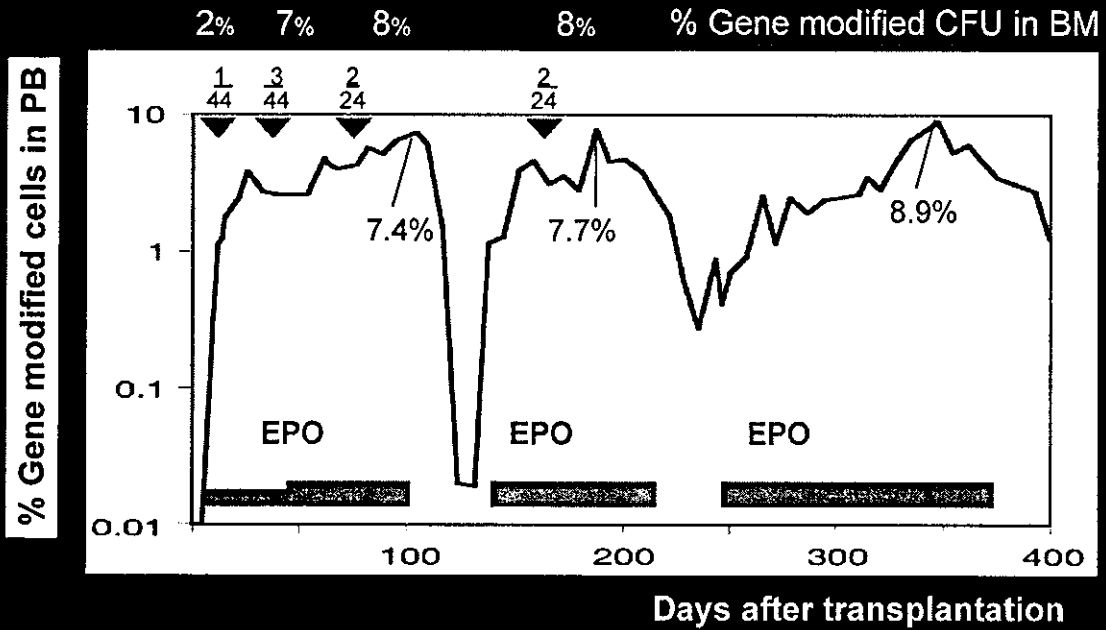
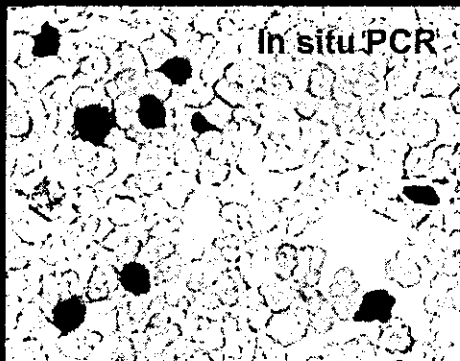


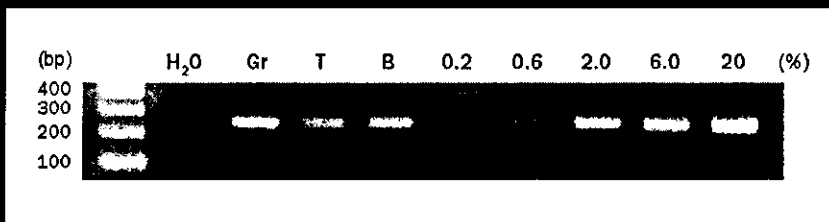
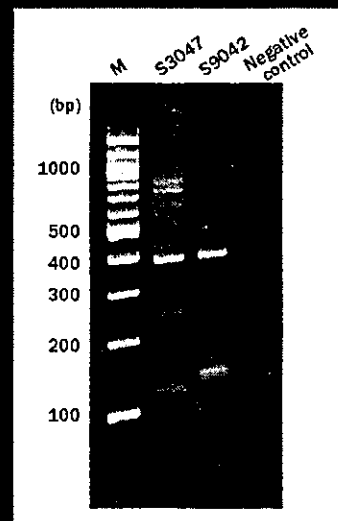
SAG+BMR: Efficient Expansion



Multi-lineage and Polyclonal Expansion of Gene Modified Cells in PB



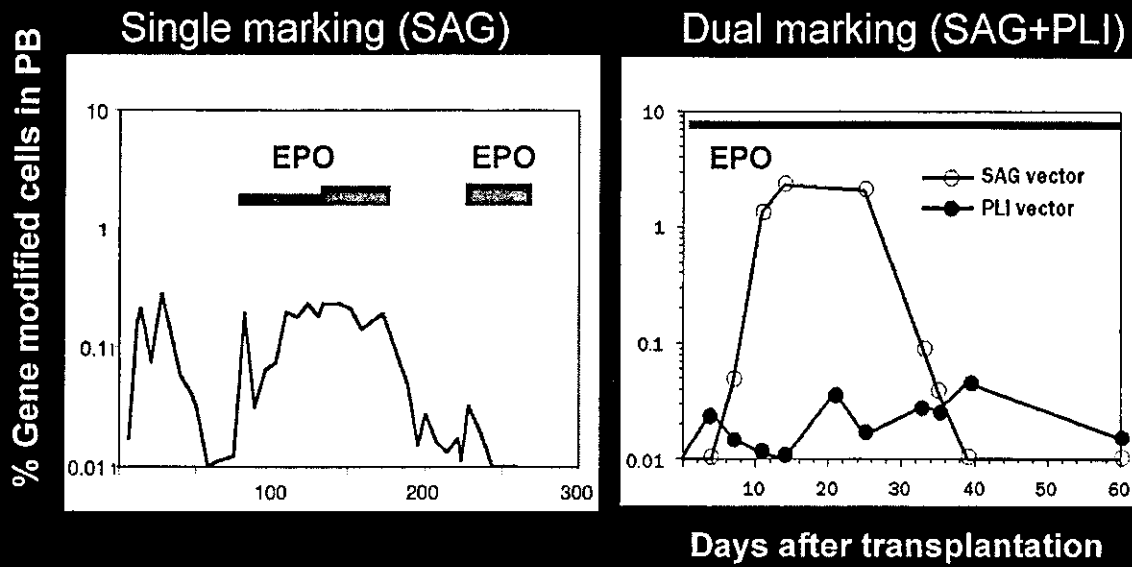
LAM PCR



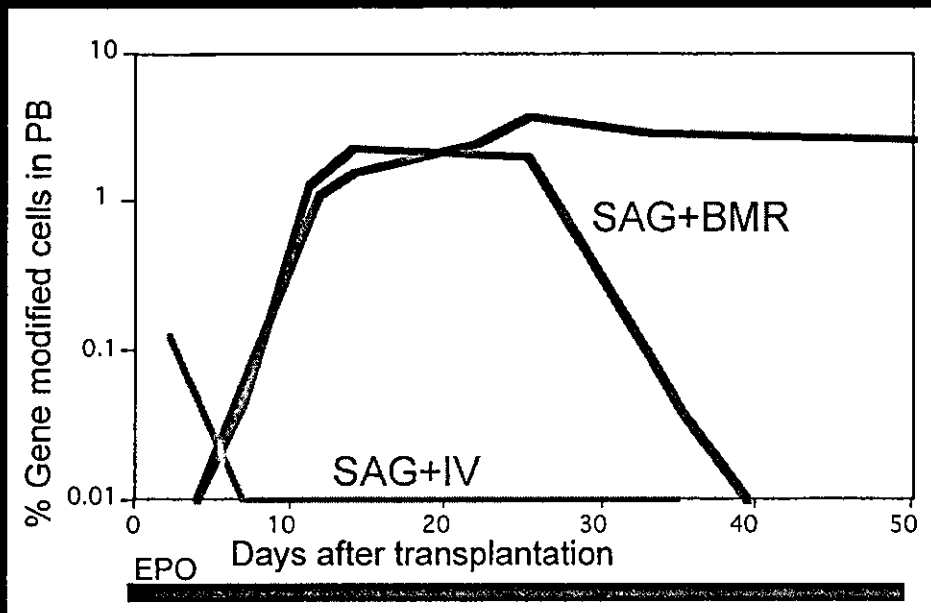
Lineage analysis in PB



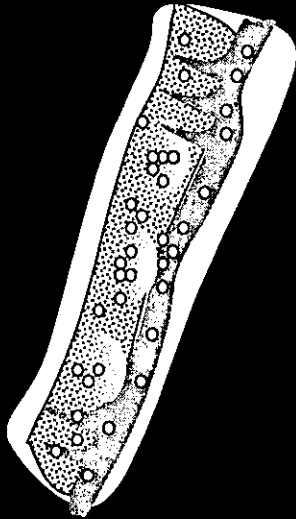
Expansion of Gene-Modified Cells with SAG and BMR in Other Monkeys



SAG + IV: Low Gene Marking Level in PB



Conclusions



Intravenous transplantation (IV):
Low efficiency of engraftment in the marrow

Bone marrow Replacement (BMR):
Effective engraftment in the marrow but few chances to grow and differentiate to periphery

IV+SAG
No expansion because of low efficiency of engraftment

BMR+SAG:
Effective engraftment, growth and differentiation to periphery



Contributors

Dनावेक Corporation
Y. Ueda,
T. Nagashima,
T. Tabata,
M. Hasegawa

Tsukuba Primate Center, Natl.
Inst. of Infectious Diseases
N. Ageyama,
K. Terao

Jichi Med School
Y. Hanazono,
H. Shibata,
K. Ueda,
S. Ogata,
M. Takatoku, Obara
A. Kume,
K. Ozawa

Kansai Med Univ.
S. Ikehara



(資料 2)

第 3 回 CGD Gene Therapy Meeting 資料

The 3rd CGD Gene Therapy Meeting

“Hematopoietic Stem Cell Gene Therapy for Chronic Granulomatous Disease: Toward Clinical Trials”

15 : 30 ~ 15 : 40

Opening remark

Keiya Ozawa

15 : 40 ~ 16 : 30

Current status of CGD gene therapy project

Sunyoung Kim

16 : 30 ~ 16 : 50

Evaluation of chimeric receptors comprising erythropoietin receptor and G-CSF receptors

○Akihiro Kume, Mari Matsuda, Keiya Ozawa

16 : 50 ~ 17 : 10

Efficient gene marking of hematopoietic cells without marrow conditioning in nonhuman primate: combinational use of SAG and BMR

○Yasuji Ueda, Mamoru Hasegawa

17 : 10 ~ 17 : 45

General discussion

17 : 50 ~ 19 : 00

Buffet-style dinner party at the SEIYODO restaurant

【Secretariat】

Division of Genetic Therapeutics, Center for Molecular Medicine, Jichi Medical School
3311-1 Yakushiji, Minamikawachi-machi, Kawachi-gun, Tochigi 329-0498, Japan
TEL: +81-285-58-7402 FAX: +81-285-44-8675

II. 関連会議

第3回自治医科大学—ソウル国立大学共同研究「慢性肉芽腫症遺伝子治療」ミーティング

日時： 平成17年2月19日（土）午後3時半～5時45分

場所： 自治医科大学研修センター第2・3研修室

参加者： 自治医科大学 遺伝子治療研究部

小澤敬也、久米晃啓、水上浩明、卜部匡司、岡田尚巳、松下卓、
信吉正治、松田真理

再生医学研究部

花園豊、柴田宏明

血液学部門

高德正昭、岡田真由美

ディナベック株式会社

上田泰次

筑波霊長類センター

寺尾恵治

ソウル国立大学

Sunyoung Kim

ViroMed Corp.

Sujeong Kim, Youngtae Hong

1. 開会挨拶

自治医科大学・内科学講座血液学部門、遺伝子治療研究部 小澤敬也

2002年11月に始まったこのミーティングは、第1回が東京・栃木、第2回がソウルで行われたが、3回目をまた栃木で開けることになり、関係諸氏のご尽力に感謝する。フランスのX-SCID遺伝子治療において3例目の白血病患者が発生するなど、遺伝子治療全体としては逆風下にあるとも言えるが、このような状況においてこそ、研究者が国の枠を越えて切磋琢磨し協力し合うことが必要である。本日の研究発表および討論が、CGD遺伝子治療の成功に向けて実り多いものになることを切望する。

2. “Current status of CGD gene therapy project”

（「韓国における慢性肉芽腫症遺伝子治療臨床試験開始に向けたロードマップ」）

ソウル国立大学生命科学部 Sunyoung Kim

現在計画しているCGD遺伝子治療臨床試験は、我々ソウル大生命科学部の基礎研究、ViroMedの開発・応用、ソウル大医学部の臨床部門という三者による協同プロジェクトである。

治療用ベクター骨格としては、我々が開発したMTを用いる。MTは、モロニーマウス白血病ウイルス（MMLV）からウイルス蛋白のコード領域を全て除去して複製可能ウイルス（RCR）の発生確率を最小にしたもので、これにX-CGD治療用遺伝子であるgp91遺伝子を組み込んだ場合（MT-gp91ベクター）、同じMMLVベースのMFGと比べても発現効率が格段に高い。これをテナガザル白血病ウイルス（GALV）エンベロープで包んだもの（GALV/MT-gp91）を治療に用いるが、臨床グレードのベクター生産については、米英に

またがるバイオベンチャーである BioReliance 社に発注済みであり、本年 12 月には製品引き渡しを受ける予定である。

MT-gp91 を実際の患者に投与するためには、new investigation drug (IND) として韓国食品薬品安全局 (KFDA、日本の厚生労働省にあたる) の認可を受ける必要があるが、その申請にあたっては細胞および動物を用いた治療実験結果に加え、3 種類の安全性試験の結果を提出するよう求められた。第一は一回投与による毒性試験 (SD テスト) で、GALV/MT-gp91 遺伝子導入したマウス骨髄細胞を同系マウスに 1 匹当たり 2×10^5 個、 1×10^6 個、および 5×10^6 個輸注して 2 週間観察し、副作用が出ないことを確認する。第二は複数回投与による毒性試験 (RD テスト) で、SD テストと同様に処理した細胞を 1 匹当たり 5×10^6 個、2 週間間隔で回投与してから 2 週間観察する。SD テスト、RD テストとも、最終結果は本年 5 月末に出る予定である。第三は発癌性試験で、エコトロピック・エンベロープで包んだ MT-gp91 ベクター (Eco/MT-gp91) で遺伝子導入したマウス骨髄細胞を、同系マウスに 1 匹当たり 1×10^6 個輸注して 1 年間観察し、腫瘍発生の有無を確認する。この試験の最終結果は本年 8 月に出る予定である。さらに我々は、KFDA から要求はされていないが、LAM-PCR 法を用いて染色体中のベクター挿入部位の同定を試みた。発癌性試験と同様の治療を受けたマウスから 2・4・6 ヶ月後に採血して解析した。観察期間中を通じてクローン性増殖は認められず、ベクター挿入発癌が起こる可能性は非常に小さい。

以上の安全性試験の結果をふまえつつ KFDA およびソウル大学倫理委員会 (IRB) の審査を仰ぎながら、臨床試験に協力をお願いする患者の選定も行っている。現在ソウル大学医学部で治療を受けている CGD 患者は 9 家系・12 名で、変異は全て同定されている。今回の第 I/II 相試験では、この中から 2-3 名の患者に治療を行う予定であり、早ければ 2006 年年明け早々にも開始する予定である。

3. “Evaluation of chimeric receptors comprising erythropoietin receptor and G-CSF receptors” (「EpoR-GcR キメラ受容体=第二世代 SAG の機能解析」)

自治医科大学・遺伝子治療研究部 久米晃啓、松田真理、小澤敬也

まず、X 連鎖型慢性肉芽腫症 (X-CGD) の遺伝子治療に用いるレトロウイルスベクター骨格について検討した。ViroMed 社が開発した MT、標準的なレトロウイルスである MFG と MSCV のハイブリッド (MGK)、昨年ドイツで X-CGD の遺伝子治療に用いられ好成績をあげた SFF の 3 者を比較した。パッケージング細胞への一過性トランスフェクションにより作製したウイルス上清のタイターはほぼ同等だった。これらをテスト細胞に感染させたときの X-CGD 治療用 gp91 遺伝子発現量も同等であった。MT は野生型レトロウイルスゲノムの蛋白コード領域を全て除いているため RCR が出現する危険性が最も低い。またサイズが小さいため治療用遺伝子に加えて SAG などを組み込む余地が大きく、我々の研究目的に適したプラットフォームである。

次いで、全てヒト化した Epo 反応型 SAG について、細胞内部分の違いによる増殖シグナル強度を比較した。比較に用いたのは野生型 EpoR、EpoR-Mpl キメラ、EpoR-GcR キメラであるが、EpoR-GcR キメラについては接合部分の構造を少しずつ違えたものを 4 種類作製した。これらの Epo 反応型 SAG を、gp91 遺伝子または EGFP マーカー遺伝子とともに MT レトロウイルスに搭載し、サイトカイン依存性細胞株 (マウス由来 Ba/F3 細胞とヒト由来 MO7e 細胞) およびマウス骨髄細胞に遺伝子導入した。細胞株については遺伝子導入細胞を選択後、Epo 刺激下での増殖曲線によりシグナル強度を判定したところ、EpoR-Mpl キメラが最強であり、野生型 EpoR および 4 種類の EpoR-GcR キメラはほぼ同等の増殖シグナルを発した。骨髄細胞については、G-CSF または Epo 刺激によるコロニーアッセイを行い、その総数ならびに遺伝子導入造血前駆細胞の割合 (EGFP マーカーまた

は gp91 の発現により判定) を調べた。その結果は培養細胞と同様、EpoR-Mpl キメラ遺伝子を導入した場合のコロニー形成数が最大で、野生型 EpoR 遺伝子および 4 種類の EpoR-GcR キメラ遺伝子を導入した骨髓細胞からはほぼ同数のコロニーが形成された。Epo 刺激により形成された造血コロニーは全て治療用遺伝子 (またはマーカー遺伝子) を発現しており、SAG の増殖シグナルが選択的に働いていることを示す。また、ステロイド刺激を増殖シグナルに用いていた第一世代 SAG に比べて形成されるコロニー数が多く、因り自然な形でシグナルが伝達されていることを示唆する。

4. “Efficient gene marking of hematopoietic cells without marrow conditioning in nonhuman primate: combinational use of SAG and BMR”

(「第二世代選択的増幅遺伝子と骨髓内移植の組合せによる非ヒト霊長類末梢における高遺伝子導入効率の実現」)

ディナベック株式会社 上田泰次、長谷川護

班会議 I-2-(5)と同内容を英語にて発表。

5. 総合討論

韓国での CGD 遺伝子治療計画について、Kim 教授に対する質問と応答が行われた。

(1) ベクター生産を BioReliance 社に委託したのは、実績をもっているからである。

(2) ベクター挿入変異による発癌を予防するため、今後どのような改良を施すかについては検討を要する。自己不活化型 (SIN) ベクターについては、ViroMed における検討では従来のベクターより優れているという実験結果は持っている。ただしこれを新たな IND として認可を得、生産を委託すると、実際に製品として納入されるまでにはさらに 1 年以上かかる。従って今回はこれまでに十分検討が済んでいる MT-gp91 で臨床試験を開始したい。安全装置としてのクロマチン・インシュレーターは未検討。自殺遺伝子の併用については、SCID については疾患と治療用遺伝子の持つ特異性から必要かもしれないが、それ以外の疾患、例えば CGD については不要ではないか。自殺遺伝子としては、レトロウイルスに載せて使う場合、単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼは非常に使いにくい。

(3) 遺伝子導入細胞の生着を助けるため、前処置として患者にフルダラビンを投与することを考慮している。ドイツの臨床試験では前処置としてブスルファンを投与しているが、これも選択肢の一つである。

サルでの前臨床試験に用いる SAG コンストラクトの選定についての提案。

(4) EpoR-GcR キメラの接合部構造の違いが余りシグナル強度に影響を与えないとすると、なるべく免疫原性が小さくなるようなものを選べないか。

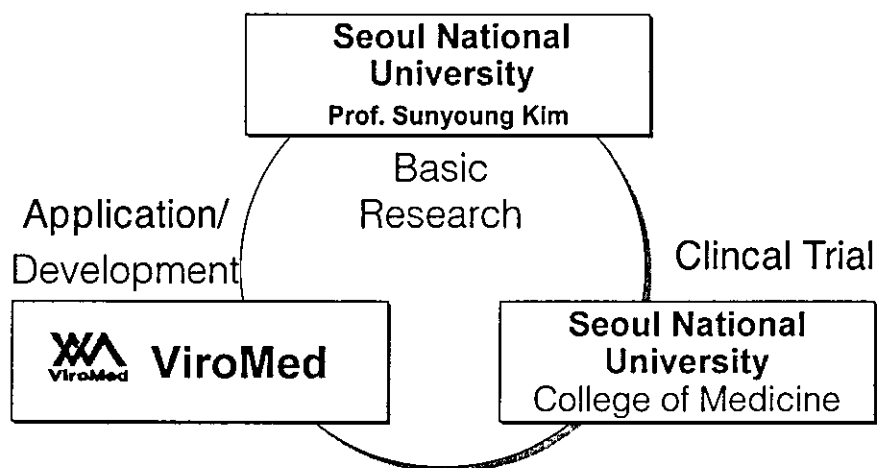
以上の討論をふまえ、次回のミーティングは臨床試験の経過報告を主な議題として、2006 年半ばをめどに韓国で開催することで合意した。

Current Status of CGD Gene Therapy Project

Sunyoung Kim

Seoul National University

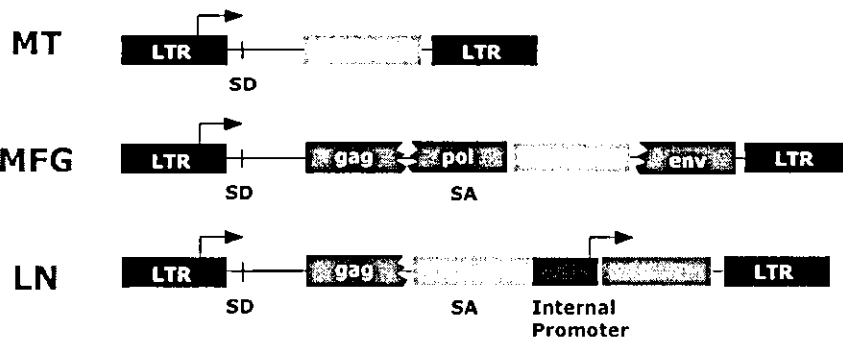
Gene Therapy Human Trial for CGD in Korea



CONTENTS

- GMP Production of Retroviral Vector
- Preclinical Study – Efficacy Tests
- Preclinical Study – Toxicity Tests
- Preclinical Study – Carcinogenicity Tests
- CGD Patients in Korea

Special feature of MT Vector : Safety



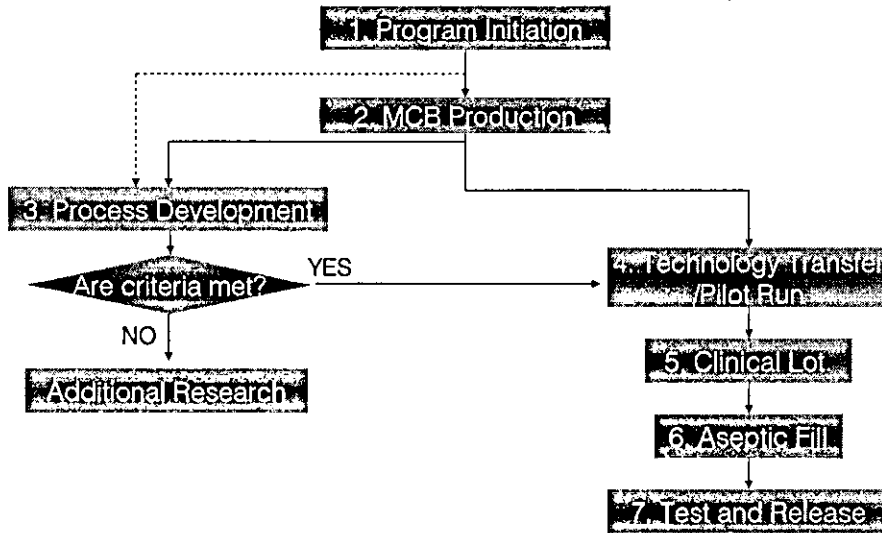
Safety

MT – No RCR
MFG – RCR (Yu et al., *Gene Therapy*, 2003)
Malech's group (NIH) recently found the presence of RCR .

GMP Production of MT-gp91

Process Flow Chart

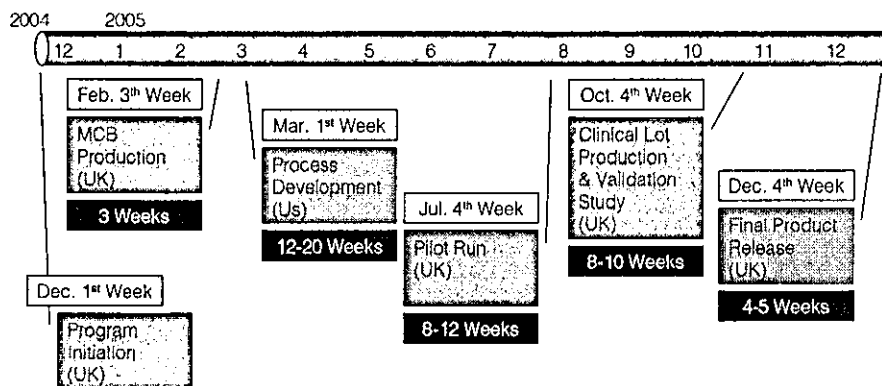
(BioReliance)



GMP Production of MT-gp91

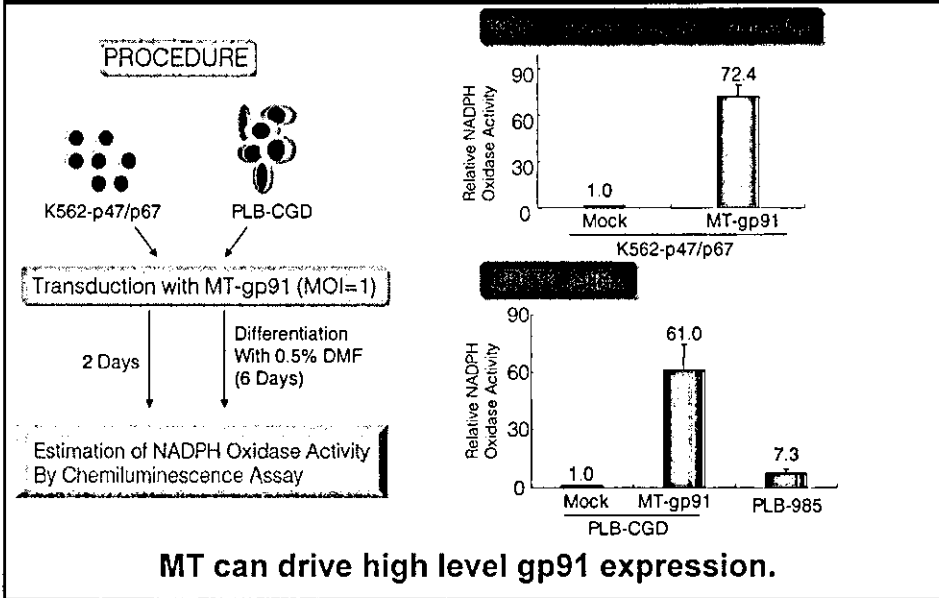
Expected Time-Line for GMP Production

(BioReliance)



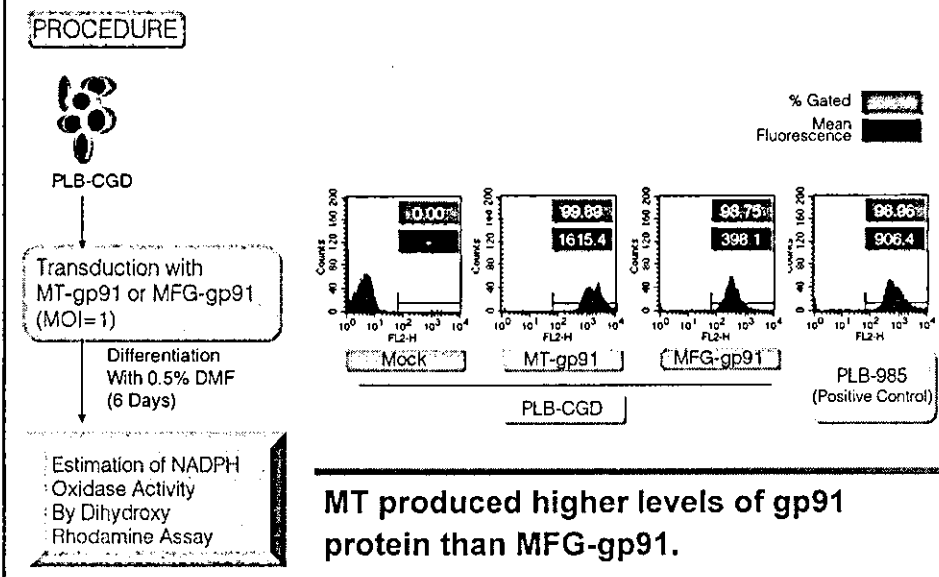
Our goal is to receive the final product at the end of 2005.

Efficacy Test – *in vitro* (1)



Efficacy Test – *in vitro* (2)

- Comparison between MT and MFG -



Efficacy Test – *in vitro* (3)

- Comparison between MT and MFG -

PROCEDURE

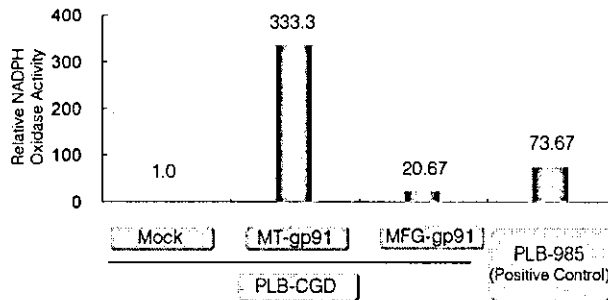


PLB-CGD

Transduction with
MT-gp91 or MFG-gp91
(MOI=1)

Differentiation
With 0.5% DMF
(6 Days)

Estimation of NADPH
Oxidase Activity
By Chemiluminescence
Assay

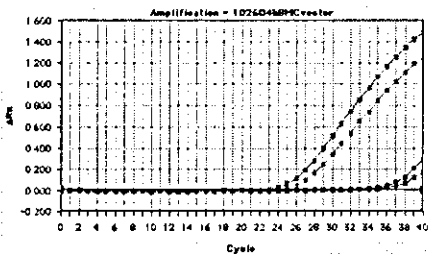


MT-gp91 showed higher level of gp91 activity than MFG-gp91.

Efficacy Test – *in vitro* (4)

- Gene Delivery Efficiency to Human CD34+ Cells -

We measured the copy number of MT-gp91 in the transduced CD34+ cells using real-time QPCR. K562-gp91 cell line that contains single copy of MT-gp91 was used as a standard.



	C_T Value	C_T Value (Actin)
K562	34.921	17.486
K562-gp91	24.308	17.173
CD34	35.383	17.556
CD34-MTgp91 (Transduced)	23.018	17.303
No Template Control	33.337	31.577

$$1 \text{ copy}/2^{(dCt(\text{sample-K562gp91}))} = x \text{ copy}$$

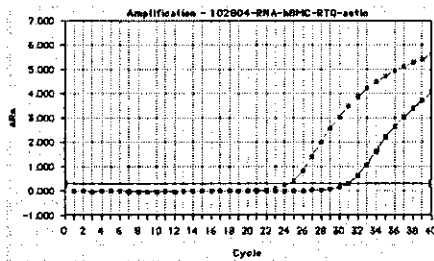
$$1/2^{(dCt(=23.018-24.308=-1.29))} = 2.45 \text{ copy}$$

Human CD34+ cells were efficiently transduced with MT-gp91.

Efficacy Test – *in vitro* (5)

- Expression of MT-gp91 in Human CD34+ Cells -

We also analyzed the mRNA level of gp91 driven by MT-gp91 in the transduced human CD34+ cells. After purification of mRNA from CD34+ cells, we measured the MT-gp91 expression using primers specific to MT-gp91 in real-time QPCR.

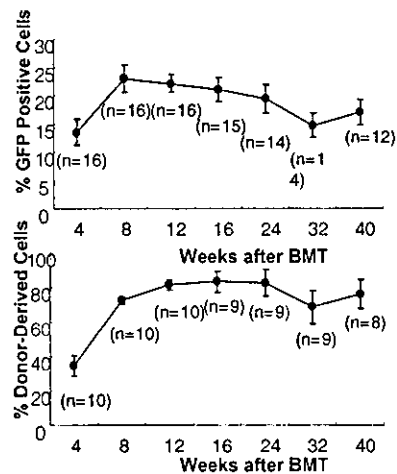
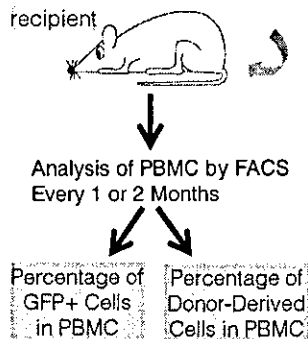


	C_T Value	C_T Value (Actin)
CD34	30.892	18.772
CD34-MTgp91 (Transduced)	24.377	19.353
No Template Control	31.173	33.131

MT-gp91 could produce a considerably high level of vector-driven gp91 mRNA in transduced human CD34 cells.

Long Term GFP Expression by MT-based Vector in Mouse Model

Reinfusion of Transduced Cells (i.v.)



The MT-based vector could drive stable, high level of gene expression *in vivo*.

Efficacy Test – *in vivo*

Reinfusion of Transduced Cells (i.v.)
(1.0×10^6 cells/mouse)

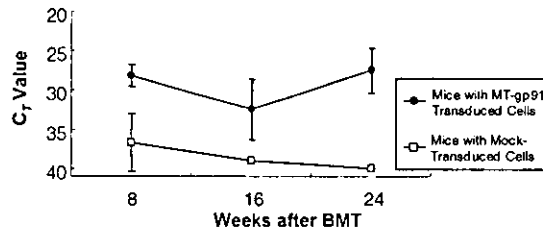


Analysis of PBMC by QPCR
Every 2 Months

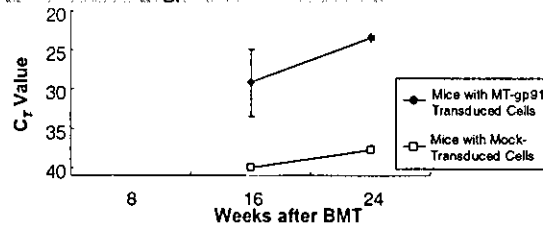
Detection of
MT-gp91 in
gDNA of
PBMC

Detection of MT-
gp91 Expression
in mRNA of
PBMC

Detection of MT-gp91 provirus in PBMC



Detection of MT-gp91 mRNA in PBMC



The MT-based vector maintained gp91 expression *in vivo* for 6 months

Toxicity Test

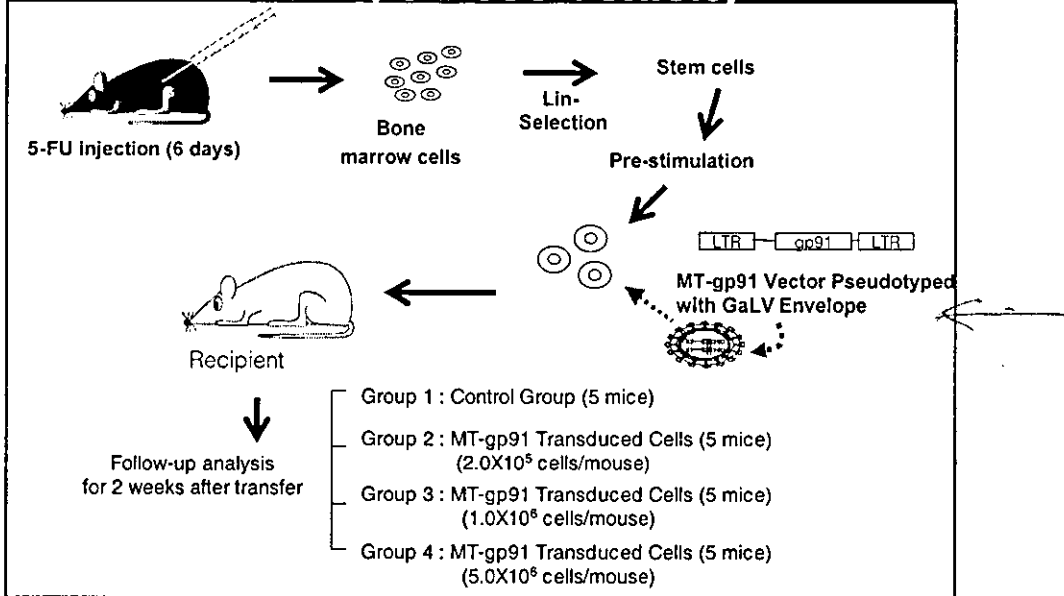
Single dose toxicity

Repeated dose toxicity

Immunotoxicity

Carcinogenicity: Insertional Mutagenesis

Overall Procedure for Toxicity Tests - Single Dose Toxicity

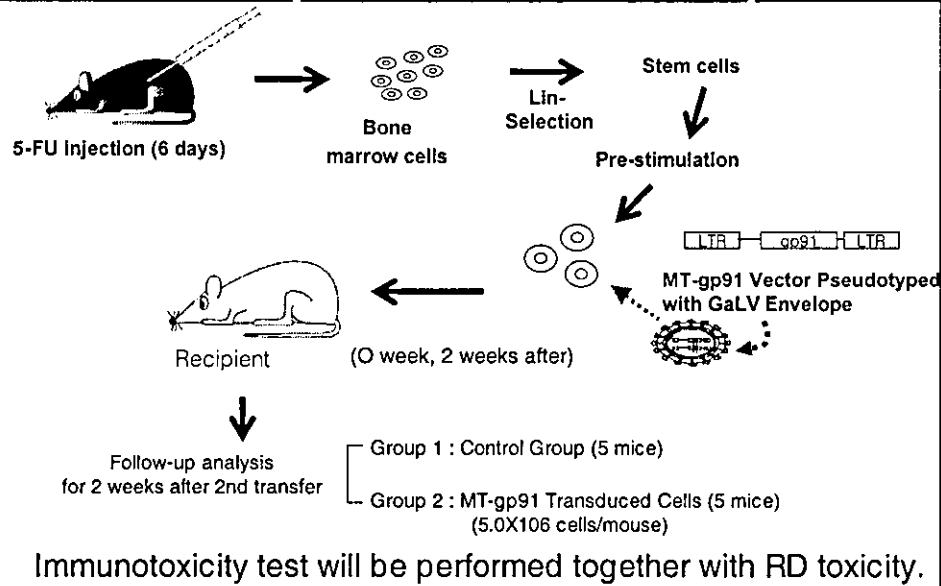


Items Analyzed in SD Toxicity Tests - Korea Institute of Toxicology (GLP) -

Clinical Observation
Body Weight Changes
Necropsy

The final report will be received at the end of
May, 2005.

Overall Procedure for Toxicity Tests - Repeated Dose Toxicity

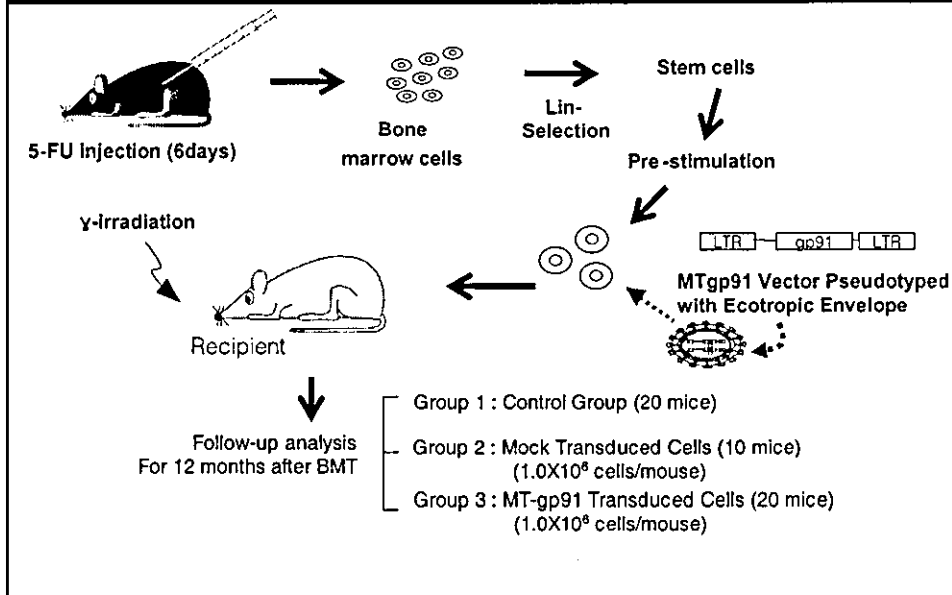


Items Analyzed in RD Toxicity Tests - Korea Institute of Toxicology (GLP) -

Mortality
 Clinical Observation
 Body Weight Changes
 Food Consumption
 Water Consumption
 Ophthalmoscopic Examination
 Urinalysis
 Hematology
 Serum Biochemistry
 Gross Finding
 Organ Weight
 Histopathological Examination
 Plasma Concentration Analysis

**The final report will be received at the end of
May, 2005.**

Overall Procedure for Carcinogenicity Test



Items Analyzed for Carcinogenicity Tests

- Department of Veterinary Medicine, Cheju National University -

- Mortality
- Clinical Observation
- Body Weight Changes
- Food Consumption
- Water Consumption
- Blood Smear
- Hematology
- Serum Biochemistry
- Gross Finding
- Organ Weight
- Histopathological Examination

The final report will be received at the end of August, 2005.

