

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2020-505317

(P2020-505317A)

(43) 公表日 令和2年2月20日 (2020.2.20)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 35/51 (2015.01)	A 6 1 K 35/51	4 B 0 5 0
A 6 1 P 25/00 (2006.01)	A 6 1 P 25/00	4 C 0 8 4
A 6 1 P 37/06 (2006.01)	A 6 1 P 37/06	4 C 0 8 5
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 2 1	4 C 0 8 6
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	4 C 0 8 7
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 64 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2019-522742 (P2019-522742)
 (86) (22) 出願日 平成30年1月19日 (2018.1.19)
 (85) 翻訳文提出日 令和1年5月15日 (2019.5.15)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2018/014370
 (87) 国際公開番号 W02018/136710
 (87) 国際公開日 平成30年7月26日 (2018.7.26)
 (31) 優先権主張番号 62/448, 433
 (32) 優先日 平成29年1月20日 (2017.1.20)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関
 米国 (US)

(71) 出願人 504279968
 ユニバーシティ オブ ピッツバーグ –
 オブ ザ コモンウェルス システム
 オブ ハイヤー エデュケーション
 アメリカ合衆国 1 5 2 6 0 ペンシルバ
 ニア州, ピッツバーグ, サッカレイ アヴ
 ェニュー 1 3 0, ガードナー スティール
 カンファレンス センター ファース
 ト フロア
 (74) 代理人 100078282
 弁理士 山本 秀策
 (74) 代理人 100113413
 弁理士 森下 夏樹
 (74) 代理人 100181674
 弁理士 飯田 貴敏

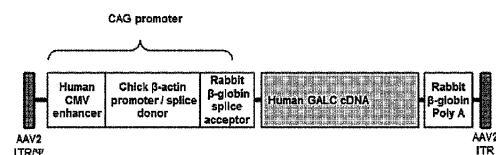
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 臍帯血移植 (U C B T) および増加したガラクトセレブロシダーゼの発現によるクラッペ病の処置

(57) 【要約】

本出願は、例えば、乳児においてクラッペ病を処置する方法を提供する。そのような方法は、例えば、骨髄アブレーションレジメンを施すことにより、患者を免疫抑制し、臍帯血移植 (U C B T) (アロジェニック U C B T など) を施し、患者においてガラクトセレブロシダーゼ (G A L C) の発現を増やす (例えば、遺伝子編集を使用することにより) ことを含むことが可能である。本発明は、例えば、対象においてクラッペ病を処置する方法であって、前記対象を免疫抑制すること、治療有効量の臍帯血を前記対象に投与すること、およびガラクトセレブロシダーゼ (G A L C) をコードする治療有効量の核酸分子を前記対象に投与することを含む方法を提供する。

FIG. 1



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

対象においてクラッペ病を処置する方法であって、
前記対象を免疫抑制すること、
治療有効量の臍帯血を前記対象に投与すること、および
ガラクトセレブロシダーゼ (G A L C) をコードする治療有効量の核酸分子を前記対象に投与すること
を含む方法。

【請求項 2】

G A L C をコードする前記核酸分子が、配列番号 1 に対して少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、少なくとも 98 %、少なくとも 99 %、または 100 % の配列同一性を含む、請求項 1 に記載の方法。

10

【請求項 3】

前記核酸分子が、配列番号 2 に対して少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、少なくとも 98 %、少なくとも 99 %、または 100 % の配列同一性を含む G A L C タンパク質をコードする、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 4】

G A L C をコードする前記核酸分子が、プロモーターに作動可能に連結している、請求項 1 から 3 のいずれかに記載の方法。

【請求項 5】

G A L C をコードする前記核酸分子が静脈内に投与される、請求項 1 から 4 のいずれかに記載の方法。

20

【請求項 6】

G A L C をコードする前記核酸分子がベクターの一部である、請求項 1 から 5 のいずれかに記載の方法。

【請求項 7】

前記ベクターがウイルスベクターである、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】

前記ウイルスベクターがアデノ随伴ベクター (A A V) である、請求項 7 に記載の方法。

30

【請求項 9】

前記アデノ随伴ベクターが A A V セロタイプ r h . 10 である、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】

前記ウイルスベクターが、対象あたり少なくとも 2×10^{13} g c、または対象あたり少なくとも 2×10^{14} g c の用量で投与される、請求項 7 から 9 のいずれかに記載の方法。

【請求項 11】

前記臍帯血が、G A L C をコードする前記核酸分子の前に投与される、請求項 1 から 10 のいずれかに記載の方法。

40

【請求項 12】

前記臍帯血が、G A L C をコードする前記核酸分子の 1 日前に投与される、請求項 1 から 11 のいずれかに記載の方法。

【請求項 13】

前記臍帯血が前記対象にアロジェニックである、請求項 1 から 12 のいずれかに記載の方法。

【請求項 14】

治療有効量の臍帯血の投与が、前記対象に少なくとも 3×10^7 / k g の総有核細胞用量を投与することを含む、請求項 1 から 13 のいずれかに記載の方法。

【請求項 15】

50

前記対象を免疫抑制することが、治療有効量のアレムツズマブ、ヒドロキシ尿素、フルダラビン、およびブスルファンを投与することを含む、請求項 1 から 14 のいずれかに記載の方法。

【請求項 16】

前記対象を免疫抑制することが、治療有効量のタクロリムスおよびミコフェノール酸モフェチル (MMF) を投与することをさらに含む、請求項 1 から 15 のいずれかに記載の方法。

【請求項 17】

前記クラッペ病が乳児クラッペ病である、請求項 1 から 16 のいずれかに記載の方法。

【請求項 18】

対象において遺伝性疾患を処置する方法であって、
前記対象において骨髄を部分的にまたは完全にアブレーションすること、
前記対象に治療有効量の造血幹細胞 (HSC) を投与すること、および
前記対象に治療有効量の治療用核酸分子を投与すること
を含み、前記核酸分子が前記遺伝性疾患を修正する、方法。

【請求項 19】

骨髄を部分的にまたは完全にアブレーションすることが、前記対象に治療量の化学療法、放射線照射、または両方を施すことを含む、請求項 18 に記載の方法。

【請求項 20】

前記 HSC の投与に続いて、前記対象に治療有効量の免疫抑制剤を投与することをさらに含む、請求項 18 または 19 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本願は、2017年1月20日に出願された米国仮出願第62/448,433号の利益を主張し、その全体が参照によって本明細書に組み込まれる。

【0002】

分野

本出願は、患者を免疫抑制し、臍帯血移植 (UCBT) を提供し、患者においてガラクトセレブロシダーゼ (GALC) の発現を増加させる (例えば、GALCを発現するウイルスベクターを使用することにより) ことにより、クラッペ病を処置する方法を提供する。他の遺伝性疾患を処置するための類似の方法も提供される。

【背景技術】

【0003】

背景

クラッペ病は、神経系における正常な髄鞘形成の発達および維持に不可欠な酵素であるガラクトセレブロシダーゼ (GALC) の欠損または非存在により引き起こされる希な遺伝性リソソーム蓄積障害である。早期乳児クラッペ病として公知の、最も重篤な型のこの状態を抱えた子供は、生後6ヶ月までに症状を発症し、急速進行性神経変性を経験し、典型的には生後2年までに死亡する。遅発乳児および若年症状を含む、遅発性型のこの疾患を抱えた患者では、著しい身体障害および早期死亡も起きる場合がある。

【0004】

臍帯血移植 (UCBT) を用いた処置は、早期乳児および遅発乳児型のクラッペ病を抱えた個体において認知を保存し寿命を延ばすのに有効となり得る。UCBTは神経症状の発症の前に脳変性の進行を停止させるが、罹患患者に著しい運動障害をもたらす末梢神経疾患の徴候を処置するのに有効ではない。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0005】

10

20

30

40

50

本明細書ではクラッペ病を処置するための方法が提供される。一部の例では、そのような方法は、対象を免疫抑制し、治療有効量の臍帯血を対象に投与すること（例えば、UCBTを実施すること）、ガラクトセレブロシダーゼ（GALC）をコードする治療有効量の核酸分子を対象に投与すること（例えば、GALC発現を増やすため）を含む。処置を受ける対象は、早期乳児クラッペ病、遅発乳児クラッペ病、または若年型クラッペ病などのいかなる型のクラッペ病を有していてもよい。一部の例では、対象は早期乳児クラッペ病を有し、生後6ヶ月未満のヒト乳児である。一部の例では、対象は、ヒト、ネコ、またはイヌなどの哺乳動物である。

【0006】

一部の例では、臍帯血は、GALCをコードする核酸分子の少なくとも12時間、少なくとも24時間、少なくとも48時間、少なくとも72時間、または少なくとも96時間前になど、GALCをコードする核酸分子の前に投与される。一部の例では、臍帯血は対象にアロジェニック（allogenic）である。そのような例では、HLA適合ドナーは処置を受ける対象に6つのHLAマーカーのうち少なくとも4つが適合する。一部の例では、対象に少なくとも 3×10^7 の総有核細胞用量/kg調整理想体重（AIBW）が投与される。

【0007】

GALCをコードする核酸は、処置される対象に適合させることが可能である。したがって、例えば、処置される対象がネコの場合、ネコGALCコード配列を使用することが可能であり、処置される対象がヒトの場合、ヒトGALCコード配列を使用することが可能である。一部の例では、GALCをコードする核酸分子は、配列番号1に対して少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%の配列同一性を有する。一部の例では、核酸分子は、配列番号2に対して少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%の配列同一性を含むGALCタンパク質をコードする。GALCをコードする核酸分子は、プロモーターに作動可能に連結することが可能である。GALCをコードする核酸分子は、例えば、裸のDNAとして直接投与することが可能である、またはプラスミドもしくはウイルスベクター、例えば、アデノ随伴ベクター（AAV）、例えば、AAVセロタイプrh.10などの血液脳関門を通過することが可能なウイルスベクターなどのベクターの一部として投与することが可能である。一部の例では、GALCをコードする核酸分子は静脈内に投与される。一部の例では、GALCをコードする核酸分子は、ウイルスベクターの一部である場合、対象あたり少なくとも 2×10^{14} gcの用量で投与される。一部の例では、GALCをコードする核酸分子は、ウイルスベクターの一部である場合、少なくとも 1×10^{11} gc/kg、少なくとも 1×10^{12} gc/kg、少なくとも 1×10^{13} gc/kgまたは少なくとも 1×10^{14} gc/kgの用量で投与される。

【0008】

対象は、UCBT、およびGALCをコードする核酸分子を受ける前に免疫抑制され得る。一部の例では、そのようなステップは、治療有効量のアレムツズマブ、ヒドロキシ尿素、フルダラビン、およびブスルファンを投与することを含む。一部の例では、そのようなステップは、治療有効量のタクロリムスおよびミコフェノール酸モフェチル（MMF）などのGVHDを減少させるための試薬の投与を含む。

【0009】

クラッペ病を処置するための方法に加えて、本開示は、哺乳動物対象などの対象において遺伝性疾患を処置するための方法を提供する。方法は、遺伝子療法において使用される試薬（例えば、ウイルスベクタータンパク質、または遺伝子療法を施すまで対象によって事前に産生されなかった新しいタンパク質）に対する望まれない免疫応答（例えば、抗体産生）を低減する。いかなる遺伝性障害もそのような方法を用いて処置することが可能である。一部の例では、遺伝子療法は、タンパク質の発現を増加するか、タンパク質の発現を減少させるか、ゲノム配列エラーを修正するか、またはその組合せである。そのような

10

20

30

40

50

方法は、対象において骨髄をアブレーションすること（例えば、化学療法、放射線、または両方を使用して）、それに続いて治療有効量の造血幹細胞（HSC）を対象に投与して対象に新しい免疫系を提供することを含むことが可能である。一部の例では、対象は、HSCの投与に続いて治療有効量の免疫抑制剤を投与される。HSCの投与に続いて（対象の免疫系の回復の前であってもよい）、方法は、対象に治療有効量の治療用核酸分子を投与することを含み、核酸分子は遺伝性疾患を修正する（例えば、欠損しているタンパク質を発現することにより）。

【0010】

本開示の前述ならびに他の目的および特長は、添付の図面を参照して進行する、以下の詳細な説明からさらに明らかになるであろう。

【図面の簡単な説明】

【0011】

【図1】図1。ヒトGALC（hGALC）を発現するAAVrh.10のゲノム構造。AAVrh.10-hGALCと称されるベクターは、AAV2末端逆位配列（ITR）、CAGプロモーター、全長ヒトGALC cDNA、およびウサギ - グロビンポリAを含有する。CAGプロモーターは、ヒトサイトメガロウイルス（CMV）エンハンサー、ニワトリ - アクチンプロモーターおよびスプライスドナー、ならびにウサギ - グロビンスプライスアクセプターから構成される。AAV2に基づくゲノムは、AAVrh.10カプシドによって偽型化されている。当業者は、全長ヒトGALC cDNAを、イヌ、ネコ、マウス、ラット、またはイルカなどの任意の哺乳動物由来の全長GALC cDNAと置き換えることができることを認識するであろう。

【0012】

【図2】図2。BMTおよび静脈内AAVrh.10-mGALCで処置したtwitcherマウスの生存。PND10でのAAVrh.10-mGALC、PND10でのBMT（ブスルファンアブレーション）、またはPND10～12でのBMT（ブスルファンアブレーション）直後のAAVrh.10-mGALCで処置したマウスの生存。垂直の青色と緑色の上昇は依然として生存しているマウスを表し、赤色の上昇は分析のために屠殺されたマウスを指す。アステリスクは、胃腸の合併症で死亡したマウスを示す。AAVrh.10-mGALC単独で処置したマウスの平均生存年齢は約70～75日であったが、一部のマウスははるかに長く生存したことに留意されたい。Rafiら、Mol. Ther. 23巻：1681～90頁、2015年から。

【0013】

【図3】図3A～3F。BMT+AAVで処置したtwitcherマウスの末梢神経系の病理学的研究。BMT単独またはBMT+AAVで処置したtwitcherマウスの坐骨神経からの横断切片を、罹患した未処置のtwitcherおよび野生型マウスからの同様の切片と比較する。全てのイメージは、ルクソールファストブルー/過ヨウ素酸シッフで染色したパラフィン切片からである（元の倍率×1,000）。野生型マウス（a）は、正常なミエリン形成を示すが、42日齢の未処置の罹患（twitcher）マウス（b）は、本質的にミエリンを有さず、多くのマクロファージを有する。BMT単独で処置した98日齢のtwitcherマウス（c）は、本質的に全てのミエリンを喪失し、未処置のtwitcherマウスに匹敵する。対照的に、組み合わせたBMT/AAVrh.10で処置した異なる年齢のマウスからの坐骨神経（d～f）は、完全に正常に見えるミエリンを有し、野生型マウスに匹敵する。Rafiら、Mol. Ther. 23巻：1681～90頁、2015年から。

【0014】

【図4】図4。臍帯血移植後のクラッペ病の小児の神経発達の転帰。固有の線は各患者の発育を表す。黒色の線（底部）は、乳児として移植を受けた症候性の患者を表し、色付きの線は、やはり乳児として移植を受けた無症候性の患者を表す。緑色の対角線は、罹患していない小児の典型的な発育を表す。影付きのエリアは、罹患していない小児の典型的な発育におけるばらつきを示す。Escolarら、NEJM、352巻：2069～81頁、2005年から。

10

20

30

40

50

5 年から。

【発明を実施するための形態】

【0015】

配列表

添付の配列表に収載される核酸およびアミノ酸配列は、37 C . F . R . 1 . 8 2 2 において定義される、ヌクレオチド塩基の標準文字略語、およびアミノ酸の3文字コードを使用して示される。それぞれの核酸配列の1つの鎖のみが示されるが、相補鎖は表示された鎖を任意に参照することにより含まれると理解される。配列表は「配列表 . t x t」（約40kb）と名付けられたファイルの形態でASCIIテキストファイルとして提出されており、このファイルは2017年12月18日に作成され、参照により本明細書に組み込まれる。

10

【0016】

配列番号1および2は、それぞれ例示的なヒトGALC核酸およびタンパク質配列（それぞれGenBank（登録商標）受託番号NM_000153.3およびNP_000144.2）である。

【0017】

配列番号3および4は、AAVrh.10のカプシドの例示的な核酸およびタンパク質配列（GenBank受託番号AY243015.1およびAAO88201.1）である。

20

【0018】

詳細な説明

他に記述されていない限り、専門用語は従来の用法に従って使用される。分子生物学における一般用語の定義は、Benjamin Lewin、Genes VII、Oxford University Press出版、1999年；Kendrewら（編）、The Encyclopedia of Molecular Biology、Blackwell Science Ltd.出版、1994年；およびRobert A. Meyers（編）、Molecular Biology and Biotechnology: a Comprehensive Desk Reference、VCH Publishers, Inc.出版、1995年；ならびに他の類似の参考文献に見ることができる。

【0019】

本明細書で使用される場合、単数形の「1つ(a)」、「1つ(an)」、および「その(the)」とは、文脈が明確に示していない限り、単数および複数の両方を指す。本明細書で使用される場合、用語「含む(comprises)」は、「含む(includes)」を意味する。したがって、「核酸分子を含む(comprising)」とは、他の要素を排除せずに「核酸分子を含む(including)」を意味する。核酸について与えられるありとあらゆる塩基サイズはおおよそであり、他に示されていない限り、説明目的のために提供されることをさらに理解すべきである。本明細書に記載される方法および材料に類似するまたは同等の多くの方法および材料を使用することが可能であるが、特に適切な方法および材料を下に記載する。不一致が生じた場合には、用語の説明を含む、本明細書が優先される。さらに、材料、方法、および実施例は説明的なものにすぎず、限定的であることを意図していない。特許出願および特許を含むすべての参考文献、ならびに収載されているGenBank（登録商標）受託番号に関連する配列（2017年1月20日現在で）は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

30

40

【0020】

本開示の種々の実施形態の吟味を容易にするため、以下の特定の用語の説明が提供される。

【0021】

投与：免疫抑制剤、臍帯血、HSC、GALCをコードする核酸分子もしくは他の治療用核酸分子、または他の治療剤などの薬剤を、任意の効果的な経路により対象に提供するまたは与えること。例示的な投与経路は、これらに限定されないが、注射（皮下、筋肉内、皮内、腹腔内、クモ膜下腔内、骨内、および静脈内など）、経皮、鼻腔内、ならびに吸入経路を含む。

50

【 0 0 2 2 】

接触：固体または液体形態を含む、直接的物理的会合に置くこと。接触は、例えば、試料（臍帯血を含有する試料など）に試薬を添加することにより *in vitro* もしくは *ex vivo* で、または対象に投与することにより *in vivo* で起こることが可能である。

【 0 0 2 3 】

有効量：有益なまたは所望の結果をもたらすのに十分な薬剤（免疫抑制剤、臍帯血、HSC、GALCをコードする核酸分子または他の治療用核酸分子など）の量のこと。

【 0 0 2 4 】

有効量（治療有効量とも呼ばれる）は、処置を受けている対象および病状、対象の体重および年齢、病状の重症度、投与様式などのうちの1つまたは複数に応じて変動してもよく、有効量は当業者であれば容易に決定することが可能である。有益な治療効果は、診断決定の実施可能性；疾患、症状、障害、または病態の軽快；疾患、症状、障害、または状態の発症を低減するまたは予防すること；および疾患、症状、障害、または病態を一般的に相殺することを含み得る。一実施形態では、1つまたは複数の免疫抑制剤の「有効量」は、白血球を少なくとも99%（免疫抑制剤の投与無しと比べた場合）低減するなどの、骨髓抑制を達成するのに十分な量である。一実施形態では、臍帯血の「有効量」は、RICUCBT後+14~15日目の中央値での生着を達成するための、少なくとも50,000,000/kg、または少なくとも100,000,000/kgなどの少なくとも 3×10^7 の総有核細胞(TNC)/kg(30,000,000/kg)レシピエント体重である。一実施形態では、GALCをコードする核酸分子（例えば、GALCをコードするベクター）の「有効量」は、例えば、少なくとも10%、少なくとも20%、少なくとも25%、少なくとも50%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも99%、少なくとも100%、少なくとも200%、少なくとも300%、少なくとも400%、少なくとも500%、または少なくとも600%（GALCをコードする核酸分子の投与無しと比べた場合）、T細胞でのGALCの活性および/または発現を増加するのに十分な量である。

【 0 0 2 5 】

一実施形態では、免疫抑制剤、臍帯血、およびGALCをコードする核酸分子（例えば、GALCをコードするベクター）の「有効量」は、例えば、少なくとも10%、少なくとも20%、少なくとも25%、少なくとも50%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも99%、少なくとも100%、少なくとも200%、少なくとも300%、少なくとも400%、少なくとも500%、または少なくとも600%（免疫抑制剤、臍帯血、およびGALCをコードする核酸分子の投与無しと比べた場合）、処置を受けたクラッペ患者の生存時間を増加するのに十分な量である。一実施形態では、免疫抑制剤、臍帯血、およびGALCをコードする核酸分子（例えば、GALCをコードするベクター）の「有効量」は、例えば、少なくとも6ヶ月、少なくとも9ヶ月、少なくとも1年、少なくとも1.5年、少なくとも2年、少なくとも2.5年、少なくとも3年、少なくとも4年、少なくとも5年、少なくとも10年、少なくとも12年、少なくとも15年、または少なくとも20年（免疫抑制剤、臍帯血、およびGALCをコードする核酸分子の投与無しと比べた場合）、処置を受けたクラッペ患者の生存時間を増やすのに十分な量である。一実施形態では、免疫抑制剤、臍帯血、およびGALCをコードする核酸分子（例えば、GALCをコードするベクター）の「有効量」は、例えば、少なくとも10%、少なくとも20%、少なくとも25%、少なくとも50%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも99%、少なくとも100%、少なくとも200%、少なくとも300%、少なくとも400%、少なくとも500%、または少なくとも600%（免疫抑制剤、臍帯血、およびGALCをコードする核酸分子の投与無しと比べた場合）、処置を受けたクラッペ患者のCNSおよび/またはPNSの細胞の髄鞘形成を増加するのに十分な量である。一実施形態では、免疫抑制剤、臍帯血、およびGALC

10

20

30

40

50

LCをコードする核酸分子（例えば、GALCをコードするベクター）の「有効量」は、例えば、少なくとも10%、少なくとも20%、少なくとも25%、少なくとも50%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも90%、または少なくとも95%（免疫抑制剤、臍帯血、およびGALCをコードする核酸分子の投与無しと比べた場合）、処置を受けたクラッペ患者のCNSおよび/またはPNSにおいてマクロファージ浸潤、アストログリオシス、および/またはCD68染色を低減するのに十分な量である。一実施形態では、免疫抑制剤、臍帯血、およびGALCをコードする核酸分子（例えば、GALCをコードするベクター）の「有効量」は、例えば、少なくとも10%、少なくとも20%、少なくとも25%、少なくとも50%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも90%、または少なくとも95%（免疫抑制剤、臍帯血、およびGALCをコードする核酸分子の投与無しと比べた場合）、処置を受けたクラッペ患者において腫瘍を低減するのに十分な量である。一実施形態では、免疫抑制剤、臍帯血、およびGALCをコードする核酸分子（例えば、GALCをコードするベクター）の「有効量」は、例えば、少なくとも10%、少なくとも20%、少なくとも25%、少なくとも50%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも99%、少なくとも100%、少なくとも200%、少なくとも300%、少なくとも400%、少なくとも500%、または少なくとも600%（免疫抑制剤、臍帯血、およびGALCをコードする核酸分子の投与無しと比べた場合）、処置を受けたクラッペ患者の体重を増加するのに十分な量である。一実施形態では、免疫抑制剤、臍帯血、およびGALCをコードする核酸分子（例えば、GALCをコードするベクター）の「有効量」は、例えば、少なくとも10%、少なくとも20%、少なくとも25%、少なくとも50%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも99%、少なくとも100%、少なくとも200%、少なくとも300%、少なくとも400%、少なくとも500%、または少なくとも600%（免疫抑制剤、臍帯血、およびGALCをコードする核酸分子の投与無しと比べた場合）、処置を受けたクラッペ患者において神経発生的機能を増加するまたは改善するのに十分な量である。一実施形態では、免疫抑制剤、臍帯血、およびGALCをコードする核酸分子（例えば、GALCをコードするベクター）の「有効量」は、例えば、少なくとも10%、少なくとも20%、少なくとも25%、少なくとも50%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも99%、少なくとも100%、少なくとも200%、少なくとも300%、少なくとも400%、少なくとも500%、または少なくとも600%（免疫抑制剤、臍帯血、およびGALCをコードする核酸分子の投与無しと比べた場合）、処置を受けたクラッペ患者において早期学習（例えば、the Bayley 乳児発達スケールまたはMullenスケール（Mullen, E. M. (1995年), Mullen Scales of Early Learning（AGS版、CirclePines, MN: American Guidance Service Inc.）により評価される）を増加するまたは改善するのに十分な量である。一実施形態では、免疫抑制剤、臍帯血、およびGALCをコードする核酸分子（例えば、GALCをコードするベクター）の「有効量」は、例えば、少なくとも10%、少なくとも20%、少なくとも25%、少なくとも50%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも99%、少なくとも100%、少なくとも200%、少なくとも300%、少なくとも400%、少なくとも500%、または少なくとも600%（免疫抑制剤、臍帯血、およびGALCをコードする核酸分子の投与無しと比べた場合）、処置を受けたクラッペ患者において運動技能（例えば、Peabody運動発達スケールにより評価される）を増加するまたは改善するのに十分な量である。一実施形態では、免疫抑制剤、臍帯血、およびGALCをコードする核酸分子（例えば、GALCをコードするベクター）の「有効量」は、例えば、少なくとも10%、少なくとも20%、少なくとも25%、少なくとも50%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも99%、少なくとも100%、少なくとも200%、少なくとも300%、少なくとも400%

%、少なくとも500%、または少なくとも600%（免疫抑制剤、臍帯血、およびGALCをコードする核酸分子の投与無しと比べた場合）、処置を受けたクラッペ患者（若年または成人対象など）の行動症状を改善するのに十分な量である。一実施形態では、免疫抑制剤、臍帯血、およびGALCをコードする核酸分子（例えば、GALCをコードするベクター）の「有効量」は、例えば、少なくとも10%、少なくとも20%、少なくとも25%、少なくとも50%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも99%、少なくとも100%、少なくとも200%、少なくとも300%、少なくとも400%、少なくとも500%、または少なくとも600%（免疫抑制剤、臍帯血、およびGALCをコードする核酸分子の投与無しと比べた場合）、処置を受けたクラッペ患者の視力を改善するのに十分な量である。10

一実施形態では、免疫抑制剤、臍帯血、およびGALCをコードする核酸分子（例えば、GALCをコードするベクター）の「有効量」は、例えば、少なくとも10%、少なくとも20%、少なくとも25%、少なくとも50%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも99%、少なくとも100%、少なくとも200%、少なくとも300%、少なくとも400%、少なくとも500%、または少なくとも600%（免疫抑制剤、臍帯血、およびGALCをコードする核酸分子の投与無しと比べた場合）、処置を受けたクラッペ患者の聴力を増加するのに十分な量である。一実施形態では、免疫抑制剤、臍帯血、およびGALCをコードする核酸分子（例えば、GALCをコードするベクター）の「有効量」は、例えば、少なくとも10%、少なくとも20%、少なくとも25%、少なくとも50%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも99%、少なくとも100%、少なくとも200%、少なくとも300%、少なくとも400%、少なくとも500%、または少なくとも600%（免疫抑制剤、臍帯血、およびGALCをコードする核酸分子の投与無しと比べた場合）、処置を受けたクラッペ患者の（例えば、脳のMRIまたはCSF開放圧により検出した場合の）白質を増加するのに十分な量である。一実施形態では、免疫抑制剤、臍帯血、およびGALCをコードする核酸分子（例えば、GALCをコードするベクター）の「有効量」は、例えば、少なくとも10%、少なくとも20%、少なくとも25%、少なくとも50%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、または少なくとも90%（免疫抑制剤、臍帯血、およびGALCをコードする核酸分子の投与無しと比べた場合）、処置を受けたクラッペ患者の（例えば、脳のMRIにより検出した場合の）頭蓋内圧を低減するのに十分な量である。一実施形態では、免疫抑制剤、臍帯血、およびGALCをコードする核酸分子（例えば、GALCをコードするベクター）の「有効量」は、例えば、少なくとも10%、少なくとも20%、少なくとも25%、少なくとも50%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、または少なくとも90%（免疫抑制剤、臍帯血、およびGALCをコードする核酸分子の投与無しと比べた場合）、処置を受けたクラッペ患者の（例えば、脳のMRIにより検出した場合の）処理時間を低減するのに十分な量である。30

一実施形態では、免疫抑制剤、臍帯血、およびGALCをコードする核酸分子（例えば、GALCをコードするベクター）の「有効量」は、例えば、少なくとも10%、少なくとも20%、少なくとも25%、少なくとも50%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、または少なくとも90%（免疫抑制剤、臍帯血、およびGALCをコードする核酸分子の投与無しと比べた場合）、処置を受けたクラッペ患者の（例えば、脳のMRIにより検出した場合の）発作を低減するのに十分な量である。一実施形態では、免疫抑制剤、臍帯血、およびGALCをコードする核酸分子（例えば、GALCをコードするベクター）の「有効量」は、例えば、少なくとも10%、少なくとも20%、少なくとも25%、少なくとも50%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも99%、少なくとも100%、少なくとも200%、少なくとも300%、少なくとも400%、少なくとも500%、または少なくとも600%（免疫抑制剤、臍帯血、およびGALCをコードする核酸分子の投与無しと比べた場合）、処置を受けたクラッペ患者において（例えば、脳のMRIに40

50

より検出した場合の) 歩行運動、痙攣、摂食能力、細かい運動技能、適応機能、易刺激性、自律神経障害、睡眠、またはそれらの組合せを改善するのに十分な量である。一実施形態では、免疫抑制剤、臍帯血、およびGALCをコードする核酸分子(例えば、GALCをコードするベクター)の「有効量」は、例えば、少なくとも10%、少なくとも20%、少なくとも25%、少なくとも50%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、または少なくとも99%(免疫抑制剤

、臍帯血、およびGALCをコードする核酸分子の投与無しと比べた場合)、処置を受けたクラッペ患者において(例えば、脳のMRIにより検出した場合の)CSFタンパク質のレベルを低減するおよび/または血液/CSFサイコシンを低減するのに十分な量である。一部の例では、これらの効果の組合せが達成される。

【0026】

ガラクトセレブロシダーゼ(GALC):(例えば、OMIM 606890):ガラクトシルセラミダーゼとしても公知であり、ガラクトースをセラミド誘導体から取り除く酵素である(EC3.2.1.46)。欠失(例えば、502/de1突然変異)、挿入、および点突然変異などのGALCにおける突然変異は、クラッペ病に関連している。Y158S突然変異はイヌで観察されており、エクソン4におけるcDNA387位および388位に対応するACの欠失は、アカゲザルで観察されている。

【0027】

GALC配列は、例えば、GenBank(登録商標)配列データベースから公的に入手可能である(例えば、受託番号NP_000144.2、AAH36518.1、NP_001003238.1、XP_011281775.1、AAB71823.1、およびNP_001037727.1は例示的GALCタンパク質配列を提供しており、受託番号NM_000153.3、BC036518.2、NM_001003238.1、XM_011283473.1、AH005573.2、およびNM_001044262.2は例示的GALC核酸配列を提供している)。当業者であれば、これらのGenBank(登録商標)配列に少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも92%、少なくとも95%、少なくとも98%、または少なくとも99%配列同一性を有する配列などの、GALCバリエーションを含む追加のGALC核酸およびタンパク質配列を同定することが可能である。

【0028】

造血幹細胞(HSC):すべての血液細胞を生じる幹細胞。したがって、HSCは、すべての血液系をin vivoで永続的に生み出す能力を有する。HSCは臍帯血および骨髄(BM)に存在している。一部の例では、HSCはCD34を発現する。一部の例では、HSCは以下のマーカー:

マウスHSC:CD34^{1.0} / -、SCA-1⁺、Flt-3⁺、C-kit⁺、lin-

ヒトHSC:CD34⁺、CD59⁺、Thy1/CD90⁺、CD38^{1.0} / -、C-kit/CD117⁺、CD166⁺、lin-、SLAM分子

を発現する。

【0029】

増加または減少:は、それぞれ、対照値(治療剤無しを表す値など)からの量の統計的に有意な正または負の変化。増加は、対照値と比べて少なくとも50%、少なくとも100%、少なくとも200%、少なくとも300%、少なくとも400%、または少なくとも500%の増加などの、正の変化である。減少は、対照値と比べて少なくとも20%、少なくとも25%、少なくとも50%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、少なくとも99%、または少なくとも100%の減少などの、負の変化である。一部の例では、減少は、90%以下、95%以下、または99%以下の減少などの、100%未満である。

【0030】

10

20

30

40

50

単離された：「単離された」生物学的成分（核酸分子またはタンパク質など）は、他の細胞（例えば、RBC）と、染色体および染色体外DNAならびにRNAと、タンパク質などの、その成分が存在する生物の細胞または組織における他の生物学的成分から実質的に分離されている、それから分かれた形で産生または精製されている。「単離」されている核酸およびタンパク質は、標準精製法により精製された核酸およびタンパク質を含む。この用語は、宿主細胞において組換え発現により調製された核酸およびタンパク質、ならびに化学的に合成された核酸およびタンパク質も包含する。

【0031】

クラッペ病：グロバイド細胞白質ジストロフィーまたはガラクトシルセラミドリビドーシスとしても公知で、神経系の髄鞘を冒す希でしばしば致死的な変性障害である。クラッペ病は、スフィンゴ脂質の機能障害性代謝を伴うので、スフィンゴリビドーシスの一形態である。この状態は常染色体劣性様式で遺伝する。クラッペ病は、GALC遺伝子（ヒトの場合、第14染色体上に位置している（14q31））の突然変異により引き起こされ、これによりガラクトセレブロシダーゼが欠損する。ヒトに加えて、クラッペ病はネコ、イヌ（ウエスティおよびケアンテリアなど）、およびイルカで観察されている。

10

【0032】

乳児クラッペ病（例えば、患者は生後0～6ヶ月）の症状は、易刺激性；筋緊張亢進；末梢神経障害；嘔吐および他の摂食困難；成長障害；発育の遅れ；原因不明の発熱；ならびに進行性筋力低下、難聴および視力喪失を含んでいる場合がある。遅発性型は、乳児後半（遅発性乳児、例えば、患者は生後7～12ヶ月）、小児期（遅発性、例えば、患者は生後13ヶ月～10歳）、早期思春期または成人期（例えば、患者は11歳またはそれよりも上）までも症状を現さない場合がある。これらの型の徴候および症状は変わりやすいが、筋力低下および硬直；歩行困難；視力喪失；知的後退；ならびに／または発作を含み得る。

20

【0033】

作動可能に連結された：第1の核酸配列が第2の核酸配列と機能的な関係に置かれている場合、第1の核酸配列は第2の核酸配列に作動可能に連結されている。例えば、プロモーターは、そのプロモーターがコード配列（GALCコード配列など）の転写または発現に影響を与える場合、そのコード配列に作動可能に連結されている。一般に、作動可能に連結されたDNA配列は近接しており、必要に応じて、同じリーディングフレームで2つのタンパク質コード領域を結合させる。

30

【0034】

薬学的に許容される担体：本発明において有用である薬学的に許容される担体は従来のである。Remington's Pharmaceutical Sciences、E. W. Martin著、Mack Publishing Co.、Easton、PA、第15版（1975年）は、本明細書で開示されるベクター、血液細胞、核酸分子、または免疫抑制剤などの治療剤の医薬送達に適している組成物および製剤を記載している。

【0035】

一般に、担体の性質は、用いられている特定の投与様式に依拠することになる。例えば、非経口製剤は通常、ビヒクルとして水、生理食塩水、平衡塩類溶液、水性デキストロース、グリセロールなどの薬学的におよび生理的に許容される流体を含む注射可能な流体を含む。生物学的に中性の担体に加えて、投与される医薬組成物は、湿潤剤または乳化剤、保存剤、およびpH緩衝剤など、例えば、酢酸ナトリウムまたはソルビタンモノラウレートなどの、少量の非毒性補助物質を含有することが可能である。

40

【0036】

プロモーター：核酸の転写を指示する核酸制御配列のアレイ。プロモーターは、ポリメラーゼII型プロモーターの場合には、TATAエレメントなどの転写の開始部位近くに必要核酸配列を含む。プロモーターは、任意選択で、転写開始部位から数千塩基対ほど離れて位置することが可能な遠位エンハンサーまたはリプレッサーエレメントも含む。

【0037】

50

プロモーターの例としては、これらに限定されないが、SV40プロモーター、CMVエンハンサープロモーター、およびCMVエンハンサー/ -アクチンプロモーターなどが挙げられる。構成的プロモーターも誘導性プロモーターも、本明細書で提供される方法において使用することが可能である（例えば、Bitterら、Methods in Enzymology 153巻：516～544頁、1987年参照）。プロモーター依存性遺伝子発現を細胞型特異的、組織特異的にとって制御可能にする、または外部シグナルもしくは薬剤による誘導性にするのに十分であるプロモーターエレメントも含まれ；そのようなエレメントは、遺伝子の5'または3'領域に位置していてもよい。組換えDNAまたは合成技法により産生されるプロモーターも、核酸配列の転写を提供するのに使用することが可能である。

【0038】

組換え：組換え核酸分子またはタンパク質配列とは、天然には存在しない配列を有する、または他の方法で分離された配列の2つのセグメントの人工的な組合せにより作製される配列を有する核酸分子またはタンパク質配列（例えば、GALCコード配列を含むウイルスベクター）のことである。この人工的な組合せは、化学合成などの型通りの方法により、または核酸の単離されたセグメントの人工的操作により、例えば遺伝子操作技法により、達成することが可能である。同様に、組換えまたはトランスジェニック細胞とは、組換え核酸分子を含有し組換えタンパク質を発現する細胞のことである。

【0039】

RNA干渉（RNAi）：RNA分子により媒介される転写後遺伝子サイレンシング機構。短いRNA分子を細胞内に導入すること（二本鎖RNAなど）により、そのRNA分子が他の特定のメッセンジャーRNA（mRNA）分子に結合し、例えば、mRNAがタンパク質を産生するのを妨げることにより、その活性を増加させるまたは減少させることが可能になる。阻害性RNA分子の例としては、低分子干渉RNA（siRNA）、マイクロRNA（miRNA）、リボザイム（ハンマーヘッド型リボザイム、VSリボザイム、またはヘアピンリボザイムなど）、およびアンチセンス分子が挙げられる。ある特定の例では、RNAi分子は、その発現が遺伝性疾患を抱えた対象において不必要に上方調節されている（したがって、その発現を減少させるのが望ましい）遺伝子などの、標的遺伝子に向けられる。一部の例では、RNAi分子は長さが、少なくとも約19ヌクレオチド（nt）、例えば、少なくとも20、少なくとも21、少なくとも22、少なくとも23、少なくとも24、少なくとも25、少なくとも26、または少なくとも27ntである。

【0040】

配列同一性：アミノ酸（またはヌクレオチド）配列間の類似性は、配列同一性とも呼ばれる、配列間の類似性に関して表される。配列同一性は、パーセンテージ同一性（または類似性もしくは相同性）に関して測定されることが多く、パーセンテージが高くなるに従って、2つの配列はそれだけ類似する。ポリペプチドの相同体は、標準法を使用して整列させた場合、比較的高度な配列同一性を有することになる。

【0041】

比較のための配列の整列方法は公知である。種々のプログラムおよび整列アルゴリズムが、SmithおよびWaterman、Adv. Appl. Math. 2巻：482頁、1981年；NeedlemanおよびWunsch、J. Mol. Biol. 48巻：443頁、1970年；PearsonおよびLipman、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85巻：2444頁、1988年；HigginsおよびSharp、Gene 73巻：237頁、1988年；HigginsおよびSharp、CABIOS 5巻：151頁、1989年；Corpetら、Nucleic Acids Research 16巻：10881頁、1988年；ならびにPearsonおよびLipman、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85巻：2444頁、1988年に記載されている。Altschulら、Nature Genet. 6巻：119頁、1994年は、配列整列方法および相同性計算の詳細な考察を提示している。

【0042】

The NCBI Basic Local Alignment Search Tool（BLAST）（Altschulら、J. Mol. Biol. 215巻：403頁、1990年

10

20

30

40

50

)は、配列分析プログラム `blastp`、`blastn`、`blastx`、`tblastn` および `tblastx` に接続して使用するため、`the National Center for Biotechnology Information` (NCBI、Bethesda、MD) およびインターネット上を含む、いくつかの供給源から利用可能である。このプログラムを使用して配列同一性を決定する方法の説明は、インターネット上の NCBI ウェブサイトで入手可能である。

【0043】

天然の G A L C タンパク質またはコード配列のバリエーションは典型的には、デフォルトパラメータに設定された NCBI `Blast2.0`、`gapped blastp` を使用してアミノ酸配列との完全長整列にわたり計数される、少なくとも約 80 %、少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、または少なくとも 99 % の配列同一性の所有によって特徴付けられる。約 30 アミノ酸よりも大きなアミノ酸配列の比較では、デフォルトパラメータ (11 の `gap existence cost` および 1 の `per residue gap cost`) に設定されたデフォルト `BLOSUM62` マトリックスを使用して、`Blast2` 配列機能が利用される。短いペプチド (約 30 アミノ酸よりも少ない) を整列させる場合、整列はデフォルトパラメータ (`open gap 9`、`extension gap 1 penalties`) に設定された `PAM30` マトリックスを用いて、`Blast2` 配列機能を使用して実施するべきである。参照配列にさらに大きな類似性を有するタンパク質は、この方法で評価した場合、少なくとも 95 %、少なくとも 98 %、または少なくとも 99 % の配列同一性など、より大きなパーセンテージ同一性を示すことになる。配列同一性について全配列未満が比較されている場合、相同体およびバリエーションは典型的には、10 ~ 20 アミノ酸の短い窓にわたって少なくとも 80 % の配列同一性を有することになり、参照配列に対するその類似性に応じて、少なくとも 85 %、または少なくとも 90 %、または少なくとも 95 % の配列同一性を有していてもよい。そのような短い窓にわたり配列同一性を決定するための方法は、インターネット上の NCBI ウェブサイトで入手可能である。これらの配列同一性範囲は手引きのためだけに提供されるので、提供される範囲から外れる強く重要な相同体を得られる可能性がある。

【0044】

したがって、本開示の方法を用いて使用することが可能なバリエーション G A L C タンパク質または核酸配列は、配列番号 1 または 2 に対して、さらに本明細書に提供される `GenBank` (登録商標) 受託番号で示されている配列のいずれかに対して、少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 91 %、少なくとも 92 %、少なくとも 93 %、少なくとも 94 %、少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、または少なくとも 99 % の配列同一性を有することが可能である。

【0045】

対象：哺乳動物、例えば、ヒトである。哺乳動物は、これらに限定されないが、マウス、サル、ヒト、家畜、スポーツ動物、およびペットを含む。一実施形態では、対象は、サルもしくは他の非ヒト霊長類、マウス、ラット、ウサギ、ブタ、ヤギ、ヒツジ、イルカ、イヌ、ネコ、ウマ、またはウシなどの非ヒト哺乳動物対象である。一部の例では、対象は、マウス、ウサギ、またはラットなどの実験動物 / 生物である。一部の例では、本明細書で開示される方法を使用して処置される対象は、生後 6 ヶ月未満のヒト乳児である。

【0046】

一部の例では、対象は、本明細書で開示される方法を使用して処置することが可能な、乳児クラッペ病などのクラッペ病を有する。一部の例では、本明細書で開示される方法を使用して処置される対象は、遺伝性疾患を有するヒト対象である。

【0047】

治療薬：対象に投与するとある有益な効果を授ける 1 つまたは複数の分子または化合物。有益な治療効果は、診断決定の実施可能性；疾患、症状、障害、または病態の軽快；疾

10

20

30

40

50

患、症状、障害、または状態の発症を低減するまたは予防すること；および疾患、症状、障害、または病態を一般的に相殺することを含み得る。

【0048】

形質導入されたおよび形質転換された：ウイルスまたはベクターは、それが核酸分子を細胞内に移行させた場合、細胞を「形質導入」する。細胞は、核酸の細胞ゲノムへの組み込みにより、またはエピソーマル複製により、核酸分子が細胞により安定的に複製される場合、細胞内に形質導入された核酸により「形質転換される」または「トランスフェクトされる」。

【0049】

化学的方法（例えば、リン酸カルシウムトランスフェクション）、物理的方法（例えば、電気穿孔、マイクロインジェクション、微粒子銃）、融合（例えば、リボソーム）、受容体媒介エンドサイトーシス（例えば、DNA-タンパク質複合体、ウイルスエンベロープ/カプシド-DNA複合体）、および組換えウイルスなどのウイルスによる生物学的感染によるなどの、数多くのトランスフェクション法を使用することが可能である（Wolff, J. A. 編、Gene Therapeutics、Birkhauser、Boston、USA（1994年））。

10

【0050】

トランス遺伝子：ベクターにより供給される外来性遺伝子。一例では、トランス遺伝子は、例えば、プロモーター配列に作動可能に連結されたGALCコード配列（または、遺伝子、コード配列もしくは阻害RNA分子などの他の治療用核酸分子）を含む。

20

【0051】

移植：1つの身体またはその身体の部分から別の身体またはその身体の部分への組織もしくは臓器、または細胞（HSCなど）の移行。「アロジェニック移植」または「異種移植」は1つの個体から別の個体への移植であり、個体は1つまたは複数の遺伝子座に、その2つの個体において配列が同一ではない遺伝子を有する。アロジェニック移植は、遺伝的に異なる同じ種の2つの個体間、または2つの異なる種の個体間で起こり得る。「自家移植」は、同じ個体における1つの位置から別の位置への組織もしくは細胞の移植、または1つの個体から別の個体への組織もしくは細胞の移植であり、その2つの個体は遺伝的に同一である。

【0052】

処置をする、処置、および療法：症状の緩解、軽減、減少あるいは状態を患者にとってもっと耐えられるものにする、変性もしくは減退の速度の緩徐化、最終変性点の衰弱性を弱める、対象の身体的もしくは精神的健康を改善する、または生存の長さを延ばすなどの、任意の客観的または主観的パラメーターを含む、傷害、病態または状態の減弱または軽快の任意の成功または成功の兆候。処置は、身体検査、血液および他の臨床検査などの結果を含む、客観的または主観的パラメーターにより評価してもよい。一部の例では、開示された方法を用いた処置は、遺伝性疾患を抱えた処置を受けた患者の生存時間を増加させるなどの、遺伝性疾患に関連する症状の数または重症度の減少をもたらす。

30

【0053】

一部の例では、開示されている方法を用いて処置すると、処置を受けたクラッペ病患者の生存時間を増やす、処置を受けたクラッペ病患者のCNSおよび/もしくはPNSにおいて細胞の髄鞘形成を増やすもしくは改善する、処置を受けたクラッペ病患者において神経発生機能を増やすもしくは改善する、処置を受けたクラッペ病患者において早期学習（例えば、MullenもしくはBayleyスケールにより評価される）を増やすもしくは改善する、処置を受けたクラッペ病患者のCNSおよび/もしくはPNSにおいてマクロファージ浸潤、アストログリオシス、および/もしくはCD68発現を低減する、処置を受けたクラッペ病患者において振戦を低減する、処置を受けたクラッペ病患者の体重を増やす、ならびに/または処置を受けたクラッペ病患者において運動技能（例えば、Peabody運動発達スケールにより評価される）を増やすもしくは改善する、処置を受けたクラッペ病患者において摂食を改善する、処置を受けたクラッペ病患者において細かい運動技能を改善する、処置を受けたクラッペ病患者において認知および適応機能を改善

40

50

する、処置を受けたクラッペ病患者において視力および聴力を改善する、処置を受けたクラッペ病患者において脳MRIを変化させる、処置を受けたクラッペ病患者において神経伝導を改善する、処置を受けたクラッペ病患者においてCSFタンパク質を低下させる、処置を受けたクラッペ病患者においてサイコシンおよび疾患進行の任意のバイオマーカーを低下させる、処置を受けたクラッペ病患者において発作を減少させる、処置を受けたクラッペ病患者において易刺激性を低減する、処置を受けたクラッペ病患者において睡眠を改善する、処置を受けたクラッペ病患者において頭蓋内圧を改善する、処置を受けたクラッペ病患者において歩行運動を改善する、ならびに処置を受けたクラッペ病患者において行動障害を低減する、などの、クラッペ病に関連する症状の数または重症度を減少させる。一部の例では、これらの効果の組合せが達成される。

10

【0054】

臍帯血(UCB)：出生後胎盤におよび付着した臍の緒に残っている血液。UCBは、赤血球、白血球、血漿、血小板および造血幹細胞などの全血に見出される全ての要素を含む。

【0055】

に十分な条件下で：所望の活性を可能にする任意の環境を記述するのに使用される語句。一例では、所望の活性は、疾患を処置するのに必要なGALC、または他のタンパク質の増加した発現または活性である。一例では、所望の活性は、例えば、開示された方法を使用して、クラッペ病などの遺伝性疾患(または表1に記載されている他の遺伝性疾患)をin vivoで処置するまたはその進行を遅くすることである。

20

【0056】

ベクター：宿主細胞に導入され、それによって形質転換宿主細胞を産生する核酸分子。ベクターは、複製起点などの、宿主細胞でのベクターの複製を可能にする核酸配列を含んでいてもよい。ベクターは、例えば、プロモーター、および/または選択可能マーカー遺伝子、ならびに当技術分野で公知の他の遺伝子エレメントと組み合わせて、GALCコード配列(または他の治療用核酸分子)を含んでいてもよい。ベクターは、細胞を形質導入する、形質転換する、または細胞に感染し、それによって、細胞に固有の核酸および/またはタンパク質以外の核酸および/またはタンパク質を細胞に発現させることが可能である。ベクターは、任意選択で、ウイルス粒子、リボソーム、タンパク質コーティングなどの、核酸の細胞内への進入を達成するのを支援する物質を含む。

30

【0057】

概論

クラッペ病(グロバイド細胞白質ジストロフィーとも呼ばれる)は希な遺伝性神経変性障害であり、発生率は100,000~250,000出生に1回と推定される。この疾患はあらゆる人種および民族に見出され、リソソーム酵素であるガラクトセレブロシダーゼ(GALC)をコードする遺伝子の突然変異により引き起こされ、この酵素は髄鞘の重要なガラクトリピド成分の正常な異化作用に不可欠である。GALC活性の欠損により、ある特定のガラクトリピドが蓄積し、このために有髄化グリア細胞が損傷を受け、それによって中枢神経系(CNS)および末梢神経系(PNS)の炎症、急速脱髄、および進行性の劣化が引き起こされる(Wengerら、(2013年)Scriber's The OnlineMetabolic and Molecular Bases of Inherited Disease (OMMBID)、第147章、Krabbe Disease (Globoid Cell Leukodystrophy))。この疾患の古典的早期乳児型では、患者は、生後最初の6ヶ月で、痙縮、発育遅延、および易刺激性を呈する。白質の喪失により、重篤な運動および精神機能低下を生じ、生後2年までに死亡する。患者のおおよそ10%が遅発性型の疾患(遅発乳児、若年、または成人)を有し、運動失調、脱力、視力問題、痙性対麻痺、行動障害、および認知症を呈し得る。一部の遺伝子型は、遅発性の重症度がもっと少ない疾患をもたらし、これはおそらく少量の残留GALC活性と関係している。

40

【0058】

GALC遺伝子において同定された147の病理性突然変異のうち、一部は明らかに早期または遅発性疾患に関連している。他の場合、強い遺伝子型-表現型の相互関係はまだ

50

十分に確立されていない。大半の患者は、クラッペ病の家族歴がない限り、既に症候性である場合に診断され、乳児クラッペ病の場合、同じGALC突然変異を共有していれば、発症年齢は類似する。

【0059】

クラッペ病を抱えた前駆症状および最小症状患者に対する現在の標準治療は、最も一般的には臍帯血移植（UCBT）の形態での造血幹細胞移植（HSCT）の施行である。しかし、このアプローチには欠点がある。1つの大きな欠陥は、HSCT単独では、罹患個人の身体障害の主要原因である末梢神経疾患の進行を、軽快させるまたは遅らせることが示されていないことである。さらに、処置は疾患の自然な進行を変えはするが、それでも患者はその十代後半に悪化して死亡する（Guptaら、NeuroImage: Clinical. 7巻：792～8頁、2014年）。さらに、UCBTは、患者がすでに症候性になった後は、運動路への広範な早期の損傷のせいで著しい恩恵をもたらさない。したがって、患者がクラッペ病の徴候または症状を明らかにした後は、効果的な処置は利用できない。

10

【0060】

UCBTと遺伝子療法の両方を利用してGALCの発現を増加させるクラッペ病を処置するための新規の方法が本明細書で提供される。GALCを発現すると、診断と神経系へGALCを利用できることとの間の間隔を短縮することにより、UCBT単独と比べた場合よりもよくCNSおよびPNSの髄鞘形成を修正しクラッペ病表現型を軽快させることが可能であると提唱されている。自家臍帯血移植および局所的レンチウイルスベクタートランスフェクションを提唱しているものもある。これとは対照的に、一部の例では、本発明はアロジェニック（無関係なドナー）臍帯血移植および静脈内アデノ随伴ウイルスベクタートランスフェクションを使用してGALCを発現させる。方法は、免疫抑制されている対象において実施し、これによりGALCタンパク質に対する抗体の形成を低減するまたは妨げることが可能になる。そのような方法は、末梢神経機能を改善し寿命を延ばすことが可能である。

20

【0061】

乳児などの対象においてクラッペ病を処置するための方法が本明細書で提供される。一部の例では、方法は、対象を免疫抑制し（骨髄抑制し）、治療有効量の臍帯血（UCB）を対象に投与し、（GALC）をコードする治療有効量の核酸分子を対象に投与することを含む。

30

【0062】

対象を免疫抑制することは、例えば、治療有効量のアレムツズマブ、ヒドロキシ尿素、フルダラビン、およびブスルファンを投与することにより、対象を骨髄抑制するまたは骨髄アブレーションする（myeloablate）ことを含み得る。一部の例では、方法は、治療有効量のタクロリムスおよびミコフェノール酸モフェチル（MMF）を投与することをさらに含む。

【0063】

一部の例では、UCBは、少なくとも6時間前に、少なくとも12時間前に、少なくとも1日前に、少なくとも2日前に、少なくとも3日前に、少なくとも4日前に、少なくとも5日前に、少なくとも6日前に、または少なくとも7日前になど、GALCをコードする核酸分子の前に投与される。一部の例では、UCBは対象にアロジェニックであり、例えば、6つのHLAマーカーのうち4、5または6つに適合する。一部の例では、治療有効量のUBCを投与することは、対象に少なくとも 3×10^7 の総有核細胞用量/kg調整理想体重（AIBW）を投与することを含む。

40

【0064】

一部の例では、GALCをコードする核酸分子は、配列番号1に対して少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%の配列同一性を共有している。一部の例では、核酸分子は、配列番号2に対して少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%の配列同一性を有す

50

る G A L C タンパク質をコードする。G A L C コード配列は、クラッペ病と関連していることが公知の突然変異を含まない。G A L C をコードする核酸分子は、構成的プロモーターなどのプロモーターに作動可能に連結し得る。一例では、プロモーターは、C A G プロモーターである（図 1 参照）。G A L C をコードする核酸分子は、ウイルスベクター、例えば、血液脳関門を通過することが可能なベクターなど、ベクターの一部であり得る。具体的な例では、ウイルスベクターは、アデノ随伴ベクター（A A V）、例えば A V V セロタイプ r h . 1 0 である。一部の例では、G A L C をコードする核酸分子は、例えば、対象あたり少なくとも 1×10^{11} ゲノムコピー（g c）、少なくとも 1×10^{12} g c、少なくとも 2×10^{12} g c、少なくとも 1×10^{13} g c、少なくとも 2×10^{13} g c、または対象あたり少なくとも 1×10^{14} g c、例えば、対象あたり 2×10^{11} g c、対象あたり 2×10^{12} g c、対象あたり 2×10^{13} g c、または対象あたり 2×10^{14} g c の用量で静脈内に投与される。一部の例では、G A L C をコードする核酸分子は、例えば、少なくとも 1×10^{11} g c / k g、少なくとも 5×10^{11} g c / k g、少なくとも 1×10^{12} g c / k g、少なくとも 5×10^{12} g c / k g、少なくとも 1×10^{13} g c / k g、または少なくとも 4×10^{13} g c / k g、例えば、 4×10^{11} g c / k g、 4×10^{12} g c / k g、または 4×10^{13} g c / k g の用量で静脈内に投与される。一部の例では、G A L C をコードする核酸分子は静脈内に投与される。

10

【0065】

クラッペ病を処置する方法

乳児などの対象においてクラッペ病を処置するための方法が本明細書で提供される。一部の例では、方法は、対象を免疫抑制し（骨髄抑制し）、治療有効量の臍帯血（U C B）を対象に投与し、G A L C をコードする治療有効量の核酸分子を対象に投与することを含む（例えば、G A L C は、正常な w t G A L C 核酸分子などの、クラッペ病に関連する突然変異を含まない）。一部の例では、方法は、自家ドナーからの U C B T 後に、G A L C 遺伝子を保有する A V V セロタイプ r h . 1 0 ベクター（A A V r h . 1 0 - G A L C）を静脈内に注入することを含む。そのような処置は、患者の免疫系が再構成し、それによって処置成績を改善する間に、脳および末梢神経において髄鞘形成を改善することにより運動機能低下を停止することが可能である。

20

【0066】

対象

処置される対象は、いかなる形態のクラッペ病を抱えたいかなる哺乳動物でも可能である。したがって、早期乳児クラッペ病、遅発乳児クラッペ病、または若年型クラッペ病を抱えたヒト、ネコおよびイヌを、開示された方法を用いて処置することが可能である。一部の例では、対象は早期乳児クラッペ病を有し、生後 6 ヶ月未満のヒト乳児である。一部の例では、対象は遅発乳児クラッペ病を有し、1 歳未満のヒト乳児である。

30

【0067】

免疫アブレーション

開示された方法を用いて処置される対象には、免疫系を抑制しおよび/または骨髄を壊滅させるのに使用される処置などの、その免疫系を抑制する処置を施すことが可能である。そのような免疫アブレーションは、U C B T の前および G A L C コード配列の投与の前に実施され、これにより望ましくない免疫応答を低減するまたは除去してもよい。したがって、一部の例では、U C B T および G A L C コード配列を受ける対象は、骨髄において造血細胞を根絶すると予想される最大投与可能量で与えられ、投与時間から 1 ~ 3 週間以内に深刻な汎血球減少をもたらす化学療法剤などの、骨髄アブレーションレジメンを前もって受ける、またはレシピエントの骨髄を部分的にアブレーションするが除去はしないと予想される低減した用量の化学療法または全身放射線照射などの、非骨髄アブレーションレジメンを前もって受ける。一部の例では、レシピエント対象は、U C B T および G A L C コード配列を受ける前に、T 細胞などのレシピエントの免疫系を枯渇させるまたはアブレーションすることになる療法を受ける。

40

【0068】

50

使用することが可能な化学療法剤の例としては、これらに限定されないが、カルムスチン、ブスルファン、カルボプラチン、シクロホスファミド、シトキサン、エトポシド、フルダラビン、メルファラン、メトトレキサート、チオテパ、トポテカン、またはそれらの組合せが挙げられる。一例では、対象は、治療有効量のブスルファンを用いて処置される。一例では、対象は、治療有効量のアレムツズマブ、ヒドロキシ尿素、フルダラビン、およびブスルファンを用いて処置される。

【0069】

一部の例では、本明細書で提供される方法を用いて処置される対象は、例えば、UCBTおよびGALCコード配列を受ける前に、3～4日かけて1200～1300センチグレイ (centigray) などの放射線照射を受ける。

10

【0070】

一部の例では、免疫アブレーションは、治療有効量のタクロリムス、治療有効量のミコフェノール酸モフェチル (MMF)、または両方などの移植片対宿主疾患を低減する薬剤を用いた処置を含む。

【0071】

免疫アブレーションの成功は、もっぱら宿主T細胞回復がないことである。すなわち、T細胞キメリズムが100%宿主ではない限り、免疫アブレーションは成功する。一部の例では、一部の宿主T細胞は約50%で観察されるが、そのT細胞は時間と共に低下する。

【0072】

UCBT

20

造血幹細胞移植についての命名法は、供給源が種により異なるために変わる。ヒトでは骨髄 (BM) および血縁関係のない臍帯血 (UCB) を移植のために使用することが可能である。しかし、造血幹細胞の最も迅速な供給源は、兄弟姉妹のドナーがいなければ、保存臍帯血由来である。したがって、ヒトでの手順はUCBTと呼ぶことが可能である。マウスでは、同系骨髄細胞が利用され、その手順はときにBMTと呼ばれる。

【0073】

UCBT (またはBMT) は、成功した免疫アブレーションに続いて、しかし、GALCをコードする核酸分子を投与するより前に実施することが可能である。一部の例では、UCBT (またはBMT) は、GALCをコードする核酸分子を投与するより12時間、24時間、48時間、72時間、または96時間前になどの、GALCをコードする核酸分子を投与するより少なくとも6時間前に、GALCをコードする核酸分子を投与するより少なくとも12時間前に、GALCをコードする核酸分子を投与するより少なくとも1日前に、GALCをコードする核酸分子を投与するより少なくとも2日前に、GALCをコードする核酸分子を投与するより少なくとも3日前に、GALCをコードする核酸分子を投与するより少なくとも4日前に、GALCをコードする核酸分子を投与するより少なくとも5日前に、GALCをコードする核酸分子を投与するより少なくとも6日前に、またはGALCをコードする核酸分子を投与するより少なくとも7日前に実施される。一部の例では、UCBT (またはBMT) は静脈内に投与される。

30

【0074】

一部の例では、UCB (またはBM) は、対象にアロジェニックである。一部の例では、ドナーは、処置されるクラッペ病対象に対して対立遺伝子レベルHLA-DRB1タイピングとの6つのHLA適合のうち最小で4つを有し、例えば、6つのHLAマーカーのうち4、5または6つで適合する。

40

【0075】

一部の例では、UBC (またはBM) は、少なくとも $5 \times 10^7 / \text{kg}$ 、少なくとも $1 \times 10^8 / \text{kg}$ AIBW、または少なくとも $3 \times 10^8 / \text{kg}$ AIBWなどの、少なくとも $2 \times 10^7 / \text{kg}$ 、少なくとも $3 \times 10^7 / \text{kg}$ の総有核細胞 (TNC) 用量で投与される。したがって、一部の例では、UBC (またはBM) は、 $5 \sim 12 \times 10^7 \text{ TNC} / \text{kg}$ または $2.3 \sim 25 \times 10^7 \text{ TNC} / \text{kg}$ などの、少なくとも20,000,000 TNC / kg、25,000,000 TNC / kg、30,000,000 TNC /

50

kg、少なくとも50,000,000 TNC/kg、少なくとも60,000,000 TNC/kg、少なくとも70,000,000 TNC/kg、少なくとも80,000,000 TNC/kg、少なくとも90,000,000 TNC/kg、少なくとも100,000,000 TNC/kg、少なくとも120,000,000 TNC/kg、少なくとも200,000,000 TNC/kg、または少なくとも250,000,000 TNC/kgの投与を含む。

【0076】

一部の例では、UBC（またはBM）は、少なくとも 3×10^5 /kg、少なくとも 5×10^5 /kg、少なくとも 1×10^6 /kg、少なくとも 3×10^6 /kg、少なくとも 5×10^6 /kg、少なくとも 1×10^7 /kg、少なくとも 3×10^7 /kg、少なくとも 5×10^7 /kg、または少なくとも 1×10^8 /kgなどの、少なくとも 1.5×10^5 /kg、例えば、 $1 \sim 9 \times 10^5$ /kgのCD34+前駆体用量を含む。

10

【0077】

対象は、+1日目に顆粒細胞コロニー刺激因子（G-CSF）も投与され、ANCが2,000になるまで続けることが可能である。一部の例では、G-CSFは、少なくとも5mcg/kg/一日量IVもしくはSC、少なくとも10mcg/kg/一日量IVもしくはSC、または少なくとも10mcg/kg/一日量IVもしくはSCなどの、少なくとも1mcg/kg/一日量IVもしくはSCの用量で投与される。

【0078】

GALC発現を増加する

20

機能的GALCをコードする核酸分子は公知であり、具体的な例が本明細書で提供される。一部の例では、使用されるGALCの配列は処置を受ける対象に適合する。例えば、対象がヒトである場合、正常な（例えば、クラッペ病に関連している突然変異を含まない配列などの、非突然変異）ヒトGALCコード配列を使用することが可能である。

【0079】

したがって、一部の例では、処置を受けた対象においてGALCを発現すると、処置を受けた対象の細胞においてGALCタンパク質発現および/または活性が、少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも100%、少なくとも200%、少なくとも300%、少なくとも400%、少なくとも500%、または少なくとも600%増す。一部の例では、処置を受けた対象においてGALCを発現すると、対象においてGALC活性（例えば、セラミド誘導体からのガラクトースの除去）が、少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも100%、少なくとも200%、少なくとも300%、少なくとも400%、少なくとも500%、または少なくとも600%増す。例えば、GALC活性のそのような増加は、脳、脊髄、小脳、および/または末梢神経（坐骨などの）などの、CNSおよび/またはPNSにおいて観察され得る。一部の例では、対象においてGALCを発現すると、対象のCNSおよび/またはPNSにおいて髄鞘形成が、少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも100%、少なくとも200%、少なくとも300%、少なくとも400%、少なくとも500%、または少なくとも600%増す。一部の例では、これらの効果の組合せが達成される。

30

40

【0080】

一部の例では、GALCコード配列はベクターの一部ではない。一部の例では、GALCコード配列は、レンチウイルスベクター、AAVベクター、またはレトロウイルスなどのウイルスベクターなどのベクターの一部である。一部の例では、GALCコード配列の発現は、構成的プロモーターなどのプロモーターにより駆動される。一部の例では、GALCコード配列は、対象の静脈内に導入される。

50

【0081】

一部の例では、G A L Cコード配列は、C R I S P R / C a s系、ジンクフィンガーヌクレアーゼ (Z F N) 編集、転写活性化因子様エフェクターベースのヌクレアーゼ (T A L E N) 編集などの、遺伝子編集法を使用して投与される。

【0082】

一部の例では、G A L Cコード配列は、裸の核酸分子として投与される。一部の例では、G A L Cコード配列は、ベクター (A A V r h . 1 0 - h G A L C など) の一部であり、例えば、ベクターの凝集を低減し、血液脳関門の透過を増強するために、5 % のソルビトールを有する 3 8 0 m M の P B S において製剤化される。

【0083】

G A L C 配列

使用する G A L Cコード配列は、天然のまたはバリエーション G A L C 配列でも可能である。天然の G A L C 配列は、数種についての G e n B a n k (登録商標) 受託番号により上に提供されている。したがって、一部の例では、対象に導入される G A L C をコードする核酸分子 (それを含有するベクターなど) は、天然の G A L Cコード配列を含む。一部の例では、対象に導入される G A L C をコードする核酸分子 (それを含有するベクターなど) は非天然の G A L Cコード配列を含むが、天然の G A L C タンパク質配列 (例えば、変性しているコード配列) をコードする。

【0084】

一例では、G A L C をコードする核酸分子 (それを含有するベクターなど) は、G e n B a n k (登録商標) 受託番号により上に提供されるタンパク質配列のバリエーションを含むバリエーション G A L C タンパク質をコードしており、単一挿入、単一欠失、単一置換などの1つまたは複数の突然変異を含有することが可能である。しかし、そのような変形形態は、セラミド誘導体からガラクトースを除去する能力などのタンパク質の機能に悪影響を及ぼさない (例えば、クラッペ病に関連する突然変異を含む)。一部の例では、バリエーション G A L C タンパク質は、1 ~ 2 0 の挿入、1 ~ 2 0 の欠失、1 ~ 2 0 の置換、および / またはそれらの任意の組合せ (例えば、1 ~ 1 9 の置換と共に単一の挿入) を含む。一部の例では、バリエーション G A L C タンパク質は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、または20のアミノ酸変化を有する。一部の例では、バリエーション G A L C タンパク質は、1 ~ 8 の挿入、1 ~ 1 5 の欠失、1 ~ 1 0 の置換、および / またはそれらの任意の組合せ (例えば、1 ~ 1 0、1 ~ 5 または 1 ~ 7 のアミノ酸置換と共に 1 ~ 1 5、1 ~ 4、または 1 ~ 5 のアミノ酸欠失) を含む。一例では、そのようなバリエーションペプチドは、特定部位の突然変異誘発または P C R などの、標準手順を使用してペプチドをコードするヌクレオチド配列を操作することにより産生される。

【0085】

1つのタイプの改変は、類似の生化学的特性を有するアミノ酸残基とのアミノ酸の置換、すなわち、保存的置換 (1 ~ 4、1 ~ 8、1 ~ 1 0、または 1 ~ 2 0 の保存的置換など、例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、または20の保存的置換) を含む。典型的には、保存的置換が、得られたペプチドの活性に及ぼす影響はほとんどないか皆無である。例えば、保存的置換は、任意の天然の G A L C タンパク質配列におけるアミノ酸置換であり、この置換はタンパク質の天然の機能 (セラミド誘導体からガラクトースを除去するなど) に実質的な影響を及ぼさない。アラニンスキャンを使用すれば、G A L C タンパク質におけるどのアミノ酸残基がアミノ酸置換に耐え得るかを同定することが可能である。一例では、アラニン、または他の保存的アミノ酸が、1 ~ 4、1 ~ 8、1 ~ 1 0、または 1 ~ 2 0 の天然のアミノ酸の代わりに使われる場合、G A L C の天然の機能は 2 5 % を超えて変化せず、例えば、2 0 % 以下、例えば、1 0 % 以下、または 5 % 以下である。G A L C タンパク質において元のアミノ酸の代わりに用いてもよく、保存的置換と見なされるアミノ酸の例としては、A l a の代わりに S e r ; A r g の代わりに L y s、G l n、または A s n ; A s

10

20

30

40

50

nの代わりにGlnまたはHis、Aspの代わりにGlu；Cysの代わりにSer；Glnの代わりにAsn；Gluの代わりにAsp；Glyの代わりにPro；Hisの代わりにAsnまたはGln；Ileの代わりにLeuまたはVal；Leuの代わりにIleまたはVal；Lysの代わりにArgまたはGln；Metの代わりにLeuまたはIle；Pheの代わりにMet、LeuまたはTyr；Serの代わりにThr；Thrの代わりにSer；Trpの代わりにTyr；Tyrの代わりにTrpまたはPhe；およびValの代わりにIleまたはLeuが挙げられる。

【0086】

天然のまたはバリエーションGALCタンパク質をコードする核酸分子は、ベクターに組み込むことが可能である。本明細書に提供されるGenBank（登録商標）受託番号に示される配列との（例えば、配列番号1または2に対して）少なくとも90%、少なくとも92%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%の配列同一性を有する配列などの天然のまたはバリエーションGALCをコードする核酸配列を作製することが可能である。さらに、配列は異なるが同じタンパク質配列をコードする核酸などの、機能的に等価な核酸を含有する種々のクローンを作製することが可能である。一部の例では、そのようなGALCコード配列は、宿主細胞での発現のために最適化される。

10

【0087】

コード配列におけるサイレント突然変異は、遺伝コードの縮重（すなわち、重複性）から生じ、縮重により1つよりも多いコドンが同じアミノ酸残基をコードすることが可能である。したがって、例えば、ロイシンはCTT、CTC、CTA、CTG、TTA、またはTTGがコードすることが可能であり；セリンはTCT、TCC、TCA、TCG、AGT、またはAGCがコードすることが可能であり；アスパラギンはAATまたはAACがコードすることが可能であり；アスパラギン酸はGATまたはGACがコードすることが可能であり；システインはTGTまたはTGCがコードすることが可能であり；アラニンはGCT、GCC、GCA、またはGCGがコードすることが可能であり；グルタミンはCAAまたはCAGがコードすることが可能であり；チロシンはTATまたはTACがコードすることが可能であり；イソロイシンはATT、ATC、またはATAがコードすることが可能である。

20

【0088】

特定の種についてのコドン優先度およびコドン使用表を使用すれば、その特定の種のコドン使用優先度を利用するGALCタンパク質をコードする単離された核酸分子を操作することが可能になる。例えば、ベクターから発現されるGALCタンパク質は、目的の特定の生物（例えば、クラッペ病を抱えた哺乳動物において）により優先的に使用されるコドンを有するように設計することが可能になる。

30

【0089】

GALCタンパク質をコードする核酸は、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）、リガーゼ連鎖反応（LCR）、転写ベースの増幅法（TAS）、自家持続配列複製法（3SR）、およびQレプリカーゼ増幅法（QB）などの、*in vitro*法によりクローニングするまたは増幅することが可能である。多種多様なクローニングおよび*in vitro*増幅法を使用することが可能である。さらに、GALCタンパク質をコードする配列をコードする核酸は、クローニング技法により調製することが可能である。適切なクローニングおよび塩配列決定技法、ならびにクローニングを通して当業者を指導するのに十分な使用説明書の例はSambrookら（編）、Molecular Cloning: A Laboratory Manual 第2版、1～3巻、Cold Spring Harbor Laboratory Press、ColdSpring、Harbor、N.Y.、1989年、およびAusubelら、（1987年）「Current Protocols inMolecular Biology」中、John Wiley and Sons、New York、N.Y.に見出される。

40

【0090】

GALCタンパク質をコードする核酸配列は、例えば、適切な配列のクローニングを含む任意の適切な方法により、またはNarangら、Meth. Enzymol. 68巻：90～99頁、

50

1979年のホスホトリエステル法；Brownら、Meth. Enzymol. 68巻：109～151頁、1979年のホスホジエステル法；Beaucageら、Tetra. Lett. 22巻：1859～1862頁、1981年のジエチルホスホロアミダイト（diethylphosphoramidite）法；例えば、Needham-VanDevanterら、Nucl. Acids Res. 12巻：6159～6168頁、1984年に記載される自動合成装置を使用して、例えば、BeaucageおよびCaruthers、Tetra. Letts. 22巻（20号）：1859～1862頁、1981年に記載される固相ホスホロアミダイトトリエステル法；および米国特許第4,458,066号の固体支持体法などの方法による、直接的な化学合成により、調製することが可能である。化学合成は、一本鎖オリゴヌクレオチドを産生する。これは相補配列とのハイブリダイゼーションにより、または鋳型として一本鎖を使用するDNAポリメラーゼを用いた重合により、二本鎖DNAに変換することが可能である。当業者であれば、DNAの化学合成は一般に約100塩基の配列に限られるが、より短い配列のライゲーションによりもっと長い配列を得ることができることは認識しているであろう。

10

【0091】

一例では、GALCタンパク質は、GALCタンパク質をコードするcDNAをベクターに挿入することにより調製される。挿入は、タンパク質がインフレームで読まれてタンパク質が産生されるように行うことが可能である。GALCタンパク質をコードする異種核酸配列を含有する組換えベクター（例えば、プラスミドまたはウイルス）を調製するための技法は公知である。

20

【0092】

GALCタンパク質の核酸コード配列は、配列の挿入または組込みを可能にするように操作することが可能であり、クラッペ病を抱えた対象において発現させることが可能であるプラスミド、ウイルスまたは他の媒介物を含むがこれらに限定されない発現ベクターに挿入することが可能である。ベクターからコード配列を発現させる方法は公知である。T細胞において発現し複製することができる生物学的に機能的なウイルスおよびプラスミドDNAベクターは公知である。発現ベクターは、T細胞におけるGALCタンパク質コード配列を含有する発現ベクターの移入およびそれに続く複製に必要な追加の要素を含有することが可能である。そのような要素の例としては、これらに限定されないが、複製起点およびチミジンキナーゼ遺伝子などの選択可能マーカー、または抗生物質耐性マーカーが挙げられる。

30

【0093】

GALCタンパク質をコードする核酸配列は、プロモーターなどの発現制御配列に作動可能に連結することが可能である。GALCタンパク質コード配列に作動可能に連結された発現制御配列は、GALCタンパク質コード配列の発現が発現制御配列に適合する条件下で達成されるようにライゲートされる。例示的な発現制御配列は、これらに限定されないが、適切なプロモーター、エンハンサー、転写ターミネーター、GALCタンパク質コード遺伝子の前の開始コドン（すなわち、ATG）、イントロンについてのスプライシングシグナル、mRNAの適切な翻訳を可能にするその遺伝子の正しいリーディングフレームの維持、および停止コドンを含む。使用可能である発現制御要素の例としては、これらに限定されないが、lac系、ファージラムダのオペレーターおよびプロモーター領域、ならびにポリオマ、アデノウイルス、レトロウイルスまたはSV40由来のプロモーターが挙げられる。追加の機能的要素としては、これらに限定されないが、リーダー配列、終止コドン、ポリアデニル化シグナル、ならびに宿主細胞においてGALCタンパク質をコードする核酸配列の適切な転写およびそれに続く翻訳に必要な他の任意の配列が挙げられる。一例では、プロモーターは、ヒトCMVエンハンサー、ベータアクチンプロモーター、ベータグロブリンプライスアクセプター、またはそれらの組合せ（例えば、図1、GAGプロモーター参照）。一部の例では、2つまたは3つのプロモーターが使用される。

40

【0094】

例示的ウイルスベクター

50

G A L C タンパク質をコードするウイルスベクターを調製することが可能である。使用可能である例示的ウイルスベクターは、これらに限定されないが、ポリオーマ、S V 4 0、アデノウイルス、ワクシニアウイルス、アデノ随伴ウイルス (A A V)、H S V および E B V を含むヘルペスウイルス、シンドビスウイルス、アルファウイルスならびにトリ、マウス、およびヒト起源のレトロウイルスを含む。バキュロウイルス (オウトグラフィ・カリフォルニカ核多角体病ウイルス ; A c M N P V) ベクターも使用可能である。他の適切なベクターは、オルソボックスベクター、アピボックスベクター、鶏痘ベクター、カプリボックスベクター、スイボックスベクター、レンチウイルスベクター、アルファウイルスベクター、およびポリオウイルスベクターを含む。具体的な例示的ベクターは、ワクシニアウイルス、鶏痘ウイルス、および高度に弱毒化されたワクシニアウイルス (M V A)、アデノウイルス、バキュロウイルスなどのボックスウイルスベクターである。有用なボックスウイルスは、オルソボックス、スイボックス、アピボックス、およびカプリボックスウイルスを含む。オルソボックスはワクシニア、エクトロメリア、およびアライグマボックスを含む。有用なオルソボックスの 1 つの例はワクシニアである。アピボックスは鶏痘、カナリアボックスおよび鳩痘を含む。カプリボックスは山羊痘および羊痘を含む。一例では、スイボックスはブタボックスである。使用可能な他のウイルスベクターは、ヘルペスウイルスおよびアデノウイルスなどの他の D N A ウイルス、ならびにレトロウイルスおよびポリオなどの R N A ウイルスを含む。

10

【 0 0 9 5 】

一部の例では、G A L C コード配列は、例えば、静脈内投与に続いて血液脳関門を透過することができるベクターなどの、ベクターの一部である。そのようなベクターの例としては、A A V セロタイプ A A V 9 および A A V r h . 1 0 などのアデノ随伴ウイルス (A A V) が挙げられる。アデノ随伴ウイルスセロタイプ r h . 1 0 (A A V . r h 1 0) ベクターは、血液脳関門を部分的に透過し、高度なレベルの広いトランス遺伝子発現をもたらす (Sondhi ら、Mol Ther. 1 5 巻 (3 号) : 4 8 1 ~ 9 1 頁、2 0 0 7 年 ; De ら、Mol Ther. 1 3 巻 : 6 7 ~ 7 6 頁、2 0 0 6 年)、静脈内送達に続いてニューロン、アストロサイト、およびグリア細胞を形質導入すると思われる (Zhang ら、J. Virol. Methods 1 7 9 巻 : 2 7 6 ~ 8 0 頁、2 0 1 1 年)。

20

【 0 0 9 6 】

開示の方法において使用可能な例示的 A A V . r h 1 0 カプシドの配列は、配列番号 3 に提供されている (別の例が、欧州特許第 2 3 4 1 0 6 8 号の配列番号 5 9 に提供されている)。したがって、一部の例では、使用する A A V . r h 1 0 ベクターは、配列番号 3 に対して少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 2 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 %、もしくは少なくとも 9 9 % の配列同一性を有するか、または配列番号 4 に対して少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 2 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 %、もしくは少なくとも 9 9 % の配列同一性を有するタンパク質をコードする。A A V . r h 1 0 は、A A V 2 遺伝子トランスファベクター骨格 (発現カセットに隣接する A A V 2 の逆位末端配列) ; ヒトサイトメガロウイルスエンハンサーを有する発現カセット ; ニワトリ アクチン由来のプロモーター、スプライスドナー、および左巻きイントロン配列 ; ウサギ グロビン由来の右巻きイントロン配列およびスプライスアクセプター (このエンハンサー / プロモーター / イントロン配列は「 C A G 」と呼ばれる) を含む。C A G プロモーターは、A A V ベクターにおいて遺伝子発現を駆動するのに使用される強力な遍在性プロモーターである。A A V . r h 1 0 - h G A L C ベクターは、完全長ヒト G A L C c D N A ; およびウサギ グロビンポリ A 配列 (図 1) をさらに含む。一本鎖ゲノムは、A A V セロタイプ r h . 1 0 のカプシドにパッケージングされ、A A V セロタイプ r h . 1 0 は元はアカゲザルから単離されたものである (Gao ら、Proc Natl Acad Sci U S A. 9 9 巻 (1 8 号) : 1 1 8 5 4 ~ 9 頁、2 0 0 2 年)。当業者であれば、完全長ヒト G A L C c D N A は、処置を受ける対象に応じて、目的のいかなる哺乳動物由来の G A L C c D N A とでも交換することが可能であることを認識するであろう。したがって、例えば、クラッペ病について処

30

40

50

置されるイヌは、完全長ヒト G A L C c D N A の代わりに完全長イヌ G A L C c D N A を含む A A V . r h 1 0 - G A L C ベクターを利用することが可能である。ベクター名中の遺伝子略称の前の小文字は、トランス遺伝子の供給源である種を示すのに使用することが可能であり、例えば、A A V r h . 1 0 - m G A L C = マウス c D N A および A A V r h . 1 0 - h G A L C = ヒト c D N A である。

【 0 0 9 7 】

ベクターの一部であることが可能な例示的 A A V . r h 1 0 カプシド配列の配列は、配列番号 3 に提供されている。したがって、一部の例では、使用する A A V . r h 1 0 は、配列番号 3 に対して少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 2 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 %、少なくとも 9 9 %、または 1 0 0 % の配列同一性を有する。一部の例では、使用する A A V . r h 1 0 は、配列番号 4 に対して少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 2 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 %、少なくとも 9 9 %、または 1 0 0 % の配列同一性を有するタンパク質をコードする。

10

【 0 0 9 8 】

一部の例では、ベクター (A A V r h . 1 0 - h G A L C など) は、例えば、ベクターの凝集を低減し、血液脳関門の透過を増強するために、5 % のソルビトールを有する 3 8 0 m M の P B S において製剤化される。

【 0 0 9 9 】

一部の例では、G A L C をコードする核酸分子は、例えば、少なくとも 1×10^{11} ゲノムコピー (g c、時にはベクターゲノム (v g) と呼ばれる)、例えば、少なくとも 2×10^{11} g c、 1×10^{12} g c、少なくとも 2×10^{12} g c、少なくとも 1×10^{13} g c、対象あたり少なくとも 2×10^{13} g c、または対象あたり少なくとも 1×10^{14} g c など、例えば、対象あたり 2×10^{11} g c、対象あたり 2×10^{12} g c、対象あたり 2×10^{13} g c、または対象あたり 2×10^{14} g c の用量で、静脈内に投与される。一部の例では、G A L C をコードする核酸分子は、例えば、少なくとも 1×10^{11} g c / k g、少なくとも 5×10^{11} g c / k g、少なくとも 1×10^{12} g c / k g、対象あたり少なくとも 5×10^{12} g c / k g、少なくとも 1×10^{13} g c / k g、少なくとも 5×10^{13} g c / k g、または少なくとも $a \times 10^{14}$ g c / k g、例えば、 4×10^{11} g c / k g、 4×10^{12} g c / k g、または 4×10^{13} g c / k g の用量で、静脈内に投与される。

20

30

【 0 1 0 0 】

血液中の A A V - カプシド特異的 T 細胞などの有害な症状が発症した場合、副腎皮質ステロイドを投与することが可能である (例えば、Nathwani ら、N Engl J Med. 365 巻 (25 号) : 2357 ~ 65 頁、2011 年参照)

【 0 1 0 1 】

遺伝子療法に先立つ免疫アブレーションおよび移植

遺伝性突然変異 (1 つもしくは複数のヌクレオチドの欠失、挿入、または置換、あるいはそれらの組合せなどの) から生じる疾患を抱えた対象を処置する方法が本明細書で提供される。開示された方法は、遺伝子療法において使用される試薬 (ウイルスベクターもしくはその部分、または対象により以前は発現されなかったタンパク質など) に対する免疫応答 (例えば、抗体発生) を低減するまたは予防する。そのような方法は、遺伝子療法の成功を高めることが可能である。開示された方法は、対象の骨髄をアブレーションし、患者に造血幹細胞 (H S C) を移植し (対象に免疫系を再構成することになる)、H S C 移植後に遺伝子療法を施すことを含む。

40

【 0 1 0 2 】

一実施形態では、免疫アブレーション剤、H S C、および治療用核酸分子をコードする核酸分子 (例えば、治療用核酸分子をコードするベクター) の「有効量」とは、例えば、少なくとも 1 0 %、少なくとも 2 0 %、少なくとも 2 5 %、少なくとも 5 0 %、少なくとも 7 0 %、少なくとも 7 5 %、少なくとも 8 0 %、少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 5 %

50

、少なくとも99%、少なくとも100%、少なくとも200%、少なくとも300%、少なくとも400%、少なくとも500%、または少なくとも600%（免疫アブレーション剤、HSC、および治療用核酸分子をコードする核酸分子の無投与と比べた場合）、処置を受けた患者の生存時間を増加するのに十分な量である。一実施形態では、免疫アブレーション剤、HSC、および治療用核酸分子をコードする核酸分子（例えば、治療用核酸分子をコードするベクター）の「有効量」とは、例えば、少なくとも6ヶ月、少なくとも9ヶ月、少なくとも1年、少なくとも1.5年、少なくとも2年、少なくとも2.5年、少なくとも3年、少なくとも4年、少なくとも5年、少なくとも10年、少なくとも12年、少なくとも15年、または少なくとも20年（免疫アブレーション剤、HSC、および治療用核酸分子をコードする核酸分子の無投与と比べた場合）、処置を受けた患者の生存時間を増加するのに十分な量である。

10

【0103】

一部の例では、免疫アブレーション剤、HSC、および治療用核酸分子をコードする核酸分子（例えば、治療用核酸分子をコードするベクター）の「有効量」とは、例えば、少なくとも10%、少なくとも20%、少なくとも25%、少なくとも50%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも99%、または少なくとも100%（免疫アブレーション剤、HSC、および治療用核酸分子をコードする核酸分子の無投与と比べた場合）、処置を受けた患者において遺伝子療法に対する免疫応答を低減するのに十分な量である。一部の例では、遺伝子療法に対する免疫応答の低減は、治療用タンパク質、ベクター成分、または両方に対する抗体産生をモニタリングすることにより測定される。

20

【0104】

したがって、開示された方法は、処置を受けた患者の生存時間を増加する、遺伝子療法に対する免疫応答を低減する、または両方が可能である。

【0105】

対象

処置される対象は、表1に収載される遺伝性疾患などの任意の遺伝性疾患を抱えた、トリまたは哺乳動物などの任意の脊椎動物であり得る。したがって、遺伝性疾患を抱えたヒト、サル、ネコ、イヌまたは他の家畜対象を、開示された方法で処置することが可能である。一部の例では、対象は生後6ヶ月未満のヒト乳児である。一部の例では、対象は少なくとも18歳のヒト成人である。

30

【0106】

完全または部分的骨髄アブレーション

一部の例では、骨髄移植（HSCを用いたなど）および遺伝子療法を受ける前に、対象は、骨髄中の造血細胞を根絶する量で骨髄アブレーション療法を受ける。そのような方法は対象の免疫系を抑制し、その骨髄を壊滅させる。この処置により、投与時間から1~3週間以内に深刻な汎血球減少が生じる。そのような処置を使用すれば、それに続いて施される遺伝子療法に対する免疫反応を低減するまたは除去することが可能になる。一部の例では、化学療法、放射線照射、または両方を使用して、対象の骨髄をアブレーションする。

40

【0107】

一部の例では、対象は、治療有効量の全身照射（TBI）、化学療法、またはそれらの組合せが施される。使用可能である化学療法剤の例としては、これらに限定されないが、カルムスチン、ブスルファン（Bu）、カルボプラチン、シクロホスファミド（Cy）、シトキサン、エトポシド、フルダラビン、ヒドロキシ尿素、メルファラン、メトトレキサート、チオテパ、およびトポテカンのうちの1つまたは複数挙げられる。一例では、対象は、治療有効量のブスルファンを用いて処置される。一例では、対象は、治療有効量のアレムツズマブ、ヒドロキシ尿素、フルダラビン、およびブスルファンを用いて処置される。一例では、対象は、治療有効量のアレムツズマブおよびフルダラビン（例えば、0.2~5mg/kg ivアレムツズマブ、0.1~30mg/kg ivフルダラビン）

50

を用いて処置され、一部の例では、ヒドロキシ尿素（例えば、 30 mg/kg/day 経口）、Bu、メルファラン（例えば、 70 mg/kg /用量 IV）、チオテパ（例えば、 200 mg/kg /用量 IV）またはそれらの組合せをさらに含む。一部の例では、方法は、治療有効量のタクロリムスおよびミコフェノール酸モフェチル（MMF）を投与することをさらに含む。

【0108】

一部の例では、処置される対象は、3～4日間かけて $1200\sim1300$ センチグレイなどの放射線照射を受ける。一例では、対象は、16の総用量（ 16 mg/kg ）について6時間毎に 1 mg/kg の経口Bu、それに続いて全部で $120\sim200\text{ mg/kg}$ について2～4日のCyを投与される。一部の例では、対象は、6分割照射線量の 200 cGy で 120 mg/kg Cyを投与される。

10

【0109】

骨髄アブレーションの成功は、もっぱら宿主T細胞回復がないことである。すなわち、T細胞キメリズムが100%の宿主ではない限り、骨髄破壊は成功する。一部の例では、一部の宿主T細胞は約50%で観察されるが、それは時間と共に低下する。

【0110】

一部の例では、骨髄移植（HSCを用いたなど）および遺伝子療法を受ける前に、対象は、骨髄中の造血細胞を低減するが根絶はしない量で、非骨髄アブレーション療法を受ける。したがって、そのような対象は、レシピエントの骨髄を部分的にアブレーションするが除去はしないと予想される減少させた用量の化学療法または全身照射を受けることが可能である。一例では、非骨髄アブレーション処置はブスルファンを使用しないが、代わりにメルファランおよびチオテパを使用する（例えば、NIH clinical trial NCT01962415 (clinicaltrials.gov/show/NCT01962415)に記載されている）。前記文献は参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。一部の例では、メルファランは 70 mg/m^2 /用量でIV投与され、チオテパは 200 mg/m^2 /用量でIV投与を施される。

20

【0111】

HSCの注入

対象が骨髄アブレーション療法を受けた後、対象は、HSC（例えば、アロジェニックHSC）などの、骨髄を再生するために治療有効量の細胞を投与される。そのような方法は、骨髄アブレーション療法に続いて対象の免疫系を再生する。HSCは、あらゆる血液細胞を生じる幹細胞である。したがって、HSCはあらゆる血液系統をin vivoで生み出すことが可能である。HSCは、臍帯、血液、および骨髄（BM）に存在している。一部の例では、HSCはCD34を発現する。一部の例では、マウスHSCは、CD34^{lo/-}、SCA-1⁺、Flt-3⁺、C-kit⁺、lin⁻である。一部の例では、ヒトHSCはCD34⁺、CD59⁺、Thy1/CD90⁺、CD38^{lo/-}、C-kit/CD117⁺、CD166⁺、lin⁻である。

30

【0112】

一部の例では、対象は、骨髄（BM）、血縁関係のない臍帯血、保存臍帯血、またはHSC（臍帯、血液（PBMCなど）、またはBMから得られるものなど）を投与される。移植は、成功した骨髄アブレーションに続いて、しかし、遺伝子療法のための核酸分子の投与の前に実施される。

40

【0113】

一部の例では、HSCを含む移植は、遺伝子療法のための核酸分子の投与の少なくとも1日、少なくとも2日、少なくとも3日、少なくとも4日、少なくとも5日、少なくとも6日、少なくとも7日、少なくとも2週間、少なくとも3週間、少なくとも1ヶ月、または少なくとも2ヶ月前になどの、遺伝子療法のための核酸分子の投与の少なくとも6時間前に、遺伝子療法のための核酸分子の投与の少なくとも12時間前に、例えば、遺伝子療法のための核酸分子の投与の12時間、24時間、48時間、72時間、または96時間前に実施される。一部の例では、HSCを含む移植は静脈内に投与される。

【0114】

50

一部の例では、HSCは、対象にアロジェニックである。一部の例では、ドナーは、処置される対象に対して対立遺伝子レベルHLA-DRB1タイピングとの6つのHLA適合のうち最小で4つを有し、例えば、6HLAマーカーのうち4、5、または6つで適合する。一部の例では、HSCは対象にとって自家HSCである。

【0115】

一部の例では、対象は、少なくとも $5 \times 10^7 / \text{kg}$ 、少なくとも $1 \times 10^8 / \text{kg}$ AIBW、または少なくとも $3 \times 10^8 / \text{kg}$ AIBWなどの、少なくとも $2 \times 10^7 / \text{kg}$ 、少なくとも $3 \times 10^7 / \text{kg}$ の総有核細胞(TNC)用量を受ける。したがって、一部の例では、対象は、 $5 \sim 12 \times 10^7 \text{ TNC} / \text{kg}$ または $2.3 \sim 25 \times 10^7 \text{ TNC} / \text{kg}$ などの、少なくとも20,000,000 TNC/kg、25,000,000 TNC/kg、30,000,000 TNC/kg、少なくとも50,000,000 TNC/kg、少なくとも60,000,000 TNC/kg、少なくとも70,000,000 TNC/kg、少なくとも80,000,000 TNC/kg、少なくとも90,000,000 TNC/kg、少なくとも100,000,000 TNC/kg、少なくとも120,000,000 TNC/kg、少なくとも200,000,000 TNC/kg、または少なくとも250,000,000 TNC/kgを投与される。

10

【0116】

一部の例では、対象は、少なくとも $3 \times 10^5 / \text{kg}$ 、少なくとも $5 \times 10^5 / \text{kg}$ 、少なくとも $1 \times 10^6 / \text{kg}$ 、少なくとも $3 \times 10^6 / \text{kg}$ 、少なくとも $5 \times 10^6 / \text{kg}$ 、少なくとも $1 \times 10^7 / \text{kg}$ 、少なくとも $3 \times 10^7 / \text{kg}$ 、少なくとも $5 \times 10^7 / \text{kg}$ 、または少なくとも $1 \times 10^8 / \text{kg}$ などの、少なくとも $1.5 \times 10^5 / \text{kg}$ 、例えば、 $1 \sim 30 \times 10^5 / \text{kg}$ 、例えば、 $1.5 \sim 30 \times 10^5 / \text{kg}$ のCD34+前駆体用量を受ける。

20

【0117】

対象は、+1日目に顆粒細胞コロニー刺激因子(G-CSF)も投与され、ANCが2,000になるまで続けることが可能である。一部の例では、G-CSFは、少なくとも $5 \text{ mcg} / \text{kg} / \text{日}$ もしくはSC、少なくとも $10 \text{ mcg} / \text{kg} / \text{日}$ もしくはSC、または少なくとも $10 \text{ mcg} / \text{kg} / \text{日}$ もしくはSCなどの、少なくとも $1 \text{ mcg} / \text{kg} / \text{日}$ もしくはSCの用量で投与される。

30

【0118】

一部の例では、移植に続いて、対象は、その免疫系が回復するまで免疫抑制療法を受ける。一部の例では、対象は、カルシニューリン阻害剤(例えば、タクロリムス、シクロスポリンA)、グルココルチコイド(例えば、プレドニゾン、デキサメタゾン、ヒドロコルチゾン)、または細胞分裂阻害剤(例えば、メトトレキサート、アザチオプリン、細胞傷害抗生物質)などの、治療有効量の1つまたは複数の免疫抑制剤を投与される。一部の例では、対象は移植に続いて治療量のシクロホスファミド(cyclophosphamide)を投与される。

【0119】

遺伝子治療の投与

免疫アブレーションおよび関連した完全または部分的骨髄アブレーションに続いて、処置された対象の造血系および免疫系を再構築するためにHSC(例えば、臍帯血または骨髄)が移植され、治療有効量の治療用核酸分子が対象に投与され、ここで核酸分子は遺伝性疾患を修正する。一部の例では、治療用核酸分子は、AAVベクター(AAV.rh10など)、アデノウイルスベクター、またはレンチウイルスベクターなどのウイルスベクターの一部である。他の例が本明細書で提供される(参照によりその全ての内容が本明細書に組み込まれるChoudhuryら、Neuropharmacol. 120巻: 63~80頁、2017年も参照)。方法は、特定の遺伝子治療法に限定されず、非相同末端結合(NHEJ)、ジンクフィンガーヌクレアーゼ(ZFN)、転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ(TALEN)、およびCRISPR/Cas9を利用するものを含む(例えば、参照により

40

50

その全ての内容が本明細書に組み込まれるMorganら、Cell Stem Cell 21巻：574～90頁、2017年；Shimら、Acta Pharma. Sinica 38巻：738～53頁、2017年を参照）。

【0120】

遺伝子治療の例には、遺伝子もしくはタンパク質の発現を増加させるか、遺伝子もしくはタンパク質の発現を低下させるか、または遺伝子もしくはタンパク質の配列を修正するために使用される方法および薬剤が含まれる。例えば、遺伝子発現を誘導するために、機能的遺伝子を対象、例えば、正常な機能を欠いている標的細胞または組織に送達することができる。遺伝子発現を低減させるために、短い核酸分子（例えば、siRNA、アンチセンス分子）を導入して、疾患関連遺伝子をサイレンシングするかまたは妨害することができる。遺伝子編集法を使用して、ゲノムレベルで永久的かつ特異的な校正効果を発揮することができる。

10

【0121】

開示された方法で処置することができる疾患には、血液のあらゆる遺伝性疾患（例えば、鎌状赤血球症、原発性免疫不全症）、HIV（例えば、HIV-1）、および血液悪性腫瘍またはがんが含まれる。原発性免疫不全症およびそれらの対応する突然変異の例には、Al-Herzら（参照によりその全ての内容が本明細書に組み込まれるFrontiers in Immunology、5巻、記事162、2014年4月22日）に列挙されるものが含まれる。血液悪性腫瘍またはがんは、血液、骨髄、およびリンパ節に影響を及ぼす腫瘍である。例には、白血病（例えば、急性リンパ性白血病、急性骨髄性白血病、慢性リンパ性白血病、慢性骨髄性白血病、急性単球性白血病）、リンパ腫（例えば、ホジキンリンパ腫および非ホジキンリンパ腫）、および骨髄腫が含まれる。表1は、治療用核酸分子によって標的とされ得る例示的な障害および遺伝子の一覧を提示する。一部の例では、遺伝子編集によって修正し得る突然変異が提示される。

20

【表 1 - 1】

表 1:例示的な障害および対応する突然変異

疾患	遺伝子	突然変異
血球の障害		
鎌状赤血球貧血	ヘモグロビンの β グロビン鎖	点突然変異(6 番目のアミノ酸における Glu→Val)を引き起こす SNP(A から T)
血友病	凝固因子 I~XIII のいずれか	
血友病 A	凝固因子 VIII	大きい欠失、挿入、逆位、および点突然変異
血友病 B	凝固因子 IX	
アルファサラセミア	HBA1 または HBA2	第 16 染色体短腕の突然変異または欠失
ベータサラセミア	HBB	第 11 染色体の突然変異
デルタサラセミア	HBD	突然変異
フォンヴィレブランド病	フォンヴィレブランド因子	突然変異または欠失
悪性貧血	MTHFR	
ファンconi 貧血	FANCA, FANCC, FANCD2, FANCG, FANCI	<p>FANCA: c.3788_3790del (p.Phe1263del); c.1115_1118delTTGG (p.Val372fs); エクソン 12-17del; エクソン 12-31del; c.295C>T (p.Gln99X)</p> <p>FANCC: c.711+4A>T (当初は IVS4+4A>T と報告された); c.67delG (当初は 322delG として報告された)</p> <p>FANCD2: c.1948-16T>G</p> <p>FANCG: c.313G>T (p.Glu105X); c.1077-2A>G; c.1480+1G>C; c.307+1G>C; c.1794_1803del (p.Trp599fs); c.637_643del (p.Tyr213fs)</p> <p>FANCI: c.2392C>T (p.Arg798X)</p>
血小板減少性紫斑病	ADAMTS13	ミスセンスおよびナンセンス突然変異
血栓形成傾向	第 V 因子ライデンプロトロンビン	F5 遺伝子の 1691 位の突然変異プロトロンビン G20210A
原発性免疫不全症		

10

20

30

40

【表 1 - 2】

T-B+ SCID	IL-2RG、JAK3;IL-2、-4、-7、-9、-15、および-21 の受容体のガンマ鎖の欠損	
T-B- SCID	RAG1, RAG2	
WHIM 症候群	CXCR4	ヘテロ接合突然変異(例えば、カルボキシ末端内);カルボキシ末端切断(例えば、10～19 残基)
他の原発性免疫不全(PID)症候群		
IL-7 受容体重症複合型免疫不全(SCID)	IL7 受容体	
アデノシンデアミナーゼ欠損症(ADA)SCID	ADA	
プリンヌクレオシドホスホリラーゼ(PNP)欠損症	PNP	
ウィスコット・アルドリッチ症候群(WAS)	WAS	300 を超える突然変異が同定された
慢性肉芽腫症(CGD)	CYBA、CYBB、NCF1、NCF2、または NCF4	
白血球接着不全症(LAD)	ベータ 2 インテグリン	
HIV	C-C ケモカイン受容体 5 型(CCR5)、MSRB1 HIV の長い末端反復 CSCR4 P17 PSIP1	CCR5 の 32bp の欠失
デュシェンヌ型筋ジストロフィー	CCR5 DMD	
グリコーゲン蓄積症 IA 型	G6Pase	
網膜ジストロフィー	CEP290 ABCA4	C2991+1655A>G 5196+1216C>A; 5196+1056A>G; 5196+1159G>A; 5196+1137G>A; 938-619A>G; 4539+2064C>T
マグネシウム欠乏、エプスタイン-バーウイルス感染、および新生物を伴う X 連鎖免疫不全(XMEN)	MAGT1	
単一遺伝子障害		
異染性白質ジストロフィー(MLD)	アリアルスルファターゼ A(ARSA)	

10

20

30

40

【表 1 - 3】

副腎白質ジストロフィー(ALD)	ABCD1	
ムコ多糖症(MPS)障害 ハンター症候群 ハーラー症候群 シャイエ症候群 サンフィリップ症候群 A、B、C、および D モルキオ症候群 A モルキオ症候群 B マロトー-ラミー症候群 スライ症候群 Natowicz 症候群	IDS IDUA IDUA SGSH, NAGLU, HGSNAT, GNS GALNS GLB1 ARSB GUSB HYAL1	
アルファマンノース症(manosidosis)	MAN2B1	
ニーマンピック病 A 型、B 型、および C 型	SMPD1, NPC1, NPC2	
嚢胞性線維症	嚢胞性線維症膜コンダクタンس制御因子(CFTR)	ΔF508
多発性嚢胞腎	PKD-1, PDK-2, PDK-3	
テイサックス病	HEXA	1278insTATC
ゴーシェ病	GBA	
ハンチントン病	HTT	CAG リピート
神経線維腫症 1 型および 2 型	NF-1 および NF2	NF1 の CGA→UGA→Arg1306Term
家族性高コレステロール血症	APOB、LDLR、LDLRAP1、および PCSK9	
がん		
慢性骨髄性白血病(CML)	BCR-ABL ASXL1	融合
急性骨髄性白血病(AML)	第 11 染色体長腕 23 または t(9;11)	転座
骨肉腫	RUNX2	
結腸直腸がん	EPHA1	
胃がん、黒色腫	PD-1	
前立腺がん	アンドロゲン受容体	
子宮頸がん	E6, E7	
神経膠芽腫	CD	
神経学的障害		
アルツハイマー病	NGF	

10

20

30

40

【表 1 - 4】

異染性白質ジストロフィー	ARSA	
多発性硬化症	MBP	
ウィスコット-アルドリッチ症候群	WASP	
X連鎖副腎白質ジストロフィー	ABCD1	
AACD 欠損症	AADC	
バッテン病	CLN2	
カナヴァン病	ASPA	
巨大軸索ニューロパチー	GAN	
レーバー遺伝性視神経症	MT-ND4	
MPS IIIA	SGSH, SUMF1	
パーキンソン病	GAD, NTRN, TH, AADC, CH1, GDNF, AADC	
ポンペ病	GAA	
脊髄性筋萎縮症 1 型	SMN	

10

20

【0122】

開示された方法を使用することは、表 1 に列挙された障害のいずれか、または他の公知の遺伝性障害を処置するために使用され得る。処置は、障害の全ての特徴の 100% の除去を必要としないが、そのような特徴の低減であり得る。具体的な例を以下に提供するが、この教示に基づいて、他の障害の症状にも同様に作用し得ることを理解するであろう。例えば、開示された方法は、対象によって発現されないかもしくは発現が低減したタンパク質の発現を増加させるか、対象によって望ましくない形で発現しているかもしくは発現が低減したタンパク質の発現を減少させるか、遺伝性突然変異を修正するか、またはそれらの組合せのために使用することができる。

30

【0123】

例えば、開示された方法は、原発性免疫不全症などの血液の遺伝性疾患の望ましくない効果を処置または低減するために使用することができる。

【0124】

例えば、開示された方法（治療用核酸分子を使用してヘモグロビンの グロビン鎖の突然変異を修正することができる）は、鎌状赤血球症の望ましくない効果を処置または低減することができる。一例では、治療用核酸分子は、鎌状赤血球症を引き起こすヘモグロビンの グロビン鎖の突然変異を修正することができる。一例では、開示された方法は、レシピエント対象における鎌状赤血球症の症状（例えば、血中の鎌状赤血球の存在、疼痛、虚血、壊死、貧血、血管閉塞クリーゼ、骨髓無形成クリーゼ、脾臓血球貯留クリーゼ、および溶血クリーゼの 1 つまたは複数）を低減し、例えば、（治療用核酸分子を投与しない場合と比較したとき）、少なくとも 10%、少なくとも 20%、少なくとも 50%、少なくとも 70%、または少なくとも 90% 低減する。一例では、開示された方法は、レシピエント対象における鎌状赤血球の数を減少させ、例えば、（治療用核酸分子を投与しない場合と比較したとき）、少なくとも 10%、少なくとも 20%、少なくとも 50%、少なくとも 70%、少なくとも 90%、または少なくとも 95% 減少させる。

40

【0125】

例えば、開示された方法（治療用核酸分子を使用して第 V 因子ライデンまたはプロトロンビンの遺伝子の突然変異を修正することができる）は、血栓形成傾向の望ましくない効

50

果を処置または低減することができる。一例では、治療用核酸分子は、血栓形成傾向を生じる第Ⅴ因子ライデンまたはプロトロンビンの遺伝子の突然変異を修正することができる。一例では、開示された方法は、レシピエント対象における血栓形成傾向の症状（例えば、深部静脈血栓症、肺塞栓症、静脈血栓塞栓症、腫脹、胸痛、動悸などの血栓症の1つまたは複数）を低減し、例えば、（治療用核酸分子を投与しない場合と比較したとき）、少なくとも10%、少なくとも20%、少なくとも50%、少なくとも70%、または少なくとも90%低減する。一例では、開示された方法は、レシピエント対象における凝固因子の活性を低下させ、例えば、（治療用核酸分子を投与しない場合と比較したとき）、少なくとも10%、少なくとも20%、少なくとも50%、少なくとも70%、少なくとも90%、または少なくとも95%減少させる。

10

【0126】

例えば、開示された方法（治療用核酸分子を使用してCD40リガンドの遺伝子の突然変異を修正することができる）は、CD40リガンド欠損症の望ましくない効果を処置または低減するために使用することができる。一例では、治療用核酸分子は、CD40リガンド欠損症を引き起こすCD40リガンドの遺伝子の突然変異を修正することができる。一例では、開示された方法は、レシピエント対象におけるCD40リガンド欠損症の症状（例えば、血清IgMの上昇、他の免疫グロブリンの低血清レベル、日和見感染症、自己免疫、および悪性腫瘍の1つまたは複数）を低減し、例えば、（治療用核酸分子を投与しない場合と比較したとき）、少なくとも10%、少なくとも20%、少なくとも50%、少なくとも70%、または少なくとも90%低減する。一例では、開示された方法は、レシピエント対象におけるCD40リガンド欠損症の量または活性を増加させ、例えば、（治療用核酸分子を投与しない場合と比較したとき）、少なくとも10%、少なくとも20%、少なくとも50%、少なくとも70%、少なくとも90%、少なくとも100%、少なくとも200%、または少なくとも500%増加させる。

20

【0127】

例えば、開示された方法（治療用核酸分子を使用してCCR5活性を低下させることができる）は、HIV-1感染症の望ましくない効果を処置または低減するために使用することができる。一例では、治療用核酸分子は、CCR5活性を低下させ、例えば、少なくとも20%、少なくとも50%、少なくとも70%、または少なくとも90%低下させることができる。一例では、CCR5は、32bp欠失を含むよう改変される（CCR5 32）。一例では、開示された方法は、レシピエント対象におけるHIV-1感染症の症状（例えば、熱、大きい圧痛のあるリンパ節、気管の炎症、発疹、頭痛、口腔の痛み、悪心、嘔吐、下痢、末梢神経障害、ギランバレー症候群、体重減少、ウイルス量、CD4+T細胞のレベル低下、ニューモシスティス肺炎、HIV消耗症候群の形態の悪液質、および食道カンジダ症の1つまたは複数）を低減し、例えば、（治療用核酸分子を投与しない場合と比較したとき）、少なくとも10%、少なくとも20%、少なくとも50%、少なくとも70%、または少なくとも90%低減する。一例では、開示された方法は、HIV感染レシピエント対象におけるCD4+T細胞のレベルを増加させ、例えば、（治療用核酸分子を投与しない場合と比較したとき）、少なくとも10%、少なくとも20%、少なくとも50%、少なくとも70%、少なくとも90%、少なくとも100%、少なくとも200%、少なくとも500%、または少なくとも1000%、CD4+T細胞を増加させる。

30

40

【0128】

例えば、開示された方法は、遺伝性欠陥から生じる原発性免疫不全症の望ましくない効果を処置または低減するために使用することができる。例えば、開示された方法（治療用核酸分子を使用して上に列挙した遺伝子における突然変異を修正することができるか、または対象において欠失しているか欠陥のある機能性タンパク質を発現することができる）は、原発性免疫不全症の望ましくない効果を処置または低減することができる。一例では、開示された方法は、レシピエント対象における原発性免疫不全症の症状（例えば、細菌感染症、真菌感染症、ウイルス感染症、寄生虫感染症、リンパ腺腫脹、脾臓肥大、創傷、

50

および体重減少の1つまたは複数)を低減し、例えば、(治療用核酸分子を投与しない場合と比較したとき)、少なくとも10%、少なくとも20%、少なくとも50%、少なくとも70%、または少なくとも90%低減する。一例では、開示された方法は、原発性免疫不全症のレシピエント対象における免疫細胞(例えば、CD8細胞などのT細胞)の数を増加させ、例えば、(治療用核酸分子を投与しない場合と比較したとき)、少なくとも10%、少なくとも20%、少なくとも50%、少なくとも70%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも100%、少なくとも200%、少なくとも300%、少なくとも400%、または少なくとも500%増加させる。一例では、開示された方法は、一定期間にわたって(例えば、1年間にわたって)、原発性免疫不全症のレシピエント対象における感染(例えば、細菌、ウイルス、真菌、またはそれらの組合せ)の数を減少させ、例えば、(治療用核酸分子を投与しない場合と比較したとき)、少なくとも10%、少なくとも20%、少なくとも50%、少なくとも70%、少なくとも90%、または少なくとも95%減少させる。

10

20

30

40

50

【0129】

例えば、開示された方法は、単一遺伝子障害の望ましくない効果を処置または低減するために使用することができる。例えば、開示された方法(治療用核酸分子を使用して上に列挙した遺伝子における突然変異を修正することができるか、または対象において欠失しているか欠陥のある機能性タンパク質を発現することができる)は、単一遺伝子障害の望ましくない効果を処置または低減することができる。一例では、開示された方法は、レシピエント対象における単一遺伝子障害の症状を低減し、例えば、(治療用核酸分子を投与しない場合と比較したとき)、少なくとも10%、少なくとも20%、少なくとも50%、少なくとも70%、または少なくとも90%低減する。一例では、開示された方法は、単一遺伝子障害のレシピエント対象で通常発現していない正常タンパク質の量を増加させ、例えば、(治療用核酸分子を投与しない場合と比較したとき)、少なくとも10%、少なくとも20%、少なくとも50%、少なくとも70%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも100%、少なくとも200%、少なくとも300%、少なくとも400%、または少なくとも500%増加させる。

【0130】

例えば、開示された方法は、レシピエント対象における血液学的悪性腫瘍の望ましくない効果を処置または低減するために使用することができる。一例では、開示された方法は、レシピエント対象(例えば、白血病の対象)における異常白血球(例えば、B細胞)の数を減少させ、例えば、(開示された治療を投与しない場合と比較したとき)、少なくとも10%、少なくとも20%、少なくとも50%、少なくとも70%、または少なくとも90%減少させる。一例では、開示された治療の投与は、白血病の望ましくない効果を処置または低減するのに使用することができ、例えば、リンパ腫のサイズ、リンパ腫の体積、リンパ腫の増殖速度、腫瘍の転移を減少させ、例えば、(開示された治療を投与しない場合と比較したとき)、少なくとも10%、少なくとも20%、少なくとも50%、少なくとも70%、または少なくとも90%減少させる。一例では、開示された治療の投与は、多発性骨髄腫の望ましくない効果を処置または低減するのに使用することができ、例えば、レシピエント対象における異常形質細胞の数を減少させ、例えば、(開示された治療を投与しない場合と比較したとき)、少なくとも10%、少なくとも20%、少なくとも50%、少なくとも70%、または少なくとも90%減少させる。

【0131】

例えば、開示された方法は、レシピエント対象における遺伝性欠陥から生じる悪性腫瘍の望ましくない効果を処置または低減するために使用することができる。一例では、開示された方法は、レシピエント対象(例えば、上に列挙したがんの対象)におけるがん細胞の数、腫瘍のサイズ、腫瘍の体積、または転移の数を減少させ、例えば、(開示された治療を投与しない場合と比較したとき)、少なくとも10%、少なくとも20%、少なくとも50%、少なくとも70%、または少なくとも90%減少させる。一例では、開示された治療の投与は、リンパ腫の望ましくない効果を処置または低減するのに使用することが

でき、例えば、腫瘍のサイズ、腫瘍の体積、がんの増殖速度、がんの転移を減少させ、例えば、（開示された治療を投与しない場合と比較したとき）、少なくとも10%、少なくとも20%、少なくとも50%、少なくとも70%、または少なくとも90%減少させる。

【0132】

例えば、開示された方法は、レシピエント対象における遺伝性欠陥から生じる神経疾患の望ましくない効果を処置または低減するために使用することができる。一例では、開示された方法は、レシピエント対象（例えば、上に列挙した神経疾患の対象）における神経機能を増加させ、例えば、（開示された治療を投与しない場合と比較したとき）、少なくとも10%、少なくとも20%、少なくとも50%、少なくとも70%、少なくとも90%、少なくとも100%、少なくとも200%、少なくとも300%、少なくとも400%、または少なくとも500%増加させる。

10

【実施例】

【0133】

（実施例1）

クラッペ病のtwitcherマウスモデルの処置

この実施例は、造血幹細胞移植（HSC T）に続いてGALC遺伝子を担持するアデノ随伴ウイルスセロタイプrh. 10ベクター（AAVrh. 10-mGALC）を使用する、クラッペ病のtwitcherマウスモデルを処置するために使用される方法を記載する（Rafiら、Mol Ther. 23巻（11号）：1681~90頁、2015年）。

20

【0134】

twitcherマウスは、GALC遺伝子におけるナンセンス突然変異（W339X）に起因するGALC活性の非存在によって生じる表現型を有する、天然に存在する突然変異系統である。マウスは、発育不全を示し、約20日齢で振戦を含む異常を発症し、30~35日齢で後肢の脱力が起こり、続いて約40日齢で消耗および死亡する。この時点で、ヒトの疾患に類似した病理組織学的欠陥（例えば、脱髄および炎症性変化）がCNSおよびPNSに見られる。

【0135】

マウスは出生後日数（PND）10で処置したが、これは、この年齢において、それらが標的臨床集団において乳児疾患にさらによく類似するからである。さらに、この戦略により、 2×10^{11} 粒子単位の総用量について、より多い量のウイルス粒子を投与する。放射線照射による骨髄アブレーションの代わりに、BMTの1日前およびAAVrh. 10-mGALC注射の2日前に、PND9においてブスルファン（30mg/kg）による骨髄アブレーションを使用した。

30

【0136】

以前の研究は、PND10でこのベクター単独（BMTなし）の静脈内注射で処置したtwitcherマウスは平均65~75日（未処置マウスの約40日と比較して）生存し、BMT単独（遺伝子治療なし）で処置したマウスは、一部はより長く生存するが、平均65~75日生存することを実証した。

【0137】

40

16匹のマウスを、PND9においてブスルファンを使用して骨髄抑制した後、1日後に骨髄移植（BMT）し、次いで24時間後にAAVrh. 10-GALCの単回静脈内注射をした。それらは異なる時期に移植したので（罹患マウスの入手可能性のため）、この時点でのそれらの年齢は異なる。無関係な原因で非常に若くして死んだ1匹のマウスを除いて、残りは経過良好であり、一部は300日齢を過ぎて生存していた（図2）。それらは、300日齢を超えるまで、体重を維持し、体力やバランスを含む正常な行動を示している。

【0138】

この併用療法で処置した4匹のマウスからの組織を検査した。GALC酵素活性は、脳、小脳、および脊髄において正常であり、坐骨神経において正常より高かった。肝臓、心

50

臓、筋肉において非常に高いGALC活性が測定された。併用療法の後、全ての神経組織においてミエリン形成の大幅な改善が見られた。坐骨神経は他の処置方法によって修正されないで、この組織における正常なミエリン形成は最も劇的な発見である(図3)。全ての神経組織におけるアストログリオシスははるかに少なく、CD68陽性細胞(活性化マクロファージ)についての染色は、一部のCD68陽性細胞が見られた脊髄を除く全ての神経組織において正常へと減少した。このデータは、BMTとそれに続くAAVrh.10-mGALCの単回静脈内注射が、いずれかの処置単独よりも良好な転帰をもたらすことを示している。AAVrh.10が、脳、小脳、脊髄、および坐骨神経に十分なGALC活性を供給し、BMTがこの疾患に見られる炎症を制御するのを助けると考えられる。

10

【0139】

したがって、造血幹細胞移植(HSCT)直後のAAVrh.10-mGALCの静脈内注入は、twitcherマウスにおいて疾患進行を急速に停止させた。この併用処置は、いずれかの処置単独よりも良好な転帰をもたらした。AAVrh.10-GALCは脳、脊髄、および末梢神経にGALC活性を急速に供給し、HSCTはクラッペ病に見られる炎症を制御する。

【0140】

(実施例2)

投与のタイミング

この実施例は、twitcherマウスにおいて3つの時点：出生後日数(PND)11、15、および20で、HSCT後に注入された静脈内AAVrh.10-GALCの有効性を比較するために使用され得る方法を記載する。

20

【0141】

以前の研究では、マウスにHSCTの1日後および化学療法の2日後にAAVrh.10-GALCを与えた。しかしながら、これほどHSCTに近い時点でのAAVrh.10注入はヒトにおいて行われていない。したがって、ドナー細胞のホーミングおよび再増殖が起こっているはずである数日後(移植後約14日)にAAVrh.10-GALCを投与した場合に同様の効果が達成できるかどうか決定する。同系移植マウスにおける完全な造血再増殖は、HSCT後10日以内に起こり(Sadelainら、J. Immunol. 144巻: 1729~36頁、1990年)、したがって、HSCTの有効性は、PND11、15、および20でのAAVrh.10-GALCの静脈内注入が後に続く、PND10で実施される。

30

【0142】

無作為に4つの群に割り当てられた46匹のマウスに、30mg/kgのブスルファンの腹腔内注射の1日後に、PND10で同系HSCTを与える。3~5×10⁷細胞を0.2mlの滅菌無血清DMEMに懸濁し、次いで、IP投与する。4群のうちの3群(各群n=10)に、HSCT後1、5、または10日目(PND11、15、20)で、AAVrh.10-GALCの一用量を与える。HSCTのみで処置された第4の群(n=16マウス)は、対照としての役割を果たす。主要評価項目は、150日目までの生存期間ならびにPND60およびPND90での体重である(生存マウスの全体的な健康状態を評価するため)。屠殺したマウスから、脳組織(皮質、小脳、脳幹)、肝臓、心臓、骨格筋、脾臓、および坐骨神経を収集し、酵素活性アッセイおよび免疫組織化学によって評価するときのGALC分布を比較する。

40

【0143】

(実施例3)

AAVrh.10-GALCの投薬

この実施例は、長期生存のためのtwitcherマウスにおけるHSCT後の静脈内AAVrh.10-GALCの最小の投薬を確立するために使用され得る方法を記載する。

【0144】

50

AAVrh.10-GALCの最小有効用量（すなわち、統計的に有意な生存率の改善をもたらす最小用量）を決定する。 4×10^{13} ゲノムコピー（gc）/kgの静脈内AAVrh.10-GALC用量が、検査した最大用量である。最小用量は2桁低く、 4×10^{11} gc/kgであり、これもまたヒト対象によく適応する。中間用量は 4×10^{12} gc/kgであり、これは、ヒト新生児に対する約 2×10^{13} gcの総用量に対応する。twitcherマウスにおける最大試験用量が他の用量よりも長い生存期間をもたらす場合、より高い用量を試験することができる。

【0145】

実施例2と同様に、4群のマウスに、30mg/kgのブスルファンの腹腔内注射の1日後に、PND10で同系HSC Tを与える。実施例2で決定した最適な日に、4群のうち3群（各群n=10）を、 4×10^{13} 、 4×10^{12} 、または 4×10^{11} gc/kgの一用量のAAVrh.10-GALCで静脈内処置する。HSC Tのみで処置した第4の群（n=16マウス）は、対照としての役割を果たす。主要評価項目は、150日目までの生存期間ならびにPND60およびPND90での体重である。

【0146】

（実施例4）

イヌにおけるクラッペ病の処置

この実施例は、マウスにおいて確立された最適なタイミングおよび最小有効用量を使用して、免疫アブレーション化学療法、HSC T、およびHSC T後の静脈内AAVrh.10-GALC注入を使用してクラッペ病のイヌモデルを処置するために使用し得る方法を記載する。

【0147】

GALC突然変異に関してヘテロ接合性のイヌは、ペンシルバニア大学の獣医学部で樹立された。放射線照射は、クラッペ病のイヌにおける免疫アブレーション法として伝統的に使用されてきたが、この方法は、現在ヒトで使用されているコンディショニングレジメンを反映していない。化学療法に基づく方法はイヌで試験されていたが、これはクラッペ病のイヌにおけるHSC T前の化学療法に基づくコンディショニングを検査する最初のものとなる。

【0148】

イヌのために開発されたがこれまでにクラッペ病のイヌで試験されていない化学療法に基づくレジメンを使用して、2匹のイヌが移植される。（ヒトでの処置を模倣するために）イヌにシクロスポリンを30日間与え、次いでブスルファンレジメンの開始前に2週間、約30mg/kg/日で経口ヒドロキシ尿素を与える。HSC T前の-3および-2日に、イヌに、5mg/kg/日のブスルファン（9mLの生理食塩水に希釈した1mLのブスルファン）を1時間にわたってシリンジポンプによる静脈内投与で与える。主要評価項目は、通常の血球数で24週間を超えた生存期間であり、この場合、放射線照射なしの移植が成功したとみなされる。24週間生存している全てのイヌを、病理組織学的研究のために屠殺する。

【0149】

イヌを無作為に次の群の1つに割り当てる：未処置（n=2）、HSC Tのみ（n=3）、またはHSC T+AAVrh.10-GALC（n=3）。AAVrh.10-GALC処置の用量およびタイミングは、マウスにおける結果（実施例2および3）に基づく。処置イヌ対未処置イヌの転帰を12週間目に比較し、処置群の転帰（HSC Tのみ対HSC T+AAVrh.10-GALC）を24週間目に比較する。

【0150】

主要評価項目には、拡散テンソルイメージングおよび異方性比率測定を使用する神経伝導速度ならびに脳のMRIの結果が含まれる。調査転帰は、運動失調症および振戦の発症を含む。移植後の生存を検査するが、24週で依然として生存している全てのイヌは、病理組織学的研究ならびに酵素活性アッセイおよび免疫組織化学によるGALC分布の評価のために、脳組織（皮質、小脳、脳幹）、頸髄、末梢神経（感覚、運動、自律神経）、肝

10

20

30

40

50

臓、腎臓、心臓、大腿四頭筋、性腺、脾臓、小腸および大腸、副腎、ならびに皮膚を収集するために屠殺する。

【0151】

(実施例5)

ラットにおけるクラッペ病の処置

この実施例は、ラットで実施される毒性研究を記載する。静脈内AAVをUCBTの1日後に免疫アブレーションラットに送達する。新しい免疫系は正常なGALC酵素を有し、したがって、ナイーブな患者のようにGALC酵素に反応しないはずである。

【0152】

毒性研究はFischer 433ラットで実施する。骨髄ドナーとしてSprague-Dawleyラットの使用により、twitcherマウスで使用されている自家BMT(実施例1を参照)とは対照的に、真のアロジェニックBMTが得られる。小げっ歯類を使用することにより、群あたり各性別のn=5が可能になり、マウスと比較してこのラットのより大きいサイズにより、屠殺時に1匹の動物からの、全血球算定および血清化学試験に十分な血液の収集がより容易になる。離乳ラット(21日齢)を、免疫抑制、BMT、およびAAV投与のための広範な取り扱いの必要性のために使用する。

10

【0153】

処置群の概要を表2に示す。ヒトまたはラットを対象としたAAVrh.10-hGALCベクターを使用する。ヒトGALC遺伝子をラット(それらは免疫抑制されるが)で使用するため、免疫原性の可能性がある。凝集を最小限にし、血液脳関門の浸透を最大限にするために、ベクターを、ヒトを対象とした5%ソルビトールを含む380mMのPBS中に製剤化する。移植片対宿主病(GVHD)を含むBMT単独に起因する合併症の可能性が存在する。したがって、陰性対照群およびAAVrh.10-hGALCの代わりにBMT+ビヒクルで処置した群を検査する。さらに、静脈内AAVの有害効果はBMTによって増強され得、したがって、AAV単独を与えている群を検査する。

20

【表 2】

表 2. ラットにおける AAVrh.10-hGALC と BMT の併用の安全性評価のための処置群。

群	動物番号	免疫抑制および BMT ¹	AAVrh.10-hGALC ^{2,3}	時点(日) ³
A	1-30	+	ビヒクル	7, 30, 180
B	31-60	+	4×10^{12} gc/kg	7, 30, 180
C	61-90	+	4×10^{13} gc/kg	7, 30, 180
D	91-120	+	達成可能な最大値、 (2×10^{14} gc/kg)	7, 30, 180
E	121-150	-	達成可能な最大値、 (2×10^{14} gc/kg)	7, 30, 180
F	151-180	-	ビヒクル	7, 30, 180

¹ 免疫抑制。ブスルファン、続いて 1 日のミコフェノール酸モフェチルと 4 日のタクロリムス。Sprague-Dawley ドナーラットの骨髄由来の 1×10^7 の未分画単核球を注入する。

² AAV 遺伝子導入。BMT の 1 日後に、ラットに、CMV 増強ニワトリ β アクチンプロモーターによって駆動されてヒト GALC cDNA を発現する示された用量の AAVrh.10 を静脈内注射で与える。

³ ラット(各時点、各性別の n=5)をバルビツレート処置により屠殺し、心臓穿刺を使用して全血球算定および血清化学試験のために血液を収集する。ラットをあらゆる肉眼的異常について検査し、それを記録し、切除する。以下の臓器を取り出し、秤量する:肝臓、腎臓、心臓、および肺。以下の臓器の試料を病理組織学的検査およびあらゆる異常所見の定量化のために採取する:副腎、脳(皮質、小脳)、結腸、横隔膜、十二指腸、精巣上体、食道、肉眼的病変、心臓、回腸、腎臓、肝臓、肺/気管支、2 を超えるリンパ節、骨格筋、坐骨神経、卵巣、膵臓、脊髄、脾臓、精巣、および子宮。各臓器についてヘマトキシリンおよびエオシン染色切片の盲検評価を実施する。同一の組織で二重の試料を保持し、qPCR によりベクターのレベルを分析する。

【0154】

使用するベクターのロット出荷基準を表 3 に示す。全てのベクターはアリコートで - 60 °C 以下において保存し、使用する日に解凍する。

【表 3】

表 3.AAVrh.10hGALC ベクターのロット出荷基準

	試験/仕様	毒性グレード
無菌性	3 つの試験培地で 14 日間、増殖が観察されなかった	AppTec
マイコプラズマ	検出されず	AppTec
エンドトキシン	LAL (Endosafe) <10 EU/mL	工場内
効力	293T 細胞に感染させ、上清中の GALC 活性をアッセイし、結果を記録する	工場内
ゲノム構造	シーケンシングによって確認されたパッケージングされた DNA の同一性(ITR 間)	工場内
純度	最小限の他の可視バンドを伴う、1:1:10 の比で VP1、VP2、および VP3 の 3 つのバンドを示す SDS-PAGE	工場内
同一性	抗 AAVrh.10 抗体を使用するウェスタンブロット;VP1、VP2、および VP3 のバンドの存在	工場内
外観	透明および無色	工場内
pH	試験紙、pH6.5~7.5	工場内
濃度	qPCR, $>2 \times 10^{13}$ gc/ml	工場内
<i>in vitro</i> 外来ウイルス	3 つの細胞系、細胞変性効果なし	AppTec
複製可能 AAV	アデノウイルスヘルパーウイルスの存在下での 293T 細胞における限界希釈、AAV 複製なし	工場内
宿主細胞 DNA の存在	qPCR;1 回用量あたり 100ng 未満	工場内
宿主細胞タンパク質の存在	結果を記録	工場内
空のカプシド:充填されたカプシドの比率	透過型電子顕微鏡法;50%以上の充填されたカプシド	工場内
残存プラスミド DNA	qPCR; 10^9 AAV 粒子あたり 100pg 以下	工場内

10

20

30

40

【 0 1 5 5 】

静脈内注射による 4×10^{13} gc / kg の AAVrh.10-mGALC の標的用量を使用する。twitcher マウスに 2×10^{11} gc を与えたが、これは約 4×10^{13} gc / kg 体重に相当する。クラッペ病と新たに診断された 5 kg の乳児の場合、これは合計 2×10^{14} gc に解釈される。

【 0 1 5 6 】

4×10^{13} gc / kg の標的ヒト用量に基づいて、ラットを A) 標的用量 ; B) 0.1 × 標的用量、および C) 達成可能な最大用量で評価する。注射量が $200 \mu\text{l}$ であり、高純度のベクターを 2×10^{13} gc / ml で提供することができ、ラットが 40 g である場合には、達成可能な最大用量は 2×10^{14} gc / kg である。

50

【 0 1 5 7 】

ラットは、7、30、および180日目で屠殺する。注入の7日後に、AAVrh.10-hGALCの注入に起因する任意の能動的な感染が明らかになり得；30日目で免疫系は完全に再構成され、任意の抗AAVまたは抗導入遺伝子の反応が明らかになり；180日目で、長期的な効果が明らかになる。このより長い時点は、新生マウスへのAAVの静脈内注射後の肝癌の可能性に関連する。

【 0 1 5 8 】

(実施例6)

ヒトにおけるクラッペ病の処置

この実施例は、乳児クラッペ病の乳児における静脈内遺伝子治療(AAVrh.10-hGALC)と無関係のUCBTとの併用処置の安全性および臨床転帰を評価するための非盲検第I/I Ia相研究を記載する。疾患関連の転帰パラメーターには、一連の標準化された神経発達試験(認知および運動技能を含む)、脳MRI、神経伝導研究、および腰椎穿刺の結果が含まれ、これらはベースライン、処置の100日後、およびその後の3ヶ月毎での全部で5回の来院で実施される。この期間は赤ん坊における急速な脳成長の時期を表すので、この間隔は必要である。正式な研究期間終了後、少なくとも5年間は年1回の経過観察が実施される。

10

【 0 1 5 9 】

サンプルサイズ(8人の患者)は、疾患の希少性に基づいて、ロジスチックおよび実際の考慮事項に従って選択された。サンプルサイズは小さいが、これは希少な疾患に典型的である。幸いなことに、臨床的に関心のある効果の大きさは、対象間のばらつきと比較して大きい。早期に診断されたクラッペ病患者の処置に関する以前の研究は、集団の効果の大きさの標準偏差が1.5~2.0であることを示唆する。1群あたり4人の対象は少ないサンプルであるが、研究はクラッペ病群と典型的な発達を示す対照小児との間の1.25の標準偏差の差を検出するための優れた能力(80%)を有する。成功した処置と自然な疾患進行との間には、1.25を超える標準偏差の差が予想される。しかしながら、対象間のばらつきをより正確に推定するために、この研究では長期的なデータを収集し、それをブートストラップ分析で分析する。

20

【 0 1 6 0 】

8人の患者を、2つの用量のコホートに分割する(表4)。4人の患者が最低のベクター用量でAAVrh.10-hGALC/UCBTを受け、その後、より高用量のコホート中の4人のさらなる患者が受ける。最初の群には、標準的な強度減少コンディショニング化学療法レジメンおよび無関係のUCBTを与える(下記のとおり)。UCBTの翌日に、適格な赤ん坊に、ヒトGALC cDNAを発現するAAVrh.10の1回静脈内注射を与え、彼らが輸血非依存性になり、生着され、安定とみなされるまで病院に留まる。AAVrh.10-hGALCを受けていない患者に基づいて、これは少なくとも4週間かかり、したがって、ベクター関連の有害事象の最も可能性が高いとき、遺伝子導入直後の期間中に、移植単位で対象を毎日モニタリングする。約30~60日目に、患者を退院させ、その後週に1回追跡する。その後3ヶ月の間隔で、対象を総合評価に供する(表5)。群Aの最初の対象は、その後の対象を登録する前に3ヶ月間追跡する。

30

40

【表4】

表4.静脈内 AAVrh.10-hGALC と UCBT の併用のための患者群

コホート	患者数	用量
A	4	0.25×標的用量
B	4	4×10 ¹³ gc/kg の標的用量(前臨床安全性 研究中)

【 0 1 6 1 】

重度の免疫抑制対象における静脈内AAV媒介遺伝子治療の使用についての先例はなく

50

、したがって、この第Ⅰ/ⅠⅠa相研究は主に安全性に焦点を当てる。結果として、研究は同時対照群なしで実施する。しかしながら、同一のパラメーターを用いる標準プロトコールを使用して前向きに評価された既知の乳児クラッペ病患者は、未処置の患者（ $n = 79$ ）とUCBTで処置された患者（ $n = 54$ ）の両方において疾患の予想された経過を示す。これらの既存のデータは、転帰パラメーターにおける予想される時間依存的変化、およびそのような尺度の標準偏差を決定するのに十分である。これにより、併用療法で処置された患者における疾患進行の正式な統計的評価が可能になる。

【0162】

性別、人種、民族に関係なく、8人の患者を登録する。選択基準は以下のとおりである：

1. ベースライン来院の後、乳児クラッペ病の確定診断、白血球におけるガラクトセレブロシド - ガラクトシダーゼ（GALC）活性が 0.20 nmol/h/mg タンパク質未満、および2つの病原性GALC突然変異。
2. スクリーニング時の年齢：1日～12ヶ月。
3. ニューロイメージング、神経伝導研究、または聴覚脳幹誘発電位の異常
4. 無関係のUCBTに適している。
5. 臨床プロトコールに従うことができる親および/または法定後見人。

【0163】

除外基準は以下のとおりである：

1. 以前のHSCCTの履歴。
2. 臨床的に重要な既知の心血管疾患、肝疾患、肺疾患、腎疾患、または他の病状の存在。
3. 主要な先天異常の存在。
4. 能動的なサイトメガロウイルス、エプスタイン - バーウイルス、ヘルペスウイルス、もしくはアデノウイルスの能動的な感染の徴候、または病歴を含む、スクリーニングでの異常な血液試験。
5. PIの見解による、研究への参加が不可能になる任意の他の病状、重篤な併発する病気、または酌量すべき状況。
6. 研究登録前30日以内の任意の治験薬の使用または臨床的検討を含む別の研究に現在登録されていること。
7. 患者の親および/または法定後見人が、研究の性質、範囲、および起こり得る結果を理解することができない。
8. PIによって決定されるとき、患者が、プロトコールに従うことができない（すなわち、経過観察評価に戻ることができない、またはそうでなければ試験を完了することができない）。

【0164】

免疫抑制および臍帯血移植

6人のHLA適合ドナーのうちの4～6人からの臍帯血移植は、症状がでる前のまたは最低限の症状のあるクラッペ病の標準治療と考えられている。患者は、移植に関連した罹患率および死亡率を減少させる、毒性が低減されたコンディショニングレジメンを受ける。この化学療法レジメンのバックボーンは骨髄アブレーションの用量のブスルファンであり、これはクラッペ病および他の多くの非悪性障害のための標準治療として使用されている。さらに、ブスルファンは、ほとんどの遺伝子治療治験で選択されている化学療法剤である。患者は、GVHD予防のためのタクロリムスおよびミコフェノール酸モフェチル（MMF）とともに、アレムツズマブ（ 0.5 mg/kg ）、ヒドロキシ尿素（ 30 mg/kg/日 ）、フルダラビン（ $1 \text{ mg/kg/日} \times 4 \text{ 日}$ ）、ブスルファン（約 $4 \text{ mg/kg/日} \times 3 \text{ 日}$ ）を受ける。

【0165】

ブスルファンを、治療薬モニタリングおよび用量調整を伴って、約 12 mg/kg で3日間かけて投与し、標的の定常状態濃度 850 mg/dl を達成する。より低いブスル

10

20

30

40

50

ァン曝露は、特に臍帯血移植片では移植片不全をもたらす可能性があり、注入されたCD34+前駆細胞用量および総有核細胞用量は骨髓移植片より約110g低い。

【0166】

患者に免疫抑制薬を与え、これには移植の2日前に開始する静脈内タクロリムス（約0.05mg/kg/日で開始）および静脈内MMFが含まれる。本発明者らの標準的なレジメンとして、MMF（45mg/kg/日で開始し、3つの用量に分ける）は、最初の28日間与え、次いでグレード2～4のGVHDの非存在下で急速に減少させる。許容される場合、経口投薬への変換を3～4週間後に行う。タクロリムス（またはその代替のシクロスポリンA）を、移植後最初の3～4ヶ月間継続し、次いでGVHDの非存在下で患者に2～3ヶ月間にわたってこれを停止する。免疫抑制療法の安全性モニタリングには、最初の3～4週間は毎日、その後は、タクロリムスが中止されるまで臨的に必要であれば実施される血液試験が含まれる。安全性血液試験には：全血球算定/白血球百分率検査/網状赤血球、総合代謝パネル、およびタクロリムスレベルが含まれる。患者は、標準的な移植プロトコールに従って有害事象についてモニタリングされ続ける。

【表 5 - 1】

表5.移植前に実施される評価

		0～6 月	6 ヶ月超
病歴および検査	病歴、処置前の毒性、全身状態(Lansky または Karnofsky)、免疫化 歴、身長、体重、BMI、バイタルサイン 10～18 歳:タナー病期分 類	X	X
基礎検査、血液	CBC+Diff、PT/PTT、フィブリノーゲン、ABO/Rh、基礎代謝パネ ル、肝機能試験、腎糸球体機能 月経のある女性のみ;血清ベータ-hCG	X	X
感染性疾患、血液検査	抗体価: PCR による、HBsAg、HBc、HCV、HIV/HCV/HBV NAT IDS、WNV NAT IDS、HIV I/II、HTLV I/II、CMV、T. cruzi、梅毒スクリーニン グ、EBV、VZV、HSV、トキソプラズマ属、ADV <hr/> EBV PCR, VZV PCR, HSV PCR, CMV PCR	X <hr/> X	X <hr/> X (IVIG を受け ている場合)
感染性疾患、呼吸器検査(NP スワブ)	呼吸器ウイルスパネル	X	X

10

20

30

40

【表 5 - 2】

感染性疾患、糞便検査	PCR による ADV、PCR によるノロウイルス、PCR による C. diff	X	
		X	X
分子検査、血液	<u>PID 患者のみ:卵および寄生虫</u>		
	キメラリズムの DNA(例えば、STR アッセイ)、HLA タイピング、パ ネル反応性抗体	X	X
臓器研究	心エコー図、EKG、肺機能試験	X	X
イメージング	胸部 X 線;CT 脳、副鼻腔、胸部腹部、骨盤	X	X
	例外として、放射線感受性の染色体切断症候群(例えば、先天性角化 異常症)の患者は:脳、副鼻腔、胸部、腹部、骨盤の MRI を受ける。		
薬物レベル、血液	アレムツズマブレベル-投与前		X
	アレムツズマブレベル- 0 日		X
調査研究、血液	免疫の再構成	X	X
	試料:1mL/kg を超えないように、グリーントップのチューブに 2mL の血液		
	追加の免疫調査研究(免疫回復、特定のウイルス免疫)		X
	試料:グリーントップのチューブに 2mL の血液(上述ものと共有し得 る)	X	
神経発達評価	行動聴力検査、脳幹聴覚誘発反応、視覚誘発電位、Mullen 早期学習 スケール、GMFM、眼科検査 CSF タンパク質、脊椎 MRI、神経伝 導速度、EEG、突然変異分析、GALC 酵素レベル	X	X

10

20

30

40

【0167】

移植後に、以下を評価する：

1. CBC - 0 日目から好中球生着まで週 3 回、次いで 28 日目まで週 2 回、そして 1

50

2 週目まで週 1 回。網状赤血球算定は、C B C とともに週 1 回実施される。

2 . 基本的な代謝パネルおよび肝機能検査 - 2 8 日目まで週 2 回、次いで 1 2 週目まで週 1 回。

3 . アデノウイルス - アレムツズマブ投与後 + 5 0 日目または移植後退院のいずれか早いほうまで週 2 回の血液 P C R、次いで 1 0 0 日目まで週 1 回。

4 . C M V : 以前にウイルスに曝露していないもの - 1 0 0 日目まで週 1 回の血液 P C R ; C M V 曝露の疑いがある / 証明されたもの : アレムツズマブ投与後 + 5 0 日目または移植後退院のいずれか早いほうまで週 2 回の血液 P C R、次いで 1 0 0 日目まで週 1 回。

5 . E B V P C R - アレムツズマブ投与後 1 0 0 日目まで 2 週に 1 回。

6 . G V H D 等級化 - 1 0 0 日目まで週 1 回

10

【 0 1 6 8 】

さらなる詳細を表 6 に提示する。

【表 6 - 1】

表6.移植後手順

	1 週	2 週	3 週	4 週	5 週	6 週	7 週	8 週	9 週	10 週	11 週	12 週 3ヶ月	6 ヶ月	9 ヶ月	12 ヶ月	24 ヶ月
				1 ヶ月				2 ヶ月				100 日	180 日	270 日	365 日	730 日
身体検査 ¹				X				X				X	X	X	X	X
GVHD 等級化	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
CBC、網状赤血球算定 ²	2-3x	2-3x	2-3x	2-3x	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
BMP、LFT、総タンパク質、アルブミン ²	2x	2x	2x	2x	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
甲状腺機能検査												X	X		X	X
性腺機能 ³															X	X
CMV、PCR によるアデノウイルス(頻度については本文を参照)	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X				
PCR による EBV		X		X		X		X		X		X				

10

20

30

40

静脈アクセス - 長期の中心静脈アクセスは、水分補給、化学療法、完全非経口栄養法、血液製剤の輸血、抗生物質、血液検査採血などのために全ての患者に必要なとなる。2つのダブルルーメンカテーテル（例えば、Broviac）が好ましいが、トリプルルーメンカテーテルが許容され得る。

【0170】

輸血依存性貧血患者：

【0171】

輸血 - サラセミア患者に対しては 12 g / dL を超える目標ヘモグロビン、および鎌状赤血球症患者に対しては $9 \sim 12 \text{ g / dL}$ の目標に、移植前の最低4週間、患者に輸血する。

10

【0172】

キレート化 - 慢性的に輸血療法を受けていて、鉄過剰 (1000 ng / mL を超えるフェリチン) の証拠がある患者は、移植前の最低4週間、デスフェラル $20 \sim 100 \text{ mg / kg / 日}$ のSCまたは夜間12時間にわたるIV持続注入または経口デフェラシロクス (Exjade) のいずれかでキレート化を受ける。

【0173】

移植準備レジメン

ヒドロキシ尿素は、最も近い丸剤サイズに丸めて、 30 mg / kg の単回1日用量で経口で与える。 5 mcg / kg (最大 300 mcg) のPRN G-CSFの使用は、 750 細胞未満のANCに推奨される。G-CSFの使用にもかかわらず、ANCが 500 細胞/ μL 未満に低下する場合、ヒドロキシ尿素が保持される。

20

【0174】

アレムツズマブは現在の施設のガイドラインに従ってIVで与える。アレムツズマブの単回用量は、-10日目または-9日目に 0.5 mg / kg /用量で与える。施設のガイドラインに従って適切な前投薬を与える。患者がアレムツズマブ注入中または注入後に 38.5 を超える熱を有する場合、血液培養物を抜き取り、抗生物質の適用範囲を追加する。

【0175】

フルダラビンは、-9~-5日目に、毎日1時間×5の用量にわたって 30 mg / m^2 /用量 (または 1 mg / kg /用量のいずれかが低いほう) の用量でIVで与える。

30

【0176】

薬物の投与

調整理想体重 (AIBW) を、理想体重 (IBW) の 125% を超える体重の肥満患者に使用する。キログラム単位のIBW計算 (CHP小児薬物療法ハンドブックより) 小児 ($1 \sim 2$ 歳) : 60 インチ未満 : $\text{IBW} = (\text{身長}^2 [\text{cm単位}] \times 1.65) / 1000$; 60 インチ超 : 男性 : $\text{IBW} = 39 + (2.27 \times 5 \text{ フィートを超えるインチ単位の身長})$ 、女性 : $\text{IBW} = 42.2 + (2.27 \times 5 \text{ フィートを超えるインチ単位の身長})$ 。実際の体重 (ABW) からの調整IBW (AIBW) の計算 : $\text{AIBW} = \text{IBW} + [(0.25) \times (\text{ABW} - \text{IBW})]$

【0177】

40

臍帯血の選択と注入

利用可能な最善のユニットは、HLA (対立遺伝子レベルHLA-DRB1タイピングによる6つのうち最低4つのHLAの一致)、総有核細胞用量 (最低 $3.0 \times 10^7 / \text{kg AIBW}$)、CD34+前駆体用量 (最低 $1.5 \times 10^5 / \text{kg AIBW}$)、および効力に影響を与える他の要素 (遺伝性酵素欠損症患者の酵素活性など) に基づいて選択する。UCBユニットは解凍し、希釈してまたは希釈せずに注入する。解凍した臍帯血または生きている無関係のドナー骨髄移植片の 5% 以下を0日目に再凍結し、後日注入する。移植片対宿主病のリスクを減らすために、全ての製品を放射線照射する。さらに、全ての製品はCMVについて安全であり (CMVを含有し得る白血球は除去されている)、濾過して赤血球および白血球を枯渇させ、HLA抗体形成の発生率を低下させる。患者は赤

50

血球および血小板の輸血を受ける。

【0178】

顆粒球コロニー刺激因子 (G-CSF)、5 mcg/kg/用量の、1日1回のIVまたはSCを+1日目に開始し、ANCが2,000以上になるまで続ける。その後、G-CSFの用量調整中止を個々の患者の状態に基づいて決定する。完全非経口栄養法 (TPN) およびイントラリピッドによる静脈内栄養補給は、経口摂取が大幅に減少した場合開始し、経口摂取が改善したら、医師の判断で漸減/中止する。肝機能、タンパク質/アルブミン、およびトリグリセリドレベルは、IV栄養補給中、注意深くモニタリングする。

【0179】

GVHD

予防のために、患者はGVHD予防のためのタクロリムスおよびミコフェノール酸 (MMF/cellcept) を受ける。IVタクロリムスの持続注入またはQ12h投薬を-2日目に開始し、患者がPO摂取を許容したら経口に変換することができる。LC/MS法を用いて12~15 ng/mlの定常状態レベルを目標として、持続注入時のタクロリムスレベルを週に少なくとも3回モニタリングする。Q12hの断続的投薬の場合、レベルを通して標的は、8~10 ng/mlの間である。ミコフェノール酸 (15 mg/kg/用量) を、-2日目から開始して28日目まで2時間かけて8時間毎にIVで与え、グレード2~4の急性GVHDの非存在下で、次の週にかけて停止する。毒性、または能動的なウイルス感染および/もしくはリンパ球回復の遅延が懸念される場合、MMFの早期停止またはタクロリムスのより低い標的範囲となる場合がある。

【0180】

急性GVHDの診断および処置は、現在のBMT CTNガイドラインを反映した現在の施設のガイドラインに基づく。慢性GVHDの診断は、臨床的および/または病理組織学的データならびに現在の標準的な診断基準に基づく。

【0181】

感染

コンディショニングの前に、全ての患者はいかなる皮膚または粘膜感染も受けていない必要がある。禁忌でない限り、脳、副鼻腔、胸部、腹部、および骨盤のCTスキャンを、潜伏感染をスクリーニングするために移植前に行い、禁忌である場合には、代替的なイメージングを実施する。全ての患者はグルコン酸クロルヘキシジン浴 (hibiclens) を受ける。特に麻酔薬を服用している場合は、患者の便秘をモニタリングし、示されるように糞便軟化剤を開始する。全ての患者は、HEPA濾過を有する個室に収容する。

【0182】

患者は (スルファ薬にアレルギーがない限り)、スルファメトキサゾール-トリメトプリム (バクトリム) によるPneumocystis (carinii) jirovecii肺炎 (PCP) 予防薬を受け、これはコンディショニング中に開始する。臨床的に禁忌でない限り、ペンタミジンまたは適切な代替物は、免疫再構成が起こるまで (全身ステロイドの非存在下で300細胞/mm³を超えるCD4+T細胞)+28日目に開始する。ペンタミジンは経口バクトリムまたは代替経口PCP予防薬に変更することができる。

【0183】

感染もしくは曝露および/または水痘感染の病歴に起因する陽性のHSVおよび/またはVZV血清学を有する患者は、アシクロビルIVを受ける。PO摂取を許容する場合、アシクロビルは経口に変更することができる。患者がガンシクロビル、ホスカルネット、またはシドフォビルを受けている場合、併用アプローチが適切でない限りアシクロビルも与える必要はない。全身性ステロイドおよび臨床的に有意なレベルの他の全身性免疫抑制剤の非存在下で、CD4+T細胞が250細胞/mm³を超えるまで予防薬を継続する。これらの薬物の有害効果によって中止が正当なものとならない限り、予防薬が移植後6ヶ月の前に中止されることは予期されていない。

【0184】

HSV/VZV予防薬は、例えば、陰性のHSV/VZVのPCRを伴うIVIgの使

10

20

30

40

50

用に起因する陽性の血清学的検査、陰性のHSV/VZVのPCRを伴う、6ヶ月未満の患者における母性IgGの移入に起因する陽性の血清学的検査、または免疫化に起因する陽性の血清学的検査など、以前のHSV/VZV感染または曝露の臨床的証拠がないことを条件として、以下の患者には必要とされない。

【0185】

登録時にHSV/VZVウイルス血症であるか、または移植前にウイルス血症を発症している患者を処置することができる。

【0186】

唾液、尿、または他の部位にCMVの陽性の血清学的検査または検出可能なウイルスを有するが検出可能なウイルス血症を有さない患者は、コンディショニング中の-12日目から-2日目までの維持投薬時（典型的に毎日5mg/kgをIV）にガンシクロビルまたは他のCMV特異的療法を、その後、+1日目に開始して+100日目まで、8時間毎に腎不全のための用量調整を伴うアシクロビルの500mg/m²をIVで受ける。毎日のホスカルネット（90mg/kg/日）で代用することができる。移植前CMVウイルス血症の患者は、臍帯血注入前および注入中に適切な抗CMV療法を受けることができる。CMV予防薬は、例えば、陰性のCMVのPCRを伴う、IVIgの使用に起因する陽性の血清学的検査、または陰性の、CMVの血液PCRもしくは他の唾液もしくは尿で実施される診断研究を伴う、6ヶ月未満の患者における母性IgGの移入に起因する陽性の血清学的検査など、以前のCMV感染または曝露の臨床的証拠がないことを条件として、以下の患者には必要とされない。

10

20

【0187】

患者は、臨床的に適切な用量およびスケジュールで+1日目から真菌予防薬を受ける。予防薬は、最初にカスポファンギンを含み、続いて退院して外来患者となる前に、治療レベルを目標に設定したポリコナゾールに移行する。

【0188】

患者は、以下のスケジュールに従って一般的な免疫予防薬としてIVIgを受ける：
- 15日目から移植後+55日目：2週間毎
移植後+55日目以降：血清IgGレベルを2～3週間に1回モニタリングし、IgGが750mg/dLを超えるように保持するためにIVIgを補給する。IgG補給は、IgAレベルが正常になり、CD4 T細胞計数が200/μLを超えるまで続ける。

30

【0189】

患者は、臨床的に適切な用量のレボフロキサシンまたは適切な代替物による細菌の予防を受け、スケジュールは医師の裁量で開始しそして生着まで継続する。これは好中球減少症熱の状況で広域抗生物質の開始時に維持される。

【0190】

患者は、アレムツズマブの後に開始して、CMVのPCRで毎週モニタリングし、臨床的に必要であるときにはさらにモニタリングする。処置は、任意の値および/または記録されたCMV疾患の確認された陽性定量的PCRを有する患者において開始する。第一選択療法は、ガンシクロビル5mg/kg/用量をIVで12時間毎に14日間、またはCMVのPCRが陰性もしくは許容可能なレベルに低下するまで、あるいは患者の臨床症状が回復するまでのいずれか長いほうからなる。維持療法は、患者が顕著に免疫抑制されたままである場合、14日間またはそれよりも長い毎日のガンシクロビル5mg/kg/用量のIVからなる。ガンシクロビル耐性および第二選択療法は、10～14日後に臨床的改善がない患者、またはPCR力価が高いままであるかもしくは増加している場合に考慮されるべきである。骨髓抑制および腎機能障害の副作用について患者を注意深くモニタリングする必要がある。ホスカルネットまたはシドフォビルは、生着の前に、または臨床的に必要とされる場合に使用され得る。

40

【0191】

新たな発熱（38.5以上×1または38以上×2（2時間以内に検温）と定義される）を有する患者は、徹底的な身体検査および全ての中央カテーテルポートから得られ

50

た血液培養を受けるべきである。追加の試験は臨床的に必要とされる場合であるが、胸部 X 線または他のイメージング研究、尿培養、咽頭または口腔培養、ウイルス研究（鼻咽頭スワブ）、および分子研究（CMV、アデノウイルス、BKウイルスなど）を含み得る。血液培養は、継続的な発熱を伴うときに 24 時間毎に、臨床的变化があればより頻繁に、繰り返さず。経験的な広域抗生物質は、培養物が得られた直後に開始する。第一選択の抗生物質は、ピペラシリン - タゾバクタム 75 mg / kg / 用量（ピペラシリンとして、3000 mg 最大用量）の IV で 6 時間毎、およびバンコマイシン 15 mg / kg / 用量の IV で 6 ~ 8 時間毎を含む。バンコマイシントラフレベルは、8 ~ 12 mg / L を目標として頻繁にモニタリングする。ペニシリンまたはバンコマイシンに対するアレルギーのある患者には、適切な代用を行うことができる。抗生物質は臨床応答および細菌性病原体の同定に基づいて調整する。経験的な抗真菌療法（カビを範囲に含む）は、3 日を超えて熱があるままである患者に考慮される。抗生物質は、最低 3 日間、発熱が解消し、ANC が 500 を超えるまで続ける。

【0192】

VOD の予防と管理

患者は静脈閉塞性疾患（VOD）の予防のために低用量ヘパリンを受ける。これは、-9 日目から +28 日目、または退院するまで、100 単位 / kg / 24 時間の持続注入として与える。ウルソジオールは、高ビリルビン血症、痛みを伴う肝腫大、腹水、体液貯留のある患者に VOD が疑われる可能性があるので、ベースライン近くで投与する。一般的な処置措置には、注意深いモニタリングおよび体液不均衡の補正が含まれる。適切な用量のループ利尿薬は必要に応じて Q6 ~ 12 h 推奨されている。重度の VOD はデフィブロチドで処置することができる。

【0193】

生着の評価と移植片不全の管理：定義（IBMTR Manual for Clinical Research Professionals、2003 年に従う）：好中球の生着 - 異なる日に試験された 3 日連続で $0.5 \times 10^3 / \mu\text{L}$ 以上の好中球；血小板の生着 - 過去 7 日間の血小板輸血なしの $20,000 / \mu\text{L}$ 以上の血小板数；ドナー細胞の生着 - +28 日目の 50% 以上のドナー細胞；移植片不全 - 一次的不全は、最低 1 週間離れた 2 つの研究で、+42 日目までに好中球の生着がないこと（上記のとおり）または、+100 日目までに末梢血もしくは骨髓における 10% 未満のドナー細胞として定義される。二次的不全は、生着が以前に（上記の基準に従って）達成された後の生着の喪失として定義される。

【0194】

約 +41 ~ 44 日目までに好中球の生着の証拠がない患者では、キメリズムを評価するために骨髓穿刺および生検を実施する。移植片不全の一般的な評価には、キメリズム、細胞遺伝学などに対する骨髓穿刺および生検が含まれ；必要な場合、他の研究に加えて CMV、EBV、パルボウイルス、および HHV-6 を含む微生物研究（骨髓および血液）；ならびにキメリズムのための末梢血が含まれる。

【0195】

移植片不全 / 拒絶の初期の処置には、増殖因子によるサポートおよび骨髓抑制薬物治療の中止が含まれる。その後の移植は、ドナー生着の証拠がない、または血球減少症に関連した重大な影響を伴う患者で検討される。蓄えておいたドナーの UCBA リコーートの注入が適切であり得る。

【0196】

ベクター投与

AAVrh.10-hGALC 用量は、上記の動物での有効性および安全性研究の結果に依存する。マウスからヒトへのスケールアップは、体重 1 キログラムあたりの同一のゲノムコピー（gc / kg）に基づく。UCBT の 1 日後に最大用量約 4×10^{13} gc / kg を与える。この標的用量の 0.25x で開始し、その後に標的用量が続く、それぞれ n = 4 の対象を有する 2 つの用量コホートを使用する。

【0197】

臨床グレードのベクターは、GMP準拠のクリーンルーム施設で製造され、表3に記載されているようにロット出荷試験を受ける。(例えば、GALC酵素活性についてアッセイすることによって)ベクターが臨床研究の持続期間にわたって安定であることを確実にするためにベクターをモニタリングする。

【0198】

ベクターは、UCBTを管理するために存在する中心線を通じた緩衝化等張食塩水中の必要用量のプッシュ(1ml/分)として投与する。これは10mlの注入の可能性が高い。

【0199】

経過観察

個々の患者の評価は表7に示されるように実施する。さらなる患者の評価は、ベースライン来院の後、約3、6、9、および12ヶ月で実施する。

【表 7】

表 7.疾患に関連した手順のスケジュール

手順	来院 1	投薬来院 ¹	来院 2 90 日目	来院 3 182 日目	来院 4 273 日目	来院 5 365 日目
PI/インフォームド コンセント	●					
イニシャルと生年月 日	●					
人口統計情報	●					
病歴/システムの吟味	●	●	●	●	●	●
選択/除外基準	●					
家族歴(一等親近親 者)	●					
過去の臨床的検討	●					
薬物治療	●	●	●	●	●	●
身体および神経学的 検査	●	●	●	●	●	●
バイタルサイン	●	●	●	●	●	●
脳MRI	●		●	●	●	●
脊髄穿刺/脳脊髄タン パク質および探索的 バイオマーカー	●		●	●	●	●
神経伝導速度	●		●	●	●	●
視力および聴覚検査	●		●	●	●	●
体重、身長、および 頭囲	●		●	●	●	●
遺伝子型決定と酵素 検査	●					
Mullen早期学習スケ ール	●		●	●	●	●
免疫/感染研究のため に採取された血液	●	●	●	●	●	●
Peabody運動発達ス ケール	●		●	●	●	●
臨床化学(血液)	●	●	●	●	●	●
GALC活性(血液およ び脳脊髄液)	●	●	●	●	●	●
抗AAV抗体	●	●	●	●	●	●
抗AAV酵素結合免疫 スポット(ELISPOT)	●		●	●	●	●
PCRによる血液、 尿、糞便、および唾 液の排出分析	●	●				

¹ AAVrh.10ベクターの投薬後、1、2、4、および8週目に収集/評価を実施する。
2週間に週2回、さらなる2週間に週1回、安定かつ治療的であれば次の4ヶ月間、
月1回、免疫抑制をモニタリングするために、さらなる血液を採取する。

来院 1 - ベースライン評価 (PRE - UCBT)

以下のデータをベースライン時に全ての患者について収集する：

- 1 . 患者のイニシャル、生年月日、および固有の患者 ID 番号。
- 2 . 人口統計情報。
- 3 . 以前の診断、病気、薬物治療、手順、および手術を含む重要な病歴。
- 4 . 以前に実施された場合、以下の臨床調査の結果：脳 MRI、神経伝導研究、ならびにクラッペ病の診断のための遺伝学的および / または生化学的試験。ベースライン試験は、親 / 法定後見人が研究に参加するためのインフォームドコンセントに署名してから 3 ヶ月以内に実施される場合に有効である。
- 5 . 以下の検査は、ベースライン来院時に実施する：脳 MRI、脊髄穿刺、神経伝導研究、ならびに視覚および聴覚検査。 10
- 6 . 現在の全ての薬物治療および投与頻度のリスト。
- 7 . バイタルサイン（血圧、脈拍、身長、体重、および頭囲）を含む身体および神経学的検査。
- 8 . 任意の他の家族がクラッペ病と診断されたのか、または疾患の臨床的な徴候および症状がある（しかし、診断されていない）のかを確認するために、親および / または法定後見人に患者の家族歴（一等親近親者）について質問する。
- 9 . M u l l e n 早期学習スケールおよび P e a b o d y 運動発達スケールの結果。
- 10 . タンパク質および白血球数ならびに G A L C 活性に関するベースライン脳脊髄液 (C S F) の収集。残りは将来のバイオマーカー評価のために保管される。 20
- 11 . 臨床化学のためのベースライン採血ならびに抗 A A V 抗体および G A L C 活性の測定。
- 12 . A A V r h . 1 0 および G A L C に対する T 細胞応答を測定するためのベースライン採血。
- 13 . ベクター排出分析（血液、糞便、尿、および唾液）のための試料のベースライン収集。

【 0 2 0 1 】

神経発達評価は 1 日目に実施する。医療 / 診断検査は 2 日目に実施する。

【 0 2 0 2 】

1 日目 神経発達評価 30

- 1 . 病歴および併発病の再調査
- 2 . 現在の全ての薬物治療および投与頻度のリスト
- 3 . 聴覚訓練士による聴力検査。
- 4 . バイタルサイン（血圧、脈拍、身長、体重、および頭囲）を含む身体および神経学的検査
- 5 . M u l l e n 早期学習スケールおよび P e a b o d y 運動発達スケールの適用

【 0 2 0 3 】

2 日目 医療診断試験

- 1 . 脳 MRI 40
- 2 . 脊髄穿刺
- 3 . 神経伝導速度研究
- 4 . 採血
- 5 . 尿、糞便、および唾液の収集

【 0 2 0 4 】

3 日目 U C B T の評価および U C B T の準備。ベクターは、U C B T に対して + 1 日目に注射する。

【 0 2 0 5 】

ベクター投与後 1、2、4、および 8 週目に、試料収集を以下のように実施する：

- 1 . 臨床化学、抗 A A V 中和抗体検出、ベクター排出分析、および G A L C 活性のための採血 50

2. ベクター排出分析のための尿、便、および唾液の収集

【0206】

来院2 (UCBTおよびAAVrh. 10 - hGALC後90 ± 5日目)

来院は2日かけて実施され、以下を含む：

1日目 神経発達評価

1. 中間の病歴および併発病の再調査
2. 前回の来院以降の、現在の全ての薬物治療および投与頻度のリスト
3. 視力および聴覚検査 (聴覚訓練士による)
4. バイタルサイン (血圧、脈拍、身長、体重、および頭囲) を含む身体および神経学的検査

10

5. Mullen早期学習スケールおよびPeabody運動発達スケールの適用

【0207】

2日目 医療診断試験

1. 脳MRI
2. 脊椎穿刺
3. 神経伝導研究
4. 血液試料を使用する臨床化学アッセイ
5. ELISPOTを使用した抗AAVおよび抗GALCのT細胞応答のための採血

【0208】

来院3 (180日 ± 1ヶ月)

20

来院は2日かけて実施され、以下を含む：

1日目 神経発達評価

1. 中間の病歴および併発病の再調査
2. 前回の来院以降の、現在の全ての薬物治療および投与頻度のリスト
3. 視力および聴覚検査 (聴覚訓練士による)
4. バイタルサイン (血圧、脈拍、身長、体重、および頭囲) を含む身体検査および神経学的検査

5. Mullen早期学習スケールおよびPeabody運動発達スケールの適用

【0209】

2日目 医療診断試験

1. 脳MRI
2. 脊椎穿刺
3. 神経伝導研究
4. 血液試料を使用する臨床化学アッセイ
5. ELISPOTによる抗AAVおよび抗GALCのT細胞応答のための採血

30

【0210】

来院4 (270日 ± 1ヶ月)

この来院は2日かけて実施され、以下を含む：

1日目 神経発達評価

1. 中間の病歴および併発病の再調査
2. 前回の来院以降の、現在の全ての薬物治療および投与頻度のリスト
3. 視力および聴覚検査 (聴覚訓練士による)
4. バイタルサイン (血圧、脈拍、身長、体重、および頭囲) を含む身体および神経学的検査

40

5. Mullen早期学習スケールおよびPeabody運動発達スケールの適用

【0211】

2日目 医療診断試験

1. 脳MRI
2. 脊椎穿刺
3. 神経伝導研究

50

4. 血液試料を使用する臨床化学アッセイ
5. ELISPOTによる抗AAVおよび抗GALCのT細胞応答のための採血

【0212】

5.5.5 来院5(360日±1ヶ月)

来院は2日かけて実施され、以下を含む：

1日目 神経発達評価

1. 中間の病歴および併発病の再調査
2. 前回の来院以降の、現在の全ての薬物治療および投与頻度のリスト
3. 視力および聴覚検査(聴覚訓練士による)
4. バイタルサイン(血圧、脈拍、身長、体重、および頭囲)を含む身体および神経学的検査
5. Mullen早期学習スケールおよびPeabody運動発達スケールの適用

【0213】

2日目 医療診断試験

1. 脳MRI
2. 脊椎穿刺
3. 神経伝導研究
4. 血液試料を使用する臨床化学アッセイ
5. ELISPOTによる抗AAVおよび抗GALCのT細胞応答のための採血

【0214】

評価方法の詳細

身体および神経学的検査。完全な身体検査(全身外観、皮膚、頭、目、耳、鼻、咽頭、リンパ節、心臓、肺、腹部、四肢/関節、および臀部の評価を含む)は、ベースラインフェーズ中に1回、および表7に指定された時間を実施する。身長または長さ(cm、標準的な測定台に仰向け)、体重(kg、濡れている場合は靴またはおむつなしで、可能な限り最軽量の衣類を着用)、および頭囲(cm、標準後頭部)を測定する。これらを自然歴データと比較し、潜在的な有害効果と処置の有効性を評価する。

【0215】

拡張された神経学的検査には、筋緊張および反射ならびに神経発達機能の評価が含まれる。

【0216】

バイタルサイン。収縮期および拡張期血圧(mm Hg)と心拍数(拍/分)を測定する。

【0217】

脳脊髄液バイオマーカー。症状がでる前のクラッペ病患者でCSFタンパク質レベルの増加が検出され、腰椎穿刺を受けた25人の小児のうち23人(92%)がCSFタンパク質の上昇を示した(Escolarら、N Engl J Med. 352巻(20号)：2069～81頁、2005年)。この例では、ミエリンの完全性のバイオマーカーを評価するためにCSFを収集する。さらに、細胞計数、タンパク質決定、グルコース、アルブミン、およびIgGを含む慣例的なCSF分析を実施する。血液脳関門の無傷性は、CSFのIgG濃度と血清アルブミン濃度の関係の評価することによって決定する。アルブミン指数(AQ)は、血液脳関門の透過性を評価するために推定することができる($AQ = CSF \text{ アルブミン} / \text{血清アルブミン} \times 100$)。髄腔内IgG産生は、CSFのIgG/血清アルブミン比を測定することによって計算し、これは0.27mg/dl未満であるべきである。IgG指数は、CSFのIgGと血清アルブミンの積の血清IgGとCSFアルブミンの積に対する比である。IgG指数の増加(0.70mg/dlを超える)は、CNSにおける免疫グロブリン合成の増加を反映しており、CNSにおける感染性および炎症性障害を反映していると考えられる。CSFのGALC活性も評価する。

【0218】

ベクター排出。ベクター投与後の血液、尿、糞便、および唾液中のベクターの存在は、

q P C Rによって評価する。

【0219】

安全性臨床検査。収集した血液に対する臨床化学アッセイを慣例的に実施し、あらゆる起こり得る有害効果をモニタリングする。肝臓酵素（アスパラギン酸トランスアミナーゼ、アラントランスアミナーゼ）は、G A L C過剰発現および/または細胞傷害性T細胞応答に起因する起こり得る肝臓毒性のためにモニタリングする。

【0220】

免疫応答。A A V r h . 1 0およびG A L Cに対するT細胞応答を測定するために、ベースライン時および注射後3ヶ月毎に全血を収集する。注射後1、2、4、および8週目、ならびに3、6、9、および12ヶ月目に、血漿または血清を分析してA A V r h . 1 0に対する抗体の生成をモニタリングする。

10

【0221】

脳MRI。各患者はMRI（すなわち、脳の拡散テンソルイメージング）を受ける。脳のMRIは現在、クラッペ病患者におけるミエリン疾患を評価するための最良の代用構造マーカーをもたらす（Escolarら、Am J Neuroradiol. 30巻（5号）：1017～21頁、2009年）。無関係のUCBTを受けたクラッペ病患者の疾患進行をモニタリングするために特別に開発された修正Loe sスコアリングシステムを使用して、対照小児とクラッペ病患者の両方の脳MRIを経験豊富な神経放射線医が視覚的にスコア化する（Provenzaleら、Ann N Y Acad Sci. 1064巻：220～9頁、2005年、Provenzaleら、Am J Roentgenol. 192巻（1号）：59～65頁、2009年）。近年、拡散テンソルイメージングは、発達中の脳の白質病理を検査し、脱髄状態の赤ん坊の軸索構造とミエリン形成の両方を評価するために選択すべきモダリティとなっている（Escolarら、Am J Neuroradiol. 30巻（5号）：1017～21頁、2009年、Guptaら、Neuroimage Clin. 26巻；7号：792～8頁、2014年）。トラクトグラフィーによる拡散テンソルイメージングを使用して、年齢および性別の対応する対照と比較するとき、ミエリン破壊を定量化し、標準偏差で測定することができる。

20

【0222】

神経伝導速度研究（感覚および運動神経）。クラッペ病の赤ん坊は、疾患進行の初期に末梢神経障害を有し、そして神経伝導速度は、疾患が進行するにつれて悪化し（Escolarら、N Engl J Med. 352巻（20号）：2069～81頁、2005年；Escolarら、Pediatrics. 118巻（3号）：e879～89頁、2006年）、筋肉の衰弱をもたらす。クラッペ病の豊富な経験を有する神経生理学者がこの試験を実施する。

30

【0223】

神経伝導速度（NCV）、振幅（AMP）、および遠位潜時（DL）の研究は、従来の技術によって実施する。運動神経について、NCV、AMP、およびDLを、正中神経および腓骨神経で測定する。これらの神経のいずれにおいても関連するシグナルがベースラインで生成され得ない場合、尺骨神経、脛骨神経、またはその両方もベースラインで評価される。腕の1つの神経および脚の1つの神経を、繰り返し評価のために利用可能な応答に基づいて選択する。感覚神経については、DL、NCV、およびAMPを、正中神経と腓腹神経で測定する。

40

【0224】

神経発達機能。神経発達評価およびクラッペ病の長期的研究におけるそれらの使用は広く公表されている（Escolarら、N Engl J Med. 352巻（20号）：2069～81頁、2005年；Escolarら、Pediatrics. 118巻（3号）：e879～89頁、2006年；Escolarら、Lysosomal Storage Dis. 6巻（3号）：71～9頁、2006年；Martínら、Acta Paediatr Suppl. 97巻（457号）：69～75頁、2007年）。クラッペ病患者における認知、言語、および運動の発達の標準化された尺度と正常な対照のそれとを反映するように、特定の評価ツールを選択した。

【0225】

成長速度。身長、体重、および頭囲を測定して成長速度を評価する。体格指数は、体重

50

と身長に基づいて計算する。

【0226】

Mullen 早期学習スケール。Mullen スケールは 68 ヶ月齢までの乳児や小児に適用することができる。T スコア、パーセンタイル順位、および年齢に応じたスコアは、4 つのスケール（視覚受容、微細運動、表現言語、および受容言語）について別々に計算できる。幼児の非言語能力レベルの評価は、全体的な発達を推定するために重要である。乳児および小児の臨床評価の訓練を受けた精神測定医が試験を実施する。年齢に応じたスコアは、時間経過に伴う発達を追跡し、試験間で比較するために使用する。

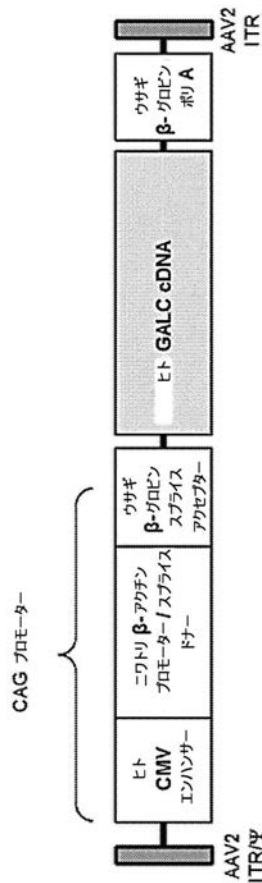
【0227】

Peabody 運動発達スケール。Peabody スケールは、いくつかの項目の定量的および定性的能力の両方を捉え、小児の疾患が進行するにつれて、または回復中に運動パターンの変化に対する感度を高める。図 4 は、上述のツールを使用して無関係の UCBT で処置された個々の患者の軌跡の例を示す (Escobar ら、N Engl J Med. 352 巻 (2005 年) : 2069 ~ 81 頁、2005 年)。図 4 は、無関係の臍帯血を移植し、上述のツールを用いて試験した個々の患者の軌跡の例である。色付きの線は、無症候性または最低限の症候性の患者の発達を示す。黒色の線は重大な症状の後に移植された患者を表す。症候性の患者の軌跡は、未処置の患者の軌跡と類似する。

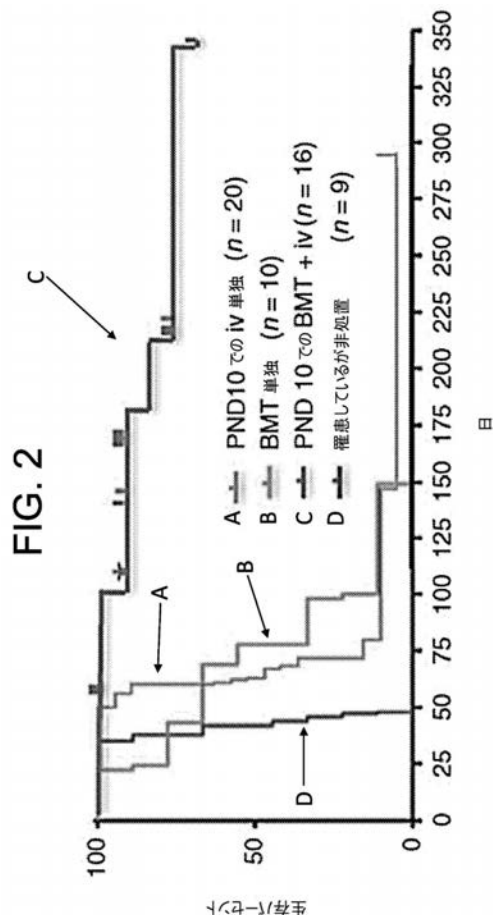
【0228】

本開示の原理が適用され得る多くの可能な実施形態を考慮して、例示された実施形態は本発明の単なる例であり、本発明の範囲を限定するものとして解釈されるべきではないことが認識されるべきである。むしろ、本発明の範囲は以下の特許請求の範囲によって規定される。したがって、本発明者らはこれらの特許請求の範囲の範囲および精神の範囲内に入る全てのものが本発明者らの発明であると主張する。

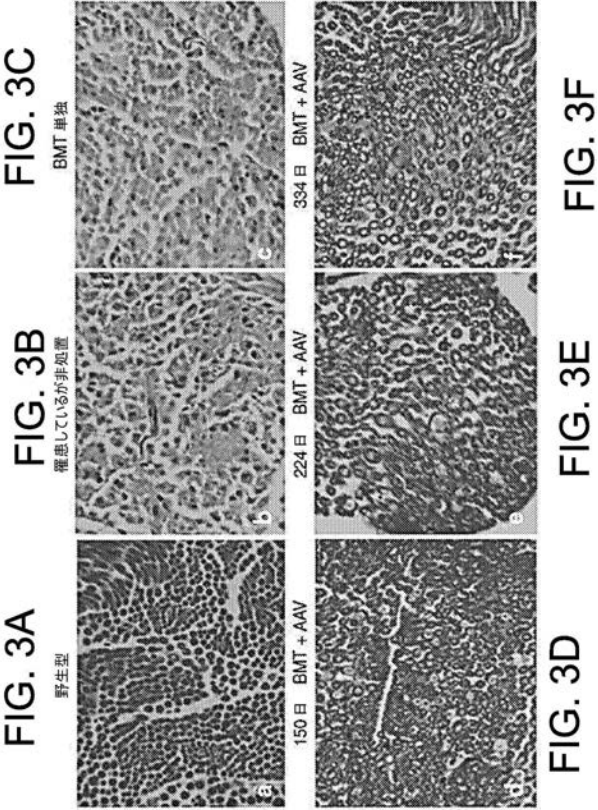
【図 1】



【図 2】



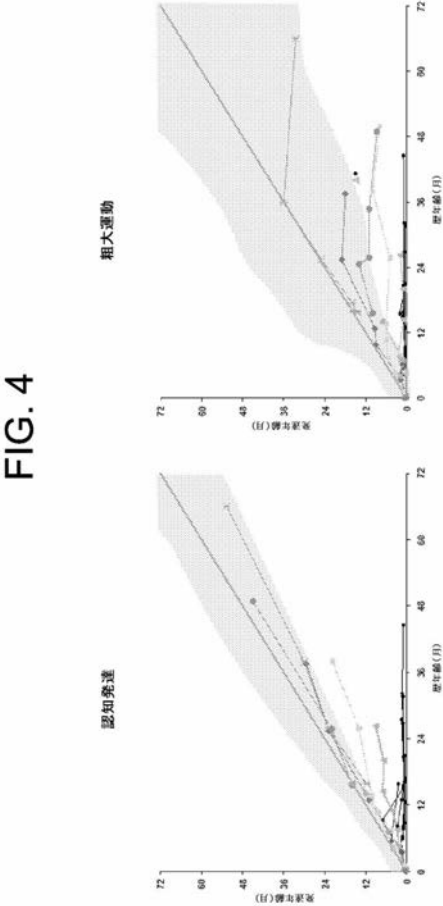
【 図 3 】



【 配 列 表 】

2020505317000001.app

【 図 4 】



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US18/14370

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC - C12N 9/24, 15/86, 5/0789; A61K 38/47; A61P 25/02 (2018.01)
CPC - C12N 9/2402, 15/86, 5/0665, 38/47, 48/0066, 9/0019

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

See Search History document

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

See Search History document

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

See Search History document

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	(ESCOLAR, ML et al.) Transplantation of Umbilical-Cord Blood in Babies with Infantile Krabbe's Disease. The New England Journal of Medicine. 19 May, 2005; Vol. 350, No. 20; pages 2069-2081; abstract; page 2070, column 2, paragraphs 2-3; page 2078, column 2, paragraph 2; DOI: 10.1056/NEJMoa042604	1-2, 3/1-2
Y	(MENEHINI, V et al.) Pervasive Supply of Therapeutic Lysosomal Enzymes in the CNS of Normal and Krabbe-affected Non-Human Primates by Intracerebral Lentiviral Gene Therapy. EMBO Molecular Medicine. 02 May, 2016; Vol. 8, No. 5; pages 489-510; page 504, column 1, paragraph 7- column 2, paragraph 1; page 505, column 2, paragraph 4; DOI: 10.15252/emmm.201505850	1-2, 3/1-2
Y	(KODAMA, S et al.) Glycosylceramide Synthesis in the Developing Spinal Cord and Kidney of the Twitcher Mouse, an Enzymatically Authentic Model of Human Krabbe Disease. Journal of Neurochemistry. November 1982; Vol. 39, No. 5; pages 1314-1318; page 1317, column 1, paragraph 2; Genbank supplement pages 1-5	2, 3/1-2

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

01 May 2018 (01.05.2018)

Date of mailing of the international search report

16 MAY 2018

Name and mailing address of the ISA/

Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents
P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450
Facsimile No. 571-273-8300

Authorized officer

Shane Thomas

PCT Helpdesk: 571-272-4300
PCT OSP: 571-272-7774

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US18/14370

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☒ Claims Nos.: 4-17
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

- Please See Within the Next Supplemental Page-

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
Group I, Claims 1-3

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/US18/14370

-----Continued from Box III Observations where unity of invention is lacking -----

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid.

Group I, Claims 1-3 are directed toward a method of treating Krabbe disease by immunosuppressing a subject; administering a therapeutically effective amount of umbilical cord blood to the subject; and administering a therapeutically effective amount of a nucleic acid molecule encoding galactocerebrosidase (GALC) to the subject.

Group II, Claims 18-20 are directed toward a method of treating a genetic disease in a subject by partially or fully ablating bone marrow in the subject; administering a therapeutically effective amount of hematopoietic stem cells (HSCs) to the subject, and administering a therapeutically effective amount of a therapeutic nucleic acid molecule to the subject to correct the genetic disease.

The inventions listed as Groups I and II do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons: the special technical features of Group I include administration of umbilical cord blood, not present in Group II; the special technical features of Group II include ablating bone marrow, not present in Group I.

Groups I-II share the technical features including: a method of treating a genetic disease in a subject, comprising: immunosuppressing the subject; administering a therapeutically effective amount of hematopoietic stem cells (HSCs) to the subject; and administering a therapeutically effective amount of a therapeutic nucleic acid molecule to the subject, wherein the nucleic acid molecule corrects the genetic disease.

However, these shared technical features are previously disclosed by US 2006/0003312 A1 to Blau et al. (hereinafter 'Blau').

Blau discloses a method of treating a genetic disease (correcting one or more genetic defects; paragraphs [0061], [0134]; such as Muscular Dystrophy; paragraph [0067], or Krabbe's disease; paragraph [0055]) in a subject (paragraph [0088]), comprising immunosuppressing the subject (administering immunosuppressive agents; paragraph [0292]); administering a therapeutically effective amount (paragraph [0067]) of hematopoietic stem cells (HSCs) to the subject (transplanting HSC to contribute to muscle regeneration; paragraphs [0281], [0284]); and administering a therapeutically effective amount (paragraph [0087]) of a therapeutic nucleic acid molecule to the subject (introducing a nucleic acid encoding a therapeutic gene; paragraphs [0054], [0134]), wherein the nucleic acid molecule corrects the genetic disease (paragraphs [0054], [0061]).

Since none of the special technical features of the Groups I and II inventions is found in more than one of the inventions, and since all of the shared technical features are previously disclosed by the Blau reference, unity of invention is lacking.

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 K 31/7088 (2006.01)	A 6 1 K 31/7088	4 C 2 0 6
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	N
A 6 1 K 31/17 (2006.01)	A 6 1 K 31/17	
A 6 1 K 31/7076 (2006.01)	A 6 1 K 31/7076	
A 6 1 K 31/255 (2006.01)	A 6 1 K 31/255	
A 6 1 K 31/436 (2006.01)	A 6 1 K 31/436	
A 6 1 K 31/5377 (2006.01)	A 6 1 K 31/5377	
A 6 1 K 35/28 (2015.01)	A 6 1 K 35/28	
C 1 2 N 9/24 (2006.01)	C 1 2 N 9/24	Z N A
C 1 2 N 15/56 (2006.01)	C 1 2 N 15/56	
C 1 2 N 15/864 (2006.01)	C 1 2 N 15/864	1 0 0 Z

(81)指定国・地域 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT

(74)代理人 100181641

弁理士 石川 大輔

(74)代理人 230113332

弁理士 山本 健策

(72)発明者 エスコラー, マリア ルイーザ

アメリカ合衆国 ペンシルベニア 1 5 2 2 4, ピッツバーグ, ペン アベニュー 4 4 0 1
, ブラザ ビルディング, フロア 4

(72)発明者 サボルクス, ポール

アメリカ合衆国 ペンシルベニア 1 5 2 2 4, ピッツバーグ, ペン アベニュー 4 4 0 1
, スイート 9 ビー

F ターム(参考) 4B050 CC03 DD11 LL01

4C084 AA13 AA19 MA02 MA56 MA65 MA66 NA05 ZB082 ZC751

4C085 AA14 CC23 DD62 EE03 GG02 GG03 GG04 GG05 GG06

4C086 AA01 AA02 BC73 CB22 EA16 EA18 MA03 MA04 MA65 NA05
ZB08 ZC75

4C087 AA01 AA02 BB44 BB59 MA02 MA65 NA05 NA14 ZA02 ZC75

4C206 AA01 AA02 HA26 JA06 MA03 MA04 MA85 NA05 ZB08 ZC75