

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2005-521632**(P2005-521632A)**

(43) 公表日 平成17年7月21日(2005.7.21)

(51) Int.Cl.⁷

F I

テーマコード (参考)

A 6 1 K 48/00

A 6 1 K 48/00

Z N A

4 B O 2 4

A 6 1 K 35/14

A 6 1 K 35/14

C

4 B O 6 3

A 6 1 K 35/28

A 6 1 K 35/28

4 B O 6 5

A 6 1 P 7/00

A 6 1 P 7/00

4 C O 8 4

A 6 1 P 31/12

A 6 1 P 31/12

4 C O 8 7

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 34 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2003-512371 (P2003-512371)

(86) (22) 出願日 平成14年7月10日 (2002.7.10)

(85) 翻訳文提出日 平成16年3月9日 (2004.3.9)

(86) 国際出願番号 PCT/US2002/021713

(87) 国際公開番号 W02003/006612

(87) 国際公開日 平成15年1月23日 (2003.1.23)

(31) 優先権主張番号 60/304, 283

(32) 優先日 平成13年7月10日 (2001.7.10)

(33) 優先権主張国 米国 (US)

(31) 優先権主張番号 60/343, 392

(32) 優先日 平成13年10月22日 (2001.10.22)

(33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 501059604

ジョンソン・アンド・ジョンソン・リサー

チ・ピー・ティー・ワイ・リミテッド

JOHNSON & JOHNSON,

RESEARCH, PTY. LIM I

TED.

オーストラリア国、1430 ニュー・サ

ウス・ウェールズ州、エベレイ、セントラ

ル・アベニュー 1

1 Central Avenue, E

veleigh 1430, NSW,

Australia.

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 形質導入造血前駆細胞の生産

(57) 【要約】

本発明は、外来核酸含有造血前駆細胞を患者に導入するための方法に関する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

外来核酸を含む造血前駆 (H P) 細胞を患者に導入するための方法であって、

(a) 患者から C D 3 4 + H P 細胞を含む細胞サンプルを得るステップと、

(b) 少なくとも 4 0 % の H P 細胞を含む細胞集団を得るために前記 H P 細胞を濃縮するステップと、

(c) 前記 H P 細胞で発現可能な外来核酸を含むベクターを前記細胞集団に導入して、生体外で (in vitro) 更に培養するステップと、

(d) 前記同一の患者または第 2 の患者に投与したときに、総数で C D 3 4 + H P 細胞を体重 1 k g 当たり 1.63×10^6 含み、そのうち遺伝子含有 C D 3 4 + H P 細胞を少なくとも 0.52×10^6 含む用量を前記同一の患者または前記第 2 の患者が受け取るようにするために、このような外来核酸含有 H P 細胞の数を決定するステップと、

(e) 前記用量を前記患者に投与するステップとを含むことを特徴とする方法。

【請求項 2】

骨髓移植後に、前記患者の骨髓に少なくとも 1 0 % の外来核酸含有 H P 細胞が存在することを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記外来核酸含有 H P 細胞の数が、体重 1 k g 当たり 0.52×10^6 の遺伝子含有 C D 3 4 + H P 細胞よりも少ない場合、前記細胞を凍結して、前記 H P 細胞数が、体重 1 k g 当たり 0.52×10^6 の遺伝子含有 C D 3 4 + H P 細胞よりも多くなるまで、請求項 1 に記載の方法を 1 回または複数回繰り返す、または 1 回または複数回の動員ステップ及び/またはアフエーシスステップを追加することを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

請求項 1 に記載の方法に従って得られた遺伝子改変 C D 3 4 + H P 細胞集団。

【請求項 5】

前記同一の患者または前記第 2 の患者に投与する前記外来核酸含有 C D 3 4 + H P 細胞の数が、体重 1 k g 当たり少なくとも 1×10^7 であることを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6】

前記同一の患者または前記第 2 の患者に投与する前記外来核酸含有 C D 3 4 + H P 細胞の数が、体重 1 k g 当たり少なくとも 2×10^7 であることを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

【請求項 7】

前記同一の患者または前記第 2 の患者に投与する前記外来核酸含有 C D 3 4 + H P 細胞の数が、体重 1 k g 当たり少なくとも 4×10^7 であることを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

【請求項 8】

前記同一の患者または前記第 2 の患者に投与する前記外来核酸含有 C D 3 4 + H P 細胞の数が、体重 1 k g 当たり少なくとも 8×10^7 であることを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

【請求項 9】

前記同一の患者または前記第 2 の患者に投与する前記外来核酸含有 C D 3 4 + H P 細胞の数が、体重 1 k g 当たり少なくとも 10×10^7 であることを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

【請求項 10】

前記外来核酸含有 C D 3 4 + H P 細胞が、外来核酸を含む子孫リンパ細胞及び子孫骨髓細胞を産生し、これらの細胞を、前記投与ステップ後の少なくとも 1 年間は前記患者の体内で検出できることを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

【請求項 11】

前記投与ステップ後の 4 年以内は、請求項 1 に記載の方法により得られたキメラ造血系

10

20

30

40

50

では、何れの種類の抹消血細胞においても少なくとも0.01%が外来核酸含有細胞であることを特徴とする請求項1乃至請求項11に記載の方法。

【請求項12】

治療後の4年以内は、何れの種類の抹消血細胞においても少なくとも0.1%が外来核酸含有細胞であるキメラ造血系を生成することを特徴とする請求項1乃至請求項11に記載の方法。

【請求項13】

治療後の4年以内は、何れの種類の抹消血細胞においても少なくとも1%が外来核酸含有細胞であるキメラ造血系を生成することを特徴とする請求項1乃至請求項11に記載の方法。

【請求項14】

治療後の4年以内は、何れの種類の抹消血細胞においても少なくとも10%が外来核酸含有細胞であるキメラ造血系を生成することを特徴とする請求項1乃至請求項11に記載の方法。

【請求項15】

治療後の4年以内は、何れの種類の抹消血細胞においても少なくとも20%が外来核酸含有細胞であるキメラ造血系を生成することを特徴とする請求項1乃至請求項11に記載の方法。

【請求項16】

治療後の4年以内は、何れの種類の抹消血細胞においても少なくとも50%が外来核酸含有細胞であるキメラ造血系を生成することを特徴とする請求項1乃至請求項11に記載の方法。

【請求項17】

治療後4年以内に採取される骨髓の生検で少なくとも0.01%が外来核酸含有細胞であるキメラ造血系を生成することを特徴とする請求項1乃至請求項11に記載の方法。

【請求項18】

治療後4年以内に採取される生検で少なくとも0.1%が外来核酸含有細胞であるキメラ造血系を生成することを特徴とする請求項1乃至請求項11に記載の方法。

【請求項19】

治療後4年以内に採取される生検で少なくとも1%が外来核酸含有細胞であるキメラ造血系を生成することを特徴とする請求項1乃至請求項11に記載の方法。

【請求項20】

治療後4年以内に採取される生検で少なくとも10%が外来核酸含有細胞であるキメラ造血系を生成することを特徴とする請求項1乃至請求項11に記載の方法。

【請求項21】

治療後4年以内に採取される生検で少なくとも20%が外来核酸含有細胞であるキメラ造血系を生成することを特徴とする請求項1乃至請求項11に記載の方法。

【請求項22】

治療後4年以内に採取される生検で少なくとも50%が外来核酸含有細胞であるキメラ造血系を生成することを特徴とする請求項1乃至請求項11に記載の方法。

【請求項23】

患者に対して骨髓切除ステップを実施しないことを特徴とする請求項1に記載の方法。

【請求項24】

前記方法を用いて患者に抗ウイルス治療を実施することを特徴とする請求項1に記載の方法。

【請求項25】

前記抗ウイルス治療が抗HIV治療であることを特徴とする請求項1に記載の方法。

【請求項26】

前記抗HIV治療がリボザイム治療であることを特徴とする請求項1に記載の方法。

【請求項27】

10

20

30

40

50

前記リボザイム治療が R R z 2 リボザイムの使用を含むことを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

【請求項 2 8】

請求項 1 乃至請求項 1 1 において、抗 H I V 遺伝子治療としてリボザイム R R z 2 を使用すること。

【請求項 2 9】

請求項 1 乃至請求項 1 1 の方法において、他の抗 H I V リボザイムを単独で、または R R z 2 と共に使用すること。

【請求項 3 0】

前記抗 H I V 治療が、R N A デコイ、細胞内抗体、または阻害 R N A を利用するアンチセンス治療であることを特徴とする請求項 2 5 に記載の方法。 10

【請求項 3 1】

量的リアルタイム P C R を用いて、外来核酸断片またはその外来核酸断片の転写産物を含む C D 3 4 + H P 細胞のパーセンテージを決定すること。

【請求項 3 2】

請求項 1 乃至請求項 1 1 の何れかに記載の方法において、DzyNA PCR を用いて抗ウイルス作成物を含む抹消血細胞、リンパ細胞、及び骨髓細胞のパーセンテージを決定すること。

【請求項 3 3】

請求項 1 乃至請求項 1 1 の何れかに記載の方法において、DzyNA PCR を用いて R R z 2 遺伝子作製物を発現する抹消血細胞、リンパ細胞、及び骨髓細胞のパーセンテージを決定すること。 20

【請求項 3 4】

前記患者から採取した少なくとも骨髓サンプルが、C D 3 4 + H P 細胞を少なくとも 1 0 % 含むことを特徴とする請求項 1 乃至請求項 1 1 に記載の方法。

【請求項 3 5】

少なくとも 1 つの他の抗 H I V 治療と組み合わせて請求項 1 の方法を実施することを含む H I V 感染患者の治療計画。

【発明の詳細な説明】

【発明の詳細な説明】

30

【0 0 0 1】

発明の分野

本発明は遺伝子治療に関し、特に、造血前駆 (H P) 細胞に関する。詳細には、本発明は、所望の治療効果を得るために患者に送達する形質導入 H P 細胞の濃縮プールの生成、並びにこの形質導入 H P 細胞の濃縮プールの製造方法及び使用方法に関する。

【0 0 0 2】

発明の背景

本発明において、遺伝子治療とは、治療効果を得るために特定の種類の細胞に組換え D N A 配列を計画的に導入することである。遺伝子治療には、異常に発現する遺伝子を不活化するために必要な遺伝子の導入、または他の核酸作製物の使用が含まれ得る。遺伝子治療の目的は、例えば遺伝子異常による様々な疾患を治療することにある。 40

【0 0 0 3】

多数の研究者が、組織培養に新規な抗ヒト免疫不全ウイルス剤を用いる様々な遺伝子治療法を提案し研究してきた。このような治療法には、トランスドミナントタンパク質 (transdominant proteins) の細胞内発現 (スマイス (Smythe) 他、1 9 9 4 年)、細胞内抗体 (マラスコ (Marasco) 他、1 9 9 8 年)、アンチセンス・リボ核酸 (R N A) (シュザキエル (Sczakiel) 他、1 9 9 1 年)、ウイルスデコイ (viral decoys) (コーン (Kohn) 他、1 9 9 9 年)、及び触媒リボザイム (サーバー (Sarver) 他、1 9 9 0 年、サン (Sun) 他、1 9 9 4 年、サン (Sun) 他、1 9 9 6 年) が含まれる。

【0 0 0 4】

50

リボザイムは、例えばH I V - 1や他のH I V株を含め、特定のR N A標的分子を切断可能な小さな触媒R N A部分である。例えば、H I V - 1に対するリボザイムは、H I V - 1のライフサイクルにおける複数のステップを阻害してH I V - 1の複製を阻害することができる。H I V - 1のライフサイクルには、(i) 逆転写の前に最近感染した細胞でゲノムウイルスR N Aを産生すること、及び(i i) 翻訳またはゲノムR N Aパッケージングの前にプロウイルスから転写されたウイルスN R Aを産生することが含まれる(サーバー(Sarver) 他(1 9 9 0 年)、サン(Sun) 他(1 9 9 4 年)、サン(Sun) 他(1 9 9 6 年)、サン(Sun) 他(1 9 9 8 年))。一般に、リボザイムはアンチセンス系の治療法よりも効果的であると考えられている。なぜなら、リボザイムは、1つの触媒リボザイムが細胞内の複数のR N A基質分子に結合して切断することができる触媒分子であるからである(サーバー(Sarver) 他(1 9 9 0 年)、サン(Sun) 他(1 9 9 4 年)、サン(Sun) 他(1 9 9 6 年))。 10

【 0 0 0 5 】

リボザイムによる切断は、ハンマーヘッド型リボザイムの場合にはアクセス可能なR N A領域が必要であり、N U Xが十分であろう場合には(ここで、Nは任意のリボヌクレオチド、XはA、C、またはUのリボヌクレオチドである)、G U X標的モチーフが必要である(ここで、Gはグアノシン、XはA、C、またはUのリボヌクレオチドである)。他の抗ウイルス治療とは異なり、触媒R N Aは免疫反応を誘発する可能性が低い。触媒R N Aを発現する不所望の免疫反応は、外来遺伝子を含む細胞を除去することができる。 20

【 0 0 0 6 】

多数の研究で、試験管反応におけるリボザイムの切断活性、並びにH I V - 1の実験室分離株及び臨床分離株に対する組織培養系での保護効果が実証された(サーバー(Sarver) 他(1 9 9 0 年)、サン(Sun) 他(1 9 9 4 年)、サン(Sun) 他(1 9 9 6 年)、サン(Sun) 他(1 9 9 8 年)、ワン(Wang) 他(1 9 9 8 年))。ハンマーヘッド型リボザイムまたはヘアピン型リボザイムを用いたこれらの研究では、例えば、R z 2と呼ばれるハンマーヘッド型リボザイムは、t a t遺伝子の高度に保存された領域に対して行われた(図1を参照)。t a t遺伝子はH I V - 1の複製に必須であり、組み込まれたH I Vプロウイルスの転写アクティベータであるT a tタンパク質をコードし産生する。R z 2リボザイムは、相補的にハイブリダイズする標的配列を有する。この標的配列は、基準株H I V - H X B 2 (Genbankアクセッション番号: K03455) の5 8 3 3 番目~ 5 8 4 9 番目のヌクレオチド(配列番号1) を含み、HIV IIIB (Genbankアクセッション番号: X01762) の5 8 6 5 番目~ 5 8 8 1 番目のヌクレオチド(配列番号1) も同様に標的配列である。このような研究では、新規のウイルスR R z 2を作製するべく、R z 2リボザイム配列(配列番号2) をD N Aとしてプラスミドp L N L 6内のn e o^R 遺伝子の3' 非翻訳領域に導入した。プラスミドp L N L 6は、複製不能なレトロウイルスベクターL N L 6 (ベンダー(Bender) 他(1 9 8 7 年)、Genbankアクセッション番号: M63653、以下の定義を参照されたい) を含む。このリボザイム配列は、R R z 2のマウス・モロニー白血病ウイルス(Moloney Murine Leukemia Virus: MoMLV) の長い末端反復配列(L T R) からn e o^R - リボザイム融合転写物として発現した。このウイルスを用いて、生体外で(in vitro) H I V感染細胞を切断するのに成功した。 30 40

【 0 0 0 7 】

体外(ex vivo) での治療用遺伝子のC D 3 4 + 多能性造血前駆細胞内への導入は、H I V - 1感染の治療にとって魅力的である。なぜなら、このような前駆細胞は、より成熟した造血細胞(C D 3 4 + 抗原が1 1 5 K dの膜結合分子であって、細胞を形成する多系統コロニーを発生させることができる細胞の表面に存在するが、より成熟した造血細胞表面には存在しないことに留意されたい(ボーム(Baum) 他、1 9 9 2 年)) から容易に分離でき、比較的迅速にリンパ系(C D 4 + Tリンパ球、C D 8 + Tリンパ球) 及び骨髄系(単球/ マクロファージ) の血球生成を再構築することができるからである(レビンスキー(Levinsky) (1 9 8 9 年)、シュワルツバーグ(Schwartzberg) 他(1 9 9 2 年))。造血前駆(H P) 細胞は分化して成熟し、中間前駆細胞を経る様々な系統の細胞の成熟 50

を促す。H I V / A I D S 感染で重要な細胞は、C D 4 + T リンパ球及び単球 / マクロファージである。再構築に時間が必要であるが、1 つの C D 3 4 + H P 細胞は、様々な系統の様々な成熟段階の細胞からなる全ての造血細胞系を理論的に再構築することができる。とは言うものの、実用的な見地からは、遺伝子改変細胞集団を含む造血系を効率的に再定着し、これにより疾患に影響を与えることができる形質導入 H P 細胞の最適な数は分かっていなかった。

【 0 0 0 8 】

2 つのフェーズ I の臨床試験を、R R z 2 を用いて C D 4 + 細胞 (クーパー (Cooper) 他、1 9 9 9 年) または C D 3 4 + 細胞 (アマド (Amado) 他、1 9 9 9 年) の何れかに作製物を導入して行った。それぞれの臨床試験では、それぞれの適切な細胞集団 (C D 4 + または C D 3 4 +) の約半分を L N L 6 で形質導入し、残りの半分以上を R R z 2 で形質導入し、次いで、ここに開示する方法とは異なった方法で細胞を混合して再注入した。C D 4 + の臨床試験では、R R z 2 を含むリンパ球を H I V 陰性のドナーから採取し、体外 (ex vivo) で形質導入し、遺伝子的に同一の双子に導入した (クーパー (Cooper) 他、1 9 9 9 年)。

【 0 0 0 9 】

C D 3 4 + 臨床試験では、体外 (ex vivo) での C D 3 4 + 細胞への R R z 2 の導入及び同一患者へのこれらの細胞の注入は、技術的に可能で安全であることが示され、抹消リンパ球及び骨髄細胞にリボザイム作製物の存在及び発現が確認された。この研究の目的は少なくとも、H I V 感染患者の細胞を H I V - 1 感染及び H I V - 1 の細胞内複製から少なくとも部分的に保護することにある。実際にこの研究により、C D 3 4 + 臨床試験において、L N L 6 含有リンパ球よりも R R z 2 含有リンパ球の方が優先的に生存することが実証された。本発明とは異なり、フェーズ I H P 臨床試験は、本発明の提案よりも各患者に戻す平均細胞数を少なくし、形質導入効率を低くして行われた。その代わりに、フェーズ I 臨床試験は、体外 (ex vivo) 法の可能性及び安全性を評価するため、並びに患者におけるこれらの形質導入細胞の造血細胞の子孫の存在 (持続) の長さを決定するために確立された。C D 3 4 + 細胞が大きな再構成及び再増殖の可能性を有していることが知られており、C D 3 4 + 細胞が H I V によって直接感染するのではない証拠が存在する。ある意味では、本発明は、患者の体内の保護された細胞の継続中の供給源となり、疾患の進行を阻害する治療的に適切なレベル形質導入された C D 3 4 + 細胞を確認することに関する。

【 0 0 1 0 】

H I V 感染のみならず、造血系の細胞に関連する他の疾患を含む疾患の進行に影響を与えるには、適当な時間内で遺伝子組換え成熟リンパ細胞及び骨髄細胞を生産する十分な数の遺伝子組換え前駆リンパ細胞及び骨髄細胞を生産するために、形質導入された H P 細胞数の意味を明確にし細胞数を最大化する必要がある。

【 0 0 1 1 】

体外 (ex vivo) で形質導入された遺伝子組換え H P 細胞で患者に恩恵を与えるには、ウイルス感染及び / または疾患の進行を阻害するリボザイム含有成熟リンパ細胞 (C D 4 + T リンパ球及び C D 3 4 + T リンパ球) 及び骨髄細胞 (単球 / マクロファージ) を十分に産生するキメラ造血系を生成するべく、レシピエント患者に十分な数の形質導入 H P 細胞を導入する必要があると本発明者達は考えた。また、造血系の遺伝子改変 H P 細胞またはより成熟した前駆細胞が必要なウイルス性または非ウイルス性の全ての疾患についても同様のことが言える。このような疾患では、遺伝子含有子孫を産生するように H P 細胞を全く同様に単離、処理、及び形質導入して、これを患者に再導入してその患者の骨髄に樹立すなわち移植することができる。従って、本発明は、患者に送達するために、治療用遺伝子が形質導入された H P 細胞の濃縮プールの必要な治療量を定義、入手、及び準備することに関する。この濃縮プールは、C D 3 4 + 細胞を含む H P 細胞の集団を起源とする。原理としては、これらの形質導入 H P 細胞が治療用遺伝子を含む成熟したリンパ細胞及び骨髄細胞を生産する。

【非特許文献1】アギーラ・エイチ・エル (Aguila, H. L.)、ケイ・アカシ (K. Akashi)、ジェイ・ドーマン (J. Domen)、ケイ・エル・ガンディ (K. L. Gandy)、イー・ラガシ (E. Lagasse)、アール・イー・メビウス (R. E. Mebius)、エス・ジェイ・モリソン (S. J. Morrison)、ジェイ・シズル (J. Shizuru)、エス・ストローバー (S. Strober)、エヌ・ウチダ (N. Uchida) 他著、「幹細胞からリンパ球へ：生物学と移植 (From stem cells to lymphocytes: biology and transplantation)」、イムノ・レビュー (Immunol Rev)、1997年、157:13~40

【非特許文献2】アマド・アール・ジー (Amado, R. G.)、アール・ティー・ミツヤス (R. T. Mitsuyasu)、ジー・シモンズ (G. Symonds)、ジェイ・ディー・ローゼンブラット (J. D. Rosenblatt)、ジェイ・ザック (J. Zack)、エル・キュー・サン (L. -Q. Sun)、エム・ミラー (M. Miller)、ジェイ・イーリー (J. Ely)、ダブリュー・ガーラック (W. Gerlach) 著、「抗HIVリボザイムを用いて形質導入された自己CD34+造血前駆細胞のフェーズI臨床試験 (A phase I trial of autologous CD34+ hematopoietic progenitor cells transduced with an anti-HIV ribozyme)」、ヒューマン・ジーン・セラ (Human Gene Ther)、1999年、10:2255~2270

【非特許文献3】ボーム・シー (Baum C.)、アイ・エル・ウェイスマン (I. L. Weissman)、エイ・エス・ツカモト (A. S. Tsukamoto)、エイ・エム・バックル (A. -M. Buckle)、ビー・ピールト (B. Peault) 著、「候補ヒト造血幹細胞集団の単離 (Isolation of candidate human hematopoietic stem-cell population)」、(米国)、米国科学アカデミー紀要 (Proc Natl Acad Sci)、1992年、89:2804~2808

【非特許文献4】ベンダー・エム・エイ (Bender, M. A.)、パルマー・ティー・ディー (Palmer, T. D.)、ジェリナス・アール・イー (Gelinas, R. E.)、ミラー・エイ・ディー (Miller, A. D.) 著、「マウス・モロニー白血病ウイルスのパッケージングシグナルがギャップ領域内への進入の証拠 (Evidence that the packaging signal of Moloney murine leukemia virus extends into the gag region)」、ジェイ・バイロル (J Virol)、1987年、61, 1639~1646

【非特許文献5】クーパー・ディー (Cooper, D.)、アール・ペニー (R. Penny)、ジー・シモンズ (G. Symonds)、エイ・カー (A. Carr)、ダブリュー・ガーラック (W. Gerlach)、エル・キュー・サン (L. Q. Sun)、ジェイ・イーリー (J. Ely) 著、「HIV不一致一卵性双生児における治療的に形質導入されたCD4+末梢血リンパ球のマーカー研究 (A marker study of therapeutically transduced CD4+ peripheral blood lymphocytes in HIV discordant identical twins.)」、ヒューマン・ジーン・セラ (Hum Gene Ther)、1999年、10(8):1401~1421

【非特許文献6】ハース・エイ・ティー (Haase, A. T.)、ヘンリー・ケイ (Henry, K.)、ジュバンチッチ・エム (Zupancic, M.)、セッジウィック・ジー (Sedgewick, G.)、ファウスト・アール・エイ (Faust, R. A.)、メルロエ・エイチ (Melroe, H.)、カバート・ダブリュー (Cavert, W.)、ゲブハード・ケイ (Gebhard, K.)、スタスクス・ケイ (Staskus, K.)、ジャン・ゼット・キュー (Zhang, Z. Q.)、デイリー・ピー・ジェイ (Dailey, P. J.)、バルフォア・エイチ・エイチ (Balfour, H. H.)、エリス・エイ・ジュニア (Jr. Erice A.)、ペレルソン・エイ・エス (Perelson, A. S.) 著、「リンパ組織におけるHIV-1感染の量的イメージ分析 (Quantitative image analysis of HIV-1 infection in lymphoid tissue)」、サイエンス (Science)、1996年、274, 985~989

【非特許文献7】ノップ・エイ・イー (Knop, A. E.)、エイ・ジェイ・アーント (A. J. Arndt)、エム・ラボニ (M. Raponi)、エム・ピー・ボイド (M. P. Boyd)、ジェイ・エイ・イーリー (J. A. Ely)、ジー・シモンズ (G. Symonds) 著、「人工キャピラリー培養：臨床用途のためのCD4+Tリンパ球の増殖及びレトロウイルス形質導入 (Artificial capillary culture: Expansion and retroviral transduction of CD4+ T lymphocytes for clinical application)」、ジーン・セラ (Gene Ther)、1999年、6:373~384

10

20

30

40

50

【非特許文献 8】コーン・ディー・ビー (Kohn, D. B.)、ジー・バウアー (G. Bauer)、シー・アール・ライス (C. R. Rice)、ジェイ・シー・ロスチャイルド (J. C. Rothschild)、ディー・エイ・カーボナーロ (D. A. Carbonaro)、ピー・ヴァルデス (P. Valdez)、キュー・ハオ (Q. Hao)、シー・ゾウ (C. Zhou)、アイ・バーナー (I. Bahner)、ケイ・カーンズ (K. Kearns) 他著、「HIV-1 感染小児の骨髄からの CD34+ 細胞内への rev 応答性要素デコイ遺伝子のレトロウイルスを介した導入の臨床試験 (A clinical trial of retroviral-mediated transfer of a rev-responsive element decoy gene into CD34 (+) cells from the bone marrow of human immunodeficiency virus-1-infected children)」、ブラッド (Blood)、1999 年、94 (1) : 368 ~ 371

【非特許文献 9】レビンスキー・アール・ジェイ (Levinsky, R. J.) 著、「骨髄移植における近年の進歩 (Recent advances in bone marrow transplantation)」1989 年、クリニカル・イムノル・イムノパソール (Clin Immunol Immunopathol)、50 (1 Pt 2) : S124 ~ 132 10

【非特許文献 10】マラスコ・ダブリュー・エイ (Marasco, W. A.)、エス・チェン (S. Chen)、ジェイ・エイチ・リチャードソン (J. H. Richardson)、ユー・ラムステット (U. Ramstedt)、エス・ディー・ジョーンズ (S. D. Jones) 著、「AIDS 遺伝子治療のための HIV-1 エンベロープタンパク質に対する細胞内抗体 (Intracellular antibodies against HIV-1 envelope protein for AIDS gene therapy)」、ヒューマン・ジェーン・テラ (Hum Gene Ther)、1998 年、9 (11) : 1627 ~ 1642

【非特許文献 11】マックファーランド・アール・ディー (McFarland, R. D.)、ディー・シー・デューク (D. C. Douek)、アール・エイ・クー (R. A. Koup)、エル・ジェイ・ピッカー (L. J. Picker) 著、「最近のヒト胸腺移出表現型の同定 (Identification of a human recent thymic emigrant phenotype)」、米国、米国科学アカデミー紀要 (Proc Natl Acad Sci)、2000 年、97 (8) : 4215 ~ 4220 20

【非特許文献 12】マーレイ・ジェイ・エム (Murray, JM)、カウフィナン・ジー (Kaufmann, G)、ケラハー・エイ・ディ (Kelleher, AD)、クーパー・ディー・エイ (Cooper, DA.) 著、「一次 HIV-1 感染モデル (A model of primary HIV-1 infection)」、マセマティカル・バイオサイエンス (Mathematical Biosciences)、1998 年、154 : 57 ~ 85

【非特許文献 13】マーレイ・ジェイ (Murray, J) 著、「治療中及び非治療中の一次 HIV-1 感染の HIV-1 RNA 及び DNA の動態 (HIV-1 RNA and DNA dynamics during treated and untreated primary HIV-1 infection.)」、シカゴで開催されたレトロウイルス及び日和見感染の第 8 回会議 (Eighth Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections, Chicago)、2001 年 30

【非特許文献 14】ロッシ・ジェイ・ジェイ (Rossi, J. J.)、イー・エム・カンタン (E. M. Cantin)、エヌ・サーバー (N. Sarver)、ピー・エフ・チャン (P. F. Chang) 著、「HIV 感染及び他の疾患の治療における触媒 RNA の使用可能性 (The potential use of catalytic RNAs in therapy of HIV infection and other diseases)」、ファーマコル・テラ (Pharmacol Ther)、1991 年、50 (2) : 245 ~ 254

【非特許文献 15】サントロ・エス・ダブリュー (Santoro, S. W.)、ジー・エフ・ジョイス (G. F. Joyce) 著、「一般目的 RNA 切断 DNA 酵素 (A general purpose RNA-cleaving DNA enzyme)」、米国、米国科学アカデミー紀要 (Proc Natl Acad Sci)、1997 年、94 (9) : 4262 ~ 4266 40

【非特許文献 16】サーバー・エヌ (Sarver, N.)、イー・エム・カンタン (E. M. Cantin)、ピー・エス・チャン (P. S. Chang)、ジェイ・エイ・ザイア (J. A. Zaia)、ピー・エイ・レイドゥン (P. A. Ladne)、ディー・エイ・ステフェンス (D. A. Stephens)、ジェイ・ジェイ・ロッシ (J. J. Rossi) 著、「見込みのある抗 HIV-1 治療薬としてのリボザイム (Ribozymes as potential anti-HIV-1 therapeutic agents)」、サイエンス (Science)、1990 年、247 : 1222 ~ 1225

【非特許文献 17】シュワルツバーグ・エル・エス (Schwartzberg, L. S.)、アール・ 50

バーチ (R. Birch)、ビー・ヘイズルトン (B. Hazelton)、ケイ・ダブリュー・タウアー (K. W. Tauer)、ピー・リー (P. Lee)、アール・アルテモース・ジュニア (Jr. R. Altomose)、シー・ジョージ (C. George)、アール・ブランコ (R. Blanco)、エフ・ウィットリン (F. Wittlin)、ジェイ・コーヘン (J. Cohen) 他著、「ヒト組換え顆粒球コロニー刺激因子を用いた及び用いない化学療法による抹消血幹細胞動員 (Peripheral blood stem cell mobilization by chemotherapy with and without recombinant human granulocyte colony-stimulating factor)」、ジェイ・ヘマトーサー (J Hematother)、1992年、1(4):317~327

【非特許文献18】シュザキエル・ジー (Sczakiel, G.)、エム・ポーリタ (M. Pawlita) 著、「アンチセンスRNAを安定して発現しているヒトT細胞におけるHIV-1型の複製の阻害 (Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 replication in human T cells stably expressing antisense RNA)」、ジェイ・バイロル (J Virol)、1991年、65(1):468~472

【非特許文献19】センボウスキ・ジー・ディー (Sempowski, G. D.)、ヘイル・エル・ピー (Hale, L. P.)、サンデイ・ジェイ・エス (Sundy, J. S.)、マッセイ・ジェイ・エム (Massey, J. M.)、クー・アール・エイ (Koup, R. A.)、デューク・ディー・シー (Douek, D. C.)、パテル・ディー・ディー (Patel, D. D.)、ヘインズ・ビー・エフ (Haynes, B. F.) 著、「ヒト胸腺における白血病抑制因子、オンコスタチンM, IL-6、及び幹細胞因子mRNAの発現が加齢により増大し胸腺萎縮に関連する (Leukemia inhibitory factor, oncostatin M, IL-6, and stem cell factor mRNA expression in human thymus increases with age and is associated with thymic atrophy)」、ジェイ・イムノル (J Immunol)、2000年、164, 2180~7

【非特許文献20】スマイス・ジェイ・エイ (Smythe, J. A.)、ディー・サン (D. Sun)、エム・トムソン (M. Thomson)、ピー・ディー・マークハム (P. D. Markham)、エム・エス・ライツ (M. S. Reitz)、アール・シー・ギャロ (R. C. Gallo)、ジェイ・リスジーウィック (J. Lisziewicz) 著、「Tリンパ球に安定的に導入されるRev誘導性突然変異gag遺伝子: HIV-1感染に対する遺伝子治療のアプローチ (A Rev-inducible mutant gag gene stably transferred into T lymphocytes: An approach to gene therapy against human immunodeficiency virus type 1 infection)」、米国、米国科学アカデミー紀要 (Proc Natl Acad Sci)、1994年、91(9):3657~3661

【非特許文献21】サレンジャー・ビー・エイ (Sullenger, B. A.)、エイチ・エフ・ギャラード (H. F. Gallardo)、ジー・イー・ウンガース (G. E. Ungers)、イー・ギルボア (E. Gilboa) 著、「TAR配列の過剰な発現により細胞がHIVの複製に対して耐性を有するようになる (Overexpression of TAR sequences renders cells resistant to human immunodeficiency virus replication)」、セル (Cell)、1990年、63(3):601~608

【非特許文献22】サン・エル・キュー (Sun, LQ)、ディー・ワーリロウ (D Warrilow)、エル・ワン (L Wang)、シー・ウィザリントン (C Witherington)、ジェイ・マクファーンソン (J Macpherson)、ジー・シモンズ (G Symonds) 著、「許容細胞系におけるHIV-1複製及びマウス・モロニー白血病ウイルスのリボザイム仲介性阻害 (Ribozyme-mediated suppression of Moloney murine leukemia virus and human immunodeficiency virus type 1 replication in permissive cell lines)」、米国、米国科学アカデミー紀要 (Proc Natl Acad Sci)、1994年、91:9715~9719

【非特許文献23】サン・エル・キュー (Sun, LQ)、ダブリュー・エル・ガーラック (W. L. Gerlach)、ジー・シモンズ (G. Symonds) 著、「HIVの複製を阻害するためのリボザイムの使用 (The use of ribozymes to inhibit HIV replication)」、触媒RNA (Catalytic RNA)、エフ・エクスタイン・アンド・ディー・リリー (F. Eckstein and D. Lilley)、1996年、10:329~342

【非特許文献24】サン・エル・キュー (Sun, LQ)、ダブリュー・エル・ガーラック (W. L. Gerlach)、ジー・シモンズ (G. Symonds) 著、「抗HIV-1リボザイムのデザイ

10

20

30

40

50

ン、生産、及びバリデーション (The design, production and validation of an anti-HIV type 1 ribozyme)」、リボザイムの治療用途 (Therapeutic Application of Ribozymes)、ケイ・ジェイ・スキャンロン (K. J. Scanlon)、トトワ・ニュージャージー州 (Totowa, NJ)、ヒューマン・プレス社 (Humana Press Inc.)、1998年、11:51~64

【非特許文献25】サン・エル・キュー (Sun, L. Q.)、ジェイ・ピアティ (J. Pyati)、ジェイ・スマイス (J. Smythe)、エル・ワン (L. Wang) ジェイ・マクファーソン (J. Macpherson)、ダブリュー・ガーラック (W. Gerlach)、ジー・シモンズ (G. Symonds) 著、「リボザイム、アンチセンス、または多因子トランス活性化応答要素作製物を用いたヒト抹消血リンパ球の形質導入による HIV-1 感染に対する耐性 (Resistance to human immunodeficiency virus type 1 infection conferred by transduction of human peripheral blood lymphocytes with ribozyme, antisense or polymeric trans-activation response element constructs)」、米国、米国科学アカデミー紀要 (Proc Natl Acad Sci)、1995年、92(16):7272~7276

【非特許文献26】トッド・エイ・ブイ (Todd, A. V.)、シー・ジェイ・フュアリー (C. J. Fuery)、エイチ・エル・インペイ (H. L. Impey)、ティー・エル・アップルゲート (T. L. Applegate)、エム・エイ・ホートン (M. A. Haughton) 著、「DzyNA-PCR: DNAをもとにした酵素 (DNAzymes) を用いたリアルタイムの蛍光フォーマットにおける核酸配列の検出及び定量 (DzyNA-PCR: use of DNAzymes to detect and quantify nucleic acid sequences in a real-time fluorescent format)」、クリン・ケム (Clin Chem)、2000年、46(5):625~630

【非特許文献27】タフ・ディー・エフ (Tough, D. F.)、ジェイ・スプレント (J. Sprent) 著、「ナイーブT細胞及びメモリーT細胞の寿命 (Life span of naive and memory T cells)」、ステムセル (Stem Cells)、1995年、13(3):242~249

【非特許文献28】ワン・エル (Wang, L.)、シー・ウィザリントン (C. Witherington)、エイ・キング (A. King)、ダブリュー・エル・ガーラック (W. L. Gerlach)、エイ・カー (A. Carr)、アール・ペニー (R. Penny)、ディー・クーパー (D. Cooper)、ジー・シモンズ (G. Symonds)、エル・キュー・サン (L. Q. Sun) 著、「治療用の抗tatリボザイムの前臨床特徴付け (Preclinical characterization of an anti-tat ribozyme for therapeutic application)」、ヒューマン・ジーン・テラ (Hum Gene Ther)、1998年、9(9):1283~1291

【非特許文献29】ザック・ジェイ・エイ (Zack, J. A.)、アリゴ・エス・ジェイ (Arrigo, S. J.)、ウェイツマン・エス・アール (Weitsman, S. R.)、ゴー・エイ・エス (Go, A. S.)、ハイスリップ・エイ (Haislip, A.)、チェン・アイ・エス (Chen, I. S.) 著、「静止状態の一次リンパ球への HIV-1 の侵入: 分子分析による不安定な潜伏ウイルス構造の解明 (HIV-1 entry into quiescent primary lymphocytes: molecular analysis reveals a labile, latent viral structure)」、(Cell)、1990年、61, 213~22

【0012】

発明の要約

本発明の一態様では、本発明は、形質導入され再注入された後の遺伝子操作したHP細胞数の最小閾値を数学的モデル化により決定することに関する。このような最小閾値の決定は、全ての造血系ではないにしても造血系の有意な割合に、様々な血液細胞系統の遺伝子改変細胞が定着して遺伝子改変細胞が治療効果を有するのを確認するのに有用である。

【0013】

更に、本発明は、治療用遺伝子を含む造血前駆 (HP) 細胞数の最小閾値に達成させる方法に関する。この方法には、細胞洗浄ステップに加えて、患者の骨髄から抹消血区画へのHP細胞の動員と、抹消血から単核細胞成分を得るためのアフエレーシスと、CD34抗原または造血-枯渴抗原を用いたHP細胞集団の精製と、HP細胞を組織培養に移すこと、サイトカイン/成長因子の活性化及び培養と、レトロウイルスによる形質導入と、続

10

20

30

40

50

く細胞培養と、回収と、患者への再注入とが含まれる。本発明は更に、形質導入 H P 細胞の量的測定及び患者内の遺伝子含有子孫細胞の量的測定のためのモデルを利用する。後者のモデルは、有望な治療効果のインジケータとして、造血系の遺伝子改変キメラ化の程度をモニターするための手段を提供する。

【 0 0 1 4 】

発明の詳細な説明

図 1 は、H I V - 1 ゲノム内のリボザイム標的部位の位置を例示する模式図である。図 1 A は、複製遺伝子、制御遺伝子、及びアクセサリー遺伝子の位置を示す H I V - 1 ゲノムを模式的な線図である。図 1 B は、好適なリボザイム配列、そのリボザイムが相補的にハイブリダイズする t a t 遺伝子内の標的配列を示している。標的 G U A 切断部位は円形である。図 1 C は、T a t タンパク質及び V p r タンパク質をコードする各遺伝子内の G U A 標的配列の位置を示している。

10

【 0 0 1 5 】

図 2 は、本発明の例示的なステップのフローチャートである。この例の各ステップは、図示されている順番で実施するのが好ましい。

【 0 0 1 6 】

図 3 は、遺伝子を含む遺伝子を発現する細胞のパーセンテージを決定するための、この場合は DzyNA PCR であるリアルタイム量的 P C R の原理を例示する。図 3 A は、DzyNA P CR 検出法の模式図である。図 3 B は定量の手段を示す図である。

20

【 0 0 1 7 】

図 4 は、C D 3 4 + H P 細胞から C D 4 + T リンパ球が生産される数学的モデルを例示する。考慮したパラメータは、T リンパ球前駆体が骨髓を離れて胸腺内の選択機構を経て、ナイーブ細胞 (N) として抹消血内に放出される割合である。これには、年齢に応じた患者の胸腺放出の推定が必要である。なぜなら、年齢と共に胸腺が退縮し、それにつれて C D 4 + T 細胞が放出される割合が低下することが分かっているためである (センポウスキー (Sempowski) ら、2 0 0 0 年) 。抹消血中でナイーブ細胞として樹立したら、遺伝子含有 T リンパ球の生存及び増殖は自然の恒常性機構に依存する。T 細胞の数を調節するこの恒常性機構は図 4 に示されている。恒常性機構は、C D 4 + T リンパ球が発達する過程は次の 4 つである。(1) 胸腺から新しいナイーブ細胞が放出される。(2) ナイーブ細胞が活性化される。(3) メモリー細胞が活性化細胞を発生させ、その中にはメモリー表現型に転換するものがある。(4) メモリー細胞がナイーブ表現型に転換する。

30

【 0 0 1 8 】

図 5 は、骨髓の C D 3 4 + H P 細胞からマクロファージが生産される数学的モデルを例示する。

【 0 0 1 9 】

図 6 は、H I V - 1 感染の存在下で C D 3 4 + H P 細胞から C D 4 + T リンパ球が生産される数学的モデルを例示する。考慮したパラメータは、R R z 2 (または他の抗 H I V 遺伝子) 含有 T リンパ球前駆体が骨髓を離れて、胸腺内での選択機構を経て、抹消血中にナイーブ細胞 (N) として放出される割合である。これには、年齢に応じた患者の胸腺放出の推定が必要である。なぜなら、年齢と共に胸腺が退縮し、それにつれて C D 4 + T 細胞が放出される割合が低下することが分かっているためである (センポウスキー (Sempowski) ら、2 0 0 0 年) 。抹消血中でナイーブ細胞として樹立したら、R R z 2 含有 T リンパ球の生存及び増殖は、自然の恒常性機構、並びに H I V がこの恒常性機構を変えた場合は R z 2 - C D 4 + T リンパ球に対する潜在的な選択優位性に依存する。T 細胞の数を調節するこの恒常性機構は図 6 の左側に示されている。恒常性機構は、図 3 の説明で詳述した C D 4 + T リンパ球が発達する過程 (1) ~ 過程 (4) を含む。

40

胸腺からの放出に加えて、R R z 2 含有 C D 4 + T リンパ球の数が、抗原によって活性化されてメモリー T リンパ球に分化することにより増大する。本発明のこのモデルは、このメモリー T リンパ球が増大する程度を推定することを含む。H I V 感染により、図の右側の構成要素 (過程 (5) ~ 過程 (7)) が機能するようになる。活性化細胞がウイルス

50

感染し（過程（５）と過程（７））、新しいウイルスを産生し（過程（６））、感染サイクルを完全にする。これらの機構がこのモデルに含まれている。また、このモデルは、HIVの存在によるナイーブ細胞（過程（２））及びメモリー細胞（過程（３））の活性の上昇などのある種の自然のプロセスの変更が可能である。

【００２０】

図７は、HIV-1感染下でCD34+HP細胞からマクロファージが生産される数学的モデルを例示する。このモデルは、感染した単球及びマクロファージが抗レトロウイルス治療中の感染を維持するのに重要な役割を果たし、かつこれらの細胞が抗ウイルス治療を用いないときに感染の進行に大きな役割を果たすという確信に基づいている。このような感染した細胞の役割を評価するモデルは、ここで開発したものであって、ザック（Zack）他（１９９０年）及びマーレイ（Murray）（２００１年）の仮説を含む。このモデルは、未処置のセロコンバーター（seroconverter）及び処置したセロコンバーターの両方におけるHIV-1 RNA及びHIV-1 DNAの動態を検査する。このモデルはまた、組み込まれていない（非組み込み）HIV-1 DNAの不安定な性質を考慮し、潜伏感染CD4+Tリンパ球及び感染マクロファージを含む。このモデルは、長命感染マクロファージMとの相互作用による、不完全な組み込まれていない形L_u及びコンピテントな組み込まれていない形L_iの両方の感染を含む。コンピテントなHIV-1 DNAが組み込まれていない感染細胞L_iにHIV-1 DNA分子が組み込まれたときに、HIV-1 DNAが組み込まれた潜伏的感染細胞L_iが生じる。遊離ウイルスVによって感染した細胞が活性化され、HIV-1 DNAが組み込まれた潜伏的感染細胞が活性化され、感染マクロファージとの相互作用のプロセス中に細胞が活性化されて生産的感染細胞Pが生じる。マクロファージは感染マクロファージと接触して感染する。

【００２１】

用語「造血前駆（HP）細胞」は、多能性であって、生体内（in vivo）で造血系の様々な系統の全てに連続的に分化できる造血細胞を指す。

【００２２】

用語「CD34+細胞」は、表面にCD34+抗原を有する細胞を指し、造血前駆細胞のサブセットである。

【００２３】

句「CD34+細胞の純度」は、任意の集団におけるCD34抗原を有する細胞のパーセンテージを指す。

【００２４】

用語「外来核酸産物」は、細胞に導入される発現可能な核酸断片であって、好ましくは、細胞内に導入されたときに、好ましくは抗ウイルス効果である治療効果を有する断片を指す。また、断片は、細胞にとって非天然構造（non-native）であるのが好ましい。この産物は、限定するものではないが、抗体、アンチセンス分子、リボザイム、または細胞内環境で転写または転写と翻訳により産生され得る他の産物を含むタンパク質をコードする遺伝子を含むことができる。

【００２５】

用語「LNL6」は、複製遺伝子が除去されネオマイシン・ホスホトランスフェラーゼ（neo^r）遺伝子が挿入されたマウス・モロニー白血病ウイルスを起源とするマウス・レトロウイルスベクターを指す（ベンダー（Bender）ら、１９８７年）。このベクターは、複製不能レトロウイルスベクターLNL6（Genbankアクセッション番号：M63653）を含むレトロウイルスプラスミドであるpLNL6に基づいている。

【００２６】

用語「Rz2」は、tat遺伝子の高度に保存された領域を標的とする抗HIVハンマーヘッド型リボザイムを指す。Rz2リボザイムのDNA形の配列は添付の配列表に示めされている配列番号３であり、RNA形の配列は配列番号４である。

【００２７】

用語「RRz2」は、Rz2がneo^rの３'非翻訳領域内に挿入されたLNL6から

なるレトロウイルスベクターを指す。

【0028】

用語「Dz y N A」は、米国特許第6,140,055号及び同第6,201,113号に開示されているようなDNAまたはRNAのリアルタイム量的PCR検出及び定量のための方法を指す。

【0029】

用語「形質導入」は、ある細胞内にある遺伝子を導入して、後にその細胞がその遺伝子を発現することを指す。

【0030】

第1の態様では、本発明は、患者に送達するべく、外来治療用遺伝子を含む細胞の用量の決定及びその細胞を準備する方法を提供する。患者に対するHP細胞の用量を増量する効果を決定するために、ユニークな数学的シミュレーションを作成した。このシミュレーションを用いて、遺伝子が形質導入されたHP細胞の手法が、成熟したTリンパ球及び単球/マクロファージ子孫細胞の集団に対して臨床的に適切な効果を上げることができるかを推定した。

【0031】

数学的モデル化を用いて、(i)CD4+リンパ球と(ii)単球及びその子孫組織マクロファージの2つの細胞集団の動態を調べた。それぞれの細胞の種類モデル化は、それぞれが異なった増殖、成熟、及び死のパラメータの特徴を有するため別々に行った。例えば、Rz2を含む集団によるウイルスの減少量を決定する。CD4+Tリンパ球の場合は、HIVの存在下でCD4+Tリンパ球集団が維持/増大する程度を評価する。

【0032】

数学的シミュレーションは、公開されている微分方程式(マーレイ(Murray)他、1998年、ハース(Haase)、1996年)に少なくとも部分的に基づいている。この文献には、(i)患者の年齢及び胸腺の質量の関数である長期に亘るTリンパ球細胞の産生、(ii)抗原に応答したナイーブTリンパ球の活性化及び増殖、及び(iii)単球/マクロファージの産生が記載されている。

【0033】

これらのシミュレーションにより、HP細胞の用量を最小閾値レベルに増大すると、遺伝子を含むCD4+Tリンパ球及び単球/マクロファージの数が増大することが示された。シミュレーションの結果から、形質導入CD34+細胞のパーセンテージが常在HP細胞の10%、より好ましくは20%を超えると、ウイルス負荷及びCD4+細胞数に影響を与えることが分かった。更に、単にリンパ球及びマクロファージのそれぞれで別々にモデル化したため、モデルは、マクロファージにおける抗ウイルス効果が見られる条件を予想した。マクロファージにおける抗ウイルス効果は、患者体内のHIVウイルスの貯蔵を減少させるのに重要である。

【0034】

第2の態様では、本発明は、この同じパーセンテージの治療用遺伝子含有細胞を生産及び送達する方法を提供する。この方法は、(a)CD34+HP細胞を含む細胞集団を患者から得るステップと、(b)このHP細胞を濃縮して少なくとも40%HP細胞を含む細胞集団を得るステップと、(c)HP細胞で発現する能力をもった遺伝子を含むベクターをHP細胞集団に導入し、この細胞を生体外(in vitro)で更に培養するステップと、(d)このような遺伝子含有HP細胞と遺伝子非含有HP細胞の数を決定して、同じまたは別の患者に送達したときに、その患者が、体重1kg当たり、遺伝子含有HP細胞を少なくとも 0.52×10^6 、 1.63×10^6 の総細胞数の投与を受けようとするステップとを含む。

【0035】

導入後約1ヶ月~3ヶ月の間に患者の骨髄で少なくとも10%の遺伝子含有HP細胞を観察できるような遺伝子含有HP細胞の数が好ましい。モデル化では、この程度の量の遺伝子含有HP細胞が骨髄で観察できれば、抗ウイルス効果などの治療効果が見られると予

10

20

30

40

50

想する。より好ましくは、遺伝子含有CD34+HP細胞は、導入ステップの後少なくとも1年間、患者の体内で検出できる遺伝子含有子孫リンパ細胞及び子孫骨髄細胞を産生する。更に好ましくは、この方法の結果として得られるキメラ造血系は、導入ステップの後4年間はあらゆる種類の抹消血細胞に少なくとも0.01%、0.1%、1.0%、10%、より好ましくは20%、更に好ましくは50%の遺伝子含有細胞を含む。加えて、この方法の結果により得られるキメラ造血系は、導入ステップの後4年間は採取した骨髄サンプルに少なくとも0.01%、0.1%、1.0%、10%、より好ましくは20%、更に好ましくは50%の遺伝子含有細胞を含む。

【0036】

従って、本発明は、患者におけるウイルス負荷の低減を観察できるか否かを推定する方法にも関連する。この方法は、先述した方法のステップを含み、移植すなわち骨髄で細胞が定着した後で、少なくとも10%の遺伝子含有HP細胞が骨髄に存在する。更に、本発明の別の好適な実施形態では、遺伝子含有HP細胞及び/または遺伝子非含有HP細胞の数が、患者に導入するには好適でない場合は、この細胞を凍結し、プールしたHP細胞(遺伝子含有及び非遺伝子含有)の数が少なくとも前記したステップ(d)と同量になるまで、1または複数回の追加の動員及びアフエレーシスを繰り返す。

10

【0037】

得られる細胞のプールは、十分な遺伝子含有CD34+HP細胞を含むのが好ましい。具体的には、患者に投与する場合、その患者の体重1kg当たり、少なくとも 5×10^6 、より好ましくは 1×10^7 または 2×10^7 よりも多く、更に好ましくは 4×10^7 または 5×10^7 よりも多く、更に好ましくは 8×10^7 を超えるか少なくとも 10×10^7 の遺伝子含有CD34+HP細胞の投与を患者が受けるようにするのが好ましい。

20

【0038】

得られる細胞のプールは、患者に投与する場合、その患者の体重1kg当たり、少なくとも 1×10^7 、最大 10×10^7 の総細胞数(すなわち、得られる細胞のプールに存在する治療遺伝子含有HP細胞と他の全ての細胞の総数)の投与を患者が受けるようにするのが好ましい。

【0039】

患者から収集する細胞集団は、当分野で周知のあらゆる方法で得ることができる。例えば、患者に処置を施して、HP細胞が骨髄から抹消血に動員されるようにする。その方法は、例えば、限定するものではないが、ペグ化顆粒球コロニー刺激因子(pegG-CSF)、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)、及びより好ましくはG-CSFを含むサイトカインを適量投与し、次いでアフエレーシス濾過を行う。別法では、HP細胞は、当分野で周知の方法に従って骨髄または臍帯血から吸引することができる。

30

【0040】

収集した細胞集団の処置には、1回または複数回の洗浄ステップ(例えば、遠心分離器または細胞洗浄装置を用いる)、及び/または容量減少ステップ(すなわち、余分な赤血球、顆粒球、血小板、Tリンパ球などの除去)が含まれるのが好ましい。容量減少ステップは、ノースカロライナ州ウINSTONセーラムに所在のチャーターメディカル社(Charter Medical, Winston Salem, NC)が販売するデンドレオンDACSシステム(Dendreon DACS System)などの装置を用いて行うのが好ましく、更にHP細胞選択ステップを含むのが好ましい。HP細胞の選択は、イムノアフィニティーまたはフローサイトメトリー法によって行うことができる。HP細胞選択ステップではCD34+細胞を選択するのが好ましい。別の実施形態では、成熟/委任造血細胞の抗原を除去してHP細胞の細胞集団を濃縮することもできる。HP細胞選択ステップは、限定するものではないが、ネクセル/バクスター アイソレックス300I(Nexell/Baxter Isolux300I)(カリフォルニア州アーバイン)、ミルティニー・クリニマックス(Miltenyi CliniMACS)(ドイツ、ベルギッシュ・グラッドバッハ所在のバイオテック社(Miltenyi; Biotech GmbH, Bergisch Gladbach, Germany))、及びステムセル・テクノロジー社(カナダ、BC州バンクーバー)のステムセップ装置(StemSep Device)などの様々な選択装置を用いて行うことができる

40

50

。

【0041】

収集した細胞集団の処置には、細胞の数、特に選択したH P細胞の数を増やすための細胞培養ステップが含まれ得る。細胞培養ステップでは、治療用遺伝子を細胞内に導入する必要があり、治療用遺伝子の導入の後に細胞培養をして遺伝子の組み込み及び遺伝子産物の発現を促し、このような遺伝子含有H P細胞の数を増やすのが好ましい。

【0042】

初めの処置ステップ（動員、アフェレーシス、H P選択）で、H P細胞を得てそのH P細胞を濃縮する。H P細胞のパーセンテージの決定には、C D 3 4 抗原陽性などのH P細胞の測定可能な特徴が必要である。体外（ex vivo）で処置した細胞のプールは、好ましくは少なくとも20%、より好ましくは少なくとも40%、更に好ましくは少なくとも60%、最も好ましくは少なくとも80%のH P細胞を含むことを理解されたい。

【0043】

治療用遺伝子すなわち核酸配列のH P細胞の少なくとも一部への導入は、当分野で周知の様々な方法または他の方法を用いて行うことができる。好適な実施形態では、導入ステップで、治療用遺伝子すなわち核酸配列を有するレトロウイルスベクター、他のウイルスまたは非ウイルス（DNAまたはRNA）ベクターを用いた形質導入を利用する。形質導入を利用する場合、形質導入促進剤（例えば、レトロウイルスベクターの場合は、レトロネクチン（RetroNectin）（登録商標）として知られるフィブロネクチンのCH296断片、またはポリブレンや硫酸プロタミンなどの他の作用物質）を用いるのが好ましい。治療用遺伝子すなわち核酸配列を含むH P細胞及びその子孫細胞（すなわち、後にリンパ造血及び骨髄造血で産生される細胞）は、細胞で発現することを意図した治療用遺伝子を含み、治療用遺伝子すなわち核酸配列を発現する能力を有するのが好ましい。

【0044】

H P細胞内に導入された治療用核酸配列は、H I V / A I D Sの場合は、限定するものではないが、タンパク質（例えば、トランスドミナント（transdominant）タンパク質、細胞内抗体）、アンチセンスRNA、アプタマー、RNA阻害（interfering RNA）、及び触媒リボザイムなどの産物をコードでき、別の疾患の場合は、これらの産物や腫瘍抑制遺伝子などの他の遺伝子をコードできる。

【0045】

細胞は、細胞注入などの決まった手順に従って患者に導入することができる。細胞はまた、薬学的に許容できるバッファー及び塩などを含む薬理学的に許容できる担体（例えば、5%ヒト血清アルブミンなど）と共に送達することができる。患者は、初めに（すなわち、細胞の再注入の前）ミエロアブレーション（myeloablation）または他の造血コンディショニング療法を受けても、受けなくてもよい。しかしながら、本発明の形質導入H P細胞集団を移植するための好適な方法では、本発明の実際の実質的な利点は、患者が、ミエロアブレーション療法（すなわち、骨髄の完全またはほぼ完全な破壊）や他の造血コンディショニング療法を受けなくてもよいことである。形質導入H P細胞を生成して移植する方法の利点は、限定するものではないが化学療法や放射線治療を含み、有害で、エネルギーを消費し、かつ患者を衰弱させるミエロアブレーション療法を用いないことである。

【0046】

本発明の方法は、例えば、他の抗ウイルス療法を含む他の療法と組み合わせることができる。他の抗ウイルス療法には、例えば、RNAデコイ（RNA decoys）、細胞内抗体、及びRNA阻害（シャープ・ピー・エイ（Sharp, P. A.）著、「RNA妨害-2001（RNA interference-2001）」、Genes & Dev、2001年、15：485～490）などの使用が含まれる。例えば、本方法が、リボザイム型療法などの抗ウイルス療法を用いる場合、他の抗ウイルス療法、特に抗H I V療法を用いることができる。リボザイム型療法を用いる場合、2つ以上の触媒リボザイムを患者から除去したサンプルの1つの細胞に送達することもできるし、また、様々なリボザイムをそのサンプルの様々な細胞に送達することもできる。同様に、本方法は、当分野で周知の標準的な化学療法や蛋白療法などの、H P

10

20

30

40

50

細胞の形質導入を必要としない他の遺伝子療法と組み合わせることができる。H I V 感染患者の治療の一例では、特にH I V 耐性が検出された場合、または患者のH I V 感染が他の抗H I V 治療に対して抗療性が確認された場合に、本発明の方法をH I V の標準的な薬剤と組み合わせることができる。

【0047】

本発明は、造血系の外来遺伝子を含む細胞を導入するための一般的な方法を企図するが、本発明は、一例としてH I V の抗ウイルス遺伝子治療についてのみを取り上げる。本方法では、H I V 陽性患者から収集した細胞からH P 細胞を濃縮し、治療用遺伝子は抗H I V 産物をコードする。

【0048】

従って、第3の態様では、本発明は、用量の決定と、好ましくはC D 3 4 + 細胞であるH P 細胞の準備を提供する。このH P 細胞は、H I V 陽性患者に送達して持続的に抗ウイルス治療効果を得るべく、抗H I V 産物をコードする遺伝子を含む。リボザイムが本発明の好適な実施形態としているが、他の抗ウイルス産物をコードする遺伝子を、限定するものではないが、アンチセンス療法やR N A 阻害などに用いることもできる。

【0049】

上記したように、この決定のための数学的シミュレーションは、公開されている微分方程式（マーレイ（Murray）他、1998年、ハース（Haase）、1996年）に基づいている。この数学的シミュレーションは、(i) 患者の年齢及び胸腺の質量の関数である長期に亘るTリンパ球細胞の産生、(i i) 抗原に应答したナイーブTリンパ球の活性化及び増殖、(i i i) H I V 感染によるC D 4 + 細胞の減少、及び(i v) 単球/マクロファージの産生を考慮して、H I V 感染に適用することができる。

【0050】

C D 3 4 + の用量を増大する効果の判定を、数学的シミュレーションを用いて研究した。この数学的シミュレーションは、R R z 2 形質導入C D 3 4 + 細胞の手法が、H I V 患者におけるC D 4 + 細胞数及びウイルス負荷に臨床的に有意な効果を与えるか否かを評価する論理法を提供する。このようなシミュレーションでは、C D 3 4 + 細胞の用量を増大することにより、C D 4 + Tリンパ球の数及びH I V ウイルス負荷に影響を与えるR R z 2 含有C D 4 + Tリンパ球及び単球/マクロファージを増大させることができると予想する。このような数学的シミュレーションに基づいて、形質導入H P 細胞の導入する数を決定し最大化する方法を見出した。形質導入C D 3 4 + 細胞の用量は、前のフェーズI臨床試験で用いた最大用量の少なくとも2倍から10倍に増量する。この用量は、方法論で求めることができる。

【0051】

従って、抗H I V 産物を送達する方法は、(i) H P 細胞、好ましくはC D 3 4 + 細胞を含む生細胞の集団を患者から得るステップと、(i i) この細胞集団を処置及び/または培養して、少なくとも20%のC D 3 4 + 細胞を含む細胞のプールを用意するステップと、(i i i) 少なくとも1種類の治療用遺伝子をこの細胞集団内のC D 3 4 + 細胞の集団内に導入して、C D 3 4 + 細胞で治療用遺伝子が発現可能にし、治療用遺伝子を含むC D 3 4 + 細胞を含む細胞のプールを用意し、患者に投与する場合、患者が体重1 k g 当たり、 0.52×10^6 の治療用遺伝子を含むH P 細胞の用量を受け取るようにするステップとを含む。

【0052】

好ましくは、治療用遺伝子含有C D 3 4 + H P 細胞を含む生細胞のプールを用意し、患者に投与する場合、患者が、体重1 k g 当たり少なくとも 5×10^6 を超える、より好ましくは 2×10^7 を超える、更に好ましくは 5×10^7 を超える治療用遺伝子を含むH P 細胞の用量を受け取るようにする。

【0053】

得られる細胞のプールは、患者に投与する場合、その患者の体重1 k g 当たり、少なくとも 1×10^7 、最大 4×10^7 、より好ましくは最大 10×10^7 の総細胞数（すなわ

10

20

30

40

50

ち、得られる細胞のプールに存在する治療遺伝子含有H P細胞と他の全ての細胞の総数)を患者が受け取るようにするのが好ましい。

【0054】

細胞集団の収集、その後の細胞集団の処置は、本発明の第1の態様で説明した要領で行うことができる。好ましくは、この処置には、細胞集団を洗浄する第1のステップ(例えば、標準的な細胞洗浄装置を用いる)と、H P細胞が濃縮された細胞集団を生成するために容積を減少させる任意選択のステップ(例えば、余分な赤血球、顆粒球、血小板、Tリンパ球を除去するための標準的な装置を用いる)と、洗浄(例えば、自動化された細胞洗浄装置を用いる)して、H P濃縮細胞集団を培養するステップとが含まれる。

【0055】

初めの処置ステップ(動員、アフェレーシス、H P選択)で、H P細胞部分が濃縮される。H P細胞のパーセンテージの決定には、C D 3 4抗原陽性などのH P細胞の測定可能な特徴が必要である。処置した細胞のプールは、好ましくは少なくとも20%、より好ましくは40%、更に好ましくは60%、最も好ましくは80%のH P細胞を含むことを理解されたい。

【0056】

少なくとも一部のC D 3 4+細胞への遺伝子の導入は、形質導入促進剤(例えば、RetroNectin)の存在下で、治療用遺伝子を含むレトロウイルスベクターでこれらの細胞を形質導入するのが好ましい。しかしながら、遺伝子治療分野の通常の技術者であれば、細胞内に遺伝子を導入する他の公開されている方法を用いても同じ結果が得られることを理解できよう。このような遺伝子には、あらゆる抗H I V産物をコードする遺伝子を用いることができるが、H I V触媒リボザイムをコードする遺伝子が好ましい。特に好適な抗H I V-1触媒リボザイムは、tat遺伝子内のH I V RNA、特に基準株HIV-HXB2(Genbankアクセッション番号:K03455)の遺伝子(すなわち、5833番目~5849番目までのヌクレオチド(配列番号3))及びHIV-IIIB株(Genbankアクセッション番号:X01762)の5865番目~5882番目までのヌクレオチド(配列番号3)の高度に保存された領域内のH I V RNAを切断する抗H I V-1触媒リボザイムである。

【0057】

好適な実施形態では、患者が骨髄のミエロアブレーションまたは他の骨髄コンディショニング療法を必要とせず、細胞を導入するステップにより、患者が、体重1kg当たり、少なくとも 1.63×10^6 のC D 3 4+細胞の用量を受け取る。この細胞の内、患者の体重1kg当たり、少なくとも 0.52×10^6 の治療用遺伝子含有C D 3 4+細胞である。

【0058】

本発明は更に、遺伝子産物の存在及び発現をモニターする方法に関する。我々は、この検出のために量的リアルタイムPCR方法論を確立した。この種の量的リアルタイムPCR方法論は、DzyNA-PCRと呼ばれ、トッド(Todd)他(2000年)によって米国特許第6,140,055号及び同第6,201,113号に開示されており、その中には疾患または外来物質の存在に関連した特定の遺伝子配列を検出するためのストラテジーが示されている。この方法は、1つの閉じた容器内でのリアルタイム蛍光検出と同種核酸増幅が可能なシステムを提供する。このストラテジーには、10:23 DNAzymes(サントロ(Santoro)他、1997年)の相補的(アンチセンス)配列を含むDzyNAプライマーを用いた遺伝子配列の生体外(in vitro)増幅が含まれる。増幅中に、反応混合液に含まれているレポーター基質を切断するDNAzymesの活性センスコピーを含むアンプリコン(単位複製配列)が生成される。PCR中のアンプリコンの蓄積は蛍光の変化でモニターできる。この蛍光の変化は、レポーター基質内のDNAzyme切断部位の反対側に組み込まれた蛍光/消光色素分子の分離によって生じる。このレポーター基質の切断は、標的核酸配列の増幅が成功したことを示す。リアルタイム測定は、ABI PRISM(登録商標)7700配列検出システム(アプライドバイオシステムズ(Applied Biosystems))またはリアルタイムで蛍光をモニターできる他のサーモサイクラーで行うことができる。

10

20

30

40

50

【 0 0 5 9 】

本明細書中において、用語「含む」またはその変形である「含んでいる」は、記載した要素、整数、ステップ、または要素、整数、ステップのグループを含むが、他のあらゆる要素、整数、ステップ、または要素、整数、ステップのグループを除外するものではないことを理解されたい。

【 0 0 6 0 】

本明細書中に含まれる文書、行為、物質、装置、及び物品などのあらゆる説明は、単に本発明の文脈を作成することが目的である。これら文書、行為、物質、装置、及び物品などの何れかあるいは全てが、本願の各クレームの優先日以前に、従来技術の基礎の一部をなし、本発明が属する分野の一般的な共通知識であると見なされるべきものではない。

10

【 0 0 6 1 】

本発明を、以下の例（限定目的ではない）及び添付の図面を用いて以下に説明する。

【 0 0 6 2 】

例

例 1 :

H P 細胞の収集、形質導入、及び再注入

好適な方法では、本発明は以下のステップを含む。

- 1 . 患者の骨髓から抹消血中への H P 細胞の動員
- 2 . 動員された H P 細胞を得るための患者の抹消血の アフエレーシス
- 3 . 実施する可能性のある容量減少ステップの準備としての、細胞洗浄装置を用いた未精製抹消血単核細胞の 洗浄ステップ 1
- 4 . 余分な赤血球、顆粒球、血小板、及び T リンパ球を除去するための 容量減少ステップ
- 5 . 細胞洗浄装置を用いた濃縮 H P 細胞の 洗浄ステップ 2
- 6 . C D 3 4 + 細胞の選択すなわち H P 細胞集団からの抗原陽性細胞の除去
- 7 . 細胞洗浄装置を用いた精製 H P 細胞の 洗浄ステップ 3
- 8 . サイトカイン / 成長因子を含む培地に精製 H P 細胞を移す 細胞培養
- 9 . 形質導入促進剤の存在下での、遺伝子作製物を含むレトロウイルスベクターを用いた H P 細胞の 形質導入処置 : ウイルスベクターの導入
- 1 0 . 形質導入 H P 細胞を含む 細胞産物の回収 及び H P 細胞の洗浄
- 1 1 . 注入用産物の準備 : H P 細胞を注入バッグに入れ産物の安全注入試験の実施
- 1 2 . 同じ患者に細胞を戻す 患者への注入

30

例を用いたこれらのステップの説明及び本発明の他の変更例を以下に示す。

【 0 0 6 3 】

ステップ 1 : H P 細胞の動員

この処置の第 1 のステップは、骨髓から抹消血に H P 細胞を動員するために作用物質を用いる。一例では、ペグ化顆粒球コロニー刺激因子 (pegG-CSF)、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 (GM-CSF)、及び最も好ましい G - C S F からなる好適な群から選択されるサイトカインを用い、次いでアフエレーシス濾過を行う。別法では、H P 細胞は、当分野で周知の方法に従って骨髓または臍帯血から吸引することができる。

【 0 0 6 4 】

顆粒球コロニー刺激因子 (G-CSF) (カリフォルニア州サウザンドオークスに所在のアンジェン社 (Amgen) の Neupogen (商標)) を 1 日 1 回、少なくとも $10 \mu\text{g} / \text{kg} / \text{日}$ 、好ましくは約 $30 \mu\text{g} / \text{kg} / \text{日}$ 、最大 5 日連続して患者の皮下に投与する。G - C S F 投与中に全血球算定 (C B C s)、微分血小板算定を毎日実施して、白血球増大の程度を評価する。C D 3 4 + 細胞数を決定するために、好ましくは G - C S F 投与の 3 日目に血液サンプルを採取して、アフエレーシス開始前に抹消血 C D 3 4 + 細胞数が $20 \text{細胞} / \text{mm}^3$ であることを確かめる。しかしながら、C D 3 4 + 細胞数がこの値に達しなかったとしても、通常は G - C S F 投与の 4 日目または 5 日目に行うアフエレーシスを妨げるものではない。

40

【 0 0 6 5 】

50

ステップ 2 : アフェレーシス (例 1 : 好ましくは 4 日目または 5 日目)

アフェレーシスとは、抹消血の単核細胞画分を得るための「血液濾過」の方法である。ここで、コープ・スペクトラ (Cobe Spectra) (コロラド州レイクウッド所在のガンプロ B C T 社 (Gambro BCT, Lakewood, Colorado))、ヘモネティクス (Haemonetics) (マサチューセッツ州に所在のヘモネティクス社 (Haemonetics Corporation, Braintree, MA))、またはアミカス (Amicus) (イリノイ州ディアフィールドに所在のバクスター社のフェンワル (Baxter Fenwal, Deerfield, IL)) などの装置を、少なくとも 2 つの別々の時に用いるのが好ましい (好ましくは、動員の後から 4 日目及び 5 日目、ここで、1 日目は動員した日である)。ただし、別の例では、アフェレーシスは、抹消血 C D 3 4 + 細胞数が 5 細胞 / mm^3 、より好ましくは 10 細胞 / mm^3 、最も好ましくは 20 細胞 / mm^3 よりも多い日を決定して、上記した日よりも前または後に行うことができる。好適な実施形態では、このアフェレーシスにより、約 5 リットルの血液量、好ましくは 5 リットル ~ 10 リットル、より好ましくは 10 リットル ~ 20 リットル、更に好ましくは 20 リットル以上の血液量から細胞産物を得る。それぞれのアフェレーシスによる産物は、別々に処置するか、好適な実施形態では 2 回目のアフェレーシスの後でプールする。全細胞数及び絶対 C D 3 4 + 細胞数を記録する。ステップ 1 及びステップ 2 により、1 kg 当たり 5×10^6 、好ましくは 2×10^7 、より好ましくは 4×10^7 の H P 細胞 (C D 3 4 陽性で測定) が得られる。

【 0 0 6 6 】

ステップ 3 : 洗浄ステップ 1 (例 1 : 好ましくは 4 日目及び 5 日目)

プールした細胞を洗浄する。この洗浄は、細胞の遠心分離 (1,500 rpm すなわち 300 g で約 15 分間)、より好ましくは自動化された細胞洗浄装置を用いて行う。一例では、この細胞洗浄は、ネクセル CytoMate (商標) 洗浄装置 (Nexell CytoMate washer) (カリフォルニア州アーバインに所在のネクセルセラピューティクス (Nexell Therapeutics)) を用いて、バッグ 4 からスピニング・メンブレンを通して洗浄バッグ 1 に移送して細胞を洗浄するプログラムで、所定のパラメータ (レジデュアル・フォールド・リダクション (Residual Fold Reduction) = 1、マキシマム・エンド・ウエイト (Maximum End Weight) = 190 ml、ソースバッグリンス (Source Bag Rinse) = 50 ml) または類似のパラメータを用いて行う。次いで細胞を、所定のパラメータ (チュープリンス容量 (Tubing Rinse Volume) = 90 ml、最大ポンプ速度 (Maximum Pump Rate) = 50 ml / 分) を用いて、洗浄バッグ 1 から最終産物バッグ 3 に移す。

【 0 0 6 7 】

ステップ 4 : 容量減少ステップ (例 1 : 好ましくは 4 日目及び 5 日目)

一実施形態では、アフェレーシス処置により得た細胞を、それぞれ処置した日にチャーターメディカル DACS-SC (商標) システム (Charter Medical DACS-SC (商標) system) (ノースカロライナ州ウINSTON セーラムに所在のチャーターメディカル (Charter Medical)) を用いて容量減少を行う。後に最終日の産物と共にプールするために産物を 1 日目 (または次の日) から一晩保存する実施形態では、2 つ以上のアフェレーシス産物を、収集した日に容量減少し、第 2 の産物を容量減少するまで第 1 の産物を保存する。容量減少では、洗浄したアフェレーシス細胞産物を DACS-SC (商標) 装置内の B D S 6 0 溶液に入れ、850 g、20 ~ 25、停止なしで 30 分間、遠心分離する。この産物を、滅菌条件下で、逆にしてトランスファーバック内に収集して回収する。

【 0 0 6 8 】

ステップ 5 : 洗浄ステップ 2 (例 1 : 4 日目)

プールする前に保存される産物の収集の日に、得られた産物を、0.5% ヒト血清アルブミンを添加したダルベッコ・リン酸緩衝生理食塩水 (Dulbecco's phosphate buffered saline: DPBS) を用いて洗浄する。この洗浄は、ネクセル CytoMate (商標) 洗浄装置を用いて、バッグ 4 からスピニング・メンブレンを通して洗浄バッグ 1 に移送して細胞を洗浄するプログラムで、所定のパラメータ (レジデュアル・フォールド・リダクション (Residual Fold Reduction) = 1,000、マキシマム・エンド・ウエイト (Maximum End Wei

ght) = 20 ml、ソースバッグリンス (Source Bag Rinse) = 50 ml、または類似のパラメータ)を用いて行う。次いで、100%自己血漿中の細胞を、所定のパラメータ (チュープリンス容量 (Tubing Rinse Volume) = 195 ml、最大ポンプ速度 (Maximum Pump Rate) = 50 ml / 分、または類似のパラメータ)を用いて、洗浄バッグ1から最終産物バッグ3に移す。次いで、この流路を、0.5%ヒト血清アルブミンを添加した別のDPBS 50 mlで洗浄する。次いで、この細胞産物を、 200×10^6 細胞/ml以下の細胞密度、2 ~ 8 で一晩保存する。一晩保存しなかった産物は、CD34+細胞選択ステップ (以下のステップ6) で洗浄するため、別の洗浄は行わない。

【0069】

ステップ6: CD34+細胞選択 (例1: 5日目)

細胞を取り出し、計数し、プールし (好適な実施形態では、2つ以上の産物が存在する)、アイソレックス300i (Isolex 300i) 使い捨てセット (カリフォルニア州アーバインに所在のネクセルセラピューティクス) のライフセルバッグ (LifeCell bag) (カリフォルニア州アーバインに所在のネクセルセラピューティクス) に移す (3つ以上の産物がある場合は、その全てを最新の時点でプールする)。CD34+細胞を、洗浄後の産物からアイソレックス300i、磁気細胞分離システム (Miltenyi)、または細胞発現マーカー (例えば、CD2、CD3、CD14、CD16、CD19、CD24、CD56、CD66b糖タンパク質A、ステムセップ (StemSep)) の系統減少法 (lineage depletion strategy) を用いて選択する。CD34+濃縮プールすなわち系統減少細胞 (lineage depleted cells) は、この種類の細胞を少なくとも40%、より好ましくは少なくとも60%、最も好ましくは少なくとも80%含む。アイソレックス300iを用いる場合、以下の自動化された処置ステップ1~ステップ6 (製造者のプロトコール及びソフトウェアバージョン2.5に従う) を含む。ステップ1では、0.41%クエン酸ナトリウム及び1%ヒト血清アルブミンを添加したDPBS中で洗浄して血小板を除去する。ステップ2では、細胞を、室温で15分間、抗CD34抗体 (購入したもの) と共にインキュベートし、結合しなかった抗体を洗浄により除去する。ステップ3では、細胞を磁気室に移してロゼット形成する (室温で30分)。ステップ4では、磁気を加えてCD34+細胞/磁気ビード・複合体を捕捉し、結合しなかった細胞を洗浄により除去する。ステップ5では、結合した細胞を、遊離剤PR34+と共にインキュベートして遊離させる。ステップ6では、後の処理のために、細胞を洗浄して最終産物バッグに移す。

【0070】

ステップ7: 洗浄ステップ3 (例1: 5日目)

細胞をカウントし、遠心分離またはネクセルCytoMate (商標) などを用いて洗浄し、10%熱不活化ウシ胎児血清を添加したイスコフ改変ダルベッコ培地 (Iscove's Modified Dulbecco's Medium: IMDM) を含む細胞培養培地に移す。好適な実施形態では、このイスコフ改変ダルベッコ培地に50 ng/ml幹細胞因子 (SCF)、及び100 ng/ml巨核球成長及び発生因子 (Megakaryocyte Growth and Development Factor: MGD F) も添加する。この洗浄は、10%熱不活化ウシ胎児血清を添加したIMDMで、ネクセルCytoMate (商標) 洗浄装置を用いてバッグ4からスピニング・メンブレンを通して洗浄バッグ1に移送して細胞を洗浄するプログラムで、所定のパラメータ (レジデュアル・フォールド・リダクション (Residual Fold Reduction) = 10、マキシマム・エンド・ウエイト (Maximum End Weight) = 20 ml、ソースバッグリンス (Source Bag Rinse) = 50 ml、または類似のパラメータ)を用いて行う。次いで細胞を、所定のパラメータ (チュープリンス容量 (Tubing Rinse Volume) = 500 ml、最大ポンプ速度 (Maximum Pump Rate) = 50 ml / 分、または類似のパラメータ)を用いて、洗浄バッグ1から最終産物バッグ3すなわちライフセルバッグ (LifeCell bag) に移す。

【0071】

ステップ8: 細胞培養 (例1: 5日目~8日目)

細胞を、好ましくは 1×10^5 ~ 5×10^6 細胞/mlで、サイトカイン/成長因子を含む10%ウシ胎児血清 (FBS) を添加したイスコフ改変ダルベッコ培地が入った、細

10

20

30

40

50

胞培養フラスコすなわち細胞培養バッグ、好適な実施形態では1,000 ml (390 cm²) ネクセルライフセルX-フォールドバッグ (Nexell Lifecell X-Fold Culture Bag) (ネクセルセラピューティクス) などに入れる。好適な実施形態では、このサイトカイン/成長因子混合物は、幹細胞因子 (50 ng/ml) とMGDF (100 ng/ml) からなる。ステップ3～ステップ9により、1 kg 当たり 1.2×10^7 HP細胞以上となる (CD34陽性で評価)。細胞培養は、37の湿潤インキュベータで、5% CO₂ で30時間～36時間行った。

【0072】

ステップ9：形質導入処置 (例1：7日目)

これらの細胞を、好適な実施形態ではライフセル培養バッグ (Lifecell Culture Bag) を含む、第1のフラスコすなわち組織培養バッグなどから収集し、CytoMate (商標) 装置などを用いて、好適な実施形態ではAM-12パッケージング細胞系 (AM-12 packaging cell line) (ジェネティクス・ファーマシューティカルズ社のマーコウィッツ・ディー、ゴフ・エス、及びバンク・エイ著、「安全かつ効率的な両栄養性ウイルス・パッケージング細胞系の作製及び使用」、バイロロジー、1988年、167, 400～406 (Genetix Pharmaceuticals or ref Markowitz, D., Goff, S. & Bank, A. (1988). Construction and use of a safe and efficient amphotropic packaging cell line. Virology, 167, 400-406)) を用いて生成されるレトロウイルス含有培地の200 µl アリコットなどのレトロウイルス上清に再懸濁する。

【0073】

この例では、GMPグレード・レトロウイルス上清は、特殊な施設においてGMP条件下で、メリーランド州ロックビルに所在のバイオリliance社 (BioReliance Corporation) が製造したものである。リボザイム含有ベクターRRz2、並びにリボザイムを含むウイルス粒子を生成する方法が、エル・キュー・サン他著、「抗HIV-1リボザイムのデザイン、生産、及び評価」、分子医学の方法、第11巻、リボザイムの治療への適用、pp 51～64、ヒューマンプレス (L-Q Sun, et al. (1998) "The design, production and validation of an anti-HIV type 1 ribozyme." In Methods in Molecular Medicine. Vol 11. Therapeutic Applications of Ribozymes; pp 51-64, Humana Press) に詳細に記載されている。ベクターを産生する細胞系を、 $3 \times 10^4 \sim 4 \times 10^4$ 細胞/cm² で、10% 熱不活化ウシ胎児血清を添加したDMEMが入った850 cm² のローラボトルに蒔き、5% CO₂ 存在下、湿潤状態、0.5 rpm～1.0 rpmで培養する。細胞密度が 9×10^4 /cm² に達したら、培地を10% 熱不活化ウシ胎児血清を添加したIMDMに取り替えて4時間培養する。4時間後に、培養上清を収集し、全ての収集物が準備できるまで2～8で保存する。10% 熱不活化ウシ胎児血清を添加したIMDMでの培養を更に5時間繰り返し、次いで更に15時間の培養をする。この方法では、ウイルスを含む培地を3つ収集し、プールし、0.2ミクロンのフィルターに通してから1Lのクリオサイトバッグ (Cryocyte bags) (カリフォルニア州アーバインに所在のネクセルセラピューティクス) に200 ml 無菌充填し、70で保管する。

【0074】

GMPグレードのウイルス上清が汚染されていないことを確認するために次に示す試験で分析する。この試験には、マイコプラズマ (Mycoplasma) (1993年、PTC)、複製コンピテント・レトロウイルス共培養アッセイ、アイソザイム分析、生体外 (in vitro) 外来性ウイルスアッセイ、生体内 (in vivo) 外来性ウイルスアッセイ、無菌 (膜濾過) アッセイ、静菌及び真菌生成 (膜濾過) アッセイ、一般安全性試験、複製コンピテント・レトロウイルス増幅アッセイ、残存DNA PCRアッセイ、及び細菌エンドトキシン試験 (カプトガニ血球抽出物色素産生アッセイ) が含まれる。加えて、GMP物質を、3T3感染性アッセイで効力について試験する。好適な実施形態では、レトロウイルス上清のタイターは、1 ml 当たり 1×10^6 コロニー形成単位である。

【0075】

この200 µl アリコットを、第2の組織培養容器内に移す。このような容器の一例と

して、レトロウイルス形質導入促進剤を含むライフセルX - フォールドバッグ (Lifecell X-Fold Culture Bag) が挙げられる。このような形質導入促進剤には、ポリブレン、硫酸プロタミン、カチオン脂質が含まれ、好適な実施形態では、 $1 \text{ mcg} / \text{cm}^2 \sim 4 \text{ mcg} / \text{cm}^2$ でレトロネクチン (登録商標) (RetroNectin) (日本の滋賀県に所在の宝酒造) でブリコートされた組織培養容器内に含まれている。レトロネクチンのコーティングのために、例えば、 $1 \text{ mg} / \text{ml}$ レトロネクチン溶液 0.8 ml を 390 cm^2 ライフセルX - フォールドバッグに入れ、16時間 ~ 48時間、 $2 \sim 8$ に保つ。結合しなかった全てのレトロネクチン (登録商標) を、 60 ml のDPBSで2回洗浄して除去する。CytoMate (商標) 細胞洗浄ステップでは、バッグ4からスピニング・メンブレンを通して洗浄バッグ1に移送して、細胞を10%熱不活化ウシ胎児血清を添加したIMDMで洗浄するプログラムで、所定のパラメータ (レジデュアル・フォールド・リダクション (Residual Fold Reduction) = 10、マキシマム・エンド・ウエイト (Maximum End Weight) = 20 ml 、ソースバッグリンス (Source Bag Rinse) = 50 ml 、または類似のパラメータ) を用いて行う。次いで好適な実施形態では、溶かした後に上記した濃度でサイトカインSCF及びMGDFが添加されたレトロウイルス上清 (好適な実施形態では 200 ml) 中のこの細胞を移送する。この移送は、所定のパラメータ (チューブリンス容量 (Tubing Rinse Volume) = 195 ml 、最大ポンプ速度 (Maximum Pump Rate) = $50 \text{ ml} / \text{分}$) または類似のパラメータを用いて、洗浄バッグ1から、レトロネクチン (登録商標) をコーティングしたライフセルバッグである最終産物バッグ3に移す。次いでこの流路を、10%熱不活化ウシ胎児血清を添加した別のIMDM 50 ml で洗浄する。細胞を含むレトロネクチン (登録商標) がコーティングされたバッグを、5% CO_2 、37の湿潤インキュベータに入れる。5時間 ~ 7時間経過した後、第2の形質導入のために、CytoMate (商標) などを用いて移送操作を繰り返して、細胞を、新しい組織培養容器 (ポリブレン、硫酸プロタミン) に移すか、或いはこの細胞を取り出したものと同じまたは類似のレトロネクチン (登録商標) がコーティングされた容器に移す。このCytoMate (商標) を用いた移送は、第1の形質導入で説明した手順と同一である。好適な実施形態では、この形質導入は、上記した新しいレトロウイルス上清の 200 ml アリコットで一晩培養する。別の実施形態では、この繰り返しの形質導入は行わない、或いは同様の時間で数回繰り返す。レトロウイルス上清のアリコットを無菌試験のために収集する。この増殖 / 形質導入処置により、体重 1 kg 当たり、 5×10^7 以上の遺伝子含有HP細胞が得られる (CD34陽性で評価)。この数は、DzyNA PCRアッセイなどの量的アッセイで決定できる。形質導入効率は、少なくとも10%、好ましくは30% ~ 50%であり、50%を超えるのが更に好ましい。

【0076】

ステップ10: 細胞産物の回収 (例1: 好ましくは8日目)

8日目の朝 (好適な実施形態では細胞培養の3日目)、細胞を回収して、標準的な細胞遠心分離 ($1,500 \text{ rpm}$ または 300 g で約15分間) または細胞培養のCytoMate (商標) サンプルのような自動化システムを用いて洗浄した。CytoMate (商標) を用いた洗浄ステップは、バッグ4からスピニング・メンブレンを通して洗浄バッグ1に送って、細胞を0.3%ヒト血清アルブミンを添加したフェノールレッドを含まないRPMIで洗浄するプログラムで、所定のパラメータ (レジデュアル・フォールド・リダクション (Residual Fold Reduction) = 1,000、マキシマム・エンド・ウエイト (Maximum End Weight) = 20 ml 、ソースバッグリンス (Source Bag Rinse) = 50 ml 、または類似のパラメータ) を用いて行う。次いで、5%ヒト血清アルブミンを添加したRPMI中の細胞を移送する。この移送は、所定のパラメータ (チューブリンス容量 (Tubing Rinse Volume) = 100 ml 、最大ポンプ速度 (Maximum Pump Rate) = $50 \text{ ml} / \text{分}$) または類似のパラメータを用いて、洗浄バッグ1から最終注入産物の移送用パックである最終産物バッグ3に移す。これにより、5%ヒト血清アルブミンなどの担体を添加したRPMI 100 ml に、 1 kg 当たり 5×10^7 以上の遺伝子含有HP細胞 (CD34陽性で評価) が含まれることになる。

【 0 0 7 7 】

ステップ 1 1 : 注入産物 (例 1 : 8 日目)

従って、細胞が、担体として 5 % ヒト血清アルブミンなどを含む生理学的注入バッファーに再懸濁されている。無菌培養 (好気性菌、嫌気性菌、真菌、マイコプラズマ) のために一定量のサンプルを取り出す。注入産物は、マイコプラズマについてのエンドトキシン (L A L) ハイブリダイゼーション、バクテリアグラム染色試験 (bacterial gram stain testing)、注入細胞のバイアビリティ、及び C D 3 4 + 細胞の純度の結果が分かるまで注入することができない。全 C D 3 4 + 細胞の用量は、体重 1 k g 当たりの C D 3 4 + 細胞数に基づいて算出する。DzyNAまたは類似の P C R 系アッセイの結果から、注入後に形質導入細胞数を決定する。

10

【 0 0 7 8 】

ステップ 1 2 : 患者への注入 (例 1 : 8 日目)

C D 3 4 + 細胞製剤を適切に患者に投与する。好適な実施形態では、担体として 5 % ヒト血清アルブミンまたは類似物を含む生理学的注入バッファー中の、体重 1 k g 当たり $0.5 \sim 5 \times 10^7$ またはそれ以上の形質導入 C D 3 4 + 細胞を患者に 1 回注入する。各患者に対する形質導入 C D 3 4 + H P 細胞の用量は、動員、アフェレーシス、単離、培養、及び形質導入の各ステップの効率によって異なる。C D 3 4 + 細胞 (形質導入されたものと形質導入されていないもの) の総数は、細胞の計数及びフローサイトメトリーによって決定する。導入遺伝子を含む H P 細胞によって、あるパーセンテージの遺伝子含有 H P 細胞を含むキメラ造血系が骨髓中に生成される。H I V / A I D S 陽性患者の治療のためには、この遺伝子含有 H P 細胞のパーセンテージは少なくとも 5 %、好ましくは 1 0 % を超え、2 0 % を超えるのがより好ましい。

20

【 0 0 7 9 】

例 2 : D z y N A 技術を用いた、H P 細胞の形質導入のパーセンテージ及び遺伝子含有子孫細胞数の検出及び定量

ステップ 1 : リアルタイム量的 P C R (D z y N A 、前記引用を参照) を用いた、注入産物中の遺伝子含有細胞のパーセンテージの決定

ステップ 2 : D z y N A 量的 P C R (前記方法論の引用を参照) を用いた、患者内の長期に亘る遺伝子含有子孫細胞数の定量

【 0 0 8 0 】

DzyNA-PCRは、疾患または外来物質の存在に関連した特定の遺伝子配列を検出するための一般的な手法である。この方法は、1つの密閉した容器内での同種核酸増幅及びリアルタイム蛍光検出を可能にするシステムを提供する。この方法では、1 0 : 2 3 DNAzymeの相補的 (アンチセンス) 配列を含む D z y N A プライマーを用いて遺伝子配列を生体外 (in vitro) で増幅する。増幅中に、アンプリコンが生成される。このアンプリコンは、反応混合液に含まれているレポーター基質を切断する DNAzymes の活性センスコピーを含む。P C R 中のアンプリコンの蓄積は、蛍光の変化によってモニターできる。この蛍光の変化は、レポーター基質内の DANzyme 切断部位の反対側に組み込まれた蛍光 / 消光色素分子の分離によって生じる。このレポーター基質の切断は、標的核酸配列の増幅が成功したことを示す。リアルタイム測定は、リアルタイムで蛍光をモニターできる A B I プリズム 7 7 0 0 (登録商標) 配列検出システム (ABI Prism 7700 Sequence Detection System) または他のサーモサイクラー (例えば、コルベット・ローター・ジーン (Corbett Rotor-Gene) (オーストラリアのシドニーに所在のコルベトリサーチ (Corbett Research))、ストラタジーン・M x 4 0 0 (Stratagene Mx 4000) (カリフォルニア州ラ・ホヤに所在のストラタジーン (Stratagene)) , LaJolla, CA)、またはロッシュ・ライトサイクラー (Roche LightCycler) (ドイツに所在のロッシュ (Roche)) で行うことができる。

30

40

【 0 0 8 1 】

ネオマイシン耐性遺伝子を含むベクター及び治療薬の分析のために DzyNA PCR プロトコールが開発された。このアッセイは、遺伝子治療を受けている患者における形質導入細胞のパーセンテージの推定、及び形質導入細胞またはその子孫細胞の存在のモニター及び定

50

量を含め、様々が使用方法がある。

【0082】

レポーター基質、Sub G5-FDを、トリリンクバイオテクノロジー (Trilink Biotechnologies) (米国カリフォルニア州) が合成した。Sub G5-FD (配列番号 5) は、RNA (小文字の部分) と DNA のヌクレオチドの両方を含むキメラ分子である。Sub G5-FD は、PCR 中に DNA ポリメラーゼによるその伸長を阻害する 3' リン酸基を有する。Sub G5-FD は、配列番号 5 の「T」デオキシリボヌクレオチドに付いた FAM (F) 及び DABCYL (D) の部分で合成された。レポーター基質の切断は、485 nm (FAM 励起波長) の励起で 530 nm (FAM 放出波長) でモニターすることができる。Sub G5-FD の配列は、5' CACCAAAAGAGAAC (T-F) GCAATguT (T-D) CAGGACCCACAGGAGCG-p3' (配列番号 5) である。

10

【0083】

シグマ・ジェノシス (Sigma Genosys) (オーストラリア、ニューサウスウェールズ州) が、2 種類の PCR プライマーを合成した。5' PCR プライマー (5L1A) がネオマイシン耐性遺伝子にハイブリダイズする。3' プライマー (3L1Dz5) が、DzyNA PCR プライマーであって、(a) 活性 DNAzyme の触媒的に不活性なアンチセンス配列を含む 5' 領域と、(b) ネオマイシン耐性遺伝子に相補的な 3' 領域とを含む。5L1A 及び 3L1Dz5 を用いた PCR 増幅中に、5L1A の伸長によって生成されたアンプリコンが、ネオマイシン耐性配列と、その 3' 領域に組み込まれた DNAzyme の触媒的に活性なセンスコピーの両方を含む。活性 DNAzyme は、RNA / DNA レポーター基質 Sub G5-FD を切断するようにデザインされている。PCR プライマーの 5' PCR プライマー (5L1A) は添付の配列表に配列番号 6 の配列として、3' プライマー (3L1Dz5) は配列番号 7 の配列として示されている。

20

【0084】

ヒト細胞系 CEMT4 を、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション (American Type Culture Collection) (メリーランド州ロックビル) から入手した。この CEMT4 細胞を、ネオマイシン耐性遺伝子を含むレトロウイルスで形質導入した。ゲノム DNA を、キアゲン DNA 抽出キット (QIAGEN DNeasy Tissue Kit) (オーストラリアのビクトリアに所在のキアゲン、カタログ番号: 69504) を用いて、ネオマイシン耐性遺伝子を含むレトロウイルスで形質導入した CEMT4 細胞と、CEMT4 細胞から単離した。形質導入細胞から抽出した DNA を非形質導入細胞からの DNA と混合して、100%、11%、1.2%、0.1%、0.02%、及び 0% (すなわち、非形質導入 CEMT4 が 0%) の形質導入 DNA を得た (質量比)。

30

【0085】

CEMT4 細胞並びにネオマイシン耐性遺伝子を含むレトロウイルスで形質導入された CEMT4 細胞から単離されたゲノム DNA を DzyNA PCR で増幅した。反応液は、20 p モルまたは 30 p モルの 5L1A、1 p モルまたは 2 p モルの 3L1Dz5、10 p モルの Sub G5-FD、20U RNasin (登録商標) (ウイスコンシン州マディソンに所在のプロメガ (Promega)、カタログ番号: N2515)、20 p モルの ROX 受動基準色素、及び 2.5 mM MgCl₂ を添加した 1x キアゲン・ホットスター Taq・マスター・ミックス (QIAGEN HotStarTaq Master mix) (オーストラリアのビクトリアに所在のキアゲン、カタログ番号: 203445) を含み、総容量が 40 µl である。1 µg のゲノム DNA を含む複製反応液を用意した。コントロール反応液には、ゲノム DNA 以外の全ての反応要素が含まれている。反応液を、ABI プリズム 7700 配列検出システム (ABI Prism 7700 Sequence Detection System) に入れ、95 で 10 分間変性し、サイクルごとに 1 下げて 70 から 1 分間のサイクルを 10 回行い、94 で 1 分保持した。次いで、60 で 1 分間のサイクルを 60 回行い、94 で 30 秒保持した。PCR のアニーリング / 伸長の最中に ABI プリズム 7700 配列検出システムで蛍光測定した。

40

【0086】

ネオマイシン耐性遺伝子を含むゲノム DNA を含む反応液は、コントロール反応液で観察される蛍光に対して、530 nm で FAM 蛍光に増大が見られた。形質導入 CEMT4

50

細胞のDNAを含むゲノムDNA 1 μ gを分析すると、検量線は100% ~ 0.02%の範囲の形質導入細胞に対して線形であった(常に R^2 は0.99よりも大きい)。非形質導入細胞のDNAを含む、またはDNAを含まない反応液は、PCRの70回のサーマルサイクル中に閾値レベルに対して増大した。標準的な量で作成した検量線を用いて、未知のサンプルにおけるネオマイシン耐性遺伝子を含む細胞すなわちDNAの割合を予想した。この例で説明した実験は、ネオマイシン耐性導入遺伝子の検出及び定量に用いることができる一連の反応条件を例示している。当業者であれば、このプロトコールを容易に変更して、ネオマイシン耐性遺伝子からのRNA転写物及び反応液に含まれている逆転写物を検出することができる。

【0087】

10

当業者であれば、広い意味で説明した本発明の概念または範囲から逸脱することなく、それぞれの実施形態に示されている本発明を様々に変形または変更できることを理解できよう。従って、上記した実施形態は単に例示目的であって限定することを意図するものではない。

【図面の簡単な説明】

【0088】

【図1】 HIV-1ゲノム内のリボザイム標的部位の位置を例示する模式図である。

【図2】本発明の例示的なステップのフローチャートである。

【図3】遺伝子を含有し遺伝子を発現する細胞のパーセンテージを決定するための、DzyNA PCRの原理を例示する模式図である。

20

【図4】CD34 + HP細胞からCD4 + Tリンパ球が生産される数学的モデルの線図である。

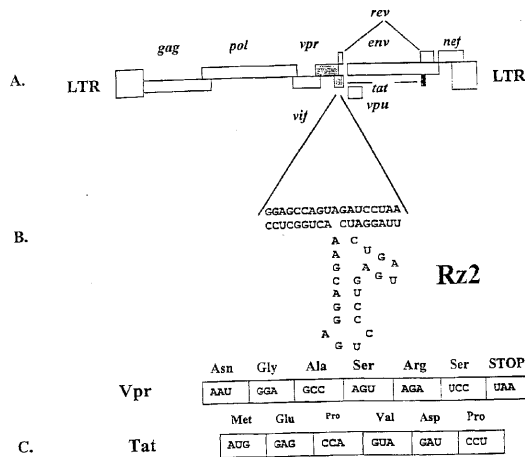
【図5】骨髓のCD34 + HP細胞からマクロファージが生産される数学的モデルの線図である。

【図6】 HIV-1感染の存在下でCD34 + HP細胞からCD4 + Tリンパ球が生産される数学的モデルの線図である。

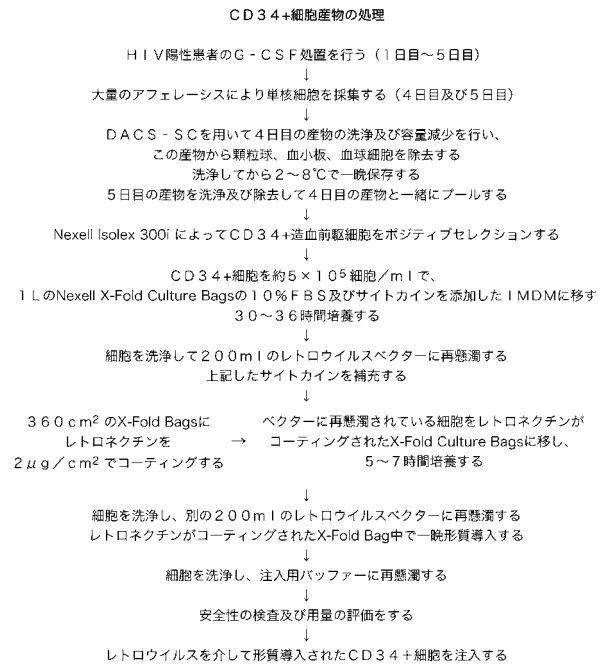
【図7】 HIV-1感染下でCD34 + HP細胞からマクロファージが生産される数学的モデルの線図である。

【図 1】

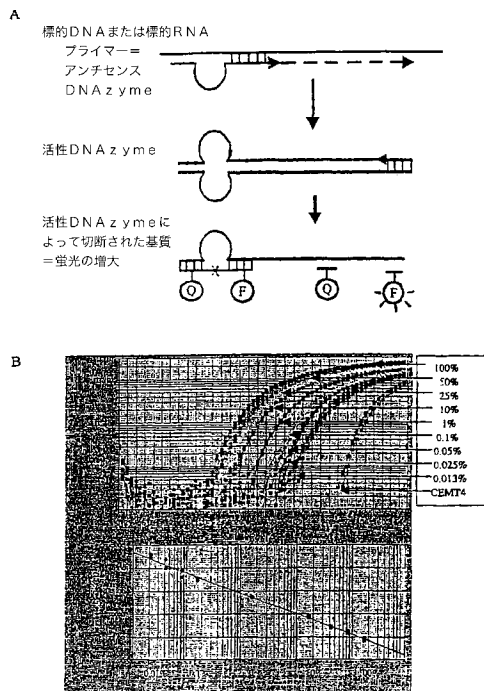
Figure 1



【図 2】



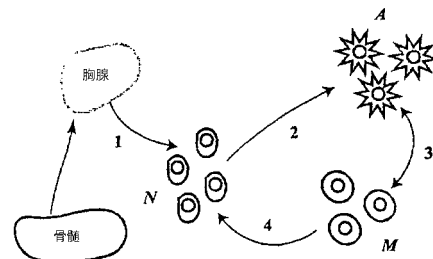
【図 3】



(A) DzyNA PCR検出法の模式的な表示

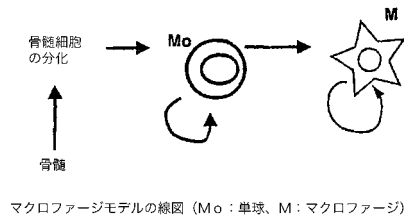
(B) DzyNA PCRによる標準曲線
 (未知のサンプルにおけるパーセンテージのマーキングの推定を可能にする)
 の作成によるneo^R遺伝子の定量

【図 4】

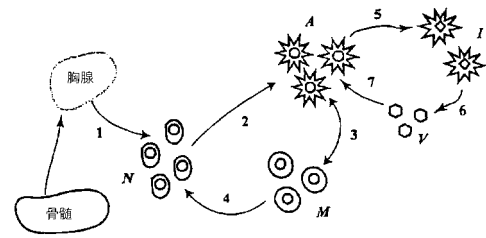


CD4+Tリンパ球モデルの線図
 (N: ナイーブ細胞、A: 活性化細胞、M: メモリー細胞)

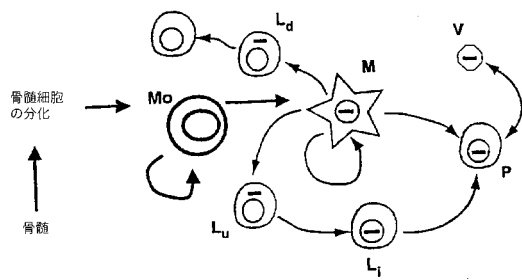
【 図 5 】



【 図 6 】



【 図 7 】



【配列表】

2005521632000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US02/21713
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(7) : A01N 63/00; A61K 48/00; C12N 15/63, 5/06, 5/08 US CL : 424/93.1, 93.21; 435/455, 320.1, 325, 363, 366, 372 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 424/93.1, 93.21; 435/455, 320.1, 325, 363, 366, 372		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) Please See Continuation Sheet		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X --- Y	US 5,911,983 A (BARRANGER et al) 15 June 1999, col. 22, lines 1-10, col 25, lines 13-40, col. 26, lines 60-64.	1-2, 4, 10, 23 ----- 3, 5-9
X	AMADO, R.G. et al. Effects of megakaryocyte growth and development factor on survival and retroviral transduction of T lymphoid progenitor cells. Human gene therapy, January 1998, Vol. 9, pages 173-183, especially page 175, col. 2, second and third paragraphs.	31
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 16 June 2003 (16.06.2003)		Date of mailing of the international search report 17 JUL 2003
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (703)305-3230		Authorized officer Quang Nguyen, Ph.D. Telephone No. (703) 308-1235

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1998)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US02/21713

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 1 of first sheet)

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

1. ☐ Claim Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claim Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☒ Claim Nos.: 11-22, 28, 29 and 32-34
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 2 of first sheet)This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
Please See Continuation Sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.: 1-10, 23 and 31

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/US02/21713

BOX II. OBSERVATIONS WHERE UNITY OF INVENTION IS LACKING

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

Group I, claims 1-10, 23, and 31, drawn to a method for introducing exogenous nucleic acid-containing hematopoietic progenitor (HP) cells into a subject and the use of quantitative real time PCR to determine the percentage of CD34+ HP cells containing an exogenous nucleic acid fragment or a transcription product of the the exogenous nucleic acid fragment.

Group II, claims 1-10, 23-25, and 35, drawn to a method for introducing exogenous nucleic acid-containing hematopoietic progenitor cells into a subject as an anti-HIV ribozyme therapy.

Group III, claims 1-10, 23-25, and 35, drawn to a method for introducing exogenous nucleic acid-containing hematopoietic progenitor cells into a subject as an anti-HIV antisense therapy.

Group IV, claims 1-10, 23-25, 30, and 35, drawn to a method for introducing exogenous nucleic acid-containing hematopoietic progenitor cells into a subject as an anti-HIV therapy through the use of RNA decoys.

Group V, claims 1-10, 23-25, and 35, drawn to a method for introducing exogenous nucleic acid-containing hematopoietic progenitor cells into a subject as an anti-HIV therapy through the use of intracellular antibodies.

Group VI, claims 1, 24-25, 30, and 35, drawn to a method for introducing exogenous nucleic acid-containing hematopoietic progenitor cells into a subject as an anti-HIV therapy through the use of interfering RNA.

The inventions listed as Groups I to VI do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

The method of each Group is materially different from the method of any other Groups. The method for introducing exogenous nucleic acid-containing HP cells into a subject of Group I does not require any anti-viral therapy, let alone an anti-HIV therapy; the method for introducing exogenous nucleic acid-containing HP cells into a subject as an anti-HIV therapy using a ribozyme of Group II does not require an antisense therapy, the use of RNA decoys, intracellular antibodies or interfering RNA as needed for the methods of Groups III, IV, V and VI, respectively, and vice versa. Furthermore, it is noted that an anti-HIV ribozyme, an HIV-antisense construct, an anti-HIV RNA decoy, an anti-HIV intracellular antibodies and an anti-HIV interfering RNA are different compositions that share no substantial common core structures or elements among themselves.

Continuation of B. FIELDS SEARCHED Item 3:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/US02/21713

APS, DIALOG, MEDLINE, EMBASE, BIOSIS

Search terms: hematopoietic progenitors, hematopoietic stem cells, transduced, transfected, enriched, concentrated, quantitative real time PCR.

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 31/18	A 6 1 P 31/18	
A 6 1 P 43/00	A 6 1 P 43/00	1 1 1
C 1 2 N 5/10	A 6 1 P 43/00	1 2 1
C 1 2 Q 1/68	C 1 2 Q 1/68	A
// C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 5/00	B
	C 1 2 N 15/00	A

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT, BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW, ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,ES, FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,N O,NZ,OM,PH,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(71)出願人 504013122
 マーレー・ジョン
 MURRAY, John
 オーストラリア連邦、2034 ニュー・サウス・ウェールズ州、サウス・クーギー、クスコ・ストリート 50
 50 Cuzco Street, South Coogee, New South Wales
 2034, Australia

(71)出願人 504013111
 ファニング・グレッグ
 FANNING, Greg
 オーストラリア連邦、2024 ニュー・サウス・ウェールズ州、ブロンテ、リード・ストリート 5/22
 5/22 Read Street, Bronte, New South Wales 2024
 , Australia

(71)出願人 504013133
 マクファーソン・ジャネット
 MACPHERSON, Janet
 オーストラリア連邦、2040 ニュー・サウス・ウェールズ州、レイチャード、デイ・ストリート 13
 13 Day Street, Leichhardt, New South Wales 2040, Australia

(71)出願人 504013155
 ポンド・スーザン
 POND, Susan
 オーストラリア連邦、2070 ニュー・サウス・ウェールズ州、リンドフィールド、ノースコート・ロード 44
 44 Northcote Road, Lindfield, New South Wales
 2070, Australia

(74)代理人 100066474
 弁理士 田澤 博昭

(74)代理人 100088605
 弁理士 加藤 公延

(74)代理人 100123434
 弁理士 田澤 英昭

- (74)代理人 100101133
弁理士 濱田 初音
- (72)発明者 マーレー・ジョン
オーストラリア連邦、2 0 3 4 ニュー・サウス・ウェールズ州、サウス・クーギー、クスコ・ストリート 5 0
- (72)発明者 ファニング・グレッグ
オーストラリア連邦、2 0 2 4 ニュー・サウス・ウェールズ州、ブロンテ、リード・ストリート 5 / 2 2
- (72)発明者 マクファーソン・ジャネット
オーストラリア連邦、2 0 4 0 ニュー・サウス・ウェールズ州、レイチャード、デイ・ストリート 1 3
- (72)発明者 ボンド・スーザン
オーストラリア連邦、2 0 7 0 ニュー・サウス・ウェールズ州、リンドフィールド、ノースコート・ロード 4 4
- (72)発明者 サイモンズ・ジェオフリー
オーストラリア連邦、2 0 2 9 ニュー・サウス・ウェールズ州、ローズ・ベイ、ハミルトン・ストリート 1 5

F ターム(参考) 4B024 AA01 CA11 DA02 EA02 GA11 HA08 HA17
4B063 QA18 QQ08 QQ42 QQ52 QR08 QR32 QR35 QR42 QR50 QR62
QR77 QS03 QS25 QS34 QS36 QS39 QX01
4B065 AA94X AB01 BA02 CA31 CA44
4C084 AA02 AA03 AA13 AA19 MA02 NA05 NA10 NA13 ZB212 ZB331
ZC551 ZC751 ZC752
4C087 BB34 BB44 BB64 BB65 CA12 DA03 DA19 MA02 NA05 NA10
NA13 ZB21 ZB33 ZC55 ZC75