

Como se utiliza en la presente memoria, el término “dosis no tóxicas” y similares se refiere a una dosis administrada a pacientes con ASMD sin que dé como resultado uno, dos, tres o todos de los siguientes: (i) un suceso adverso relacionado moderado o grave como lo define un síntoma clínico que interfiere con el funcionamiento diario normal y necesita control, intervención o tratamiento adicionales, o un valor de laboratorio anormal o resultado de procedimiento de interés clínico que necesite control, tratamiento o investigación adicionales. Véase, por ejemplo, la terminología estándar del Clinical Data Interchange Standards Consortium Study Data Tabulation Model v.3.1.1; (ii) un valor de bilirrubina total mayor de 1,5 mg/dL, 1,75 mg/dL, 2,0 mg/dL, 2,1 mg/dL, 2,2 mg/dL, 2,3 mg/dL, 2,4 mg/dL, 2,5 mg/dL, 2,6 mg/dL, 2,7 mg/dL, 2,75 mg/dL, 2,8 mg/dL, 2,9 mg/dL, 3,0 mg/dL, 3,1 mg/dL, 3,2 mg/dL, 3,3 mg/dL, 3,4 mg/dL, 3,5 mg/dL, 3,6 mg/dL, 3,7 mg/dL, 3,8 mg/dL, 3,9 mg/dL o 4 mg/dL o en el intervalo de 2,1 mg/dL a 2,5 mg/dL, 2,1 mg/dL a 3,0 mg/dL, o 2,1 mg/dL a 4 mg/dL que dura más de 18 horas, 24 horas, 36 horas, 48 horas o 72 horas, 5 días, una semana, dos semanas o tres semanas después de la administración de la dosis de ASM; (iii) una concentración de ceramida plasmática mayor de 8,2 µg/mL, 8,3 µg/mL, 8,4 µg/mL, 8,5 µg/mL, 8,75 µg/mL, 9 µg/mL, 9,5 µg/mL, 10 µg/mL, 11 µg/mL, 12 µg/mL, 13 µg/mL, 14 µg/mL, 15 µg/mL, 16 µg/mL, 17 µg/mL, 18 µg/mL, 19 µg/mL, 20 µg/mL, 25 µg/mL, 30 µg/mL, 35 µg/mL, 40 µg/mL, 45 µg/mL, 50 µg/mL, 55 µg/mL, 60 µg/mL, 65 µg/mL, 70 µg/mL, 75 µg/mL, 80 µg/mL, o en el intervalo de 8,2 µg/mL a 10 µg/mL, 8,5 µg/mL a 10 µg/mL, 9 µg/mL a 12 µg/mL, 10 µg/mL a 12 µg/mL, 10 µg/mL a 15 µg/mL, 10 µg/mL a 20 µg/mL, 15 µg/mL a 20 µg/mL, o 20 µg/mL a 30 µg/mL 6 horas, 8 horas, 10 horas, 12 horas, 16 horas, 18 horas, 24 horas, 36 horas, 48 horas o 72 horas después de la administración de la dosis de ASM; o (iv) una respuesta/reacción de fase aguda. La “dosis no tóxica” de ASM puede variar dependiendo de, por ejemplo, la estabilidad de la enzima utilizada, la actividad de la enzima utilizada, y/o la vía de administración de la enzima. Por ejemplo, la dosis de una enzima ASM modificada con mayor actividad puede ser menor que la dosis de una ASM no modificada. Un experto en la técnica sería capaz de ajustar la dosis de la enzima administrada basado en la estabilidad de la enzima, la actividad de la enzima, y/o la vía de administración de la enzima.

Una reacción de fase aguda es una reacción temprana (generalmente, por ejemplo, dentro de 12 a 72 horas) después de la administración de ASM que es indicativa de una respuesta inflamatoria. Una respuesta de fase aguda puede evaluarse por un cambio en la concentración de un reactante de fase aguda (tal como, por ejemplo, CRP/hs-CRP, ferritina, fibrinógeno, hierro o transferrina), un cambio en el porcentaje de neutrófilos, un cambio en el tiempo de protrombina, o un cambio en el tiempo parcial de tromboplastina. En una realización específica, un aumento en la concentración de CRP/hs-CRP 6 horas, 8 horas, 12 horas, 18 horas, 24 horas, 36 horas, 48 horas o 72 horas después de la administración de una dosis de ASM en relación con la concentración de CRP/hs-CRP de un paciente antes de la administración de ASM se puede utilizar como una medición de una respuesta de fase aguda. En otra realización específica, una concentración de CRP/hs-CRP plasmática que es mayor que la concentración de CRP/hs-CRP plasmática normal 6 horas, 8 horas, 12 horas, 16 horas, 18 horas, 24 horas, 36 horas, 48 horas o 72 horas después de la administración de la dosis de ASM se puede utilizar como una medida de una respuesta de fase aguda. En ciertas realizaciones, una concentración de CRP/hs-CRP plasmática mayor de aproximadamente 8,1 mg/L, 8,2 mg/L, 8,3 mg/L, 8,4 mg/L, 8,5 mg/L, 9 mg/L, 9,5 mg/L, 10 mg/L, 11 mg/L, 12 mg/L, o en el intervalo de 8,5 mg/L a 10 mg/L, o 8,5 mg/L a 12 mg/L, o 10 mg/L a 12 mg/L 6 horas, 8 horas, 12 horas, 16 horas, 18 horas, 24 horas, 36 horas, 48 horas o 72 horas después de la administración de la dosis de ASM se puede utilizar como una medida de una respuesta de fase aguda.

En una realización específica, un aumento en la concentración de ferritina 6 horas, 8 horas, 12 horas, 16 horas, 18 horas, 24 horas, 36 horas, 48 horas o 72 horas después de la administración de una dosis de ASM en relación a la concentración de ferritina del paciente antes de la administración de ASM se puede utilizar como una medida de una respuesta de fase aguda. En otra realización específica, una concentración de ferritina plasmática que es mayor que la concentración de ferritina plasmática normal 6 horas, 8 horas, 12 horas, 18 horas, 24 horas, 36 horas, 48 horas o 72 horas después de la administración de la dosis de ASM se puede utilizar como una medida de una respuesta de fase aguda. En ciertas realizaciones, una concentración de ferritina plasmática mayor de aproximadamente 300 ng/mL, 325 ng/mL, 350 ng/mL, 375 ng/mL, 400 ng/mL, 425 ng/mL, 450 ng/mL, 475 ng/mL, 500 ng/mL, 525 ng/mL, 550 ng/mL, 575 ng/mL, 600 ng/mL, 625 ng/mL, 650 ng/mL, 675 ng/mL, 700 ng/mL, 725 ng/mL, 750 ng/mL, 775 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, o 1200 ng/mL o en el intervalo de 600 ng/mL a 800 ng/mL, 650 ng/mL a 850 ng/mL, 600 ng/mL a 1000 ng/mL, 600 ng/mL a 1200 ng/mL, 800 ng/mL a 1000 ng/mL, 900 ng/mL a 1000 ng/mL, o 1000 ng/mL a 1200 ng/mL 6 horas, 8 horas, 12 horas, 16 horas, 18 horas, 24 horas, 36 horas, 48 horas o 72 horas después de la administración de la dosis de ASM se puede utilizar como una medida de una respuesta de fase aguda.

5 En una realización específica, un aumento en la concentración de IL-8 sérico o plasmático 6 horas, 8 horas, 12 horas, 16 horas, 18 horas, 24 horas, 36 horas, 48 horas o 72 horas después de la administración de una dosis de ASM en relación con la concentración de IL-8 de un paciente antes de la administración de ASM se puede utilizar como una medida de una respuesta de fase aguda. En otra realización específica, una concentración de IL-8 sérico o plasmático que es mayor que la concentración de IL-8 plasmático normal 6 horas, 8 horas, 12 horas, 18 horas, 24 horas, 36 horas, 48 horas o 72 horas después de la administración de la dosis de ASM se puede utilizar como una medida de una respuesta de fase aguda. En ciertas realizaciones una concentración de IL-8 plasmático mayor de aproximadamente 24 pg/mL, 50 pg/mL, 75 pg/mL, 100 pg/mL, 200 pg/mL, 300 pg/mL, 400 pg/mL, 500 pg/mL, 600 pg/mL, 700 pg/mL, 800 pg/mL, o 900 pg/mL, 6 horas, 8 horas, 12 horas, 16 horas, 18 horas, 24 horas, 36 horas, 48 horas o 72 horas después de la administración de la dosis de ASM se puede utilizar como una medida de una respuesta de fase aguda.

15 En una realización específica, un aumento en la concentración de IL-6 sérico o plasmático 6 horas, 8 horas, 12 horas, 16 horas, 18 horas, 24 horas, 36 horas, 48 horas o 72 horas después de la administración de una dosis de ASM en relación con la concentración de IL-6 de un paciente antes de la administración de ASM se puede utilizar como una medida de una respuesta de fase aguda. En otra realización específica, una concentración de IL-6 sérico o plasmático que es mayor que la concentración de IL-6 sérico o plasmático normal 6 horas, 8 horas, 12 horas, 18 horas, 24 horas, 36 horas, 48 horas o 72 horas después de la administración de la dosis de ASM se puede utilizar como una medida de una respuesta de fase aguda. En ciertas realizaciones, una concentración de IL-6 plasmático de más de aproximadamente 4,4 pg/mL, 6 pg/mL, 8 pg/mL, 10 pg/mL 15 pg/mL, 20 pg/mL, 25 pg/mL, o 30 pg/mL, 6 horas, 8 horas, 12 horas, 16 horas, 18 horas, 24 horas, 36 horas, 48 horas o 72 horas después de la administración de la dosis de ASM se puede utilizar como una medida de una respuesta de fase aguda.

25 En una realización específica, un aumento en la concentración de calcitonina sérica o plasmática 6 horas, 8 horas, 12 horas, 16 horas, 18 horas, 24 horas, 36 horas, 48 horas o 72 horas después de la administración de una dosis de ASM en relación a la concentración de calcitonina de un paciente antes de la administración de ASM se puede utilizar como una medida de una respuesta de fase aguda. En otra realización específica, una concentración de calcitonina sérica o plasmática que es mayor que la concentración de calcitonina plasmática normal 6 horas, 8 horas, 12 horas, 18 horas, 24 horas, 36 horas, 48 horas o 72 horas después de la administración de la dosis de ASM se puede utilizar como una medida de una respuesta de fase aguda. En ciertas realizaciones, una concentración de calcitonina plasmática de más de aproximadamente 9,4 pg/mL, 20 pg/mL, 30 pg/mL, 40 pg/mL, 50 pg/mL, 75 pg/mL, 100 pg/mL, 150 pg/mL, 200 pg/mL, o 250 pg/mL, 6 horas, 8 horas, 12 horas, 16 horas, 18 horas, 24 horas, 36 horas, 48 horas o 72 horas después de la administración de la dosis de ASM se puede utilizar como una medida de una respuesta de fase aguda.

35 En una realización específica, un aumento en la concentración de fibrinógeno 6 horas, 8 horas, 12 horas, 16 horas, 18 horas, 24 horas, 36 horas, 48 horas o 72 horas después de la administración de una dosis de ASM en relación a la concentración de fibrinógeno del paciente antes de la administración de ASM se puede utilizar como una medida de una respuesta de fase aguda. En otra realización específica, una concentración de fibrinógeno plasmático que es mayor que la concentración de fibrinógeno plasmático normal 6 horas, 8 horas, 12 horas, 16 horas, 18 horas, 24 horas, 36 horas, 48 horas o 72 horas después de la administración de la dosis de ASM se puede utilizar como una medida de una respuesta de fase aguda. En ciertas realizaciones, una concentración de fibrinógeno plasmático de más de aproximadamente 350 mg/dL, 375 mg/dL, 400 mg/dL, 425 mg/dL, o 450 mg/dL, o en el intervalo de 350 mg/dL a 400 mg/dL, 350 mg/dL a 450 mg/dL o 400 mg/dL a 450 mg/dL 6 horas, 8 horas, 12 horas, 16 horas, 18 horas, 24 horas, 36 horas, 48 horas o 72 horas después de la administración de la dosis de ASM se puede utilizar como una medida de una respuesta de fase aguda.

45 En una realización, un aumento en el porcentaje de neutrófilos de los glóbulos blancos totales 6 horas, 8 horas, 12 horas, 16 horas, 18 horas, 24 horas, 36 horas, 48 horas o 72 horas después de la administración de una dosis de ASM en relación con el porcentaje de neutrófilos de los glóbulos blancos totales del paciente antes de la administración de ASM se puede utilizar como una medida de una respuesta de fase aguda. En otra realización, un aumento en el porcentaje de neutrófilos de los glóbulos blancos totales que es mayor que el porcentaje de neutrófilos normal de la concentración de los glóbulos blancos totales 6 horas, 8 horas, 12 horas, 16 horas, 18 horas, 24 horas, 36 horas, 48 horas o 72 horas después de la administración de la dosis de ASM se puede utilizar como una medida de una respuesta de fase aguda. En ciertas realizaciones, un aumento en el porcentaje de neutrófilos de los glóbulos blancos totales que es 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o mayor 6 horas, 8 horas, 12 horas, 16 horas, 18 horas, 24 horas, 36 horas, 48 horas o 72 horas después de la administración de la dosis de ASM se puede utilizar como una medida de una respuesta de fase aguda.

55 Como se utiliza en la presente memoria, el término “dosis bajas, no tóxicas” y similares en el contexto de la dosis o dosis iniciales administradas a un sujeto se refiere a una dosis que es la primera dosis o dosis de ASM administradas a un sujeto para tratar la ASMD que no es tóxica. En ciertos aspectos, una dosis baja, no tóxica es una dosis de 0,001 mg/kg a 0,01 mg/kg, 0,001 mg/kg a 0,01 mg/kg, 0,001 mg/kg a 0,05 mg/kg, 0,001 mg/kg a 0,1 mg/kg, 0,001 mg/kg a 0,5 mg/kg de ASM. En el contexto de la presente invención, una dosis baja, no tóxica es una dosis de 0,05 mg/kg a 0,275 mg/kg, 0,075 mg/kg a 0,275 mg/kg, 0,05 mg/kg a 0,2 mg/kg, 0,075 mg/kg a 0,2 mg/kg, 0,1 mg/kg a 0,275 mg/kg, 0,1 mg/kg a 0,25 mg/kg, de ASM. En otros aspectos, una dosis baja, no tóxica es una

dosis de 0,1 mg/kg a 1 mg/kg, 0,5 mg/kg a 1 mg/kg, 0,75 mg/kg a 1 mg/kg, 0,1 mg/kg a 2 mg/kg, 0,5 mg/kg a 2 mg/kg, 0,75 mg/kg a 2 mg/kg, 1 mg/kg a 2 mg/kg o 1,25 mg/kg a 2 mg/kg, 1,5 mg/kg a 2 mg/kg o 1,75 mg/kg a 2 mg/kg de ASM. En algunas realizaciones específicas, una dosis baja, no tóxica es una dosis de 0,05 mg/kg, 0,075 mg/kg, 0,1 mg/kg, 0,125 mg/kg, 0,15 mg/kg, 0,175 mg/kg, 0,2 mg/kg, 0,225 mg/kg, 0,25 mg/kg, 0,275 mg/kg de ASM. En otros aspectos, una dosis baja, no tóxica es una dosis de 0,001 mg/kg, 0,005 mg/kg, 0,0075 mg/kg, 0,01 mg/kg, 0,0125 mg/kg, 0,025 mg/kg, 0,3 mg/kg, 0,4 mg/kg, 0,5 mg/kg, 0,6 mg/kg, 0,7 mg/kg, 0,75 mg/kg, 0,8 mg/kg, 0,9 mg/kg o 1 mg/kg de ASM.

Los términos “sujeto” y “paciente” se utilizan en la presente memoria indiferentemente para referirse a un humano. En una realización específica, el humano tiene o se ha diagnosticado que tiene una ASMD.

10 Como se utiliza en la presente memoria, el término “terapéuticamente efectivo” en el contexto de administrar una dosis de ASM a un sujeto se refiere a la cantidad de ASM que da como resultado un efecto beneficioso o terapéutico. En realizaciones específicas, el término “terapéuticamente efectivo” en el contexto de administrar una dosis de ASM a un sujeto se refiere a la cantidad de ASM que es suficiente para lograr al menos uno, dos, tres, cuatro o más de los siguientes efectos: (i) una reducción en el volumen del bazo según lo evaluado por técnicas conocidas en la técnica, por ejemplo MRI; (ii) una reducción en los niveles de esfingomielina hepática según lo evaluado por técnicas conocidas en la técnica, por ejemplo, análisis bioquímico y/o análisis histomorfométrico de muestras de hígado; (iii) un aumento en la capacidad de ejercicio según lo evaluado por técnicas conocidas en la técnica, por ejemplo, la máxima carga de trabajo por ergometría de ciclo, incluyendo el porcentaje de carga máxima predicho, el consumo máximo de oxígeno y la producción de dióxido de carbono; (iv) un aumento en la función pulmonar según lo evaluado por técnicas conocidas en la técnica, por ejemplo, la técnicas descritas en American Thoracic Society, 1991, Am. Rev. Respir. Dis. 144: 1202-1218, tal como la capacidad de difusión (DLco), el porcentaje predicho de la capacidad vital forzada (FVC) según lo medido, por ejemplo, mediante técnicas espirométricas, el volumen espiratorio forzado dentro de 1 segundo (FEV₁) según lo medido, por ejemplo, mediante técnicas espirométricas, y capacidad pulmonar total; (v) una disminución en la esfingomielina del lavado alveolar bronquial (BAL); (vi) una disminución en el volumen del hígado según se evalúa mediante técnicas conocidas en la técnica, por ejemplo MRI; (vii) una mejora en la apariencia pulmonar según se evalúa mediante técnicas conocidas en la técnica, por ejemplo, una tomografía computarizada de alta resolución o una radiografía de tórax; (viii) una disminución en la concentración de esfingomielina en la piel, el plasma y la mancha de sangre seca (DBS) medida por, por ejemplo, espectrometría de masas en tándem; (ix) una reducción o la mejora de la gravedad de la ASMD y/o un síntoma asociado con la misma; (x) una reducción en la duración de un síntoma asociado con la ASMD; (xi) la prevención en la recurrencia de un síntoma asociado con la ASMD; (xii) una reducción en la hospitalización de un sujeto; (vi) reducción de la duración de la hospitalización; (xiii) un aumento en la supervivencia de un sujeto; (xiv) una reducción de la mortalidad; (xv) una disminución en la tasa de hospitalización; (xvi) una reducción en el número de síntomas asociados con la ASMD; (xvii) un aumento en la supervivencia sin síntomas de los pacientes con ASMD; (xviii) una mejora en la función neurológica (por ejemplo, función psicomotora, capacidad de respuesta social, etc.); (xix) una mejora en el aclaramiento pulmonar medido, por ejemplo, por el recuento y perfil de células BAL; (xx) una disminución en los niveles séricos de quitotriosidasa; (xxi) una disminución en los niveles séricos de CCL18; (xxii) una mejora en el perfil lipídico (por ejemplo, HDL, LDL, colesterol, triglicéridos y proporción colesterol total:HDL); y (xxiii) mejora de la calidad de vida según lo evaluado por, por ejemplo, un cuestionario.

40 Como se utiliza en la presente memoria, los términos “terapias” y “terapia” se pueden referir a cualquier protocolo(s), método(s), composiciones, formulaciones, y/o agente(s) que se pueden utilizar en el tratamiento, manejo o mejora de ASMD o afecciones o síntomas asociados con la misma. En ciertas realizaciones, los términos “terapias” o “terapia” se refieren a terapia biológica, terapia de apoyo y/u otras terapias útiles en el tratamiento, manejo, prevención o mejora de la ASMD o afecciones o síntomas asociados con la misma. En realizaciones, el término “terapia” se refiere a una terapia que realiza uno, dos o más de los siguientes: (i) mejora el suministro de ASM a los sitios de patología, (ii) mejora la actividad de la ASM, y (iii) mejora la estabilidad de la ASM. En ciertas realizaciones, el término “terapia” se refiere a una terapia diferente a la ASM. En realizaciones específicas una “terapia adicional” y “terapias adicionales” se refieren a una terapia distinta de ASM.

50 Como se utiliza en la presente memoria, el término “efecto(s) tóxico” y similares se refiere a uno, dos, tres o todos los siguientes puntos posteriores a la administración de una dosis de ASM: (i) un suceso adverso relacionado moderado o grave como lo define un síntoma clínico que interfiere con el funcionamiento diario normal y necesita control, intervención o tratamiento adicionales, o un valor de laboratorio anormal o resultado de procedimiento de interés clínico que necesita control, tratamiento o investigación adicionales. Véase, por ejemplo, la terminología estándar de Clinical Data Interchange Standards Consortium Study Data Tabulation Model v.3.1.1; (ii) un valor de bilirrubina total mayor de 1,5 mg/dL, 1,75 mg/dL, 2,0 mg/dL, 2,1 mg/dL, 2,2 mg/dL, 2,3 mg/dL, 2,4 mg/dL, 2,5 mg/dL, 2,6 mg/dL, 2,7 mg/dL, 2,75 mg/dL, 2,8 mg/dL, 2,9 mg/dL, 3,0 mg/dL 3,1 mg/dL, 3,2 mg/dL, 3,3 mg/dL, 3,4 mg/dL, 3,5 mg/dL, 3,6 mg/dL, 3,7 mg/dL, 3,8 mg/dL, 3,9 mg/dL o 4 mg/dL o en el intervalo de 2,1 mg/dL a 2,5 mg/dL, 2,1 mg/dL a 3,0 mg/dL, o 2,1 mg/dL a 4 mg/dL que dura más de 16 horas, 18 horas, 24 horas, 36 horas, 48 horas o 72 horas, 5 días, una semana, dos semanas o tres semanas después de la administración de la dosis de ASM; (iii) una concentración de ceramida plasmática mayor de 8,2 µg/mL, 8,3 µg/mL, 8,4 µg/mL, 8,5 µg/mL, 8,75 µg/mL, 9 µg/mL, 9,5 µg/mL, 10 µg/mL, 11 µg/mL, 12 µg/mL, 13 µg/mL, 14 µg/mL, 15 µg/mL, 16 µg/mL, 17 µg/mL, 18 µg/mL, 19 µg/mL, 20 µg/mL, 25 µg/mL, 30 µg/mL, 35 µg/mL, 40 µg/mL, 45 µg/mL, 50 µg/mL, 55 µg/mL, 60 µg/mL, 65 µg/mL, 70

µg/mL, 75 µg/mL o 80 µg/mL, o en el intervalo de 8,2 µg/mL a 10 µg/mL, 8,5 µg/mL a 10 µg/mL, 9 µg/mL a 12 µg/mL, 10 µg/mL a 12 µg/mL, 10 µg/mL a 15 µg/mL, 10 µg/mL a 20 µg/mL, 15 µg/mL a 20 µg/mL, o 20 µg/mL a 30 µg/mL 6 horas, 8 horas, 10 horas, 12 horas, 16 horas, 18 horas, 24 horas, 36 horas, 48 horas o 72 horas después de la administración de la dosis de ASM; o (iv) una respuesta de fase aguda.

5 Una respuesta de fase aguda puede evaluarse mediante un cambio en la concentración de un reactante de fase aguda (tal como, por ejemplo, proteína C reactiva, ferritina, albúmina, IL-8, IL-6, calcitonina, fibrinógeno, hierro o transferrina), un cambio en el porcentaje de neutrófilos, un cambio en el tiempo de protrombina o un cambio en el tiempo parcial de tromboplastina. En una realización específica, un aumento en la concentración de CRP/hs-CRP 6 horas, 8 horas, 12 horas, 18 horas, 24 horas, 36 horas, 48 horas o 72 horas después de la administración de una dosis de ASM en relación con la concentración de CRP/hs-CRP de un paciente antes de la administración de ASM se puede utilizar como una medida de una respuesta de fase aguda. En otra realización específica, una concentración de CRP/hs-CRP plasmática que es mayor que la concentración de CRP/hs-CRP plasmática normal 6 horas, 8 horas, 12 horas, 16 horas, 18 horas, 24 horas, 36 horas, 48 horas o 72 horas después de la administración de la dosis de ASM se puede utilizar como una medida de una respuesta de fase aguda. En ciertas realizaciones, 10 una concentración de CRP/hs-CRP plasmática de más de aproximadamente 8,1 mg/L, 8,2 mg/L, 8,3 mg/L, 8,4 mg/L, 8,5 mg/L, 8,6 mg/L, 8,7 mg/L, 8,8 mg/L, 8,9 mg/L, 9 mg/L, 9,5 mg/L, 10 mg/L, 11 mg/L, o 12 mg/L, o en el intervalo de 8,5 mg/L a 10 mg/L, o 8,5 mg/L a 12 mg/L, o 10 mg/L a 12 mg/L 6 horas, 8 horas, 12 horas, 16 horas, 18 horas, 24 horas, 36 horas, 48 horas o 72 horas después de la administración de la administración de la dosis de ASM se puede utilizar como una medida de una respuesta de fase aguda.

20 En una realización específica, un aumento en la concentración de ferritina 6 horas, 8 horas, 12 horas, 16 horas, 18 horas, 24 horas, 36 horas, 48 horas o 72 horas después de la administración de ASM se puede utilizar como una medida de una respuesta de fase aguda. En otra realización específica, una concentración de ferritina plasmática que es mayor que la concentración de ferritina plasmática normal 6 horas, 8 horas, 12 horas, 18 horas, 24 horas, 36 horas, 48 horas o 72 horas después de la administración de la dosis de ASM se puede utilizar como una medida de una respuesta de fase aguda. En ciertas realizaciones, una concentración de ferritina plasmática de más de 25 aproximadamente 600 ng/mL, 625 ng/mL, 650 ng/mL, 675 ng/mL, 700 ng/mL, 725 ng/mL, 750 ng/mL, 775 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, o 1200 ng/mL o en el intervalo de 600 ng/mL a 800 ng/mL, 650 ng/mL a 850 ng/mL, 600 ng/mL a 1000 ng/mL, 600 ng/mL a 1200 ng/mL, 800 ng/mL a 1000 ng/mL, 900 ng/mL a 1000 ng/mL, o 1000 ng/mL a 1200 ng/mL 6 horas, 8 horas, 12 horas, 30 16 horas, 18 horas, 24 horas, 36 horas, 48 horas o 72 horas después de la administración de la dosis de ASM se puede utilizar como una medida de una respuesta de fase aguda.

En una realización específica, un aumento en la concentración de fibrinógeno 6 horas, 8 horas, 12 horas, 16 horas, 18 horas, 24 horas, 36 horas, 48 horas o 72 horas después de la administración de una dosis de ASM con relación a una concentración de fibrinógeno del paciente antes de la administración de ASM se puede utilizar como una medida de una respuesta de fase aguda. En otra realización específica, una concentración de fibrinógeno plasmático que es mayor que la concentración de fibrinógeno plasmático normal 6 horas, 8 horas, 12 horas, 16 horas, 18 horas, 24 horas, 36 horas, 48 horas o 72 horas después de la administración de la dosis de ASM se puede utilizar como una medida de una respuesta de fase aguda. En ciertas realizaciones, una concentración de fibrinógeno plasmático de más de aproximadamente 350 mg/dL, 375 mg/dL, 400 mg/dL, 425 mg/dL, o 450 mg/dL, o en el intervalo de 350 35 g/dL a 400 mg/dL, 350 mg/dL a 450 mg/dL o 400 mg/dL a 450 mg/dL 6 horas, 8 horas, 12 horas, 16 horas, 18 horas, 40 24 horas, 36 horas, 48 horas o 72 horas después de la administración de la dosis de ASM se puede utilizar como una medida de una respuesta de fase aguda.

En una realización específica, una disminución en la concentración de albúmina 6 horas, 8 horas, 12 horas, 18 horas, 24 horas, 36 horas, 48 horas o 72 horas después de la administración de una dosis de ASM en relación con la concentración de albúmina del paciente antes de la administración ASM se puede utilizar como una medida de una respuesta de fase aguda. En ciertas realizaciones, una disminución en la siguiente magnitud de la concentración de albúmina de 0,2, 0,4, 0,6, 1, 1,5, 2,0 g/dL de un intervalo normal de 3,5 a 5,0 g/dL 6 horas, 8 horas, 12 horas, 16 horas, 18 horas, 24 horas, 36 horas, 48 horas o 72 horas después de la administración de la dosis de ASM se puede utilizar como una medida de una respuesta de fase aguda.

50 En una realización específica, una disminución en la concentración de ferritina 6 horas, 8 horas, 12 horas, 18 horas, 24 horas, 36 horas, 48 horas o 72 horas después de la administración de una dosis de ASM en relación con la concentración de ferritina del paciente antes de la administración de ASM se puede utilizar como una medida de una respuesta de fase aguda. En ciertas realizaciones, una disminución en la siguiente magnitud de la concentración de ferritina de 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160 mcg/dL de un intervalo normal de 60 a 170 mcg/dL 6 horas, 8 horas, 55 12 horas, 16 horas, 18 horas, 24 horas, 36 horas, 48 horas o 72 horas después de la administración de la dosis de ASM se puede utilizar como una medida de una respuesta de fase aguda.

En una realización específica, una disminución en la concentración de transferrina 6 horas, 8 horas, 12 horas, 18 horas, 24 horas, 36 horas, 48 horas o 72 horas después de la administración de una dosis de ASM en relación con la concentración de transferrina del paciente antes de la administración de ASM puede utilizarse como una medida de una respuesta de fase aguda. En ciertas realizaciones, una disminución en la siguiente magnitud de la 60

concentración de transferrina de 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160, 180 mg/dL de un intervalo normal de 202 a 336 mg/dL 6 horas, 8 horas, 12 horas, 16 horas, 18 horas, 24 horas, 36 horas, 48 horas o 72 horas después de la administración de la dosis de ASM se puede utilizar como una medida de una respuesta de fase aguda.

5 En una realización, un aumento en el porcentaje de neutrófilos de los glóbulos blancos totales 6 horas, 8 horas, 12 horas, 16 horas, 18 horas, 24 horas, 36 horas, 48 horas o 72 horas después de la administración de una dosis de ASM en relación con el porcentaje de neutrófilos de los glóbulos blancos totales del paciente antes de la administración de ASM se puede utilizar como una medida de una respuesta de fase aguda. En otra realización, un aumento en el porcentaje de neutrófilos de los glóbulos blancos totales que es mayor que el porcentaje de neutrófilos normal de la concentración de los glóbulos blancos totales 6 horas, 8 horas, 12 horas, 16 horas, 18 horas, 24 horas, 36 horas, 48 horas o 72 horas después de la administración de la dosis de ASM se puede utilizar como una medida de una respuesta de fase aguda. En ciertas realizaciones, un aumento en el porcentaje de neutrófilos de los glóbulos blancos totales que es del 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o más 6 horas, 8 horas, 12 horas, 16 horas, 18 horas, 24 horas, 36 horas, 48 horas o 72 horas después de la administración de la dosis de ASM puede utilizarse como una medida de una respuesta de fase aguda.

15 **4. Breve descripción de los dibujos**

La Figura 1 es una representación gráfica del diseño del protocolo.

La Figura 2 es un cuadro que muestra las características demográficas e iniciales de los pacientes inscritos en el protocolo que se describe a continuación.

20 Las Figuras 3A, 3B y 3C son gráficos que representan los niveles plasmáticos de ceramida (Figura 3A) y los niveles plasmáticos de esfingomielina (Figura 3B), y el nivel de esfingomielina en la mancha de sangre seca (Figura 3C) a lo largo del tiempo en diferentes pacientes que se les ha administrado diferentes dosis de rhASM. El eje derecho de la gráfica muestra el número de paciente y la dosis de rhASM.

25 La Figura 4 es un gráfico que representa los niveles totales de bilirrubina determinados a lo largo del tiempo en diferentes pacientes que se les ha administrado diferentes dosis de rhASM durante el protocolo. El eje derecho de la gráfica representa el número de paciente y la dosis de rhASM.

Figuras 5A-5G son gráficos que representan los niveles de CRP/hs-CRP (Figura 5A), porcentaje de neutrófilos (Figura 5B), fibrinógeno (Figura 5C), ferritina (Figura 5D), IL-8 (Figura 5E), IL-6 (Figura 5F), y calcitonina (Figura 5G) determinados a lo largo del tiempo en diferentes pacientes que se les ha administrado diferentes dosis de rhASM durante el protocolo. El eje derecho de la gráfica representa el número de paciente y la dosis de rhASM.

30 La Figura 6 es un cuadro de los sucesos adversos emergentes del tratamiento para cuatro pacientes, cada uno con una dosis diferente de rhASM, cuyos sucesos se consideraron relacionados (posiblemente, probablemente o definitivamente) con el tratamiento.

35 La Figura 7 es un diagrama que muestra el período de tratamiento primario, que consiste en: fases de aumento de la dosis y de mantenimiento de la dosis, el protocolo de dosis repetidas de la Fase 2 de rhASM en pacientes con ASMD.

5. Descripción detallada de la invención

40 La invención generalmente se refiere a la terapia de sustitución de la enzima de aumento de la dosis para su uso en un método para tratar sujetos humanos que tienen ASMD, particularmente sujetos que tienen manifestaciones no neurológicas de NPD, y en ciertas realizaciones, NPD de tipo B. Más particularmente, la enzima, ASM, se administra a dichos pacientes a una dosis inicial baja y no tóxica que después se aumenta en las administraciones posteriores. La dosis más alta de ASM tolerada por el paciente puede utilizarse como una dosis de mantenimiento. Alternativamente, una dosis terapéuticamente eficaz menor que la dosis más alta tolerada puede utilizarse como una dosis de mantenimiento.

45 El tratamiento de la NPD necesita dosis lo suficientemente altas para lograr una distribución adecuada de la enzima ASM en los órganos de patología (por ejemplo, el bazo, pulmones, corazón, riñones, y cerebro). Después de la administración intravenosa de ASM humana recombinante en ratones ASMKO, la mayor parte de la actividad de ASM se distribuye al hígado con pequeñas cantidades de actividad enzimática de ASM detectada en otros órganos de la patología, tales como el bazo, corazón, riñón y el pulmón (véase, por ejemplo, Figura 9B de He et al., 1999, Biochimia et Biophysica Acta 1432: 251-264). Por lo tanto, se necesitarían dosis muy altas para asegurar la distribución y el suministro de la enzima administrada al pulmón, corazón y riñón en pacientes con ASMD o enfermedad de Niemann-Pick.

55 Los estudios en un modelo de ratón Knockout para la ASM (ratones ASKMO) mostraron que la mayoría de la rhASM administrada se distribuye al hígado y al bazo donde reduce el sustrato, pero en mucho menor grado en los pulmones, corazón y cerebro (Miranda et al., FASEB 2000, 14: 1988). En estudios posteriores que utilizaron dosis más altas de rhASM en el modelo de ratón ASMKO, el sustrato se redujo y no se observó toxicidad a dosis $\leq 3,0$

mg/kg; de hecho, no se observaron síntomas clínicos de toxicidad hasta que se utilizaron dosis ≥ 10 mg/kg. Véase, "Dose Responsive Toxicological Findings Following Intravenous Administration of Recombinant Human Acid Sphingomyelinase (rhASM) to Acid Sphingomyelinase Knock-out (ASMKO) Mice" C. Nickerson, J. Murray, A. Visky, M. Hawes, S. Ryan, P. Ewing, B. Thurberg, L. Andrews. Dept Pharm/Tox, Pathology, Genzyme Corp., Framingham, MA., American Society of Human Genetics 2005; y "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," J. Murray, A.M.D' Angona, C. Nickerson, A. Vitsky, M. Hawes, S. Ryan, P. Ewing, B. Thurberg, L. Andrews. Dept. Pharmacology/Toxicology & Pathology, Genzyme Corp., Framingham, MA., Society of Toxicology 2006.

Basándonos en estos datos de ASKMO, tratamos a sujetos humanos con ASMD no neuronopáticos con una dosis máxima conservadora de 1,0 mg/kg como se describe en la sección 6, a continuación. De manera bastante inesperada, la toxicidad en los sujetos humanos, incluyendo la aparición de sucesos adversos con síntomas clínicos, se observó con dosis tan bajas como 0,3 mg/kg. Este resultado fue especialmente sorprendente, ya que la enzima ASM está ausente en el modelo de ratón knock out que debería reflejar una afección más grave que los sujetos humanos que tienen al menos cierta actividad enzimática y una enfermedad relativamente leve.

Sin limitarse a ninguna teoría, la administración de altas dosis de ASM a pacientes con NPD puede provocar la hidrólisis de grandes cantidades de esfingomielina en grandes concentraciones de ceramida, lo que puede producir los efectos secundarios tóxicos observados en esos pacientes con NPD. La enzima ASM hidroliza la esfingomielina, que es un componente principal de la membrana plasmática de las células (véase, por ejemplo, Milaus et al., 2010 FEBS Letters 584: 1887-1894), en ceramida y fosfolina. Se sabe que la ceramida desempeña un papel en la muerte celular y se sabe que es un agente pro-apoptótico (véase, por ejemplo, Smith and Schuchman, 2008, FASEB 22: 3419-3431).

Además, a diferencia de otras enzimas lisosómicas asociadas con enfermedades caracterizadas por el almacenamiento lisosomal, la ASM hidroliza la esfingomielina al pH neutro encontrada en el plasma y el pH ácido que se encuentra en el lisosoma (véase, por ejemplo, Schissel et al., 1998. J. Biol. Chem. 273: 2738-2746). La capacidad de la enzima ASM para funcionar en el plasma puede dar como resultado la hidrólisis de la esfingomielina que se encuentra en las lipoproteínas y la membrana plasmática de las células, lo que puede aumentar la cantidad del producto de degradación, la ceramida, que puede causar los efectos secundarios tóxicos observados en los pacientes con NPD que recibieron altas dosis de la enzima ASM.

Para resolver el problema de lograr una distribución adecuada de la enzima ASM en los órganos de la patología mientras se evita o minimiza la toxicidad asociada con la administración de altas dosis de la enzima, los inventores desarrollan los regímenes descritos en la presente memoria, en los que una dosis baja y no tóxica de la enzima ASM se administra inicialmente a un paciente con NPD y la dosis se incrementa con el tiempo. A medida que aumenta la dosis de la enzima ASM, se puede controlar al paciente para determinar las concentraciones de bilirrubina total/directa/indirecta, la producción de reactantes de fase aguda, la producción de mediadores inflamatorios y los sucesos adversos relacionados. La administración de una dosis baja de ASM y el aumento de la enzima facilitan la reducción de la esfingomielina acumulada. Una vez que el paciente está reducido, se pueden administrar de manera segura dosis más altas de la enzima ASM para asegurar la distribución adecuada de la enzima ASM a los órganos objetivo (por ejemplo, hígado, bazo, pulmones, corazón, riñón, cerebro, médula ósea, esqueleto, articulaciones, etc.). En ciertas realizaciones, la dosis máxima tolerada por el paciente puede utilizarse como la dosis de mantenimiento. Alternativamente, una dosis terapéuticamente eficaz menor que la dosis más alta tolerada puede utilizarse como una dosis de mantenimiento. En algunas realizaciones, basándose en la afección del paciente, la dosis de mantenimiento puede aumentarse o disminuirse.

En ciertas realizaciones, el tratamiento del paciente puede controlarse midiendo los niveles de esfingomielina plasmática, los niveles de ceramida plasmática, la producción de "reactantes de fase aguda" y los mediadores inflamatorios que son una medida de las respuestas inflamatorias, las concentraciones de bilirrubina (total, directa o indirecta) y/u otros marcadores bioquímicos para asegurar una respuesta estable antes de aumentar la dosis al siguiente nivel. Estos marcadores incluyen, pero no se limitan a CRP/hs-CRP, citoquinas (por ejemplo, IL-8, IL-6), calcitonina y ferritina. En realizaciones específicas, el paciente puede controlarse para detectar uno o más sucesos adversos relacionados que pueden incluir, pero no se limitan a síntomas constitucionales (por ejemplo, fiebre, náuseas, vómitos, dolor, mialgia e ictericia).

5.1 Protocolo de escalado de la dosis

Se describen métodos para tratar la ASMD que implican la administración de una o más dosis iniciales, bajas, no tóxicas de ASM a un sujeto para reducir la cantidad de esfingomielina que se ha acumulado en el sujeto. Después de un cierto período de tiempo, la dosis de ASM puede aumentarse hasta que se logre la dosis más alta tolerada por el sujeto que es terapéuticamente eficaz. Una vez que se identifica esta dosis, se puede utilizar como la dosis de mantenimiento para tratar al sujeto. La dosis de mantenimiento se puede administrar semanalmente, quincenalmente o mensualmente al sujeto para tratar la ASMD. En algunas realizaciones, un sujeto que recibe una dosis de mantenimiento se controla cada 3 meses, cada 6 meses o anualmente para uno, dos, tres o todos lo siguientes: (i) sucesos adversos relacionados; (ii) concentraciones de bilirrubina total/directa/indirecta; (iii)

concentración de ceramida plasmática; o (iv) una respuesta de fase aguda. Si el sujeto experimenta un suceso adverso relacionado de intensidad moderada (por ejemplo, un suceso adverso moderado relacionado), una concentración de bilirrubina total mayor que el valor de bilirrubina total para un humano sin ASMD (por ejemplo, un humano sano), una concentración de ceramida plasmática mayor que la concentración de ceramida plasmática de un ser humano sin ASMD (por ejemplo, un ser humano sano), o una respuesta de fase aguda, entonces la dosis administrada al sujeto puede ser evaluada por un médico u otro profesional médico para determinar si la dosis debe ajustarse.

En una realización, se proporciona una ASM para su uso en un método para tratar un sujeto humano que tiene una deficiencia de esfingomielinasa ácida, que comprende: (a) un régimen para reducir el sustrato de esfingomielina acumulado en el sujeto humano que comprende: (i) administrar una dosis inicial baja, no tóxica que varía entre 0,05 y 0,275 mg/kg de ASM al sujeto humano (ii) administrar dosis sucesivamente más altas de aproximadamente 0,1 a 1,0 mg/kg o 0,1 a 0,5 mg/kg más altas que la dosis previa de ASM al sujeto humano, y controlar al sujeto por uno o más efectos secundarios adversos después de cada dosis sucesiva según lo indicado por la elevada bilirrubina o un suceso adverso relacionado; y (b) un régimen de mantenimiento que comprende administrar una dosis igual o inferior a la dosis más alta tolerada por el sujeto como la dosis de mantenimiento para el sujeto en donde dicha dosis más alta tolerada por el sujeto humano es de 1 a 3 mg/kg. En ciertos aspectos de la descripción, los intervalos de dosis iniciales son de 0,1 mg/kg a 0,5 mg/kg o 0,1 mg/kg a 1 mg/kg de ASM. En algunas realizaciones, las dosis sucesivamente más altas se administran una, dos, tres o cuatro semanas después de la dosis previa. En ciertas realizaciones, la dosis sucesivamente más alta es aproximadamente 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 o 1 mg/kg o más alto que la dosis previa. En algunos aspectos, la dosis sucesivamente más alta es aproximadamente 1,2 mg/kg, 1,5 mg/kg, 1,75 mg/kg, 2 mg/kg, 3 mg/kg, 4 mg/kg o 5 mg/kg más alto que la dosis previa. En algunas realizaciones, la dosis sucesivamente más alta es de 0,1 a 0,5 mg/kg, 0,1 mg/kg a 1 mg/kg, o 0,5 mg/kg a 1 mg/kg más alto que la dosis previa. En algunos aspectos, la dosis sucesivamente más alta es de 0,5 mg/kg a 2 mg/kg, 1 mg/kg a 2 mg/kg, 2mg/kg a 4 mg/kg o 2 mg/kg a 5 mg/kg más alto que la dosis previa. En ciertos aspectos de la descripción la dosis más alta tolerada por el sujeto es de 1 mg/kg a 2,5 mg/kg. En algunas realizaciones, la dosis más alta se administra al sujeto humano como una dosis de mantenimiento.

En ciertos aspectos de la descripción, un método para tratar un sujeto humano que tiene ASMD, comprende: (a) una administración de ASM para reducir la cantidad de esfingomielina que se ha acumulado en el sujeto humano, en donde la administración de ASM para reducir el tamaño comprende: (i) administrar una dosis baja, no tóxica de ASM a un sujeto humano; y (ii) administrar dosis sucesivamente más altas de ASM al humano si el sujeto humano no manifiesta uno o más efectos secundarios adversos como se indica por la elevada concentración de bilirrubina total, la elevada concentración de ceramida plasmática, la producción de reactantes de fase aguda, la producción de mediadores inflamatorios, o un suceso adverso (por ejemplo, tal como se define mediante la terminología estándar de Clinical Data Interchange Standards Consortium Study Data Tabulation Model v.3.1.1); y (b) una administración de ASM de mantenimiento, en donde la administración de ASM de mantenimiento comprende la administración repetida de una dosis de mantenimiento de ASM al sujeto humano. En algunas realizaciones, el paciente se controla durante un período de tiempo después de la administración de una dosis de ASM (por ejemplo, 6 horas, 12 horas, 16 horas, 24 horas, 48 horas, 72 horas, semanalmente, o hasta la siguiente dosis) para uno o más efectos secundarios adversos o bilirrubina total. En ciertas realizaciones, la dosis de mantenimiento que se administra puede ajustarse durante el curso del tratamiento del paciente. En algunas realizaciones, la dosis de mantenimiento administrada al sujeto es la dosis más alta tolerada por el sujeto.

En otros aspectos descritos en la presente memoria, un método para tratar ASMD comprende administrar a un sujeto que lo necesite una dosis inicial baja, no tóxica de ASM (por ejemplo, una dosis de 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, 0,1 mg/kg a 0,5 mg/kg, o 0,5 mg/kg a 1 mg/kg de ASM) y después de un cierto período de tiempo (por ejemplo, 3 días, 1 semana, 2 semanas, o 3 semanas) aumentando sucesivamente la dosis de ASM administrada al sujeto hasta que el nivel de actividad de la ASM en uno o más órganos de la patología sea al menos del 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 12%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 50%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o más de la actividad de ASM en el órgano correspondiente en un sujeto(s) sin ASMD (por ejemplo, un sujeto sano o una población de 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 75, 100, 150, 175 o más sujetos) como se mide por técnicas conocidas en la técnica, tales como, por ejemplo, la técnica descrita en He et al., 2003, Analytical Biochemistry 314: 116-120. En otro aspecto, un método para tratar ASMD comprende administrar a un sujeto que lo necesite una dosis de 0,1 mg/kg de ASM y después de un cierto período de tiempo (por ejemplo, 3 días, 1 semana, 2 semanas, o 3 semanas) aumentar sucesivamente la dosis de ASM administrada al sujeto hasta que el nivel de la actividad de ASM en uno o más de los siguientes órganos de patología sea del 5% al 10%, 5% al 15%, 5% al 20%, 10% al 15%, 10% al 20%, 15% al 20%, 15% al 25%, 25% al 50 %, 50% al 75%, o 75% al 95% de la actividad normal de la ASM en el órgano correspondiente en un sujeto(s) sin ASMD (por ejemplo, un sujeto sano o una población de 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 75, 100, 150, 175 o más sujetos) medido por las técnicas conocidas en la técnica, tales como, por ejemplo, la técnica descrita en He et al., 2003, Analytical Biochemistry 314: 116-120. En ciertas realizaciones, la dosis se aumenta sucesivamente si la concentración de bilirrubina total es menor o igual a 2,0 mg/dL o 2,1 mg/dL y el sujeto no experimenta un suceso adverso relacionado moderado o grave.

En realizaciones específicas, la actividad de ASM en sujetos sanos normales se estima que es aproximadamente de 20 a 40 unidades/mg de proteína para el cerebro, corazón, riñón e hígado, según la actividad de la ASM en órganos similares en ratones sanos utilizando el ensayo descrito en Horinouchi et al., 1995, Nature Genetics 10: 288-293. En ciertas realizaciones, la actividad de la ASM en sujetos sanos normales se estima que es aproximadamente de 15 a 25 unidades/mg de proteína para el pulmón y de 10 a 15 unidades/mg de proteína para el bazo en base a la actividad de ASM en órganos similares en ratones sanos utilizando el ensayo descrito en Horinouchi et al., 1995, Nature Genetics 10: 288-293. En ciertas realizaciones, una vez que la actividad de la ASM alcanza un nivel normal o un cierto porcentaje de lo normal en uno o más órganos de patología, se puede administrar al sujeto una dosis igual o menor que la dosis más alta tolerada por el sujeto como la dosis de mantenimiento. Con el tiempo, la dosis de mantenimiento se puede ajustar según la salud del sujeto. Dependiendo de las circunstancias del sujeto, la dosis de mantenimiento se puede aumentar o disminuir.

En una realización, una ASM para su uso en un método para tratar ASMD comprende: (a) administrar a un humano que lo necesite una dosis inicial baja, no tóxica en el intervalo de 0,05 a 0,275 mg/kg de ASM; y (b) administrar sucesivamente dosis más altas de ASM de aproximadamente 0,1 a 1,0 mg/kg y 0,1 a 0,5 mg/kg más altas que la dosis previa si el humano no manifiesta uno, dos, tres o cuatro de los siguientes efectos secundarios después de la administración de una dosis de ASM: (i) un suceso adverso relacionado grave como se define por, por ejemplo, la terminología estándar de la Clinical Data Interchange Standards Consortium Study Data Tabulation Model v.3.1.1; (ii) un valor de bilirrubina total de más de 1,5 mg/dL, 1,75 mg/dL, 2,0 mg/dL, 2,1 mg/dL, 2,2 mg/dL, 2,3 mg/dL, 2,4 mg/dL, 2,5 mg/dL, 2,6 mg/dL, 2,7 mg/dL, 2,75 mg/dL, 2,8 mg/dL, 2,9 mg/dL, 3,0 mg/dL, 3,1 mg/dL, 3,2 mg/dL, 3,3 mg/dL, 3,4 mg/dL, 3,5 mg/dL, 3,6 mg/dL, 3,7 mg/dL, 3,8 mg/dL, 3,9 mg/dL o 4 mg/dL, o en el intervalo de 2,1 mg/dL a 2,5 mg/dL, 2,1 mg/dL a 3,0 mg/dL, o 2,1 mg/dL a 4 mg/dL que dura más de 18 horas, 24 horas, 36 horas, 48 horas o 72 horas, 5 días, una semana, dos semanas o tres semanas después de la administración de la dosis de ASM; (iii) una concentración de ceramida plasmática de más de 8,2 µg/mL, 8,3 µg/mL, 8,4 µg/mL, 8,5 µg/mL, 8,75 µg/mL, 9 µg/mL, 9,5 µg/mL, 10 µg/mL, 11 µg/mL, 12 µg/mL, 13 µg/mL, 14 µg/mL, 15 µg/mL, 16 µg/mL, 17 µg/mL, 18 µg/mL, 19 µg/mL, 20 µg/mL, 25 µg/mL, 30 µg/mL, 35 µg/mL, 40 µg/mL, 45 µg/mL, 50 µg/mL, 55 µg/mL, 60 µg/mL, 65 µg/mL, 70 µg/mL, 75 µg/mL, o 80 µg/mL, o en el intervalo de 8,2 µg/mL a 10 µg/mL, 8,5 µg/mL a 10 µg/mL, 9 µg/mL a 12 µg/mL, 10 µg/mL a 12 µg/mL, 10 µg/mL a 15 µg/mL, 10 µg/mL a 20 µg/mL, 15 µg/mL a 20 µg/mL, o 20 µg/mL a 30 µg/mL 6 horas, 8 horas, 10 horas, 12 horas, 16 horas, 18 horas, 24 horas, 36 horas, 48 horas o 72 horas después de la administración de la dosis de ASM; o (iv) una respuesta de fase aguda. Según esta realización, el humano que lo necesite se le puede administrar sucesivamente dosis más altas de ASM, siempre que el humano no manifieste uno o más de los puntos (i) a (iv). En el caso de que el humano manifieste uno o más de los puntos (i) a (iv), después, dependiendo de la gravedad de la manifestación, se puede repetir la misma dosis que resultó en la manifestación de los puntos (i) a (iv) o la dosis puede reducirse a la dosis previa.

En otra realización, una ASM para su uso en un método para tratar ASMD comprende: (a) administrar a un humano que lo necesite una dosis inicial de 0,1 mg/kg de ASM; (b) controlar uno o más de los siguientes en el humano después de la administración de la dosis de ASM: (i) concentración de bilirrubina total; (ii) la manifestación de un suceso adverso relacionado; (iii) una respuesta de fase aguda; o (iv) concentración de ceramida plasmática; (c) determinar si ajustar (por ejemplo, aumentar o disminuir) o mantener la dosis de ASM en base a uno o más de los puntos (i) a (iv); y (d) repetir las etapas (b) y (c) después de la administración de la dosis de ASM determinada en la etapa anterior (c). En otra realización, una ASM para su uso en un método para tratar ASMD comprende: (a) administrar a un humano que lo necesite dos dosis iniciales de 0,1 mg/kg de ASM con un intervalo de 2 a 4 semanas; (b) controlar uno o más de los siguientes en el humano después de la administración de cada dosis de ASM: (i) concentración de bilirrubina total, (ii) la manifestación de un suceso adverso relacionado; (iii) una respuesta de fase aguda; o (iv) concentración de ceramida plasmática; (c) determinar si ajustar (por ejemplo, aumentar o disminuir) o mantener la dosis de ASM en base a uno o más de los puntos (i) a (iv); y (d) repetir las etapas (b) y (c) después de la administración de la dosis de ASM determinada en la etapa anterior (c). Según estas realizaciones, el humano se le puede administrar una dosis más alta de ASM una o más veces con un intervalo de 2 a 4 semanas si la dosis inicial de 0,1 mg/kg o la dosis ajustada determinada en la etapa (c) da como resultado: (i) una concentración de bilirrubina total menor o igual a 2,0 mg/dL antes de la fecha límite para administrar otra dosis de ASM; (ii) no hay sucesos adversos relacionados o solo sucesos adversos relacionados leves; (iii) una ceramida plasmática dentro del intervalo normal 6 horas, 8 horas 12 horas, 16 horas, 18 horas, 24 horas, 48 horas o 72 horas de la administración de la última dosis de ASM; o (iv) ninguna respuesta de fase aguda o una respuesta de fase aguda que no sea estadísticamente significativa. Sin embargo, la dosis se puede mantener o disminuir si la dosis inicial de 0,1 mg/kg o la dosis ajustada determinada en la etapa (c) da como resultado: (i) una concentración de bilirrubina total de 2,1 mg/dL o mayor antes de la fecha límite para la administración de otra dosis de ASM; (ii) un suceso adverso relacionado; (iii) una ceramida plasmática por encima del intervalo normal 6 horas, 8 horas, 12 horas, 16 horas, 18 horas, 24 horas, 48 horas o 72 horas de la administración de la última dosis de ASM; o (iv) una respuesta de fase aguda que es estadísticamente significativa.

En otro aspecto, un método para tratar ASMD comprende: (A) administrar a un humano que lo necesite dos dosis iniciales de 0,1 mg/kg con un intervalo de 2 semanas; (B) controlar o (i) la concentración de bilirrubina total, (ii) la manifestación de un suceso adverso relacionado, (iii) o tanto (i) como (ii) en el humano después de la administración de cada dosis inicial de ASM; (C) determinar si ajustar (por ejemplo, aumentar o disminuir) o mantener la dosis de ASM en base a uno o más de los puntos (i) a (iii), y (D) repetir las etapas (B) y (C) después de la administración de

la dosis de ASM determinada en la etapa anterior (C), en donde (a) la dosis administrada al humano se aumenta si la concentración de bilirrubina total es menor o igual a 2,0 mg/dL o el humano presenta un suceso adverso relacionado leve; (b) el humano continua recibiendo la dosis actual de 1 a 4 veces con un intervalo de 2 a 4 semanas si la concentración de bilirrubina total es 2,1 mg/dL a 3,1 mg/dL o el humano presenta un suceso adverso relacionado moderado y esta dosis se mantiene si la concentración de bilirrubina total permanece mayor de 2,0 mg/dL después de la última dosis administrada; (c) la dosis de ASM administrada al humano se disminuye o deja de administrarse si la concentración de bilirrubina total es mayor de 3 mg/dL o el humano presenta un suceso adverso relacionado grave.

En otro aspecto, un método para tratar ASMD comprende: (A) administrar a un humano que lo necesite dos dosis iniciales de 0,3 mg/kg en intervalos de dos semanas; (B) controlar o (i) concentración de bilirrubina total, (ii) la manifestación de un suceso adverso relacionado, (iii) o tanto (i) como (ii) en el humano después de la administración de cada dosis de ASM; (C) determinar si ajustar (por ejemplo, aumentar o disminuir) o mantener la dosis de ASM en base a uno o más de los puntos (i) a (iii), y (D) repetir las etapas (B) y (C) después de la administración de la dosis de ASM determinada en la etapa anterior (C), en donde (a) la dosis administrada al humano se aumenta si la concentración de bilirrubina total es menor o igual a 2,0 mg/dL o el humano presenta un suceso adverso relacionado leve; (b) el humano continua recibiendo la dosis actual 1 a 4 veces en intervalos de 2 a 4 semanas si la concentración de bilirrubina total es 2,1 mg/dL a 3,1 mg/dL o el humano presenta un suceso adverso relacionado moderado y esta dosis se mantiene si la concentración de bilirrubina total permanece mayor que 2,0 mg/dL después de la última dosis administrada; (c) la dosis de ASM administrada al humano se disminuye o se deja de administrar si la concentración de bilirrubina total es mayor de 3 mg/dL o el humano presenta un suceso adverso relacionado grave.

En una realización específica, una ASM para su uso en un método para tratar ASMD comprende administrar a un sujeto que lo necesite una dosis de 0,1 mg/kg de ASM y después de dos semanas una dosis de 0,3 mg/kg de ASM cada dos semanas. En otra realización específica, un método para tratar ASMD comprende administrar a un sujeto que lo necesite una dosis de 0,1 mg/kg de ASM, una dosis de 0,3 mg/kg de ASM dos semanas después de la administración de la dosis de 0,1 mg/kg de ASM, y una dosis de 0,6 mg/kg de ASM dos semanas después de la administración de la dosis de 0,3 mg/kg de ASM. En otra realización específica, una ASM para su uso en un método para tratar ASMD comprende administrar a un sujeto que lo necesite una dosis de 0,1 mg/kg de ASM, una dosis de 0,3 mg/kg de ASM dos semanas después de la administración de la dosis de 0,1 mg/kg de ASM, una dosis de 0,6 mg/kg de ASM dos semanas después de la administración de la dosis de 0,3 mg/kg de ASM, y una dosis de 1 mg/kg de ASM dos semanas después de la administración de la dosis de 0,6 mg/kg de ASM. En ciertas realizaciones, cada dosis se puede repetir al menos dos, y preferiblemente de dos a cuatro veces antes de aumentar la dosis al siguiente nivel. Según estas realizaciones, la dosis solo se aumenta si el valor de bilirrubina total es igual o menor que 2,0 mg/dL y/o el sujeto experimenta un suceso adverso relacionado leve. La dosis no se aumenta si el valor de bilirrubina total está entre 2,1 y 3 mg/dL y/o el sujeto experimenta un suceso relacionado moderado. La dosis se disminuye a la dosis tolerada anteriormente si el valor de bilirrubina total es mayor de 3,0 mg/dL de la bilirrubina total y/o el sujeto experimenta un suceso adverso relacionado grave.

En realizaciones específicas, un paciente se trata para ASMD según el protocolo descrito en la Sección 8 o 9 siguientes, a continuación, o un protocolo análogo.

En algunos aspectos, un método para tratar ASMD comprende administrar a un sujeto que lo necesite una dosis de 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, o 0,1 mg/kg a 0,5 mg/kg, o 0,1 mg/kg a 1 mg/kg de ASM y después de un cierto período de tiempo (por ejemplo, 3 días, 1 semana, 2 semanas, 3 semanas o 4 semanas) aumentar sucesivamente la dosis de ASM administrada al sujeto si la concentración de bilirrubina total es menor o igual a 2,1 mg/dL y el sujeto no experimenta un suceso adverso relacionado moderado o grave. En algunas realizaciones, la dosis de ASM se aumenta sucesivamente hasta que se logra la dosis máxima o más alta tolerada por el sujeto que es efectiva terapéuticamente. En ciertas realizaciones, dicha dosis máxima o más alta tolerada se administra hasta el momento en que la esfingomielina acumulada en los órganos de la patología se reduce, después de lo cual se administra al sujeto una dosis de mantenimiento que es inferior a la dosis máxima tolerada que todavía es terapéuticamente eficaz. En algunas realizaciones, la dosis de mantenimiento se reduce con el tiempo a medida que mejora la afección del paciente.

En un aspecto específico, la dosis más alta tolerada que es terapéuticamente eficaz es la dosis más alta que es efectiva en el tratamiento de ASMD sin provocar uno, dos o más sucesos adversos relacionados graves o sucesos adversos relacionados como se definen por, por ejemplo, la terminología estándar de la Clinical Data Interchange Standards Consortium Study Data Tabulation Model v.3.1.1. En otro aspecto, la dosis más alta tolerada que es terapéuticamente eficaz es la dosis más alta que es efectiva en el tratamiento de ASMD sin provocar un aumento en la concentración de bilirrubina total en relación a la concentración de bilirrubina total del paciente antes de la administración de ASM, cuyo aumento dura más de dos días, tres días, cinco días, una semana, dos semanas, o tres semanas. En otro aspecto, la dosis más alta tolerada que es terapéuticamente eficaz es la dosis más alta que es efectiva en el tratamiento de ASMD sin provocar una concentración de bilirrubina total mayor que las concentraciones de bilirrubina totales normales, que dura más de 18 horas, 24 horas, 36 horas, 48 horas o 72 horas, 5 días, una semana, dos semanas o tres semanas después de la administración de la dosis de ASM. La

concentración de bilirrubina total normal en un humano sin ASMD (por ejemplo, un humano sano) es menor de aproximadamente 1,2 mg/dL. En ciertos aspectos, la dosis más alta tolerada que es terapéuticamente eficaz es la dosis más alta que es efectiva en el tratamiento de ASMD sin provocar una concentración de bilirrubina total que sea mayor de aproximadamente 1,5 mg/dL, 1,75 mg/dL, 2,0 mg/dL, 2,1 mg/dL, 2,2 mg/dL, 2,3 mg/dL, 2,4 mg/dL, 2,5 mg/dL, 2,6 mg/dL, 2,7 mg/dL, 2,75 mg/dL, 2,8 mg/dL, 2,9 mg/dL, 3,0 mg/dL, 3,1 mg/dL, 3,2 mg/dL, 3,3 mg/dL, 3,4 mg/dL, 3,5 mg/dL, 3,6 mg/dL, 3,7 mg/dL, 3,8 mg/dL, 3,9 mg/dL, o 4 mg/dL, o en el intervalo de 2,1 mg/dL a 2,5 mg/dL, 2,1 mg/dL a 3,0 mg/dL, o 2,1 mg/dL a 4 mg/dL que dura más de 18 horas, 24 horas, 36 horas, 48 horas o 72 horas, 5 días, una semana, dos semanas o tres semanas después de la administración de la dosis de ASM.

En otro aspecto, la dosis más alta tolerada es la dosis más alta que es eficaz en el tratamiento de ASMD sin producir una concentración de ceramida plasmática que es mayor que la concentración de ceramida plasmática normal 6 horas, 8 horas, 12 horas, 16 horas, 18 horas, 24 horas, 36 horas, 48 horas o 72 horas después de la administración de la dosis de ASM. La concentración de ceramida plasmática normal en un humano sin ASMD (por ejemplo, un humano sano) es aproximadamente de 1,5 a 8 µg/mL. En ciertas realizaciones, la dosis más alta tolerada es la dosis más alta que es eficaz en el tratamiento de ASMD sin producir una concentración de ceramida plasmática mayor que aproximadamente 8,2 µg/mL, 8,3 µg/mL, 8,4 µg/mL, 8,5 µg/mL, 8,75 µg/mL, 9 µg/mL, 9,5 µg/mL, 10 µg/mL, 11 µg/mL, 12 µg/mL, 13 µg/mL, 14 µg/mL, 15 µg/mL, 16 µg/mL, 17 µg/mL, 18 µg/mL, 19 µg/mL, 20 µg/mL, 25 µg/mL, 30 µg/mL, 35 µg/mL, 40 µg/mL, 45 µg/mL, 50 µg/mL, 55 µg/mL, 60 µg/mL, 65 µg/mL, 70 µg/mL, 75 µg/mL, o 80 µg/mL, o en un intervalo de 8,2 µg/mL a 10 µg/mL, 8,5 µg/mL a 10 µg/mL, 9 µg/mL a 12 µg/mL, 10 µg/mL a 12 µg/mL, 10 µg/mL a 15 µg/mL, 10 µg/mL a 20 µg/mL, 15 µg/mL a 20 µg/mL, o 20 µg/mL a 30 µg/mL 6 horas, 8 horas, 10 horas, 12 horas, 16 horas, 18 horas, 24 horas, 36 horas, 48 horas o 72 horas después de la administración de la dosis de ASM.

En otro aspecto, la dosis más alta tolerada que es terapéuticamente eficaz es la dosis más alta que es efectiva en el tratamiento de ASMD sin provocar una respuesta de fase aguda. Una respuesta de fase aguda se puede evaluar mediante un cambio en la concentración de un reactante de fase aguda, un cambio en el tiempo de protrombina, un cambio en el tiempo de tromboplastina parcial, o un cambio en el porcentaje de neutrófilos. Por ejemplo, una respuesta de fase aguda puede evaluarse mediante un aumento en uno o más de los siguientes factores después de la administración de ASM al sujeto en relación con esos factores antes de la administración de ASM al sujeto o en relación con esos factores en un humano sin ASMD (por ejemplo, un humano sano): el porcentaje de neutrófilos, el tiempo de protrombina (PT), el tiempo de tromboplastina parcial (PTT), la concentración total de bilirrubina, la concentración de proteína C reactiva (CRP/hs-CRP), el amiloide sérico A (SAA), el componente amiloide sérico P, la enzima convertidora de angiotensina (ACE), concentración de ferritina, concentración de IL-6, concentración de IL-8, concentración de calcitonina, concentración de albúmina o concentración de fibrinógeno. Una respuesta de fase aguda también se puede evaluar mediante una disminución en la concentración de hierro o concentración de albúmina después de la administración de ASM a un sujeto en relación con la concentración de hierro o concentración de albúmina en el sujeto antes de la administración de ASM o en relación con la concentración de hierro o concentración de albúmina en un humano sin ASMD (por ejemplo, un humano sano).

En un aspecto específico, la dosis más alta tolerada que es terapéuticamente eficaz es la dosis más alta que es efectiva en el tratamiento de ASMD sin provocar un aumento en la concentración de CRP/hs-CRP 6 horas, 8 horas, 12 horas, 16 horas, 18 horas, 24 horas, 36 horas, 48 horas o 72 horas después de la administración de la dosis de ASM en relación a la concentración de CRP/hs-CRP de un paciente antes de la administración de ASM. En otro aspecto específico, la dosis más alta tolerada que es terapéuticamente eficaz es la dosis más alta que es efectiva en el tratamiento de ASMD sin dar como resultado una concentración de CRP/hs-CRP plasmática que es mayor que la concentración de CRP/hs-CRP plasmática normal 6 horas, 8 horas, 12 horas, 16 horas, 18 horas, 24 horas, 36 horas, 48 horas o 72 horas después de la administración de la dosis de ASM. La concentración de CRP/hs-CRP plasmática normal en un humano sin ASMD (por ejemplo, un humano sano) es menor de aproximadamente 8 mg/L. En ciertos aspectos, la dosis más alta tolerada que es terapéuticamente eficaz es la dosis más alta que es efectiva en el tratamiento de ASMD sin provocar una concentración de CRP/hs-CRP plasmática mayor de aproximadamente 8,1 mg/L, 8,2 mg/L, 8,3 mg/L, 8,4 mg/L, 8,5 mg/L, 8,6 mg/L, 8,7 mg/L, 8,8 mg/L, 8,9 mg/L, 9 mg/L, 9,5 mg/L, 10 mg/L, 11 mg/L, o 12 mg/L, o en el intervalo de 8,5 mg/L a 10 mg/L, o 8,5 mg/L a 12 mg/L, o 10 mg/L a 12 mg/L 6 horas, 8 horas, 12 horas, 16 horas, 18 horas, 24 horas, 36 horas, 48 horas o 72 horas después de la administración de la dosis de ASM.

En un aspecto específico, la dosis más alta tolerada que es terapéuticamente eficaz es la dosis más alta que es efectiva en el tratamiento de ASMD sin provocar un aumento en la concentración de ferritina 6 horas, 8 horas, 12 horas, 16 horas, 18 horas, 24 horas, 36 horas, 48 horas o 72 horas después de la administración de la dosis de ASM en relación con la concentración de ferritina de un paciente antes de la administración de ASM. En otro aspecto específico, la dosis más alta tolerada que es terapéuticamente eficaz es la dosis más alta que es efectiva en el tratamiento de ASMD sin dar como resultado una concentración de ferritina plasmática que es mayor que la concentración de ferritina plasmática normal 6 horas, 8 horas, 12 horas, 16 horas, 18 horas, 24 horas, 36 horas, 48 horas o 72 horas después de la administración de la dosis de ASM. La concentración de ferritina plasmática normal en un humano sin ASMD (por ejemplo, un humano sano) es de 10 a 30 ng/mL. En ciertos aspectos, la dosis más alta tolerada que es terapéuticamente eficaz es la dosis más alta que es efectiva en el tratamiento de ASMD sin provocar una concentración de ferritina plasmática mayor de aproximadamente 300 ng/mL, 325 ng/mL, 350 ng/mL,

375 ng/mL, 400 ng/mL, 425 ng/mL, 450 ng/mL, 475 ng/mL, 500 ng/mL, 525 ng/mL, 550 ng/mL, 575 ng/mL, 600 ng/mL, 625 ng/mL, 650 ng/mL, 675 ng/mL, 700 ng/mL, 725 ng/mL, 750 ng/mL, 775 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, o 1200 ng/mL, o en el intervalo de 600 ng/mL a 800 ng/mL, 650 ng/mL a 850 ng/mL, 600 ng/mL a 1000 ng/mL, 600 ng/mL a 1200 ng/mL, 800 ng/mL a 1000 ng/mL, 900 ng/mL a 1000 ng/mL, o 1000 ng/mL, o 1000 ng/mL a 1200 ng/mL 6 horas, 8 horas, 12 horas, 16 horas, 18 horas, 24 horas, 36 horas, 48 horas o 72 horas después de la administración de la dosis de ASM puede utilizarse como una medida de una respuesta de fase aguda.

En una realización específica, un aumento en la concentración de IL-8 sérico o plasmático 6 horas, 8 horas, 12 horas, 16 horas, 18 horas, 24 horas, 36 horas, 48 horas o 72 horas después de la administración de una dosis de ASM en relación con la concentración de IL-8 de un paciente antes de la administración de ASM se puede utilizar como una medida de una respuesta de fase aguda. En otra realización específica, una concentración de IL-8 sérico o plasmático que es mayor de la concentración de IL-8 plasmático normal 6 horas, 8 horas, 12 horas, 18 horas, 24 horas, 36 horas, 48 horas o 72 horas después de la administración de la dosis de ASM se puede utilizar como una medida de una respuesta de fase aguda. En ciertas realizaciones, una concentración de IL-8 plasmático de más de aproximadamente 24 pg/mL, 50 pg/mL, 75 pg/mL, 100 pg/mL, 200 pg/mL, 300 pg/mL, 400 pg/mL, 500 pg/mL, 600 pg/mL, 700 pg/mL, 800 pg/mL, o 900 pg/mL 6 horas, 8 horas, 12 horas, 16 horas, 18 horas, 24 horas, 36 horas, 48 horas o 72 horas después de la administración de la dosis de ASM se puede utilizar como una medida de una respuesta de fase aguda.

En una realización específica, un aumento en la concentración de IL-6 sérico o plasmático 6 horas, 8 horas, 12 horas, 16 horas, 18 horas, 24 horas, 36 horas, 48 horas o 72 horas después de la administración de una dosis de ASM en relación con la concentración de IL-6 de un paciente antes de la administración de ASM se puede utilizar como una medida de una respuesta de fase aguda. En otra realización específica, una concentración de IL-6 sérico o plasmático que es mayor que la concentración de IL-6 sérico o plasmático normal 6 horas, 8 horas, 12 horas, 18 horas, 24 horas, 36 horas, 48 horas o 72 horas después de la administración de la dosis de ASM se puede utilizar como una medida de una respuesta de fase aguda. En ciertas realizaciones, una concentración de IL-6 plasmático de más de aproximadamente 4,4 pg/mL, 6 pg/mL, 8 pg/mL, 10 pg/mL, 15 pg/mL, 20 pg/mL, 25 pg/mL, o 30 pg/mL 6 horas, 8 horas, 12 horas, 16 horas, 18 horas, 24 horas, 36 horas, 48 horas o 72 horas después de la administración de la dosis de ASM se puede utilizar como una medida de una respuesta de fase aguda.

En una realización específica, un aumento en la concentración de calcitonina sérica o plasmática 6 horas, 8 horas, 12 horas, 16 horas, 18 horas, 24 horas, 36 horas, 48 horas o 72 horas después de la administración de una dosis de ASM en relación con la concentración de calcitonina de un paciente antes de la administración de ASM se puede utilizar como una medida de una respuesta de fase aguda. En otra realización específica, una concentración de calcitonina sérica o plasmática que es mayor que la concentración de calcitonina plasmática normal 6 horas, 8 horas, 12 horas, 18 horas, 24 horas, 36 horas, 48 horas o 72 horas después de la administración de la dosis de ASM se puede utilizar como una medida de una respuesta de fase aguda. En ciertas realizaciones, una concentración de calcitonina plasmática de más de aproximadamente 9,4 pg/mL, 20 pg/mL, 30 pg/mL, 40 pg/mL, 50 pg/mL, 75 pg/mL, 100 pg/mL, 150 pg/mL, 200 pg/mL, o 250 pg/mL, 6 horas, 8 horas, 12 horas, 16 horas, 18 horas, 24 horas, 36 horas, 48 horas o 72 horas después de la administración de la dosis de ASM se puede utilizar como una medida de una respuesta de fase aguda.

En un aspecto específico, la dosis más alta tolerada que es terapéuticamente eficaz es la dosis más alta que es efectiva en el tratamiento de ASMD sin provocar un aumento en la concentración de fibrinógeno 6 horas, 8 horas, 12 horas, 18 horas, 24 horas, 36 horas, 48 horas o 72 horas después de la administración de la dosis de ASM en relación con la concentración de fibrinógeno de un paciente antes de la administración de ASM. En otro aspecto específico, la dosis más alta tolerada que es terapéuticamente eficaz es la dosis más alta que es efectiva en el tratamiento de ASMD sin dar como resultado una concentración de fibrinógeno plasmático que es mayor que la concentración de fibrinógeno plasmático normal 6 horas, 8 horas, 12 horas, 16 horas, 18 horas, 24 horas, 36 horas, 48 horas o 72 horas después de la administración de la dosis de ASM. La concentración de fibrinógeno plasmático normal en un humano sin ASMD (por ejemplo, un humano sano) es de 150 mg/dL a 300 mg/dL. En ciertas realizaciones, la dosis más alta tolerada que es terapéuticamente eficaz es la dosis más alta que es efectiva en el tratamiento de ASMD sin provocar una concentración de fibrinógeno plasmático mayor de aproximadamente 350 mg/dL, 375 mg/dL, 400 mg/dL, 425 mg/dL, o 450 mg/dL, o en el intervalo de 350 mg/dL a 400 mg/dL, 350 mg/dL a 450 mg/dL, o 400 mg/dL a 450 mg/dL, 6 horas, 8 horas, 12 horas, 16 horas, 18 horas, 24 horas, 36 horas, 48 horas o 72 horas después de la administración de la dosis de ASM.

En un aspecto específico, la dosis más alta tolerada que es terapéuticamente eficaz es la dosis más alta que es efectiva en el tratamiento de ASMD sin provocar un aumento en el porcentaje de neutrófilos de los glóbulos blancos totales 6 horas, 8 horas, 12 horas, 16 horas, 18 horas, 24 horas, 36 horas, 48 horas o 72 horas después de la administración de la dosis de ASM en relación con el porcentaje de neutrófilos de los glóbulos blancos totales de un paciente antes de la administración de ASM. En otro aspecto específico, la dosis más alta tolerada que es terapéuticamente eficaz es la dosis más alta que es efectiva en el tratamiento de ASMD sin dar como resultado un porcentaje de neutrófilos de los glóbulos blancos totales que es mayor que el porcentaje de la concentración de neutrófilos de los glóbulos blancos totales normal 6 horas, 8 horas, 12 horas, 16 horas, 18 horas, 24 horas, 36 horas, 48

horas o 72 horas después de la administración de la dosis de ASM. El porcentaje de neutrófilos de glóbulos blancos totales normal en un humano sin ASMD (por ejemplo, un humano sano) es del 45% al 60%. En ciertos aspectos, la dosis más alta tolerada que es terapéuticamente eficaz es la dosis más alta que es efectiva en el tratamiento de ASMD sin producir un aumento en el porcentaje de neutrófilos de glóbulos blancos totales que es del 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o mayor 6 horas, 8 horas, 12 horas, 18 horas, 24 horas, 36 horas, 48 horas o 72 horas después de la administración de la dosis de ASM.

En otro aspecto, la dosis más alta tolerada que es terapéuticamente eficaz es la dosis más alta que es efectiva en el tratamiento de ASMD sin provocar un aumento en los anticuerpos a la ASM administrada. En otro aspecto, la dosis más alta tolerada que es terapéuticamente eficaz es la dosis más alta que es efectiva en el tratamiento de ASMD sin provocar una reacción de hipersensibilidad. En otro aspecto, la dosis más alta tolerada que es terapéuticamente eficaz es la dosis más alta que es efectiva en el tratamiento de ASMD sin provocar el síndrome de liberación de citoquina.

En ciertos aspectos, la dosis más alta tolerada por un sujeto que es terapéuticamente eficaz es de 1 mg/kg a 2,5 mg/kg, 2 mg/kg a 3 mg/kg, 3 mg/kg a 5 mg/kg, 5 mg/kg a 10 mg/kg, 10 mg/kg a 15 mg/kg, 15 mg/kg a 20 mg/kg, 15 mg/kg a 25 mg/kg, 20 mg/kg a 30 mg/kg, o 25 mg/kg a 50 mg/kg. En algunos aspectos, la dosis más alta tolerada por un sujeto que es terapéuticamente eficaz es de 1 mg/kg, 2 mg/kg, 3 mg/kg, 4 mg/kg, 5 mg/kg, 6 mg/kg, 7 mg/kg, 8 mg/kg, 9 mg/kg, 10 mg/kg, 11 mg/kg, 12 mg/kg, 13 mg/kg, 14 mg/kg, o 15 mg/kg. En ciertos aspectos, la dosis más alta tolerada por un sujeto que es terapéuticamente eficaz es de 20 mg/kg, 25 mg/kg, 30 mg/kg, 35 mg/kg, 40 mg/kg, 45 mg/kg, o 50 mg/kg.

En un aspecto específico, la dosis más alta tolerada que es terapéuticamente eficaz es la dosis más alta que es efectiva en el tratamiento de ASMD sin provocar uno, dos o más sucesos adversos relacionados graves o sucesos adversos relacionados como se define por, por ejemplo, la terminología estándar en la Clinical Data Interchange Standards Consortium Study Data Tabulation Model v.3.1.1. En otro aspecto, la dosis más alta tolerada que es terapéuticamente eficaz es la dosis más alta que es efectiva en el tratamiento de ASMD sin provocar un aumento en la concentración de bilirrubina total en relación con la concentración de bilirrubina total de un paciente antes de la administración de ASM, cuyo aumento dura más de dos días, tres días, cinco días, una semana, dos semanas, o tres semanas. En otro aspecto, la dosis más alta tolerada que es terapéuticamente eficaz es la dosis más alta que es efectiva en el tratamiento de ASMD sin provocar una concentración de bilirrubina total mayor que las concentraciones de bilirrubina total normales que duran más de 18 horas, 24 horas, 36 horas, 48 horas o 72 horas, 5 días, una semana, dos semanas o tres semanas después de la administración de la dosis de ASM. La concentración de bilirrubina total normal en un humano sin ASMD (por ejemplo, un humano sano) es menor de aproximadamente 1,2 mg/dL. En ciertos aspectos, la dosis más alta tolerada que es terapéuticamente eficaz es la dosis más alta que es efectiva en el tratamiento de ASMD sin provocar una concentración de bilirrubina total que es mayor de aproximadamente 1,5 mg/dL, 1,75 mg/dL, 2,0 mg/dL, 2,1 mg/dL, 2,2 mg/dL, 2,3 mg/dL, 2,4 mg/dL, 2,5 mg/dL, 2,6 mg/dL, 2,7 mg/dL, 2,75 mg/dL, 2,8 mg/dL, 2,9 mg/dL, 3,0 mg/dL, 3,1 mg/dL, 3,2 mg/dL, 3,3 mg/dL, 3,4 mg/dL, 3,5 mg/dL, 3,6 mg/dL, 3,7 mg/dL, 3,8 mg/dL, 3,9 mg/dL o 4 mg/dL o en el intervalo de 2,1 mg/dL a 2,5 mg/dL, 2,1 mg/dL a 3,0 mg/dL, o 2,1 mg/dL a 4 mg/dL que dura más de 18 horas, 24 horas, 36 horas, 48 horas o 72 horas, 5 días, una semana, dos semanas o tres semanas después de la administración de la dosis de ASM.

En otro aspecto, la dosis más alta tolerada es la dosis más alta que es efectiva en el tratamiento de ASMD sin dar como resultado una concentración de ceramida plasmática que es mayor que la concentración de ceramida plasmática normal 6 horas, 8 horas, 12 horas, 16 horas, 18 horas, 24 horas, 36 horas, 48 horas o 72 horas después de la administración de la dosis de ASM. La concentración de ceramida plasmática normal en un humano sin ASMD (por ejemplo, un humano sano) es aproximadamente de 1,5 a 8 µg/mL. En ciertos aspectos, la dosis más alta tolerada es la dosis más alta que es efectiva en el tratamiento de ASMD sin dar como resultado una concentración de ceramida plasmática mayor de aproximadamente 8,2 µg/mL, 8,3 µg/mL, 8,4 µg/mL, 8,5 µg/mL, 8,75 µg/mL, 9 µg/mL, 9,5 µg/mL, 10 µg/mL, 11 µg/mL, 12 µg/mL, 13 µg/mL, 14 µg/mL, 15 µg/mL, 16 µg/mL, 17 µg/mL, 18 µg/mL, 19 µg/mL, 20 µg/mL, 25 µg/mL, 30 µg/mL, 35 µg/mL, 40 µg/mL, 45 µg/mL, 50 µg/mL, 55 µg/mL, 60 µg/mL, 65 µg/mL, 70 µg/mL, 75 µg/mL, o 80 µg/mL, o en el intervalo de 8,2 µg/mL a 10 µg/mL, 8,5 µg/mL a 10 µg/mL, 9 µg/mL a 12 µg/mL, 10 µg/mL a 12 µg/mL, 10 µg/mL a 15 µg/mL, 10 µg/mL a 20 µg/mL, 15 µg/mL a 20 µg/mL, o 20 µg/mL a 30 µg/mL 6 horas, 8 horas, 10 horas, 12 horas, 16 horas, 18 horas, 24 horas, 36 horas, 48 horas o 72 horas después de la administración de la dosis de ASM.

En otro aspecto, la dosis más alta tolerada que es terapéuticamente eficaz es la dosis más alta que es efectiva en el tratamiento de ASMD sin provocar una respuesta de fase aguda. Una respuesta de fase aguda se puede evaluar por un cambio en la concentración de un reactante de fase aguda, un cambio en el tiempo de protrombina, un cambio en el tiempo de tromboplastina parcial, o un cambio en el porcentaje de neutrófilos. Por ejemplo, una respuesta de fase aguda se puede evaluar por un aumento en uno o más de los siguientes factores después de la administración de ASM a un sujeto en relación con esos factores antes de la administración de ASM al sujeto o en relación con esos factores en un ser humano sin ASMD (por ejemplo, un humano sano); el porcentaje de neutrófilos, el tiempo de protrombina (PT), el tiempo de tromboplastina parcial (PTT), la concentración de bilirrubina total, la concentración de proteína C reactiva (CRP/hs-CRP), amiloide sérico A (SAA), componente del amiloide sérico P, enzima convertidora de angiotensina (ACE), concentración de ferritina, concentración de albúmina o concentración de fibrinógeno. Una

respuesta de fase aguda se puede evaluar también por una disminución en la concentración de hierro o concentración de albúmina después de la administración de ASM a un sujeto en relación con la concentración de hierro o concentración de albúmina en el sujeto antes de la administración de ASM o en relación con la concentración de hierro o concentración de albúmina en un humano sin ASMD (por ejemplo, un humano sano).

- 5 En un aspecto específico, la dosis más alta tolerada que es terapéuticamente eficaz es la dosis más alta que es efectiva en el tratamiento de ASMD sin provocar un aumento en la concentración de CRP/hs-CRP 6 horas, 8 horas, 12 horas, 16 horas, 18 horas, 24 horas, 36 horas, 48 horas o 72 horas después de la administración de la dosis de ASM en relación con la concentración de CRP/hs-CRP de un paciente antes de la administración de ASM.

- 10 En otro aspecto específico, la dosis más alta tolerada que es terapéuticamente eficaz es la dosis más alta que es efectiva en el tratamiento de ASMD sin dar como resultado una concentración de CRP/hs-CRP plasmática que es mayor que la concentración de CRP/hs-CRP plasmática normal 6 horas, 8 horas, 12 horas, 16 horas, 18 horas, 24 horas, 36 horas, 48 horas o 72 horas después de la administración de la dosis de ASM. La concentración de CRP/hs-CRP plasmática normal en un humano sin ASMD (por ejemplo, un humano sano) es menor de aproximadamente 8 mg/L. En ciertos aspectos, la dosis más alta tolerada que es terapéuticamente eficaz es la dosis más alta que es efectiva en el tratamiento de ASMD sin provocar una concentración de CRP/hs-CRP plasmática mayor de aproximadamente 8,1 mg/L, 8,2 mg/L, 8,3 mg/L, 8,4 mg/L, 8,5 mg/L, 8,6 mg/L, 8,7 mg/L, 8,8 mg/L, 8,9 mg/L, 9 mg/L, 9,5 mg/L, 10 mg/L, 11 mg/L, o 12 mg/L, o en el intervalo de 8,5 mg/L a 10 mg/L, o 8,5 mg/L a 12 mg/L, o 10 mg/L a 12 mg/L 6 horas, 8 horas, 12 horas, 16 horas, 18 horas, 24 horas, 36 horas, 48 horas o 72 horas después de la administración de la dosis de ASM.

- 20 En un aspecto específico, la dosis más alta tolerada que es terapéuticamente eficaz es la dosis más alta que es efectiva en el tratamiento de ASMD sin provocar un aumento en la concentración de ferritina 6 horas, 8 horas, 12 horas, 16 horas, 18 horas, 24 horas, 36 horas, 48 horas o 72 horas después de la administración de la dosis de ASM en relación con la concentración de ferritina de un paciente antes de la administración de ASM. En otra realización específica, la dosis más alta tolerada que es terapéuticamente eficaz es la dosis más alta que es efectiva en el tratamiento de ASMD sin dar como resultado una concentración de ferritina plasmática que es mayor que la concentración de ferritina plasmática normal 6 horas, 8 horas, 12 horas, 16 horas, 18 horas, 24 horas, 36 horas, 48 horas o 72 horas después de la administración de la dosis de ASM. La concentración de ferritina plasmática normal en un humano sin ASMD (por ejemplo, un humano sano) es de 10 a 30 ng/mL. En ciertos aspectos, la dosis más alta tolerada que es terapéuticamente eficaz es la dosis más alta que es efectiva en el tratamiento de ASMD sin provocar una concentración de ferritina plasmática de más de aproximadamente 600 ng/mL, 625 ng/mL, 650 ng/mL, 675 ng/mL, 700 ng/mL, 725 ng/mL, 750 ng/mL, 775 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, o 1200 ng/mL o en el intervalo de 600 ng/mL a 800 ng/mL, 650 ng/mL a 850 ng/mL, 600 ng/mL a 1000 ng/mL, 600 ng/mL a 1200 ng/mL, 800 ng/mL a 1000 ng/mL, 900 ng/mL a 1000 ng/mL, o 1000 ng/mL a 1200 ng/mL 6 horas, 8 horas, 12 horas, 16 horas, 18 horas, 24 horas, 36 horas, 48 horas o 72 horas después de la administración de la dosis de ASM.

- 40 En un aspecto específico, la dosis más alta tolerada que es terapéuticamente eficaz es la dosis más alta que es efectiva en el tratamiento de ASMD sin provocar un aumento en la concentración de fibrinógeno 6 horas, 8 horas, 12 horas, 18 horas, 24 horas, 36 horas, 48 horas o 72 horas después de la administración de la dosis de ASM en relación con la concentración de fibrinógeno de un paciente antes de la administración de ASM. En otro aspecto específico, la dosis más alta tolerada que es terapéuticamente eficaz es la dosis más alta que es efectiva en el tratamiento de ASMD sin dar como resultado una concentración de fibrinógeno plasmático que es mayor que la concentración de fibrinógeno plasmático normal 6 horas, 8 horas, 12 horas, 16 horas, 18 horas, 24 horas, 36 horas, 48 horas o 72 horas después de la administración de la dosis de ASM. La concentración de fibrinógeno plasmático normal en un humano sin ASMD (por ejemplo, un humano sano) es de 150 mg/dL a 300 mg/dL. En ciertos aspectos, la dosis más alta tolerada que es terapéuticamente eficaz es la dosis más alta que es efectiva en el tratamiento de ASMD sin provocar una concentración de fibrinógeno plasmático de más de aproximadamente 350 mg/dL, 375 mg/dL, 400 mg/dL, 425 mg/dL, o 450 mg/dL, o en el intervalo de 350 mg/dL a 400 mg/dL, 350 mg/dL a 450 mg/dL, o 400 mg/dL a 450 mg/dL, 6 horas, 8 horas, 12 horas, 16 horas, 18 horas, 24 horas, 36 horas, 48 horas o 72 horas después de la administración de la dosis de ASM.

- 50 En un aspecto específico, la dosis más alta tolerada que es terapéuticamente eficaz es la dosis más alta que es efectiva en el tratamiento de ASMD sin provocar un aumento en el porcentaje de neutrófilos de los glóbulos blancos totales 6 horas, 8 horas, 12 horas, 16 horas, 18 horas, 24 horas, 36 horas, 48 horas o 72 horas después de la administración de la dosis de ASM en relación con el porcentaje de neutrófilos de los glóbulos blancos totales de un paciente antes de la administración de ASM. En otro aspecto específico, la dosis más alta tolerada que es terapéuticamente eficaz es la dosis más alta que es efectiva en el tratamiento de ASMD sin dar como resultado un porcentaje de neutrófilos de los glóbulos blancos totales que es mayor que el porcentaje normal de neutrófilos de los glóbulos blancos totales 6 horas, 8 horas, 12 horas, 16 horas, 18 horas, 24 horas, 36 horas, 48 horas o 72 horas después de la administración de la dosis de ASM. El porcentaje normal de neutrófilo de los glóbulos blancos totales en un humano sin ASMD (por ejemplo, un humano sano) es del 45% al 60%. En ciertos aspectos, la dosis más alta tolerada que es terapéuticamente eficaz es la dosis más alta que es efectiva en el tratamiento de ASMD sin provocar un aumento en el porcentaje de neutrófilos de los glóbulos blancos totales que es del 70%, 75%, 80%, 85%, 90%,

95% o mayor 6 horas, 8 horas, 12 horas, 18 horas, 24 horas, 36 horas, 48 horas o 72 horas después de la administración de la dosis de ASM.

En otro aspecto, la dosis más alta tolerada que es terapéuticamente eficaz es la dosis más alta que es efectiva en el tratamiento de ASMD sin provocar un aumento en los anticuerpos contra la ASM administrada. En otro aspecto, la dosis más alta tolerada que es terapéuticamente eficaz es la dosis más alta que es efectiva en el tratamiento de ASMD sin provocar una reacción de hipersensibilidad. En otro aspecto, la dosis más alta tolerada que es terapéuticamente eficaz es la dosis más alta que es efectiva en el tratamiento de ASMD sin provocar el síndrome de liberación de citoquina.

En ciertos aspectos, la dosis más alta tolerada por un sujeto que es terapéuticamente eficaz es 1 mg/kg a 2,5 mg/kg, 2 mg/kg a 3 mg/kg, 3 mg/kg a 5 mg/kg, 5 mg/kg a 10 mg/kg, 10 mg/kg a 15 mg/kg, 15 mg/kg a 20 mg/kg, 15 mg/kg a 25 mg/kg, 20 mg/kg a 30 mg/kg, o 25 mg/kg a 50 mg/kg. En algunos aspectos, la dosis más alta tolerada por un sujeto que es terapéuticamente eficaz es de 1 mg/kg, 2 mg/kg, 3 mg/kg, 4 mg/kg, 5 mg/kg, 6 mg/kg, 7 mg/kg, 8 mg/kg, 9 mg/kg, 10 mg/kg, 11 mg/kg, 12 mg/kg, 13 mg/kg, 14 mg/kg, o 15 mg/kg. En ciertos aspectos, la dosis más alta tolerada por un sujeto que es terapéuticamente eficaz es de 20 mg/kg, 25 mg/kg, 30 mg/kg, 35 mg/kg, 40 mg/kg, 45 mg/kg, o 50 mg/kg.

En ciertas realizaciones, una dosis de ASM descrita en la presente memoria se administra cada 3 días, cada 4 días, cada 5 días, cada 6 días, cada semana, cada 8 días, cada 9 días, cada 10 días, cada 11 días, cada 12 días, cada 13 días, cada 2 semanas, cada 3 semanas, cada 4 semanas, o cada 5 semanas a un sujeto. En algunas realizaciones, una dosis de ASM descrita en la presente memoria se administra cada 3 a 5 días, cada 3 a 7 días, cada 5 a 7 días, cada 5 a 10 días, cada 5 a 14 días, cada 7 a 14 días, cada 2 a 4 semanas, o cada 3 a 5 semanas a un sujeto. En ciertas realizaciones, la frecuencia de administración de una dosis de ASM cambia cuando se ajusta la dosis. Por ejemplo, una dosis de 0,3 mg/kg se puede administrar cada semana o dos semanas y una dosis de 1 mg/kg se puede administrar cada dos semanas o tres semanas.

En algunas realizaciones, una dosis de ASM (por ejemplo, una dosis de mantenimiento) se administra a un sujeto durante un período de 12 semanas, 20 semanas, 25 semanas, 30 semanas, 35 semanas, 40 semanas, 45 semanas, 50 semanas, 52 semanas, 1 año, 1,5 años, 2 años, 2,5 años, 3 años, 3,5 años, 4 años o hasta que el paciente experimente un suceso adverso relacionado, un valor de bilirrubina total mayor que el valor de bilirrubina para un humano sin ASMD (por ejemplo, un humano sano), una concentración de ceramida plasmática mayor que la concentración de ceramida plasmática de un humano sin ASMD (por ejemplo, un humano sano), o una respuesta de fase aguda.

En ciertas realizaciones, una dosis inicial baja, no tóxica de ASM se administra cada 3 días, cada 4 días, cada 5 días, cada 6 días, cada semana, cada 8 días, cada 9 días, cada 10 días, cada 11 días, cada 12 días, cada 13 días, cada 2 semanas, cada 3 semanas, cada 4 semanas, o cada 5 semanas a un sujeto. En algunas realizaciones, una dosis de ASM descrita en la presente memoria se administra cada 3 a 5 días, cada 3 a 7 días, cada 5 a 7 días, cada 5 a 10 días, cada 5 a 14 días, cada 7 a 14 días, cada 2 a 4 semanas, o cada 3 a 5 semanas a un sujeto. En ciertas realizaciones, la dosis inicial baja, no tóxica de ASM se administra durante un período de 4 semanas, 6 semanas, 8 semanas, 12 semanas, 14 semanas o más.

En ciertas realizaciones, un aumento sucesivo en la dosis de ASM es aproximadamente 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, o 1 mg/kg mayor que la dosis anterior. En algunas realizaciones, un aumento sucesivo en la dosis de ASM 0,1 a 0,5 mg/kg, 0,1 mg/kg a 1 mg/kg, o 0,5 mg/kg a 1 mg/kg mayor que la dosis anterior. En algunos aspectos, un aumento sucesivo en la dosis de ASM es 0,5 mg/kg a 2 mg/kg, 1 mg/kg a 2 mg/kg, 2 mg/kg a 4 mg/kg o 2 mg/kg a 5 mg/kg o 1,2 mg/kg, 1,5 mg/kg, 1,75 mg/kg, 2 mg/kg, 3 mg/kg, 4 mg/kg o 5 mg/kg mayor que la dosis anterior.

Las dosis de ASM descritas en la presente memoria se pueden administrar por cualquier vía que sea útil para lograr un efecto terapéutico. Vías específicas de administración de dosis de ASM incluyen, pero no se limitan a, intravenoso, intraventricular, intradérmico, transdérmico, subcutáneo, intramuscular, intranasal, inhalación, intrapulmonar, tópico, transmucoso, intracraneal, intratecal, epidural e intra-sinovial. En una realización, una dosis de ASM se administra sistemáticamente (por ejemplo, parenteralmente) a un sujeto que lo necesita. En otra realización, una dosis de ASM se administra localmente a un sujeto que lo necesita.

La dosis de la enzima ASM que es eficaz en el tratamiento de las manifestaciones somáticas (sistema nervioso no central) de ASMD no es capaz de cruzar con eficacia la barrera hematoencefálica. Por lo tanto, en realizaciones específicas, la ASM se administra a un paciente intraventricular o intratécamente en el cerebro de un paciente con NPD. Véase, por ejemplo, los documentos de Solicitud de Patente U.S. Patent Application Publication No. 2009/0130079 y 2009/0123451 para métodos para el suministro intraventricular de enzimas de almacenamiento lisosomal al cerebro. En ciertas realizaciones, la ASM se administra a un paciente intracerebraventricularmente. Véase, por ejemplo, Dodge et al., 2009, *Experimental Neurology* 215: 349-357 para métodos para infusión intracerebraventricular de ASM. En algunas realizaciones, la ASM se administra a un paciente mediante inyecciones intraparenquimatosas indirectas. Véase, por ejemplo, Yang et al., 2007, *Experimental Neurology* 207: 258-266. En

algunas realizaciones, una forma modificada de ASM que dirige la enzima al cerebro, tal como se describe en la Sección 5.2, a continuación, se administra a un paciente para tratar la ASMD.

5 Solo un pequeño porcentaje de la enzima ASM administrada a un paciente alcanza el pulmón. Así, en realizaciones específicas, la ASM se administra a los pulmones de un paciente. En ciertas realizaciones, la ASM se administra por vía intranasal o por inhalación a un paciente. Véase, por ejemplo, Ziegler et al., 2009, *Molecular Genetics and Metabolism* 97: 35-42 para obtener información sobre la administración intranasal de ASM. En algunas realizaciones, una forma modificada de ASM que dirige la enzima al pulmón, tal como se describe en la Sección 5.2, a continuación, se administra a un paciente para tratar la ASMD. En ciertas realizaciones, la ASM se administra a un paciente utilizando un nebulizador. El suministro de ASM a los pulmones puede ocurrir por inyección intrapulmonar a través de un broncoscopio, un inhalador de dosis medida o un nebulizador.

15 En ciertas realizaciones, la enzima ASM se administra sistémicamente a un paciente, así como se administra localmente a órganos específicos, como el cerebro y el pulmón. En algunas realizaciones, la administración local de la enzima ASM complementa la administración sistémica de la enzima. En realizaciones específicas, la enzima ASM se administra localmente, por ejemplo, al cerebro o los pulmones, después de que la esfingomielina acumulada en el paciente se haya reducido por administración sistémica (por ejemplo, administración intravenosa).

En ciertas realizaciones, un paciente es genotipado antes de la administración de ASM. En algunas realizaciones, el patrón de glicosilación de la ASM expresada por un paciente se determina antes de la administración de la ASM. La administración de la ASM que es similar/compatible con la expresada de forma endógena por un paciente puede reducir el potencial de inmunogenicidad.

20 En ciertas realizaciones, la actividad de la ASM expresada de manera endógena se determina antes de la administración de la ASM. La actividad de la ASM expresada endógenamente se puede medir en DBS y en fibroblastos cultivados utilizando técnicas conocidas por los expertos en la técnica.

En una realización específica, una ASM para su uso en los métodos para tratar ASMD proporcionados en la presente memoria reducen el volumen del bazo según se evalúa mediante técnicas conocidas en la técnica, por ejemplo, MRI. En otra realización específica, una ASM para su uso en los métodos para tratar ASMD proporcionados en la presente memoria reducen los niveles de esfingomielina hepática según se evalúa mediante técnicas conocidas en la técnica, por ejemplo, análisis bioquímicos y/o análisis histomorfométricos de muestras de hígado. En otra realización específica, una ASM para su uso en los métodos para tratar ASMD proporcionados en la presente memoria aumentan la capacidad de ejercicio según se evalúa mediante técnicas conocidas en la técnica, por ejemplo, la máxima carga de trabajo por ergometría de ciclo, incluyendo el porcentaje de carga máxima predicha, el consumo máximo de oxígeno y la producción de dióxido de carbono. En otra realización específica, una ASM para su uso en los métodos para tratar ASMD proporcionados en la presente memoria aumentan la función pulmonar según se evalúa mediante técnicas conocidas en la técnica, por ejemplo, DLco, FVC, FEV₁, y/o TLC. En otra realización específica, una ASM para su uso en los métodos para tratar ASMD proporcionados en la presente memoria disminuyen en esfingomielina de lavado alveolar bronquial (BAL). En otra realización específica, una ASM para su uso en los métodos para tratar ASMD proporcionados en la presente memoria disminuyen el volumen del hígado según se evalúa mediante técnicas conocidas en la técnica, por ejemplo, MRI. En otra realización específica, una ASM para su uso en los métodos para tratar ASMD proporcionados en la presente memoria mejoran la apariencia pulmonar según se evalúa mediante técnicas conocidas en la técnica, por ejemplo, tomografía computarizada de alta resolución o radiografía de tórax. En otra realización específica, una ASM para su uso en los métodos para tratar ASMD proporcionados en la presente memoria mejoran el aclaramiento pulmonar. En otra realización específica, una ASM para su uso en los métodos para tratar ASMD proporcionados en la presente memoria reducen la concentración de esfingomielina en el hígado, piel, plasma y DBS. En otra realización específica, una ASM para su uso en los métodos para tratar ASMD proporcionados en la presente memoria reducen los niveles séricos de quitotriosidasa. En otra realización específica, una ASM para su uso en los métodos para tratar ASMD proporcionados en la presente memoria reducen los niveles séricos de CCL18. En otra realización específica, una ASM para su uso en los métodos para tratar ASMD proporcionados en la presente memoria mejora el perfil lipídico del paciente (por ejemplo, disminuyen el colesterol). En otra realización específica, una ASM para su uso en los métodos para tratar ASMD proporcionados en la presente memoria reduce o mejora la gravedad de ASMD y/o un síntoma asociado con el mismo. En otra realización específica, una ASM para su uso en los métodos para tratar ASMD proporcionados en la presente memoria reduce la duración de un síntoma asociado con ASMD. En otra realización específica, una ASM para su uso en los métodos para tratar ASMD proporcionados en la presente memoria previenen la aparición de un síntoma asociado con ASMD. En otra realización específica, una ASM para su uso en los métodos para tratar ASMD proporcionados en la presente memoria reduce la hospitalización de un sujeto. En otra realización específica, una ASM para su uso en los métodos para tratar ASMD proporcionados en la presente memoria reduce la duración de la hospitalización. En otra realización específica, una ASM para su uso en los métodos para tratar ASMD proporcionados en la presente memoria aumenta la supervivencia de un sujeto. En otra realización específica, una ASM para su uso en los métodos para tratar ASMD proporcionados en la presente memoria reduce la mortalidad del sujeto. En otra realización específica, una ASM para su uso en los métodos para tratar ASMD proporcionados en la presente memoria disminuye la tasa de hospitalización de un sujeto. En otra realización específica, una ASM para su uso en los métodos para tratar ASMD

proporcionados en la presente memoria reduce el número de síntomas asociados con ASMD. En otra realización específica, una ASM para su uso en los métodos para tratar ASMD proporcionados en la presente memoria aumenta la supervivencia sin síntomas de los pacientes de ASMD. En otra realización específica, una ASM para su uso en los métodos para tratar ASMD proporcionados en la presente memoria mejoran la función neurológica (por ejemplo, función psicomotora, capacidad de respuesta social, etc) de un sujeto.

En otra realización específica, una ASM para su uso en los métodos para tratar ASMD proporcionados en la presente memoria mejoran la calidad de vida de un paciente. En ciertas realizaciones específicas, una ASM para su uso en los métodos para tratar ASMD proporcionados en la presente memoria mejoran la calidad de vida de un paciente como se evalúa mediante, por ejemplo, el Brief Fatigue Inventory (BFI; Mendoza et al., 1999, Cancer 85(5): 1186-1196), The Brief Pain Inventory-Short Form (BPI-SF; Cleeland et al., 1994, Ann Acad Med Singapore 23(2): 129-138), The ASM-Health Assessment Questionnaire, que es una mezcla de BFI, BPI-SF, y Short Form-36 Health Survey, The Chronic Respiratory Disease Questionnaire Self-Administered Standardized (CRQ-SAS; Schunemann et al., 2005, Eur. Respir. J. 25: 31-40) para evaluar la disnea y la fatiga, y la Activity Measure for Post-Acute Care (AM-PAC), un ensayo adaptativo de computadora que evalúa las motilidades funcionales (por ejemplo, movilidad, autocuidado y cognición aplicada).

Enzima esfingomielinasa ácida

ASM se refiere a cualquier forma de la enzima esfingomielinasa ácida que retiene la capacidad de hidrolizar la esfingomielina a ceramida y fosforilcolina como se evaluó mediante técnicas conocidas por un experto en la técnica, tal como lo descrito en los documentos de Patente U.S. Patent. Nos. 4,039,388, 4,082,781, 5,686,240 y 7,563,591, y las Publicaciones Internacionales Nos. WO 2007/078806 y WO 2006/058385. En una realización específica, una enzima esfingomielinasa ácida tiene la capacidad para hidrolizar la esfingomielina a ceramida y fosfocolina en el ensayo de cromatografía líquida de alto rendimiento basado en fluorescencia descrito en He et al., 2003, Analytical Biochemistry 314: 116-120. En una realización específica, una esfingomielinasa ácida tiene al menos el 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 75%, 80%, 85%, 80%, 90%, 95% o 98%, o 30% a 50%, 40% a 50%, 50% a 75%, 50% a 90%, 75% a 80%, 75% a 90%, 75% a 95% o 85% a 95% de la actividad de ASM-1 (SEQ ID NO: 1, a continuación) como se midió mediante, por ejemplo, el ensayo descrito en He et al., 2003, Analytical Biochemistry 314: 116-120.

En una realización específica, la ASM es una ASM humana. Existen varias isoformas de la ASM humana que resultan de un empalme alternativo. Una de las isoformas de ASM humana, la isoforma 1 de la ASM humana (algunas veces nombrada como ASM-1), tiene la secuencia de aminoácidos encontrada en el número de acceso de UniProtKB/Swiss-Prot P17405-1. Otra isoforma de ASM humana, la isoforma 2 de la ASM humana (algunas veces nombrada como ASM-2), tiene la secuencia de aminoácidos encontrada en el número de acceso de UniProtKB/Swiss-Prot P17405-2. Una tercera isoforma de ASM humana, la isoforma 3 de la ASM humana (algunas veces nombrada como ASM-3), tiene la secuencia de aminoácidos encontrada en el número de acceso de UniProtKB/Swiss-Prot P17405-3. La secuencia de aminoácidos de ASM-1, que es la isoforma más abundante, se proporciona a continuación:

ES 2 738 859 T3

10 20 30 40 50 60
 MPRYGASLRQ SCPRSGREQG QDGTAGAPGL LWMGLVLALA LALALALSDS RVLWAPAEAH

70 80 90 100 110 120
 PLSPQGHPAR LHRIVPRLRD VFGWGNLTCP ICKGLFTAIN LGLKKEPNVA RVGSVAIKLC

130 140 150 160 170 180
 NLLKIAPPAV CQSIVHLFED DMVEVWRRSV LSPSEACGLL LGSTCGHWDI FSSWNISLPT

190 200 210 220 230 240
 VPKPPKPPS PPAPGAPVSR ILFLTDLHWD HDYLEGTDPD CADPLCCRRG SGLPPASRPG

250 260 270 280 290 300
 AGYWGEYSKC DLPLRTLESL LSGLGPAAGPF DMVYWTGDIP AHDVWHQTRQ DQLRALTTVT

310 320 330 340 350 360
 ALVRKFLGPV PVYPAVGNHE STPVNSFPPP FIEGNHSSRW LYEAMAKAWE PWLPAEALRT

370 380 390 400 410 420
 LRIGGFYALS PYPGLRLISL NMNFCSRENF WLLINSTDPA GQLQWLVGEL QAAEDRGDKV

430 440 450 460 470 480
 HIIGHIPPGH CLKSWSWNY RIVARYENTL AAQFFGHTHV DEFEVIFYDEE TLRPLAVAF

490 500 510 520 530 540
 LAPSATTYIG LNPgyrvyqi DGNYSgsshv VLDHETYILN LTQANIPGAI PHWQLLYRAR

550 560 570 580 590 600
 ETYGLPNTLP TAWHNLVYRM RGDMLFQTF WFLYHKGHPP SEPCGTPCRL ATLCAQLSAR

610 620
 ADSPALCRHL MPDGSLPEAQ SLWPRPLFC

5 (SEQ ID NO: 1). ASM-2 difiere de ASM-1 en que los restos de aminoácidos 363 a 374 de ASM-1 (es decir, IGGFYALSPYPG (SEQ ID NO: 2)) se sustituyen con los aminoácidos YLSSVETQEGKR (SEQ ID NO: 3) y los restos de aminoácidos 375 a 418 de ASM-1 faltan en ASM-2. ASM-3 difiere de ASM-1 en que los restos de aminoácidos 363 a 418 de ASM-1 faltan en ASM-3. En la medida en que ASM-2 y ASM-3 tiene actividad enzimática medida

mediante, por ejemplo, el ensayo descrito en He et al., 2003, *Analytical Biochemistry* 314: 116-120, se incluyen como una ASM que podría administrarse a un sujeto. En una realización específica, en la medida en que ASM-2 y ASM-3 tengan al menos el 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 75%, 80%, 85%, 80%, 90%, 95% o 98%, o 30% a 50%, 40% a 50%, 50% a 75%, 50% a 90%, 75% a 80%, 75% a 90%, 75% a 95%, o 85% a 95% de la actividad de ASM-1 como se mide mediante, por ejemplo, el ensayo descrito en He et al., 2003, *Analytical Biochemistry* 314: 116-120, se incluyen como un ASM que podría administrarse a un sujeto.

En una realización específica, la ASM humana tiene la secuencia de aminoácidos de la esfingomielinasa ácida humana descrita en SEQ ID NO: 1, anterior, la secuencia de aminoácidos de una esfingomielinasa ácida humana descrita en el documento de Patente U.S. Patent No. 6,541,218 (por ejemplo, SEQ ID NO: 2 en el documento de Patente U.S. Patent No. 6,541,218), o la secuencia de aminoácidos descrita en la Figura 3 de Schuchman et al., 1991, *J. Biol. Chem.* 266: 8531-8539.

En realizaciones específicas, la ASM humana es la forma madura procesada. En otras realizaciones, la ASM humana es la forma inmadura, sin procesar. Con respecto a ASM-1, la forma inmadura tiene una longitud de 629 aminoácidos y contiene el péptido señal que se encuentra en los restos de aminoácidos 1 a 46. La forma madura de ASM-1 carece de ese péptido señal y es del resto de aminoácidos 47 al resto de aminoácidos 629. La ASM-1 humana contiene un dominio de saposina de tipo B de los restos de aminoácidos del 85 al 169. Con respecto a la ASM-1, los siguientes restos de aminoácidos están glicosilados (en particular, glicosilados unidos a N): 86, 175, 335, 395, y 520.

Además de las isoformas de la ASM humana, existen varias variantes naturales de la ASM humana. Por ejemplo, se han identificado variantes naturales del gen ASM humano con diferentes números de unidades de repetición de hexanucleótidos que se producen dentro de la región del gen que codifica el péptido señal putativo de ASM. Véase, por ejemplo, Wan and Schuchman, 1995, *Biochimica et Biophysica Acta* 1270: 207-210 que describe la identificación de cinco alelos que corresponden a nueve, siete, seis, cinco y cuatro repeticiones de hexanucleótidos. Además, se han identificado variantes naturales de la ASM humana con variaciones de aminoácidos individuales. Véase, por ejemplo, Schuchman et al., 1991, *J. of Biol. Chem.* 266: 8531-8539 y Schuchman et al., 1991, *Nucleic Acids Research* 19(11): 3160 para obtener información sobre polimorfismos únicos. En la medida en que cualquiera de las variantes naturales de la ASM humana tenga actividad enzimática, medida mediante, por ejemplo, el ensayo descrito en He et al., 2003, *Analytical Biochemistry* 314: 116-120, se incluyen como una ASM que podría administrarse a un sujeto. En una realización específica, en la medida en que cualquiera de las variantes naturales de la ASM humana tenga al menos el 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 75%, 80%, 85%, 80%, 90%, 95% o 98%, o 30% a 50%, 40% a 50%, 50% a 75%, 50% a 90%, 75% a 80%, 75% a 90%, 75% a 95%, o 85% a 95% de la actividad del ASM-1 como se mide mediante, por ejemplo, el ensayo descrito en He et al., 2003, *Analytical Biochemistry* 314: 116-120, se incluyen como un ASM que podría administrarse a un sujeto.

Se han identificado muchos polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) para el gen que codifica la ASM humana (véase, por ejemplo, la página web del ncbi: ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/ para ejemplos de SNPs). En la medida en que cualquiera de los SNPs en el gen codifique un ASM que tiene actividad enzimática como se mide mediante, por ejemplo, el ensayo descrito en He et al., 2003, *Analytical Biochemistry* 314: 116-120, se incluyen como un ASM que podría administrarse a un sujeto. En una realización específica, en la medida en que cualquiera de los SNPs en el gen codifique una ASM que tenga al menos el 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 75%, 80%, 85%, 80%, 90%, 95% o 98%, o 30% a 50%, 40% a 50%, 50% a 75%, 50% a 90%, 75% a 80%, 75% a 90%, 75% a 95%, o 85% a 95% de la actividad del ASM-1 como se mide mediante, por ejemplo, el ensayo descrito en He et al., 2003, *Analytical Biochemistry* 314: 116-120, se incluyen como un ASM que podría administrarse a un sujeto.

En ciertas realizaciones, la ASM es una forma modificada de la ASM humana. En una realización específica, la forma modificada de la ASM humana es una descrita en el documento de Patente U.S. Patent. No. 7,527,956. En otra realización, la forma modificada de la ASM humana es una descrita en la Publicación Internacional No. WO 2008/136451. En algunas realizaciones, la ASM es una forma modificada de la ASM humana que tiene una, dos o más de las siguientes propiedades: (i) mayor orientación a los sitios de patología (por ejemplo, el pulmón y/o el cerebro) en relación con la ASM humana no modificada, (ii) mayor estabilidad en relación con la ASM humana no modificada, y (iii) mayor actividad en relación con la ASM humana no modificada. Las técnicas conocidas en la técnica se pueden utilizar para medir la estabilidad, la actividad y el direccionamiento de ASM. En una realización específica, se utilizan las técnicas descritas en Gamacho et al., 2008, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 325: 400-408 para evaluar la orientación de ASM. En otra realización específica, se utilizan las técnicas descritas en He et al., 1999, *Biochimica et Biophysica Acta* 1432: 251-264 o Dhami et al., 2001, *Lab Invest.* 81: 987-999 para evaluar la estabilidad de la ASM. En otra realización específica, se utilizan las técnicas descritas en He et al., 2003, *Analytical Biochemistry* 314: 116-120 para evaluar la actividad de la ASM.

En una realización, la ASM es una forma modificada de la ASM humana que tiene la actividad enzimática aumentada en relación a la ASM humana sin modificar, tal como ASM-1. Véase, por ejemplo, Qiu et al., 2003, *J. Biol. Chem.* 278(35): 32744-32752 y el documento de Patente U.S. Patent. No. 7,527,956 para formas mutantes de una ASM humana recombinante con actividad enzimática con la actividad mayor que la ASM humana recombinante de tipo nativo (tal como, por ejemplo, ASM-1). En algunas realizaciones, la ASM tiene la actividad enzimática

5 aumentada en relación a la ASM humana sin modificar (tal como, por ejemplo, AMS-1) debido a la adición de cationes zinc. Véase, por ejemplo, Schissel et al., 1998, J. Biol. Chem 273: 18250-18259 para una discusión sobre el papel del zinc en la actividad de la ASM. En otra realización, la ASM es una forma modificada de la ASM humana que tiene una mayor afinidad por un receptor natural de la ASM humana (por ejemplo, manosa-6-fosfato o alta manosa) en relación con la ASM humana sin modificar (tal como, por ejemplo, ASM-1). En una realización específica, la ASM se conjuga con un oligosacárido, tal como se describe en el documento de Patente U.S. Patent No. 7,001,994 y la Solicitud de Patente Internacional No. WO 2010/075010 y la solicitud de Patente U.S. Patent No. 2010/0173385 para aumentar el direccionamiento de la enzima por su receptor natural. En otra realización, la ASM es una forma modificada de la ASM humana que se une a un receptor alternativo (por ejemplo, una molécula de adhesión intercelular (ICAM)-1 que puede aumentar el direccionamiento a órganos como el pulmón) al receptor natural para la ASM. En una realización, la ASM es una forma modificada de la ASM humana que tiene la estabilidad aumentada en relación con la ASM humana sin modificar (tal como, por ejemplo, ASM-1).

10 En algunas realizaciones, la ASM se conjuga o fusiona, directa o indirectamente, a un resto de direccionamiento, tal como el factor de crecimiento similar a la insulina (IGF)-I, IGF-II, leptina, factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), o un anticuerpo humanizado que se une al receptor de insulina humano (HIR). Véase, por ejemplo, el documento de Solicitud de Patente U.S. Patent Application Publication No. 2009/0029467 y el documento de Patente U.S. Patent No. 7,560,424 para una discusión del uso de IGF-I como un resto de direccionamiento para enzimas de almacenamiento lisosomal, y el documento de Patente U.S. Patent No. 7,396,811 para una discusión del uso de IGF-II como un resto de direccionamiento para enzimas de almacenamiento lisosomal. Los restos de direccionamiento IGF-I e IGF-II pueden facilitar el direccionamiento de la enzima ASM al lisosoma. Para una discusión del uso de hormonas, tales como G-CSF o leptina como restos de direccionamiento véase, por ejemplo, la Solicitud de Patente Internacional International Patent Application Publication NO. WO 2007/091250 y la Solicitud de Patente U.S. Patent Application Publication No. 2010/0183577. Véase, por ejemplo, la Solicitud de Patente U.S. Patent Application Publication No. 2004/0101904 para una discusión de un anticuerpo monoclonal humanizado que se une a un receptor de insulina humano (HIR) unido a un agente farmacéutico, tal como una enzima. Los restos de direccionamiento G-CSF, leptina y un anticuerpo que se unen a HIR pueden facilitar la orientación de la enzima ASM al cerebro.

15 En ciertas realizaciones, la ASM es una forma modificada de la ASM (por ejemplo, una forma modificada de la ASM humana) con una disminución en la actividad en relación con la ASM sin modificar (tal como, una ASM humana no modificada, por ejemplo, ASM-1). En algunas realizaciones, la ASM es una forma modificada de la ASM (por ejemplo, una forma modificada de la ASM humana) con un aumento en el direccionamiento a los sitios de patología y una disminución en la actividad enzimática en relación con la ASM sin modificar (tal como una ASM humana no modificada, por ejemplo, ASM-1).

20 En ciertas realizaciones, la ASM es una forma de ASM altamente fosforilada. Véase, por ejemplo, la Solicitud de Patente U.S. Patent Application Publication No. 2002/0150981 para una discusión de las técnicas para producir formas altamente fosforiladas de las enzimas lisosómicas.

25 La enzima ASM se puede producir por cualquier método conocido en la técnica, incluyendo, pero no limitado a, métodos de DNA recombinante, clonación de cDNA (véase, por ejemplo, Schuchman et al., 1991, J. Biol. Chem 266: 8531-8539 y el documento de Patente U.S. Patent No. 5,773,278 para clones de cDNA de ASM humano), clonación genómica, activación génica (véase, por ejemplo, el documento de Patente U.S. Patent No. 5,641,670 para técnicas de activación génica), o líneas celulares seleccionadas (por ejemplo, células de mamíferos, levaduras, procariontas, insectos (por ejemplo, Sf9, Sf21, *Trichoplusia ni*, *Spodoptera frugiperda* y *Bombyx mori*), y células vegetales) que producen altos niveles de la enzima ASM. La ASM, así como los métodos para producir la ASM se describen, por ejemplo, en los documentos de Patente U.S. Patent Nos. 5,773,278; 6,541,218; 5,686,240; y 7,527,956.

30 En una realización específica, la ASM es una ASM producida de forma recombinante (por ejemplo, una ASM humana producida de forma recombinante). Se prefieren los sistemas de expresión celular que poseen la maquinaria celular y los elementos para el procesamiento adecuado, es decir, la escisión de la señal, la glicosilación, la fosforilación y la clasificación de proteínas. Por ejemplo, se prefieren los sistemas de expresión de mamíferos para la expresión de enzimas biológicamente activas que se pliegan y procesan adecuadamente; cuando se administran en humanos, dichos productos de expresión deben mostrar una orientación adecuada al tejido y no una reacción inmunológica adversa.

35 En ciertas realizaciones, la ASM (por ejemplo, una ASM humana) se produce por sobreexpresión de cDNA de ASM en células de mamíferos. En una realización específica, la ASM humana se produce por sobreexpresión de cDNA de ASM humana en células de ovario de hámster chino (CHO). Véase, por ejemplo, He et al., 1999, Biochimia et Biophysica Acta 1432: 251-264 para métodos para la sobreexpresión de cDNA de ASM humana en células CHO, y el documento de Patente U.S. 6,541,218. En ciertas realizaciones, la ASM humana se produce por sobreexpresión de cDNA de ASM humana en células CHO que co-expresan la alfa-2,6-sialiltransferasa. Véase, por ejemplo, el documento de Patente No. 5,047,335 que describe células CHO diseñadas para expresar la alfa-2,6-sialiltransferasa.

En otra realización específica, las células de mamífero son células humanas. Ejemplos de células humanas que se pueden utilizar para expresar ASM de forma recombinante (por ejemplo, ASM humana) incluyen, pero no se limitan a células Crucell Per.C6, células HT 1080, células HeLa, células HEK 293, células 293T, células WI38, células HuT292, células LF 1043 (HEL), células MRC-5, células TMK-1, células BT483, células Hs578T, células HTB2, células HTB3, células HTB4, células BT 20, células T47D, células CRL7030, células HsS78Bst, células 721, células A2780, células A172, células A253, células COR-L23/R23, células COV-434, células DU145, células DuCaP, células EM2, células Saos-2, células U373, células WM39, células L132, células A-5489, células G-293, células G-401, células CAKI-1, células RD, y células YAR. Otros ejemplos de células humanas que se pueden utilizar para expresar ASM incluyen las líneas celulares humanas listadas en el Immuno Polymorphism Database del European Molecular Biology Laboratory, y la base de datos del U.S. National Institutes of Health, así como las formas disponibles en el mercado, por ejemplo, the American Type Culture Collection, Manassas, Virginia, y Lifeline Cell Technology, Walkersville, Maryland. Cuando se utilizan líneas celulares humanas para la producción, rASM se pueden producir utilizando cDNAs, gDNAs para hASM o mediante técnicas de activación génica tales como las descritas en el documento de Patente U.S. Patent No. 5,641,670.

Ejemplos de otras células de mamíferos que se pueden utilizar para producir ASM (por ejemplo, ASM humana) incluyen, pero no se limitan a, células Vero, células VERY, células BHK, células COS, células MDCK, o células 3T3. En ciertas realizaciones, las células de mieloma se utilizan para producir ASM (por ejemplo, ASM humana). Ejemplos no limitantes de células de mieloma incluyen células NS0, células 45.6 TG1.7, células 9B5 del clon AF-2, células 9B5 del clon AF-2, células J558L, células MOPC 315, células MPC-11, células NCI-H929, células NP, células NS0/1, células P3 NS1 Ag4, células P3/NS1/1-Ag4-1, células P3U1, células P3X63Ag8, células P3X63Ag8.653, células P3X63Ag8U.1, células RPMI 8226, células Sp20-Ag14, células U266B1, células X63AG8.653, células Y3.Ag.1.2.3, y células YO.

En algunas realizaciones, un sistema de cultivo celular vegetal se utiliza para la expresión de la ASM. Véase, por ejemplo, los documentos de Patente U.S. Patent Nos. 5,929,304; 7,504,560; 6,770,799; 6,551,820; 6,136,320; 6,034,298; 5,914,935; 5,612,487; y 5,484,719, las Solicitudes de Patente U.S. Patent Application publication Nos. 2009/0208477, 2009/0082548, 2009/0053762, 2008/0038232, 2007/0275014 y 2006/0204487, y Shoji et al., 2008, Vaccine, 26(23): 2930-2934, y D'Aoust et al., 2008, J. Plant Biotechnology, 6(9): 930-940 para células vegetales y métodos para la producción de proteínas utilizando sistemas de cultivo celular vegetal. En particular, las Solicitudes de Patente U.S. Patent Application Nos. 2009/0208477, 2008/0038232 y 2006/0204487 describen la expresión y producción de enzimas lisosómicas de alta manosa enzimáticamente activas utilizando raíces de plantas transgénicas, particularmente células de zanahoria. En una realización específica, las células de zanahoria están diseñadas para expresar ASM. En ciertas realizaciones, las algas (por ejemplo, *Chlamydomonas reinhardtii*) se pueden diseñar para expresar ASM (véase, por ejemplo, Rasala et al., 2010, Plant Biotechnology Journal (Published online March 7, 2010).

La captación tisular y celular de la ASM está mediada tanto por los restos de alta manosa (por ejemplo, en macrófagos) como por la manosa-6-fosfato (por ejemplo, en el hígado). Por lo tanto, la producción de ASM con contenido alterado de glucanos y/o fosforilación pueden necesitarse para mejorar la distribución del fármaco. Por ejemplo, la ASM se puede producir por células que tienen una mutación, por ejemplo, un knockout para, al menos una manosidasa que procesa el Golgi. En una realización, la mutación reduce la expresión génica, reduce los niveles de proteínas y la actividad, o altera la distribución u otras modificaciones post traduccionales de la manosidasa, por ejemplo, el procesamiento de las cadenas de carbohidratos. En una realización específica, la mutación reduce el nivel de la actividad de la manosidasa procesadora del Golgi. La mutación puede estar en una manosidasa procesadora de clase 1; una manosidasa procesadora de clase 2; una manosidasa procesadora de clase 1 y una manosidasa procesadora de clase 2. La manosidasa procesadora de clase 1 incluye: manosidasa IA de Golgi; manosidasa IB de Golgi; manosidasa IC de Golgi. La manosidasa procesadora de clase 2 incluye: manosidas II de Golgi. Véase, por ejemplo, la Solicitud de Patente Internacional International Patent Application Publication No. WO 02/15927 y el documento de Patente U.S. Patent. No. 7,138,262 para métodos para producir una proteína de alta manosa.

En ciertas realizaciones, las células que expresan ASM se cultivan en presencia de un inhibidor de manosidasa, tal como un anticuerpo, kifunesina, swainsonina, manostatina, 6-desoxi-1,4-didesoxi-1,4-imino-D-manitol (6-desoxi-DIM), o 6-desoxi-6-fluoro-1,4-didesoxi-1,4-imino-D-manitol (6-desoxi-6-fluor-DIM). El cultivo de ASM en presencia de dichos inhibidores puede dar como resultado la producción de una ASM de alta manosa. En algunas realizaciones, las células que expresan ASM incluyen una secuencia de ácidos nucleicos, tal como una molécula anti sentido o ribozima, que puede unirse a o inactivar una secuencia de ácidos nucleicos de manosidasa celular, por ejemplo, mRNA, e inhibir la expresión de la proteína. Véase, por ejemplo, la Solicitud de Patente Internacional International Patent Application Publication No. WO 02/15927 y el documento de Patente U.S. Patent No. 7,138,262 para los métodos para producir una proteína de alta manosa.

En ciertas realizaciones, las cadenas de carbohidratos de la enzima ASM expresadas de forma recombinante se remodelan mediante tratamiento secuencial con varias enzimas, tales como neuraminidasa, galactosidasa y beta-N-acetilglucosaminidasa. Véase, por ejemplo, el documento de Patente U.S. Patent No. 5,549,892 para métodos para remodelar las cadenas de carbohidratos de una enzima lisosómica.

La captación de ASM, mediada por manosa-6-fosfato (M6P) puede mejorarse mediante la modificación de ASM para producir restos de manosa altamente fosforilados y M6P. Por ejemplo, la ASM se puede modificar mediante tecnología recombinante para introducir manosa-6-fosfato adicional en la ASM para mejorar la captación celular. Véase, por ejemplo, Matsuoka et al., 2010 Mole. Ther. 18:1519-1526. En otras realizaciones, la ASM se puede acoplar a derivados de oligosacáridos altamente fosforilados que contienen manosa-6-fosfato (M6P). Véase, por ejemplo, el documento de Patente U.S. Patent No. 7,001,994, la Solicitud de Patente U.S. Patent Application Publication US2010/0173385 y el documento de Patente internacional International Publication No. WO2010/075010. En otro enfoque, se puede utilizar un sistema de cultivo de levadura para la expresión de ASM recombinante que contiene restos adicionales de manosa-6-fosfato altamente fosforilados. Véase, por ejemplo, Akeboshi et al., 2009 Glycobiology 19(9): 1002-1009.

Una vez que se ha producido la ASM, se puede aislar o purificar por cualquier método conocido en la técnica para el aislamiento o la purificación de una proteína, por ejemplo, por cromatografía (por ejemplo, intercambio iónico, cromatografía líquida de alto rendimiento, afinidad, particularmente por afinidad por la ASM, por proteína A, y cromatografía de exclusión por tamaño), centrifugación, solubilidad diferencial, o por cualquier otra técnica estándar para el aislamiento o purificación de proteínas. Cuando la enzima ASM es secretada por las células de cultivo, la ASM se puede recuperar fácilmente del medio de cultivo. Véase, por ejemplo, He et al., 1999, Biochimia et Biophysica Acta 1432: 251-264 para métodos para purificar ASM.

La enzima ASM se puede formular para cualquier vía de administración (por ejemplo, infusión, subcutánea, intramuscular, intratecal, intraventricular, intranasal, inhalación o intradérmica). La enzima ASM se puede suministrar en una forma liofilizada que se reconstituye antes de su uso con, una disolución salina estéril (por ejemplo, cloruro de sodio al 0,9%) o agua estéril. Alternativamente, la enzima ASM se puede suministrar en una forma acuosa. En ciertas realizaciones, la ASM se administra a un sujeto en una formulación que comprende zinc. En algunas realizaciones, la enzima ASM se administra al paciente mediante infusión utilizando, por ejemplo, una bomba de jeringa o una bolsa de infusión con una bomba.

En ciertas realizaciones, la ASM se administra a un sujeto en un vehículo, tal como liposomas o un vehículo policatiónico. Véase, por ejemplo, el documento de Patente U.S. Patent No. 5,716,614 para vehículos que se pueden utilizar para administrar la ASM. En algunas realizaciones, la ASM se administró a un sujeto en nanovehículos de direccionamiento ICAM-1. Véase, por ejemplo, Muro et al., 2006, Mol. Ther. 13(1): 135-141, para suministro de ASM utilizando nanovehículos de direccionamiento ICAM-1.

5.2 Poblaciones de pacientes

En realizaciones específicas, un sujeto tratado para ASMD según la invención proporcionada en la presente memoria es un humano que tiene o se diagnostica que tiene una o más mutaciones en el gen que codifica la esfingomielinasa ácida. En realizaciones particulares, un sujeto tratado para ASMD según la invención proporcionada en la presente memoria es un humano que tiene o se diagnostica que tiene la enfermedad de Niemann-Pick (NPD). En una realización, un sujeto tratado para ASMD según la invención proporcionada en la presente memoria es un humano que tiene o se diagnostica que tiene una NPD de Tipo A. En otra realización específica, un sujeto tratado para ASMD según la invención proporcionada en la presente memoria es un humano que tiene o se diagnostica que tiene una NPD de Tipo B.

En ciertas realizaciones, un sujeto tratado para ASMD según la invención proporcionada en la presente memoria tiene una o más mutaciones en el gen SMPD1. En algunas realizaciones, la mutación es una mutación sin sentido. En otras realizaciones, la mutación es una eliminación que da como resultado la eliminación de uno, dos o más restos de aminoácidos. En realizaciones específica, un sujeto tratado para ASMD según la invención proporcionada en la presente memoria tiene una o más de las mutaciones.

Tabla 1

Posición del aminoácido de ASM-1	Mutación
49	D → V en NPDB
92	C → W en NPDB
103	L → P en NPDA y NPDB
130	V → A en NPDB
137	L → P en NPDB
157	C → R en NPDB
166	G → R en NPDB

176	I → N en NPDB
184	P → L en NPDA/NPDB
196	A → P en NPDB
200	R → C en NPDB
225	L → M en NPDB
225	L → P en NPDB
228	R → C en NPDB
228	R → H en NPDA/NPDB
232	G → D en NPDB
241	A → V en NPDA/NPDB
242	G → R en NPDB
244	W → C en NPDB
245	G → S en NPDA y NPDB
246	E → K en NPDA
246	E → Q en NPDA
248	S → R en NPDA y NPDB
251	D → E en NPDA/NPDB
278	D → A en NPDA/NPDB
281	A → T en NPDB
289	R → H en NPDB
292	Q → K en NPDA/NPDB
294	R → Q en NPDA
302	L → P en NPDA
313	Y → H en NPDA
319	H → Y en NPDA
323	P → A en NPDB
330	P → R en NPDB
341	L → P en NPDA/NPDB
357	A → D en NPDB
367	Y → C en NPDA
371	P → S en NPDB
376	R → H en NPDB
376	R → L en NPDB
379	S → P en NPDB
382	M → I en NPDA

383	N → S en NPDB
389	N → T en NPDA
390	Desaparecido en NPDA
391	W → G en NPDB
413	A → V en NPDB
421	H → R en NPDA
421	H → Y en NPDB
431	C → R en NPDB
432	L → P en NPDB
435	W → C en NPDB
436	S → R en NPDB
446	Y → C en NPDA
450	L → P en NPDA
452	A → V en NPDB
456	G → D en NPDB
463	F → S en NPDA
467	Y → S en NPDA
474	R → W en NPDB
475	P → L en NPDA y NPDB
480	F → L en NPDB
482	A → E en NPDA
485	A → V en NPDB
486	T → A en NPDB
488	Y → N en NPDB
494	G → S en NPDB
496	R → C en NPDB
496	R → H en NPDA
496	R → L en NPDA
514	H → Q en NPDB
515	E → V en NPDB
517	Y → C en NPDA
533	W → R en NPDB
537	Y → H en NPDA
549	L → P en NPDB
563	D → Y en NPDB

576	K → N en NPDB
577	G → S en NPDA
592	Desaparecido en NPDA
600	R → H en NPDB
600	R → P en NPDB
608	Desaparecido en NPDB

Véase, por ejemplo, Simonaro et al., 2002, Am. J. Hum. Genet. 71: 1413-1419 para mutaciones en el gen de la esfingomielinasa ácida (nombrado SMPD1).

5 En ciertas realizaciones, un sujeto tratado para ASMD según la invención proporcionada en la presente memoria expresa de forma endógena ASM con 2% a 5%, 5% a 10%, 5% a 15%, 5% a 20%, 5% a 30%, o 20% a 30% de la actividad de la ASM humana normal, por ejemplo, ASM-1. En algunas realizaciones, un sujeto tratado para ASMD según la invención proporcionada en la presente memoria expresa de forma endógena ASM con menos del 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 5%, 4%, 3%, 2% o 1% de la actividad de la ASM humana, normal, por ejemplo, ASM-1. Véase, por ejemplo, los documentos de Patente U.S. Patent Nos. 4,039,388, 4,082,781, 5,686,240, y 7,563,591 y los documentos de Patente internacional International Publication Nos. WO 2007/078806 y WO 2006/058385 para técnicas que se pueden utilizar para medir la actividad de la ASM. En una realización específica, el ensayo de cromatografía líquida de alto rendimiento basado en fluorescencia descrito en He et al., 2003, Analytical Biochemistry 314: 116-120 se utiliza para medir la actividad de la ASM.

15 En ciertas realizaciones, un sujeto tratado para ASMD según la invención proporcionada en la presente memoria muestra uno o más síntomas de NPD. Los síntomas de NPD incluyen, pero no se limitan a, abdomen distendido, hepatomegalia, esplenomegalia, hepatoesplenomegalia, neutropenia, enfermedad pulmonar, linfadenopatía, presencia de células de espuma NPD histoquímicamente características, anemia (por ejemplo, anemia microcítica), trombocitopenia, vómitos recurrentes, estreñimiento crónico, retraso del crecimiento (por ejemplo, disminución del crecimiento del revestimiento y del peso corporal), pubertad tardía, moretones constantes, sangrado constante, perfil lipídico aterogénico (colesterol alto, triglicéridos, LDL y HDL bajo), dolor (dolor de cabeza, espalda, extremidades, abdomen), fatiga, saciedad temprana, resistencia baja, osteopenia, manifestaciones neurológicas y dificultades respiratorias (por ejemplo, enfermedad pulmonar intersticial, dificultad para respirar). La manifestación neurológica de la NPD incluye la mancha rojo cereza, hipotonía, debilidad muscular, retraso psicomotor, espasticidad, falta de respuesta social, irritabilidad y convulsiones.

25 En ciertas realizaciones, un sujeto tratado para ASMD según la invención proporcionada en la presente memoria es un sujeto humano que muestra dos o más características clínicas compatibles con NPD no neuropático. En realizaciones específicas, un sujeto tratado para ASM según la invención proporcionada en la presente memoria es un sujeto humano que muestra dos o más características clínicas compatibles con NPD no neuropático: trombocitopenia, anemia, neutropenia, hepatomegalia, esplenomegalia, y enfermedad pulmonar. En otras realizaciones, un sujeto tratado para ASMD según la invención proporcionada en la presente memoria es un sujeto humano que muestra dos o más características clínicas compatibles con NPD neuropática.

35 En ciertas realizaciones, un sujeto tratado para ASMD según la invención proporcionada en la presente memoria es un humano con un volumen de bazo dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once o doce veces mayor que el volumen de bazo de un humano sano como se evalúa por técnicas conocidas en la técnica, tal como, por ejemplo, imágenes de resonancia magnética (MRI). En realizaciones específicas, un sujeto tratado para ASMD según la invención proporcionada en la presente memoria es un humano con un volumen de bazo mayor de ocho veces el volumen de bazo de un humano sano como se evalúa mediante técnicas conocidas en la técnica, tales como, por ejemplo, MRI. En algunas realizaciones, un sujeto tratado para ASMD según la invención proporcionada en la presente memoria es un humano con un volumen de bazo de ocho a doce, de nueve a doce, de diez a doce, o de doce a catorce veces mayor que el volumen de bazo de un humano sano como se evalúa mediante técnicas conocidas en la técnica, tales como, por ejemplo, MRI. En realizaciones específicas, un sujeto tratado para ASMD según la invención proporcionada en la presente memoria es un humano con un volumen de bazo ≥ 8 múltiplos de lo normal (MN) (es decir, 1,6% del peso corporal) como se evalúa mediante técnicas conocidas en la técnica, tales como, por ejemplo, MRI.

45 En ciertas realizaciones, un sujeto tratado para ASMD según la invención proporcionada en la presente memoria es un humano con una capacidad de difusión (DL_{CO}) entre 20% a 80%, 25% a 80%, 30% a 80%, 40% a 80%, 50% a 80%, o 60% a 80% de la DL_{CO} predicha de un humano sano. En algunas realizaciones, un sujeto tratado para ASMD según la invención proporcionada en la presente memoria es un humano con una DL_{CO} de entre 20% a 90%, 25% a 90%, 30% a 90%, 40% a 90%, 50% a 90%, 60% a 90% o 70% a 90% de la DL_{CO} predicha de un humano sano. La

DL_{CO} mide la velocidad de difusión de un gas de difusión limitada (por ejemplo, monóxido de carbono) por minuto a través de la membrana alveolocapilar. La DL_{CO} se puede calcular comparando la cantidad de monóxido de carbono exhalado después de una cantidad conocida de monóxido de carbono inhalado. Se pueden utilizar las técnicas conocidas en la técnica para evaluar la DL_{CO}.

5 En ciertas realizaciones, un sujeto tratado para ASMD según la invención proporcionada en la presente memoria es un bebé humano. En algunas realizaciones, un sujeto tratado para ASMD según la invención proporcionada en la presente memoria es un humano que tiene de 2 a 3 meses de edad, de 2 a 6 meses de edad, de 3 a 6 meses de edad, de 4 a 6 meses de edad, de 5 a 8 meses de edad, o de 6 a 9 meses de edad. En otras realizaciones, un sujeto tratado para ASMD según la invención proporcionada en la presente memoria es un niño humano. En algunas realizaciones, un sujeto tratado para ASMD según la invención proporcionada en la presente memoria es un humano que tiene de 1 a 3 años de edad, de 2 a 3 años de edad, de 3 a 5 años de edad, de 4 a 5 años de edad, de 5 a 7 años de edad, o de 6 a 9 años de edad.

15 En ciertas realizaciones, un sujeto tratado para ASMD según la invención proporcionada en la presente memoria es un humano adulto. En otras realizaciones, un sujeto tratado para ASMD según los métodos descritos en la presente memoria es un humano anciano. En algunas realizaciones, un sujeto tratado para ASMD según la invención proporcionada en la siguiente memoria es un humano que tiene de 10 a 18 años de edad, de 10 a 20 años de edad, de 12 a 20 años de edad, de 15 a 20 años de edad, de 20 a 25 años de edad, de 21 a 25 años de edad, de 25 a 30 años de edad, de 25 a 30 años de edad, de 30 a 35 años de edad, de 35 a 40 años de edad, de 40 a 45 años de edad, de 45 a 50 años de edad, de 50 a 55 años de edad, de 55 a 60 años de edad, de 60 a 65 años de edad, de 65 a 70 años de edad, de 70 a 75 años de edad, de 75 a 80 años de edad, de 80 a 85 años de edad, de 85 a 90 años de edad, de 90 a 95 años de edad o de 95 a 100 años de edad.

25 En realizaciones específicas, un sujeto tratado para ASMD según la invención proporcionada en la presente memoria es una hembra humana. En otras realizaciones, un sujeto tratado para ASMD según la invención proporcionada en la presente memoria es un macho humano. En ciertas realizaciones, un sujeto tratado para ASMD según la invención proporcionada en la presente memoria es una hembra humana que está embarazada o se quedará embarazada o está amamantando.

30 En ciertas realizaciones, un sujeto tratado para ASMD según la invención proporcionada en la presente memoria es un humano que no ha tenido un trasplante de órgano principal (por ejemplo, trasplante de hígado o médula ósea). En otras realizaciones, un sujeto tratado para ASMD según la invención proporcionada en la presente memoria es un humano que ha tenido un trasplante de órgano principal (por ejemplo, trasplante de hígado o médula ósea). En algunas realizaciones, un sujeto tratado para ASMD según la invención proporcionada en la presente memoria es un humano que no ha tenido una esplenectomía total o parcial. En otras realizaciones, un sujeto tratado para ASMD según la invención proporcionada en la presente memoria es un humano que ha tenido una esplenectomía total o parcial.

35 En ciertas realizaciones, un sujeto tratado para ASMD según la invención proporcionada en la presente memoria es un humano que no tiene o no ha sido diagnosticado con uno o más de los siguientes: hepatitis B activa, hepatitis C activa, infección por el virus de inmunodeficiencia humana (VIH), cirrosis, o enfermedad cardíaca significativa (por ejemplo, hipertensión pulmonar moderada o grave o disfunción valvular, o menos del 50%, menos del 40%, menos del 30% o menos del 20% de la fracción de eyección ventricular izquierda mediante ecocardiografía). En otras realizaciones, un sujeto tratado para ASMD según la invención proporcionada en la presente memoria es un humano que tiene o ha sido diagnosticado como que tiene una o más de las siguientes: hepatitis B activa, hepatitis C activa, infección por el virus de inmunodeficiencia humana (VIH), cirrosis, o enfermedad cardíaca significativa (por ejemplo, hipertensión pulmonar moderada o grave o disfunción valvular, o menos del 50%, menos del 40%, menos del 30%, menos del 20% de la fracción de eyección ventricular izquierda mediante ecocardiografía).

45 En ciertas realizaciones, un sujeto tratado para ASMD según la invención proporcionada en la presente memoria es un humano que no tiene uno o más de los siguientes: una relación normalizada internacional (INR) mayor que 1,25, 1,5, 1,75 o 2, un recuento plaquetario de menos de 60×10^3 por μL , una alanina aminotransferasa (ALT) mayor que 250 IU/L, un aspartato aminotransferasa mayor que 250 UI/L, o una bilirrubina total mayor que 1,5 mg/dL, 1,75 mg/dL o 2 mg/dL. En otras realizaciones, un sujeto tratado para ASMD según la invención proporcionada en la presente memoria es un humano que tiene uno o más de los siguientes: una relación normalizada internacional (INR) mayor que 1,25, 1,5, 1,75 o 2, un recuento plaquetario de menos de 60×10^3 por μL , una alanina aminotransferasa (ALT) mayor que 250 IU/L, un aspartato aminotransferasa mayor que 250 UI/L, o una bilirrubina total mayor que 1,5 mg/dL, 1,75 mg/dL o 2 mg/dL.

55 En ciertas realizaciones, un sujeto tratado para ASMD según la invención proporcionada en la presente memoria es un humano que no toma uno o más de los siguientes medicamentos: clorpromazina, imipramina o desipramina. En otras realizaciones, un sujeto tratado para ASMD según la invención proporcionada en la presente memoria es un humano que toma uno o más de los siguientes medicamentos: clorpromazina, imipramina o desipramina.

En ciertas realizaciones, un sujeto tratado para ASMD según la invención proporcionada en la presente memoria es un humano que no está tomando suplementos a base de hierbas o medicamentos que pueden causar o prolongar el

sangrado (por ejemplo, anticoagulantes, ibuprofeno, aspirina, suplementos de ajo, ginkgo y ginseng), o tienen hepatotoxicidad potencial (por ejemplo, inhibidores de 3-hidroxi-3-metil glutarilo [HMG]-CoA reductasa, eritromicina, ácido valproico, antidepresivos, kava y equinaecea). En otras realizaciones, un sujeto tratado para ASMD según la invención proporcionada en la presente memoria es un humano que toma uno o más de los siguientes suplementos a base de hierbas o medicamentos: anticoagulantes, ibuprofeno, aspirina, suplementos de ajo, ginkgo, ginseng, inhibidores de 3-hidroxi-3-metil glutarilo [HMG]-CoA reductasa, eritromicina, ácido valproico, antidepresivos, kava y equinaecea.

En realizaciones específicas, un sujeto tratado para ASMD según la invención proporcionada en la presente memoria es un humano que cumple uno, dos o más, o todos los criterios para sujetos en los Ejemplos de trabajo en las secciones 6, 8 y 9 siguientes.

5.3 Tratamiento de control

Según la invención proporcionada en la presente memoria, un número de parámetros (por ejemplo, factores o marcadores) se pueden controlar antes, durante y/o después de la administración de una dosis de ASM. En ciertas realizaciones, se realiza un examen físico antes de la administración de ASM y según sea necesario o recomendado durante el curso del tratamiento con ASM. Un examen físico puede incluir las siguientes evaluaciones: aspecto general, piel, cabeza, orejas, ojos, nariz y garganta (HEENT), ganglios linfáticos, corazón, pulmones, abdomen, extremidades/articulaciones, estado neurológico, mental y reflejos. En ciertas realizaciones, los signos vitales, la frecuencia cardíaca continua, la frecuencia respiratoria, la temperatura y la saturación de oxígeno pueden evaluarse antes, durante y/o después de la administración de una dosis de ASM. Las frecuencias cardíacas pueden controlarse continuamente por telemetría empezando, por ejemplo, 6 horas antes de la administración de una dosis de ASM hasta 72 horas después de la administración de una dosis de ASM.

En realizaciones específicas, un hemograma completo con diferencial, nitrógeno de urea en sangre (BUN), bicarbonato, creatinina, glucosa, ácido úrico, calcio, fosfato, albúmina, proteínas totales, sodio, potasio, cloruro, lactato deshidrogenasa, creatina quinasa, creatina quinasa con fracción MB, y análisis de orina (incluyendo el color de la orina, aspecto, gravedad específica, pH, proteínas, glucosa, cetonas, bilirrubina, hemoglobina, y la microscopia si se indica) se pueden realizar en los momentos especificados antes, durante y/o después de la administración de una dosis de ASM. En ciertas realizaciones, se pueden realizar pruebas de hígado, estudios de coagulación y/o perfil lipídico en ayunas antes, durante y/o después de la administración de una dosis de ASM. Los ensayos de la función hepática pueden incluir la evaluación de las concentraciones de alanina aminotransferasa (ALT), aspartato aminotransferasa (AST), fosfatasa alcalina (AP), gamma-glutamil transferasa (GGT) y bilirrubina total y directa. Los estudios de coagulación pueden incluir evaluar el tiempo de protrombina (PT), el tiempo de tromboplastina parcial (PTT), la proporción internacional normalizada (INR), la concentración de dímero D, y la concentración de fibrinógeno. Las evaluaciones del perfil lipídico en ayunas pueden incluir evaluaciones de colesterol total (TC), lipoproteínas de baja densidad (LDL), lipoproteínas de alta densidad (HDL), lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) y triglicéridos.

En ciertas realizaciones, una biopsia de piel se realiza antes, durante y/o después de la administración de una dosis de ASM. En algunas realizaciones, una biopsia de hígado se realiza antes, durante y/o después de la administración de una dosis de ASM. Los niveles de esfingomielina en la piel y las biopsias hepáticas pueden evaluarse mediante análisis histológico de metamorfos.

En ciertas realizaciones, las pruebas de la función pulmonar se realizan antes, durante y/o después de la administración de una dosis de ASM. La calibración de los equipos de ensayo de la función pulmonar y los protocolos de administración de las pruebas se pueden estandarizar según las pautas de la American Thoracic Society (ATS) (ATS, 1991, Am. Rev. Respir Dis 144: 1202-1218). En ciertas realizaciones, el porcentaje de capacidad vital forzada (FVC) predicha se evalúa antes, durante y/o después de la administración de una dosis de ASM. FVC es el volumen total de aire expirado durante una maniobra forzada. La FVC se puede medir utilizando técnicas espirométricas estándar.

En ciertas realizaciones, el volumen espiratorio forzado en 1 segundo (FEV1) se puede realizar antes, durante y después de la administración de una dosis de ASM. FEV1 es el volumen de aire expulsado durante el primer segundo de FVC. El FEV1 se puede medir utilizando técnicas espirométricas estándar.

En ciertas realizaciones, la capacidad pulmonar total (TLC) se puede evaluar antes, durante y después de la administración de una dosis de ASM. La TLC es el volumen total de aire dentro de los pulmones después de un esfuerzo inspiratorio máximo. La TLC se puede medir utilizando pletismografía de cuerpo entero.

En ciertas realizaciones, la DL_{CO} puede evaluarse antes, durante y después de la administración de una dosis de ASM. La DL_{CO} mide la velocidad de difusión de un gas de difusión limitada (monóxido de carbono, CO) por minuto a través de la membrana alveolocapilar. La DL_{CO} puede calcularse comparando la cantidad de monóxido de carbono (CO) exhalado después de una cantidad conocida de CO inhalado. El helio, que no se difunde a través de la membrana alveolocapilar, puede incluirse como un marcador con el CO inspirado para controlar la retención de aire.

En ciertas realizaciones, puede obtenerse una radiografía de tórax (posterior-anterior y lateral) antes, durante y/o después de la administración de una dosis de ASM. En ciertas realizaciones, se obtiene un MRI abdominal antes, durante y/o después de la administración de una dosis de ASM.

5 En ciertas realizaciones, se toma una muestra de sangre antes, durante y/o después de la administración de una dosis de ASM para evaluar los biomarcadores, la concentración de bilirrubina, y el porcentaje de neutrófilos de los glóbulos blancos totales. En una realización específica, la concentración de uno o más de los siguientes biomarcadores se evalúa utilizando técnicas conocidas por un experto en la técnica: concentración de CRP/hs-CRP, concentración de esfingomielina, concentración de hierro, concentración de ferritina, concentración de calcitonina, concentración de albúmina, SAA, componente del amiloide sérico P, ACE, CCL18, quitotriosidasa, transferrina, concentración de fibrinógeno, y concentración de esfingomielina plasmática, concentración de ceramida plasmática. En ciertas realizaciones, la concentración de una o más de las siguientes citoquinas se evalúa utilizando técnicas conocidas por un experto en la técnica: IL-6 y IL-8.

15 En ciertas realizaciones, la concentración de anticuerpos frente a ASM (por ejemplo, IgG de ASM anti-recombinante humana y/o IgE de ASM anti-recombinante humana) se evalúa antes, durante y/o después de la administración de una dosis de ASM. En algunas realizaciones, la concentración de uno, dos o más factores del complemento se evalúan antes, durante y/o después de la administración de una dosis de ASM. En ciertas realizaciones, la concentración de triptasa sérica se evalúa antes, durante y/o después de la administración de una dosis de ASM. En ciertas realizaciones, una prueba cutánea para determinar las reacciones mediadas por IgE a ASM se evalúa antes, durante y/o después de la administración de una dosis de ASM.

20 En algunas realizaciones, el perfil farmacocinético para ASM se mide antes, durante y/o después de la administración de una dosis de ASM. En algunas realizaciones, el recuento de células BAL se mide antes, durante y/o después de la administración de una dosis de ASM. Véase la Sección 8 y siguientes, a continuación, para conocer otros parámetros que se pueden evaluar antes, durante y/o después de la administración de una dosis de ASM.

25 En ciertas realizaciones, un factor o marcador descrito en la presente memoria se evalúa 1 semana, 72 horas, 48 horas, 24 horas, 12 horas, 6 horas, 4 horas, 2 horas, 1 hora, 30 minutos o 15 minutos antes de la administración de una dosis de ASM. En algunas realizaciones, un factor o marcador descrito en la presente memoria se evalúa durante la administración de una dosis de ASM. Por ejemplo, un factor o marcador descrito en la presente memoria se evalúa durante la administración de una dosis de ASM. En ciertas realizaciones, un factor o marcador descrito en la presente memoria se evalúa 15 minutos, 30 minutos, 1 hora, 2 horas, 4 horas, 6 horas, 8 horas, 12 horas, 16 horas, 18 horas, 24 horas, 36 horas, 48 horas, 72 horas, 4 días, 5 días, 6 días, 1 semana, dos semanas, tres semanas, cuatro semanas, un mes, dos meses, tres meses o más después de la administración de una dosis de ASM. En ciertas realizaciones, un factor o marcador descrito en la presente memoria se evalúa varias horas o semanas después de un cierto número de dosis de ASM. Por ejemplo, un factor o marcador descrito en la presente memoria se puede evaluar cada cuatro semanas, 1 mes, 2 meses, 3 meses, 4 meses, 5 meses o 6 meses después de un cierto número de dosis de ASM. En ciertas realizaciones, un factor o marcador se evalúa cada 4 semanas, un mes, 2 meses, 3 meses, 4 meses, 5 meses, 6 meses, 7 meses, 8 meses, 9 meses, 10 meses, 11 meses, o 12 meses. En algunas realizaciones, un factor o marcador se evalúa cada mes a 2 meses, cada mes a 4 meses, cada 2 meses a 4 meses, cada 2 meses a 4 meses, cada 3 meses a 4 meses, cada 2 meses a 5 meses, cada 3 meses a 5 meses, cada 4 meses a 5 meses, cada 2 meses a 6 meses, cada 3 meses a 6 meses, cada 4 meses a 6 meses, o cada 5 meses a 6 meses. En ciertas realizaciones, un factor o marcador se evalúa cada 6 meses a 8 meses, cada 6 meses a 12 meses, cada 8 meses a 12 meses, cada 9 meses a 12 meses, o cada 10 meses a 12 meses. En algunas realizaciones, uno o más factores o marcadores descritos en la presente memoria no se evalúan antes, durante y/o después de la administración de una dosis de ASM.

45 En ciertas realizaciones, los resultados de las evaluaciones de uno o más factores o marcadores indican que la dosis de ASM estaría ajustada.

5.4 Muestras biológicas

50 Según los métodos descritos en la presente memoria, una muestra biológica se somete a una o más etapas de pretratamiento antes de la detección y/o medida de la población celular, factor o marcador (por ejemplo, biomarcador). En ciertas realizaciones, un fluido biológico se trata previamente por centrifugación, filtración, precipitación, diálisis, o cromatografía, o por una combinación de dichas etapas de pretratamiento. En otras realizaciones, una muestra de tejido se trata previamente mediante congelación, fijación química, incrustación de parafina, deshidratación, permeabilización u homogeneización seguida de centrifugación, filtración, precipitación, diálisis, o cromatografía, o por combinación de dichas etapas de pretratamiento. En ciertas realizaciones, la muestra se trata previamente separando las células de un cierto tipo de la muestra, o eliminado los restos de la muestra antes de la determinación del número o cantidad de un tipo(s) de células en particular en la muestra según los métodos descritos en la presente memoria.

La muestra biológica puede ser una muestra de tejido, un fluido biológico, descarga, o cualquier otra muestra de un sujeto humano. En algunas realizaciones, la muestra biológica es una muestra de sangre o de médula ósea. En

ciertas realizaciones, la muestra biológica es una muestra de tejido (por ejemplo, una biopsia de hígado, piel o pulmón). En algunas realizaciones, la muestra biológica es un fluido biológico tal como la orina. En ciertas realizaciones, la muestra biológica es una muestra de esputo o descarga nasal. En algunas realizaciones, la muestra biológica es un hisopo bucal.

5 Las técnicas conocidas en la técnica se pueden utilizar para evaluar la presencia, número, cantidad o porcentaje de un cierto tipo(s) de células presentes en la muestra biológica. Por ejemplo, las células se pueden clasificar utilizando un clasificador de células activadas por fluorescencia (FACS). La clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS) es un método conocido para separar partículas, incluyendo las células, basado en las propiedades fluorescentes de las partículas. Véase, por ejemplo, Kamarch, 1987, *Methods Enzymol* 151: 150-165. La excitación con láser de restos fluorescentes en las partículas individuales da como resultado una pequeña carga eléctrica que permite la separación electromagnética de partículas positivas y negativas de una mezcla. Un anticuerpo o ligando utilizado para detectar un determinante antigénico presente en la superficie celular de las células particulares se marca con un fluorocromo, tal como FITC o ficoeritrina. Las células se incuban con el anticuerpo o ligando marcado fluorescentemente durante un período de tiempo suficiente para permitir que el anticuerpo o ligando marcado se una a las células. Las células se procesan a través de un clasificador de células, lo que permite la separación de las células de interés de otras células. Las partículas clasificadas por FACS se pueden depositar directamente en los pocillos individuales de las placas de microtitulación para facilitar la separación.

También se pueden utilizar las perlas magnéticas para separar células. Por ejemplo, las células se pueden clasificar utilizando una técnica de clasificación de células activadas magnéticamente (MACS), un método para separar partículas basado en sus capacidades para unirse a las perlas magnéticas (0,5-100 μm de diámetro). Se pueden realizar una variedad de modificaciones útiles en las microesferas magnéticas, incluyendo la adición covalente de un anticuerpo que reconoce específicamente una molécula de superficie en fase sólida de la célula o hapteno. Se aplica después un campo magnético, para manipular físicamente las perlas seleccionadas. En una realización específica, los anticuerpos frente a un marcador de superficie de células sanguíneas se acoplan a las perlas magnéticas. Las perlas se mezclan después con el cultivo de células sanguíneas para permitir la unión. Después, las células pasan a través de un campo magnético para separar las células que tienen los marcadores de superficie de las células sanguíneas de interés. Estas células pueden aislarse después.

En algunas realizaciones, la superficie de una placa de cultivo se puede recubrir con anticuerpos, y utilizarla para separar las células por un método llamado "panning" (cocinado en plástico). Las placas separadas pueden recubrirse con anticuerpos específicos para células particulares. Las células se pueden añadir primero a una placa recubierta con anticuerpos específicos de células sanguíneas de interés. Después de un lavado completo, las células que permanecen unidas a la placa serán células que expresan los marcadores celulares de interés. Los ejemplos de marcadores o determinantes antigénicos de la superficie celular incluyen, pero no se limitan a, CD2 para linfocitos T y células asesinas naturales, CD3 para linfocitos T, CD11a para leucocitos, CD28 para linfocitos T, CD19 para linfocitos B, CD20 para linfocitos B, CD21 para linfocitos B, CD22 para linfocitos B, CD23 para linfocitos B, CD29 para leucocitos, CD14 para monocitos, CD41 para plaquetas, CD61 para plaquetas, CD66 para granulocitos, CD67 para granulocitos y CD68 para monocitos y macrófagos.

La presencia, concentración o cantidad de un marcador (incluyendo un biomarcador) o factor se puede evaluar utilizando técnicas conocidas en la técnica. La presencia, concentración o cantidad de un marcador (incluyendo un biomarcador) o factor puede medirse a nivel de proteína y/o nivel de RNA utilizando técnicas conocidas por los expertos en la técnica. A nivel de proteínas, se pueden utilizar inmunoensayos, como ELISA e inmunoprecipitación y transferencias de Western para medir la presencia, concentración o cantidad de un marcador (incluyendo un biomarcador) o factor. Además, el FACS se puede utilizar para medir la presencia, concentración o cantidad de un marcador (incluyendo un biomarcador) o factor. A nivel de RNA, se pueden utilizar RT-PCR o transferencias Northern para medir la presencia, concentración o cantidad de un marcador (incluyendo un biomarcador) o factor.

5.5 Co-terapias

En algunas realizaciones, una ASM para su uso en un método para tratar ASMD implica la administración de ASM en combinación con una o más terapias adicionales. Como se utiliza en la presente memoria, el término "en combinación" se refiere, en el contexto de la administración de ASM, a la administración de una dosis de ASM antes, simultáneamente o después de la administración de una o más terapias adicionales (por ejemplo, agentes) para su uso en el tratamiento de ASMD. El uso del término "en combinación" no restringe el orden en el que se administra la ASM y una o más terapias adicionales al sujeto. En realizaciones específicas, el intervalo de tiempo entre la administración de una dosis de ASM y la administración de una o más terapias adicionales puede ser de aproximadamente 1-5 minutos, 1-30 minutos, 30 minutos a 60 minutos, 1 hora, 1-2 horas, 2-6 horas, 2-12 horas, 12-24 horas, 1-2 días, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días, 7 días, 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, 5 semanas, 6 semanas, 7 semanas, 8 semanas, 9 semanas, 10 semanas, 15 semanas, 20 semanas, 26 semanas, 52 semanas, 11-15 semanas, 15-20 semanas, 20-30 semanas, 30-40 semanas, 40-50 semanas, 1 mes, 2 meses, 3 meses, 4 meses, 5 meses, 6 meses, 7 meses, 8 meses, 9 meses, 10 meses, 11 meses, 12 meses, 1 año, 2 años, o cualquier período de tiempo entre ellos. En ciertas realizaciones, una dosis de ASM y una o más terapias adicionales

se administran separadas menos de 1 día, 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, un mes, 2 meses, 3 meses, 6 meses, 1 año, 2 años, o 5 años.

5 En algunas realizaciones, la combinación de terapias proporcionadas en la presente memoria implica administrar una dosis de ASM cada 2 a 4 semanas, y administrar una o más terapias adicionales una vez a la semana, una vez cada 2 semanas, una vez cada 3 semanas, una vez cada 4 semanas, una vez cada mes, una vez cada 2 meses (por ejemplo, aproximadamente 8 semanas), una vez cada 3 meses (por ejemplo, aproximadamente 12 semanas), o una vez cada 4 meses (por ejemplo, aproximadamente 16 semanas). En ciertas realizaciones, la ASM y una o más terapias adicionales se administran cíclicamente a un sujeto. La terapia cíclica implica la administración de la ASM durante un período de tiempo, seguido de la administración de una o más terapias adicionales durante un período de tiempo, y se repite esta administración secuencial. En ciertas realizaciones, la terapia cíclica puede incluir también un período de descanso donde la ASM o la terapia adicional no se administra durante un período de tiempo (por ejemplo, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días, 7 días, 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, 5 semanas, 10 semanas, 20 semanas, 1 mes, 2 meses, 3 meses, 4 meses, 5 meses, 6 meses, 7 meses, 8 meses, 9 meses, 10 meses, 11 meses, 12 meses, 2 años, o 3 años). En una realización, el número de ciclos administrado es de 1 a 12 ciclos, de 2 a 10 ciclos, o de 2 a 8 ciclos.

10 En algunas realizaciones, una ASM para su uso en los métodos para tratar ASMD proporcionados en la presente memoria comprende administrar ASM como un agente único durante un período de tiempo antes de la administración de ASM en combinación con una etapa adicional. En ciertas realizaciones, una ASM para su uso en los métodos para tratar ASMD proporcionados en la presente memoria comprende administrar una terapia adicional sola durante un período de tiempo antes de la administración de ASM en combinación con la terapia adicional.

15 En algunas realizaciones, la administración de la ASM y una o más terapias adicionales según los métodos presentados en la presente memoria tienen un efecto aditivo en relación con la administración de la ASM o dichas una o más terapias adicionales solas. En algunas realizaciones, la administración de la ASM y una o más terapias adicionales según los métodos presentados en la presente memoria tienen un efecto sinérgico en relación con la administración de la ASM o dicha una o más terapias adicionales solas.

20 Como se utiliza en la presente memoria, el término "sinérgico" se refiere al efecto de la administración de una dosis de ASM en combinación con una o más terapias adicionales (por ejemplo, agentes), cuya combinación es más efectiva que los efectos aditivos de cualquiera dos o más terapias únicas (por ejemplo, agentes). En una realización específica, un efecto sinérgico de una terapia de combinación permite el uso de dosis más bajas (por ejemplo, dosis sub-óptimas) de ASM o una terapia adicional y/o una administración menos frecuente de ASM o una terapia adicional a un sujeto. En ciertas realizaciones, la capacidad para utilizar dosis más bajas de ASM o de una terapia adicional y/o administrar ASM o dicha terapia adicional menos frecuentemente reduce la toxicidad asociada con la administración de ASM o de dicha terapia adicional, respectivamente, a un sujeto sin reducir la eficacia de la ASM o de dicha terapia adicional, respectivamente, en el tratamiento de ASMD. En algunas realizaciones, un efecto sinérgico da como resultado una eficacia mejorada de la ASM y cada una de dichas terapias adicionales en el tratamiento de la ASMD. En algunas realizaciones, un efecto sinérgico de una combinación de ASM y una o más terapias adicionales evita o reduce los efectos secundarios adversos o no deseados asociados con el uso de cualquier terapia individual.

25 En realizaciones particulares, una o más terapias adicionales se administran en combinación con ASM a los sujetos para reducir o mejorar uno o más de los siguientes que pueden estar asociados con la administración de una dosis particular de ASM: (i) un suceso adverso relacionado, (ii) un valor de bilirrubina total mayor que el valor de bilirrubina para un humano sin ASMD (por ejemplo, un humano sano), (iii) una concentración de ceramida plasmática mayor que la concentración de ceramida plasmática de un humano sin ASMD (por ejemplo, un humano sano), o (iv) una respuesta de fase aguda. En realizaciones específicas, una o más terapias adicionales se administran en combinación con ASM a sujetos para aumentar la función pulmonar mientras minimizan uno o más de los siguientes que pueden estar asociadas con la administración de una dosis particular de ASM: (i) un suceso adverso relacionado, (ii) un valor de bilirrubina total mayor que el valor de bilirrubina para un humano sin ASMD (por ejemplo, un humano sano), (iii) una concentración de ceramida plasmática mayor que la concentración de ceramida plasmática de un humano sin ASMD (por ejemplo, un humano sano), o (iv) una respuesta de fase aguda.

30 En ciertas realizaciones, una o más terapias adicionales se administraron en combinación con ASM a un sujeto para controlar o aliviar los síntomas asociados con ASMD. En algunas realizaciones, una o más terapias adicionales que se administran en combinación con ASM a un sujeto son analgésicos. Ejemplos específicos de terapias que se pueden administrar en combinación con ASM incluyen, pero no se limitan a, N-acetil-L-cisteína (NAC), S-adenosil-L-metionina (SAM), anticuerpo de interleucina (IL)-6, anticuerpo del receptor de IL-6, dexametasona, L-Nil, (un inhibidor selectivo del NOS inducible), L-NAME (un inhibidor selectivo de NOS), factor de crecimiento de fibroblastos básicos (b-FGF), imipramina (un inhibidor de esfingomielinasa), D609 (un inhibidor de esfingomielinasa), y N-oleoiletanolamina (NOE; un inhibidor de ceramida).

35 En ciertas realizaciones, las chaperonas, tales como las chaperonas de pequeñas moléculas, se administran en combinación con ASM. Véase, por ejemplo, el documento de Patente U.S. Patent No. 7,750,050 y los documentos de Patente internacional International Publication Nos. WO 2004/045574 y WO 2010/015816 para agentes (por

ejemplo, moléculas pequeñas) que pueden administrarse en combinación con ASM a un sujeto. En algunas realizaciones, la chaperona (por ejemplo, la chaperona de molécula pequeña) realiza una, dos o todas las siguientes acciones: aumenta el direccionamiento de la ASM a los sitios de patología, estabiliza la actividad de la ASM y mejora la actividad de la ASM.

- 5 En algunas realizaciones, un glucocorticosteroide, tal como dexametasona, se administra en combinación con la ASM. Véase, por ejemplo, el documento de Patente U.S. Patent No. 7,658,916 para agentes (por ejemplo, glucocorticosteroides) que se pueden administrar en combinación con ASM.

10 En algunas realizaciones, una molécula de reducción de sustrato se administra en combinación con ASM a un sujeto. En realizaciones específicas, una molécula (por ejemplo, una molécula pequeña) que o disminuye la cantidad de esfingomielina, reduce la velocidad de síntesis de esfingomielina, o se administra en combinación con ASM a un sujeto. Véase, por ejemplo, Li et al., 2007, Biochim Biophys Acta 1771(9): 1186-1194 para inhibidores de esfingomielina sintasa, tales como triciclododecan-9-il-xantogenato y siRNAs de la esfingomielina sintasa.

15 En algunas realizaciones, una terapia que reduce la inmunogenicidad potencial de la ASM se administra en combinación con la ASM a un sujeto. En ciertas realizaciones, se administra benedrilol en combinación con la ASM a un sujeto.

20 La combinación de ASM y una o más de las terapias adicionales se puede administrar a un sujeto en la misma composición farmacéutica. Alternativamente, la ASM y una o más terapias adicionales se pueden administrar simultáneamente a un sujeto en composiciones farmacéuticas separadas. La ASM y una o más terapias adicionales se pueden administrar secuencialmente a un sujeto en composiciones farmacéuticas separadas. La ASM y una o más terapias adicionales se pueden administrar a un sujeto mediante la misma o diferentes vías de administración.

5.6 Productos farmacéuticos

25 En un aspecto, se describen en la presente memoria productos farmacéuticos envasados y etiquetados terminados. En una realización, un producto farmacéutico comprende una forma de dosificación unitaria de ASM en un recipiente o contenedor apropiado (por ejemplo, un vial de vidrio u otro recipiente que está herméticamente cerrado). En algunas realizaciones, la forma de dosificación unitaria es una forma liofilizada de ASM, y en esas circunstancias, el producto farmacéutico puede contener un segundo contenedor con solución salina estéril o agua estéril para reconstituir la forma liofilizada de ASM. En otras realizaciones, la forma de dosificación unitaria es una forma acuosa de ASM que no necesita reconstitución antes de la administración a un sujeto. En realizaciones específicas, la forma de dosificación unitaria de ASM contiene ASM en una cantidad suficiente para la administración de una dosis baja, no tóxica, de la enzima al sujeto. En ciertas realizaciones, la forma de dosificación unitaria es adecuada para la vía de administración seleccionada de la ASM al sujeto. En una realización específica, la forma de dosificación unitaria es adecuada para la administración intravenosa al sujeto.

35 En una realización, un producto farmacéutico comprende una forma de dosificación unitaria de la ASM en un recipiente o contenedor apropiado (por ejemplo, un vial de vidrio u otro contenedor que está herméticamente cerrado) y una bomba de infusión o bomba de jeringa para la administración de la ASM a un sujeto.

40 Al igual que con cualquier producto farmacéutico, el material de embalaje y el contenedor están diseñados para proteger la estabilidad del producto durante el almacenamiento y el envío. Además, el producto farmacéutico incluye instrucciones para el uso u otro material informativo que aconseje al médico, técnico o paciente sobre cómo tratar adecuadamente la ASMD. En otras palabras, el producto farmacéutico incluye medios de instrucción que indican o sugieren un régimen de dosificación que incluye, pero no se limita a, dosis reales (por ejemplo, un protocolo de aumento de dosis), procedimientos de control y otra información de control. En ciertas realizaciones, el producto farmacéutico incluye un medio para genotipar a un paciente (por ejemplo, cebadores de PCR para el gen SMPD1).

6 Ejemplo 1: Ensayo de la terapia de sustitución de la enzima esfingomielinasa recombinante ácida humana en humanos adultos con deficiencia de ASM

45 6.1 Introducción

50 La ASMD es un trastorno de almacenamiento lisosomal autosómico recesivo que se produce cuando la esfingomielina no puede ser catabolizada normalmente a la ceramida y la fosforilcolina. En consecuencia, la esfingomielina se acumula dentro de las células principalmente del sistema reticuloendotelial, lo que lleva a hepatoesplenomegalia, anemia, trombocitopenia y enfermedad pulmonar intersticial. El retraso en el crecimiento y un perfil lipídico aterogénico también son hallazgos comunes. Los pacientes que tienen poca o ninguna actividad residual de la ASM muestran los síntomas más graves con inicio en la infancia, falta de crecimiento, neurodegeneración y muerte a los 3 años (enfermedad de Niemann-Pick de tipo A, NPD A). Los pacientes con mayores cantidades de actividad residual de ASM tienen edades variables de inicio, presentaciones heterogéneas y síntomas somáticos, poca o ninguna participación neurológica, y generalmente sobreviven hasta la edad adulta (NPD B). Actualmente, no hay tratamiento para los pacientes con ASMD.

La terapia de sustitución enzimática (ERT) se ha utilizado con éxito para tratar varios trastornos de almacenamiento lisosomal graves, incluyendo la enfermedad de Gaucher, Mucopolisacaridosis de Tipos I, II, y VI, enfermedad de Fabry, y enfermedad de Pompe. Las enzimas lisosomales humanas recombinantes se administran intravenosamente y se recogen en las células mediante endocitosis mediada por receptores para su posterior direccionamiento a los lisosomas. La prueba de principio para el tratamiento de ASMD fue demostrada por el laboratorio del Dr. Edward Schuchman (Mount Sinai Medical Center) en un modelo de ratón Knockout para la ASM (ASMKO) donde las inyecciones intravenosas de ASM humana recombinante (rhASM) redujeron de manera eficiente los niveles de esfingomielina en hígado y bazo, y, en menor medida, en los pulmones (Miranda et al., FASEB 2000; 14: 1988). Sin embargo, los niveles de esfingomielina no se redujeron en el cerebro debido a la incapacidad de rhASM para cruzar la barrera hematoencefálica. Debido al hecho de que el ratón ASMKO no tiene actividad o proteína de ASM residual y desarrolla una enfermedad neurológica rápida y grave, este animal se considera más apropiadamente un modelo de NPD de tipo A (véase, Buccinna et al., 2009, J. Neurochem. 109: 105-115).

Estudios adicionales confirmaron que las dosis quincenales de rhASM redujeron los niveles de esfingomielina en ratones ASMKO de una manera dependiente de la dosis (0,3-3 mg/kg). Los niveles de efectos adversos no observados (NOAEL) para dosis únicas y repetidas se determinaron para ser 0,3 y 3 mg/kg, respectivamente, en ratones ASMKO. Los intentos posteriores de agotar los niveles de esfingomielina en el pulmón con dosis más altas de rhASM llevaron a una toxicidad inesperada. En dosis ≥ 10 mg/kg, los ratones ASMKO, pero no los animales normales experimentaron inflamación del hígado, hemorragia suprarrenal, shock cardiovascular y muerte en el contexto de niveles muy elevados de citoquina, lo que sugiere un síndrome de liberación de citoquinas. La toxicidad y los aumentos de citoquinas observados con altas dosis de rhASM podrían mejorarse o prevenirse mediante el tratamiento previo de ratones ASMKO con varias dosis menores de rhASM, lo que sugiere que la velocidad y la cantidad de degradación de la esfingomielina desempeñan un papel clave.

En el ratón ASMKO, no se observó toxicidad en un modelo de NPD de tipo A después de dosis únicas de $\leq 0,3$ mg/kg de rhASM y dosis repetidas de $\leq 3,0$ mg/kg de rhASM; no se observó toxicidad grave hasta que se administraron dosis únicas de ≥ 10 mg/kg de rhASM. Por lo tanto, se seleccionó una dosis inicial conservadora de 0,03 mg/kg de rhASM para el tratamiento con dosis única de sujetos humanos para garantizar un margen de seguridad de 10 veces con respecto al NOAEL de dosis única (0,3 mg/kg) observado en ratones ASMKO. Se seleccionó una dosis máxima de 1,0 mg/kg de rhASM para el tratamiento de dosis única de sujetos humanos para garantizar un margen de seguridad de 10 veces con respecto a la dosis a la que se observó una toxicidad grave en el ratón ASMKO (10 mg/kg). Una vez completado el protocolo establecido a continuación, se observó inesperadamente la toxicidad en los sujetos humanos con una dosis tan baja como 0,3 mg/kg de rhAS.

6.2 Materiales y métodos

6.2.1 Diseño del protocolo de humanos

Este protocolo fue un ensayo de Fase 1 de escalado de dosis, de dosis única en un solo centro. Los objetivos principales del ensayo fueron evaluar la seguridad y la farmacocinética de las dosis únicas de rhASM en humanos adultos con ASMD no neuronopático (Niemann-Pick B). Las dosis únicas de 0,03, 0,1, 0,3, 0,6 y 1,0 mg/kg de rhASM se infundieron secuencialmente por la cohorte de dosis. El diseño original del ensayo requería un mínimo de 15 pacientes (5 cohortes de 3 pacientes cada una). Debido a las dificultades con la inscripción de pacientes, el protocolo se modificó de manera que las 2 primeras cohortes incluyeron 3 pacientes cada una y las 3 últimas cohortes fueron para inscribir a 2 pacientes cada una. Un comité de control de datos independiente supervisó la realización del ensayo y todos los procedimientos del protocolo fueron aprobados por el IRB. La Figura 1 representa el protocolo del flujo del paciente.

6.2.2 Pacientes

Para ser elegibles para el protocolo, los pacientes debían tener entre 18 y 65 años de edad y tener una actividad enzimática de ASM deficiente, un volumen de bazo ≥ 2 x normal, AST y ALT ≤ 250 UI/L, bilirrubina $\leq 3,6$ mg/dL, INR $\leq 1,5$, DL_{CO} $\geq 30\%$ predicho y plaquetas ≥ 60000 /mL. Se excluyó a los pacientes si tenían cirrosis (por biopsia hepática), enfermedad cardíaca significativa, esplenectomía total, o si tomaban medicamentos o suplementos de hierbas que podrían ser hepatotóxicos, promover el sangrado o inhibir el rhASM.

Un total de 13 pacientes fueron inscritos y 11 pacientes infundidos con rhASM. rhASM se produjo por sobreexpresión de cDNA de ASM en células de ovario de hámster chino. La edad promedio de los pacientes infundidos fue de 30,8 años, todos eran caucásicos (no hispanos/no latinos), y el volumen promedio del bazo fue de 10,8 múltiplos de lo normal. Uno tenía una esplenectomía parcial; los pacientes restantes tenían bazos intactos a la entrada del protocolo. La Figura 2 representa las características demográficas y de inicio de los pacientes en este protocolo.

Una vez que se completó la selección y se confirmó la elegibilidad, los pacientes ingresaron en la unidad de atención cardíaca (CCU) durante la noche para recibir telemetría inicial e infundirlos a la mañana siguiente con rhASM. Los pacientes se controlaron durante 72 horas después de la dosis mientras estaban en telemetría (24 horas en la CCU

y 48 horas en el General Clinical Research Center). Los pacientes regresaron para una visita durante una noche el día 14 y una visita ambulatoria el día 28.

A continuación, se exponen las evaluaciones médicas que se realizaron durante el protocolo:

- Examen físico – días 0, 1, 2, 14, y 28
- 5 • Química, hematología y análisis de orina – preinfusión, después de 24, 48, 72 horas; días 14, 28
- Pruebas de función hepática – preinfusión, después de 12 a 72 horas, días 14, 28, Aldosterona, cortisol, delta-4-androstenediona – preinfusión, después de 12 horas a través de las 72 horas
- Prueba de estimulación de ACTH – selección, telemetría del día 14 – ECG continuo durante 72 horas, ecocardiograma – preinfusión, final de la infusión, y postinfusión a las 1, 2, 6, 12, y 4 horas, día 14
- 10 • Biomarcadores cardíacos (BNP, troponina-I cardíaca, CPK-MB) – preinfusión, después de 2, 6, 12, 24 horas
- Esfingomielina, niveles de ceramida plasmática – preinfusión, después de 24, 48, 72 horas; días 14 y 28
- Pruebas de función pulmonar y CXR – selección, día 14
- Volúmenes de hígado y bazo por MRI – selección, día 14
- Biopsias de hígado y piel – selección, día 14
- 15 • Biomarcadores – predosa, días 14, 28
- Prueba de IgG de anti-rhASM – preinfusión, día 28
- Farmacocinéticas: dentro de los 30 minutos preinfusión, 15 minutos después del inicio de la infusión, fin de la infusión y en los siguientes puntos de tiempo post-infusión – 15 minutos, 30 minutos, 45 minutos; 1 hora, 2, 3, 4, 6, 8, 12, 18, 24, 48, 72 horas.
- 20 • Citoquinas (IL-1a, IL-1b, IL-6, G-CSF, GM-CSF, MIP-1a, TNF-a) – puntos de tiempo farmacocinéticos (arriba) más el día 14

6.3 Resultados

25 Como se muestra en las Figuras 3A y 3B, los niveles de ceramida plasmática y los niveles de esfingomielina plasmática, respectivamente, se determinaron en varios puntos de tiempo. Los niveles de ceramida plasmática mostraron un aumento dependiente de la dosis a las 6 horas y alcanzaron su punto máximo a las 18-72 horas. Los niveles de esfingomielina plasmática fueron normales al inicio y no mostraron una tendencia constante en el tiempo. En el paciente no. 12112 que recibió la dosis más alta (1 mg/kg), el nivel de esfingomielina plasmática aumentó después de la dosis y alcanzó su punto máximo a las 72 horas.

30 La Figura 4 muestra los niveles de bilirrubina total determinados en varios puntos de tiempo durante el protocolo. La bilirrubina total mostró un aumento relacionado con la dosis a las 24 horas y alcanzó su punto máximo a las 48-60 horas. La bilirrubina total más alta fue de 4,7 mg/dL en el paciente no. 12112 que recibió la dosis más alta (1 mg/kg). Hubo aumentos proporcionales en la bilirrubina directa e indirecta. No se observaron aumentos en la ALT, AST o fosfatasa alcalina. Hubo un aumento leve de GGT a lo largo de las 72 horas (no mostrado) en dos pacientes que recibieron las dosis más altas (1 mg/kg, paciente no. 12112) y más bajas (0,03 mg/kg, paciente no. 10503). Los niveles de hemoglobina y hematocrito se mantuvieron estables a través del protocolo, lo que indica que la hemólisis no fue responsable de los niveles altos de bilirrubina.

40 Las Figuras 5A-5G representan los niveles de marcadores de respuesta de fase aguda (inflamación), CRP/hs-CRP, % de neutrófilos, fibrinógeno, ferritina, IL-8, IL-6 y calcitonina, respectivamente, determinados en varios puntos de tiempo para varios pacientes. CRP/hs-CRP mostró un aumento transitorio relacionado con la dosis a las 24 horas, alcanzó su punto máximo a las 48-72 horas y volvió a la normalidad el día 14. Otros reactantes de fase aguda también mostraron aumentos (% de neutrófilos, fibrinógeno, ferritina, PT y PTT) y disminuciones (hierro, albúmina). Ciertos biomarcadores inflamatorios, por ejemplo, las citoquinas IL-6 e IL-8, y la calcitonina, también mostraron aumentos sustanciales que dependían de la dosis y alcanzaron su punto máximo a las 48 horas después de la infusión. Entre estos mediadores inflamatorios, los mayores cambios en el orden descendiente se produjeron en la IL 8 (punto máximo 33,8 x límite superior de lo normal), calcitonina (punto máximo 33,4 x límite superior de lo normal), CRP (punto máximo 9,8 x límite superior de lo normal) y ferritina (3,9 x límite superior de lo normal). No hubo una tendencia en el recuento de plaquetas o en el nivel de productos de división de fibrina (no mostrado). Los aumentos

en los reactantes de fase aguda de laboratorio se correlacionaron con los síntomas clínicos constitucionales de fiebre, náuseas, vómitos, dolor de cabeza, dolor y mialgias en algunos pacientes.

La Figura 6 es un cuadro de los sucesos adversos emergentes del tratamiento para cuatro pacientes, cada uno con una dosis diferente de rhASM, cuyos sucesos se consideraron relacionados (posiblemente, probablemente o definitivamente) con el tratamiento. Como se establece en el cuadro, el paciente no. 11509, a quien se le administró una dosis de 0,3 mg/kg de rhASM, mostró sucesos adversos moderadamente graves a partir del día 2.

Con respecto a los sucesos adversos relacionados reportados en el protocolo, no hubo cambios cardiovasculares significativos por telemetría, ECG, ecocardiograma o biomarcadores (BNP, troponina-I cardíaca, CPK-MB) o disfunción de la hormona suprarrenal. Un paciente (no. 12112, cohorte de 1,0 mg/kg) tuvo un elevado nivel de cortisol por la mañana 24 horas después de la dosis, lo que probablemente representaba una respuesta de estrés fisiológico normal a varios sucesos adversos relacionados moderados en curso. Además, cuatro de los seis pacientes que recibieron $\geq 0,3$ mg/kg de rhASM experimentaron un total de 19 sucesos adversos clínicos y de laboratorio evaluados como relacionados con el fármaco. La intensidad de los sucesos adversos relacionados varió de leve a grave, pero la mayoría fue moderada y no requirió ninguna intervención. Incluían fiebre ($n = 2$), dolor [mialgia; dolor abdominal, de piernas y de cadera] ($n = 2$), náuseas ($n = 2$), ictericia escleral y urobilinógeno en orina ($n = 1$), fatiga ($n = 1$), vómitos ($n = 1$), infiltrado linfocítico/degeneración hepatocelular ($n = 1$), reacción de fase aguda ($n = 4$), bilirrubina alta ($n = 2$), y aumento del dímero D de fibrina ($n = 1$). El inicio de los síntomas clínicos comenzó 12 horas después de la infusión y se resolvió a las 72 horas, a excepción del dolor de cadera en un paciente que comenzó después de las 72 horas. En el día 14, una biopsia de hígado en un paciente (0,6 mg/kg de rhASM, paciente n°. 12313) mostró dos nuevos focos de infiltrados linfocíticos: uno era minúsculo (0,1 mm de diámetro) y el otro era moderado (0,5 mm de diámetro) y que se asoció con la degeneración hepatocelular. Este protocolo se detuvo cuando el primer paciente de la cohorte 5 (1 mg/kg de rhASM, paciente no. 12112) experimentó una toxicidad de hiperbilirrubinemia limitante de la dosis (punto máximo 4,7 mg/dL).

Los resultados de esto mostraron un inicio inesperado y tardío de los sucesos clínicos y de laboratorio adversos relacionados con la dosis en humanos que padecen ASMD a dosis de rhASM de 0,3 mg/kg y mayores. Además, se hicieron dos observaciones principales de laboratorio de seguridad en vista de los resultados de este protocolo. Una relacionada con la hiperbilirrubinemia, en la que se observó una proporción proporcional al aumento de la dosis en la bilirrubina directa e indirecta sin marcadores consistentes de daño hepático (AST, ALT, AP) o evidencia de hemólisis (hemoglobina y hematocrito). Dos pacientes tenían GGT levemente alto a las 48-72 horas, y un paciente tenía dos nuevos focos hepáticos de infiltrados linfocíticos, uno de los cuales estaba asociado con la degeneración hepatocelular.

La otra observación se refería a la respuesta de fase aguda, es decir, a la inflamación. Los resultados mostraron un aumento en CRP/hs-CRP, % de neutrófilos, ferritina, IL-6, IL-8, calcitonina, fibrinógeno, PT, PTT, y una disminución en el hierro y la albúmina en respuesta al aumento de las dosis de rhASM. Los síntomas clínicos constitucionales de fiebre, náuseas, vómitos, dolor y mialgia estaban probablemente relacionados con la respuesta de fase aguda. Los resultados no mostraron evidencia del síndrome de liberación de citoquinas asociado con cambios cardiovasculares, ni evidencia de disfunción de la hormona suprarrenal.

6.4 Conclusiones

El protocolo descrito anteriormente es la primera experiencia con la terapia de sustitución enzimática en pacientes humanos adultos con ASMD. A dosis bioactivas en humanos, el rhASM no provocó el síndrome de liberación de citoquinas asociado con cambios cardiovasculares, ni provocó la disfunción de la hormona suprarrenal. Las principales observaciones de seguridad fueron la hiperbilirrubinemia y la respuesta de fase aguda relacionadas con la dosis. Es probable que ambos sucesos adversos estén relacionados con la descomposición de la esfingomielina en ceramida y fosfolcolina, pero los mecanismos moleculares exactos no se conocen completamente. Se identificaron varios biomarcadores de seguridad que incluyen bilirrubina, ceramida, CRP/hs-CRP, IL-8, IL-6, calcitonina y ferritina. Además, basado en los hallazgos de la hiperbilirrubinemia, la dosis inicial máxima tolerada de rhASM fue de 0,6 mg/kg.

Además, el hecho de que la aparición de sucesos adversos con síntomas clínicos en pacientes se observara a una dosis tan baja como 0,3 mg/kg fue sorprendente, dado que el NOAEL ("nivel de efecto adverso no observado") en el ratón ASMKO fue de 0,3 mg/kg. Notablemente, los síntomas clínicos de toxicidad en los ratones ASMKO no se observaron hasta que se utilizaron dosis mayores o iguales a 10 mg/kg.

7. Ejemplo 2: Protocolo de toxicidad de la inyección intravenosa repetida de la dosis después de la fase de reducción de esfingomielinasa ácida en ratones Knock-out

Este ejemplo describe la investigación de la toxicidad potencial de la administración intravenosa repetida de esfingomielinasa ácida humana recombinante (rhASM) después de la fase de reducción en los ratones Knockout de la esfingomielinasa ácida (ASMKO). Una vez establecido que los efectos secundarios tóxicos comienzan a observarse en dosis iniciales de 10 mg/kg de rhASM en ratones ASMKO, se diseñó la siguiente investigación para determinar si la administración de dosis crecientes de esfingomielinasa ácida humana recombinante (rhASM) en

ratones ASMKO no reduciría suficiente la esfingomielina acumulada para que se pueda administrar una mayor dosis de rhASM a los ratones ASMKO en los sitios de patología objetivo, tal como el pulmón y el cerebro, con una toxicidad mínima o no observable.

5 A los ratones JK ASMKO se les administraron 3 mg/kg de rhASM en los días de estudio (SD) 1, 3, 5, 7 (fase de reducción). Comenzando con el SD 9 y continuado cada dos semanas durante 13 semanas (7 dosis), los ratones recibieron dosis de tratamiento de 3, 10 o 30 mg/kg de rhASM (fase de tratamiento).

10 rh ASM se administró por vía intravenosa mediante una inyección en bolo en una vena lateral de la cola a ratones ASMKO machos y hembras. Los grupos 1-3 recibieron 3 mg/kg de rhASM durante la fase de reducción (SD 1, 3, 5 y 7). Los grupos 1, 2 y 3 recibieron 3, 10 y 30 mg/kg de rhASM, respectivamente, durante la fase de tratamiento (SD 9, 23, 37, 51, 65, 79 y 93). Se realizó un sangrado previo al estudio de un subconjunto de ratones en cada grupo (los primeros 2 ratones/sexo en el Grupo 1 y los primeros 4 ratones/sexo en los Grupos 2-3) así como 5 minutos y 4 horas después de las Dosis 1, 4, y 7 de la fase de tratamiento para el análisis de toxicocinéticos (TK) (5 minutos) y niveles de ceramida (4 horas). Se realizó un sangrado del otro subgrupo de ratones de cada grupo (los últimos 2 ratones/sexo en el Grupo 1 y los últimos 4 ratones/sexo en los grupos 2-3) así como 4 y 24 horas después de las Dosis 1,4, y 7 de la fase de tratamiento para el análisis de los perfiles de múltiples analitos en roedores (4 horas) y los niveles de prueba de función hepática/proteína de fase aguda (24 horas). Véase el Diseño del Estudio en la Tabla 2, a continuación.

20 Debido a la probabilidad de respuestas anafilácticas que comienzan con la primera dosis de la fase de tratamiento y cada dosis posterior, se observó a cada ratón de cerca para signos de anafilaxia (por ejemplo, inquietud, masticación, frotación de la cara, urticaria, edema, letargo y pelaje desaliñado) después de la prueba de administración de artículos. Los ratones recibieron difenhidramina (DPH) comenzando antes de la primera dosis de la fase de tratamiento y cada dosis posterior.

25 La DPH a una concentración de 5 mg/mL se preparó diluyendo una disolución madre disponible comercialmente de 50 mg/mL con disolución salina estéril al 0.9%. La DPH se administró por vía intraperitoneal (IP) a una dosis de 20 mg/kg (4 mL/kg) según el peso corporal más reciente, 10-20 minutos antes de la administración de rhASM para prevenir posibles reacciones anafilácticas. Si algún animal demostró una reacción de hipersensibilidad después de la administración del artículo de prueba, a pesar del tratamiento previo con DPH, se administró por vía intraperitoneal una segunda dosis de DPH a 10 mg/kg (2 mL/kg).

30 Todos los ratones se sometieron a eutanasia mediante asfixia con CO₂ en SD 100. Después de la eutanasia, se extrajo sangre para análisis patológico clínico y de inmunogenicidad mediante una punción cardíaca. Se realizó una necropsia en todos los ratones después de la extracción de sangre. Todos los tejidos se conservaron en formalina tamponada neutra al 10% (NBF) seguido de un análisis histopatológico. Una porción del hígado, bazo, riñón y pulmón se conservaron en glutaraldehído al 2%/paraformaldehído al 2% para el análisis de la carga de esfingomielina. También se recolectó una porción de hígado, bazo, riñón y pulmón y se almacenó a ≤ -70°C para un posible análisis futuro.

35 Después de la necropsia, todos los tejidos restantes, incluyendo el cadáver del animal se colocaron en NBF al 10%.

Tabla 2: Diseño del estudio

Identificación de la dosis	No. de animales		Fase de reducción	Nivel de dosis de tratamiento con rhASM	Concentración de dosis de tratamiento (mg/mL)	Volumen de dosis de tratamiento (mg/mL)
	Macho	Hembra				
1 – rhASM*	4	4	Todos los ratones se administraron con 3mg/kg de rhASM en los días de estudio 1, 3, 5, y 7 Las dosis se administraron a una concentración de 0,39mg/mL a un volumen	3 mg/kg empezando en el día 9 del estudio y cada dos semanas a partir de entonces durante 13 semanas	0,39	7,7
2– rhASM*	8	8	a una concentración de 0,39mg/mL a un volumen	10 mg/kg empezando en el día 9 del estudio y	1,3	

			de 7,7 mL/kg	cada dos semanas a partir de entonces durante 13 semanas		
3- rhASM*	8	8		30 mg/kg empezando en el día 9 del estudio y cada dos semanas a partir de entonces durante 13 semanas	3,9	

*La difenilhidramina se administrará a todos los ratones antes de la primera dosis de la fase de tratamiento y después de cada dosis

En observaciones de la vida

- 5 El primer día del estudio se consideró SD1 (el primer día de la dosificación). Los pesos corporales de los animales se tomaron una vez a la semana durante el curso del estudio que comenzó en SD-1 y se tomaron el lunes de cada semana posterior. Las observaciones de Cageside se realizaron una vez al día de lunes a viernes. Se registró cualquier anomalía y observación de normalidad. Las observaciones/puntuaciones clínicas posteriores a la dosis se realizaron inmediatamente antes de 10-20 y 50-70 minutos después de cada administración de dosis. Se registró cualquier anomalía y observación de normalidad. Se consultó al veterinario asistente y/o al director del estudio en caso de una reacción adversa y se tomaron medidas apropiadas basadas en sus recomendaciones.

Eutanasia

- 15 Si hubo una reacción adversa que afectó la salud y el bienestar de un animal, el animal se sacrificó mediante asfixia con CO₂, se abrió a través de las cavidades torácica, abdominal y craneal y se colocó en formalina tamponada neutra al 10% (NBF) para un posible futuro análisis. Si un animal se encontró muerto, todo el cadáver del animal se conservó en NBF al 10% para un posible análisis futuro. Al final del estudio, todos los animales supervivientes fueron sometidos a eutanasia por asfixia con CO₂.

Recogida de muestras:

- 20 Análisis de dosis: Aproximadamente quinientos microlitros (500 µL) del artículo de prueba de todos los niveles de dosis se recogieron dentro de los 1-10 minutos después de la formulación en cada día de dosificación y se almacenaron en hielo seco hasta que se transfirieron a un congelador fijado para mantener una temperatura de ≤ -70°C. Las muestras de análisis de dosis se transfirieron en SD 1, 3, 5, 7, 9, 23, 37, 51, 65, 79, y 93 y se almacenaron a ≤ -70°C hasta el análisis. Las muestras para el análisis de dosis se midieron a través el ensayo A280.

- 25 Recogida de sangre: Para la extracción de sangre para el análisis de TK, los niveles de análisis de múltiples analitos en roedores y los niveles de prueba de la proteína de fase aguda/función hepática, los ratones se anestesiaron con una mezcla de isoflurano y oxígeno. Las recolecciones de sangre se realizaron en SD – 1, 9, 51 y 93 (antes del estudio y las dosis de las fases de tratamiento 1^a, 4^a y 7^a, respectivamente) según the Blood Collection Tables (véase las Tablas 4 y 5, a continuación) y el siguiente texto.

- 30 Toxicocinéticas de rhASM: Los primeros 2 ratones/sexo en el Grupo 1 y los primeros 4 ratones/sexo en los Grupos 2-3 tuvieron una toma de muestra para el análisis del punto máximo de los niveles de rhASM antes del estudio (SD-1) y 5 minutos después de la 1^a, 4^a, y 7^a dosis de la fase de tratamiento. La sangre de todos los animales se extrajo del plexo retro-orbital de ratones inconscientes. Se recogieron aproximadamente 60 µL de sangre total en tubos de hematocrito y se dejaron coagular a temperatura ambiente durante al menos un minuto. El suero se preparó a partir de estas muestras mediante centrifugación durante 5 minutos a 10000 revoluciones por minuto (RPM). Después de la centrifugación, se recogió el suero y se almacenó en hielo seco hasta que se transfirió a un congelador para mantener una temperatura de ≤ -70°C. Una vez transferidas, todas las muestras se almacenaron a ≤ -70°C hasta su análisis. Las muestras de TK se transfirieron en SD 1, 9, 51 y 93. Las muestras de TK se midieron mediante un ensayo inmunoenzimático (ELISA).

5 Análisis de los niveles de ceramida: Se tomaron muestras de sangre de los primeros 2 ratones/sexo en el Grupo 1 y los 4 primeros ratones/sexo en los Grupos 2-3 para el análisis de los niveles de ceramida antes del estudio (SD – 1), y 4 horas después de la 1^a, 4^a y 7^a dosis de la fase de tratamiento. La sangre de estos animales se extrajo del plexo retro-orbital de ratones inconscientes. Aproximadamente 240 µL de sangre total se recolectaron en tubos de EDTA de potasio y se colocaron en un balancín Nutator durante un máximo de 30 minutos para evitar la formación de un coágulo. El plasma se preparó a partir de estas muestras mediante centrifugación durante 5 minutos a 10000 RPM. Después de la centrifugación, se recogió el plasma y se almacenó en hielo seco hasta que se transfirió a un congelador para mantener una temperatura de ≤ -70°C. Una vez transferidas, todas las muestras se almacenaron a ≤ -70°C hasta su análisis mediante un grupo de Espectrometría de masas. Las muestras de ceramida se transfirieron a más tardar en SD 94. Las muestras de ceramida se midieron por espectrometría de masas.

15 Análisis de los perfiles multi-analitos de roedores (MAP): Se tomaron muestras de sangre de los primeros 2 ratones/sexo en el Grupo 1 y los 4 primeros ratones/sexo en los Grupos 2-3 para el análisis de los perfiles multi-analitos de roedores antes del estudio (SD – 1), y 4 horas después de la 1^a, 4^a, y 7^a dosis de la fase de tratamiento. La sangre de todos los animales se extrajo del plexo retro-orbital de ratones inconscientes. Se recogieron aproximadamente 150 µL de sangre total en tubos separadores de suero y se dejaron coagular durante al menos 30 minutos. El suero se preparó a partir de estas muestras mediante centrifugación durante 5 minutos a 10000 revoluciones por minuto, RPM. Después de la centrifugación, se recogió el suero y se almacenó en hielo seco hasta que se transfirió a un congelador para mantener una temperatura de ≤ -70°C. Una vez transferidas, todas las muestras se almacenaron a ≤ -70°C hasta su envío a más tardar en SD 94 para el análisis de los perfiles de multi-analitos de roedores. Las muestras se enviaron a Rules Based Medicine en hielo seco. La tabla de perfiles de multi-analitos de roedores (véase Tabla 3, a continuación) enumera los analitos que se midieron.

Tabla 3: Perfiles de multi-analitos de roedores:

Analitos que se van a ensayar		
Apolipoproteína A1	Interleucina-2	MIP-3 beta
Proteína C reactiva	Interleucina-3	MMP-9
CD40	Interleucina-4	MCP-1
Ligando de CD40	Interleucina-5	MCP-3
Endotelina-1	Interleucina-6	MCP-5
Eotaxina	Interleucina-7	Mieloperoxidasa
Factor de crecimiento epidérmico	Interleucina-10	Mioglobina
Factor VII	Interleucina-11	Oncostatina M
Fibrinógeno	Interleucina-12p70	RANTES
FGF-básico	Interleucina-17	Amilide P del suero
FGF-9	KC/GRO alfa	SGOT
GCP-2	Factor inhibidor de la leucemia	Factor de células madre
GM-CSF	Linfotactina	Trombopoietina
GST-alfa	M-CSF	TIMP 1
Haptoglobina	MDC	Factor tisular
Inmunoglobulina A	MIP-1 alfa	Factor de necrosis tumoral alfa
Proteína 10 inducible	MIP-1 beta	VCAM-1
Interferon-gamma	MIP-1 gamma	VEGF
Interleucina-1 alfa	MIP-2	Factor de von Willebrand
Interleucina-1 beta		

5 Análisis de los niveles de ensayo de la proteína de fase aguda/función hepática: Se tomaron muestras de sangre de los primeros 2 ratones/sexo en el Grupo 1 y los 4 primeros ratones/sexo en los Grupos 2-3 para el análisis de los niveles de la proteína de fase aguda (amiloide A del suero y amiloide P del suero) y la función hepática (bilirrubina y alanina aminotransferasa (ALT)) antes del estudio (SD- 1), y 24 horas después de la 1ª, 4ª y 7ª dosis de la fase de tratamiento. La sangre de estos animales se extrajo del plexo retro-orbital de ratones inconscientes. Se recogieron aproximadamente 150 µL de sangre total en tubos separadores de suero y se dejaron coagular durante al menos 30 minutos. El suero se preparó a partir de estas muestras mediante centrifugación durante 5 minutos a 10000 RPM. Después de la centrifugación, se recogió el suero y se almacenó en hielo seco hasta que se transfirió a un congelador para mantener una temperatura de ≤ -70°C. Una vez transferidas, todas las muestras se almacenaron a ≤ -70°C hasta su envío a más tardar en SD 94 para el análisis del ensayo de proteína de fase aguda/función hepática. Las muestras se enviaron a Analytics en hielo seco.

Tabla 4: Tabla de la recogida de sangre antes del estudio (SD – 1)

Grupo	Animal #	Sexo	Pre-sangrado de TK (60 µL)	Pre-sangrado del mapa de roedores (150 µL)	Pre-sangrado de ceramida (240 µL)	Pre-sangrado de APP/Función hepática (150 µL)
1	1,2	M	X		X	
	5,6	H	X		X	
	3,4	M		X		X
	7,8	H		X		X
2	9, 10, 11, 12	M	X		X	
	17, 18, 19, 20	H	X		X	
	13, 14, 15 16	M		X		X
	21, 22, 23, 24	H		X		X
3	25, 26, 27, 28	M	X		X	
	33, 34, 35, 36	H	X		X	
	29, 30, 31, 32	M		X		X
	37, 38, 39, 40	H		X		X

Tabla 5: Tabla de la recogida de sangre a SD 9, 51, y 93

Grupo	Animal #	Sexo	Sangrado de TK (60 µL) 5 minutos después de la dosis	Sangrado del mapa de roedores (150 µL) 4 horas después de la dosis	Sangrado de ceramida (240 µL) 4 horas después de la dosis	Sangrado de APP/Función hepática (150 µL) 24 horas después de la dosis
1	1,2	M	X		X	
	5,6	H	X		X	
	3,4	M		X		X
	7,8	H		X		X
2	9, 10, 11, 12	M	X		X	
	17, 18, 19, 20	H	X		X	

	13, 14, 15 16	M		X		X
	21, 22, 23, 24	H		X		X
3	25, 26, 27, 28	M	X		X	
	33, 34, 35, 36	H	X		X	
	29, 30, 31, 32	M		X		X

Necropsia

5 Recogida terminal de sangre para análisis de patología clínica e inmunogenicidad: Después de la eutanasia, a todos los animales se les realizó una punción cardíaca para la recogida de sangre total (aproximadamente $\geq 500 \mu\text{L}$) de todos los animales del estudio principal para el análisis de patología clínica y de inmunogenicidad. Aproximadamente 150 μL de sangre total se colocaron en tubos de EDTA de potasio y se invirtieron suavemente para el análisis de los parámetros de hematología. Después de la suave inversión, todas las muestras se almacenaron a temperatura ambiente oscilando en un balancín Nutator hasta que las muestras se almacenaron a 2-10°C hasta el análisis. La sangre restante (de la barra cardíaca después de la extracción de 150 μL para el análisis hematológico) se colocó en un tubo separador de suero, se dejó coagular a temperatura ambiente durante al menos 30 minutos, se centrifugó en una centrifugadora durante 5 minutos a 10000 RPM, y se recogerá el suero. Se colocaron aproximadamente 30 μL de suero en un tubo eppendorf para el análisis de inmunogenicidad, mientras que el suero restante se colocó en un tubo eppendorf para el análisis de química clínica. Las muestras de inmunogenicidad se almacenaron en hielo seco hasta que se almacenaron en un congelador para mantener una temperatura de $\leq -70^\circ\text{C}$. Las muestras de inmunogenicidad se midieron mediante ELISA. Las muestras de química clínica se colocaron en hielo seco hasta que todas las muestras se almacenaron a $\leq -20^\circ\text{C}$ hasta el análisis. La Tabla de analitos de hematología y química clínica (véase, Tabla 6, a continuación) enumera los analitos que se midieron.

Tabla 6: Tabla de analitos para hematología y química clínica:

Parámetros de hematología	Parámetros de química clínica
Recuento de leucocitos (diferencial total y absoluto)	Fosfatasa alcalina
Recuento de eritrocitos	Bilirrubina total (con bilirrubina directa si la bilirrubina total excede de 1 mg/dL)
Hemoglobina	Aspartato aminotransferasa
Hematocrito	Alanina aminotransferasa
Hemoglobina corpuscular media	Gamma glutamil transferasa
Volumen corpuscular medio	Nitrógeno de urea
Concentración de hemoglobina corpuscular media (Calculada)	Creatinina
Reticulocitos absolutos	Proteínas totales
Recuento de plaquetas	Albúmina
Morfología de las células sanguíneas	Proporción globulina y proporción A/G (albúmina/globulina) (Calculada)
Frotis de sangre	Glucosa
	Colesterol total
	Triglicéridos
	Electrolitos (sodio, potasio, cloruro)
	Calcio
	Fósforo

Los resultados del análisis de hematología y análisis de química clínica de todos los animales se interpretaron por un patólogo certificado por la junta.

- 5 Recogida de tejidos: Después de la eutanasia en SD 100, todos los animales se sometieron a necropsia para la recogida de tejidos. La necropsia incluyó un examen de las características externas del cadáver del animal, los orificios externos del cuerpo, las cavidades, órganos y tejidos abdominales y torácicos. Se recogieron los resultados macroscópicos. La Tabla de recogida de tejidos (véase Tabla 7, a continuación) enumera los tejidos que se recogieron en NBF al 10%. Las lesiones macroscópicas también se recogieron y se almacenaron en NBF al 10%. Los cadáveres de animales restantes se conservaron en NBF al 10%.

- 10 Tabla 7: Tabla de recogida de tejidos:

Tejido	Tejido
Suprarrenal (2)	Páncreas
Aorta	Glándula pituitaria
Cerebro	Próstata
Ciego	Recto
Colon	Glandula salivar [mandibular (2)]
Duodeno	Vesícula seminal
Epidídimo (2)	Nervio ciático
esófago	Músculo del esqueleto (cuádriceps)
Ojo con nervio óptico (2)	Piel
Fémur con médula ósea (superficie articular del extremo distal)	Médula espinal (cervical, torácica y lumbar)
Vesícula biliar	Bazo
Corazón	Esternón con médula ósea
íleon	Estómago
Yeyuno	Testículos (2)
Riñón (2)	Timo
Hígado	Tiroides (2) con paratiroides
Pulmón con bronquios principales	Lengua
Ganglio linfático (mandibular)	Tráquea
Ganglio linfático (mesentérico)	Vejiga urinaria
Glándula mamaria (hembras)	Útero con cuello uterino
Ovario (2)	Lesiones macroscópicas

Se pesarán las muestras en negrita.

- 15 Pesos de órganos: En el momento de la necropsia, se pesaron los órganos en negrita anteriores. Los órganos pareados se pesaron juntos. Los pesos se registraron en la forma del peso del órgano. Los porcentajes de peso de órgano a cerebro y las proporciones de peso órgano a cerebro se calcularon en función de los pesos corporales tomados antes de la necropsia.

Histopatología: Las muestras de todos los animales, así como las lesiones macroscópicas de cualquier animal en estudio se transfirieron a la histología. Los tejidos conservados enumerados anteriormente de cada animal se

incluyeron en parafina. Todos los tejidos se seccionaron, se tiñeron con hematoxilina y eosina, y se examinaron microscópicamente. Todas las secciones de tejido se examinaron microscópicamente para evaluar los cambios histológicos por un patólogo certificado por la junta.

5 Se recogieron muestras de hígado, bazo, riñón y pulmón de todos los animales y se fijaron en glutaraldehído al 2%/paraformaldehído al 2% para el análisis de la carga de esfingomielina. Estos tejidos se fijaron posteriormente en dicromato de potasio/tetróxido de osmio y se incluyeron en epon. Las secciones de un micrón se tiñeron con ácido tánico y azul de toluidina para un examen microscópico de luz. La carga de esfingomielina en cada muestra se cuantificó mediante morfometría computarizada con el software MetaMorph por un patólogo certificado.

10 Se recogieron muestras de hígado, bazo, riñón y pulmón de todos los animales, se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron congeladas a $\leq -70^{\circ}\text{C}$ para un posible análisis futuro.

Análisis de muestra:

El análisis de dosis se midió mediante el análisis A280 y toxicocinético, y las muestras de inmunogenicidad se analizaron mediante ELISA.

El análisis de ceramida se midió mediante espectrometría de masas.

15 Las muestras de hematología y patología clínica se midieron utilizando un analizador Sysmex XTV 2000 IV Hematology Analyzer y un analizador Radnox Daytona Clinical Chemistry Analyzer, respectivamente.

Las muestras de tejido se procesaron y el análisis histopatológico fue interpretado por un patólogo certificado por la junta según los SOPs. Los resultados del análisis de patología clínica fueron interpretados por un patólogo certificado por la junta según los SOPs.

20 **8. Ejemplo 3: Dosis de escalado de la terapia de sustitución enzimática de la esfingomielinasa ácida humana recombinante**

8.1 Introducción

25 El protocolo descrito a continuación utiliza el escalado de la dosis dentro del paciente como una opción para lograr dosis de repetición más altas de rhASM. Se evaluaron la seguridad, la eficacia, y la farmacocinética (PK) de las infusiones de rhASM en dosis de 0,3, 0,6 y 1,0 mg/kg administradas cada 2 semanas (q2w) durante 40 semanas, y la seguridad y eficacia a largo plazo de las infusiones de rhASM.

8.2 Materiales y métodos

8.2.1 Diseño del protocolo

30 Los 12 pacientes con NP de tipo B a tratar son de ambos sexos. Los pacientes recibirán inicialmente al menos 1 dosis de 0,1 mg/kg de rhASM. A los pacientes que toleran la infusión de rhASM de 0,1 mg/kg se les administran dosis crecientes de 0,3 mg/kg, 0,6 mg/kg y 1 mg/kg cada 2 semanas, según lo toleren. Los pacientes que toleran 1,0 mg/kg se estratifican por volumen de bazo (<12 veces o ≥ 12 veces múltiplos de lo normal) y se asignan al azar para recibir una de 2 dosis diana; 1,0 mg/kg de rhASM o 3,0 mg/kg; los pacientes asignados al azar al grupo de 3,0 mg/kg, aumentarán a 2,0 mg/kg y luego a 3,0 mg/kg, según lo toleren. Los pacientes que no toleran la dosis de 0,1 mg/kg de rhASM son reemplazados. Los pacientes que no pueden tolerar la escalada a dosis más altas permanecerán en su dosis máxima tolerada durante el período de dosis de mantenimiento de 26 semanas.

40 A todos los pacientes se les aumentará la dosis de 0,1 mg/kg a su dosis objetivo. Los ajustes de la dosis durante el período de escalado se producirán en intervalos de 2 semanas hasta que se alcance la dosis deseada (si se tolera). Después de la infusión inicial (0,1 mg/kg de rhASM), así como de las dosis posteriores se revisarán los resultados del paciente, es decir, la aparición/gravedad de sucesos adversos (AE) y la bilirrubina sérica, la hsCRP y otras proteínas de respuesta de fase aguda y la ceramida. Los siguientes criterios determinarán la próxima dosis que se administrará durante el período de aumento de las dosis:

1. Valor de bilirrubina total $\leq 2,0$ mg/dL o AE leve \rightarrow aumentar a la siguiente dosis (si corresponde)
2. Valor de bilirrubina total = 2,1-3,0 mg/dL o AE moderado \rightarrow no aumentar de dosis; repetir la dosis actual,
- 45 3. Valor de bilirrubina total $> 3,0$ mg/dL o AE grave \rightarrow disminuir la dosis a la administrada/tolerada anteriormente

50 Cualquier suceso adverso serio (SAE) se considera relacionado con rhASM, un valor de bilirrubina que no disminuye a $< 2,0$ mg/dL antes de la siguiente dosis programada o cualquier AE que genere preocupación con respecto a la seguridad del rhASM a la dosis administrada se puede considerar una toxicidad limitante de dosis (DLT). Si un paciente experimenta una DLT, las dosis siguientes para el paciente deben interrumpirse temporalmente. Los

pacientes pueden ser re-desafiados para recibir la dosis que que dio como resultado una DLT y, si se tolera, el tratamiento procederá como se planeó originalmente.

Si el paciente no puede tolerar 2 dosis de 0,1 mg/kg (es decir, infusión inicial y una dosis de re-desafío) no será tratado con dosis crecientes y será suspendido y reemplazado en el estudio. Los pacientes que toleran la dosis de 0,3 mg/kg recibirán la infusión inicial de rhASM (0,1 mg/kg) y, después de 2 semanas, 0,3 mg/kg de rhASM (siempre que se cumplan los criterios de escalado de dosis después de la dosis de 0,1 mg/kg). La dosis de rhASM posteriores se administrarán durante el período de aumento de dosis q2w durante un máximo de 18 semanas. Si un paciente aumenta con éxito a 0,3 mg/kg y después cumple con los criterios #2 o #3 (anteriores), el paciente puede ser re-desafiado dos veces. Si el re-desafío no tiene éxito (es decir, no se puede alcanzar la dosis deseada), el paciente continuará con una dosis de 0,1 mg/kg de rhASM durante el resto del período de tratamiento de 40 semanas.

Los pacientes que se tratarán con el régimen de dosis de 0,6 mg/kg recibirán la infusión inicial de rhASM (0,1 mg/kg), seguido de 1 dosis de 0,3 mg/kg de rhASM, seguido de 0,6 mg/kg d rhASM q2w para el resto del período de tratamiento de 40 semanas (siempre que las infusiones anteriores de rhASM de 0,1 mg/kg y 0,3 mg/kg sean bien toleradas). Los pacientes que se tratarán con el régimen de 1,0 mg/kg recibirán la infusión inicial de rhASM (0,1 mg/kg), seguido de 1 dosis de 0,3 mg/kg de rhASM, seguido de 1 dosis de 0,6 mg/kg de rhASM, seguido de 1,0 mg/kg de rhASM q2w durante el resto del período de tratamiento de 40 semanas (siempre que las infusiones previas de rhASM de 0,1 mg/kg, 0,3 mg/kg y 0,6 mg/kg sean bien toleradas). Si un paciente aumenta con éxito de 0,3 a 0,6 mg/kg o de 0,6 a 1,0 mg/kg y después cumple con los criterios #2 o #3 (anteriores), el paciente puede ser re-desafiado dos veces. Si el re-desafío no tiene éxito (es decir, no se puede alcanzar la dosis objetivo), el paciente continuará con la dosis más baja tolerada durante el resto del período de tratamiento de 40 semanas.

Después de la fase de tratamiento de 40 semanas, los pacientes pueden continuar su tratamiento a su nivel de dosis de mantenimiento.

8.2.2 Pacientes

Cada paciente debe cumplir con los siguientes criterios de inclusión para ser tratado según estos regímenes:

- 1- Deficiencia documentada de ASM compatible con la enfermedad de Niemann-Pick (N-P);
- 2- Capacidad de difusión (DL_{CO}) > 20% y ≤ 80% del valor normal previsto;
- 3- Volumen del bazo ≥ 8 veces el normal (≥ 1,6% del peso corporal);
- 4- Las pacientes en edad fértil deben tener una prueba de embarazo en suero negativo para β-hCG, y aceptar usar un método anticonceptivo médicamente aceptable durante la duración del protocolo.

8.2.3 Tratamiento

Los pacientes recibirán una sola dosis de 0,1mg/kg de rhASM durante un período de tiempo aproximado de 35 minutos. Las pautas de administración se resumen en la Tabla 8, a continuación. Los pacientes que toleran la infusión inicial de 0,1 mg/kg de rhASM se escalarán de la dosis a una dosis de tratamiento objetivo (0,3, 0,6 o 1,0 mg/kg de rhASM). A todos los pacientes se les aumentará la dosis de 0,1 mg/kg a su dosis objetivo. Los ajustes de la dosis durante el período de escalado se producirán en intervalos de 2 semanas hasta que se alcance la dosis deseada.

Tabla 8: Administración de rhASM

Dosis objetivo (mg/kg)	Velocidad de infusión aproximada (mL/h)	Velocidad de infusión aproximada (mg/kg/h)	Duración de la administración (tiempo aproximado en minutos)
0,1	Etapa 1: 20 mL/h durante 20 minutos (+/- 5 min), si no IAR Etapa 2: 60 mL/h para el resto de la infusión si no IAR	Etapa 1: 0,1 mg/kg/h durante 20 minutos (+/- 5 min), si no IAR Etapa 2: 0,3 mg/kg/h para el resto de la infusión si no IAR	35
0,3	Etapa 1: 17 mL/h durante 20 minutos (+/- 5 min), si no IAR Etapa 2: 50 mL/h durante 20 minutos (+/- 5 min), si	Etapa 1: 0,1 mg/kg/h durante 20 minutos (+/- 5 min), si no IAR Etapa 2: 0,3 mg/kg/h durante 20 minutos (+/- 5	60

	no IAR Etapa 3: 100 mL/h para el resto de la infusión si no IAR	min), si no IAR Etapa 3: 0,6 mg/kg/h para el resto de la infusión si no IAR	
0,6	Etapa 1: 17 mL/h durante 20 minutos (+/- 5 min), si no IAR Etapa 2: 50 mL/h durante 20 minutos (+/- 5 min), si no IAR Etapa 3: 100 mL/h durante 20 minutos (+/- 5 min), si no IAR Etapa 4: 167 mL/h para el resto de la infusión si no IAR	Etapa 1: 0,1 mg/kg/h durante 20 minutos (+/- 5 min), si no IAR Etapa 2: 0,3 mg/kg/h durante 20 minutos (+/- 5 min), si no IAR Etapa 3: 0,6 mg/kg/h durante 20 minutos (+/- 5 min), si no IAR Etapa 4: 1,0 mg/kg/h para el resto de la infusión si no IAR	80
1,0	Etapa 1: 10 mL/h durante 20 minutos (+/- 5 min), si no IAR Etapa 2: 30 mL/h durante 20 minutos (+/- 5 min), si no IAR Etapa 3: 60 mL/h durante 20 minutos (+/- 5 min), si no IAR Etapa 4: 100 mL/h para el resto de la infusión si no IAR	Etapa 1: 0,1 mg/kg/h durante 20 minutos (+/- 5 min), si no IAR Etapa 2: 0,3 mg/kg/h durante 20 minutos (+/- 5 min), si no IAR Etapa 3: 0,6 mg/kg/h durante 20 minutos (+/- 5 min), si no IAR Etapa 4: 1,0 mg/kg/h para el resto de la infusión si no IAR	100

El grado de esplenomegalia de cada paciente al inicio del estudio se puede registrar en múltiplos de lo normal (x normal) como un indicador de la gravedad de la enfermedad. El volumen normal del bazo es igual al 0,2% del peso corporal.

5 En cada visita, los pacientes deben evaluarse para detectar sucesos adversos nuevos o en curso (AEs).

Los puntos finales clínicos se pueden medir como el % de cambio desde el inicio hasta la semana 26 del período de dosis de mantenimiento. El punto final de eficacia primario es una disminución en el volumen del bazo según lo medido por MRI. Los puntos finales de eficacia secundarios incluyen una disminución en el nivel de esfingomielina hepática; un aumento en la capacidad de ejercicio según lo determinado por % de la carga de trabajo máxima predicha por cicloergometría; aumento de la función pulmonar como % de la DL_{CO} predicha; aumento del aclaramiento pulmonar, que se puede determinar por el recuento y perfil de células de lavado alveolar (BAL) bronquial, esfingomielina, ceramida, citoquina y quitotriosidasa. Los puntos finales de eficacia terciaria pueden incluir una disminución en el volumen del hígado según lo medido por MRI; aumento de la función pulmonar que se puede determinar por el % de FVC, FEV1, TLC predichos; apariencia pulmonar mejorada determinada por tomografía computarizada de alta resolución, radiografía de tórax; perfil lipídico mejorado según lo determinado por HDL, LDL, colesterol total, niveles de triglicéridos y la relación de colesterol total: colesterol HDL; recuento de plaquetas mejorado; hemoglobina; disminución de los niveles de esfingomielina en la piel, plasma, DBS; y mejora en otros biomarcadores como CCL18, ACE.

20 **9. Ejemplo 4: Dosis de escalado de la terapia de sustitución enzimática de la esfingomielinasa ácida humana recombinante (RHASM)**

9.1 Introducción

El protocolo descrito a continuación utiliza una dosis repetida, comparación de dosis para evaluar la seguridad, eficacia y la farmacocinética de la esfingomielinasa ácida humana recombinante (rhASM) en pacientes adultos con ASMD. Los objetivos del protocolo incluyen: (i) la evaluación de la seguridad del escalado de la dosis de rhASM; (ii)

la evaluación de la seguridad, eficacia y farmacocinética de la dosis máxima tolerada o aleatoria de rhASM administrada por vía intravenosa cada 2 semanas durante 26 semanas; y (iii) la evaluación de la seguridad y eficacia a largo plazo de las infusiones de rhASM administradas por vía intravenosa cada 2 semanas desde la semana 26 hasta la finalización del protocolo (al menos 182 semanas de duración).

5 9.2 Materiales y métodos

9.2.1 Pacientes

Cada paciente debe cumplir con los siguientes criterios de inclusión para ser tratado según estos regímenes:

1. Deficiencia documentada de esfingomielinasa (ASM) compatible con la enfermedad de Niemann-Pick (NPD).
- 10 2. Dos o más características clínicas características, que incluyen trombocitopenia, anemia, neutropenia, hepatomegalia, esplenomegalia y enfermedad pulmonar compatible con NPD no neuronopático.
3. Capacidad de difusión del monóxido de carbono (DL_{CO}) > 20% y 80% del valor normal previsto;
- 15 4. Volumen del bazo ≥ 8 múltiplos de lo normal (MN) (es decir, 1,6% del peso normal). Se puede permitir una esplenectomía parcial si se realiza ≥ 1 año desde el examen de detección/inicio y el volumen residual del bazo ≥ 8 MN.
5. Las pacientes en edad fértil deben tener una prueba de embarazo en suero negativa para gonadotropina coriónica β -humana (β -HCG) y aceptar un método anticonceptivo médicamente aceptado durante la duración del protocolo.

9.2.2. Diseño del protocolo

20 Los pacientes que pueden tolerar el rhASM a 0,1 mg/kg pueden inscribirse en el protocolo. Para cada paciente, la participación en el protocolo puede consistir en tres periodos:

1. Selección/inicio (- 60 a - 1 día)
2. Período de tratamiento primario (aproximadamente de 32 a 46 semanas). Fase de escalado de la dosis (DE) (DE primaria - aproximadamente de 6 a 16 semanas)
- 25 - Tras un aumento seguro de 0,1 a 0,3 a 0,6 a 1,0 mg/kg de rhASM, los pacientes se pueden estratificar por el volumen del bazo (< 12 y ≥ 12 MN) y aleatorizar para continuar con la dosis a 1,0 mg/kg o continuar con el aumento de la dosis a 2,0 y 3,0 mg/kg y recibir después 3,0 mg/kg de rhASM o la dosis máxima tolerada (DE secundaria - 4 semanas) para el resto del protocolo.
- Los pacientes no aleatorizados pueden permanecer en su dosis máxima tolerada ($< 1,0$ mg/kg de rhASM).
- 30 Fase de mantenimiento de la dosis (DM) (26 semanas a la dosis máxima tolerada o aleatorizada).
3. Período de tratamiento a largo plazo (al menos 182 semanas con la dosis máxima o aleatorizada).

35 Las evaluaciones de la selección/inicio se pueden completar a menos 24 horas antes de la infusión inicial de rhASM. La inscripción en el protocolo depende de que el paciente pueda tolerar 2 dosis de rhASM de 0,1 mg/kg. Inicialmente, todos los pacientes elegibles pueden recibir una dosis única de 0,1 mg/kg de rhASM en el día 1 del aumento de la dosis (DE). Los pacientes que no pueden tolerar esta dosis se re-desafían dos semanas después. Los pacientes que no pueden tolerar 2 dosis de 0,1 mg/kg de rhASM (es decir, la dosis inicial, y la dosis de re-desafío) se suspenden y reemplazan, para garantizar que se inscriban aproximadamente 12 pacientes (que puedan tolerar rhASM a 0,1 mg/kg).

40 Las dosis de rhASM se pueden escalar cada 2 semanas de 0,1 a 0,3 a 0,6 a 1,0 mg/kg durante la fase DE primaria. Durante la fase DE primaria, los pacientes pueden tener dosis de rhASM aumentadas de manera segura cada 2 semanas de 0,1 a 1,0 mg/kg (como se indica en la Figura 7).

Durante las fases DE primaria y secundaria, el siguiente criterio de escalado de la dosis puede determinar la siguiente dosis de rhASM que se va administrar:

- 45 1. Si la bilirrubina total (el valor más alto antes de la siguiente dosis programada de rhASM e incluye la extracción de sangre antes de la infusión) es de $\leq 2,0$ mg/dL o no hay un suceso adverso relacionado leve (EA) \rightarrow escalar a la siguiente dosis,
2. Si la bilirrubina total es $> 2,0$ pero $< 3,0$ mg/dL o AE relacionada moderada \rightarrow repetir la misma dosis.

- Si la bilirrubina total permanece > 2,0 mg/dL justo antes de la dosis siguiente → detener temporalmente la dosificación adicional del paciente (toxicidad potencial limitante de la dosis [DLT]).

3. Si la bilirrubina total es $\geq 3,0$ mg/dL o AE relacionado grave → disminuir la dosis.

5 • Si la bilirrubina total permanece > 2,0 mg/dL justo antes de la siguiente dosis → detener la dosificación adicional del paciente temporalmente (DLT potencial).

4. Los pacientes se pueden re-desafiar (a un nivel de dosis particular) tantas veces como sea necesario solamente en la fase DE primaria (no se permite la re-réplica en la fase DE secundaria), antes de ser aleatorizados o mantenerse en su dosis máxima tolerada al final de la fase DE primaria de 16 semanas.

10 5. Los pacientes inscritos (es decir, aquellos que pueden tolerar la rhASM a 0,1 mg/kg) no se pueden reemplazar sin no pueden aumentar hasta una dosis de 1,0 mg/kg y ser aleatorizados, o no pueden tolerar su dosis de aleatorización objetivo (es decir, 1,0 o 3,0 mg/kg de rhASM). Estos pacientes pueden continuar en el protocolo a su dosis máxima tolerada.

15 Si se pierde una infusión, el paciente puede recibir la misma dosis que la infusión previa. Si se excede la ventana de visita de ± 5 días, no se puede hacer esa infusión y el paciente debe recibir su próxima infusión a la hora programada para esa infusión.

Para los fines de este protocolo, si se cumple alguno de los siguientes criterios, los resultados pueden considerarse indicativos de una posible toxicidad limitante de la dosis (DLT) para rhASM en una dosis determinada:

- cualquier suceso adverso grave (SAE) que el médico considere relacionado con el rhASM, o
- la bilirrubina total permanece > 2,0 mg/dL justo antes de la siguiente dosis, o

20 • cualquier suceso adverso (AE) que, en opinión del médico, genere preocupación con respecto a la seguridad del rhASM a la dosis administrada.

25 La gravedad de un suceso adverso relacionado será evaluada por un médico. Un suceso adverso relacionado leve suele ser transitorio y puede necesitar solo un tratamiento mínimo o una intervención terapéutica. Un suceso adverso relacionado moderado generalmente se alivia con una intervención terapéutica específica adicional. Este suceso interfiere con las actividades habituales de la vida diaria, causando incomodidad, pero no representa un riesgo significativo o permanente de daño para el sujeto. Un suceso adverso grave interrumpe las actividades habituales de la vida diaria, afecta significativamente al estado clínico o puede necesitar una intervención terapéutica intensiva.

30 Todos los pacientes que recibieron dosis aumentadas y toleran de forma segura 1,0 mg/kg de rhASM en la semana 16 se pueden estratificar por el volumen del bazo (< 12 y ≥ 12 MN) y aleatorizar en una proporción de 1:1 a cualquiera:

- que continúe recibiendo 1,0 mg/kg de rhASM (o la dosis máxima tolerada) cada 2 semanas durante 26 semanas o
- que continúe el escalado de la dosis (DE) de 2,0 a 3,0 mg/kg y después recibir 3,0 mg/kg de rhASM (o la dosis máxima tolerada) cada dos semanas durante 26 semanas.

35 Durante la fase DE secundaria, los pacientes asignados al azar al grupo de 3,0 mg/kg pueden tener solo 4 semanas para aumentar su dosis de rhASM a 3,0 mg/kg antes de comenzar la fase de DM de la semana 26 a 3,0 mg/kg (o la dosis máxima tolerada; véase la Figura 7).

40 La fase DE primaria puede variar desde aproximadamente 6 a 16 semanas de duración para cada paciente. Esto puede depender de los problemas individuales de tolerabilidad del paciente, si los hay, encontrados por el paciente durante el aumento de la dosis de rhASM. Durante la fase DE primaria, cada paciente puede recibir un aumento de su dosis de rhASM cada 2 semanas, de 0,1 a 1,0 mg/kg (como se indica en la Figura 7).

45 La fase DE primaria se puede completar cuando un paciente recibe y tolera una dosis de 1,0 mg/kg de rhASM o llega a la semana 16, lo que ocurra primero. Si no se cumplen los criterios que conducen a un re-desafío de la dosis o una disminución de la dosis, un paciente puede recibir una sola infusión de cada dosis (es decir, un total de 4 infusiones de rhASM), lo que da como resultado una fase DE primaria de 6 semanas. Sin embargo, si se cumplen los criterios que conducen a la repetición de dosis o la disminución de la dosis, la duración de la fase DE primaria puede ser de más de 6 semanas, pero no excederá de 16.

50 Los pacientes que recibieron dosis aumentadas y toleran de manera segura 1,0 mg/kg en la semana 16 pueden asignarse a 1 de 2 grupos de dosis objetivo (es decir, 1,0 o 3,0 mg/kg de rhASM).

Los pacientes asignados al azar a 3,0 mg/kg de rhASM puede ingresar en la fase DE secundaria (véase la Figura 7), que consiste en 2 infusiones: la primera infusión (es decir, 2,0 mg/kg) es 2 semanas después de la primera dosis tolerada de 1,0 mg/kg, y la segunda infusión (es decir, 3,0 mg/kg o la dosis máxima tolerada) es 4 semanas después de la primera dosis tolerada de 1,0 mg/kg. Por lo tanto, la fase DE secundaria puede completarse 4 semanas después de la primera dosis tolerada de 1,0 mg/kg. No se permitirá ninguna dosis de re-desafío. Si el paciente no puede tolerar la primera dosis de 2,0 mg/kg, la segunda dosis de rhASM puede reducirse a la dosis máxima tolerada (es decir, 1,0 mg/kg) o detenerse temporalmente en el caso de una toxicidad potencial limitante de la dosis (DLT).

Los pacientes pueden continuar recibiendo rhASM a la dosis máxima tolerada o aleatorizada administrada IV cada 2 semanas durante la fase de DM de 26 semanas del período de tratamiento primario. Esto puede incluir tanto pacientes aleatorios como no aleatorios.

Como se indica en la Figura 7, los pacientes en el grupo de dosis 1,0 mg/kg pueden comenzar la fase de DM en su primera dosis de 1,0 mg/kg después de la aleatorización, mientras que los pacientes en el grupo de 3,0 mg/kg pueden comenzar la fase de DM en su tercera dosis de rhASM después de la aleatorización. Las dosis de rhASM posteriores pueden administrarse por vía intravenosa cada 2 semanas durante 26 semanas en la fase de DM para todos los pacientes asignados al azar.

Los pacientes no aleatorizados pueden comenzar la fase DM a su primera dosis de rhASM 2 semanas después de su fase DE de 16 semanas. Estos pacientes pueden continuar con su dosis máxima tolerada de rhASM (< 1,0 mg/kg) cada 2 semanas durante un total de 26 semanas.

Si un paciente aleatorio experimenta un AE relacionado moderado/grave (es decir, una reacción asociada a la infusión (IAR) durante la infusión en la fase DM, el paciente puede detener y reiniciar la infusión de rhASM (es decir, interrumpir) o disminuir la velocidad de infusión. Siempre que no se haya producido un DLT potencial, el paciente puede continuar con esta dosis de rhASM durante el resto de la fase DM.

Después de que se hayan completado todas las evaluaciones del protocolo de la semana 26, todos los pacientes (incluyendo los pacientes no aleatorizados) pueden ingresar al período de tratamiento a largo plazo y continuar el tratamiento con rhASM (a la dosis de rhASM que se administró durante la fase DM) IV cada 2 semanas durante al menos 182 semanas [3,5 años] de duración o hasta la finalización del protocolo. El período de tratamiento a largo plazo incluye la visita de finalización de protocolo (o retiro/interrupción del paciente) y una llamada telefónica de seguimiento de seguridad (30 a 37 días después de la última dosis de rhASM). Las dosis individuales de rhASM para pacientes se pueden ajustar en el período de tratamiento a largo plazo según los resultados de los análisis del período de tratamiento primario. Cualquier aumento de dosis necesario puede producirse como se describió anteriormente.

9.3 Tratamiento

Los pacientes recibirán infusiones por vía intravenosa de rhASM a 0,1, 0,3, 0,6 y 1,0 mg/kg cada 2 semanas durante la fase DE primaria. Los pacientes aleatorizados a 3,0 mg/kg de rhASM recibirán 2,0 mg/kg antes de recibir los 3,0 mg/kg (o la dosis máxima tolerada) 2 semanas después durante la fase DE secundaria. Durante la fase DM de 26 semanas, a los pacientes se les administrará 1,0 o 3,0 mg/kg (o dosis máxima tolerada) de rhASM cada 2 semanas después de la fase DE. Durante el período de tratamiento a largo plazo, la dosis de rhASM que se administró durante la fase de DM se administrará por vía intravenosa cada 2 semanas.

Los pacientes recibirán cada infusión intravenosa de rhASM durante un período de aproximadamente 35 a 135 minutos (min), dependiendo de la dosis (véase la Tabla 9 a continuación). El tratamiento de protocolo (rhASM) se administrará mediante una bomba de infusión programable estándar y un filtro en línea de baja unión a proteínas de 0,22 micrones. Para calcular la dosis en mg/kg, se utiliza el peso real para pacientes con un índice de masa corporal (BMI) ≤ 30 (peso en kg)/(altura en metros); para pacientes con BMI > 30, se calcula el peso correspondiente a un BMI de 30 utilizando la altura del paciente.

Tabla 9: Administración de rhASM

ES 2 738 859 T3

Dosis de rhASM (mg/kg)	Volumen total de cloruro de sodio al 0,9% para la inyección, para ser mezclado (mL)	Velocidad de infusión aproximada (mL/h)	Velocidad de infusión aproximada (mg/kg/h)	Duración de la administración (tiempo aproximado [min])
0,1	20	Etapa 1: 20 mL/h durante 20 minutos (+/- 5 min), si no IAR Etapa 2: 60 mL/h para el resto de la infusión si no IAR	Etapa 1: 0,1 mg/kg/h durante 20 minutos (+/- 5 min), si no IAR Etapa 2: 0,3 mg/kg/h para el resto de la infusión si no IAR	35
0,3	50	Etapa 1: 17 mL/h durante 20 minutos (+/- 5 min), si no IAR Etapa 2: 50 mL/h durante 20 minutos (+/- 5 min), si no IAR Etapa 3: 100 mL/h para el resto de la infusión si no IAR	Etapa 1: 0,1 mg/kg/h durante 20 minutos (+/- 5 min), si no IAR Etapa 2: 0,3 mg/kg/h durante 20 minutos (+/- 5 min), si no IAR Etapa 3: 0,6 mg/kg/h para el resto de la infusión si no IAR	60
0,6	100	Etapa 1: 17 mL/h durante 20 minutos (+/- 5 min), si no IAR Etapa 2: 50 mL/h durante 20 minutos (+/- 5 min), si no IAR Etapa 3: 100 mL/h durante 20 minutos (+/- 5 min), si no IAR Etapa 4: 167 mL/h para el resto de la infusión si no IAR	Etapa 1: 0,1 mg/kg/h durante 20 minutos (+/- 5 min), si no IAR Etapa 2: 0,3 mg/kg/h durante 20 minutos (+/- 5 min), si no IAR Etapa 3: 0,6 mg/kg/h durante 20 minutos (+/- 5 min), si no IAR Etapa 4: 1,0 mg/kg/h para el resto de la infusión si no IAR	80
1,0	100	Etapa 1: 10 mL/h durante 20 minutos (+/- 5 min), si no IAR Etapa 2: 30 mL/h durante 20 minutos (+/- 5 min), si no IAR Etapa 3: 60 mL/h durante 20 minutos (+/- 5 min), si no IAR Etapa 4: 100 mL/h para el resto de la infusión si no IAR	Etapa 1: 0,1 mg/kg/h durante 20 minutos (+/- 5 min), si no IAR Etapa 2: 0,3 mg/kg/h durante 20 minutos (+/- 5 min), si no IAR Etapa 3: 0,6 mg/kg/h durante 20 minutos (+/- 5 min), si no IAR Etapa 4: 1,0 mg/kg/h para el resto de la infusión si no IAR	100

2,0	200	<p>Etapa 1: 10 mL/h durante 20 minutos (+/- 5 min), si no IAR</p> <p>Etapa 2: 30 mL/h durante 20 minutos (+/- 5 min), si no IAR</p> <p>Etapa 3: 60 mL/h durante 20 minutos (+/- 5 min), si no IAR</p> <p>Etapa 4: 100 mL/h durante 20 min (+/- 5 min), si no IAR</p> <p>Etapa 5: 200 mL/h para el resto de la infusión si no IAR</p>	<p>Etapa 1: 0,1 mg/kg/h durante 20 minutos (+/- 5 min), si no IAR</p> <p>Etapa 2: 0,3 mg/kg/h durante 20 minutos (+/- 5 min), si no IAR</p> <p>Etapa 3: 0,6 mg/kg/h durante 20 minutos (+/- 5 min), si no IAR</p> <p>Etapa 4: 1,0 mg/kg/h durante 20 minutos (+/- 5 min), si no IAR</p> <p>Etapa 5: 2,0 mg/kg/h para el resto de la infusión si no IAR</p>	120
3,0	300	<p>Etapa 1: 10 mL/h durante 20 minutos (+/- 5 min), si no IAR</p> <p>Etapa 2: 30 mL/h durante 20 minutos (+/- 5 min), si no IAR</p> <p>Etapa 3: 60 mL/h durante 20 minutos (+/- 5 min), si no IAR</p> <p>Etapa 4: 100 mL/h durante 20 min (+/- 5 min), si no IAR</p> <p>Etapa 5: 200 mL/h durante 20 min (+/- 5 min), si no IAR</p> <p>Etapa 6: 300 mL/h para el resto de la infusión si no IAR</p>	<p>Etapa 1: 0,1 mg/kg/h durante 20 minutos (+/- 5 min), si no IAR</p> <p>Etapa 2: 0,3 mg/kg/h durante 20 minutos (+/- 5 min), si no IAR</p> <p>Etapa 3: 0,6 mg/kg/h durante 20 minutos (+/- 5 min), si no IAR</p> <p>Etapa 4: 1,0 mg/kg/h durante 20 minutos (+/- 5 min), si no IAR</p> <p>Etapa 5: 2,0 mg/kg/h durante 20 minutos (+/- 5 min), si no IAR</p> <p>Etapa 6: 3,0 mg/kg/h para el resto de la infusión si no IAR</p>	135

h = hora; IAR = reacción asociada a la infusión; min = minutos

- 5 Los puntos finales clínicos pueden medirse como el porcentaje (%) de cambio desde el inicio en los volúmenes de bazo múltiples de lo normal (medido por imágenes de resonancia magnética) después de 26 semanas de recibir la dosis máxima tolerada o aleatoria de rhASM. Los criterios de valoración secundarios de la eficacia incluyen el volumen hepático (medido por MRI); imágenes pulmonares (mediante tomografía computarizada de alta resolución y radiografía de tórax; pruebas de función pulmonar, incluyendo el porcentaje predicho de la capacidad de difusión del monóxido de carbono, el porcentaje predicho de la capacidad vital forzada, el volumen respiratorio forzado en 1 segundo y la capacidad pulmonar total; la capacidad de ejercicio por cicloergometría, incluyendo el porcentaje de carga de trabajo máxima predicha, el consumo máximo de oxígeno y la producción de dióxido de carbono; la evaluación global del cambio por parte del médico; biomarcadores de eficacia tal como la quitotriosidasa sérica, CCL 18 y ACE; y los parámetros hematológicos tales como el recuento de plaquetas, el nivel de hemoglobina. Las evaluaciones de la eficacia también pueden incluir lípidos en ayunas, estudios de coagulación, biomarcadores relacionados con la enfermedad, medidas de resultados de salud y fotografías de pacientes.
- 10
- 15 Las evaluaciones de seguridad se pueden realizar antes, durante y/o después de la administración de la dosis. Las evaluaciones de seguridad que se pueden realizar incluyen: un examen físico con evaluación neurológica, signos vitales (por ejemplo, presión arterial sistólica y diastólica, temperatura, frecuencia cardíaca, frecuencia respiratoria y saturación de oxígeno), ECG, CHO con dopler, química de la sangre (por ejemplo, sodio, potasio, calcio, cloruro, nitrógeno de urea en sangre, creatinina, ácido úrico, ALT, aspartato aminotransferasa, bilirrubina total, lactato deshidrogenasa, fosfato alcalino, proteínas totales, albúmina, glucosa, colesterol, etc.), hematología (por ejemplo, recuento de sangre total), análisis de orina, análisis de biomarcadores para biomarcadores relacionados con el
- 20

5 cáncer, hormonas, citoquinas (por ejemplo, IL-8 y IL-6), riesgo cardiovascular, reactantes de fase aguda y otros procesos celulares, concentración sérica de IgG de anti-rhASM, concentración sérica de IgE de anti-rhASM, actividad de la triptasa sérica, y pruebas cutáneas de hipersensibilidad. Además, las evaluaciones farmacocinéticas y farmacodinámicas se pueden realizar antes, durante y/o después de la administración de la dosis. Por ejemplo, los niveles de esfingomielina pueden evaluarse en el hígado y la piel mediante biopsia, y en el plasma y DBS mediante espectrometría de masas en tándem.

10 La invención no está limitada en su alcance por las realizaciones específicas descritas en la presente memoria. De hecho, diversas modificaciones de la invención, además de las descritas, serán evidentes para los expertos en la técnica a partir de la descripción anterior y las figuras adjuntas. Tales modificaciones están destinadas a caer dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

LISTADO DE SECUENCIAS

- 5 <110> SCHUCHMAN, Edward H.
 DESNICK, Robert J.
 COX, Gerald F.
 ANDREWS, Laura P.
 MURRAY, James M.
- 10 <120> TERAPIA DE SUSTITUCIÓN DE LA ENZIMA DE AUMENTO DE LA DOSIS PARA EL TRATAMIENTO DE LA DEFICIENCIA DE ESFINGOMIELINASA ÁCIDA
- <130> 6923-159-999
- <140>
 <141>
- 15 <150> 61/238,113
 <151> 28-08-2009
- <160> 3
- 20 <170> FastSEQ para Windows Versión 4.0
- <210> 1
 <211> 629
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
- 25 <220>
 <223> isoforma 1 de la ASM humana (ASM-1), número de acceso de UniProtKB/Swiss-Prot No. P17405-1
- 30 <400> 1
 Met Pro Arg Tyr Gly Ala Ser Leu Arg Gln Ser Cys Pro Arg Ser Gly
 1 5 10 15
 Arg Glu Gln Gly Gln Asp Gly Thr Ala Gly Ala Pro Gly Leu Leu Trp
 20 25 30
 Met Gly Leu Val Leu Ala Leu Ala Leu Ala Leu Ala Leu Ala Leu Ser
 35 40 45
 Asp Ser Arg Val Leu Trp Ala Pro Ala Glu Ala His Pro Leu Ser Pro
 50 55 60
 Gln Gly His Pro Ala Arg Leu His Arg Ile Val Pro Arg Leu Arg Asp
 65 70 75 80
 Val Phe Gly Trp Gly Asn Leu Thr Cys Pro Ile Cys Lys Gly Leu Phe
 85 90 95
 Thr Ala Ile Asn Leu Gly Leu Lys Lys Glu Pro Asn Val Ala Arg Val
 100 105 110
 Gly Ser Val Ala Ile Lys Leu Cys Asn Leu Leu Lys Ile Ala Pro Pro
 115 120 125
 Ala Val Cys Gln Ser Ile Val His Leu Phe Glu Asp Asp Met Val Glu
 130 135 140
 Val Trp Arg Arg Ser Val Leu Ser Pro Ser Glu Ala Cys Gly Leu Leu
 145 150 155 160
 Leu Gly Ser Thr Cys Gly His Trp Asp Ile Phe Ser Ser Trp Asn Ile
 165 170 175
 Ser Leu Pro Thr Val Pro Lys Pro Pro Pro Lys Pro Pro Ser Pro Pro
 180 185 190
 Ala Pro Gly Ala Pro Val Ser Arg Ile Leu Phe Leu Thr Asp Leu His
 195 200 205
 Trp Asp His Asp Tyr Leu Glu Gly Thr Asp Pro Asp Cys Ala Asp Pro
 210 215 220
 Leu Cys Cys Arg Arg Gly Ser Gly Leu Pro Pro Ala Ser Arg Pro Gly
 225 230 235 240
 Ala Gly Tyr Trp Gly Glu Tyr Ser Lys Cys Asp Leu Pro Leu Arg Thr

```

                245                250                255
Leu Glu Ser Leu Leu Ser Gly Leu Gly Pro Ala Gly Pro Phe Asp Met
                260                265                270
Val Tyr Trp Thr Gly Asp Ile Pro Ala His Asp Val Trp His Gln Thr
                275                280                285
Arg Gln Asp Gln Leu Arg Ala Leu Thr Thr Val Thr Ala Leu Val Arg
                290                295                300
Lys Phe Leu Gly Pro Val Pro Val Tyr Pro Ala Val Gly Asn His Glu
305                310                315
Ser Thr Pro Val Asn Ser Phe Pro Pro Pro Phe Ile Glu Gly Asn His
                325                330                335
Ser Ser Arg Trp Leu Tyr Glu Ala Met Ala Lys Ala Trp Glu Pro Trp
                340                345                350
Leu Pro Ala Glu Ala Leu Arg Thr Leu Arg Ile Gly Gly Phe Tyr Ala
                355                360                365
Leu Ser Pro Tyr Pro Gly Leu Arg Leu Ile Ser Leu Asn Met Asn Phe
                370                375                380
Cys Ser Arg Glu Asn Phe Trp Leu Leu Ile Asn Ser Thr Asp Pro Ala
385                390                395
Gly Gln Leu Gln Trp Leu Val Gly Glu Leu Gln Ala Ala Glu Asp Arg
                405                410                415
Gly Asp Lys Val His Ile Ile Gly His Ile Pro Pro Gly His Cys Leu
                420                425                430
Lys Ser Trp Ser Trp Asn Tyr Tyr Arg Ile Val Ala Arg Tyr Glu Asn
                435                440                445
Thr Leu Ala Ala Gln Phe Phe Gly His Thr His Val Asp Glu Phe Glu
                450                455                460
Val Phe Tyr Asp Glu Glu Thr Leu Ser Arg Pro Leu Ala Val Ala Phe
465                470                475
Leu Ala Pro Ser Ala Thr Thr Tyr Ile Gly Leu Asn Pro Gly Tyr Arg
                485                490                495
Val Tyr Gln Ile Asp Gly Asn Tyr Ser Gly Ser Ser His Val Val Leu
                500                505                510
Asp His Glu Thr Tyr Ile Leu Asn Leu Thr Gln Ala Asn Ile Pro Gly
                515                520                525
Ala Ile Pro His Trp Gln Leu Leu Tyr Arg Ala Arg Glu Thr Tyr Gly
                530                535                540
Leu Pro Asn Thr Leu Pro Thr Ala Trp His Asn Leu Val Tyr Arg Met
545                550                555
Arg Gly Asp Met Gln Leu Phe Gln Thr Phe Trp Phe Leu Tyr His Lys
                565                570                575
Gly His Pro Pro Ser Glu Pro Cys Gly Thr Pro Cys Arg Leu Ala Thr
                580                585                590
Leu Cys Ala Gln Leu Ser Ala Arg Ala Asp Ser Pro Ala Leu Cys Arg
                595                600                605
His Leu Met Pro Asp Gly Ser Leu Pro Glu Ala Gln Ser Leu Trp Pro
                610                615                620
Arg Pro Leu Phe Cys
625

```

<210> 2

<211> 12

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

10 <223> residuos de aminoácidos 363 a 374 de ASM-1

<400> 2

Ile Gly Gly Phe Tyr Ala Leu Ser Pro Tyr Pro Gly

1

5

10

<210> 3

15 <211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

20 <223> residuos de aminoácidos 363 a 374 de ASM-2 (véase numero de acceso de UniProtKB/Swiss-Prot. P17405-2)

<400> 3
Tyr Leu Ser Ser Val Glu Thr Gln Glu Gly Lys Arg
1 5 10

5

REIVINDICACIONES

1. Una esfingomielinasa ácida (ASM) para su uso en un método para tratar una deficiencia de esfingomielinasa ácida en un sujeto humano, en donde el método comprende administrar ASM:
- (a) en un régimen para reducir un sustrato de esfingomielina acumulado que comprende:
- 5 (i) administrar una dosis inicial baja no tóxica de ASM, en donde dicho intervalo de dosis inicial es de 0,05 mg/kg a 0,275 mg/kg de ASM;
- (ii) administrar dosis más altas sucesivamente de ASM, y controlar el sujeto para uno o más efectos secundarios adversos después de cada dosis sucesiva como se indica por la alta concentración de bilirrubina total, alta concentración de ceramida plasmática, alta concentración de proteína C reactiva plasmática (CRP), o un suceso
- 10 adverso que tiene una relación casual con el tratamiento, en donde dicha dosis sucesivamente más alta es de 0,1 a 1,0 mg/kg más alta que la dosis anterior o de 0,1 a 0,5 mg/kg más alta que la dosis anterior; y
- (b) en un régimen de mantenimiento que comprende administrar una dosis igual o menor que la dosis más alta tolerada por el sujeto como la dosis de mantenimiento para el sujeto, en donde dicha dosis más alta tolerada por el sujeto humano es de 1 mg/kg a 3 mg/kg.
- 15 2. La ASM para su uso en la reivindicación 1, en donde dicha ASM es una ASM humana recombinante (rhASM).
3. La ASM para su uso en la reivindicación 2, en donde dicha dosis inicial es 0,1 mg/kg de rhASM.
4. La ASM para su uso en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde dichas dosis más altas sucesivamente se administran una, dos, tres o cuatro semanas después de la dosis anterior.
- 20 5. La ASM para su uso en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde dicha dosis más alta tolerada se administra al sujeto humano como la dosis de mantenimiento.
6. La ASM para su uso en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde dicha dosis de mantenimiento es una dosis terapéuticamente eficaz menor que la dosis más alta tolerada.
7. La ASM para su uso en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde el método comprende además controlar al sujeto durante el régimen de mantenimiento para uno o más efectos secundarios adversos como se indica por la alta bilirrubina o un suceso adverso que tiene una relación casual con el tratamiento; y ajustar la dosis de mantenimiento.
- 25 8. La ASM para su uso en una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7, en donde dicha dosis de mantenimiento se administra al sujeto cada dos a cuatro semanas.
- 30 9. La ASM para su uso en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde dicha concentración alta de bilirrubina total es una concentración de bilirrubina total mayor de 1,5 mg/dL que dura durante más de 16 horas, 18 horas, 24 horas, 36 horas, 48 horas o 72 horas, 5 días, una semana, dos semanas o tres semanas después de la administración de la dosis de ASM; dicha concentración alta de ceramida plasmática es una concentración de ceramida plasmática mayor de 10 µg/mL 6 horas, 8 horas, 12 horas, 16 horas, 18 horas, 24 horas, 36 horas, 48
- 35 horas o 72 horas después de la administración de la dosis de ASM; o dicha concentración alta de CRP plasmática es una concentración de CRP plasmática mayor de 12 mg/L 6 horas, 8 horas, 12 horas, 16 horas, 18 horas, 24 horas, 36 horas, 48 horas o 72 horas después de la administración de la dosis de ASM.
10. Una esfingomielinasa ácida (ASM) para su uso en un método para tratar una deficiencia de esfingomielinasa ácida en un sujeto humano, en donde el método comprende administrar ASM en un régimen de escalado de dosis a las siguientes dosis secuenciales:
- 40 (a) 0,1 mg/kg,
- (b) 0,3 mg/kg, y
- (c) 0,6 mg/kg,
- en donde cada dosis se administra al menos dos veces, y cada dosis se administra con un intervalo de dos
- 45 semanas, y en donde el sujeto se controla para los efectos secundarios tóxicos antes de aumentar la dosis al siguiente nivel.
11. La ASM para su uso en la reivindicación 10, en donde dicha ASM es una ASM humana recombinante (rhASM).

12. La ASM para su uso en la reivindicación 10 o 11, en donde el método comprende además una dosis secuencial de 1 mg/kg de rhASM en el régimen de escalado de dosis.
13. La ASM para su uso en la reivindicación 12, en donde el método comprende además una dosis secuencial de 2 mg/kg de rhASM en el régimen de escalado de dosis.
- 5 14. La ASM para su uso en la reivindicación 13, en donde el método comprende además una dosis secuencial de 3 mg/kg de rhASM en el régimen de escalado de dosis.
15. La ASM para su uso en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en donde dichas dosis se administran por vía intravenosa, intradérmica, subcutánea o intramuscular.
- 10 16. La ASM para su uso en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, en donde dicha deficiencia de esfingomielinasa ácida es la enfermedad de Niemann Pick (NPD) de tipo A, o NPD de tipo B.
17. La ASM para su uso en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, en donde dicho sujeto humano tiene una mutación sin sentido en el gen que codifica la esfingomielinasa ácida, o el sujeto humano tiene una mutación en el gen que codifica la esfingomielinasa ácida y la mutación es $\Delta R608$.
- 15 18. La ASM para su uso en la reivindicación 17, en donde dicha mutación sin sentido es L302P, H421Y o R496L.

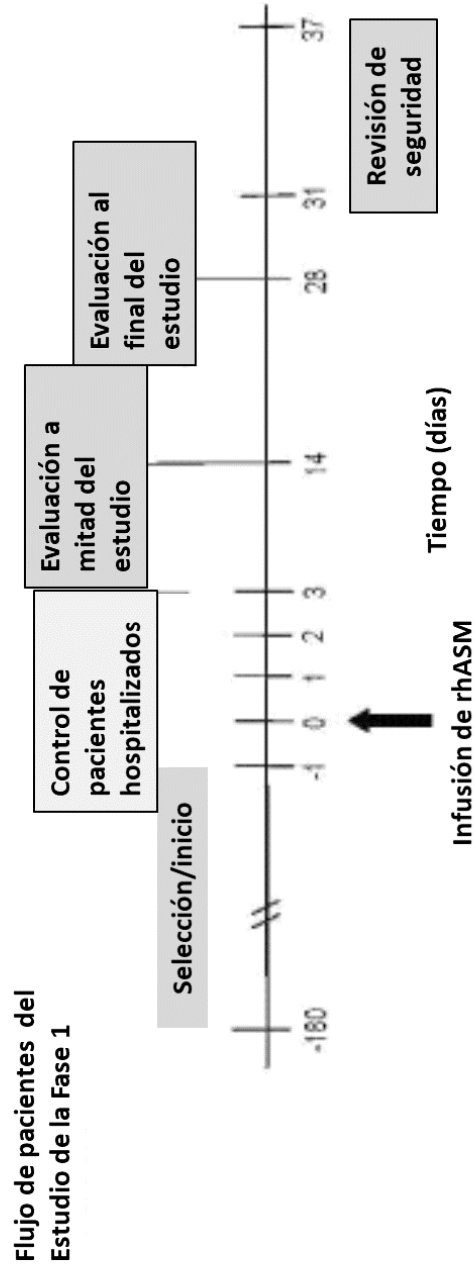


Fig. 1

Características de demografía e inicio

Número de cohorte	Dosis (mg/kg)	No. Paciente	Edad de infusión (años)	Sexo	Edad al inicio del síntoma (años)	Edad en el diagnóstico (años)	Volúmen del bazo (X norm)	Actividad de ASM (% norm)
1	0.03	10202	23	H	22	22	12.5	14
		10401	21	M	0.5	8.1	15.1	25
		10503	19	M	5.9	5.9	16.1	15
2	0.1	10304	45	H	38.7	38.7	4.8	14
		10605	26	H	2.9	3.3	12.8	17
		10906	41	H	9.6	9.6	8.7	29
3	0.3	10807	24	M	1.0	3.0	9.5	18
		11509	54	H	53.3	53.3	6.1	24
4	0.6	12010	18	M	Desconocido	13.9	8.7	12
		12313	18	M	1.4	3.0	10.1	6
5	1.0	12112	46	M	3.5	3.5	14.5	6

Fig. 2

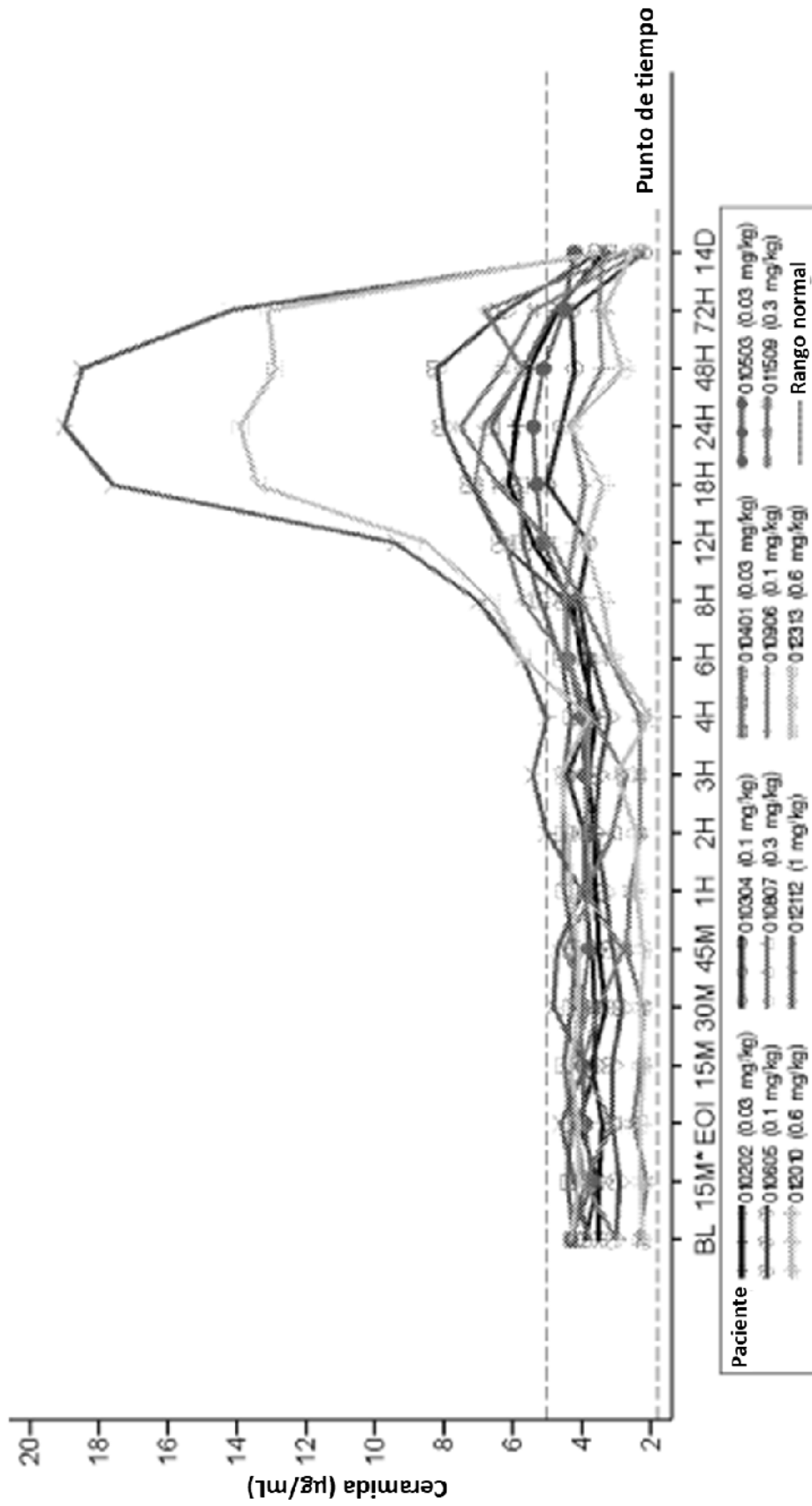


Fig. 3A

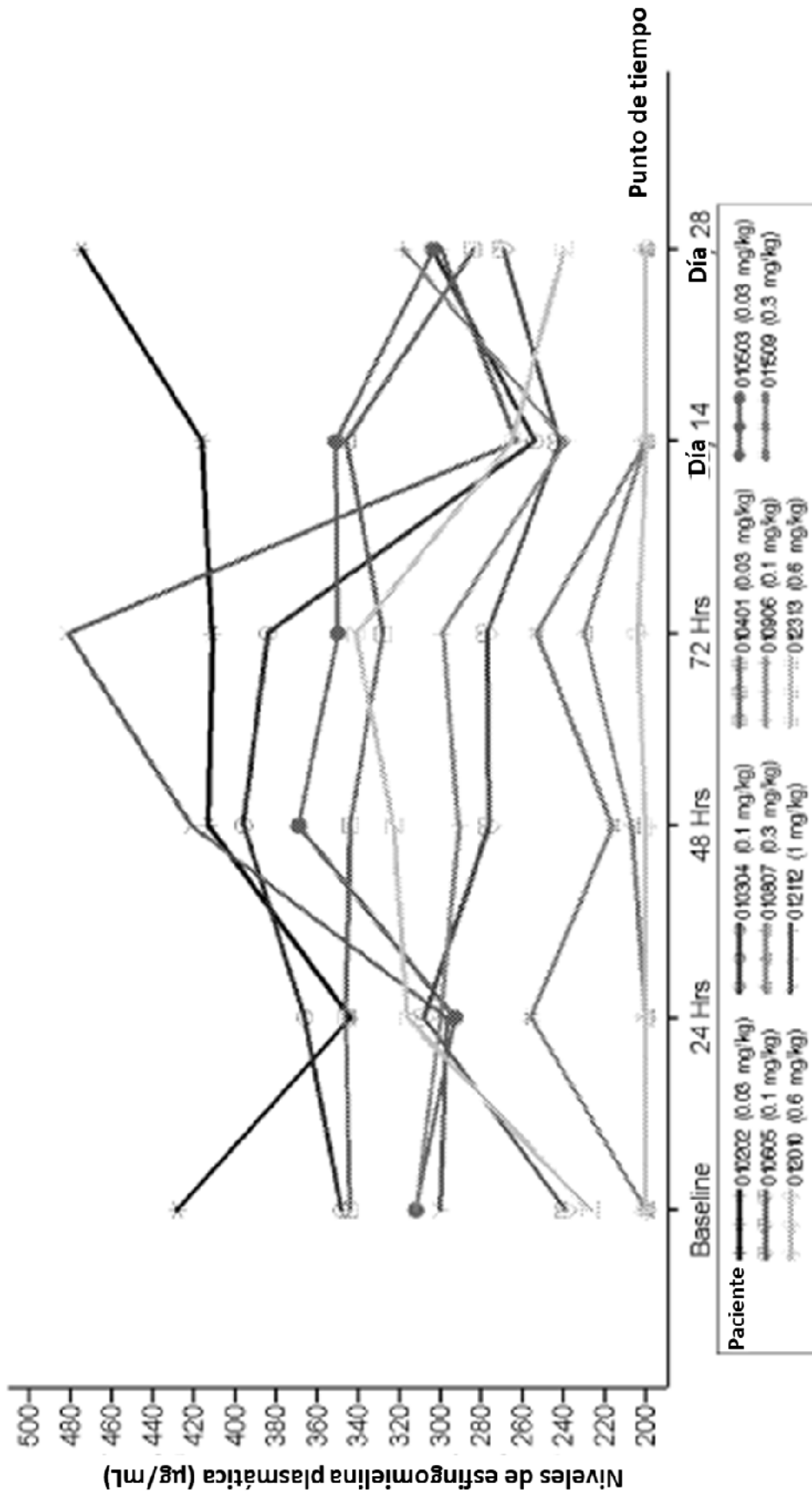


Fig. 3B

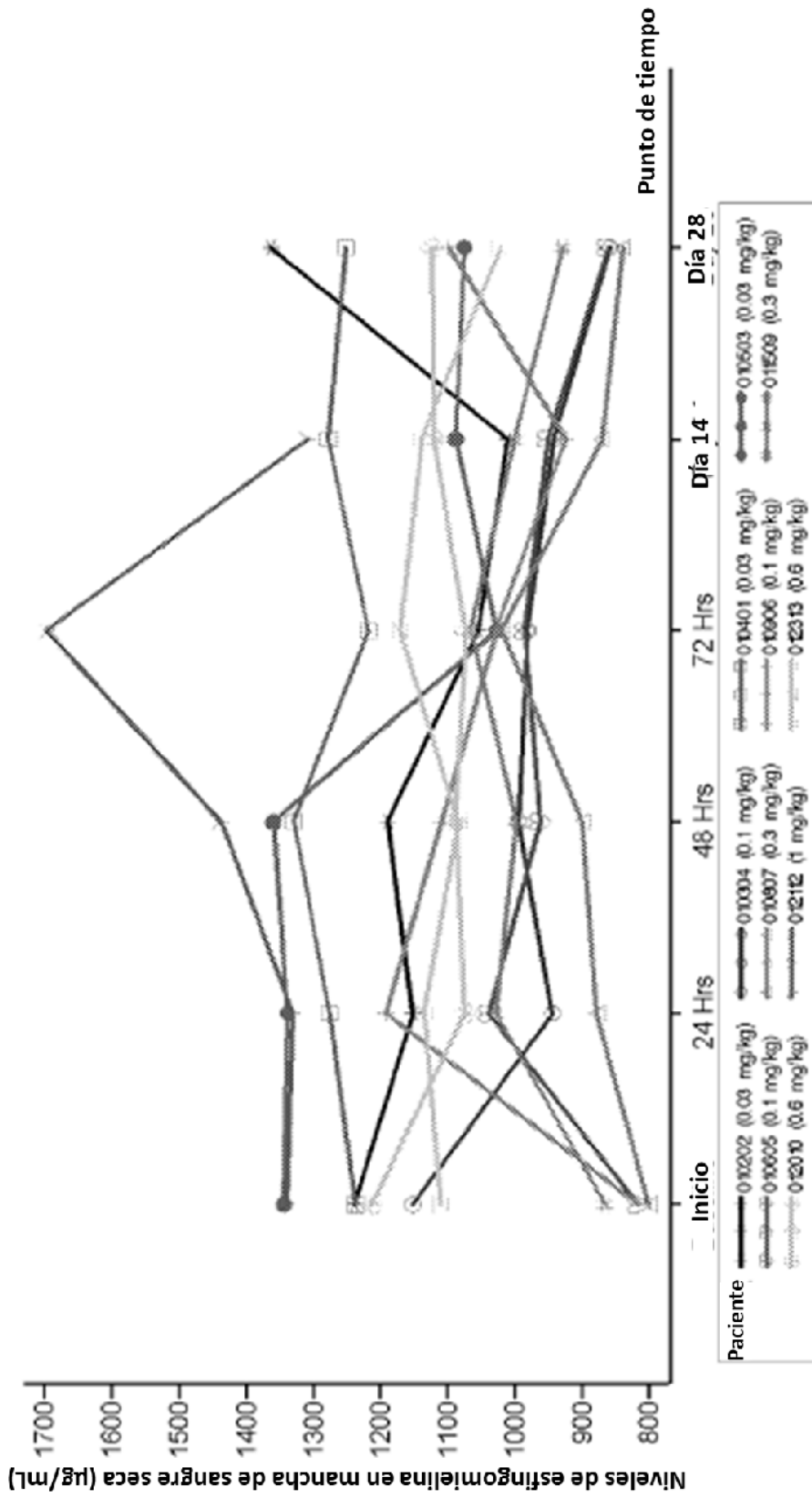


Fig. 3C

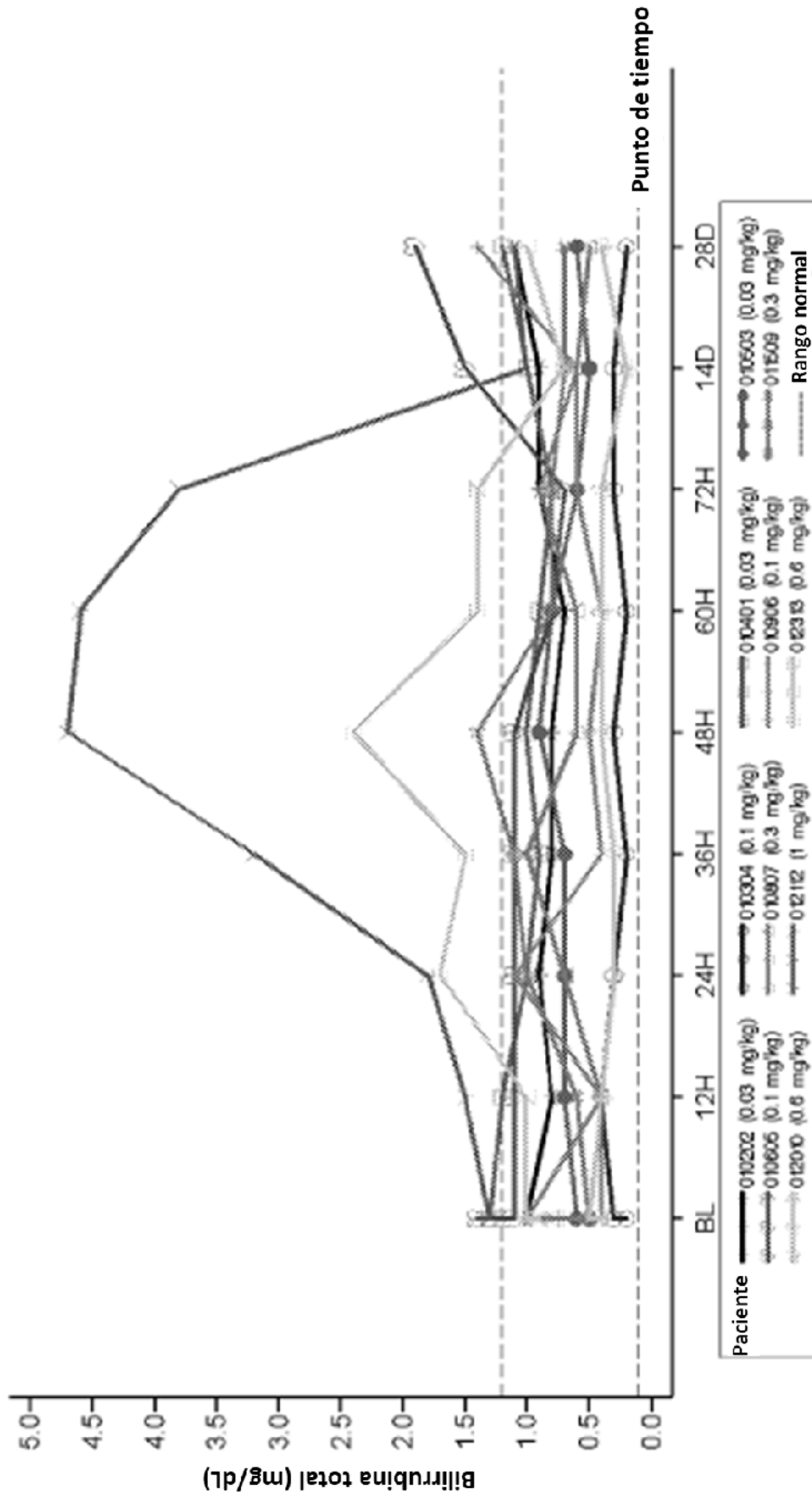


Fig. 4

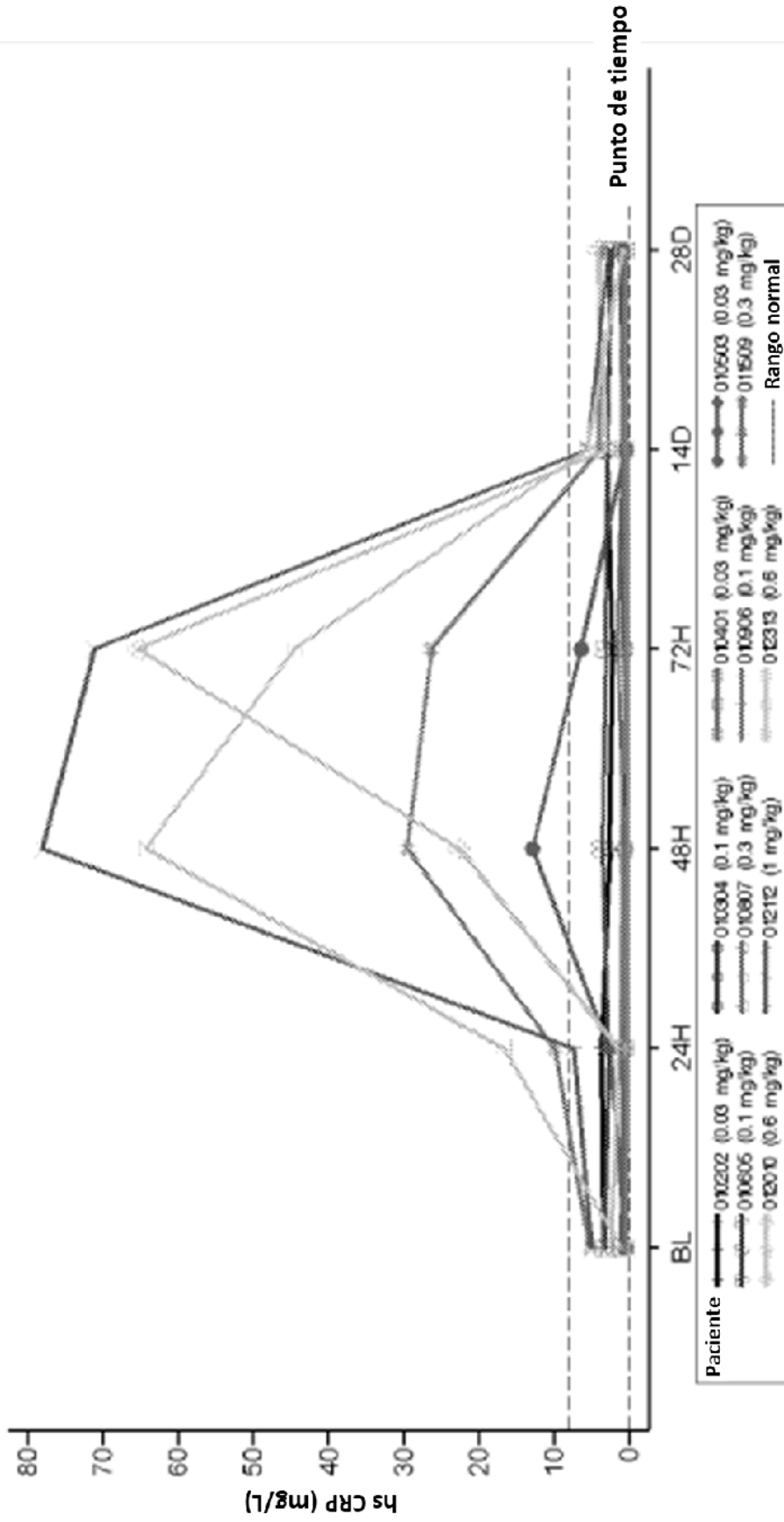


Fig. 5A

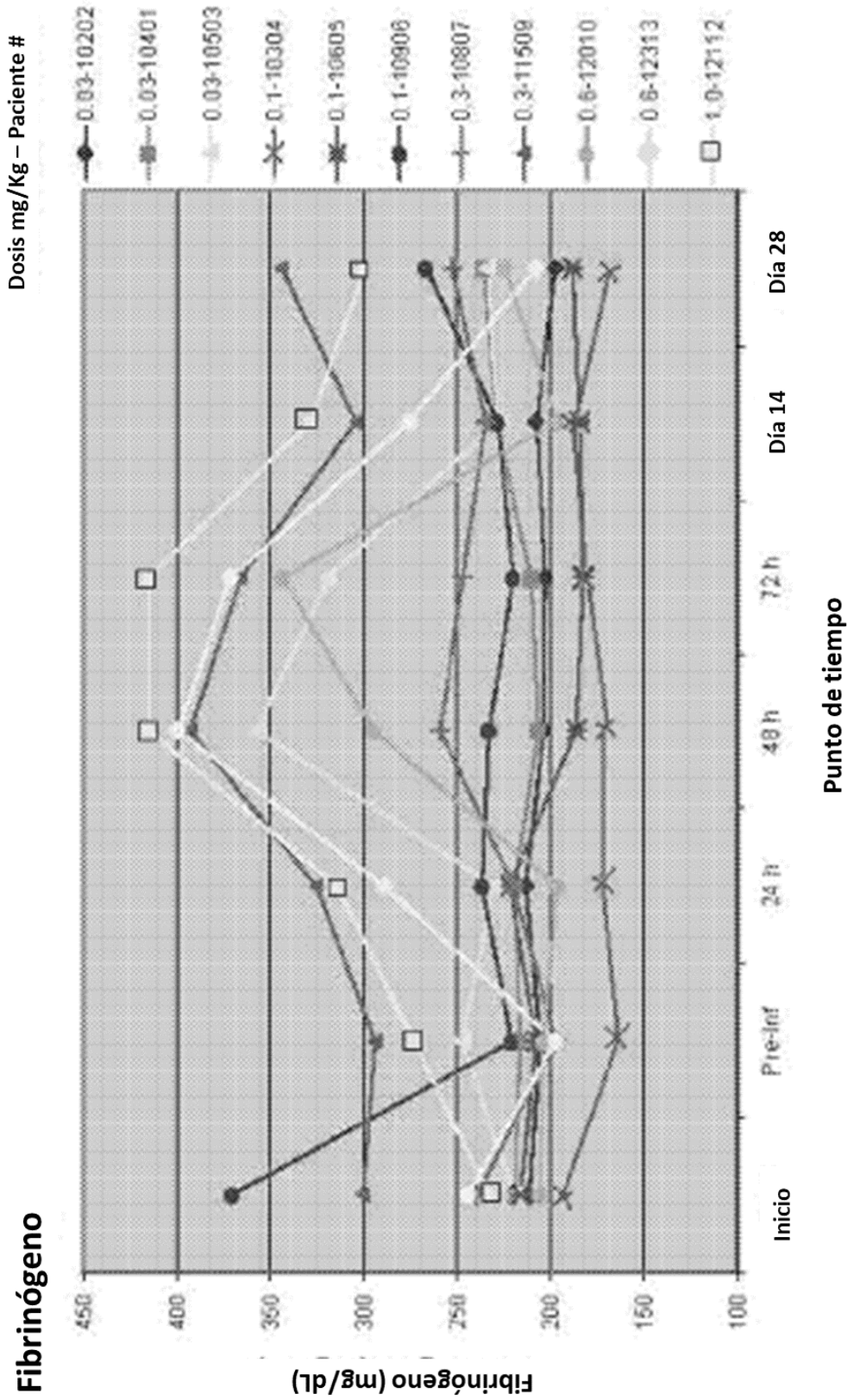


Fig. 5B

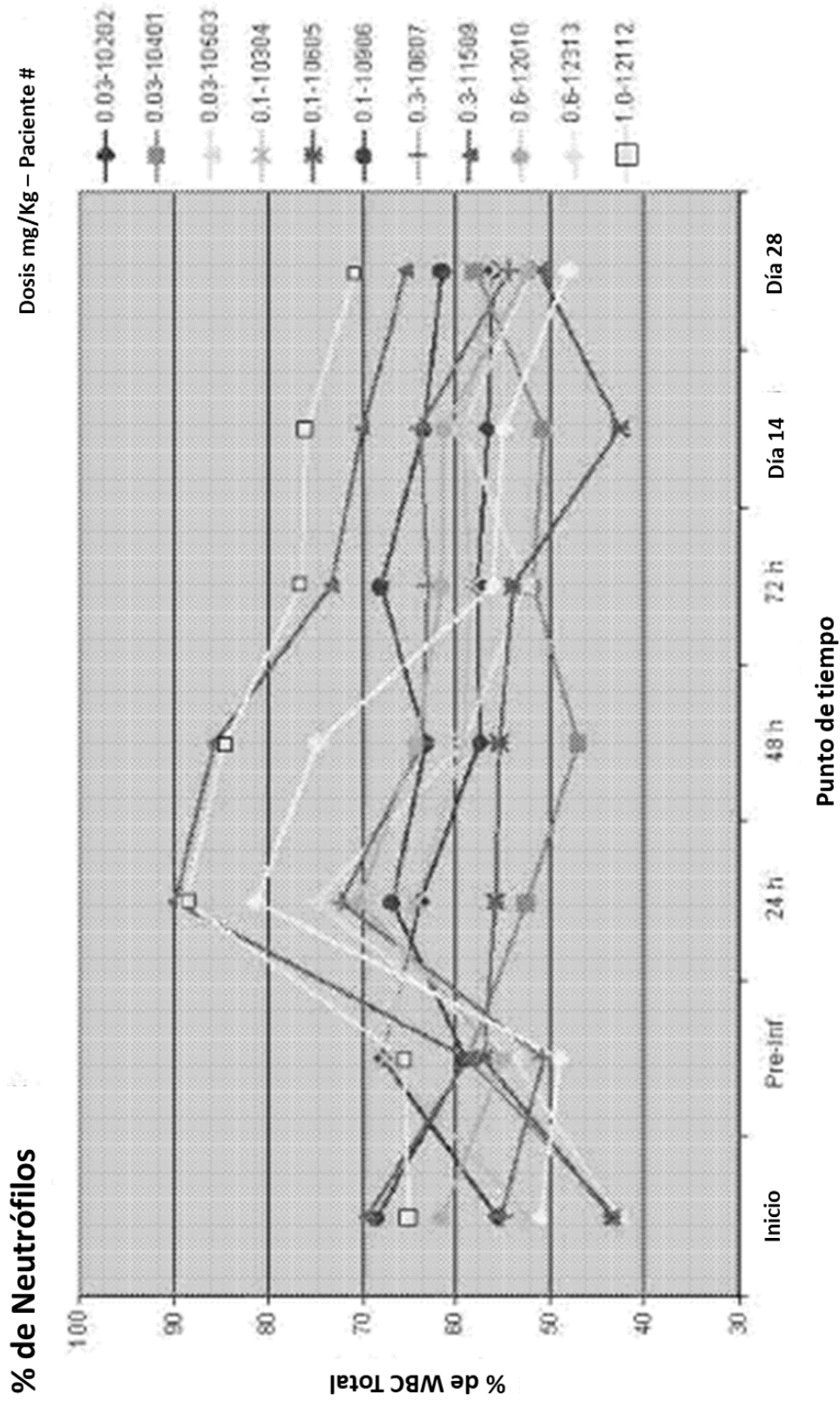


Fig. 5C

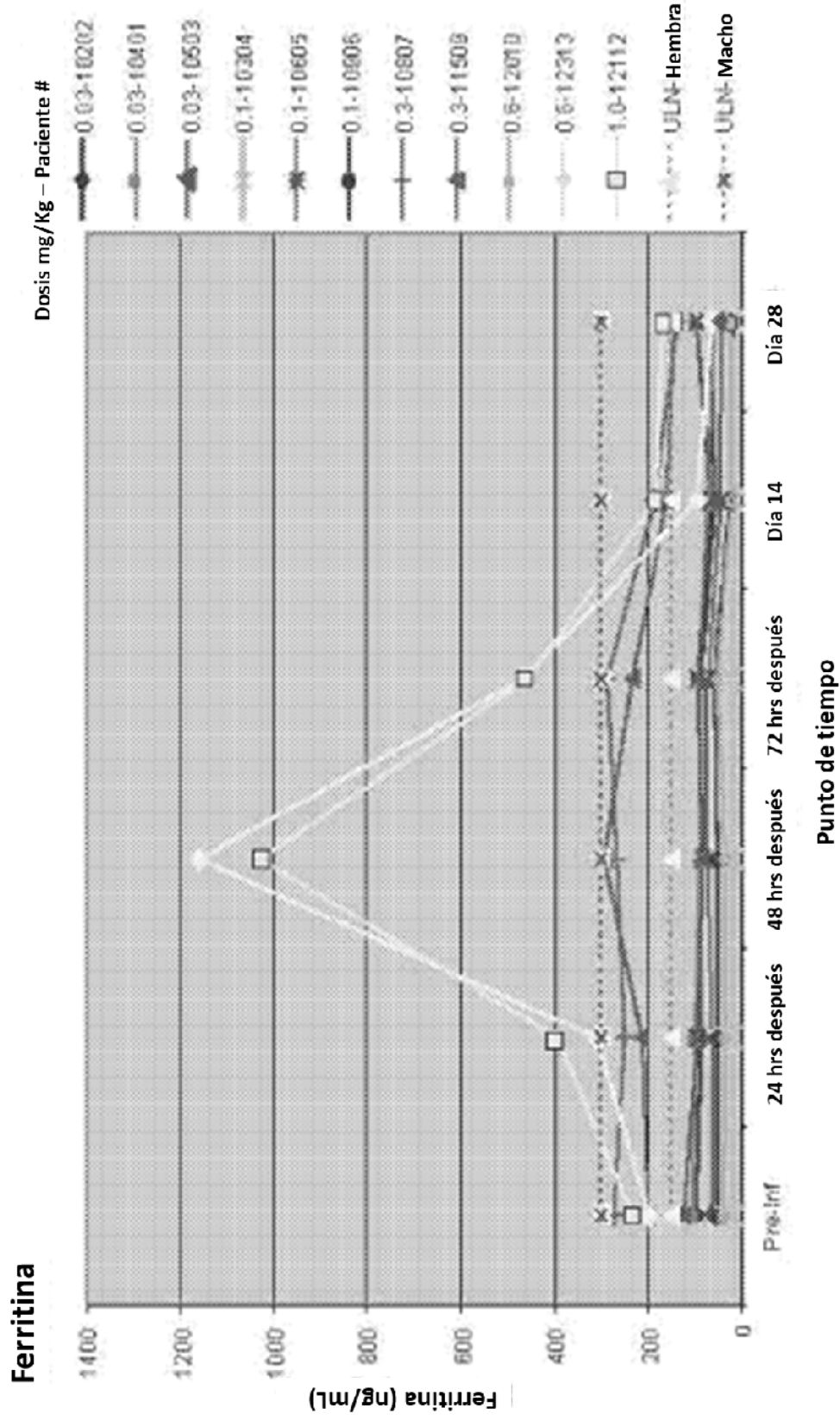


Fig. 5D

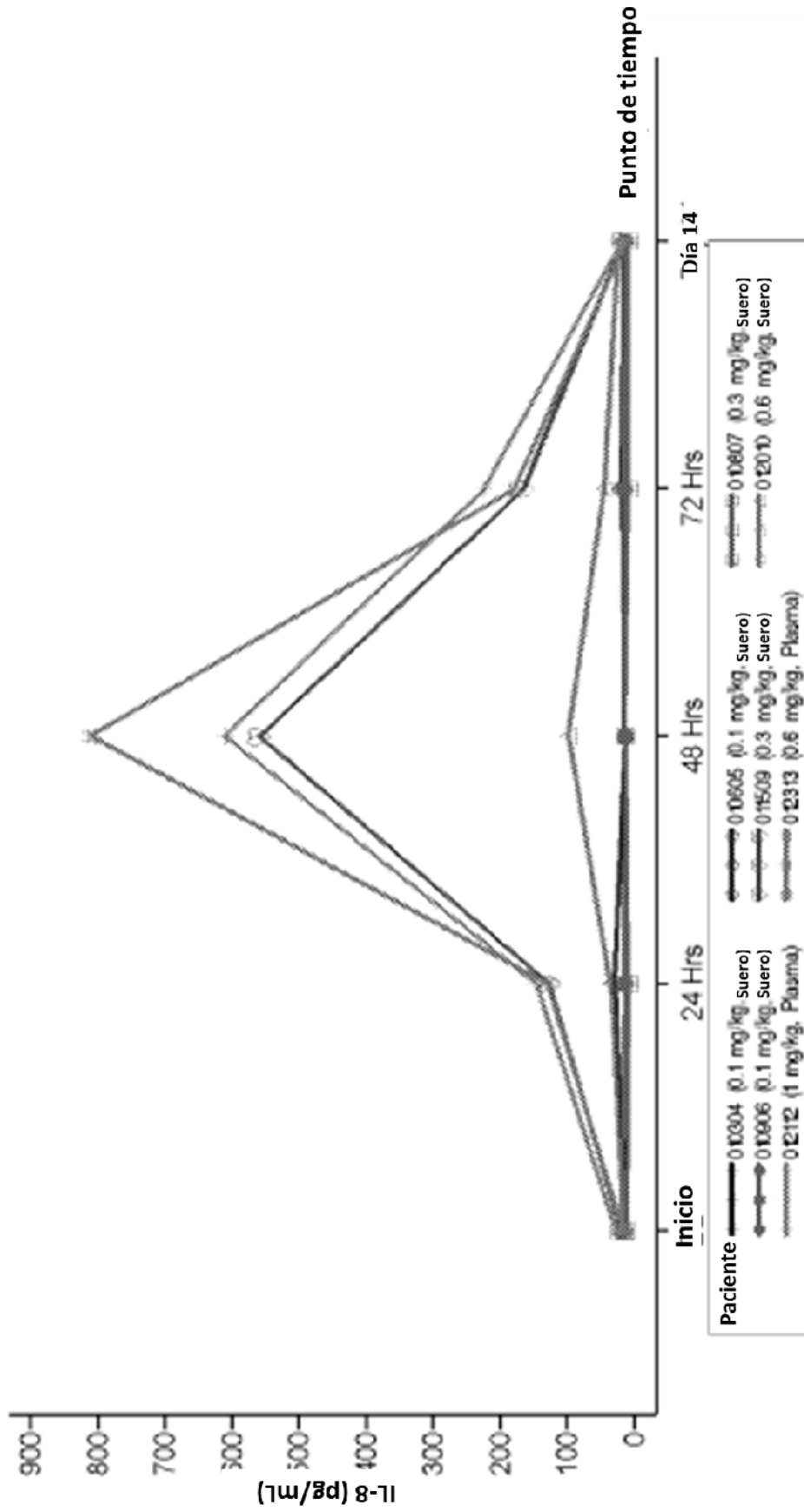


Fig. 5E

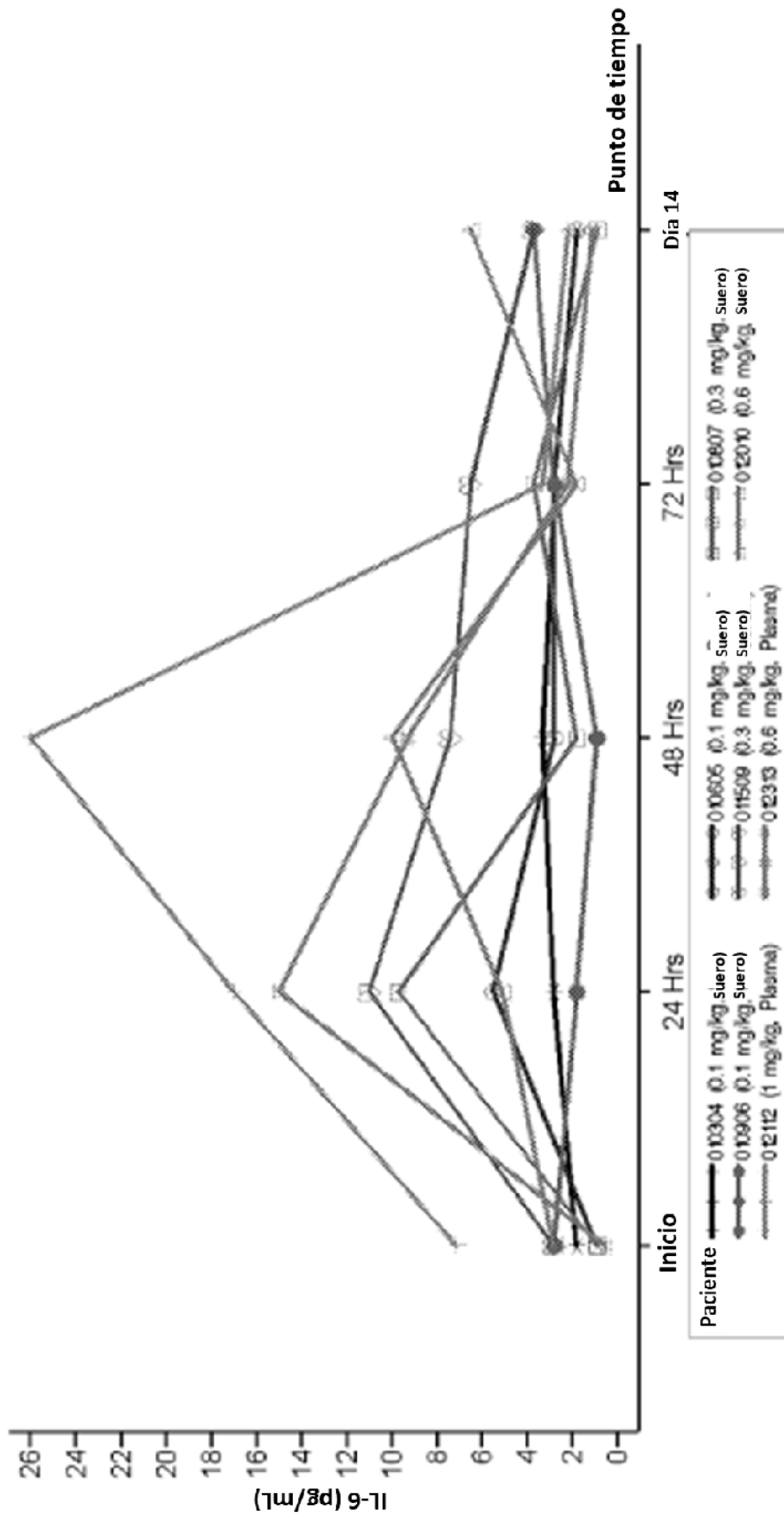


Fig. 5F

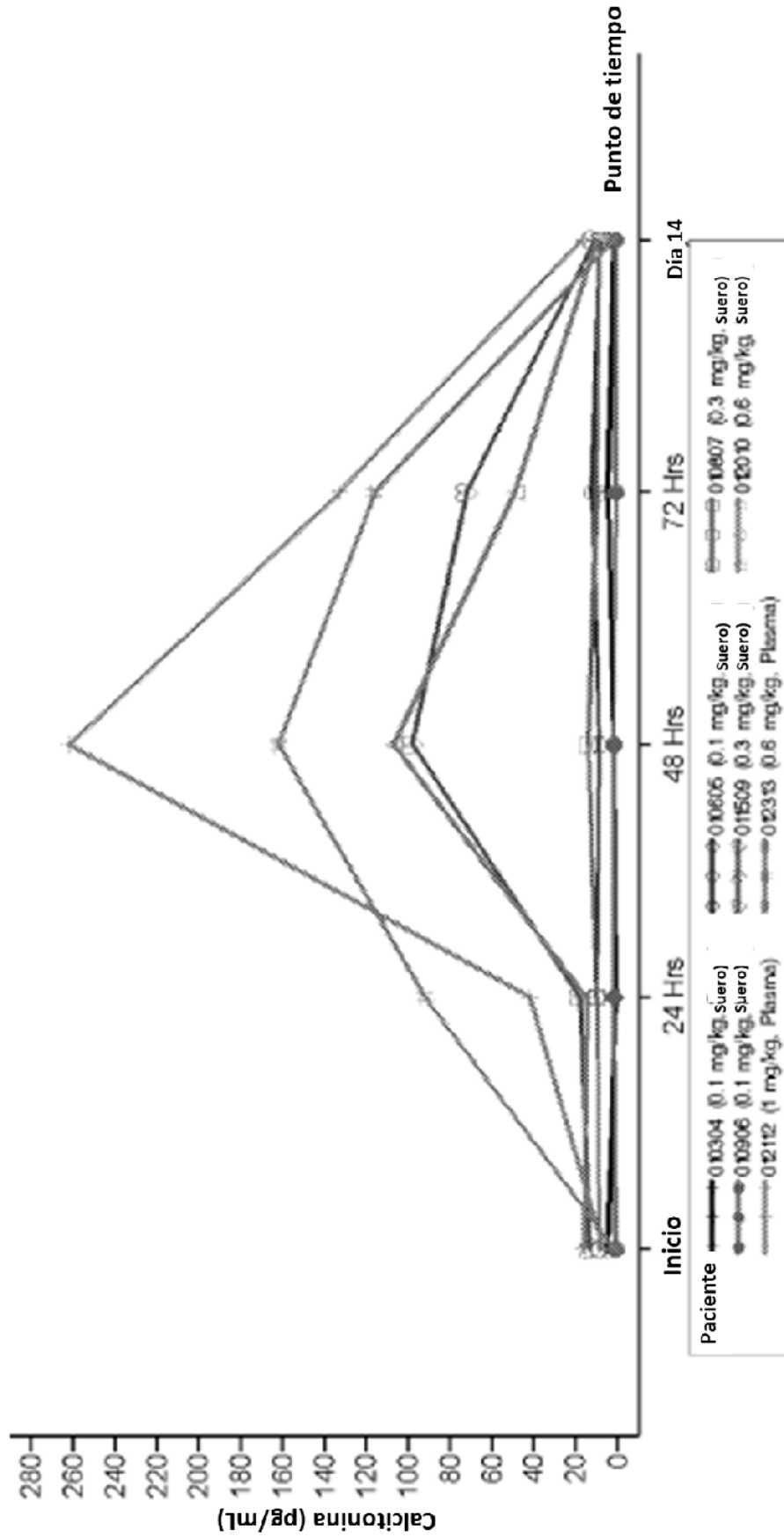


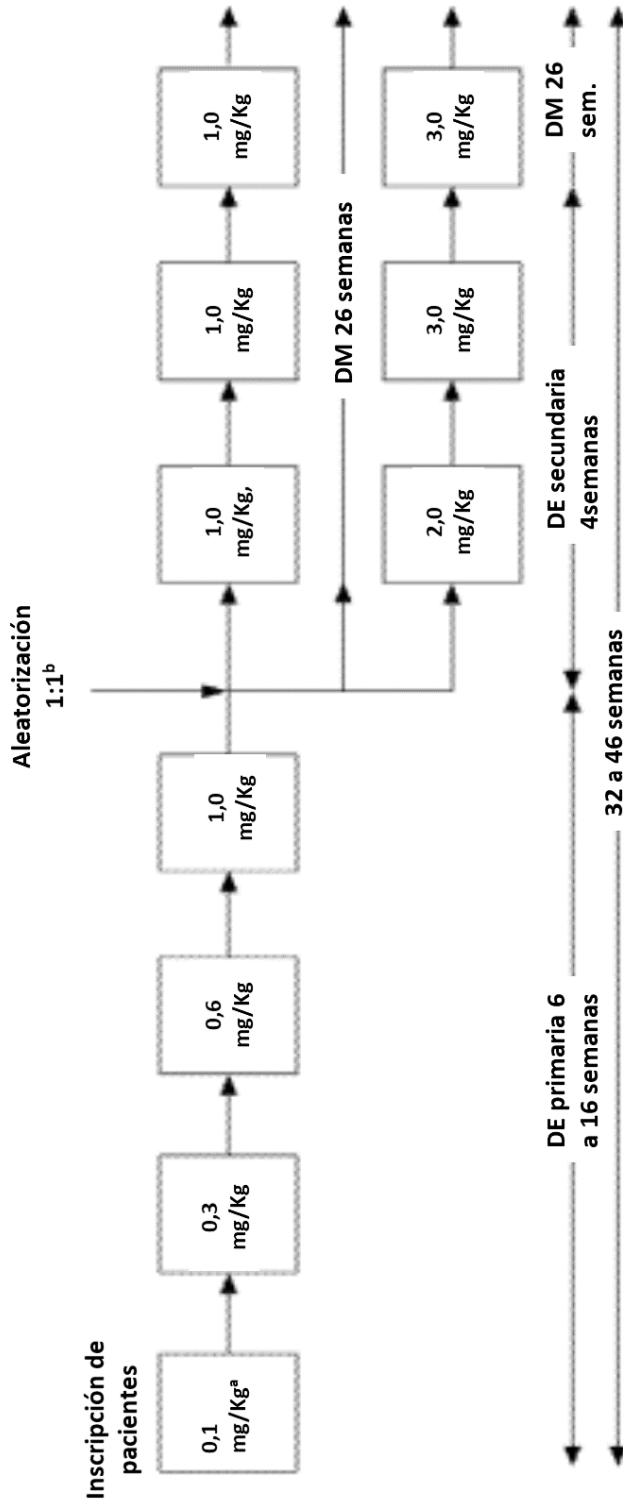
Fig. 5G

Sucesos adversos emergentes del tratamiento considerados relacionados (posiblemente, probablemente, o definitivamente) con el tratamiento

Dosis (mg/kg)	No. Paciente	Suceso adverso	Día° de inicio	Gravedad	Acción tomada
0.3	11509	Fiebre	2	Moderada	Ninguna
		Mialgia	2	Moderada	Ninguna
		Náusea	2	Moderada	Ninguna
		Reacción de fase aguda	2	Moderada	Ninguna
		Dolor de piernas	1	Moderada	Ninguna
		Dolor abdominal	2	Leve	Ninguna
0.6	12010	Dolor de cadera	2	Moderada	Ninguna
		Reacción de fase aguda	3	Moderada	Ninguna
		Reacción de fase aguda	2	Moderada	Ninguna
		Bilirrubina alta	2	Moderada	Ninguna
		Infiltrado linfocítico/degeneración hepatocelular (biopsia del hígado)	14	Moderada	Ninguna
		Náuseas/Vómitos	1	Moderada	Medicación
1.0	12112	Bilirrubina alta	3	Grave	Ninguna
		Fiebre	2	Moderada	Medicación
		Fatiga	2	Moderada	Ninguna
		Reacción de fase aguda	2	Moderada	Ninguna
		Urobilinógeno en orina	3	Moderada	Ninguna
		Ictericia esclerótica	3	Moderada	Ninguna
Fibrinógeno en D-dímero aumentado	2	Moderada	Ninguna		

Fig. 6

Período de tratamiento primario – fases de escalado de la dosis y mantenimiento de la dosis



^a Si las 2 primeras dosis no se toleran, el paciente puede suspenderse y reemplazarse

^b Estratificado por el tamaño del bazo (< 12 y ≥ 12 MN)

Nota: Cada dosificación 2 semanas (± 5 días). La Figura no incluye las dosis de re-desafío.

DE = Escalado de la dosis; DM = Mantenimiento de Dosis; MN = Múltiplos de normal; sem = semanas

Fig. 7