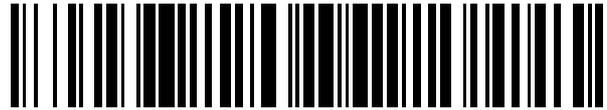


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 762 608**

51 Int. Cl.:

G01N 33/92 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.06.2014 PCT/US2014/041405**

87 Fecha y número de publicación internacional: **11.12.2014 WO14197859**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.06.2014 E 14735056 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.09.2019 EP 3004896**

54 Título: **Marcador para trastornos de esfingomielinasa ácida y usos del mismo**

30 Prioridad:

07.06.2013 US 201361832302 P

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

25.05.2020

73 Titular/es:

**GENZYME CORPORATION (100.0%)
50 Binney Street
Cambridge, MA 02142, US**

72 Inventor/es:

**CHUANG, WEI-LIEN;
COX, GERALD, F. y
ZHANG, X., KATE**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 762 608 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

Marcador para trastornos de esfingomielinasa ácida y usos del mismo

La presente solicitud reivindica el beneficio de prioridad bajo la sección 119 del título 35 del U.S.C. de la solicitud provisional de EE. UU. Nº 61/832.302, presentada el 7 de junio de 2013.

- 5 La presente divulgación se refiere a métodos de cribado, diagnóstico, monitorización y/o tratamiento de deficiencia de esfingomielinasa ácida (ASMD), tal como enfermedad de Niemann-Pick tipo A o tipo B.

10 La esfingomielinasa ácida (ASM) es una enzima fosfodiesterasa lisosomal que hidroliza esfingomielina (SPM), una sustancia de almacenamiento de fosfolípidos encontrada en el cerebro, hígado, pulmones, bazo y ganglios linfáticos, en ceramida y fosforilcolina. La pérdida de actividad de ASM puede dar como resultado la incapacidad del cuerpo para degradar SPM. En pacientes con trastornos de ASM, SPM se acumula predominantemente en macrófagos, pero también dentro de hepatocitos y otros tipos de células, dando como resultado una marcada hepatoesplenomegalia, trombocitopenia, enfermedad pulmonar intersticial y enfermedad de las arterias coronarias. La SPM no es significativamente elevada en plasma, sangre completa, u orina, que hace que su uso sea limitado como biomarcado no invasivo.

15 El diagnóstico de un trastorno de ASM requiere actualmente pruebas invasivas y/o reconocimiento médico que requiere tiempo, tal como una evaluación de sospecha de signos clínicos y síntomas, biopsia de hígado o pulmón, prueba de la actividad de ASM en una muestra de sangre (donde se ha informado de casos negativos y positivos falsos), y/o pruebas genéticas (por ejemplo, análisis de mutaciones del gen *SMPD1*). El tratamiento de trastornos de ASM puede incluir la administración de enzima de reemplazo. A dosis altas, la terapia de reemplazo enzimática
20 puede dar como resultado la producción de metabolitos tóxicos o perjudiciales. Por consiguiente, existe una necesidad de desarrollar métodos mejorados de cribado, diagnóstico y/o monitorización de la evolución del tratamiento para un trastorno de ASM. En el presente documento se desvelan métodos de terapia no invasiva de cribado, diagnóstico, monitorización, y/o ajuste de la dosis de un agente terapéutico para tratar un trastorno de ASM, que comprende medir el nivel de liso-SPM (esfingosilfosforilcolina o liso-esfingomielina) en una muestra biológica.
25 Se pueden usar niveles elevados de liso-SPM para cribar o diagnosticar un trastorno de ASM. También se pueden usar niveles elevados de liso-SPM como señal o indicación de la producción de uno o más metabolitos tóxicos asociados a una dosis excesivamente alta de terapia de reemplazo enzimática, permitiendo así la calibración de la terapia enzimática para reducir la acumulación de SPM, mientras que se evitan los efectos secundarios perjudiciales de la terapia. También se pueden usar niveles elevados de liso-SPM para monitorizar la eficacia a largo plazo de
30 una evolución del tratamiento para un trastorno de ASM (por ejemplo, si los niveles de liso-SPM no disminuyen durante la evolución de tratamiento, esto puede indicar un tratamiento ineficaz).

35 La enfermedad de Niemann-Pick (NPD) es un trastorno de almacenamiento de lípidos recesivo autosómico hereditario caracterizado por la acumulación en exceso de SPM en los lisosomas de células tales como macrófagos y neuronas, que altera la función celular normal. Niemann-Pick tipo A ("NPD-A") es una enfermedad neurodegenerativa rápidamente progresiva en lactantes y normalmente da como resultado la muerte en el plazo de dos a tres años de edad. Niemann-Pick de tipo B ("NPD-B") da como resultado el agrandamiento del hígado y el bazo, y dificultad respiratoria con muerte, en general, que ocurre en la adultez temprana. Otros tipos de enfermedad de Niemann-Pick, por ejemplo, tipo C ("NPD-C"), también se pueden asociar a acumulación de SPM y/o liso-SPM. También se denominan en el presente documento trastornos de ASM. Estas formas de enfermedad de Niemann-Pick se denominan conjuntamente en el presente documento enfermedad de Niemann-Pick (NPD).

40 La NPD ocurre más frecuentemente entre individuos de linaje judío asquenazí que en la población general. Se estima que la incidencia de NPD-A entre judíos asquenazís es aproximadamente 1 entre 40.000, con una frecuencia génica (q) de aproximadamente 1 entre 200 y una frecuencia de portadores heterocigotos (2 pq) de 1 entre 100 (Goodman, 1979, en "Genetic Disorders Among The Jewish People", John Hopkins Univ. Press, Baltimore, pp. 96-
45 100). La incidencia de portadores heterocigotos de NPD-B en la población de judíos asquenazís es menos frecuente. Ídem. Se ha estimado que la frecuencia de portadores heterocigotos combinados para NPD A y B es aproximadamente 1 entre 70 entre individuos de descendencia judía asquenazí. Ídem. En estudios epidemiológicos realizados en diversos países, se estima que la incidencia combinada de enfermedad de NPD A y B en varios países en el mundo varía desde 1 entre 167.000 hasta 1 entre 250.000 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). Se cree que la tasa de portadores heterocigotos varía desde 1 entre 200 hasta 1 entre 250 individuos.

50 Los pacientes de ASMD con o NPD-A o NPD-B tienen actividad de ASM residual (aproximadamente 1 a 10 % de normal), pero esto no es suficiente para prevenir la excesiva acumulación de esfingomielina en los lisosomas. Además, la evolución clínica de NPD-B es altamente variable (véase, por ejemplo, Wasserstein et al., Journal of pediatrics, 149(4): 554-559 (2006)), y actualmente no es posible correlacionar la gravedad de la enfermedad con el nivel de actividad residual de ASM. Aunque se puede hacer el diagnóstico enzimático de pacientes afectados con o NPD-A o NPD-B en muestras de sangre, este diagnóstico va frecuentemente precedido por procedimientos invasivos tales como biopsia de hígado o pulmón. Además, la detección enzimática de heterocigotos obligados ha demostrado ser problemática, particularmente usando leucocitos periféricos como fuente de enzimas. Una

posibilidad es que la aparición de esfingomielinasas neutras en algunas fuentes y/o la presencia de actividad residual de ASM resultante de los alelos mutantes han contribuido a la incapacidad para discriminar de forma fiable portadores de 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. Por consiguiente, se necesitan métodos alternativos para detectar con exactitud, cribar, diagnosticar y tratar trastornos de ASM, tales como NPD.

Se ha usado terapia de reemplazo enzimático (ERT) para tratar diversas enfermedades de almacenamiento lisosomal. Véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. 7.001.994 y la solicitud de patente de EE.UU. N° 2011/0052559, que trata ERT para enfermedad de Tay-Sachs, Pompe y Niemann-Pick, entre otras. ERT intenta complementar la enzima deficiente y/o defectuosa con enzima exógenamente suministrada. En el caso de ERT para enfermedad de Niemann-Pick, el objetivo sería permitir que el individuo afectado procesara esfingomielina y evitara su acumulación dentro de los lisosomas. Para ser eficaces, dicha terapia puede requerir inicialmente una cantidad suficientemente grande de enzima de reemplazo para degradar la esfingomielina acumulada, así como la administración continuada de enzima de reemplazo para evitar la posterior re-acumulación de esfingomielina. El metabolismo de la esfingomielina acumulada puede, sin embargo, dar como resultado la producción de metabolitos tóxicos o perjudiciales. Se necesita la cuidadosa coordinación de ERT, por tanto, para reducir eficazmente la esfingomielina acumulada en un paciente sin producir niveles elevados de metabolito que puedan dar como resultado efectos secundarios adversos.

Como se observó previamente, SPM no es significativamente elevada en plasma, sangre completa, u orina, que hace que su uso sea limitado como biomarcador no invasivo para cribar, diagnosticar o monitorizar el tratamiento para un trastorno de ASM. Como se desvela en el presente documento, liso-SPM (esfingosilfosforilcolina o liso-esfingomielina), la forma desacilada de SPM, es significativamente elevada en tejidos, que incluyen tejidos periféricos, en pacientes que padecen y/o que están tratándose para trastornos de ASM, que hace que sea un posible marcador para cribar, diagnosticar y/o monitorizar el tratamiento de un trastorno de ASM. Esta dicotomía es una diferencia de muchos otros trastornos de almacenamiento lisosomal, donde niveles alterados de tanto los glicoesfingolípidos acilados como desacilados son detectables en plasma. Dado que los niveles alterados de SPM no son detectables en plasma de pacientes que padecen o que están tratándose para trastornos de ASM, se podría haber esperado que liso-SPM no fuera asimismo adecuado para cribar, diagnosticar, o monitorizar el tratamiento. Sin embargo, como se desvela en el presente documento, se ha encontrado que liso-SPM se puede detectar en niveles alterados en muestras biológicas de diversos tejidos, que incluyen tejidos periféricos tales como plasma sanguíneo.

Los liso-esfingolípidos (liso-SL), que incluyen liso-SPM, son las formas desaciladas de esfingolípidos; se han mostrado varios que son elevados en ciertos trastornos de almacenamiento lisosomal. Galbiati et al., "Combined hematopoietic and lentiviral gene-transfer therapies in newborn Twitcher mice reveal contemporaneous neurodegeneration and demyelination in Krabbe disease", J. Neurosci. Res. 87: 1748-1759 (2009). No se ha elucidado completamente el mecanismo por el que se producen liso-SPM y otros liso-SL. La ausencia de una elevación simultánea en esfingosina sugiere que la desacilación del esfingolípidos correspondiente es la vía probable de generación. Sin embargo, la única esfingomielina desacilada identificada hasta la fecha es del estrato córneo de un sujeto con dermatitis atópica. Murata et al., "Abnormal expression of sphingomyelin acylase in atopic dermatitis: an etiologic factor for ceramide deficiency?", J. Invest. Dermatol. 106: 1242-1249 (1996). La expresión de esta desacilasa parece estar limitada a tipos seleccionados de células en ciertas condiciones fisiológicas. Se ha mostrado que la ASM purificada de placenta, cerebro y orina no hidroliza liso-SPM. Pentchev et al., "The isolation and characterization of sphingomyelinase from human placental tissue", Biochim. Biophys. Acta. 488: 312-321 (1977); Yamanaka and Suzuki, "Acid sphingomyelinase of human brain: purification to homogeneity", J. Neurochem. 38: 1753-1764 (1982); Quintern et al., "Acid sphingomyelinase from human urine: purification and characterization," Biochim. Biophys. Acta. 922: 323-336 (1987). La falta de entendimiento referente a la vía biosintética para liso-SPM enfatiza más la dificultad en predecir su nivel de expresión a priori en pacientes que padecen trastornos de ASM.

La liso-SPM tiene una corta semivida en sangre *in vitro* debido a su rápido metabolismo en esfingosina-1-fosfato mediante autotaxina, una exoenzima con actividad de lisofosfolipasa D. Tokumura et al., "Identification of human plasma lysophospholipase D, a lysophosphatidic acid-producing enzyme, as autotaxin, a multifunctional phosphodiesterase", J. Biol. Chem. 277: 39436-39442 (2002); Clair et al., "Autotaxin hydrolyzes sphingosylphosphorylcholine to produce the regulator of migration, sphingosine-1-phosphate", Cancer Res. 63: 5446-5453 (2003). Aparte de en el bazo e hígado de pacientes con NPD-B, y los cerebros de sujetos con NPD-A que tienen de poca a ninguna actividad de ASM y manifiestan enfermedad neuropática grave, no existen informes sobre el nivel de liso-SPM en otros órganos.

Como se ha desvelado en el presente documento, la liso-SPM se puede detectar a concentraciones alteradas en muestras biológicas (por ejemplo, muestras tomadas de tejidos periféricos) de pacientes que padecen y/o que están tratándose para trastornos de ASM. El nivel alterado puede reflejar un efecto transitorio del tratamiento (por ejemplo, niveles alterados de liso-SPM pueden servir de un marcador para la producción de metabolitos tóxicos agudos en respuesta a ERT). También se pueden usar diagnósticamente los niveles alterados (por ejemplo, niveles alterados de liso-SPM pueden servir de marcador de diagnóstico o de cribado para identificar un sujeto sintomático o pre-sintomático que padece un trastorno de ASM). También se pueden usar los niveles alterados para monitorizar la

5 eficacia a largo plazo de una evolución de tratamiento de un trastorno de ASM (por ejemplo, si los niveles de liso-SPM no disminuyen durante la evolución del tratamiento, esto puede indicar un tratamiento ineficaz). Por consiguiente, en el presente documento se desvelan nuevos métodos de cribado, diagnóstico, monitorización de la progresión del tratamiento, y/o ajuste de la dosis de un agente terapéutico para tratar un trastorno de ASM tal como NPD usando biomarcadores novedosos que incluyen liso-SPM (esfingosilfosforilcolina o liso-esfingomielina). La monitorización de la evolución del tratamiento puede incluir detectar una reducción en el nivel de uno o más marcadores de toxicidad (por ejemplo, liso-SPM) durante la evolución del tratamiento, indicando así una pauta de tratamiento, o detectar una ausencia de cambio en el nivel del marcador con el tiempo, indicando así una pauta ineficaz. La invención es como se define por las reivindicaciones.

10 Los métodos desvelados en el presente documento también incluyen métodos de tratamiento de un sujeto humano que tiene un trastorno de esfingomielinasa ácida (ASM). En ciertos aspectos, los métodos pueden comprender administrar al sujeto una primera dosis de un agente terapéutico para tratar un trastorno de ASM que tiene una primera concentración; y administrar al sujeto una segunda dosis de agente terapéutico que tiene una segunda concentración igual o superior a la primera concentración si se ha determinado que el sujeto tiene un nivel de liso-SPM que es inferior o igual a un nivel de referencia después de la administración de la primera dosis. Los métodos pueden incluir la medición de liso-SPM en muestras biológicas de tejidos periféricos y la identificación de un paciente que padece un trastorno de ASM detectando niveles alterados de liso-SPM. Los métodos también incluyen monitorizar o ajustar el tratamiento de un paciente de un trastorno de ASM detectando el nivel de uno o más marcadores de toxicidad, que incluyen liso-SPM, que son alterados como resultado de tratar el paciente con un agente terapéutico, por ejemplo, un agente que reduce el nivel de SPM en los tejidos del paciente. Los métodos permiten la evaluación no invasiva de dichos pacientes.

15 Los métodos desvelados en el presente documento también se pueden usar para cribar, diagnosticar, monitorizar la progresión del tratamiento, y/o ajustar el tratamiento de un trastorno de ASM, tal como NPD. Por ejemplo, los métodos incluyen ajustar la dosis de un agente terapéutico administrado a un paciente para tratar un trastorno de ASM midiendo un marcador de toxicidad (por ejemplo, liso-SPM) para gestionar los niveles de metabolitos tóxicos resultantes del tratamiento. Los métodos desvelados en el presente documento se pueden usar para monitorizar la eficacia a largo plazo de una evolución del tratamiento de un trastorno de ASM (por ejemplo, si los niveles de liso-SPM no disminuyen durante la evolución del tratamiento, esto puede indicar un tratamiento ineficaz). Los métodos también se pueden usar para cribar sujetos (por ejemplo, pacientes que son pre-sintomáticos) para la elevada liso-SPM como indicación inicial de un trastorno de ASM. A los sujetos identificados por tener elevada liso-SPM en el cribado se les podría realizar entonces una evaluación adicional (por ejemplo, análisis de sangre para ASM, pruebas genéticas, etc.) para diagnosticar/confirmar un diagnóstico de un trastorno de ASM, mientras que los sujetos que no presentaron liso-SPM no se les realizará evaluación adicional. Dicho método de cribado podría reducir posiblemente los costes de las pruebas.

20 Los métodos desvelados en el presente documento pueden incluir la medición de liso-SPM en una muestra biológica de un sujeto humano y la administración de un agente terapéutico para tratar un trastorno de ASM (por ejemplo, ERT, terapia de chaperonas, y/o terapia de reducción de sustrato) a concentraciones optimizadas basadas en el nivel medido de liso-SPM. En diversas realizaciones, la muestra biológica es una muestra periférica. En ciertas realizaciones, la muestra biológica puede ser una muestra de plasma, sangre completa (por ejemplo, mancha de sangre seca), suero y/u orina. En uso de una muestra periférica para medir niveles de liso-SPM puede evitar la necesidad de procedimientos invasivos, tales como biopsia de hígado.

DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

25 La FIG. 1A es un gráfico que muestra la relación de la concentración de SPM en manchas de sangre seca (DBS) de pacientes con NPD-A y NPD-B con el valor medio de concentración en DBS de muestras de control normales. La FIG. 1B es un gráfico que muestra la relación de la concentración de liso-SPM en DBS de pacientes con NPD-A y NPD-B con el valor medio de concentración en DBS de muestras de control normales.

30 La FIG. 2 es un histograma que muestra la elevación en veces en las concentraciones de liso-SPM (eje vertical) en DBS de ratones inactivados en ASM en los puntos de tiempo indicados (1, 2, 4, 6, 24, 48 y 72 horas después de la dosis), en comparación con la concentración 5 minutos después de una administración de dosis única de 0, 3 o 20 mg/kg de rhASM.

35 La FIG. 3 muestra la concentración de liso-SPM (ng/mL) en DBS obtenidas de ratones no mutantes (C57BL/6) o inactivados en ASM (ASMKO) tras la administración de una dosis única (10 mg/kg) o una pauta posológica reductora (3 mg/kg), seguido por una dosis de 20 mg/kg de rhASM. Se tomaron muestras de sangre en los siguientes puntos de tiempo: 5 minutos, 4 horas, 6 horas, 24 horas y 72 horas después de la dosis. Los animales en el grupo de dosis de 10 mg/kg se tuvieron que sacrificar después del momento de tiempo de 24 horas.

40 La FIG. 4 es un histograma que muestra la concentración de liso-SPM (ng/mL) en DBS de un paciente humano con Niemann-Pick recogida antes de la dosis, y 24, 48, y 72 horas después de administración de una dosis de rhASM durante un período de 26 semanas. Las dosis (0,1, 0,3, 0,6, 1, 2 o 3 mg/kg) y la fecha de administración

(día 1, semana 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 y 26) se indican en el eje horizontal. A las 26 semanas, se tomaron muestras solo antes de la dosis y 24 y 48 horas después de la dosis.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

5 Ahora se hará referencia en detalle a ciertos aspectos a modo de ejemplo según la presente divulgación, ciertos ejemplos de los cuales se ilustran en los dibujos adjuntos. Cuando sea posible, los mismos números de referencia se usarán en todos los dibujos para referirse a las mismas partes o partes similares.

10 En la presente solicitud, el uso del singular incluye el plural, a menos que se establezca específicamente de otro modo. En la presente solicitud, el uso de "o" significa "y/o", a menos que se establezca de otro modo. Además, el uso del término "que incluye", así como otras formas, tales como "incluye" e "incluido," no es limitante. Se entenderá que cualquier intervalo descrito en el presente documento incluirá los puntos extremos y todos los valores entre los puntos extremos.

Los encabezados de sección usados en el presente documento son para fines organizativos solo y no se deben interpretar como limitantes de la materia descrita.

15 En el presente documento se desvelan métodos de cribado, diagnóstico, monitorización de la progresión del tratamiento, y/o ajuste de la dosis de un agente terapéutico para tratar un trastorno de ASM, tal como NPD. Un "trastorno de ASM" puede englobar cualquier trastorno asociado a la expresión reducida o función alterada de la esfingomielinasa ácida (deficiencia de ASM o ASMD). Un trastorno de ASM también puede englobar cualquier otro trastorno asociado a la acumulación de esfingomielina en un tejido. Según la invención, el trastorno de ASM es deficiencia de esfingomielinasa ácida (ASMD).

20 En algunos aspectos, los métodos pueden comprender administrar al sujeto una primera dosis de un agente terapéutico para tratar un trastorno de ASM que tiene una primera concentración; y luego administrar al sujeto una segunda dosis de agente terapéutico que tiene una segunda concentración igual o superior a la primera concentración si se ha determinado que el sujeto tiene un nivel de liso-SPM que es inferior o igual a un nivel de referencia (por ejemplo, el nivel en una muestra de un sujeto de control que no tiene un trastorno de ASM, o el nivel inicial medido en el paciente antes del tratamiento) después de la administración de la primera dosis.

30 En ciertos aspectos, los métodos comprenden recoger y medir liso-esfingomielina (liso-SPM) en una muestra biológica de un sujeto humano. El nivel medido de liso-SPM se puede usar para cribar, diagnosticar, monitorizar la progresión del tratamiento, y/o ajustar la dosis de un agente terapéutico para tratar un trastorno de ASM. Los métodos se basan en el descubrimiento de que la liso-SPM es significativamente elevada en muestras biológicas de tejidos periféricos de pacientes con trastornos de ASM tales como NPD, que permite la evaluación no invasiva de dichos pacientes, que incluyen el cribado y el diagnóstico de un trastorno de ASM y la monitorización/calibración/gestión de la terapia para un trastorno de ASM. Los métodos también se basan en el descubrimiento de que la degradación de ASM acumulada durante el tratamiento puede conducir a niveles elevados de marcadores (por ejemplo, liso-SPM) que señalizan la producción de metabolitos tóxicos o perjudiciales, y que estos niveles perjudiciales de metabolitos se pueden evitar por un método de administración de un agente terapéutico diseñado para reducir los niveles de SPM (por ejemplo, ERT, terapia de chaperonas y/o terapia de reducción de sustrato) a dosis que previenen la excesiva producción de metabolitos. Se puede usar la medición de la elevada concentración de liso-SPM para detectar la producción de dichos metabolitos y se puede usar para calibrar la terapia para evitar la producción de niveles excesivamente elevados de metabolito (por ejemplo, niveles tóxicos).

40 En ciertos aspectos, el nivel de liso-SPM en un paciente que recibe tratamiento de un trastorno de ASM determina si la dosis es incrementada, reducida, repetida, retardada o interrumpida.

45 Se puede usar la detección de niveles elevados de liso-SPM en un sujeto que tiene un trastorno de ASM (por ejemplo, pacientes con NPD) como parte de un método de monitorización de un efecto secundario adverso durante el tratamiento. Por ejemplo, el método puede comprender recoger una muestra biológica del sujeto, medir un nivel de liso-esfingomielina (liso-SPM) en la muestra, comparar el nivel medido de liso-SPM en la muestra con un nivel de referencia, y detectar un efecto secundario adverso si el nivel de liso-SPM en la muestra es elevado. En algunos aspectos, si el nivel de liso-SPM es elevado en una cantidad predeterminada en comparación con una muestra de referencia (por ejemplo, un nivel de referencia en una muestra de un sujeto de control que no tiene un trastorno de ASM), o si el nivel de liso-SPM aumenta en una cantidad predeterminada en el sujeto con el tiempo durante la evolución del tratamiento (es decir, un aumento por encima del nivel inicial medido en el paciente antes del tratamiento, también denominado en el presente documento un nivel de referencia), entonces el nivel medido de liso-SPM se puede usar como indicación de un efecto secundario adverso del tratamiento. En algunas realizaciones, el tratamiento es terapia de reemplazo enzimático (ERT) y la dosificación de ERT se gestiona recogiendo una o más muestras biológicas del paciente, probando cada muestra para una elevación en liso-SPM, y estableciendo la dosis de ERT a un nivel que no produzca niveles elevados de liso-SPM por encima de un umbral predeterminado. La gestión de la dosis de un agente terapéutico puede incluir aumentar, disminuir o mantener la concentración de un agente terapéutico, y/o interrumpir el tratamiento. En ciertas realizaciones, se recogen una o más muestras biológicas después de administrar una dosis de un agente terapéutico y/o justo antes de la administración de una dosis posterior de un agente terapéutico. En algunas realizaciones, se puede detectar un efecto secundario adverso

si el nivel de liso-SPM en la muestra biológica (por ejemplo, una muestra de sangre tal como plasma, suero, o una mancha de sangre seca) es mayor que un nivel de referencia de aproximadamente 100-700 ng/mL (por ejemplo, superior a aproximadamente 100, 200, 250, 300, 400, 500, 600 o 700 ng/mL, o cualquier concentración intermedia), o si el nivel de liso-SPM en la muestra biológica aumenta en al menos aproximadamente 1,1, 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 5,5, 6, 6,5, 7, 7,5, 8, 8,5, 9, 9,5 o 10 veces, o más (o cualquier valor intermedio) con respecto a un nivel de referencia. Por ejemplo, el aumento puede ser al menos aproximadamente 3 veces. El nivel de referencia puede ser, por ejemplo, el nivel en una muestra de un sujeto de control que no tiene un trastorno de ASM o el nivel inicial medido en el paciente antes del tratamiento con una dosis del agente terapéutico.

En el presente documento también se desvelan métodos de tratamiento de un sujeto que tiene un trastorno de ASM (por ejemplo, NPD). En diversos aspectos, el método comprende administrar un agente terapéutico para tratar un trastorno de ASM (por ejemplo, ERT, terapia de chaperonas y/o terapia de reducción de sustrato) en dosis secuenciales de concentración creciente y monitorizar el sujeto para niveles elevados de liso-SPM en una muestra biológica después de cada dosis (por ejemplo, 1 minuto, 5 minutos, 10 minutos, 30 minutos, o 45 minutos, o 1, 2, 3, 4, 5, 10, 12, 15 o 20 horas, o 1 día, 2 días, 5 días, 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, o 4 semanas después de la dosificación, o cualquier periodo de tiempo intermedio), o justo antes de la siguiente dosis. La monitorización del sujeto puede comprender recoger una muestra biológica del sujeto, medir el nivel de liso-SPM en la muestra, comparar el nivel de liso-SPM en la muestra con un nivel de referencia (por ejemplo, el nivel en una muestra de un donante que no tiene un trastorno de ASM, o el nivel en un paciente con ASM antes del tratamiento), y detectar un nivel elevado de liso-SPM en la muestra en comparación con el nivel de referencia. En algunas realizaciones, el nivel de referencia es el nivel de liso-SPM medido en una muestra biológica de un sujeto de control que no tiene un trastorno de ASM. En algunas realizaciones, el nivel de referencia es el nivel de liso-SPM medido en una muestra del sujeto tomada después de la administración de una dosis anterior más baja de ERT o antes de la administración de cualquier ERT. En algunas realizaciones, un nivel elevado de liso-SPM en la muestra biológica (por ejemplo, una muestra de sangre tal como una muestra de suero, muestra de plasma, o mancha de sangre seca) es un nivel superior a un nivel de referencia de, por ejemplo, aproximadamente 100-700 ng/mL. En algunas realizaciones, un nivel elevado de liso-SPM en la muestra biológica (por ejemplo, una muestra de sangre) es un nivel superior a un nivel de referencia en al menos aproximadamente 1,1, 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 5,5, 6, 6,5, 7, 7,5, 8, 8,5, 9, 9,5 o 10 veces, o más (o cualquier valor intermedio). Por ejemplo, el nivel puede ser mayor en un factor de al menos aproximadamente 3. En algunas realizaciones, no se administra una dosis de concentración más alta de ERT si se detecta un nivel elevado de liso-SPM después de la administración de una dosis previa.

Además de monitorizar la terapia y los métodos terapéuticos, en el presente documento se desvelan métodos de cribado y/o diagnóstico de un trastorno de ASM (por ejemplo, NPD) en un sujeto. En diversos aspectos, el método comprende recoger una muestra biológica del sujeto, medir un nivel de liso-SPM en la muestra, comparar el nivel de liso-SPM en la muestra con un nivel de referencia, y detectar/diagnosticar un trastorno de ASM si el nivel de liso-SPM en la muestra es elevado con respecto a la muestra de referencia. En algunos aspectos, la muestra de referencia es una muestra de un sujeto de control que no tiene un trastorno de ASM. En algunos aspectos, se puede cribar y/o diagnosticar un trastorno de ASM si el nivel de liso-SPM en la muestra biológica (por ejemplo, una muestra de sangre, tal como una muestra de plasma, muestra de suero, o mancha de sangre seca) es superior a un nivel de referencia en al menos aproximadamente 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 5,5, 6, 6,5, 7, 7,5, 8, 8,5, 9, 9,5 o 10 veces, o más (o cualquier valor intermedio), o superior a un nivel de referencia de al menos aproximadamente 200-2000 ng/mL, tal como al menos aproximadamente 200 ng/mL, al menos aproximadamente 250 ng/mL, al menos aproximadamente 300 ng/mL, al menos aproximadamente 400 ng/mL, al menos aproximadamente 500 ng/mL, al menos aproximadamente 525 ng/mL, al menos aproximadamente 575 ng/mL, al menos aproximadamente 700 ng/mL, y/o al menos aproximadamente 900 ng/mL (por ejemplo, superior a aproximadamente 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 525, 550, 575, 600, 625, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950, 1000, 1050, 1100, 1150, 1200, 1300, 1400, 1500, 1600, 1700, 1800, 1900 o 2000 ng/mL, o cualquier concentración intermedia). En algunos aspectos, una muestra biológica de un sujeto normal puede contener un nivel de liso-SPM en el intervalo de aproximadamente 25-200 ng/mL (por ejemplo, aproximadamente 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175, o 200 ng/mL, o cualquier concentración intermedia).

50 **Medición de liso-SPM**

Para una discusión de la estructura química de liso-SPM, véanse, por ejemplo, Ito et al., J. Biol. Chem. 270: 24370-4 (1995); véase también Cayman Chemical Co. Número de artículo 10007947, como se ofrece en su catálogo en: <https://www.caymanchem.com/app/template/Product.vm/catalog/10007947>.

Los métodos desvelados en el presente documento implican la medición de liso-SPM de diversas muestras biológicas, que incluyen muestras de tejidos periféricos. Se puede usar cualquier método de recogida, preparación y cuantificación del nivel de liso-SPM de una muestra biológica. Se puede cuantificar el nivel de liso-SPM en una muestra biológica usando un espectrómetro, tal como un espectrómetro de masas, por ejemplo, LC/MS/MS, o un espectrómetro de frecuencia electromagnética, por ejemplo, UV-VIS, IR, o RMN. En algunas realizaciones, el método de cuantificación del nivel de liso-SPM puede comprender recoger una muestra biológica (por ejemplo, por punción arterial o venosa, biopsia de tejido, hisopos bucales, muestra de orina, etc.), detectar y/o separar la liso-SPM de los otros componentes de la muestra (por ejemplo, usando un anticuerpo, un producto químico indicador, un

espectrómetro de masas tal como LC/MS/MS, o un espectrómetro de frecuencia electromagnética tal como UV-VIS, IR, o RMN), y comparar el nivel de liso-SPM con el nivel en una muestra de referencia.

Los niveles de liso-SPM se pueden medir en muestras biológicas de diversos tejidos con los métodos descritos en el presente documento. Por ejemplo, se pueden recoger muestras biológicas de tejidos periféricos, tales como plasma, sangre completa (por ejemplo, mancha de sangre seca), suero, piel y/u orina para su uso en detectar niveles elevados de liso-SPM. También se pueden usar muestras biológicas de otros tejidos, por ejemplo, bazo, pulmón, corazón, hígado, riñón y/o tejido cerebral. Se pueden usar muestras de combinaciones de dos o más tejidos (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, o más tejidos). En algunas realizaciones, el uso de una muestra biológica de un tejido periférico puede evitar la necesidad de procedimientos invasivos, tales como una biopsia de hígado.

En algunas realizaciones, la muestra biológica se somete a una o más etapas de pretratamiento antes de la detección y/o medición en la muestra de liso-SPM. En ciertas realizaciones, la muestra se pretrata por centrifugación, filtración, precipitación, diálisis, o cromatografía, o por una combinación de dichas etapas de pretratamiento. En otras realizaciones, la muestra se pretrata por congelación, fijación química, incorporación en parafina, deshidratación, permeabilización, y/u homogenización, seguido por centrifugación, filtración, precipitación, diálisis y/o cromatografía. En ciertas realizaciones, la muestra se pretrata retirando células de un cierto tipo de la muestra o retirando residuos de la muestra antes de la evaluación de liso-SPM.

En diversas realizaciones, la muestra biológica se evalúa usando un dispositivo para cuantificar o semi-cuantificar el nivel de uno o más marcadores en la muestra. Por ejemplo, el nivel de liso-SPM y/u otros marcadores en la muestra se puede evaluar cuantitativamente o semi-cuantitativamente. En algunas realizaciones, se puede usar un dispositivo para cuantificar el nivel de liso-SPM y/u otros marcadores en una muestra biológica, tal como una cromatografía de líquidos-espectrometría de masas en tándem (por ejemplo, LC/MS/MS). En algunas realizaciones, se pueden usar uno o más anticuerpos u otros agentes de detección para unir la liso-SPM y/u otro marcador en la muestra biológica. Se pueden aplicar uno o más agentes (por ejemplo, un agente colorimétrico) que reacciona con el agente de detección para emitir una señal detectable cuya fuerza, intensidad, color, etc., se puede usar para determinar semi-cuantitativamente o cuantitativamente el nivel de liso-SPM y/u otros marcadores en una muestra (por ejemplo, por comparación con la señal de una o más muestras de referencia). También se pueden usar métodos adicionales para cuantificar liso-SPM y/u otros marcadores en una muestra biológica, por ejemplo, inmunoensayos tales como ELISA, inmunoprecipitación, y transferencia Western, así como métodos de citometría de flujo activada por fluorescencia (FACS), transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET), RT-PCR, y/o transferencia Northern.

Gestión del tratamiento de un trastorno de ASM

En diversos aspectos, se pueden medir niveles de liso-SPM como parte de una terapia para un trastorno de ASM. Por ejemplo, el trastorno de ASM puede ser la enfermedad de Niemann-Pick (NPD), por ejemplo, NPD-A, NPD-B, o NPD-C. La terapia para un trastorno de ASM puede comprender la administración de uno o más agentes terapéuticos que reducen los niveles de SPM en los tejidos de un paciente (por ejemplo, ERT, terapia de chaperonas, y/o terapia de reducción de sustrato). Por ejemplo, se puede usar un método de terapia de reemplazo enzimático (ERT) de aumento de la dosis dentro del paciente, tal como los métodos de aumento de la dosis de ASM desvelados en la solicitud de EE. UU. N° 2011/0052559 (véanse, por ejemplo, los párrafos [0063]-[0075], que describen los protocolos de aumento de la dosis).

En diversos aspectos, se desvela un método para monitorizar un sujeto para un efecto secundario adverso (por ejemplo, producción de niveles tóxicos o perjudiciales de metabolitos) monitorizando un marcador tal como liso-SPM durante una terapia de aumento de la dosis para un trastorno de ASM. El método puede comprender recoger una muestra biológica del sujeto, medir el nivel de liso-SPM en la muestra, comparar el nivel de liso-SPM en la muestra con un nivel de referencia, y detectar un efecto secundario adverso si el nivel de liso-SPM en la muestra es elevado en comparación con la muestra de referencia. Se pueden recoger y evaluar una o más muestras después de la administración de una dosis de agente terapéutico, o antes de la administración de la siguiente dosis. Por ejemplo, se pueden recoger y evaluar muestras 1 minuto, 5 minutos, 10 minutos, 30 minutos, o 45 minutos, o 1, 2, 3, 5, 10, 12, 15 o 20 horas, o 1, 2, 3, 4, 5 días, o 1, 2, 3 o 4 semanas después de la administración de una dosis terapéutica, o cualquier periodo de tiempo intermedio, o antes de la administración de la siguiente dosis. En algunos aspectos, la muestra de referencia es una muestra de un sujeto de control que no tiene un trastorno de ASM. En algunos aspectos, la muestra de referencia es una muestra biológica anterior del sujeto antes de la administración de una dosis de concentración más alta de agente terapéutico (o antes de la administración de cualquier agente terapéutico). En algunos aspectos, si el nivel de liso-SPM aumenta en una cantidad predeterminada o por encima de un umbral predeterminado después de la administración de una dosis inicial o después de la administración de una dosis elevada (es decir, concentración más alta) de agente terapéutico (por ejemplo, una mayor concentración de ERT), en comparación con el nivel en una muestra de referencia, entonces esto se puede usar como una indicación de un efecto secundario adverso del tratamiento. En ciertos aspectos, si el nivel de liso-SPM no aumenta o no aumenta por encima de un nivel umbral, entonces se pueden usar como una indicación de que no ha ocurrido un efecto secundario adverso.

En diversos aspectos, se proporciona una terapia para un trastorno de ASM. La terapia puede comprender la administración de uno o más agentes terapéuticos que reducen el nivel de SPM en los tejidos de un paciente (por ejemplo, ERT, terapia de chaperonas, y/o terapia de reducción de sustrato). Según la invención, la terapia comprende ERT (es decir, terapia de reemplazo de ASM con ASM humana recombinante (rhASM)). La terapia puede comprender monitorizar el sujeto para niveles elevados de liso-SPM durante la terapia y ajustar la concentración de agente terapéutico (por ejemplo, la concentración de una dosis de ERT) para reducir los niveles de liso-SPM por debajo de un nivel umbral predeterminado. En algunas realizaciones, la monitorización comprende evaluar una muestra para niveles elevados de liso-SPM después de cada dosis de agente terapéutico o antes de la administración de cada dosis posterior de agente terapéutico. En ciertas realizaciones, la monitorización después de cada dosis es opcional, y se realiza periódicamente después de ciertas dosis de agente terapéutico o antes de la administración de cierta dosis posterior de agente terapéutico.

En algunos aspectos, la terapia puede comprender administrar una ERT (por ejemplo, terapia de reemplazo de ASM) en dosis secuenciales de concentración creciente, recoger muestras biológicas del paciente después de ciertas dosis (por ejemplo, después de cada dosis o antes de cada dosis posterior), detectar un nivel de liso-SPM en la muestra (por ejemplo, usando LC/MS/MS), y monitorizar el sujeto para niveles elevados de liso-SPM después de cada dosis o antes de la administración de la siguiente dosis. Por ejemplo, las muestras biológicas se pueden recoger y monitorizar para liso-SPM elevada 1 minuto, 5 minutos, 10 minutos, 30 minutos, o 45 minutos, o 1, 2, 3, 5, 10, 12, 15 o 20 horas, o 1, 2, 3, 4, 5 días, o 1, 2, 3 o 4 semanas después de administrar una dosis de ERT, o en cualquier periodo de tiempo intermedio, o antes de la administración de la siguiente dosis. La monitorización del sujeto puede comprender recoger una muestra biológica del sujeto, medir un nivel de liso-SPM en la muestra, comparar el nivel de liso-SPM en la muestra con un nivel de referencia, y ajustar la dosis de ERT si el nivel de liso-SPM en la muestra es elevado en una cantidad predeterminada en comparación con la muestra de referencia. En algunas realizaciones, la muestra de referencia es una muestra de un sujeto de control que no tiene un trastorno de ASM. En algunas realizaciones, la muestra de referencia es una muestra biológica anterior del sujeto antes de la administración de una dosis de concentración más alta de ERT (o antes de la administración de cualquier ERT). En algunas realizaciones, si el nivel de liso-SPM aumenta en una cantidad predeterminada en la muestra del sujeto y/o es superior a un referencia umbral, entonces esto se puede usar como una indicación de que la dosificación de ERT se deben reducir, retardar, o terminar para evitar la producción de niveles tóxicos o perjudiciales de metabolito. En algunas realizaciones, si el nivel de liso-SPM está en el umbral o por debajo del umbral, entonces se puede administrar una dosis posterior de concentración igual o superior.

En diversos aspectos, se proporciona una terapia de aumento de la dosis, que comprende administrar ERT a un sujeto a dosis crecientes con el tiempo para reducir SPM acumulada sin producir niveles tóxicos o perjudiciales de metabolito resultante de la rápida hidrólisis de la SPM acumulada. En algunas realizaciones, se monitorizan muestras biológicas del paciente para niveles elevados de liso-SPM durante la terapia de aumento de la dosis, ya que la liso-SPM elevada indicaría la producción de niveles tóxicos o perjudiciales de metabolito. En algunas realizaciones, si se detectan niveles de liso-SPM por encima de una concentración umbral, o se detecta un gran aumento en los niveles de liso-SPM en comparación con los niveles en una muestra previa, entonces se retarda un aumento de dosis de ERT o no se administra. La ERT se puede administrar por cualquier vía adecuada para lograr un efecto terapéutico, que incluye por vía intravenosa, por vía intradérmica, por vía subcutánea, por vía intraperitoneal, por vía intrapulmonar, por vía tópica, por vía intranasal, por vía intracraneal, o por vía intramuscular.

En algunos aspectos, la ERT puede comprender la administración de una esfingomielinasa ácida (ASM), tal como una ASM humana recombinante (rhASM), o la ERT puede comprender la administración de una ASM modificada (por ejemplo, rhASM modificada). Una ASM modificada puede comprender cualquier modificación a la enzima que no altere significativamente su capacidad para hidrolizar esfingomielina lisosomal en ceramida y fosforicolina (por ejemplo, la ASM modificada presenta al menos aproximadamente 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 95, 99, 99,5 o 99,9 % de la actividad enzimática de ASM sin modificar, o cualquier porcentaje intermedio). La capacidad hidrolítica de una ASM modificada se puede evaluar por técnicas conocidas para un experto en la técnica, tales como aquellas descritas en las patentes de EE.UU. N^o 4.039.388, 4.082.781, 5.686.240 y 7.563.591, y las publicaciones internacionales N^o WO 2007/078806 y WO 2006/058385. Una terapia de aumento de la dosis de reemplazo enzimático usando esfingomielinasa ácida (ASM) para el tratamiento de sujetos humanos que tienen deficiencia de esfingomielinasa ácida (ASMD) se describe en el documento de patente WO 2011/025996. Se realizó un ensayo de fase 1 de tratamiento con rhASM en el contexto de ERT en enfermedad de ASM en adultos (véase Mc Govern et al., "A phase 1 trial of recombinant human acid sphingomyelinase (rhASM) enzyme replacement therapy in adults with ASM deficiency (ASMD), 2012, recuperar en <http://www.nnpdf.org/documents/>").

En algunos aspectos, la ERT puede comprender la administración de ASM humana recombinante (rhASM) o una rhASM modificada. Existen diversas isoformas de ASM humana conocidas en la técnica, todas las cuales se pueden usar en los métodos desvelados en el presente documento. Véase, por ejemplo, la solicitud de EE. UU. N^o 2011/0052559 (véase, por ejemplo, la discusión de isoformas ASM de humana y sus conjugados de enzima y su uso en ERT en los párrafos [108]-[0117] y [0124]-[0127]).

En algunas realizaciones, la terapia de reemplazo enzimático se administra a un sujeto a una dosis inicial baja, no tóxica, que entonces se aumenta en administraciones posteriores. La dosis más alta de enzima que el sujeto puede tolerar sin producir niveles tóxicos o perjudiciales de metabolito (como se detecta por, por ejemplo, la monitorización

de los niveles de un marcador de toxicidad tal como liso-SPM) se puede usar entonces como una dosis de mantenimiento. Alternativamente, se puede usar una dosis terapéuticamente eficaz inferior a la dosis tolerada más alta como dosis de mantenimiento. Una dosis terapéuticamente eficaz puede comprender cualquier dosis que sea suficiente para reducir la concentración de esfingomielina acumulada en un sujeto con ASM en al menos aproximadamente 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, o 99% (o cualquier porcentaje intermedio) después de una o más rondas de administración.

El tratamiento de trastornos de ASM, tales como NPD, requiere dosis suficientemente altas de agente terapéutico (por ejemplo, ERT, terapia de chaperonas, y/o terapia de reducción de sustrato) para lograr la distribución adecuada del agente terapéutico en los órganos de patología (por ejemplo, el bazo, pulmones, hígado, corazón, riñón y cerebro). Se ha mostrado que, tras la administración intravenosa de ASM humana recombinante en ratones inactivados en ASM, la mayoría de la actividad de ASM se distribuye al hígado, con pequeñas cantidades de actividad enzimática de ASM detectadas en otros órganos, tales como el bazo, corazón, hígado, riñón y pulmón. Véase, por ejemplo, He et al., *Biochimica et Biophysica Acta* 1432: 251-264 (1999), Miranda et al., *FASEB Journal*, 14(13): 1988-1995 (2000). Así, se pueden requerir dosis que tienen una elevada concentración de agente terapéutico (por ejemplo, altas concentraciones de enzima de reemplazo) para garantizar la distribución adecuada y administración a, por ejemplo, el pulmón, hígado, corazón y riñón en sujetos que tienen un trastorno de ASM, tal como NPD.

Los estudios en ratones inactivados en ASM también han demostrado que la terapia de reemplazo enzimático puede, a dosis suficientemente altas, dar como resultado la producción de metabolitos tóxicos o de otro modo perjudiciales de esfingomielina. Véase, por ejemplo, C. Nickerson, et al., *American Society of Human Genetics* (2005); y J. Murray et al., *Society of Toxicology* (2006). Sin desear quedar ligado a teoría, la administración de altas dosis de ASM a sujetos con NPD puede dar como resultado la hidrólisis de grandes cantidades de esfingomielina acumulada en ceramida y fosforilcolina. La ceramida se conoce por desempeñar una función en la muerte celular y puede ser un agente pro-apoptótico. Véase, por ejemplo, Smith y Schuchman, *FASEB* 22: 3419-3431 (2008). Así, la ceramida puede contribuir a los efectos secundarios tóxicos observados en los ratones inactivados en ASM y en sujetos con NPD.

Así, se necesita una calibración y coordinación de terapia (por ejemplo, ERT, terapia de chaperonas, y/o terapia de reducción de sustrato) para proporcionar una concentración suficiente de agente terapéutico para reducir y prevenir la futura acumulación de esfingomielina lisosomal a lo largo de los órganos de patología, mientras que también se evita la producción de concentraciones excesivas de metabolitos tóxicos. En algunos aspectos, esta coordinación se proporciona mediante la gestión de un protocolo de aumento de dosis que evalúa los niveles de un marcador tóxico, tal como liso-SPM en una muestra de paciente después de ciertas dosis o después de cada dosis y, si fuera necesario, que ajusta la pauta posológica como se describe en el presente documento. La gestión de la dosis de un agente terapéutico puede incluir aumentar, disminuir o mantener la concentración de un agente terapéutico, y/o interrumpir el tratamiento.

En diversas realizaciones, un método de tratamiento de aumento de la dosis implica la administración de una o más dosis iniciales bajas de agente terapéutico (por ejemplo, enzima de reemplazo) a un sujeto para reducir la cantidad de esfingomielina que se ha acumulado en el sujeto. Entonces, la dosis de agente terapéutico se puede administrar a concentraciones sistemáticamente más altas hasta que se logre la dosis más alta que es tolerada por el sujeto y terapéuticamente eficaz. En algunas realizaciones, el agente terapéutico es enzima de reemplazo (rhASM) y se administra de forma que la actividad enzimática en uno o más órganos de patología (por ejemplo, un órgano que presenta elevados niveles lisosomales de SPM en un paciente que padece un trastorno de ASM) sea al menos aproximadamente 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, 10 %, 12 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 50 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % (o cualquier porcentaje intermedio) del nivel de actividad de la actividad en el órgano correspondiente en un sujeto que no padece un trastorno de ASM (por ejemplo, un sujeto sano).

En algunos aspectos, un método de tratamiento de un trastorno de ASM puede comprender: (a) administrar un régimen de reemplazo enzimático para reducir sustrato acumulado de esfingomielina en el sujeto que comprende: (i) administrar una dosis inicial baja de rhASM o una rhASM modificada al sujeto; y (ii) administrar sucesivamente dosis más altas de rhASM o una rhASM modificada al sujeto (aumento de la dosis); (b) monitorizar el sujeto para niveles elevados de liso-SPM y/o para uno o más marcadores adicionales de un efecto secundario adverso después de ciertas dosis, o después de cada dosis, administradas en las etapas (a)(i) y (a)(ii) (por ejemplo, usando LC/MS/MS para cuantificar la concentración de liso-SPM); (c) repetir, disminuir y/o terminar el protocolo de aumento de la dosis después de que se detecten elevados niveles de liso-SPM y/o después de que se detecten uno o más efectos secundarios adversos adicionales. En ciertos aspectos, el método adicional incluye administrar un régimen de mantenimiento que comprende administrar una dosis igual o inferior a la dosis tolerada más alta por el sujeto como la dosis de mantenimiento, y opcionalmente monitorizar adicionalmente niveles elevados de liso-SPM durante la administración del régimen de mantenimiento. En ciertas realizaciones, la dosis inicial de rhASM o una rhASM modificada puede variar desde aproximadamente 0,03 mg/kg hasta aproximadamente 1,0 mg/kg, o aproximadamente 0,1 mg/kg hasta aproximadamente 0,5 mg/kg (la concentración de una dosis se mide como mg de enzima por kg de peso corporal). En algunas realizaciones, cada dosis posterior de concentración de enzima elevada se administra aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, o 7 días, o 1, 2, 3, 4, o 5 semanas después de la dosis previa. En algunas realizaciones, la dosis posterior de enzima elevada puede ser una concentración de entre

aproximadamente 0,1 y 5 mg/kg (por ejemplo, aproximadamente 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5 o 5 mg/kg, o cualquier concentración intermedia).

En algunas realizaciones, se administra una dosis de enzima de reemplazo a una concentración dada al menos dos veces (por ejemplo, al menos 2, 3, 4, o 5 veces) antes de administrar la siguiente dosis de concentración más alta.

5 En ciertas realizaciones, la dosis sucesivamente más alta puede ser aproximadamente 0,03 mg/kg, 0,05 mg/kg, 0,1 mg/kg, 0,2 mg/kg, 0,3 mg/kg, 0,4 mg/kg, 0,5 mg/kg, 0,6 mg/kg, 0,7 mg/kg, 0,8 mg/kg, 0,9 mg/kg, 1 mg/kg, 1,2 mg/kg, 1,5 mg/kg, 1,75 mg/kg, 2 mg/kg, 3 mg/kg, 4 mg/kg o 5 mg/kg superior a la dosis previa (o cualquier valor intermedio). En algunas realizaciones, la dosis sucesivamente más alta puede ser aproximadamente 0,03 a
10 aproximadamente 0,1 mg/kg, aproximadamente 0,1 mg/kg a aproximadamente 0,5 mg/kg, aproximadamente 0,5 mg/kg a aproximadamente 1 mg/kg, aproximadamente 0,5 mg/kg a aproximadamente 2 mg/kg, aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 2 mg/kg, aproximadamente 2 mg/kg a aproximadamente 4 mg/kg, o aproximadamente 2 mg/kg a aproximadamente 5 mg/kg superior a la dosis previa (o cualquier valor intermedio). En ciertas realizaciones, la dosis tolerada más alta por el sujeto sin producción de metabolitos tóxicos o perjudiciales puede ser aproximadamente 1,0 mg/kg a aproximadamente 3,0 mg/kg. En algunas realizaciones, la dosis tolerada
15 más alta se administra posteriormente al sujeto humano como una dosis de mantenimiento. En algunas realizaciones, la dosis de mantenimiento se administra aproximadamente cada 1 a 8 semanas (por ejemplo, aproximadamente cada 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 semanas, o cualquier periodo de tiempo intermedio).

Una vez se identifica una dosificación tolerada máxima (por ejemplo, una dosis que no produce niveles tóxicos o de otro modo perjudiciales de metabolito), se puede usar como una dosis de mantenimiento para tratar que el sujeto
20 avance. La dosis de mantenimiento se puede administrar diariamente, semanalmente, bisemanalmente, mensualmente, bimensualmente o trimestralmente (o cualquier intervalo de tiempo intermedio). La monitorización para niveles elevados de liso-SPM se puede realizar durante la administración del régimen de mantenimiento, por ejemplo, 1, 2, 3, 5, 10, 12, 15 o 20 horas, o 1, 2, 3, 4, 5 días, o 1, 2, 3 o 4 semanas después de la administración de una dosis de mantenimiento, o cualquier periodo de tiempo intermedio. Si se detectan niveles elevados de liso-SPM
25 (por ejemplo, niveles superiores a un nivel de referencia de aproximadamente 100-700 ng/mL, o niveles de al menos aproximadamente 1,1-10 veces superiores a un nivel de referencia), entonces se puede reducir o interrumpir la dosis de mantenimiento.

Se pueden medir ciertos otros parámetros en combinación con liso-SPM para monitorizar un sujeto durante la
30 terapia (por ejemplo, durante ERT) y/o como parte de la terapia para determinar la dosis máxima que puede ser tolerada por el sujeto. Por ejemplo, el sujeto se puede monitorizar adicionalmente midiendo los niveles de SPM, niveles de ceramida en plasma, y/o concentraciones de bilirrubina. El sujeto también se puede monitorizar para la producción de "reactantes de fase aguda" y mediadores inflamatorios que son una medida de respuestas inflamatorias, y/o para otros marcadores bioquímicos. Estos otros marcadores bioquímicos pueden incluir, pero no se limitan a, CRP/hs-CRP, citocinas (por ejemplo, IL-8, IL-6), calcitonina y ferritina. En algunas realizaciones, se
35 pueden monitorizar uno o más de los parámetros enumerados anteriormente para garantizar una respuesta estable a la terapia antes de elevar la dosis a una concentración más alta. En algunas realizaciones, el sujeto también se puede monitorizar para uno o más acontecimientos adversos relacionados, que pueden incluir síntomas constitucionales (por ejemplo, fiebre, náuseas, vómitos, dolor, mialgia e ictericia). También se pueden monitorizar combinaciones de marcadores (por ejemplo, se pueden monitorizar niveles de liso-SPM en combinación con niveles
40 de bilirrubina y/o ceramida). Los niveles umbral adecuados para los marcadores que se pueden monitorizar en combinación con liso-SPM se desvelan, por ejemplo, en la solicitud de EE. UU. Nº 2011/0052559 (véanse, por ejemplo, los párrafos [0067]-[0086]).

En algunas realizaciones, un sujeto que recibe un protocolo de aumento de la dosis (por ejemplo, un protocolo de
45 aumento de la dosis de ERT) se monitoriza para efectos secundarios tóxicos o perjudiciales (por ejemplo, monitorizando los niveles de uno o más marcadores de toxicidad, tales como liso-SPM) después de cada ronda de administración terapéutica (por ejemplo, aproximadamente 1 minuto, 5 minutos, 10 minutos, 30 minutos, o 45 minutos, o 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 12, 18 o 24 horas, o 2, 3, 4, 5, 6 o 7 días, o 1, 2, 3 o 4 semanas o más después de la administración, o cualquier periodo de tiempo intermedio), o antes de la administración de una concentración más alta de agente terapéutico. En algunas realizaciones, el sujeto se monitoriza después de cada administración de una
50 dosis de mantenimiento (por ejemplo, aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 12, 18 o 24 horas, o 2, 3, 4, 5, 6 o 7 días, o 1, 2, 3 o 4 semanas o más después de la administración, o cualquier periodo de tiempo intermedio), o antes de la administración de una dosis de mantenimiento posterior de agente terapéutico. En algunas realizaciones, un sujeto recibe una dosis de mantenimiento durante uno, dos, tres o más años y se monitoriza periódicamente para efectos secundarios tóxicos o perjudiciales. La monitorización puede comprender monitorizar los marcadores de
55 toxicidad mencionados anteriormente, así como monitorizar acontecimientos adversos relacionados. Si el sujeto experimenta un acontecimiento adverso o si uno o más de los marcadores monitorizados indica un efecto secundario perjudicial (por ejemplo, si se detecta un nivel elevado de liso-SPM), entonces la administración de la dosis de mantenimiento puede ser terminada o ajustada (por ejemplo, se puede administrar una concentración reducida de ERT) para reducir o minimizar el efecto secundario no deseable.

60 En diversas realizaciones, un sujeto se puede monitorizar para una dosis tóxica y/o de otro modo perjudicial de ERT midiendo los niveles de liso-SPM de una muestra biológica obtenida después de la administración de una dosis de ERT (por ejemplo, después de la administración de rhASM o rhASM modificada). En algunas realizaciones, el

método puede comprender recoger una muestra biológica del sujeto, medir el nivel de liso-SPM en la muestra, comparar el nivel de liso-SPM en la muestra con un nivel de referencia, y detectar un efecto secundario adverso si el nivel de liso-SPM en la muestra es elevado en comparación con la muestra de referencia o elevado por una cantidad particular en comparación con la muestra de referencia. En algunas realizaciones, solo se administra la siguiente
 5 dosis de ERT a una concentración más alta si el nivel de liso-SPM en la muestra biológica no está por encima de un umbral definido después de la administración de la dosis previa. Se describen en el presente documento ejemplos de niveles umbral adecuados. En algunas realizaciones, también se monitorizan los niveles de liso-SPM durante la administración de la dosis de mantenimiento. En algunas realizaciones, si el nivel de liso-SPM supera un umbral
 10 definido durante la administración de la dosis de mantenimiento, entonces se interrumpe la administración de mantenimiento o se administra una dosis más baja que no da como resultado un nivel de liso-SPM por encima del umbral definido.

En algunas realizaciones, se puede detectar un efecto secundario adverso de ERT si el nivel de liso-SPM en la muestra biológica es superior a un nivel de referencia predeterminado. En algunas realizaciones, se puede detectar un efecto secundario adverso si el nivel de liso-SPM en la muestra biológica (por ejemplo, una muestra de sangre)
 15 es mayor que un nivel de referencia de aproximadamente 100-700 ng/mL (por ejemplo, superior a aproximadamente 100, 200, 250, 300, 400, 500, 600 o 700 ng/mL, o cualquier concentración intermedia). En algunas realizaciones, se puede detectar un efecto secundario adverso si el nivel de liso-SPM en la muestra biológica (por ejemplo, una muestra de sangre) es superior a un nivel de referencia en al menos aproximadamente 1,1, 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5,
 20 5, 5,5, 6, 6,5, 7, 7,5, 8, 8,5, 9, 9,5 o 10 veces, o más (o cualquier valor intermedio). Por ejemplo, el aumento puede ser al menos aproximadamente 3 veces.

En algunas realizaciones, los métodos de tratamiento de trastornos de ASM proporcionados en el presente documento reducen el volumen del bazo como se evalúa por técnicas conocidas en la técnica, por ejemplo, IRM. En ciertas realizaciones, los métodos reducen los niveles de esfingomielina en hígado como se evalúa por técnicas
 25 conocidas en la técnica, por ejemplo, análisis bioquímico y/o análisis histomorfológico de muestras de hígado. En algunas realizaciones, los métodos aumentan la capacidad de ejercicio como se evalúa por técnicas conocidas en la técnica, por ejemplo, máxima carga de trabajo por ergometría de ciclo, que incluye porcentaje de la máxima carga de trabajo predicha, consumo pico de oxígeno y/o producción de dióxido de carbono. En algunas realizaciones, los métodos aumentan la función pulmonar y/o mejoran la eliminación pulmonar, como se evalúa por técnicas conocidas
 30 en la técnica, por ejemplo, DLco, FVC, FEV y/o TLC. En ciertas realizaciones, los métodos disminuyen la esfingomielina de lavado alveolar bronquial (BAL). En ciertas realizaciones, los métodos mejoran el aspecto del pulmón como se evalúa por técnicas conocidas en la técnica, por ejemplo, TAC de alta resolución y/o radiografía del tórax.

En diversas realizaciones, los métodos de tratamiento de trastornos de ASM proporcionados en el presente documento disminuyen la concentración de esfingomielina en el hígado, piel y/o plasma, y/o reducen la quitotriosidasa en suero, niveles de CCL18, liso-SPM, ceramida y/o bilirrubina. En algunas realizaciones, los métodos mejoran el perfil de lípidos de un sujeto (por ejemplo, disminución de colesterol). En algunas realizaciones, los métodos mejoran una o más funciones neurológicas en un sujeto (por ejemplo, función psicomotora, sensibilidad social, etc.). En algunas realizaciones, los métodos reducen o mejoran la gravedad y/o duración de un trastorno de
 35 ASM y/o uno o más síntomas asociados al trastorno. En algunas realizaciones, los métodos previenen la reaparición de un síntoma asociado a un trastorno de ASM. En algunas realizaciones, los métodos aumentan la tasa de supervivencia de sujetos después del tratamiento.

Cribado y/o diagnóstico de un trastorno de ASM

En diversos aspectos, en el presente documento se desvelan métodos de cribado y/o diagnóstico de un trastorno de ASM. En algunos aspectos, el trastorno de ASM es la enfermedad de Niemann-Pick (NPD). En algunos aspectos, el
 45 trastorno es NPD tipo A, tipo B y/o tipo C. En algunos aspectos, un trastorno de ASM (por ejemplo, NPD) se pueden cribar y/o diagnosticar midiendo los niveles de liso-SPM en una muestra biológica tomada de un sujeto.

En algunos aspectos, un método de cribado y/o diagnóstico de un trastorno de ASM en un sujeto puede comprender recoger una muestra biológica del sujeto, medir el nivel de liso-SPM en la muestra, comparar el nivel de liso-SPM en la muestra con un nivel de referencia, y detectar/diagnosticar un trastorno de ASM si el nivel de liso-SPM en la
 50 muestra es elevado en comparación con el nivel de referencia. En algunos aspectos, un nivel de referencia es el nivel de liso-SPM medido en una muestra de un sujeto de control que no tiene un trastorno de ASM. En algunas realizaciones, un trastorno de ASM se pueden detectar/diagnosticar si el nivel de liso-SPM en la muestra biológica del sujeto es superior a un nivel de referencia predeterminado. En algunas realizaciones, se puede detectar/diagnosticar un trastorno de ASM si el nivel de liso-SPM en la muestra biológica (por ejemplo, una muestra de sangre) es mayor que un nivel de referencia de al menos aproximadamente 200-2000 ng/mL, tal como superior a
 55 aproximadamente 200 ng/mL, superior a aproximadamente 300 ng/mL, superior a aproximadamente 400 ng/mL, superior a aproximadamente 500 ng/mL, superior a aproximadamente 525 ng/mL, superior a aproximadamente 575 ng/mL, y/o superior a aproximadamente 700 ng/mL (por ejemplo, superior a aproximadamente 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 525, 550, 575, 600, 625, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950, 1000, 1050, 1100, 1150, 1200,
 60 1300, 1400, 1500, 1600, 1700, 1800, 1900 o 2000 ng/mL, o cualquier concentración intermedia). En algunas realizaciones, un trastorno de ASM se puede detectar/diagnosticar si el nivel de liso-SPM en la muestra biológica

(por ejemplo, una muestra de sangre) es mayor que un nivel de referencia en un factor de aproximadamente 1-10 veces.

Se pueden usar muestras biológicas de diversos tejidos con los métodos de cribado y diagnóstico descritos en el presente documento. Por ejemplo, se pueden usar muestras biológicas de tejidos periféricos, tales como plasma, sangre completa (por ejemplo, mancha de sangre seca), suero, piel y/u orina para monitorizar niveles elevados de liso-SPM. También se pueden usar muestras biológicas de otros tejidos, por ejemplo, bazo, pulmón, hígado, corazón, riñón y/o tejido cerebral. Se pueden usar muestras de combinaciones de dos o más tejidos (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, o más tejidos). En algunos aspectos, un trastorno de ASM (por ejemplo, NPD) se puede detectar/diagnosticar midiendo niveles de liso-SPM en una muestra biológica tomada de un tejido periférico. En ciertos aspectos, el tejido periférico puede ser plasma, sangre completa (por ejemplo, una mancha de sangre seca), suero y/u orina. El uso de una muestra periférica puede evitar la necesidad de procedimientos invasivos, tales como una biopsia de hígado.

En diversos aspectos, los métodos de cribado y/o diagnóstico desvelados en el presente documento pueden comprender además administrar un agente terapéutico (por ejemplo, una terapia de reemplazo enzimático) a un sujeto si se detecta/diagnostica un trastorno de ASM. En algunos aspectos, la terapia de reemplazo enzimático comprende administrar una rhASM o una rhASM modificada al sujeto.

Kit

En diversos aspectos, se desvela un kit en el presente documento que comprende un dispositivo para recoger una muestra biológica que contiene liso-SPM y/u otros marcadores de un trastorno de ASM, e instrucciones para usar el kit para medir el nivel de liso-SPM y/u otros marcadores en la muestra biológica. En algunos aspectos, el dispositivo para recoger una muestra biológica puede comprender un tubo de ensayo, jeringa, y/u otro recipiente para almacenar una muestra de fluido, y/o una tira de ensayo, tira reactiva, etc. También se pueden usar cualquier otro dispositivo conocido en la técnica para recoger una muestra biológica. En algunos aspectos, la muestra biológica es una muestra de un tejido periférico, tal como plasma, sangre completa (por ejemplo, mancha de sangre seca), suero, piel, y/u orina. También se pueden recoger muestras biológicas de otros tejidos, por ejemplo, bazo, pulmón, corazón, hígado, riñón y/o tejido cerebral, y el kit comprende un dispositivo para recoger una muestra de los tejidos enumerados. Se pueden usar muestras de una combinación de dos o más tejidos.

En algunos aspectos, el kit puede comprender además un dispositivo para medir el nivel de liso-SPM y/u otros marcadores en la muestra biológica. Por ejemplo, el kit puede incluir un anticuerpo y/u otros agentes de detección que se pueden usar para detectar la liso-SPM u otros marcadores en la muestra biológica. En algunos aspectos, el agente de detección se incluye en o sobre el dispositivo de recogida de tejido (por ejemplo, un anticuerpo o producto químico indicador impregnado sobre una tira reactiva), mientras que en otras realizaciones, el agente de detección se proporciona por separado del dispositivo de recogida.

En algunos aspectos, un kit puede comprender además un dispositivo para cuantificar o semi-cuantificar el nivel de liso-SPM y/u otros marcadores en la muestra. Por ejemplo, se puede proporcionar un agente (por ejemplo, un agente colorimétrico) que reacciona con el agente de detección para emitir una señal detectable cuya fuerza, intensidad, color, etc., se pueden usar para determinar cuantitativamente o semi-cuantitativamente el nivel de liso-SPM y/u otros marcadores en la muestra (por ejemplo, por comparación con la señal de una o más muestras de referencia). En algunos aspectos, el dispositivo puede comprender un dispositivo para separar liso-SPM de los otros componentes de la muestra, por ejemplo, usando cromatografía de líquidos y/o espectrometría de masas. En algunos aspectos, el dispositivo para cuantificar el nivel de liso-SPM y/u otros marcadores en la muestra es un espectrómetro, tal como un espectrómetro de masas, por ejemplo, LC/MS/MS, o un espectrómetro de frecuencia electromagnética, por ejemplo, UV-VIS, IR, o RMN.

En algunos aspectos, el kit puede comprender además instrucciones para comparar el nivel de liso-SPM y/u otros marcadores en la muestra con un nivel de referencia y para detectar la presencia de niveles tóxicos de uno o más metabolitos y/o un efecto secundario adverso durante un tratamiento de un trastorno de ASM si el nivel de liso-SPM y/u otros marcadores de toxicidad en la muestra son elevados en comparación con una o más muestras de referencia. En algunos aspectos, el kit puede comprender además instrucciones para comparar el nivel de liso-SPM en la muestra con el nivel en una muestra de referencia y para cribar y/o diagnosticar un trastorno de ASM si el nivel de liso-SPM en la muestra es elevado en comparación con el nivel en la muestra de referencia.

En algunos aspectos, el kit se puede usar como parte de una terapia y/o para diagnosticar un trastorno de ASM. En algunos aspectos, el trastorno de ASM es NPD-A, NPD-B, o NPD-C.

Poblaciones de sujetos

En diversos aspectos, un sujeto como se usa en el presente documento es un humano que está siendo cribado para un trastorno de ASM. En diversos aspectos, un sujeto como se usa en el presente documento es un sujeto diagnosticado con o tratado para un trastorno de ASM según los métodos proporcionados en el presente documento, es un ser humano que tiene o está diagnosticado con un trastorno que da como resultado la excesiva acumulación de SPM lisosomal en uno o más órganos de patología. En algunas realizaciones, el sujeto tiene una o más

mutaciones en el gen que codifica esfingomielinasa ácida, por ejemplo, una delección, un desplazamiento del marco, una mutación de aminoácido, y/o una mutación terminadora. En una realización, el sujeto tiene NPD-A, o NPD-B.

5 En algunas realizaciones, un sujeto tiene una o más mutaciones en el gen *SMPD1*. En ciertas realizaciones, la mutación es $\Delta R608$ (delección de arginina 608). En algunas realizaciones, la mutación es una mutación de aminoácido. En ciertas realizaciones, la mutación de aminoácido es L302P, H421Y o R496L. En otras realizaciones, la mutación es una delección que da como resultado la delección de uno, dos, tres, o más restos de aminoácidos. En realizaciones específicas, un sujeto tratado para un trastorno de ASM según los métodos proporcionados en el presente documento tiene una o más de las mutaciones mostradas en la Tabla 1 en la solicitud de EE. UU. N° 2011/0052559. Véase también Simonaro et al., *Am. J. Hum. Genet.* 71: 1413-1419 (2002) para mutaciones en el gen de esfingomielinasa ácida (designado *SMPD1*).

10 En ciertas realizaciones, un sujeto que es cribado para o diagnosticado con o tratado para un trastorno de ASM según los métodos proporcionados en el presente documento pueden expresar endógenamente ASM, pero con aproximadamente 2 a 5 %, 5 a 10 %, 5 a 15 %, 5 a 20 %, 5 a 30 %, 20 % a 30 %, o 5 a 35 % de la actividad de ASM humana normal (por ejemplo, no mutada), por ejemplo, ASM-1. En algunas realizaciones, el sujeto expresa endógenamente ASM con menos de 35 %, 30 %, 25 %, 20 %, 15 %, 10 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 % o 1 % de la actividad de ASM humana normal, por ejemplo, ASM-1. Véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. N° 4.039.388, 4.082.781, 5.686.240 y 7.563.591, y las publicaciones internacionales N° WO 2007/078806 y WO 2006/058385, para técnicas que se pueden usar para medir la actividad de ASM; véase también el ensayo de cromatografía de líquidos de alto rendimiento basado en fluorescencia descrito en He et al., *Analytical Biochemistry* 314: 116-120 (2003).

20 En diversas realizaciones, un sujeto que es cribado para o diagnosticado con o tratado para un trastorno de ASM según los métodos proporcionados en el presente documento puede mostrar uno o más síntomas de NPD. Los síntomas de NPD pueden incluir, pero no se limitan a, un abdomen distendido, hepatomegalia, esplenomegalia, hepatoesplenomegalia, neutropenia, enfermedad pulmonar, linfadenopatía, la presencia de macrófagos espumosos de NPD histoquímicamente característicos, anemia (por ejemplo, anemia microcítica), trombocitopenia, vómitos recurrentes, estreñimiento crónico, fallo del crecimiento (por ejemplo, disminución del crecimiento lineal y peso corporal), retraso de la pubertad, cardenales recurrentes, hemorragia recurrente, perfil aterogénico de lípidos (colesterol alto, triglicéridos, o LDL, y/o HDL bajo), dolor (cefalea, espalda, extremidades, abdomen), fatiga, saciedad precoz, bajo aguante, osteopenia, manifestaciones neurológicas y dificultades respiratorias (por ejemplo, enfermedad pulmonar intersticial y/o disnea). La manifestación neurológica de NPD incluye mancha rojo cereza, hipotonía, debilidad muscular, retardo psicomotor, espasticidad, insensibilidad social, irritabilidad y/o convulsiones.

30 En ciertas realizaciones, un sujeto que se criba para o diagnostica con o se trata para un trastorno de ASM según los métodos proporcionados en el presente documento es un lactante humano. En otras realizaciones, el sujeto es un niño humano. En ciertas realizaciones, el sujeto es un adulto humano (18 años o mayor). En ciertas realizaciones, el sujeto es una mujer. En otras realizaciones, el sujeto es un hombre. En ciertas realizaciones, el sujeto es una mujer que no está embarazada o no es lactante.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos sirven para ilustrar, y de ninguna forma limitar, la presente divulgación.

Ejemplo 1: Materiales y métodos

40 La sangre completa usada en el estudio se adquirió de 20 sujetos con NPD-B previamente diagnosticados tras el consentimiento informado por escrito y de 20 adultos sanos (comprada de ProMedDx, LLC, Norton, MA). Se extrajo sangre venosa en tubos Vacutainer® (Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ) que contenían EDTA, se enviaron sobre paquetes fríos durante la noche, y se mantuvieron a 4 °C. En el plazo de 48 horas desde la recogida, la sangre se mezcló invirtiendo los tubos varias veces, y se extendieron 75 μ L de sangre por mancha sobre papel de recogida de especímenes Whatman 903® y se secaron a temperatura ambiente durante al menos 4 horas.

45 Para cuantificar liso-SPM, se usó 1-O-hexadecil-(7,7,8,8-d4)-2-O-acetil-sn-gliceril-3-fosforilcolina (factor de activación de plaquetas C16-d4; PAF C16-D4, Cayman Chemical Company, Ann Arbor, Michigan) como patrón interno. Se extrajo una perforación de 3,2 mm de las manchas de sangre seca (DBS) en 200 μ L de metanol/acetoneitrilo/agua (80/15/5) que contenía 0,8 ng de patrón interno, se agitó con vórtex durante 30 minutos, y se sonicó durante 10 minutos. Se aclaró el eluyente por centrifugación durante 5 minutos a 16.200 g y luego se inyectaron 30 μ L en un sistema de LC/MS/MS API Qtrap 4000 (AB Sciex, Toronto, Canadá) interconectado con un sistema de cromatografía líquida de alta presión (HPLC) Agilent 1100 (Agilent, Palo Alto, CA). Se realizó HPLC con una columna de sílice de fase normal en modo isocrático usando una mezcla de metanol/acetoneitrilo/agua como fase móvil. Se realizó espectrometría de masas (MS) en modo de monitorización de múltiples reacciones (MRM) con las siguientes transiciones: m/z 465,4>184,1 para liso-SPM y 528,5>184,1 para PAF C16-D4. Para cuantificar SPM, se usó C12-SPM (Avanti Polar Lipids, Alabaster, Alabama) como patrón interno. La extracción y los procedimientos de LC/MS/MS fueron similares a los usados para liso-SPM, excepto que el eluyente se diluyó 320 veces antes de la inyección y se monitorizaron y resumieron las doce isoformas de SPM.

Ejemplo 2: Diagnóstico de NPD

Aunque se sabe que los niveles de SPM eran elevados más de 10 veces en los hígados y bazo de sujetos con NPD-B, los niveles de SPM en el plasma de sujetos con NPD-B no son apreciablemente elevados y se solapan con los de controles normales. Como se muestra en la **FIG. 1A**, el nivel de SPM en pacientes con NPD-A y NPD-B no fue significativamente elevado, como se muestra por la relación de la concentración de SPM en manchas de sangre seca (DBS) de pacientes con NPD-A y NPD-B con el valor medio de concentración en DBS de muestras de control normales. SPM es un componente importante de las membranas celulares y lipoproteínas, y la ligera elevación de SPM en DBS de sujetos con NPD se puede relacionar con sus niveles ya altos y la rápida renovación en la circulación.

A diferencia de SPM, los niveles de liso-SPM fueron claramente elevados en DBS de sujetos con NPD-A y NPD-B. Como se muestra en la **FIG. 1B**, el nivel de liso-SPM en pacientes con NPD-A y NPD-B fue elevado, como se muestra por la relación de la concentración de liso-SPM en manchas de sangre seca (DBS) de pacientes con NPD-A y NPD-B con el valor medio de concentración en DBS de muestras de control normales. El nivel de liso-SPM no se correlacionó con la cantidad de actividad residual de ASM en DBS ni con la edad del sujeto en la recogida. En conclusión, liso-SPM es elevada en tejido periférico (DBS) de sujetos con NPD a niveles que son distinguibles de los controles normales.

Ejemplo 3: Efecto del aumento de la dosis en ratón

Estudios previos en ratones inactivados en ASM (ratones de modelo Niemann-Pick, véase por ejemplo, Horinouchi et al., *Nature Genetics*, 10: 288-293 (1995)) demostraron que los síntomas clínicos de toxicidad no se observaron hasta que se usaron dosis únicas superiores o iguales a 10 mg/kg. Nickerson et al., "Dose Responsive Toxicological Findings Following Intravenous Administration of Recombinant Human Acid Sphingomyelinase (rhASM) to Acid Sphingomyelinase Knock-out (ASMKO) Mice", *American Society of Human Genetics* 2005; y Murray et al., "Elevations of Pro-Inflammatory Cytokines and Decreases in Cardiovascular Hemodynamics Following Intravenous Administration of Recombinant Human Acid Sphingomyelinase (rhASM) to Acid Sphingomyelinase Knock-out (ASMKO) Mice", *Society of Toxicology* 2006.

En el presente estudio, ratones inactivados en ASM se administraron con una dosis intravenosa única de rhASM a una de tres concentraciones diferentes: 0 mg/kg, 3 mg/kg (dosis no tóxica, no se observaron efectos adversos clínicamente evidentes), o 20 mg/kg (dosis tóxica). Se asignaron 3 ratones macho y 3 hembra a cada grupo de dosificación (18 animales en total) y se recogieron muestras de sangre en los momentos indicados en la Tabla 1.

Tabla 1

Grupo	Tratamiento	Dosis (mg/kg)	Tipo de muestra	Momentos de tiempo de recogida de muestras
1	rhASM	0	DBS	5 minutos y 6, 24, 48 y 72 horas después de la dosis
2		3		5 minutos y 6, 24, 48 y 72 horas después de la dosis
3		20		5 minutos y 1, 4, 6 y 9 horas después de la dosis

Se cuantificaron los niveles de liso-SPM de muestras de DBS y mostraron que los niveles aumentaron al aumentar las concentraciones de dosis de rhASM, alcanzando el máximo para los grupos de tratamiento de 3 mg/kg y 20 mg/kg aproximadamente 6 horas después de la dosis. Véase la **FIG. 2**, un histograma que muestra la elevación en veces en las concentraciones de liso-SPM en DBS para las tres dosis en los momentos de tiempo muestreados después de la dosis, en comparación con la concentración 5 minutos después de la dosis. Sorprendentemente, el aumento en veces en la concentración plasmática de liso-SPM en respuesta a una dosis tóxica (20 mg/kg) de rhASM fue notablemente superior al aumento en veces en la concentración plasmática de liso-SPM en respuesta a una dosis no tóxica (3 mg/kg) de rhASM. Este resultado sugiere que liso-SPM es útil como marcador para calibrar los efectos tóxicos de un agente terapéutico que reduce el nivel de SPM acumulada en un paciente con un trastorno de ASM.

Ejemplo 4: Comparación de regímenes de dosis única y de reducción

Se obtuvieron manchas de sangre seca de ratones no mutantes (C57BL/6) o inactivados en ASM (ASMKO) tras la administración de una dosis única o una pauta posológica de reducción de rhASM. Se administraron cinco ratones ASMKO con una dosis única de 10 mg/kg de rhASM. Se trataron cinco ratones C57BL/6 y cinco ASMKO usando un régimen de reducción de 3 mg/kg de rhASM y luego se administraron con una dosis de 20 mg/kg. Se tomaron muestras de sangre en los siguientes momentos de tiempo: 5 minutos, 4 horas, 6 horas, 24 horas y 72 horas después de la dosis. Los animales en el grupo de dosificación de 10 mg/kg se tuvieron que sacrificar después del momento de tiempo de 24 horas.

5 Se prepararon las 70 muestras de manchas de sangre usando el procedimiento de múltiples extracciones de lípidos y se analizaron por LC/MS/MS. Brevemente, se perforaron manchas de DBS individuales de cada tarjeta de muestra y se dispusieron en tubos Eppendorf individuales. Entonces se añadieron doscientos microlitros de una disolución 80:15:5 (MeOH:ACN:H₂O) a cada tubo antes se agitar con vórtex durante 30 minutos, se sonicaron 10 minutos, y se centrifugaron para sedimentar cualquier partícula. Se usó una curva de calibración de liso-SPM (sin patrón interno) para determinar la concentración de liso-SPM en cada muestra.

10 Los datos en la **FIG. 3** muestran que los niveles de liso-SPM solo aumentaron en el grupo de ASMKO que se trató con una única dosis (alta) de rhASM a 10 mg/kg, a diferencia del grupo de ASMKO sometido a un régimen de reducción. A dicha dosis alta, se espera que al menos 50 % de los ratones mueran entre 24 y 72 horas, mientras que todos los ratones deben sobrevivir en el régimen de reducción. Estos resultados sugieren que liso-SPM podría ser útil como marcador para calibrar el efecto tóxico de una dosis alta de un agente terapéutico.

Ejemplo 5: Prueba humana

15 Se recogieron muestras de sangre de pacientes con Niemann-Pick que estaban tratándose con rhASM. Se muestra un ejemplo representativo en la **FIG. 4**. Se recogieron muestras antes de la dosis, y 24, 48 y 72 horas después de la administración de una dosis indicada (0,1, 0,3, 0,6, 1, 2 o 3 mg/kg) de rhASM durante un periodo de 26 semanas (día 1, semana 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 y 26). A las 26 semanas, se tomaron muestras solo antes de la dosis y 24 y 48 horas después de la dosis. Se midieron los niveles de liso-SPM en ng/mL. Los datos muestran una tendencia descendente general en los niveles de liso-SPM tras las dosis repetidas a mayores concentraciones, con fluctuaciones en el nivel de liso-SPM entre los momentos de tiempo de antes de la dosis y 72 horas después de la dosis tras cada dosis individual. La muestra después de la dosis más temprana se tomó después de 24 horas, momento en el cual puede no haberse observado un pico en la concentración de liso-SPM tras la administración. Las dosificaciones administradas también pueden haber estado por debajo de la concentración necesaria para observar un pico significativo en el nivel de liso-SPM tras la administración.

25 Los ejemplos precedentes pretenden ilustrar y no limitar de forma alguna la presente divulgación. Otras realizaciones de los dispositivos y métodos desvelados serán evidentes para los expertos en la técnica en consideración de la memoria descriptiva y la práctica de los dispositivos y métodos desvelados en el presente documento.

REIVINDICACIONES

1. Un agente terapéutico para su uso en un método de tratamiento de un sujeto humano que tiene una deficiencia de esfingomielinasa ácida (ASMD), en donde:
- 5 (a) se administra al sujeto una primera dosis de un agente terapéutico que tiene una primera concentración para tratar una ASMD; y
- (b) se administra al sujeto una segunda dosis del agente terapéutico que tiene una segunda concentración igual o superior a la primera concentración si se ha determinado que una muestra biológica del sujeto tiene un nivel de liso-esfingomielina (liso-SPM) que es inferior o igual a un nivel de referencia después de la administración de la primera dosis,
- 10 en donde el agente terapéutico comprende una esfingomielinasa ácida humana recombinante (rhASM), en donde la primera dosis del agente terapéutico comprende 0,03 a 1,0 mg/kg de rhASM.
2. Un agente terapéutico para su uso en un método de tratamiento de un sujeto humano que tiene una deficiencia de esfingomielinasa ácida (ASMD), en donde:
- (a) el agente terapéutico se administra repetidamente al sujeto; y
- 15 (b) se mide periódicamente el nivel de liso-esfingomielina (liso-SPM) en una muestra biológica obtenida después de la administración de una dosis del agente terapéutico al sujeto, en donde una disminución del nivel de liso-SPM en comparación con un nivel de referencia indica eficacia del agente terapéutico,
- en donde el agente terapéutico comprende una esfingomielinasa ácida humana recombinante (rhASM), en donde la primera dosis del agente terapéutico comprende 0,03 a 1,0 mg/kg de rhASM.
- 20 3. El agente terapéutico para el uso de la reivindicación 2, en donde el nivel de liso-esfingomielina (liso-SPM) se mide en una muestra biológica obtenida de tres días a 4 semanas después de la última dosis del sujeto y en donde la dosis del agente terapéutico es de concentración creciente.
4. El agente terapéutico para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el nivel de referencia es el nivel inicial de liso-SPM del sujeto antes de cualquier tratamiento con el agente terapéutico.
- 25 5. El agente terapéutico para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde cada dosis del agente terapéutico se administra dos semanas después de la dosis previa y es de concentración creciente.
6. El agente terapéutico para el uso de la reivindicación 1, en donde cada dosis del agente terapéutico a una concentración dada se administra al menos dos veces.
- 30 7. El agente terapéutico para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde la muestra biológica se recoge antes de la administración de la siguiente dosis.
8. El agente terapéutico para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en donde la muestra biológica es sangre completa, una mancha de sangre seca, plasma, o suero.
9. El agente terapéutico para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en donde el agente terapéutico se administra por vía intravenosa.
- 35 10. El agente terapéutico para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en donde una dosis de mantenimiento del agente terapéutico se administra adicionalmente, en donde la dosis de mantenimiento es igual o inferior a la dosis más alta del agente terapéutico tolerada por el sujeto.
11. El agente terapéutico para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en donde la ASMD es enfermedad de Niemann-Pick (NPD) tipo A o NPD tipo B.
- 40 12. El agente terapéutico para el uso de la reivindicación 10, en donde se administra una dosis de mantenimiento del agente terapéutico que comprende rhASM a 1, 2 o 3 mg/kg.

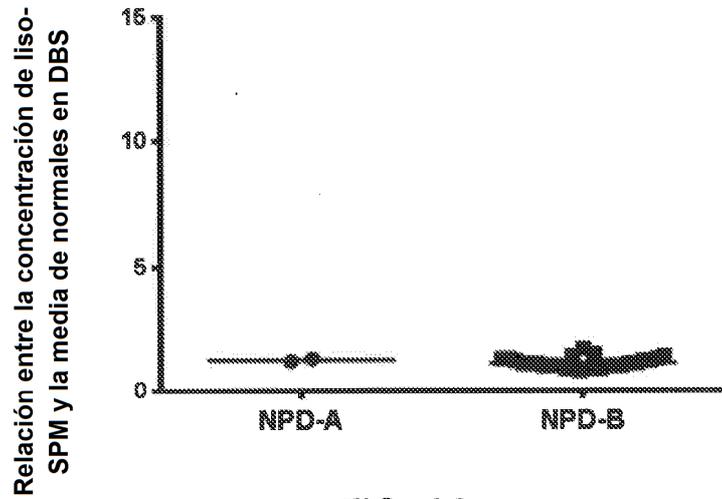


FIG. 1A

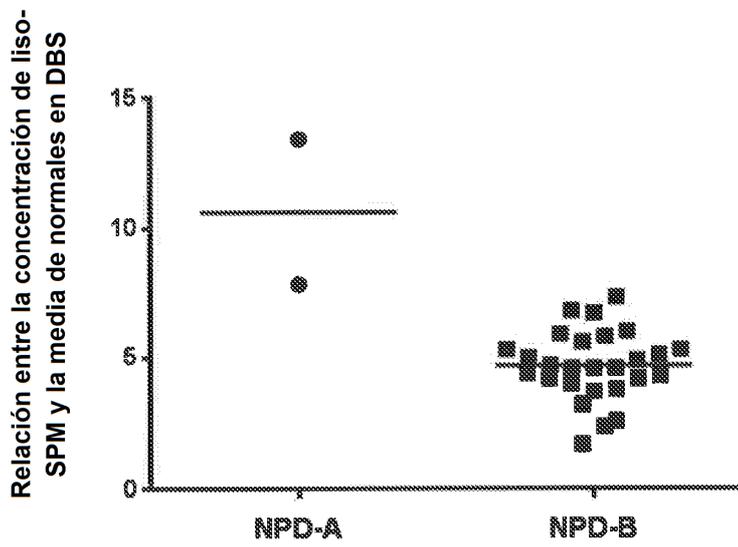


FIG. 1B

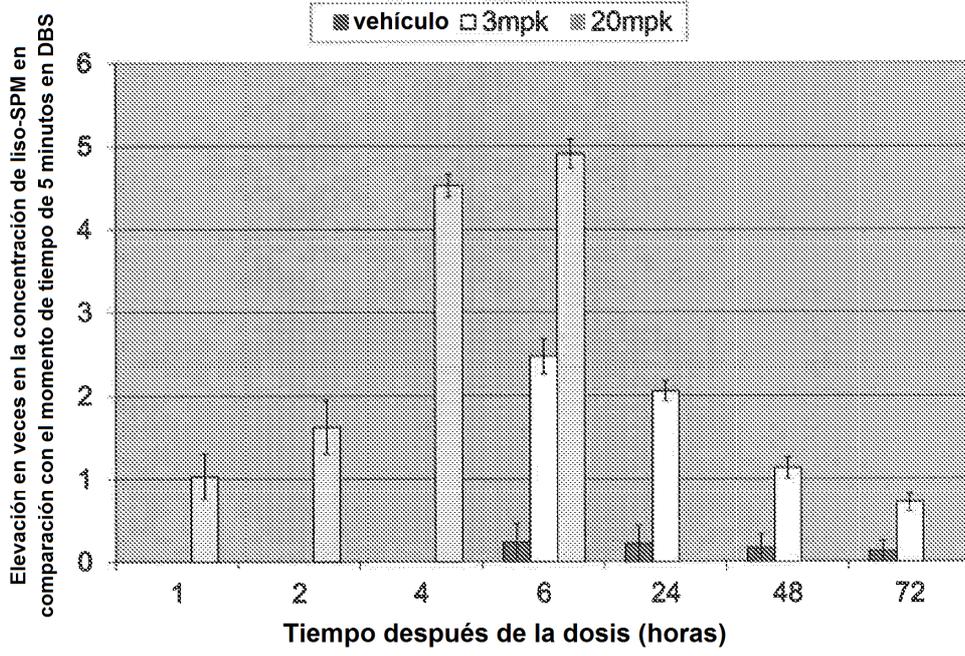


FIG. 2

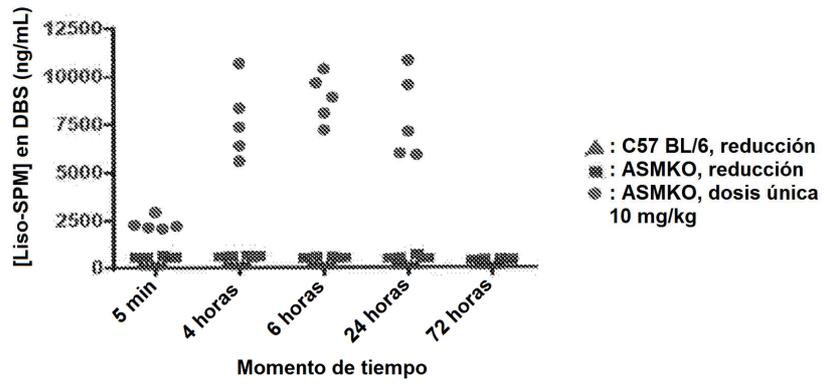


FIG. 3

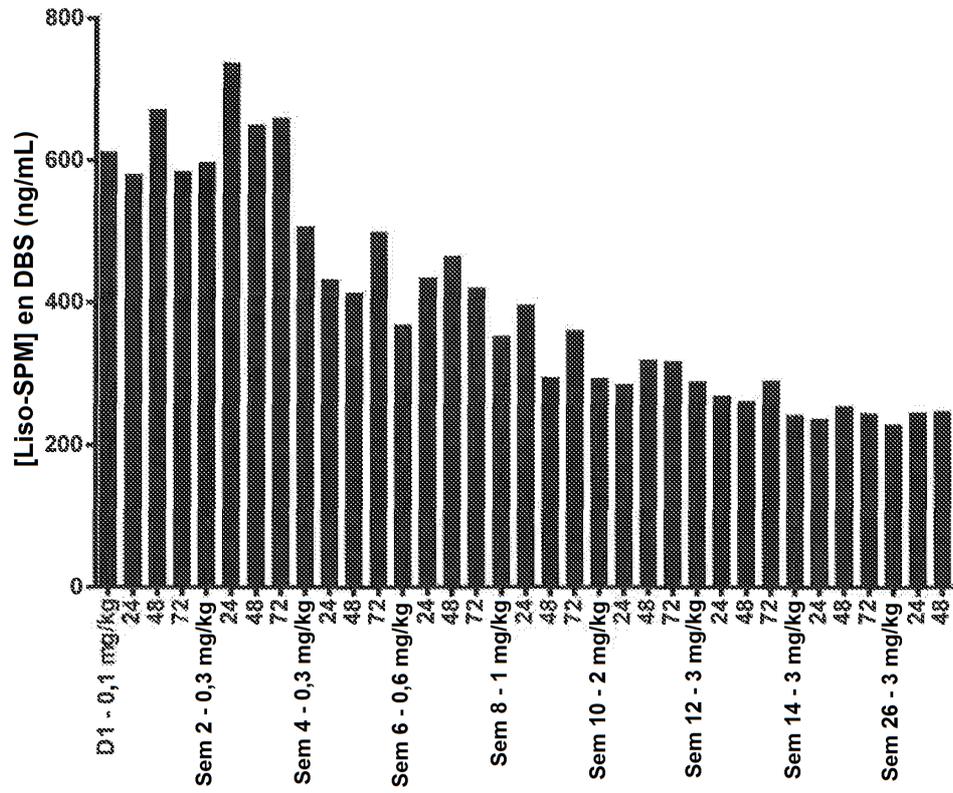


FIG. 4