

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7576754号
(P7576754)

(45)発行日 令和6年11月1日(2024.11.1)

(24)登録日 令和6年10月24日(2024.10.24)

(51)国際特許分類	F I		
A 6 1 K 35/28 (2015.01)	A 6 1 K 35/28	Z N A	
A 6 1 P 7/06 (2006.01)	A 6 1 P 7/06		
A 6 1 K 38/17 (2006.01)	A 6 1 K 38/17		
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00		

請求項の数 7 (全64頁)

(21)出願番号	特願2020-555511(P2020-555511)	(73)特許権者	521067485
(86)(22)出願日	平成31年4月11日(2019.4.11)		スペースクラフト セブン リミテッド
(65)公表番号	特表2021-521180(P2021-521180 A)		ライアピリティ カンパニー
(43)公表日	令和3年8月26日(2021.8.26)		アメリカ合衆国 0 8 5 1 2 ニュージャ ージー州 クランベリー シダー ブルック ドライブ 9
(86)国際出願番号	PCT/US2019/027083	(73)特許権者	519080791
(87)国際公開番号	WO2019/200167		フンダシオン パラ ラ インベスティガ シオン バイオメディカ デル オスピタル インファンティル ウニベルシタリオ ニ ーニョ ヘスス
(87)国際公開日	令和1年10月17日(2019.10.17)		スペイン王国 2 8 0 0 9 マドリード アベニーダ メネンデス ベラーヨ 6 5
審査請求日	令和4年4月11日(2022.4.11)	(74)代理人	100102978
(31)優先権主張番号	62/656,292		弁理士 清水 初志
(32)優先日	平成30年4月11日(2018.4.11)		
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 幹細胞移植のための組成物および方法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

ファンコニ貧血の治療を必要とする対象においてファンコニ貧血を治療するための遺伝的に改変されたCD34濃縮細胞集団を調製するための方法であって、

(i) CD34⁺細胞を選択することによって対象から得られた生体試料からCD34濃縮細胞集団を調製する段階、および

(ii)

(a) ファンコニ貧血相補群(FANC)ポリペプチドまたはその機能的バリエーションもしくは断片をコードするポリヌクレオチド配列を含む、組換え遺伝子治療ベクター、または

(b) 内因性変異FANC遺伝子の直接修復を標的とする遺伝子編集システムによって前記CD34濃縮細胞集団を遺伝的に改変する段階を含み、前記生体試料が、前記対象がG-CSFおよびプレリキサフォルで治療された後に得られた末梢血であり、CD34⁺細胞を選択することが、

(a) CD34⁺細胞と結合する捕捉マトリックスに前記生体試料を適用すること、

(b) 前記生体試料の非結合画分を前記捕捉マトリックスに流れさせること、および

(c) 溶出緩衝液を使用して前記捕捉マトリックスからCD34濃縮細胞集団を溶出すること

を含み、溶出の前に非結合画分が洗浄されない、前記方法。

【請求項 2】

C D 3 4 + 細胞の選択が、C D 3 4 と特異的に結合する抗体またはその機能的断片を使用して実行される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

C D 3 4 + 細胞の選択が、1 0 ~ 2 0 m L / 分の流速を使用して実行される、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記末梢血に対して 1 回以上のアフェレーシスを実行することを含む、請求項 2 または 3 に記載の方法。

【請求項 5】

溶出された C D 3 4 濃縮細胞集団を、組換え遺伝子治療ベクターで遺伝的に改変することを含み、前記組換え遺伝子治療ベクターが、

(a) 真核生物で活性なプロモーター配列、および

(b) ヒト F A N C ポリペプチドまたはその機能的断片もしくはバリエントをコードする配列

を 5 ' から 3 ' の順序で含むポリヌクレオチド配列を含み、

前記ヒト F A N C ポリペプチドまたはその機能的断片もしくはバリエントをコードする配列が、前記真核生物で活性なプロモーター配列と作動可能に連結され、かつ前記 F A N C ポリペプチドが、F A N C A、F A N C C、および F A N C G ポリペプチドから選択される、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6】

前記 F A N C ポリペプチドが F A N C A ポリペプチドである、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

溶出された C D 3 4 濃縮細胞集団を、遺伝子編集システムで遺伝的に改変することを含み、前記遺伝子編集システムが、

(a) C a s タンパク質または C a s タンパク質をコードするポリヌクレオチド、

(b) g R N A、および

(c) 前記内因性変異 F A N C 遺伝子における 1 つ以上の変異と重複する前記 F A N C 遺伝子またはその断片を含む配列を含む、修復鋳型

を含み、

g R N A が、前記修復鋳型を前記内因性変異 F A N C 遺伝子に誘導するように構成され、前記 F A N C 遺伝子が、F A N C A、F A N C C、および F A N C G 遺伝子から選択され、かつ前記遺伝子編集システムは、内因性変異 F A N C 遺伝子の直接修復が可能である、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

発明の分野

本発明は、概して、ファンconi貧血 (F A) の治療を含む、H S C 移植に使用するための遺伝子改変された造血幹細胞 (H S C) を含む造血細胞の集団を調製する方法に関する。

【0002】

関連出願の相互参照

本出願は、2 0 1 8 年 4 月 1 1 日に出願された米国仮出願第 6 2 / 6 5 6 , 2 9 2 号に対する優先権を主張し、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【0003】

電子的に提出されたテキストファイルの説明

本明細書に電子的に提出されたテキストファイルの内容は、参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる。配列表のコンピュータ可読形式コピー (ファイル名: R O P A _ 0 0 8 _ 0 1 W O _ S e q L i s t _ S T 2 5、記録日: 2 0 1 9 年 4 月 1 1 日、ファイルサイズ約 5 2 キロバイト) 。

10

20

30

40

50

【背景技術】

【0004】

発明の背景

エクスピボを介した標的細胞への遺伝子導入は、細胞および遺伝子治療に臨床的に適用される方法である。HSCを含むCD34濃縮細胞集団の単離およびエクスピボでの遺伝的な改変は、非標的細胞への遺伝子導入の減少、およびそれにより、例えば、遺伝子治療ベクターなどの遺伝的な改変因子の必要性/量を低減する、2つの大きな利点を提供し、これにより、遺伝的に改変されたHSCの臨床生産に関連するコストが低減される。遺伝的に改変されたHSCの移植のためのモデル系は、FAである。FAの状況下において開発された方法は、他の障害および状態にも適用可能である。

10

【0005】

FAは、常染色体劣性疾患であり(X連結型である補体群FA-Bを除く)、患者の生存期間の中央値は、約24年である(Butturini A, et al. (1994) Blood 84:1650-1655(非特許文献1);Kutler DI, et al. (2003) Blood 101:1249-1256(非特許文献2))。出生時に、これらの患者の血球数は概して正常である。大赤血球症は、多くの場合、これらの患者で最初に検出される血液学的異常である。これは通常、血小板減少、貧血、および汎血球減少と共に発生する。骨髄不全(BMF)は、通常、5~10年後にこれらの患者で観察され、血液学的疾患の平均発症年齢は7歳である。FAを有する患者の約80%は、生後10年間にBMFの証拠を開発するであろう。これまでの疫学的研究に基づいて、悪性エピソードが形成不全前に現れない場合、FAを有する事実上すべての患者は40歳までにBMFを発症し(Butturini A, et al. (1994) Blood 84:1650-1655;Kutler DI, et al. (2003) Blood 101:1249-1256)、これは、これらの患者における死亡の主な原因である。FAの複雑な臨床症状のため、これらの患者の管理は、主に骨髄不全(BMF)、骨髄性白血病、および固形腫瘍の臨床症状の改善に焦点を当てている。

20

【0006】

FAおよび他の疾患の治療は、遺伝的に改変したHSCの効率的な生着に依存する。したがって、FA患者を含む患者において高レベルの生着を達成する遺伝的に改変されたHSCを含む細胞集団を調製する方法が必要とされている。本発明は、この必要性などに対応する。

30

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0007】

【文献】Butturini A, et al. (1994) Blood 84:1650-1655

【文献】Kutler DI, et al. (2003) Blood 101:1249-1256

【発明の概要】

【0008】

本発明は、概して、血液悪性腫瘍および幹細胞移植の分野に関し、特に、遺伝子送達および遺伝子修復の両方を含む、遺伝子治療に使用するためのCD34⁺細胞の濃縮された幹細胞集団の製造および使用に関する。特に、これらのCD34濃縮細胞集団は、哺乳動物、特に、ファンコニ貧血相補群A(FANCA)、群C(FANCC)、または群G(FANCG)遺伝子産物調節不全に関連するヒト疾患、障害、および機能不全を治療するための遺伝子治療において有用である。特定の実施形態では、本開示の方法は、エクスピボで実行され、人体自体では実行されない。

40

【0009】

一実施形態では、本開示は、ファンコニ貧血の治療を必要とする対象においてファンコニ貧血を治療する方法であって、(i)前記対象から得られた第1の生体試料から高スト

50

リンジェンシー条件下でCD34⁺細胞を選択することによって調製された、高ストリンジェンシーCD34濃縮細胞集団、および(i i)前記対象から得られた第2の生体試料から低ストリンジェンシー条件下でCD34⁺細胞を選択することによって調製された低ストリンジェンシーCD34濃縮細胞集団の組み合わせを対象に提供することを含み、高ストリンジェンシーCD34濃縮細胞集団および/または低ストリンジェンシーCD34濃縮細胞集団の一方または両方が、機能的バリエーションまたは断片または天然に存在するFANCTタンパク質(例えば、FANCAまたはFANCCまたはFANG)を含むFANCPオリペプチドをコードする組換え遺伝子治療ベクターで形質導入されており、第1の生体試料および第2の生体試料が、任意で同じ生体試料であり、それによりファンコニ貧血を治療する方法を提供する。

10

【0010】

一実施形態では、本方法は、高ストリンジェンシー条件下でCD34濃縮細胞集団を調製する段階、低ストリンジェンシー条件下で別のCD34濃縮細胞集団を調製する段階、CD34濃縮細胞集団のうち一方または両方を組換え遺伝子治療ベクターと接触させる段階、および2つのCD34濃縮細胞集団を対象に順次または同時に投与する段階を含み、それによりファンコニ貧血を治療することにより、対象のファンコニ貧血を治療することを含む。特定の実施形態では、遺伝子治療ベクターと接触した細胞集団(複数可)は結果として形質導入され、したがって、ファンコニ貧血の治療のための治療用核酸またはオリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む。一実施形態では、組換え遺伝子治療ベクターは、国際特許出願第PCT/US2017/050837号に記載されるベクターのような、治療用FANC(例えば、FANCAまたはFANCCまたはFANG)遺伝子セグメントまたはタンパク質をコードする自己不活化レンチウイルスベクターを含む。一実施形態では、組換え遺伝子治療ベクターは、Casタンパク質またはCasタンパク質をコードする核酸、gRNAまたはsgRNAを含むCRISPR/Cas系、および1つ以上の変異が内因性FANC遺伝子と重複するFANC遺伝子またはFANC遺伝子の断片を含む修復鋳型を送達することによって、内因性FANC遺伝子(例えば、FANCAまたはFANCCまたはFANG)を修復するように構成される。

20

【0011】

一実施形態では、本開示は、ファンコニ貧血の治療を必要とする対象においてそれを治療するための方法であって、高ストリンジェンシー条件下でCD34⁺細胞を選択することによって、対象から得られた第1の生体試料から高ストリンジェンシーCD34濃縮細胞集団を調製する段階、低ストリンジェンシー条件下でCD34⁺細胞を選択することによって、対象から得られた第2の生体試料から低ストリンジェンシーCD34濃縮細胞集団を調製する段階、高ストリンジェンシーCD34濃縮細胞集団または低ストリンジェンシーCD34濃縮細胞集団の一方または両方をファンコニ貧血に対する組換え遺伝子治療ベクターと接触させる段階、ならびに高ストリンジェンシーCD34濃縮細胞集団および低ストリンジェンシーCD34濃縮細胞集団を対象に投与する段階を含み、高ストリンジェンシーCD34濃縮細胞集団または低ストリンジェンシーCD34濃縮細胞集団の一方または両方が、組換え遺伝子治療ベクターと接触させるまたは形質導入され、それによりファンコニ貧血を治療する、方法を提供する。

30

40

【0012】

本発明の一態様では、第1の生体試料および第2の生体試料は、それぞれ独立して、末梢血または骨髄である。一態様では、第1の生体試料および第2の生体試料は、対象が顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(G-CSF)、プレリキサフォル、またはG-CSFおよびプレリキサフォルの組み合わせで治療された後に得られた末梢血である。

【0013】

一実施形態では、本方法のうちいずれかでは、高ストリンジェンシー条件下でCD34⁺細胞を選択することをさらに含み、CD34⁺細胞と結合する捕捉マトリックスに第1の生体試料を適用することと、洗浄緩衝液を使用して捕捉マトリックスを1回以上洗浄することと、溶出緩衝液を使用して捕捉マトリックスから高ストリンジェンシーCD34

50

濃縮細胞集団を溶出することを含み得る。一実施形態では、適用ステップは、5 ~ 10 mL / 分、5 ~ 15 mL / 分、15 ~ 20 mL / 分、20 ~ 25 mL / 分、または25 ~ 30 mL / 分で実行される。一実施形態では、溶出ステップは、5 ~ 10 mL / 分、5 ~ 15 mL / 分、15 ~ 20 mL / 分、20 ~ 25 mL / 分、または25 ~ 30 mL / 分で実行される。一実施形態では、適用ステップは、10 ~ 20 mL / 分で実行される。一実施形態では、溶出ステップは、20 mL / 分で実行される。

【0014】

一実施形態では、本方法のうちのいずれかでは、低ストリンジェンシー条件下でCD34⁺細胞を選択することをさらに含み、CD34⁺細胞と結合する捕捉マトリックスに第2の生体試料を適用することと、第2の生体試料の非結合画分を捕捉マトリックスに流れさせることと、溶出緩衝液を使用して捕捉マトリックスから低ストリンジェンシーCD34濃縮細胞集団を溶出することを含み得る。一実施形態では、適用ステップは、5 ~ 10 mL / 分、5 ~ 15 mL / 分、15 ~ 20 mL / 分、20 ~ 25 mL / 分、または25 ~ 30 mL / 分で実行される。一実施形態では、溶出ステップは、5 ~ 10 mL / 分、5 ~ 15 mL / 分、15 ~ 20 mL / 分、20 ~ 25 mL / 分、または25 ~ 30 mL / 分で実行される。一実施形態では、適用ステップは、10 ~ 20 mL / 分で実行される。一実施形態では、溶出ステップは、20 mL / 分で実行される。

10

【0015】

本発明の一態様では、高ストリンジェンシーCD34濃縮細胞集団および/または低ストリンジェンシーCD34濃縮細胞集団を、組換え遺伝子療法ベクターと接触させる。いくつかの実施形態では、高ストリンジェンシーCD34濃縮細胞集団におけるCD34⁺細胞の割合は、低ストリンジェンシーCD34濃縮細胞集団におけるCD34⁺細胞の割合よりも2 ~ 4倍大きい。一実施形態では、高ストリンジェンシーCD34濃縮細胞集団におけるCD34⁺細胞の割合は、約60%であり、低ストリンジェンシーCD34濃縮細胞集団におけるCD34⁺細胞の割合は、60%未満または15 ~ 60%または15 ~ 30%である。一実施形態では、高ストリンジェンシーCD34濃縮細胞集団におけるCD34⁺細胞の割合は、約70%以上であり、低ストリンジェンシーCD34濃縮細胞集団におけるCD34⁺細胞の割合は、17.5 ~ 35%である。一実施形態では、高ストリンジェンシーCD34濃縮細胞集団におけるCD34⁺細胞の割合は、約80%以上であり、低ストリンジェンシーCD34濃縮細胞集団におけるCD34⁺細胞の割合は、40%未満または20 ~ 40%である。一実施形態では、高ストリンジェンシーCD34濃縮細胞集団におけるCD34⁺細胞の割合は、約90%以上であり、低ストリンジェンシーCD34濃縮細胞集団におけるCD34⁺細胞の割合は、40%未満または22.5 ~ 40%である。

20

30

【0016】

本発明の一実施形態では、ファンconi貧血の治療のための組換え遺伝子治療ベクターは、(a)真核生物で活性なプロモーター配列、および(b)機能的断片およびそのバリエーションを含む、ヒトFANC遺伝子またはポリペプチドをコードする配列を5'から3'の順序で含むポリヌクレオチド配列を含み、ヒトFANC遺伝子もしくはポリペプチドまたはその機能的断片もしくはバリエーションをコードする配列は、真核生物活性プロモーター配列と機能的に連結されており、FANC遺伝子またはポリペプチドは、FANCA、FANCC、およびFANCG、例えば、天然ヒトFANCA、FANCC、およびFANCG、またはその機能的断片もしくはバリエーションから選択される。特定の実施形態では、天然FANCタンパク質の機能的断片または機能的バリエーションは、天然FANCタンパク質と実質的に同様の生物活性を有する。

40

【0017】

本発明の一実施形態では、ファンconi貧血のための組換え遺伝子治療ベクターは、内因性のFANC遺伝子の指示された修復が可能な遺伝子編集システムを含み、遺伝子編集システムは、Casタンパク質またはCasタンパク質をコードするポリヌクレオチドと、gRNAと、内因性FANC遺伝子における1つ以上の変異と重複するFANC遺伝子ま

50

たはその断片を含む配列を含む修復鋳型とを含み、sgRNAは、修復鋳型をFANC遺伝子に誘導するように構成され、FANC遺伝子は、FANCA、FANCC、およびFANGから選択される。

【0018】

一実施形態では、選択方法は、ビーズ系磁気選択によって実行される。

【0019】

一実施形態では、本明細書に開示される方法は、末梢血に対して1回以上のアフエレーションを実行することをさらに含む。

【0020】

一態様では、本明細書に開示される方法は、遺伝子改変ファンコニ貧血細胞の経時的な増加をもたらす。

10

【0021】

一態様では、本明細書に開示される治療方法は、例えば、限定されないが、骨髄不全、血小板減少、白血球減少、汎血球減少、好中球減少、および貧血のうちの1つ以上など、対象におけるファンコニ貧血の血液学的徴候の発生を阻害し、進行を停止し、および/または進行を逆転させる。

【0022】

一態様では、本明細書に開示される方法は、例えば、限定されないが、リンパ球、好酸球、好中球、赤血球、および血小板のうちの1つ以上など、高ストリンジェンシーCD34濃縮細胞集団および低ストリンジェンシーCD34濃縮細胞集団を対象に投与する前に対象において減少していた1つ以上の造血系統の回復をもたらす。特定の実施形態では、本方法は、1つ以上の造血系統の減退の遅延もしくは減少、または1つ以上の造血系統、例えば、リンパ球、好酸球、好中球、赤血球、および血小板のうちの1つ以上の集団の安定化をもたらす。

20

【0023】

一態様では、本方法は、ヘモグロビンなど、高ストリンジェンシーCD34濃縮細胞集団および低ストリンジェンシーCD34濃縮細胞集団を対象に投与する前に対象において減少していた1つ以上の血液学的パラメータの安定化または回復をもたらす。

【0024】

一実施形態では、本開示は、ファンコニ貧血の治療のための遺伝的に改変された細胞を調製するための方法であって、高ストリンジェンシー条件下でCD34⁺細胞を選択することによって、対象から得られた第1の生体試料から高ストリンジェンシーCD34濃縮細胞集団を調製する段階、低ストリンジェンシー条件下でCD34⁺細胞を選択することによって、対象から得られた第2の生体試料から低ストリンジェンシーCD34濃縮細胞集団を調製する段階、および高ストリンジェンシーCD34濃縮細胞集団または低ストリンジェンシーCD34濃縮細胞集団の一方または両方をファンコニ貧血に対する組換え遺伝子治療ベクターと接触させる段階を含む、方法を提供する。特定の実施形態では、遺伝子治療ベクターと接触した細胞集団(複数可)は、遺伝子治療ベクターによって形質導入され、治療用核酸もしくはポリペプチド(例えば、野生型もしくは天然FANCポリペプチドまたはその機能的断片もしくはバリエーションであり得るFANCポリペプチド)をコードするヌクレオチド配列を含む形質導入細胞を含む細胞集団をもたらす。

30

40

【0025】

一態様では、低ストリンジェンシーおよび高ストリンジェンシーCD34濃縮細胞集団のいずれかまたは両方の選択は、CD34と特異的に結合する抗体またはその機能的断片を使用して実行される。一態様では、選択は、10~20mL/分の流速を使用して実行される。

【0026】

一実施形態では、本発明は、第1の生体試料から高ストリンジェンシー条件下でCD34⁺細胞を選択することによって調製された、高ストリンジェンシーCD34濃縮細胞集団と、第2の生体試料から低ストリンジェンシー条件下でCD34⁺細胞を選択すること

50

によって調製された、低ストリンジェンシーCD34濃縮細胞集団とを含むシステムを提供し、高ストリンジェンシーCD34濃縮細胞集団または低ストリンジェンシーCD34濃縮細胞集団の一方または両方は、ファンコニ貧血のための組換え遺伝子治療ベクターと接触しているか、またはそれにより形質導入されている。特定の実施形態では、高ストリンジェンシーCD34濃縮細胞集団は、1つ以上の薬学的に許容される担体、希釈剤、または賦形剤を含む第1の薬学的組成物中に存在し、低ストリンジェンシーCD34濃縮細胞集団は、1つ以上の薬学的に許容される担体、希釈剤、または賦形剤を含む第2の薬学的組成物中に存在する。いくつかの実施形態では、高ストリンジェンシーCD34濃縮細胞集団および低ストリンジェンシーCD34濃縮細胞集団の両方は、1つ以上の薬学的に許容される担体、希釈剤、または賦形剤を含む同じ薬学的組成物中に存在する。特定の実施形態では、高ストリンジェンシーCD34濃縮細胞集団および低ストリンジェンシーCD34濃縮細胞集団の両方は、ファンコニ貧血の治療のための遺伝子療法ベクターによって形質導入されている。特定の実施形態では、遺伝子治療ベクターおよび/または形質導入細胞は、治療用核酸もしくはポリペプチド（例えば、野生型もしくは天然FANCポリペプチドまたはその機能的断片もしくはバリエーションであり得るFANCポリペプチド）をコードするヌクレオチド配列を含む。

10

【0027】

別の実施形態では、本発明は、第1の生体試料から高ストリンジェンシー条件下でCD34⁺細胞を選択することによって調製された、高ストリンジェンシーCD34濃縮細胞集団と、第2の生体試料から低ストリンジェンシー条件下でCD34⁺細胞を選択することによって調製された、低ストリンジェンシーCD34濃縮細胞集団とを含む薬学的組成物を提供し、高ストリンジェンシーCD34濃縮細胞集団または低ストリンジェンシーCD34濃縮細胞集団の一方または両方は、組換え遺伝子療法ベクターで形質導入されている。特定の実施形態では、遺伝子治療ベクターは、レンチウイルスである。特定の実施形態では、遺伝子治療ベクターは、治療用FANC（例えば、FANCAまたはFANCCまたはFANG）遺伝子セグメントもしくはタンパク質またはその機能的バリエーションもしくは断片をコードする。薬学的組成物は、1つ以上の薬学的に許容される賦形剤、希釈剤、または担体を含み得る。

20

【0028】

[本発明1001]

ファンコニ貧血の治療を必要とする対象においてファンコニ貧血を治療する方法であって、

30

(i) 前記対象から得られた第1の生体試料から高ストリンジェンシー条件下でCD34⁺細胞を選択することによって調製された、高ストリンジェンシーCD34濃縮細胞集団、および

(ii) 前記対象から得られた第2の生体試料から低ストリンジェンシー条件下でCD34⁺細胞を選択することによって調製された、低ストリンジェンシーCD34濃縮細胞集団を前記対象に提供する段階を含み、

前記高ストリンジェンシーCD34濃縮細胞集団および/または前記低ストリンジェンシーCD34濃縮細胞集団の一方または両方が、

40

(i) ファンコニ貧血相補群(FANC)ポリペプチドまたはその機能的バリエーションもしくは断片をコードするポリヌクレオチド配列を含む、組換え遺伝子治療ベクター、または

(ii) 内因性変異FANC遺伝子の直接修復を標的とする遺伝子編集システムによって遺伝的に改変され、かつ

前記第1の生体試料および前記第2の生体試料が、任意で同じ生体試料である、前記方法。

[本発明1002]

(a) 高ストリンジェンシー条件下でCD34⁺細胞を選択することによって、前記対象から得られた第1の生体試料から高ストリンジェンシーCD34濃縮細胞集団を調製する段階、

(b) 低ストリンジェンシー条件下でCD34⁺細胞を選択することによって、前記対象

50

から得られた第2の生体試料から低ストリンジェンシーCD34濃縮細胞集団を調製する段階、

(c) 前記高ストリンジェンシーCD34濃縮細胞集団または前記低ストリンジェンシーCD34濃縮細胞集団の一方または両方を、

(i) ファンコニ貧血相補群A (FANCA) ポリペプチドまたはその機能的バリエーションもしくは断片をコードするポリヌクレオチド配列を含む、前記組換え遺伝子治療ベクター、または

(ii) 前記内因性変異FANCA遺伝子の直接修復を標的とする前記遺伝子編集システムで遺伝的に改変する段階、ならびに

(d) 前記高ストリンジェンシーCD34濃縮細胞集団および前記低ストリンジェンシーCD34濃縮細胞集団を前記対象に提供する段階

をさらに含み、

それにより、ファンコニ貧血を治療する、本発明1001の方法。

[本発明1003]

前記第1の生体試料および前記第2の生体試料が、それぞれ独立して、末梢血または骨髄である、本発明1001または1002の方法。

[本発明1004]

前記第1の生体試料および前記第2の生体試料が、前記対象がG-CSF、プレリキサフォル、またはG-CSFおよびプレリキサフォルの組み合わせで治療された後に得られた末梢血である、本発明1001または1002の方法。

[本発明1005]

前記高ストリンジェンシー条件下でCD34⁺細胞を選択することが、CD34⁺細胞と結合する捕捉マトリックスに前記第1の生体試料を適用すること、洗浄緩衝液を使用して前記捕捉マトリックスを1回以上洗浄すること、および溶出緩衝液を使用して前記捕捉マトリックスから前記高ストリンジェンシーCD34濃縮細胞集団を溶出することを含む、本発明1002の方法。

[本発明1006]

前記低ストリンジェンシー条件下でCD34⁺細胞を選択することが、CD34⁺細胞と結合する捕捉マトリックスに前記第2の生体試料を適用すること、前記第2の生体試料の非結合画分を前記捕捉マトリックスに流れさせること、および溶出緩衝液を使用して前記捕捉マトリックスから前記低ストリンジェンシーCD34濃縮細胞集団を溶出することを含む、本発明1002の方法。

[本発明1007]

前記高ストリンジェンシーCD34濃縮細胞集団が遺伝的に改変される、本発明1001または1002の方法。

[本発明1008]

前記低ストリンジェンシーCD34濃縮細胞集団が遺伝的に改変される、本発明1001、1002、1006、または1007の方法。

[本発明1009]

前記高ストリンジェンシーCD34濃縮細胞集団におけるCD34⁺細胞の割合が、前記低ストリンジェンシーCD34濃縮細胞集団におけるCD34⁺細胞の割合よりも2~4倍大きい、本発明1001~1008のいずれかの方法。

[本発明1010]

前記高ストリンジェンシーCD34濃縮細胞集団が、20%を超える純度または30%を超える純度でCD34⁺細胞を含む、本発明1001~1009のいずれかの方法。

[本発明1011]

前記低ストリンジェンシーCD34濃縮細胞集団が、30%未満の純度でCD34⁺細胞を含む、本発明1001~1010のいずれかの方法。

[本発明1012]

前記高ストリンジェンシーCD34濃縮細胞集団が、20%を超える収率でCD34⁺細胞

10

20

30

40

50

を含む、本発明1001～1011のいずれかの方法。

[本発明1013]

前記低ストリンジェンシーCD34濃縮細胞集団が、35%を超える収率でCD34+細胞を含む、本発明1001～1012のいずれかの方法。

[本発明1014]

前記組換え遺伝子治療ベクターが、

(a) 真核生物で活性なプロモーター配列、および

(b) ヒトFANC遺伝子ポリペプチドまたはその機能的断片もしくはバリエーションをコードする配列

を5'から3'の順序で含むポリヌクレオチド配列を含み、

前記ヒトFANC遺伝子ポリペプチドまたはその機能的断片もしくはバリエーションをコードする配列が、前記真核生物で活性なプロモーター配列と作動可能に連結され、かつ前記FANC遺伝子が、FANCA、FANCC、およびFANCGから選択される、本発明1001～1003のいずれかの方法。

[本発明1015]

前記遺伝子編集システムが、

(a) Casタンパク質またはCasタンパク質をコードするポリヌクレオチド、

(b) gRNA、および

(c) 内因性FANC遺伝子における1つ以上の変異と重複する前記FANC遺伝子またはその断片を含む配列を含む、修復鋳型

を含み、

sgRNAが、前記修復鋳型を前記FANC遺伝子に誘導するように構成され、前記FANC遺伝子が、FANCA、FANCC、およびFANCGから選択され、かつ前記遺伝子編集システムは、内因性FANC遺伝子の直接修復が可能である、本発明1001の方法。

[本発明1016]

前記対象におけるファンconi貧血の血液学的徴候の発生を阻害し、進行を停止し、および/または進行を逆転させる方法であって、前記ファンconi貧血の血液学的徴候が、骨髄不全、血小板減少、白血球減少、汎血球減少、好中球減少、および貧血のうちの1つ以上から任意に選択される、本発明1001～1015のいずれかの方法。

[本発明1017]

前記選択がビーズ系磁気選択によって実行される、本発明1002の方法。

[本発明1018]

前記末梢血に対して1回以上のアフエレーシスを実行することをさらに含む、本発明1004の方法。

[本発明1019]

経時的に遺伝子改変フランconi貧血細胞の進行的増加をもたらす、本発明1001～1018のいずれかの方法。

[本発明1020]

前記対象に前記高ストリンジェンシーCD34濃縮細胞集団および前記低ストリンジェンシーCD34濃縮細胞集団を投与する前に前記対象において減少していた1つ以上の造血系統の回復をもたらす、本発明1001～1019のいずれかの方法。

[本発明1021]

前記1つ以上の造血系統が、リンパ球、好酸球、好中球、赤血球、および血小板のうちの1つ以上を含む、本発明1020の方法。

[本発明1022]

前記対象に前記高ストリンジェンシーCD34濃縮細胞集団および前記低ストリンジェンシーCD34濃縮細胞集団を投与する前に前記対象において減少していた1つ以上の血液学的パラメータの回復をもたらす、本発明1001～1019のいずれかの方法。

[本発明1023]

10

20

30

40

50

前記血液学的パラメータがヘモグロビンである、本発明1022の方法。

[本発明1024]

ファンコニ貧血の治療のための遺伝的に改変された細胞を調製するための方法であって、

(a) 高ストリンジェンシー条件下でCD34⁺細胞を選択することによって、対象から得られた第1の生体試料から高ストリンジェンシーCD34濃縮細胞集団を調製する段階、

(b) 低ストリンジェンシー条件下でCD34⁺細胞を選択することによって、対象から得られた第2の生体試料から低ストリンジェンシーCD34濃縮細胞集団を調製する段階、および

(c) 前記高ストリンジェンシーCD34濃縮細胞集団または前記低ストリンジェンシーCD34濃縮細胞集団の一方または両方を、ファンコニ貧血のための組換え遺伝子治療ベクターで遺伝的に改変する段階であって、前記遺伝子治療ベクターが、ファンコニ貧血相補群(FANC)ポリペプチドまたはその機能的パリアントもしくは断片をコードするポリヌクレオチドを任意に含む、段階

を含む、前記方法。

[本発明1025]

前記第1の生体試料および前記第2の生体試料が、それぞれ独立して、末梢血または骨髄である、本発明1024の方法。

[本発明1026]

前記第1の生体試料および前記第2の生体試料が、前記対象がG-CSF、プレリキサフォル、またはG-CSFおよびプレリキサフォルの組み合わせで治療された後に得られた末梢血である、本発明1025の方法。

[本発明1027]

前記高ストリンジェンシー条件下でCD34⁺細胞を選択することが、CD34⁺細胞と結合する捕捉マトリックスに前記第1の生体試料を適用すること、洗浄緩衝液を使用して前記捕捉マトリックスを1回以上洗浄すること、および溶出緩衝液を使用して前記捕捉マトリックスから前記高ストリンジェンシーCD34濃縮細胞集団を溶出することを含む、本発明1024の方法。

[本発明1028]

前記低ストリンジェンシー条件下でCD34⁺細胞を選択することが、CD34⁺細胞と結合する捕捉マトリックスに前記第2の生体試料を適用すること、前記第2の生体試料の非結合画分を前記捕捉マトリックスに流れさせること、および溶出緩衝液を使用して前記捕捉マトリックスから前記低ストリンジェンシーCD34濃縮細胞集団を溶出することを含む、本発明1024の方法。

[本発明1029]

前記高ストリンジェンシーCD34濃縮細胞集団が、前記組換え遺伝子治療ベクターと接触する、本発明1024の方法。

[本発明1030]

前記低ストリンジェンシーCD34濃縮細胞集団が、前記組換え遺伝子治療ベクターと接触する、本発明1024～1029のいずれかの方法。

[本発明1031]

前記高ストリンジェンシーCD34濃縮細胞集団におけるCD34⁺細胞の割合が、前記低ストリンジェンシーCD34濃縮細胞集団におけるCD34⁺細胞の割合よりも2～4倍大きい、本発明1240～1030のいずれかの方法。

[本発明1032]

前記高ストリンジェンシーCD34濃縮細胞集団が、20%を超える純度または30%を超える純度でCD34⁺細胞を含む、本発明1024～1031のいずれかの方法。

[本発明1033]

前記低ストリンジェンシーCD34濃縮細胞集団が、30%未満の純度でCD34⁺細胞を含む、本発明1024～1032のいずれかの方法。

[本発明1034]

10

20

30

40

50

前記高ストリンジェンシーCD34濃縮細胞集団が、20%を超える収率でCD34+細胞を含む、本発明1024~1033のいずれかの方法。

[本発明1035]

前記低ストリンジェンシーCD34濃縮細胞集団が、35%を超える収率でCD34+細胞を含む、本発明1024~1034のいずれかの方法。

[本発明1036]

前記ファンコニ貧血のための組換え遺伝子治療ベクターが、

(a) 真核生物で活性なプロモーター配列、および

(b) ヒトFANC遺伝子ポリペプチドまたはその機能的断片もしくはバリエントをコードする配列

を5'から3'の順序で含むポリヌクレオチド配列を含み、

前記ヒトFANC遺伝子ポリペプチドまたはその機能的断片もしくはバリエントをコードする配列が、前記真核生物で活性なプロモーター配列と作動可能に連結され、かつ前記FANC遺伝子が、FANCA、FANCC、およびFANGCから選択される、本発明1024~1035のいずれかの方法。

[本発明1037]

前記ファンコニ貧血のための組換え遺伝子治療ベクターが、内因性FANC遺伝子の直接修復が可能である遺伝子編集システムを含み、前記遺伝子編集システムが、

(a) Casタンパク質またはCasタンパク質をコードするポリヌクレオチド、

(b) gRNA、および

(c) 前記内因性FANC遺伝子における1つ以上の変異と重複する前記FANC遺伝子またはその断片を含む配列を含む、修復鋳型

を含み、前記sgRNAが、前記修復鋳型を前記FANC遺伝子に誘導するように構成され、前記FANC遺伝子が、FANCA、FANCC、およびFANGCから選択される、本発明1024~1035のいずれかの方法。

[本発明1038]

前記(a)および/または(b)の選択が、ビーズ系磁気選択によって実行される、本発明1024の方法。

[本発明1039]

前記(a)および/または(b)の選択が、CD34と特異的に結合する抗体またはその機能的断片を使用して実行される、本発明1024または1038の方法。

[本発明1040]

前記(a)および/または(b)の選択が、10~20mL/分の流速を使用して実行される、本発明1024または1038の方法。

[本発明1041]

(a) 第1の生体試料から高ストリンジェンシー条件下でCD34⁺細胞を選択することによって調製された、高ストリンジェンシーCD34濃縮細胞集団、および

(b) 第2の生体試料から低ストリンジェンシー条件下でCD34+細胞を選択することによって調製された、低ストリンジェンシーCD34濃縮細胞集団

を含み、前記高ストリンジェンシーCD34濃縮細胞集団または前記低ストリンジェンシーCD34濃縮細胞集団の一方または両方が、ファンコニ貧血のための組換え遺伝子治療ベクターと接触する、前記組成物。

[本発明1042]

前記第1の生体試料および前記第2の生体試料が、それぞれ独立して、末梢血または骨髄である、本発明1041の組成物。

[本発明1043]

前記第1の生体試料および前記第2の生体試料が、対象がG-CSF、プレリキサフォル、またはG-CSFおよびプレリキサフォルの組成物で治療された後に前記対象から得ら

10

20

30

40

50

れた末梢血である、本発明1041の組成物。

[本発明1044]

前記高ストリンジェンシーCD34濃縮細胞集団におけるCD34+細胞の割合が、前記低ストリンジェンシーCD34濃縮細胞集団におけるCD34+細胞の割合よりも2~4倍大きい、本発明1041~1043のいずれかの組成物。

[本発明1045]

前記高ストリンジェンシーCD34濃縮細胞集団が、20%を超える純度または30%を超える純度でCD34+細胞を含む、本発明1041~1044のいずれかの組成物。

[本発明1046]

前記低ストリンジェンシーCD34濃縮細胞集団が、30%未満の純度でCD34+細胞を含む、本発明1041~1045のいずれかの組成物。

10

[本発明1047]

前記高ストリンジェンシーCD34濃縮細胞集団が、20%を超える収率でCD34+細胞を含む、本発明1041~1046のいずれかの組成物。

[本発明1048]

前記低ストリンジェンシーCD34濃縮細胞集団が、35%を超える収率でCD34+細胞を含む、本発明1041~1047のいずれかの組成物。

[本発明1049]

前記高ストリンジェンシーCD34濃縮細胞集団が、前記組換え遺伝子治療ベクターと接触する、本発明1041~1048のいずれかの組成物。

20

[本発明1050]

前記低ストリンジェンシーCD34濃縮細胞集団が、前記組換え遺伝子治療ベクターと接触する、本発明1041~1049のいずれかの組成物。

[本発明1051]

前記組換え遺伝子送達ベクターが、

(a) 真核生物で活性なプロモーター配列、および

(b) ヒトFANCAポリペプチドまたはその機能的断片もしくはバリエーションをコードする配列

を5'から3'の順序で含むポリヌクレオチド配列を含み、

前記ヒトFANCAポリペプチドまたはその機能的断片もしくはバリエーションをコードする配列が、前記真核生物で活性なプロモーター配列と作動可能に連結され、かつ前記FANCA遺伝子が、FANCA、FANCC、およびFANCGから選択される、本発明1041~1050のいずれかの組成物。

30

[本発明1052]

本発明1041~1051のいずれかの組成物および薬学的に許容される担体を含む、薬学的組成物。

本発明の他の特徴および利点は、以下の詳細な記載および特許請求の範囲から明らかであり、それによって包含される。

【図面の簡単な説明】

【0029】

【図1】例示的な組換え遺伝子治療プラスミドベクター、pCCL-PGK-FANCA W-82-ROのマップを示す。

【発明を実施するための形態】

【0030】

詳細な説明

ファンconi貧血 (FA) は、製剤製造にとっていくつかの固有な課題を提示する。FA については、他のエクスピボ遺伝子療法用途と同様に、遺伝子導入のための標的細胞集団は、CD34細胞表面タンパク質を発現する。FA患者について、CD34+細胞をフローサイトメトリーによって分析すると、BM細胞の低い割合は、健康な個体と比較したCD34+であり、それぞれ1~3%と比較して0.1~1.5%である。FA患者のm

40

50

P B 出発物質から製造された薬物物質からのより低い絶対 C D 3 4 + 細胞は、年齢とともに減少する F A 患者における限られた C D 3 4 + 細胞の確立された特徴を考えると、不思議ではなかった。しかしながら、これは、製造される医薬品の潜在的な有効性に直接影響を及ぼすため、F A 患者からの C D 3 4 + 収率の低下および純度の悪さが懸念されていた。

【 0 0 3 1 】

標準的な C D 3 4 + 細胞濃縮では、C D 3 4 + 細胞の低い割合（総細胞と比較して）は、免疫磁性ビーズによって結合され、したがって、純度が主な目的であるため、カラムは、比較的急速に充填され（m L / 分）、洗浄は厳格である。本発明者らは、F A 患者からの m P B を使用する際に、このアプローチが低い C D 3 4 収率で不最適な結果をもたらすという問題を認識した。

10

【 0 0 3 2 】

F A 患者のための標準的な C D 3 4 + 細胞濃縮プロトコルの限界に取り組むために、本発明者らは、より高い収量および有効な製剤をもたらす、F A 患者からの C D 3 4 + 細胞集団を調製するための新しい方法を開発した。これらの方法は、2つの細胞集団を調製することを伴い、1つは標準的な C D 3 4 + 細胞濃縮条件（「高ストリンジェンシー」条件）下で選択され、もう1つは「低ストリンジェンシー」条件下で選択される。これらの2つの細胞集団の一方または両方を好適な遺伝子治療ベクターで形質導入し、F A 患者に投与する。本明細書に示されるように、新しい方法は、有利な治療効果を示す。理論に拘束されることなく、より高い数の C D 3 4 + 細胞または他の細胞の存在またはより低い C D 3 4 + 細胞純度を伴う細胞の調製物中に存在する他の因子のいずれかが、本明細書に開示される方法に従って調製される組成物の驚くべき効力に寄与すると考えられる。

20

【 0 0 3 3 】

したがって、本開示は、遺伝子改変または遺伝子補正された幹細胞を遺伝子治療のために製造および使用するためのシステムおよび方法を提供する。詳細には、対象の幹細胞が高ストリンジェンシー C D 3 4 + 選択および低ストリンジェンシー C D 3 4 + 選択の組み合わせによって選択され、治療剤（例えば、F A N C タンパク質）をコードするベクターで形質導入され、対象に投与される疾患または障害（例えば、ファンコニ貧血）を治療するための方法が本明細書に提供される。予想外に、治療ベクターで形質導入された高ストリンジェンシー選択 C D 3 4 + 細胞および低ストリンジェンシー選択 C D 3 4 + 細胞の組み合わせによる治療は、従来の高ストリンジェンシー製剤よりも低い C D 3 4 + 細胞純度を有する組み合わせであり、治療効果が向上した。

30

【 0 0 3 4 】

別途定義されない限り、本明細書で使用される全ての技術用語および科学用語は、本発明が関連する技術分野の当業者に一般的に理解されるのと同じ意味を有する。本明細書に記載される方法および材料と類似または等価の方法および材料を本発明の実施に使用することができるが、適切な方法および材料を以下に記載する。本明細書に参照される全ての刊行物、特許出願、特許、および他の参照は、それらの全体が参照により明示的に組み込まれる。矛盾する場合、定義を含む本明細書が、支配するであろう。加えて、本明細書に記載される材料、方法、および実施例は例示的であり、限定することを意図するものではない。

40

【 0 0 3 5 】

一態様では、高ストリンジェンシー条件下および/または低ストリンジェンシー条件下での生体試料からの高ストリンジェンシーおよび低ストリンジェンシー C D 3 4 濃縮細胞集団（例えば、C D 3 4 と特異的に結合する抗体またはその機能性断片を用いたビーズ系磁気選択によって）の製造、ならびに哺乳動物、特にヒトにおける疾患、障害、および機能不全の標的遺伝子治療に有用な薬物の調製におけるこれらの C D 3 4 濃縮細胞集団の使用のために提供される。

【 0 0 3 6 】

別の態様では、本発明は、高ストリンジェンシーおよび低ストリンジェンシー C D 3 4 濃縮細胞集団を投与することに基づいて、ファンコニア貧血および F A N C 遺伝子産物関

50

連障害を治療するためのHSC移植レジメンを提供し、CD34濃縮細胞集団のいずれかまたは両方は、遺伝子治療ベクター（例えば、FANCA、FANCC、またはFANCG遺伝子断片を有するレンチウイルスベクターで形質導入される）と接触するか、またはFANCG遺伝子の部位特異的修復を誘導する遺伝子治療ベクター（例えば、CRISPR-Cas）のいずれかと接触する。

【0037】

いくつかの実施形態では、生体試料は、対象、例えば、治療される対象から得られる末梢血または骨髄である。特定の実施形態では、生体試料は、対象がG-CSF、プレリキサフォル、またはG-CSFおよびプレリキサフォルの組み合わせで治療された後に得られる末梢血である。一実施形態では、生体試料の一方または両方は、末梢血に対して1回以上のアフエーシスを実行することによって調製される。本開示は、これらの方法をまとめて「動員白血球アフエーシス」と称する。

10

【0038】

いくつかの実施形態では、高ストリンジェンシー条件下でCD34⁺細胞を選択することは、CD34⁺細胞と結合する捕捉マトリックスに生体試料を適用することと、洗浄緩衝液を使用して捕捉マトリックスを1回以上洗浄することと、溶出緩衝液を使用して捕捉マトリックスから高ストリンジェンシーCD34濃縮細胞集団を溶出することとを含む。いくつかの事例では、生体試料は、2、3、4、5、または6回など、1回以上捕捉マトリックスに再適用される。一実施形態では、適用ステップは、5~10mL/分、5~15mL/分、15~20mL/分、20~25mL/分、または25~30mL/分で実行される。特定の実施形態では、溶出ステップは、5~10mL/分、5~15mL/分、15~20mL/分、25~25mL/分、または25~30mL/分で実行される。一実施形態では、適用ステップは、10~20mL/分で実行される。一実施形態では、溶出ステップは、20mL/分で実行される。いくつかの実施形態では、洗浄ステップは、洗浄緩衝液を使用して捕捉マトリックスを1回以上洗浄することを含む。いくつかの事例において、洗浄緩衝液は、少なくとも100mL、少なくとも200mL、少なくとも300mL、少なくとも400mL、少なくとも500mL以上の容量を含む。一実施形態では、洗浄ステップは、5~10mL/分、5~15mL/分、15~20mL/分、20~25mL/分、または25~30mL/分で実行される。一実施形態において、洗浄ステップは、10~20mL/分で実行される。いくつかの実施形態では、洗浄緩衝液は、任意で、エチレンジアミン四酢酸(EDTA)、および/または任意で、例えば、約2.5%w/vの濃度のヒト血清アルブミンを含むリン酸緩衝生理食塩水(PBS)である。いくつかの実施形態では、溶出緩衝液は、任意で、エチレンジアミン四酢酸(EDTA)、および/または任意で、例えば、約2.5%w/vの濃度のヒト血清アルブミンを含むリン酸緩衝生理食塩水(PBS)である。いくつかの実施形態では、洗浄緩衝液および溶出緩衝液は低張性である。

20

30

【0039】

いくつかの実施形態では、低ストリンジェンシー条件下でCD34⁺細胞について選択することは、CD34⁺細胞に結合する捕捉マトリックスに生体試料を適用し、生体試料の非結合画分を捕捉マトリックスに流れさせることと、溶出緩衝液を使用して、低ストリンジェンシーCD34濃縮細胞集団を捕捉マトリックスから溶出することとを含む。一実施形態では、適用ステップは、1~2mL/分、2~3mL/分、1~2mL/分、1~2mL/分、5~10mL/分、5~15mL/分、15~20mL/分で実行される。一実施形態では、溶出ステップは、5~10mL/分、5~15mL/分、15~20mL/分、25~25mL/分、または25~30mL/分で実行される。一実施形態では、適用ステップは、10~20mL/分で実行される。いくつかの実施形態では、適用ステップは、高ストリンジェンシー条件下での流速よりも約10%、約20%、約30%、約40%、約50%、約60%、約70%、約80%、約90%、またはそれより低い流速、例えば、高ストリンジェンシー条件下で使用される流速よりも少なくとも10%低い、少なくとも20%低い、少なくとも30%低い、少なくとも40%低い、少なくとも5

40

50

0%低い、少なくとも60%低い、少なくとも70%低い、少なくとも80%低い、または少なくとも90%低い流速で実行される。いくつかの実施形態では、洗浄ステップは、洗浄緩衝液を使用して捕捉マトリックスを1回以上洗浄することを含む。いくつかの事例では、洗浄緩衝液は、500mL、400mL、300mL、200mL、100mL以下、例えば、500mL未満、400mL未満、300mL未満、200mL未満、または100mL未満の容量を含む。いくつかの事例では、洗浄ステップは省略される。一実施形態では、洗浄ステップは、5~10mL/分、5~15mL/分、15~20mL/分、20~25mL/分、または25~30mL/分で実行される。一実施形態において、洗浄ステップは、10~20mL/分で実行される。いくつかの実施形態では、洗浄緩衝液は、任意で、エチレンジアミン四酢酸(EDTA)、および/または任意で、例えば、約2.5%w/vの濃度のヒト血清アルブミンを含むリン酸緩衝生理食塩水(PBS)である。いくつかの実施形態では、溶出緩衝液は、任意で、エチレンジアミン四酢酸(EDTA)、および/または任意で、例えば、約2.5%w/vの濃度のヒト血清アルブミンを含むリン酸緩衝生理食塩水(PBS)である。いくつかの実施形態では、洗浄緩衝液および溶出緩衝液は低張性である。

10

【0040】

いくつかの実施形態では、選択は、ビーズ系磁気選択によって実行される。一実施形態では、CD34と特異的に結合する抗体またはその機能的断片は、選択、例えば、ビーズ系磁気選択のために使用される。選択は、いくつかの事例では、10~20mL/分の流速を使用して実行される。いくつかの事例では、流速は、1、5、10、15、20、25、30、もしくはそれ以上のmL/分、またはその間の任意の値である。

20

【0041】

実施形態では、高ストリンジェンシーCD34濃縮細胞集団を組換え遺伝子療法ベクターと接触させ、低ストリンジェンシーCD34濃縮細胞集団を組換え遺伝子療法ベクターと接触させ、または高ストリンジェンシーおよび低ストリンジェンシーCD34濃縮細胞集団の両方を組換え遺伝子療法ベクターと接触させる。特定の実施形態では、ベクターは、ウイルス、リポソーム、または脂質もしくは脂質様ナノ粒子である。いくつかの事例では、ウイルスは、レンチウイルス、アデノ随伴ウイルス、アデノウイルス、または発泡性ウイルスである。

【0042】

いくつかの実施形態では、高ストリンジェンシーCD34濃縮細胞集団におけるCD34+細胞の割合は、低ストリンジェンシーCD34濃縮細胞集団におけるCD34+細胞の割合よりも2~4倍大きい。

30

【0043】

本発明の方法またはシステムの実施形態では、組換え遺伝子治療ベクターは、(a)真核生物で活性なプロモーター配列および(b)ヒトFANC遺伝子ポリペプチドまたはその機能的断片もしくはバリエーションをコードする配列を、5'から3'の順序で含むポリヌクレオチド配列を含み、ヒトFANC遺伝子ポリペプチドまたはその機能的断片もしくはバリエーションをコードする配列は、真核生物で活性なプロモーター配列と作動可能に連結される。いくつかの実施形態では、FANC遺伝子は、FANCA、FANCC、およびFANGから選択される。

40

【0044】

一実施形態では、本方法は、対象における疾患または障害(例えば、ファンコニア貧血)の血液学的徴候の発生を阻害し、進行を停止し、および/または進行を逆転させ、かつ任意で、ファンコニア貧血の血液学的徴候は、骨髄不全(BMF)、血小板減少、白血球減少、汎血球減少、好中球減少、および貧血のうちの一つ以上から選択される。一実施形態では、本方法は、遺伝子改変ファンコニア貧血(または骨髄増殖性障害または免疫不全性障害などの別の疾患または障害に罹患している対象の細胞)細胞の経時的な増加をもたらす。一実施形態では、方法は、高ストリンジェンシーのCD34濃縮細胞集団および低ストリンジェンシーCD34濃縮細胞集団を対象に投与する前に対象において減少していた1

50

つ以上の血液学的パラメータ（例えば、ヘモグロビン）の回復をもたらす。

【0045】

一実施形態では、本方法は、対象に高ストリンジェンシーCD34濃縮細胞集団および低ストリンジェンシーCD34濃縮細胞集団を投与する前に対象において減少していた1つ以上の造血系統の回復をもたらす、この1つ以上の造血系統は、リンパ球、好酸球、好中球、赤血球、および血小板のうちの1つ以上を含み得る。特定の細胞集団の回復は、いくつかの事例において達成される。回復は、流動活性化セルソーティング、サイトメトリー、または顕微鏡などの当該技術分野で既知の様々な方法によってモニタリングされ得る。

【0046】

本発明は、これらの方法の実施形態のいずれかにおいて使用するための組成物およびシステムをさらに提供する。本発明は、遺伝子治療ベクター、例えば、ヒトFANCタンパク質またはその機能的パリアントもしくは断片をコードするポリヌクレオチド配列を含む遺伝子治療ベクターで形質導入されるCD34濃縮細胞集団を含むが、これらに限定されない、医薬に使用するためのCD34濃縮細胞集団を提供する。

【0047】

本明細書で使用される場合、「高ストリンジェンシー」または「高ストリンジェンシー条件」は、特定の生物学的マーカー、例えば、CD34を発現する細胞についての細胞の実質的な濃縮をもたらすことを意図した細胞集団のための濃縮する方法を指す。例えば、臨床的に使用される「高ストリンジェンシー」CD34濃縮により、平均値：61.6%、中央値：65.7%収率のCD34+細胞、平均値：88.5%、中央値：95.9%相対純度（N=166）をもたらす（Clin Lab. 2016 Jul 1; 62(7): 1243-1248 (PMID: 28164638))。「高ストリンジェンシー」は、比較的希少な細胞型であるCD34+の実質的な濃縮を目的としたプロセスを指し、これは、通常、動員白血球アフェレーシスまたは骨髓取集において細胞産物の0.2~2%を構成する。動員白血球アフェレーシスまたは骨髓取集からのCD34+細胞の高ストリンジェンシー濃縮は、0.2~2%から>80%に増加している最終的なCD34+割合を標的とする。これを達成するために、生体試料を捕捉マトリックスに初期適用した後、本明細書で「洗浄」と称される反復緩衝液交換は、捕捉マトリックスに弱くまたは非特異的に結合した細胞を除去することを目標として実行される。一般に、細胞を捕捉マトリックスから除去し、洗浄サイクルごとに再適用する。除去および再適用は、チューブからピペティングすることにより手動で、またはポンプおよびチューブシステムを使用して自動的に達成することができる。例えば、Dynabeads（登録商標）磁気細胞分離システムと結合されるQuad Technologies MagCloudz（登録商標）を使用して、細胞-磁気粒子複合体を磁気スタンド上のチューブ内で分離し、手動で洗浄する。Miltenyi Biotec ClinimaCS（登録商標）システムを使用して、予め設定された自動プログラムは、チューブセット内の磁気カラムに細胞磁気粒子複合体を適用し、洗浄/再適用は、バルブポンプシステムを使用して行われる。特定の実施形態では、高ストリンジェンシー条件下での選択は、限定されないが、Miltenyi Biotec MACSQuant Tyto（登録商標）、Quad Technologies MagCloudz（登録商標）、GE Sepax（登録商標）細胞分離システム、Terumo Elutra（登録商標）細胞分離システム、COBE Spectra（登録商標）細胞分離器、SynGen LAB（登録商標）もしくはWASH（登録商標）システム、Fresenius-Kabi Lovo（登録商標）、Miltenyi Biotec ClinimaCS（登録商標）システム、またはClinimaCS Prodigy（登録商標）システムを含む様々な機器で実行され得る。選択は、実験室またはポイントオブケアで実行され得る。高ストリンジェンシー条件下でCD34+細胞を選択するための例示的な方法を含む、細胞および細胞集団の調製ならびに濃縮のための詳細な方法は、例えば、国際特許公開第WO 2016/118780号に記載される。高ストリンジェンシー選択に有用な例示的な選択方法は、米国特許第8,727,132号に提供される。

10

20

30

40

50

【 0 0 4 8 】

高ストリンジェンシー濃縮プロトコルでは、CD34+細胞を含む生体試料は、CD34標識試薬、例えば、直接的に結合された免疫磁気ビーズで標識される。生体試料は、限定されないが、細胞の生存能力と互換性のある緩衝液pHおよび等張性のエチレンジアミン四酢酸(EDTA)を任意で含むリン酸緩衝生理食塩水(PBS)などの任意の好適な流体に懸濁され得る。いくつかの事例では、使用される流体はまた、約2.5%などの好適な濃度でヒト血清アルブミンを含有する。磁気活性化細胞選別(MACS)技術を使用して、生体試料は、標識された後、磁気感受性または強磁性材料を含むカラムに適用される。MACSシステムを使用して、カラムの磁気感受性または強磁性材料は、非標的細胞がカラムを通して流出する能力に影響を与えずに、標的細胞を保持する。かかる磁気感受性または強磁性材料には、鉄、鋼、コバルトニッケル、およびそれらの合金の他の強磁性希土類金属が含まれる。かかる材料が容易に磁化および消磁されることが当業者には理解されるであろう。いくつかの実施形態では、生体試料は、磁気感受性または強磁性材料上で1回以上再循環される。カラム負荷後、結合した細胞を洗浄、溶出、および/または低速でカラム上に再負荷して、濃縮画分の純度を増加させる。好適な洗浄緩衝液としては、(任意に)EDTAおよび(任意に)ヒト血清アルブミンを含むPBSが含まれる。洗浄ステップ中に除去される標識された生体試料の任意の成分は、廃棄物または「非標的」バッグ中に収集される。好適な洗浄ステップの後、高ストリンジェンシー濃縮細胞は、標的細胞バッグに溶出させる。

10

【 0 0 4 9 】

本明細書で使用される場合、「低ストリンジェンシー」または「低ストリンジェンシー条件」は、生体試料中の他の細胞と比較して、生物学的マーカーを発現する細胞の濃縮、すなわち、低減された濃縮を犠牲にして、高ストリンジェンシー選択によって達成されたよりも、濃縮された細胞集団のより高い収量を維持する様式で、特定の生物学的マーカーを発現する細胞、例えばCD34を発現する細胞についての細胞の濃縮をもたらすことを意図した細胞集団を濃縮する方法を指す。定義により、高ストリンジェンシー条件下での倍率濃縮は、低ストリンジェンシー条件下での倍率濃縮よりも大きい。高ストリンジェンシー(CD34または他のマーカー)-濃縮細胞集団における、例えばCD34+細胞の倍率濃縮は、いくつかの事例において、低ストリンジェンシー(CD34または他のマーカー)濃縮細胞集団におけるCD34+細胞の倍率濃縮の2、2.25、2.5、2.75、3、3.25、3.5、3.75、または4倍である。一実施形態では、高ストリンジェンシー(CD34または他のマーカー)濃縮細胞集団における、例えばCD34+細胞の倍率濃縮は、低ストリンジェンシー(CD34または他のマーカー)濃縮細胞集団におけるCD34+細胞の倍率濃縮の2~4倍である。特定の実施形態では、低ストリンジェンシー条件下での選択は、限定されないが、Miltenyi Biotec MACS Quant Tyto(登録商標)、Quad Technologies MagCloudz(登録商標)、GE Sepax(登録商標)細胞分離システム、Terumo Elutra(登録商標)細胞分離システム、COBE Spectra(登録商標)細胞分離器、SynGen LAB(登録商標)もしくはWASH(登録商標)システム、Fresenius-Kabi Lovo(登録商標)、Miltenyi Biotec Clinimacs(登録商標)システム、またはClinimacs Prodigy(登録商標)システムを含む様々な機器で実行され得る。選択は、実験室またはポイントオブケアで実行され得る。

20

30

40

【 0 0 5 0 】

低ストリンジェンシー濃縮プロトコルでは、CD34+細胞を含む生体試料は、CD34標識試薬、例えば、直接的に結合された免疫磁気ビーズで標識される。磁気活性化細胞選別(MACS)技術を使用して、生体試料は、標識された後、高ストリンジェンシー濃縮よりも低い流速で磁気感受性または強磁性材料を含むカラムに適用される。高ストリンジェンシー濃縮と同様に、磁気感受性または強磁性材料は、非標的細胞がカラムを通して流出する能力に影響を与えずに、標的細胞を保持する。いくつかの実施形態では、

50

生体試料は、磁気感受性または強磁性材料上で1回以上再循環される。カラム負荷後、低ストリンジェンシー濃縮のために、結合された細胞は、より低いストリンジェンシーで洗浄される。次いで、結合された細胞は、収集バッグに溶出させる。

【0051】

例示的な実施形態では、低ストリンジェンシー濃縮は、高ストリンジェンシーの枯渇（すなわち、標的細胞の除去）を達成することを目的とした「枯渇モード」ソフトウェアプログラムは、代わりに低ストリンジェンシーの濃縮をもたらすように、MACSシステムの標準的な動作手順を修正することによって実行される。枯渇モードでのMACSシステムの操作により、生体試料の標的細胞が、濃縮モードでの操作よりも遅いカラム負荷および低いストリンジェンシー洗浄ステップを使用して、カラム内の磁気感受性または強磁性材料に結合される。非標的細胞は、MACSシステムによって洗浄バッグまたはいわゆる「標的」バッグにフラッシュされる。次いで、枯渇モードプログラムは、出力バルブを切り替えて、いわゆる「非標的」バッグに流体を誘導し、その後、カラムを消磁する。消磁されたカラムに液体を流し続けると、低ストリンジェンシー条件下で濃縮されたCD34+濃縮細胞集団が、いわゆる「非標的」バッグに溶出し、この方法を使用して標的細胞が収集される。

10

【0052】

当業者は、この低ストリンジェンシー濃縮方法が、限定されないが、Miltenyi Biotec MACSQuant Tyto（登録商標）、Quad Technologies MagCloudz（登録商標）、GE Sepax（登録商標）細胞分離システム、Terumo Elutra（登録商標）細胞分離システム、COBE Spectra（登録商標）細胞分離器、SynGen LAB（登録商標）もしくはWASH（登録商標）システム、Fresenius-Kabi Lovo（登録商標）、Miltenyi Biotec CliniMACS（登録商標）システム、またはCliniMACS Prodigy（登録商標）システムを含む様々な機器で実施できることを認識するであろう。当業者は、過度の実験なしに、かかるMACSシステムのソフトウェアを再プログラミングして、その結果、出力バルブは、初期結合ステップの通過画分を廃棄物または「非標的」バッグ（標的バッグではなく）に誘導し、溶出した低ストリンジェンシーCD34濃縮集団を「標的」バッグに誘導する。実際には、次に、従来のMACSプログラムの通常の洗浄ステップなしに、低ストリンジェンシー濃縮を分離モードで実行する。

20

30

【0053】

本明細書で使用される「ベクター」は、ポリヌクレオチドを含むか、またはポリヌクレオチドと会合し、細胞へのポリヌクレオチドの送達を媒介するために使用できる高分子または高分子の会合を指す。例示的なベクターには、例えば、プラスミド、ウイルスベクター（例えば、レンチウイルスベクターなどのレトロウイルスベクター）、リポソーム、および他の遺伝子送達ビヒクルが含まれる。

【0054】

「LV」という用語は、レンチウイルスの略称であり、ウイルス自体またはその誘導体を指すために使用され得る。この用語は、別様に必要とされる場合を除いて、全ての亜型、ならびに天然に存在する形態および組換え形態の両方を包含する。

40

【0055】

本明細書で使用される場合、「遺伝子」または「コード配列」という用語は、遺伝子産物をコードするインピトロまたはインピボのヌクレオチド配列を指す。いくつかの事例では、遺伝子は、コード配列、すなわち、遺伝子産物をコードする配列からなるかまたは本質的になる。他の事例では、遺伝子は、追加の非コード配列を含む。例えば、遺伝子は、コード領域の前後の領域、例えば5'非翻訳（5'UTR）配列または「リーダー」配列、および3'UTR配列または「トレーラー」配列、ならびに個々のコードセグメント（エキソン）間の介在配列（イントロン）を含んでもまたは含まなくてもよい。

【0056】

本明細書で使用される場合、「治療用遺伝子」は、発現すると、それが存在する細胞も

50

しくは組織、または遺伝子が発現される哺乳動物に有益な効果を与える遺伝子を指す。有益な効果の例としては、状態もしくは疾患の徴候もしくは症状の寛解、状態もしくは疾患の予防もしくは阻害、または所望の特徴の付与が含まれる。治療用遺伝子には、細胞または哺乳動物における遺伝的欠損を補正する遺伝子が含まれる。

【 0 0 5 7 】

本明細書で使用される場合、導入遺伝子は、ベクターによって細胞に送達される遺伝子である。

【 0 0 5 8 】

本明細書で使用される場合、「遺伝子産物」という用語は、ポリペプチド、ペプチド、タンパク質、または低分子干渉RNA (siRNA)、miRNA、もしくは低分子ヘアピン型RNA (shRNA) を含む干渉RNAなどのポリヌクレオチド配列の所望の発現産物を指す。特定の実施形態では、遺伝子産物は治療用遺伝子産物であり、発現すると、それが存在する細胞もしくは組織、または遺伝子が発現される哺乳動物に有益な効果を与える。

【 0 0 5 9 】

本明細書で使用される場合、「ポリペプチド」、「ペプチド」、および「タンパク質」という用語は、任意の長さのアミノ酸のポリマーを指す。また、この用語は、例えば、ジスルフィド結合形成、グリコシル化、脂質付加、ペグ化、リン酸化、または標識構成成分との抱合で改変されているアミノ酸ポリマーも包含する。

【 0 0 6 0 】

「含む」とは、列挙された要素が、例えば、組成物、方法、キットなどにおいて必要とされるが、例えば、特許請求の範囲に記載の範囲内で組成物、方法、キットなどを形成するために他の要素が含まれていてもよいことを意味する。例えば、プロモーターに作動可能に連結された治療用ポリペプチドをコードする遺伝子を「含む」発現カセットは、遺伝子およびプロモーターに加えて他の要素、例えば、ポリアデニル化配列、エンハンサ要素、他の遺伝子、リンカードメインなどを含み得る発現カセットである。例えば、CD34濃縮細胞集団を調製することを「含む」調製方法または治療方法は、CD34濃縮細胞集団を調製するための別の段階、例えば、幹細胞を動員するための薬剤を投与する段階、誘導療法を投与する段階、またはそれを組み合わせて薬物を共投与する段階を含み得る。

【 0 0 6 1 】

低ストリンジェンシー条件に関して本明細書で使用される「含む (comprising)」または「含む (comprises)」という用語は、同じ選択ステップ中に同じ試料に適用される追加の高ストリンジェンシー選択を許容すると解釈されるべきではない。低ストリンジェンシー条件下および高ストリンジェンシー条件下の両方で選択を実行することは、高ストリンジェンシー選択をもたらず一方で、低ストリンジェンシー選択は、高ストリンジェンシー条件下での選択を除外するものとして本明細書に明示的に定義されることを理解されたい。低ストリンジェンシー条件下でCD34⁺細胞のための選択によって低ストリンジェンシーCD34濃縮細胞集団を調製することは、生体試料をカラムに負荷してから、低ストリンジェンシーCD34濃縮細胞集団をカラムから溶出するまでの間、カラムが高ストリンジェンシー条件下で洗浄されない、他の方法ステップを含み得る。

【 0 0 6 2 】

「から本質的になる」とは、例えば、組成物、方法、キットなどの基本的小および新規特徴 (複数可) に実質的な影響を与えない特定の材料またはステップに対して記載される、例えば、組成物、方法、キットなどの範囲の限定を意味する。例えば、プロモーターに作動可能に連結された治療用ポリペプチドをコードする遺伝子、およびポリアデニル化配列「から本質的になる」は、それらが遺伝子の転写または翻訳に実質的な影響を与えない限り、追加の配列、例えば、リンカー配列を含み得る。別の例として、列挙される配列「から本質的になる」バリエーション、または変異体、ポリペプチド断片は、それが由来する全長ナイーブポリペプチドに基づく配列の境界に、列挙された配列のアミノ酸配列プラスまたはマイナス約10アミノ酸残基を有し、例えば、列挙される結合アミノ酸残基よりも10

10

20

30

40

50

、9、8、7、6、5、4、3、2、もしくは1残基少ない、または列挙される結合アミノ酸残基よりも1、2、3、4、5、6、7、8、9、もしくは10残基多い。

【0063】

「からなる」とは、組成物、方法、またはキットから、特許請求の範囲において特定されていない任意の要素、ステップ、または成分が除外されることを意味する。例えば、プロモーターに作動可能に連結された治療用ポリペプチドをコードする遺伝子、および転写後調節要素「からなる」発現カセットは、プロモーター、治療用ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列、および転写後調節要素のみからなる。別の例として、列挙される配列「からなる」ポリペプチドは、列挙される配列のみを含有する。

【0064】

本明細書で使用される場合、「骨髄細胞」または「骨髄幹細胞」は、本明細書では、生検などによって骨髄から直接得られる細胞と、例えば動員後に骨髄に由来する末梢血から得られる細胞との両方を指す。

【0065】

本明細書で使用される「発現ベクター」は、上記で論じられるかまたは当該技術分野で既知のように、目的の遺伝子産物をコードするポリヌクレオチドを含むベクター、例えば、プラスミド、ミニサークル、ウイルスベクター、リポソームなどを包含し、目的の標的細胞に遺伝子産物の発現をもたらすために使用される。発現ベクターはまた、標的における遺伝子産物の発現を促進するためにコード領域に作動的に連結される制御要素も含む。制御要素、例えば、プロモーター、エンハンサ、UTR、miRNAターゲティング配列など、およびそれらが発現のために作動可能に連結される1つ以上の遺伝子の組み合わせは、「発現カセット」と称されることがある。多くのかかる制御要素は、当該技術分野で既知であり、かつ入手可能であるか、または当該技術分野で入手可能な成分から容易に構築することができる。

【0066】

本明細書で使用される「プロモーター」は、RNAポリメラーゼの結合を誘導し、それによってRNA合成を促進するDNA配列、すなわち、転写を誘導するのに十分な最小の配列を包含する。プロモーターおよび対応するタンパク質またはポリペプチドの発現は遍在性であり得、これは、広範囲の細胞、組織、および種において非常に活性であるか、または細胞型特異的、組織特異的、もしくは種特異的であることを意味する。プロモーターは、継続的活性を意味する「構成的」、または生物的または非生物的因子の存在または不在によってプロモーターを活性化または非活性化できることを意味する「誘導性」であり得る。本発明の核酸構築物またはベクターには、プロモーター配列と隣接していてもまたはしていなくてもよいエンハンサ配列も含まれる。エンハンサ配列は、プロモーター依存性遺伝子発現に影響を及ぼし、天然遺伝子の5'または3'領域に位置し得る。

【0067】

本明細書で使用される「エンハンサ」は、隣接する遺伝子の転写を刺激または阻害するシス作用性要素を包含する。転写を阻害するエンハンサは、「サイレンサー」とも称される。エンハンサは、コード配列から、および転写される領域の下流の位置から、数千ベース対(kb)までの距離にわたって、いずれの方向にも機能することができる(すなわち、コード配列と会合することができる)。

【0068】

本明細書で使用される「終結シグナル配列」は、例えば、ポリアデニル化シグナル配列などの、RNAポリメラーゼに転写を終結させる任意の遺伝的要素を包含する。

【0069】

本明細書で使用される場合、「作動的に連結された」または「作動可能に連結された」という用語は、遺伝子要素、例えば、プロモーター、エンハンサ、終結シグナル配列、ポリアデニル化配列などが並列しており、要素が予測された様式で作動することを可能にする関係にあることを指す。例えば、プロモーターがコード配列の転写または発現の開始を補助する場合、プロモーターはコード領域に作動的に連結される。この機能的な関係が維

10

20

30

40

50

持される限り、プロモーターとコード領域との間に残基が介在してもよい。

【0070】

本明細書で使用される場合、「異種」という用語は、それが比較される実体の残りとは遺伝子型が異なる実体に由来することを意味する。例えば、遺伝子工学の技法によって異なる種に由来するプラスミドまたはベクターに導入されたポリヌクレオチドは、異種ポリヌクレオチドである。別の例として、その天然コード配列から除去され、天然では連結されないことが見出されているコード配列に作動的に連結されたプロモーターは、異種プロモーターである。したがって、例えば、異種遺伝子産物をコードする異種核酸を含むLVベクターは、天然に存在する野生型LVには通常含まれない核酸を含むLVベクターであり、コードされる異種遺伝子産物は、天然に存在する野生型LVによって通常はコードされない遺伝子産物である。

10

【0071】

ヌクレオチド分子または遺伝子産物に関して本明細書で使用される「内在性」という用語は、宿主ウイルスまたは細胞に天然に存在するかまたはそれに関連する核酸配列、例えば、遺伝子もしくは遺伝子要素、または遺伝子産物、例えば、RNA、タンパク質を指す。

【0072】

本明細書で使用される「天然」という用語は、野生型ウイルスまたは細胞に存在するヌクレオチド配列、例えば遺伝子、または遺伝子産物、例えばRNA、タンパク質を指す。本明細書で使用される「バリエーション」という用語は、参照ポリヌクレオチドまたはポリペプチド配列、例えば天然ポリヌクレオチドまたはポリペプチド配列の変異体またはバリエーション、すなわち参照ポリヌクレオチドまたはポリペプチド配列と100%未満の配列同一性を有することを指す。換言すると、バリエーションは、参照ポリヌクレオチド配列、例えば、天然ポリヌクレオチドまたはポリペプチド配列に対して少なくとも1つのアミノ酸の差異（例えば、アミノ酸置換、アミノ酸挿入、アミノ酸欠失）を含む。例えば、バリエーションは、全長の天然ポリヌクレオチド配列と70%以上の配列同一性、例えば、85%、90%、または95%以上などの75%または80%以上、全長天然ポリヌクレオチド配列と、例えば、98%または99%の同一性を有するポリヌクレオチドであり得る。別の例として、バリエーションは、全長の天然ポリペプチド配列と70%以上の配列同一性、例えば、85%、90%、または95%以上などの75%または80%以上、全長天然ポリペプチド配列と、例えば、98%または99%の同一性を有するポリペプチドであり得る。バリエーションはまた、例えば天然配列などの参照の断片と70%以上の配列同一性、例えば、85%、90%、または95%以上などの75%または80%以上の同一性、例えば、天然配列と98%または99%の同一性を共有する、例えば天然配列などの参照のバリエーション断片を含み得る。

20

30

【0073】

本明細書で使用される場合、「生物活性」および「生物学的に活性な」という用語は、細胞内の特定の生物学的要素に起因する活性を指す。例えば、「免疫グロブリン」、「抗体」またはその断片もしくはバリエーションの「生物活性」は、抗原性決定基に結合し、それによって免疫学的機能を促進する能力を指す。別の例として、ポリペプチドまたはその機能的断片もしくはバリエーションの生物活性は、ポリペプチドまたはその機能的断片もしくはバリエーションが、例えば、結合、酵素活性などの天然機能を行う能力を指す。第3の例として、遺伝子調節要素、例えば、プロモーター、エンハンサー、コザック配列などの生物活性は、調節要素またはその機能的断片もしくはバリエーションが、それが作動可能に連結した遺伝子の翻訳を調節する、すなわち、それぞれ、促進する、増強する、または活性化する能力を指す。

40

【0074】

「投与する」または「導入する」という用語は、本明細書で使用される場合、例えば、細胞集団を対象の血液に動脈内または静脈内に輸送することによって、細胞集団を対象に送達することを指す。細胞集団は、生理食塩水などの種々の溶液中で投与され得る。いくつかの実施形態では、使用される溶液は、対象の血液に対して等張性であり、pH緩衝さ

50

れる。

【 0 0 7 5 】

「形質転換」は、典型的には、異種DNAを細菌または別の細胞に導入するプロセス、またはがん遺伝子を発現しており、したがって、腫瘍細胞などの継続的な成長モードに変換されている細胞を指すために使用される。細胞を「形質転換する」ために使用されるベクターは、プラスミド、ウイルス、または他のビヒクルであり得る。

【 0 0 7 6 】

典型的には、異種DNA（すなわち、ベクター）を細胞に投与、導入、または挿入するために使用される手段に応じて、細胞は、「形質導入された」、「感染させた」、「トランスフェクトされた」、または「形質転換された」と称される。「形質導入された」、「トランスフェクトされた」、および「形質転換された」という用語は、異種DNAの導入方法にかかわらず本明細書において互換的に使用され得る。

10

【 0 0 7 7 】

「宿主細胞」という用語は、本明細書で使用される場合、ベクターで形質導入された、感染させた、トランスフェクトされた、または形質転換された細胞を指す。ベクターは、プラスミド、ウイルス粒子、ファージなどであり得る。温度、pHなどの培養条件は、発現のために選択された宿主細胞に以前に使用されたものであり、当業者には明白であろう。「宿主細胞」という用語は、元の形質導入された、感染させた、トランスフェクトされた、または形質転換された細胞、およびその後代を指すことを理解されたい。

【 0 0 7 8 】

「治療」、「治療すること」などの用語は、概して、所望の薬理学的効果および/または生理学的効果を得ることを意味するために本明細書で使用される。効果は、疾患もしくはその症状を完全もしくは部分的予防すること、例えば、対象において疾患もしくはその症状が発生する可能性を低減させるという点では予防的であり得、かつ/または疾患の部分的もしくは完全な治癒および/または疾患に起因する悪影響、もしくは疾患の進行を遅らせることに関して治療的であり得る。本明細書で使用される「治療」は、哺乳動物における疾患の任意の治療を包含し、(a) 疾患の素因があり得るが、まだそれを有すると診断されていない対象において疾患が発生するのを防止すること、(b) 疾患を阻害すること、すなわち、その発症を阻止すること、または(c) 疾患を軽減すること、すなわち、疾患の退行を引き起こすことを含む。治療剤は、疾患または傷害の発生の前、その間、またはその後投与され得る。治療が患者の望ましくない臨床症状を安定させるかまたは低減する、進行中の疾患の治療が特に興味深い。かかる治療は、患部組織における機能が完全に失われる前に行うことが望ましい。対象の治療は、疾患の症候性段階の間に、いくつかの事例において、疾患の症候性段階の後に施され得る。特定の実施形態では、対象は、対象が疾患、例えば、FAに関連するか、またはその原因となる変異を有すると特定された遺伝子検査に続いて治療を施される。

20

30

【 0 0 7 9 】

「個体」、「宿主」、「対象」、および「患者」という用語は、本明細書において互換的に使用され、限定されないが、サルおよびヒトを含むヒトおよび非ヒト霊長類；哺乳動物の競技動物（例えば、ウマ）；哺乳動物の家畜（例えば、ヒツジ、ヤギなど）；哺乳動物の愛玩動物（イヌ、ネコなど）；およびげっ歯類（例えば、マウス、ラットなど）を含む哺乳動物を指す。

40

【 0 0 8 0 】

本明細書で使用される場合、ポリペプチドに適用される「断片」は、通常、長さが少なくとも10アミノ酸残基、より典型的には少なくとも20残基、好ましくは少なくとも30（例えば、50）残基であるが、完全な無傷の配列よりは短いであろう。断片は、例えば、天然または組換えタンパク質の酵素消化によって、定義された断片をコードする発現ベクターを用いた組換えDNA技法によって、または化学合成によって、当業者に既知の方法によって生成することができる。特定のDNA配列と結合する候補断片の能力は、本明細書に記載される方法によって評価することができる。精製された断片または抗原性断

50

片は、調節領域を単離するため、または新しい調節酵素を生成するために（例えば、異なる酵素からの複数の機能的断片を使用して）、および抗体を生成するために使用でき、すべて当業者に既知の標準プロトコルを使用する。本明細書で使用される場合、「機能的断片」は、生物学的活性を保持するペプチド断片だけでなく、特定のヌクレオチド配列との結合特異性を保持するペプチド断片を包含することを意味する。

【0081】

抗CD34抗体の「機能的断片」は、CD34 + 細胞の選択または濃縮を可能にするのに十分な親和性および特異性で細胞表面のCD34分子と結合できる断片である。

【0082】

「同一」または「パーセント同一性」という用語は、2つ以上の核酸配列またはポリペプチド配列の文脈において、最大的一致について比較および整列された場合、同じであるか、または同じであるヌクレオチドもしくはアミノ酸残基の指定されたパーセンテージを有する、2つ以上の配列またはサブ配列を指す。同一性パーセントを決定するために、配列は、最適な比較目的のために整列される（例えば、ギャップは、第2のアミノ酸または核酸配列との最適な整列のために、第1のアミノ酸または核酸配列の配列に導入できる）。次いで、対応するアミノ酸位置またはヌクレオチド位置のアミノ酸残基またはヌクレオチドが比較される。第1の配列中の位置が、第2の配列中の対応する位置と同じアミノ酸残基またはヌクレオチドによって占められる場合、次いで、分子は、その位置において同一である。2つの配列間の同一性パーセントは、配列によって共有される同一位置数（すなわち、 $\% \text{同一性} = \text{同一位置の数} / \text{位置の総数} \text{ (例えば、重複する位置)} \times 100$) の関数である。いくつかの実施形態では、2つの配列は同じ長さである。

【0083】

ギャップペナルティを考慮した最適な整列を実行するためのコンピュータプログラムの例は、GCG Wisconsin Bestfitパッケージ (University of Wisconsin, U.S.A.; Devereux et al. (1984) Nucleic Acids Res. 12:387) である。配列比較を実行することができる他のソフトウェアの例として、限定されないが、BLASTパッケージ (Ausubel et al. (1999) ibid - Ch. 18を参照されたい)、FASTA (Atschul et al. (1990) J. Mol. Biol. 403-410)、比較ツールのGENEWORKSスイート、GCG Bestfitプログラムを使用することができ、およびBLAST 2 Sequences (FEMS Microbiol. Lett. (1999) 174:247-50; FEMS Microbiol. Lett. (1999) 177:187-8を参照されたい) が含まれる。化学的類似性または進化距離に基づいて、各対比較にスコアを割り当てるスケール化された類似性スコアマトリックスが使用され得る。かかるマトリックスの例は、プログラムのBLASTスイートのデフォルトマトリックスであるBLOSUM62マトリックスである。GCG Wisconsinプログラムは、提供される場合、公開デフォルト値またはカスタム記号比較テーブルのいずれかを使用することができる（詳細についてはユーザマニュアルを参照されたい）。

【0084】

「実質的に同一である」という用語は、2つの核酸またはポリペプチドの文脈において、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%の同一性を有する2つ以上の配列またはサブ配列を指す（例えば、以下に記載される方法のうちの1つを使用して決定される）。

【0085】

文脈によって別途示されない限り、「バリエーション」は、第2のポリペプチド（「誘導体」とも称される）と比較して1つ以上の非保存的または保存的アミノ酸置換を有するポリペプチドもしくはその断片、または例えば異種ポリペプチドの結合、もしくはグリコシル化、アセチル化、リン酸化などによる第2の分子の共有結合によって改変されるポリペプ

10

20

30

40

50

チドもしくはその断片である。「バリエント」の定義にさらに含まれるのは、例えば、アミノ酸（例えば、非天然アミノ酸など）の1つ以上の類似体を含有するポリペプチド、非置換結合を有するポリペプチド、ならびに天然および非天然の両方で生じる、当該技術分野で既知の他の改変である。

【0086】

本発明の種々の組成物および方法を以下に記載する。特定の組成物および方法が本明細書において例示されているが、多くの代替的な組成物および方法のいずれも、本発明を実施する際に使用するのに適用可能であり好適であることを理解されたい。また、本発明の発現構築物および方法の評価は、当該技術分野において標準的な手順を用いて行われ得ることも理解されたい。

10

【0087】

本発明の実践には、別段の指示がない限り、当該技術分野の技能の範囲内である、細胞生物学、分子生物学（組換え技法を含む）、微生物学、生化学、および免疫学の従来技法が用いられる。かかる技術は、例えば、「Molecular Cloning: A Laboratory Manual」, second edition (Sambrook et al., 1989); 「Oligonucleotide Synthesis」 (M. J. Gait, ed., 1984); 「Animal Cell Culture」 (R. I. Freshney, ed., 1987); 「Methods in Enzymology」 (Academic Press, Inc.); 「Handbook of Experimental Immunology」 (D. M. Weir & C. C. Blackwell, eds.); 「Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells」 (J. M. Miller & M. P. Calos, eds., 1987); 「Current Protocols in Molecular Biology」 (F. M. Ausubel et al., eds., 1987); 「PCR: The Polymerase Chain Reaction」, (Mullis et al., eds., 1994); および「Current Protocols in Immunology」 (J. E. Coligan et al., eds., 1991) などの文献に完全に記載されており、これらの各々が、参照により本明細書に明示的に組み込まれる。

20

【0088】

本発明のいくつかの態様が、例示のために例示的な用途を参照して以下に記載される。多数の特定の詳細、関係、および方法は、本発明の完全な理解を提供するために記載されていることを理解されたい。しかしながら、本発明は、特定の詳細のうちの1つ以上を用いずに、または他の方法を用いて実施され得ることは、関連技術分野の当業者には容易に理解されよう。本発明は、例示される行為または事象の順序によって限定されず、いくつかの行為は、他の行為または事象と異なる順序で、かつ/またはそれと同時に行為得る。さらに、例示される行為または事象の全てが本発明による方法を実行するために必要であるとは限らない。

30

【0089】

本明細書で使用される専門用語は、特定の実施形態を説明することのみを目的とし、本発明を限定することを意図するものではない。本明細書で使用される場合、単数形の「a」、「an」、および「the」は、文脈により明らかにそうではないと指示されない限り、複数の形態も同様に含むことが意図される。さらに、「含む (including)」、「含む (includes)」、「有する (having)」、「有する (has)」、「有する (with)」という用語またはその変形が詳細な説明および/または特許請求の範囲のいずれかにおいて使用されている限り、そのような用語は、「含む (comprising)」という用語と同様に、包括的なものであることが意図される。

40

【0090】

「約」または「およそ」という用語は、当業者によって決定される特定の値に対する許容誤差範囲内であることを意味し、それは、その値がどのように測定または決定されるか

50

、すなわち、測定システムの限界に一部依存する。例えば、「約」は、当該技術分野における慣例に従って、1以内のまたは1を超える標準偏差を意味し得る。代替として、「約」は、所与の値の最大20%、好ましくは最大10%、より好ましくは最大5%、およびより好ましくはさらに最大1%の範囲を意味し得る。代替的に、特に生物学的システムまたはプロセスに関して、この用語は、値の1桁以内、好ましくは5倍以内、およびより好ましくは2倍以内であることを意味し得る。本出願および特許請求の範囲において特定の値が記載される場合、別段の記載がない限り、特定の値について許容誤差範囲内であることを意味する「約」という用語が想定されるべきである。

【0091】

本明細書で言及される全ての刊行物は、引用される刊行物に関連して方法および/または材料を開示し、説明するために、参照により本明細書に組み込まれる。本開示は、矛盾が生じる場合には、組み込まれた刊行物のいかなる開示よりも優先されることを理解されたい。

10

【0092】

特許請求の範囲は、あらゆる任意の要素を除外するように立案され得ることにさらに留意されたい。そのため、この記述は、特許請求の範囲の要素の列挙に関連する「単に」、「のみ」などの排他的な用語の使用、または「否定的」な限定の使用の先行詞としての役割を果たすことが意図される。

【0093】

本明細書において論じられる刊行物は、本出願の出願日より前のそれらの開示についてのみ提供される。さらに、提供される刊行物の日付は実際の公開日とは異なる可能性があり、これらは独立して確認する必要がある。

20

【0094】

別段の指示がない限り、本明細書で使用される全ての用語は、当業者にとっての意味と同じ意味を有し、本発明の実施には、当業者の知識の範囲内である微生物学および組換えDNA技術の従来技法が用いられる。

【0095】

CD34 + 濃縮細胞集団を調製、導入、および使用するための方法

一態様では、本開示は、遺伝子改変CD34 + 細胞を含む、CD34 + 細胞が濃縮された細胞の集団を調製する方法を提供する。特定の実施形態では、本方法は、2つのCD34濃縮細胞集団を調製することを含み、一方は低ストリンジェンシー条件を使用して調製され、他方は高ストリンジェンシー条件を使用して調製される。本明細書で示されるように、低ストリンジェンシーCD34濃縮細胞集団および高ストリンジェンシーCD34濃縮細胞集団の組み合わせの使用は、対象におけるCD34 + 幹細胞の予想外に効果的な再構成を有利にもたらす。

30

【0096】

別の態様では、本開示は、遺伝子改変CD34 + 細胞を含む、治療有効量のCD34 + 細胞が濃縮された1つ以上の細胞集団を対象に提供することにより、疾患または障害を有する対象を治療する方法を提供し、遺伝子改変CD34 + 細胞は、疾患または障害を治療するのに有効な治療剤をコードする。特定の実施形態では、治療剤は、ポリペプチドまたはポリヌクレオチド、例えば、RNAである。特定の実施形態では、CD34濃縮細胞集団は、治療を受ける対象から得られるCD34細胞から調製される。

40

【0097】

本明細書に開示される方法の特定の実施形態では、高ストリンジェンシーCD34濃縮細胞集団および低ストリンジェンシーCD34濃縮細胞集団を含む、CD34 + 細胞が濃縮された2つの細胞集団が産生される。これらの2つの細胞集団は別々に保たれ得るか、またはそれらを組み合わせて高ストリンジェンシーCD34濃縮細胞および低ストリンジェンシーCD34濃縮細胞の両方を含む混合細胞集団を産生し得る。特定の実施形態では、2つの細胞集団のいずれかまたは両方は、遺伝子治療ベクター、例えば、FANCAまたはその機能的断片もしくはバリエーションをコードするLVベクターで形質導入される。

50

【 0 0 9 8 】

特定の実施形態では、細胞は、任意の哺乳動物種、例えば、げっ歯類（例えば、マウス、ラット、スナネズミ、リス）、ウサギ、ネコ、イヌ、ヤギ、ヒツジ、ブタ、ウマ、ウシ、霊長類、ヒトに由来し得る。特定の実施形態では、細胞は、樹立細胞株に由来し得るか、または初代細胞であり得、「初代細胞」、「初代細胞株」、および「初代培養物」は、本明細書では互換的に使用され、対象に由来しており、培養の限られた数の継代、すなわち分裂のためにインピトロで増殖することができる細胞および細胞培養物を指す。例えば、初代培養物は、0回、1回、2回、4回、5回、10回、または15回継代されているが、クライシス期を経るのに十分な回数は継代されていない培養物である。典型的には、本発明の初代細胞株は、インピトロで10回未満の継代の間で維持される。

10

【 0 0 9 9 】

特定の実施形態では、本方法は、対象から得られた生体試料からCD34濃縮細胞集団を調製することを含む。一実施形態では、生体試料は、骨髄試料である。別の実施形態では、生体試料は、末梢血である。

【 0 1 0 0 】

特定の実施形態では、生体試料、例えば、末梢血は、造血幹細胞（HSC）の動員後に対象から得られる。一実施形態では、HSCおよび/または前駆細胞は、例えば、患者においてHSCの動員を引き起こすのに十分な量および時間で、対象をG-CSFまたはその類似体で治療することによって動員される。末梢血中のHSCおよび前駆細胞（HSPC）は、生体試料の収集前に動員され得る。末梢血HSCおよびHSPCは、当該技術分野で既知の任意の方法によって動員され得る。末梢血HSCおよびHSPCは、対象の末梢血中を循環するHSCおよび/またはHSPCの数を増加させる、本明細書に記載のまたは当技術分野で公知の任意の薬剤（複数可）で対象を治療することにより動員できる。HSCまたはHSPCのいずれかについての言及は、別段の指示がない限り、HSCおよびHSPCの両方を包含することを意図している。例えば、特定の実施形態において、末梢血は、対象を1つ以上のサイトカインまたは成長因子（例えば、G-CSF、キトリグランド（KL）、IL-1、IL-7、IL-8、IL-11、Flt3リグランド、SCF、トロンボポエチン、またはGM-CSF（サルグラモスチムなど））で治療することによって動員される。末梢血を動員するための方法で使用できるさまざまな種類のG-CSFには、フィルグラスチムおよびより長時間作用するG-CSF：ペグフィルグラスチムが含まれる。特定の実施形態では、末梢血は、対象を1つ以上のケモカイン（例えば、マクロファージ炎症性タンパク質-1a（MIP1a/CCL3）、ケモカイン受容体リグランド（例えば、ケモカイン受容体2リグランドGRO13およびGRO13M）、ケモカイン受容体類似体（例えば、間質細胞由来因子-1a（SDF-1a）タンパク質類似体、例えば、CTCE-0021、CTCE-0214、またはSDF-1a、例えば、Met-SDF-113）、またはケモカイン受容体アンタゴニスト（例えば、ケモカイン（C-X-Cモチーフ）受容体4（CXCR4）アンタゴニスト、例えば、AMD3100）で治療することによって動員される。特定の実施形態では、末梢血は、対象を1つ以上の抗インテグリンシグナル伝達物質（例えば、機能障害抗超遅発性抗原4（VLA-4）抗体、または抗血管細胞接着分子1（VCAM-1））で治療することによって動員される。特定の実施形態では、末梢血は、対象をシクロホスファミド、エトポシド、またはパクリタキセルなどの1つ以上の細胞傷害性薬物で治療することによって動員される。特定の実施形態では、末梢血は、対象に、上記に列挙される薬剤のうちの1つ以上を一定期間投与することによって動員され得る。例えば、対象は、HSPCの収集前に1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、または14日日間、1日1回または1日2回の注入（例えば、皮下、静脈内、または腹腔内）を介して、1つ以上の薬剤（例えば、G-CSF）で治療できる。特定の実施形態では、HSPCは、HSPCの末梢血への動員に使用される薬剤の最後の容量から1、2、3、4、5、6、7、8、12、14、16、18、20、または24時間以内に収集される。特定の実施形態では、HSCおよびHSPCは、対象を、成長因子（例えば、G-CSF）およびケモカイン受容

20

30

40

50

体アンタゴニスト（例えば、CXCR4受容体アンタゴニスト、例えば、AMD3100）、または成長因子（例えば、G-CSFまたはKL）、および抗インテグリン剤（例えば、VLA-4抗体を遮断する機能）などの上術されるまたは当該技術分野で既知の2つ以上の異なる種類の薬剤で治療することによって動員される。一実施形態では、HSCおよび/または前駆細胞は、対象をG-CSFまたはその類似体で治療することによって動員される。一実施形態では、G-CSFは、フィルグラスチムである。一実施形態では、HSCおよび/または前駆細胞は、対象をプレキサフォルで治療することによって動員される。特定の実施形態では、HSCおよび/または前駆細胞は、フィルグラスチムおよびプレキサフォルの組み合わせ、フィルグラスチム単独、またはプレキサフォル単独を使用して動員される。特定の実施形態では、異なる種類の動員剤は、同時にまたは順次投与される。末梢血の動員の方法に関する追加情報については、例えば、Craddock et al., 1997, Blood 90(12):4779-4788; Jin et al., 2008, Journal of Translational Medicine 6:39; Pelus, 2008, Curr. Opin. Hematol. 15(4):285-292; Papayannopoulou et al., 1998, Blood 91(7):2231-2239; Tricot et al., 2008, Haematologica 93(11):1739-1742; およびWeaver et al., 2001, Bone Marrow Transplantation 27(2):S23-S29)を参照されたい。

10

【0101】

特定の実施形態では、末梢血は、対象の静脈に挿入されたシリンジまたはカテーテルを通して得られる。例えば、末梢血は、アフエーシス装置を使用して収集することができる。血液は静脈からカテーテルを流れてアフエーシス装置に流れ、アフエーシス装置は、HSPCを含む白血球を残りの血液から分離し、その後、残りの血液を対象の体内に戻す。アフエーシスは、十分なHSPCが収集されるまで数日間（例えば、1～5日間）実施することができる。

20

【0102】

特定の実施形態では、骨髄は、針吸引によって対象の後方腸骨稜から得られる（例えば、Koda et al., 1984, J. Clin. Invest. 73:1377-1384を参照されたい）。

30

【0103】

特定の実施形態では、生体試料のヘマトクリットレベルが決定され得る。ヘマトクリットレベルは、治療チャンバ内で試料を遠心分離して、試料のRBCを層に分離し、その結果、パックされた細胞の体積を決定することによって決定され得る。ヘマトクリットレベルの決定を支援するために、試料を抗凝固剤と組み合わせてもよく、かかる抗凝固剤を遠心分離の前または最中に治療チャンバに加えてもよいことを理解されたい。代替的に、ヘマトクリットレベルは、試料の光学特性を測定することによって決定され得る。例えば、分光計を使用して、試料を分析することができる。ヘマトクリットレベルを決定する任意の種類の既知の分光法は、例えば、ラマン分光および/または光散乱技術などが使用され得ることを理解されたい。

40

【0104】

特定の実施形態では、生体試料は、例えば、生体試料からのCD34+細胞が濃縮された1つ以上の細胞集団を調製する前に、赤血球を枯渇させる。いくつかの実施形態では、枯渇技術後に残る細胞が洗浄される。別の実施形態では、非特異的IgGは、洗浄された細胞に追加される。いくつかの実施形態では、非特異的IgGは、フレボガンマである。

【0105】

CD34+細胞が濃縮された2つの細胞集団は、高ストリンジェンシー条件下でCD34+細胞の細胞集団を選択し、低ストリンジェンシー条件下でCD34+細胞の別の細胞集団を選択することによって産生され得、それによって2つの細胞集団を産生し、一方は、高ストリンジェンシーCD34濃縮細胞集団、他方は低ストリンジェンシーCD34濃

50

縮細胞集団である。CD34+細胞を選択するために使用される方法は、陽性選択、陰性選択、またはそれらの組み合わせであり得る。特定の実施形態では、対象から得られる生体試料は、2つの試料に分けられ、一方の試料を使用して高ストリンジエンシーCD34濃縮細胞集団を調製し、他方の試料を使用して低ストリンジエンシーCD34濃縮細胞集団を調製する。

【0106】

他の実施形態では、対象から得られる生体試料は、最初に低ストリンジエンシーCD34+選択に供して低ストリンジエンシーCD34濃縮細胞集団を調製し、次いで低ストリンジエンシーCD34濃縮集団の一部を高ストリンジエンシーCD34+選択に供して高ストリンジエンシーCD34濃縮細胞集団を調製する。選択は、順次適用され得、例えば、低ストリンジエンシー条件下でのCD34濃縮細胞の選択が、最初に、続いて高ストリンジエンシー条件下でのさらなるCD34濃縮細胞の得られた集団からの選択が適用され得る。

10

【0107】

他の事例では、高ストリンジエンシー条件下でのCD34濃縮細胞の選択が、最初に、続いて低ストリンジエンシー条件下でのCD34濃縮細胞の残りの集団からの選択が適用され得る。いくつかの事例では、細胞集団は、低ストリンジエンシーまたは高ストリンジエンシー選択が、以前に高ストリンジエンシーまたは低ストリンジエンシー選択に供された細胞の画分に適用されるように分割され得る。いくつかの事例では、1つの生体試料が、低ストリンジエンシーまたは高ストリンジエンシー条件下でCD34濃縮細胞を選択する前に、2つ以上の試料に分割される。

20

【0108】

いくつかの事例では、2つ以上の生体試料は、選択前に一緒に混合され、例えば、1、2、3、4日もしくはそれ以上の間隔、または1、2もしくは3週間の間隔、または1、2もしくは3ヶ月の間隔、または数年の間隔など、他の時間増分を含めて、異なる期間に取得した動員骨髄試料を含む。事例において、異なる対象由来の生体試料、例えば、自己生体試料および同種ドナー由来の試料などが混合される。全ての事例では、生体試料または濃縮細胞集団を混合または分割する前または後の高ストリンジエンシーまたは低ストリンジエンシー選択が、全ての可能な順列において企図される。特定の実施形態では、本方法は、高ストリンジエンシー条件下でCD34+細胞を選択することによって、対象から得られた第1の生体試料から高ストリンジエンシーCD34濃縮細胞集団を調製する段階、および低ストリンジエンシー条件下でCD34+細胞を選択することによって、対象から得られた第2の生体試料から低ストリンジエンシーCD34濃縮細胞集団を調製する段階を含む。

30

【0109】

いくつかの実施形態では、高ストリンジエンシーCD34濃縮細胞集団におけるCD34+細胞の割合は、低ストリンジエンシーCD34濃縮細胞集団におけるCD34+細胞の割合よりも1.5倍、2倍、2.5倍、3倍、3.5倍、4倍、またはいくつかの事例では、5倍、6倍、7倍、もしくは8倍大きい。

【0110】

CD34+細胞の様々な収量および純度は、開示される方法によって達成され得る。いくつかの事例では、高ストリンジエンシー条件下でのCD34+細胞の選択は、インプット生体試料と比較して、少なくとも約10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%以上、もしくはその間の任意の値のCD34+細胞の収率を有する高ストリンジエンシーCD34濃縮細胞集団、かつ/または濃縮試料中の細胞の総数と比較して、少なくとも約20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%以上、もしくはその間の任意の値の純度をもたらす。いくつかの事例では、高ストリンジエンシー条件下でのCD34+細胞の選択は、インプット生体試料と比較して、約10%~20%、20%~30%、もしくは30%~40%、もしくはその間の任意の値のCD34+細胞の収率を有する高ストリンジエンシーCD34濃縮細胞集団、かつ/ま

40

50

たは濃縮試料中の細胞の総数と比較して、少なくとも約20%、30%、40%、50%、もしくはその間の任意の値の純度をもたらす。特定の実施形態では、高ストリンジェンシー条件下でのCD34+細胞の選択は、インプット生体試料と比較して、少なくとも約20%のCD34+細胞の収率を有する高ストリンジェンシーCD34濃縮細胞集団、かつ/または濃縮試料中の細胞の総数と比較して、少なくとも約20%もしくは少なくとも約30%を超える純度をもたらす。

【0111】

いくつかの事例では、低ストリンジェンシー条件下でのCD34+細胞の選択は、インプット生体試料と比較して、少なくとも約30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%以上、もしくはその間の任意の値のCD34+細胞の収率を有する低ストリンジェンシーCD34濃縮細胞集団、かつ濃縮試料中の細胞の総数と比較して、少なくとも約5%、10%、15%、25%、40%、50%以上、もしくはその間の任意の値の純度をもたらす。いくつかの事例では、低ストリンジェンシー条件下でのCD34+細胞の選択は、インプット生体試料と比較して、30%を超える、約30%~40%、40%~50%、もしくは50%~60%、もしくはその間の任意の値のCD34+細胞の収率を有する低ストリンジェンシーCD34濃縮細胞集団、かつ濃縮試料中の細胞の総数と比較して、少なくとも約3%、5%、8%、10%、もしくはその間の任意の値の純度をもたらす。特定の実施形態では、低ストリンジェンシー条件下でのCD34+細胞の選択は、インプット生体試料と比較して、35%を超えるCD34+細胞の収率を有する高ストリンジェンシーCD34濃縮細胞集団、かつ/または濃縮試料中の細胞の総数と比較して、30%未満、25%未満、20%未満、10%未満、もしくは5%未満の純度をもたらす。特定の実施形態では、低ストリンジェンシー条件下でのCD34+細胞の選択は、濃縮試料中の細胞の総数と比較して、1~30%、1~20%、1~10%、10~30%、10~20%、または20~30%の純度を有する低ストリンジェンシーCD34濃縮細胞集団をもたらす。いくつかの実施形態では、低ストリンジェンシーCD34濃縮細胞集団は、少なくとも好中球およびB細胞をさらに含む。

【0112】

特定の実施形態では、高ストリンジェンシーおよび低ストリンジェンシー選択は、両方とも、例えば、CD34+細胞と結合する薬剤を使用して陽性選択によって実行される。特定の実施形態では、薬剤は溶液中であり、一方、他の実施形態では、薬剤は固体表面に固定される。特定の実施形態では、薬剤は、磁気ビーズの表面に結合される。いくつかの実施形態では、薬剤は、抗CD34抗体またはその機能的断片である。

【0113】

特定の実施形態では、高ストリンジェンシー条件および/または低ストリンジェンシー条件下での選択は、限定されないが、Miltenyi Biotec MACSQuant Tyto (登録商標)、Quad Technologies MagCloudz (登録商標)、GE Sepax (登録商標)細胞分離システム、Terumo Elutra (登録商標)細胞分離システム、COBE Spectra (登録商標)細胞分離器、SynGen LAB (登録商標)もしくはWASH (登録商標)システム、Fresenius-Kabi Lovvo (登録商標)、Miltenyi Biotec ClinMACS (登録商標)システム、またはCliniMACS Prodigy (登録商標)システムを含む様々な機器で実行され得る。選択は、実験室またはポイントオブケアで実行され得る。高ストリンジェンシー条件下でCD34+細胞を選択するための例示的な方法を含む、細胞および細胞集団の調製ならびに濃縮のための詳細な方法は、例えば、国際特許公開第WO 2016/118790号に記載される。高ストリンジェンシー選択に有用な例示的な選択方法は、米国特許第8,727,132号に提供される。

【0114】

一実施形態では、本機器は、遠心分離および培養機能を備える少なくとも1つの処理チャンバ、閉鎖チューブセット、ポンプ、ならびに標的細胞セレクタの材料入力(例えば、試料、緩衝液、ガス)を含む閉鎖システム装置である。制御ソフトウェアは、デバイスが

10

20

30

40

50

、特定の実施形態において、対象試料から直接エクスピボで標的細胞を単離し、遺伝的に
 改変し、製剤化することを可能にする。特定の実施形態では、選択プロセスは、最小限ま
 たはユーザ入力を伴わずに30時間以内、25時間以内、または20時間以内に完了する
 ことができる。特定の実施形態では、プロセス全体は、72時間以内または64時間以内
 に完了する。特定の実施形態では、最小限のユーザ入力とは、デバイスへの試料入力と、
 対象への投与のために製剤化された遺伝的に改変された細胞の回収との間で、ユーザがデ
 バイスと相互作用する回数が20、15、10、もしくは5回以下であり、かつ/または
 デバイスと相互作用する回数が12時間、10時間、8時間、5時間、4時間、もしくは
 3時間以下であることを意味する。ユーザからの例示的な相互作用は、滅菌チューブセッ
 トを接続すること、閉鎖された滅菌システムのメンテナンスを検証すること、ステージが
 繰り返されるべきであることを決定すること（例えば、沈殿）、ステージが正常に完了し
 たことを検証すること、プロセス品質チェックに従って新しいステージが開始されること
 を可能にすること、デバイス入力のための試薬を提供すること、ならびに追加または除去
 のための用量を決定することおよび/または計算することのうちの1つ以上を含むことが
 できる。相互作用は、試料受領後、ユーザがデバイスを調整している時間または実際にデ
 バイスと相互作用している時間によって計時できる。

【0115】

特定の実施形態では、高ストリンジェンシーCD34濃縮細胞集団および/または低ス
 トリンジェンシーCD34濃縮細胞集団の一方または両方は、HSC、アフレーシスを
 処理するソフトウェア制御機器であるCliniMACS（登録商標）^{plus}機器などの
 CliniMACS（登録商標）機器を使用して調整される。CliniMACS（登録
 商標）^{plus}機器、ならびに関連する設備および試薬は、Miltenyi Biotec
 GmbH、Bergisch Gladbach、Germanyから市販されている）。
 。使用される機器または試薬としては、CliniMACS（登録商標）CD34抗原/
 試薬が含まれ、それは、ヒトCD34抗原のクラスIIエピトープに指向するモノクロー
 ナル抗体であるマウスIgGからなる抗体コンジュゲートを含む溶液であり、それは、酸
 化鉄/水酸化物コアを有するデキストランビーズに化学的と結合されており、それは、C
 liniMACS（登録商標）チューブがCD34+細胞の選択または濃縮に使用され、
 それは、 60×10^9 （標準スケール）の白血球を超えない総細胞数のうち、最大、 $6 \times$
 10^9 のCD34+細胞、または 120×10^9 （大きいスケール）の白血球を超えない
 総細胞数のうち、最大 1.2×10^9 のCD34+細胞を処理するための2つの細胞分離
 カラムを備えた使い捨ての滅菌使い捨てチューブセット、およびCliniMACS（登
 録商標）PBS/EDTA緩衝液であり、これは、無菌の等張リン酸緩衝液、1mM E
 DTA、生理食塩水であり、HSC、アフレーシスのインビトロ処理用の外部洗浄およ
 び輸送液として使用される。洗浄は、PBSおよび2.5%ヒト血清アルブミンを含むC
 liniMACS緩衝液を使用して実行できる。CliniMACS（登録商標）システ
 ムを使用する手順は、MiltenyiのWebサイトにあるCliniMACSユーザ
 マニュアルに提供されており、例えば、2019年4月8日にhttps://www.miltenyibiotec.com/_Resources/Persistent/2c28c84939f4ce793b29c9f2e897c0bb1a334c47/User%20Manual%20for%20the%20CliniMACS%20CD34%20Reagent%20System.pdfで入手したCliniM
 ACS（登録商標）CD34試薬システムについてのCliniMACS（登録商標）ユー
 ザマニュアルが含まれる。一実施形態では、高ストリンジェンシーCD34濃縮細胞集
 団は、CD34試薬を使用して細胞を標識することによって調製され、次いでCD34+
 細胞は、標準CliniMACS（登録商標）CD34濃縮プログラムを使用して選択さ
 れる。一実施形態では、低ストリンジェンシーCD34濃縮細胞集団は、CliniMA
 CS（登録商標）枯渇プログラムの修飾版を使用して調製される。この実施形態によれば
 、細胞は、CD34試薬を使用して標識されるが、修正枯渇プログラムが実行される。マ
 グネットをONにして標識細胞を負荷した後、Cell Collectionバッグを

10

20

30

40

50

取り外し、収集した細胞は移植に使用しない。代わりに、磁石をOFFにし、溶出緩衝液を機器に適用し、CD34+細胞を溶出し、収集する。特定の実施形態では、選択モードと比較して、枯渇モード下で、機器はよりゆっくり（mL/分）負荷され、洗浄はより低いストリンジェンシーである。

【0116】

特定の実施形態では、高ストリンジェンシーCD34濃縮細胞集団および/または低ストリンジェンシーCD34濃縮細胞集団の一方または両方は、例えば、高ストリンジェンシーCD34濃縮細胞集団および/または低ストリンジェンシーCD34濃縮細胞集団のいずれかまたは両方をベクターと接触させることにより、治療剤をコードするベクター、例えば、遺伝子治療ベクターで形質導入される。特定の実施形態では、細胞をベクターと約30分間、約1時間、約1.5時間、約2時間、約2.5時間、約3時間、約3.5時間、約4時間、約5時間、約6時間、約7時間、約8時間、約12時間、約16時間、約18時間、約20時間、約24時間、約36時間、約48時間、約60時間接触させる。いくつかの実施形態では、細胞は、60時間未満、48時間未満、36時間未満、または24時間未満で形質導入される。特定の実施形態では、細胞は、ベクターと1回以上、例えば、1回、2回、3回、または3回より多く接触させてもよく、各接触事象後のいくつかの時間、例えば、16~24時間、細胞を薬剤（複数可）と共にインキュベートすることができ、その時間後、培地を新鮮な培地と交換し、細胞をさらに培養する。細胞をベクターと接触させることは、細胞の生存を促進する任意の培養培地において、かつ任意の培養条件下で実行され得る。培養物は、細胞が応答する増殖因子を含有し得る。本明細書において定義される増殖因子は、膜貫通型受容体に対する特異的な効果を通じて、培養物中またはインタクテナ組織中のいずれかで、細胞の生存、成長および/または分化を促進することが可能な分子である。増殖因子は、ポリペプチドおよび非ポリペプチド因子を含む。

【0117】

特定の実施形態では、細胞は、コードされた治療剤の検出可能なレベルを達成するのに十分な有効量の遺伝子治療ベクターと接触させる。特定の実施形態では、治療剤は、疾患または障害の治療に有用または有効なポリペプチドまたはポリヌクレオチドである。特定の実施形態では、治療剤は、対象から得られた細胞において調節解除または変異されたポリペプチド、例えば、FAの治療のためのFANCポリペプチドである。有効量は、例えば、治療剤の存在またはレベルを検出することによって、細胞の生存能または機能に対する影響を検出することなどによって、経験的に容易に決定することができる。典型的には、治療剤の発現は、非形質導入細胞と比較して、形質導入細胞において2倍もしくはそれ以上、例えば、3倍、4倍、または5倍もしくはそれ以上、いくつかの事例では、10倍、20倍、または50倍もしくはそれ以上、例えば100倍増強される。

【0118】

哺乳動物細胞にポリヌクレオチド配列を送達することに使用される任意の好都合な遺伝子治療ベクターは、本開示の遺伝子治療ベクターに包含される。例えば、ベクターは、一本鎖または二本鎖核酸、例えば、一本鎖または二本鎖DNAを含み得る。例えば、遺伝子治療ベクターは、DNA、例えば、ネイキッドDNA、例えば、プラスミド、ミニサークルなどであり得る。ベクターは、RNAの改変形態を含む一本鎖または二本鎖RNAを含み得る。別の例では、遺伝子治療ベクターは、RNA、例えば、mRNAまたは改変mRNAであり得る。

【0119】

特定の実施形態では、遺伝子治療ベクターは、ウイルス、例えば、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、レンチウイルス（LV）、ヘルペスウイルス、アルファウイルス、またはレトロウイルス、例えば、モロニーマウス白血病ウイルス（M-MuLV）、モロニーマウス肉腫ウイルス（MoMSV）、ハーベイマウス肉腫ウイルス（HaMuSV）、マウス乳がんウイルス（MuMTV）、テナガザル白血病ウイルス（GaLV）、ネコ白血病ウイルス（FLV）、スプーマウイルス、フレンドマウス白血病ウイルス、マウス幹細胞ウイルス（MSCV）、またはラウス肉腫ウイルス（RSV）に由来するウイルスベ

クターであり得る。LVの使用を包含する実施形態が以下により詳細に記載されているが、当業者は、当該技術分野における同様の知見および技術が非LV遺伝子治療ベクターにも同様に当てはめることができることを理解することが予想される。いくつかの実施形態では、遺伝子治療ベクターは、自己限定型LVである。

【0120】

特に、本明細書に開示される特定の方法は、幹細胞または前駆細胞、例えば造血幹細胞(HSC)または造血前駆細胞(本明細書において「造血前駆体」とも称される)の集団の一方または両方を、治療用ポリペプチド、例えばFANCAをコードするおよび/または発現する遺伝子療法ベクターで形質導入することに関し、一方の集団は、高ストリンジエンシー条件下での選択によって調製され、他方の集団は、低ストリンジエンシー条件下での選択によって調製され、一実施形態では、細胞集団は、CD34+細胞について濃縮される。一実施形態では、HSCまたは造血前駆体は、1つ以上のFANCAコードタンパク質からのタンパク質活性が低下したまたは全くない対象に由来する。一実施形態では、対象は、FA-Aを有する。一実施形態では、HSCの内因性FANCA遺伝子は、欠失および/または変異される。

10

【0121】

一実施形態では、遺伝子治療ベクターで細胞を形質導入することは、遺伝子治療ベクター内の治療剤をコードするポリヌクレオチド配列に作動可能に連結されたプロモーターを含む発現カセットの細胞ゲノムへの組み込みをもたらす。いくつかの実施形態では、遺伝子治療ベクターで細胞を形質導入することは、治療剤、例えば、生物活性FANCAタンパク質の発現をもたらす。

20

【0122】

例えば、生物学的に活性なFANCAタンパク質は、FAコア複合体の一部を形成する。特定の実施形態では、FANCA遺伝子は、ウイルスベクターを介して送達される。一実施形態では、FANCA遺伝子は、レンチウイルスベクターを介して送達される。特定の実施形態では、レンチウイルスベクターは、PGK-FANCA.WPRE*LVである。FANCAレンチウイルスベクター(LV)を用いたFA-A患者からの骨髓(BM)細胞または幹細胞または前駆細胞の形質導入後、治療用ベクターが細胞のゲノムに組み込まれることが企図される。組み込まれると、治療用タンパク質(例えば、ヒトFANCAタンパク質)は、細胞によって発現される。形質導入されたFA細胞は、遺伝子補正され、したがって、FANCD2およびFANCIの単一ユビキチン化によってFA経路を活性化することができる。次いで、これらのタンパク質は、DNA損傷の領域に移動することができ、他のDNA修復タンパク質と協力して、健康な細胞で起こるように、これらの細胞のDNAの修復を促進する。

30

【0123】

本明細書で論じられるように、主題の方法および組成物は、動物の細胞において導入遺伝子、例えば、FANCAを発現することにおいて用途を見出す。例えば、主題の組成物は、例えば、遺伝子が細胞の生存能および/または機能に与える影響を決定するために、研究において使用され得る。別の例として、主題の組成物は、例えば、FAなどの障害を治療するために、医薬品に使用され得る。

40

【0124】

したがって、本開示は、疾患または障害を治療する必要がある対象においてそれを治療する方法であって、本明細書に記載されるように調製された高ストリンジエンシーCD34濃縮細胞集団、および低ストリンジエンシーCD34濃縮細胞集団の組み合わせを対象に提供または投与することを含み、高ストリンジエンシーCD34濃縮細胞集団または低ストリンジエンシーCD34濃縮細胞集団のうちの一方または両方が、治療剤をコードするポリヌクレオチド配列を含むか、または治療剤を発現する発現カセットを含む組換え遺伝子治療ベクターで形質導入され、治療剤が、疾患または障害を治療するのに有効である、方法を提供する。特定の実施形態では、疾患はFAであり、治療剤は、ファンconi貧血相補群A(FANCA)ポリペプチドまたはその機能的バリエーションもしくは断片である。

50

【 0 1 2 5 】

特定の実施形態では、方法は、(a) 高ストリンジェンシー条件下で C D 3 4 + 細胞を選択することによって、対象から得られた第 1 の生体試料から高ストリンジェンシー C D 3 4 濃縮細胞集団を調製する段階、(b) 低ストリンジェンシー条件下で C D 3 4 + 細胞を選択することによって、対象から得られた第 2 の生体試料から低ストリンジェンシー C D 3 4 濃縮細胞集団を調製する段階、(c) 高ストリンジェンシー C D 3 4 濃縮細胞集団または低ストリンジェンシー C D 3 4 濃縮細胞集団の一方または両方を、治療薬をコードするポリヌクレオチド配列を含む組換え遺伝子治療ベクターで形質導入する段階、および(d) 高ストリンジェンシー C D 3 4 濃縮細胞集団および低ストリンジェンシー C D 3 4 濃縮細胞集団を対象に提供または投与する段階を含み、高ストリンジェンシー C D 3 4 濃縮細胞集団または低ストリンジェンシー C D 3 4 濃縮細胞集団の一方または両方に組換え遺伝子治療ベクターを形質導入し、治療剤は、疾患または障害を治療するのに有効である。特定の実施形態では、疾患は F A であり、治療剤は、ファンコニ貧血相補群 A (F A N C A) ポリペプチドまたはその機能的バリエーションもしくは断片である。特定の実施形態では、2 つの細胞集団のそれぞれから得られた細胞の全てが、患者に投与される。2 つの細胞集団の各々の細胞用量は、類似しているかまたは異なり得、例えば、より多くの総細胞およびより多くの総 C D 3 4 + 細胞は、低ストリンジェンシーの集団に由来する。特定の実施形態では、最初に患者から得られた細胞は、2 つのほぼ等しい集団に分けられ、1 つの集団は、高ストリンジェンシー C D 3 4 + 選択条件下で処理され、1 つは、低ストリンジェンシー C D 3 4 + 選択条件下で処理され、これにより、低ストリンジェンシー選択プロセスに起因する約 2 倍以上の C D 3 4 + 細胞、および総細胞の 5 ~ 1 0 倍以上をもたらす得る。

10

20

【 0 1 2 6 】

本明細書に記載される治療方法のうちのいずれかの特定の実施形態では、第 1 の生体試料および第 2 の生体試料は、それぞれ独立して、末梢血または骨髄である。特定の実施形態では、第 1 の生体試料および第 2 の生体試料は、対象が G - C S F、プレリキサフォル、または G - C S F およびプレリキサフォルの組み合わせで治療された後に得られた末梢血である。

【 0 1 2 7 】

本明細書に記載される治療方法の特定の実施形態では、高ストリンジェンシー条件下で C D 3 4 + 細胞を選択することは、C D 3 4 + 細胞と結合するカラムに第 1 の生体試料を適用することと、洗浄緩衝液を使用して負荷されたカラムを 1 回以上洗浄することと、溶出緩衝液を使用してカラムから高ストリンジェンシー C D 3 4 濃縮細胞集団を溶出することとを含む。一実施形態では、適用ステップは、5 ~ 1 0 m L / 分、5 ~ 1 5 m L / 分、1 5 ~ 2 0 m L / 分、2 0 ~ 2 5 m L / 分、または 2 5 ~ 3 0 m L / 分で実行される。一実施形態では、溶出ステップは、5 ~ 1 0 m L / 分、5 ~ 1 5 m L / 分、1 5 ~ 2 0 m L / 分、2 5 ~ 2 5 m L / 分、または 2 5 ~ 3 0 m L / 分で実行される。一実施形態では、適用ステップは、1 0 ~ 2 0 m L / 分で実行される。一実施形態では、溶出ステップは、2 0 m L / 分で実行される。

30

【 0 1 2 8 】

本明細書に記載される治療方法の特定の実施形態では、低ストリンジェンシー条件下で C D 3 4 + 細胞を選択することは、C D 3 4 + 細胞と結合するカラムに第 2 の生体試料を負荷することと、第 2 の生体試料をカラムに流れさせることと、溶出緩衝液を使用してカラムから低ストリンジェンシー C D 3 4 濃縮細胞集団を溶出することとを含む。一実施形態では、適用ステップは、5 ~ 1 0 m L / 分、5 ~ 1 5 m L / 分、1 5 ~ 2 0 m L / 分、2 0 ~ 2 5 m L / 分、または 2 5 ~ 3 0 m L / 分で実行される。一実施形態では、溶出ステップは、5 ~ 1 0 m L / 分、5 ~ 1 5 m L / 分、1 5 ~ 2 0 m L / 分、2 5 ~ 2 5 m L / 分、または 2 5 ~ 3 0 m L / 分で実行される。一実施形態では、適用ステップは、1 0 ~ 2 0 m L / 分で実行される。一実施形態では、溶出ステップは、2 0 m L / 分で実行される。

40

50

【 0 1 2 9 】

本明細書に記載される治療方法の特定の実施形態では、高ストリンジェンシーCD34濃縮細胞集団は、形質導入され、かつ/または低ストリンジェンシーCD34濃縮細胞集団は、形質導入される。

【 0 1 3 0 】

いくつかの実施形態では、主題の方法は、障害の発症を予防する、障害の進行を停止する、障害の進行を逆転させるなどの治療的利益をもたらす。例えば、一実施形態では、障害は、FAである。別の実施形態では、疾患または障害は、BMFである。一実施形態では、障害は、血小板減少である。別の実施形態では、障害は、白血球減少である。一実施形態では、障害は、汎細胞減少である。一実施形態では、障害は、好中球減少である。別の実施形態では、障害は、貧血である。いくつかの実施形態では、主題の方法は、治療的利益が達成されていることを検出するステップを含む。当業者は、かかる治療的利益の測定値が改善される特定の疾患に適用可能であることを理解し、治療有効性を測定するために使用する適切な検出方法を認識するであろう。

10

【 0 1 3 1 】

実施例でさらに詳細に記載されるように、末梢血生体試料に動員され、本発明の方法に従って投与される骨髓細胞に関する臨床データは、既存の技術の方法によって移植された他のFA患者と比較して、予想外に、より迅速なインビボ選択生着動態を示した。特定の実施形態では、本開示の方法および組成物は、FAを治療するために使用される。

【 0 1 3 2 】

したがって、本発明は、FA、またはFAの1つ以上の血液学的徴候の治療方法を提供する。一実施形態では、FAの血液学的徴候は、骨髓不全(BMF)、血小板減少、白血球減少、汎血球減少、好中球減少、および貧血のうちの1つ以上から選択される。特定の実施形態では、血液学的徴候はBMFであり、ほとんどのFA患者の小児年齢に現れる。一実施形態では、血液学的徴候は、血小板減少である。別の実施形態では、血液学的徴候は、白血球減少である。一実施形態では、血液学的徴候は、汎細胞減少である。一実施形態では、血液学的徴候は、好中球減少である。別の実施形態では、血液学的徴候は、貧血である。一実施形態では、血液学的徴候は、BMF、血小板減少、白血球減少、汎細胞減少、好中球減少、および貧血のうちの2つ以上の組み合わせである。

20

【 0 1 3 3 】

CRISPR/Cas9遺伝子編集システムなどを使用して、内因性FANCG遺伝子(例えば、FANCA、FANCC、および/またはFANCG)を修復することも、本発明の目的である。ファンコニ貧血に関連する遺伝子のCas9を介した修復は、例えば、Obsorn et al. Fanconi anemia gene editing by the CRISPR/Cas9 system. Hum Gene Ther. 2015 Feb; 26(2): 114-26で、インビトロで実証されている。本発明は、修復のインビボ効率の向上および骨髓の再構成の向上をもたらすファンコニ貧血を治療するための方法、ならびに遺伝的に改変された細胞を調製する方法を提供する。いくつかの事例では、遺伝子編集システムは、単一のヌクレオチド多型、欠失、挿入、インデル、または別の遺伝子欠損を修復する。修復は、いくつかの事例において、遺伝子のコード領域、イントロン、または上流もしくは下流領域、例えば、疾患または障害に関連する遺伝子に近位または遠位のゲノムの遺伝子調節領域に向けられる。

30

40

【 0 1 3 4 】

本発明の方法の一実施形態では、本開示は、ファンコニ貧血の治療を必要とする対象においてそれを治療するための方法であって、高ストリンジェンシー条件下でCD34⁺細胞を選択することによって、対象から得られた第1の生体試料から高ストリンジェンシーCD34濃縮細胞集団を調製する段階、低ストリンジェンシー条件下でCD34⁺細胞を選択することによって、対象から得られた第2の生体試料から低ストリンジェンシーCD34濃縮細胞集団を調製する段階、高ストリンジェンシーCD34濃縮細胞集団または低ストリンジェンシーCD34濃縮細胞集団の一方または両方をファンコニ貧血に対する組

50

換え遺伝子治療ベクターと接触させる段階、ならびに高ストリンジェンシーCD34濃縮細胞集団および低ストリンジェンシーCD34濃縮細胞集団を対象に投与する段階を含み、高ストリンジェンシーCD34濃縮細胞集団または低ストリンジェンシーCD34濃縮細胞集団の一方または両方を組換え遺伝子治療ベクターと接触させ、遺伝子治療ベクターが、内因性遺伝子の指示された修復が可能な遺伝子編集システムを含み、それによりファンconi貧血を治療する、方法を提供する。いくつかの事例では、遺伝子編集システムは、CRISPR-Casシステム（例えば、CRISPR-Cas9）である。

【0135】

いくつかの実施形態では、遺伝子編集システムは、プロモーターに作動可能に連結されたCas、Cas9、またはspCas遺伝子産物（mRNA、cDNA、プラスミドなど）をコードする核酸を含む。いくつかの実施形態では、遺伝子編集システムは、Cas、Cas9、またはspCasタンパク質をコードする核酸を含む。いくつかの事例では、遺伝子治療ベクターは、リボソームもしくは脂質ナノ粒子、または他の脂質系もしくは脂質様送達システムである。いくつかの事例では、遺伝子治療ベクターは、レンチウイルス、アデノウイルス、またはアデノ随伴ウイルスなどのウイルスである。いくつかの実施形態では、遺伝子編集システムは、ガイドRNA、例えば、単一ガイドRNA（sgRNA）、および任意で修復鋳型を含む。修復鋳型およびガイドRNAは、いくつかの事例では、異なる分子であるか、またはいくつかの事例では、同じ分子である。修復鋳型およびガイドRNAは、共有的または非共有的に連結され得る。ガイドRNAは、いくつかの事例では、Cas、Cas9、またはspCasタンパク質に事前に負荷される。遺伝子編集システムの成分は、いくつかの事例では、単一の遺伝子治療ベクターで送達される。いくつかの事例では、遺伝子編集システムは、個別の遺伝子治療ベクターで送達される。複数の遺伝子治療ベクターを使用することができる。例えば、限定されないが、複数の遺伝的病変は、同じまたは異なる遺伝子治療ベクターで修復できる。いくつかの事例では、2つ以上のFANC遺伝子が同時に修復される。いくつかの事例では、一方の遺伝子治療ベクターを高ストリンジェンシーCD34濃縮細胞集団と接触させ、別の遺伝子治療ベクターを低ストリンジェンシーCD34濃縮細胞集団と接触させる。いくつかの事例では、2つの遺伝子治療ベクターは同じである。いくつかの事例では、一方の遺伝子治療ベクターは、所与の遺伝子（例えば、FANCA）に関連する障害のための導入遺伝子を含み、他方の遺伝子治療ベクターは、遺伝子編集システムを含む。

【0136】

いくつかの事例では、遺伝子治療ベクターは、疾患または障害に関連する遺伝子以外の遺伝子の導入遺伝子を提供するか、または修復する。例えば、限定されないが、遺伝子療法ベクターは、免疫エフェクタ遺伝子を上方または下方制御し得、細胞表面マーカーを変更し得、代替のMHC分子を提供し得、または免疫グロブリン遺伝子をコードし得る。いくつかの事例では、遺伝子療法ベクターまたはベクターは、免疫マーカー（例えば、HLAまたはMHC遺伝子）を変更させるか、または免疫エフェクタ遺伝子の発現を引き起こすことによって、同種または不一致のドナー移植の使用を提供することが特に企図される。

【0137】

いくつかの実施形態では、疾患または障害の治療を必要とする対象においてそれを治療する方法であって、高ストリンジェンシーCD34濃縮細胞集団および低ストリンジェンシーCD34濃縮細胞集団の組み合わせを対象に提供することを含み、両方とも対象から得られた1つ以上の生体試料から調製され、対象から得られたCD34細胞が、疾患または障害と関連するかまたはその原因となる1つ以上の遺伝子変異を含み、高ストリンジェンシーCD34濃縮細胞集団または低ストリンジェンシーCD34濃縮細胞集団の一方または両方が、対象に細胞集団を提供する前に、1つ以上の遺伝子変異を修復するために遺伝子編集に供される、方法を提供する。特定の実施形態では、遺伝子編集は、CD34濃縮細胞集団の一方または両方をCas（例えば、Cas9またはspCas）タンパク質、ガイドRNA（例えば、単一ガイドRNA、sgRNA）、および修復鋳型と接触させることによって実行される。特定の実施形態では、疾患はFAであり、修復される遺伝子

10

20

30

40

50

変異は、ファンコニ貧血相補群 A (F A N C A) 遺伝子の変異である。

【 0 1 3 8 】

特定の実施形態では、本明細書に開示される遺伝子治療ベクターは、治療剤をコードする配列、すなわちコード配列に作動可能に連結されたプロモーターを含むポリヌクレオチドを含む。本明細書で使用される場合、「作動可能に連結された」という用語は、プロモーターが治療剤をコードする配列の発現を駆動することができることを意味する。

【 0 1 3 9 】

いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、1つ以上のエンハンサを含む。エンハンサは、転写を増強するために当該技術分野で既知の核酸要素であり、例えば、上流、下流、イントロン内など、それらが調節する遺伝子と関連する任意の場所に位置することができる。任意のエンハンサ要素は、プロモーターと組み合わせて使用される場合に遺伝子の発現を増強する限り、本開示のポリヌクレオチドカセットおよび遺伝子治療ベクターに使用することができる。

10

【 0 1 4 0 】

細胞で発現されるコード配列は、任意のポリヌクレオチド配列、例えば、遺伝子産物、例えば、ポリペプチドまたはRNA系治療剤 (s i R N A 、 アンチセンス、リボザイム、 s h R N A など) をコードする遺伝子または c D N A であり得る。コード配列は、それが作動可能に連結されたプロモーター配列に対して異種であり得る、すなわち、天然ではそれと作動可能に会合していない。代替的に、コード配列は、それが作動可能に連結されたプロモーター配列に対して内在性であり得る、すなわち、天然ではそのプロモーターと会合している。遺伝子産物は、哺乳動物細胞において内因的に作用し得るか、または外因的に作用し得、例えば、それは分泌され得る。例えば、導入遺伝子が治療用遺伝子である場合、コード配列は、疾患または障害を治療するための治療薬として使用することができる所望の遺伝子産物またはその機能的断片もしくはバリエーションをコードする任意の遺伝子であり得る。種々の実施形態では、導入遺伝子は、ヒト F A N C A をコードする。

20

【 0 1 4 1 】

本発明の一実施形態では、導入遺伝子コード配列は、出現頻度の低いコドンにより高い出現頻度のコドンで置き換えることによって発現を増強するように改変されるかまたは「コドン最適化される」。コード配列は、翻訳のためにアミノ酸をコードする m R N A 配列の一部である。翻訳中、61個のトリヌクレオチドコドンの各々が20個のアミノ酸のうちの1つに翻訳され、遺伝暗号に縮重または重複性が生じる。しかしながら、異なる細胞腫および異なる動物種は、同じアミノ酸をコードする t R N A (各々がアンチコドンを含む) を異なる頻度で利用する。遺伝子配列が、対応する t R N A での出現頻度の低いコドンを含む場合、リボソーム翻訳機構が遅くなり、効率的な翻訳が妨げられる可能性がある。特定の種に対する「コドン最適化」によって発現を改善することができ、コード配列は、同じタンパク質配列をコードするが、高度に出現するコドンを利用する、かつ/または高度に発現するヒトタンパク質によって利用されるように改変される (C i d - A r r e g u i e t a l . , 2 0 0 3 ; J . V i r o l . 7 7 : 4 9 2 8) 。本発明の一態様では、導入遺伝子のコード配列は、哺乳動物または霊長類において発現頻度の低いコドンを、霊長類において発現頻度の高いコドンで置き換えるように改変される。例えば、いくつかの実施形態では、導入遺伝子によってコードされるコード配列は、上記また本明細書に開示される配列によってコードされるポリペプチドと少なくとも85%の配列同一性、例えば、少なくとも90%の配列同一性、例えば、少なくとも95%の配列同一性、少なくとも98%の配列同一性、または少なくとも99%配列同一性を有するポリペプチドをコードし、コード配列の少なくとも1つのコドンは、上記または本明細書に開示される配列の対応するコドンよりもヒトにおいてより高い t R N A 頻度を有する。

30

40

【 0 1 4 2 】

本発明の追加の実施形態では、導入遺伝子コード配列は、所望の導入遺伝子をコードしないオープンリーディングフレーム (O R F) の終結または除去により発現を増強するように改変される。オープンリーディングフレーム (O R F) は、開始コドンに続き、終止

50

コドンを含まない核酸配列である。ORFは、目的の遺伝子と比較して、順方向または逆方向であり得、「フレーム内」または「フレーム外」であり得る。かかるオープンリーディングフレームは、目的の遺伝子と並んで発現カセットで発現される可能性を有し、望ましくない悪影響をもたらす可能性がある。本発明の一態様では、導入遺伝子のコード配列は、コドン使用頻度をさらに変更することによって、オープンリーディングフレームを除去するように改変されている。これは、開始コドン(ATG)を除去し、逆方向またはフレーム外ORFでの終止コドン(TAG、TAA、またはTGA)を導入することによって実行され得るが、一方で、アミノ酸配列を保存し、目的の遺伝子中で高度に利用されるコドンを維持する(すなわち、頻度が20%未満のコドンを回避する)。本開示において、導入遺伝子コード配列は、コドン最適化および非導入遺伝子ORFの除去のいずれか、または両方の手法を使用して最適化され得る。当業者には明白であろうように、コドン最適化中に導入されるORFを除去するために、コドン最適化後に非導入遺伝子ORFを除去または最小化することが好ましい。

10

【0143】

本開示は、本明細書に記載の発現カセットまたは導入カセットを含むプラスミドを含む。特定の実施形態では、プラスミドは、pCCL-PGK-FANCA-WPRE*(配列番号:24)であり、かつ/またはプラスミドは、pCCL-PGK-FANCA-WPRE(配列番号:25)からの発現カセットを含む。

【0144】

特定の実施形態では、遺伝子治療ベクターまたはその中の遺伝子導入カセットは、1つ以上の追加の要素、例えば、5'LTR、3'LTR、cPPT、CTS、RRE、エンハンサ配列、およびパッケージングシグナルから選択される1つ以上の要素を含む。いくつかの実施形態では、遺伝子治療ベクターまたは遺伝子導入カセットは、国際特許公開第WO 2018/049273 A1号に開示される任意のベクターまたはカセットであり、その開示は、あらゆる目的のためにその全体が本明細書に組み込まれる。ファンconi貧血相補群(FANC)ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列には、米国特許第5,952,190号に開示されるものが含まれ、その開示は、あらゆる目的のためにその全体が本明細書に組み込まれる。

20

【0145】

RRE配列は、遺伝子導入の効率を向上させる。本明細書に記載される発現カセットおよび遺伝子治療ベクターのいずれかの特定の実施形態では、RRE配列は、以下の配列、または以下の配列と少なくとも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%、または少なくとも99%の同一性を有する配列(いずれも5'から3'方向に表示される)のいずれかを含むか、またはそれからなる:

30

40

50

AGGAGCTTTGTTTCCTTGGGTTCTTGGGAGCAGCAGGAAGCACTATGGGCGCAGCGTCAATGACGCTGACGGTACA
 GGCCAGACAATTATTGTCTGGTATAGTGCAGCAGCAGAACAATTTGCTGAGGGCTATTGAGGGCGAACAGCATCT
 GTTGCAACTCACAGTCTGGGGCATCAAGCAGCTCCAGGCAAGAATCCTGGCTGTGGAAAGATACCTAAAGGATCA
 ACAGCTCCT (配列番号：1)；

GATCTTCAGACCTGGAGGAGGAGATATGAGGGACAATTGGAGAAGTGAATTATATAAAATATAAAGTAGTAAAAAT
 TGAACCATTAGGAGTAGCACCCACCAAGGCAAAGAGAAGAGTGGTGCAGAGAGAAAAAAGAGCAGTGGGAATAGG
 AGCTTTGTTTCCTTGGGTTCTTGGGAGCAGCAGGAAGCACTATGGGCGCAGCGTCAATGACGCTGACGGTACAGGC
 CAGACAATTATTGTCTGGTATAGTGCAGCAGCAGAACAATTTGCTGAGGGCTATTGAGGGCGAACAGCATCTGTT
 GCAACTCACAGTCTGGGGCATCAAGCAGCTCCAGGCAAGAATCCTGGCTGTGGAAAGATACCTAAAGGATCAACA
 GCTCCTGGGGATTTGGGGTTGCTCTGGAAAACCTATTTGCACCCTGCTGTGCCTTGGAAATGCTAGTTGGAGTAA
 TAAATCTCTGGAACAGATTTGGAATCACACGACCTGGATGGAGTGGGACAGAGAAATTAACAATTACACAAGCTT
 AATACACTCCTTAATTGAAGAATCGCAAACCAGCAAGAAAAGAATGAACAAGAATTATTGGAATTAGATAAATG
 GGCAAGTTTGTGGAATTGGTTAACATAACAAATTTGGCTGTGGTATATAAAATTTATTACATAATGATAGTAGGAGG
 CTTGGTAGGTTTAAGAATAGTTTTTGTGTACTTTCTATAGTGAATAGAGTTAGGCAGGGATATTCACCATTATC
 GTTTCAGACCCACCTCCCAACCCGAGGGGACCCGACAGGCCGAAGGAATAGAAGAAGAAGGTGGAGAGAGAGA
 CAGAGACAGATCCATTGATTAGTGAACGGATC (配列番号：26)；または

配列番号：24のヌクレオチド2649～2882もしくは配列番号：25のポリヌクレ
 オチド1296～2153を含むかまたはそれからなる配列。

【0146】

レトロウイルスリーダー領域は、パッケージングシグナル()を含有し、レトロウイ
 ルスゲノムをウイルスカプシドにパッケージ化することに関与する。LVベクターは、こ
 の領域におけるGag遺伝子の約300bpを必要とすると考えられた。現在、このGag
 配列は、わずか40bpに減少している(図65)。本明細書に記載される発現カセッ
 トおよび遺伝子治療ベクターのいずれかの特定の形態では、配列は、HIV-1
 配列であるか、または配列は、以下の配列、または以下の配列と少なくとも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%、または少な
 なくとも99%の同一性を有する配列のいずれかを含むか、またはそれからなる：

CTCTCTCGACGCAGGACTCGGCTTGCTGAAGCGCGCACGGCAAGAGGCGAGGGGCGGCGACTGGTGAGTACGCCA
 AAAATTTTGGACTAGCGGAGGCTAGAAGGAGAGAGATGGGTGCGAGAGCGTC (配列番号：2)；

TGAGTACGCCAAAAATTTTGGACTAGCGGAGGCTAGAAGGAGAGA (配列番号：27)；または

配列番号：24のポリヌクレオチド2031～2156もしくは配列番号：25のポリヌ
 クレオチド889～933を含むかまたはそれからなる配列。

【0147】

本明細書に記載される発現カセットおよび遺伝子治療ベクターのいずれかの特定の形態
 では、切断型HIV-15'LTRは、以下の配列、または以下の配列のいずれかと少
 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%、または少なくとも99%の同一性を有する配列のいずれかを含むか、またはそれ
 からなる：

10

20

30

40

50

GGGTCTCTCTGGTTAGACCAGATCTGAGCCTGGGAGCTCTCTGGCTAACTAGGGAACCCACTGCTT
 AAGCCTCAATAAAGCTTGCCCTTGAGTGCTTCAAGTAGTGTGTGCCCGTCTGTTGTGTGACTCTGGTAACTAGAGA
 TCCCTCAGACCCTTTTAGTCAGTGTGGAAAATCTCTAGCA (配列番号 : 3);

GTCTCTCTGGTTAGACCAGATCTGAGCCTGGGAGCTCTCTGGCTAACTAGGGAACCCACTGCTTAA
 GCCTCAATAAAGCTTGCCCTTGAGTGCTTCAAGTAGTGTGTGCCCGTCTGTTGTGTGACTCTGGTAACTAGAGATC
 CCTCAGACCCTTTTAGTCAGTGTGGAAAATCTCTAGCAGTGGCGCCC (配列番号 : 28);または

10

配列番号 : 24 のポリヌクレオチド 1586 ~ 9495 もしくは配列番号 : 25 のポリヌ
 クレオチド 934 ~ 1295 を含むかまたはそれからなる配列。

【 0 1 4 8 】

本明細書に記載される発現カセットおよび遺伝子治療ベクターのいずれかの特定の実施
 形態では、HIV-1 自己不活化 3'LTR は、以下の配列、または以下の配列と少なくと
 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%
 、または少なくとも 99% の同一性を有する配列のいずれかを含むか、またはそれからなる
 る :

TGGAAGGGCTAATTCACCTCCCAACGAAGACAAGATCTGCTTTTTGCTTGTACTGGGTCTCTCTGGTTAGACCAGA
 TCTGAGCCTGGGAGCTCTCTGGCTAACTAGGGAACCCACTGCTTAAGCCTCAATAAAGCTTGCCCTTGAGTGCTTC
 AAGTAGTGTGTGCCCGTCTGTTGTGTGACTCTGGTAACTAGAGATCCCTCAGACCCTTTTAGTCAGTGTGGAAAA
 TCTCTAGCA (配列番号 : 4);

20

TGGAAGGGCTAATTCACCTCCCAACGAAGACAAGATCTGCTTTTTGCTTGTACTGGGTCTCTCTGGTTAGACCAGA
 TCTGAGCCTGGGAGCTCTCTGGCTAACTAGGGAACCCACTGCTTAAGCCTCAATAAAGCTTGCCCTTGAGTGCTTC
 AAGTAGTGTGTGCCCGTCTGTTGTGTGACTCTGGTAACTAGAGATCCCTCAGACCCTTTTAGTCAGTGTGGAAAA
 TCTCTAGCA (配列番号 : 29);または

30

配列番号 : 24 のポリヌクレオチド 9262 ~ 9495 もしくは配列番号 : 25 のポリヌ
 クレオチド 8056 ~ 8289 を含むかまたはそれからなる配列。

【 0 1 4 9 】

本明細書に記載される発現カセットおよび遺伝子治療ベクターのいずれかの特定の実施
 形態では、ヒトサイトメガロウイルス (CMV) 前初期プロモーターは、以下の配列、そ
 の機能的断片、または以下の配列のいずれかと少なくとも 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%、または少なくとも 99% の同一
 性を有する配列のいずれかを含むか、またはそれからなる :

40

50

GTGATGCGGTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATAGCGTTTTGACTCACGGGGATTTCCAAGTCTCCACCCC
 ATTGACGTCAATGGGAGTTTTGTTTTGGCACCAAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTCGTAACAACCTCCGCCCA
 TTGACGCAAATGGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCT (配列番号 : 5);

ACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCCG
 CGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCCGCCCATTTGACGTCAATAATGAC
 GTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCA
 CTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCCGCTG
 GCATTATGCCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTAC
 CATGGTGTATGCGGTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATAGCGTTTTGACTCACGGGGATTTCCAAGTCTCCA
 CCCCATTTGACGTCAATGGGAGTTTTGTTTTGGCACCAAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTCGTAACAACCTCCGC
 CCCATTGACGCAAATGGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGC (配列番号 : 30); または

配列番号 : 24 のポリヌクレオチド 1586 ~ 1789 もしくは配列番号 : 25 のポリヌ
 クレオチド 1 ~ 577 を含むかまたはそれからなる配列。

【 0 1 5 0 】

本明細書に記載される発現カセットおよび遺伝子治療ベクターのいずれかの特定の実施
 形態では、ラウス肉腫ウイルス (R S V) プロモーターは、以下の配列、その機能的断片
 、または以下の配列のいずれかと少なくとも 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 %、または少なくとも 99 % の同一性を有する配
 列のいずれかを含むか、またはそれからなる :

TTAATGTAGTCTTATGCAATACTCTTGTAGTCTTGCACATGGTAACGATGAGTTAGCAACATGCCTTACAAGGA
 GAGAAAAAGCACCGTGATGCCGATTGGTGGAAAGTAAGGTGGTACGATCGTGCCTTATTAGGAAGGCAACAGACG
 GGTCTGACATGGATTGGACGAACCACTGAATTGCCGCATTGCAGAGATATTGTATTTAAGTGCCTAGCTCGATA
 AATAAACG (配列番号 : 31)。

【 0 1 5 1 】

統合前複合体の核移行を促進する c P P T は、逆転写酵素の分離に関与する C T S と共
 に、ウイルス力価を改善することが確認されている (Z e n n o u , e t a l . 2 0 0
 0 ; F o l l e n z i e t a l . 2 0 0 0) 。本明細書に記載される発現カセットおよ
 び遺伝子治療ベクターのいずれかの特定の実施形態では、H I V - 1 (c P P T / C T S
) の中枢ポリプリン管および中枢終結配列は、以下の配列、その機能的断片、または以下
 の配列のいずれかと少なくとも 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 %、または少なくとも 99 % の同一性を有する配列のいずれか
 を含むか、またはそれからなる :

TTTTAAAAGAAAAGGGGGGATTTGGGGGTACAGTGCAGGGGAAAGAATAGTAGACATAATAGCAACAGACATACA
 AACTAAAAGAAATTACAAAAACAAATTACAAAAATTCAAAATTTT (配列番号 : 6);

TTTTAAAAGAAAAGGGGGGATTTGGGGGT (配列番号 : 12);

AAAAGAAAAGGGGGGA (配列番号 : 32);

TTGGGGGTACAGTGCAGGGGAAAGAATAGTAGACATAATAGCAACAGACATACAACTAAAGAATTACAAAAAC
 AAATTACAAAAATTCAAAATTTTATCGATCACGAGACTAGCCTCGA (配列番号 : 33); または

配列番号 : 24 のヌクレオチド 3378 ~ 3495 もしくは配列番号 : 25 のヌクレオチ

ド 2 1 7 6 ~ 2 3 1 2 を含むかまたはそれからなる配列。

【 0 1 5 2 】

本明細書に記載される発現カセットおよび遺伝子治療ベクターのいずれかの特定の実施形態では、ヒトホスホグリセリン酸キナーゼ 1 (h P G K) プロモーターは、以下の配列、その機能的断片、または以下の配列のいずれかと少なくとも 8 0 %、少なくとも 8 5 %、少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 8 %、または少なくとも 9 9 % の同一性を有する配列のいずれかを含むか、またはそれからなる：

GGGGTTGGGGTTGCGCCTTTTCCAAGGCAGCCCTGGGTTTTCGCGAGGGACGCGGCTGCTCTGGGCGTGGTTCCGG
GAAACGCAGCGGCGCCGACCCTGGGTCTCGCACATTCTTCACGTCCGTTTCGAGCGTCACCCGGATCTTCGCCGC
TACCCTTGTGGGCCCCCGGCGACGCTTCTGCTCCGCCCTAAGTCGGGAAGGTTCTTTCGCGTTTCGCGGCGTG
CCGGACGTGACAAACGGAAGCCGCACGTCTACTAGTACCCTTCGAGACGGACAGCGCCAGGGAGCAATGGCAGC
GCGCCGACCGCGATGGGCTGTGGCCAATAGCGGCTGCTCAGCAGGGCGCGCCGAGAGCAGCGGCCGGGAAGGGGC
GGTTCGGGAGGCGGGGTGTGGGGCGGTAGTGTGGGCCCTGTTTCTGCCCAGCGGTTTCCGCATTCTGCAAGCC
TCCGGAGCGCACGTCCGGCAGTCGGCTCCCTCGTTGACCGAATCACCGACCTCTCTCCCCAG (配列番号 :
7); または

10

配列番号 : 2 4 のヌクレオチド 3 5 4 1 ~ 4 0 5 1 もしくは配列番号 : 2 5 のヌクレオチド 2 3 3 5 ~ 2 8 4 5 を含むかまたはそれからなる配列。

20

【 0 1 5 3 】

特定の実施形態では、本明細書に開示される発現カセットおよび遺伝子治療ベクターは、1つ以上の追加の要素、例えば、CMV プロモーターおよび/またはエンハンサ、SV 40 ポリ A 配列、複製起点、例えば、SV 40 ori 配列、または本明細書に開示される要素のいずれかをさらに含む。

【 0 1 5 4 】

本明細書に記載される発現カセットおよび遺伝子治療ベクターの特定の実施形態では、ヒト CMV エンハンサは、以下の配列、その機能的断片、または以下の配列と少なくとも 8 0 %、少なくとも 8 5 %、少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 8 %、または少なくとも 9 9 % の同一性を有する配列を含むか、またはそれからなる：

30

GACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCC
GCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCCGCCATTGACGTCAATAATGA
CGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCC
ACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCT
GGCATTATGCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTA
CCATG (配列番号 : 9)。

【 0 1 5 5 】

40

本明細書に記載される発現カセットおよび遺伝子治療ベクターのいずれかの特定の実施形態では、サルウイルス 40 (SV 40) ポリ (A) シグナルは、以下の配列、その機能的断片、または以下の配列と少なくとも 8 0 %、少なくとも 8 5 %、少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 8 %、または少なくとも 9 9 % の同一性を有する配列を含むか、またはそれからなる：

AACTTGTTTATTGCGCCTTATAATGGTTACAAATAAAGCAATAGCATCACAAATTTACAAATAAAGCATTTTTT
TCACTGCATTCTAGTTGTGGTTTGTCCAACTCATCAATGTATCTTA (配列番号 : 10); または

配列番号 : 2 5 のヌクレオチド 8 3 6 1 ~ 8 4 8 2 を含むかまたはそれからなる配列。

50

【 0 1 5 6 】

本明細書に記載される発現カセットおよび遺伝子治療ベクターのいずれかの特定の実施形態では、SV40複製起点は、以下の配列、その機能的断片、または以下の配列と少なくとも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%、または少なくとも99%の同一性を有する配列を含むか、またはそれからなる：

ATCCCGCCCTAACTCCGCCAGTTCCGCCATTCTCCGCCCATGGCTGACTAATTTTTTTTATTTATGCAGAGGCCGAGGCCCTCGGCCTCTGAGCTATTCCAGAAGTAGTGAGGAGGCTTTTTTGGAGGCC (配列番号 : 11) ;

GGCTCCAAAAAAGCCTCCTCACTACTTCTGGAATAGCTCAGAGGCCGAGGCCCTCGGCCTCTGCATAAATAA
AAAAAATTAGTCAGCCATGGGGCGGAGAATGGGCGGAACTGGGCGGAGTTAGGGCGGGATGGGCGGAGTTAGGG
GCGGGA (配列番号 : 34) ; または

10

配列番号 : 25 のヌクレオチド 8502 ~ 8657 を含むかまたはそれからなる配列。

【 0 1 5 7 】

本明細書に記載の発現カセットおよび遺伝子治療ベクターのいずれかのいくつかの実施形態では、本明細書に記載される発現カセットまたは遺伝子治療ベクターのいずれかに存在するdNEFシグナルは、以下の配列、その機能的断片、または以下の配列と少なくとも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%、または少なくとも99%の同一性を有する配列を含むか、またはそれからなる：

GAATTCGAGCTCGGTACCTTTAAGACCAATGACTTACAAGGCAGCTGTAGATCTTAGCCACTTTTTAAAGAAAA
GGGGGGAC (配列番号 : 13)。

20

【 0 1 5 8 】

本明細書に記載される発現カセットおよび遺伝子治療ベクターのいずれかの特定の実施形態では、本明細書に記載される発現カセットまたは遺伝子治療ベクターのいずれかに存在するKanR配列は、以下の配列を含むか、またはそれからなる：

ATGATTGAACAAGATGGATTGCACGCAGGTTCTCCGGCGGCTTGGGTGGAGAGGCTATTCGGCTATGACTGGGCA
CAACAGACAAATCGGCTGCTCTGATGCCGCCGTGTTCCGGCTGTCAGCGCAGGGGCGTCCGGTTCTTTTTGTCAAG
ACCGACCTGTCCGGTGCCCTGAATGAACTGCAAGACGAGGCAGCGCGGCTATCGTGGCTGGCGACGACGGGCGTT
CCTTGCGCGGCTGTGCTCGACGTTGTCACTGAAGCGGGAAGGGACTGGCTGCTATTGGGCGAAGTGCCGGGGCAG
GATCTCCTGTCACTCACCTTGCTCCTGCCGAGAAAGTATCCATCATGGCTGATGCAATGCGGCGGCTGCATACG
CTTGATCCGGCTACCTGCCCATTCGACCACCAAGCGAAACATCGCATCGAGCGAGCACGTAATCGGATGGAAGCC
GGTCTTGTGATCAGGATGATCTGGACGAAGAGCATCAGGGGCTCGCGCCAGCCGAACTGTTCCGCAGGCTCAAG
GCGTCTATGCCCCGACGGCGAGGATCTCGTCGTGACCCACGGCGATGCCTGCTTGCCGAATATCATGGTGGAAAAT
GGCCGCTTTTCTGGATTTCATCGACTGTGGCCGTCTGGGTGTGGCGGACCGCTATCAGGACATAGCGTTGGCTACC
CGTGATATTGCTGAAGAGCTTGGCGGCAATGGGCTGACCGCTTCCTTGTGCTTTACGGTATCGCCGCGCCCGAT
TCGACGCGCATCGCCTTCTATCGCCTTCTTGACGAGTTCTTCTGA (配列番号 : 14)。

30

40

【 0 1 5 9 】

本明細書に記載される発現カセットおよび遺伝子治療ベクターのいずれかの特定の実施形態では、本明細書に記載される発現カセットまたは遺伝子治療ベクターのいずれかに存在するRNA-OUT配列は、以下の配列を含むか、またはそれからなる：

50

GTAGAATTGGTAAAGAGAGTCGTGTAAAATATCGAGTTCGCACATCTTGTGTCTGATTATTGATTTTTGGCGAA
 ACCATTTGATCATATGACAAGATGTGTATCTACCTTAACTTAATGATTTTGATAAAAATCATTAGG (配列番号
 : 35); または

配列番号 : 25 のヌクレオチド 9731 ~ 9871 を含むかまたはそれからなる配列。

【 0160 】

本明細書に記載される発現カセットおよび遺伝子治療ベクターのいずれかのいくつかの
 実施形態では、本明細書に記載される発現カセットまたは遺伝子治療ベクターのいずれか
 に存在する *rrnG* ターミネータ (*E. coli* リボソーム RNA *rrnG* オペロン (*Albrechtsen et al.*, 1991) からの転写ターミネータ) は、以下の
 配列を含むか、またはそれからなる :

10

GCATTGGCGCAGAAAAAATGCCTGATGCGACGCTGCGCGTCTTATACTCCCACATATGCCAGATTGAGCAACGG
 ATACGGCTTCCCCAAGTTCCTTCCATACGTGTCTCCTTACCAGAAATTTATCCTTAA (配列番号 : 15)。

【 0161 】

本明細書に記載の発現カセットおよび遺伝子治療ベクターのいずれかのいくつかの実施
 形態では、本明細書に記載される発現カセットまたは遺伝子治療ベクターのいずれかに存
 在する *ori* (高コピー数の *ColE1 / pMB1 / pBR322 / pUC* 複製起点) は
 、以下の配列、その機能的断片、または以下の配列と少なくとも 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 %、または少なくとも 99 %
 の同一性を有する配列を含むか、またはそれからなる :

20

TTGAGATCCTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAACAAAAAACCACCGCTACCAGCGGTGGTTTTGTTT
 GCCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAAGTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAAATACTGTTCT
 TCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCGCCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCT
 GTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGTCTTACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAA
 GGCGCAGCGTCCGGCTGAACGGGGGTTTCGTGCACACAGCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAG
 ATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGG
 CAGGGTCCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGAAACGCCTGGTATCTTTATAGTCCTGTCCGGTT
 TCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGCGGAGCCTATGGAAA (配列番号
 : 16)

30

GGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGTAAC
 TGTGACACCAAGTTTACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAAACCTTCATTTTTAATTTAAAAGGATCTAGGTGA
 AGATCCTTTTTGATAATCTCATGACCAAAATCCCTAACGTGAGTTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAG
 AAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAACAAAAAACCACCGC
 TACCAGCGGTGGTTTTGTTTCCCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAAGTGGCTTCAGCAGAGCGC
 AGATACCAAATACTGTTCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCGCCTACAT
 ACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGTCTTACCGGGTTGGACTCAA
 GACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGTCCGGCTGAACGGGGGTTTCGTGCACACAGCCAGCTTGGAGCGAA
 CGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGCGG
 ACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGAAACGCCTGGTATC
 TTTATAGTCCTGTCCGGTTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGCGGAGCC
 TATGAAAAACGCCAGCAACCGGCCTTTTTACGGTTCCTGGCCTTTTGCTGGCCTTTTGCTCACATGTTCTTTC
 CTGCGTTATCCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGCCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGCAGCCGAA
 CGACCGAGCGCAGCGAGTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAGA (配列番号 : 37); または

40

50

配列番号：24のヌクレオチド9731～9871もしくは配列番号：25のヌクレオチド8700～9714を含むかまたはそれからなる配列。

【0162】

本明細書に記載の発現カセットおよび遺伝子治療ベクターのいずれかのいくつかの実施形態では、本明細書に記載される発現カセットまたは遺伝子治療ベクターのいずれかに存在するCAP結合部位は、以下の配列、その機能的断片、または以下の配列と少なくとも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%、または少なくとも99%の同一性を有する配列を含むか、またはそれからなる：

TAATGTGAGTTAGCTCACTCAT (配列番号：17)。

10

【0163】

本明細書に記載の発現カセットおよび遺伝子治療ベクターのいずれかのいくつかの実施形態では、本明細書に記載される発現カセットまたは遺伝子治療ベクターのいずれかに存在するE.coli lacプロモーターは、以下の配列、その機能的断片、または以下の配列と少なくとも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%、または少なくとも99%の同一性を有する配列を含むか、またはそれからなる：

TTTACACTTTATGCTTCCGGCTCGTATGTTG (配列番号：18)。

20

【0164】

本明細書に記載の発現カセットおよび遺伝子治療ベクターのいずれかのいくつかの実施形態では、本明細書に記載される発現カセットまたは遺伝子治療ベクターのいずれかに存在するlacオペレーターは、以下の配列、その機能的断片、または以下の配列と少なくとも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%、または少なくとも99%の同一性を有する配列を含むか、またはそれからなる：

TTGTGAGCGGATAACAA (SEQ ID NO: 19)。

【0165】

本明細書に記載の発現カセットおよび遺伝子治療ベクターのいずれかのいくつかの実施形態では、本明細書に記載される発現カセットまたは遺伝子治療ベクターのいずれかに存在するT3プロモーター(バクテリオファージT3 RNAポリメラーゼのプロモーター)は、以下の配列、その機能的断片、または以下の配列と少なくとも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%、または少なくとも99%の同一性を有する配列を含むか、またはそれからなる：

AATTAACCCCTCACTAAAGG (配列番号：20)。

30

【0166】

本明細書に記載の発現カセットおよび遺伝子治療ベクターのいずれかのいくつかの実施形態では、本明細書に記載される発現カセットまたは遺伝子治療ベクターのいずれかに存在するT7プロモーター(バクテリオファージT7 RNAポリメラーゼのプロモーター)は、以下の配列、その機能的断片、または以下の配列と少なくとも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%、または少なくとも99%の同一性を有する配列を含むか、またはそれからなる：

CCTATAGTGAGTCGTATTA (配列番号：21)。

40

【0167】

50

本明細書に記載の発現カセットおよび遺伝子治療ベクターのいずれかのいくつかの実施形態では、本明細書に記載される発現カセットまたは遺伝子治療ベクターのいずれかに存在する *f1 ori* (*f1* バクテリオファージ複製起点) は、以下の配列、その機能的断片、または以下の配列と少なくとも 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%、または少なくとも 99% の同一性を有する配列を含むか、またはそれからなる：

ACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAGCGCGGCGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCCAGCG
CCCTAGCGCCCGCTCCTTTTCGCTTTCTTCCCTTCCCTTTCTCGCCACGTTTCGCCGGCTTTCCCGTCAAGCTCTAA
ATCGGGGGCTCCCTTTAGGGTTCCGATTTAGTGCTTTACGGCACCTCGACCCCAAAAACTTGATTAGGGTGATG
GTTACGCTAGTGGGCCATCGCCCTGATAGACGGTTTTTCGCCCTTTGACGTTGGAGTCCACGTTCTTTAATAGTG
GACTCTTGTTCAAACTGGAACAACACTCAACCCTATCTCGGTCTATTCTTTTGATTTATAAGGGATTTTGCCGA
TTTCGGCCTATTGGTTAAAAAATGAGCTGATTTAACAAAAATTTAACGCGAATT (配列番号：22)。

10

【0168】

本明細書で論じられるように、本発明の発現カセットおよび遺伝子治療ベクターは、RNA 核外遊出シグナルを含み得る。例示的な RNA 核外遊出配列として、限定されないが、WPRE が含まれる。WPRE は、導入遺伝子、プロモーター、およびベクター非依存の様式における RNA の安定性を増加させることによって、標的細胞における導入遺伝子発現を有意に増加させる (Zuffrey et al, 1999)。しかしながら、肝臓がんに関与する WHV X 遺伝子に由来する切断型 60 - アミノ酸タンパク質を発現することができる (Kingsman et al, 2005)。したがって、ほとんどの前臨床プロトコルおよび臨床試験は、WPRE 要素の変異バージョンを含む (Zanta-Boussif et al, 2009)。一方、SIN-LV ベクターにおける 2 つの SV40 - USE 要素の使用は、転写リードスルーの抑制において、WPRE 配列よりも効率的であることが見出されている (Schambach et al, 2007)。より正確には、本明細書に開示される WPRE は、Axel Schambach (ヌクレオチド 1 ~ 589) によって実行された改変 WPRE (WO 2008 / 136670 A2) からの 589 ヌクレオチド、および以前の WPRE (ヌクレオチド 590 ~ 677) からの 88 ヌクレオチドを運ぶキメラ WPRE である (Zuffrey et al, 1999)。本明細書に開示されるデータは、このキメラ WPRE が、以前の WPRE よりも良好に機能することを示す。キメラ WPRE 配列は、以下の配列、その機能的断片、または以下の配列と少なくとも 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%、または少なくとも 99% の同一性を有する配列を含む：

20

30

CGAGCATCTTACCGCCATTTATTTCCCATATTTGTTCTGTTTTTCTTGATTTGGGTATAACATTTAAATGTTA
ATAAAACAAAATGGTGGGGCAATCATTTACATTTTTAGGGATATGTAATTAAGTTTTCAGGTGATTGCCA
CAAGACAAACATGTTAAGAACTTTCCCGTTATTTACGCTCTGTTCTGTTAATCAACCTCTGGATTACAA
AATTTGTGAAAGATTGACTGATATTTCTTAACATGTTGCTCCTTTTACGCTGTGTGGATATGCTGCTTTAA
TGCCCTCTGTATCATGCTATTGCTTCCCGTACGGCTTTTCGTTTTCTCCTCCTTGATAAATCCTGGTTGCTG
TCTCTTTATGAGGAGTTGTGGCCCGTTGTCCGTCAACGTGGCGTGGTGTGCTCTGTGTTTGCTGACGCAAC
CCCCACTGGCTGGGGCATTGCCACCACCTGTCAACTCCTTTCTGGGACTTTTCGCTTTCCCGCTCCCGATCG
CCACGGCAGAACTCATCGCCGCCTGCCTTGCCCGCTGCTGGACAGGGGCTAGGTTGCTGGGCACTGATAAT
TCCGTGGTGTGTCGGGGAAGGGCTGCTGCCGGCTCTGCGGCCTTTCCGCGTCTTCGCTTTCGCCCTCA
GACGAGTCGGATCTCCCTTTGGGCCGCTCCCGCCTG (配列番号：23)。

40

【0169】

特定の実施形態では、変異 WPRE 配列は、WPRE* を含むか、またはそれからなり

50

、配列番号：24のヌクレオチド8502～9178もしくは配列番号：25のヌクレオチド7293～7888に対応するか、または配列番号：24もしくは配列番号：25のこの領域と少なくとも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%、もしくは少なくとも99%の同一性を有する。

【0170】

本明細書に開示されるか、または当該技術分野で既知の両方の要素の他の組み合わせは、当業者によって容易に理解されるであろう。

【0171】

加えて、当業者には認識されるように、発現カセットおよび遺伝子治療ベクターは、特定の遺伝子治療ベクターのクローニングおよび調節要素を促進するための制限部位を含むがこれらに限定されない他の要素を任意に含み得る。

10

【0172】

本発明のいくつかの態様では、対象のポリヌクレオチドカセットは、遺伝子を細胞に送達するために、例えば、遺伝子が細胞の生存能および/または機能に及ぼす影響を決定するため、細胞障害などを治療するために使用される。様々な実施形態では、形質導入によるウイルスベクターの細胞への送達は、インビトロ、エクスピボ、またはインビトロで生じ得る。したがって、本発明のいくつかの態様では、哺乳動物細胞において導入遺伝子の発現を提供する組成物は、遺伝子治療ベクターであり、遺伝子治療ベクターは、本開示のポリヌクレオチドカセット、例えば遺伝子導入カセットを含む。

【0173】

FA患者からのHSCの遺伝子補正、続いてこれらの細胞の自己移植（造血遺伝子治療）は、FA患者、特にHLA-同型兄弟を欠く患者にとって良好な代替物である。一実施形態では、造血遺伝子療法は、HLA-同型兄弟を欠く患者にとって好ましい治療レジメンである。別の実施形態では、造血遺伝子療法は、HLA-同型兄弟を有する患者の治療レジメンである。

20

【0174】

本明細書に開示される方法のいずれかの特定の実施形態では、遺伝子治療ベクターは、FACタンパク質をコードするポリヌクレオチド配列を含み、ベクターと共に透過された細胞は、FAを治療するために対象に提供される。

【0175】

FA患者のほとんどがFA-A相補群に属するため（Casado et al., 2007, Levitus et al., 2004, Taniguchi et al., 2006）、機能的FANCA遺伝子を保持するベクターが開発されている。ウッドチャック肝炎ウイルス（WPRE*）の変異転写後調節要素を含み、任意の残留オープンリーディングフレームを欠く（Schambach A et al. Gene Ther. 2006; 13: 641-645）を用いて、治療遺伝子の発現レベルおよび安定性を改善する。

30

【0176】

いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドカセットは、
 (i) ホスホグリセートキナーゼ（PGK）プロモーター配列またはその機能的バリエーションもしくは断片、
 (ii) ヒトFANCAタンパク質またはその機能的断片もしくはバリエーションをコードする配列、および
 (iii) ウッドチャック肝炎ウイルス（WPRE）配列の転写後調節要素を含む。

40

【0177】

いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドカセットは、
 (i) ヒトホスホグリセートキナーゼ（PGK）プロモーター配列、
 (ii) ヒトFANCAタンパク質をコードする配列、および
 (iii) 変異型WPRE配列を含む。

50

【 0 1 7 8 】

いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドカセットは、

- a) 5'LTR、任意に改変された5'LTR、
- b) cPPT配列、
- c) PGKプロモーター配列、任意にヒトPGKプロモーター配列、および
- d) ヒトFANCAタンパク質をコードする配列、任意にcDNA配列またはコドン最適化配列、
- e) 変異型WPRE配列、
- f) 3'LTR、任意に改変された3'LTR

を含む。

10

【 0 1 7 9 】

一実施形態では、改変されたWPREは、WPRE*と称される。WPRE*は、オープンリーディングフレームを欠く改変されたWPREである(例えば、Schambach et al., 2006 Gene Ther. 13: 641-645を参照されたい)。

【 0 1 8 0 】

FA患者のほとんどがFA-A相補群に属するため(Casado et al., 2007, Levitus et al., 2004, Taniguchi et al., 2006)、特定の実施形態では、コードされた治療用遺伝子産物はFANCAであるが、本開示は、他の相補群のFAタンパク質も送達され、したがって、例えば、FANCAの代わりに、本明細書に開示される発現カセットにコードされ得ることを企図する。

20

【 0 1 8 1 】

本明細書に記載される発現カセットおよび遺伝子治療ベクターのいずれかの特定の実施形態では、コドン最適化FANCAをコードするポリヌクレオチド配列は、以下の配列、またはその機能的断片、または以下の配列と少なくとも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%、または少なくとも99%の同一性を有する配列を含むか、またはそれからなるヒトFANCA cDNA配列である：

```

ATGTCCGACTCGTGGGTCCCGAACTCCGCCTCGGGCCAGGACCCAGGGGGCCGCCGAGGGCCTGGGCCGAGCTG
CTGGCGGGGAAGGGTCAAGAGGGAAAAATATAATCCTGAAAGGGCACAGAAATTAAAGGAATCAGCTGTGCGCCTC
CTGCGAAGCCATCAGGACCTGAATGCCCTTTTGCTTGAGGTAGAAGGTCCACTGTGTAATAAATTGTCTCTCAGC
AAAGTGATTGACTGTGACAGTTCTGAGGCCTATGCTAATCATTCTAGTTTATATAGGCTCTGCTTTGCAGGAT
CAAGCCTCAAGGCTGGGGTTCCCGTGGGTATTCTCTCAGCCGGGATGGTTGCCTCTAGCGTGGGACAGATCTGC
ACGGCTCCAGCGGAGACCAGTCACCCTGTGCTGCTGACTGTGGAGCAGAGAAAGAAGCTGTCTTCCCTGTTAGAG
TTTGCTCAGTATTTATTGGCACACAGTATGTTCTCCCGTCTTTCCTTCTGTCAAGAATTATGGAAAATACAGAGT
TCTTTGTTGCTTGAAGCGGTGTGGCATCTTCACGTACAAGGCATTGTGAGCCTGCAAGAGCTGCTGGAAAGCCAT
CCCACATGCATGCTGTGGGATCGTGGCTCTTCAGGAATCTGTGCTGCCTTTGTGAACAGATGGAAGCATCCTGC
CAGCATGCTGACGTCGCCAGGGCCATGCTTTCTGATTTTGTTCAAATGTTTGTGTTTGGAGGGATTTTCAGAAAAC
TCAGATCTGAGAAGAACTGTGGAGCCTGAAAAAATGCCGCAGGTCACGGTTGATGTAAGTGCAGAGAATGCTGATT
TTTGCACTTGACGCTTTGGCTGCTGGAGTACAGGAGGAGTCCCTCCACTCACAAGATCGTGAGGTGCTGGTTCGGA
GTGTTTCACTGGACACACGCTTGGCAGTGTAAATTTCCACAGATCCTCTGAAGAGGTTCTTCAGTCATACCCTGACT
CAGATACTCACTCACAGCCCTGTGCTGAAAGCATCTGATGCTGTTTCAGATGCAGAGAGAGTGGAGCTTTGCGCGG

```

30

40

50

ACACACCCTCTGCTCACCTCACTGTACCGCAGGCTCTTTGTGATGCTGAGTGCAGAGGAGTTGGTTGGCCATTG
CAAGAAGTTCTGAAACGCAGGAGGTTCACTGGCAGAGAGTGCTCTCCTTTGTGTCTGCCCTGGTTGTCTGCTTT
CCAGAAGCGCAGCAGCTGCTTGAAGACTGGGTGGCGCGTTTGATGGCCAGGCATTTCGAGAGCTGCCAGCTGGAC
AGCATGGTCACTGCGTTCCCTGGTTGTGCGCCAGGCAGCACTGGAGGGCCCTCTGCGTTCCCTGTATATGCAGAC
TGTTCAAGGCCCTCTTTGGGAGCACACGAGGCTACCATGGTGCAGCAAGAAGGCCCTGGTCTTCTGTTTACG
TTCTTGTGAGAAGCTCGTGCCTTTTGTGAGTCTCCCGGTACCTGCAGGTGCACATTCTCCACCCACCCTGGTTCCC
AGCAAGTACCGCTCCCTCCTCACAGACTACATCTCATTGGCCAAGACACGGCTGGCCGACCTCAAGGTTTCTATA
GAAAACATGGGACTCTACGAGGATTTGTATCAGCTGGGGACATTACTGAGCCCCACAGCCAAGCTCTTCAGGAT
GTTGAAAAGGCCATCATGGTGTGGAGCATAACGGGAACATCCCAGTCACCGTCATGGAGGCCAGCATATTACAGG
AGGCCCTTACTACGTGTCCACTTCCCTCCCGCCCTGCTCACACCTCGAGTGCTCCCAAAGTCCCTGACTCCCGT
GTGGCGTTTATAGAGTCTCTGAAGAGAGCAGATAAAATCCCCCATCTCTGTACTCCACCTACTGCCAGGCCCTGC
TCTGCTGCTGAAGAGAAGCCAGAAGATGCAGCCCTGGGAGTGAGGGCAGAACCCTCTGCTGAGGAGCCCTG
GGACAGCTCACAGCTGCACTGGGAGAGCTGAGAGCCTCCATGACAGACCCAGCCAGCGTGATGTTATATCGGCA
CAGGTGGCAGTGATTTCTGAAAGACTGAGGGCTGTCTGGGCCACAATGAGGATGACAGCAGCGTTGAGATATCA
AAGATTGAGCTCAGCATCAACACGCCGAGACTGGAGCCACGGGAACACATTGCTGTGGACCTCCTGCTGACGTCT
TTCTGTGAGAAGCTGATGGCTGCCTCCAGTGTGCTCCCGGAGAGGCAGGGTCCCTGGGCTGCCCTCTTCGTG
AGGACCATGTGTGGACGTGTGCTCCCTGCAGTGTCTACCCGGCTCTGCCAGTGCTCCGTACCCAGGGCCCGAGC
CTGAGTGCCCCACATGTGCTGGGGTTGGCTGCCCTGGCCGTGCACCTGGGTGAGTCCAGGTCTGCGCTCCAGAG
GTGGATGTGGGTCCCTCCTGCACCTGGTGCTGGCCCTTCCGTGCCCTGCGCTCTTTGACAGCCTCCTGACCTGTAGG
ACGAGGGATTCCCTTGTCTTCTGCTGAAATTTTGTACAGCAGCAATTTCTTACTCTCTCTGCAAGTTTCTTCC
CAGTCACGAGATACTTTGTGAGCTGCTTATCTCCAGGCCATTATTAAGGTTTTCAGTTCTCATGTTGAGATTG
TTCTCAGAGGCCCGACAGCCTCTTTCTGAGGAGGACGTAGCCAGCCTTTCTGGAGACCCTTGACCTTCCCTTCT
GCAGACTGGCAGAGAGCTGCCCTCTCTCTGACACACAGAACCCTCCGAGAGGTGTTGAAAGAGGAAGATGTT
CACTTAAGTTACCAAGACTGGTTACACCTGGAGCTGGAATTTCAACCTGAAGCTGATGCTCTTTGAGATACTGAA
CGGCAGGACTTCCACCAGTGGGCGATCCATGAGCACTTTCTCCCTGAGTCCCTCGGCTTCAGGGGGCTGTGACGGA
GACCTGCAGGCTGCGTGTACCATTCTTGTCAACGCACTGATGGATTTCCACCAAAGCTCAAGGAGTTATGACCAC
TCAGAAAATTCTGATTTGGTCTTTGGTGGCCGCACAGGAAATGAGGATATTATTTCCAGATTGCAGGAGATGGTA
GCTGACCTGGAGCTGCAGCAAGACCTCATAGTGCTCTCGGCCACACCCTTCCAGGAGCACTTCCCTTTGAG
ATTTTCCGAGACGGCTCCAGGCTCTGACAAGCGGGTGGAGCGTGGCTGCCAGCCTTCAGAGACAGAGGGAGCTG
CTAATGTACAAACGGATCCCTCCCGCTGCCTTCGTCTGCCTCTGCGGCAGCAGCTTCCAGGCAGAACAGCCC
ATCACTGCCAGATGCGAGCAGTTCTTCCACTTGGTCAACTCTGAGATGAGAACTTCTGCTCCACGGAGGTGCC
CTGACACAGGACATCACTGCCACTTCTTCCAGGGCCTCCTGAACGCTGTCTGCGGAGCAGAGACCCCTCCCTG
ATGGTCGACTTCATACTGGCCAAGTGCAGACGAAATGCCCTTAATTTGACCTCTGCTCTGGTGTGGTGGCCG
AGCCTGGAGCCTGTGCTGCTTGCCTGGTGGAGGAGACTGCCAGAGCCCGCTGCCCGGGAATGCAGAAGCTA
CAAGAAGGCCCGGAGTTTGCAGCGATTTCCCTCTCCCTGAGGCTGCCTCCCGCAGCCCAACCCGGACTGGCTC
TCAGCTGCTGCACTGCACTTTGCGATTCAACAAGTCAAGGAAGAAAACATCAGGAAGCAGCTAAAGAAGCTGGAC
TGCGAGAGAGAGGAGCTATTGGTTTTCTTTCTTCTTCTCCTTGTGATGGGCTGCTGTGCTCACATCTGACCTCA
AATAGCACACAGACCTGCCAAAGGCTTTCCACGTTTGTGACGCAATCCTCGAGTGTGTTAGAGAAGAGGAAGATA
TCCTGGCTGGCACTCTTTCAGTTGACAGAGAGTGACCTCAGGCTGGGGCGGCTCCTCCTCCGTGTGGCCCCGGAT
CAGCACACCAGGCTGCTGCCTTTTCGCTTTTACAGTCTTCTCTCACTTCCATGAAGACGCGGCCATCAGGGAA

10

20

30

40

50

GAGGCCCTTCCTGCATGTTGCTGTGGACATGTAAGCTGGTCCAGCTCTTCGTGGCTGGGGATACAAGCACA
 GTTTCACCTCCAGCTGGCAGGAGCCTGGAGCTCAAGGGTCAGGGCAACCCCGTGGAAGTGAATAACAAAAGCTCGT
 CTTTTTCTGCTGCAGTTAATACCTCGGTGCCGAAAAAGAGCTTCTCACACGTGGCAGAGCTGCTGGCTGATCGT
 GGGGACTGCGACCCAGAGGTGAGCGCCGCCCTCCAGAGCAGACAGCAGGCTGCCCTGACGCTGACCTGTCCCAG
 GAGCCTCATCTCTTCTGA (配列番号 : 8); または

ATGTCCGACTCGTGGGTCCCGAACTCCGCCTCGGGCCAGGACCCAGGGGGCCGCCGAGGGCCTGGGCCGAGCTG
 CTGGCGGGAAGGGTCAAGAGGGAAAAATATAATCCTGAAAGGGCACAGAAATTAAGGAATCAGCTGTGCGCCTC
 CTGCGAAGCCATCAGGACCTGAATGCCCTTTTGTGTTGAGGTAGAAGGTCCACTGTGTAAAAAATTGTCTCTCAGC
 AAAGTGATTGACTGTGACAGTTCTGAGGCCTATGCTAATCATTCTAGTTTATAGGCTCTGCTTTGCAGGAT
 CAAGCCTCAAGGCTGGGGTTCCTCGTGGGTATTCTCTCAGCCGGGATGGTTGCCTCTAGCGTGGGACAGATCTGC
 ACGGCTCCAGCGGAGACCAGTACCCTGTGCTGCTGACTGTGGAGCAGAGAAAGAGCTGTCTCCCTGTTAGAG
 TTTGCTCAGTATTTATTGGCACACAGTATGTTCTCCCGTCTTCCCTTCTGTCAAGAATTATGAAAAATACAGAGT
 TCTTTGTTGCTTGAAGCGGTGTGGCATCTTACGTACAAGGCATTTGTGAGCCTGCAAGAGCTGCTGGAAAGCCAT
 CCCGACATGCATGCTGTGGGATCGTGGCTCTTTCAGGAATCTGTGCTGCCTTTGTGAACAGATGGAAGCATCTGC
 CAGCATGCTGACGTCGCCAGGGCCATGCTTTCTGATTTTGTCAAATGTTTGTGTTTGGGGATTTCAGAAAAAC
 TCAGATCTGAGAAGAACTGTGGAGCCTGAAAAATGCCGAGGTACCGTTGATGTAAGTGCAGAGAATGCTGATT
 TTTGCACTTGACGCTTTGGCTGCTGGAGTACAGGAGGAGTCCCTCCACTCACAAGATCGTGAGGTGCTGGTTCCGA
 GTGTTCAAGTGGACACACGCTTGGCAGTGAATTTCCACAGATCCTCTGAAGAGGTTCTTCACTATACCCTGACT
 CAGATACTCACTCACAGCCCTGTGCTGAAAGCATCTGATGCTGTTCAGATGCAGAGAGAGTGGAGCTTTGCGCGG
 ACACACCCTCTGCTCACCTCACTGTACCGCAGGCTCTTTGTGATGCTGAGTGCAGAGGAGTTGGTTGGCCATTTG
 CAAGAAGTTCTGGAACGCAGGAGGTTCACTGGCAGAGAGTGTCTCCTTTGTGTCTGCCCTGGTTGTCTGCTTT
 CCAGAAGCGCAGCAGCTGCTTGAAGACTGGGTGGCGCTTTGATGGCCAGGCATTCGAGAGCTGCCAGCTGGAC
 AGCATGGTCACTGCGTTCTGGTTGTGCGCCAGGCAGCACTGGAGGGCCCTCTGCGTTCTTGTGCATATGCAGAC
 TGGTTCAAGGCTCCTTTGGGAGCACACGAGGCTACCATGGCTGCAGCAAGAAGGCCCTGGTCTTCTGTTTACG
 TTCTTGTGAGAACTCGTGCCTTTTGTGCTCCCCGTACCTGCAGGTGCACATTCTCCACCCACCCTGGTTCCC
 AGCAAGTACCCTCCCTCCTCACAGACTACATCTCATTGGCCAAGACAGGCTGGCCGACCTCAAGGTTTCTATA
 GAAAACATGGGACTCTACGAGGATTTGTGCATCAGCTGGGGACATTACTGAGCCCCACAGCCAAGCTCTCAGGAT
 GTTGAAGGCCATCATGGTGTGTTGAGCATAAGGGGAACATCCAGTCACCGTCATGGAGGCCAGCATAATCAGG
 AGGCCTTACTACGTGTCCCCTTCTCCCCGCCCTGCTCACACCTCGAGTGTCCCCAAAGTCCCTGACTCCCCTG
 GTGGCGTTTATAGAGTCTCTGAAGAGAGCAGATAAAATCCCCCATCTCTGTAAGTCCACTACTGCCAGGCCTGC
 TCTGCTGCTGAAGAGAAGCCAGAAGATGCAGCCCTGGGAGTGGGGCAGAACCAACTCTGCTGAGGAGCCCCTG
 GGACAGCTCACAGCTGCACTGGGAGAGCTGAGAGCCTCCATGACAGACCCAGCCAGCGTGATGTTATATCGGCA
 CAGGTGGCAGTGATTTCTGAAAGACTGAGGGCTGTCTGGGCCACAATGAGGATGACAGCAGCGTTGAGATATCA
 AAGATTCAGCTCAGCATCAACACGCCGAGACTGGAGCCACGGGAACACATTGCTGTGGACCTCCTGCTGACGTCT
 TTCTGTCAGAACCTGATGGCTGCCTCCAGTGTGCTCCCCGGAGAGGCAGGGTCCCTGGGCTGCCCTCTTCGTG
 AGGACCATGTGTGGACGTGTGCTCCCTGCAGTGTACCCGGCTCTGCCAGCTGCTCCGTACCAGGGCCCGAGC
 CTGAGTGCCCATATGTGCTGGGGTTGGCTGCCCTGGCCGTGCACCTGGGTGAGTCCAGGCTGCGCTCCAGAG
 GTGGATGTGGGTCTCTGACCTGGTGTGCTGCCCTTCTGTCCCTGCGCTCTTTGACAGCCTCCTGACCTGTAGG
 ACGAGGGATTCTTGTCTTCTGCTGAAATTTGTACAGCAGCAATTTCTTACTCTCTGCAAGTTTCTTCC
 CAGTACAGAGATACTTTGTGACGCTGCTTATCTCCAGGCCTTATTAAGGTTTCAAGTTCCTCATGTTTCAGATTG

10

20

30

40

50

TTCTCAGAGGCCCGACAGCCTCTTTCTGAGGAGGACGTAGCCAGCCTTTCCTGGAGACCCTTGCACCTTCCTTCT
GCAGACTGGCAGAGAGCTGCCCTCTCTCTCTGGACACACAGAACCTTCCGAGAGGTGTTGAAAGAGGAAGATGTT
CACTTAACTTACCAAGACTGGTTACACCTGGAGCTGGAAATTCAACCTGAAGCTGATGCTCTTTCAGATACTGAA
CGGCAGGACTTCCACCAGTGGGCGATCCATGAGCACTTCTCCCTGAGTCTCGGCTTCAGGGGGCTGTGACGGA
GACCTGCAGGCTGCGTGTACCATTCTTGTCAACGCCTGATGGATTTCCACCAAAGCTCAAGGAGTTATGACCAC
TCAGAAAATTCTGATTTGGTCTTTGGTGGCCGCACAGGAAATGAGGATATTATTTCCAGATTGCAGGAGATGGTA
GCTGACCTGGAGCTGCAGCAAGACCTCATAGTGCCTCTCGGCCACACCCCTTCCCAGGAGCACTTCTCTTTGAG
ATTTTCCGCAGACGGCTCCAGGCTCTGACAAGCGGGTGGAGCGTGGCTGCCAGCCTTTCAGAGACAGAGGGAGCTG
CTAATGTACAAAAGGATCCTCCTCCGCCTGCCTTCTGTCTGTCTCTGCGGCAGCAGCTTCCAGGCAGAACAGCCC
ATCACTGCCAGATGCGAGCAGTTCTTCCACTTGGTCAACTCTGAGATGAGAACTTCTGCTCCCACGGAGGTGCC
CTGACACAGGACATCACTGCCCCTTCTTCCAGGGGCTCCTGAACGCCTGTCTGCGGAGCAGAGACCCCTCCCTG
ATGGTCGACTTCATACTGGCCAAGTCCAGACGAAATGCCCTTAATTTTACCTCTGCTCTGGTGTGGTGGCCG
AGCCTGGAGCCTGTGCTGCTCTGCCGGTGGAGGAGACACTGCCAGAGCCCGCTGCCCCGGGAACTGCAGAAGCTA
CAAGAAGGCCGGCAGTTTGGCAGCGATTTCTCTCCCTGAGGCTGCCTCCCAGCACCCAACCCGGACTGGCTC
TCAGCTGCTGCACTGCACTTTGCGATTCACAAGTCAAGGAAAGAAAACATCAGGAAGCAGCTAAAGAAGCTGGAC
TGCGAGAGAGAGGAGCTATTGGTTTTCTTTTCTTCTCTCCTTGATGGGCCTGCTGTGTCACATCTGACCTCA
AATAGCACACAGACCTGCCAAAGGCTTTCCACGTTTTGTGCAGCAATCCTCGAGTGTTTAGAGAAGAGGAAGATA
TCCTGGCTGGCACTCTTTCAGTTGACAGAGAGTGACCTCAGGCTGGGGCGGCTCCTCCTCCGTGTGGCCCCGGAT
CAGCACACCAGGCTGCTGCCTTTTCGTTTTTACAGTCTTCTCTCTTCCATGAAGACGCGGCCATCAGGGAA
GAGGCCCTTCTGCATGTTGCTGTGGACATGTACTTGAAGCTGGTCCAGCTCTTCGTGGCTGGGGATACAAGCACA
GTTTTACCTCCAGCTGGCAGGAGCCTGGAGCTCAAGGGTCAGGGCAACCCCGTGGAACTGATAACAAAAGCTCGT
CTTTTTCTGCTGCAGTTAATACCTCGGTGCCCGAAAAGAGCTTCTCACACGTGGCAGAGCTGCTGGCTGATCGT
GGGGACTGCGACCCAGAGGTGAGCGCCGCCCTCCAGAGCAGACAGCAGGCTGCCCTGACGCTGACCTGTCCCAG
GAGCCTCATCTCTTCTGATGA (配列番号 : 36)。

10

20

30

【 0 1 8 2 】

本開示は、本明細書に記載の発現カセットまたは導入カセットを含むプラスミドを含む。特定の実施形態では、プラスミドは、p C C L - P G K - F A N C A - W P R E * または p C C L - P G K - F A N C A W - 8 2 - R O (配列番号 : 2 5) である。

【 0 1 8 3 】

いくつかの実施形態では、遺伝子治療ベクターは、自己限定型 L V である。本明細書に記載される発現カセットおよび遺伝子治療ベクターのいずれかの特定の実施形態では、導入カセットは、以下の配列、または配列番号 : 2 4 と少なくとも 8 0 %、少なくとも 8 5 %、少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 8 %、または少なくとも 9 9 % の同一性を有する配列を含むか、またはそれからなる本開示の p C C L - S I N - c P P T / C T S - h P G K - h F A N C A - W P R E である。配列番号 : 2 4 は、p C C L - P G K - F A N C A - W P R E * プラスミドに対応する。配列番号 : 2 5 は、p C C L - P G K - F A N C A W - 8 2 - R O プラスミドに対応する。

40

【 0 1 8 4 】

一実施形態では、F A N C A 遺伝子は、レンチウイルスベクター (L V) を介して送達される。本明細書に記載される F A N C A L V は、自己不活性化レンチウイルスベクター (L V) を利用する。一実施形態では、F A N C A L V は、ヒトホスホグリセレート (P G K) 遺伝子のプロモーターを含む。このベクターの安全性は、クリニックですで使用されているガンマレトロウイルスベクターと比較して著しく改善されており、これは強力なウイルスプロモーターを含む。

50

【0185】

特定の実施形態では、レンチウイルスベクターは、PGK-FANCA-WPRE*LVであり、配列番号：24に開示される配列を含む遺伝子導入カセットを含む。PGK-FANCA-WPRE*LV遺伝子発現カセット部分は、ヒトPGKプロモーター、FANCA cDNAのコード配列、およびWPRE*を含み、配列番号：24のヌクレオチド3541~9178に対応する。PGK-FANCA-WPRE*LV導入カセット部分は、配列の約5'LTR(U5)から約3'LTR(U5)を含む。配列番号：24に関して、配列番号：24のヌクレオチド1586~1789は、ヒトCMV前初期プロモーターを含む。配列番号：24のヌクレオチド2031~2156は、HIV1 psiパッケージングシグナルを含む。配列番号：24のヌクレオチド2649~2882は、HIV1 RRE要素を含む。配列番号：24のヌクレオチド3378~3495は、HIV cPPT/CTS要素を含む。配列番号：24のヌクレオチド3541~4051は、hPGKプロモーターを含む。配列番号：24のヌクレオチド4078~8445は、ヒトFANCA-A cDNAを含む。配列番号：24のヌクレオチド8502~9178は、変異型WPRE要素を含む。配列番号：24のヌクレオチド9262~9495は、HIVデルタU3'LTRを含む。

10

【0186】

特定の実施形態では、レンチウイルスベクターは、pCCL-PGK-FANCAW-82-ROであり、配列番号：25に開示される配列を含む遺伝子導入カセットを含む。pCCL-PGK-FANCAW-82-RO遺伝子発現カセット部分は、ヒトPGKプロモーター、FANCA cDNAのコード配列、およびWPRE*を含み、配列番号：25のヌクレオチド2335~7888に対応する。pCCL-PGK-FANCAW-82-RO導入カセット部分は、配列の約5'LTR(U5)から約3'LTR(U5)を含む。配列番号：25に関して、配列番号：25のヌクレオチド1~577は、ヒトCMV前初期プロモーターを含む。配列番号：25のヌクレオチド889~933は、HIV1 psiパッケージングシグナルを含む。配列番号：25のヌクレオチド1296~253は、HIV1 RRE要素を含む。配列番号：25のヌクレオチド2176~2191は、HIV cPPT/CTS要素を含む。配列番号：25のヌクレオチド2335~2845は、hPGKプロモーターを含む。配列番号：25のヌクレオチド2872~7242は、ヒトFANCA-A cDNAを含む。配列番号：25のヌクレオチド7293~7888は、変異型WPRE要素を含む。配列番号：25のヌクレオチド8056~8289は、HIVデルタU3'LTRを含む。

20

30

【0187】

さらに別の実施形態では、レンチウイルスベクターは、以下の要素を含む：(i)初期pCCLsin-cppt-hPGK-eGFP-WPREに由来するレンチウイルスベクターの骨格(Dull et al, 1998; J. Virol 72(11), 9873-9880)。pCCL骨格は、異種CMV-HIV 5'LTRを利用して、プロデューサー細胞内で高レベルのウイルスRNA転写を得る。かかる異種のLTRは、rHIV粒子の生成のためにHIV Tatタンパク質を使用する必要性から独立して構築物を与え、それはその安全性が特徴である。3'LTRのU3領域は、ベクターに自己不活性化特性を付与する(Zufferey et al J. Virol, 1998)に記載されるような400bp欠失を含む；(ii)ヒトコンドン最適化FANCA遺伝子のcDNA(4368bp GenBank受託番号：X_99226または本明細書に開示されるように)は、ヒトPGKプロモーターの制御下でFANCAタンパク質(1455AA)をコードする。プロモーターは、すでに遺伝子治療において使用されている他のプロモーターと比較して、インビボでのその安定した活性および改善された安全性特性によって特徴付けられており、(iii)ウッドチャック肝炎ウイルスの転写後調節要素(WPRE)の変異型バージョンは、Xタンパク質をコードする配列の3'領域、およびSchambachら(Gene therapy, 2006; 13, 641-645)によって記述された任意の残りのORFまたはWPRE*で除去される。

40

50

【0188】

特定の実施形態では、本明細書に記載されるFANCA-LVは、自己不活性化レンチウイルスベクター(LV)を利用する。一実施形態では、FANCA-LVは、ヒトホスホグリセレート(PGK)遺伝子のプロモーターを含む。このベクターの安全性は、クリニックですでに使用されているガンマレトロウイルスベクターと比較して著しく改善されており、これは強力なウイルスプロモーターを含む。一実施形態では、FANCA遺伝子は、レンチウイルスベクターを介して送達される。特定の実施形態では、レンチウイルスベクターは、PGK-FANCA-WPRE*LVである。

【0189】

本開示のポリヌクレオチドカセットを封入する遺伝子治療ベクターは、標準的な方法を使用して産生され得る。例えば、LVビリオンの場合、本発明によるLV発現ベクターをプロデューサー細胞に導入し、続いてLVヘルパー構築物を導入してもよく、ヘルパー構築物は、プロデューサー細胞において発現させることが可能なLVコード領域を含み、LVベクターの非存在下でLVヘルパー機能を補完する。これに続いて、ヘルパーウイルスおよび/または追加のベクターがプロデューサー細胞に導入され、ヘルパーウイルスおよび/または追加のベクターは、効率的なLVウイルス産生をサポートすることができるアクセサリ機能を提供する。次いで、プロデューサー細胞を培養してLVを産生させる。これらのステップは、標準的な方法を使用して行われる。特定の実施形態では、図38~41に示されるプラスミドは、遺伝子治療ベクターを産生するために使用される。

【0190】

以下の実施例に記載されるものを含むが、これらに限定されない、対象のポリヌクレオチドカセットの送達のためのウイルスベクター粒子を産生するための任意の好適な方法を使用することができる。哺乳動物細胞を効率的に形質導入するのに好適な任意の濃度の感染性ウイルスベクター粒子は、インビトロまたはインビボで哺乳動物細胞と接触させるために調製することができる。ウイルス粒子は、1mLあたり 10^8 感染単位またはそれ以上、例えば、1mLあたり 5×10^8 感染単位、1mLあたり 10^9 感染単位、1mLあたり 5×10^9 感染単位、1mLあたり 10^{10} 感染単位、1mLあたり 5×10^{10} 感染単位、1mLあたり 10^{11} 感染単位、1mLあたり 5×10^{11} 感染単位、1mLあたり 10^{12} 感染単位、1mLあたり 5×10^{12} 感染単位、1mLあたり 10^{13} 感染単位、1mLあたり 1.5×10^{13} 感染単位、1mLあたり 3×10^{13} 感染単位、1mLあたり 5×10^{13} 感染単位、1mLあたり 7.5×10^{13} 感染単位、1mLあたり 9×10^{13} 感染単位、1mLあたり 1×10^{14} 感染単位、1mLあたり 5×10^{14} 感染単位またはそれ以上、ただし通常は1mLあたり 1×10^{15} 感染単位以下の濃度で製剤化され得る。

【0191】

対象のLV遺伝子治療ベクターの調製において、例えば、哺乳動物細胞(例えば、293細胞)、昆虫細胞(例えば、SF9細胞)、微生物、および酵母を含む、LVビリオンを産生するための任意の宿主細胞が使用され得る。宿主細胞はまた、LVrepおよびcap遺伝子が、LVベクターゲノムが安定して維持およびパッケージングされる宿主細胞またはプロデューサー細胞において安定して維持されるパッケージング細胞であり得る。例示的なパッケージング細胞およびプロデューサー細胞は、SF-9、293、A549、またはHeLa細胞に由来する。LVベクターは、当該技術分野で既知の標準的な技法を使用して精製および製剤化される。

【0192】

特定の実施形態では、本発明は、本明細書に開示される遺伝子発現カセット、遺伝子導入カセット、または遺伝子治療ベクターを含む細胞を含む。関連する実施形態では、細胞は、本明細書に開示される発現カセットを含む遺伝子療法ベクターで形質導入されるか、または細胞のゲノムに組み込まれる本明細書に開示される発現カセットを有する。特定の実施形態では、細胞は、ウイルス遺伝子治療ベクター、例えば、パッケージング細胞を産生するために使用される細胞である。

10

20

30

40

50

【 0 1 9 3 】

他の実施形態では、細胞は、発現カセットによってコードされる遺伝子産物を対象に提供するために対象に送達される細胞である。したがって、特定の実施形態では、細胞は、治療される対象に対して自家であるか、または治療される対象から得られる。他の実施形態では、細胞は、治療される対象と同種であるか、または治療される対象以外のドナーから得られる。特定の実施形態では、細胞は、哺乳動物細胞、例えば、ヒト細胞である。特定の実施形態では、細胞は、血液細胞、赤血球、造血前駆細胞、骨髄細胞、例えば、系統枯渇骨髄細胞、造血幹細胞（例えば、CD34+）、または関与する造血赤血球前駆細胞である。特定の実施形態では、細胞は、細胞が本明細書に開示される遺伝子治療ベクターによって形質導入された後に細胞で治療される対象から得られるCD34+細胞である。特定の実施形態では、細胞は、FAと診断された対象から得られたCD34+FA細胞である。

10

【 0 1 9 4 】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示される方法は、障害の発症を予防する、障害の進行を停止する、障害の進行を逆転させるなどの治療的利益をもたらす。例えば、一実施形態では、障害は、BMFである。一実施形態では、障害は、血小板減少である。別の実施形態では、障害は、白血球減少である。一実施形態では、障害は、汎細胞減少である。一実施形態では、障害は、好中球減少である。別の実施形態では、障害は、貧血である。いくつかの実施形態では、主題の方法は、治療的利益が達成されていることを検出するステップを含む。当業者は、かかる治療的利益の測定値が改善される特定の疾患に適用可能であることを理解し、治療有効性を測定するために使用する適切な検出方法を認識するであろう。

20

【 0 1 9 5 】

別の実施形態では、本発明は、疾患の治療を必要とする対象においてそれを治療する方法であって、有効量の高ストリンジエンシーCD34濃縮細胞集団および低ストリンジエンシーCD34濃縮細胞集団のいずれかまたは両方を対象に提供することを含み、それらのいずれかまたは両方を、細胞内で治療用遺伝子産物を発現する遺伝子治療ベクター、例えばウイルスベクターと接触させる、方法を含む。特定の実施形態では、高ストリンジエンシーCD34濃縮細胞集団および低ストリンジエンシーCD34濃縮細胞集団のいずれかまたは両方は、対象に対して自家である。特定の実施形態では、細胞は、赤血球細胞、例えば造血幹細胞または関与する造血赤血球前駆細胞である。いくつかの実施形態では、細胞は、骨髄細胞、例えば、系統枯渇骨髄細胞である。特定の実施形態では、本方法は、FAを治療するために使用され、ウイルスベクターは、FANCA遺伝子cDNAまたはコード配列に作動可能に連結されたヒトPGKプロモーターを含む本明細書に開示される発現構築物、および本明細書に開示される変異wPREを含むLVである。特定の実施形態では、細胞は、例えば静脈内注射を介して非経口的に対象に提供される。

30

【 0 1 9 6 】

別の実施形態では、本発明は、FAの治療を必要とする対象においてそれを治療する方法であって、有効量の細胞内でFANCA cDNAを発現するLVベクターで形質導入された幹細胞の自家高ストリンジエンシーCD34濃縮細胞集団および/または低ストリンジエンシーCD34濃縮細胞集団を対象に提供することを含み、LVベクターが、FANCA cDNAまたはコード配列に作動可能に連結されたヒトPGKプロモーター、および本明細書に開示される変異wPRE配列を含む、方法を含む。特定の実施形態では、細胞は、造血幹細胞または関与する造血赤血球前駆細胞、例えば、骨髄細胞である。特定の実施形態では、細胞は、例えば静脈内注射を介して非経口的に対象に提供される。

40

【 0 1 9 7 】

対象の導入遺伝子を使用する導入遺伝子の発現は、頑強であることが予想される。したがって、いくつかの事例では、例えば、遺伝子産物のレベルを測定することによって、治療有効性を測定することなどによって検出される導入遺伝子の発現は、対象組成物の投与後2ヶ月以下、例えば、投与後4、3、または2週間以下、例えば、投与後1週間で観察

50

され得る。導入遺伝子の発現はまた、経時的に持続することが予想される。したがって、いくつかの事例では、例えば、遺伝子産物のレベルを測定することによって、治療有効性を測定することなどによって検出される導入遺伝子の発現は、対象組成物の投与後2ヶ月以上、例えば、4、6、8、または10ヶ月以上、いくつかの事例では、1年以上、例えば、2、3、4、または5年、特定の事例では、5年を超えて観察され得る。

【0198】

特定の実施形態では、方法は、細胞または対象における導入遺伝子の発現を検出するステップを含み、発現は、本開示の1つ以上の改善された要素を含まないポリヌクレオチドカセットからの発現と比較して増強される。例えば、より早い検出、より高いレベルの遺伝子産物、細胞に対するより強力な機能的影響などによって証明されるように、典型的には、発現は、参照、すなわち、対照ポリヌクレオチドカセットからの発現と比較して2倍以上、例えば、3倍、4倍、または5倍以上、いくつかの事例では、10倍、20倍、または50倍以上、例えば、100倍増強されるであろう。

10

【0199】

いくつかの実施形態では、注入によって患者が受ける細胞の用量は、形質導入プロセスから得られるものであろう。種々の好ましい実施形態では、患者体重の少なくとも約 1×10^1 、 1×10^2 、 1×10^3 、 1×10^4 、 1×10^5 、 1×10^6 、 1×10^7 、 1×10^8 以上の高ストリンジェンシーCD34濃縮細胞/KGを患者に注入する。種々の好ましい実施形態では、患者体重の少なくとも少なくとも約 1×10^1 、 1×10^2 、 1×10^3 、 1×10^4 、 1×10^5 、 1×10^6 、 1×10^7 、 1×10^8 以上の低ストリンジェンシーCD34濃縮細胞/KGを患者に注入する。いくつかの実施形態では、患者体重の $1 \times 10^6 \sim 4 \times 10^6$ の高ストリンジェンシーCD34濃縮細胞/Kgを患者に注入する。他の実施形態では、患者体重の $3 \times 10^5 \sim 4 \times 10^6$ の高ストリンジェンシーCD34濃縮細胞/Kgを患者に注入する。いくつかの実施形態では、患者体重の $1 \times 10^6 \sim 4 \times 10^6$ の高ストリンジェンシーCD34濃縮細胞/Kgを患者に注入する。他の実施形態では、患者体重の $3 \times 10^5 \sim 4 \times 10^6$ の高ストリンジェンシーCD34濃縮細胞/Kgを患者に注入する。いくつかの実施形態では、細胞は、単回用量で患者に注入される。他の実施形態では、細胞は、複数用量で患者に注入される（例えば、高ストリンジェンシーおよび低ストリンジェンシーCD34濃縮細胞集団は、1回または複数回で順次投与される）。形質導入された細胞は、形質導入プロセスが完了した直後に注入することができる。特定の実施形態では、形質導入された細胞は、使用前に保存または凍結されるが、特定の実施形態において、それらは、形質導入された直後またはすぐに、例えば、1時間、2時間、4時間、または8時間以内に対象に提供される。

20

30

【0200】

組み込まれると、治療用タンパク質（例えば、ヒトFANCAタンパク質）は、細胞によって発現される。形質導入されたFA細胞は、遺伝子補正され、したがって、FANCD2およびFANCIの単一ユビキチン化によってFA経路を活性化することができる。これらのタンパク質は、DNA損傷の領域に移動し、他のDNA修復タンパク質と協力して、健康な細胞に起こるように、これらの細胞のDNAの修復を促進する

【0201】

実施例でさらに詳細に記載するように、ヒトFA患者由来のBM試料を用いた前臨床インビトロデータは、これらの細胞の表現型を修正するためのFANCALVの有効性をすでに示している。

40

【0202】

一実施形態では、患者体重1kgあたりの少なくとも $1 \sim 4 \times 10^6$ のCD34⁺補正細胞（例えば、FANCA形質導入HSC）が投与され、例えば、非条件化FA患者における造血を回復する。いくつかの実施形態では、形質導入細胞は、形質導入直後に患者に注入または投与される。他の実施形態では、形質導入細胞は、患者に注入または投与する前に凍結される。

【0203】

50

F A患者からのH S Cの遺伝子補正、続いてこれらの細胞の自己移植（造血遺伝子治療）は、F A患者、特にH L A - 同型兄弟を欠く患者にとって良好な代替物である。一実施形態では、造血遺伝子療法は、H L A - 同型兄弟を欠く患者にとって好ましい治療レジメンである。別の実施形態では、造血遺伝子療法は、H L A - 同型兄弟を有する患者にとって好ましい治療レジメンである。

【0204】

組成物および製剤

本開示の特定の態様は、高ストリンジェンシーC D 3 4濃縮細胞集団および低ストリンジェンシーC D 3 4濃縮細胞集団のシステムまたは組み合わせに関し、これらのいずれかまたは両方は、遺伝子治療ベクターで形質導入されている。いくつかの実施形態は、高ストリンジェンシーC D 3 4濃縮および低ストリンジェンシーC D 3 4濃縮細胞集団の組み合わせを含み、これらのいずれかまたは両方は、ヒトF A N C遺伝子、例えば、F A N C A、F A N C C、またはF A N C Gを含むレンチウイルスベクター、または機能的バリエーションおよびその断片を含むF A N Cタンパク質をコードする核酸配列で形質導入されている。いくつかの実施形態は、高ストリンジェンシーC D 3 4濃縮および低ストリンジェンシーC D 3 4濃縮細胞集団の組み合わせを含み、これらのいずれかまたは両方は、C R I S P R、T A L E N、ジンクフィンガー、またはメガヌクレアーゼ遺伝子編集システムなどの遺伝子編集または遺伝子修復を受けている。いくつかの実施形態は、高ストリンジェンシーC D 3 4濃縮および低ストリンジェンシーC D 3 4濃縮細胞集団の組み合わせを含み、これらは免疫不全障害などの疾患または状態に関連する導入遺伝子を含むレンチウイルス（または他のウイルス）ベクターで形質導入されている。

【0205】

本開示のいくつかの態様では、疾患または状態の治療のための製剤が提供される。製剤は、高ストリンジェンシーC D 3 4濃縮細胞集団（複数可）、または低ストリンジェンシーC D 3 4濃縮細胞集団（複数可）、またはその両方を、本明細書に記載される生理学的に許容される担体もしくは薬学的に許容される担体と共に含み得る。製剤は、高ストリンジェンシーC D 3 4濃縮細胞集団（複数可）、または低ストリンジェンシーC D 3 4濃縮細胞集団（複数可）、またはその両方を含み得、一方または両方の細胞集団は、遺伝子治療ベクターで形質導入され、本明細書に記載の生理学的に許容される担体または薬学的に許容される担体と共に治療剤を発現または発現することが可能である。

【0206】

本発明は、本明細書に記載される高ストリンジェンシーC D 3 4濃縮細胞集団および低ストリンジェンシーC D 3 4濃縮細胞集団遺伝子治療ベクターのいずれかまたは両方、ならびに薬学的に許容される担体、希釈剤、または賦形剤を含む薬学的組成物および製剤を含む。対象の高ストリンジェンシーC D 3 4濃縮細胞集団および/または低ストリンジェンシーC D 3 4濃縮細胞集団は、霊長類への使用が許容される賦形剤を含む、一般に安全、無毒性、かつ望ましい製剤の調製において有用な薬学的に許容される担体、希釈剤、および試薬と組み合わせることができる。かかる賦形剤、担体、または希釈剤の例として、限定されないが、水、食塩水、リンゲル液、デキストロース溶液、および5%ヒト血清アルブミンが含まれる。また、補助的な活性化合物も製剤に組み入れることができる。製剤に使用される溶液または懸濁物として、注射用水、食塩溶液、ジメチルスルホキシド（D M S O）、固定油、ポリエチレングリコール、グリセリン、プロピレングリコールまたは他の合成溶媒などの無菌希釈剤、ベンジルアルコールまたはメチルパラベンなどの抗菌化合物、アスコルビン酸または亜硫酸水素ナトリウムなどの抗酸化剤、エチレンジアミン四酢酸（E D T A）などのキレート化合物、アセテート、シトレート、またはホスフェートなどの緩衝液、凝集を防止するためのT w e e n 20などの洗浄剤、および塩化ナトリウムまたはデキストロースなどの浸透圧を調整するための化合物を含むことができる。p Hは、塩酸または水酸化ナトリウムなどの酸または塩基で調整できる。特定の実施形態では、製剤は、無菌である。

【0207】

10

20

30

40

50

いくつかの実施形態では、CD34濃縮細胞集団は、現在の適正製造基準に従って製造される。現在の適正製造基準に従って製造されることは、投与のために調製される製剤が、管理規制および政府の許可の下でヒト対象への投与を可能にするのに十分に安全であることを意味する。一般に、制御規制および認可は、規制および認可を管理することにより、製剤が同一性、強度、品質、および純度に関して事前承認された受容基準を満たすことを規定する。許容基準には、製剤が現在の適正製造基準を満たしているかを決定するために使用される試験結果の数値制限、範囲、または他の適切な尺度が含まれる。仕様書には、許容基準への適合性を試験するために使用される分析手順が記載されている。製剤は、バッチで評価することができる。バッチは、許容基準を確実に遵守するために試験される製剤の特定の量である。

10

【0208】

製剤は、容器、パック、またはディスペンサ、例えば、シリンジ、例えば、充填済みシリンジに、投与のための指示書と共に含まれ得る。

【0209】

必要または有益な場合、製剤は、注入部位の疼痛を緩和するためにリドカインなどの局所麻酔剤を含むことができる。

【0210】

製剤内の治療有効量の細胞は、 10^2 を超える細胞、 10^3 を超える細胞、 10^4 を超える細胞、 10^5 を超える細胞、 10^6 を超える細胞、 10^7 を超える細胞、 10^8 を超える細胞、 10^9 を超える細胞、 10^{10} を超える細胞、または 10^{11} を超えることができる。

20

【0211】

本明細書に開示される製剤では、細胞は、概して、1リットル以下、500ml以下、250ml以下、または100ml以下の容量にある。したがって、投与される細胞の密度は、典型的には、 10^4 細胞/ml、 10^7 細胞/ml、または 10^8 細胞/mlを超える。

【0212】

本明細書に開示される製剤は、例えば、注入、点滴、灌流、または洗浄によって投与するために調製することができる。投与する治療有効量は、 10^2 を超える細胞、 10^3 を超える細胞、 10^4 を超える細胞、 10^5 を超える細胞、 10^6 を超える細胞、 10^7 を超える細胞、 10^8 を超える細胞、 10^9 を超える細胞、 10^{10} を超える細胞、または 10^{11} を超えて含むことができる。特定の実施形態では、最低用量は、 2×10^6 細胞/kgの対象体重である。

30

【0213】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供される薬学的組成物は、治療有効量の本明細書で開示される高ストリンジェンシーCD34濃縮細胞集団および低ストリンジェンシーCD34濃縮細胞集団のいずれかまたは両方を、薬学的に許容される担体ならびに/または賦形剤、例えば、食塩水、リン酸緩衝食塩水、リン酸、およびアミノ酸、ポリマー、ポリオール、糖、緩衝液、防腐剤、および他のタンパク質との混合物中に含む。例示的なアミノ酸、ポリマー、および糖などは、オクチルフェノキシポリエトキシエタノール化合物、ポリエチレングリコールモノステアレート化合物、ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル、スクロース、フルクトース、デキストロース、マルトース、グルコース、マンニトール、デキストラン、ソルビトール、イノシトール、ガラクトール、キシリトール、ラクトース、トレハロース、ウシまたはヒト血清アルブミン、クエン酸、酢酸、リンゲル液およびハンクス液、システイン、アルギニン、カルニチン、アラニン、グリシン、リジン、バリン、ロイシン、ポリビニルピロリドン、ポリエチレン、ならびにグリコールである。好ましくは、この製剤は、4で少なくとも6ヶ月間安定である。

40

【0214】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供される薬学的組成物は、緩衝液、例えば、リン酸緩衝食塩水(PBS)またはリン酸ナトリウム/硫酸ナトリウム、トリス緩衝液、グ

50

リシン緩衝液、無菌水、および Good et al. (1966) Biochemistry 5: 467 に記載されるものなどの当業者に既知の他の緩衝液を含む。アデノウイルスベクター送達系に含まれる腫瘍抑制遺伝子を含む薬学的組成物が含まれる緩衝液の pH は、6.5 ~ 7.75、好ましくは 7 ~ 7.5、最も好ましくは 7.2 ~ 7.4 の範囲であり得る。

【0215】

本明細書で言及される全ての刊行物は、引用される刊行物に関連して方法および/または材料を開示し、説明するために、参照により本明細書に組み込まれる。本開示は、矛盾が生じる場合には、組み込まれた刊行物のいかなる開示よりも優先されることを理解されたい。

10

【0216】

特許請求の範囲は、あらゆる任意の要素を除外するように立案され得ることにさらに留意されたい。そのため、この記述は、特許請求の範囲の要素の列挙に関連する「単に」、「のみ」などの排他的な用語の使用、または「否定的」な限定の使用の先行詞としての役割を果たすことが意図される。

【0217】

本明細書において論じられる刊行物は、本出願の出願日より前のそれらの開示についてのみ提供される。さらに、提供される刊行物の日付は実際の公開日とは異なる可能性があり、これらは独立して確認する必要がある。

【0218】

FA-A が FA 患者における最も頻繁な相補群であるため (Casado et al., 2007, Taniguchi et al., 2006)、FANCA 遺伝子および/または EGFP マーカー遺伝子を発現するベクターが実施例の焦点であるが、他の FANCA 遺伝子を利用して、同様に他の相補群が治療され得る。

20

【0219】

本開示は、特許請求の範囲に記載される本開示の範囲を限定しない以下の実施例にさらに記載される。

【実施例】

【0220】

実施例 1

高および低ストリンジェンシー CD34 濃縮細胞集団での患者の治療

患者 1 は、ファンconi貧血を呈した。その後、患者 1 は、G-CSF およびプレリキサンを用いて動員し、続いて連日で 2 回のアフエーシス収集を行った。同じ臨床試験における他の FA 患者と比較して、患者 1 は、循環 CD34 細胞の末梢血分析によって示される CD34 細胞の適度な動員を有し、他の患者と同様の動員動態を有した。2 回のアフエーシス収集の後、収集した HSPC を 2 つの末梢血生体試料に分けた。

30

【0221】

高ストリンジェンシー CD34 選択：第 1 の生体試料は、米国特許第 8,727,132 号に記載されるように、濃縮のための Miltenyi Biotec CD34 試薬で濃縮モードで Miltenyi Biotec CliniMACS (登録商標) システムを使用して、高ストリンジェンシー条件下で CD34+ 細胞について選択することによって濃縮した。高ストリンジェンシー CD34 選択は、CD34+ 細胞の 29.0% の収率、および 36% の相対純度をもたらした。

40

【0222】

低ストリンジェンシー CD34 選択：第 2 の生体試料は、Miltenyi Biotec CliniMACS (登録商標) システムの枯渇モード使用の修正を使用して、低ストリンジェンシー条件下で CD34+ 細胞について選択することによって濃縮した。簡単に説明すると、第 2 の生体試料を、Miltenyi Biotec CD34 試薬を使用して標識した。次いで、試料を機器の枯渇モードプログラムを使用してカラムに負荷した。磁石を「ON」にして試料を大量に負荷した後、細胞採取バッグ (標的細胞を採取す

50

るための機器の通常動作で使用)を取り外し、幹細胞移植には使用しなかった。「非標的細胞バッグ」を取り付け、次いで磁石を「OFF」にし、次いで溶出緩衝液を機器に適用し、CD34⁺細胞を非標的細胞バッグに溶出させた。非標的細胞バッグに収集した細胞集団は保存し、低ストリンジェンシーCD34濃縮細胞集団として指定した。低ストリンジェンシーCD34選択は、5.8%の相対純度で、CD34⁺細胞の54.5%の収率をもたらした。低純度は、選択プロセス中にCD34⁺細胞から精製されなかった他の造血細胞型に起因する。その結果を表1Aおよび1Bに要約する。

【0223】

(表1A) CD34濃縮前

FA	Aph	TNC	CD34%	総CD34	CD34/kg
Pt #1	1	1.36E+10	0.15	2.04E+07	1.46E+06
	2	2.30E+10	0.1	2.30E+07	1.64E+06

10

(表1B) CD34濃縮後

FA	Aph	CD34濃縮後					CD34収率
		CD34濃縮	TNC	CD34%	総CD34	CD34/kg	
Pt #1	1	低	1.92E+08	5.8	1.11E+07	7.95E+05	54.5
	2	高	1.85E+07	36	6.66E+06	4.76E+05	29.0

20

ファンコニ貧血 - A患者からの開始細胞数、およびCD34⁺細胞純度、および得られた細胞集団

Aph: アフェレーシス

TNC: 総有核細胞数

低: 修正したCliniMACS枯渇プログラム

高: 標準CliniMACS CD34濃縮プログラム

【0224】

続いて、高ストリンジェンシーCD34濃縮細胞集団および低ストリンジェンシーCD34濃縮細胞集団の両方を、各々、FANCA遺伝子産物をコードする組換え遺伝子療法ベクター(PGK-FANCA-WPRE*) (配列番号: 25) で個別に形質導入し、得られた遺伝的に改変された細胞をそれぞれ生成物1.1および生成物1.2に指定した。

30

【0225】

生成物1.1および生成物1.2を一緒に混合し、その後、臨床指標をモニタリングしながら10~30分間にわたって連続静脈内注入により患者1に投与した。

【0226】

患者1は、参加機関で移植された全てのFA患者の中で、最も速い、またはほぼ最も速いインビボ選択生着動態を示している。移植前にこのFA患者において低下していた造血システムの安定化の初期の傾向は、この治療法によって予想外に達成された臨床的成功のための説得力のあるエンドポイントである。他の5人のFA患者が標準的なCD34選択アプローチで移植されており、いずれも患者1に匹敵する生着動態を示していない。

40

【0227】

理論に束縛されることなく、高ストリンジェンシー(生成物1.1)および低ストリンジェンシー(生成物1.2)CD34濃縮細胞集団の混合物は、遺伝子改変されたFA造血細胞にインビボ選択的優位性を付与し、経時的に遺伝子改変された細胞の進行的増加をもたらすと考えられる。生成物1.1(高ストリンジェンシーCD34濃縮細胞集団)は、造血に寄与する遺伝子組改変された細胞の大部分を提供していると考えられ、生成物1.2(低ストリンジェンシーCD34濃縮細胞集団)は、生成物1.1による頑強な生着および造血再増殖を促進したと考えられる。

50

【0228】

実施例2

系統枯渇細胞集団による治療の比較有効性

患者2は、ファンコニ貧血を呈した。末梢血生体試料を、実施例1と同等の手順を用いて動員アフエーシスによって患者2から得た。系統枯渇細胞集団は、生体試料をCD3/CD14/CD16/CD19試薬で標識し、Miltenyi Biotec ClinimaCS（登録商標）システムを枯渇モードで使用して、標識された細胞の試料を枯渇させることによって調整した。系統枯渇CD34選択は、1.6%の相対純度で、CD34⁺細胞の56%の収率をもたらした。低純度は、選択プロセス中にCD34⁺細胞から精製されなかった他の造血細胞型に起因する。CD34細胞の収率および純度は、低ストリンジェンシーCD34濃縮細胞集団において患者1で達成されたものと同等であった。高ストリンジェンシーCD34濃縮細胞集団は、調製しなかった。系統枯渇細胞集団は、FANCA遺伝子産物をコードする組換え遺伝子療法ベクターで形質導入し、生成物2.1として指定した。

10

【0229】

製品2.1は、患者1で使用されているものに匹敵する細胞数の臨床指標をモニタリングしながら、10~30分間の持続静脈内注入によって患者2に投与した。患者1とは対照的に、移植から6ヶ月後には、患者2の血液中で遺伝子組み換え細胞は検出できなかった。したがって、生成物1.2単独に類似していると考えられる生成物2.1は、検出可能な造血回復をもたらさない。

20

【0230】

実施例3

より高い収率のための低ストリンジェンシー条件の修正、および結果として生じる細胞集団による治療

患者3は、ファンコニ貧血を呈する。末梢血生体試料は、実施例1と同等の手順を用いて動員アフエーシスによって患者3から得られる。アフエーシス収集後、収集したHSPCを2つの末梢血生体試料に分ける。

【0231】

高ストリンジェンシーCD34選択：第1の生体試料は、実施例1に記載されるように、濃縮のためのMiltenyi Biotec CD34試薬で濃縮モードでMiltenyi Biotec ClinimaCS（登録商標）システムを使用して、高ストリンジェンシー条件下でCD34⁺細胞について選択することによって濃縮した。高ストリンジェンシーCD34選択は、CD34⁺細胞の20%を超える収率、および20%を超える相対純度をもたらす。ClinimaCS（登録商標）システム上のCD34選択プログラムは、表2に示されるようなパラメータで上記に記載されるような試料を使用して実行した。プロセスは、およそ20~30分間続く。ClinimaCS（登録商標）システムの「標的細胞バッグ」は、高ストリンジェンシーCD34濃縮細胞集団を含む。

30

【0232】

(表2)

40

入力プログラムおよび試料パラメータ		
分離プログラム	濃縮 1.1	
チューブセット (リストから選択)	CliniMACS LS チューブセット REF 162-01	
細胞濃度 [$\times 10^6$ /mL]	180 最小: 20、最大: 400	
標識細胞の頻度 [%]	1 最小: 1、最大: 80	
試料負荷容積 [mL]	150 最小: 60、最大: 400	10
計算処理パラメータ		
最大処理時間 [分]	29	
処理される標識細胞 [-]	2. 7E+08	
ステージ数 [-]	1	
プロセス仕様	内側仕様	20
計算されたプロセスパラメータ - 画面出力		
処理 [mL] に必要な緩衝液	1000	
バッグサイズ; 細胞収集バッグ [mL]	150	
バッグサイズ: 陰性画分バッグ [mL] または非標的細胞バッグ [mL]	500	30
バッグサイズ: 緩衝液廃棄バッグ [mL]	500	
バッグサイズ: プライミング廃棄バッグ [mL] または再適用バッグ [mL]	変更なし	
追加の処理パラメータ		
秒単位におけるステージ長	511	
mL におけるステージ長	85	40

【 0 2 3 3 】

低ストリンジェンシー CD34 選択: 第 2 の生体試料は、患者 1 に適用される低ストリンジェンシー濃縮と比較して CD34+ 細胞のより高い収量を提供することを意図した修正を伴う、実施例 1 に記載される Miltenyi Biotec CliniMACS (登録商標) システムの枯渇モード使用の修正を使用する低ストリンジェンシー条件下で CD34+ 細胞について選択することによって濃縮した。

【 0 2 3 4 】

抗凝固クエン酸デキストロース溶液 (ACD - A) で抗凝固された末梢血由来のアフェレーシス生成物は、 $6.0 \times 10^9 \sim 6 \times 10^8$ の総細胞 (CD34 標識試薬の 1 つのパイ

アルを使用する場合)または $1.20 \times 10^9 \sim 1.2 \times 10^8$ の総細胞(CD34標識試薬の2つのバイアルを使用する場合)のいずれかで提供される。無菌条件下における層流フード内で、細胞数、細胞生存率、およびCD3⁺、CD19⁺、またはCD34⁺細胞の亜集団の数を測定する。アフェレーシス生成物を、リン酸緩衝食塩水(PBS)で600 mLの総容量に満たされた導入バッグに導入する。内容物を230Gで15分間遠心分離し、上清を除去し、90 mLを残し、5 mLの免疫グロブリンを添加し、次に室温で10分間混合する。CliniMACS(登録商標)CD34試薬の1つまたは2つの7.5 mLのバイアルをバッグに注入し、それを混合し、室温で30分間攪拌下でインキュベートする。細胞を230Gで15分間遠心分離し、150 mLのPBS中に再懸濁した。

【0235】

CliniMACS(登録商標)システム上のCD34選択プログラムは、表2に示されるようなパラメータで上記に記載されるような試料を使用して実行した。プロセスは、およそ20~30分間続く。プログラムは、洗浄ステップのいずれかが行われ、CD34濃縮細胞および他の非特異的細胞が「標的細胞袋」に流される前に中止される。CliniMACS(登録商標)システムの「標的細胞バッグ」は、低ストリンジェンシーCD34濃縮細胞集団を含む。CliniMACS(登録商標)システムの「非標的細胞バッグ」は、非標的細胞を含む。

【0236】

低ストリンジェンシーCD34選択は、CD34⁺細胞の約35%~60%の収率、および約10%~30%の相対純度をもたらす。

【0237】

続いて、高ストリンジェンシーCD34濃縮細胞集団および低ストリンジェンシーCD34濃縮細胞集団の両方を、各々、個別に形質導入するか、または実施例1に記載されるように、FANCA遺伝子産物をコードする組換え遺伝子治療ベクターで組み合わせ、形質導入し、得られた遺伝的に改変された細胞をそれぞれ生成物3.1および生成物3.2に指定した。

【0238】

個別に形質導入した生成物3.1および生成物3.2と一緒に混合し、その後静脈内ボラスにより患者3に投与した。

【0239】

患者3は、急速なインビボ選択生着動態を示す。この治療プロトコルは、造血、好中球、赤血球、および血小板における多系統をもたらす。移植前に患者3において低下していた造血系統の安定化は、臨床的成功のための説得力のあるエンドポイントである。

【0240】

実施例4

高および低ストリンジェンシーCD34濃縮細胞集団でCRISPR-CASを使用する遺伝子治療

生体試料を追加の患者から採取し、実施例3に記載されるように高ストリンジェンシーおよび低ストリンジェンシーCD34濃縮細胞集団を調製する。組み換え遺伝子療法を創出し、これは内因性FANCA遺伝子の指示された修復が可能な遺伝子編集システムを提供するように設計した。遺伝子編集システムは、Casタンパク質またはCasタンパク質をコードするポリヌクレオチド、gRNA、および修復鋳型を含む。修復鋳型は、追加の患者におけるFANCA遺伝子(例えば、FANCA)に対する既知の変異(複数可)と重複する配列断片を含む。高ストリンジェンシーおよび低ストリンジェンシーCD34濃縮細胞集団の一方または両方を組換え遺伝子療法ベクターと接触させ、次いで2つのCD34濃縮細胞集団の混合物を患者の各々に自家移植する。患者は、急速なインビボ選択生着動態を示す。この治療プロトコルは、造血、好中球、赤血球、血小板における多系統の増加をもたらす。移植前に患者において低下していた造血系統の回復は、臨床的成功のための説得力のあるエンドポイントである。

10

20

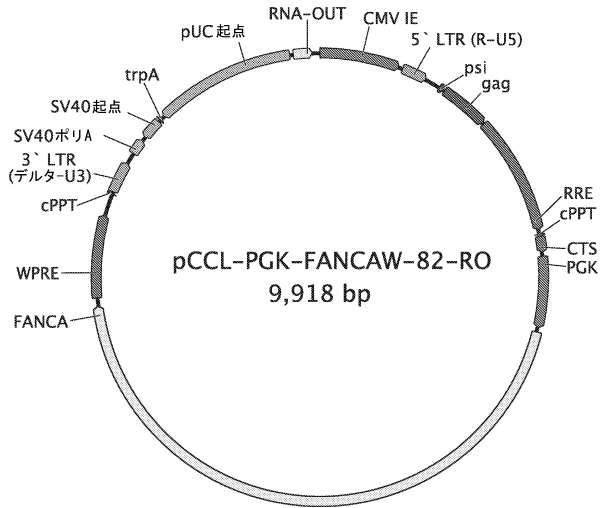
30

40

50

【 図面 】

【 図 1 】



10

【 配列表 】

0007576754000001.app

20

30

40

50

フロントページの続き

- (74)代理人 100160923
弁理士 山口 裕孝
- (74)代理人 100119507
弁理士 刑部 俊
- (74)代理人 100142929
弁理士 井上 隆一
- (74)代理人 100148699
弁理士 佐藤 利光
- (74)代理人 100128048
弁理士 新見 浩一
- (74)代理人 100129506
弁理士 小林 智彦
- (74)代理人 100205707
弁理士 小寺 秀紀
- (74)代理人 100114340
弁理士 大関 雅人
- (74)代理人 100121072
弁理士 川本 和弥
- (72)発明者 ピアード ブライアン
アメリカ合衆国 1 0 1 1 8 ニューヨーク州 ニューヨーク フィフス アベニュー 3 5 0 スイート 7 5 3 0 ジ エンパイア ステート ビルディング ロケット ファーマシューティカルズ リミテッド内
- (72)発明者 セビラ ナバーロ フリアン
スペイン王国 2 8 0 0 9 マドリッド アベニーダ メネンデス ペラーヨ ナンバー 6 5 フンダシオン パラ ラ インベスティガシオン バイオメディカ デル オスピタル インファンティル ウニベルシタリオ ニーニョ ヘスス内
- (72)発明者 シャー ゴーラヴ
アメリカ合衆国 1 0 1 1 8 ニューヨーク州 ニューヨーク フィフス アベニュー 3 5 0 スイート 7 5 3 0 ジ エンパイア ステート ビルディング ロケット ファーマシューティカルズ リミテッド内
- (72)発明者 パテル キンナリー
アメリカ合衆国 1 0 1 1 8 ニューヨーク州 ニューヨーク フィフス アベニュー 3 5 0 スイート 7 5 3 0 ジ エンパイア ステート ビルディング ロケット ファーマシューティカルズ リミテッド内
- (72)発明者 ブラバカール ラジ
アメリカ合衆国 1 0 1 1 8 ニューヨーク州 ニューヨーク フィフス アベニュー 3 5 0 スイート 7 5 3 0 ジ エンパイア ステート ビルディング ロケット ファーマシューティカルズ リミテッド内
- 審査官 柴原 直司
- (56)参考文献 国際公開第 2 0 1 6 / 1 1 8 7 8 0 (W O , A 1)
国際公開第 2 0 1 8 / 0 4 9 2 7 3 (W O , A 1)
Blood, (2017), 130, [suppl.1], Article.2451 DOI:10.1182/blood.V130.Suppl_1.2451.2451
Stem Cells Dev., (2016), 25, [20], p.1591-1603
- (58)調査した分野 (Int.Cl. , D B 名)
A 6 1 K 3 5 / 2 8
A 6 1 K 3 5 / 0 0 - 3 5 / 7 6 8
A 6 1 K 3 6 / 0 6 - 3 6 / 0 6 8
C 1 2 N 1 / 0 0 - 7 / 0 8
C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 1 5 / 9 0

CAplus/BIOSIS/MEDLINE/EMBASE (STN)
REGISTRY/CASREACT/MARPAT/KOSMET/GSTA/RDI
SCLOSURE/ReaxysFile/CHEMCATS/AGRICOLA/BI
OTEHNO/CABA/SCISEARCH/TOXCENTER (STN)
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)