



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 118078860 A

(43) 申请公布日 2024. 05. 28

(21) 申请号 202410102735.9 *A61K 48/00* (2006.01)
 (22) 申请日 2018.01.19 *A61P 25/02* (2006.01)
 (30) 优先权数据 *C12N 15/86* (2006.01)
 62/448,433 2017.01.20 US *C12N 9/24* (2006.01)

(62) 分案原申请数据
201880004477.3 2018.01.19

(71) 申请人 联邦高等教育系统匹兹堡大学
地址 美国宾夕法尼亚州

(72) 发明人 P·绍博尔奇 M·L·埃斯科拉

(74) 专利代理机构 北京华睿卓成知识产权代理
事务所(普通合伙) 11436
专利代理师 程淼 唐莉

(51) Int. Cl.

A61K 35/51 (2015.01)
A61K 38/47 (2006.01)

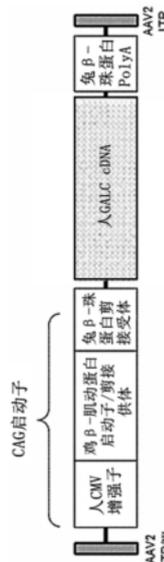
权利要求书1页 说明书46页
序列表(电子公布) 附图6页

(54) 发明名称

用脐带血移植(UCBT)和增加的半乳糖脑苷酯酶(GALC)表达治疗克拉伯病

(57) 摘要

本申请提供治疗克拉伯病的方法,例如治疗婴儿中克拉伯病的方法。这样的方法包括免疫抑制患者(例如通过施用清髓方案),施用脐带血移植(UCBT)(如同种异体的UCBT),和增加患者中半乳糖脑苷酯酶(GALC)的表达(例如,通过使用基因编辑)。



1. 治疗有效量的脐带血和治疗有效量的编码半乳糖脑苷脂酶 (GALC) 的核酸分子的组合在制备药物中的用途, 所述药物用于治疗受试者中的克拉伯病, 其中所述受试者已被免疫抑制。

2. 权利要求1的用途, 其中所述编码GALC的核酸分子包含与SEQ ID NO:1至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%、至少99%或100%的序列同一性。

3. 权利要求1或2的用途, 其中所述核酸分子编码GALC蛋白, 所述GALC蛋白包含与SEQ ID NO:2至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%、至少99%或100%的序列同一性。

4. 权利要求1至3中任一项的用途, 其中所述编码GALC的核酸分子与启动子可操作连接。

5. 权利要求1至4中任一项的用途, 其中静脉内施用所述编码GALC的核酸分子。

6. 权利要求1至5中任一项的用途, 其中所述编码GALC的核酸分子是载体的部分。

7. 权利要求6的用途, 其中所述载体是病毒载体。

8. 权利要求7的用途, 其中所述病毒载体是腺相关载体 (AAV)。

9. 权利要求8的用途, 其中所述腺相关载体是AAV血清型rh.10。

10. 权利要求7至9中任一项的用途, 其中以每受试者至少 2×10^{13} gc或每受试者至少 2×10^{14} gc的剂量施用所述病毒载体。

11. 权利要求1至10中任一项的用途, 其中在施用所述编码GALC的核酸分子之前施用所述脐带血。

12. 权利要求1至11中任一项的用途, 其中在施用所述编码GALC的核酸分子之前1天施用所述脐带血。

13. 权利要求1至12中任一项的用途, 其中所述脐带血对所述受试者而言是同种异体的。

14. 权利要求1至13中任一项的用途, 其中施用治疗有效量的脐带血包括给所述受试者施用至少 3×10^7 /kg的总核细胞剂量。

15. 权利要求1至14中任一项的用途, 其中通过施用治疗有效量的阿仑单抗、羟基脲、氟达拉滨和白消安, 所述受试者已被免疫抑制。

16. 权利要求1至15中任一项的用途, 其中通过进一步施用治疗有效量的他克莫司和霉酚酸酯 (MMF), 所述受试者已被免疫抑制。

17. 权利要求1至16中任一项的用途, 其中所述克拉伯病是婴儿克拉伯病。

18. 有效量的造血干细胞 (HSC) 和有效量的治疗性核酸分子的组合在制备药物的用途, 所述药物用于治疗受试者中的遗传病, 其中所述受试者的骨髓已经被部分或完全清除; 其中所述核酸分子校正所述遗传病。

19. 权利要求18的用途, 其中通过给所述受试者施用治疗量的化学疗法、照射或两者, 所述受试者的骨髓已经被部分或完全清除。

20. 权利要求18或19的用途, 其中所述组合进一步包括治疗有效量的免疫抑制剂, 所述免疫抑制剂在施用所述HSC后, 施用于所述受试者。

用脐带血移植(UCBT)和增加的半乳糖脑苷酯酶(GALC)表达治疗克拉伯病

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请是申请日为2018年1月19日、申请号为CN201880004477.3的中国专利申请的分案申请。本申请要求2017年1月20日提交的美国临时申请No.62/448,433的优先权,上述申请通过引用整体并入本文。

技术领域

[0003] 本申请提供了治疗克拉伯病(Krabbe disease)的方法,其通过免疫抑制患者,提供脐带血移植(umbilical cord blood transplant,UCBT)和增加患者中半乳糖脑苷酯酶(galactocerebrosidase,GALC)的表达(例如,通过使用病毒载体来表达GALC)。还提供了用于治疗其他遗传病的类似方法。

背景技术

[0004] 克拉伯病是由半乳糖脑苷酯酶(GALC)的缺乏或缺失引起的罕见的遗传性溶酶体贮积症,半乳糖脑苷酯酶是一种对神经系统中正常髓鞘形成的发育和维持至关重要的酶。患有最严重形式的这种病症(称为早期婴儿克拉伯病)的儿童,在6个月大时出现症状并经历快速进行性神经变性(neurodegeneration),通常导致到2岁时死亡。患有晚发形式的该疾病的患者也可能发生严重残疾和过早死亡,包括婴儿后期发病和青少年发病。

[0005] 采用脐带血移植(umbilical cord blood transplantation,UCBT)的治疗在患有早期婴儿和婴儿后期形式的克拉伯病的个体中可以有效地保留认知并延长寿命。尽管UCBT在神经系统症状发作之前阻止了脑退化的进程,但它对治疗导致患者出现严重运动障碍的周围神经病变的症状无效。

发明内容

[0006] 本文提供了治疗克拉伯病的新方法。在一些实施例中,这样的方法包括免疫抑制受试者,给受试者施用治疗有效量的脐带血(例如,进行UCBT),和给受试者施用治疗有效量的编码半乳糖脑苷酯酶(GALC)的核酸分子(例如,以增加GALC表达)。经治疗的受试者可以患有任何形式的克拉伯病,如早期婴儿克拉伯病、婴儿后期克拉伯病或青少年克拉伯病。在一些实施例中,所述受试者患有早期婴儿克拉伯病,并且是不到6个月大的人类婴儿。在一些实施例中,所述受试者是哺乳动物,如人、猫或犬。

[0007] 在一些实施例中,在施用编码GALC的核酸分子之前,例如在施用编码GALC的核酸分子之前至少12小时、至少24小时、至少48小时、至少72小时或至少96小时施用所述脐带血。在一些实施例中,所述脐带血对所述受试者而言是同种异体的。在这些例子中,HLA-匹配的供体(HLA-matched donor)与被治疗的受试者在6个HLA标记物中至少匹配4个。在一些实施例中,给所述受试者施用至少 3×10^7 /kg校正理想体重(AIBW)的总有核细胞剂量。

[0008] 所述编码GALC的核酸可与所述被治疗的受试者相匹配。因此,例如,如果待治疗的

受试者是猫,可以使用猫GALC编码序列,并且如果待治疗的受试者是人,可以使用人GALC编码序列。在一些实施例中,所述编码GALC的核酸分子与SEQ ID NO:1具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%、至少99%或100%的序列同一性。在一些实施例中,所述核酸分子编码GALC蛋白,所述GALC蛋白包含与SEQ ID NO:2至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%、至少99%或100%的序列同一性。所述编码GALC的核酸分子可以与启动子可操作地连接。所述编码GALC的核酸分子可以直接施用,例如,作为裸DNA,或者可以作为载体的部分施用,如质粒或病毒载体,例如可以通过血脑屏障的载体,如腺相关载体(AAV),例如AAV血清型rh.10。在一些实施例中,静脉内施用所述编码GALC的核酸分子。在一些实施例中,所述编码GALC的核酸分子(当为病毒载体的部分时)以每受试者至少 2×10^{14} gc的剂量施用。在一些实施例中,所述编码GALC的核酸分子(当为病毒载体的部分时)以至少 1×10^{11} gc/kg、至少 1×10^{12} gc/kg、至少 1×10^{13} gc/kg或至少 1×10^{14} gc/kg的剂量施用。

[0009] 所述受试者在接受所述UBCT和所述编码GALC的核酸分子之前可以进行免疫抑制。在一些实施例中,这样的步骤包括施用治疗有效量的阿仑单抗、羟基脲、氟达拉滨和白消安。在一些实施例中,这样的步骤包括施用试剂以降低GVHD,如治疗有效量的他克莫司和霉酚酸酯(MMF)。

[0010] 除了治疗克拉伯病的方法,本公开提供了治疗受试者,例如哺乳动物受试者中遗传病的方法。所述方法减少基因治疗中所用试剂(例如,病毒载体蛋白或在施用所述基因治疗时才由所述受试者产生的新蛋白质)的不希望的免疫应答(例如,抗体产生)。这些方法可以用来治疗任何遗传疾病。在一些实施例中,该基因治疗增加蛋白质的表达、降低蛋白质的表达、校正基因组序列错误或其组合。这些方法可包括在所述受试者中清除骨髓(例如使用化学疗法、照射或两者),和随后给所述受试者施用治疗有效量的造血干细胞(HSC)以便为所述受试者提供新的免疫系统。在一些实施例中,在施用所述HSC之后,给所述受试者施用治疗有效量的免疫抑制剂。在施用所述HSC之后(其可以在所述受试者的免疫系统恢复之前),所述方法包括给所述受试者施用治疗有效量的治疗性核酸分子,其中所述核酸分子校正所述遗传病(例如,通过表达缺失蛋白)。

[0011] 通过参考附图进行的以下详细描述,本公开的前述和其他目的以及特征将变得更加显而易见。

附图说明

[0012] 图1-表达人GALC(hGALC)的AAVrh.10的基因组结构。命名为AAVrh.10-hGALC的载体包含AAV2反向末端重复序列(ITR)、CAG启动子、全长的人GALC cDNA和兔 β -珠蛋白polyA。所述CAG启动子由人巨细胞病毒(CMV)增强子、鸡 β -肌动蛋白启动子和剪接供体和兔 β -珠蛋白剪接受体组成。基于AAV2的基因组用AAVrh.10衣壳进行假型化。本领域技术人员将理解,所述全长的人GALC cDNA可以用来自任何哺乳动物,如犬、猫、小鼠、大鼠或海豚的全长GALC cDNA替换。

[0013] 图2.用BMT和静脉内AAVrh.10-mGALC治疗的twitcher小鼠的存活。在PND10时用AAVrh.10-mGALC治疗的小鼠的存活,在PND10时用BMT(白消安清除)治疗的小鼠的存活,或在PND10-12时用BMT(白消安清除)治疗后立即用AAVrh.10-mGALC治疗的小鼠的存活。垂直的蓝色和绿色上升(upsticks)代表小鼠仍然是活的,红色上升是指被处死用于分析的小

鼠。星号表示死于胃肠道并发症的小鼠。请注意,仅用AAVrh.10-mGALC治疗的小鼠的平均存活年龄约为70-75天,尽管有一只小鼠活得更长。来自Raft等, *Mol. Ther.* 23:1681-90, 2015。

[0014] 图3A-3F. 用BMT+AAV治疗的twitcher小鼠的周围神经系统的病理学研究。将来自仅用BMT治疗的twitcher小鼠或用BMT+AAV治疗的twitcher小鼠的坐骨神经的切片与来自未经治疗的患病twitcher小鼠和野生型小鼠的相似切片进行比较。所有图像均来自用固蓝(luxol-fast blue)/过碘酸雪夫氏(periodic acid Schiff) (原始放大倍数×1,000) 染色的石蜡切片。野生型小鼠(a)显示正常的髓鞘形成,而42日龄的未经治疗的患病(twitcher)小鼠(b)基本上没有髓鞘且具有许多巨噬细胞。仅用BMT治疗的98日龄的twitcher小鼠(c)基本上已经失去所有髓鞘,并且与未经治疗的twitcher小鼠相当。相反,来自用组合的BMT/AAVrh10(d-f)治疗的不同年龄的小鼠的坐骨神经具有外观完全正常的髓鞘,并且与野生型小鼠相当。来自Rafi等, *Mol. Ther.* 23:1681-90, 2015。

[0015] 图4. 脐血移植后患有克拉伯病的儿童的神经发育结果。用独有的线代表每位患者的发育。黑线(下部)代表作为婴儿接受移植的有症状患者,彩色的线表示作为婴儿也接受移植的无症状患者。绿色对角线代表未患病儿童的典型发育。阴影区域表示未患病儿童的典型发育的可变性。来自Escolar等, *NEJM*, 352:2069-81, 2005。

[0016] 序列表

[0017] 所附序列表中列出的核酸序列和氨基酸序列使用核苷酸碱基的标准字母缩写和氨基酸的三字母代码显示,如37C.F.R.1.822中所定义。仅显示了每个核酸序列的一条链,但应理解当提及所展示的链时,其互补链也包括在内。序列表以命名为“sequence listing.txt”(~40kb)的ASCII文本文件的形式提交,该文件于2017年12月18日创建,并且通过引用并入本文。

[0018] SEQ ID NO:1和2分别为示例性人GALC核酸和蛋白序列(GenBank®登录号分别为NM_000153.3和NP_000144.2)。

[0019] SEQ ID NO:3和4为AAVrh.10的衣壳的示例性核酸和蛋白序列(来自GenBank登录号AY243015.1和AA088201.1)。

具体实施方式

[0020] 除非另有说明,否则根据常规用法使用技术术语。分子生物学中常见术语的定义可参见Benjamin Lewin, *Genes VII*, published by Oxford University Press, 1999; Kendrew et al. (eds.), *The Encyclopedia of Molecular Biology*, 由Blackwell Science Ltd. 出版, 1994; 和Robert A. Meyers (ed.), *Molecular Biology and Biotechnology: a Comprehensive Desk Reference*, 由VCH Publishers, Inc. 出版, 1995; 和其他类似的参考文献。

[0021] 如本文所用的,单数形式“一(a)”,“一个(an)”和“该(the)”指单数形式和复数形式二者,除非上下文另有明确说明。如本文所用,术语“包含(comprises)”意指“包括(includes)”。因此,“包含核酸分子”意指“包括核酸分子”而不排除其他要素。还应理解,除非另有说明,为核酸给出的任何和所有碱基大小都是近似的,并且出于描述目的而提供。尽管可以使用与本文描述的那些类似或等同的许多方法和材料,但是下面描述了特别合适的方法和材料。如有冲突,以本说明书(包括术语解释)为准。另外,所述材料、方法和实施例仅

是说明性的而不是限制性的。所有参考文献(包括专利申请和专利),以及与列出的 GenBank® 登录号相关的序列(截至2017年1月20日)均通过引用整体并入本文。

[0022] 为了便于审阅本公开的各种实施方案,提供了以下具体术语的解释:

[0023] 施用:通过任何有效的途径给受试者提供或给予试剂,如免疫抑制剂、脐带血、HSC、编码GALC的核酸分子或其他治疗性核酸分子,或其他治疗剂。示例性的施用途径包括但不限于注射(例如,皮下、肌肉内、皮内、腹膜内、鞘内、骨内和静脉内注射)、透皮、鼻内和吸入途径。

[0024] 接触:直接物理相关的放置,包括固体或液体形式。接触可以在体外或离体发生,例如,通过向样品(如含脐带血的样品)中添加试剂,或通过给受试者施用在体内发生。

[0025] 有效量:足以产生有益或所需结果的试剂(如免疫抑制剂、脐带血、HSC、编码GALC的核酸分子或其他治疗性核酸分子)的量。

[0026] 有效量(也被称为治疗有效量)可以根据下列中的一项或多项而变化:受试者和所治疗的疾病状况、受试者的体重和年龄、疾病状况的严重程度、施用方式等,其可以很容易地由本领域普通技术人员确定。有益的治疗效果可包括诊断确定的实现;疾病、症状、病症或病理状况的改善;减少或预防疾病、症状、病症或病状的发作;和通常地抵抗疾病、症状、病症或病理状况。在一个实施方案中,一种或更多种免疫抑制剂的“有效量”是足以实现骨髓抑制,如使白细胞减少至少99%(与未施用所述免疫抑制剂相比)的量。在一个实施方案中,脐带血的“有效量”是至少 3×10^7 总核细胞(TNC)/kg (30million/kg)受体重量,例如至少 5×10^7 /kg或至少 1×10^8 /kg,以在RIC UCBT后在第+14-15天的中位实现移植。在一个实施方案中,编码GALC的核酸分子(例如,编码GALC的载体)的“有效量”是足以增加T细胞中GALC的活性和/或表达,例如增加至少10%、至少20%、至少25%、至少50%、至少70%、至少75%、至少80%、至少90%、至少95%、至少99%、至少100%、至少200%、至少300%、至少400%、至少500%或至少600%(与未施用所述编码GALC的核酸分子相比)的量。

[0027] 在一个实施方案中,免疫抑制剂、脐带血和编码GALC的核酸分子(例如,编码GALC的载体)的“有效量”是足以增加经治疗的克拉伯病患者的存活时间,例如增加至少10%、至少20%、至少25%、至少50%、至少70%、至少75%、至少80%、至少90%、至少95%、至少99%、至少100%、至少200%、至少300%、至少400%、至少500%或至少600%(与未施用所述免疫抑制剂、脐带血和所述编码GALC的核酸分子相比)的量。在一个实施方案中,免疫抑制剂、脐带血和编码GALC的核酸分子(例如,编码GALC的载体)的“有效量”是足以增加经治疗的克拉伯病患者的存活时间,例如增加至少6个月、至少9个月、至少1年、至少1.5年、至少2年、至少2.5年、至少3年、至少4年、至少5年、至少10年、至少12年、至少15年或至少20年(与未施用所述免疫抑制剂、脐带血和所述编码GALC的核酸分子相比)的量。在一个实施方案中,免疫抑制剂、脐带血和编码GALC的核酸分子(例如,编码GALC的载体)的“有效量”是足以增加经治疗的克拉伯病患者的CNS和/或PNS细胞的髓鞘形成,例如增加至少10%、至少20%、至少25%、至少50%、至少70%、至少75%、至少80%、至少90%、至少95%、至少99%、至少100%、至少200%、至少300%、至少400%、至少500%或至少600%(与未施用所述免疫抑制剂、脐带血和所述编码GALC的核酸分子相比)的量。在一个实施方案中,免疫抑制剂、脐带血和编码GALC的核酸分子(例如编码GALC的载体)的“有效量”是足以减少经治疗的克拉伯病患者的CNS和/或PNS中的巨噬细胞渗透、星形胶质细胞增生(astrogliosis)和/或CD68

染色,例如减少至少10%、至少20%、至少25%、至少50%、至少70%、至少75%、至少80%、至少90%或至少95%(与未施用所述免疫抑制剂、脐带血和所述编码GALC的核酸分子相比)的量。在一个实施方案中,免疫抑制剂、脐带血和编码GALC的核酸分子(例如,编码GALC的载体)的“有效量”是足以减少经治疗的克拉伯病患者中震颤(tremors),例如减少至少10%、至少20%、至少25%、至少50%、至少70%、至少75%、至少80%、至少90%或至少95%(与未施用所述免疫抑制剂、脐带血和所述编码GALC的核酸分子相比)的量。在一个实施方案中,免疫抑制剂、脐带血和编码GALC的核酸分子(例如,编码GALC的载体)的“有效量”是足以增加经治疗的克拉伯病患者的体重,例如增加至少10%、至少20%、至少25%、至少50%、至少70%、至少75%、至少80%、至少90%、至少95%、至少99%、至少100%、至少200%、至少300%、至少400%、至少500%或至少600%(与未施用所述免疫抑制剂、脐带血和所述编码GALC的核酸分子相比)的量。在一个实施方案中,免疫抑制剂、脐带血和编码GALC的核酸分子(例如,编码GALC的载体)的“有效量”是足以增加或改善经治疗的克拉伯病患者中神经发育功能,例如增加或改善至少10%、至少20%、至少25%、至少50%、至少70%、至少75%、至少80%、至少90%、至少95%、至少99%、至少100%、至少200%、至少300%、至少400%、至少500%或至少600%(与未施用所述免疫抑制剂、脐带血和所述编码GALC的核酸分子相比)的量。在一个实施方案中,免疫抑制剂、脐带血和编码GALC的核酸分子(例如,编码GALC的载体)的“有效量”是足以增加或改善经治疗的克拉伯病患者的早期学习(例如,如通过Bayley婴幼儿发育量表或Mullen量表(Mullen,E.M.(1995).Mullen Scales of Early Learning (AGS ed..Circle Pines,MN;American Guidance Service Inc.)所评估的),例如增加或改善至少10%、至少20%、至少25%、至少50%、至少70%、至少75%、至少80%、至少90%、至少95%、至少99%、至少100%、至少200%、至少300%、至少400%、至少500%或至少600%(与未施用所述免疫抑制剂、脐带血和所述编码GALC的核酸分子相比)的量。在一个实施方案中,免疫抑制剂、脐带血和编码GALC的核酸分子(例如,编码GALC的载体)的“有效量”是足以增加或改善经治疗的克拉伯病患者的运动技能(例如,如通过Peabody运动发育量表所评估的),例如增加或改善至少10%、至少20%、至少25%、至少50%、至少70%、至少75%、至少80%、至少90%、至少95%、至少99%、至少100%、至少200%、至少300%、至少400%、至少500%或至少600%(与未施用所述免疫抑制剂、脐带血和所述编码GALC的核酸分子相比)的量。在一个实施方案中,免疫抑制剂、脐带血和编码GALC的核酸分子(例如,编码GALC的载体)的“有效量”是足以改善经治疗的克拉伯病患者(例如,青少年或成人受试者)的行为症状,例如改善至少10%、至少20%、至少25%、至少50%、至少70%、至少75%、至少80%、至少90%、至少95%、至少99%、至少100%、至少200%、至少300%、至少400%、至少500%或至少600%(与未施用所述免疫抑制剂、脐带血和所述编码GALC的核酸分子相比)的量。在一个实施方案中,免疫抑制剂、脐带血和编码GALC的核酸分子(例如,编码GALC的载体)的“有效量”是足以提高经治疗的克拉伯病患者的视力,例如提高至少10%、至少20%、至少25%、至少50%、至少70%、至少75%、至少80%、至少90%、至少95%、至少99%、至少100%、至少200%、至少300%、至少400%、至少500%或至少600%(与未施用所述免疫抑制剂、脐带血和所述编码GALC的核酸分子相比)的量。在一个实施方案中,免疫抑制剂、脐带血和编码GALC的核酸分子(例如,编码GALC的载体)的“有效量”是足以提高经治疗的克拉伯病患者的听力,例如提高至少10%、至少20%、至少25%、至少50%、至少70%、至少75%、

至少80%、至少90%、至少95%、至少99%、至少100%、至少200%、至少300%、至少400%、至少500%或至少600% (与未施用所述免疫抑制剂、脐带血和所述编码GALC的核酸分子相比) 的量。在一个实施方案中,免疫抑制剂、脐带血和编码GALC的核酸分子(例如,编码GALC的载体)的“有效量”是足以增加经治疗的克拉伯病患者的白质(例如,如通过大脑的MRI或CSF开放压力所检测的),例如增加至少10%、至少20%、至少25%、至少50%、至少70%、至少75%、至少80%、至少90%、至少95%、至少99%、至少100%、至少200%、至少300%、至少400%、至少500%或至少600% (与未施用所述免疫抑制剂、脐带血和所述编码GALC的核酸分子相比) 的量。在一个实施方案中,免疫抑制剂、脐带血和编码GALC的核酸分子(例如,编码GALC的载体)的“有效量”是足以减少经治疗的克拉伯病患者的颅内压(例如,如通过大脑的MRI所检测的),例如减少至少10%、至少20%、至少25%、至少50%、至少70%、至少75%、至少80%或至少90% (与未施用所述免疫抑制剂、脐带血和所述编码GALC的核酸分子相比) 的量。在一个实施方案中,免疫抑制剂、脐带血和编码GALC的核酸分子(例如,编码GALC的载体)的“有效量”是足以减少经治疗的克拉伯病患者的处理时间(例如,如通过大脑的MRI所检测的),例如减少至少10%、至少20%、至少25%、至少50%、至少70%、至少75%、至少80%或至少90% (与未施用所述免疫抑制剂、脐带血和所述编码GALC的核酸分子相比) 的量。在一个实施方案中,免疫抑制剂、脐带血和编码GALC的核酸分子(例如,编码GALC的载体)的“有效量”是足以减少经治疗的克拉伯病患者的癫痫发作(seizure)(例如,如通过大脑的MRI所检测的),例如减少至少10%、至少20%、至少25%、至少50%、至少70%、至少75%、至少80%或至少90% (与未施用所述免疫抑制剂、脐带血和所述编码GALC的核酸分子相比) 的量。在一个实施方案中,免疫抑制剂、脐带血和编码GALC的核酸分子(例如,编码GALC的载体)的“有效量”是足以改善经治疗的克拉伯病患者中步态、痉挛、摄食能力、精细运动技能、适应功能、易怒(irritability)、自主神经异常、睡眠或其组合(例如,如通过大脑的MRI所检测的),例如改善至少10%、至少20%、至少25%、至少50%、至少70%、至少75%、至少80%、至少90%、至少95%、至少99%、至少100%、至少200%、至少300%、至少400%、至少500%或至少600% (与未施用所述免疫抑制剂、脐带血和所述编码GALC的核酸分子相比) 的量。在一个实施方案中,免疫抑制剂、脐带血和编码GALC的核酸分子(例如,编码GALC的载体)的“有效量”是足以减少经治疗的克拉伯病患者中CSF蛋白水平和/或减少血液/CSF鞘氨醇半乳糖苷(psychosine)的水平(例如,如通过大脑的MRI所检测的),例如减少至少10%、至少20%、至少25%、至少50%、至少70%、至少75%、至少80%、至少90%、至少95%或至少99% (与未施用所述免疫抑制剂、脐带血和所述编码GALC的核酸分子相比) 的量。在一些实施例中,实现了这些效果的组合。

[0028] 半乳糖脑苷脂酶(GALC):(例如OMIM 606890):也称为半乳糖神经酰胺酶(galactosylceramidase),是一种从神经酰胺衍生物中去除半乳糖的酶(EC 3.2.1.46)。GALC中的突变,如缺失(例如,502/de1突变)、插入和点突变,与克拉伯病相关。已经在犬中观察到Y158S突变,并且在恒河猴中观察到对应于cDNA的外显子4中的位置387和388的AC缺失。

[0029] GALC序列可公开获得,例如来自**GenBank®**序列数据库(例如,登录号NP_000144.2、AAH36518.1、NP_001003238.1、XP_011281775.1、AAB71823.1和NP_001037727.1提供了示例性GALC蛋白序列,而登录号:NM_000153.3、BC036518.2、NM_001003238.1、XM_

011283473.1、AH005573.2和NM_001044262.2提供了示例性GALC核酸序列)。本领域普通技术人员可以鉴别其他GALC核酸和蛋白序列,包括GALC变体,例如与这些GenBank®序列具有至少80%、至少85%、至少90%、至少92%、至少95%、至少98%或至少99%的序列同一性的那些。

[0030] 造血干细胞(HSC):产生所有血细胞的干细胞。因此,HSC具有在体内持久产生所有血液谱系的能力。它们存在于脐带血和骨髓(BM)中。在一些实施例中,HSC表达CD34。在一些实施例中,HSC表达以下标志物:

[0031] 小鼠HSC:CD34^{10/-}、SCA-1⁺、Flt-3⁺、C-kit⁺、lin-

[0032] 人HSC:CD34⁺、CD59⁺、Thy1/CD90⁺、CD38^{10/-}、C-kit/CD117⁺、CD166⁺、lin⁻、SLAM分子

[0033] 增加或减少:与对照值(例如,代表无治疗剂的值)相比,数量上分别具有统计学上显著的正或负变化。增加是正变化,如与对照值相比增加至少50%、至少100%、至少200%、至少300%、至少400%或至少500%。减少是负变化,如与对照值相比减少至少20%、至少25%、至少50%、至少75%、至少80%、至少90%、至少95%、至少98%、至少99%或至少100%。在一些实施例中,所述减少小于100%,如不超过90%、不超过95%或不超过99%的减少。

[0034] 分离的:“分离的”生物组分(例如核酸分子或蛋白)基本上与产生所述组分的生物体的细胞或组织中的其他生物组分分离,与所述其他组分分开产生,或从所述其他组分中纯化,所述其它生物组分如其他细胞(例如,RBC)、染色体和染色体外DNA和RNA,以及蛋白质。已经“分离”的核酸和蛋白质包括通过标准纯化方法纯化的核酸和蛋白质。该术语还包括通过在宿主细胞中重组表达制备的核酸和蛋白质以及化学合成的核酸和蛋白质。

[0035] 克拉伯病:也称为球形细胞脑白质营养不良或半乳糖酰基鞘氨醇脂沉积症,是影响神经系统髓鞘的一种罕见的,通常是致命的退行性疾病。它是神经鞘脂病(sphingolipidosis)的一种形式,因为它涉及鞘脂的功能失调。这种病症以常染色体隐性模式遗传。克拉伯病是由GALC基因中的突变引起的(在人类中位于14号染色体(14q31)上),其导致半乳糖脑苷脂酶的缺陷。除了人类,已经在猫、犬(例如,韦斯特犬(Westies)和凯恩犬(Caim Terriers))和海豚中观察到克拉伯病。

[0036] 婴儿克拉伯病(例如,患者是0-6个月大)的症状可包括易怒;肌张力增高(hypertonia);周围神经病;呕吐和其他喂食困难;未能茁壮成长(failure to thrive);发育迟缓;不明原因的发烧;和进行性肌肉无力、听力丧失和视力丧失。迟发型可能直到婴儿期后期(婴儿晚期,例如患者为7-12个月大)、儿童期(晚发,例如患者为13个月至10岁)、青春期早期甚至到成年期(例如,患者为11岁或更大)才出现症状。这些形式的体征和症状是可变化的,但可能包括肌肉无力和僵硬;行走困难;视力丧失;智力退化;和/或癫痫发作。

[0037] 可操作连接:当第一核酸序列与第二核酸序列处于功能关系时,所述第一核酸序列与所述第二核酸序列可操作连接。例如,如果启动子影响编码序列(例如,GALC编码序列)的转录或表达,所述启动子与所述编码序列可操作连接。通常,可操作连接的DNA序列是连续的,并且在必要时将两个蛋白质编码区连接在同一阅读框中。

[0038] 药学上可接受的载体:用于本发明的药学上可接受的载体是常规的。Remington's Pharmaceutical Sciences(E.W.Martin,Mack Publishing Co.,Easton,PA,15th Edition(1975))描述了适用于治疗剂的药物递送的组合物和制剂,如本文所公开的载体、血细胞、

核酸分子或免疫抑制剂。

[0039] 一般来说,载体的性质取决于所采用的特定给药方式。例如,肠胃外制剂通常包含可注射的流体作为载体,该流体包括药学上和生理学上可接受的流体,如水、生理盐水、平衡盐溶液、葡萄糖水溶液、甘油等。除生物学上中性的载体外,待施用的药物组合物可含有少量无毒辅助物质,如润湿剂或乳化剂、防腐剂和pH缓冲剂等,例如乙酸钠或山梨醇酐月桂酸酯。

[0040] 启动子:指导核酸转录的一系列核酸控制序列。启动子包括转录起始位点附近的必需核酸序列,例如,在聚合酶II型启动子的情况下为TATA元件。启动子还任选地包括可位于距转录起始位点数千碱基对的远端增强子或阻遏元件。

[0041] 启动子的实例包括但不限于SV40启动子、CMV增强子-启动子和CMV增强子/ β -肌动蛋白启动子。本文提供的方法中,组成型和诱导型启动子均可使用(参见,例如Bitter等, *Methods in Enzymology* 153:516-544,1987)。还包括这样的启动子元件,它们足以使启动子依赖性的基因表达对于细胞类型特异性表达、组织特异性表达而言是可控的,或可被外部信号或试剂诱导;这些元件可位于基因的5'或3'区域。通过重组DNA或合成技术产生的启动子也可用于提供核酸序列的转录。

[0042] 重组的:重组核酸分子或蛋白质序列具有非天然存在的序列或具有通过将两个原本分开的序列区段人工组合而制成的序列的核酸分子或蛋白质序列(例如,包括GALC编码序列的病毒载体)。该人工组合可以通过常规方法,如化学合成实现,或通过人工操纵分离的核酸片段,如通过基因工程技术来实现。类似地,重组或转基因细胞是包含重组核酸分子和表达重组蛋白的细胞。

[0043] RNA干扰(RNAi):由RNA分子介导的转录后基因沉默机制。将短RNA分子(例如,双链RNA)引入细胞导致RNA分子与其他特异性信使RNA(mRNA)分子的结合,并且可以增加或降低它们的活性,例如通过阻止mRNA产生蛋白质。抑制性RNA分子的实例包括小干扰RNA(siRNA)、微小RNA(miRNA)、核酶(例如,锤头状核酶、VS核酶或发夹核酶)和反义分子。在特定的实施例中,RNAi分子针对靶基因,例如在患有遗传病的受试者中其表达被不希望地上调的基因(因此希望降低其表达)。在一些实施例中,RNAi分子的长度为至少约19个核苷酸(nt),例如至少20、至少21、至少22、至少23、至少24、至少25、至少26或至少27nt。

[0044] 序列同一性:氨基酸(或核苷酸)序列之间的相似性用序列之间的相似性表示,否则称为序列同一性。序列同一性经常以百分比同一性(或相似性或同源性)来衡量;百分比越高,两个序列越相似。当使用标准方法比对时,多肽的同源物将具有相对高程度的序列同一性。

[0045] 用于比较的序列比对方法是已知的。各种程序和比对算法描述于:Smith and Waterman, *Adv. Appl. Math.* 2:482,1981;Needleman and Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48:443,1970;Pearson and Lipman, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85:2444,1988;Higgins and Sharp, *Gene* 73:237,1988;Higgins and Sharp, *CABIOS* 5:151,1989;Corpet等, *Nucleic Acids Research* 16:10881,1988;和Pearson and Lipman, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85:2444,1988。Altschul等, *Nature Genet.* 6:119,1994提出了序列比对方法和同源性计算的详细论述。

[0046] NCBI基本局部比对搜索工具(NCBI Basic Local Alignment Search Tool,

BLAST) (Altschul等, J.Mol.Biol. 215:403, 1990) 可自多种来源获得, 包括美国国家生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information, NCBI, Bethesda, MD) 和互联网, 与序列分析程序blastp、blastn、blastx、tblastn和tblastx一起使用。可在NCBI网站上找到有关如何使用该程序确定序列同一性的说明。

[0047] 天然GALC蛋白或编码序列的变体的特征通常在于: 在使用缺口blastp设定为默认参数的NCBI Blast 2.0与氨基酸序列进行全长比对时, 经计算, 具有至少约80%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性。为了比较超过约30个氨基酸的氨基酸序列, 采用Blast 2序列功能, 使用设定为默认参数的默认BLOSUM62矩阵(间隙存在值为11, 每残基间隙值为1)。当比对短肽(少于约30个氨基酸)时, 所述比对应该采用Blast 2序列功能, 使用设定为默认参数的PAM30矩阵(开放间隙9, 延伸间隙1罚分)进行。当通过此方法评估与参考序列具有更高相似性的蛋白时, 显示百分比同一性增加, 如至少95%、至少98%或者至少99%的序列同一性。当比较少于全长序列的序列同一性时, 同源物和变体通常在10-20个氨基酸的短窗口上具有至少80%序列同一性, 并且根据其参与参考序列的相似性可具有至少85%、至少90%、或至少95%的序列同一性。在这种短窗口上确定序列同一性的方法描述于互联网上NCBI网站上。这些序列同一性范围仅出于指导目的而提供; 有可能获得超出所提供范围的很重要的同源物。

[0048] 因此, 可以与本公开的方法一起使用的变体GALC蛋白或核酸序列与SEQ ID NO:1或2以及与本文提供的**GenBank®**登录号中所示的任何序列可具有至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性。

[0049] 受试者: 哺乳动物, 例如人。哺乳动物包括但不限于鼠、猿猴、人、农场动物、运动动物(sport animals)和宠物。在一个实施方案中, 所述受试者是非人哺乳动物受试者, 如猴或其他非人灵长动物、小鼠、大鼠、兔子、猪、山羊、绵羊、海豚、犬、猫、马或牛。在一些实施例中, 所述受试者是实验室动物/生物, 如小鼠、兔或大鼠。在一些实施例中, 使用本文公开的方法治疗的受试者是不到6个月的人类婴儿。

[0050] 在一些实施例中, 所述受试者患有可用本文公开的方法治疗的克拉伯病, 如婴儿克拉伯病。在一些实施例中, 使用本文公开的方法治疗的受试者是患有遗传病的人受试者。

[0051] 治疗剂: 指在施用于受试者后获得一些有益效果的一种或更多种分子或化合物。有益的治疗效果可包括诊断确定的实现; 疾病、症状、病症或病理状况的改善; 减少或预防疾病、症状、病症或病状的发作; 和通常地抵抗疾病、症状、病症或病理状况。

[0052] 转导和转化: 当病毒或载体将核酸转移到细胞中时, 其“转导”细胞。当通过将核酸掺入细胞基因组中或通过游离型复制(episomal replication)使核酸分子被细胞稳定复制时, 该细胞被转导到其中的核酸“转化”或“转染”。

[0053] 可以使用多种转染方法, 例如化学方法(例如, 磷酸钙转染)、物理方法(例如, 电穿孔、显微注射、粒子轰击)、融合(例如, 脂质体)、受体介导的内吞作用(例如, DNA-蛋白质复合物、病毒包膜/衣壳-DNA复合物)和用病毒如重组病毒进行的生物感染(Wolff, J.A., ed, Gene Therapeutics, Birkhauser, Boston, USA (1994))。

[0054] 转基因: 由载体提供的外源基因。在一个实施例中, 转基因包括GALC编码序列(或其他治疗性核酸分子, 如基因、编码序列或抑制性RNA分子), 例如, 其与启动子序列可操作

地连接。

[0055] 移植:组织或器官或者细胞(例如,HSC)从一个身体或身体的一部分转移到另一个身体或身体的另一部分。“同种异体移植”或“异种移植”是从一个个体移植到另一个个体,其中这些个体在一个或多个基因座上具有在所述两个个体中序列不同的基因。同种异体移植可发生在遗传上不同的同一物种的两个个体之间,或发生在两个不同物种的个体之间。“自体移植”是组织或细胞从同一个体中的一个位置移植到另一个位置,或组织或细胞从一个个体移植到另一个个体,其中所述两个个体在遗传上是相同的。

[0056] 治疗(Treating)、治疗(Treatment)和疗法(Therapy):在减轻或改善损伤、病理或病症方面的任何成功或成功的标志,包括任何客观或主观参数,如减轻、缓解、减少症状或使病情更容易被患者容忍,减慢退化或衰退的速度,使退化的最终点不那么衰弱,改善受试者的身心健康或延长生存期。治疗可以通过客观或主观参数来评估;包括体检、血液和其他临床测试的结果等。在一些实施例中,用所公开的方法进行的治疗导致与遗传病相关的症状的数量或严重程度降低,如增加经治疗的遗传病患者的存活时间。

[0057] 在一些实施例中,用所公开的方法进行的治疗导致与克拉伯病相关的症状的数量或严重程度降低,如增加经治疗的克拉伯病患者的存活时间,增加或改善经治疗的克拉伯病患者的CNS和/或PNS中细胞的髓鞘形成,增加或改善经治疗的克拉伯病患者的神经发育功能,增加或改善经治疗的克拉伯病患者的早期学习(例如,如通过Bayley量表或Mullen量表所评估的),减少巨噬细胞渗透,星形胶质细胞增生和/或经治疗的克拉伯病患者的CNS和/或PNS中的CD68表达,减少经治疗的克拉伯病患者的震颤,增加经治疗的克拉伯病患者的体重,和/或增加或改善经治疗的克拉伯病患者的运动技能(例如,如通过Peabody运动发育量表所评估的),改善经治疗的克拉伯病患者的喂食,改善经治疗的克拉伯病患者的精细运动技能,改善经治疗的克拉伯病患者的认知和适应功能,改善经治疗的克拉伯病患者的视力和听力,改变经治疗的克拉伯病患者的脑MRI,改善经治疗的克拉伯病患者的神经传导、降低经治疗的克拉伯病患者中的CSF蛋白,降低经治疗的克拉伯病患者中的神经鞘氨醇半乳糖苷和疾病进程的任何生物标志物,减少经治疗的克拉伯病患者的癫痫发作,减轻经治疗的克拉伯病患者的易怒,改善经治疗的克拉伯病患者的睡眠,改善经治疗的克拉伯病患者的颅内压,改善经治疗的克拉伯病患者的步态,和减少经治疗的克拉伯病患者的行为问题。在一些实施例中,实现了这些效果的组合。

[0058] 脐带血(UCB):分娩后留在胎盘和附着的脐带中的血液。UCB含有全血中发现的所有要素,如红细胞、白细胞、血浆、血小板和造血干细胞。

[0059] 在足以……的情况下(Under conditions sufficient for):用于描述允许所期望的活性的任何环境的短语。在一个实施例中,所期望的活性是增加GALC或治疗疾病所需的其他蛋白质的表达或活性。在一个实施例中,所期望的活性是在体内治疗或减缓遗传病如克拉伯病(或表1中列出的其他遗传病)的进程,例如使用所公开的方法。

[0060] 载体:被引入入宿主细胞的核酸分子,由此产生转化的宿主细胞。载体可包括允许其在宿主细胞中复制的核酸序列,例如复制起点。载体还可以包括GALC编码序列(或其他治疗性核酸分子),例如与启动子和/或可选择的标记物基因,以及本领域已知的其他遗传元件组合。载体可以转导、转化或感染细胞,从而使细胞表达除天然存在于该细胞的核酸和/或蛋白质以外的那些核酸和/或蛋白质。载体任选地包括有助于实现核酸进入细胞的材料,

例如病毒颗粒、脂质体、蛋白质包衣等。

[0061] 概述

[0062] 克拉伯病(也称为球形细胞脑白质营养不良)是一种罕见的遗传性神经退行性疾病,据估计,其发病率为每100,000到250,000新生儿中有一例。该疾病存在于所有种族和民族中,并且由编码溶酶体酶半乳糖脑苷脂酶(GALC)的基因中的突变引起,GALC对髓鞘的重要半乳糖脂组分的正常分解代谢是必需的。GALC活性的缺陷导致某些半乳糖脂的积累,其损害成髓鞘胶质细胞,从而引起炎症、快速脱髓鞘,以及中枢神经系统(CNS)和周围神经系统(PNS)的进行性恶化(Wenger等(2013). Scriver's The Online Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease(OMMBID). Chapter 147Krabbe Disease (Globoid Cell Leukodystrophy))。在该疾病的典型早期婴儿形式中,患者在出生后的前6个月出现痉挛、发育迟缓和易怒。白质的丧失导致严重的运动和精神恶化,并在2岁前死亡。大约10%的患者患有该疾病的晚发形式(婴儿后期(late-infantile)、青少年或成人),其可表现为共济失调、虚弱、视力问题、痉挛性瘫痪、行为问题和痴呆。一些基因型导致疾病发作较轻并且发病较晚,可能与少量残留的GALC活性有关。

[0063] 在GALC基因中鉴定的147种引起疾病的突变中,有些明显与早发或晚发疾病有关。在其他情况下,强的基因型-表型相关性尚未确立。除非有克拉伯病的家族史,否则大多数患者是在已经有症状时被诊断出来,其中在婴儿克拉伯病的情况下,如果它们具有相同的GALC突变,则发病年龄相似。

[0064] 目前对症状前和最轻症状的克拉伯病患者的护理标准是施用造血干细胞移植(HSCT),最常见的是以脐带血移植(UCBT)的形式。然而,这种方法具有缺点。一个主要缺点是尚未显示单独的HSCT能改善或减缓周围神经疾病的进程,周围神经疾病是导致患病个体残疾的主要原因。此外,尽管治疗改变了疾病的自然进程,但患者仍然在青少年晚期时恶化并死亡(Gupta等, NeuroImage: Clinical. 7: 792-8, 2014)。此外,一旦患者已经出现症状,UCBT就无法提供明显的益处,因为对运动神经束早期损害很大。因此,一旦患者表现出克拉伯病的体征或症状,就没有有效的治疗方法。

[0065] 本文提供了治疗克拉伯病的新方法,所述方法利用UCBT和基因治疗来增加GALC的表达。有人提出表达GALC可以校正CNS和PNS的髓鞘形成,并且与单独的UCBT相比,可以通过缩短诊断和GALC对神经系统的可用性之间的间隔来更好地改善克拉伯病表型。其他人提出了自体脐血移植和局部慢病毒载体转染。相反,在一些实施例,本方法使用同种异体(无关供体)脐血移植和静脉内腺相关病毒载体转染来表达GALC。该方法在免疫抑制的受试者中进行,其可以减少或防止形成针对GALC蛋白的抗体。这些方法可以改善周围神经功能并延长寿命。

[0066] 本文提供了治疗受试者,如婴儿中克拉伯病的方法。在一些实施例,所述方法包括免疫抑制(例如,骨髓抑制)所述受试者,给所述受试者施用治疗有效量的脐带血(UCB),和给所述受试者施用治疗有效量的编码(GALC)的核酸分子。

[0067] 免疫抑制所述受试者可包括对所述受试者进行骨髓抑制或骨髓清除,例如通过施用治疗有效量的阿仑单抗、羟基脲、氟达拉滨和白消安。在一些实施例,所述方法进一步包括施用治疗有效量的他克莫司和霉酚酸酯(MMF)。

[0068] 在一些实施例,在施用所述编码GALC的核酸分子之前,例如至少6小时前、至少

12小时前、至少1天前、至少2天前、至少3天前、至少4天前、至少5天前、至少6天前或至少7天前施用所述UCB。在一些实施例中,所述UCB对所述受试者而言是同种异体的,并且例如,与6个HLA标志物中的4、5或6个匹配。在一些实施例中,施用治疗有效量的UCB包括给所述受试者施用至少 3×10^7 /kg校正理想体重(AIBW)的总有核细胞剂量。

[0069] 在一些实施例中,所述编码GALC的核酸分子与SEQ ID NO:1具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%、至少99%或100%的序列同一性。在一些实施例中,所述核酸分子编码GALC蛋白,所述GALC蛋白与SEQ ID NO:2具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%、至少99%或100%的序列同一性。所述GALC编码序列不包括已知与克拉伯病相关的突变。所述编码GALC的核酸分子可以与启动子(如组成型启动子)可操作连接。在一个实施例中,所述启动子是CAG启动子(参见图1)。所述编码GALC的核酸分子可以是载体的部分,所述载体如病毒载体,例如可以通过血脑屏障的载体。在特定的实施例中,所述病毒载体是腺相关载体(AAV),如AAV血清型rh.10。在一些实施例中,静脉内施用所述编码GALC的核酸分子,例如以每受试者至少 1×10^{11} 基因组拷贝(gc)、至少 1×10^{12} gc、至少 2×10^{12} gc、至少 1×10^{13} gc、至少 2×10^{13} gc或每受试者至少 1×10^{14} gc,如每受试者 2×10^{11} gc、每受试者 2×10^{12} gc、每受试者 2×10^{13} gc或每受试者 2×10^{14} gc的剂量。在一些实施例中,静脉内施用所述编码GALC的核酸分子,例如以至少 1×10^{11} gc/kg、至少 5×10^{11} gc/kg、至少 1×10^{12} gc/kg、至少 5×10^{12} gc/kg、至少 1×10^{13} gc/kg或至少 4×10^{13} gc/kg,如 4×10^{11} gc/kg, 4×10^{12} gc/kg或 4×10^{13} gc/kg的剂量。在一些实施例中,静脉内施用所述编码GALC的核酸分子。

[0070] 治疗克拉伯病的方法

[0071] 本文提供了治疗受试者,如婴儿中克拉伯病的方法。在一些实施例中,所述方法包括免疫抑制(例如,骨髓抑制)所述受试者,给所述受试者施用治疗有效量的脐带血(UCB),和给所述受试者施用治疗有效量的编码GALC的核酸分子(例如,其中所述GALC不包括与克拉伯病相关的突变,如正常的wt GALC核酸分子)。在一些实施例中,所述方法包括在来自自体供体的UCBT后,静脉输注携带GALC基因的AAV血清型rh.10载体(AAVrh.10-GALC)。当患者的免疫系统重建时,这种治疗可以通过改善脑和周围神经中的髓鞘形成来阻止运动恶化,从而改善治疗结果。

[0072] 受试者

[0073] 所述待治疗的受试者可以是患有任何形式的克拉伯病的哺乳动物。因此,患有早期婴儿克拉伯病、婴儿后期克拉伯病或青少年克拉伯病的人类、猫和犬可以用所公开的方法进行治疗。在一些实施例中,所述受试者患有早期婴儿克拉伯病,并且是不到6个月的人类婴儿。在一些实施例中,所述受试者患有婴儿后期克拉伯病,并且是不到1岁的人类婴儿。

[0074] 免疫清除

[0075] 可以给使用所公开的方法进行治疗的受试者施用抑制其免疫系统的治疗,如用于抑制免疫系统和/或破坏骨髓的治疗。在UCBT之前和在施用所述GALC编码序列之前进行这种免疫清除,其可以减少或消除不希望的免疫应答。因此,在一些实施例中,接受UCBT和GALC编码序列的受试者事先接受骨髓清除方案,例如以预期根除骨髓中的造血细胞并且在施用后一至三周内导致严重的全血细胞减少症的最大耐受剂量给予的化疗剂),或者事先接受非骨髓清除方案,例如预期部分清除但不消除受体骨髓的降低剂量的化学疗法或全身照射)。在一些实施例中,受体受试者在接收UCBT和GALC编码序列之前接受将耗尽或清除受体

免疫系统(如T细胞)的疗法。

[0076] 可使用的化疗剂的实例包括但不限于:卡莫司汀、白消安、卡铂、环磷酰胺、癌得星(cytosan)、依托泊苷、氟达拉滨、美法仑、甲氨蝶呤、塞替派(thiotepa)、拓扑替康或其组合。在一个实施例中,所述受试者用治疗有效量的白消安进行治疗。在一个实施例中,所述受试者用治疗有效量的阿仑单抗、羟基脲、氟达拉滨和白消安进行治疗。

[0077] 在一些实施例中,用本文提供的方法治疗的受试者接受照射,如三到四天内1200至1300厘戈瑞,例如在接受UCBT和GALC编码序列之前。

[0078] 在一些实施例中,所述免疫清除包括用减少移植物抗宿主病的试剂进行的治疗,如治疗有效量的他克莫司、治疗有效量的霉酚酸酯(MMF)或两者。

[0079] 成功的免疫清除是指不存在完全地宿主T细胞恢复。也就是说,只要T细胞嵌合体(chimerism)不是100%宿主,就是成功的。在一些情况下,观察到~50%的宿主T细胞,但它们随时间下降。

[0080] UCBT

[0081] 造血干细胞移植的命名因来源的物种不同而异。在人中,骨髓(BM)和不相关的脐带血(UCB)可用于移植。然而,造血干细胞的最快捷来源是库存的脐血,除非有兄弟姐妹供体。因此,用于人的过程可称为UCBT。在小鼠中,使用同基因骨髓细胞,该过程有时称为BMT。

[0082] 所述UCBT(或BMT)可以在成功的免疫清除后但在施用所述编码GALC的核酸分子之前进行。在一些实施例中,所述UCBT(或BMT)在施用所述编码GALC的核酸分子前至少6小时、在施用所述编码GALC的核酸分子前至少12小时、在施用所述编码GALC的核酸分子前至少1天、在施用所述编码GALC的核酸分子前至少2天、在施用所述编码GALC的核酸分子前至少3天、在施用所述编码GALC的核酸分子前至少4天、在施用所述编码GALC的核酸分子前至少5天、在施用所述编码GALC的核酸分子前至少6天或在施用所述编码GALC的核酸分子前至少7天,例如在施用所述编码GALC的核酸分子前12小时、24小时、48小时、72小时或96小时进行。在一些实施例中,所述UCBT(或BMT)通过IV施用。

[0083] 在一些实施例中,所述UCB(或BM)对所述受试者而言是同种异体的。在一些实施例中,所述供体在6个HLA中最少有4个与待治疗的克拉伯病受试者在等位基因水平HLA-DRB1分型上匹配,例如匹配所述6个HLA中的4、5或6个。

[0084] 在一些实施例中,所述UCB(或BM)以至少 2×10^7 /kg、至少 3×10^7 /kg、例如至少 5×10^7 /kg、至少 1×10^8 /kg AIBW或至少 3×10^8 /kg AIBW的总有核细胞(TNC)剂量施用。因此,在一些实施例中,所述UCB(或BM)包括施用至少 2×10^7 TNC/kg、 2.5×10^7 TNC/kg、 3×10^7 TNC/kg、至少 5×10^7 TNC/kg、至少 6×10^7 TNC/kg、至少 7×10^7 TNC/kg、至少 8×10^7 TNC/kg、至少 9×10^7 TNC/kg、至少 1×10^8 TNC/kg、至少 1×10^8 TNC/kg、至少 1.2×10^8 TNC/kg、至少 2×10^8 TNC/kg或至少 2.5×10^8 TNC/kg,如5至 12×10^7 TNC/kg或2.3至 25×10^7 TNC/kg。

[0085] 在一些实施例中,所述UCB(或BM)包括至少 1.5×10^5 /kg,如至少 3×10^5 /kg、至少 5×10^5 /kg、至少 1×10^6 /kg、至少 3×10^6 /kg、至少 5×10^6 /kg、至少 1×10^7 /kg、至少 3×10^7 /kg、至少 5×10^7 /kg或至少 1×10^8 /kg,如1至 9×10^5 /kg的CD34+祖细胞剂量。

[0086] 还可以从第+1天开始给所述受试者施用粒细胞集落刺激因子(G-CSF),直到ANC \geq 2,000。在一些实施例中,所述G-CSF以每日IV或SC至少1mcg/kg/剂,例如每日IV或SC至少5mcg/kg/剂、每日IV或SC至少10mcg/kg/剂或每日IV或SC至少10mcg/kg/剂的剂量施用。

[0087] 增加GALC表达

[0088] 编码功能性GALC的核酸分子是已知的,本文提供了具体的实例。在一些实施例中,所用的GALC的序列与所述经治疗的受试者匹配。例如,如果所述受试者是人,则可以使用正常的(例如,非突变的,如不包括与克拉伯病相关的突变的那些)人GALC编码序列。

[0089] 因此,在一些实施例中,所述经治疗的受试者中GALC的表达使所述经治疗的受试者的细胞中GALC蛋白表达和/或活性增加至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少75%、至少80%、至少90%、至少95%、至少100%、至少200%、至少300%、至少400%、至少500%或至少600%。在一些实施例中,所述经治疗的受试者中表达GALC使所述受试者中的GALC活性(例如,从神经酰胺衍生物中去除半乳糖)增加至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少75%、至少80%、至少90%、至少95%、至少100%、至少200%、至少300%、至少400%、至少500%或至少600%。例如,GALC活性的这种增加可在CNS和/或PNS中观察到,如在大脑、脊髓、小脑和/或周围神经(例如,坐骨神经)中。在一些实施例中,在所述受试者中表达GALC使所述受试者的CNS和/或PNS中的髓鞘形成增加至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少75%、至少80%、至少90%、至少95%、至少100%、至少200%、至少300%、至少400%、至少500%或至少600%。在一些实施例中,实现了这些效果的组合。

[0090] 在一些实施例中,所述GALC编码序列不是载体的部分。在一些实施例中,GALC编码序列是载体的部分,所述载体如病毒载体,如慢病毒载体、AAV载体、或逆转录病毒。在一些实施例中,所述GALC编码序列的表达由启动子,如组成型启动子驱动。在一些实施例中,在所述受试者中静脉内引入所述GALC编码序列。

[0091] 在一些实施例中,使用基因编辑方法施用所述GALC编码序列,例如CRISPR/Cas系统、锌指核酸酶(ZFN)编辑、转录激活因子样效应物核酸酶(TALEN)编辑等。

[0092] 在一些实施例中,所述GALC编码序列以裸核酸分子的方式被施用。在一些实施例中,所述GALC编码序列是载体的部分(例如,AAVrh.10-hGALC),并且配制在含有5%山梨糖醇的380mM PBS中,例如,以减少所述载体的聚集并增强血脑屏障的穿透。

[0093] GALC序列

[0094] 所用的GALC编码序列可以是天然的或变体GALC序列。通过**GenBank®**登录号在上面提供了几个物种的天然GALC序列。因此,在一些实施例中,向所述受试者引入的编码GALC的核酸分子(例如,含有其的载体)包括天然GALC编码序列。在一些实施例中,向所述受试者引入的编码GALC的核酸分子(例如,含有其的载体)包括非天然GALC编码序列,但编码天然GALC蛋白序列(例如,简并的编码序列)。

[0095] 在一个实施例中,所述编码GALC的核酸分子(例如,含有其的载体)编码变体GALC蛋白,包括通过**GenBank®**登录号在上面提供的蛋白序列的变体,可以含有一个或多个突变,如单插入、单缺失、单取代。然而,这些变异不会对蛋白质的功能产生不利影响,例如从神经酰胺衍生物中去除半乳糖的能力(例如,包括克拉伯病相关的突变)。在一些实施例中,所述变体GALC蛋白包括1-20个插入、1-20个缺失、1-20个取代和/或其任何组合(例如,单插入与1-19个取代的组合)。在一些实施例中,变体GALC蛋白具有1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20个氨基酸改变。在一些实施例中,变体GALC蛋白包括1-8个插入、1-15个缺失、1-10个取代和/或其任何组合(例如,1-15、1-4或1-5个氨基酸缺失与1-

10、1-5或1-7个氨基酸取代的组合)。在一个实施例中,这些变体肽是通过使用标准方法,例如定点诱变或PCR操纵编码肽的核苷酸序列而产生的。

[0096] 一种类型的修饰包括具有相似生化性质的氨基酸残基的氨基酸取代,即保守取代(例如,1-4、1-8、1-10或1-20个保守取代,如1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20个保守取代)。通常,保守取代对所得肽的活性几乎没有影响。例如,保守取代是任何天然GALC蛋白序列中的氨基酸取代,其基本上不影响该蛋白质的天然功能(例如,从神经酰胺衍生物中去除半乳糖)。丙氨酸扫描可用于鉴别GALC蛋白中哪些氨基酸残基可以容忍氨基酸取代。在一个实施例中,当有1-4、1-8、1-10或1-20个天然氨基酸中的丙氨酸或其他保守氨基酸被取代时,GALC的天然功能改变不超过25%,例如不超过20%,例如不超过10%或不超过5%。对于GALC蛋白中的原始氨基酸来说,可被取代并且被认为是保守取代的氨基酸实例包括:Ser对Ala而言;Lys、Gln或Asn对Arg而言;Gln或His对Asn而言;Glu对Asp而言;Ser对Cys而言;Asn对Gln而言;Asp对Glu而言;Pro对Gly而言;Asn或Gln对His而言;Leu或Val对Ile而言;Ile或Val对Leu而言;Arg或Gln对Lys而言;Leu或Ile对Met而言;Met,Leu或Tyr对Phe而言;Thr对Ser而言;Ser对Thr而言;Tyr对Trp而言;Trp或Phe对Tyr而言;和Ile或Leu对Val而言。

[0097] 编码天然或变体GALC蛋白的核酸分子可以被掺入到载体中。可以产生编码天然或变体GALC的核酸序列,例如与本文提供的**GenBank®**登录号所示的那些(例如与SEQ ID NO: 1或2)具有至少90%、至少92%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性的那些变体GALC。此外,可以产生多种含有功能等价核酸,例如序列不同但编码相同蛋白序列的核酸的克隆。在一些实施例中,这样的GALC编码序列被优化以适于在宿主细胞中表达。

[0098] 编码序列中的沉默突变由遗传密码的简并性(即冗余)导致,因此不止一个密码子可以编码相同的氨基酸残基。因此,例如,亮氨酸可由CTT、CTC、CTA、CTG、TTA或TTG编码;丝氨酸可由TCT、TCC、TCA、TCG、AGT或AGC编码;天冬酰胺可由AAT或AAC编码;天冬氨酸可以由GAT或GAC编码;半胱氨酸可由TGT或TGC编码;丙氨酸可由GCT、GCC、GCA或GCG编码;谷氨酰胺可由CAA或CAG编码;酪氨酸可由TAT或TAC编码;以及异亮氨酸可编码由ATT、ATC或ATA编码。

[0099] 特定物种的密码子偏好和密码子使用表可用于利用该特定物种的密码子使用偏好来构建分离的编码GALC蛋白的核酸分子。例如,从载体表达的GALC蛋白可以被设计为具有优先被感兴趣的特定生物使用的密码子(例如,在患有克拉伯病的哺乳动物中)。

[0100] 编码GALC蛋白的核酸可以通过体外方法克隆或扩增,如聚合酶链反应(PCR)、连接酶链反应(LCR)、基于转录的扩增系统(TAS)、自主序列复制系统(3SR)和Q β 复制酶扩增系统(QB)。可以使用多种克隆和体外扩增方法。另外,编码GALC蛋白的核酸编码序列可通过克隆技术制备。适当的克隆和测序技术的实例,以及足以指导技术人员进行克隆的说明可在 Sambrook et al. (ed.), *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* 2nd ed., vol.1-3, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring, Harbor, N.Y., 1989和 Ausubel等, (1987) in "Current Protocols in Molecular Biology," John Wiley and Sons, New York, N.Y. 中找到。

[0101] 编码GALC蛋白的核酸序列可以通过任何合适的方法制备,包括如适当序列的克隆或通过方法直接化学合成,所述方法如Narang等 (*Meth. Enzymol.* 68:90-99, 1979) 的磷酸三

酯法;Brown等(Meth.Enzymol.68:109-151,1979)的磷酸二酯法;Beaucage等(Tetra.Lett.22:1859-1862,1981)的二乙基亚磷酰胺法;Beaucage&Camthers(Tetra.Letts.22(20):1859-1862,1981)描述的固相亚磷酰胺三酯法,例如,使用例如描述于Needham-VanDevanter等,Nucl.Acids Res.12:6159-6168,1984的自动合成仪;和美国专利号4,458,066的固相载体法。化学合成产生单链寡核苷酸。这可以通过与互补序列杂交或通过DNA聚合酶进行以单链为模板的聚合反应而转化为双链DNA。技术人员将认识到,尽管DNA的化学合成通常限于约100个碱基的序列,但通过连接较短的序列可以获得更长的序列。

[0102] 在一个实施例中,GALC蛋白通过在载体中插入编码GALC蛋白的cDNA来制备。所述插入可以这样进行以使得蛋白质在阅读框中被读出以便产生蛋白质。制备含有编码GALC蛋白的异源核酸序列的重组载体(例如,质粒或病毒)的技术是已知的。

[0103] GALC蛋白的核酸编码序列可以插入到表达载体中,包括但不限于质粒、病毒或其他媒介物,其可以被操作以允许序列的插入或掺入并且可以在患有克拉伯病的受试者中被表达。从载体表达编码序列的方法是已知的。能够在T细胞中表达和复制的生物学功能性病毒和质粒DNA载体是已知的。所述表达载体可含有表达载体的转移和随后在T细胞中的复制所必需的其他元件,所述表达载体含有GALC蛋白编码序列。此类元件的实例包括但不限于复制起点和选择性标记,例如胸苷激酶基因或抗生素抗性标记。

[0104] 编码GALC蛋白的核酸序列可以与表达调控序列(如启动子)可操作连接。与GALC蛋白编码序列可操作连接的表达调控序列被这样连接以使得在与表达调控序列相容的条件下实现GALC蛋白编码序列的表达。示例性表达调控序列包括但不限于适当的启动子、增强子、转录终止子、在GALC蛋白-编码基因前面的起始密码子(即ATG)、内含子的剪接信号、维持该基因的正确阅读框架以允许mRNA的正确翻译,和终止密码子。表达调控元件的实例包括但不限于lac系统、噬菌体 λ 的操纵子和启动子区域以及衍生自多瘤、腺病毒、逆转录病毒或SV40的启动子。其他操作元件包括但不限于前导序列、终止密码子、多腺苷酸化信号和编码GALC蛋白的核酸序列在宿主细胞中的适当转录和随后翻译所必需的任何其他序列。在一个实施例中,所述启动子包括人CMV增强子、 β -肌动蛋白启动子、 β -珠蛋白剪接受体或其组合(例如,参见图1,CAG启动子)。在一些实施例中,使用两种或三种启动子。

[0105] 示例性病毒载体

[0106] 可以制备编码GALC蛋白的病毒载体。可使用的示例性病毒载体包括但不限于禽、鼠和人来源的多瘤、SV40、腺病毒、痘苗病毒、腺相关病毒(AAV)、疱疹病毒(包括HSV和EBV)、辛德毕斯病毒(Sindbis virus)、 α 病毒和逆转录病毒。也可以使用杆状病毒(苜蓿银纹夜蛾多核多角体病毒(Autographa californica multinuclear polyhedrosis virus);AcMNPV)载体。其他合适的载体包括正痘载体、禽痘载体、鸡痘载体、羊痘载体、猪痘(suipox)载体、慢病毒载体、 α 病毒载体和脊髓灰质炎病毒载体。具体的示例性载体是痘病毒载体,如痘苗病毒、鸡痘病毒和高度减毒的痘苗病毒(MVA)、腺病毒、杆状病毒等。使用的痘病毒包括正痘病毒、猪痘病毒、禽痘病毒和羊痘病毒。正痘包括痘苗、鼠痘和浣熊痘。使用正痘的一个例子是牛痘。禽痘包括鸡痘、金丝雀痘和鸽痘。羊痘包括山羊痘和绵羊痘。在一个实施例中,所述猪痘是猪痘(swinepox)。可以使用的其他病毒载体包括其他DNA病毒,如疱疹病毒和腺病毒,以及RNA病毒,如逆转录病毒和脊髓灰质炎。

[0107] 在一些实施例中,所述GALC编码序列是载体的部分,如可以例如在静脉施用后穿透血脑屏障的载体。此类载体的实例包括腺相关病毒(AAV),如AAV血清型AAV9和AAVrh.10。所述腺相关病毒血清型rh.10(AAV.rh10)载体部分穿透血脑屏障,提供高水平 and 扩散的转基因表达(Sondhi等,Mol Ther.15(3):481-91,2007;De等,Mol Ther.13:67-76,2006),并且似乎在静脉内递送后转导神经元、星形胶质细胞和胶质细胞(Zhang等,J.Virol.Methods 179:276-80,2011)。

[0108] 可在所公开的方法中使用的示例性AAV.rh10衣壳的序列在SEQ ID NO:3中提供(另一个实例是在EP 2341068的SEQ ID NO:59中提供)。因此,在一些实施例中,所用的AAV.rh10载体与SEQ ID NO:3具有至少90%、至少92%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性,或者编码与SEQ ID NO:4具有至少90%、至少92%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%序列同一性的蛋白。AAV.rh10包括AAV2基因转移载体骨架(表达盒侧翼的AAV2的反向末端重复序列);具有人巨细胞病毒增强子的表达盒;来自鸡 β -肌动蛋白的启动子、剪接供体和左边内含子序列(left-hand intron sequence);来自兔 β -珠蛋白的右边内含子序列(right-hand intron sequence)和剪接受体(该增强子/启动子/内含子序列被称为“CAG”)。所述CAG启动子是一种在AAV载体中驱动基因表达的强大的泛素启动子。所述AAV.rh10-hGALC载体进一步包括全长的人GALC cDNA;和兔 β -珠蛋白polyA序列(图1)。单链基因组将包装在AAV血清型rh.10的衣壳中,其最初从恒河猴中分离出来(Gao等,Proc Natl Acad Sci U S A.99(18):11854-9,2002)。本领域技术人员将理解全长的人GALC cDNA可以被任何目的哺乳动物的GALC cDNA替代,这取决于被治疗的受试者。因此,例如,治疗犬的克拉伯病可以利用包括全长犬GALC cDNA代替全长的人GALC cDNA的AAV.rh10-GALC载体。所述载体名称中基因缩写之前的小写字母可用于表示转基因来源的物种,例如:AAVrh.10-mGALC=小鼠cDNA和AAVrh.10-hGALC=人cDNA。

[0109] 示例性AAV.rh10衣壳序列(其可以为载体的部分)的序列在SEQ ID NO:3中提供。因此,在一些实施例中,所用的AAV.rh10与SEQ ID NO:3具有至少90%、至少92%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%的序列同一性。在一些实施例中,所用的AAV.rh10编码与SEQ ID NO:4具有至少90%、至少92%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%序列同一性的蛋白。

[0110] 在一些实施例中,所述载体(如AAVrh.10-hGALC)配制在含有5%山梨糖醇的380mM PBS中,例如,以减少载体的聚集并增强血脑屏障的穿透。

[0111] 在一些实施例中,静脉内施用所述编码GALC的核酸分子,例如以每受试者至少 1×10^{11} 基因组拷贝(gc,有时称为载体基因组(vg))的剂量,例如每受试者至少 2×10^{11} gc, 1×10^{12} gc、至少 2×10^{12} gc、至少 1×10^{13} gc、至少 2×10^{13} gc或者每受试者至少 1×10^{14} gc,如每受试者 2×10^{11} gc、每受试者 2×10^{12} gc、每受试者 2×10^{13} gc、或每受试者 2×10^{14} gc。在一些实施例中,静脉内施用所述编码GALC的核酸分子,例如以每受试者至少 1×10^{11} gc/kg、至少 5×10^{11} gc/kg、至少 1×10^{12} gc/kg、至少 5×10^{12} gc/kg gc、至少 1×10^{13} gc/kg、至少 5×10^{13} gc/kg或至少 $a \times 10^{14}$ gc/kg,如 4×10^{11} gc/kg、 4×10^{12} gc/kg或 4×10^{13} gc/kg的剂量。

[0112] 如果出现不良症状,例如血液中的AAV-衣壳特异性T细胞,可以施用皮质类固醇(例如,参见Nathwani等,N Engl J Med.365(25):2357-65,2011)。

[0113] 在基因治疗之前免疫清除和移植

[0114] 本文提供了治疗受试者的由遗传突变(例如,一个或多个核苷酸的缺失、插入或取代,或其组合)引起的疾病的方法。所公开的方法减少或防止针对基因治疗中所用试剂(例如,病毒载体或其部分,或所述受试者先前不表达的蛋白质)的免疫应答(例如,抗体产生)。这些方法可以增加基因治疗的成功。所公开的方法包括清除所述受试者的骨髓、用造血干细胞(HSC)对患者进行移植(其将会重建所述受试者的免疫系统),并在HSC移植后施用基因治疗。

[0115] 在一个实施方案中,免疫清除剂、HSC和编码治疗性核酸分子的核酸分子(例如,编码治疗性核酸分子的载体)的“有效量”是足以增加经治疗的患者的存活时间,例如增加至少10%、至少20%、至少25%、至少50%、至少70%、至少75%、至少80%、至少90%、至少95%、至少99%、至少100%、至少200%、至少300%、至少400%、至少500%或至少600%(与未施用所述免疫清除剂、HSC和编码治疗性核酸分子的核酸分子相比)的量。在一个实施方案中,免疫清除剂、HSC和编码治疗性核酸分子的核酸分子(例如,编码治疗性核酸分子的载体)的“有效量”是足以增加经治疗的患者的存活时间,例如增加至少6个月、至少9个月、至少1年、至少1.5年、至少2年、至少2.5年、至少3年、至少4年、至少5年、至少10年、至少12年、至少15年或至少20年(与未施用所述免疫清除剂、HSC和编码治疗性核酸分子的核酸分子相比)的量。

[0116] 在一些实施例中,免疫清除剂、HSC和编码治疗性核酸分子的核酸分子(例如,编码治疗性核酸分子的载体)的“有效量”是足以降低经治疗的患者中针对基因治疗的免疫应答,例如降低至少10%、至少20%、至少25%、至少50%、至少70%、至少75%、至少80%、至少90%、至少95%、至少99%或至少100%(与未施用所述免疫清除剂、HSC和编码治疗性核酸分子的核酸分子相比)的量。在一些实施例中,针对基因治疗的免疫应答的降低通过监测针对治疗性蛋白质、载体组分或两者的抗体产生来测量。

[0117] 因此,所公开的方法可以增加经治疗的患者的存活时间、减少对基因治疗的免疫应答,或两者。

[0118] 受试者

[0119] 待治疗的受试者可以是患有任何遗传病(如表1所列的)的任何脊椎动物(如鸟类或哺乳动物)。因此,患有遗传病的人、猴、猫、犬或其他兽类受试者可以用所公开的方法进行治疗。在一些实施例中,所述受试者是不到6个月的人类婴儿。在一些实施例中,所述受试者是至少18岁的成年人。

[0120] 完全或部分骨髓清除(myeloablation)

[0121] 在一些实施例中,在接受骨髓移植(例如,采用HSC)和基因治疗之前,所述受试者以根除骨髓中的造血细胞的量接受骨髓清除疗法。这些方法抑制所述受试者的免疫系统并损坏他们的骨髓。该治疗在施用后一至三周内导致严重的全血细胞减少症。这种治疗可用于减少或消除针对随后施用的基因治疗的免疫反应。在一些实施例中,采用化学疗法、照射或两者对所述受试者进行骨髓清除。

[0122] 在一些实施例中,给受试者施用治疗有效量的全身照射(TBI)、化学疗法或其组合。可以使用的化疗剂的实例包括但不限于下述的一种或多种:卡莫司汀、白消安(Bu)、卡铂、环磷酰胺(Cy)、癌得星、依托泊苷、氟达拉滨、羟基脲、美法仑、甲氨蝶呤、塞替派和拓扑替康。在一个实施例中,所述受试者用治疗有效量的白消安进行治疗。在一个实施例中,所

述受试者用治疗有效量的阿仑单抗、羟基脲、氟达拉滨和白消安进行治疗。在一个实施例中,所述受试者用治疗有效量的阿仑单抗和氟达拉滨(如0.2至5mg/kg iv阿仑单抗,0.1至30mg/kg iv氟达拉滨)进行治疗,在一些实施例中,其进一步包括羟基脲(如30mg/kg/天口服)、Bu、美法仑(如70mg/kg/剂IV)、塞替派(如200mg/kg/剂IV)或其组合。在一些实施例中,所述方法进一步包括施用治疗有效量的他克莫司和霉酚酸酯(MMF)。

[0123] 在一些实施例中,所述待治疗的受试者接受照射,如三至四天内1200至1300厘戈瑞。在一个实施例中,给所述受试者每6个小时施用1mg/kg口服Bu,总共16个剂量(16me/kg),接着施用Cy 2-4天,总共120-200mg/kg。在一些实施例中,给所述受试者施用120mg/kg Cy和六次200cGy的分剂量的照射。

[0124] 成功的免疫清除是指不存在完全地宿主T细胞恢复。也就是说,只要T细胞嵌合体不是100%宿主,就是成功的。在一些情况下,观察到~50%的宿主T细胞,但它们随时间下降。

[0125] 在一些实施例中,在接受骨髓移植(例如,采用HSC)和基因治疗之前,所述受试者以减少但不根除骨髓中的造血细胞的量接受非-骨髓清除疗法。因此,所述受试者可以接受预期部分清除但不消除受体骨髓的减少剂量的化学疗法或全身照射。在一个实施例中,非-骨髓清除治疗不使用白消安,而是使用美法仑和塞替派(例如,如在NIH clinical trial NCT01962415(clinicaltrials.gov/show/NCT01962415)中所述的,通过引用整体并入本文)。在一些实施例中,美法仑以70mg/m²/剂IV施用,并且塞替派以200mg/m²/剂IV施用。

[0126] HSC的输注

[0127] 在所述受试者已经接受骨髓清除疗法后,给所述受试者施用治疗有效量的细胞以再生骨髓,如HSC(例如,同种异体的HSC)。这些方法在骨髓清除疗法之后再生所述受试者的免疫系统。HSC是产生所有血细胞的干细胞。因此,HSC可以在体内产生所有血液谱系。它们存在于脐带、血液和骨髓(BM)中。在一些实施例中,HSC表达CD34。在一些实施例中,小鼠HSC是CD34lo/-、SCA-1+、Flt-3+、C-kit+、lin-。在一些实施例中,人HSC是CD34+、CD59+、Thy1/CD90+、CD38lo/-、C-kit/CD117+、CD166+、lin-。

[0128] 在一些实施例中,给所述受试者施用骨髓(BM)、不相关的脐带血、库存的脐带血或HSC(例如,从脐带、血液(例如,PBMC)或BM获得的那些)。移植是在成功的骨髓清除之后,但是在施用用于基因治疗的核酸分子之前进行。

[0129] 在一些实施例中,包括HSC的移植在施用用于基因治疗的核酸分子之前至少6小时、在施用用于基因治疗的核酸分子之前至少12小时,例如在施用用于基因治疗的核酸分子之前至少1天、至少2天、至少3天、至少4天、至少5天、至少6天、至少7天、至少2周、至少3周、至少1个月或至少2个月,例如在施用用于基因治疗的核酸分子之前12小时、24小时、48小时、72小时或96小时进行。在一些实施例中,静脉内施用所述包括HSC的移植。

[0130] 在一些实施例中,所述HSC对所述受试者而言是同种异体的。在一些实施例中,所述供体在6个HLA中最少有4个与所述待治疗的受试者在等位基因水平HLA-DRB1分型上匹配,例如匹配6个HLA标志物中的4、5或6个。在一些实施例中,所述HSC对所述受试者而言是自体的。

[0131] 在一些实施例中,所述受试者接受至少 2×10^7 /kg、至少 3×10^7 /kg,例如至少 5×10^7 /kg、至少 1×10^8 /kg AIBW或至少 3×10^8 /kg AIBW的总有核细胞(TNC)剂量。因此,在一些实施例

中,给所述受试者施用至少 2×10^7 TNC/kg、 2.5×10^7 TNC/kg、 3×10^7 TNC/kg、至少 5×10^7 TNC/kg、至少 6×10^7 TNC/kg、至少 7×10^7 TNC/kg、至少 8×10^7 TNC/kg、至少 9×10^7 TNC/kg、至少 1×10^8 TNC/kg、至少 1×10^8 TNC/kg、至少 1.2×10^8 TNC/kg、至少 2×10^8 TNC/kg或至少 2.5×10^8 TNC/kg,如5至 12×10^7 TNC/kg或2.3至 25×10^7 TNC/kg。

[0132] 在一些实施例中,所述受试者接受至少 1.5×10^5 /kg,如至少 3×10^5 /kg、至少 5×10^5 /kg、至少 1×10^6 /kg、至少 3×10^6 /kg、至少 5×10^6 /kg、至少 1×10^7 /kg、至少 3×10^7 /kg、至少 5×10^7 /kg或至少 1×10^8 /kg,如1至 30×10^5 /kg,如1.5至 30×10^5 /kg的CD34+祖细胞剂量。

[0133] 还可以从第+1天开始给所述受试者施用粒细胞集落刺激因子(G-CSF),直到ANC $\geq 2,000$ 。在一些实施例中,所述G-CSF以每日IV或SC至少1mcg/kg/剂,例如每日IV或SC至少5mcg/kg/剂、每日IV或SC至少10mcg/kg/剂或每日IV或SC至少10mcg/kg/剂的剂量施用。

[0134] 在一些实施例中,在所述移植后,所述受试者接受免疫抑制疗法直至其免疫系统恢复。在一些实施例中,给所述受试者施用治疗有效量的一种或更多种免疫抑制剂,如钙神经素(calcineurin)抑制剂(如他克莫司、环孢菌素A)、糖皮质激素(如泼尼松、地塞米松、氢化可的松)或细胞抑制剂(如甲氨蝶呤、硫唑嘌呤、细胞毒性抗生素)。在一些实施例中,在所述移植后,给所述受试者施用治疗量的环磷酰胺。

[0135] 基因治疗的施用

[0136] 在免疫清除和相关的完全或部分骨髓清除之后,HSC(例如,脐血或骨髓)被移植以重建所述经治疗的受试者的造血和免疫系统,给所述受试者施用治疗有效量的治疗性核酸分子,其中所述核酸分子校正所述遗传病。在一些实施例中,所述治疗性核酸分子是病毒载体,如AAV载体(例如,AAV.rh10)、腺病毒载体或慢病毒载体的部分。本文提供了其他实例(另参见Choudhury等,Neuropharmacol. 120:63-80,2017,通过引用整体并入本文)。所述方法不限于具体的基因治疗方法,并且包括利用非同源末端连接(NHEJ)、锌指核酸酶(ZFN)、转录激活因子样效应物核酸酶(TALEN)和CRISPR/Cas9的那些(参见,例如Morgan等,Cell Stem Cell 21:574-90,2017;Shim等,Acta Pharma.Sinica 38:738-53,2017,通过引用整体并入本文)。

[0137] 基因治疗的实例包括用于增加基因或蛋白的表达、减少基因或蛋白的表达,或校正基因或蛋白序列的那些方法和试剂。例如,为了诱导基因表达,可以将功能基因递送至所述受试者,例如递送至缺乏正常功能的靶细胞或组织。为了减少基因表达,可以引入短核酸分子(例如,siRNA、反义分子)以沉默或干扰疾病相关基因。基因编辑方法可用于在基因组水平上发挥永久和特定的校对(proofreading)效果。

[0138] 可用所公开的方法治疗的疾病包括任何血液遗传病(如镰状细胞病、原发性免疫缺陷病)、HIV(例如,HIV-1)和恶性血液病或癌症。原发性免疫缺陷病的实例及其相应的突变包括在Al-Herz等(Frontiers in Immunology,volume 5,article 162,April 22,2014,通过引用整体并入本文)中列出的那些。恶性血液病或癌症是影响血液、骨髓和淋巴结的那些肿瘤。实例包括白血病(例如,急性淋巴细胞白血病、急性髓性白血病、慢性淋巴细胞白血病、慢性髓性白血病、急性单核细胞白血病)、淋巴瘤(例如,霍奇金淋巴瘤和非霍奇金淋巴瘤)和骨髓瘤。表1提供了示例性病症和可以被所述治疗性核酸分子靶向的基因的列表。在一些实施例中,提供了可以通过基因编辑校正的突变。

[0139] 表1:示例性病症和相应的突变

[0140]

疾病	基因	突变
血细胞病症		
镰状细胞贫血	血红蛋白的 β -珠蛋白链	引起点突变 (在第 6 个 aa 处 Glu->Val) 的 SNP (A 到 T)
血友病	凝血因子 I 至 XIII 中任何一个	
甲型血友病	凝血因子 VIII	大的缺失、插入、反转和点突变
乙型血友病	凝血因子 IX	
α -地中海贫血	HBA1 或 HBA2	染色体 16 p 中的突变或缺失
β -地中海贫血	HBB	染色体 11 中的突变
δ -地中海贫血	HBD	突变
血管性血友病	血管性血友病因子	突变或缺失
恶性贫血	MTHFR	
范可尼贫血	FANCA, FANCC, FANCD2, FANCG, FANCI	FANCA: c.3788_3790del (p.Phe1263del); c.1115_1118delTTGG (p.Val372fs); 外显子 12-17del; 外显子 12-31del; c.295C>T (p.Gln99X)

[0141]

		<p>FANCC: c.711+4A>T (最初报道为 IVS4+4A>T); c.67delG (最初报道为 322delG)</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>
血小板减少性紫癜	ADAMTS13	错义和无意义突变
血栓形成倾向	凝血因子 V Leiden 凝血酶原	F5 基因的 1691 位的突变 凝血酶原 G20210A
原发性免疫缺陷病		
T-B+ SCID	IL-2RG, JAK3, IL-2、 -4、-7、-9、-15 和-21 受 体 γ 链缺陷	
T-B- SCID	RAG1, RAG2	
WHIM 综合征	CXCR4	杂合突变 (例如, 在羧基末端); 羧 基末端截短 (例如, 10-19 残基)
其他原发性免疫缺陷 (PID) 综合征		
IL-7 受体严重联合免 疫缺陷 (SCID)	IL7 受体	
腺苷脱氨酶缺陷 (ADA) SCID	ADA	
嘌呤核苷磷酸化酶 (PNP) 缺陷	PNP	
Wiskott-Aldrich 综合征 (WAS)	WAS	鉴别了超过 300 个突变
慢性肉芽肿 (CGD)	CYBA, CYBB, NCF1, NCF2 或 NCF4	
白细胞黏附缺陷(LAD)	β -2 整合素	
HIV	C-C 趋化因子受体 5 型 (CCR5), MSRB1 HIV 长末端重复 CSCR4 P17	CCR5 中 32 bp 的缺失

[0142]

	PSIP1	
杜氏型肌营养不良症 (Duchenne muscular dystrophy)	CCR5 DMD	
糖原累积症 IA 型 (Glycogen storage disease type IA)	G6Pase	
视网膜发育不良 (Retinal Dystrophy)	CEP290 ABCA4	C2991+1655A>G 5196+1216C>A; 5196+1056A>G; 5196+1159G>A; 5196+1137G>A; 938-619A>G; 4539+2064C>T
伴随镁缺陷、EB 病毒感染和腺瘤病的 X 连锁免疫缺陷 (X-linked immunodeficiency with magnesium defect, Epstein-Barr virus infection, and neoplasia, XMEN)	MAGT1	
单基因遗传病		
异染性脑白质营养不良 (Metachromatic leukodystrophy, MLD)	芳基硫酸酯酶 A (ARSA)	
脑白质营养不良 (Adrenoleukodystrophy, ALD)	ABCD1	
粘多糖 (MPS) 病 Hunter 综合征 Hurler 综合征 Scheie 综合征 Sanfilippo 综合征 A、B、C 和 D Morquio 综合征 A Morquio 综合征 B 马-拉二综合征 (Maroteaux-Lamy syndrome) 斯赖综合征 (Sly syndrome) Natowicz 综合征	IDS IDUA IDUA SGSH, NAGLU, HGSNAT, GNS GALNS GLB1 ARSB GUSB HYAL1	
α -甘露糖苷贮积症	MAN2B1	
尼曼匹克病 (Niemann Pick disease) A、B 和	SMPD1, NPC1, NPC2	

[0143]

C 型		
囊性纤维化	囊性纤维化跨膜传导调节因子 (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator, CFTR)	ΔF508
多囊肾病	PKD-1, PDK-2, PDK-3	
泰伊-萨克斯二氏病 (Tay Sachs Disease)	HEXA	1278insTATC
戈谢病 (Gaucher disease)	GBA	
亨廷顿舞蹈病 (Huntington's disease)	HTT	CAG 重复
神经纤维瘤 1 型和 2 型	NF-1 和 NF2	NF1 中 CGA->UGA->Arg1306Term
家族性高胆固醇血症	APOB, LDLR, LDLRAP1 和 PCSK9	
癌症		
慢性髓系白血病 (CML)	BCR-ABL ASXL1	融合
急性髓系白血病 (AML)	染色体 11q23 或 t(9;11)	易位
骨肉瘤	RUNX2	
结直肠癌	EPHA1	
胃癌、黑色素瘤	PD-1	
前列腺癌	雄激素受体	
宫颈癌	E6, E7	
胶质母细胞瘤	CD	
神经系统疾病		
阿尔茨海默病	NGF	
异染性脑白质退化症 (Metachromatic leukodystrophy)	ARSA	
多发性硬化	MBP	
Wiskott-Aldrich 综合征	WASP	
X-连锁肾上腺脑白质营养不良 (X-linked adrenoleukodystrophy)	ABCD1	
AACD 缺陷	AADC	
贝敦氏症 (Batten disease)	CLN2	
卡那万病 (Canavan disease)	ASPA	

[0144]	巨轴索神经病 (Giant axonal neuropathy)	GAN	
	莱伯遗传性视神经病 (Leber's hereditary optic neuropathy)	MT-ND4	
	MPS IIIA	SGSH, SUMF1	
	帕金森病	GAD, NTRN, TH, AADC, CH1, GDNF, AADC	
	庞贝氏症 (Pompe disease)	GAA	
	脊髓性肌萎缩 1 型	SMN	

[0145] 所公开的方法可用于治疗表1中所列的任何病症或其他已知的遗传病症。治疗不需要100%去除病症的所有特征,但可以减少病症的特征。尽管下面提供了具体实例,但基于该教导,可以理解其他病症的症状可以类似地受到影响。例如,所公开的方法可用于增加受试者不表达的或表达较少的蛋白质的表达,减少不希望被受试者表达的或具有减少表达的蛋白质的表达,校正基因突变或其组合。

[0146] 例如,所公开的方法可用于治疗或降低血液遗传病,如原发性免疫缺陷病的不良影响。

[0147] 例如,所公开的方法(其可以使用治疗性核酸分子以校正血红蛋白的 β -珠蛋白链中的突变)可以治疗或降低镰状细胞病的不良影响。在一个实施例中,所述治疗性核酸分子可以校正血红蛋白的 β -珠蛋白链中导致镰状细胞病的突变。在一个实施例中,所公开的方法减少受体受试者中镰状细胞病的症状(例如,血液中镰状细胞的存在、疼痛、缺血、坏死、贫血、血管闭塞性危象、再生障碍危象、脾脏阻断危象和溶血危象中的一种或更多种),例如减少至少10%、至少20%、至少50%、至少70%或至少90%(与未施用所述治疗性核酸分子相比)。在一个实施例中,所公开的方法减少受体受试者中镰状细胞的数量,例如减少至少10%、至少20%、至少50%、至少70%、至少90%或至少95%(与未施用所述治疗性核酸分子相比)。

[0148] 例如,所公开的方法(其可以使用治疗性核酸分子以校正凝血因子V Leiden或凝血酶原基因中的突变)可以治疗或降低易栓症的不良影响。在一个实施例中,所述治疗性核酸分子可以校正凝血因子V Leiden或凝血酶原基因中导致易栓症的突变。在一个实施例中,所公开的方法降低受体受试者中血栓形成倾向的症状(例如,血栓形成如深静脉血栓形成、肺栓塞、静脉血栓栓塞、肿胀、胸痛、心悸中的一种或更多种),例如降低至少10%、至少20%、至少50%、至少70%或至少90%(与未施用所述治疗性核酸分子相比)。在一个实施例中,所公开的方法降低受体受试者中凝血因子的活性,例如,例如降低至少10%、至少20%、至少50%、至少70%、至少90%或至少95%(与未施用所述治疗性核酸分子相比)。

[0149] 例如,所公开的方法(其可以使用治疗性核酸分子来校正CD40配体基因中的突变)可用于治疗或降低CD40配体缺陷的不良影响。在一个实施例中,所述治疗性核酸分子可以校正CD40配体基因中导致CD40配体缺陷的突变。在一个实施例中,所公开的方法减少受体受试者中CD40配体缺陷的症状(例如,升高的血清IgM、其他免疫球蛋白的低血清水平、机会性感染、自身免疫和恶性肿瘤中的一种或更多种),例如降低至少10%、至少20%、至少

50%、至少70%或至少90% (与未施用所述治疗性核酸分子相比)。在一个实施例中,所公开的方法增加受体受试者中CD40配体缺陷的量或活性,例如增加至少10%、至少20%、至少50%、至少70%、至少90%、至少100%、至少200%或至少500% (与未施用所述治疗性核酸分子相比)。

[0150] 例如,所公开的方法(其可以使用治疗性核酸分子来降低CCR5活性)可用于治疗或降低HIV-1感染的不良影响。在一个实施例中,所述治疗性核酸分子可降低CCR5活性,例如降低至少20%、至少50%、至少70%或至少90%。在一个实施例中,所述CCR5被修饰以包括32-bp缺失(CCR5 Δ 32)。在一个实施例中,所公开的方法减少受体受试者中HIV-1感染的症状(例如,发热、大而软的淋巴结(large tender lymph nodes)、咽喉炎、皮疹、头痛、口腔溃疡、恶心、呕吐、腹泻、周围神经病变、格林-巴利综合征(Guillain-Barre syndrome)、体重减轻、病毒载量、降低的CD4+T细胞水平、肺孢子虫肺炎,HIV消耗综合症(HIV wasting syndrome)形式的恶病质和食道念珠菌病(esophageal candidiasis)中的一种或更多种),例如降低至少10%、至少20%、至少50%、至少70%或至少90% (与未施用所述治疗性核酸分子相比)。在一个实施例中,所公开的方法增加HIV-感染的受体受试者中的CD4+T细胞水平,例如使CD4+T细胞增加至少10%、至少20%、至少50%、至少70%、至少90%、至少100%、至少200%、至少500%或至少1000% (与未施用所述治疗性核酸分子相比)。

[0151] 例如,所公开的方法可用于治疗或降低由遗传缺陷导致原发性免疫缺陷病的不良影响。例如,所公开的方法(其可以使用治疗性核酸分子以校正上面所列的基因中的突变,或者可以表达所述受试者中缺失或有缺陷的功能蛋白)可以治疗或降低原发性免疫缺陷病的不良影响。在一个实施例中,所公开的方法减少受体受试者中原发性免疫缺陷病的症状(例如,细菌感染、真菌感染、病毒感染、寄生虫感染、淋巴腺肿大、脾脏肿大、伤口和体重减轻中的一种或更多种),例如减少至少10%、至少20%、至少50%、至少70%或至少90% (与未施用所述治疗性核酸分子相比)。在一个实施例中,所公开的方法增加患有原发性免疫缺陷病症的受体受试者中免疫细胞(例如T细胞,如CD8细胞)的数量,例如增加至少10%、至少20%、至少50%、至少70%、至少90%、至少95%、至少100%、至少200%、至少300%、至少400%或至少500% (与未施用所述治疗性核酸分子相比)。在一个实施例中,所公开的方法减少患有原发性免疫缺陷病症的受体受试者中在一段时间内(例如,1年内)感染(例如,细菌感染、病毒感染、真菌感染或其组合)的数量,例如减少至少10%、至少20%、至少50%、至少70%、至少90%或至少95% (与未施用所述治疗性核酸分子相比)。

[0152] 例如,所公开的方法可用于治疗或降低单基因遗传病的不良影响。例如,所公开的方法(其可以使用治疗性核酸分子以校正上面所列的基因中的突变,或者可以表达所述受试者中缺失或有缺陷的功能蛋白)可以治疗或降低单基因遗传病的不良影响。在一个实施例中,所公开的方法减低受体受试者中单基因遗传病的症状,例如减低至少10%、至少20%、至少50%、至少70%或至少90% (与未施用所述治疗性核酸分子相比)。在一个实施例中,所公开的方法增加通常不被患有p单基因遗传病的受体受试者表达的正常蛋白质的量,例如增加至少10%、至少20%、至少50%、至少70%、至少90%、至少95%、至少100%、至少200%、至少300%、至少400%或至少500% (与未施用所述治疗性核酸分子相比)。

[0153] 例如,所公开的方法可用于治疗或降低受体受试者中恶性血液病的不良影响。在一个实施例中,所公开的方法降低受体受试者(例如,患有白血病的受试者)中异常白细胞

(例如,B细胞)的数量,例如降低至少10%、至少20%、至少50%、至少70%或至少90%(与未施用所公开的疗法相比)。在一个实施例中,所公开疗法的施用可用于治疗或降低淋巴瘤的不良影响,如减少淋巴瘤的大小、淋巴瘤的体积、淋巴瘤的生长速度、淋巴瘤的转移,例如减少至少10%、至少20%、至少50%、至少70%或至少90%(与未施用所公开的疗法相比)。在一个实施例中,所公开疗法的施用可用于治疗或降低受体受试者中多发性骨髓瘤的不良影响(如降低异常浆细胞的数量),例如降低至少10%、至少20%、至少50%、至少70%或至少90%(与未施用所公开的疗法相比)。

[0154] 例如,所公开的方法可用于治疗或降低受体受试者中遗传缺陷导致的恶性肿瘤的不良影响。在一个实施例中,所公开的方法降低受体受试者中癌细胞的数量、肿瘤的大小、肿瘤的体积、或转移的数量(例如,患有上面所列癌症的受试者),例如降低至少10%、至少20%、至少50%、至少70%或至少90%(与未施用所公开的疗法相比)。在一个实施例中,所公开疗法的施用可用于治疗或降低淋巴瘤的不良影响,如减小肿瘤的大小、肿瘤的体积、癌的生长速度、癌症的转移,例如降低至少10%、至少20%、至少50%、至少70%或至少90%(与未施用所公开的疗法相比)。

[0155] 例如,所公开的方法可用于治疗或降低受体受试者中遗传缺陷导致的神经系统疾病的不良影响。在一个实施例中,所公开的方法增强受体受试者(例如,患有上面所列的神经系统疾病的受试者)的神经功能,例如增强至少10%、至少20%、至少50%、至少70%、至少90%、至少100%、至少200%、至少300%、至少400%或至少500%(与未施用所公开的疗法相比)。

[0156] 实施例

[0157] 实施例1

[0158] 克拉伯病的Twitcher小鼠模型的治疗

[0159] 本实施例描述了用于治疗克拉伯病的twitcher小鼠模型的方法,其在造血干细胞移植(HSCT)之后使用携带GALC基因的腺相关病毒血清型rh.10载体(AAVrh.10-mGALC)(Rafi等,Mol Ther.23(11):1681-90,2015)。

[0160] 所述twitcher小鼠是天然存在的突变株,具有由于GALC基因中的无义突变(W339X)而导致缺乏GALC活性的表型。所述小鼠显示出生长迟缓和发育异常,包括在约20日龄时震颤,和到30-35日龄时后腿无力,然后到大约40日龄时消瘦和死亡。此时,在CNS和PNS中发现了类似于人类疾病的组织病理学缺陷(例如,脱髓鞘和炎性变化)。

[0161] 小鼠在出生后(PND)第10天进行治疗,因为在这个年龄,它们更接近于目标临床群体中的婴儿疾病。此外,这种策略需要施用更大量的病毒颗粒,总剂量为 2×10^{11} 颗粒单位。在PND9时使用白消安(30mg/kg)进行骨髓清除,代替通过照射进行的骨髓清除,在BMT前1天和AAVrh.10-mGALC注射前2天进行。

[0162] 以前的研究表明,在PND10时单独静脉注射该载体(无BMT)治疗的twitcher小鼠平均存活65-75天(与在未经治疗的小鼠中约40天相比),单独用BMT治疗的小鼠(无基因治疗)平均存活65-75天,虽然有些存活更长时间。

[0163] 在PND9时使用白消安对16只小鼠进行骨髓抑制,1天后进行骨髓移植(BMT),然后在24小时后单次静脉内注射AAVrh.10-GALC。由于它们在不同时间被移植(由于患病小鼠的可获得性),此时它们的年龄不同。除了一只因无关原因在非常小时就死亡的小鼠外,其他

小鼠都表现良好,其中一些已经存活超过300天(图2)。他们保持体重并表现出正常的行为,包括力量和平衡,直到超过300天。

[0164] 检查来自用该组合疗法治的四只小鼠的组织。GALC酶活性在大脑、小脑和脊髓中是正常的,并且在坐骨神经中高于正常水平。在肝脏、心脏和肌肉中测量到非常高的GALC活性。联合治疗后,所有神经组织均出现明显改善的髓鞘形成。坐骨神经中的正常髓鞘形成是最引人注目的发现,因为该组织没有被其他治疗方法校正(图3)。所有神经组织中星形胶质细胞增生少得多,并且CD68阳性细胞(活化的巨噬细胞)染色,在除脊髓外的所有神经组织中均降到正常,在脊髓中可见一些CD68阳性细胞。该数据表明在单次静脉内注射AAVrh.10-mGALC后的BMT提供比单独治疗更好的结果。据认为,AAVrh.10为大脑、小脑、脊髓和坐骨神经提供了充足的GALC活性,并且BMT有助于控制这种疾病中出现的炎症。

[0165] 因此,造血干细胞移植(HSCT)后不久,AAVrh.10-mGALC的静脉输注迅速停止了twitcher小鼠的疾病进程。这种联合治疗比单独治疗提供了更好的结果。AAVrh.10-GALC迅速向大脑、脊髓和周围神经提供GALC活性,并且HSCT控制克拉伯病中出现的炎症。

[0166] 实施例2

[0167] 施用时机

[0168] 本实施例描述了可用于比较在twitcher小鼠中HSCT后在三个时间点静脉内输注AAVrh.10-GALC的功效的方法:出生后(PND)第11、15和20天。

[0169] 在先前的研究中,小鼠在HSCT后1天和化学疗法后2天接受AAVrh.10-GALC。然而,与HSCT这么接近就输注AAVrh.10并未在人类中进行过。因此,要确定如果在几天后,当已发生供体细胞归巢和再增殖(移植后~14天)时施用AAVrh10-GALC,是否可以实现类似的效果。同系移植小鼠的完全造血再生在HSCT后10天内发生(Sadelain等,J.Immunol.144:1729-36,1990);因此,HSCT的功效在PND10时进行,然后在PND11、15和20时静脉输注AAVrh.10-GALC。

[0170] 46只小鼠(随机分配到四组)在PND 10时(在腹膜内注射30mg/kg白消安后一天)接受同系HSCT。将 $3-5 \times 10^7$ 个细胞悬浮于0.2ml无菌非血清DMEM中,然后腹膜内施用。四组中的三组(每组,n=10)在HSCT后1天、5天或10天(PND 11、15、20)接受一剂量的AAVrh.10-GALC。仅用HSCT治疗的第四组(n=16只小鼠)作为对照。主要结果指标(primary outcome measures)是存活至150天,和在PND60和PND90时的体重(以评估存活小鼠的整体健康状况)。我们从处死小鼠收集脑组织(皮质、小脑、脑干)、肝脏、心脏、骨骼肌、脾脏和坐骨神经,并比较GALC分布,如通过酶活性测定和免疫组织化学所评估的。

[0171] 实施例3

[0172] AAVrh10-GALC的剂量

[0173] 本实施例描述了可用于确定twitcher小鼠中为长期存活而使用的HSCT后静脉内AAVrh.10-GALC的最小剂量的方法。

[0174] 确定AAVrh.10-GALC的最小有效剂量(即导致统计学显著改善的存活的最小剂量)。 4×10^{13} 基因组拷贝(gc)/kg的静脉内AAVrh.10-GALC剂量是检查的最大剂量。最低剂量低两个数量级,即 4×10^{11} gc/kg,这也非常适合人受试者。中间剂量为 4×10^{12} gc/kg,其相当于约 2×10^{13} gc的人类新生儿的总剂量。如果twitcher小鼠中的最大测试剂量导致比其他剂量更长的存活,则可以测试更高的剂量。

[0175] 如实施例2中所述,在腹膜内注射30mg/kg白消安后一天,四组小鼠在PND 10时接受同系HSCT。在实施例2中确定的最佳日期,四组中的三组(每组,n=10)用 4×10^{13} 、 4×10^{12} 或 4×10^{11} gc/kg的一剂量AAVrh.10-GALC静脉内治疗。仅用HSCT治疗的第四组(n=16只小鼠)作为对照。主要结果指标是存活至150天,和在PND60和PND90时的体重。

[0176] 实施例4

[0177] 治疗犬的克拉伯病

[0178] 本实施例描述了可以用于治疗克拉伯病的犬模型的方法,所述方法使用免疫清除化学疗法、HSCT和HSCT后静脉内AAVrh.10-GALC输注,使用在小鼠中确立的最佳时机和最小有效剂量。

[0179] 在宾夕法尼亚大学兽医学院构建了对GALC突变而言是杂合的犬。照射传统上被用作克拉伯病犬的免疫清除方法;然而,这种方法并不体现目前在人类中使用的预处理方案(conditioning regimen)。已经在犬中测试了基于化学疗法的方法,但这是第一次在克拉伯病犬中在HSCT前考察基于化学疗法的预处理。

[0180] 使用基于化学疗法的方案对两只犬进行移植,该方案是为犬而开发的,但之前未在克拉伯病犬中进行过试验。犬接受环孢菌素30天(以模拟人类治疗),然后在开始白消安方案前2周以 $\sim 30\text{mg/kg/天}$ 接受口服羟基脲。在HSCT之前的第-3和-2天,犬在1小时内通过注射泵静脉内施用5mg/kg/天白消安(1mL白消安稀释在9mL盐水中)。主要结果指标是存活超过24周,同时具有正常血细胞计数,在这种情况下,没有照射的移植被认为是成功的。在24周时存活的犬都被处死用于组织病理学研究。

[0181] 犬将随机分配到以下组中的一组:未治疗组(n=2),仅HSCT组(n=3)或HSCT+AAVrh.10-GALC组(n=3)。AAVrh.10-GALC治疗的剂量和时机基于小鼠的结果(实施例2和3)。在12周比较经治疗犬与未经治疗犬的结果,并且在24周比较治疗组(仅HSCT与HSCT+AAVrh.10-GALC)的结果。

[0182] 主要结果指标包括使用扩散张量成像和各向异性分数测量获得的神经传导速度和脑MRI的结果。探索性结果包括共济失调和震颤的发作。虽然检查移植后的存活,但所有在24周仍然活着的犬都被处死以收集用于组织病理学研究的脑组织(皮质、小脑、脑干)、脊髓、周围神经(感觉、运动和自主)、肝脏、肾脏、心脏、股四头肌、性腺、脾脏、小肠和大肠、肾上腺和皮肤,以及通过酶活性测定和免疫组织化学评估GALC分布。

[0183] 实施例5

[0184] 治疗大鼠的克拉伯病

[0185] 本实施例描述了在大鼠中进行的毒理学研究。在UCBT后1天静脉内递送AAV至免疫清除的大鼠。新的免疫系统具有正常的GALC酶,因此不应该像初治患者(naive patients)那样对GALC酶起反应。

[0186] 毒理学研究在Fischer 433大鼠中进行。使用Sprague-Dawley大鼠作为骨髓供体提供真正的同种异体BMT,与已经在twitcher小鼠中使用的自体BMT相反(参见实施例1)。使用小型啮齿动物允许每组每个性别n=5,并且相对小鼠具有更大尺寸的大鼠允许更容易地从处死时的一个动物收集足够的血液用于进行全血细胞计数和血清化学测试。使用断奶的大鼠(21日龄),因为需要进行免疫抑制、BMT和AAV施用的大量操作。

[0187] 治疗组的总结如表2所示。使用用于人或大鼠的AAVrh.10-hGALC载体。由于将人

GALC基因用于大鼠,因此存在免疫原性的可能(尽管它们会被免疫抑制)。为了使聚集最小化并且使血脑屏障的渗透最大化,所述载体配制在含有5%山梨糖的380mM PBS中,如用于人类那样。仅进行BMT存在潜在的并发症,包括移植物抗宿主病(GVHD)。因此,考察阴性对照组和用BMT加媒介物代替AAVrh.10-hGALC进行治疗的组。此外,BMT可以增强静脉内AAV的副作用;因此,考察仅接受AAV的组。

[0188] 表2.用于大鼠中联合的AAVrh.10-hGALC和BMT的安全性评估的治疗组

组	动物#	免疫抑制和 BMT ¹	AAVrh.10-hGALC ^{2,3}	时间点(天) ³
A	1-30	+	媒介物	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	+	最大可实现的, (2×10 ¹⁴ gc/kg)	7, 30, 180
E	121-150	-	最大可实现的, (2×10 ¹⁴ gc/kg)	7, 30, 180

[0190]	F	151-180	-	媒介物	7, 30, 180
--------	---	---------	---	-----	------------

[0191] ¹免疫抑制。白消安,接着是霉酚酸酯1天和他克莫司4天。输注来自Sprague-Dawley供体大鼠的骨髓的1×10⁷个未分级(unfractionated)单核细胞。

[0192] ²AAV基因转移。BMT后一天,大鼠接受所述剂量AAVrh.10的静脉注射,所述AAVrh.10表达由CMV增强的鸡β-肌动蛋白启动子驱动的人GALC cDNA。

[0193] ³通过巴比妥酸盐处理来处死大鼠(每个时间点每个性别n=5),并使用心脏穿刺收集血液用于全血细胞计数和血清化学测试。检查大鼠是否有任何肉眼异常(gross abnormalities),将其记录并切掉。将以下器官取出并称重:肝脏、肾脏、心脏和肺部。以下器官的样本将用于组织病理学检查和对任何异常发现进行定量:肾上腺、脑(皮质、小脑)、结肠、膈肌、十二指肠、附睾、食道、肉眼病变(gross lesions)、心脏、回肠、肾脏、肝脏、肺/支气管、>2淋巴结、骨骼肌、坐骨神经、卵巢、胰腺、脊髓、脾、睾丸和子宫。对每个器官的苏木精和伊红染色的切片进行盲法评估。保留相同组织的样品一式两份,并通过qPCR分析载体水平。

[0194] 要使用的载体的批签发(Lot-release)标准如表3所示。所有载体在≤-60℃以等分试样储存,并在它们使用的当天解冻。

[0195] 表3.AAVrh.10 hGALC载体的批签发标准

	测试/规格	毒理学等级	
[0196]	无菌	在 3 种测试培养基中未观察到生长, 14 天	AppTec
	支原体	没有检测到	AppTec
	内毒素	LAL (Endosafe) <10 EU/mL	室内 (in house)
	效力	感染 293T 细胞, 测定上清液中的 GALC 活性, 记录结果	室内
	基因组结构	通过测序确认包装的 DNA (在 ITR 之间) 的身份	室内
	纯度	SDS-PAGE, 显示比例为 1:1:10 的 VP1、VP2 和 VP3 的 3 个条带, 其他条带几乎不可见	室内
	鉴定	使用抗 AAVrh.10 抗体进行蛋白质印迹; 存在 VP1、VP2 和 VP3 条带	室内
	外观	透明无色	室内
	pH	试纸, pH 6.5–7.5	室内
	浓度	qPCR, > 2×10 ¹³ gc/ml	室内
	体外外源病毒	3 种细胞系, 无细胞病变	AppTec
	具有复制能力的 AAV	在腺病毒辅助病毒存在下 293T 细胞的有限稀释, 无 AAV 复制	室内
	存在宿主细胞 DNA	qPCR; <100 ng/剂	室内
	存在宿主细胞蛋白	记录结果	室内
	空衣壳: 全衣壳比	透射电镜; ≥50%全衣壳	室内
	残留的质粒 DNA	qPCR; 每 10 ⁹ AAV 颗粒≤100 pg	室内

[0197] 使用 4×10^{13} gc/kg 的静脉内注射 AAVrh.10-mGALC 目标剂量。Twitcher 小鼠接受 2×10^{11} gc, 其相当于约 4×10^{13} gc/kg 体重。对于新诊断为克拉伯病的 5 公斤婴儿, 这相当于总共 2×10^{14} gc。

[0198] 基于 4×10^{13} gc/kg 的目标人剂量, 在下述剂量评估大鼠: A) 目标剂量; B) $0.1 \times$ 目标剂量和 C) 最大可实现剂量。如果注射体积为 200 μ l 和高级载体可以以 2×10^{13} gc/ml 提供, 并且大鼠为 40g, 那么最大可实现剂量为 2×10^{14} gc/kg。

[0199] 在 7 天、30 天和 180 天时处死大鼠。在输注后 7 天, 由 AAVrh.10-hGALC 输注引起的任何活性感染都可能是明显的; 在 30 天时, 免疫系统被完全重建, 并且任何抗 AAV 或抗转基因反应都是明显的; 并且在 180 天时, 长期效果会很明显。该较长的时间点涉及静脉内 AAV 注射到新生小鼠后肝癌的可能性。

[0200] 实施例 6

[0201] 治疗人的克拉伯病

[0202] 本实施例描述了一项开放 (open label) I/IIa 期研究, 旨在评估患有婴儿克拉伯病的婴儿中静脉基因治疗 (AAVrh.10-hGALC) 加上无关 UCBT 的联合治疗的安全性和临床效果。与疾病相关的结果参数包括一系列标准化神经发育试验 (包括认知和运动技能)、脑 MRI、神经传导研究和腰椎穿刺的结果, 其在基线、治疗后 100 天和之后每 3 个月进行 (总共进行 5 次访问)。该间隔是必要的, 因为这段时间代表婴儿大脑快速生长的时期。将在正式研究期结束后进行至少 5 年的年度随访。

[0203] 基于疾病的罕见性,根据逻辑和实际考虑选择样本量(8名患者)。虽然样本量很小,但这对于罕见疾病来说是典型的。幸运的是,与受试者之间的可变性相比,具有临床意义的效应量是大的。之前对早期诊断为克拉伯病的患者治疗的研究表明,群效应量为1.5-2.0标准差。尽管每组4个受试者是一个小样本,但该研究具有良好的效力(80%)以检测克拉伯病组与具有典型发育的对照儿童之间1.25标准差的差异。成功治疗与自然疾病进程之间预期差异>1.25标准差。然而,为了更好地评估受试者之间的可变性,该研究收集纵向数据,并其通过靴值分析(bootstrap analysis)进行分析。

[0204] 8名患者分为2个剂量组(表4)。四名患者接受最低载体剂量的AAVrh.10-hGALC/UCBT,然后另外4名患者在更高剂量组(cohort)中。第一组给予标准的降低强度的预处理化疗方案和无关系的UCBT(如下所述)。在UCBT后的那天,符合条件的婴儿接受一次表达人GALC cDNA的AAVrh.10的静脉注射并留在医院直到他们脱离输血、移植,并被认为是稳定的。基于未接受AAVrh.10-hGALC的患者,这需要至少4周;因此,在刚基因转移后,此时移植相关的不良事件是最有可能的,在移植单元中每天监测受试者。在大约第30-60天,患者出院并每周进行一次随访。此后每隔3个月,对所述受试者进行综合评估(表5)。在招募随后的受试者之前,跟踪A组中的第一个受试者3个月。

[0205] 表4.联合的静脉内AAVrh.10-hGALC和UCBT的患者组

	群	患者数量	剂量
[0206]	A	4	0.25× 目标剂量
	B	4	目标剂量为 4×10^{13} gc/kg (等待临床前安全研究)

[0207] 在严重免疫抑制的受试者中使用静脉内AAV介导的基因治疗没有先例;因此,这项I/IIa期研究主要关注安全性。结果,该研究在没有同期对照组的情况下进行。然而,已经使用具有相同参数的标准方案进行前瞻性评估的已知婴儿克拉伯病患者显示具有未治疗患者(n=79)和接受UCBT治疗的患者(n=54)中的预期病程。现有数据足以确定在结果参数中所预期的时间依赖性变化,以及这些措施的标准偏差。这允许对用联合疗法治疗的那些患者的疾病进程进行正式的统计评估。

[0208] 无论性别、种族或民族如何,招募8名患者。纳入标准如下:

[0209] 1.基线访问后确诊婴儿克拉伯病、白细胞中半乳糖脑苷脂 β -半乳糖苷酶(GALC)活性 $<0.20\text{nmol/h/mg}$ 蛋白和两种致病性GALC突变。

[0210] 2.筛选时的年龄:1天至12个月。

[0211] 3.神经影像异常、神经传导研究或脑干听觉诱发电位。

[0212] 4.符合无关UCBT。

[0213] 5.患者和/或法定监护人能够遵守临床协议。

[0214] 排除标准如下:

[0215] 1.以前HSCT的历史。

[0216] 2.存在已知临床上显著的心血管、肝、肺或肾疾病或其他医学病症。

[0217] 3.存在严重的先天性异常。

[0218] 4.筛查时的血液检查异常,包括活性感染的体征或活性巨细胞病毒、Epstein-Barr

[0219] 病毒、疱疹病毒或腺病毒的病史。

[0220] 5. 任何其他医学病症、严重的并发症或在PI的意见中,妨碍参与研究的情有可原的情况。

[0221] 6. 在研究招募前30天内使用任何研究产品或目前参加另一项涉及临床研究的研究。

[0222] 7. 患者的父母和/或法定监护人无法理解研究的性质、范围和可能的后果。

[0223] 8. 患者无法遵守方案(即,无法返回进行随访评估或不可能完成研究),如通过PI
[0224] 所确定的。

[0225] 免疫抑制和脐带血移植

[0226] 来自6个HLA中的4-6个-匹配的供体的脐带血移植被认为是症状前或症状最轻的克拉伯病的护理标准。患者接受毒性降低的预处理方案,其降低与移植相关的发病率和死亡率。该化学疗法方案的核心(backbone)是白消安的清髓剂量,其已被用作克拉伯病和许多其他非恶性疾病的护理标准。此外,白消安一直是大多数基因治疗试验中化疗剂的首选。患者接受阿仑单抗(0.5mg/kg)、羟基脲(30mg/kg/天)、氟达拉滨(1mg/kg/天×4天)、白消安(约4mg/kg/天×3天),用他克莫司和霉酚酸酯(MMF)进行GVHD预防。

[0227] 以~12mg/kg施用白消安3天,进行治疗药物监测和剂量调整,以达到850mg/dl的目标稳态浓度。较低的白消安暴露可能导致移植失败,特别是对于脐血移植物,其中输注的CD34+祖细胞剂量和总有核细胞剂量比骨髓移植物低~1个对数。

[0228] 患者接受免疫抑制药物治疗,其包括移植前2天开始静脉注射克莫司(开始于~0.05mg/kg/天)和静脉内MMF。MMF(以45mg/kg/天开始,分成3个剂量)作为我们的标准方案在前28天施用,然后在没有2-4级GVHD的情况下迅速降低。如果耐受的话,在3-4周后转为口服给药。他克莫司(或其替代物环孢菌素A)在移植后的前3-4个月继续使用,然后在没有GVHD的情况下,患者在2-3个月内断奶。免疫抑制疗法的安全性监测包括在前3至4周每天进行血液测试,此后按临床指示进行,直至停止使用他克莫司。安全血液测试包括:全血细胞计数/分类(differential)/网织红细胞,综合代谢检查(comprehensive metabolic panel)和他克莫司水平。根据标准移植方案,继续监测患者的不良事件。

[0229]

表 5. 在移植前进行评价

		0 to 6 mo	> 6 mo
历史与检查	病史、先前治疗毒性、行为状态 (Lansky 或 Karnofsky)、免疫史、身高、体重、BMI、生命体征、年龄 10-18 岁: Tanner 分期	X	X
基础实验室 血液	CBC+Diff、PT/PTT、纤维蛋白原、ABO/Rh、基本代谢检测、肝功能试验、肾小球功能 仅限有月经的女性: 血清 β -hCG	X	X
传染病 血液 实验室	抗体滴度: HBsAg、HBe、HCV、HIV/HCV/HBV NAT IDS、WNV NAT IDS、HIV I/II、HTLV I/II、CMV、T. cruzi、梅毒(syphilis) 筛选、EBV、VZV、HSV、弓形虫 (Toxoplasma)、ADV, 通过 PCR 检测 <hr/> EBV PCR、VZV PCR、HSV PCR、CMV PCR	X	X X (如果接受 IVIG) X
传染病 (NP 拭子) 呼吸道 实验室	呼吸道病毒检测	X	
传染病 粪便 实验室	通过 PCR 检测的 ADV、通过 PCR 检测的 Norovirus、通过 PCR 检测的 C. diff	X	
分子测试 血液	<hr/> 仅限 PID 患者: Ova & Parasites 用于嵌合体的 DNA (例如, STR 测定)、HLA 分型、群体反应性抗体 (PRA) 超声心动图、EKG、肺功能测试	X	X
器官研究 成像	胸部 X 光; CT 脑、鼻窦、胸腹部、骨盆 除辐射 - 敏感染色体断裂综合征 (例如, 先天性角化不良) 的患者外具有: 大脑、鼻窦、胸部、腹部、骨盆的 MRI	X	X

[0230]

药物水平	血液	阿仑单抗水平 - 在施用前	X
		阿仑单抗水平 - 第 0 天	X
研究性学习	血液	免疫重建 样品: 绿顶管中的 2 mL 血液, 不超过 1 mL/kg 其他研究免疫研究 (免疫恢复, 特异性病毒免疫性) 样品: 绿顶管中的 2 mL 血液 (可与上面共用)	X
神经发育评估		行为测听法、脑干听觉诱发反应、视觉诱发电位、Mullen 早期学习量表、GMFm、眼科检查 CSF 蛋白、脊柱 MRI、神经传导速度、EEG、突变分析、GALC 酶水平	X

[0231] 移植后,评估以下内容:

[0232] 1. CBC-从第0天直到中性粒细胞移植每周三次,然后每周两次直到第28天和每周

一次直到第12周。网织红细胞计数每周进行一次,与CBC一起进行。

[0233] 2.基本代谢检测和肝功能测试-每周两次直到第28天,然后每周一次直到第12周。

[0234] 3.腺病毒-阿仑单抗后每周进行血液PCR两次,直到第+50天或移植后出院(以较早者为准);然后每周进行血液PCR直到第100天。

[0235] 4.CMV:那些之前没有病毒暴露的人-每周进行血液PCR直到第100天;怀疑/证实有CMV暴露的人:在阿仑单抗后每周进行血液PCR两次,直到第+50天或移植后出院(以较早者为准);然后每周进行血液PCR直到第100天。

[0236] 5.EBV PCR-在阿仑单抗后每两周一次直到第100天。

[0237] 6.GVHD评级-每周直到第100天。

[0238] 其他细节在表6中提供。

[0239]

表 6: 移植后过程

	wk1	wk2	wk3	wk4	wk5	wk6	wk7	wk8	wk9	wk10	wk11	wk12 3mo	6mo	9mo	12mo	24mo
身体检查 ¹				1mo				2mo				100天	180天	270天	365天	730天
GVHD 评级	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
CBC、网织红细胞计数 ²	2-3x	2-3x	2-3x	2-3x	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
BMP、LFT、总蛋白、白蛋白 ²	2x	2x	2x	2x	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
甲状腺功能测试																
性腺功能 ³																
通过 PCR 检测的 CMV、腺病毒(关于频率参见正文)	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
通过 PCR 检测的 EBV		X		X		X		X		X		X		X		X
嵌合体研究 ⁴				X				X		X		X		X		X
免疫重建研究				X				X		X		X		X		X
体液免疫研究				X				X		X		X		X		X
成像研究 ⁵												X (可选的)	X	X (如果 d180 是异常的)	X	X
器官毒性 ⁶				X				X				X	X		X	X

1 包括身高、体重、OFC (患者 <2 yr)

2 CBC 与分类、基本代谢检测、总蛋白和白蛋白的肝功能测试。网织红细胞计数与 CBC 一起每周进行一次。

3 FSH、LH、雌二醇、睾酮 (年龄和性别特异性的)

4 总嵌合体以及骨髓和淋巴结; 通过 RFLP 检测。在移植时或到第 30 天时进行初步评估。

5 胸部 X 光; 超声心动图、EKG、肺功能检查。疾病特异性第 100 天成像研究是可选的; 咨询神经发育障碍或为所需研究提供服务。如果第 180 天测试异常或如果有临床指征, 则在第 270 天获得研究。

6 NCI CTCAE 3.0 版本

[0240] 静脉通路-对所有患者而言,水化、化学疗法、全胃肠外营养、血液制品输注、抗生素、血液实验室抽取等都需要延长中心静脉通路。两个双腔导管(例如,Broviac)是优选的

但是三腔导管是可接受的。

[0241] 输血依赖性贫血患者：

[0242] 输血-患者将在移植前至少输血4周至目标血红蛋白>12g/dL(对于地中海贫血患者),目标为9-12g/dL(对于患有镰状细胞病的患者)。

[0243] 螯合治疗-正在进行慢性输血治疗和有证据证明铁超负荷(铁蛋白>1000ng/mL)的患者在移植前接受至少4周的螯合治疗,使用去铁胺(20-100mg/kg/天)每晚SC或IV连续输注12小时或口服地拉罗司(Exjade)。

[0244] 移植预处理方案(Transplant Preparative Regimen)

[0245] 以30mg/kg的单日剂量口服给予羟基脲,调整至最接近的药丸大小。对于<750细胞的ANC,鼓励使用5mcg/kg(max 300mcg)的PRN G-CSF。如果虽然使用G-CSF,ANC降至<500细胞/ μ L,则采用羟基脲。

[0246] 根据现行的机构指南给予阿仑单抗。在第-10天或第-9天,以0.5mg/kg/剂给予单剂量的阿仑单抗。根据机构指南给予适当的术前用药。如果患者在阿仑单抗输注期间或之后发烧>38.5°C,抽取血液培养物并添加抗生素覆盖范围。

[0247] 在第-9至-5天,IV给予氟达拉滨,剂量为30mg/m²/剂(或1mg/kg/剂,以较低者为准)每日1小时x 5剂。

[0248] 给药

[0249] 校正理想体重(MBW)用于体重>理想体重(IBW)的125%的肥胖患者。IBW以千克计算(来自CHP儿科药物治疗手册(CHP Pediatric Drug Therapy Handbook)):儿童(1-2年):<60英寸:IBW=(身高²[以cm为单位]x 1.65)/1000;>60英寸:男性:IBW=39+(2.27x身高,以英寸为单位,超过5英尺),女性:IBW=42.2+(2.27x身高,以英寸为单位,超过5英尺)。校正IBW(AIBW)从实际体重(ABW)计算:AIBW=IBW+[(0.25)x(ABW-IBW)]

[0250] 脐带血选择和输注

[0251] 基于HLA(在6个HLA中最少有4个在等位基因水平HLA-DRB1分型上匹配)、总有核细胞剂量(最小 3.0×10^7 /kg AIBW)、CD34+祖细胞剂量(最小 1.5×10^5 /kg AIBW)和影响效力的其他因素(例如,遗传性酶缺陷患者的酶活性)选择最佳可用单元。UCB单元被解冻,并在稀释或不稀释的情况下被输注。不超过5%的解冻脐血或活体的无关供体骨髓移植在第0天重新冷冻,以便日后输注。所有产品被辐照,以降低移植抗宿主病的风险。此外,所有产品都是CMV安全的(可能含有CMV的白细胞已被除去)并被过滤以耗尽红细胞和白细胞以降低HLA抗体形成的发生率。患者接受红细胞和血小板输注。

[0252] 在第+1天开始以每天5mcg/kg/剂IV或SC给予粒细胞集落刺激因子(G-CSF),并持续直至ANC \geq 2,000。此后,基于个体患者状况确定G-CSF的剂量调整终止。当口服摄入显著降低并且一旦口服摄入改善后逐渐减少/停止时(由医生决定),开始全胃肠外营养(TPN)和脂肪乳剂的静脉营养。在IV营养期间将密切监测肝功能,蛋白质/白蛋白和甘油三酯水平。

[0253] GVHD

[0254] 对于预防,患者接受他克莫司和霉酚酸(MMF/cellcept)用于GVHD预防。IV他克莫司的连续输注或Q12h给药在第-2天开始,并且一旦患者耐受PO摄入,可以转换为口服。连续输注的他克莫司水平每周用LC/MS方法监测至少三次,目标为12-15ng/ml稳态水平。在Q12h间歇给药的情况下,目标通过水平(the target through levels)在8-10ng/ml之间。从第-

2天开始每隔8小时在2小时内IV给予霉酚酸(15mg/kg/dose)直至第28天,在没有2-4级急性GVHD的情况下在下一周断奶。如果担心毒性或活性病毒感染和/或延迟淋巴细胞恢复,可能会发生MMF的早期断奶或更低目标范围的他克莫司。

[0255] 急性GVHD的诊断和治疗基于反映当前BMT CTN指导的现行机构指南。慢性GVHD的诊断基于临床和/或组织病理学数据和当前的标准诊断标准。

[0256] 感染

[0257] 在预处理(conditioning)之前,所有患者应该没有任何皮肤或粘膜感染。除非存在禁忌,否则在移植前获得脑、鼻窦、胸部、腹部和骨盆的CT扫描以筛查隐匿性感染,在这种情况下进行替代成像。所有患者都接受葡萄糖酸氯己定浴(洗必泰)。监测患者的便秘,特别是如果接受麻醉剂,大便软化剂将按照指示开始。所有患者被安置在带有HEPA过滤的私人房间。

[0258] 患者(除非对磺胺类药物过敏)接受使用磺胺甲恶唑-甲氧苄啶(Bactrim)预防卡氏肺孢子虫肺炎(Pneumocystis (carinii) jiroveci pneumonia,PCP);这在预处理期间开始。除非存在临床禁忌,戊烷脒或合适的替代品开始于第+28天,直到发生免疫重建(不存在全身性类固醇时CD4+T细胞>300细胞/mm³)。戊烷脒可改为口服Bactrim或替代口服PCP预防。

[0259] 由于感染或暴露和/或有鸡痘感染史而具有阳性HSV和/或VZV血清学的患者接受阿昔洛韦IV。当耐受PO摄入时,阿昔洛韦可能会变为口服。如果患者接受更昔洛韦、膦甲酸或西多福韦,除非采用联合方法,否则不必也给予阿昔洛韦。在没有全身性类固醇和临床显著水平的其他全身性免疫抑制剂的情况下,持续预防直至CD4+T细胞>250个细胞/mm³。除非这些药物的不良反应需要停药,否则预计在移植后6个月之前不会停止预防。

[0260] 如果没有先前HSV/VZV感染或暴露的临床证据,则以下患者不需要HSV/VZV预防,例如阳性血清学是由于使用HSV/VZV PCR为阴性的IVIG导致的;小于6个月的患者的阳性血清学是由于IgG的母体转移而导致的但HSV/VZV PCR为阴性;或由于免疫接种而导致的血清学阳性。

[0261] 可以治疗在招募时患有HSV/VZV病毒血症或在移植前患有病毒血症的患者。

[0262] 在唾液、尿液或其他部位中具有阳性CMV血清学或可检测的病毒但没有可检测到的病毒血症的患者在预处理期间从第-12天到第-2天以维持剂量(通常每天5mg/kgIV)接受更昔洛韦或其他CMV特异性疗法,然后是每8小时接受阿昔洛韦500mg/m² IV,从第+1天开始至第+100天,就对肾功能不全者进行剂量进行调整。每日膦甲酸(90mg/kg/天)可以被替代。那些在移植前有CMV病毒血症的人可以在脐血输注前和期间接受适当的抗CMV治疗。如果没有先前CMV感染或暴露的临床证据,则以下患者不需要进行CMV预防,例如:阳性血清学是由于使用CMV PCR为阴性的IVIG导致的,小于6个月的患者的阳性血清学是由于IgG的母体转移所导致的但CMV血液PCR为阴性或从唾液或尿液进行的其他诊断研究导致的。

[0263] 患者根据临床适当剂量和时间表从第+1天开始接受真菌预防。预防最初包括卡泊芬净(caspofungin),然后在出院到具有目标治疗水平的门诊之前转变为伏立康唑(voriconazole)。

[0264] 根据以下时间表,患者接受IVIG作为一般免疫预防:

[0265] 第-15天至移植后第+55天:每2周

[0266] 移植后第+55天后：监测血清IgG水平q2-3周并用IVIG补充以使IgG保持在750mg/dL以上。继续补充IgG直至IgA水平正常并且CD4 T细胞计数超过200/uL。

[0267] 患者根据临床适当剂量和时间表接受左氧氟沙星或适当替代品的细菌预防，由医生决定开始并持续直到移植。这在发生中性粒细胞减少伴发热(neutropenic fever)时开始使用广谱抗生素时进行。

[0268] 在阿仑单抗(alemtuzumab)后，开始每周用CMV PCR监测患者，其他的如临床指示。对于任何值的确认的阳性定量PCR和/或记录有CMV疾病的患者，开始治疗。一线治疗由以下组成：每12小时施用更昔洛韦5mg/kg/剂(IV)持续14天或直至CMV PCR阴性或下降至可接受的水平或患者的临床症状已解决，以较长者为准。如果患者保持显著的免疫抑制，维持治疗将由每天施用更昔洛韦5mg/kg/剂(IV)持续14天或更长时间组成。对于10-14天后没有临床改善或如果保持高PCR滴度或PCR滴度增加的患者，应考虑更昔洛韦抗性和二线治疗。应密切监测患者的骨髓抑制和肾功能不全的副作用。可以在移植之前或有临床指征时使用膦甲酸或西多福韦。

[0269] 新发热患者(定义为温度 $\geq 38.5^{\circ}\text{C}\times 1$ 或 $\geq 38^{\circ}\text{C}\times 2$ [2小时内服用])应进行彻底的身体检查，并从所有中心导管口获得血培养。其他测试根据临床指征进行，但可包括胸部x-光或其他成像研究、尿培养、咽喉或口腔培养、病毒研究(鼻咽拭子)和分子研究(CMV、腺病毒、BK病毒等)。如果出现临床变化，伴有持续发烧时每24小时或更频繁地重复血培养。在获得培养物后立即开始使用经验性广谱抗生素。一线抗生素包括哌拉西林-他唑巴坦75mg/kg/剂(如哌拉西林，最大剂量3000mg) IV(每6小时一次)和万古霉素15mg/kg/剂IV(每6-8小时一次)。经常监测万古霉素谷浓度，目标为8-12mg/L。对青霉素或万古霉素过敏的患者可以采用适当的替代物。根据临床反应和细菌病原体的鉴定来调整抗生素。对于发热超过3天的患者，考虑经验性抗真菌疗法(包括霉菌覆盖范围)。抗生素一直持续直到退烧和ANC >500 持续至少3天。

[0270] VOD的预防和管理

[0271] 患者接受低剂量肝素来预防静脉闭塞病(VOD)。这从第-9天至第+28天或直至出院时连续输注100单位/kg/24小时。尽可能接近基线施用脱氧熊胆酸(ursodiol)，在高胆红素血症、疼痛性肝肿大、腹水、液体潴留的患者中怀疑患有VOD。一般治疗措施包括密切监测和校正液体不平衡。如果需要，鼓励使用适当剂量的袪利尿剂(loop diuretics)Q6-12h。可以用去纤苷(defibrotide)治疗严重的VOD。

[0272] 移植失败的植入和管理评估：定义(根据IMBTR Manual for Clinical Research Professionals, 2003年)：中性粒细胞植入-在不同天连续三天测试的中性粒细胞 $\geq 0.5 \times 10^3/\mu\text{L}$ ；血小板植入-血小板计数 $\geq 20,000/\mu\text{L}$ ，在之前的7天中没有血小板输注；供体细胞植入-第+28天 $\geq 50\%$ 供体细胞；移植失败-原发性失败定义为在至少间隔1周的两次研究中到第+42天时缺乏中性粒细胞植入(如上所述)或者到第+100天时外周血或骨髓中 $<10\%$ 供体细胞。二次失败定义为先前实现植入后失去植入(根据上述标准)。

[0273] 在大约第+41-44天没有中性粒细胞植入证据的患者中，进行骨髓涂片和活组织检查以评估嵌合体。移植失败的一般评估包括嵌合体的骨髓涂片和活组织检查、细胞遗传学等；除其他研究(如果指出的话)之外，包括CMV、EBV、细小病毒和HHV-6的微生物研究(骨髓和血液)；和嵌合体外周血检查。

[0274] 移植失败/排斥的初始治疗包括生长因子的支持和骨髓抑制药物治疗的终止。随后的移植被考虑用于没有供体植入证据或有与血细胞减少症相关的显著后果的患者。保留的供体UCB等分试样的输注可能是合适的。

[0275] 载体施用

[0276] AAVrh.10-hGALC剂量取决于上述动物功效和安全性研究的结果。从小鼠到人的放大基于相同的基因组拷贝每千克体重 (gc/kg)。最大剂量约为 4×10^{13} gc/kg, 在UCBT后1天给予。将使用两个剂量组, 每组具有n=4受试者, 从该目标剂量的0.25倍开始, 然后使用目标剂量。

[0277] 临床级载体在符合GMP标准的洁净室设施中生产, 并进行如表3所述的批签发测试。监测所述载体以确保其在临床研究期间保持稳定 (例如, 通过测定GALC酶活性)。

[0278] 将缓冲等渗盐水中的载体以所需剂量推动 (1ml/分钟) 通过中心线来施用该载体, 所述中心线的存在是用于管理脐血移植。这可能是10ml输注。

[0279] 随访

[0280] 按照表7中所示进行个体患者评估。在基线访问后约3、6、9和12个月进行其他患者评估。

[0281] 表7. 疾病相关过程的时间表

过程	访问 1	给药访问 ¹	访问 2 90 天	访问 3 182 天	访问 4 273 天	访问 5 365 天
PI/知情同意	•					
姓名缩写和出生日期	•					
人口统计信息	•					
病史/系统综述	•	•	•	•	•	•
纳入/排除标准	•					
家族史 (一级亲属)	•					
过去的临床调查	•					
药物治疗	•	•	•	•	•	•
身体和神经系统检查	•	•	•	•	•	•
生命体征	•	•	•	•	•	•
脑 MRI	•		•	•	•	•
脊椎穿刺/脑脊髓蛋白和探索性生物标志物	•		•	•	•	•
神经传导速度	•		•	•	•	•
视力和听力检查	•		•	•	•	•
体重、身高和头围	•		•	•	•	•
基因分型和酶测试	•					
Mullen 早期学习量表	•		•	•	•	•
抽血用于免疫/感染研究	•	•	•	•	•	•
Peabody 运动发育量表	•		•	•	•	•
临床化学 (血液)	•	•	•	•	•	•
GALC 活性 (血液和脑脊液)	•	•	•	•	•	•
抗 AAV 抗体	•	•	•	•	•	•
抗 AAV 酶联免疫斑点 (ELISPOT)	•		•	•	•	•
通过 PCR 对血液、尿液、粪便和唾液进行脱落分析 (Shedding analysis)	•	•				

[0283] ¹在给药AAVrh.10载体后,在1、2、4和8周进行收集/评估。额外抽取血液以监测免疫抑制,每周两次持续2周,每周一次持续另外2周,并且如果是稳定和治疗性的,则接下来的4个月每月一次。

[0284] 访问1-基线评估 (PRE-UCBT)

[0285] 在基线时为所有患者收集以下数据:

[0286] 1. 患者的姓名首字母,出生日期和唯一的患者ID号。

[0287] 2. 人口统计信息。

[0288] 3. 重要的病史,包括既往诊断、疾病、药物治疗、手术 (procedures) 和外科手术 (surgeries)。

[0289] 4. 以下临床研究的结果 (如果先前进行的话): 脑MRI、神经传导研究以及克拉伯病

的遗传和/或生化检测。如果在父母/法定监护人签署知情同意书进入研究的3个月内进行基线测试,则基线测试有效。

[0290] 5. 在基线访问时进行以下检查:脑MRI、脊椎穿刺、神经传导研究、以及视力和听力检查。

[0291] 6. 所有当前用药和施用频率的清单。

[0292] 7. 身体和神经系统检查,包括生命体征(血压、脉搏、身高,体重和头围)。

[0293] 8. 询问父母和/或法定监护人有关患者的家族史(一级亲属),以确定是否有任何其他家庭成员已被诊断患有克拉伯病或有该病的临床体征和症状(但尚未确诊)。

[0294] 9. Mullen早期学习量表和Peabody运动发育量表的结果。

[0295] 10. 蛋白质和白细胞计数的基线脑脊液(CSF)收集以及GALC活性。将其余部分存档用于将来生物标记物评估。

[0296] 11. 基线血液采集用于临床化学和抗AAV抗体和GALC活性的测量。

[0297] 12. 基线血液采集以测量针对AAVrh.10和GALC的T细胞应答。

[0298] 13. 样品的基线收集用于载体脱落分析(血液、粪便、尿液和唾液)。

[0299] 在第1天进行神经发育评估。在第2天进行医疗/诊断测试。

[0300] 第一天 神经发育评估

[0301] 1. 病史和伴随疾病回顾

[0302] 2. 所有当前用药和施用频率的清单

[0303] 3. 听力检查(由听觉专家进行)。

[0304] 4. 身体和神经系统检查,包括生命体征(血压、脉搏、身高,体重和头围)

[0305] 5. 早期学习和Peabody运动发育量表的Mullen量表的施用

[0306] 第二天 医学和诊断测试

[0307] 1. 脑MRI

[0308] 2. 脊椎穿刺

[0309] 3. 神经传导速度研究

[0310] 4. 抽血

[0311] 5. 尿液、粪便和唾液收集

[0312] 第三天 UCBT评估和准备UCBT。在相对于UCBT的第+1天注射载体。

[0313] 在载体施用后的第1、2、4和8周,如下进行样品收集:

[0314] 1. 采集血液用于临床化学、抗AAV中和抗体检测、载体脱落分析和GALC活性

[0315] 2. 收集尿液、粪便和唾液用于载体脱落分析

[0316] 访问2 (UCBT和AAVrh.10-hGALC后第90±5天)

[0317] 访问在2天内进行,并包括:

[0318] 第一天 神经发育评估

[0319] 1. 临时病史和伴随疾病回顾

[0320] 2. 自上次访问以来所有当前用药和施用频率的清单

[0321] 3. 视力和听力检查(由听觉专家进行)

[0322] 4. 身体和神经系统检查,包括生命体征(血压、脉搏、身高,体重和头围)

[0323] 5. 早期学习和Peabody运动发育量表的Mullen量表的施用

- [0324] 第二天 医学和诊断测试
- [0325] 1. 脑MRI
- [0326] 2. 脊椎穿刺
- [0327] 3. 神经传导研究
- [0328] 4. 使用血液样品的临床化学测定
- [0329] 5. 使用ELISPOT针对抗AAV和抗GALC T细胞应答收集血液
- [0330] 访问3(180天±1个月)
- [0331] 访问在2天内进行,并包括:
- [0332] 第一天 神经发育评估
- [0333] 1. 临时病史和伴随疾病回顾
- [0334] 2. 自上次访问以来所有当前用药和施用频率的清单
- [0335] 3. 视力和听力检查(由听觉专家进行)
- [0336] 4. 身体和神经系统检查,包括生命体征(血压、脉搏、身高,体重和头围)
- [0337] 5. 早期学习和Peabody运动发育量表的Mullen量表的施用
- [0338] 第二天 医学和诊断测试
- [0339] 1. 脑MRI
- [0340] 2. 脊椎穿刺
- [0341] 3. 神经传导研究
- [0342] 4. 使用血液样品的临床化学测定
- [0343] 5. 通过ELISPOT针对抗AAV和抗GALC T细胞应答收集血液
- [0344] 访问4(270天±1个月)
- [0345] 访问在2天内进行,并包括:
- [0346] 第一天 神经发育评估
- [0347] 1. 临时病史和伴随疾病回顾
- [0348] 2. 自上次访问以来所有当前用药和施用频率的清单
- [0349] 3. 视力和听力检查(由听觉专家进行)
- [0350] 4. 身体和神经系统检查,包括生命体征(血压、脉搏、身高,体重和头围)
- [0351] 5. 早期学习和Peabody运动发育量表的Mullen量表的施用
- [0352] 第二天. 医学和诊断测试
- [0353] 1. 脑MRI
- [0354] 2. 脊椎穿刺
- [0355] 3. 神经传导研究
- [0356] 4. 使用血液样品的临床化学测定
- [0357] 5. 通过ELISPOT针对抗AAV和抗GALC T细胞应答收集血液
- [0358] 5.5访问5(360天±1个月)
- [0359] 访问在2天内进行,并包括:
- [0360] 第一天 神经发育评估
- [0361] 1. 临时病史和伴随疾病回顾
- [0362] 2. 自上次访问以来所有当前用药和施用频率的清单

- [0363] 3.视力和听力检查(由听觉专家进行)
- [0364] 4.身体和神经系统检查,包括生命体征(血压、脉搏、身高,体重和头围)
- [0365] 5.早期学习和Peabody运动发育量表的Mullen量表的施用
- [0366] 第二天 医学和诊断测试
- [0367] 1.脑MRI
- [0368] 2.脊椎穿刺
- [0369] 3.神经传导研究
- [0370] 4.使用血液样品的临床化学测定
- [0371] 5.通过ELISPOT针对抗AAV和抗GALC T细胞应答收集血液
- [0372] 评估方法的细节
- [0373] 身体和神经系统检查。完整的身体检查(包括对一般外观、皮肤、头部、眼睛、耳朵、鼻子、喉咙、淋巴结、心脏、肺部、腹部、四肢/关节和臀部的评估)在基线阶段和表7中规定的时间各进行一次。测量身高或长度(cm,仰卧在标准测量板上)、体重(kg,不穿鞋或尿布,如果潮湿的话,穿着最轻的衣服)和头围(cm,标准枕骨前额)。这些与自然历史数据进行比较,以评估潜在的不良反应和治疗功效。
- [0374] 扩展的神经系统检查包括评估肌肉张力和反射以及神经发育功能。
- [0375] 生命体征。测量收缩压和舒张压(mm Hg)和心率(次/分钟)。
- [0376] 脑脊液生物标记物。在症状前克拉伯病患者中检测到CSF蛋白水平升高,其中25例接受腰椎穿刺的儿童中有23例(92%)显示CSF蛋白升高(Escolar等,N Engl J Med.352(20):2069-81,2005)。在该实例中,收集CSF来评估髓鞘完整性的生物标志物。此外,进行常规CSF分析,包括细胞计数、蛋白质测定、葡萄糖、白蛋白和IgG。通过评估CSF IgG浓度与血清白蛋白浓度之间的关系来确定血脑屏障的完整性。可以估计白蛋白比值(AQ)来评估血脑屏障的渗透性($AQ = \text{CSF白蛋白} / \text{血清白蛋白} \times 100$)。通过测量CSF IgG/血清白蛋白比来计算鞘内IgG产生,其应小于0.27mg/dl。IgG指数是CSF IgG和血清白蛋白的产物与血清IgG和CSF白蛋白的产物的比。IgG指数的增加(>0.70mg/dl)反映了CNS中免疫球蛋白合成的增加,并且被认为反映了CNS中的感染性病症和炎性病症。还评估CSF中的GALC活性。
- [0377] 载体脱落。通过qPCR评估载体施用后血液、尿液、粪便和唾液中所述载体的存在。
- [0378] 安全实验室。定期对收集的血液进行临床化学分析,以监测任何潜在的不良反应。由于GALC过表达和/或细胞毒性T细胞应答,监测肝酶(天冬氨酸转氨酶、丙氨酸转氨酶)的潜在肝毒性。
- [0379] 免疫应答。在基线和注射后每3个月收集全血以测量针对AAVrh.10和GALC的T细胞应答。分析血浆或血清以监测注射后第1、2、4和8天以及3、6、9和12个月针对AAVrh.10的抗体产生。
- [0380] 脑MRI。每位患者都进行MRI检查(即大脑的扩散张量成像)。脑MRI目前提供了评估克拉伯病患者中髓鞘疾病(myelin disease)的最佳替代结构标志物(Escolar等,Am J Neuroradiol.30(5):1017-21,2009)。对照儿童和克拉伯病患者的脑MRI由经验丰富的神经放射学家使用修正的Loes评分系统进行视觉评分,该系统专门用于监测接受无关UCBT的克拉伯病患者的疾病进程(Provenzale等,Ann N Y Acad Sci.1064:220-9,2005,Provenzale等,Am J Roentgenol. 192(1):59-65,2009)。近年来,扩散张量成像已经成为研究发育中

大脑的白质病理学和评估有脱髓鞘病症的婴儿中轴突结构和髓鞘形成的选择方式 (Escolar等, *Am J Neuroradiol.* 30(5):1017-21, 2009, Gupta等, *Neuroimage Clin.* 26;7:792-8, 2014)。使用扩散张量纤维束成像, 与年龄和性别匹配的对照相比, 可以以标准偏差定量和测量髓鞘破坏。

[0381] 神经传导速度研究(感觉与运动神经)。患有克拉伯病的婴儿在疾病进程的早期就有周围神经病变, 随着疾病的进展神经传导速度变得更差 (Escolar等, *N Engl J Med.* 352(20):2069-81, 2005; Escolar等, *Pediatrics.* 118(3):e879-89, 2006), 导致肌肉无力。对克拉伯病有丰富经验的神经生理学家进行这项测试。

[0382] 神经传导速度(NCV)、振幅(AMP)和远端潜伏期(DL)研究使用常规技术进行。对于运动神经, NCV、AMP和DL在正中神经和腓神经中测量。如果在这些神经中的任何一个在基线都不能产生相关信号, 那么尺神经、胫神经或两者也在基线进行评估。根据重复评估中可获得的响应选择手臂中的神经和腿中的神经。对于感觉神经, DL, NCV和AMP在正中神经和腓肠神经中测量。

[0383] 神经发育功能。神经发育评估及其在克拉伯病纵向研究中的应用已被广泛发表 (Escolar等, *N Engl J Med.* 352(20):2069-81, 2005; Escolar等, *Pediatrics.* 118(3):e879-89, 2006; Escolar等, *Lysosomal Storage Dis.* 6(3):71-9, 2006; Martin等, *Acta Paediatr Suppl.* 97(457):69-75, 2007)。选择具体的评估工具以反映克拉伯病患者相对于正常对照组的认知、语言和运动发育的标准化测量。

[0384] 生长速度。测量身高、体重和头围以评估生长速度。体重指数根据体重和身高计算。

[0385] Mullen早期学习量表。Mullen量表可用于达68个月的婴儿和儿童。T-评分, 百分位和年龄当量评分(age-equivalent score)可以分别针对四个量表(视觉接受、精细运动、表达语言和接受性语言)进行计算。评估幼儿的非语言能力水平对于估计总体发育非常重要。由受过婴幼儿临床评估训练的心理测量学家进行测试。年龄当量评分用于跟踪一段时间内的发育情况并在不同测试之间进行比较。

[0386] Peabody运动发育量表。Peabody量表采集某些项目的定量和定性能力, 增加儿童疾病进展时或在恢复期间对运动模式改变的敏感性。图4显示使用上述工具用无关UCBT治疗的个体患者的轨迹的例子 (Escolar等, *N Engl J Med.* 352(20):2069-81, 2005)。图4是移植无关脐带血并用上述工具进行测试的个体患者的轨迹的例子。彩色的线显示无症状或最小症状患者的发展。黑线表示在显著症状后移植的患者。有症状患者的轨迹类似于未经治疗的患者。

[0387] 鉴于可以应用本公开原理的许多可能实施例, 应该认识到, 所示实施例仅是本发明的实例, 不应被视为限制本发明的范围。相反, 本发明的范围由以下权利要求限定。因此, 声称所有在这些权利要求的范围和精神内的都属于本发明。

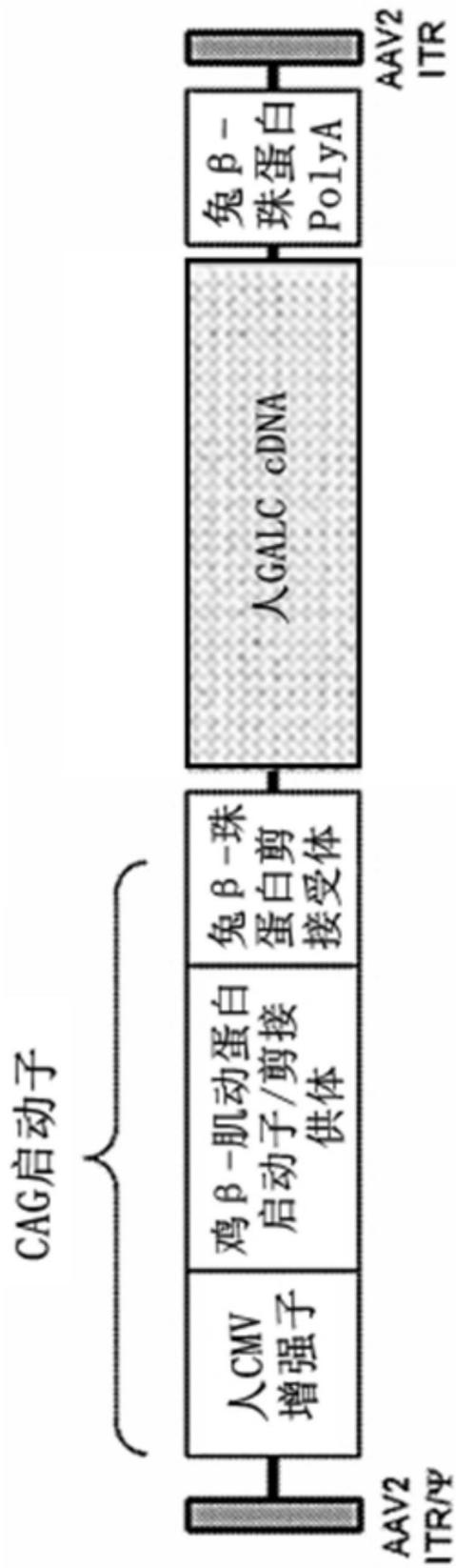


图1

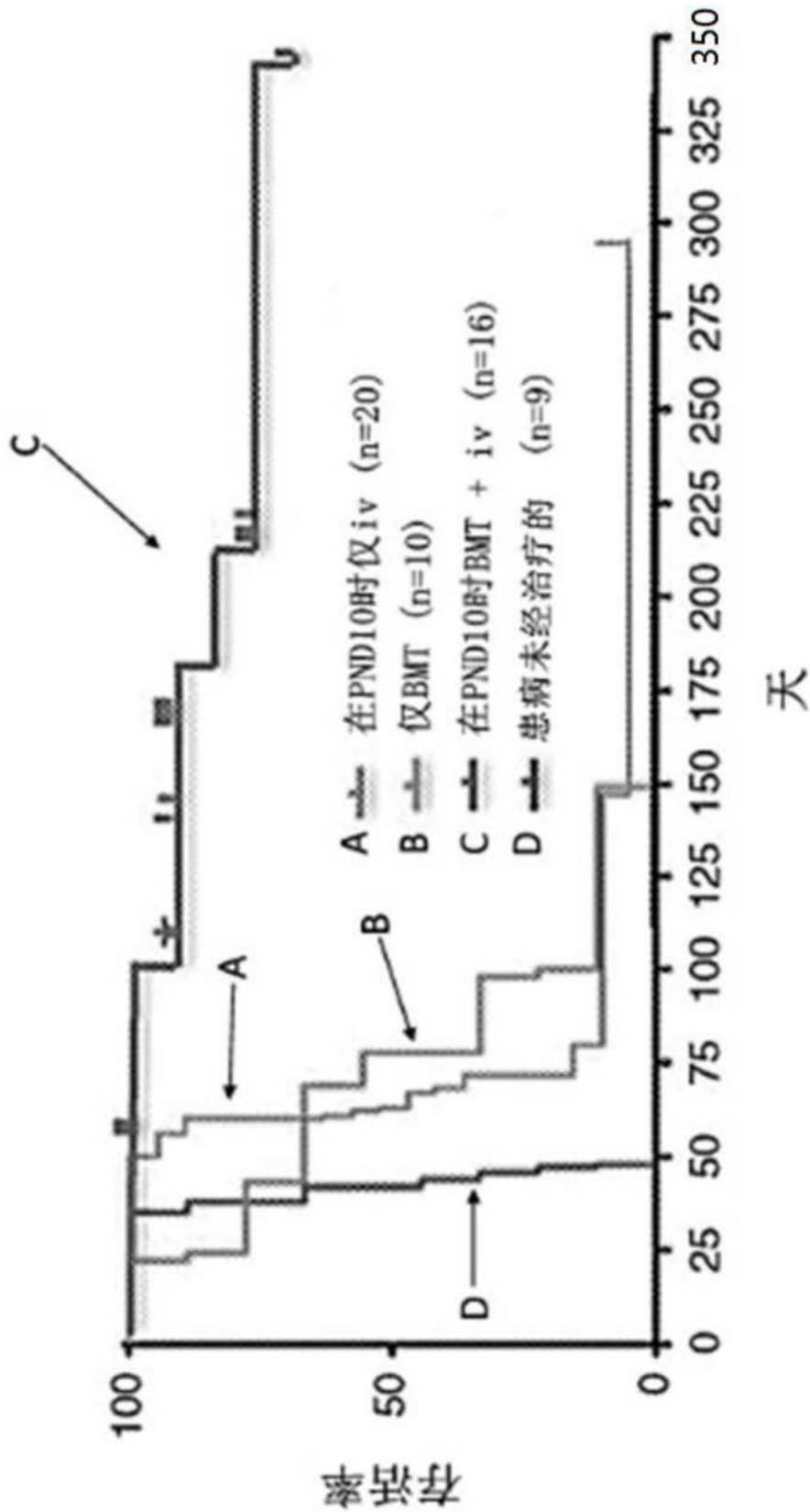


图2

野生型

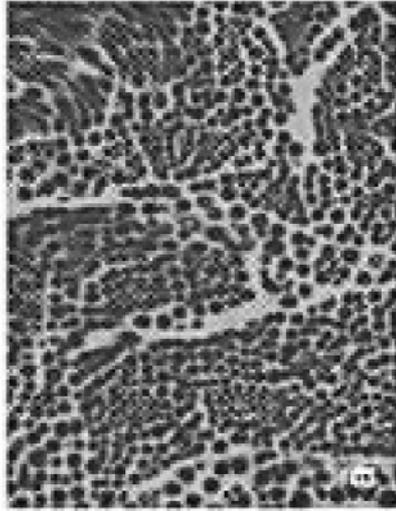


图3A

患病未经治疗的

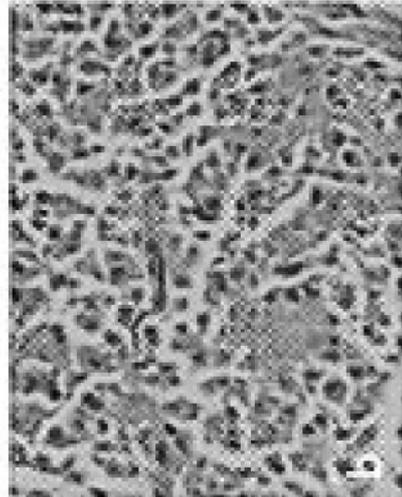


图3B

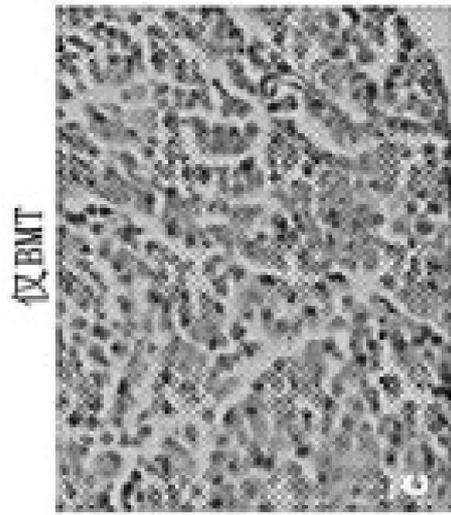


图3C

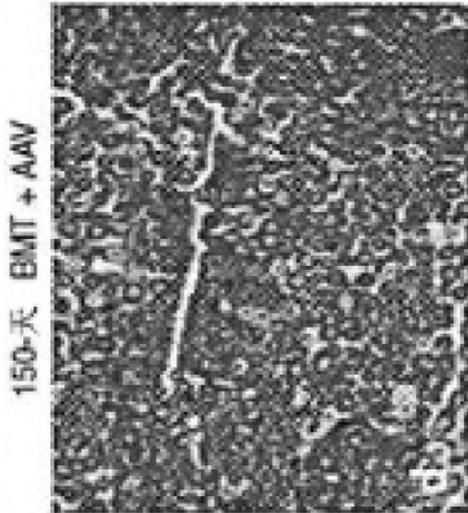


图3D

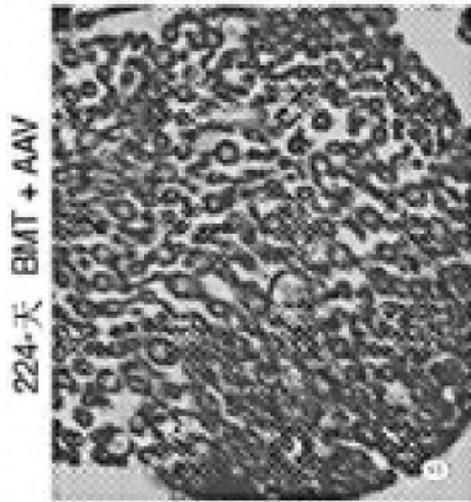


图3E

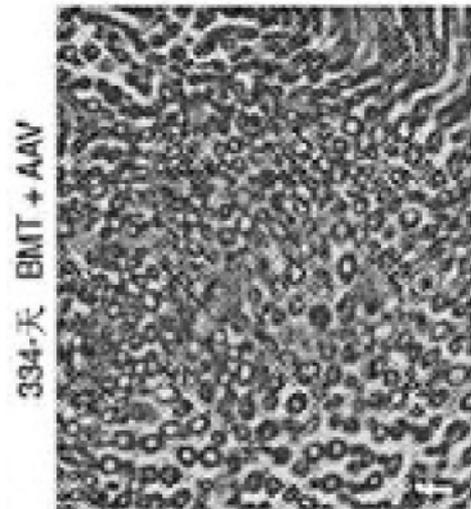


图3F

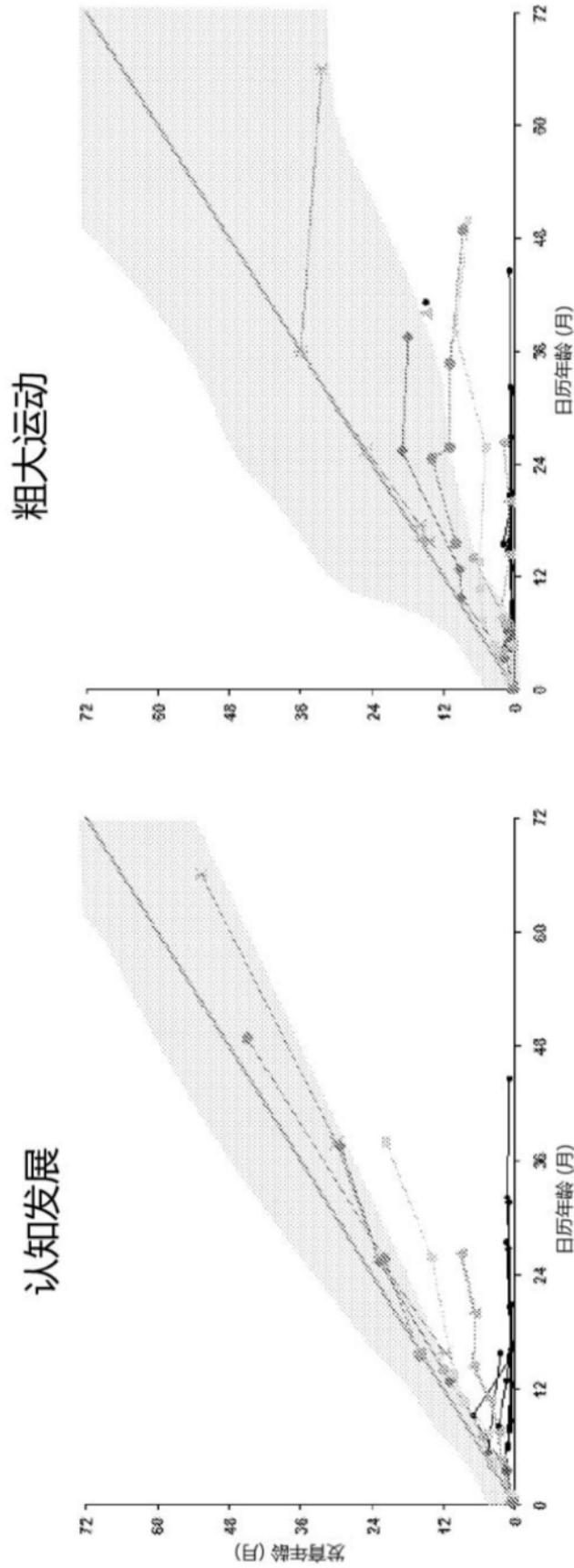


图4