

(19)日本国特許庁(JP)

## (12)特許公報(B2)

(11)特許番号

特許第7260170号

(P7260170)

(45)発行日 令和5年4月18日(2023.4.18)

(24)登録日 令和5年4月10日(2023.4.10)

(51)国際特許分類

F I

C 1 2 N 15/86 (2006.01)

C 1 2 N 15/86 Z

C 1 2 N 15/867 (2006.01)

C 1 2 N 15/867 Z

C 1 2 N 15/113 (2010.01)

C 1 2 N 15/113 1 0 2 Z

C 1 2 N 5/10 (2006.01)

C 1 2 N 15/113 1 4 0 Z

C 1 2 N 5/078 (2010.01)

C 1 2 N 5/10

請求項の数 30 (全157頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2019-536901(P2019-536901)

(86)(22)出願日 平成30年1月9日(2018.1.9)

(65)公表番号 特表2020-515234(P2020-515234  
A)

(43)公表日 令和2年5月28日(2020.5.28)

(86)国際出願番号 PCT/US2018/012998

(87)国際公開番号 WO2018/129540

(87)国際公開日 平成30年7月12日(2018.7.12)

審査請求日 令和2年12月17日(2020.12.17)

(31)優先権主張番号 62/444,147

(32)優先日 平成29年1月9日(2017.1.9)

(33)優先権主張国・地域又は機関  
米国(US)

前置審査

(73)特許権者 517428713

アメリカン ジーン テクノロジーズ インターナショナル インコーポレイテッド  
アメリカ合衆国 メリーランド 20850, ロックビル, キー ウェスト アベニュー 9713, フィフス フロア

(74)代理人 100078282

弁理士 山本 秀策

(74)代理人 100113413

弁理士 森下 夏樹

(74)代理人 100181674

弁理士 飯田 貴敏

(74)代理人 100181641

弁理士 石川 大輔

(74)代理人 230113332

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 事前の免疫化ステップのないH I V免疫療法

## (57)【特許請求の範囲】

## 【請求項1】

形質導入した末梢血単核細胞(P B M C)を産生する方法であって、前記細胞は、H I Vワクチンで以前に免疫化されていない対象から単離されたものであり、

(a) H I Vに感染し、H I Vワクチンで以前に免疫化されていない対象から単離されたP B M Cを、治療有効量の刺激性作用剤と接触させるステップであって、前記接触がe x v i v oで実施されるステップ；

(b) e x v i v oにおいて、遺伝子エレメントをコードするウイルス送達システムを用いて前記P B M Cに形質導入するステップであって、前記遺伝子エレメントが、以下：

配列番号31と少なくとも90%の配列同一性を有する配列であって、ここで、前記遺伝子エレメントは、発現した場合に、細胞表面C C R 5レベルを減少させ、かつ、2つのH I V遺伝子を阻害することができる配列；または

(i i i) 配列番号97と少なくとも90%の配列同一性を含む配列、(i v) 配列番号6と少なくとも90%の配列同一性を含む配列および(v) 配列番号7と少なくとも90%の配列同一性を含む配列の各々を含む配列であって、ここで、前記遺伝子エレメントは、発現した場合に、細胞表面C C R 5レベルを減少させ、かつ、2つのH I V遺伝子を阻害することができる配列

を含み、

ここで、前記2つのH I V遺伝子がT a tとV i fであり、

ただし、前記遺伝子エレメントは、T a tもしくはV i f以外のH I V遺伝子を阻害で

10

20

きる他の配列を除く、ステップ；および

(c) 前記形質導入された P B M C を、少なくとも 1 日間培養するステップを含む方法であって、

ただし、前記形質導入された P B M C をヒト対象に注入するステップを除く、方法。

【請求項 2】

前記形質導入された P B M C が、1 ~ 35 日間培養される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

対象に注入されることを特徴とする、H I V 感染の処置に使用するための、請求項 1 に記載の方法によって産生された、前記形質導入された P B M C を含む組成物。

【請求項 4】

前記対象がヒトである、請求項 3 に記載の組成物。

【請求項 5】

前記刺激性作用剤がペプチドを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6】

前記ペプチドが、g a g ペプチドを含む、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

前記刺激性作用剤がワクチンを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 8】

前記ワクチンが、H I V ワクチンを含む、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】

前記 H I V ワクチンが、M V A / H I V 62 B ワクチンまたはそのバリエーションを含む、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】

前記ウイルス送達システムが、レンチウイルス粒子を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 11】

前記遺伝子エレメントが、配列番号 31；および、配列番号 6 と配列番号 7 のいずれか 1 つを含む場合、前記遺伝子エレメントが、発現した場合に 2 つの H I V 遺伝子を標的とすることができ、前記 2 つの H I V 遺伝子が T a t と V i f である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 12】

前記遺伝子エレメントが、配列番号 31 または配列番号 97 のいずれかを含む場合、前記遺伝子エレメントが、発現した場合にケモカイン受容体 C C R 5 の産生を阻害することができる、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 13】

前記遺伝子エレメントが、マイクロ R N A または s h R N A を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 14】

前記遺伝子エレメントが、マイクロ R N A クラスターを含む、請求項 13 に記載の方法。

【請求項 15】

前記マイクロ R N A クラスターが、  
配列番号 31；または  
配列番号 97、配列番号 6 および配列番号 7 の各々  
を含む、請求項 14 に記載の方法。

【請求項 16】

H I V ワクチンで以前に免疫化されていない対象の H I V 感染を処置する方法において使用するための、形質導入された末梢血単核細胞 ( P B M C ) を含む組成物であって、前記形質導入された P B M C が、

(a) 前記対象から白血球を取り出すステップであって、前記対象が H I V ワクチンで以前に免疫化されていない、ステップ；

(b) e x v i v o において、前記白血球から P B M C を精製するステップ；

10

20

30

40

50

( c ) *ex vivo*において、前記 P B M C を治療有効量の刺激性作用剤と接触させるステップ；

( d ) *ex vivo*において、遺伝子エレメントをコードするウイルス送達システムを用いて前記 P B M C に形質導入するステップであって、前記遺伝子エレメントが、以下：

配列番号 3 1 と少なくとも 9 0 % の配列同一性を有する配列であって、ここで、前記遺伝子エレメントは、発現した場合に、細胞表面 C C R 5 レベルを減少させ、かつ、2 つの H I V 遺伝子を阻害することができる配列；または

( i i i ) 配列番号 9 7 と少なくとも 9 0 % の配列同一性を含む配列、( i v ) 配列番号 6 と少なくとも 9 0 % の配列同一性を含む配列および ( v ) 配列番号 7 と少なくとも 9 0 % の配列同一性を含む配列の各々を含む配列であって、ここで、前記遺伝子エレメントは、発現した場合に、細胞表面 C C R 5 レベルを減少させ、かつ、2 つの H I V 遺伝子を阻害することができる配列を含み、

ここで、前記 2 つの H I V 遺伝子が T a t と V i f であり、

ただし、前記遺伝子エレメントは、T a t もしくは V i f 以外の H I V 遺伝子を阻害できる他の配列を除く、ステップ；および

( e ) 前記形質導入された P B M C を、少なくとも 1 日間培養するステップを含む方法によって産生される、組成物。

【請求項 1 7】

前記形質導入された P B M C が、1 ~ 3 5 日間培養される、請求項 1 6 に記載の組成物。

【請求項 1 8】

前記対象に注入されることを特徴とする、請求項 1 6 に記載の組成物。

【請求項 1 9】

前記対象がヒトである、請求項 1 6 から 1 8 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 2 0】

前記刺激性作用剤がペプチドを含む、請求項 1 6 に記載の組成物。

【請求項 2 1】

前記ペプチドが、g a g ペプチドを含む、請求項 2 0 に記載の組成物。

【請求項 2 2】

前記刺激性作用剤がワクチンを含む、請求項 1 6 に記載の組成物。

【請求項 2 3】

前記ワクチンが、H I V ワクチンを含む、請求項 2 2 に記載の組成物。

【請求項 2 4】

前記 H I V ワクチンが、M V A / H I V 6 2 B ワクチンまたはそのバリエーションを含む、請求項 2 3 に記載の組成物。

【請求項 2 5】

前記ウイルス送達システムが、レンチウイルス粒子を含む、請求項 1 6 に記載の組成物。

【請求項 2 6】

前記遺伝子エレメントが、配列番号 3 1 ；および、配列番号 6 と配列番号 7 のいずれか 1 つを含む場合、前記遺伝子エレメントが、2 つの H I V 遺伝子を標的とすることができる少なくとも 1 つのスモール R N A を含み、前記 2 つの H I V 遺伝子が T a t と V i f である、請求項 1 6 に記載の組成物。

【請求項 2 7】

前記遺伝子エレメントが、配列番号 3 1 または配列番号 9 7 を含む場合、前記遺伝子エレメントが、ケモカイン受容体 C C R 5 の産生を阻害することができるスモール R N A も含む、請求項 2 6 に記載の組成物。

【請求項 2 8】

前記遺伝子エレメントが、マイクロ R N A または s h R N A を含む、請求項 2 6 または 2 7 に記載の組成物。

【請求項 2 9】

10

20

30

40

50

前記遺伝子エレメントが、マイクロRNAクラスターを含む、請求項28に記載の組成物。

【請求項30】

前記マイクロRNAクラスターが、  
配列番号31；または

配列番号97、配列番号6および配列番号7の各々を含む、請求項29に記載の組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願への相互参照

本出願は、2017年1月9日に出願された“HIV Immunotherapy With No Pre-Immunization Step”と題する米国特許出願第62/444,147号に基づく優先権を主張しており、その開示は、参考として本明細書中に援用される。

【0002】

発明の分野

本発明は、一般に、HIVを処置および予防するための免疫療法の分野に関する。特に、開示された処置および予防の方法は、事前の免疫化ステップなしの、遺伝子を送達するためのウイルスベクターおよびシステムの投与、ならびに他の療用法、診断用、または研究用の使用に関する。

【背景技術】

【0003】

発明の背景

併用抗レトロウイルス療法(cART)(高活性抗レトロウイルス療法またはHAARTとしても公知)は、HIV-1複製を制限し、疾患の進行を遅延させるが、薬物毒性、および薬物耐性ウイルスの出現は、HIV感染した人での長期的な制御にとって課題である。さらに、伝統的な抗レトロウイルス療法は、AIDSの発症または死を遅延させることに成功してはいるものの、機能的治癒をいまだ提供していない。代替的処置戦略が必要とされている。

【0004】

免疫システムが、HIV複製を制限することにおいて主要ではあるが通常は不十分な役割を果たすことを示すデータの出現により、HIV感染に対する免疫療法における強い興味が生じている。ウイルス特異的Tヘルパー細胞は、細胞溶解性T細胞(CTL)機能の維持にとって重要であり、おそらくは役割を果たす。また、ウイルス血症は中和抗体によって影響されるが、これらの抗体は、HIV感染では規模が一般に小さく、in vivoで進化していくウイルスバリエーションに後れを取っている。

【0005】

合わせると、これらのデータは、HIV特異的細胞性免疫応答の強さおよび幅を増加させることが、いわゆるHIV免疫療法を通じて臨床的な利益を有する可能性があることを示している。一部の研究はHIVに対するワクチンを試験しているが、今日までのところ成功は限定的である。さらに、遺伝子療法技術を利用することによってHIV免疫療法を増強することに興味をもたれてきたが、他の免疫療法アプローチを用いた場合と同様、成功は限定的である。

【0006】

特定のウイルスエンベロープ-宿主細胞受容体相互作用および遺伝子発現についてのウイルス機構の故に、標的細胞に遺伝子を形質導入するためにウイルスベクターを使用することができる。結果として、ウイルスベクターは、全T細胞または他の免疫細胞ならびに胚、受精卵、単離された組織試料、in situの組織標的、および培養細胞を含む多くの異なる細胞型への遺伝子の移入のためのビヒクルとして使用されてきている。細胞内に外来遺伝子または改変遺伝子を導入および発現する能力は、遺伝子治療、誘導多能性幹

10

20

30

40

50

細胞の体細胞再プログラミング、および様々な型の免疫療法のような療法介入に有用である。

#### 【 0 0 0 7 】

遺伝子治療は、ウイルスベクターの使用を含み得る新しい療法を創造する可能性を有する生物医学研究の最も成熟した領域の1つである。療法に利用可能な幅広い種類の潜在的な遺伝子を考慮すると、感染性疾患および非感染性疾患を処置する手段としての遺伝子治療の将来性を実現するためには、これらの遺伝子を送達する効率的な手段が必要である。マウスレトロウイルス、アデノウイルス、パルボウイルス（アデノ随伴ウイルス）、ワクシニアウイルス、およびヘルペスウイルスを含むいくつかのウイルスシステムが、療法用遺伝子移入ベクターとして開発されている。

10

#### 【 0 0 0 8 】

組織指向性、ウイルス調製物の安定性、発現の安定性および制御、ゲノムパッケージング能力、および構築物依存性ベクター安定性を含む、ウイルスベクターを開発する際に考慮しなければならない多くの因子がある。さらに、ウイルスベクターの *in vivo* 応用は、ウイルス構造タンパク質および/または形質導入遺伝子産物に対する宿主免疫応答によってしばしば制限される。

#### 【 0 0 0 9 】

したがって、毒性および安全性は、対象の処置のために *in vivo* で使用されるウイルスベクターにとって克服されなければならない重要なハードルである。遺伝子送達ビヒクルまたは療法用遺伝子産物に対する宿主免疫応答に関連する問題を抱えた、ヒトにおける遺伝子治療応用の数多くの歴史的例が存在する。1つまたは複数の療法遺伝子と共にいくつかのウイルス遺伝子を同時形質導入するウイルスベクター（例えばアデノウイルス）は特に問題である。

20

#### 【 0 0 1 0 】

レンチウイルスベクターは一般に細胞傷害性を誘導せず、強力な宿主免疫応答を誘発しないが、いくつかの免疫刺激遺伝子産物を有する HIV-1 のようないくつかのレンチウイルスベクターは、細胞毒性を引き起こし、*in vivo* で強い免疫応答を誘導する可能性がある。しかしながら、これは、形質導入後に複数のウイルス遺伝子をコードしないレンチウイルス由来の形質導入ベクターにとっては問題ではないかもしれない。もちろん、臨床的に有用な免疫応答を引き起こすであろうタンパク質をコードすることがベクターの目的であることもあるので、このことが必ずしも当てはまるわけではないだろう。

30

#### 【 0 0 1 1 】

レンチウイルスベクターの使用に関する別の重要な問題は、いくつかの細胞傷害性ウイルスタンパク質への曝露の際に起こり得る細胞病原性の問題である。特定の HIV-1 タンパク質への曝露は、細胞死またはT細胞における機能不応答性を誘導するかもしれない。同様に、組換えにより複製コンピテントな毒性ウイルスを生成する可能性が、しばしば問題となる。したがって、HIVの改善された処置がいまだ必要とされている。

#### 【発明の概要】

#### 【課題を解決するための手段】

#### 【 0 0 1 2 】

40

#### 発明の要旨

本開示の一態様では、対象の HIV 感染を処置する方法が開示される。方法は、対象から白血球を取り出し、末梢血単核細胞（PBMC）を精製するステップを含む。方法は、*ex vivo* において、PBMCを治療有効量の刺激性作用剤と接触させるステップ；*ex vivo* において、少なくとも1つの遺伝子エレメントをコードするウイルス送達システムを用いてPBMCに形質導入するステップ；および形質導入されたPBMCを、少なくとも1日間培養するステップをさらに含む。形質導入されたPBMCは、約1～約35日間培養されてもよい。方法は、形質導入されたPBMCを対象に注入するステップをさらに含んでもよい。対象は、ヒトであってもよい。刺激性作用剤は、ペプチドまたはペプチドの混合物を含んでもよい。好ましい実施形態では、刺激性作用剤は、g

50

a g ペプチドを含む。刺激性作用剤は、ワクチンを含んでいてもよい。ワクチンは、H I V ワクチンであってもよく、好ましい実施形態では、H I V ワクチンは、M V A / H I V 6 2 B ワクチンまたはそのバリエーションである。好ましい実施形態では、ウイルス送達システムは、レンチウイルス粒子を含む。一実施形態では、少なくとも1つの遺伝子エレメントは、ケモカイン受容体 C C R 5 の産生を阻害することができるスモールRNA、またはH I V RNA 配列を標的とすることができる少なくとも1つのスモールRNAを含んでいてもよい。別の実施形態では、少なくとも1つの遺伝子エレメントは、ケモカイン受容体 C C R 5 の産生を阻害することができるスモールRNA、およびH I V RNA 配列を標的とすることができる少なくとも1つのスモールRNAを含んでいてもよい。H I V RNA 配列は、H I V V i f 配列、H I V T a t 配列、またはそれらのバリエーションを含んでいてもよい。少なくとも1つの遺伝子エレメントは、マイクロRNAまたはs h RNA を含んでいてもよい。好ましい実施形態では、少なくとも1つの遺伝子エレメントは、マイクロRNAクラスターを含む。

10

【0013】

別の態様では、少なくとも1つの遺伝子エレメントは、

【化1】

AGGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCGACTGTAACTGAGCTTGCTCTACTGTGAAG  
CCACAGATGGGTAGAGCAAGCACAGTTTACCGCTGCCTACTGCCTCGGACTTCAA  
GGGGCTT ( 配列番号 1)

20

と少なくとも80%、または少なくとも85%、または少なくとも90%、または少なくとも95%の同一性パーセントを有するマイクロRNAを含む。好ましい実施形態では、少なくとも1つの遺伝子エレメントは、

【化2】

AGGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCGACTGTAACTGAGCTTGCTCTACTGTGAAG  
CCACAGATGGGTAGAGCAAGCACAGTTTACCGCTGCCTACTGCCTCGGACTTCAA  
GGGGCTT ( 配列番号 1)

30

を含む。

【0014】

別の態様では、少なくとも1つの遺伝子エレメントは、

【化3】

CATCTCCATGGCTGTACCACCTTGTCGGGGGATGTGTACTTCTGAACTTGTGTTGA  
ATCTCATGGAGTTTCAAGAAGACATCCGCACTGACATTTTGGTATCTTTCATCTG  
ACCA ( 配列番号 2)

と少なくとも80%、もしくは少なくとも85%、もしくは少なくとも90%、もしくは少なくとも95%の同一性パーセントを有するか、または

40

【化4】

GGGCCTGGCTCGAGCAGGGGGCGAGGGATTCCGCTTCTTCCTGCCATAGCGTGG  
TCCCCTCCCCTATGGCAGGCAGAAGCGGCACCTTCCCTCCCAATGACCGCGTCTTC  
GTCG ( 配列番号 3)

と少なくとも80%、もしくは少なくとも85%、もしくは少なくとも90%、もしくは少なくとも95%の同一性パーセントを有するマイクロRNAを含む。好ましい実施形態では、少なくとも1つの遺伝子エレメントは、

50

## 【化 5】

CATCTCCATGGCTGTACCACCTTGTCTGGGGGATGTGTACTTCTGAACTTGTGTTGA  
ATCTCATGGAGTTCAGAAGAACACATCCGCACTGACATTTTGGTATCTTTCATCTG  
ACCA ( 配列番号 2 ); または  
GGGCCTGGCTCGAGCAGGGGGCGAGGGATTCCGCTTCTTC  
CTGCCATAGCGTGGTCCCCTCCCCTATGGCAGGCAGAAGCGGCACCTTCCCCTCCCA  
ATGACCGCGTCTTCGTCG ( 配列番号 3)

10

を含む。

## 【 0 0 1 5】

別の態様では、マイクロRNAクラスターは、

## 【化 6】

AGGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCGACTGTAAACTGAGCTTGCTCTACTGTGAAG  
CCACAGATGGGTAGAGCAAGCACAGTTTACCGCTGCCTACTGCCTCGGACTTCAA  
GGGGCTTCCCGGGCATCTCCATGGCTGTACCACCTTGTCTGGGGGATGTGTACTTCT  
GAACTTGTGTTGAATCTCATGGAGTTCAGAAGAACACATCCGCACTGACATTTTGG  
TATCTTTCATCTGACCAGCTAGCGGGCCTGGCTCGAGCAGGGGGCGAGGGATTCC  
GCTTCTTCCCTGCCATAGCGTGGTCCCCTCCCCTATGGCAGGCAGAAGCGGCACCTT  
CCCTCCCAATGACCGCGTCTTCGTC ( 配列番号 31)

20

と少なくとも 80%、または少なくとも 85%、または少なくとも 90%、または少なく  
とも 95%の同一性パーセントを有する配列を含む。好ましい実施形態では、マイクロR  
NAクラスターは、

## 【化 7】

AGGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCGACTGTAAACTGAGCTTGCTCT  
ACTGTGAAGCCACAGATGGGTAGAGCAAGCACAGTTTACCGCTGCCTACTGCCTC  
GGACTTCAAGGGGCTTCCCGGGCATCTCCATGGCTGTACCACCTTGTCTGGGGGATG  
TGTACTTCTGAACTTGTGTTGAATCTCATGGAGTTCAGAAGAACACATCCGCACTG  
ACATTTTGGTATCTTTCATCTGACCAGCTAGCGGGCCTGGCTCGAGCAGGGGGCGA  
GGGATTCCGCTTCTTCCCTGCCATAGCGTGGTCCCCTCCCCTATGGCAGGCAGAAGC  
GGCACCTTCCCCTCCCAATGACCGCGTCTTCGTC ( 配列番号 31)

30

を含む。

## 【 0 0 1 6】

別の態様では、HIVに感染した細胞を処置する方法が提供される。方法は、HIVに  
感染した対象から単離された末梢血単核細胞(PBMC)を、治療有効量の刺激性作用剤  
と接触させるステップであって、接触がex vivoで実施されるステップ; ex vi  
voにおいて、少なくとも1つの遺伝子エレメントをコードするウイルス送達システム  
を用いてPBMCに形質導入するステップ; および形質導入されたPBMCを、少なくと  
も1日間培養するステップを含む。形質導入されたPBMCは、約1~約35日間培養され  
てもよい。方法は、形質導入されたPBMCを対象に注入するステップをさらに含んでい  
てもよい。対象は、ヒトであってもよい。刺激性作用剤は、ペプチドまたはペプチドの混  
合物を含んでいてもよく、好ましい実施形態では、gagペプチドを含む。刺激性作用剤  
は、ワクチンを含んでいてもよい。ワクチンは、HIVワクチンであってもよく、好まし

40

50

い実施形態では、H I V ワクチンは、M V A / H I V 6 2 B ワクチンまたはそのバリエーションである。好ましい実施形態では、ウイルス送達システムは、レンチウイルス粒子を含む。一実施形態では、少なくとも1つの遺伝子エレメントは、ケモカイン受容体 C C R 5 の産生を阻害することができるスモール R N A、または H I V R N A 配列を標的とすることができる少なくとも1つのスモール R N A を含んでいてもよい。別の実施形態では、少なくとも1つの遺伝子エレメントは、ケモカイン受容体 C C R 5 の産生を阻害することができるスモール R N A、および H I V R N A 配列を標的とすることができる少なくとも1つのスモール R N A を含んでいてもよい。H I V R N A 配列は、H I V V i f 配列、H I V T a t 配列、またはそれらのバリエーションを含んでいてもよい。少なくとも1つの遺伝子エレメントは、マイクロ R N A または s h R N A を含んでいてもよい。好ましい実施形態では、少なくとも1つの遺伝子エレメントは、マイクロ R N A クラスターを含む。

10

【 0 0 1 7 】

別の態様では、少なくとも1つの遺伝子エレメントは、

【 化 8 】

AGGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCGACTGTAAACTGAGCTTGCTCTACTGTGAAG  
CCACAGATGGGTAGAGCAAGCACAGTTTACCGCTGCCTACTGCCTCGGACTTCAA  
GGGGCTT ( 配列番号 1)

と少なくとも80%、または少なくとも85%、または少なくとも90%、または少なくとも95%の同一性パーセントを有するマイクロ R N A を含む。好ましい実施形態では、少なくとも1つの遺伝子エレメントは、

20

【 化 9 】

AGGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCGACTGTAAACTGAGCTTGCTCTACTGTGAAG  
CCACAGATGGGTAGAGCAAGCACAGTTTACCGCTGCCTACTGCCTCGGACTTCAA  
GGGGCTT ( 配列番号 1)

を含む。

【 0 0 1 8 】

別の態様では、少なくとも1つの遺伝子エレメントは、

【 化 1 0 】

CATCTCCATGGCTGTACCACCTTGTCTGGGGGATGTGTACTTCTGAACTTGTGTTGA  
ATCTCATGGAGTTCAGAAGAACACATCCGCACTGACATTTTGGTATCTTTCATCTG  
ACCA ( 配列番号 2)

30

と少なくとも80%、もしくは少なくとも85%、もしくは少なくとも90%、もしくは少なくとも95%の同一性パーセントを有するか、または

【 化 1 1 】

GGGCCTGGCTCGAGCAGGGGGCGAGGGATTCCGCTTCTTCCTGCCATAGCGTGG  
TCCCCTCCCCTATGGCAGGCAGAAGCGGCACCTTCCCTCCCAATGACCGCGTCTTC  
GTCG ( 配列番号 3)

40

と少なくとも80%、もしくは少なくとも85%、もしくは少なくとも90%、もしくは少なくとも95%の同一性パーセントを有するマイクロ R N A を含む。好ましい実施形態では、少なくとも1つの遺伝子エレメントは、

50



## 【化 1 2】

CATCTCCATGGCTGTACCACCTTGTCTGGGGGATGTGTACTTCTGAACTTGTGTTGA  
ATCTCATGGAGTTCAGAAGAACACATCCGCACTGACATTTTGGTATCTTTTCATCTG  
ACCA ( 配列番号 2); または  
GGGCCTGGCTCGAGCAGGGGGCGAGGGATTCCGCTTCTTC  
CTGCCATAGCGTGGTCCCCTCCCCTATGGCAGGCAGAAGCGGCACCTTCCCCTCCCA  
ATGACCGCGTCTTCGTCG ( 配列番号 3)

10

を含む。

## 【 0 0 1 9】

別の態様では、マイクロRNAクラスターは、

## 【化 1 3】

AGGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCGACTGTAACTGAGCTTGCTCTACTGTGAAG  
CCACAGATGGGTAGAGCAAGCACAGTTTACCGCTGCCTACTGCCTCGGACTTCAA  
GGGGCTTCCCGGGCATCTCCATGGCTGTACCACCTTGTCTGGGGGATGTGTACTTCT  
GAACTTGTGTTGAATCTCATGGAGTTCAGAAGAACACATCCGCACTGACATTTTGG  
TATCTTTCATCTGACCAGCTAGCGGGCCTGGCTCGAGCAGGGGGCGAGGGATTCC  
GCTTCTTCCCTGCCATAGCGTGGTCCCCTCCCCTATGGCAGGCAGAAGCGGCACCTT  
CCCTCCCAATGACCGCGTCTTCGTC ( 配列番号 31)

20

と少なくとも80%、または少なくとも85%、または少なくとも90%、または少なくとも95%の同一性パーセントを有する配列を含む。好ましい実施形態では、マイクロRNAクラスターは、

## 【化 1 4】

AGGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCGACTGTAACTGAGCTTGCTCT  
ACTGTGAAGCCACAGATGGGTAGAGCAAGCACAGTTTACCGCTGCCTACTGCCTC  
GGACTTCAAGGGGCTTCCCGGGCATCTCCATGGCTGTACCACCTTGTCTGGGGGATG  
TGTACTTCTGAACTTGTGTTGAATCTCATGGAGTTCAGAAGAACACATCCGCACTG  
ACATTTTGGTATCTTTCATCTGACCAGCTAGCGGGCCTGGCTCGAGCAGGGGGCGA  
GGGATTCCGCTTCTTCCCTGCCATAGCGTGGTCCCCTCCCCTATGGCAGGCAGAAGC  
GGCACCTTCCCTCCCAATGACCGCGTCTTCGTC ( 配列番号 31)

30

を含む。

## 【 0 0 2 0】

別の態様では、レンチウイルスベクターが開示される。レンチウイルスベクターは、少なくとも1つのコードされた遺伝子エレメントを含み、少なくとも1つのコードされた遺伝子エレメントは、ケモカイン受容体CCR5の産生を阻害することができるスモールRNA、またはHIV RNA配列を標的とすることができる少なくとも1つのスモールRNAを含む。別の態様では、少なくとも1つのコードされた遺伝子エレメントは、ケモカイン受容体CCR5の産生を阻害することができるスモールRNA、およびHIV RNA配列を標的とすることができる少なくとも1つのスモールRNAを含む。HIV RNA配列は、HIV Vif配列、HIV Tat配列、またはそれらのバリエーションを含んでもよい。少なくとも1つのコードされた遺伝子エレメントは、マイクロRNAまたはshRNAを含んでもよい。少なくとも1つのコードされた遺伝子エレメントは、マ

40

50

マイクロRNAクラスターを含んでいてもよい。

【0021】

別の態様では、少なくとも1つの遺伝子エレメントは、

【化15】

AGGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCGACTGTAAACTGAGCTTGCTCTACTGTGAAG  
CCACAGATGGGTAGAGCAAGCACAGTTTACCGCTGCCTACTGCCTCGGACTTCAA  
GGGGCTT ( 配列番号 1)

と少なくとも80%、または少なくとも85%、または少なくとも90%、または少なくとも95%の同一性パーセントを有するマイクロRNAを含む。好ましい実施形態では、少なくとも1つの遺伝子エレメントは、

10

【化16】

AGGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCGACTGTAAACTGAGCTTGCTCTACTGTGAAG  
CCACAGATGGGTAGAGCAAGCACAGTTTACCGCTGCCTACTGCCTCGGACTTCAA  
GGGGCTT ( 配列番号 1)

を含む。

【0022】

別の態様では、少なくとも1つの遺伝子エレメントは、

【化17】

CATCTCCATGGCTGTACCACCTTGTCGGGGGATGTGTACTTCTGAACTTGTGTTGA  
ATCTCATGGAGTTCAGAAGAACACATCCGCACTGACATTTTGGTATCTTTCATCTG  
ACCA ( 配列番号 2)

20

と少なくとも80%、もしくは少なくとも85%、もしくは少なくとも90%、もしくは少なくとも95%の同一性パーセントを有するか、または

【化18】

GGGCCTGGCTCGAGCAGGGGGCGAGGGATTCCGCTTCTTCCTGCCATAGCGTGG  
TCCCCCTCCCCTATGGCAGGCAGAAGCGGCACCTTCCCTCCCAATGACCGCGTCTTC  
GTCG ( 配列番号 3)

30

と少なくとも80%、もしくは少なくとも85%、もしくは少なくとも90%、もしくは少なくとも95%の同一性パーセントを有するマイクロRNAを含む。好ましい実施形態では、少なくとも1つの遺伝子エレメントは、

【化19】

CATCTCCATGGCTGTACCACCTTGTCGGGGGATGTGTACTTCTGAACTTGTGTTGA  
ATCTCATGGAGTTCAGAAGAACACATCCGCACTGACATTTTGGTATCTTTCATCTG  
ACCA ( 配列番号 2); または  
GGGCCTGGCTCGAGCAGGGGGCGAGGGATTCCGCTTCTTC  
CTGCCATAGCGTGGTCCCCCTCCCCTATGGCAGGCAGAAGCGGCACCTTCCCCTCCCA  
ATGACCGCGTCTTCGTCG ( 配列番号 3)

40

を含む。

【0023】

50

別の態様では、マイクロRNAクラスターは、  
【化20】

AGGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCGACTGTAAACTGAGCTTGCTCTACTGTGAAG  
CCACAGATGGGTAGAGCAAGCACAGTTTACCGCTGCCTACTGCCTCGGACTTCAA  
GGGGCTTCCCGGGCATCTCCATGGCTGTACCACCTTGTCGGGGGATGTGTACTTCT  
GAACTTGTGTTGAATCTCATGGAGTTCAGAAGAACACATCCGCACTGACATTTTGG  
TATCTTTCATCTGACCAGCTAGCGGGCCTGGCTCGAGCAGGGGGCGAGGGATTCC  
GCTTCTTCCTGCCATAGCGTGGTCCCCTCCCCTATGGCAGGCAGAAGCGGCACCTT  
CCCTCCCAATGACCGCGTCTTCGTC ( 配列番号 31)

10

と少なくとも80%、または少なくとも85%、または少なくとも90%、または少なくとも95%の同一性パーセントを有する配列を含む。好ましい実施形態では、マイクロRNAクラスターは、

【化21】

AGGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCGACTGTAAACTGAGCTTGCTCT  
ACTGTGAAGCCACAGATGGGTAGAGCAAGCACAGTTTACCGCTGCCTACTGCCTC  
GGAATTCAGGGGCTTCCCGGGCATCTCCATGGCTGTACCACCTTGTCGGGGGATG  
TGTACTTCTGAACTTGTGTTGAATCTCATGGAGTTCAGAAGAACACATCCGCACTG  
ACATTTTGGTATCTTTCATCTGACCAGCTAGCGGGCCTGGCTCGAGCAGGGGGCGA  
GGGATTCCGCTTCTTCCTGCCATAGCGTGGTCCCCTCCCCTATGGCAGGCAGAAGC  
GGCACCTTCCCCTCCCAATGACCGCGTCTTCGTC ( 配列番号 31)

20

を含む。

【0024】

別の態様では、レンチウイルス粒子を発現するためのレンチウイルスベクターシステムが開示される。システムは、本明細書に記載のようなレンチウイルスベクター；細胞への感染が最適化されているエンベロープタンパク質を発現するためのエンベローププラスミド；ならびにgag、pol、およびrev遺伝子を発現するための少なくとも1つのヘルパープラスミドを含み、レンチウイルスベクター、エンベローププラスミド、および少なくとも1つのヘルパープラスミドがパッケージング細胞株にトランスフェクトされると、パッケージング細胞株によってレンチウイルス粒子が産生され、レンチウイルス粒子は、ケモカイン受容体CCR5の産生を阻害することができるかまたはHIV RNA配列を標的とすることができる。システムは、gagおよびpol遺伝子を発現するための第1のヘルパープラスミド、ならびにrev遺伝子を発現するための第2のプラスミドをさらに含んでもよい。

30

【0025】

別の態様では、細胞に感染することができるレンチウイルス粒子が開示される。レンチウイルス粒子は、細胞への感染が最適化されたエンベロープタンパク質、および本明細書に記載のようなレンチウイルスベクターを含む。エンベロープタンパク質は、T細胞への感染のために最適化されていてもよい。好ましい実施形態では、エンベロープタンパク質は、CD4+ T細胞への感染のために最適化されている。

40

【0026】

別の態様では、改変細胞が開示される。改変細胞は、CD4+ T細胞を含み、CD4+ T細胞は、本明細書に記載のようなレンチウイルス粒子に感染している。好ましい実施形態では、CD4+ T細胞は、HIV抗原もまた認識する。さらに好ましい実施形態では、HIV抗原は、gag抗原を含む。さらに好ましい実施形態では、CD4+ T細胞は

50

、レンチウイルス粒子による感染後に、減少したレベルのCCR5を発現する。

【0027】

別の態様では、治療処置レジメンのために対象を選択する方法が開示される。方法は、対象から白血球を取り出し、末梢血単核細胞(PBMC)を精製し、PBMCに関連する少なくとも1つの因子に関連する第1の定量化可能な測定値を決定するステップ; *ex vivo*において、PBMCを、治療有効量の第2の刺激性作用剤と接触させ、PBMCに関連する少なくとも1つの因子に関連する第2の測定値を決定するステップを含み、第2の定量化可能な測定値が、第1の定量化可能な測定値よりも高い場合、対象が、処置レジメンのために選択される。少なくとも1つの因子は、T細胞増殖またはIFNガンマ産生であってもよい。

10

【0028】

別の態様では、本明細書に開示される方法は、PBMCから細胞の少なくとも1つのサブセットを枯渇させるステップを含む。方法は、PBMCから細胞の少なくとも1つのサブセットを枯渇させるステップを含み、細胞の少なくとも1つのサブセットは、CD8+T細胞、細胞、NK細胞、B細胞、好中球、好塩基球、好酸球、調節性T細胞、NK T細胞、および赤血球の任意の1つまたは複数を含む。実施形態では、枯渇させるステップは、白血球を取り出した後に行われる。実施形態では、枯渇させるステップは、白血球を取り出すのと同時にされる。

【0029】

前述の一般的な記載ならびに以下の図面の簡単な説明および発明を実施するための形態は、例示的かつ説明的であり、特許請求する本発明のさらなる説明を提供することを意図している。他の目的、利点、および新規な特徴は、以下の図面の簡単な説明および発明を実施するための形態から当業者に容易に明らかになるであろう。

20

【図面の簡単な説明】

【0030】

【図1】図1は、特定の臨床療法戦略のフローチャートダイアグラムを示す。

【0031】

【図2】図2は、他の細胞が感染するのを予防するためおよび/またはウイルス複製を予防するための遺伝子治療を使用して、CD4+T細胞がどのように変更され得るかをダイアグラムで示す。

30

【0032】

【図3】図3は、療法用ベクター、ヘルパープラスミド、およびエンベローププラスミドで構成されている例示的なレンチウイルスベクターシステムを示す。ここに示されている療法用ベクターは、本明細書ではAGT103とも呼ばれ、miR30CCR5-miR21Vif-miR185-Tatを含む、好ましい療法用ベクターである。

【0033】

【図4】図4は、環状化形態の例示的な3ベクターレンチウイルスベクターシステムを示す。

【0034】

【図5】図5は、環状化形態の例示的な4ベクターレンチウイルスベクターシステムを示す。

40

【0035】

【図6】図6は、例示的なベクター配列を示す。プロモーターおよびmiRクラスターのポジティブ(ゲノム)鎖配列は、CCR5指向性HIV株の拡散を阻害するために開発された。下線で示されていない配列は、このmiRクラスターにとって最良として選択されたEF-1アルファ転写プロモーター(配列番号105)を含む。下線で示した配列は、miR30CCR5(CCR5 mRNAへの再指向を生じる天然ヒトmiR30の改変; 配列番号1)、miR21Vif(Vif RNA配列への再指向を生じる; 配列番号2)およびmiR185Tat(Tat RNA配列への再指向を生じる; 配列番号108)からなるmiRクラスターを示す(配列番号33にまとめて示されている)。

50

【 0 0 3 6 】

【 図 7 】 図 7 は、本開示の態様による例示的なレンチウイルスベクター構築物を示す。

【 0 0 3 7 】

【 図 8 】 図 8 は、実験ベクターによる C C R 5 のノックダウンが、A G T c 1 2 0 細胞での R 5 指向性 H I V 感染を予防することを示す。( A ) は、A G T 1 0 3 レンチウイルスベクターを含むか、または含まない A G T c 1 2 0 細胞における C C R 5 発現を示す。( B ) は、H I V の N e f 遺伝子に融合した緑色蛍光タンパク質 ( G F P ) を発現する H I V B a L ウイルスストックによる感染に対する形質導入された A G T c 1 2 0 細胞の感受性を示す。

【 0 0 3 8 】

【 図 9 】 図 9 は、レンチウイルスベクターの s h R N A 阻害剤配列によって、C C R 5 発現が調節されたことを実証するデータを示す。( A ) 有力候補のスクリーニングデータが示されている。( B ) C C R 5 s h R N A - 1 ( 配列番号 1 6 ) を形質導入した後の C C R 5 ノックダウンデータが示されている。

【 0 0 3 9 】

【 図 1 0 】 図 1 0 は、レンチウイルスベクターの s h R N A 阻害剤配列によって、H I V 成分が調節されたことを実証するデータを示す。( A ) R e v / T a t 標的遺伝子のノックダウンデータが示されている。( B ) G a g 標的遺伝子のノックダウンデータが示されている。

【 0 0 4 0 】

【 図 1 1 】 図 1 1 は、A G T 1 0 3 が、本明細書に記載のように、H I V 発現プラスミドをトランスフェクトした細胞での T a t タンパク質の発現を低減させることを実証するデータを示す。

【 0 0 4 1 】

【 図 1 2 】 図 1 2 は、レンチウイルスベクターの合成マイクロRNA配列によって、H I V 成分が調節されたことを実証するデータを示す。( A ) T a t ノックダウンデータが示されている。( B ) V i f ノックダウンデータが示されている。

【 0 0 4 2 】

【 図 1 3 】 図 1 3 は、レンチウイルスベクターの合成マイクロRNA配列によって、C C R 5 発現が調節されたことを実証するデータを示す。

【 0 0 4 3 】

【 図 1 4 】 図 1 4 は、長鎖または短鎖 W P R E 配列を含むレンチウイルスベクターの合成マイクロRNA配列によって、C C R 5 発現が調節されたことを実証するデータを示す。

【 0 0 4 4 】

【 図 1 5 】 図 1 5 は、W P R E 配列を含むまたは含まないレンチウイルスベクターの合成マイクロRNA配列によって、C C R 5 の発現が調節されたことを実証するデータを示す。

【 0 0 4 5 】

【 図 1 6 】 図 1 6 は、レンチウイルスベクターの C D 4 プロモーター調節性合成マイクロRNA配列によって、C C R 5 発現が調節されたことを実証するデータを示す。

【 0 0 4 6 】

【 図 1 7 】 図 1 7 は、H I V G a g 特異的 C D 4 T 細胞の検出を実証するデータを示す。

【 0 0 4 7 】

【 図 1 8 】 図 1 8 は、H I V 特異的 C D 4 T 細胞の増殖およびレンチウイルス形質導入を実証するデータを示す。( A ) 処置スケジュールが示されている。( B ) C D 4 でゲートした T 細胞での I F N - ガンマ産生が、本明細書に記載されているように示されている。( C ) C D 4 でゲートした T 細胞での I F N - ガンマ産生および G F P 発現が、本明細書に記載されているように示されている。( D ) 本明細書に記載されているような、かつ重要なことにはワクチン接種前およびワクチン接種後の、H I V 特異的 C D 4 + T 細胞の頻度が示されている。( E ) ワクチン接種後の P B M C からの I F N - ガンマ産生が、本明細書に記載されているように示されている。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 4 8 】

【図 1 9】図 1 9 は、A G T 1 0 3 - G F P を増加させた際の用量応答および C C R 5 発現の阻害に関する機能アッセイを実証するデータを示す。( A ) A G T 1 0 3 - G F P の量を増加させた際の用量応答データが示されている。( B ) C C R 5 発現の点で正規分布した集団が示されている。( C ) A G T 1 0 3 - G F P の用量を増加させた際の C C R 5 発現の阻害パーセンテージが示されている。

## 【 0 0 4 9 】

【図 2 0】図 2 0 は、A G T 1 0 3 が初代ヒト C D 4 + T 細胞を効率的に形質導入することを実証するデータを示す。( A ) 形質導入された細胞 ( G F P 陽性 ) の頻度が、本明細書に記載されているように、F A C S により示されている。( B ) 細胞あたりのベクターコピー数が、本明細書に記載されているように示されている。

10

## 【 0 0 5 0 】

【図 2 1】図 2 1 は、A G T 1 0 3 が初代 C D 4 + T 細胞における H I V 複製を阻害することを実証するデータを、本明細書に記載されているように示す。

## 【 0 0 5 1 】

【図 2 2】図 2 2 は、A G T 1 0 3 が H I V 誘導性枯渇から初代ヒト C D 4 + T 細胞を防御することを実証するデータを示す。

## 【 0 0 5 2 】

【図 2 3 - 1】図 2 3 は、H I V 特異的 A G T 1 0 3 形質導入 C D 4 T 細胞が高度に濃縮された C D 4 + T 細胞集団の生成を実証するデータを示す。( A ) は、細胞集団の C D 4 および C D 8 発現プロファイルを、本明細書に記載されているように示す。( B ) は、細胞集団の C D 4 および C D 8 発現プロファイルを、本明細書に記載されているように示す。( C ) は、細胞集団の I F N - ガンマおよび C D 4 発現プロファイルを、本明細書に記載されているように示す。( D ) は、細胞集団の I F N - ガンマおよび G F P 発現プロファイルを、本明細書に記載されているように示す。

20

【図 2 3 - 2】図 2 3 は、H I V 特異的 A G T 1 0 3 形質導入 C D 4 T 細胞が高度に濃縮された C D 4 + T 細胞集団の生成を実証するデータを示す。( A ) は、細胞集団の C D 4 および C D 8 発現プロファイルを、本明細書に記載されているように示す。( B ) は、細胞集団の C D 4 および C D 8 発現プロファイルを、本明細書に記載されているように示す。( C ) は、細胞集団の I F N - ガンマおよび C D 4 発現プロファイルを、本明細書に記載されているように示す。( D ) は、細胞集団の I F N - ガンマおよび G F P 発現プロファイルを、本明細書に記載されているように示す。

30

## 【 0 0 5 3 】

【図 2 4】図 2 4 は、C D 8 枯渇プロトコルの模式図を示す。

## 【 0 0 5 4 】

【図 2 5 - 1】図 2 5 は、ペプチド刺激、C D 8 枯渇および I L - 7 / I L - 1 5 インキュベーションによる G a g 特異的 T 細胞の増殖を示す。( A )、( B )、および ( C ) は、C D 8 + 細胞の枯渇後に C D 4 + T 細胞増殖が顕著に改善されたことを示すフローサイトメトリーデータを示す。C D 4 + T 細胞増殖の改善に加えて、( A ) V 1 T 細胞の過剰成長および ( C ) N K 細胞の過剰成長もまた生じた。

40

【図 2 5 - 2】図 2 5 は、ペプチド刺激、C D 8 枯渇および I L - 7 / I L - 1 5 インキュベーションによる G a g 特異的 T 細胞の増殖を示す。( A )、( B )、および ( C ) は、C D 8 + 細胞の枯渇後に C D 4 + T 細胞増殖が顕著に改善されたことを示すフローサイトメトリーデータを示す。C D 4 + T 細胞増殖の改善に加えて、( A ) V 1 T 細胞の過剰成長および ( C ) N K 細胞の過剰成長もまた生じた。

【図 2 5 - 3】図 2 5 は、ペプチド刺激、C D 8 枯渇および I L - 7 / I L - 1 5 インキュベーションによる G a g 特異的 T 細胞の増殖を示す。( A )、( B )、および ( C ) は、C D 8 + 細胞の枯渇後に C D 4 + T 細胞増殖が顕著に改善されたことを示すフローサイトメトリーデータを示す。C D 4 + T 細胞増殖の改善に加えて、( A ) V 1 T 細胞の過剰成長および ( C ) N K 細胞の過剰成長もまた生じた。

50

【 0 0 5 5 】

【図 2 6】図 2 6 は、C D 8 / C D 5 6 / C D 1 9 / 枯渇プロトコールの模式図を示す。

【 0 0 5 6 】

【図 2 7 - 1】図 2 7 は、ペプチド刺激、C D 8 / / N K / B 細胞枯渇および I L - 7 / I L - 1 5 インキュベーションによる G a g 特異的 T 細胞の増殖を示す。( A ) ~ ( B ) は、C D 8 + 、 、または N K 細胞の過剰成長が、C D 4 + T 細胞の成長を阻害することまたはレンチウイルス形質導入抗原特異的 C D 4 + T 細胞を死滅させることを示すフローサイトメトリーデータを示す。C D 8 + 、 、または N K 細胞の枯渇後、C D 4 + T 細胞を増殖させた。

10

【図 2 7 - 2】図 2 7 は、ペプチド刺激、C D 8 / / N K / B 細胞枯渇および I L - 7 / I L - 1 5 インキュベーションによる G a g 特異的 T 細胞の増殖を示す。( A ) ~ ( B ) は、C D 8 + 、 、または N K 細胞の過剰成長が、C D 4 + T 細胞の成長を阻害することまたはレンチウイルス形質導入抗原特異的 C D 4 + T 細胞を死滅させることを示すフローサイトメトリーデータを示す。C D 8 + 、 、または N K 細胞の枯渇後、C D 4 + T 細胞を増殖させた。

【 0 0 5 7 】

【図 2 8】図 2 8 は、ペプチド刺激、C D 8 / / N K / B 細胞枯渇および I L - 7 / I L - 1 5 インキュベーションによる G a g 特異的 T 細胞の増殖および形質導入を示す。I F N - 陽性の抗原特異的 C D 4 + T 細胞は、培養物中の他のサブセットと比較して、良好な形質導入効率を生じた。

20

【 0 0 5 8 】

【図 2 9】図 2 9 は、形質導入された細胞のパーセンテージとベクターコピー数との関係を示す。( A ) は、形質導入された細胞のパーセンテージが増加するにつれて、ベクターコピー数もまた増加することを示す表を示す ( n = 4 ) 。( B ) は、形質導入された細胞のパーセンテージとベクターコピー数との間の正の相関を示す、表中に示された同じ試料の回帰分析を示す ( n = 4 ) 。

【発明を実施するための形態】

【 0 0 5 9 】

詳細な説明

30

概要

機能的治癒を達成するためにヒト免疫不全ウイルス ( H I V ) 疾患を処置および / または予防するための方法および組成物が、本明細書において開示される。機能的治癒は、c A R T の必要を低減または排除し、支持的アジュバント療法を必要としてもしなくてもよい開示された処置および方法から生じる状態として定義される。本発明の方法には、以下に記載される組み込みレンチウイルス、非組み込みレンチウイルス、および関連ウイルスベクター技術による遺伝子送達が含まれる。

【 0 0 6 0 】

療法用ウイルスベクター (例えば、レンチウイルスベクター)、免疫療法、および H I V 感染の機能的治癒を達成するための戦略においてそれらを使用するための方法が、本明細書において開示される。本明細書の図 1 に示されているように、HIV を処置するための戦略は、H I V 特異的 C D 4 T 細胞の画分を濃縮することを目的とした、H A A R T の毎日の投与によるウイルス血症の安定な抑制を有する H I V 感染患者における H I V に対する強力な免疫応答を生成することを意図したワクチンによる最初の療法的免疫化を含む。しかしながら、本明細書で詳述されているように、最初の療法的免疫化は、必ずしも必要でなくてもよい。次いで、( 1 ) 末梢白血球を白血球アフェレーシスによって単離するか、または P B M C を静脈血から精製するステップ、( 2 ) e x v i v o において、H I V ワクチンタンパク質で、C D 4 T 細胞を再刺激するステップ、( 3 ) 療法用レンチウイルス形質導入、e x v i v o において、T 細胞培養を行うステップ、および ( 4 ) 元のドナーへ再注入し戻すステップが、これに続く。

40

50

## 【 0 0 6 1 】

先述の記載に鑑み、本明細書の図 2 を参照すると、方法は、C D 4 + T 細胞などの新しい細胞が H I V に感染するのを予防するために使用され得る。新しい細胞が感染するのを予防するために、C C R 5 発現が、ウイルス付着を予防するために標的とされ得る。さらに、任意の残留する感染性ウイルス R N A の破壊もまた標的とされ得る。先述の記載に鑑み、本明細書の図 2 を参照すると、方法は、既に H I V に感染している細胞での H I V ウイルスサイクルを停止させるためにも使用され得る。H I V ウイルスサイクルを停止させるために、潜伏感染 C D 4 + T 細胞などの潜伏感染細胞によって産生されるウイルス R N A が標的とされ得る。

## 【 0 0 6 2 】

H I V を阻害することができる高度に有効な療法用レンチウイルスを提供することによって、H I V の機能的治癒を達成するための新しい戦略が開発された。

## 【 0 0 6 3 】

## 定義および解釈

本明細書中で別様に定義されていない限り、本開示に関して使用される科学用語および専門用語は、当業者により一般に理解される意味を有するものとする。さらに、状況により別様に求められない限り、単数形の用語は複数を含み、複数形の用語は単数を含むものとする。一般に、本明細書に記載されている細胞および組織培養、分子生物学、免疫学、微生物学、遺伝学、ならびにタンパク質および核酸化学、ならびにハイブリダイゼーションに関して使用される命名法および技術は、周知であり、当技術分野で一般に使用されているものである。本開示の方法および技術は、別様の指定がない限り、一般に、当技術分野で周知の従来法により、本明細書の全体にわたって引用および考察されている種々の一般的なおよびより専門的な参考文献に記載されているように実施される。例えば、Sambrook J. および Russell D. Molecular Cloning: A Laboratory Manual、第 3 版、Cold Spring Harbor Laboratory Press、Cold Spring Harbor、N.Y. ( 2 0 0 0 年 ) ; Ausubel ら、Short Protocols in Molecular Biology: A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology、Wiley, John & Sons, Inc. ( 2 0 0 2 年 ) ; Harlow および Lane、Using Antibodies: A Laboratory Manual、Cold Spring Harbor Laboratory Press、Cold Spring Harbor、N.Y. ( 1 9 9 8 年 ) ; ならびに Coligan ら、Short Protocols in Protein Science、Wiley, John & Sons, Inc. ( 2 0 0 3 年 ) を参照されたい。任意の酵素反応または精製技術は、製造業者の仕様に従って、当技術分野で一般に達成されるように、または本明細書に記載されているように実施される。本明細書に記載されている分析化学、合成有機化学、ならびに医学および医薬化学に関して使用される命名法、実験手順、および技術は、周知であり、当技術分野で一般に使用されているものである。

## 【 0 0 6 4 】

本明細書で使用される場合、「約」という用語は、当業者によって理解され、使用される文脈に依存してある程度変化するであろう。使用される文脈を考慮しても、当業者に明白ではない用語の使用がある場合には、「約」は特定の用語のプラスまたはマイナス 1 0 % を意味するであろう。

## 【 0 0 6 5 】

本明細書で使用される場合、活性剤の「投与」または「投与する」という用語は、本発明の活性剤を、処置の必要な対象に療法上有用な形態で治療有効量をその個体の体内に導入することができる形態で、提供することを意味する。

## 【 0 0 6 6 】

本明細書で使用される場合、「A G T 1 0 3」という用語は、本明細書で詳述されているような、mi R 3 0 - C C R 5 / mi R 2 1 - V i f / mi R 1 8 5 - T a t マイクロ R N A クラスター配列を含むレンチウイルスベクターの特定の実施形態を指す。

## 【 0 0 6 7 】

本明細書で使用される場合、「A G T 1 0 3 T」という用語は、A G T 1 0 3 レンチウ

10

20

30

40

50



イルスペクターを含むレンチウイルスまたはレンチウイルス粒子で形質導入された細胞を指す。

【0068】

本明細書および特許請求の範囲の全体にわたって、「含む (comprise)」という単語、または「含む (comprises)」もしくは「含むこと (comprising)」などの活用形は、記載されている整数または整数の群を含むが、任意の他の整数または整数の群を除外しないことを示唆すると理解されるであろう。さらに、本明細書で使用される場合、「含む (includes)」という用語は、含むが限定ではないことを意味する。

【0069】

「移植」という用語は、当業者が、細胞供給源を注入した後の対象において移植持続の定量的レベルを決定することができることを指す (例えば、Rosenbergら、N. Engl. J. Med. 323巻: 570~578頁 (1990年); Dudleyら、J. Immunother. 24巻: 363~373頁 (2001年); Yeeら、Curr. Opin. Immunol. 13巻: 141~146頁 (2001年); Rooneyら、Blood 92巻: 1549~1555頁 (1998年) を参照)。

【0070】

「発現」、「発現した」、または「コードする」という用語は、ポリヌクレオチドがmRNAに転写されるプロセスおよび/または転写されたmRNAが続いてペプチド、ポリペプチド、もしくはタンパク質に翻訳されるプロセスを指す。発現には、真核細胞におけるmRNAのスプライシング、または他の形態の転写後修飾もしくは翻訳後修飾を含み得る。

【0071】

「機能的治癒」という用語は、以前にcARTまたはHAARTを必要としていたHIV+個体が、cARTまたはHAARTのより低い用量もしくは断続的用量を使用するか、または投薬中止して、ウイルス複製が低いまたは検出不可能な形で生存することができる状況または状態を指す。個体は、低いレベルのウイルス複製を維持し疾患の進行を遅くするかまたは排除するための補助療法を依然として必要としていても、「機能的に治癒した」と言われ得る。機能的治癒の可能性がある結果としては、再発のすべての可能性を予防する、HIVの最終的な撲滅がある。

【0072】

「HIVワクチン」という用語は、HIV特異的免疫応答を誘発することを意図した免疫原とビヒクルとアジュバントを包含する。「HIVワクチン」は、HIVであってもよい精製された不活性化ウイルス粒子もしくは不活性化ウイルス粒子全体、またはHIVタンパク質、タンパク質断片もしくはペプチド、糖タンパク質断片もしくは糖ペプチドを発現することができる組換えウイルススペクターを、特異的免疫を誘発することができるHIVタンパク質、糖タンパク質またはタンパク質断片を産生するように細胞を誘導することができる組換え細菌ベクター、プラスミドDNAまたはRNAに加えて含んでもよい。代替的には、形質導入の前にHIV特異的CD4<sup>+</sup>T細胞を濃縮する目的のために、または、レンチウイルス形質導入CD4<sup>+</sup>T細胞のin vitroアッセイのために、抗CD3/CD28ビーズ、T細胞受容体特異的抗体、分裂促進因子、スーパー抗原、および他の化学的または生物学的刺激を含む免疫刺激のための特定の方法を使用して、樹状、TもしくはB細胞を活性化することができる。活性化物質は、可溶性、ポリマー性集合体、リポソームまたはエンドソームベースのまたは連結されたビーズであってもよい。インターロイキン-2、6、7、12、15、23または他を含むサイトカインを添加して、刺激に対する細胞応答を改善し、ならびに/または培養および形質導入間隔を通じてCD4<sup>+</sup>T細胞の生存を改善することができる。代替的には、前述のいずれにも限定されず、「HIVワクチン」という用語は、MVA/HIV62Bワクチンおよびそのバリエーションを包含する。MVA/HIV62Bワクチンは、公知の高度に弱毒化された二重組換えMVAワクチンである。MVA/HIV62Bワクチンは、HIV-1 gag-polおよびe

10

20

30

40

50

n v 配列を公知の M V A ベクターに挿入することにより構築された（例えば、Goepfertら（2014年）J. Infect. Dis. 210 巻（1号）：99～110 頁を参照、および国際公開第2006026667号を参照。両文献は、参照により本明細書に組み込まれる）。また、「HIV ワクチン」という用語は、以下の表1に提供されている任意の1つまたは複数のワクチンを含む。

【表1 - 1】

IAVI 臨床試験 ID*	プライム**
HVTN 704 AMP	VRC-HIVMAB060-00-AB
VAC89220HPX2004	Ad26.Mos.HIV 三価
01-I-0079	VRC4302
04/400-003-04	APL 400-003 GENEVAX-HIV
10-1074	10-1074
87 I-114	gp160 ワクチン(Immuno-AG)
96-I-0050	APL 400-003 GENEVAX-HIV
ACTG 326; PACTG 326	ALVAC vCP1452
Ad26.ENVA.01	Ad26.EnvA-01
Ad26.ENVA.01 粘膜/PCAVD003	Ad26.EnvA-01
Ad5HVR48.ENVA.01	Ad5HVR48.ENVA.01
ANRS VAC 01	ALVAC vCP125
ANRS VAC 02	rgp 160 とペプチド V3 ANRS VAC 02
ANRS VAC 03	ALVAC-HIV MN120TMG 株(vCP205)
ANRS VAC 04	LIPO-6
ANRS VAC 04 bis	LIPO-6
ANRS VAC 05	ALVAC vCP125
ANRS VAC 06	ALVAC vCP125
ANRS VAC 07	ALVAC vCP300
ANRS VAC 08	ALVAC-HIV MN120TMG 株(vCP205)
ANRS VAC 09	ALVAC-HIV MN120TMG 株(vCP205)
ANRS VAC 09 bis	LIPO-6
ANRS VAC 10	ALVAC vCP1452
ANRS VAC 12	LPHIV1
ANRS VAC 14	gp160 MN/LAI
ANRS VAC 16	LPHIV1
ANRS VAC 17	LIPO-6

10

20

30

40

50

【表 1 - 2】

ANRS VAC 18	LIPO-5
APL 400-003RX101	APL 400-003 GENEVAX-HIV
AVEG 002	HIVAC-1e
AVEG 002A	HIVAC-1e
AVEG 002B	HIVAC-1e
AVEG 003	VaxSyn gp160 ワクチン(MicroGeneSys)
AVEG 003A	VaxSyn gp160 ワクチン(MicroGeneSys)
AVEG 003B	VaxSyn gp160 ワクチン(MicroGeneSys)
AVEG 004	gp160 ワクチン(Immuno-AG)
AVEG 004A	gp160 ワクチン(Immuno-AG)
AVEG 004B	gp160 ワクチン(Immuno-AG)
AVEG 005A/B	Env 2-3
AVEG 005C	Env 2-3
AVEG 006X; VEU 006	MN rgp120
AVEG 007A/B	rgp120/HIV-1 SF-2
AVEG 007C	rgp120/HIV-1 SF-2
AVEG 008	HIVAC-1e
AVEG 009	MN rgp120
AVEG 010	HIVAC-1e
AVEG 011	UBI HIV-1 ペプチド免疫原、多価
AVEG 012A/B	ALVAC vCP125
AVEG 013A	gp160 ワクチン(Immuno-AG)
AVEG 013B	gp160 ワクチン(Immuno-AG)
AVEG 014A/B	TBC-3B
AVEG 014C	TBC-3B
AVEG 015	rgp120/HIV-1 SF-2
AVEG 016	MN rgp120
AVEG 016A	MN rgp120

10

20

30

40

50

【表 1 - 3】

AVEG 016B	MN rgp120
AVEG 017	UBI HIV-1 ペプチドワクチン、微粒子 一価
AVEG 018	UBI HIV-1 ペプチドワクチン、微粒子 一価
AVEG 019	p17/p24-Ty- VLP
AVEG 020	gp120 C4-V3
AVEG 021	P3C541b リボペプチド
AVEG 022	ALVAC-HIV MN120TMG 株(vCP205)
AVEG 022A	ALVAC-HIV MN120TMG 株(vCP205)
AVEG 023	UBI HIV-1 ペプチド免疫原、多価
AVEG 024	rgp120/HIV-1 SF-2
AVEG 026	ALVAC vCP300
AVEG 027	ALVAC-HIV MN120TMG 株(vCP205)
AVEG 028	Salmonella typhi CVD 908-HIV-1 LAI gp 120
AVEG 029	ALVAC-HIV MN120TMG 株(vCP205)
AVEG 031	APL 400-047
AVEG 032	ALVAC-HIV MN120TMG 株(vCP205)
AVEG 033	ALVAC-HIV MN120TMG 株(vCP205)
AVEG 034/034A	ALVAC vCP1433
AVEG 036	MN rgp120
AVEG 038	ALVAC-HIV MN120TMG 株(vCP205)
AVEG 201	rgp120/HIV-1 SF-2
AVEG 202/HIVNET 014	ALVAC-HIV MN120TMG 株(vCP205)
C060301	GTU-MultiHIV
C86P1	HIV gp140 ZM96
子宮腔部 CN54gp140-hsp70 コンジュゲートワ クチン(TL01)	CN54gp140
CM235 および SF2gp120	CM235(ThaiE)gp120 と SF2(B)gp120
CM235gp120 および SF2gp120	CM235(ThaiE)gp120 と SF2(B)gp120

10

20

30

40

50

【表 1 - 4】

CombiHIVvac (KombiVICHvak)	CombiHIVvac
CRC282	P2G12
CRO2049/ CUT*HIVAC001	GTU-MultiHIV
CUTHIVAC002	DNA-C CN54ENV
DCVax-001	DCVax-001
DNA-4	DNA-4
DP6?001	DP6?001 DNA
DVP-1	EnvDNA
EN41-UGR7C	EN41-UGR7C
EnvDNA	EnvDNA
EnvPro	EnvPro
EuroNeut41	EN41-FPA2
EV01	NYVAC-C
EV02 (EuroVacc 02)	DNA-C
EV03/ANRSVAC20	DNA-C
エクステンション HVTN 073E/SAAVI 102	サブ C gp140
F4/AS01	F4/AS01
FIT Biotech	GTU-Nef
チワン(Guangxi)CDC DNA ワクチン	チャイニーズ DNA
HGP-30 メモリー応答	HGP-30
HIV-CORE002	ChAdV63.HIVconsv
HIV-POL-001	MVA-mBN32
HIVIS 01	HIVIS-DNA
HIVIS 02	MVA-CMDR
HIVIS 03	HIVIS-DNA
HIVIS 05	HIVIS-DNA
HIVIS06	HIVIS-DNA
HIVIS07	HIVIS-DNA
HIVNET 007	ALVAC-HIV MN120TMG 株(vCP205)

10

20

30

40

50

【表 1 - 5】

HIVNET 026	ALVAC vCP1452
HPTN 027	ALVAC-HIV vCP1521
HVRF-380-131004	Vichrepol
HVTN 039	ALVAC vCP1452
HVTN 040	AVX101
HVTN 041	rgp120w61d
HVTN 042 / ANRS VAC 19	ALVAC vCP1452
HVTN 044	VRC-HIVDNA009-00-VP
HVTN 045	pGA2/JS7 DNA
HVTN 048	EP HIV-1090
HVTN 049	Gag および Env DNA/PLG 微粒子
HVTN 050/Merck 018	MRKAd5 HIV-1 gag
HVTN 052	VRC-HIVDNA009-00-VP
HVTN 054	VRC-HIVADV014-00-VP
HVTN 055	TBC-M335
HVTN 056	MEP
HVTN 057	VRC-HIVDNA009-00-VP
HVTN 059	AVX101
HVTN 060	HIV-1 gag DNA
HVTN 063	HIV-1 gag DNA
HVTN 064	EP HIV-1043
HVTN 065	pGA2/JS7 DNA
HVTN 067	EP-1233
HVTN 068	VRC-HIVADV014-00-VP
HVTN 069	VRC-HIVDNA009-00-VP
HVTN 070	PENNVAX-B
HVTN 071	MRKAd5 HIV-1 gag
HVTN 072	VRC-HIVDNA044-00-VP
HVTN 073	SAAVI DNA-C2

10

20

30

40

50

【表 1 - 6】

HVTN 076	VRC-HIVDNA016-00-VP
HVTN 077	VRC-HIVADV027-00-VP
HVTN 078	NYVAC-B
HVTN 080	PENNVAX-B
HVTN 082	VRC-HIVDNA016-00-VP
HVTN 083	VRC-HIVADV038-00-VP
HVTN 084	VRC-HIVADV054-00-VP
HVTN 085	VRC-HIVADV014-00-VP
HVTN 086, SAAVI 103	SAAVI MVA-C
HVTN 087	HIV-MAG
HVTN 088	オリゴマー gp140/MF59
HVTN 090	VSV-Indiana HIV gag ワクチン
HVTN 092	DNA-HIV-PT123
HVTN 094	GEO-D03
HVTN 096	DNA-HIV-PT123
HVTN 097	ALVAC-HIV vCP1521
HVTN 098	PENNVAX-GP
HVTN 100	ALVAC-HIV-C (vCP2438)
HVTN 101	DNA-HIV-PT123
HVTN 102	DNA-HIV-PT123
HVTN 104	VRC-HIVMAB060-00-AB
HVTN 105	AIDSVAX B/E
HVTN 106	DNA Nat-B env
HVTN 110	Ad4-mgag
HVTN 112	HIV-1 nef/tat/vif,env pDNA ワクチン
HVTN 114; GOVX-B11	AIDSVAX B/E
HVTN 116	VRC-HIVMAB060-00-AB
HVTN 203	ALVAC vCP1452
HVTN 204	VRC-HIVDNA016-00-VP

10

20

30

40

50

【表 1 - 7】

HVTN 205	pGA2/JS7 DNA
HVTN 502/Merck 023(Step 研究)	MRKAd5 HIV-1 gag/pol/nef
HVTN 503 (Phambili)	MRKAd5 HIV-1 gag/pol/nef
HVTN 505	VRC-HIVDNA016-00-VP
HVTN 702	ALVAC-HIV-C (vCP2438)
HVTN 703 AMP	VRC-HIVMAB060-00-AB
HVTN 908	pGA2/JS7 DNA
IAVI 001	DNA.HIVA
IAVI 002	DNA.HIVA
IAVI 003	MVA.HIVA
IAVI 004	MVA.HIVA
IAVI 005	DNA.HIVA
IAVI 006	DNA.HIVA
IAVI 008	MVA.HIVA
IAVI 009	DNA.HIVA
IAVI 010	DNA.HIVA
IAVI 011	MVA.HIVA
IAVI 016	MVA.HIVA
IAVI A001	tgAAC09
IAVI A002	tgAAC09
IAVI A003	AAV1-PG9
IAVI B001	Ad35-GRIN/ENV
IAVI B002	アジュバント GSK 研究用 HIV ワクチン製剤 1
IAVI B003	Ad26.EnvA-01
IAVI B004	HIV-MAG
IAVI C001	ADVAX
IAVI C002	ADMVA
IAVI C003	ADMVA
IAVI C004/DHO-614	ADVAX

10

20

30

40

50



【表 1 - 8】

IAVI D001	TBC-M4
IAVI N004 HIV-CORE 004	Ad35-GRIN
IAVI P001	ADVAX
IAVI P002	ADVAX
IAVI R001	rcAd26.MOS1.HIVEnv
IAVI S001	SeV-G
IAVI V001	VRC-HIVDNA016-00-VP
IAVI V002	VRC-HIVDNA016-00-VP
IDEA EV06	DNA-HIV-PT123
IHV01	全長単鎖(FLSC)
IMPAACT P1112	VRC-HIVMAB060-00-AB
IPCAVD006	MVA モザイク
IPCAVD008	三量体 gp140
IPCAVD009	Ad26.Mos.HIV 三価
IPCAVD010	Ad26.Mos.HIV 三価
ISS P-001	Tat ワクチン
ISS P-002	Tat ワクチン
LFn-p24 ワクチン	LFn-p24
MCA-0835	3BNC117
Merck V520-007	Ad-5 HIV-1 gag (Merck)
MRC V001	rgp120w61d
MRK Ad5	Ad-5 HIV-1 gag (Merck)
MRKAd5 + ALVAC	MRKAd5 HIV-1 gag
Mucovac2	CN54gp140
MV1-F4	麻疹ベクター-GSK
MYM-V101	ピロソーム-Gp41
NCHECR-AE1	pHIS-HIV-AE
PACTG 230	AIDSVAX B/E

10

20

30

40

50

【表 1 - 9】

PAVE100	VRC-HIVDNA016-00-VP
PEACHI-04	ChAdV63.HIVconsV
PedVacc001 & PedVacc002	MVA.HIVA
PolyEnv1	PolyEnv1
PXVX-HIV-100-001	Ad4-mgag
RISVAC02	MVA-B
RisVac02 ブースト	MVA-B
RV 124	ALVAC-HIV MN120TMG 株(vCP205)
RV 132	ALVAC-HIV vCP1521
RV 135	ALVAC-HIV vCP1521
RV 138; B011	ALVAC-HIV MN120TMG 株(vCP205)
RV 144	ALVAC-HIV vCP1521
RV 151 / WRAIR 984	LFn-p24
RV 156	VRC-HIVDNA009-00-VP
RV 156A	VRC-HIVDNA009-00-VP
RV 158	MVA-CMDR
RV 172	VRC-HIVDNA016-00-VP
RV 305	ALVAC-HIV vCP1521
RV 306	ALVAC-HIV vCP1521
RV 328	AIDSVAX B/E
RV 365	MVA-CMDR
RV262	Pennvax-G
SG06RS02	HIV gp140 ZM96
TAB9	TAB9
TaMoVac II	HIVIS-DNA
TAMOVAC-01-MZ	HIVIS-DNA
チアンタン・ワクシニア(Tiantan vaccinia)HIV ワクチン	チャイニーズ DNA
チアンタン・ワクシニア(Tiantan vaccinia)HIV ワ	チャイニーズ DNA

10

20

30

40

50

【表 1 - 1 0】

クチンおよび DNA	
TMB-108	イバリズマブ
UBI HIV-1 MN 中国	UBI HIV-1 ペプチド免疫原、多価
UBI HIV-1MN 八量体-オーストラリア研究	UBI HIV-1 ペプチド免疫原、多価
UBI V106	UBI HIV-1 ペプチドワクチン、微粒子 一価
UCLA MIG-001	TBC-3B
UCLA MIG-003	ALVAC-HIV MN120TMG 株(vCP205)
UKHVCSpoke003	DNA-CN54ENV および ZM96GPN
V24P1	HIV p24/MF59 ワクチン
V3-MAPS	V3-MAPS
V520-016	MRKAd5 HIV-1 gag/pol/nef
V520-027	MRKAd5 HIV-1 gag/pol/nef
V526-001 MRKAd5 および MRKAd6 HIV-1 三遺伝子ワクチン	MRKAd5 HIV-1 gag/pol/nef
VAX 002	AIDSVAX B/B
VAX 003	AIDSVAX B/E
VAX 004	AIDSVAX B/B
VRC 004 (03-I-0022)	VRC-HIVDNA009-00-VP
VRC 006 (04-I-0172)	VRC-HIVADV014-00-VP
VRC 007 (04-I-0254)	VRC-HIVDNA016-00-VP
VRC 008 (05-I-0148)	VRC-HIVDNA016-00-VP
VRC 009 (05-I-0081)	VRC-HIVDNA009-00-VP
VRC 010 (05-I-0140)	VRC-HIVADV014-00-VP
VRC 011(06-I-0149)	VRC-HIVDNA016-00-VP
VRC 012 (07-I-0167)	VRC-HIVADV027-00-VP
VRC 015 (08-I-0171)	VRC-HIVADV014-00-VP
VRC 016	VRC-HIVDNA016-00-VP
VRC 602	VRC-HIVMAB060-00-AB

10

20

30

40

50

【表 1 - 1 1】

VRC 607	VRCHIVMAB080-00-AB
VRC01LS	VRCHIVMAB080-00-AB
VR101	MVA-B
X001	CN54gp140

\* IAVI は、国際エイズワクチン推進構想であり、その臨床試験データベースは、  
<http://www.iavi.org/trials-database/trials> で公的に入手可能である。

10

\*\*本明細書で使用される場合、「プライム」という用語は、本明細書の表 1 に参照されている所与の臨床試験において免疫学的接種材料として元々使用された組成物を指す。

## 【0073】

「*in vivo*」という用語は、生命体で生じるプロセスを指す。「*ex vivo*」という用語は、生命体の外部で生じるプロセスを指す。

## 【0074】

「*miRNA*」という用語は、マイクロRNAを指し、「*miR*」と呼ばれる場合もある。

20

## 【0075】

「パッケージング細胞株」という用語は、レンチウイルス粒子を発現するために使用することができるあらゆる細胞株を指す。

## 【0076】

2つまたはそれよりも多くの核酸配列またはポリペプチド配列の文脈における「同一性パーセント」という用語は、最大一致で比較およびアラインした場合に、下に記載されている配列比較アルゴリズム（例えば、BLASTPおよびBLASTN、または当業者に利用可能な他のアルゴリズム）の1つを使用してまたは目視検討によって測定される、同じヌクレオチドまたはアミノ酸残基の指定のパーセンテージを有する2つまたはそれよりも多くの配列または部分配列を指す。「同一性パーセント」は、目的に応じて、比較されている配列の領域にわたって、例えば機能的ドメインにわたって存在してもよく、または代替的には、比較される2つの配列の全長にわたって存在してもよい。配列比較の場合、典型的には、一方の配列が、試験配列をそれに対して比較する参照配列としての役目を果たす。配列比較アルゴリズムを使用する場合、試験配列および参照配列をコンピュータに入力し、必要に応じて部分配列座標を指定し、配列アルゴリズムプログラムパラメータを指定する。その後、配列比較アルゴリズムにより、指定されているプログラムパラメータに基づいて、参照配列に対する試験配列の配列同一性パーセントが計算される。

30

## 【0077】

比較するための最適な配列アラインメントは、例えば、SmithおよびWaterman、Adv. Appl. Math. 2巻：482頁（1981年）の局所相同性アルゴリズムにより、NeedlemanおよびWunsch、J. Mol. Biol. 48巻：443頁（1970年）の相同性アラインメントアルゴリズムにより、PearsonおよびLipman、Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 85巻：2444頁（1988年）の類似性探索法（search for similarity method）により、これらのアルゴリズムのコンピュータ実装により（Wisconsin Genetics Software Package、Genetics Computer Group、575 Science Dr.、Madison、Wis. のGAP、BESTFIT、FASTA、およびTFASTA）、または目視検査により（一般に、Ausubelら、上記を参照）実施することができる。

40

## 【0078】

50

配列同一性パーセントおよび配列類似性パーセントを決定するのに適切なアルゴリズムの一例は、BLASTアルゴリズムであり、これは、Altschulら、J. Mol. Biol. 215巻：403～410頁（1990年）に記載されている。BLAST分析を実施するためのソフトウェアは、国立生物工学情報センターのウェブサイトから公的に利用可能である。【0079】

2つのヌクレオチド配列間の同一性パーセントは、NWsgapdna.CMPマトリクス、ならびに40、50、60、70、または80のギャップ重みおよび1、2、3、4、5、または6の長さ重みを使用するGCGソフトウェアパッケージ（<http://www.gcg.com>から入手可能）のGAPプログラムを使用して決定することができる。また、2つのヌクレオチド配列またはアミノ酸配列間の同一性パーセントは、PAM120重み残基表、ギャップ長ペナルティ12、およびギャップペナルティ4を使用するALIGNプログラム（バージョン2.0）に組み込まれているE. MeyersおよびW. Miller（CABIOS、4巻：11～17頁（1989年））のアルゴリズムを使用して、決定することができる。加えて、2つのアミノ酸配列間の同一性パーセントは、Blossum62マトリクスまたはPAM250マトリクスのいずれか、ならびに16、14、12、10、8、6、または4のギャップ重みおよび1、2、3、4、5、または6の長さ重みを使用するGCGソフトウェアパッケージ（<http://www.gcg.com>から入手可能）のGAPプログラムに組み込まれているNeedlemanおよびWunsch（J. Mol. Biol.（48巻）：444～453頁（1970年））のアルゴリズムを使用して決定することができる。

#### 【0080】

さらに、本開示の核酸配列およびタンパク質配列を、公開データベースの検索を実施するための「クエリー配列」として使用して、例えば、関連配列を特定することができる。そのような検索は、Altschulら（1990年）J. Mol. Biol. 215巻：403～10頁のNBLASTおよびXBLASTプログラム（バージョン2.0）を使用して実施することができる。NBLASTプログラムをスコア＝100、ワード長＝12で用いて、BLASTヌクレオチド検索を実施して、本発明の核酸分子に相同性のヌクレオチド配列を得ることができる。XBLASTプログラムをスコア＝50、ワード長＝3で用いて、BLASTタンパク質検索を実施して、本発明のタンパク質分子に相同性のアミノ配列を得ることができる。比較目的のギャップ付きアラインメントを得るためには、Gapped BLASTを、Altschulら（1997年）Nucleic Acids Res. 25巻（17号）：3389～3402頁に記載のように利用してもよい。BLASTプログラムおよびGapped BLASTプログラムを利用する場合、それぞれのプログラム（例えば、XBLASTおよびNBLAST）の初期設定パラメータを使用してもよい。<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>を参照されたい。

#### 【0081】

本明細書で使用される場合、「薬学的に許容される」は、健全な医学的判断の範囲内で、過度の毒性、刺激、アレルギー応答、または合理的なベネフィット/リスク比と釣り合う他の問題もしくは合併症を起こさず、ヒトおよび動物の組織、器官、および/または体液と接触させて使用するために適切である化合物、材料、組成物、および/または剤形を指す。

#### 【0082】

本明細書で使用される場合、「薬学的に許容される担体」は、生理学的に適合するありとあらゆる溶媒、分散媒、コーティング、抗菌剤および抗真菌剤、ならびに等張剤および吸収遅延剤などを指し、それらを含む。組成物としては、薬学的に許容される塩、例えば、酸付加塩または塩基付加塩を挙げることができる（例えば、Bergeら（1977年）J Pharm Sci 66巻：1～19頁を参照）。

#### 【0083】

本明細書で使用される場合、「配列番号（SEQ ID NO）」という用語は、「配列番号（Sequence ID No）」という用語と同義である。

## 【0084】

本明細書で使用される場合、「スモールRNA」とは、一般に長さ約200ヌクレオチド未満またはそれ未満であり、サイレンシングまたは干渉機能を持つノンコーディングRNAのことを指す。他の実施形態では、スモールRNAは、長さ約175ヌクレオチドもしくはそれ未満、約150ヌクレオチドもしくはそれ未満、約125ヌクレオチドもしくはそれ未満、約100ヌクレオチドもしくはそれ未満、または約75ヌクレオチドもしくはそれ未満である。そのようなRNAには、マイクロRNA(miRNA)、低分子干渉RNA(siRNA)、二本鎖RNA(dsRNA)、および短鎖ヘアピンRNA(shRNA)が含まれる。本開示の「スモールRNA」は、標的遺伝子mRNAの破壊をもたらす経路を一般に介して、標的遺伝子の遺伝子発現を阻害またはノックダウンすることが可能であるべきである。

10

## 【0085】

本明細書で使用される場合、「刺激性作用剤」という用語は、白血球を刺激することができる、あらゆる外因性作用剤を指す。

## 【0086】

本明細書で使用される場合、「対象」という用語は、ヒト患者を含むだけでなく、他の哺乳動物も含む。「対象」、「個体」、「宿主」、および「患者」という用語は、本明細書では交換可能に使用することができる。

## 【0087】

本明細書で使用される場合、「標的細胞」という用語は、一般に、HIV遺伝子配列を示すタンパク質またはペプチド断片を用いた刺激に応答するCD4+ T細胞を指し、CD4+ T細胞のHIVに対する感受性を低くする、本明細書で詳述されているレンチウイルスベクターを形質導入したCD4+ T細胞を含む。

20

## 【0088】

「治療有効量」という用語は、所定の不快、傷害、疾患、または状態に苦しんでいる患者に見られる症状、進行、または合併症の発症を処置または予防するのに適切な組成物における、および適切な剤形における、本発明の活性剤の十分な量を指す。治療有効量は、患者の状態またはその重篤度、および処置される対象の年齢、体重などに依存して変化するであろう。治療有効量は、例えば、投与経路、対象の状態、ならびに当業者によって理解される他の要因を含む、多くの要因のいずれかに依存して変化し得る。

30

## 【0089】

本明細書で使用される場合、「療法用ベクター」という用語は、AGT103ベクターなどのレンチウイルスベクターと同義である。

## 【0090】

「処置」または「処置する」という用語は、一般に、処置される対象の自然経過を変える試みにおける介入のことを指し、予防のためにかまたは臨床病理の経過の間のいずれかに実施することができる。望ましい効果は、疾患の発生または再発を予防すること、症状を緩和すること、疾患の任意の直接的もしくは間接的な病理学的帰結を抑制、減少、または阻害すること、疾患状態を改善または軽減すること、および寛解または予後の向上を引き起こすことを含むが、これらに限定されない。

40

## 【0091】

本開示の態様の説明

本明細書で詳述されているように、一態様では、対象のHIV感染を処置する方法が開示される。方法は、対象から白血球を取り出し、末梢血単核細胞(PBMC)を精製するステップを含む。方法は、ex vivoにおいて、PBMCを治療有効量の刺激性作用剤と接触させるステップ；ex vivoにおいて、少なくとも1つの遺伝子エレメントをコードするウイルス送達システムを用いてPBMCに形質導入するステップ；および形質導入されたPBMCを、少なくとも1日間培養するステップをさらに含む。方法は、例えば、PBMCをCD4+ T細胞に関して好ましくは濃縮することによる、PBMCのさらなる濃縮をさらに含んでもよい。形質導入されたPBMCは、約1～約35日間

50

培養されてもよい。方法は、形質導入された P B M C を対象に注入するステップをさらに含んでいてもよい。対象は、ヒトであってもよい。刺激性作用剤は、ペプチドまたはペプチドの混合物を含んでいてもよい。好ましい実施形態では、刺激性作用剤は、g a g ペプチドを含む。刺激性作用剤は、ワクチンを含んでいてもよい。ワクチンは、H I V ワクチンであってもよく、好ましい実施形態では、H I V ワクチンは、M V A / H I V 6 2 B ワクチンまたはそのバリエーションである。好ましい実施形態では、ウイルス送達システムは、レンチウイルス粒子を含む。一実施形態では、少なくとも 1 つの遺伝子エレメントは、ケモカイン受容体 C C R 5 の産生を阻害することができるスモール R N A、または H I V R N A 配列を標的とすることができる少なくとも 1 つのスモール R N A を含んでいてもよい。別の実施形態では、少なくとも 1 つの遺伝子エレメントは、ケモカイン受容体 C C R 5 の産生を阻害することができるスモール R N A、および H I V R N A 配列を標的とすることができる少なくとも 1 つのスモール R N A を含んでいてもよい。H I V R N A 配列は、H I V V i f 配列、H I V T a t 配列、またはそれらのバリエーションを含んでいてもよい。少なくとも 1 つの遺伝子エレメントは、マイクロ R N A または s h R N A を含んでいてもよい。好ましい実施形態では、少なくとも 1 つの遺伝子エレメントは、マイクロ R N A クラスターを含む。

10

【 0 0 9 2 】

別の態様では、少なくとも 1 つの遺伝子エレメントは、

【 化 2 2 】

AGGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCGACTGTAAACTGAGCTTGCTCTACTGTGAAG  
CCACAGATGGGTAGAGCAAGCACAGTTTACCGCTGCCTACTGCCTCGGACTTCAA  
GGGGCTT ( 配列番号 1)

20

と少なくとも 8 0 %、少なくとも 8 1 %、少なくとも 8 2 %、少なくとも 8 3 %、少なくとも 8 4 %、少なくとも 8 5 %、少なくとも 8 6 %、少なくとも 8 7 %、少なくとも 8 8 %、少なくとも 8 9 %、少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 1 %、少なくとも 9 2 %、少なくとも 9 3 %、少なくとも 9 4 %、少なくとも 9 5 %、またはそれよりも高い同一性パーセントを有するマイクロ R N A を含む。好ましい実施形態では、少なくとも 1 つの遺伝子エレメントは、

30

【 化 2 3 】

AGGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCGACTGTAAACTGAGCTTGCTCTACTGTGAAG  
CCACAGATGGGTAGAGCAAGCACAGTTTACCGCTGCCTACTGCCTCGGACTTCAA  
GGGGCTT ( 配列番号 1)

を含む。

【 0 0 9 3 】

別の態様では、少なくとも 1 つの遺伝子エレメントは、

【 化 2 4 】

CATCTCCATGGCTGTACCACCTTGTCGGGGGATGTGTACTTCTGAACTTGTGTTGA  
ATCTCATGGAGTTCAGAAGAACACATCCGCACTGACATTTTGGTATCTTTCATCTG  
ACCA ( 配列番号 2)

40

と少なくとも 8 0 %、もしくは少なくとも 8 5 %、もしくは少なくとも 9 0 %、もしくは少なくとも 9 5 % の同一性パーセントを有するか、または

50

## 【化 2 5】

GGGCCTGGCTCGAGCAGGGGGCGAGGGATTCCGCTTCTTCCTGCCATAGCGTGG  
TCCCCTCCCCTATGGCAGGCAGAAGCGGCACCTTCCCTCCCAATGACCGCGTCTTC  
GTCG ( 配列番号 3)

と少なくとも 8 0 %、少なくとも 8 1 %、少なくとも 8 2 %、少なくとも 8 3 %、少なくとも 8 4 %、少なくとも 8 5 %、少なくとも 8 6 %、少なくとも 8 7 %、少なくとも 8 8 %、少なくとも 8 9 %、少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 1 %、少なくとも 9 2 %、少なくとも 9 3 %、少なくとも 9 4 %、少なくとも 9 5 %もしくはそれよりも高い同一性パーセントを有するマイクロRNAを含む。好ましい実施形態では、少なくとも 1 つの遺伝子エレメントは、

10

## 【化 2 6】

CATCTCCATGGCTGTACCACCTTGTCGGGGGATGTGTACTTCTGAACTTGTGTTGA  
ATCTCATGGAGTTCAGAAGAACACATCCGCACTGACATTTTGGTATCTTTCATCTG  
ACCA ( 配列番号 2); または  
GGGCCTGGCTCGAGCAGGGGGCGAGGGATTCCGCTTCTTC  
CTGCCATAGCGTGGTCCCCTCCCCTATGGCAGGCAGAAGCGGCACCTTCCCTCCCA  
ATGACCGCGTCTTCGTCG ( 配列番号 3)

20

を含む。

## 【0 0 9 4】

別の態様では、マイクロRNAクラスターは、

## 【化 2 7】

AGGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCGACTGTAACTGAGCTTGCTCTACTGTGAAG  
CCACAGATGGGTAGAGCAAGCACAGTTTACCGCTGCCTACTGCCTCGGACTTCAA  
GGGGCTTCCCGGGCATCTCCATGGCTGTACCACCTTGTCGGGGGATGTGTACTTCT  
GAACTTGTGTTGAATCTCATGGAGTTCAGAAGAACACATCCGCACTGACATTTTGG  
TATCTTTCATCTGACCAGCTAGCGGGCCTGGCTCGAGCAGGGGGCGAGGGATTCC  
GCTTCTTCCTGCCATAGCGTGGTCCCCTCCCCTATGGCAGGCAGAAGCGGCACCTT  
CCCTCCCAATGACCGCGTCTTCGTC ( 配列番号 31)

30

と少なくとも 8 0 %、少なくとも 8 1 %、少なくとも 8 2 %、少なくとも 8 3 %、少なくとも 8 4 %、少なくとも 8 5 %、少なくとも 8 6 %、少なくとも 8 7 %、少なくとも 8 8 %、少なくとも 8 9 %、少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 1 %、少なくとも 9 2 %、少なくとも 9 3 %、少なくとも 9 4 %、少なくとも 9 5 %またはそれよりも高い同一性パーセントを有する配列を含む。好ましい実施形態では、マイクロRNAクラスターは、

40



【化 2 8】

AGGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCGACTGTAAACTGAGCTTGCTCT  
 ACTGTGAAGCCACAGATGGGTAGAGCAAGCACAGTTTACCGCTGCCTACTGCCTC  
 GGA CTTC AAGGGGCTTCCCGGGCATCTCCATGGCTGTACCACCTTGTCGGGGGATG  
 TGTACTTCTGAACCTTGTTGAATCTCATGGAGTTCAGAAGAACACATCCGCACTG  
 ACATTTTGGTATCTTTCATCTGACCAGCTAGCGGGCCTGGCTCGAGCAGGGGGGCGA  
 GGGATTCCGCTTCTTCCTGCCATAGCGTGGTCCCCTCCCCTATGGCAGGCAGAAGC  
 GGCACCTTCCCCTCCCAATGACCGCGTCTTCGTC ( 配列番号 31)

10

を含む。

【 0 0 9 5】

別の態様では、H I Vに感染した細胞を処置する方法が提供される。方法は、H I Vに感染した対象から単離された末梢血単核細胞 ( P B M C ) を、治療有効量の刺激性作用剤と接触させるステップであって、接触が e x v i v oで実施されるステップ ; e x v i v oにおいて、少なくとも1つの遺伝子エレメントをコードするウイルス送達システムを用いて P B M Cに形質導入するステップ ; および形質導入された P B M Cを、少なくとも1日間培養するステップを含む。形質導入された P B M Cは、約1 ~ 約35日間培養されてもよい。方法は、形質導入された P B M Cを対象に注入するステップをさらに含んでもよい。対象は、ヒトであってもよい。刺激性作用剤は、ペプチドまたはペプチドの混合物を含んでもよく、好ましい実施形態では、g a gペプチドを含む。刺激性作用剤は、ワクチンを含んでもよい。ワクチンは、H I Vワクチンであってもよく、好ましい実施形態では、H I Vワクチンは、M V A / H I V 6 2 B ワクチンまたはそのバリエーションである。好ましい実施形態では、ウイルス送達システムは、レンチウイルス粒子を含む。一実施形態では、少なくとも1つの遺伝子エレメントは、ケモカイン受容体 C C R 5 の産生を阻害することができるスモールRNA、またはH I V RNA配列を標的とすることができる少なくとも1つのスモールRNAを含んでもよい。別の実施形態では、少なくとも1つの遺伝子エレメントは、ケモカイン受容体 C C R 5 の産生を阻害することができるスモールRNA、およびH I V RNA配列を標的とすることができる少なくとも1つのスモールRNAを含んでもよい。H I V RNA配列は、H I V V i f 配列、H I V T a t 配列、またはそれらのバリエーションを含んでもよい。少なくとも1つの遺伝子エレメントは、マイクロRNAまたはs h RNAを含んでもよい。好ましい実施形態では、少なくとも1つの遺伝子エレメントは、マイクロRNAクラスターを含む。

20

30

【 0 0 9 6】

別の態様では、少なくとも1つの遺伝子エレメントは、

【化 2 9】

AGGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCGACTGTAAACTGAGCTTGCTCTACTGTGAAG  
 CCACAGATGGGTAGAGCAAGCACAGTTTACCGCTGCCTACTGCCTCGGACTTCAA  
 GGGGCTT ( 配列番号 1)

40

と少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、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%またはそれよりも高い同一性パーセントを有するマイクロRNAを含む。好ましい実施形態では、少なくとも1つの遺伝子エレメントは、

50

【化 3 0】

AGGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCGACTGTAAACTGAGCTTGCTCTACTGTGAAG  
CCACAGATGGGTAGAGCAAGCACAGTTTACCGCTGCCTACTGCCTCGGACTTCAA  
GGGGCTT ( 配列番号 1)

を含む。

【 0 0 9 7】

別の態様では、少なくとも 1 つの遺伝子エレメントは、

【化 3 1】

CATCTCCATGGCTGTACCACCTTGTTCGGGGGATGTGTACTTCTGAACTTGTGTTGA  
ATCTCATGGAGTTCAGAAGAACACATCCGCACTGACATTTTGGTATCTTTCATCTG  
ACCA ( 配列番号 2)

と少なくとも 8 0 %、少なくとも 8 1 %、少なくとも 8 2 %、少なくとも 8 3 %、少なく  
とも 8 4 %、少なくとも 8 5 %、少なくとも 8 6 %、少なくとも 8 7 %、少なくとも 8 8  
%、少なくとも 8 9 %、少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 1 %、少なくとも 9 2 %、少な  
くとも 9 3 %、少なくとも 9 4 %、少なくとも 9 5 %、もしくはそれよりも高い同一性パ  
ーセントを有するか、または

【化 3 2】

GGGCCTGGCTCGAGCAGGGGGCGAGGGATTCCGCTTCTTCCTGCCATAGCGTGG  
TCCCCTCCCCTATGGCAGGCAGAAGCGGCACCTTCCCTCCCAATGACCGCGTCTTC  
GTCG ( 配列番号 3)

と少なくとも 8 0 %、少なくとも 8 1 %、少なくとも 8 2 %、少なくとも 8 3 %、少なく  
とも 8 4 %、少なくとも 8 5 %、少なくとも 8 6 %、少なくとも 8 7 %、少なくとも 8 8  
%、少なくとも 8 9 %、少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 1 %、少なくとも 9 2 %、少な  
くとも 9 3 %、少なくとも 9 4 %、少なくとも 9 5 %、もしくはそれよりも高い同一性パ  
ーセントを有するマイクロ RNA を含む。好ましい実施形態では、少なくとも 1 つの遺伝  
子エレメントは、

【化 3 3】

CATCTCCATGGCTGTACCACCTTGTTCGGGGGATGTGTACTTCTGAACTTGTGTTGA  
ATCTCATGGAGTTCAGAAGAACACATCCGCACTGACATTTTGGTATCTTTCATCTG  
ACCA ( 配列番号 2); または  
GGGCCTGGCTCGAGCAGGGGGCGAGGGATTCCGCTTCTTC  
CTGCCATAGCGTGGTCCCCTCCCCTATGGCAGGCAGAAGCGGCACCTTCCCTCCCA  
ATGACCGCGTCTTCGTCG ( 配列番号 3)

を含む。

【 0 0 9 8】

別の態様では、マイクロ RNA クラスターは、

10

20

30

40

50

## 【化 3 4】

AGGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCGACTGTAAACTGAGCTTGCTCTACTGTGAAG  
 CCACAGATGGGTAGAGCAAGCACAGTTTACCGCTGCCTACTGCCTCGGACTTCAA  
 GGGGCTTCCCGGGCATCTCCATGGCTGTACCACCTTGTCGGGGGATGTGTACTTCT  
 GAACTTGTGTTGAATCTCATGGAGTTCAGAAGAACACATCCGCACTGACATTTTGG  
 TATCTTTCATCTGACCAGCTAGCGGGCCTGGCTCGAGCAGGGGGCGAGGGATTCC  
 GCTTCTTCCTGCCATAGCGTGGTCCCCTCCCCTATGGCAGGCAGAAGCGGCACCTT  
 CCTCCCAATGACCGCGTCTTCGTC ( 配列番号 31)

10

と少なくとも 80%、少なくとも 81%、少なくとも 82%、少なくとも 83%、少なく  
 とも 84%、少なくとも 85%、少なくとも 86%、少なくとも 87%、少なくとも 88  
 %、少なくとも 89%、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%、またはそれよりも高い同一性パー  
 セントを有する配列を含む。好ましい実施形態では、マイクロ RNA クラスタは、

## 【化 3 5】

AGGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCGACTGTAAACTGAGCTTGCTCT  
 ACTGTGAAGCCACAGATGGGTAGAGCAAGCACAGTTTACCGCTGCCTACTGCCTC  
 GGACTTCAAGGGGCTTCCCGGGCATCTCCATGGCTGTACCACCTTGTCGGGGGATG  
 TGTACTTCTGAACTTGTGTTGAATCTCATGGAGTTCAGAAGAACACATCCGCACTG  
 ACATTTTGGTATCTTTCATCTGACCAGCTAGCGGGCCTGGCTCGAGCAGGGGGCGA  
 GGGATTCCGCTTCTTCCTGCCATAGCGTGGTCCCCTCCCCTATGGCAGGCAGAAGC  
 GGCACCTTCCCCTCCCAATGACCGCGTCTTCGTC ( 配列番号 31)

20

を含む。

## 【0099】

別の態様では、レンチウイルスベクターが開示される。レンチウイルスベクターは、少  
 なくとも 1つのコードされた遺伝子エレメントを含み、少なくとも 1つのコードされた遺  
 伝子エレメントは、ケモカイン受容体 CCR5 の産生を阻害することができるスモール R  
 NA、または HIV RNA 配列を標的とすることができる少なくとも 1つのスモール R  
 NAを含む。別の態様では、少なくとも 1つのコードされた遺伝子エレメントが、ケモカ  
 イン受容体 CCR5 の産生を阻害することができるスモール RNA、および HIV RNA  
 配列を標的とすることができる少なくとも 1つのスモール RNAを含む、レンチウイル  
 スベクターが開示される。HIV RNA 配列は、HIV Vif 配列、HIV Tat 配  
 列、またはそれらの改変体を含んでいてもよい。少なくとも 1つのコードされた遺伝子エ  
 レメントは、マイクロ RNA または shRNA を含んでいてもよい。少なくとも 1つのコ  
 ードされた遺伝子エレメントは、マイクロ RNA クラスタを含んでいてもよい。

30

40

## 【0100】

別の態様では、少なくとも 1つの遺伝子エレメントは、

## 【化 3 6】

AGGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCGACTGTAAACTGAGCTTGCTCTACTGTGAAG  
 CCACAGATGGGTAGAGCAAGCACAGTTTACCGCTGCCTACTGCCTCGGACTTCAA  
 GGGGCTT ( 配列番号 1)

と少なくとも 80%、少なくとも 81%、少なくとも 82%、少なくとも 83%、少なく  
 とも 84%、少なくとも 85%、少なくとも 86%、少なくとも 87%、少なくとも 88

50

%、少なくとも89%、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%、またはそれよりも高い同一性パーセントを有するマイクロRNAを含む。好ましい実施形態では、少なくとも1つの遺伝子エレメントは、

【化37】

AGGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCGACTGTAAACTGAGCTTGCTCTACTGTGAAG  
CCACAGATGGGTAGAGCAAGCACAGTTTACCGCTGCCTACTGCCTCGGACTTCAA  
GGGGCTT ( 配列番号 1)

10

を含む。

【0101】

別の態様では、少なくとも1つの遺伝子エレメントは、

【化38】

CATCTCCATGGCTGTACCACCTTGTCGGGGGATGTGTACTTCTGAACTTGTGTTGA  
ATCTCATGGAGTTCAGAAGAACACATCCGCACTGACATTTTGGTATCTTTCATCTG  
ACCA ( 配列番号 2)

と少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、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%、もしくはそれよりも高い同一性パーセントを有するか、または

20

【化39】

GGGCCTGGCTCGAGCAGGGGGCGAGGGATTCCGCTTCTTCCTGCCATAGCGTGG  
TCCCCTCCCCTATGGCAGGCAGAAGCGGCACCTTCCCTCCCAATGACCGCGTCTTC  
GTCG ( 配列番号 3)

30

と少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、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%、もしくはそれよりも高い同一性パーセントを有するマイクロRNAを含む。好ましい実施形態では、少なくとも1つの遺伝子エレメントは、

【化40】

CATCTCCATGGCTGTACCACCTTGTCGGGGGATGTGTACTTCTGAACTTGTGTTGA  
ATCTCATGGAGTTCAGAAGAACACATCCGCACTGACATTTTGGTATCTTTCATCTG  
ACCA ( 配列番号 2); または  
GGGCCTGGCTCGAGCAGGGGGCGAGGGATTCCGCTTCTTC  
CTGCCATAGCGTGGTCCCCTCCCCTATGGCAGGCAGAAGCGGCACCTTCCCTCCCA  
ATGACCGCGTCTTCGTCG ( 配列番号 3)

40

を含む。

【0102】

別の態様では、マイクロRNAクラスターは、

50

## 【化 4 1】

AGGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCGACTGTAAACTGAGCTTGCTCTACTGTGAAG  
 CCACAGATGGGTAGAGCAAGCACAGTTTACCGCTGCCTACTGCCTCGGACTTCAA  
 GGGGCTTCCCGGGCATCTCCATGGCTGTACCACCTTGTCGGGGGATGTGTACTTCT  
 GAACTTGTGTTGAATCTCATGGAGTTCAGAAGAACACATCCGCACTGACATTTTGG  
 TATCTTTCATCTGACCAGCTAGCGGGCCTGGCTCGAGCAGGGGGCGAGGGATTCC  
 GCTTCTTCCTGCCATAGCGTGGTCCCCTCCCCTATGGCAGGCAGAAGCGGCACCTT  
 CCCTCCCAATGACCGCGTCTTCGTC ( 配列番号 31)

10

と少なくとも 8 0 %、少なくとも 8 1 %、少なくとも 8 2 %、少なくとも 8 3 %、少なく  
 とも 8 4 %、少なくとも 8 5 %、少なくとも 8 6 %、少なくとも 8 7 %、少なくとも 8 8  
 %、少なくとも 8 9 %、少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 1 %、少なくとも 9 2 %、少な  
 くとも 9 3 %、少なくとも 9 4 %、少なくとも 9 5 %、またはそれよりも高い同一性パー  
 セントを有する配列を含む。好ましい実施形態では、マイクロ RNA クラスターは、

## 【化 4 2】

AGGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCGACTGTAAACTGAGCTTGCTCT  
 ACTGTGAAGCCACAGATGGGTAGAGCAAGCACAGTTTACCGCTGCCTACTGCCTC  
 GGACTTCAAGGGGCTTCCCGGGCATCTCCATGGCTGTACCACCTTGTCGGGGGATG  
 TGTACTTCTGAACTTGTGTTGAATCTCATGGAGTTCAGAAGAACACATCCGCACTG  
 ACATTTTGGTATCTTTCATCTGACCAGCTAGCGGGCCTGGCTCGAGCAGGGGGCGA  
 GGGATTCCGCTTCTTCCTGCCATAGCGTGGTCCCCTCCCCTATGGCAGGCAGAAGC  
 GGCACCTTCCCTCCCAATGACCGCGTCTTCGTC ( 配列番号 31)

20

を含む。

## 【0103】

別の態様では、レンチウイルス粒子を発現するためのレンチウイルスベクターシステム  
 が開示される。システムは、本明細書に記載のようなレンチウイルスベクター；細胞への  
 感染が最適化されているエンベロープタンパク質を発現するためのエンベローププラスミ  
 ド；ならびに gag、pol、および rev 遺伝子を発現するための少なくとも 1 つのヘル  
 パープラスミドを含み、レンチウイルスベクター、エンベローププラスミド、および少  
 なくとも 1 つのヘルパープラスミドがパッケージング細胞株にトランスフェクトされると  
 、パッケージング細胞株によってレンチウイルス粒子が産生され、レンチウイルス粒子は  
 、ケモカイン受容体 CCR5 の産生を阻害することができるかまたは HIV RNA 配列  
 を標的とすることができる。

30

## 【0104】

別の態様では、細胞に感染することができるレンチウイルス粒子が開示される。レンチ  
 ウイルス粒子は、細胞への感染が最適化されたエンベロープタンパク質、および本明細書  
 に記載のようなレンチウイルスベクターを含む。エンベロープタンパク質は、T 細胞への  
 感染のために最適化されていてもよい。好ましい実施形態では、エンベロープタンパク質  
 は、CD4 + T 細胞への感染のために最適化されている。

40

## 【0105】

別の態様では、改変細胞が開示される。改変細胞は、CD4 + T 細胞を含み、CD4 +  
 T 細胞は、本明細書に記載のようなレンチウイルス粒子に感染している。好ましい実施形  
 態では、CD4 + T 細胞は、HIV 抗原もまた認識する。さらに好ましい実施形態では  
 、HIV 抗原は、gag 抗原を含む。さらに好ましい実施形態では、CD4 + T 細胞は  
 、レンチウイルス粒子による感染後に、減少したレベルの CCR5 を発現する。

50

## 【 0 1 0 6 】

別の態様では、治療処置レジメンのために対象を選択する方法が開示される。方法は、対象から白血球を取り出し、末梢血単核細胞（P B M C）を精製し、P B M Cに関連する少なくとも1つの因子に関連する第1の定量化可能な測定値を決定するステップ；*e x v i v o*において、P B M Cを、治療有効量の第2の刺激性作用剤と接触させ、P B M Cに関連する少なくとも1つの因子に関連する第2の測定値を決定するステップを含み、第2の定量化可能な測定値が、第1の定量化可能な測定値よりも高い場合、対象が、処置レジメンのために選択される。少なくとも1つの因子は、T細胞増殖またはI F Nガンマ産生であってもよい。

## 【 0 1 0 7 】

10

別の態様では、本明細書に記載されているH I Vに感染した細胞を処置することを含む方法のいずれかは、P B M Cから細胞の少なくとも1つのサブセットを枯渇させるステップをさらに含む。実施形態では、方法は、P B M Cから細胞の少なくとも1つのサブセットを枯渇させるステップを含み、細胞の少なくとも1つのサブセットは、C D 8 + T細胞、細胞、N K細胞、B細胞、好中球、好塩基球、好酸球、調節性T細胞、N K T細胞、および赤血球の任意の1つまたは複数を含む。実施形態では、枯渇させるステップは、白血球を取り出した後に行われる。実施形態では、枯渇させるステップは、白血球を取り出すのと同じに行われる。

## 【 0 1 0 8 】

20

他の態様では、本明細書に記載されている対象のH I Vを処置することを含む方法のいずれかは、P B M Cから細胞の少なくとも1つのサブセットを枯渇させるステップをさらに含む。実施形態では、方法は、P B M Cから細胞の少なくとも1つのサブセットを枯渇させるステップを含み、細胞の少なくとも1つのサブセットは、C D 8 + T細胞、細胞、N K細胞、B細胞、好中球、好塩基球、好酸球、調節性T細胞、N K T細胞、および赤血球の任意の1つまたは複数を含む。実施形態では、枯渇させるステップは、白血球を取り出した後に行われる。実施形態では、枯渇させるステップは、白血球を取り出すのと同じに行われる。

## 【 0 1 0 9 】

30

別の態様では、本明細書に記載されている処置レジメンのために対象を選択することを含む方法のいずれかは、P B M Cから細胞の少なくとも1つのサブセットを枯渇させるステップをさらに含む。実施形態では、方法は、P B M Cから細胞の少なくとも1つのサブセットを枯渇させるステップを含み、細胞の少なくとも1つのサブセットは、C D 8 + T細胞、細胞、N K細胞、B細胞、好中球、好塩基球、好酸球、調節性T細胞、N K T細胞、および赤血球の任意の1つまたは複数を含む。実施形態では、枯渇させるステップは、白血球を取り出した後に行われる。実施形態では、枯渇させるステップは、白血球を取り出すのと同じに行われる。

## 【 0 1 1 0 】

40

別の態様では、本明細書に記載されている方法のいずれかは、P B M Cから免疫細胞の少なくとも1つのサブセットを枯渇させるステップをさらに含み、細胞の少なくとも1つのサブセットは、C D 8 + T細胞、細胞、N K細胞、B細胞、好中球、好塩基球、好酸球、調節性T細胞、N K T細胞、および赤血球の任意の1つまたは複数を含む。実施形態では、P B M Cから枯渇される細胞は、C D 8 + T細胞である。実施形態では、P B M Cから枯渇される細胞は、細胞である。実施形態では、P B M Cから枯渇される細胞は、N K細胞である。実施形態では、P B M Cから枯渇される細胞は、B細胞である。実施形態では、P B M Cから枯渇される細胞は、調節性T細胞である。実施形態では、P B M Cから枯渇される細胞は、N K T細胞である。実施形態では、P B M Cから枯渇される細胞は、赤血球である。実施形態では、P B M Cから枯渇される細胞は、C D 8 + T細胞および細胞である。実施形態では、P B M Cから枯渇される細胞は、C D 8 + T細胞、細胞、およびN K細胞である。実施形態では、P B M Cから枯渇される細胞は、C D 8 + T細胞、細胞、N K細胞、およびB細胞である。実施形態では、P B

50

M C から枯渇される細胞は、C D 8 + T 細胞、細胞、N K 細胞、B 細胞、および調節性 T 細胞である。実施形態では、P B M C から枯渇される細胞は、C D 8 + T 細胞、細胞、N K 細胞、B 細胞、調節性 T 細胞、および N K T 細胞である。実施形態では、P B M C から枯渇される細胞は、C D 8 + T 細胞、細胞、N K 細胞、B 細胞、調節性 T 細胞、N K T 細胞、および赤血球である。実施形態では、P B M C から枯渇される細胞は、細胞および N K 細胞である。実施形態では、P B M C から枯渇される細胞は、細胞、N K 細胞、および B 細胞である。実施形態では、P B M C から枯渇される細胞は、細胞、N K 細胞、B 細胞、および調節性 T 細胞である。実施形態では、P B M C から枯渇される細胞は、細胞、N K 細胞、B 細胞、調節性 T 細胞、および N K T 細胞である。実施形態では、P B M C から枯渇される細胞は、細胞、N K 細胞、B 細胞、調節性 T 細胞、および N K T 細胞である。実施形態では、P B M C から枯渇される細胞は、N K 細胞、B 細胞、および調節性 T 細胞である。実施形態では、P B M C から枯渇される細胞は、N K 細胞、B 細胞、調節性 T 細胞、および N K T 細胞である。実施形態では、P B M C から枯渇される細胞は、N K 細胞、B 細胞、調節性 T 細胞、N K T 細胞、および赤血球である。実施形態では、P B M C から枯渇される細胞は、B 細胞および調節性 T 細胞である。実施形態では、P B M C から枯渇される細胞は、B 細胞、調節性 T 細胞、および N K T 細胞である。実施形態では、P B M C から枯渇される細胞は、B 細胞、調節性 T 細胞、N K T 細胞、および赤血球である。実施形態では、P B M C から枯渇される細胞は、調節性 T 細胞および N K T 細胞である。実施形態では、P B M C から枯渇される細胞は、調節性 T 細胞、N K T 細胞、および赤血球である。実施形態では、P B M C から枯渇される細胞は、N K T 細胞および赤血球である。実施形態では、P B M C から枯渇される細胞は、C D 8 + T 細胞および N K 細胞である。実施形態では、P B M C から枯渇される細胞は、C D 8 + T 細胞、N K 細胞、および B 細胞である。実施形態では、P B M C から枯渇される細胞は、C D 8 + T 細胞、N K 細胞、B 細胞、および調節性 T 細胞である。実施形態では、P B M C から枯渇される細胞は、C D 8 + T 細胞、N K 細胞、B 細胞、調節性 T 細胞、および N K T 細胞である。実施形態では、P B M C から枯渇される細胞は、C D 8 + T 細胞、N K 細胞、B 細胞、調節性 T 細胞、N K T 細胞、および赤血球である。実施形態では、P B M C から枯渇される細胞は、および B 細胞である。実施形態では、P B M C から枯渇される細胞は、B 細胞、および調節性 T 細胞である。実施形態では、P B M C から枯渇される細胞は、B 細胞、調節性 T 細胞、および N K T 細胞である。実施形態では、P B M C から枯渇される細胞は、B 細胞、調節性 T 細胞、N K T 細胞、および赤血球である。実施形態では、P B M C から枯渇される細胞は、B 細胞、N K T 細胞、および赤血球である。実施形態では、P B M C から枯渇される細胞は、調節性 T 細胞および赤血球である。実施形態では、本明細書に記載のように、P B M C から枯渇される細胞は、好中球、好塩基球、および好酸球のいずれか 1 つまたはそれらの任意の組合せを含む。

【 0 1 1 1 】

別の態様では、C D 8 + T 細胞は、C D 4 + T 細胞増殖を改善するために、細胞増殖の開始時に枯渇される。実施形態では、細胞枯渇は、細胞が機械的ストレスによりよく耐えることができる、ペプチド刺激の後かつレンチウイルス形質導入の前に実施される。実施形態では、C D 8 + T 細胞枯渇の後、細胞は、およそ 2 4 時間にわたって培養培地中に置かれる。実施形態では、C D 8 + 細胞枯渇の後、細胞は、2 4 時間未満、例えば、2 0 時間未満、1 6 時間未満、8 時間未満、または 4 時間未満にわたって培養物中に置かれる。実施形態では、C D 8 + T 細胞枯渇の後、細胞は、2 4 時間よりも長い時間、例えば、3 0 時間よりも長い時間、3 6 時間よりも長い時間、4 2 時間よりも長い時間、また

10

20

30

40

50

は48時間よりも長い時間にわたって培養物中に置かれる。実施形態では、培養培地は、IL-7を含む。実施形態では、培養培地は、IL-15を含む。実施形態では、培養培地は、IL-7およびIL-15を含む。実施形態では、細胞枯渇は、ペプチド刺激の前に実施される。実施形態では、gagタンパク質が、ペプチド刺激を引き起こすために使用される。実施形態では、HIVワクチンが、ペプチド刺激を引き起こすために使用される。実施形態では、ワクチンは、ペプチド刺激を引き起こすために使用されるMVA/HIV62Bワクチンである。実施形態では、CD8+ T細胞は、PE抗ヒトCD8抗体および抗PEマイクロビーズを用いて枯渇される。実施形態では、CD8抗体は、抗ラット抗体である。実施形態では、CD8抗体は、抗マウス抗体である。実施形態では、CD8抗体は、抗ウサギ抗体である。実施形態では、CD8抗体は、抗ヤギ抗体である。実施形態では、細胞枯渇およびペプチド刺激の後、細胞が形質導入される。実施形態では、細胞は、レンチウイルスを用いて形質導入される。実施形態では、レンチウイルスは、GFPを有する。実施形態では、レンチウイルスは、RFPを有する。実施形態では、レンチウイルスは、EGFPを有する。実施形態では、細胞は、形質導入後培養物中に置かれる。実施形態では、培養培地は、IL-7を含む。実施形態では、培養培地は、IL-15を含む。実施形態では、培養培地は、IL-7およびIL-15を含む。実施形態では、細胞は、CD4+ T細胞増殖を可能にするためにおよそ2日間にわたって培養される。実施形態では、細胞は、CD4+ T細胞増殖を可能にするためにおよそ3日間にわたって培養される。実施形態では、細胞は、2日間未満、例えば、42時間未満、36時間未満、30時間未満、24時間未満、18時間未満、12時間未満、または6時間未満にわたって培養される。実施形態では、細胞は、3日間よりも長い時間、例えば、4日間よりも長い時間、5日間よりも長い時間、6日間よりも長い時間、7日間よりも長い時間、8日間よりも長い時間、9日間よりも長い時間、または10日間よりも長い時間にわたって培養される。実施形態では、細胞は、2日間から3日間の間、例えば、およそ30時間、およそ36時間、またはおよそ42時間培養される。

#### 【0112】

別の態様では、CD8+、NK、またはB細胞が、CD4+ T細胞増殖を改善するために枯渇される。実施形態では、CD8+、NK、およびB細胞の任意の2つまたはそれよりも多くが、CD4+ T細胞増殖を改善するために枯渇される。実施形態では、CD8+、NK、B、調節性T、NKT、または赤血球細胞が、CD4+ T細胞増殖を改善するために枯渇される。実施形態では、CD8+、NK、B、調節性T、NKT、および赤血球細胞の任意の2つまたはそれよりも多くが、CD4+ T細胞増殖を改善するために枯渇される。実施形態では、細胞枯渇は、ペプチド刺激の後かつレンチウイルス形質導入の前に実施される。実施形態では、細胞枯渇の後、細胞は、約24時間にわたって培養培地中に置かれる。実施形態では、細胞枯渇の後、細胞は、24時間未満、例えば、20時間未満、16時間未満、8時間未満、または4時間未満にわたって培養物中に置かれる。実施形態では、CD8+ T細胞枯渇の後、細胞は、24時間よりも長い時間、例えば、30時間よりも長い時間、36時間よりも長い時間、42時間よりも長い時間、または48時間よりも長い時間にわたって培養物中に置かれる。実施形態では、培養培地は、IL-7を含む。実施形態では、培養培地は、IL-15を含む。実施形態では、培養培地は、IL-7およびIL-15を含む。実施形態では、細胞枯渇は、ペプチド刺激の前に実施される。実施形態では、gagタンパク質が、ペプチド刺激を引き起こすために使用される。実施形態では、HIVワクチンが、ペプチド刺激を引き起こすために使用される。実施形態では、MVA/HIV62Bワクチンが、ペプチド刺激を引き起こすために使用される。実施形態では、CD8+ T、NK、および/またはB細胞は、PE標識された特異的抗体および抗PEマイクロビーズを用いて枯渇される。実施形態では、使用される抗体は、抗ヒト抗体である。実施形態では、使用される抗体は、抗ラット抗体であった。実施形態では、使用される抗体は、抗マウス抗体である。実施形態では、使用される抗体は、抗ヤギ抗体である。実施形態では、細胞枯渇およびペプチド刺激の後、細胞が形質導入される。実施形態では、細胞は、レンチウイルスを用

10

20

30

40

50



いて形質導入される。実施形態では、レンチウイルスは、GFPを有する。実施形態では、レンチウイルスは、RFPを有する。実施形態では、レンチウイルスは、EGFPを有する。実施形態では、細胞は、形質導入後培養物中に置かれる。実施形態では、培養培地は、IL-7を含む。実施形態では、培養培地は、IL-15を含む。実施形態では、培養培地は、IL-7およびIL-15を含む。実施形態では、細胞は、CD4+ T細胞増殖を可能にするためにおよそ2日間にわたって培養される。実施形態では、細胞は、CD4+ T細胞増殖を可能にするために約3日間にわたって培養される。実施形態では、細胞は、2日間未満、例えば、42時間未満、36時間未満、30時間未満、24時間未満、18時間未満、12時間未満、または6時間未満にわたって培養される。実施形態では、細胞は、3日間よりも長い時間、例えば、4日間よりも長い時間、5日間よりも長い時間、6日間よりも長い時間、7日間よりも長い時間、8日間よりも長い時間、9日間よりも長い時間、または10日間よりも長い時間にわたって培養される。実施形態では、細胞は、2日間から3日間の間、例えば、約30時間、約36時間、または約42時間培養される。

10

#### 【0113】

別の態様では、レンチウイルスは、形質導入効率を測定するために使用されるGFPを含む。実施形態では、レンチウイルスは、RFPを含む。実施形態では、レンチウイルスは、EGFPを有している。実施形態では、サイトカイン捕捉システムが、GFP陽性細胞を用いて抗原特異的CD4+ T細胞を識別するために使用される。実施形態では、GFPが、形質導入された細胞サブセットを識別するために使用される。実施形態では、RFPが、形質導入された細胞サブセットを識別するために使用される。実施形態では、EGFPが、形質導入された細胞サブセットを識別するために使用される。実施形態では、本明細書に記載されている形質導入法のいずれかが、形質導入効率を測定するために使用され得る。実施形態では、レンチウイルス形質導入の前に、本明細書に記載されている枯渇法のいずれかが、CD8+ T、NK、B、好中球、好塩基球、好酸球、調節性T、NKT、および赤血球細胞の任意の1つまたは複数を枯渇させるために使用され得る。

20

#### 【0114】

他の態様では、形質導入効率は、qPCRによってベクターコピー数(VCN)を検出することによって測定される。実施形態では、最終細胞産物中のVCNに基づく形質導入された細胞のパーセンテージは、形質導入された細胞とVCNとの関係を確立することによって推定できる。実施形態では、GFPを有するレンチウイルスが、形質導入された細胞のパーセンテージを決定するために使用される。実施形態では、RFPを有するレンチウイルスが、形質導入された細胞のパーセンテージを決定するために使用される。実施形態では、EGFPを有するレンチウイルスが、形質導入された細胞のパーセンテージを決定するために使用される。実施形態では、本明細書に記載されている形質導入法のいずれかが、形質導入効率を測定するために使用され得る。実施形態では、レンチウイルス形質導入の前に、本明細書に記載されている枯渇法のいずれかが、CD8+ T、NK、B細胞の任意の1つまたは複数を枯渇させるために使用され得る。

30

#### 【0115】

ヒト免疫不全ウイルス(HIV)

40

一般に「HIV」とも呼ばれるヒト免疫不全ウイルスは、ヒトにおいて後天性免疫不全症候群(AIDS)を引き起こすレトロウイルスである。AIDSは、免疫システムの進行性の不全により、生命を脅かす日和見感染症およびがんが猛威を振るう状態である。処置なくしては、HIV感染後の平均生存期間は、HIVサブタイプに依存して9~11年と推測される。HIV感染は、血液、精液、膿液、前射精液、唾液、涙液、リンパ液もしくは脳脊髄液、または母乳を含むがそれらに限定されない体液の移入によって起きる。HIVは、感染した個体内に、遊離ウイルス粒子および感染した免疫細胞内の両方として、存在し得る。

#### 【0116】

HIVは、ヘルパーT細胞のようなヒト免疫システムの生体細胞に感染するが、指向性

50

はH I Vサブタイプ内で様々である可能性がある。H I V感染に特異的に感受性であり得る免疫細胞には、C D 4 + T細胞、マクロファージ、および樹状細胞が含まれるが、これらに限定されない。H I V感染は、未感染バースタンダー細胞のアポトーシス、感染細胞の直接的なウイルス死滅、および感染細胞を認識するC D 8細胞傷害性リンパ球による感染C D 4 + T細胞の死滅を含むが、これに限定されない数多くのメカニズムにより、C D 4 + T細胞のレベルの低下をもたらす。C D 4 + T細胞数が臨界レベル以下に低下すると、細胞性免疫が失われ、身体が日和見感染症およびがん、進行性で、より感受性となる。

#### 【0117】

構造的に、H I Vは他の多くのレトロウイルスとは異なる。RNAゲノムは、19個のタンパク質をコードする、少なくとも7つの構造的ランドマーク(LTR、TAR、RRE、PE、SLIP、CRS、およびINS)および少なくとも9つの遺伝子(gag、pol、env、tat、rev、nef、vif、vpr、vpu、時にはtat、env、およびrevの融合物である10番目のtev)からなる。これらの遺伝子の3つのgag、pol、およびenvには、新しいウイルス粒子の構造タンパク質を作るために必要な情報が含まれている。

10

#### 【0118】

H I Vは主にC D 4 T細胞において複製し、宿主免疫を低下させる細胞破壊または調節不全を引き起こす。H I Vは、組み込まれたプロウイルスとして感染を確立し、特定の細胞におけるウイルス発現が、その細胞に影響を及ぼす細胞病理のレベルまたは宿主免疫システムによる検出のレベル未満にまで低下する、潜伏感染状態に移行する可能性があるため、H I Vは処置が困難であり、長期間の高活性抗レトロウイルス療法(HAART)の後でさえも根絶されていない。生存期間はHAARTによって延長される場合があるが、ほとんどの場合、H I V感染は致命的な疾患を引き起こす。

20

#### 【0119】

H I Vとの戦いにおける主な目標は、疾患を治癒するための戦略を開発することである。延長されたHAARTはこの目標の達成には至っていないので、研究者は代替手順に目を向けている。(感染が起きた後にワクチンを使用する)療法的免疫化によって宿主免疫を改善するための初期の努力は、わずかな程度であるかまたはインパクトがなかった。同様に、処置の強化は中程度のインパクトであるかまたはインパクトがなかった。

30

#### 【0120】

遺伝子治療を用いることで、いくらかの進歩がみられたが、ポジティブな結果は孤発性であり、宿主細胞へのウイルスの侵入に重要な役割を果たすCCR5(ケモカイン受容体)をコードする遺伝子の一方または両方の対立遺伝子に欠損を有するまれなヒトの間でのみ見出された。しかしながら、多くの研究者は、遺伝子治療が最終的にH I V治癒を達成するための最高の将来性を持っていると楽観的である。

#### 【0121】

本明細書に開示されるように、本発明の方法および組成物は、身体からのすべてのH I Vの完全な根絶を含んでも含まなくてもよい機能的治癒を達成することができる。上記で言及されているように、機能的治癒は、以前にHAARTを必要としていたH I V + 個体が、低いもしくは検出不可能なウイルス複製とともに生存し、より低いもしくは断続的な用量のHAARTを使用しているか、または潜在的にHAARTを完全に中止することができる、状況または状態として定義される。本明細書で使用されるように、機能的治癒は、低レベルのウイルス複製を維持し、疾患の進行を遅らせるかまたは排除するために、補助療法を必要とする可能性がなお、あるかもしれない。機能的治癒の可能な結果は、再発のすべての可能性を防ぐためのH I Vの最終的な根絶である。

40

#### 【0122】

機能的治癒を達成するための主な障害は、H I V自体の基本的な生物学にある。ウイルス感染は、ほぼすべての免疫機能にとって重要なC D 4 T細胞を欠失させる。最も重要なことに、H I V感染およびC D 4 T細胞の枯渇は、個々の細胞の活性化を必要とする

50

。活性化とは、再編成されたT細胞受容体を使用して病原体または他の分子を認識する個々のCD4<sup>+</sup>T細胞クローンに特異的な機構である。

【0123】

HIVの場合、感染は、ウイルスにそれほど特異的でない他のT細胞の前に、HIVに特異的なT細胞の集団を活性化させ、結果的に枯渇させ、ウイルスに対する免疫システムの防御を効率的に無能力化する。HIV特異的T細胞応答の能力は、長期間のHAART中に再構築される；しかしながら、HAARTが中断されると、反復性ウイルス感染はプロセスを反復し、再びウイルス特異的細胞を欠失させ、疾患の進行の時計をリセットする。

【0124】

明らかに、機能的治癒は、HAARTが中断されても、十分なHIV特異的CD4<sup>+</sup>T細胞が保護されて、宿主の自然免疫がHIVに対抗しHIVを制御することができる場合にのみ可能である。一実施形態では、本開示の態様は、事前の免疫化を必要とせずに機能的治癒を提供するために、HIVに対する宿主免疫を増強するための方法および組成物を提供する。

【0125】

遺伝子治療

ウイルスベクターは、疾患の療法または予防の目的のために宿主細胞に遺伝子構築物を送達するために使用される。

【0126】

遺伝子構築物は、機能的遺伝子または既存の欠陥を修正または補完する遺伝子の一部、調節タンパク質をコードするDNA配列、アンチセンス、短いホモロジーRNA、長い非コードRNA、低分子干渉RNAまたはその他を含む調節RNA分子をコードするDNA配列、および疾患状態を変化させるために重要な細胞因子について競合するように設計されたRNAまたはタンパク質のいずれかをコードするデコイ配列を含むことができるが、それらに限定されない。遺伝子治療は、特定の疾患の処置または緩和を提供するために、これらの療法用遺伝子構築物を標的細胞に送達することを含む。

【0127】

HIV疾患の処置において遺伝子治療を利用する努力は複数行われてきているが、これまでのところ、結果は貧弱である。CCR5遺伝子の自発的欠失(CCR5 $\Delta$ 32として公知である対立遺伝子)を有するまれなHIV患者において、少数の処置成功が得られた。

【0128】

レンチウイルスにより送達されたヌクレアーゼまたは遺伝子欠失/修飾のための他の機構を使用して、CCR5の全体的発現を低下させ、および/またはHIV複製を低下させるのを助けることができる。レンチウイルスがCCR5 $\Delta$ 32の遺伝的背景を有する患者に投与された場合にこの疾患の処置に成功したことを報じる研究が、少なくとも1つある。しかしながら、これは成功のわずかに一例に過ぎず、CCR5 $\Delta$ 32遺伝子型を持たない多くの他の患者はうまく処置されていない。その結果、個々のウイルスベクター構築物の性能および機能的HIV治癒を達成するための戦略によるベクターの使用の改善の両方の点で、HIVに対するウイルス遺伝子治療の性能を改善する実質的な必要性がある。

【0129】

例えば、いくつかの既存の療法は、細胞をHIV感染に対して耐性にする試みにおいて、ジンクフィンガーヌクレアーゼに依存して、CCR5の一部を欠失させる。しかしながら、最適な処置の後でさえも、T細胞の30%だけがヌクレアーゼによって改変されるのみであり、改変されたもののうち、全CD4<sup>+</sup>T細胞集団のわずか10%がHIV感染を予防するように改変されただけであった。対照的に、開示された方法は、レンチウイルス導入遺伝子を保有する実質的にすべての細胞で、HIV感染を可能にするのに必要なレベル未満までCCR5発現が減少する結果となる。これにより、初期CD4<sup>+</sup>T細胞プールを増加させるための事前の免疫化ステップなしであっても、HIVの処置の成功とい

10

20

30

40

50

う結果を得ることができる。

【0130】

開示される方法の目的のために、遺伝子治療には、親和性が増強されたT細胞受容体、CD4 T細胞上の（または代替的にCD8 T細胞上の）キメラ抗原受容体、ウイルスタンパク質により引き起こされる細胞死を避けるためのシグナル伝達経路の改変、TREX、SAMHD1、MxAまたはMxBタンパク質、APOBEC複合体、TRIM5-アルファ複合体、テザリン（tetherin；BST2）、および哺乳動物細胞におけるHIV複製を減少させることができるものと識別された類似のタンパク質を含むHIV制限エレメントの発現の増加を含むことができるが、それらに限定されない。

【0131】

免疫療法

歴史的に、ワクチンは、天然痘、ポリオ、麻疹、黄熱病を含む、致命的な感染性疾患に対する頼りになる武器であった。残念ながら、現在のところ、HIVについては承認されているワクチンはない。HIVウイルスは、免疫システムを回避する独特の手段を持っており、人体はそれに対して有効な免疫応答を実装することができないようである。その結果、科学者はHIVに対する保護を提供するために何が必要であるかを明確に把握していない。

【0132】

しかしながら、免疫療法は、従来のワクチン接種アプローチによっては以前に対処できなかった解決法を提供し得る。生物学的療法とも呼ばれる免疫療法は、感染症またはがんと戦うための身体の自然防御を強化するために設計された処置の一型である。それは、免疫システムの機能を改善、標的化、または回復させるために、身体あるいは実験室のいずれかにおいて作られた材料を使用する。

【0133】

本開示のある特定の態様では、宿主の抗HIV免疫を増加させる目的で、HIV特異的CD4 T細胞の集団を濃縮するために、免疫療法アプローチを使用することができる。開示された発明の他の態様では、宿主の抗HIV免疫を増加させる目的で、宿主の免疫細胞に形質導入するために、組み込みまたは非組み込みのレンチウイルスベクターを使用することができる。本開示の他の態様では、宿主の免疫応答を増加させるための適切なビヒクルおよび/または生物学的もしくは化学的アジュバントと組み合わせた、死滅粒子、ウイルス様粒子、HIVペプチドもしくはペプチド断片を含むがこれらに限定されないHIVタンパク質、組換えウイルスベクター、組換え細菌ベクター、精製サブユニットまたはプラスミドDNAを含むワクチンは、ウイルス特異的T細胞の集団または抗体を濃縮するために使用することができ、これらの方法は、レンチウイルスまたは他のウイルスベクターを使用したHIV標的遺伝子治療の使用によってさらに増強され得る。

【0134】

方法

一態様では、本開示は、HIV疾患の機能的治癒を達成するためにウイルスベクターを使用する方法を提供する。この方法は、HIV特異的CD4 T細胞の割合を濃縮させるための免疫療法、続く、必要に応じてHIVならびにCCR5およびCXCR4の阻害剤を送達するためのレンチウイルス形質導入を含んでいてもよい。重要なことに、HIV特異的CD4 T細胞の濃縮およびレンチウイルス形質導入は、事前の免疫化ステップなしであっても有効であり得る。

【0135】

実施形態では、方法は、HIV特異的CD4 T細胞の割合を濃縮させるための方法として療法的免疫化を含み、この免疫化は、対象への刺激された細胞の注入と同時にまたはその後に行われる。療法的免疫化には、精製タンパク質、不活化ウイルス、ウイルスベクター化タンパク質、細菌性ベクター化タンパク質、ペプチドまたはペプチド断片、ウイルス様粒子（VLP）、サイトカインおよび/またはケモカインを含む生物学的または化学的アジュバント、ビヒクル、ならびに免疫化のための方法が含まれ得る。

10

20

30

40

50

## 【0136】

療法用ワクチンは、処置が行われている地理的領域の支配的なウイルス型を表すタンパク質配列を有する1つまたは複数のHIVタンパク質を含むことができる。療法的ワクチンには、精製タンパク質、不活化ウイルス、ウイルスベクター化タンパク質、細菌性ベクター化タンパク質、ペプチドまたはペプチド断片、ウイルス様粒子(VLP)、サイトカインおよび/もしくはケモカインを含む生物学的または化学的アジュバント、ビヒクル、ならびに免疫化のための方法が含まれ得る。ワクチン接種は、当該分野で公知の標準的な方法に従って投与することができ、HIV患者は、免疫化の期間およびその後のレンチウイルス形質導入を含むex vivoリンパ球培養の間に抗レトロウイルス療法を続けることができる。

10

## 【0137】

ある特定の実施形態では、HIV+患者をHIVワクチンで免疫化して、HIV特異的CD4 T細胞の頻度を、約2、約25、約250、約500、約750、約1000、約1250、または約1500倍(またはこれらの値の間の任意の量)増加させることができる。ワクチンは、ワクチン送達システムとして使用される、開示されたレンチウイルス、他のウイルスベクターまたは他の細菌ベクターを含む、任意の臨床的に利用されるかまたは実験的なHIVワクチンであってもよい。別の実施形態では、ベクターは、中和抗体のより高い力価およびより強いHIV特異的T細胞応答を誘導するためにウイルス様粒子(VLP)をコードし得る。別の実施形態では、ベクターは、gag、pol、およびenv、tat、rev、nef、vif、vpr、vpu、およびtevならびにLTR、TAR、RRE、PE、SLIP、CRS、およびINSを含むがこれらに限定されないHIVに関連するペプチドまたはペプチド断片をコードし得る。代替的には、開示された方法で使用されるHIVワクチンは、精製タンパク質、不活性化ウイルス、ウイルスベクター化タンパク質、細菌性ベクター化タンパク質、ペプチドもしくはペプチド断片、ウイルス様粒子(VLP)、またはサイトカインおよび/もしくはケモカインを含む生物学的もしくは化学的アジュバントを含んでもよい。

20

## 【0138】

例えば、末梢血単核細胞(PBMC)は白血球アフェレーシスによって得られ、ex vivoで処理され、約 $1 \times 10^{10}$ 個のCD4 T細胞を得ることができ、その約0.1%、約1%、約5%、または約10%、または約30%は、抗原応答の点でHIV特異的であり、かつ開示されたレンチウイルスベクターによって送達される療法用導入遺伝子を有することによりHIV耐性である。代替的には、約 $1 \times 10^7$ 、約 $1 \times 10^8$ 、約 $1 \times 10^9$ 、約 $1 \times 10^{10}$ 、約 $1 \times 10^{11}$ 、または約 $1 \times 10^{12}$ 個のCD4 T細胞を再刺激のために単離することができる。重要なことに、ex vivoにおける再刺激のために、任意の適切な量のCD4 T細胞が単離され得る。

30

## 【0139】

単離されたCD4 T細胞は、以前の療法用ワクチン接種に存在する抗原を含んでも含まなくてもよいHIVワクチン抗原による再刺激を通して、適切な培地中で培養することができる。逆転写酵素、プロテアーゼまたはインテグラーゼの阻害剤を含む抗レトロウイルス療法薬は、長期のex vivoでの培養中のウイルス再出現を防ぐために添加することができる。CD4 T細胞再刺激は、培養物中のHIV特異的CD4 T細胞の割合を濃縮するために使用され得る。同じ手順を、精製によって得られた末梢血単核細胞を有する少量の血液量を使用して、HIV特異的T細胞を識別し、この亜集団の頻度を測定する分析目的にもまた使用することができる。

40

## 【0140】

PBMC画分は、in vivo免疫化のために以前に使用されたワクチンの成分と一致または相補的なHIVタンパク質と細胞を接触させることによって、HIV特異的CD4 T細胞について濃縮され得る。ex vivo再刺激は、HIV特異的CD4 T細胞の相対頻度を約5、約10、約25、約50、約75、約100、約125、約150、約175、または約200倍増加させることができる。ex vivo再刺激は、事前の

50

免疫化ステップの有無にかかわらず、H I V特異的C D 4 T細胞の相対頻度を増加させることができる。

【0141】

本明細書で詳述されている方法は、e x v i v oでのレンチウイルス形質導入および培養を用いた、e x v i v oでのC D 4 T細胞の再刺激を含み得る。本明細書で詳述されている方法はまた、事前の免疫化ステップなしに、e x v i v oでのレンチウイルス形質導入および培養を用いた、e x v i v oでのC D 4 T細胞の再刺激を含み得る。

【0142】

したがって、一実施形態では、H I V特異的C D 4 T細胞について濃縮された再刺激されたP B M C画分は、療法用抗H I Vレンチウイルスまたは他のベクターを用いて形質導入され、約1～約21日間または最大約35日間、培養物中に保持され得る。代替的には、細胞は、約1～約18日間、約1～約15日間、約1～約12日間、約1～約9日間、または約3～約7日間培養され得る。したがって、形質導入された細胞は、約1、約2、約3、約4、約5、約6、約7、約8、約9、約10、約11、約12、約13、約14、約15、約16、約17、約18、約19、約20、約21、約22、約23、約24、約25、約26、約27、約28、約29、約30、約31、約32、約33、約34、または約35日間、培養されてもよい。

10

【0143】

形質導入された細胞が十分に培養されると、形質導入されたC D 4 T細胞が元の患者に注入し、戻される。注入は、当該技術分野において公知の様々な機械および方法を使用して実施することができる。一部の実施形態では、注入には、再移植の効率を高めるために、シクロホスファミドまたは同様の化合物での前処置が伴ってもよい。

20

【0144】

一部の実施形態では、C C R 5標的療法は、処置プロセスを通して継続して、対象の抗レトロウイルス療法レジメンに加えられてもよい。C C R 5標的療法の例としては、マラビロク (Maraviroc ; C C R 5アンタゴニスト) またはラパマイシン (Rapamycin ; C C R 5を低下させる免疫抑制剤) が挙げられるが、これらに限定されない。一部の実施形態では、抗レトロウイルス療法は中止され、対象はウイルスのリバウンドについて試験されることができる。リバウンドが起こらない場合、アジュバント療法もまた取り除くことができ、対象はウイルスのリバウンドについて再び試験されることができる。

30

【0145】

c A R TまたはH A A R Tを含めた抗レトロウイルス療法を減少させたか、または伴わないものであって、約26週間のアジュバント療法を減少させたか、または伴わない継続的なウイルス抑制は、H I Vの機能的治癒と考えることができる。機能的治癒の他の定義は、本明細書に記載されている。

【0146】

開示された方法で使用されるレンチウイルスベクターおよび他のベクターは、少なくとも1つ、少なくとも2つ、少なくとも3つ、少なくとも4つ、もしくは少なくとも5つの目的の遺伝子、または少なくとも6つの目的の遺伝子、または少なくとも7つの目的の遺伝子、または少なくとも8つの目的の遺伝子、または少なくとも9つの目的の遺伝子、または少なくとも10個の目的の遺伝子、または少なくとも11個の目的の遺伝子、または少なくとも12個の目的の遺伝子をコードし得る。H I V標的化遺伝子治療の多様性および治療可能性を考慮すると、本発明のウイルスベクターは、( i ) 感染性疾患に関連する抗原または感染性病原体により産生された毒素に対する抗体、( i i ) 免疫細胞の増殖または機能に必要で、H I Vおよび他の慢性または急性のヒトウイルスまたは細菌病原体で遭遇する免疫調節不全のための療法であり得る、インターロイキンを含むサイトカイン、( i i i ) C D 8抑制因子を含む i n v i v oにおいてH I Vの増殖を抑制する因子、( i v ) ケモカイン受容体C C R 5の変異もしくは欠失、ケモカイン受容体C X C R 4の変異もしくは欠失、またはケモカイン受容体C X C R 5の変異もしくは欠失、( v ) H I Vに関連する特異的受容体もしくはペプチドまたはH I Vに関連する宿主タンパク質に対

40

50

するアンチセンスDNAまたはRNA、(v i) HIVに関連する特異的受容体もしくはペプチドまたはHIVに関連する宿主タンパク質に対する低分子干渉RNA、または(v i i) HIVまたはAIDSを処置するために使用され得る様々な他の療法的に有用な配列を含むがそれらに限定されない遺伝子または核酸配列をコードしてもよい。

【0147】

開示された方法において使用することができるHIV標的化遺伝子治療のさらなる例は、親和性が増強されたT細胞受容体、CD4 T細胞上の(または代替的にはCD8 T細胞上の)キメラ抗原受容体、ウイルスタンパク質により引き起こされる細胞死を避けるためのシグナル伝達経路の改変、TREX、SAMHD1、MxAまたはMxBタンパク質、APOBEC複合体、TRIM5 - アルファ複合体、テザリン(BST2)、および哺乳動物細胞におけるHIV複製を減少させることができるものと識別された類似のタンパク質を含むHIV制限エレメントの発現の増加を含むことができるが、それらに限定されない。

10

【0148】

一部の実施形態では、患者は、本発明の方法に従って処置されながら同時にcARTまたはHAARTを受けていてもよい。他の実施形態では、患者は、本発明の方法に従って処置される前または後に、cARTまたはHAARTを受けてもよい。一部の実施形態では、cARTまたはHAARTは、本発明の方法に従った処置を通して維持され、患者は血液中のHIVウイルス負荷についておよび血液中のレンチウイルス形質導入CD4 T細胞の頻度についてモニターされてもよい。好ましくは、本発明の方法に従って処置される前にcARTまたはHAARTを受けている患者は、本発明の方法に従った処置の後にcARTまたはHAARTを中止または減少することができる。

20

【0149】

有効性を評価する目的で、遺伝子治療効果についての新規の代用マーカーである形質導入されたHIV特異的CD4 T細胞の頻度を、本明細書でより詳細に議論されているように決定してもよい。

【0150】

組成物

一態様では、開示された発明は、感受性細胞のHIV侵入を阻害するために遺伝子構築物を送達することができるレンチウイルスベクターを提供する。例えば、1つの作用メカニズムは、CCR5および/またはCXCR4ケモカイン受容体のmRNAレベルを減少させ、それにより感受性細胞へのウイルス進入の速度を減少させることである。

30

【0151】

代替的には、開示されるレンチウイルスベクターは、入ってくるHIVゲノムRNAの安定性を減少させることによって、HIV感染細胞の形成を阻害することができてよい。さらに別の実施形態では、開示されたレンチウイルスベクターは、潜伏感染細胞からのHIV産生を防止することができ、その作用メカニズムは、短い相同性、低分子干渉性、または他の調節RNA種を含む阻害性RNAの作用により、ウイルスRNA配列の不安定性を引き起こすことである。

【0152】

40

本出願に開示される療药用レンチウイルスは、一般に、2つの型の遺伝子カーゴ(genetic cargo)のうちの少なくとも1つを含む。第1に、レンチウイルスは、感受性細胞のHIV侵入にとって重要なケモカイン受容体CCR5および/またはCXCR4の産生を阻害することができるスモールRNAの発現を導く遺伝子エレメントをコードしてもよい。第2の型の遺伝子カーゴは、逆転写、RNAスプライシング、タンパク質を産生するRNA翻訳、または粒子産生および感染蔓延のためのウイルスゲノムRNAのパッケージングを防止する目的で、HIV RNA配列を標的とするスモールRNA分子を発現することができる構築物を含む。例示的な構造を図3に図示する。

【0153】

図3に示すように(上パネル)、例示的な構築物は、多数のセクションまたは構成要素

50

を含むことができる。例えば、一実施形態では、例示的なLV構築物は、以下のセクションまたは構成要素を含み得る：

- ・ R S V - ラウス肉腫ウイルス (Rous Sarcoma virus) 末端反復配列；
- ・ 5' L T R - 染色体組み込み後にベクターの複製を阻止するために切断され得る H I V 末端反復配列の一部；
- ・ P s i - パッケージング中にベクター R N A ゲノムをウイルス粒子に取り込むことを可能にするパッケージングシグナル；
- ・ R R E - R e v 反応性エレメントは、R N A を核から細胞の細胞質に移動することによって導入遺伝子からの発現を改善するために添加することができる；
- ・ c P P T - 宿主細胞の染色体に導入遺伝子を組み込む前に、第 2 鎖 D N A 合成を促進するポリプリントラクト (poly purine tract)；
- ・ プロモーター - プロモーターとは、マイクロRNA クラスター (または構築物の他の遺伝子エレメント) を発現するために、組み込まれた導入遺伝子から R N A 転写を開始するものであり、一部の実施形態では、ベクターは E F - 1 プロモーターを使用してもよい；
- ・ A n t i - C C R 5 - 宿主細胞因子 C C R 5 のメッセンジャー R N A を標的として、細胞表面上の発現を減少させるマイクロRNA；
- ・ A n t i - R e v / T a t - H I V R e v コーディング領域と T a t コーディング領域の間の接合部にある H I V ゲノム R N A またはメッセンジャー R N A を標的とするマイクロRNA であり、時には m i R N A T a t と称されるか、またはこの出願において同様の記載が与えられる；
- ・ A n t i - V i f - V i f コーディング領域内の H I V ゲノム R N A またはメッセンジャー R N A を標的とするマイクロRNA；
- ・ W P R E - ウッドチャック肝炎ウイルス転写後調節エレメント (woodchuck hepatitis virus post-transcriptional regulatory element) は、核の R N A 輸送を促進するために使用することができる追加のベクター構成成分である；および
- ・ d e l t a U 3 3' L T R - ベクターの安全性を改善するために U 3 領域の一部が欠失している、H I V 3' 末端反復配列の改変バージョン。

#### 【0154】

当業者は、上記成分が単なる例であり、そのような成分は、構築物が H I V 遺伝子の発現を防止し、感染の拡散を減少させることができる限り、再編成し、他のエレメントで置換し、または限定されないがヌクレオチドの置換、欠失、付加、もしくは突然変異を施すことを含む他の方法で変化させてもよいことを認識する。

#### 【0155】

本発明のベクターは、上に議論した遺伝子カーゴの型 (すなわち、遺伝子の発現を導く遺伝子エレメントまたは翻訳もしくは転写を阻止することができる s i R N A、s h R N A もしくは m i R N A のようなスモール R N A) の一方または両方を含んでもよく、本発明のベクターはまた、HIV の処置または診断の目的のためにさらなる有用な産物をコードしてもよい。例えば、一部の実施形態では、これらのベクターはまた、i n v i v o で遺伝子改変細胞を選択的に維持する目的で、ベクターまたは抗生物質耐性遺伝子を追跡する目的で、緑色蛍光タンパク質 (G F P) をコードしてもよい。

#### 【0156】

開示されるベクターに組み込まれる遺伝子エレメントの組合せは、特に限定されない。例えば、ベクターは、1 個のスモール R N A、2 個のスモール R N A、3 個のスモール R N A、4 個のスモール R N A、5 個のスモール R N A、6 個のスモール R N A、7 個のスモール R N A、8 個のスモール R N A、9 個のスモール R N A、または 10 個のスモール R N A、または 11 個のスモール R N A、または 12 個のスモール R N A をコードしてもよい。そのようなベクターは、H I V の発現および感染を阻止するために、スモール R N A と協調して機能する他の遺伝子エレメントを、さらにコードしてもよい。

#### 【0157】

10

20

30

40

50



当業者は、療法用レンチウイルスが、プロモーター領域、調節RNAの標的化、および調節RNAの型の代わりに代替配列を使用し得ることを理解する。さらに、本開示の療法用レンチウイルスは、レンチウイルス粒子をパッケージングするために使用されるプラスミド中に変化を含んでもよい；これらの変化は、*in vitro*における産生のレベルを増加させるために必要となる。

【0158】

レンチウイルスベクターシステム

レンチウイルスビリオン（粒子）は、ビリオン（ウイルス粒子）の産生に必要なウイルスタンパク質をコードするベクターシステムによって発現される。逆転写および組み込みのために必要であり、プロモーターに作動可能に連結されている、レンチウイルス *pol* タンパク質をコードする核酸配列を含む少なくとも1つのベクターが存在する。別の実施形態では、*pol* タンパク質は、複数のベクターによって発現される。ウイルスカプシドを形成するために必要なレンチウイルス *gag* タンパク質をコードし、プロモーターに作動可能に連結した核酸配列を含むベクターもまた存在する。ある実施形態では、この *gag* 核酸配列は、*pol* 核酸配列の少なくともいくつかとは異なるベクターに存在する。別の実施形態では、*gag* 核酸は、*pol* タンパク質をコードする *pol* 核酸配列すべてと異なるベクターに存在する。

【0159】

ベクターには、多数の改変を施すことができる。そうした改変は、野生型復帰変異体を得る可能性がさらに最小限に抑えられた粒子を創造するために使用される。これらには、LTRのU3領域の欠失、*tat* 欠失、およびマトリクス（MA）欠失が含まれるが、これらに限定されない。

【0160】

*gag*、*pol*、および *env* ベクターは、レンチウイルスパッケージング配列と呼ばれる、レンチウイルスRNAをパッケージングするレンチウイルスゲノム由来ヌクレオチドを含んでいない。

【0161】

粒子を形成するベクターは、好ましくは、エンベロープタンパク質を発現するレンチウイルスゲノム由来核酸配列を含んでいない。好ましくは、プロモーターに作動可能に連結したエンベロープタンパク質をコードする核酸配列を含む別のベクターが使用される。この *env* ベクターも、レンチウイルスパッケージング配列を含んでいない。一実施形態では、*env* 核酸配列は、レンチウイルスエンベロープタンパク質をコードする。

【0162】

別の実施形態では、エンベロープタンパク質は、レンチウイルスではなく、異なるウイルスに由来する。その結果生じる粒子は、偽型粒子と呼ばれる。エンベロープを適切に選択することにより、事実上あらゆる細胞に「感染」させることができる。例えば、インフルエンザウイルス、VSV-G、アルファウイルス（セムリキ森林熱ウイルス、シンドビスウイルス）、アレナウイルス（リンパ球脈絡髄膜炎ウイルス）、フラビウイルス（ダニ媒介性脳炎ウイルス、デング熱ウイルス、C型肝炎ウイルス、GBウイルス）、ラブドウイルス（水疱性口内炎ウイルス、狂犬病ウイルス）、パラミクソウイルス（流行性耳下腺炎または麻疹）、およびオルトミクソウイルス（インフルエンザウイルス）のものなどの、エンドサイトーシス性区画（*endocytic compartment*）を標的とするエンベロープタンパク質をコードする *env* 遺伝子を使用することができる。好ましく使用することができる他のエンベロープには、MLV-E、MLV-A、およびGALVなどの、モロニー白血病ウイルスに由来するものが含まれる。これら後者のエンベロープは、宿主細胞が初代細胞である場合、特に好ましい。所望の宿主細胞に応じて、他のエンベロープタンパク質を選択してもよい。例えば、脳送達には、ドーパミン受容体などの標的化特異的受容体を使用することができる。別の標的は、血管内皮であってもよい。これら細胞は、フィロウイルスエンベロープを使用して標的とすることができる。例えば、転写後修飾によりGPおよびGP<sub>2</sub>糖タンパク質になるエボラのGP。別の実施形態では、偽型エンベロープ

10

20

30

40

50

を有する様々なレンチウイルスカプシドを使用することができる。例えば、F I VまたはS H I V [ 米国特許第 5 , 6 5 4 , 1 9 5 号 ] 。 S H I V 偽型ベクターは、サルなどの動物モデルで容易に使用することができる。

#### 【 0 1 6 3 】

本明細書で詳述されているように、レンチウイルスベクターシステムは、典型的には、g a g、p o l、またはr e v 遺伝子の少なくとも1つを含む少なくとも1つのヘルパープラスミドを含む。g a g、p o l、r e v 遺伝子の各々は、個々のプラスミドに提供されていてもよく、または1つもしくは複数の遺伝子が、同じプラスミドと一緒に提供されていてもよい。一実施形態では、g a g、p o l、およびr e v 遺伝子は、同じプラスミドに提供されている（例えば、図 4）。別の実施形態では、g a g および p o l 遺伝子は、第 1 のプラスミドに提供されており、r e v 遺伝子は、第 2 のプラスミドに提供されている（例えば、図 5）。したがって、3 ベクターシステムおよび 4 ベクターシステムは両方とも、実施例のセクションおよび本明細書の他の場所に記載のようなレンチウイルスを産生するために使用することができる。療法用ベクター、エンベローププラスミド、および少なくとも1つのヘルパープラスミドは、パッケージング細胞株にトランスフェクトされる。パッケージング細胞株の非限定的な例は、2 9 3 T / 1 7 H E K 細胞株である。療法用ベクター、エンベローププラスミド、および少なくとも1つのヘルパープラスミドが、パッケージング細胞株にトランスフェクトされると、最終的にレンチウイルス粒子が産生される。

#### 【 0 1 6 4 】

別の態様では、レンチウイルス粒子を発現するためのレンチウイルスベクターシステムが開示される。システムは、本明細書に記載のようなレンチウイルスベクター；細胞に感染するために最適化されているエンベロープタンパク質を発現するためのエンベローププラスミド；および g a g、p o l、および r e v 遺伝子を発現するための少なくとも1つのヘルパープラスミドを含み、レンチウイルスベクター、エンベローププラスミド、および少なくとも1つのヘルパープラスミドが、パッケージング細胞株にトランスフェクトされると、パッケージング細胞株によってレンチウイルス粒子が産生され、レンチウイルス粒子は、ケモカイン受容体 C C R 5 の産生を阻害することができるかまたは H I V R N A 配列を標的とすることができる。

#### 【 0 1 6 5 】

別の態様では、本明細書で詳述されているように、本明細書では療法用ベクターとも呼ばれるレンチウイルスベクターは、以下のエレメントを含むことができる：ハイブリッド 5 ' 末端反復配列 ( R S V / 5 ' L T R ) ( 配列番号 3 4 ~ 3 5 )、P s i 配列 ( R N A パッケージング部位 ) ( 配列番号 3 6 )、R R E ( R e v 応答エレメント ) ( 配列番号 3 7 )、c P P T ( ポリプリントラクト ) ( 配列番号 3 8 )、E F - 1 プロモーター ( 配列番号 4 )、m i R 3 0 C C R 5 ( 配列番号 1 )、m i R 2 1 V i f ( 配列番号 2 )、m i R 1 8 5 T a t ( 配列番号 3 )、ウッドチャック転写後調節エレメント ( W P R E ) ( 配列番号 3 2 または 8 0 )、および U 3 3 ' L T R ( 配列番号 3 9 )。別の態様では、置換、欠失、または付加による配列変異を使用して、上で参照されている配列を改変することができる。

#### 【 0 1 6 6 】

別の態様では、本明細書で詳述されているように、ヘルパープラスミドは、以下のエレメントを含むように設計されている：C A G プロモーター ( 配列番号 4 1 )；H I V 成分 g a g ( 配列番号 4 3 )；H I V 成分 p o l ( 配列番号 4 4 )；H I V I n t ( 配列番号 4 5 )；H I V R R E ( 配列番号 4 6 )；および H I V R e v ( 配列番号 4 7 )。別の態様では、ヘルパープラスミドは、g a g および p o l 遺伝子を発現するための第 1 のヘルパープラスミド、ならびに r e v 遺伝子を発現するための第 2 の別のプラスミドを含むように改変されていてもよい。別の態様では、置換、欠失、または付加による配列変異を使用して、上で参照されている配列を改変することができる。

#### 【 0 1 6 7 】

10

20

30

40

50

別の態様では、本明細書で詳述されているように、エンベローププラスミドは、左から右へと以下のエレメントを含むように設計されている：RNAポリメラーゼIIプロモーター（CMV）（配列番号60）および水疱性口内炎ウイルスG糖タンパク質（VSV-G）（配列番号62）。別の態様では、置換、欠失、または付加による配列変異を使用して、上で参照されている配列を改変することができる。

#### 【0168】

別の態様では、レンチウイルスパッケージングに使用されるプラスミドは、ベクター機能を喪失させずに、類似のエレメントにより改変され得、イントロン配列は、潜在的に除去され得る。例えば、パッケージングシステムを含むプラスミドの類似エレメントの代わりに、以下のエレメントを使用することができる：伸長因子-1（EF-1）、ホスホグリセリン酸キナーゼ（PGK）、およびユビキチンC（UbC）プロモーターを、CMVまたはCAGプロモーターの代わりに使用することができる。SV40ポリAおよびbGHポリAを、ウサギベータグロビンポリAの代わりに使用することができる。ヘルパープラスミドのHIV配列は、異なるHIV株または系統群から構築されていてもよい。VSV-G糖タンパク質を、ネコ内在性ウイルス（RD114）、テナガザル類人猿白血病ウイルス（GALV）、狂犬病（FUG）、リンパ球脈絡髄膜炎ウイルス（LCMV）、インフルエンザA型家禽ペストウイルス（FPV）、ロスリパーアルファウイルス（RRV）、マウス白血病ウイルス10A1（MLV）、またはエボラウイルス（EboV）に由来する膜糖タンパク質と置換することができる。

#### 【0169】

注目すべきことに、レンチウイルスパッケージングシステムは、商業的に入手することができる（例えば、OriGene Technologies, Inc.、Rockville、MDのLenti-vpakパッケージングキット）、本明細書に記載のように設計することもできる。さらに、レンチウイルス粒子の産生効率を含む任意の数の関連要因を改善するために、レンチウイルスパッケージングシステムの態様を置換または改変することは、当業者の技術範囲にある。

#### 【0170】

##### バイオアッセイ

一態様では、本発明は、機能的治癒を達成するためのHIV処置の成功を決定するためのバイオアッセイを含む。これらのアッセイは、患者における形質導入されたHIV特異的CD4 T細胞の頻度を測定することによって、開示された方法の有効性を測定するための方法を提供する。HIV特異的CD4 T細胞は、増殖し、細胞表面マーカーの組成を改変させ、リン酸化を含むシグナル伝達経路を誘導し、あるいはサイトカイン、ケモカイン、カスパーゼ、リン酸化シグナル伝達分子または他の細胞質および/もしくは核成分であり得る特異的マーカータンパク質を発現するので、認識できる。特異的応答性CD4 T細胞は、例えば、フローサイトメトリーソーティング、磁気ビーズ分離または抗原特異的CD4 T細胞単離のための他の認識されている方法を使用して、HIV特異的細胞の選別を可能にする、標識モノクローナル抗体またはmRNA配列の特異的in situ増幅を使用して、認識される。単離したCD4 T細胞を試験して、組み込まれた療法用レンチウイルスを有する細胞の頻度を決定する。HIVに対する応答性および組み込まれた療法用レンチウイルスの存在を確認するための質量分析法、PCR、ELISA、または抗体染色と組み合わせた、個々の細胞のマイクロ流体分離を含む、単一細胞試験法もまた、使用してもよい。

#### 【0171】

したがって、ある特定の実施形態では、本発明による処置（例えば、（a）免疫化なし、（b）ex vivoリンパ球培養；（c）精製タンパク質、不活性化ウイルス、ウイルスベクター化タンパク質、細菌性ベクター化タンパク質、サイトカインおよび/またはケモカインを含む生物学的または化学的アジュバント、ピヒクルによる再刺激；ならびに（d）濃縮され形質導入されたT細胞の注入）の適用の後、処置の有効性を決定するために患者を次いで、アッセイしてもよい。注入のための細胞産物内の標的T細胞の閾値は、

機能的治癒を測定するために、例えば、約  $1 \times 10^8$  個の、療法用レンチウイルスによる遺伝子改変を有する HIV 特異的 CD4<sup>+</sup> T 細胞として確立してもよい。代替的には、閾値は、患者の体内において、約  $1 \times 10^5$ 、約  $1 \times 10^6$ 、約  $1 \times 10^7$ 、約  $1 \times 10^8$ 、約  $1 \times 10^9$ 、または約  $1 \times 10^{10}$  個の CD4<sup>+</sup> T 細胞であってもよい。

#### 【0172】

療法用レンチウイルスによる遺伝子改変を有する HIV 特異的 CD4<sup>+</sup> T 細胞は、例えば、ただし限定されることがない、フローサイトメトリー、細胞選別、FACS 分析、DNA クローニング、PCR、RT-PCR もしくは Q-PCR、ELISA、FISH、ウェスタンブロッティング、サザンブロッティング、ハイスループット配列決定、RNA 配列決定、オリゴヌクレオチドプライマー伸長、または当該技術分野で公知の他の方法のような任意の適切な方法を使用して決定することができる。

10

#### 【0173】

遺伝子改変を有する抗原特異的 T 細胞を規定するための方法は、当該技術分野において公知である。しかしながら、有効性の標準的な尺度として、HIV 特異的 T 細胞を同定することを、組み込まれたまたは組み込まれていない遺伝子治療構築物と組み合わせるこのような方法を利用することは、HIV 処置の分野における新しい概念である。

#### 【0174】

##### 用量および剤形

開示された方法および組成物は、疾患の様々な段階の間に HIV + 患者を処置するために使用することができる。したがって、投薬レジメンは、患者の状態および投与の方法に基づいて変化し得る。

20

#### 【0175】

一態様では、HIV 特異的ワクチンは、刺激された細胞の注入と同時にまたは注入の後に、対象に投与され得る。一実施形態では、HIV 特異的ワクチンは、様々な用量で、必要とする対象に投与され得る。一般に、筋肉内注射によって送達されるワクチンは、不活性化されたウイルス粒子、ウイルス様粒子から調製された全ウイルスタンパク質、または組換えシステムからのもしくはウイルス調製物から精製された精製ウイルスタンパク質のいずれかの、約  $10 \mu\text{g}$  ~ 約  $300 \mu\text{g}$ 、約  $25 \mu\text{g}$  ~ 約  $275 \mu\text{g}$ 、約  $50 \mu\text{g}$  ~ 約  $250 \mu\text{g}$ 、約  $75 \mu\text{g}$  ~ 約  $225$ 、または約  $100 \mu\text{g}$  ~ 約  $200 \mu\text{g}$  の HIV タンパク質を含む。組換えウイルスまたは細菌ベクターは、記載されたいかなるルートによって投与されてもよい。筋肉内ワクチンは、約  $1 \mu\text{g}$  ~ 約  $100 \mu\text{g}$ 、約  $10 \mu\text{g}$  ~ 約  $90 \mu\text{g}$ 、約  $20 \mu\text{g}$  ~ 約  $80 \mu\text{g}$ 、約  $30 \mu\text{g}$  ~ 約  $70 \mu\text{g}$ 、約  $40 \mu\text{g}$  ~ 約  $60 \mu\text{g}$ 、または約  $50 \mu\text{g}$  の適切なアジュバント分子を含み、注射用量あたり  $0.1 \sim 5 \text{ ml}$  の容量の油、生理食塩水、緩衝液または水に懸濁され、可溶性またはエマルション調製物であってもよい。いくつかのウイルスベクター化もしくは細菌性ベクター化ワクチン、融合タンパク質、リポソーム製剤または同様の調製物を含む、口腔、直腸、頬、生殖器粘膜または鼻腔内に送達されるワクチンは、より多量のウイルスタンパク質およびアジュバントを含んでもよい。経皮、真皮下または皮下ワクチンは、経口、直腸または鼻腔内送達ワクチンにより類似したタンパク質およびアジュバントの量を利用する。最初の免疫化に対する応答に依存して、ワクチン接種は、送達のための同じまたは代替的なルートを使用して、1 ~ 5 回繰り返してもよい。間隔は、免疫化間で 2 ~ 24 週間であってもよい。ワクチン接種に対する免疫応答は、血清、血漿、腔分泌物、直腸分泌物、唾液または気管支肺胞洗浄液中の HIV 特異的抗体を、ELISA または同様の方法を使用して試験することによって測定される。細胞性免疫応答は、ワクチン抗原を用いた *in vitro* 刺激、続いて細胞内サイトカイン蓄積の染色、次いで、フローサイトメトリー、またはリンパ球増殖、リン酸化シグナル伝達タンパク質の発現もしくは細胞表面活性化マーカーの変化を含む同様の方法によって試験される。投薬の上限は、個々の患者に基づいて決定されてもよく、個々の製品または製品ロットの毒性 / 安全性プロファイルに依存する。

30

40

#### 【0176】

免疫化は、1 回、2 回、3 回、または繰り返して行われてもよい。例えば、HIV 免疫

50

化のための薬剤は、週 1 回、隔週に 1 回、3 週間に 1 回、1 ヶ月に 1 回、隔月に 1 回、3 ヶ月に 1 回、6 ヶ月に 1 回、9 ヶ月に 1 回、1 年に 1 回、18 ヶ月に 1 回、2 年に 1 回、36 ヶ月に 1 回、または 3 年に 1 回、必要とする対象に投与されてもよい。

【0177】

CD4<sup>+</sup> T 細胞の *ex vivo* 増殖および濃縮の後、*ex vivo* でのリンパ球の培養/再刺激および注入後は、1 回、2 回、3 回、またはそれよりも多くの回数で、免疫化を行ってもよい。

【0178】

一実施形態では、免疫化のための HIV ワクチンは、医薬組成物として投与される。一実施形態では、HIV ワクチンを含む医薬組成物は、臨床応用のための幅広く様々な経鼻、経肺、経口、局所、または非経口剤形で製剤化され得る。各々の剤形は、様々な崩壊剤、界面活性剤、充填剤、増粘剤、結合剤、湿潤剤のような希釈剤または他の薬学的に許容される賦形剤を含むことができる。HIV ワクチンを含む医薬組成物はまた、注射のために製剤化することもできる。

【0179】

免疫化の目的のための HIV ワクチン組成物は、鼻腔内、頬側、舌下、経口、直腸、眼、非経口（静脈内、皮内、筋肉内、皮下、大槽内、腹腔内）、肺内、膈内、部位的投与、局所投与、乱刺後の局所投与、粘膜投与、エアロゾルを介して、または頬側もしくは鼻スプレー製剤を介してなどの任意の薬学的に許容される方法を使用して投与することができる。

【0180】

さらに、HIV ワクチン組成物は、固体剤形、錠剤、丸薬、ロゼンジ、カプセル、液体分散液、ゲル、エアロゾル、肺エアロゾル、鼻エアロゾル、軟膏、クリーム、半固体剤形、および懸濁液などの、任意の薬学的に許容される剤形に製剤化されることができる。さらに、組成物は、制御放出製剤、持続放出製剤、即時放出製剤、またはそれらの任意の組合せであってもよい。さらに、組成物は、経皮送達システムであってもよい。

【0181】

別の実施形態では、HIV ワクチンを含む医薬組成物は、経口投与のための固体剤形で製剤化され得、固体剤形は、散剤、顆粒剤、カプセル剤、錠剤または丸薬であり得る。さらに別の実施形態では、固体剤形は、炭酸カルシウム、デンプン、スクロース、乳糖、微結晶セルロースまたはゼラチンのような、1 つまたは複数の賦形剤を含んでもよい。さらに、固体剤形は、賦形剤に加えて、タルクまたはステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤を含むことができる。一部の実施形態では、経口剤形は、即時放出または改変放出形態であり得る。改変放出剤形には、制御放出または持続放出、腸内放出などが含まれる。改変放出剤形において使用される賦形剤は、当業者に一般的に公知である。

【0182】

さらなる実施形態では、HIV ワクチンを含む医薬組成物は、舌下または頬側の剤形として製剤化され得る。そのような剤形は、舌の下に投与される舌下錠剤または溶液組成物、および頬と歯茎との間に配置される頬側錠剤を含む。

【0183】

なおさらなる実施形態では、HIV ワクチンを含む医薬組成物は、鼻用剤形として製剤化され得る。そのような本発明の剤形は、経鼻送達のための溶液、懸濁液およびゲル組成物を含む。

【0184】

一実施形態では、医薬組成物は、懸濁液、エマルションまたはシロップのような経口投与用の液体剤形で製剤化され得る。他の実施形態では、液体剤形は、水および流動パラフィンのような一般的に使用される単純希釈剤に加えて、保湿剤、甘味料、芳香剤または防腐剤のような様々な賦形剤を含むことができる。特定の実施形態では、HIV ワクチンまたはその薬学的に許容される塩を含む組成物は、小児患者への投与に適するように製剤化され得る。

10

20

30

40

50

## 【0185】

一実施形態では、医薬組成物は、滅菌水溶液、懸濁液、エマルション、非水性溶液または坐剤などの非経口投与のための剤形で製剤化され得る。他の実施形態では、非水性溶液または懸濁液は、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、オリーブ油のような植物油、またはオレイン酸エチルのような注射可能なエステルを含み得る。坐剤のベースとして、ウィテプソール (witepsol)、マクロゴール (macrogol)、ツイーン 61 (tween 61)、カカオ油、ラウリン油またはグリセリン化ゼラチンを使用することができる。

## 【0186】

医薬組成物の投与量は、患者の体重、年齢、性別、投与の時間および形態、排泄速度、ならびに疾患の重篤度に依存して変化し得る。

## 【0187】

再刺激の目的のために、リンパ球、P B M C、および/または C D 4<sup>+</sup> T 細胞を患者から取り出し、刺激および培養のために単離する。単離された細胞は、免疫化に使用されるものと同じ H I V ワクチンもしくは活性化剤または異なる H I V ワクチンもしくは活性化剤と接触させてもよい。一実施形態では、単離された細胞は、培養物中の約  $10^6$  個の細胞あたり約  $10\text{ ng} \sim 5\text{ }\mu\text{g}$  (または任意の他の適切な量) の H I V ワクチンまたは活性化剤と接触される。より具体的には、単離された細胞は、培養物中の約  $10^6$  個の細胞あたり、約  $50\text{ ng}$ 、約  $100\text{ ng}$ 、約  $200\text{ ng}$ 、約  $300\text{ ng}$ 、約  $400\text{ ng}$ 、約  $500\text{ ng}$ 、約  $600\text{ ng}$ 、約  $700\text{ ng}$ 、約  $800\text{ ng}$ 、約  $900\text{ ng}$ 、約  $1\text{ }\mu\text{g}$ 、約  $1.5\text{ }\mu\text{g}$ 、約  $2\text{ }\mu\text{g}$ 、約  $2.5\text{ }\mu\text{g}$ 、約  $3\text{ }\mu\text{g}$ 、約  $3.5\text{ }\mu\text{g}$ 、約  $4\text{ }\mu\text{g}$ 、約  $4.5\text{ }\mu\text{g}$ 、または約  $5\text{ }\mu\text{g}$  の H I V ワクチンまたは活性化剤と接触させてもよい。

## 【0188】

活性化剤またはワクチンは、一般に、各々の *in vitro* 細胞培養に 1 回使用されるが、約 15 ~ 約 35 日の間隔の後に繰り返してもよい。例えば、繰り返しの投薬は、約 15、約 16、約 17、約 18、約 19、約 20、約 21、約 22、約 23、約 24、約 25、約 26、約 27、約 28、約 29、約 30、約 31、約 32、約 33、約 34、または約 35 日で行ってもよい。

## 【0189】

濃縮され、再刺激された細胞の形質導入のために、細胞は、レンチウイルスベクターまたは本明細書に開示される他の公知のベクターシステムを用いて形質導入されてもよい。形質導入される細胞は、培養中の標的細胞あたり、(レンチウイルスベクターを含む培養液の R T - P C R アッセイにより測定された) 約  $1 \sim 1,000$  個 (または任意の他の適切な量) のウイルスゲノムと接触させてもよい。レンチウイルスの形質導入は、培養物中の標的細胞あたり  $1 \sim 1,000$  個のウイルスゲノムの同じ範囲を使用して、1 ~ 5 回繰り返してもよい。

## 【0190】

## 細胞濃縮

1 つのアプローチでは、T 細胞などの細胞を H I V 感染患者から得て、多重ウェルプレート、順化培地 (「C M」) を含む培養培地中で培養してもよい。上清 p 2 4 g a g (「p 2 4」) のレベルおよびウイルス R N A レベルは、標準的手段によって評価することができる。その C M 培養細胞が  $1\text{ ng/ml}$  未満のピーク p 2 4 上清レベルを有する患者は、さらなる抗ウイルス剤を使用してまたは使用せずに C M 中で T 細胞を大量に増殖させるのに適切な患者であってもよい。加えて、異なる目的の薬物または目的の薬物の組合せを、異なるウェルに添加し、試料中のウイルスレベルに対する影響を、標準的手段によって評価してもよい。適度なウイルス抑制を提供する薬物の組合せは、治療上有益な組合せである。何をもって適度なウイルス抑制とするかを特定の対象に関して決定するのは、適任の専門家の能力内にある。目的の薬物がウイルス増殖を制限する有効性を試験するために、抗 C D 3 抗体などのさらなる因子を培養物に添加して、ウイルス産生を刺激してもよい。H I V 感染細胞試料を培養するための、当技術分野で公知の方法とは異なり、C M は、2 ヶ月間よりも長期間にわたって T 細胞の培養を可能にし、それにより、長期的な薬物有

10

20

30

40

50

効性をアッセイするための有効なシステムを提供する。

【0191】

このアプローチは、CMを含む培地で細胞を培養することにより、細胞集団においてHIVLTRプロモーター領域によって駆動される遺伝子発現の阻害を可能にする。CM4中での培養は、転写媒介性タンパク質とHIV遺伝子発現調節エレメントとの間の1つまたは複数の相互作用を変更することによって、HIVLTR駆動性遺伝子発現を阻害する可能性が高い。目的の転写媒介性タンパク質には、AP-1、NFκB、NF-AT、IRF、LEF-1、およびSp1などの宿主細胞にコードされているタンパク質、ならびにHIVにコードされているタンパク質Tatが含まれる。目的のHIV遺伝子発現調節エレメントには、AP-1、NFκB、NF-AT、IRF、LEF-1、およびSp1の結合部位、ならびにTatと相互作用するトランス作用性応答エレメント(「TAR」)が含まれる。

10

【0192】

好ましい実施形態では、HIV感染細胞は、感受性転写媒介性タンパク質配列および感受性HIV調節エレメント配列を有する対象から得られる。より好ましい実施形態では、HIV感染細胞は、野生型転写媒介性タンパク質配列および野生型HIV調節配列を有する対象から得られる。

【0193】

T細胞を濃縮する別の方法では、免疫親和性に基づく選択が利用される。このアプローチは、CD4+およびCD8+細胞集団などの第1および第2の細胞集団を、同時に濃縮または選択することを含んでいてもよい。初代ヒトT細胞を含む細胞を、CD4に特異的に結合する第1の免疫親和性試薬およびCD8に特異的に結合する第2の免疫親和性試薬と、インキュベーション組成物中にて、免疫親和性試薬が試料中の細胞の表面にあるCD4およびCD8分子にそれぞれ特異的に結合する条件下で接触させる。第1および/または第2の免疫親和性試薬と結合した細胞を回収し、それにより、CD4+細胞およびCD8+細胞を含む濃縮された組成物を生成する。このアプローチは、組成物を、最適未満の収量濃度である濃度の第1および/または第2の免疫親和性試薬と共にインキュベーションすることを含んでいてもよい。特筆すべきことには、一部の実施形態では、形質導入された細胞は、混合T細胞集団であり、他の実施形態では、形質導入された細胞は、混合T細胞集団ではない。

20

30

【0194】

一部の実施形態では、固体支持体が、マイクロビーズまたはナノビーズなどのビーズなどの球体である、免疫親和性に基づく選択が使用される。他の実施形態では、ビーズは、磁気ビーズであってもよい。別の実施形態では、抗体は、球体またはクロマトグラフィーマトリクスなどの固体表面に固定化されている結合試薬と可逆的結合を形成し、抗体を固体表面に可逆的に固定化することができる1つまたは複数の結合パートナーを含む。一部の実施形態では、前記固体表面の抗体が結合する細胞表面マーカーを発現する細胞を、結合試薬と結合パートナーとの可逆的結合を壊すことによって、マトリクスから回収することができる。一部の実施形態では、結合試薬は、ストレプトアビジン、またはストレプトアビジン類似体もしくはバリエーションである。

40

【0195】

造血系および/または造血幹細胞の初代細胞の安定形質導入は、細胞の表面と、レンチウイルスベクターおよび細胞表面に結合する少なくとも1つの分子の両方と、in vitroまたはex vivoで接触させることにより得ることができる。細胞は、成長および/または増殖を促す条件下で、2つまたはそれよりも多くの層を含む換気容器中で培養してもよい。一部の実施形態では、このアプローチは、非CD4+T細胞枯渇および/または広域ポリクローナル増殖(broad polyclonal expansion)と共に使用することができる。

【0196】

T細胞濃縮の別のアプローチでは、PBMCをペプチドで刺激し、インターフェロン-

50

ガンマなどのサイトカインを分泌する細胞について濃縮する。このアプローチは、一般に、T細胞を含む細胞の混合物を抗原で刺激するステップ、産物で標識される度合いに応じて、抗原で刺激された細胞の分離を達成するステップを含む。抗原刺激は、少なくとも1つのT細胞の抗原特異的刺激を誘発するのに有効な条件下で、細胞を、少なくとも1つの抗原に曝露することにより達成される。産物による標識化は、少なくとも1つの捕捉部分を含むように細胞の表面を修飾し、産物が分泌され、放出され、前記捕捉部分に特異的に結合する（「捕捉される」または「捕獲される」）条件下で細胞を培養し、捕捉された産物を標識部分で標識することにより達成され、ここで、標識された細胞は、標識手順の一部としても分離手順の一部としても溶解されない。捕捉部分には、濃縮ステップを精緻化し、一般には抗原特異的T細胞の、特にCD4<sup>+</sup> T細胞の割合を増加させるために、細胞表面糖タンパク質CD3またはCD4の検出が組み込まれていてもよい。

10

#### 【0197】

以下の実施例は、本発明の態様を例示するために示されている。しかしながら、本発明は、これらの実施例において記載された特定の条件または詳細に限定されるものではないことが理解されるべきである。本明細書で参照されている刊行物は全て、参照により具体的に組み込まれる。

#### 【実施例】

#### 【0198】

（実施例1：レンチウイルスベクターシステムの開発）

レンチウイルスベクターシステムを、図3（直線状形態）および図4（環状化形態）に要約されているように開発した。まず図3の上段部分を参照すると、代表的な療法用ベクターを、以下のエレメントを左から右に向かって有するように設計および生成した：ハイブリッド5'末端反復配列（RSV/5'LTR）（配列番号34~35）、Psi配列（RNAパッケージング部位）（配列番号36）、RRE（Rev応答エレメント）（配列番号37）、cPPT（ポリプリントラクト）（配列番号38）、EF-1プロモーター（配列番号4）、miR30CCR5（配列番号1）、miR21Vif（配列番号2）、miR185Tat（配列番号3）、ウッドチャック転写後調節エレメント（WPRE）（配列番号32または80）、およびU3 3'LTR（配列番号39）。図3に詳述されている療法用ベクターは、本明細書ではAGT103とも呼ばれる。

20

#### 【0199】

次に、図3の中段部分を参照すると、ヘルパープラスミドを、左から右に向かって以下のエレメントを有するように設計および生成した：CAGプロモーター（配列番号41）；HIV成分gag（配列番号43）；HIV成分pol（配列番号44）；HIV Int（配列番号45）；HIV RRE（配列番号46）；およびHIV Rev（配列番号47）。

30

#### 【0200】

次に、図3の下段部分を参照すると、エンベローププラスミドを、左から右に向かって以下のエレメントを有するように設計および生成した：RNAポリメラーゼIIプロモーター（CMV）（配列番号60）および水疱性口内炎ウイルスG糖タンパク質（VSV-G）（配列番号62）。

40

#### 【0201】

レンチウイルス粒子を、293T/17 HEK細胞（American Type Culture Collection、Manassas、VAから購入）で産生し、その後、療法用ベクター、エンベローププラスミド、およびヘルパープラスミド（図3に示されているような）をトランスフェクションした。機能的ウイルス粒子を産生した293T/17 HEK細胞のトランスフェクションでは、試薬ポリ（エチレンジアミン）（PEI）を使用して、プラスミドDNA取り込みの効率を増加させた。最初に、プラスミドおよびDNAを、無血清培養培地に3：1の比率（PEI対DNAの質量比）で別々に添加した。2~3日後、細胞培地を集め、レンチウイルス粒子を、高速遠心分離および/または濾過してから、陰イオン交換クロマトグラフィーによって精製した。レンチウイルス粒子の濃度は、形質導入単位/

50



m1 (TU/m1) で表すことができる。TUの決定は、培養液中のHIV p24レベルを測定し (p24タンパク質は、レンチウイルス粒子に組み込まれている)、定量PCRで細胞あたりのウイルスDNAコピー数を測定することにより、または細胞を感染させ、光を使用することにより (ベクターがルシフェラーゼまたは蛍光タンパク質マーカーをコードしている場合) 達成した。

#### 【0202】

上記で言及されているように、3ベクターシステム (つまり、2ベクターレンチウイルスパッケージングシステム) を、レンチウイルス粒子の産生のために設計した。3ベクターシステムの模式図は、図4に示されている。図4の模式図は、図3で上述した線形システムの環状化バージョンである。手短に言えば、図4を参照すると、最上段のベクターは、ヘルパープラスミドであり、この場合は、Revを含む。図4の中段に現れるベクターは、エンベローププラスミドである。最下段のベクターは、上述した療法用ベクターである。

10

#### 【0203】

図4をより詳しく参照すると、ヘルパー+Revプラスミドは、CAGエンハンサー (配列番号40) ; CAGプロモーター (配列番号41) ; ニワトリベータアクチンイントロン (配列番号42) ; HIV gag (配列番号43) ; HIV Pol (配列番号44) ; HIV Int (配列番号45) ; HIV RRE (配列番号46) ; HIV Rev (配列番号47) ; およびウサギベータグロビンポリA (配列番号48) を含む。

#### 【0204】

エンベローププラスミドは、CMVプロモーター (配列番号60) ; ベータグロビンイントロン (配列番号61) ; VSV-G (配列番号62) ; およびウサギベータグロビンポリA (配列番号63) を含む。

20

#### 【0205】

ヘルパー (+Rev) およびエンベローププラスミドを含む2ベクターレンチウイルスパッケージングシステムの合成。

材料および方法:

ヘルパープラスミドの構築: ヘルパープラスミドは、Gag、Pol、およびインテグラーゼ遺伝子を含むpNL4-3 HIVプラスミド (NIH AIDS 試薬プログラム) に由来するDNA断片の最初のPCR増幅により構築した。プライマーは、pCDNA3プラスミド (Invitrogen) の同じ部位に挿入するために使用することができるEcoRIおよびNotI制限部位を有する断片を増幅するように設計した。フォワードプライマーは、(5' - T A A G C A G A A T T C A T G A A T T T G C C A G G A A G A T - 3' ) (配列番号81) であり、リバースプライマーは、(5' - C C A T A C A A T G A A T G G A C A C T A G G C G G C C G C A C G A A T - 3' ) (配列番号82) であった。Gag、Pol、インテグラーゼ断片の配列は以下の通りであった:

30

40

50

【化 4 3 - 1】

GAATTCATGAATTTGCCAGGAAGATGGAAACCAAAAATGATAGGGGGAATTGGA  
GGTTTTATCAAAGTAAGACAGTATGATCAGATACTCATAGAAATCTGCGGACATA  
AAGCTATAGGTACAGTATTAGTAGGACCTACACCTGTCAACATAATTGGAAGAAA  
TCTGTTGACTCAGATTGGCTGCACCTTTAAATTTTCCCATTAGTCCTATTGAGACTGT  
ACCAGTAAAATTAAAGCCAGGAATGGATGGCCCCAAAAGTTAAACAATGGCCATTG  
ACAGAAGAAAAAATAAAAGCATTAGTAGAAATTTGTACAGAAATGGAAAAGGAA  
GGAAAAATTTCAAAAATTGGGCCTGAAAATCCATACAATACTCCAGTATTTGCCAT  
AAAGAAAAAAGACAGTACTAAATGGAGAAAATTAGTAGATTTTCAGAGAACTTAAT  
AAGAGAACTCAAGATTTCTGGGAAGTTCAATTAGGAATACCACATCCTGCAGGGT  
TAAAACAGAAAAAATCAGTAACAGTACTGGATGTGGGCGATGCATATTTTTTCAGT  
TCCCTTAGATAAAGACTTCAGGAAGTATACTGCATTTACCATACCTAGTATAAACA  
ATGAGACACCAGGGATTAGATATCAGTACAATGTGCTTCCACAGGGATGGAAAGG  
ATCACCAGCAATATTCCAGTGTAGCATGACAAAAATCTTAGAGCCTTTTAGAAAA  
CAAAATCCAGACATAGTCATCTATCAATACATGGATGATTTGTATGTAGGATCTGA  
CTTAGAAATAGGGCAGCATAGAACAAAAATAGAGGAACTGAGACAACATCTGTTG  
AGGTGGGGATTTACCACACCAGACAAAAAACATCAGAAAGAACCTCCATTCCTTT  
GGATGGGTTATGAACTCCATCCTGATAAATGGACAGTACAGCCTATAGTGCTGCC  
AGAAAAGGACAGCTGGACTGTCAATGACATACAGAAATTAGTGGGAAAATTGAAT  
TGGGCAAGTCAGATTTATGCAGGGATTAAAGTAAGGCAATTATGTAACTTCTTA  
GGGGAACCAAAAGCACTAACAGAAGTAGTACCACTAACAGAAGAAGCAGAGCTAG  
AACTGGCAGAAAACAGGGAGATTCTAAAAGAACCGGTACATGGAGTGTATTATGA  
CCCATCAAAAGACTTAATAGCAGAAATACAGAAGCAGGGGCAAGGCCAATGGAC  
ATATCAAATTTATCAAGAGCCATTTAAAAATCTGAAAACAGGAAAGTATGCAAGA  
ATGAAGGGTGCCCACTAATGATGTGAAACAATTAACAGAGGCAGTACAAAAA  
ATAGCCACAGAAAGCATAGTAATATGGGGAAAGACTCCTAAATTTAAATTACCCA

10

20

30

40

50

## 【化 4 3 - 2】

TACAAAAGGAAACATGGGAAGCATGGTGGACAGAGTATTGGCAAGCCACCTGGA  
TTCCTGAGTGGGAGTTTGTCAATACCCCTCCCTTAGTGAAGTTATGGTACCAGTTA  
GAGAAAGAACCCATAATAGGAGCAGAACTTTCTATGTAGATGGGGCAGCCAATA  
GGGAAACTAAATTAGGAAAAGCAGGATATGTAAGTACAGAGGAAGACAAAAAG  
TTGTCCCCCTAACGGACACAACAAATCAGAAGACTGAGTTACAAGCAATTCATCT  
AGCTTTGCAGGATTCGGGATTAGAAGTAAACATAGTGACAGACTCACAATATGCA  
TTGGGAATCATTCAAGCACAACCAGATAAGAGTGAATCAGAGTTAGTCAGTCAA  
TAATAGAGCAGTTAATAAAAAAGGAAAAAGTCTACCTGGCATGGGTACCAGCACA  
CAAAGGAATTGGAGGAAATGAACAAGTAGATAAATTGGTCAGTGCTGGAATCAG  
GAAAGTACTATTTTATAGATGGAATAGATAAGGCCCAAGAAGAACATGAGAAATAT  
CACAGTAATTGGAGAGCAATGGCTAGTGATTTTAACCTACCACCTGTAGTAGCAA  
AAGAAATAGTAGCCAGCTGTGATAAATGTCAGCTAAAAGGGGAAGCCATGCATGG  
ACAAGTAGACTGTAGCCCAGGAATATGGCAGCTAGATTGTACACATTTAGAAGGA  
AAAGTTATCTTGGTAGCAGTTCATGTAGCCAGTGGATATATAGAAGCAGAAGTAA  
TTCCAGCAGAGACAGGGCAAGAAACAGCATACTTCCTCTTAAAATTAGCAGGAAG  
ATGGCCAGTAAAAACAGTACATACAGACAATGGCAGCAATTTCCACAGTACTACA  
GTTAAGGCCGCCTGTTGGTGGGCGGGGATCAAGCAGGAATTTGGCATTCCCTACA  
ATCCCCAAAGTCAAGGAGTAATAGAATCTATGAATAAAGAATTAAAGAAAATTAT  
AGGACAGGTAAGAGATCAGGCTGAACATCTTAAGACAGCAGTACAAATGGCAGT  
ATTCATCCACAATTTTAAAAGAAAAGGGGGGATTGGGGGGTACAGTGCAGGGGAA  
AGAATAGTAGACATAATAGCAACAGACATACAACTAAAGAATTACAAAAACAA  
ATTACAAAAATTCAAATTTTCGGGTTTATTACAGGGACAGCAGAGATCCAGTTTG  
GAAAGGACCAGCAAAGCTCCTCTGGAAAGGTGAAGGGGCAGTAGTAATACAAGA  
TAATAGTGACATAAAAGTAGTGCCAAGAAGAAAAGCAAAGATCATCAGGGATTAT  
GGAAAACAGATGGCAGGTGATGATTGTGTGGCAAGTAGACAGGATGAGGATTAA  
( 配列番号 83)

10

20

30

## 【 0 2 0 6 】

次に、Rev、RRE、およびウサギベータグロビンポリA配列を含み、XbaIおよびXmaI隣接制限部位を有するDNA断片が、MWG Operonによって合成された。その後、DNA断片を、プラスミドのXbaIおよびXmaI制限部位に挿入した。DNA配列は、以下の通りであった：

40

## 【化 4 4】

TCTAGAATGGCAGGAAGAAGCGGAGACAGCGACGAAGAGCTCATCAGAACAGTC  
 AGACTCATCAAGCTTCTCTATCAAAGCAACCCACCTCCCAATCCCGAGGGGACCC  
 GACAGGCCCCGAAGGAATAGAAGAAGAAGGTGGAGAGAGAGACAGAGACAGATC  
 CATTCGATTAGTGAACGGATCCTTGGCACTTATCTGGGACGATCTGCGGAGCCTGT  
 GCCTCTTCAGCTACCACCGCTTGAGAGACTTACTCTTGATTGTAACGAGGATTGTG  
 GAACTTCTGGGACGCAGGGGGTGGGAAGCCCTCAAATATTGGTGGAATCTCCTAC  
 AATATTGGAGTCAGGAGCTAAAGAATAGAGGAGCTTTGTTCCCTTGGGTTCTTGGG  
 AGCAGCAGGAAGCACTATGGGCGCAGCGTCAATGACGCTGACGGTACAGGCCAG  
 ACAATTATTGTCTGGTATAGTGCAGCAGCAGAACAATTTGCTGAGGGCTATTGAG  
 GCGCAACAGCATCTGTTGCAACTCACAGTCTGGGGCATCAAGCAGCTCCAGGCAA  
 GAATCCTGGCTGTGGAAAGATACCTAAAGGATCAACAGCTCCTAGATCTTTTTCCC  
 TCTGCCAAAAATTATGGGGACATCATGAAGCCCCTTGAGCATCTGACTTCTGGCTA  
 ATAAAGGAAATTTATTTTCATTGCAATAGTGTGTTGGAATTTTTTGTGTCTCTCACT  
 CGGAAGGACATATGGGAGGGCAAATCATTAAAACATCAGAATGAGTATTTGGTT  
 TAGAGTTTGGCAACATATGCCATATGCTGGCTGCCATGAACAAAGGTGGCTATAA  
 AGAGGTCATCAGTATATGAAACAGCCCCCTGCTGTCCATTCTTATTCATAGAAA  
 AGCCTTGACTTGAGGTTAGATTTTTTTTATATTTTGTGTTATTTTTTTCTTTA  
 ACATCCCTAAAATTTTCCTTACATGTTTTACTAGCCAGATTTTTCTCCTCTCCTGA  
 CTACTCCCAGTCATAGCTGTCCCTCTTCTCTTATGAAGATCCCTCGACCTGCAGCCC  
 AAGCTTGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCA  
 CAATTCCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAGCCTGGGGTGCCTA  
 ATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCCTTTCCAGTCGG  
 GAAACCTGTCGTGCCAGCGGATCCGCATCTCAATTAGTCAGCAACCATAGTCCCGC  
 CCCTAACTCCGCCCATCCCGCCCCTAACTCCGCCCAGTTCCGCCCATTCTCCGCCCC  
 ATGGCTGACTAATTTTTTTTATTTATGCAGAGGCCGAGGCCGCCTCGGCCTCTGAG  
 CTATTCCAGAAGTAGTGAGGAGGCTTTTTTGGAGGCCTAGGCTTTTGCAAAAAGCT  
 AACTTGTTTATTGCAGCTTATAATGGTTACAAATAAAGCAATAGCATCACAAATTT  
 CACAAATAAAGCATTTTTTTTCACTGCATTCTAGTTGTGGTTTGTCCAAACTCATCAA  
 TGTATCTTATCAGCGGCCGCCCCGGG ( 配列番号 84)

## 【 0 2 0 7】

最後に、pCDNA3.1のCMVプロモーターを、CAGエンハンサー/プロモーター+ニワトリベータアクチンイントロン配列と置換した。CAGエンハンサー/プロモーター/イントロン配列を含み、MluIおよびEcoRI隣接制限部位を有するDNA断片が、MWG Operonによって合成された。その後、DNA断片を、プラスミドのMluIおよびEcoRI制限部位に挿入した。DNA配列は以下の通りであった：

10

20

30

40

## 【化 4 5】

ACGCGTTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATA  
 TGGAGTTCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAAC  
 GACCCCCGCCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGG  
 GACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGACTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAG  
 TACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAA  
 TGGCCCGCCTGGCATTATGCCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCA  
 GTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGGTTCGAGGTGAGCCCCACGTTC  
 TGCTTCACTCTCCCCATCTCCCCCCCCCTCCCCACCCCCAATTTTGTATTTATTTATTT  
 TTTAATTATTTTGTGCAGCGATGGGGGCGGGGGGGGGGGGGGGGGCGCGCGCCAGGCG  
 GGGCGGGGCGGGGCGAGGGGCGGGGCGGGGCGAGGCGGAGAGGTGCGGCGGCA  
 GCCAATCAGAGCGGCGCGCTCCGAAAGTTTCCTTTTATGGCGAGGCGGCGGCGGC  
 GGGCGGCCCTATAAAAAGCGAAGCGCGCGGGCGGGCGGGAGTCGCTGCGTTGCCTTC  
 GCCCCGTGCCCCGCTCCGCGCCGCCTCGCGCCGCCCGCCCCGGCTCTGACTGACCG  
 CGTTACTCCCACAGGTGAGCGGGCGGGACGGCCCTTCTCCTCCGGGCTGTAATTAG  
 CGCTTGGTTTAATGACGGCTCGTTTCTTTTCTGTGGCTGCGTGAAAGCCTTAAAGG  
 GCTCCGGGAGGGCCCTTTGTGCGGGGGGAGCGGCTCGGGGGGTGCGTGCGTGTG  
 TGTGTGCGTGGGGAGCGCCGCGTGCGGCCCGCGCTGCCCGGCGGCTGTGAGCGCT  
 GCGGGCGCGGCGCGGGGCTTTGTGCGCTCCGCGTGTGCGCGAGGGGAGCGCGGCC  
 GGGGGCGGTGCCCCGCGGTGCGGGGGGGCTGCGAGGGGAACAAAGGCTGCGTGC  
 GGGGTGTGTGCGTGGGGGGGTGAGCAGGGGGTGTGGGCGCGGCGGTTCGGGCTGT  
 AACCCCCCCTGCACCCCCCTCCCCGAGTTGCTGAGCACGGCCCCGGCTTCGGGTGC  
 GGGGCTCCGTGCGGGGCGTGGCGCGGGGCTCGCCGTGCCGGGCGGGGGGTGGCG  
 GCAGGTGGGGGTGCCGGGCGGGGCGGGGCCGCTCGGGCCGGGGAGGGCTCGGG  
 GGAGGGGCGCGGCGGCCCCGGAGCGCCGGCGGCTGTGAGGCGCGGCGAGCCGC  
 AGCCATTGCCTTTTATGGTAATCGTGCGAGAGGGCGCAGGGACTTCCTTTGTCCCA  
 AATCTGGCGGAGCCGAAATCTGGGAGGCGCCGCCGACCCCCCTCTAGCGGGCGCG  
 GGCGAAGCGGTGCGGCGCCGGCAGGAAGGAAATGGGCGGGGAGGGCCTTCGTGC  
 GTCGCCGCGCCGCGTCCCCCTTCTCCATCTCCAGCCTCGGGGCTGCCGCAGGGGGA  
 CGGCTGCCTTCGGGGGGGACGGGGCAGGGCGGGGTTCGGCTTCTGGCGTGTGACC  
 GGCGGGAATTC ( 配列番号 85)

10

20

30

40

## 【 0 2 0 8 】

V S V - G エンベローププラスミドの構築：

隣接する E c o R I 制限部位を有する水疱性口内炎インディアンウイルス糖タンパク質  
 ( V S V - G ) 配列が、M W G O p e r o n によって合成された。その後、D N A 断片  
 を、p C D N A 3 . 1 プラスミド ( I n v i t r o g e n ) の E c o R I 制限部位に挿入  
 し、C M V 特異的プライマーを使用して配列決定することにより、配向性が正しいことを  
 決定した。D N A 配列は以下の通りであった：

## 【化 4 6】

GAATTCATGAAGTGCCTTTTGTACTTAGCCTTTTATTCAATTGGGGTGAATTGCAAG  
 TTCACCATAGTTTTTCCACACAACCAAAAAGGAACTGGAAAAATGTTCTTCTAA  
 TTACCATTATTGCCCCGTCAAGCTCAGATTTAAATTGGCATAATGACTTAATAGGCA  
 CAGCCTTACAAGTCAAAATGCCCAAGAGTCACAAGGCTATTCAAGCAGACGGTTG  
 GATGTGTCATGCTTCCAAATGGGTCCTACTTGTGATTTCCGCTGGTATGGACCGA  
 AGTATATAACACATTCCATCCGATCCTTCACTCCATCTGTAGAACAATGCAAGGAA  
 AGCATTGAACAAACGAAACAAGGAACTTGGCTGAATCCAGGCTTCCCTCCTCAAA  
 GTTGTGGATATGCAACTGTGACGGATGCCGAAGCAGTGATTGTCCAGGTGACTCCT  
 CACCATGTGCTGGTTGATGAATACACAGGAGAATGGGTTGATTCACAGTTCATCA  
 ACGGAAAATGCAGCAATTACATATGCCCCACTGTCCATAACTCTACAACCTGGCAT  
 TCTGACTATAAGGTCAAAGGGCTATGTGATTCTAACCTCATTTCATGGACATCAC  
 CTTCTTCTCAGAGGACGGAGAGCTATCATCCCTGGGAAAGGAGGGCACAGGGTTC  
 AGAAGTAACTACTTTGCTTATGAACTGGAGGCAAGGCCTGCAAAATGCAATACT  
 GCAAGCATTGGGGAGTCAGACTCCCATCAGGTGTCTGGTTCGAGATGGCTGATAA  
 GGATCTCTTTGCTGCAGCCAGATTCCCTGAATGCCCAGAAGGGTCAAGTATCTCTG  
 CTCCATCTCAGACCTCAGTGGATGTAAGTCTAATTCAGGACGTTGAGAGGATCTTG  
 GATTATTCCTCTGCCAAGAAACCTGGAGCAAAATCAGAGCGGGTCTTCCAATCTC  
 TCCAGTGGATCTCAGCTATCTTGCTCCTAAAAACCCAGGAACCGGTCTGCTTTCA  
 CCATAATCAATGGTACCCTAAAATACTTTGAGACCAGATACATCAGAGTCGATATT  
 GCTGCTCCAATCCTCTCAAGAATGGTCGGAATGATCAGTGGAACCTACCACAGAAA  
 GGGAACCTGTGGGATGACTGGGCACCATATGAAGACGTGGAAATTGGACCCAATGG  
 AGTTCTGAGGACCAGTTCAGGATATAAGTTTCCTTTATACATGATTGGACATGGTA  
 TGTTGGACTCCGATCTTCATCTTAGCTCAAAGGCTCAGGTGTTTGAACATCCTCAC  
 ATTCAAGACGCTGCTTCGCAACTTCCTGATGATGAGAGTTTATTTTTTGGTGATACT  
 GGGCTATCCAAAAATCCAATCGAGCTTGTAGAAGGTTGGTTCAGTAGTTGGAAAA  
 GCTCTATTGCCTCTTTTTTCTTTATCATAGGGTTAATCATTGGACTATTCTTGGTTCT  
 CCGAGTTGGTATCCATCTTTGCATTAAATTAAGCACACCAAGAAAAGACAGATTT  
 ATACAGACATAGAGATGAGAATTC ( 配列番号 86)

10

20

30

## 【0209】

また、4ベクターシステム（つまり、3ベクターレンチウイルスパッケージングシステム）を、本明細書に記載されている方法および材料を使用して設計および生成した。4ベクターシステムの模式図は、図5に示されている。図5を参照して手短かに言えば、最上段のベクターは、ヘルパープラスミドであり、この場合は、Revを含んでいない。最上段から2つ目のベクターは、別のRevプラスミドである。最下段から2つ目のベクターは、エンベローププラスミドである。最下段のベクターは、上述した療法用ベクターである。

## 【0210】

部分的に図5を参照して、ヘルパープラスミドは、CAGエンハンサー（配列番号49）；CAGプロモーター（配列番号50）；ニワトリベータアクチンイントロン（配列番号51）；HIV gag（配列番号52）；HIV Pol（配列番号53）；HIV

40

50

I n t ( 配列番号 5 4 ) ; H I V R R E ( 配列番号 5 5 ) ; およびウサギベータグロビンポリ A ( 配列番号 5 6 ) を含む。

【 0 2 1 1 】

R e v プラスミドは、R S V プロモーター ( 配列番号 5 7 ) ; H I V R e v ( 配列番号 5 8 ) ; およびウサギベータグロビンポリ A ( 配列番号 5 9 ) を含む。

【 0 2 1 2 】

エンベローププラスミドは、C M V プロモーター ( 配列番号 6 0 ) ; ベータグロビンイントロン ( 配列番号 6 1 ) ; V S V - G ( 配列番号 6 2 ) ; およびウサギベータグロビンポリ A ( 配列番号 6 3 ) を含む。

【 0 2 1 3 】

ヘルパー、R e v、およびエンベローププラスミドを含む 3 ベクターレンチウイルスパッケージングシステムの合成。

材料および方法：

R e v を含まないヘルパープラスミドの構築：

R e v を含まないヘルパープラスミドを、R R E およびウサギベータグロビンポリ A 配列を含む D N A 断片を挿入することにより構築した。隣接する X b a I および X m a I 制限部位を有するこの配列は、M W G O p e r o n によって合成された。その後、R R E / ウサギポリ A ベータグロビン配列を、ヘルパープラスミドの X b a I および X m a I 制限部位に挿入した。D N A 配列は以下の通りである：

10

20

30

40

50

## 【化 4 7】

TCTAGAAGGAGCTTTGTTCCCTGGGTTCTTGGGAGCAGCAGGAAGCACTATGGGC  
GCAGCGTCAATGACGCTGACGGTACAGGCCAGACAATTATTGTCTGGTATAGTGC  
AGCAGCAGAACAATTTGCTGAGGGCTATTGAGGCGCAACAGCATCTGTTGCAACT  
CACAGTCTGGGGCATCAAGCAGCTCCAGGCAAGAATCCTGGCTGTGGAAAGATAC  
CTAAAGGATCAACAGCTCCTAGATCTTTTTCCCTCTGCCAAAAATTATGGGGACAT  
CATGAAGCCCCTTGAGCATCTGACTTCTGGCTAATAAAGGAAATTTATTTTCATTG  
CAATAGTGTGTTGGAATTTTTTGTGTCTCTCACTCGGAAGGACATATGGGAGGGCA  
AATCATTTAAAACATCAGAATGAGTATTTGGTTTAGAGTTTGGCAACATATGCCAT  
ATGCTGGCTGCCATGAACAAAGGTGGCTATAAAGAGGTCATCAGTATATGAAACA  
GCCCCCTGCTGTCCATTCCCTTATCCATAGAAAAGCCTTGACTTGAGGTTAGATTTT  
TTTTATATTTTGTTTTGTGTTATTTTTTTCTTTAACATCCCTAAAATTTTCCTTACAT  
GTTTTACTAGCCAGATTTTTTCCTCCTCTCCTGACTACTCCAGTCATAGCTGTCCCT  
CTTCTCTTATGAAGATCCCTCGACCTGCAGCCCAAGCTTGGCGTAATCATGGTCAT  
AGCTGTTTCCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAATTCCACACAACATACGAGCC  
GGAAGCATAAAGTGTAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAA  
TTGCGTTGCGCTCACTGCCCCGCTTTCAGTCGGGAAACCTGTCGTGCCAGCGGATC  
CGCATCTCAATTAGTCAGCAACCATAGTCCCGCCCCTAACTCCGCCCATCCCGCCC  
CTAACTCCGCCCAGTTCCGCCCATTCTCCGCCCCATGGCTGACTAATTTTTTTTATT  
TATGCAGAGGCCGAGGCCGCTCGGCCTCTGAGCTATTCCAGAAGTAGTGAGGAG  
GCTTTTTTGGAGGCCTAGGCTTTTGCAAAAAGCTAACTTGTTTATTGCAGCTTATA  
ATGGTTACAAATAAAGCAATAGCATCACAAATTTACAAATAAAGCATTTTTTTTCA  
CTGCATTCTAGTTGTGGTTTGTCCAACTCATCAATGTATCTTATCACCCGGG

10

20

30

( 配列番号 87)

## 【 0 2 1 4 】

R e v プラスミドの構築：

R S V プロモーターおよび H I V R e v 配列が、隣接する M f e I および X b a I 制限部位を有する単一 D N A 断片として、M W G O p e r o n によって合成された。その後、D N A 断片を、C M V プロモーターが R S V プロモーターに置換されている p C D N A 3 . 1 プラスミド ( I n v i t r o g e n ) の M f e I および X b a I 制限部位に挿入した。D N A 配列は以下の通りであった：

40

50



## 【化 4 8】

CAATTGCGATGTACGGGCCAGATATACGCGTATCTGAGGGGACTAGGGTGTGTTT  
 AGGCGAAAAGCGGGGCTTCGGTTGTACGCGGTTAGGAGTCCCCTCAGGATATAGT  
 AGTTTCGCTTTTGCATAGGGAGGGGGAAATGTAGTCTTATGCAATACACTTGTAGT  
 CTTGCAACATGGTAACGATGAGTTAGCAACATGCCTTACAAGGAGAGAAAAAGCA  
 CCGTGCATGCCGATTGGTGAAGTAAGGTGGTACGATCGTGCCTTATTAGGAAGG  
 CAACAGACAGGTCTGACATGGATTGGACGAACCACTGAATTCCGCATTGCAGAGA  
 TAATTGTATTTAAGTGCCTAGCTCGATACAATAAACGCCATTTGACCATTACCCAC  
 ATTGGTGTGCACCTCCAAGCTCGAGCTCGTTTGTAGTGAACCGTCAGATCGCCTGGAG  
 ACGCCATCCACGCTGTTTTGACCTCCATAGAAGACACCGGGACCGATCCAGCCTCC  
 CCTCGAAGCTAGCGATTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAGCGGAGACAGCGAC  
 GAAGAACTCCTCAAGGCAGTCAGACTCATCAAGTTTCTCTATCAAAGCAACCCAC  
 CTCCCAATCCCGAGGGGACCCGACAGGCCCGAAGGAATAGAAGAAGAAGGTGGA  
 GAGAGAGACAGAGACAGATCCATTTCGATTAGTGAACGGATCCTTAGCACTTATCT  
 GGGACGATCTGCGGAGCCTGTGCCTCTTCAGCTACCACCGCTTGAGAGACTTACTC  
 TTGATTGTAACGAGGATTGTGGAACCTTCTGGGACGCAGGGGGTGGGAAGCCCTCA  
 AATATTGGTGAATCTCCTACAATATTGGAGTCAGGAGCTAAAGAATAGTCTAGA  
 ( 配列番号 88)

10

20

## 【0 2 1 5】

2ベクターおよび3ベクターパッケージングシステムのプラスミドを、類似のエレメントで改変し、ベクター機能を喪失させずにイントロン配列を潜在的に除去することができる。例えば、以下のエレメントを、2ベクターおよび3ベクターパッケージングシステムの類似エレメントの代わりに使用することができる可能性がある。

30

## 【0 2 1 6】

プロモーター：伸長因子 - 1 (EF - 1) (配列番号 64)、ホスホグリセリン酸キナーゼ (PGK) (配列番号 65)、およびユビキチン C (UbC) (配列番号 66) を、CMV (配列番号 60) またはCAGプロモーター (配列番号 100) の代わりに使用することができる。

## 【0 2 1 7】

ポリA配列：SV40ポリA (配列番号 67) およびbGHポリA (配列番号 68) を、ウサギベータグロビンポリA (配列番号 48) の代わりに使用することができる。

## 【0 2 1 8】

HIV Gag、Pol、およびインテグラーゼ配列：ヘルパープラスミド中のHIV配列は、異なるHIV株またはクレードから構築することができる。例えば、Bal株に由来するHIV Gag (配列番号 69)；HIV Pol (配列番号 70)；およびHIV Int (配列番号 71) を、本明細書で概説されているようなヘルパー/ヘルパー+Revプラスミドに含まれているgag、pol、およびint配列と交換することができる。

40

## 【0 2 1 9】

エンベロープ：VSV-G糖タンパク質は、ネコ内在性ウイルス (RD114) (配列番号 72)、テナガザル類人猿白血病ウイルス (GALV) (配列番号 73)、狂犬病 (FUG) (配列番号 74)、リンパ球脈絡髄膜炎ウイルス (LCMV) (配列番号 75)、インフルエンザA型家禽ペストウイルス (FPV) (配列番号 76)、ロスリバーアル

50

ファウウイルス (RRV) (配列番号 77)、マウス白血病ウイルス 10A1 (MLV) (配列番号 78)、またはエボラウイルス (EbV) (配列番号 79) に由来する膜糖タンパク質と置換することができる。これらのエンベロープの配列は、本明細書中の配列部分で特定されている。

#### 【0220】

要約すると、3ベクターシステム対4ベクターシステムは、以下のように比較および対比させることができる。3ベクターレンチウイルスベクターシステムは、以下のものを含む：1.ヘルパープラスミド：HIV Gag、Pol、インテグラーゼ、および Rev/Tat；2.エンベローププラスミド：VSV-G/FUGエンベロープ；および3.療法用ベクター：RSV 5'LTR、Psiパッケージングシグナル、Gag断片、RRE、Env断片、cPPT、WPRE、および3'デルタLTR。4ベクターレンチウイルスベクターシステムは、以下のものを含む：1.ヘルパープラスミド：HIV Gag、Pol、およびインテグラーゼ；2.Revプラスミド：Rev；3.エンベローププラスミド：VSV-G/FUGエンベロープ；および4.療法用ベクター：RSV 5'LTR、Psiパッケージングシグナル、Gag断片、RRE、Env断片、cPPT、WPRE、および3'デルタLTR。上記の元素に対応する配列は、本明細書の配列表部分で特定されている。

#### 【0221】

(実施例2：抗HIVレンチウイルスベクターの開発)

この実施例の目的は、抗HIVレンチウイルスベクターを開発することであった。

#### 【0222】

阻害性RNA設計。ホモ・サピエンス (Homo sapiens) ケモカインC-Cモチーフ受容体5 (CCR5) (GC03P046377) mRNAの配列を使用して、ヒト細胞のCCR5レベルをノックダウンする潜在的なsiRNAまたはshRNA候補を探索した。潜在的RNA干渉配列は、Broad InstituteからなどのsiRNAまたはshRNA設計プログラムまたはThermo ScientificからのBLOCK-iT RNAi Designerによって選択された候補から選んだ。shRNA発現を調節するために、H1、U6、または7SKのようなRNAポリメラーゼIIIプロモーターのすぐ3'側へ、個々の選択したshRNA配列をレンチウイルスベクターに挿入した。これらのレンチウイルス-shRNA構築物を使用して、細胞に形質導入し、特異的mRNAレベルの変化を測定した。mRNAレベルを減少させるために最も強力なshRNAは、CMVまたはEF-1アルファRNAポリメラーゼIIIプロモーターのいずれかによる発現を可能にするために、マイクロRNA骨格内に個々に埋め込んだ。マイクロRNA骨格はmirbase.org/から選択された。RNA配列はまた、合成siRNAオリゴヌクレオチドとして合成され、レンチウイルスベクターを使用せずに直接細胞内に導入された。

#### 【0223】

ヒト免疫不全ウイルス1型のBaL株のゲノム配列 (HIV-1 85US\_\_BaL、受託番号AY713409) を使用して、ヒト細胞におけるHIV複製レベルをノックダウンする潜在的なsiRNAまたはshRNA候補を探索した。配列相溶性および経験に基づいて、HIVのTatおよびVif遺伝子の領域に探索の焦点を合わせたが、当業者はこれらの領域の使用が非限定的であり、他の潜在的な標的が選択され得ることを理解する。重要なことに、Gagまたはポリメラーゼ遺伝子の高保存領域は、これらの同配列がベクター製造に必要なパッケージングシステム補完プラスミドに存在したため、shRNAによって標的化することができなかった。CCR5 (NM 000579.3、NM 001100168.1特異的) RNAと同様に、潜在的なHIV特異的RNA干渉配列は、Broad Institute (broadinstitute.org/mai/public) が主催するGene-E Software SuiteからなどのsiRNAもしくはshRNAデザインプログラムまたはThermo ScientificからのBLOCK-iT RNAi Designer (rnadesigner.the

rmofisher.com/rnaiexpress/setOption.do?designOption=shrna&pid=6712627360706061801)によって選択された候補から選択された。shRNA発現を調節するために、H1、U6、または7SKのようなRNAポリメラーゼIIプロモーターのすぐ3'側へ、個々の選択したshRNA配列をレンチウイルスベクターに挿入した。これらのレンチウイルス-shRNA構築物を使用して、細胞に形質導入し、特異的mRNAレベルの変化を測定した。mRNAレベルを減少させるために最も強力なshRNAは、CMVまたはEF-1アルファRNAポリメラーゼIIプロモーターのいずれかによる発現を可能にするために、マイクロRNA骨格内に個々に埋め込んだ。

#### 【0224】

ベクター構築。CCR5、TatまたはVif shRNAについて、BamHIおよびEcoRI制限部位を含むオリゴヌクレオチド配列が、Eurofins MWG Operon, LLCによって合成された。オーバーラップするセンスおよびアンチセンスオリゴヌクレオチド配列を混合し、70 から室温まで冷却する間にアニールさせた。レンチウイルスベクターを制限酵素BamHIおよびEcoRIで、37 で1時間、消化した。消化したレンチウイルスベクターをアガロースゲル電気泳動で精製し、InvitrogenのDNAゲル抽出キットを使用してゲルから抽出した。DNA濃度を決定し、ベクター対オリゴ(3:1の比)を混合し、アニールさせ、ライゲーションした。ライゲーション反応はT4 DNAリガーゼを用いて室温で30分間実施した。2.5マイクロリットルのライゲーションミックスを25マイクロリットルのSTBL3コンピテント細菌細胞に添加した。形質転換は、42 でのヒートショック後に達成された。アンピシリンを含有する寒天プレート上に細菌細胞を広げ、薬物耐性コロニー(アンピシリン耐性プラスミドの存在を示す)を回収し、精製し、LBブロスで増殖させた。オリゴ配列の挿入をチェックするために、Invitrogen DNAミニプレップキットを用いて、収穫した細菌培養物からプラスミドDNAを抽出した。レンチウイルスベクター中のshRNA配列の挿入を、shRNA発現を調節するために使用されるプロモーターのための特異的プライマーを使用したDNA配列決定によって確認した。HIV複製を制限することが決定された例示的なベクター配列は、図6に見出すことができる。その後、例えば、CCR5、Tat、またはVif遺伝子発現に対して最も高い活性を有するshRNA配列を、EF-1アルファプロモーター制御下のマイクロRNA(miR)クラスターに組み立てた。プロモーターおよびmiRの配列を図6に示す。

#### 【0225】

さらに、標準的な分子生物学技術(例えば、Sambrook; Molecular Cloning: A Laboratory Manual、第4版)ならびに本明細書に記載されている技術を使用して、本明細書の図7に示されているように、一連のレンチウイルスベクターを開発した。

#### 【0226】

ベクター1を開発した。ベクター1は、左から右に向かって以下のものを含む: 末端反復配列(LTR)部分(配列番号35); H1エレメント(配列番号101); shCCR5(配列番号16、18、20、22、または24); ウッドチャック肝炎ウイルスの転写後調節エレメント(WPRE)(配列番号32、80); および末端反復配列部分(配列番号102)。

#### 【0227】

ベクター2を開発した。ベクター2は、左から右に向かって以下のものを含む: 末端反復配列(LTR)部分(配列番号35); H1エレメント(配列番号101); shRev/Tat(配列番号10); H1エレメント(配列番号101); shCCR5(配列番号16、18、20、22、または24); ウッドチャック肝炎ウイルスの転写後調節エレメント(WPRE)(配列番号32、80); および末端反復配列部分(配列番号102)。

#### 【0228】

ベクター3を開発した。ベクター3は、左から右に向かって以下のものを含む: 末端反

10

20

30

40

50

復配列 ( L T R ) 部分 ( 配列番号 3 5 ) ; H 1 エlement ( 配列番号 1 0 1 ) ; s h G a g ( 配列番号 1 2 ) ; H 1 エlement ( 配列番号 1 0 1 ) ; s h C C R 5 ( 配列番号 1 6 、 1 8 、 2 0 、 2 2 、 または 2 4 ) ; ウッドチャック肝炎ウイルスの転写後調節Element ( W P R E ) ( 配列番号 3 2 、 8 0 ) ; および末端反復配列部分 ( 配列番号 1 0 2 ) 。

【 0 2 2 9 】

ベクター 4 を開発した。ベクター 4 は、左から右に向かって以下のものを含む：末端反復配列 ( L T R ) 部分 ( 配列番号 3 5 ) ; 7 S K Element ( 配列番号 1 0 3 ) ; s h R e v / T a t ( 配列番号 1 0 ) ; H 1 エlement ( 配列番号 1 0 1 ) ; s h C C R 5 ( 配列番号 1 6 、 1 8 、 2 0 、 2 2 、 または 2 4 ) ; ウッドチャック肝炎ウイルスの転写後調節Element ( W P R E ) ( 配列番号 3 2 、 8 0 ) ; および末端反復配列部分 ( 配列番号 1 0 2 ) 。

10

【 0 2 3 0 】

ベクター 5 を開発した。ベクター 5 は、左から右に向かって以下のものを含む：末端反復配列 ( L T R ) 部分 ( 配列番号 3 5 ) ; E F 1 Element ( 配列番号 4 ) ; m i R 3 0 C C R 5 ( 配列番号 1 ) ; M i R 2 1 V i f ( 配列番号 2 ) ; m i R 1 8 5 T a t ( 配列番号 3 ) ; ウッドチャック肝炎ウイルスの転写後調節Element ( W P R E ) ( 配列番号 3 2 、 8 0 ) ; および末端反復配列部分 ( 配列番号 1 0 2 ) 。

【 0 2 3 1 】

ベクター 6 を開発した。ベクター 6 は、左から右に向かって以下のものを含む：末端反復配列 ( L T R ) 部分 ( 配列番号 3 5 ) ; E F 1 Element ( 配列番号 4 ) ; m i R 3 0 C C R 5 ( 配列番号 1 ) ; M i R 2 1 V i f ( 配列番号 2 ) ; m i R 1 5 5 T a t ( 配列番号 1 0 4 ) ; ウッドチャック肝炎ウイルスの転写後調節Element ( W P R E ) ( 配列番号 3 2 、 8 0 ) ; および末端反復配列部分 ( 配列番号 1 0 2 ) 。

20

【 0 2 3 2 】

ベクター 7 を開発した。ベクター 7 は、左から右に向かって以下のものを含む：末端反復配列 ( L T R ) 部分 ( 配列番号 3 5 ) ; E F 1 Element ( 配列番号 4 ) ; m i R 3 0 C C R 5 ( 配列番号 1 ) ; M i R 2 1 V i f ( 配列番号 2 ) ; m i R 1 8 5 T a t ( 配列番号 3 ) ; ウッドチャック肝炎ウイルスの転写後調節Element ( W P R E ) ( 配列番号 3 2 、 8 0 ) ; および末端反復配列部分 ( 配列番号 1 0 2 ) 。

【 0 2 3 3 】

ベクター 8 を開発した。ベクター 8 は、左から右に向かって以下のものを含む：末端反復配列 ( L T R ) 部分 ( 配列番号 3 5 ) ; E F 1 Element ( 配列番号 4 ) ; m i R 3 0 C C R 5 ( 配列番号 1 ) ; M i R 2 1 V i f ( 配列番号 2 ) ; m i R 1 8 5 T a t ( 配列番号 3 ) ; および末端反復配列部分 ( 配列番号 1 0 2 ) 。

30

【 0 2 3 4 】

ベクター 9 を開発した。ベクター 9 は、左から右に向かって以下のものを含む：末端反復配列 ( L T R ) 部分 ( 配列番号 3 5 ) ; C D 4 Element ( 配列番号 3 0 ) ; m i R 3 0 C C R 5 ( 配列番号 1 ) ; m i R 2 1 V i f ( 配列番号 2 ) ; m i R 1 8 5 T a t ( 配列番号 3 ) ; ウッドチャック肝炎ウイルスの転写後調節Element ( W P R E ) ( 配列番号 3 2 、 8 0 ) ; および末端反復配列部分 ( 配列番号 1 0 2 ) 。

40

【 0 2 3 5 】

ベクターの開発

これらの実験のために開発されたベクターがすべて計画通りに機能したわけではなかったことに留意すべきである。より具体的には、H I V に対するレンチウイルスベクターは、3つの主要成分を含んでいてもよい：1) 標的細胞表面のH I V 結合タンパク質 ( 受容体 ) のレベルを低減させて、初期ウイルス付着および侵入を遮断するための阻害性R N A ; 2) ウイルスT a t タンパク質を隔離し、ウイルス遺伝子発現をトランス活性化するその能力を減少させることになるH I V T A R 配列の過剰発現 ; ならびに3) H I V ゲノム内の重要な保存配列を攻撃する阻害性R N A 。

【 0 2 3 6 】

50

上記の第1の点に関して、重要な細胞表面HIV結合タンパク質は、ケモカイン受容体CCR5である。HIV粒子は、CD4およびCCR5細胞表面タンパク質に結合することにより、感受性T細胞に付着する。CD4は、T細胞の免疫学的機能に重要である必須細胞表面糖タンパク質であるため、その発現レベルを操作する標的としては選択しなかった。しかしながら、CCR5遺伝子のヌル突然変異が生まれながらにホモ接合性であり、受容体発現が完全に欠如している人々は、少数の感染性疾患に対する感受性が増強されること、およびまれに自己免疫を発症する可能性があることを除けば、正常な生活を送る。CCR5発現を低減させるために全身CD4+ T細胞の比較的少数が遺伝子改変され、病原体免疫、または自己免疫の制御に必要なCD4+ T細胞が改変細胞中に存在する可能性は低いので、この実施例において安全性は増強される。したがって、CCR5のモジュレーションは、比較的安全的なアプローチであると判断し、抗HIVレンチウイルスベクターの開発における主要な標的とした。

10

#### 【0237】

上記の第2の点に関して、ウイルスTAR配列は、ウイルスTatタンパク質に強固に結合する、HIVゲノムRNAの高度構造化領域である。Tat:TAR複合体は、ウイルスRNAの効率的な生成に重要である。TAR領域の過剰発現は、Tatタンパク質を隔離し、ウイルスRNAのレベルを減少させるデコイ分子として企図されている。しかしながら、TARは、レンチウイルス粒子を製造するために使用される細胞を含むほとんどの哺乳動物細胞に毒性であることが証明された。さらに、TARは、他の実験室ではウイルス遺伝子発現の阻害が非効率的であり、HIV遺伝子治療における実行可能な成分としては放棄されている。

20

#### 【0238】

上記の第3の点に関して、以下の3つの基準を満たすウイルス遺伝子配列を特定した：  
i) 配列が、一連のHIV単離株にわたって適度に保存されており、目的の地理的領域のエピデミックを代表するものであること；  
ii) ウイルスベクター中の阻害性RNAの活性によるRNAレベルの低減が、HIV複製を有意義に低減させるのに十分な量だけ、対応するタンパク質レベルを低減させることになること；  
および  
iii) 阻害性RNAによって標的とされるウイルス遺伝子配列が、製造中にウイルスベクター粒子をパッケージングおよび組み入れるのに必要な遺伝子中に存在しないこと。ウイルス粒子自体の有効な機能に必要な遺伝子を標的とする阻害性RNAを有することは完全に不利であるので、最後の点は重要である。本実施形態では、HIV Tat遺伝子とRev遺伝子の接合部の配列、およびHIV Vif遺伝子内の第2の配列を、阻害性RNAによる標的とした。Tat/Rev標的化は、この領域が、HIVゲノムのエンベロープ遺伝子と重複するため、HIVエンベロープ糖タンパク質発現を低減するというさらなる利益を有する。

30

#### 【0239】

ベクターを開発および試験するための戦略は、まず、適切な標的を特定し（本明細書に記載のように）、その後、細胞モデルにおいて試験するための個々のまたは複数の阻害性RNA種を発現するプラスミドDNAを構築し、最終的には、実証済みの抗HIV機能を有する阻害性RNAを含むレンチウイルスベクターを構築することに依存する。レンチウイルスベクターを、毒性、in vitro産生中の収量、およびCCR5発現レベルを低減させるかまたはウイルス遺伝子産物を低下させてウイルス複製を阻害する点におけるHIVに対する有効性について試験する。

40

#### 【0240】

以下の表2には、複数のバージョンの阻害性構築物を経て臨床候補に到着するまでの経緯が示されている。まず、shRNA（短い相同性RNA）分子を設計し、プラスミドDNA構築物から発現させた。

#### 【0241】

以下の表2に詳述されているプラスミド1～4で、HIVのGag、Pol、およびRT遺伝子に対するshRNA配列を試験した。各shRNAは、細胞モデルにおいてウイルスタンパク質発現の抑制に活性であったが、さらなる開発を妨げた2つの重要な問題が

50

あった。第 1 に、それら配列は、北米および欧州で現在流布しているクレード B HIV 株を代表しない HIV の実験室単離株を標的としていた。第 2 に、これらの shRNA は、レンチウイルスベクターパッケージングシステムの重要な成分を標的としていたため、製造中にベクター収量を著しく低減することになるであろう。表 2 に詳述されているプラスミド 5 は、CCR5 を標的とするように選択され、リード候補配列を提供した。表 2 に詳述されているプラスミド 6、7、8、9、10、および 11 は、TAR 配列を組み込んでおり、レンチウイルスベクター製造に使用される細胞を含む哺乳動物細胞に対して許容できない毒性をもたらしたことが見出された。表 2 に詳述されているプラスミド 2 では、Tat RNA 発現を低減することができるリード shRNA 配列が特定された。表 2 に詳述されているプラスミド 12 は、レンチウイルスベクターのマイクロ RNA (miR) として発現された shCCR5 が有効であることを実証し、それが最終産物中にあるはずであることが確認された。表 2 に詳述されているプラスミド 13 は、レンチウイルスベクターのマイクロ RNA (miR) として発現された shVif が有効であることを実証し、それが最終産物中にあるはずであることが確認された。表 2 に詳述されているプラスミド 14 は、レンチウイルスベクターのマイクロ RNA (miR) として発現された shTat が有効であることを実証し、それが最終産物中にあるはずであることが確認された。表 2 に詳述されているプラスミド 15 は、miR CCR5、miR Tat、および miR Vif を、単一プロモーターから発現される miR クラスターの形態で含んでいた。これらの miR は、レンチウイルスベクターパッケージングシステムの重要な成分を標的とせず、哺乳動物細胞に対する毒性が無視できる程度であることが証明された。クラスター内の miR は、以前に試験された個々の miR と同等に有効であった。全体的な影響は、CCR5 指向性 HIV BAL 株の複製の大幅な低減であった。

10

20

30

40

50

## 【表 2 - 1】

表 2:HIV ベクターの開発

	内部コード	材料	説明	備考	決定
1	SIH-H1-shRT-1,3	レンチウイルスベクター	LAI 株の RT 用の shRNA 構築物	誤標的、実験用ウイルス、ウイルス試験無し	放棄
2	SIH-H1-shRT43 (Tat/Rev NL4-3)	レンチウイルスベクター	H1 プロモーター shRNA Tat/Rev オーバーラップ	Tat タンパク質ノックダウン>90%	リード
<p>ベクター構築: Rev/Tat(RT)shRNA について、BamHI および EcoRI 制限部位を含むオリゴヌクレオチド配列が、MWG Operon によって合成された。2 つの異なる Rev/Tat 標的配列を、Tat mRNA 発現を減少させるそれらの能力に関して試験した。RT1,3 標的配列は、(5'-ATGGCAGGAAGAAGCGGAG-3')(配列番号 89)であり、shRNA 配列は、(5'-ATGGCAGGAAGAAGCGGAGTTCAAGAGACTCCGCTTCTTCTGCCATTTTTT-3')(配列番号 90)である。RT43 配列は、(5'-GCGGAGACAGCGACGAAGAGC-3')(配列番号 9)であり、shRNA 配列は、(5'-GCGGAGACAGCGACGAAGAGCTTCAAGAGAGCTCTTCGTCGCTGTCTCCGCTTTTT-3')(配列番号 10)である。オリゴヌクレオチド配列を、pSIH レンチウイルスベクター(System Biosciences)に挿入した。</p> <p>Rev/Tat に対する shRNA の機能試験:ベクターが Tat 発現を低減する能力を、3'-UTR(mRNA の非翻訳領域)に挿入された Rev/Tat 標的配列を含むルシフェラーゼレポータープラスミドを使用して試験した。shRT1,3 または shRT43 プラスミドのいずれかを、ルシフェラーゼおよび Rev/Tar 標的配列を含むプラスミドと共に同時トランスフェクトした。shRT43 shRNA 配列では光放射が 90%低減し、その機能が強力であることが示されたが、shRT1,3 プラスミドでは 10%未満であった。</p> <p>結論: SIH-H1-shRT43 は、ルシフェラーゼアッセイシステムでの mRNA レベルを低減させた点で、SIH-H1-shRT-1,3 よりも優れていた。これは、shRT43 配列の阻害活性が強力であることを示す。shRT43 配列を、さらなる開発のリード候補として選択した。</p>					
3	SIH-H1-shGag-1	レンチウイルスベクター	LAI Gag の shRNA 構築物	Gag 発現を阻害するが、パッケージングを阻害することになる	放棄
<p>ベクター構築: Gag shRNA について、BamHI および EcoRI 制限部位を含むオリゴヌクレオチド配列が、MWG Operon によって合成された。Gag 標的配列を、Gag mRNA 発現を減少させるそれらの能力に関して試験した。Gag 標的配列は、(5'-GAAGAAATGATGACAGCAT-3')(配列番号 11)であり、shRNA 配列は、(5'-</p>					

【表 2 - 2】

<p>GAAGAAATGATGACAGCATTTCAAGAGAATGCTGTCATCATTTCTCTTTTT-3')(配列番号 12)である。オリゴヌクレオチド配列を、pSIH レンチウイルスベクター(System Biosciences)に挿入した。</p> <p><i>Gag</i> に対する <i>shRNA</i> の機能試験: ベクターが <i>Gag</i> 発現を低減する能力を、3'-UTR(mRNA の非翻訳領域)に挿入された <i>Gag</i> 標的配列を含むルシフェラーゼレポータープラスミドを使用して試験した。<i>Gag</i> プラスミドを、ルシフェラーゼおよび <i>Gag</i> 標的配列を含むプラスミドと共に同時トランスフェクトした。光放射がほぼ 90%低減され、sh<i>Gag</i> <i>shRNA</i> 配列の効果が強力であることが示された。</p> <p>結論: この <i>shRNA</i> 配列は、HIV <i>Gag</i> 発現に対して強力だが、放棄した。レンチウイルスパッケージングシステムは、ヘルパープラスミドからの <i>Gag</i> 産生を必要とし、<i>Gag</i> の <i>shRNA</i> 阻害は、レンチウイルスベクター収量を低減させることになる。この <i>shRNA</i> 配列は、HIV のオリゴヌクレオチド阻害剤として使用することができる。または異なるベクターゲノムが使用されているかもしくはこの <i>shRNA</i> による阻害に抵抗するように改変されている代替的ウイルスベクターパッケージングシステムに組み込んでよい。</p>					
4	SIH-H1-shPol-1	レンチウイルスベクター	Pol の <i>shRNA</i> 構築物	Pol 発現を阻害するが、パッケージングを阻害することになる	放棄
<p>ベクター構築: MWG Operon によって合成された、BamHI および EcoRI 制限部位を含むオリゴヌクレオチド配列を有する Pol <i>shRNA</i> を構築した。Pol 標的配列を、Pol mRNA 発現を減少させるその能力に関して試験した。Pol 標的配列は、(5'-CAGGAGCAGATGATACAG-3')(配列番号 13)であり、<i>shRNA</i> 配列は、(5'-CAGGAGATGATACAGTTCAAGAGACTGTATCATCTGCTCCTGTTTT-3')(配列番号 14)である。オリゴヌクレオチド配列を、pSIH レンチウイルスベクター(System Biosciences)に挿入した。</p> <p><i>HIV Pol</i> に対する <i>shRNA</i> の機能試験: ベクターが Pol 発現を低減する能力を、3'-UTR(mRNA の非翻訳領域)に挿入された Pol 標的配列を含むルシフェラーゼレポータープラスミドを使用して試験した。Pol プラスミドを、ルシフェラーゼおよび Pol 標的配列を含むプラスミドと共に同時トランスフェクトした。光放射が 60%低減され、shPol <i>shRNA</i> 配列の効果が強力であることが示された。</p> <p>結論: この <i>shRNA</i> 配列は、HIV Pol 発現に対して強力だが、放棄した。レンチウイルスパッケージングシステムは、ヘルパープラスミドからの Pol 産生を必要とし、Pol の <i>shRNA</i> 阻害は、レンチウイルスベクター収量を低減させることになる。この <i>shRNA</i> 配列は、HIV のオリゴヌクレオチド阻害剤として使用することができる。または異なるベクターゲノムが使用されているかもしくはこの <i>shRNA</i> による阻害に抵抗するように改変されている代替的ウイルスベクターパッケージングシステムに組み込んでよい。</p>					
5	SIH-H1-	レンチウイルス	CCR5 の	5 候補中で最良、細	リード

10

20

30

40

50



【表 2 - 3】

	shCCR5-1	ベクター	shRNA 構築物	胞外 CCR5 タンパク 質低減>90%	
<p>ベクター構築: MWG Operon によって合成された、BamHI および EcoRI 制限部位を含むオリゴヌクレオチド配列を有する CCR5 shRNA を構築した。オリゴヌクレオチド配列を、pSIH レンチウイルスベクター (System Biosciences) に挿入した。CCR5 遺伝子配列 1(配列番号 25)に着目する CCR5 標的配列#1 は、(5'-GTGTCAAGTCCAATCTATG-3')(配列番号 15)であり、shRNA 配列は、(5'-GTGTCAAGTCCAATCTATGTTCAAGAGACATAGATTGGACTTGACACTTTTT-3')(配列番号 16)である。CCR5 遺伝子配列 2(配列番号 26)に着目する CCR5 標的配列#2 は、(5'-GAGCATGACTGACATCTAC-3')(配列番号 17)であり、shRNA 配列は、(5'-GAGCATGACTGACATCTACTTCAAGAGAGTAGATGTCAGTCATGCTCTTTTT-3')(配列番号 18)である。CCR5 遺伝子配列 3(配列番号 27)に着目する CCR5 標的配列#3 は、(5'-GTAGCTCTAACAGGTTGGA-3')(配列番号 19)であり、shRNA 配列は、(5'-GTAGCTCTAACAGGTTGATTCAAGAGATCCAACTGTTAGAGCTACTTTTT-3')(配列番号 20)である。CCR5 遺伝子配列 4(配列番号 28)に着目する CCR5 標的配列#4 は、(5'-GTTTCAGAACTACCTCTTA-3')(配列番号 21)であり、shRNA 配列は、(5'-GTTTCAGAACTACCTCTTATTCAAGAGATAAGAGGTAGTTTCTGAACTTTTT-3')(配列番号 22)である。CCR5 遺伝子配列 5(配列番号 29)に着目する CCR5 標的配列#5 は、(5'-GAGCAAGCTCAGTTTACACC-3')(配列番号 23)であり、shRNA 配列は、(5'-GAGCAAGCTCAGTTTACACCTTCAAGAGAGGTGTAACTGAGCTTGCTCTTTTT-3')(配列番号 24)である。</p> <p>CCR5 に対する shRNA の機能試験: CCR5 shRNA 配列が、CCR5 RNA 発現をノックダウンする能力を、まず、5 つの CCR5 標的配列の 1 つを含むレンチウイルスプラスミドの各々を、各プラスミド毎に別の実験で、ヒト CCR5 遺伝子を発現するプラスミドと共に同時トランスフェクトすることにより試験した。次に、CCR5 mRNA 発現を、CCR5 特異的プライマーを使用して qPCR 分析によって評価した。</p> <p>結論: CCR5 mRNA レベルの低減に基づき、shRNACCR5-1 が、CCR5 遺伝子発現の低減に最も強力であった。この shRNA をリード候補として選択した。</p>					
6	SIH-U6-TAR	レンチウイルス ベクター	U6 プロモーター- TAR	細胞に毒性	放棄
7	SIH-U6-TAR- H1-shCCR5	レンチウイルス ベクター	U6 プロモーター- TAR-H1- shCCR5	細胞に毒性	放棄
8	U6-TAR-H1- shRT	レンチウイルス	U6 プロモーター-	HIV を抑制、細胞に	放棄

10

20

30

40

50

【表 2 - 4】

		ベクター	TAR-H1-RT	毒性、パッケージングが不良	
9	U6-TAR-7SK-shRT	レンチウイルスベクター	shRNA プロモーターを 7SK に変更	毒性、パッケージングが不良	放棄
10	U6-TAR-H1-shRT-H1-shCCR5	レンチウイルスベクター	U6 プロモーター-TAR-H1-RT-H1-shCCR5	毒性、パッケージングが不良、H1 が回復	放棄
11	U6-TAR-7SK-shRT-H1-CCR5	レンチウイルスベクター	shRNA プロモーターを 7SK に変更	毒性、パッケージングが不良	放棄
<p>ベクター構築: 隣接する KpnI 制限部位を含む TAR デコイ配列が、MWG operon によって合成され、pSIH レンチウイルスベクター(System Biosciences)の KpnI 部位に挿入された。このベクターでは、TAR 発現は、U6 プロモーターによって調節される。TAR デコイ配列は、(5'-CTTGCAATGATGTCGTAATTTGCGICTTACCTCGTTCTCGACAGCGACCAGATCTGAGCCTGGGAGCTCTCTGGCTGTCAGTAAGCTGGTACAGAAGGTTGACGAAAATTCTTACTGAGCAAGAAA-3')(配列番号 8)である。TAR デコイ配列の発現を、TAR 配列について特異的なプライマーを使用して qPCR 分析によって決定した。TAR 配列も含むさらなるベクターを構築した。H1 プロモーターおよび shRT 配列を、このベクターの XhoI 部位に挿入した。H1 shRT 配列は、(5'-GAACGCTGACGTCATCAACCCGCTCCAAGGAATCGCGGGCCAGTGTCCTAGGCGGGACACCCAGCGCGCGTGCGCCCTGGCAGGAAGATGGCTGTGAGGGACAGGGGAGTGGCGCCCTGCAATATTTGCATGTCGCTATGTGTTCTGGGAAATCACCATAAACGTGAAATGTCTTTGGATTTGGGAATCTTATAAGTTCTGTATGAGACCACTTGGATCCGCGGAGACAGCGACGAAGAGCTTCAAGAGAGCTCTTCGTCGCTGTCTCCGCTTTTT-3')(配列番号 91)である。このベクターは、TAR を発現し、RT をノックダウンすることができた。また、7SK プロモーターを H1 プロモーターの代わりに使用して、shRT 発現を調節した。U6 TAR、H1 shRT、および H1 shCCR5 を含む別のベクターを構築した。H1 shCCR5 配列を、U6 TAR および H1 shRT を含むプラスミドの SpeI 部位に挿入した。H1 CCR5 配列は、(5'-GAACGCTGACGTCATCAACCCGCTCCAAGGAATCGCGGGCCAGTGTCCTAGGCGGGACACCCAGCGCGCGTGCGCCCTGGCAGGAAGATGGCTGTGAGGGACAGGGGAGTGGCGCCCTGCAATATTTGCATGTCGCTATGTGTTCTGGGAAATCACCATAAACGTGAAATGTCTTTGGATTTGGGAATCTTATAAGTTCTGTATGAGACCACTTGGATCCGTGTCAAGTCCAATCTATGTTCAAGAGACATAGATTGGACTTGACACTTTTT-3')(配列番号 92)である。また、7SK プロモーターを H1 プロモーターの代わりに使用して、shRT 発現を調節した。</p> <p>TAR デコイ活性の機能試験: 本発明者らは、パッケージング効率に対する SIH-U6-TAR の効果を試験し</p>					

10

20

30

40

50

【表 2 - 5】

た。TAR 配列が含まれていた場合、SH パッケージングシステムでのベクター収量は、顕著に低減された。					
結論: TAR デコイ配列を発現するレンチウイルスベクターは、ベクター収量が低いため、商業的開発には適さない。これらの構築物は放棄した。					
12	shCCR5	レンチウイルス ベクター	マイクロ RNA 配 列	細胞外 CCR5 タンパ ク質低減>90%	リード
<p>ベクター構築: MWG Operon によって合成された、BsrGI および NotI 制限部位を含むオリゴヌクレオチド配列を有する CCR5 マイクロ RNA を構築した。オリゴヌクレオチド配列を、pCDH レンチウイルスベクター (System Biosciences) に挿入した。EF-1 プロモーターを、プラスミド構築物試験材料 5 で使用した CMV プロモーターの代わりに使用した。隣接する ClaI および BsrGI 制限部位を含む EF-1 プロモーターが、MWG Operon によって合成され、shCCR5-1 を含む pCDH ベクターに挿入された。EF-1 プロモーター配列は、(5'-</p> <p>CCGGTGCCTAGAGAAGGTGGCGCGGGGTAACTGGGAAAGTGATGTCGTGTACTGGCTC CGCCTTTTCCCGAGGGTGGGGGAGAACCGTATATAAGTGCAGTAGTCGCCGTGAACGT TCTTTTCGCAACGGGTTTGCCGCCAGAACACAGGTAAGTGCCGTGTGTGGTTCCCGCGG GCCTGGCCTCTTTACGGGTTATGGCCCTTGCCTGCTTGAATTACTTCCACGCCCCCTGGC TGCAGTACGTGATTCTTGATCCCGAGCTTCGGGTTGGAAGTGGGTGGGAGAGTTCGAGG CCTTGCGCTTAAGGAGCCCCCTTCGCCCTGCTGCTTGAAGGCTGGCCTGGGCGCTGG GGCCGCCGCGTGCAATCTGGTGGCACCTTCGCGCCTGCTCCTGCTGCTTTCGATAAGTCT CTAGCCATTTAAATTTTGTATGACCTGCTGCGACGCTTTTTTCTGGCAAGATAGTCTTG TAAATGCGGGCCAAGATCTGCACACTGGTATTTCGGTTTTTGGGGCCGCGGGCGGCGAC GGGGCCCCGTGCGTCCAGCGCACATGTTCCGGCGAGGCGGGGCCCTGCGAGCGCGGCCACC GAGAATCGGACGGGGGTAGTCTCAAGCTGGCCGGCCTGCTCTGGTGCCTGGCCTCGCGC CGCCGTGTATCGCCCCGCCCTGGGCGGCAAGGCTGGCCCGGTGCGCACCAAGTTGCGTGA GCGGAAAGATGGCCGCTTCCCGCCCTGCTGCGAGGAGCTCAAATGGAGGACGCGGC GCTCGGGAGAGCGGGCGGGTGAGTCAACCCACACAAAGGAAAAGGGCCTTCCGTCCTCA GCCGTGCTTCATGTGACTCCACGGAGTACCGGGCGCCGTCCAGGCACCTCGATTAGTTC TCGAGCTTTTGGAGTACGTCGCTTTAGGTTGGGGGGAGGGGTTTTATGCGATGGAGTTT CCCCACACTGAGTGGGTGGAGACTGAAGTTAGGCCAGCTTGGCACTTGATGTAATTCTC CTTGGAATTTGCCCTTTTGTAGTTGGATCTTGGTTTATTCTCAAGCCTCAGACAGTGGTT CAAAGTTTTTTCTTCCATTTCAAGGTGTCGTGA-3')(配列番号 4)である。</p> <p>レンチウイルス CDH-shCCR5-1 の機能試験: miR CCR5 配列が、CCR5 発現をノックダウンする能力を、CEM-CCR5 T 細胞への形質導入を行い、CCR5 に対する蛍光標識モノクローナル抗体で染色し、染色の強度を測定した後、細胞表面 CCR5 発現を測定することによって決定した。染色の強度は、分析フローサイトメトリーによる細胞表面 CCR5 分子の数と正比例する。CCR5 の標的化に最も有効な shRNA 配列は、CCR5 shRNA 配列#1 であった。しかしながら、合成マイクロ RNA 配列の構築に最も</p>					

10

20

30

40

50

【表 2 - 6】

<p>有効な CCR5 標的化配列は、CCR5 配列#5 とオーバーラップしていた。この結論は、配列アラインメントおよび miRNA 構築の経験に基づいていた。最後に、miR30 ヘアピン配列を使用して、合成 miR30 CCR5 配列を構築した。合成 miR30 CCR5 配列は、(5'-AGGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCGACTGTAACTGAGCTTGCTCTACTGTGAAGCCA CAGATGGGTAGAGCAAGCACAGTTTACCGCTGCCTACTGCCTCGGACTTCAAGGGG CTT-3')(配列番号 1)である。miR CCR5 標的配列は、(5'-GAGCAAGCTCAGTTIACA-3')(配列番号 5)である。5 に等しい感染多重度では、細胞あたり平均で 1.25 ゲノムコピーの組み込みレンチウイルスが生成され、CCR5 発現レベルは、<math>\geq 90\%</math> 低減された。これは、レンチウイルスベクターの miR30CCR5 マイクロ RNA 構築物によって、CCR5 mRNA が強力に阻害されたことを示す。</p> <p><b>結論:</b> miR30CCR5構築物は、CCR5細胞表面発現の低減に強力であり、HIVの療法用レンチウイルスのリード候補である。</p>					
13	shVif	レンチウイルス ベクター	マイクロ RNA 配 列	Vif タンパク質低減 >80%	リード
<p><b>ベクター構築:</b> MWG Operon によって合成された、BsrGI および NotI 制限部位を含むオリゴヌクレオチド配列を有する Vif マイクロ RNA を構築した。オリゴヌクレオチド配列を、EF-1 プロモーターを含む pCDH レンチウイルスベクター(System Biosciences)に挿入した。配列アラインメントおよび合成 miRNA 構築の経験に基づき、miR21 ヘアピン配列を使用して、合成 miR21 Vif 配列を構築した。合成 miR21 Vif 配列は、(5'-CATCTCCATGGCTGTACCACCTTGTCGGGGGATGTGTACTTCTGAACTTGTGTTGAATCT CATGGAGTTCAGAAGAACACATCCGCACTGACATTTTGGTATCTTTCATCTGACCA-3')(配列番号 2)である。miR Vif 標的配列は、(5'-GGGATGTGTACTTCTGAACTT-3')(配列番号 6)である。</p> <p><b>miR21Vif の効力の機能試験:</b> miR Vif 配列が Vif 発現をノックダウンする能力を、Vif タンパク質を特定するために抗 Vif モノクローナル抗体を使用したイムノブロット分析により Vif タンパク質発現を測定することによって決定した。</p> <p><b>結論:</b>イムノブロットデータの定量的画像分析によって決定したところ、miR21Vif は、Vif タンパク質発現を <math>\geq 10</math> 倍低減した。これは、本発明者らの療法用レンチウイルスのリード候補として、miR21Vif が妥当であることを証明するのに十分であった。</p>					
14	shTat	レンチウイルス ベクター	マイクロ RNA 配 列	Tat RNA 低減>80%	リード

10

20

30

40

50

【表 2 - 7】

<p><b>ベクター構築:</b> MWG Operon によって合成された、BsrGI および NotI 制限部位を含むオリゴヌクレオチド配列を有する Tat マイクロ RNA を構築した。マイクロ RNA クラスターを、EF-1 プロモーターを含む pCDH レンチウイルスベクター(System Biosciences)に挿入した。配列アラインメントおよび合成 miRNA 構築の経験に基づき、miR185 ヘアピン配列を、合成 miR185 Tat 配列を構築するために選択した。合成 miR185 Tat 配列は、(5'-</p> <p>GGGCTGCTCGAGCAGGGGGCGAGGGATTCCGCTTCTTCCTGCCATAGCGTGGTCCCC</p> <p>TCCCCATGGCAGGCAGAAGCGGCACCTTCCCTCCCAATGACCGCGTCTTCGTCG-3')(配列番号 3)である。miR Tat 標的配列は、(5'-TCCGCTTCTTCCTGCCATAG-3')(配列番号 7)である。</p> <p><b>miR185Tat の効力の機能試験:</b> miR Tat が Tat 発現をノックダウンする能力を、Tat 特異的プライマーを使用した RT-PCR 分析により Tat mRNA 発現を測定することによって決定した。本発明者らは、miR185Tat (配列番号108)を、Tat mRNA の相対的レベルの低減に基づき、類似の miR155Tat と比較した。</p> <p><b>結論:</b> :miR185Tat (配列番号108) は、miR155Tat と比較して、Tat mRNA の低減がおおよそ 2 倍強力であった。miR185Tat を、本発明者らの療法用レンチウイルスのリード候補として選択した。</p>					
15	shCCR5-shVif-shTat	レンチウイルスベクター	マイクロ RNA クラスター配列	CCR5 低減>90%、Vif タンパク質低減>80%、Tat RNA 低減>80%、>95% HIV 複製阻害	候補
<p><b>ベクター構築:</b> MWG Operon によって合成された、BsrGI および NotI 制限部位を含む合成 DNA 断片を有する miR30CCR5 miR21Vif miR185Tat マイクロ RNA クラスター配列を構築した。DNA 断片を、EF-1 プロモーターを含む pCDH レンチウイルスベクター(System Biosciences)に挿入した。miR クラスター配列は、(5'-</p> <p>AGGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCGACTGTAACTGAGCTTGCTCTACTGTGAAGCCA</p> <p>CAGATGGGTAGAGCAAGCACAGTTTACCGCTGCCTACTGCCTCGGACTTCAAGGGGCTT</p> <p>CCCGGGCATCTCCATGGCTGTACCACCTTGTCGGGGGATGTGTACTTCTGAACTTGTGTT</p> <p>GAATCTCATGGAGTTCAGAAGAACACATCCGCACTGACATTTTGGTATCTTTCATCTGAC</p> <p>CAGCTAGCGGGCCTGGCTCGAGCAGGGGGCGAGGGATTCCGCTTCTTCCTGCCATAGCG</p> <p>TGGTCCCCCTCCCCATGGCAGGCAGAAGCGGCACCTTCCCTCCCAATGACCGCGTCTTCG</p> <p>TC-3')(配列番号 31)であり、試験材料 12、試験材料 13、および試験材料 14 が、EF-1 プロモーターの制御下で発現させることができる単一クラスターに組み込まれている。</p>					

10

20

30

40

50

## 【表 2 - 8】

*miR30CCR5*、*miR21Vif*、および *miR185Tat* のマイクロRNA クラスターを含むレンチウイルスベクター *AGT103* の効力の機能試験: *AGT103* ベクターを、細胞表面 CCR5 発現低減のアッセイを使用して、CCR5 に対する効力に関して試験した(試験材料 12)。*AGT103* ベクターを、細胞表面 Vif 発現低減のアッセイを使用して、Vif に対する効力に関して試験した(試験材料 13)。*AGT103* ベクターを、細胞表面 Tat 発現低減のアッセイを使用して、Tat に対する効力に関して試験した(試験材料 14)。

10

**結論:** miRNA クラスターによる CCR5 発現低減の効力は、*miR30CCR5* のみの場合に観察された効力と同様であった。miRNA クラスターによる Vif 発現低減の効力は、*miR21Vif* のみの場合に観察された効力と同様であった。miRNA クラスターによる Tat 発現低減の効力は、*miR185Tat* のみの場合に観察された効力と同様であった。miRNA クラスターは、細胞表面 CCR5 レベルの低減、および 2 つの HIV 遺伝子の阻害に強力である。したがって、この miRNA クラスターを含む *AGT103* を、本発明者らの HIV 機能的治療プログラムの療法用ベクター構築物として選択した。

20

## 【0242】

機能アッセイ。CCR5、TatまたはVif shRNA配列を含み、実験目的のために、CMV即時型初期プロモーター(CMV Immediate Early Promoter)の制御下で緑色蛍光タンパク質(GFP)を発現し、AGT103/CMV-GFPと命名された個々のレンチウイルスベクターを、CCR5、TatまたはVif発現をノックダウンする能力について試験した。ポリブレンの存在下または非存在下で、レンチウイルス粒子を哺乳動物細胞に形質導入した。細胞を2~4日後に集めた;タンパク質およびRNAをCCR5、TatまたはVif発現について分析した。ウェスタンブロットアッセイまたは細胞を特異的蛍光抗体で標識すること(CCR5アッセイ)によって、続いてCCR5特異的抗体またはアイソタイプ対照抗体のいずれかを使用して改変および非改変細胞の蛍光を比較する分析フローサイトメトリーによって、タンパク質レベルを試験した。

30

## 【0243】

レンチウイルスの試験の開始。10%FBSおよび1%ペニシリン-ストレプトマイシンを補充したRPMI 1640を使用して、T細胞培養培地を作製した。IL2 10,000ユニット/ml、IL-12 1μg/ml、IL-7 1μg/ml、IL-15 1μg/mlのサイトカインストックもまた、前もって調製した。

## 【0244】

レンチウイルスの形質導入の前に、感染性ウイルス力価を決定し、適切な感染多重度(MOI)のために加えるウイルス量を計算するために使用した。

40

## 【0245】

0~12日目:抗原特異的濃縮:0日目に、凍結保存したPBMCを解凍し、37℃の培地10mlで1200rpmにて10分間洗浄し、37℃の培地中で $2 \times 10^6$ 個/mlの濃度で再懸濁した。37℃で5%CO<sub>2</sub>中に、24ウェルプレート内で0.5ml/ウェルで細胞を培養した。最適刺激条件を定義するために、以下の表3に列挙される試薬の組合せで細胞を刺激した:

50

【表 3 - 1】

表 3

1	2	3	4	5	6
IL-2+IL-12	IL-7+IL-15	ペプチド + IL-2+IL-12	ペプチド + IL-7+IL-15	MVA+ IL- 2+IL-12	MVA+ IL- 7+IL-15

## 【0246】

最終濃度：IL - 2 = 20 ユニット / ml、IL - 12 = 10 ng / ml、IL - 7 = 10 ng / ml、IL - 15 = 10 ng / ml、ペプチド = 5 µg / ml 個々のペプチド、MVA MOI = 1。

10

## 【0247】

4 および 8 日目に、0.5 ml の新鮮な培地および列挙された濃度（すべての濃度は培養物中の最終濃度を示す）でのサイトカインを刺激された細胞に添加した。

## 【0248】

12 ~ 24 日目：非特異的な増殖およびレンチウイルスの形質導入。12 日目に、刺激された細胞をピペットでプレートから取り出し、新鮮な T 細胞培地に  $1 \times 10^6$  個 / ml の濃度で再懸濁した。再懸濁した細胞を T25 培養フラスコに移し、製造業者の取扱説明書に従って DYNABEADS（登録商標）Human T-Activator CD3 / CD28 および上に列挙したサイトカインで刺激した；フラスコを垂直位置でインキュベートした。

20

## 【0249】

14 日目に、AGT103 / CMV - GFP を MOI 20 で加え、培養物をインキュベーターに 2 日間で戻した。この時点で、細胞をピペティングにより回収し、1300 rpm で 10 分間の遠心分離によって集め、同じ容量の新鮮な培地に再懸濁し、再び遠心分離して緩やかな細胞ペレットを形成した。その細胞ペレットを、前のステップで使ったのと同じサイトカインを含む新鮮な培地に、1 ml あたり  $0.5 \times 10^6$  個の生存可能な細胞で再懸濁した。

## 【0250】

14 ~ 23 日目まで、2 日ごとに細胞の数を評価し、細胞を新鮮な培地で  $0.5 \times 10^6$  個 / ml に希釈した。サイトカインは毎回、添加された。

30

## 【0251】

24 日目に細胞を集め、ビーズを細胞から除去した。ビーズを除去するために、細胞を適切なチューブに移し、選別マグネット（sorting magnet）中に 2 分間置いた。細胞を含む上清を新しいチューブに移した。その後、新鮮な培地中で 1 日間、 $1 \times 10^6$  個 / ml で細胞を培養した。抗原特異的 T 細胞およびレンチウイルス形質導入細胞の頻度を決定するためにアッセイを実施した。

## 【0252】

起こり得るウイルスの増殖を阻止するために、刺激の初日および培養中の隔日にアンブレナビル（0.5 ng / ml）もしくはサキナビル（0.5 ng / ml）または別の適切なプロテアーゼもしくはインテグラーゼ阻害剤を培養物に添加した。

40

## 【0253】

IFN - ガンマについての細胞内サイトカイン染色により抗原特異的 T 細胞を調べる。ペプチド刺激後または  $1 \times 10^6$  細胞 / ml でのレンチウイルス形質導入後の培養細胞を培地単独（陰性対照）、Gag ペプチド（5 µg / ml の個々のペプチド）、または PHA（5 µg / ml、陽性対照）で刺激した。4 時間後、BD Golgi Plug（商標）（1 : 1000、BD Biosciences）を添加して、ゴルジ輸送を遮断した。8 時間後、細胞を洗浄し、製造業者の取扱説明書に従って BD Cytofix / Cytoperm（商標）キットを用いて、細胞外（CD3、CD4 または CD8；BD B

50

i o s c i e n c e s ) 抗体および細胞内 ( I F N - ガンマ ; B D B i o s c i e n c e s ) 抗体で染色した。試料を B D F A C S C a l i b u r ( 商標 ) フローサイトメーターで分析した。適切なアイソタイプ適合抗体で標識された対照試料を各々の実験に含めた。データは、F l o w j o ソフトウェアを使用して分析した。

【 0 2 5 4 】

レンチウイルスの形質導入率は、G F P + 細胞の頻度によって決定した。形質導入された抗原特異的 T 細胞は、C D 3 + C D 4 + G F P + I F N ガンマ + 細胞の頻度によって決定される ; C D 3 + C D 8 + G F P + I F N ガンマ + 細胞の試験は対照として含まれる。

【 0 2 5 5 】

これらの結果は、標的 T 細胞集団である C D 4<sup>+</sup> T 細胞に、H I V 特異的タンパク質の発現を特異的にノックダウンするように設計されたレンチウイルスを用いて形質導入することができ、したがって、ウイルスに対して免疫性である T 細胞の増殖可能な集団を生成することを示す。この実施例は、H I V 患者において機能的治癒を生じさせるために、開示されたレンチウイルス構築物が使用できることを示す概念証明となる。

【 0 2 5 6 】

( 実施例 4 : 実験的ベクターでの C C R 5 ノックダウン )

A G T c 1 2 0 は、大量の C D 4 および C C R 5 を安定して発現する H e l a 細胞株である。L V - C M V - m C h e r r y ( C M V 即時型初期プロモーターの制御下で発現される赤色蛍光タンパク質 m C h e r r y ) または A G T 1 0 3 / C M V - m C h e r r y を用いて、または用いずに、A G T c 1 2 0 を用いて形質導入した。m C h e r r y 蛍光タンパク質の遺伝子発現は、C M V ( サイトメガロウイルス即時型初期プロモーター ) 発現カセットによって制御された。A G T 1 0 3 / C M V - m C h e r r y が C C R 5、V i f および T a t に対する療法用 m i R N A を発現した一方で、L V - C M V - m C h e r r y ベクターはマイクロ R N A クラスターを欠いていた。

【 0 2 5 7 】

図 8 A に示すように、形質導入効率は > 9 0 % であった。7 日後、細胞を集め、C C R 5 に対する蛍光モノクローナル抗体で染色し、分析フローサイトメトリーに供した。C C R 5 A P C の平均蛍光強度 ( x 軸 ) に対してモードについて規格化した細胞数 ( y 軸 ) をプロットしたこれらのヒストグラムにおいて、アイソタイプ対照を灰色で示す。細胞表面 C C R 5 の染色後、レンチウイルス無しまたは対照レンチウイルス ( m C h e r r y マーカーのみを発現する ) で処理した細胞は、C C R 5 密度の変化を示さなかった一方で、A G T 1 0 3 ( 右側のセクション ) は C C R 5 染色強度をほぼアイソタイプ対照のレベルまで低下させた。7 日後、細胞を R 5 指向性 H I V レポーターウイルス B a l - G F P を用いてまたは用いずに感染させた。3 日後、細胞を集め、フローサイトメトリーにより分析した。9 0 % を超える細胞が形質導入された。A G T 1 0 3 - C M V / C M V m C h e r r y は、形質導入された A G T c 1 2 0 細胞における C C R 5 発現を低下させ、対照ベクターで処理した細胞と比較して R 5 指向性 H I V 感染を遮断した。

【 0 2 5 8 】

図 8 B は、H I V の感染に対してのトランスフェクトされた A G T c 1 2 0 細胞の相対非感受性を示す。上のように、レンチウイルスベクターは m C h e r r y タンパク質を発現し、また H I V に感染した形質導入細胞 ( G F P を発現する ) は、偽色フローサイトメトリードットプロットの右上の象限に二重陽性細胞として現れる。H I V が存在しない場合 ( 上パネル )、いかなる条件下においても G F P + 細胞は存在しなかった。H I V 感染後 ( 下パネル )、レンチウイルス形質導入の非存在下では 5 6 % の細胞が感染し、L V - C M V - m C h e r r y を用いて形質導入された A G T c 1 2 0 細胞では 5 3 . 6 % の細胞が感染した。療法用 A G T 1 0 3 / C M V - m C h e r r y ベクターを用いて細胞に形質導入した場合、0 . 8 3 % の細胞のみが二重陽性の象限に現れ、このことはそれらが形質導入され、感染したことを示している。

【 0 2 5 9 】

5 3 . 6 2 ( 対照ベクターとの二重陽性細胞の割合 ) を 0 . 8 3 ( 療法用ベクターとの

10

20

30

40

50



二重陽性細胞の割合)で割ると、AGT103がこの実験システムにおいてHIVに対して65倍を超える防御を提供したことが示される。

#### 【0260】

(実施例5：レンチウイルスベクターのshRNA阻害剤配列によるCCR5発現の調節)

阻害性RNA設計。ホモ・サピエンス(Homo sapiens)ケモカイン受容体CCR5(CCR5、NC000003.12)の配列を使用して、ヒト細胞のCCR5レベルをノックダウンするための潜在的なsiRNAまたはshRNA候補を探索した。潜在的RNA干渉配列は、Broad InstituteからなどのsiRNAまたはshRNA設計プログラムまたはThermo ScientificからのBLOCK-IT RNA iDesignerによって選択された候補から選択した。shRNA配列は、shRNA発現を調節するために、H1、U6、または7SKなどの、プラスミドのRNAポリメラーゼIIIプロモーターの直後に挿入してもよい。また、shRNA配列は、類似のプロモーターが使用されているレンチウイルスベクターに挿入してもよく、またはCMVもしくはEF-1アルファなどのRNAポリメラーゼIIIプロモーターによる発現を可能にするために、マイクロRNA骨格内に埋め込んでもよい。RNA配列はまた、siRNAオリゴヌクレオチドとして合成され、プラスミドまたはレンチウイルスベクターとは独立して利用されてもよい。

#### 【0261】

プラスミド構築。CCR5 shRNAについて、BamHIおよびEcoRI制限部位を含むオリゴヌクレオチド配列が、MWG Operonによって合成された。オリゴヌクレオチド配列を、70℃でインキュベーションすることによってアニールさせ、その後室温に冷却した。アニールさせたオリゴヌクレオチドを、制限酵素BamHIおよびEcoRIで、37℃で1時間、消化し、その後、酵素を70℃で20分間不活化した。並行して、プラスミドDNAを、37℃で1時間、制限酵素BamHIおよびEcoRIで消化した。消化したプラスミドDNAをアガロースゲル電気泳動で精製し、InvitrogenのDNAゲル抽出キットを使用してゲルから抽出した。DNA濃度を決定し、血漿(plasma)をオリゴヌクレオチド配列に、3:1のインサート対ベクター比でライゲーションした。ライゲーション反応はT4 DNAリガーゼを用いて室温で30分間実施した。2.5µLのライゲーションミックスを25µLのSTBL3コンピテント細菌細胞に添加した。形質転換には、42℃でのヒートショックが必要であった。アンピシリンを含有する寒天プレート上に細菌細胞を広げ、コロニーを、LBプロスで増殖させた。オリゴ配列の挿入をチェックするために、Invitrogen DNAミニプレップキットを使用して、収穫した細菌培養物からプラスミドDNAを抽出し、制限酵素消化で試験した。プラスミドへのshRNA配列の挿入は、shRNA発現を調節するために使用されるプロモーターに特異的なプライマーを使用してDNA配列決定によって確認した。

#### 【0262】

CCR5 mRNA低減の機能アッセイ：CCR5発現阻害のアッセイには、2つのプラスミドの同時トランスフェクションが必要であった。第1のプラスミドは、CCR5 mRNAに対する5つの異なるshRNA配列の1つを含む。第2のプラスミドは、ヒトCCR5遺伝子のcDNA配列を含む。プラスミドを、293T細胞に同時トランスフェクトした。48時間後に細胞を溶解し、QiagenのRNeasyキットを使用してRNAを抽出した。InvitrogenのSuper Scriptキットを使用して、RNAからcDNAを合成した。その後、Applied Biosystems Step One PCR機を使用して、定量的RT-PCRによって試料を分析した。CCR5発現は、ポリメラーゼ連鎖反応分析の標準的条件で、フォワードプライマー(5'-AGGAATTGATGGCGAGAAAGG-3') (配列番号93)およびリバースプライマー(5'-CCCCAAAGAAAGGTCAAGGTAAATCA-3') (配列番号94)を使用して、InvitrogenのSYBRグリーンを用いて検出した。試料は、ポリメラーゼ連鎖反応分析の標準的条件で、フォワードプライマー(5'-AGCGCGGCTA

10

20

30

40

50

C A G C T T C A - 3 ' ) ( 配列番号 9 5 ) およびリバースプライマー ( 5 ' - G G C G A C G T A G C A C A G C T T C T - 3 ' ) ( 配列番号 9 6 ) を使用して、ベータアクチン遺伝子発現の mRNA に対して正規化した。CCR5 mRNA の相対的発現は、各試料のアクチンメッセンジャー RNA のレベルに対して正規化されたその Ct 値によって決定した。結果は、図 9 に示されている。

#### 【 0 2 6 3 】

図 9 A に示されているように、CCR5 shRNA 構築物および CCR5 発現プラスミドの同時トランスフェクションによって、CCR5 ノックダウンを 293T 細胞で試験した。対照試料に、いかなるヒト遺伝子も標的としないスクランブル shRNA 配列および CCR5 発現プラスミドをトランスフェクトした。トランスフェクションの 60 時間後、試料を収穫し、CCR5 mRNA レベルを定量的 PCR によって測定した。さらに、図 9 B に示されているように、CCR5 shRNA - 1 ( 配列番号 16 ) を発現するレンチウイルスを用いて形質導入した後、CCR5 はノックダウンされた。

#### 【 0 2 6 4 】

( 実施例 6 : レンチウイルスベクターの shRNA 阻害剤配列による HIV 成分の調節 ) 阻害性 RNA 設計。

HIV 1 型 Rev / Tat ( 5 ' - G C G G A G A C A G C G A C G A A G A G C - 3 ' ) ( 配列番号 9 ) および Gag ( 5 ' - G A A G A A A T G A T G A C A G C A T - 3 ' ) ( 配列番号 11 ) の配列を使用して、

#### 【 化 4 9 】

Rev/Tat:

(5'GCGGAGACAGCGACGAAGAGCTTCAAGAGAGCTCTTCGTCGCTGTCTCCGCTTTT-3')( 配列番号 10) および

Gag:

(5'GAAGAAATGATGACAGCATTTCAAGAGAATGCTGTCATCATTCTTTCTTTT-3')

( 配列番号 12)

shRNA を設計し、それらを合成し、上記に記載のようにプラスミドにクローニングした。

#### 【 0 2 6 5 】

プラスミド構築。Rev / Tat または Gag 標的配列を、細胞または組織における遺伝子発現のレポーターとして一般に使用されるホタルルシフェラーゼ遺伝子の 3 ' UTR ( 非翻訳領域 ) に挿入した。加えて、1つのプラスミドを、Rev / Tat shRNA を発現するように構築し、第 2 のプラスミドを、Gag shRNA を発現するように構築した。プラスミド構築は、上記に記載されている通りであった。

#### 【 0 2 6 6 】

Rev / Tat または Gag mRNA の shRNA 標的化の機能アッセイ：プラスミド同時トランスフェクションを使用して、本発明者らは、shRNA プラスミドがルシフェラーゼメッセンジャー RNA を分解することができるか否か、および同時トランスフェクトされた細胞の発光の強度を減少させることができるか否かを試験した。shRNA 対照 ( スクランブル配列 ) を使用して、ルシフェラーゼをトランスフェクトした細胞からの光の最大発生量を確立した。3 ' - UTR ( mRNA の非翻訳領域 ) に挿入された Rev / Tat 標的配列を含むルシフェラーゼ構築物を、Rev / Tat shRNA 配列と共に同時トランスフェクトした場合、発光のほぼ 90 % 低減がもたらされ、shRNA 配列の機能が強力であることが示された。3 ' - UTR に Gag 標的配列を含むルシフェラーゼ構築物を、Gag shRNA 配列と同時トランスフェクトした場合も、同様の結果が得られた。これらの結果は、shRNA 配列の活性が強力であることを示す。

#### 【 0 2 6 7 】

図 10 A に示されているように、Rev/Tat 標的遺伝子のノックダウンを、293T 細胞の一過性トランスフェクションにより、3'UTR の標的 mRNA 配列と融合されていたルシフェラーゼの活性の低減によって測定した。図 10 B に示されているように、ルシフェラーゼ遺伝子と融合されていた Gag 標的遺伝子配列がノックダウンされた。結果は、各々三連での 3 回の独立したトランスフェクション実験の平均 ± SD として表示されている。

#### 【0268】

(実施例 7: AGT103 は、Tat および Vif の発現を減少させる)

例示的ベクター AGT103/CMV-GFP を細胞にトランスフェクトした。AGT103 および他の例示的ベクターは、以下の表 3 に定義される。

10

#### 【表 3 - 2】

表 3

ベクター名	組成
AGT103	EF1-miR30CCR5-miR21Vif-miR185-Tat-WPRE
対照-mCherry	CMV-mCherry
AGT103/CMV-mCherry	CMV-mCherry-EF1-miR30CCR5-miR21Vif-miR185-Tat-WPRE-
対照-GFP	CMV-mCherry
AGT103/CMV-GFP	CMV-GFP-EF1-miR30CCR5-miR21Vif-miR185-Tat-WPRE-
略語:	
EF-1:伸長因子 1 転写プロモーター	
miR30CCR5- 細胞表面の CCR5 タンパク質を低減させることができる合成マイクロ RNA	
miR21Vif-HIV RNA および Vif タンパク質発現のレベルを低減させることができる合成マイクロ RNA	
miR185Tat-HIV RNA および Tat タンパク質発現のレベルを低減させることができる合成マイクロ RNA	
CMV- ヒトサイトメガロウイルス由来の即時型初期転写プロモーター	
mCherry- Cherry 赤色蛍光タンパク質のコーディング領域	
GFP- 緑色蛍光タンパク質のコーディング領域	
WPRE- ウッドチャック肝炎ウイルス転写後調節エレメント	

20

30

#### 【0269】

T リンパ芽球様細胞株 (CEM; CCRF-CEM; アメリカ合衆国培養細胞系統保存機関カタログ番号 CCL119) に AGT103/CMV-GFP を用いて形質導入した。48 時間後、ウイルス配列全体をコードする HIV 発現プラスミドを細胞にトランスフェクトした。24 時間後、RNA を細胞から抽出し、逆転写酵素ポリメラーゼ連鎖反応を使用してインタクトな Tat 配列のレベルについて試験した。インタクトな Tat RNA の相対発現レベルは、図 11 に示すように、対照レンチウイルスベクターの存在下でのおよそ 850 から、AGT103/CMV-GFP の存在下でのおよそ 200 に減少し、> 4 倍減少した。

40

#### 【0270】

(実施例 8: レンチウイルスベクターの合成マイクロ RNA 配列による HIV 成分の調節)

阻害性 RNA 設計。HIV-1 Tat および Vif 遺伝子の配列を使用して、ヒト細

50

胞においてTatまたはVifレベルをノックダウンする潜在的siRNAまたはshRNA候補を探索した。潜在的RNA干渉配列は、Broad InstituteからなどのsiRNAまたはshRNA設計プログラムまたはThermo ScientificからのBLOCK-IT RNA iDesignerによって選択された候補から選んだ。TatまたはVifノックダウンが最も強力な、選択されたshRNA配列を、CMVまたはEF-1アルファなどのRNAポリメラーゼIIプロモーターによる発現が可能になるように、マイクロRNA骨格内に埋め込んだ。また、RNA配列を、siRNAオリゴヌクレオチドとして合成し、プラスミドまたはレンチウイルスベクターとは独立して使用してもよい。

【0271】

プラスミド構築。Tat標的配列(5'-TCCGCTTCTTCCTGCCATAG-3') (配列番号7)をmiR185骨格に組み込んで、Tat miRNA

【化50】

(5'-

GGGCTGGCTCGAGCAGGGGGCGAGGGATTCCGCTTCTTCCTGCCATAGCGTGGT  
CCCCTCCCCTATGGCAGGCAGAAGCGGCACCTTCCCTCCCAATGACCGCGTCTTCG  
TCG-3') (配列番号 3)

を作出し、それをレンチウイルスベクターに挿入し、EF-1アルファプロモーターの制御下で発現させた。同様に、Vif標的配列(5'-GGGATGTGTACTTCTGAACCTT-3') (配列番号6)をmiR21骨格に組み込んで、Vif miRNA

【化51】

(5'-

CATCTCCATGGCTGTACCACCTTGTCTGGGGGATGTGTACTTCTGAACCTTGTGTTGA  
ATCTCATGGAGTTCAGAAGAACACATCCGCACTGACATTTTGGTATCTTTCATCTG  
ACCA-3') (配列番号 2)

を作出し、それをレンチウイルスベクターに挿入し、EF-1アルファプロモーターの制御下で発現させた。得られたVif/Tat miRNA発現レンチウイルスベクターを、レンチウイルスベクターパッケージングシステムを使用して293T細胞中で産生させた。VifおよびTat miRNAは、すべてEF-1プロモーターの制御下で発現されるmiRCCR5、miRVif、およびmiRTatで構成されるマイクロRNAクラスターに埋め込まれていた。

【0272】

Tat mRNA蓄積のmiR185 Tat阻害の機能アッセイ。miR185 Tatを発現するレンチウイルスベクター(LV-EF1-miRCCR5-Vif-Tat)を、5と等しい感染多重度で使用して293T細胞に形質導入した。形質導入の24時間後、細胞に、Lipofectamine 2000を標準的条件下で使用して、HIV株NL4-3(pNL4-3)を発現するプラスミドをトランスフェクトした。24時間後、RNAを抽出し、TatメッセンジャーRNAのレベルを、Tat特異的プライマーを使用してRT-PCRによって試験し、対照のアクチンmRNAレベルと比較した。

【0273】

Vifタンパク質蓄積のmiR21 Vif阻害の機能アッセイ。miR21 Vifを発現するレンチウイルスベクター(LV-EF1-miRCCR5-Vif-Tat)を、5と等しい感染多重度で使用して、293T細胞に形質導入した。形質導入の24時間後、Lipofectamine 2000を使用して、HIV株NL4-3(pNL4-3)を発現するプラスミドを細胞にトランスフェクトした。24時間後、細胞を溶解し、全可溶性タンパク質を試験して、Vifタンパク質の含有量を測定した。細胞溶解物を

10

20

30

40

50

、確立されている技術に従ってSDS-PAGEによって分離した。分離されたタンパク質を、ナイロン膜に転写し、Vif特異的モノクローナル抗体またはアクチン対照抗体を用いてプローブした。

【0274】

図12Aに示されているように、Tatノックダウンを、対照レンチウイルスベクター、または合成miR185 TatもしくはmiR155 TatマイクロRNAのいずれかを発現するレンチウイルスベクターのいずれかを形質導入した293T細胞中で試験した。24時間後、HIVベクターpNL4-3を、Lipofectamine 2000を用いて24時間にわたってトランスフェクトし、その後、Tat用のプライマーを用いてqPCR分析するためにRNAを抽出した。図12Bに示されているように、Vifノックダウンを、対照レンチウイルスベクター、または合成miR21 VifマイクロRNAを発現するレンチウイルスベクターのいずれかを形質導入した293T細胞中で試験した。24時間後、HIVベクターpNL4-3を、Lipofectamine 2000を用いて24時間にわたってトランスフェクトし、その後、HIV Vifに対する抗体を用いてイムノブロット分析するためにタンパク質を抽出した。

10

【0275】

(実施例9：レンチウイルスベクターの合成マイクロRNA配列によるCCR5発現の調節)

CEM-CCR5細胞に、CCR5の合成miR30配列を含むレンチウイルスベクター(AGT103:TGTAAACTGAGCTTGCTCTA(配列番号97)、AGT103-R5-1:TGTAAACTGAGCTTGCTCGC(配列番号98)、またはAGT103-R5-2:CATAGATTGGACTTGACAC(配列番号99))を形質導入した。6日後、CCR5発現を、APCコンジュゲートCCR5抗体でのFACS分析によって決定し、平均蛍光強度(MFI)によって定量化した。CCR5レベルは、LV-対照を100%とした場合のCCR5の%として表した。AGT103およびAGT103-R5-1の標的配列は、CCR5標的配列#5と同じ領域にある。AGT103-R5-2の標的配列は、CCR5標的配列#1と同じである。AGT103(全CCR5の2%)は、AGT103-R5-1(全CCR5の39%)、およびCCR5レベルを低減させなかったAGT103-R5-2と比較して、CCR5レベルの低減に最も有効である。データは、本明細書の図13に実証されている。

20

30

【0276】

(実施例10：長鎖または短鎖WPRE配列のいずれかを含有するレンチウイルスベクターの合成マイクロRNA配列によるCCR5発現の調節。)

ベクター構築。レンチウイルスベクターは、治療用遺伝子または遺伝子構築物を最適に発現させるためのRNA調節エレメントを必要とすることが多い。一般的な選択は、ウッドチャック肝炎ウイルス転写後調節エレメント(WPRE)を使用することである。本発明者らは、全長WPRE:

40

## 【化 5 2】

(5'AATCAACCTCTGATTACAAAATTTGTGAAAGATTGACTGGTATTCTTAACTATG  
TTGCTCCTTTTACGCTATGTGGATACGCTGCTTTAATGCCTTTGTATCATGCTATTG  
CTTCCCGTATGGCTTTTCATTTTCTCCTCCTTGTATAAATCCTGGTTGCTGTCTCTTTA  
TGAGGAGTTGTGGCCCGTTGTCAGGCAACGTGGCGTGGTGTGCACTGTGTTTGCTG  
ACGCAACCCCCACTGGTTGGGGCATTGCCACCACCTGTCAGCTCCTTTCCGGGACT  
TTCGCTTTCCCCCTCCCTATTGCCACGGCGGAACTCATCGCCGCCTGCCTTGCCCGC  
TGCTGGACAGGGGCTCGGCTGTTGGGCACTGACAATTCCGTGGTGTGTCGGGGA  
AATCATCGTCCTTTTCCTTGGCTGCTCGCCTGTGTTGCCACCTGGATTCTGCGCGGGA  
CGTCCTTCTGCTACGTCCCTTCGGCCCTCAATCCAGCGGACCTTCCTTCCCGCGGCC  
TGCTGCCGGCTCTGCGGCCTCTTCCGCGTCTTCGCCTTCGCCCTCAGACGAGTCGG  
ATCTCCCTTTGGGCCGCCTCCCCGCCT-3') ( 配列番号 32)

10

を含む A G T 1 0 3 を、短縮された W P R E エlement

## 【化 5 3】

(5'AATCAACCTCTGGATTACAAAATTTGTGAAAGATTGACTGATATTCTTAACTAT  
GTTGCTCCTTTTACGCTGTGTGGATATGCTGCTTTAATGCCTCTGTATCATGCTATT  
GCTTCCCGTACGGCTTTTCGTTTTCTCCTCCTTGTATAAATCCTGGTTGCTGTCTCTTT  
ATGAGGAGTTGTGGCCCGTTGTCCGTCAACGTGGCGTGGTGTGCTCTGTGTTTGCT  
GACGCAACCCCCACTGGCTGGGGCATTGCCACCACCTGTCAACTCCTTTCTGGGAC  
TTTCGCTTTCCCCCTCCCGATCGCCACGGCAGAACTCATCGCCGCCTGCCTTGCCC  
GCTGCTGGACAGGGGCTAGGTTGCTGGGCACTGATAATTCCGTGGTGTGTC-3')  
( 配列番号 80)

20

を含む改変 A G T 1 0 3 ベクターと比較した。

## 【0 2 7 7】

ベクター配列内の長鎖 W P R E エlement 対 短鎖 W P R E エlement の関数としての、細胞表面 C C R 5 発現モジュレーションの機能アッセイ。長鎖または短鎖 W P R E エlement を含む A G T 1 0 3 を、5 と等しい感染多重度で C E M - C C R 5 T 細胞に形質導入するために使用した。形質導入の 6 日後、細胞を集め、細胞表面 C C R 5 タンパク質を検出することができるモノクローナル抗体で染色した。抗体は、蛍光マーカーにコンジュゲートされていた。染色強度は、細胞表面の C C R 5 のレベルに正比例する。対照レンチウイルスは、細胞表面 C C R 5 レベルに影響を及ぼさず、73.6 単位の平均蛍光強度を有する単一集団をもたらした。長鎖 W P R E エlement を有する従来の A G T 1 0 3 は、C C R 5 発現を 11 単位の平均蛍光強度レベルに低減させた。短鎖 W P R E エlement を組み込むように改変された A G T 1 0 3 は、13 単位の平均蛍光強度を有する細胞の単一集団をもたらした。したがって、短鎖 W P R E エlement の置換は、A G T 1 0 3 が細胞表面 C C R 5 の発現を低減させる能力にほとんどまたはまったく影響を及ぼさなかった。

30

40

## 【0 2 7 8】

図 1 4 に示されているように、C E M - C C R 5 細胞に、長鎖または短鎖 W P R E 配列のいずれかを含む A G T 1 0 3 を形質導入した。6 日後、C C R 5 発現を、A P C コンジュゲート C C R 5 抗体を用いた F A C S 分析によって決定し、平均蛍光強度 ( M F I ) として定量化した。C C R 5 レベルは、L V - 対照を 100 % とした場合の C C R 5 の % として表した。C C R 5 レベルの低減は、短鎖 ( 全 C C R 5 の 5 . 5 % ) または長鎖 ( 全 C

50

C R 5 の 2 . 3 % ) W P R E 配列のいずれかを有する A G T 1 0 3 について類似していた。  
【 0 2 7 9 】

( 実施例 1 1 : W P R E 配列を含むまたは含まないレンチウイルスベクターの合成マイクロRNA配列による C C R 5 発現の調節 )

ベクター構築。 C C R 5 発現の A G T 1 0 3 下方調節に W P R E が 必要か否かを試験するために、本発明者らは、 W P R E エlement配列を含まない改変ベクターを構築した。

【 0 2 8 0 】

A G T 1 0 3 ベクターに長鎖 W P R E エlementを含む場合またはそれを含まない場合の関数としての、細胞表面 C C R 5 発現モジュレーションの機能アッセイ。 C C R 5 発現レベルの A G T 1 0 3 モジュレーションに W P R E が 必要であるか否かを試験するために、本発明者らは、 5 と等しい感染多重度を使用して、 A G T 1 0 3 または W P R E を欠如する改変ベクターを用いて C E M - C C R 5 T 細胞に形質導入した。形質導入の 6 日後、細胞を集め、細胞表面 C C R 5 タンパク質を認識することができるモノクローナル抗体で染色した。モノクローナル抗体は、蛍光マーカーに直接コンジュゲートされていた。染色強度は、細胞表面あたりの C C R 5 分子の数に正比例する。レンチウイルス対照ベクターは、細胞表面 C C R 5 レベルに影響を及ぼさず、 1 6 4 の平均蛍光強度を有する均一な集団をもたらした。レンチウイルスベクター ( 長鎖 W P R E を有し、さらに G F P マーカータンパク質を発現する A G T 1 0 3 ) 、 G F P を欠如するが、長鎖 W P R E エlementを含む A G T 1 0 3 、または G F P および W P R E を両方とも欠如する A G T 1 0 3 はすべて、細胞表面 C C R 5 発現モジュレーションに同様に有効であった。 G F P を除去した後では、 W P R E エlementを含むまたは含まない A G T 1 0 3 は、細胞表面 C C R 5 発現をモジュレーションするそれらの能力の点からは識別不能であった。

【 0 2 8 1 】

C E M - C C R 5 細胞に、 G F P および W P R E を含むまたは含まない A G T 1 0 3 を形質導入した。 6 日後、 C C R 5 発現を、 A P C コンジュゲート C C R 5 抗体を用いた F A C S 分析によって決定し、平均蛍光強度 ( M F I ) として定量化した。 C C R 5 レベルは、 L V - 対照を 1 0 0 % とした場合の C C R 5 の % として表した。 C C R 5 レベルの低減は、 W P R E 配列を含む ( 全 C C R 5 の 0 % ) または含まない ( 全 C C R 5 の 0 % ) A G T 1 0 3 について類似していた。データは、図 1 5 に実証されている。

【 0 2 8 2 】

( 実施例 1 2 : レンチウイルスベクターの C D 4 プロモーター調節性合成マイクロRNA配列による C C R 5 発現の調節 )

ベクター構築。改変バージョンの A G T 1 0 3 を構築して、 C C R 5 、 V i f 、および T a t 遺伝子発現を抑制するマイクロRNAクラスターを発現するために、代替的プロモーターを代用した場合の効果を試験した。本発明者らは、通常の E F - 1 プロモーターの代わりに、以下の配列を使用して、 C D 4 糖タンパク質を発現させるための T 細胞特異的プロモーターを代用した：

10

20

30

40

50

## 【化 5 4】

(5'TGTTGGGGTTCAAATTTGAGCCCCAGCTGTTAGCCCTCTGCAAAGAAAAAAAAA  
 AAAAAAAAAAGAACAAAGGGCCTAGATTTCCCTTCTGAGCCCCACCCTAAGATGAA  
 GCCTCTTCTTTCAAGGGAGTGGGGTTGGGGTGGAGGCGGATCCTGTCAGCTTTGCT  
 CTCTCTGTGGCTGGCAGTTTCTCCAAAGGGTAACAGGTGTCAGCTGGCTGAGCCTA  
 GGCTGAACCCTGAGACATGCTACCTCTGTCTTCTCATGGCTGGAGGCAGCCTTTGT  
 AAGTCACAGAAAGTAGCTGAGGGGCTCTGGAAAAAAGACAGCCAGGGTGGAGGT  
 AGATTGGTCTTTGACTCCTGATTTAAGCCTGATTCTGCTTAACTTTTTCCCTTGACT  
 TTGGCATTTTCACTTTGACATGTTCCCTGAGAGCCTGGGGGGTGGGGAACCCAGCT  
 CCAGCTGGTGACGTTTGGGGCCGGCCCAGGCCTAGGGTGTGGAGGAGCCTTGCCA  
 TCGGGCTTCCTGTCTCTCTTCATTTAAGCACGACTCTGCAGA-3') ( 配列番号 30)

10

## 【 0 2 8 3】

細胞表面 C C R 5 タンパク質発現を低減するための効力の点で、E F - 1 および C D 4 遺伝子プロモーターを比較する機能アッセイ。通常の E F - 1 プロモーターの代わりに C D 4 遺伝子プロモーターを使用することによって改変された A G T 1 0 3 を、C E M - C C R 5 T 細胞の形質導入に使用した。形質導入の 6 日後、細胞を集め、細胞表面 C C R 5 タンパク質を認識することができるモノクローナル抗体で染色した。モノクローナル抗体は、蛍光マーカーにコンジュゲートされていた。染色強度は、細胞表面 C C R 5 タンパク質のレベルに正比例する。対照レンチウイルス形質導入は、C C R 5 特異的モノクローナル抗体で染色され、8 1 . 7 単位の平均蛍光強度を示した C E M - C C R 5 T 細胞の集団をもたらした。マイクロ R N A を発現するために E F - 1 プロモーターの代わりに C D 4 遺伝子プロモーターが使用された改変 A G T 1 0 3 は、幅広い染色分布を示し、平均蛍光強度はおおよそ 1 7 . 3 単位と等しかった。この結果に基づくと、E F - 1 プロモーターは、マイクロ R N A 発現用の C D 4 遺伝子プロモーターと少なくとも同様であり、それよりも優れている可能性がある。所望の標的細胞集団にもよるが、E F - 1 プロモーターは、すべての細胞タイプで普遍的に活性であり、C D 4 プロモーターは、T リンパ球でしか活性ではない。

20

30

## 【 0 2 8 4】

C E M - C C R 5 細胞に、C C R 5、V i f、および T a t に対する合成マイクロ R N A 配列を調節する C D 4 プロモーターを含むレンチウイルスベクター ( A G T 1 0 3 ) を形質導入した。6 日後、C C R 5 発現を、A P C コンジュゲート C C R 5 抗体を用いた F A C S 分析によって決定し、平均蛍光強度 ( M F I ) として定量化した。C C R 5 レベルは、L V - 対照を 1 0 0 % とした場合の C C R 5 の % として表した。L V - C D 4 - A G T 1 0 3 を形質導入した細胞では、C C R 5 レベルは全 C C R 5 の 1 1 % であった。これは、E F 1 プロモーターを含む L V - A G T 1 0 3 で観察されたものと同等である。このデータは、図 1 6 に実証されている。

40

## 【 0 2 8 5】

( 実施例 1 3 : H I V G a g 特異的 C D 4 T 細胞の検出 )

細胞および試薬。生存凍結末梢血単核細胞 ( P B M C ) を、ワクチン会社から得た。データは、候補 H I V 療法用ワクチンを試験する初期段階臨床試験 ( 試験登録 : c l i n i c a l t r i a l s . g o v N C T 0 1 3 7 8 1 5 6 ) に登録されている H I V + 個体に由来する代表的な検体を用いて得られた。「ワクチン接種前」および「ワクチン接種後」研究のために、2 つの検体を得た。細胞培養産物、補充物、およびサイトカインは、商業的供給業者からのものであった。細胞を、Thompson, M., S. L. Heath, B. Sweeton, K. Williams, P. Cunningham, B. F. Keele, S. Sen, B. E. Palmer, N. Chomont, Y. Xu, R. Basu, M. S. Hellerstein, S. Kwa, および H. L. Robins

50



on (2016年)。「DNA/MVA Vaccination of HIV-1 Infected Participants with Viral Suppression on Antiretroviral Therapy, followed by Treatment Interruption: Elicitation of Immune Responses without Control of Re-Emergent Virus.」PLoS One 11巻(10号): e0163164 頁に記載されているように、Geovax Corporationの組換え改変Vaccinia Ankara 63Bに対する応答について試験した。HIV-1 Gagポリタンパク質全体を表す合成ペプチドを、Geovaxから得た。または、HIV(GAG)Ultraペプチドセットを、JPT Peptide Technologies GmbH(www.jpt.com)、Berlin、Germanyから得た。HIV(GAG)Ultraは、各々長さが15アミノ酸であり、11個アミノ酸が重複している150個のペプチドを含む。それらは、化学的に合成された後、精製され、液体クロマトグラフィー-質量分析によって分析されていた。一緒にすると、これらのペプチドは、HIV Gagポリタンパク質の主要な免疫原領域を表し、公知HIV株の間での57.8%の平均カバレッジ(average coverage)のために設計されている。ペプチド配列は、ロスアラモス国立研究所(<http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/NEUALIGN/align.html>)のHIV配列データベースに基づく。ペプチドは、ペプチドあたり25マイクログラムの乾燥トリフルオロ酢酸塩として提供されている。それを、およそ40マイクロリットルのDMSOに溶解し、PBSで終濃度に希釈する。CD4および細胞質IFN-ガンマを検出するためのモノクローナル抗体を商業的供給源から得た。細胞内染色は、インターフェロン-ガンマ用のBD Pharmingen細胞内染色キットで実施した。ペプチドを、DMSOに再懸濁した。本発明者らは、DMSOのみの対照条件を含める。

#### 【0286】

HIV特異的CD4+ T細胞を検出するための機能アッセイ。凍結PBMCを解凍し、洗浄し、10%ウシ胎仔血清、補充物、およびサイトカインを含むRPMI培地に再懸濁した。ワクチン接種前または接種後に集めた培養PBMCを、DMSO対照、MVA Geovax(細胞あたり1ブランク形成単位と等しい感染多重度)、ペプチドGeovax(1マイクログラム/ml)、またはHIV(GAG)Ultraペプチド混合物(1マイクログラム/ml)で、Golgi Stop試薬の存在下にて20時間処理した。細胞を集め、洗浄し、固定し、透過化し、細胞表面CD4または細胞内インターフェロン-ガンマに特異的なモノクローナル抗体で染色した。染色した細胞を、FACSCalibur分析用フローサイトメーターで分析した。データは、CD4+ T細胞サブセットをゲートしたものであった。四角で囲まれている領域内の強調されている細胞は、二重陽性であり、MVAまたはペプチド刺激後のインターフェロン-ガンマ発現に基づき、HIV特異的CD4+ T細胞であると指定した。四角で囲まれている領域内の数値は、HIV特異的であると特定された全CD4のパーセンテージを示す。本発明者らは、DMSOまたはMVAに対する強い応答を検出しなかった。Geovaxのペプチドは、JPTのHIV(GAG)Ultraペプチド混合物と比較して、より少ない応答性細胞を誘発したが、違いは小さく、有意ではなかった。

#### 【0287】

図17に示されているように、ワクチン接種前または接種後のHIV陽性患者に由来するPBMCを、DMSO(対照)、GeovaxのHIV Gagを発現する組換えMVA(MVA Geovax)、GeovaxのGagペプチド(Pep Geovax、本明細書ではGagペプチドプール1とも呼ばれる)またはJPTのGagペプチド(HIV(GAG)Ultraペプチド混合物、本明細書ではGagペプチドプール2とも呼ばれる)で20時間にわたって刺激した。IFN $\gamma$ 産生を、標準的プロトコールを使用した細胞内染色およびフローサイトメトリーによって検出した。フローサイトメトリーデータは、CD4+ T細胞をゲートしたものである。四角内に表示されている数値は、抗原特異的刺激に対するサイトカイン応答に基づき、「HIV特異的」と指定された全CD4+ T細胞のパーセンテージである。

## 【0288】

(実施例14：HIV特異的CD4<sup>+</sup>T細胞増殖およびレンチウイルス形質導入)

PBMCを濃縮してHIV特異的CD4<sup>+</sup>T細胞の割合を増加させ、それらの細胞にAGT103を形質導入して細胞産物AGT103Tを産生するための方法の設計および試験。療法用HIVワクチンを受けたHIV陽性患者に由来するPBMC(末梢血単核細胞)をex vivo培養するためのプロトコールを設計した。この実施例では、療法用ワクチンは、HIV Gag、Pol、およびEnv遺伝子を発現する3用量のプラスミドDNA、その後の、同じHIV Gag、Pol、およびEnv遺伝子を発現する2用量のMVA 62-B(改変vaccinia Ankaraナンバー62-B)で構成されていた。プロトコールは、ワクチン産物に特定されず、免疫化後に十分なレベルのHIV特異的CD4<sup>+</sup>T細胞を必要とするに過ぎない。静脈血を集め、PBMCを、Ficoll-Paque密度勾配遠心分離によって精製した。代替的には、PBMCまたは規定された細胞トラクション(traction)は、抗体カクテルおよび蛍光活性化または磁気ビーズ選別を使用して、ポジティブまたはネガティブ選択法によって調製してもよい。精製したPBMCを、洗浄し、補充物、抗生物質、およびウシ胎仔血清を含む標準的培地中で培養する。これらの培養物に、HIV Gagポリタンパク質内の考え得るT細胞エピトープを表す合成ペプチドのプールを添加した。インターロイキン-2およびインターロイキン-12、インターロイキン2およびインターロイキン-7、インターロイキン-2およびインターロイキン-15の組合せを試験した後で選択したサイトカイン、インターロイキン2およびインターロイキン-12を添加することにより培養物を補充する。ペプチド刺激を行い、その後およそ12日間の培養を行う。12日間の培養中、新鮮な培地および新鮮なサイトカイン補充物を、およそ4日に1回添加した。

10

20

## 【0289】

ペプチド刺激間隔は、PBMC培養物中のHIV特異的CD4<sup>+</sup>T細胞の頻度を増加させるように設計されている。これらのHIV特異的CD4<sup>+</sup>T細胞は、以前の療法的免疫化によって活性化された。それらは、合成ペプチド曝露によって再刺激し、増殖させることができる。本発明者らの目標は、ペプチド刺激培養期間の終了時まで、HIVに特異的な全CD4<sup>+</sup>T細胞が1%よりも多いかまたは1%と等しくなることを達成することである。

## 【0290】

30

培養のおよそ12日目に、細胞を洗浄して残留物質を除去し、その後、CD4<sup>+</sup>T細胞表面タンパク質CD3およびCD28に対する抗体で修飾されている合成ビーズで刺激する。T細胞をポリクローナル刺激するためのこの十分に確立されている方法は、細胞を再活性化し、それらをAGT103レンチウイルス形質導入に対してより感受性にするであろう。培養のおよそ13日目に、1~5の感染多重度を使用して、レンチウイルス形質導入を実施する。形質導入後、細胞を洗浄して残留レンチウイルスベクターを除去し、インターロイキン-2およびインターロイキン-12を含む培地中で培養し、培養のおよそ24日目までおよそ4日に1回、新鮮な培地およびサイトカインを添加する。

## 【0291】

培養間隔の全体にわたって、抗レトロウイルス薬サキナビルを、およそ100nMの濃度で添加して、可能性のあるHIVのあらゆる増殖を抑制する。

40

## 【0292】

培養のおよそ24日目に、細胞を収穫し、洗浄し、効力およびリリースアッセイ用の試料を確保し、次に残りの細胞を凍結保存培地に懸濁してから、AGT103が形質移入されているおよそ1×10<sup>8</sup>個のHIV特異的CD4<sup>+</sup>T細胞が含まれることになる用量あたりおよそ1×10<sup>10</sup>細胞の単一アリコートとして凍結する。

## 【0293】

細胞産物(AGT103T)の効力を、2つの代替的効力アッセイの1つで試験する。効力アッセイ1では、CD4<sup>+</sup>T細胞あたりの平均ゲノムコピー数(組み込みAGT103ベクター配列)が試験される。産物をリリースするための最低限の効力は、CD4<sup>+</sup>T

50

細胞あたりおよそ 0.5 のゲノムコピーである。このアッセイは、磁気ビーズ標識モノクローナル抗体を使用して C D 3 陽性 / C D 4 陽性 T 細胞をポジティブ選択し、全細胞 D N A を抽出し、定量的 P C R 反応を使用して A G T 1 0 3 ベクターに固有な配列を検出することによって実施する。効力アッセイ 2 では、H I V 特異的 C D 4 T 細胞の亜集団内の組み込み A G T 1 0 3 の平均ゲノムコピー数が試験される。このアッセイ (essay) は、まず、H I V G a g タンパク質を表す合成ペプチドのプールで P B M C を刺激することによって達成される。その後、細胞を、C D 4 T 細胞に結合することができ、分泌されたインターフェロン - ガンマサイトカインを補捉することもできる特異的抗体試薬で染色する。C D 4 陽性 / インターフェロン - ガンマ陽性細胞を、磁気ビーズ選択によって捕捉し、全細胞 D N A を調製し、細胞あたりの A G T 1 0 3 のゲノムコピー数を、定量的 P C R 反応で決定する。アッセイ 2 を使用した効力に基づくリリース基準は、H I V 特異的 C D 4 T 細胞あたり 0.5 よりも多いかまたはそれと等しいゲノムコピーが、A G T 1 0 3 細胞産物中に存在することを必要とする。

10

#### 【0294】

療法用 H I V ワクチンを受けた H I V 陽性患者の P B M C に由来する H I V 特異的 C D 4 T 細胞の濃縮および形質導入の機能試験。H I V 特異的 C D 4 T 細胞の頻度に対する療法用ワクチン接種の影響を、ペプチド刺激アッセイで試験した (図 14 パネル B)。ワクチン接種前の H I V 特異的 C D 4 T 細胞の頻度は、この代表的な個体では 0.036 % であった。ワクチン接種後の H I V 特異的 C D 4 T 細胞の頻度は、およそ 2 倍の値である 0.076 % に増加した。細胞質インターフェロン - ガンマの蓄積によって特定された応答性細胞 (H I V 特異的) は、特異的ペプチド刺激後にのみ検出された。

20

#### 【0295】

また、本発明者らは、ペプチド刺激して H I V 特異的 C D 4 T 細胞を濃縮し、その後 A G T 1 0 3 を形質導入することにより、培養物中の全 C D 4 T 細胞のおよそ 1 % の、H I V 特異的であり、かつ A G T 1 0 3 が形質導入されている C D 4 T 細胞を生成するという本発明者らの目標が達成されるか否かを試験した。この場合、本発明者らは、緑色蛍光タンパク質を発現する実験バージョンの A G T 1 0 3 を使用した (G F P を参照)。図 14 のパネル C では、ペプチド刺激 (H I V (G A G) U l t r a) および A G T 1 0 3 形質導入後のワクチン接種後培養物は、全 C D 4 T 細胞の 1.11 % が、H I V 特異的であり (ペプチド刺激に応答してインターフェロン - ガンマを発現することに基づく)、かつ A G T 1 0 3 が形質導入されていた (G F P の発現に基づく) ことが実証された。

30

#### 【0296】

療法用 H I V ワクチン研究の数人の患者を試験して、ペプチド刺激に対する応答の程度を評価し、将来のヒト臨床試験の遺伝子治療集団に参加させるための適格性基準の規定を開始した。図 18 のパネル D は、4 人のワクチン試験参加者の H I V 特異的 C D 4 T 細胞の頻度を示し、ワクチン接種前および接種後の検体が比較されている。重要なことに、3 つの症例で、ワクチン接種後検体は、全 C D 4 T 細胞の 0.076 % よりも高いかまたはそれと等しい H I V 特異的 C D 4 T 細胞の値を示す。この値に到達する能力は、ワクチン接種前の検体によっては予測されなかった。なぜなら、患者 001 - 004 および患者 001 - 006 は両者とも、開始時には H I V 特異的 C D 4 T 細胞のワクチン接種前値が 0.02 % であったが、1 人が最終的には 0.12 % の H I V 特異的 C D 4 T 細胞のワクチン接種後値に達したのに対し、他方の個体はワクチン接種後にこの値を増加させることができていないためである。また、ワクチンに良好に応答した同じ 3 人の患者は、H I V 特異的 C D 4 T 細胞の頻度を増加させるという点では、ペプチド刺激および培養後に H I V 特異的 C D 4 T 細胞の実質的な濃縮を示した。図 18 のパネル E に示されている 3 つの症例では、ペプチド刺激およびその後の培養により、それぞれ全 C D 4 T 細胞の 2.07 %、0.72 %、または 1.54 % が、H I V に特異的であった試料が生成された。これらの値は、最終細胞産物において、H I V に特異的であり A G T 1 0 3 が形質導入されている C D 4 T 細胞が全 C D 4 T 細胞のおよそ 1 % に達するようにするという本発明者らの目標を可能にするために十分に大きな、ペプチド刺激に対する e x v

40

50

i v o 応答を、療法用 H I V ワクチンに 応答する大半の個体が有することになることを示す。

#### 【 0 2 9 7 】

図 1 8 に示されているように、パネル A は、処置のスケジュールを説明する。パネル B は、P B M C を、G a g ペプチドまたは D M S O 対照で 2 0 時間 にわたって刺激したことを実証する。I F N ガンマ産生を、細胞内染色によって、F A C S によって検出した。分析のために C D 4 <sup>+</sup> T 細胞をゲーティングした。パネル C は、パネル A に示されているような方法を使用して C D 4 <sup>+</sup> T 細胞を増殖し、A G T 1 0 3 - G F P を形質導入したことを実証する。増殖した C D 4 <sup>+</sup> T 細胞を、サイトカインを一切含まない新鮮な培地で 2 日間休息させ、G a g ペプチドまたは D M S O 対照で 2 0 時間再刺激した。I F N ガンマ産生および G F P 発現を F A C S によって検出した。分析のために C D 4 <sup>+</sup> T 細胞をゲーティングした。パネル D は、本明細書で議論されているように、H I V 特異的 C D 4 <sup>+</sup> T 細胞の頻度 ( I F N ガンマ陽性、ワクチン接種前および接種後 ) を、4 人の患者から検出したことを実証する。パネル E は、4 人の患者に由来するワクチン接種後 P B M C を増殖させ、H I V 特異的 C D 4 <sup>+</sup> T 細胞を検査したことを実証する。

10

#### 【 0 2 9 8 】

( 実施例 1 5 : 用量 応答 )

ベクター構築。改変バージョンの A G T 1 0 3 を構築して、A G T 1 0 3 を増加させた際の用量 応答、および細胞表面 C C R 5 レベルに対するその効果を試験した。A G T 1 0 3 を、C M V プロモーターの制御下に緑色蛍光タンパク質 ( G F P ) 発現カセットを含むように改変した。形質導入された細胞は、m i R 3 0 C C R 5 m i R 2 1 V i f m i R 1 8 5 T a t マイクロRNA クラスターを発現し、G F P 発現による緑色光を放つ。

20

#### 【 0 2 9 9 】

A G T 1 0 3 - G F P を増加させた際の用量 応答および C C R 5 発現の阻害に関する機能アッセイ。細胞あたりの 0 から 5 までの感染多重度を使用して、C E M - C C R 5 T 細胞に A G T 1 0 3 - G F P を形質導入した。形質導入された細胞を、細胞表面 C C R 5 に特異的な蛍光コンジュゲート ( A P C ) モノクローナル抗体で染色した。染色強度は、細胞表面あたりの C C R 5 分子の数に比例する。緑色蛍光の強度は、細胞あたりの組み込まれた A G T 1 0 3 - G F P コピー数に比例する。

#### 【 0 3 0 0 】

図 1 9 に示されているように、パネル A は、A G T 1 0 3 - G F P を増加させた際の用量 応答、および細胞表面 C C R 5 発現に対するその効果を実証する。0 . 4 と等しい感染多重度では、1 . 0 4 % の細胞のみが、緑色 ( 形質導入を示す ) であり、かつ C C R 5 発現の著しい低減を示す。1 と等しい感染多重度では、低 C C R 5 、G F P + 細胞の数は 6 8 . 1 % に、5 と等しい感染多重度では、低 C C R 5 、G F P + 細胞の数は 9 5 . 7 % に増加した。これらのデータは、図 1 9 のパネル B ではヒストグラム形態で提示されており、C C R 5 染色の点で正規分布した集団が、A G T 1 0 3 - G F P 用量の増加と共により低い平均蛍光強度に向かって移動したことを示す。A G T 1 0 3 - G F P の効力は、図 1 9 のパネル C ではグラフ形態で提示されており、A G T 1 0 3 - G F P の用量を増加させた際の C C R 5 発現の阻害パーセンテージが示されている。5 と等しい感染多重度では、9 9 % よりも高い C C R 5 発現レベルの低減があった。

30

40

#### 【 0 3 0 1 】

( 実施例 1 6 : A G T 1 0 3 は、初代ヒト C D 4 <sup>+</sup> T 細胞に効率的に形質導入する )

A G T 1 0 3 レンチウイルスベクターの初代 C D 4 T 細胞への形質導入。緑色蛍光タンパク質マーカー ( G F P ) を含む改変 A G T 1 0 3 ベクターを 0 . 2 ~ 5 の感染多重度を使用して、精製された初代ヒト C D 4 T 細胞に形質導入した。

#### 【 0 3 0 2 】

初代ヒト C D 4 T 細胞への A G T 1 0 3 の形質導入効率の機能アッセイ。C D 4 T 細胞を、磁気ビーズ標識抗体および標準的手順を使用して、ヒト P B M C ( H I V 陰性ドナー ) から単離した。精製した C D 4 T 細胞を C D 3 / C D 2 8 ビーズで e x v i v o 刺

50

激し、A G T 1 0 3 形質導入前に、インターロイキン - 2 を含む培地中で 1 日間培養した。レンチウイルスベクター用量（感染多重度）と形質導入効率との関係が、図 2 0 のパネル A に実証されており、0 . 2 と等しい感染多重度では、9 . 2 7 % の A G T 1 0 3 が形質導入された C D 4 陽性 T 細胞がもたらされ、5 と等しい感染多重度では、A G T 1 0 3 が形質導入された C D 4 陽性 T 細胞のこの値は、6 3 . 1 % に増加したことが示されている。初代 C D 4 陽性 T 細胞の効率的形質導入の達成に加えて、細胞あたりのゲノムコピー数を定量化することも必要である。図 2 0 のパネル B では、いくつかの感染多重度で形質導入された初代ヒト C D 4 T 細胞に由来する全細胞 D N A を定量的 P C R で試験して、細胞あたりのゲノムコピー数を決定した。0 . 2 と等しい感染多重度では、本発明者らは、細胞あたり 0 . 0 9 6 のゲノムコピーを測定した。これは、パネル A の 9 . 2 7 % の G F P 陽性 C D 4 T 細胞と良好に一致した。1 と等しい感染多重度では、細胞あたり 0 . 6 9 1 のゲノムコピーが生成され、5 と等しい感染多重度では、細胞あたり 1 . 2 4 5 のゲノムコピーが生成された。

10

#### 【 0 3 0 3 】

図 2 0 に示されているように、P B M C から単離された C D 4 + T 細胞を、C D 3 / C D 2 8 ビーズと I L - 2 で 1 日間刺激し、種々の濃度の A G T 1 0 3 を形質導入した。2 日後、ビーズを取り出し、C D 4 + T 細胞を集めた。パネル A に示されているように、形質導入された細胞（G F P 陽性）の頻度を、F A C S で検出した。パネル B に示されているように、細胞あたりのベクターコピー数を、q P C R で決定した。5 の感染多重度（M O I）では、6 3 % の C D 4 + T 細胞に、細胞あたり平均 1 ベクターコピーが形質導入された。

20

#### 【 0 3 0 4 】

（実施例 1 7 : A G T 1 0 3 は、初代 C D 4 + T 細胞での H I V 複製を阻害する）

細胞に A G T 1 0 3 を形質導入することによる、初代ヒト C D 4 陽性 T 細胞の H I V 感染からの保護。療药用レンチウイルス A G T 1 0 3 を、細胞あたり 0 . 2 ~ 5 の感染多重度で使用して、初代ヒト C D 4 陽性 T 細胞に形質導入した。その後、形質導入された細胞に、侵入に細胞表面 C C R 5 を必要としない C X C R 4 指向性 H I V 株 N L 4 . 3 をチャレンジした。このアッセイでは、H I V の V i f および T a t 遺伝子に対するマイクロ R N A の効力が、初代 C D 4 陽性 T 細胞における増殖性感染の予防の点で試験されるが、感染した初代ヒト C D 4 T 細胞から放出される H I V の量を検出する間接法が使用される。

30

#### 【 0 3 0 5 】

初代ヒト C D 4 陽性 T 細胞の C X C R 4 指向性 H I V 感染に対する A G T 1 0 3 保護の機能アッセイ。C D 4 T 細胞を、磁気ビーズ標識抗体および標準的手順を使用して、ヒト P B M C（H I V 陰性ドナー）から単離した。精製した C D 4 T 細胞を C D 3 / C D 2 8 ビーズで e x v i v o 刺激し、インターロイキン - 2 を含む培地で 1 日間培養してから、0 . 2 ~ 5 の感染多重度を使用して A G T 1 0 3 を形質導入した。形質導入の 2 日後、C D 4 陽性 T 細胞培養物に、緑色蛍光タンパク質（G F P）を発現するように操作された H I V 株 N L 4 . 3 をチャレンジした。形質導入され H I V に曝露された初代 C D 4 T 細胞培養物を 7 日間維持してから、H I V を含む無細胞培養液を集めた。無細胞培養液を使用して、高度に許容性の T 細胞株 C 8 1 6 6 に 2 日間感染させた。H I V に感染した C 8 1 6 6 細胞の割合を、G F P 蛍光を検出するフローサイトメトリーによって決定した。模擬レンチウイルス感染の場合、N L 4 . 3 H I V についての 0 . 1 の感染多重度の用量は、1 5 . 4 % の C 8 1 6 6 T 細胞で増殖性感染を確立することを可能にした量の培養液へ放出された H I V をもたらした。0 . 2 感染多重度の A G T 1 0 3 の用量では、C 8 1 6 6 細胞の H I V 感染に関するこの値は、5 . 3 % に低減され、1 と等しい感染多重度の A G T 1 0 3 では、3 . 1 9 % の C 8 1 6 6 T 細胞しか H I V に感染しなかった。C 8 1 6 6 感染は、5 と等しい感染多重度を使用した A G T 1 0 3 形質導入後、0 . 6 2 % にさらに低減された。形質導入に使用した A G T 1 0 3 の量と、培養培地に放出された H I V の量との間には明らかな用量応答関係性が存在する。

40

#### 【 0 3 0 6 】

50

図 2 1 に示されているように、P B M C から単離された C D 4 <sup>+</sup> T 細胞を、C D 3 / C D 2 8 ビーズと I L - 2 で 1 日間刺激し、種々の濃度 ( M O I ) の A G T 1 0 3 を形質導入した。2 日後、ビーズを取り出し、C D 4 <sup>+</sup> T 細胞に、0 . 1 M O I の H I V N L 4 . 3 - G F P を感染させた。2 4 時間後、細胞を P B S で 3 回洗浄し、I L - 2 ( 3 0 U / m l ) と共に 7 日間培養した。培養の終了時に、上清を集めて、H I V 許容性細胞株 C 8 1 6 6 に 2 日間感染させた。H I V に感染した C 8 1 6 6 細胞 ( G F P 陽性 ) を、F A C S で検出した。C 8 1 6 6 細胞のより少ない感染により観察されるように、A G T 1 0 3 の感染多重度が増加すると共に生存可能な H I V が低減された ( M O I 0 . 2 = 6 5 . 6 % 、 M O I 1 = 7 9 . 3 % 、および M O I 5 = 9 6 % ) 。

【 0 3 0 7 】

( 実施例 1 8 : A G T 1 0 3 は、H I V 誘導性枯渇から初代ヒト C D 4 <sup>+</sup> T 細胞を保護する )

H I V 媒介性細胞病理および細胞枯渇から保護するための初代ヒト C D 4 T 細胞の A G T 1 0 3 形質導入。P B M C を、健康な H I V 陰性ドナーから取得し、C D 3 / C D 2 8 ビーズで刺激し、その後、インターロイキン - 2 を含む培地で 1 日間培養してから、0 . 2 ~ 5 の感染多重度を使用して A G T 1 0 3 を形質導入した。

【 0 3 0 8 】

H I V 媒介性細胞病理からの初代ヒト C D 4 T 細胞の A G T 1 0 3 保護の機能アッセイ。A G T 1 0 3 を形質導入した初代ヒト C D 4 T 細胞に、細胞進入に C C R 5 を必要としない H I V N L 4 . 3 株 ( C X C R 4 指向性 ) を感染させた。C X C R 4 指向性 N L 4 . 3 を使用する場合、H I V 複製に対する V i f および T a t マイクロ RNA の効果のみを試験する。H I V N L 4 . 3 の用量は、0 . 1 の感染多重度であった。H I V 感染の 1 日後、細胞を洗浄して残留ウイルスを除去し、培地とインターロイキン - 2 で培養した。1 4 日間の培養中、細胞を 3 日毎に集め、その後、C D 4 に特異的であり、蛍光マーカーに直接コンジュゲートされているモノクローナル抗体で染色して、P B M C 中の C D 4 陽性 T 細胞の割合の測定を可能にした。未処理 C D 4 T 細胞、または対照レンチウイルスベクターを用いて形質導入した C D 4 T 細胞は、H I V チャレンジに高度に感受性であり、P B M C 中の C D 4 陽性 T 細胞の割合は、培養 1 4 日目までに 1 0 % 未満に低下した。対照的に、A G T 1 0 3 は、H I V チャレンジによる細胞枯渇の防止に対して用量依存的効果を示した。0 . 2 の感染多重度の A G T 1 0 3 用量では、P B M C の 2 0 % 超が、培養の 1 4 日目までに C D 4 T 細胞であり、5 と等しい感染多重度の A G T 1 0 3 用量では、培養の 1 4 日目までに C D 4 陽性 T 細胞になった P B M C は、5 0 % よりも高い値に増加した。この場合も、A G T 1 0 3 は、ヒト P B M C の H I V 細胞病理性に対して明らかな用量応答効果を示した。

【 0 3 0 9 】

図 2 2 に示されているように、P B M C を、C D 3 / C D 2 8 ビーズと I L - 2 で 1 日間刺激し、種々の濃度 ( M O I ) の A G T 1 0 3 を形質導入した。2 日後、ビーズを取り出し、細胞に 0 . 1 M O I の H I V N L 4 . 3 を感染させた。2 4 時間後、細胞を P B S で 3 回洗浄し、I L - 2 ( 3 0 U / m l ) と共に培養した。細胞を、3 日毎に集め、C D 4 <sup>+</sup> T 細胞の頻度を、F A C S で分析した。H I V に曝露した 1 4 日間後、L V - 対照を形質導入した C D 4 <sup>+</sup> T 細胞は 8 7 % 低減され、A G T 1 0 3 M O I 0 . 2 では 6 0 % 低減され、A G T 1 0 3 M O I 1 では 3 7 % 低減され、A G T 1 0 3 M O I 5 では 1 7 % 低減された。

【 0 3 1 0 】

( 実施例 1 9 : H I V 特異性について濃縮され、A G T 1 0 3 / C M V - G F P を用いて形質導入された C D 4 <sup>+</sup> T 細胞の集団の生成 )

H I V に対する療法用ワクチン接種は、C D 4 <sup>+</sup>、C D 8 <sup>+</sup>、および C D 4 <sup>+</sup> / C D 8 <sup>+</sup> T 細胞の分布に最小限の影響しか及ぼさなかった。図 2 3 A に示されるように、C D 4 T 細胞集団は、分析フローサイトメトリードットプロットの左上の象限に示され、ワクチン接種系列後、全 T 細胞の 5 2 % から 5 7 % に変化する。これらは代表的なデータである。

10

20

30

40

50

## 【0311】

H I V 療法用ワクチン試験における参加者からの末梢血単核細胞を、培地 + / - インターロイキン - 2 / インターロイキン - 12 または + / - インターロイキン - 7 / インターロイキン - 15 で 12 日間培養した。T 細胞刺激のためのエピトープペプチドの供給源として、H I V - 1 の全 p 55 G a g タンパク質 (H I V (G A G) U l t r a ペプチド混合物) を表す重複ペプチドで、いくつかの培養物を刺激した。これらのペプチドは、長さが 10 ~ 20 アミノ酸であり、その長さの 20 ~ 50 % が重複しており、H I V - 1 B a L 株由来の G a g 前駆体タンパク質 (p 55) 全体を表す。個々のペプチドの組成および配列は、主な循環 H I V 配列の領域変動を補償するために、または詳細な配列情報がこの療法を受けている個々の患者に利用可能である場合に、調整することができる。培養終了時に、細胞を回収し、抗 C D 4 または抗 C D 8 モノクローナル抗体で染色し、C D 3 + 集団をゲートし、ここに表示した。ワクチン接種前または接種後のいずれかの試料についての H I V (G A G) U l t r a ペプチド混合物刺激は培地対照と同様であり、このことは、H I V (G A G) U l t r a ペプチド混合物が細胞に対して毒性ではなく、ポリクローナル分裂促進因子としては作用しなかったことを示している。この分析の結果は、図 23 B に見出すことができる。

10

## 【0312】

H I V (G A G) U l t r a ペプチド混合物およびインターロイキン - 2 / インターロイキン - 12 は、抗原特異的 C D 4 T 細胞の最適な増殖のために提供された。図 23 C の上のパネルに示されるように、H I V (G A G) U l t r a ペプチド混合物に曝露されたワクチン接種後検体において、サイトカイン (インターフェロン - ガンマ) 分泌細胞の増加があった。ワクチン接種前の試料において、抗原性ペプチドへの曝露の結果として、サイトカイン分泌細胞が 0.43 から 0.69 % まで増加した。対照的に、ワクチン接種後の試料は、ペプチド刺激の結果として、全 C D 4 T 細胞の 0.62 から 1.76 % までのサイトカイン分泌細胞の増加を示した。これらのデータは、H I V 抗原に対する C D 4 T 細胞応答におけるワクチン接種の強い影響を実証する。

20

## 【0313】

最後に、抗原増殖した C D 4 T 細胞の A G T 103 / C M V - G F P 形質導入は、H I V に対する機能的治癒の一部として患者に注入するために必要とされる H I V 特異的および H I V 耐性ヘルパー C D 4 T 細胞を産生した (他の様々な態様および実施形態に応じて、A G T 103 は単独で使用され、例えば、臨床実施形態は C M V - G F P セグメントを含まなくてもよい)。図 23 C の上のパネルは、培養物中の C D 4 + T 細胞集団を分析した結果を示す。図 23 C の x 軸は、緑色蛍光タンパク質 (G F P) 放出を示しており、このことは、個々の細胞に A G T 103 / C M V - G F P が形質導入されたことを示している。ワクチン接種後の試料において、いずれもサイトカインを分泌する全 C D 4 T 細胞の 1.11 % が回収され、このことは、細胞が H I V 抗原に特異的に応答し、これらの細胞に A G T 103 / C M V - G F P が形質導入されることを示している。これは、H I V の注入および機能的治癒を意図した標的細胞集団および臨床産物である。e x v i v o 培養の抗原刺激およびその後のポリクローナル増殖期の間の細胞増殖の効率で、 $4 \times 10^8$  個の抗原特異的な、レンチウイルス形質導入 C D 4 T 細胞を産生することができる。これは、細胞産生の標的を 4 倍超えており、およそ 40 細胞 / マイクロリットルの血液または全循環 C D 4 T 細胞のおよそ 5.7 % の、抗原特異的および H I V 耐性 C D 4 T 細胞の数を達成することができるであろう。

30

40

## 【0314】

下の表 4 は、開示されたベクターおよび方法を使用した、H I V 特異的および H I V 耐性 C D 4 T 細胞の e x v i v o における産生の結果を示す。

【表 4】

表 4			
材料/操作	全 CD4 T 細胞	HIV 特異的パーセンテージ	HIV 特異的および HIV 耐性パーセンテージ
HIV+患者からの白血球アフェレーシスパック	約 $7 \times 10^8$	約 0.12	N/A
<i>ex vivo</i> でのペプチド増殖	約 $8 \times 10^8$	約 2.4	N/A
分裂促進因子増殖	約 $1.5 \times 10^{10}$	約 2.4	N/A
レンチウイルス形質導入	約 $1.5 \times 10^{10}$	約 2.4	約 1.6

10

## 【0315】

(実施例20)

免疫化を伴わないHIV陽性対象の処置の臨床研究

AGT103Tは、AGT103レンチウイルスベクター用いてさらに形質導入されている  $5 \times 10^7$  個のHIV特異的CD4 T細胞を含む遺伝子改変自己由来PBMCである。

20

## 【0316】

第I相臨床試験では、HIV感染が確認された、cARTを受けている間、血液  $1 \text{ mm}^3$  あたりのCD4 + T細胞数  $> 600$  細胞、および血漿  $1 \text{ ml}$  あたり200コピー未満の安定なウイルス抑制を有する成人研究参加者への *ex vivo* 改変自己由来CD4 T細胞 (AGT103T) 注入の安全性および実施可能性が試験されることになる。すべての研究参加者が、第I相臨床試験を通じて、標準的抗レトロウイルス薬物療法を受け続けることになる。HIV-1 Gagポリタンパク質を表す重複合成ペプチドのプールによる刺激に应答するCD4 + T細胞の頻度を測定するための *in vitro* 試験のために血液を提出することによって、研究参加者をスクリーニングする。全CD4 T細胞の0.065%がGag特異的CD4 T細胞と指定される対象は、遺伝子治療研究に登録され、白血球アフェレーシスを受け、その後PBMCが精製され (フィコール密度勾配遠心分離または抗体によるネガティブ選択を使用して)、PBMCは、*ex vivo* で培養され、HIV Gagペプチドとインターロイキン-2およびインターロイキン-12で12日間刺激され、その後、CD3 / CD28二重特異性抗体で修飾されているビーズで再び刺激される。抗レトロウイルス薬サキナビルを  $100 \text{ nM}$  で含めて、*ex vivo* 培養の間、自己由来HIVの出現を防止する。CD3 / CD28刺激の1日後、細胞に、1 ~ 10の感染多重度でAGT103が形質導入される。形質導入された細胞は、さらに7 ~ 14日間培養され、その間に、形質導入された細胞は、ポリクロナル増殖によって増殖する。収穫することにより培養期間を終了させ、細胞が洗浄され、効力およびリリース安全性アッセイのために分取し、残りの細胞は、凍結保存培地に再懸濁される。単一用量は、 $1 \times 10^{10}$  個の自己由来PBMCである。効力アッセイでは、ペプチド刺激に应答するCD4 T細胞の頻度が、インターフェロン-ガンマの発現によって測定される。他のリリース基準としては、産物が、AGT103をさらに形質導入した  $0.5 \times 10^7$  個のHIV特異的CD4 T細胞を含んでいなければならないことが挙げられる。別のリリース基準は、細胞あたりのAGT103ゲノムコピー数が、3を超過してはならないということである。AGT103Tを注入する5日前に、対象は、1用量のブスルフラム (busulfuram) (あるいはシトキサンまたはフルダラビンもしくは適切な薬物の組合せ) 条件付けレジメンを受け、その後、遺伝子改変CD4 T細胞を含む  $1 \times 10^{10}$  個

30

40

50



の P B M C が注入される。

#### 【 0 3 1 7 】

第 I I 相研究では、A G T 1 0 3 T 細胞療法の有効性が評価されることになる。第 I I 相研究参加者には、本発明者らの第 I 相研究に以前に登録され、遺伝子改変自己由来 H I V 特異的 C D 4 + T 細胞の成功した安定な移植、および有効性評価 ( 1 . 3 ) に記載されるようにモニターされるパラメータにおける正の変化として定義される臨床応答を有すると判断された個体が含まれる。研究参加者には、抗レトロウイルス薬物療法の彼らの既存のレジメンにマラビロクを追加することが求められることになる。マラビロクは、C C R 5 レベルを低減させることを目的とした遺伝子治療の有効性を増強する C C R 5 アンタゴニストである。マラビロクレジメンが整うと、対象には、以前の抗レトロウイルス薬レジメンを中止し、マラビロク単剤療法のみを、28 日間にわたって、または血漿ウイルス R N A レベルが 2 回の逐次的な毎週の採血で 1 m l あたり 1 0 , 0 0 0 を超過するまで維持することが求められることになる。持続的に高いウイルス血症の場合、参加者は、彼らの H I V 診療医の推奨に従って、マラビロクありまたはなしで、彼らの元の抗レトロウイルス薬レジメンに戻る必要がある。

10

#### 【 0 3 1 8 】

参加者の H I V がマラビロク単剤療法で > 28 日間にわたって抑制されたまま ( 血漿 1 m l あたり 2 , 0 0 0 未満の v R N A コピー ) である場合、参加者には、マラビロク投薬を 4 週間の期間にわたって徐々に低減させ、続いて、さらに 28 日間にわたって集中的にモニターすることが求められることになる。マラビロク単剤療法で H I V 抑制を維持した対象は、機能的治癒を有するとみなされる。マラビロク休薬後にも H I V 抑制を維持する対象も、機能的治癒を有するとみなされる。6 ヶ月間にわたる毎月のモニタリング、続く、あまり集中的でないモニタリングが、機能的治癒の持続性を確立することになる。

20

#### 【 0 3 1 9 】

##### 1 . 1 患者選択

選択基準：

- ・年齢が 18 ~ 60 歳であること。
- ・研究登録前に H I V 感染が判明していること。
- ・研究期間中に彼らの抗レトロウイルスレジメンを ( 医学的に指示されない限り ) 変化させないことを含め、研究で義務付けられている評価に応じる意思がなければならない。
- ・ C D 4 + T 細胞数が、立方ミリメートルあたり > 600 個 ( 細胞 / m m <sup>3</sup> ) であること
- ・ C D 4 + T 細胞最下点が、> 400 細胞 / m m <sup>3</sup> であること
- ・ H I V ウイルス負荷が、1 ミリリットル ( m L ) あたり > 1 , 000 コピーであること

30

除外基準：

- ・あらゆるウイルス性肝炎
- ・急性 H I V 感染
- ・ H I V ウイルス負荷が、> 1 , 000 , 000 コピー / m L であること
- ・活動性または最近の ( 過去 6 ヶ月の ) A I D S を規定する合併症
- ・研究に入ってから 12 週間以内の H I V 薬物療法におけるあらゆる変化
- ・少なくとも 5 年間寛解していないがんまたは悪性腫瘍、ただし処置に成功した皮膚の基底細胞癌は除く
- ・ N Y H A グレード 3 または 4 のうっ血性心不全または管理不良の狭心症もしくは不整脈と現在診断されていること
- ・出血障害の病歴
- ・過去 30 日の慢性ステロイドの使用
- ・妊婦または授乳
- ・活性薬物またはアルコール乱用
- ・過去 30 日の重度疾病
- ・別の臨床試験に現在参加しているか、またはあらゆる以前の遺伝子治療

40

#### 【 0 3 2 0 】

50

## 1.2 安全性評価

- ・急性注入反応
- ・注入後の安全性追跡調査

### 【0321】

#### 1.3 有効性評価 - 第Ⅰ相

- ・改変CD4<sup>+</sup> T細胞の数および頻度。
- ・改変CD4<sup>+</sup> T細胞の持続性。
- ・メモリーT細胞機能の尺度としてのGagペプチド再刺激に対する*in vitro*応答(ICSアッセイ)。
- ・ワクチン接種前およびワクチン接種後の時点と比較した、多機能的抗HIV CD8<sup>+</sup> T細胞応答。

10

- ・*in vitro*刺激後に二重スプライシングされたHIV mRNAを産生するCD4<sup>+</sup> T細胞の頻度。

### 【0322】

#### 1.4 有効性評価 - 第Ⅱ相

- ・遺伝子改変CD4<sup>+</sup> T細胞の数および頻度。
- ・マラビロク単剤療法によるウイルス抑制の維持(1mlあたり<2,000のvRNAコピーであるが、1mlあたり $5 \times 10^4$ 個のvRNAコピーを超過しない2回の連続する毎週の採血が許容される)。
- ・マラビロク休薬の間および後に継続するウイルス抑制。
- ・安定なCD4<sup>+</sup> T細胞数。

20

### 【0323】

#### (実施例21)

ペプチド刺激前に、CD8<sup>+</sup> T細胞の枯渇を介してCD4<sup>+</sup> T細胞の集団を生成するCD8<sup>+</sup> T細胞過剰成長は、標的CD4<sup>+</sup> T細胞の増殖に対して顕著に影響を与えたので、CD8<sup>+</sup> T細胞を細胞増殖の開始時に枯渇させて、それがCD4<sup>+</sup> T細胞増殖を改善するかどうかを決定した。現在のCD8<sup>+</sup> T細胞枯渇法では、細胞は磁気カラムを通過する必要がある。抗原提示細胞およびCD4<sup>+</sup> T細胞に対するその手順の起こり得る影響を回避するために、細胞枯渇を、細胞が機械的ストレスによりよく耐えることができる、ペプチド刺激の後かつレンチウイルス形質導入の前に実施した。

30

### 【0324】

より具体的には、HIV陽性ヒト末梢血を得た。Ficoll-Paque PLUS (GE Healthcare、カタログ番号17-1440-02)を用いてPBMCを分離した。新鮮な分離されたPBMC( $1 \times 10^7$ 個)を、24ウェルプレート中で1ml培地中のPepMix(商標)HIV(GAG)Ultra(カタログ番号PM-HIV-GAG、JPT Peptide Technologies、Berlin、Germany)で18時間刺激した。CD8<sup>+</sup> T細胞を、PE抗ヒトCD8抗体および抗PEマイクロビーズを用いて枯渇させた。陰性選択された細胞を、IL-7(170-076-111、Miltenyi Biotech、Bergisch Gladbach、Germany)、IL-15(170-076-114、Miltenyi Biotech、Bergisch Gladbach、Germany)およびサキナビル(カタログ番号4658、NIH AIDS Reagent Program、Germantown、MD)を含むTexMACS GMP培地(カタログ番号170-076-309、Miltenyi Biotech、Bergisch Gladbach、Germany)中で $2 \times 10^6$ /mlで培養した。レンチウイルスAGT103を、24時間後にMOI5で添加した。IL-7、IL-15およびサキナビルを含む新鮮な培地を、増殖の間2~3日毎に添加した。IL-7/IL-15の最終濃度は、10ng/mlであった。サキナビルの最終濃度は、100nMであった。12~16日目に、 $2 \sim 3 \times 10^6$ 個の細胞を、ペプチド再刺激および細胞内サイトカイン染色(ICS)分析のために集めた。この枯渇プロトコールの模式図は、図24に示されている。

40

50

## 【 0 3 2 5 】

C D 8 + T 細胞を枯渇させた場合、H I V 特異的 C D 4 T 細胞増殖は、有意に改善された ( 図 2 5 A ~ C ) 。しかしながら、V 1 T 細胞 ( P T I D 0 1 - 0 0 6 ) ( 図 2 5 A ) および N K 細胞 ( P T I D 0 1 - 0 0 8 ) ( 図 2 5 C ) による過剰成長が観察された。

## 【 0 3 2 6 】

図 2 5 A を参照すると、0 日目に、対照の左下四分儀、右下四分儀、左上四分儀、および右上四分儀は、それぞれ、4 4 . 5 %、5 5 . 5 %、0 . 0 3 2 %、および 0 % の蛍光強度を有した。0 日目に、G a g P e p M i x の左下四分儀、右下四分儀、左上四分儀、および右上四分儀は、それぞれ、4 4 . 2 %、5 5 . 3 %、0 . 4 8 %、および 0 . 0 5 3 % の蛍光強度を有した。1 2 日目に、C D 8 枯渇なしの場合、対照の左下四分儀、右下四分儀、左上四分儀、および右上四分儀は、それぞれ、7 9 . 8 %、2 0 . 1 %、0 . 1 2 %、および 0 . 0 1 8 % の蛍光強度を有した。1 2 日目に、C D 8 枯渇なしの場合、G a g P e p M i x の左下四分儀、右下四分儀、左上四分儀、および右上四分儀は、それぞれ、5 8 . 9 %、1 9 . 2 %、2 1 . 2 %、および 0 . 6 9 % の蛍光強度を有した。1 2 日目に、C D 8 枯渇ありの場合、対照の左下四分儀、右下四分儀、左上四分儀、および右上四分儀は、それぞれ、6 4 . 4 %、3 5 . 0 %、0 . 4 4 %、および 0 . 1 4 % の蛍光強度を有した。1 2 日目に、C D 8 枯渇ありの場合、G a g P e p M i x の左下四分儀、右下四分儀、左上四分儀、および右上四分儀は、それぞれ、6 1 . 9 %、3 2 . 9 %、3 . 4 7 %、および 1 . 7 0 % の蛍光強度を有した。

## 【 0 3 2 7 】

1 2 日目に、C D 8 枯渇ありの場合のゲーティングデータもまた、C D 4 および C D 8 を変数として使用して生成した。左下四分儀、右下四分儀、左上四分儀、および右上四分儀は、それぞれ、4 5 . 5 % / 4 5 . 3 %、4 4 . 9 %、9 . 2 6 %、および 0 . 3 5 % の蛍光強度を有した。さらに、V 1 および V 2 を変数として使用してゲーティングデータを生成した。左下四分儀、右下四分儀、左上四分儀、および右上四分儀は、それぞれ、1 6 . 9 %、8 2 . 8 %、0 . 1 4 %、および 0 . 1 2 % の蛍光強度を有した。

## 【 0 3 2 8 】

図 2 5 B を参照すると、0 日目に、対照の左下四分儀、右下四分儀、左上四分儀、および右上四分儀は、それぞれ、3 3 . 6 %、6 6 . 4 %、5 . 9 E - 4 %、および 1 . 7 8 E - 3 の蛍光強度を有した。0 日目に、G a g P e p M i x の左下四分儀、右下四分儀、左上四分儀、および右上四分儀は、それぞれ、3 3 . 7 %、6 6 . 3 %、0 . 0 1 1 %、および 0 . 0 1 6 % の蛍光強度を有した。1 6 日目に、C D 8 枯渇なしの場合、対照の左下四分儀、右下四分儀、左上四分儀、および右上四分儀は、それぞれ、7 8 . 4 %、2 1 . 2 %、0 . 3 0 %、および 0 . 0 1 8 % の蛍光強度を有した。1 6 日目に、C D 8 枯渇なしの場合、G a g P e p M i x の左下四分儀、右下四分儀、左上四分儀、および右上四分儀は、それぞれ、7 6 . 3 %、2 0 . 2 %、2 . 9 5 %、および 0 . 6 1 % の蛍光強度を有した。1 6 日目に、C D 8 枯渇ありの場合、対照の左下四分儀、右下四分儀、左上四分儀、および右上四分儀は、それぞれ、5 0 . 9 %、4 8 . 7 %、0 . 3 6 %、および 0 . 1 0 % の蛍光強度を有した。1 6 日目に、C D 8 枯渇ありの場合、G a g P e p M i x の左下四分儀、右下四分儀、左上四分儀、および右上四分儀は、それぞれ、5 1 . 6 %、4 4 . 4 %、0 . 4 3 %、および 3 . 6 0 % の蛍光強度を有した。

## 【 0 3 2 9 】

図 2 5 C を参照すると、0 日目に、対照の左下四分儀、右下四分儀、左上四分儀、および右上四分儀は、それぞれ、6 5 . 4 %、3 4 . 5 %、0 . 0 9 6 %、および 7 . 7 1 E - 4 の蛍光強度を有した。0 日目に、G a g P e p M i x の左下四分儀、右下四分儀、左上四分儀、および右上四分儀は、それぞれ、6 5 . 4 %、3 4 . 3 %、0 . 2 0 %、および 0 . 1 0 % の蛍光強度を有した。1 6 日目に、C D 8 枯渇なしの場合、対照の左下四分儀、右下四分儀、左上四分儀、および右上四分儀は、それぞれ、8 7 . 9 %、1 2 . 1 %、0 . 0 2 8 %、および 6 . 2 4 E - 3 % の蛍光強度を有した。1 6 日目に、C D 8 枯渇

なしの場合、G a g P e p M i x の左下四分儀、右下四分儀、左上四分儀、および右上四分儀は、それぞれ、82.3%、12.1%、5.38%、および0.23%の蛍光強度を有した。16日目に、C D 8 枯渇ありの場合、対照の左下四分儀、右下四分儀、左上四分儀、および右上四分儀は、それぞれ、87.8%、12.0%、0.22%、および0.013%の蛍光強度を有した。16日目に、C D 8 枯渇ありの場合、G a g P e p M i x の左下四分儀、右下四分儀、左上四分儀、および右上四分儀は、それぞれ、87.8%、11.1%、0.30%、および0.78%の蛍光強度を有した。

#### 【0330】

16日目に、C D 8 枯渇ありの場合のゲーティングデータもまた、変数C D 3 およびC D 4 を使用して生成したところ、示された領域において83.1%の蛍光強度が示された。さらに、変数C D 5 6 およびC D 4 を使用してゲーティングデータを生成したところ、示された領域において65.7%の蛍光強度が示された。

#### 【0331】

##### (実施例22)

ペプチド刺激前に、C D 8 +、NK、およびB細胞の枯渇を介してC D 4 + T細胞の集団を生成する

C D 8 + T細胞を枯渇させた場合、またはNK細胞の過剰成長が、複数の患者で観察された。したがって、C D 8、NKまたはB細胞を枯渇させて、それがC D 4 + T細胞増殖を改善するかどうかを試験した。細胞枯渇を、ペプチド刺激の後かつレンチウイルス形質導入の前に実施した。

#### 【0332】

H I V 陽性ヒト末梢血を得た。F i c o l l - P a q u e P L U S ( G E H e a l t h c a r e、カタログ番号17-1440-02)を用いてP B M C を分離した。新鮮な分離されたP B M C ( $1 \times 10^7$ 個)を、24ウェルプレート中で1mL培地中のP e p M i x (商標)H I V (G A G)U l t r a (カタログ番号P M - H I V - G A G、J P T P e p t i d e T e c h n o l o g i e s、Berlin、Germany)で18時間刺激した。C D 8 + T、NK、またはB細胞を、P E 標識された特異的抗体および抗P E マイクロビーズを用いて枯渇させた。陰性選択された細胞を、I L - 7 (170-076-111、M i l t e n y i B i o t e c h、B e r g i s c h G l a d b a c h、Germany)、I L - 15 (170-076-114、M i l t e n y i B i o t e c h、B e r g i s c h G l a d b a c h、Germany)およびサキナビル(カタログ番号4658、N I H A I D S R e a g e n t P r o g r a m、G e r m a n t o w n、MD)を含むT e x M A C S G M P 培地(カタログ番号170-076-309、M i l t e n y i B i o t e c h、B e r g i s c h G l a d b a c h、Germany)中で $2 \times 10^6$ /mLで培養した。レンチウイルスA G T 103を、24時間後にM O I 5 で添加した。I L - 7、I L - 15 およびサキナビルを含む新鮮な培地を、増殖の間2~3日毎に添加した。I L - 7 / I L - 15 の最終濃度は、10ng/mLであった。12~16日目に、 $2 \sim 3 \times 10^6$ 個の細胞を、ペプチド再刺激および細胞内サイトカイン染色(I C S)分析のために集めた。この枯渇プロトコールの模式図は、図26に示されている。

#### 【0333】

さらなる細胞サブセットを枯渇させた場合、H I V G a g 特異的C D 4 T細胞は、より高いレベルまで増殖した(図27A~B)。C D 8、NK、またはB細胞の過剰成長は、C D 4 T細胞増殖を阻害し、またはレンチウイルス形質導入抗原特異的C D 4 T細胞を死滅させるようである。この最適化されたプロトコールは、スケールアップおよび細胞製造に適切である。

#### 【0334】

図27Aを参照すると、0日目に、対照の左下四分儀、右下四分儀、左上四分儀、および右上四分儀は、それぞれ、56.4%、43.5%、0.034%、および7.44E-4%の蛍光強度を有した。0日目に、G a g P e p M i x の左下四分儀、右下四分儀、

左上四分儀、および右上四分儀は、それぞれ、54.8%、44.8%、0.30%、および0.055%の蛍光強度を有した。18時間後の枯渇なしの場合、対照の左下四分儀、右下四分儀、左上四分儀、および右上四分儀は、それぞれ、83.9%、16.0%、0.061%、および0.027%の蛍光強度を有した。18時間後の枯渇なしの場合、GagPePMixの左下四分儀、右下四分儀、左上四分儀、および右上四分儀は、それぞれ、77.6%、15.4%、6.39%、および0.54%の蛍光強度を有した。18時間後の枯渇ありの場合、対照の左下四分儀、右下四分儀、左上四分儀、および右上四分儀は、それぞれ、41.9%、57.9%、0.094%、および0.099%の蛍光強度を有した。18時間後の枯渇ありの場合、GagPePMixの左下四分儀、右下四分儀、左上四分儀、および右上四分儀は、それぞれ、43.3%、50.7%、3.00%、および2.98%の蛍光強度を有した。18時間後のCD8および枯渇ありの場合、対照の左下四分儀、右下四分儀、左上四分儀、および右上四分儀は、それぞれ、40.4%、59.3%、0.12%、および0.13%の蛍光強度を有した。18時間後のCD8および枯渇ありの場合、GagPePMixの左下四分儀、右下四分儀、左上四分儀、および右上四分儀は、それぞれ、38.3%、54.7%、3.14%、および3.86%の蛍光強度を有した。18時間後のCD8、およびB枯渇ありの場合、対照の左下四分儀、右下四分儀、左上四分儀、および右上四分儀は、それぞれ、46.2%、53.6%、0.13%、および0.080%の蛍光強度を有した。18時間後のCD8、およびB枯渇ありの場合、GagPePMixの左下四分儀、右下四分儀、左上四分儀、および右上四分儀は、それぞれ、42.1%、48.5%、4.28%、および5.06%の蛍光強度を有した。

10

20

#### 【0335】

図27Bを参照すると、0日目に、対照の左下四分儀、右下四分儀、左上四分儀、および右上四分儀は、それぞれ、42.6%、57.4%、2.71E-3%、および0.0%の蛍光強度を有した。0日目に、GagPePMixの左下四分儀、右下四分儀、左上四分儀、および右上四分儀は、それぞれ、42.5%、57.4%、0.031%、および0.048%の蛍光強度を有した。18時間後の枯渇なしの場合、対照の左下四分儀、右下四分儀、左上四分儀、および右上四分儀は、それぞれ、79.5%、20.5%、0.017%、および9.73E-3%の蛍光強度を有した。18時間後の枯渇なしの場合、GagPePMixの左下四分儀、右下四分儀、左上四分儀、および右上四分儀は、それぞれ、78.9%、19.5%、0.93%、および0.65%の蛍光強度を有した。18時間後の枯渇ありの場合、対照の左下四分儀、右下四分儀、左上四分儀、および右上四分儀は、それぞれ、51.4%、48.4%、0.11%、および0.063%の蛍光強度を有した。18時間後の枯渇ありの場合、GagPePMixの左下四分儀、右下四分儀、左上四分儀、および右上四分儀は、それぞれ、51.7%、43.0%、0.22%、および5.03%の蛍光強度を有した。18時間後のCD8、CD56、およびB枯渇ありの場合、刺激なしの細胞の左下四分儀、右下四分儀、左上四分儀、および右上四分儀は、それぞれ、12.8%、87.0%、0.14%、および0.10%の蛍光強度を有した。18時間後のCD8、CD56、およびB枯渇ありの場合、GagPePMixの左下四分儀、右下四分儀、左上四分儀、および右上四分儀は、それぞれ、13.2%、79.4%、0.27%、および7.17%の蛍光強度を有した。

30

40

#### 【0336】

##### (実施例23)

AGT103レンチウイルスの形質導入効率を測定する方法

CD4+ T細胞の増殖を改善するために、標的細胞は、レンチウイルスAGT103形質導入抗原特異的CD4+ T細胞である。GFPを有するレンチウイルスを使用して、形質導入効率を測定した。細胞内染色は顕著なGFPシグナル喪失を引き起こすので、CCSを使用して、抗原特異的CD4+ T細胞を識別し、GFP陽性細胞を使用して、形質導入された細胞サブセットを識別した。

#### 【0337】

50

H I V陽性患者由来の $1 \times 10^7$ 個のP B M Cを、24ウェルプレート中で1 mL培地中のP e p M i x (商標) H I V ( G A G ) U l t r a (カタログ番号P M - H I V - G A G、J P T P e p t i d e T e c h n o l o g i e s、B e r l i n、G e r m a n y)で18時間刺激した。C D 8、NKまたはB細胞を、P E 標識された特異的抗体および抗P E マイクロビーズを用いて枯渇させた。陰性選択された細胞を、I L - 7 (170 - 076 - 111、M i l t e n y i B i o t e c h、B e r g i s c h G l a d b a c h、G e r m a n y)、I L - 15 (170 - 076 - 114、M i l t e n y i B i o t e c h、B e r g i s c h G l a d b a c h、G e r m a n y)およびサキナビル (カタログ番号4658、N I H A I D S R e a g e n t P r o g r a m、G e r m a n t o w n、M D)を含むT e x M A C S G M P培地 (カタログ番号170 - 076 - 309、M i l t e n y i B i o t e c h、B e r g i s c h G l a d b a c h、G e r m a n y)中で $2 \times 10^6$  / mLで培養した。G F Pを有するレンチウイルスを、24時間後にM O I 5で添加した。I L - 7、I L - 15およびサキナビルを含む新鮮な培地を、増殖の間3日毎に添加した。I L - 7 / I L - 15の最終濃度は、10 ng / mLであった。12 ~ 16日目に、 $2 \sim 3 \times 10^6$ 個の細胞を集めた。ペプチド再刺激およびC C Sアッセイを実施して、I F N - 陽性抗原特異的C D 4 + T細胞を評価し、G F Pシグナル生成を用いて、形質導入効率を評価した。すべての実験は、製造業者の指示に従って実施した。

#### 【0338】

I F N - 陽性抗原特異的C D 4 + T細胞は、培養物中の他の細胞サブセットと比較して、かなりよい形質導入効率を示した (図28)。抗原特異的C D 4 + T細胞が、T C R刺激を受け、より速く増殖し、レンチウイルスによる感染がより容易であったことを考慮すると、これは合理的である。図28に示されているように、右下四分儀 (68.6%蛍光) および右上四分儀 (12.6%蛍光) は、それぞれ、41.5%、および67.8%のG F P形質導入効率を有した。これは、それぞれ、35.6%および43.3%のG F P形質導入効率を有した左下四分儀 (9.75%蛍光) および左上四分儀 (2.46%蛍光) とは対照的である。

#### 【0339】

##### (実施例24)

形質導入された細胞のパーセンテージとベクターコピー数との関係を決定する方法  
標的細胞は、A G T 103レンチウイルス形質導入H I V特異的C D 4 T細胞であるので、どれだけ多くの標的細胞が最終細胞産物中に含まれるかを知ることが重要である。しかしながら、臨床グレードのA G T 103レンチウイルス中には、検出可能なマーカーは含まれない。結果として、形質導入効率を、q P C Rによってベクターコピー数 (V C N) を検出することによって測定した。G F Pを有するレンチウイルスを使用して、形質導入された細胞のパーセンテージとV C Nとの関係を確立することによって、最終細胞産物中のV C Nに基づいて、形質導入された細胞のパーセンテージを確立することができる。

#### 【0340】

H I V陽性患者由来の $1 \times 10^7$ 個のP B M Cを、24ウェルプレート中で1 mL培地中のP e p M i x (商標) H I V ( G A G ) U l t r a (カタログ番号P M - H I V - G A G、J P T P e p t i d e T e c h n o l o g i e s、B e r l i n、G e r m a n y)で18時間刺激した。C D 8、NKまたはB細胞を、P E 標識された特異的抗体および抗P E マイクロビーズを用いて枯渇させた。陰性選択された細胞を、I L - 7 (170 - 076 - 111、M i l t e n y i B i o t e c h、B e r g i s c h G l a d b a c h、G e r m a n y)、I L - 15 (170 - 076 - 114、M i l t e n y i B i o t e c h、B e r g i s c h G l a d b a c h、G e r m a n y)およびサキナビル (カタログ番号4658、N I H A I D S R e a g e n t P r o g r a m、G e r m a n t o w n、M D)を含むT e x M A C S G M P培地 (カタログ番号170 - 076 - 309、M i l t e n y i B i o t e c h、B e r g i s c h G l a d b a c h、G e r m a n y)中で $2 \times 10^6$  / mLで培養した。G F Pを有するレンチウイルス

を、24時間後にMOI5で添加した。IL-7、IL-15およびサキナビルを含む新鮮な培地を、増殖の間3日毎に添加した。IL-7/IL-15の最終濃度は、10 ng/mLであった。サキナビルの最終濃度は、100 nMであった。12～16日目に、 $2 \sim 3 \times 10^6$ 個の細胞を集めた。ペプチド再刺激およびCCSアッセイを実施して、抗原特異的CD4+ T細胞を評価し、GFPシグナル生成を用いて、形質導入効率を評価した。QPCRを実施してベクターコピー数を検出した。すべての実験は、製造業者の指示に従って実施した。

【0341】

4つの試料を試験した後、形質導入された細胞のパーセンテージとベクターコピー数との間に正の相関が観察された(図29)。

【0342】

配列

以下の配列が、本明細書で引用されている：

【表5-1】

配列番号	説明	配列
1	miR30 CCR5	AGGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCGACTGTAAACTGAG CTTGCTCTACTGTGAAGCCACAGATGGGTAGAGCAAGCA CAGTTTACCGCTGCCTACTGCCTCGGACTTCAAGGGGCTT
2	miR21 Vif	CATCTCCATGGCTGTACCACCTTGTCTGGGGGATGTGTACT TCTGAACTTGTGTTGAATCTCATGGAGTTCAGAAGAACAC ATCCGCACTGACATTTTGGTATCTTTCATCTGACCA
3	miR185 Tat	GGGCCTGGCTCGAGCAGGGGGCGAGGGATTCCGCTTCTT CCTGCCATAGCGTGG TCCCCTCCCCCTATGGCAGGCAGAAGCGGCACCTTCCCTCC

10

20

30

40

50

【表 5 - 2】

		CAATGACCGCGTCTTCGTCG
4, 64	伸長因子-1 アルファ(EF1-アルファ)プロモーター	CCGGTGCCTAGAGAAGGTGGCGCGGGTAAACTGGGAA AGTGATGTCGTGTACTGGCTCCGCCTTTTCCCGAGGGTG GGGGAGAACCGTATATAAGTGCAGTAGTCGCCGTGAACG TTCTTTTCGCAACGGGTTTGCCGCCAGAACACAGGTAAG TGCCGTGTGTGGTTCCCGCGGGCCTGGCCTCTTACGGGT TATGGCCCTTGCGTGCCTTGAATTACTTCCACGCCCTGG CTGCAGTACGTGATTCTTGATCCCGAGCTTCGGGTTGGAA GTGGGTGGGAGAGTTCGAGGCCTTGCGCTTAAGGAGCCC CTTCGCCTCGTGCTTGAGTTGAGGCCTGGCCTGGGCGCTG GGGCCGCCGCGTGC GAATCTGGTGGCACCTTCGCGCCTG TCTCGCTGCTTTCGATAAGTCTCTAGCCATTAAAAATTTT GATGACCTGCTGCGACGCTTTTTTTCTGGCAAGATAGTCT TGTAATGCGGGCCAAGATCTGCACACTGGTATTTCGGTT TTTGGGGCCGCGGGCGGCGACGGGGCCCGTGCCTCCAG CGCACATGTTGCGCGAGGCGGGGCTGCGAGCGCGGCCA CCGAGAATCGGACGGGGGTAGTCTCAAGCTGGCCGGCCT GCTCTGGTGCCTGGCCTCGCGCCGCCGTGTATCGCCCCGC CCTGGGCGGCAAGGCTGGCCCGGTGCGCACCAAGTTGCGT GAGCGGAAAGATGGCCGCTTCCCGGCCCTGCTGCAGGGA GCTCAAAATGGAGGACGCGGCGCTCGGGAGAGCGGGCG GGTGAGTCACCCACACAAAGGAAAAGGGCCTTTCGTCC TCAGCCGTCGCTTCATGTGACTCCACGAGTACCGGGCG CCGTCCAGGCACCTCGATTAGTTCTCGAGCTTTGGAGTA CGTCGTCTTAGGTTGGGGGAGGGGTTTTATGCGATGG AGTTTCCCCACACTGAGTGGGTGGAGACTGAAGTTAGGC CAGCTTGGCACTTGATGTAATTCTCCTGGAATTTGCCCT TTTGAGTTTGGATCTTGGTTCATCTCAAGCCTCAGACA GTGGTTCAAAGTTTTTTCTTCCATTTCAGGTGTCGTGA
5	CCR5 標的配列	GAGCAAGCTCAGTTTACA
6	Vif 標的配列	GGGATGTGTACTTCTGAACCT
7	Tat 標的配列	TCCGCTTCTTCTGCCATAG
8	TAR デコイ配列	CTTGCAATGATGTCGTAATTTGCGTCTTACCTCGTTCTCG ACAGCGACCAGATCTGAGCCTGGGAGCTCTCTGGCTGTC AGTAAGCTGGTACAGAAGGTTGACGAAAATTCTTACTGA GCAAGAAA
9	Rev/Tat 標的配列	GCGGAGACAGCGACGAAGAGC
10	Rev/Tat shRNA	GCGGAGACAGCGACGAAGAGCTTCAAGAGAGCTCTTCGT

10

20

30

40

50



【表 5 - 3】

	配列	CGCTGCTCCGCTTTTT
11	Gag 標の配列	GAAGAAATGATGACAGCAT
12	Gag shRNA 配列	GAAGAAATGATGACAGCATTTCAAGAGAATGCTGTCATC ATTCTTCTTTTT
13	Pol 標の配列	CAGGAGCAGATGATACAG
14	Pol shRNA 配列	CAGGAGATGATACAGTTCAAGAGACTGTATCATCTGCTC CTGTTTTT
15	CCR5 標の配列 #1	GTGTCAAGTCCAATCTATG
16	CCR5 shRNA 配 列#1	GTGTCAAGTCCAATCTATGTTCAGAGACATAGATTGGA CTTGACACTTTTT
17	CCR5 標の配列 #2	GAGCATGACTGACATCTAC
18	CCR5 shRNA 配 列#2	GAGCATGACTGACATCTACTTCAAGAGAGTAGATGTCA GTCATGCTCTTTTT
19	CCR5 標の配列 #3	GTAGCTCTAACAGGTTGGA
20	CCR5 shRNA 配 列#3	GTAGCTCTAACAGGTTGGATTCAAGAGATCCAACCTGTT AGAGCTACTTTTT
21	CCR5 標の配列 #4	GTTTCAGAACTACCTCTTA
22	CCR5 shRNA 配 列#4	GTTTCAGAACTACCTCTTATTCAAGAGATAAGAGGTAG TTTCTGAACTTTT
23	CCR5 標の配列 #5	GAGCAAGCTCAGTTTACACC
24	CCR5 shRNA 配 列#5	GAGCAAGCTCAGTTTACACCTTCAAGAGAGGTGTAAAC TGAGCTTGCTCTTTTT
25	Homo sapiens CCR5 遺伝子、 配列 1	ATGGATTATCAAGTGTCAAGTCCAATCTATGACATCAATT ATTATACATCGGAGCCCTGCCAAAAAATCAATGTGAAGC AAATCGCAGCCCGCCTCCTGCCTCCGCTCTACTACTGGT GTTTCATCTTTGGTTTGTGGGC
26	Homo sapiens CCR5 遺伝子、 配列 2	AACATGCTGGTCATCCTCATCCTGATAAACTGCAAAAGG CTGAAGAGCATGACTGACATCTACCTGCTCAACCTGGCC ATCTCTGACCTGTTTTCTTCTTACTGTCCCTTCTGGGC TCACTATGCTGCCGCCAGTGGGACTTTGGAAATACAAT GTGTCAACTCTTGACAGGGCTCTATTTATAGGCTTCTTCT CTGGAATCTTCTTCATCATCCTCCTGACAATCGATAGGTA

10

20

30

40

50

【表 5 - 4】

		CCTGGCTGTCGTCCATGCTGTGTTTGCTTTAAAAGCCAGG ACGGTCACCTTTGGGGTGGTGACAAGTGTGATCACTTGG GTGGTGGCTGTGTTTGCCTCTCTCCAGGAATCATCTTTA CCAGATCTCAAAAAGAAGGTCTTCATTACACCTGCAGCT CTCATTTTCCATACAGTCAGTATCAATTCTGGAAGAATTT CCAGACATTAAAGATAGTCATCTTGGGGCTGGTCCTGCC GCTGCTTGTTCATGGTCATCTGCTACTCGGGAATCCTAAAA ACTCTGCTTCGGTGTGCGAAATGAGAAGAAGAGGCACAGG GCTGTGAGGCTTATCTTCACCATCATGATTGTTTATTTCT CTTCTGGGCTCCCTACAACATTGTCCTTCTCCTGAAC
27	Homo sapiens CCR5 遺伝子、 配列 3	ACCTTCCAGGAATCTTTGGCCTGAATAATTGCAGTAGCT CTAACAGGTTGGACCAAGCTATGCAGGTGA
28	Homo sapiens CCR5 遺伝子、 配列 4	CAGAGACTCTTGGGATGACGCACTGCTGCATCAACCCCA TCATCTATGCCTTTGTGCGGGAGAAGTTCAGAACTACCT CTTAGTCTTCTTCCAAAAGCACATTGCCAAACGCTTCTGC AAATGCTGTCTAATTTCCAG
29	Homo sapiens CCR5 遺伝子、 配列 5	CAAGAGGCTCCCGAGCGAGCAAGCTCAGTTTACACCCGA TCCACTGGGGAGCAGGAAATATCTGTGGGCTTGTGA
30	CD4 プロモーター 配列	TGTTGGGGTTCAAATTTGAGCCCAGCTGTTAGCCCTCTG CAAAGAAAAAAAAAAAAAAAAAAGAACAAAGGCCTAG ATTTCCCTTCTGAGCCCCACCCTAAGATGAAGCCTCTTCT TTCAAGGGAGTGGGGTTGGGGTGGAGGCGGATCCTGTCA GCTTTGCTCTCTCTGTGGCTGGCAGTTTCTCAAAGGGTA ACAGGTGTCAGCTGGCTGAGCCTAGGCTGAACCTGAGA CATGCTACCTCTGTCTTCTCATGGCTGGAGGCAGCCTTTG TAAGTCACAGAAAGTAGCTGAGGGGCTCTGGAAAAAAG ACAGCCAGGGTGGAGGTAGATTGGTCTTTGACTCCTGATT TAAGCCTGATTCTGCTTAACTTTTTCCCTTGACTTTGGCAT TTTCACTTTGACATGTTCCCTGAGAGCCTGGGGGGTGGGG AACCCAGCTCCAGCTGGTGACGTTTGGGGCCGGCCAGG CCTAGGGTGTGGAGGAGCCTTGCCATCGGGCTTCCTGTCT CTCTTCATTTAAGCACGACTCTGCAGA
31	miR30- CCR5/miR21- Vif/miR185 Tat マイクロ RNA クラ	AGGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCGACTGTAACTGAG CTTGCTCTACTGTGAAGCCACAGATGGGTAGAGCAAGCA CAGTTTACCGCTGCCTACTGCCTCGGACTTCAAGGGGCTT CCCGGGCATCTCCATGGCTGTACCACCTTGTGCGGGGATG TGTA CTCTGA ACTTGTGTTGAATCTCATGGAGTTCAGAA

10

20

30

40

50

【表 5 - 5】

	スター配列	GAACACATCCGCACTGACATTTTGGTATCTTTCATCTGAC CAGCTAGCGGGCCTGGCTCGAGCAGGGGGCGAGGGATT CGCTTCTTCCCTGCCATAGCGTGGTCCCTCCCTATGGCA GGCAGAAGCGGCACCTTCCCTCCCAATGACCGCGTCTTC GTC
32	長鎖 WPRE 配列	AATCAACCTCTGATTACAAAATTTGTGAAAGATTGACTG GTATTCTTAACCTATGTTGCTCCTTTTACGCTATGTTGATAC GCTGCTTTAATGCCCTTGTATCATGCTATTGCTTCCCGTAT GGCTTTCATTTCTCCTCCTGTATAAAATCCTGGTTGCTGT CTCTTTATGAGGAGTTGTGGCCCGTTGTCAGGCAACGTGG CGTGGTGTGCACTGTGTTTGTGACGCAACCCCCACTGGT TGGGGCATTGCCACCACCTGTCAGCTCCTTTCCGGGACTT TCGCTTCCCCCTCCCTATTGCCACGGCGGAACATCATCG CGCCTGCCTTGCCCGCTGCTGGACAGGGGCTCGGCTGTTG GGCACTGACAATTCCGTGGTGTGTCGGGGAAATCATCG TCCTTTCCTTGGCTGCTCGCCTGTGTTGCCACCTGGATTCT GCGCGGGACGTCTTCTGCTACGTCCCTTCGGCCCTCAAT CCAGCGGACCTTCCTTCCCGCGGCTGCTGCCGGCTCTGC GGCTCTTCCGCGTCTTCGCCTTCGCCCTCAGACGAGTCG GATCTCCCTTTGGGCCGCTCCCCGCCT
33	伸長因子-1 アルファ(EF1-アルファ)プロモーター; miR30CCR5;miR21Vif;miR185 Tat	CCGGTGCCTAGAGAAGGTGGCGCGGGGTAACTGGGAA AGTGATGTGCTGTACTGGCTCCGCCTTTTCCCGAGGGTG GGGGAGAACCCTATATAAGTGCAGTAGTCGCCGTGAACG TTCTTTTTCGAACGGGTTTGCCGCCAGAACACAGGTAAG TGCCGTGTGTGGTTCCCGCGGGCCTGGCCTCTTTACGGGT TATGGCCCTTGCGTGCTTGAATTACTTCCACGCCCTTGG CTGCAGTACGTGATTCTTGATCCCGAGCTTCGGGTGGAA GTGGGTGGGAGAGTTTCGAGGCCTTGCGCTTAAGGAGCCC CTTCGCCTCGTGCTTGAGTTGAGGCCTGGCCTGGGCGCTG GGGCCGCCGCGTGCGAATCTGGTGGCACCTTCGCGCCTG TCTCGCTGCTTTCGATAAGTCTCTAGCCATTTAAAATTTT GATGACCTGCTGCGACGCTTTTTTCTGGCAAGATAGTCT TGTAATGCGGGCCAAGATCTGCACACTGGTATTTCCGGT TTTGGGGCCGCGGGCGGCGACGGGGCCGTGCGTCCAG CGCACATGTTCCGGCAGGCGGGGCTGCGAGCGCGGCCA CCGAGAATCGGACGGGGGTAGTCTCAAGCTGGCCGGCCT GCTCTGGTGCTTGGCTTCGCGCCGCCGTGTATCGCCCCGC CCTGGGCGGCAAGGCTGGCCCGGTTCGGCACCAAGTTGCGT GAGCGGAAAGATGGCCGCTTCCCGGCCCTGCTGCAGGGA

10

20

30

40

50

【表 5 - 6】

		<p>GCTCAAATGGAGGACGCGGCGCTCGGGAGAGCGGGCG GGTGAGTCACCCACACAAAGGAAAAGGGCCTTCCGTCC TCAGCCGTCGCTTCATGTGACTCCACGGAGTACCGGGCG CCGTCCAGGCACCTCGATTAGTTCTCGAGCTTTGGAGTA CGTCGTCTTTAGGTTGGGGGAGGGGTTTATGCGATGG AGTTTCCCCACACTGAGTGGGTGGAGACTGAAGTTAGGC CAGCTTGGCACTTGATGTAATTCCTTGGAATTTGCCCT TTTTGAGTTGGATCTTGGTTCATTCTCAAGCCTCAGACA GTGGTTCAAAGTTTTTCTTCCATTTCAGGTGTCGTGATG TACA AGGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCGACTGTAACTGAG CTTGCTCTACTGTGAAGCCACAGATGGGTAGAGCAAGCA CAGTTTACCGCTGCCTACTGCCTCGGACTTCAAGGGGCTT CCCGGGCATCTCCATGGCTGTACCACCTTGTCGGGGGATG TGACTTCTGAACTTGTTGAATCTCATGGAGTTTCAGAA GAACACATCCGCACTGACATTTTGGTATCTTTCATCTGAC CAGCTAGCGGGCTGGCTCGAGCAGGGGGCGAGGGATTTC CGCTTCTTCTGCCATAGCGTGGTCCCCCTCCCTATGGCA GGCAGAAGCGGCACCTTCCCTCCCAATGACCGCGTCTTC GTC</p>	10
34	ラウス肉腫ウイルス (RSV)プロモーター	<p>GTAGTCTTATGCAATACTCTGTAGTCTTGCAACATGGTA ACGATGAGTTAGCAACATGCCTTACAAGGAGAGAAAAAG CACCGTGCATGCCGATTGGTGAAGTAAGGTGGTACGAT CGTGCCTTATTAGGAAGGCAACAGACGGGTCTGACATGG ATTGGACGAACCACTGAATTGCCGATTGCAGAGATATT GTATTTAAGTGCCTAGTCGATAACAATAAACG</p>	20
35	5'末端反復配列 (LTR)	<p>GGTCTCTCTGGTTAGACCAGATCTGAGCCTGGGAGCTCTC TGGCTAACTAGGGAACCCACTGCTTAAGCCTCAATAAAG CTTGCCTTGAGTGCTTCAAGTAGTGTGTGCCCCTCTGTTG TGTGACTCTGGTAACTAGAGATCCCTCAGACCCTTTAGT CAGTGTGGAAAATCTCTAGCA</p>	30
36	Psi パッケージング シグナル	<p>TACGCCAAAAATTTTACTAGCGGAGGCTAGAAGGAGAG AG</p>	
37	Rev 応答エレメン ト(RRE)	<p>AGGAGCTTTGTTCTTGGGTCTTGGGAGCAGCAGGAAG CACTATGGGCGCAGCCTCAATGACGCTGACGGTACAGGC CAGACAATTATTGTCTGGTATAGTGCAGCAGCAGAACAA TTTGCTGAGGGCTATTGAGGCGCAACAGCATCTGTTGCA ACTCACAGTCTGGGGCATCAAGCAGCTCCAGGCAAGAAT CCTGGCTGTGGAAAGATACCTAAAGGATCAACAGCTCC</p>	40

10

20

30

40

50

【表 5 - 7】

38	中央ポリプリントラ クト(cPPT)	TTTAAAAGAAAAGGGGGGATTGGGGGTACAGTGCAGG GGAAAGAATAGTAGACATAATAGCAACAGACATACAAA CTAAAGAATTACAAAAACAAATTACAAAATTCAAAATTT TA
39, 102	3'デルタ LTR	TGGAAGGGCTAATTCACCTCCCAACGAAGATAAGATCTGC TTTTTGCTTGTAAGTGGGTCTCTCTGGTTAGACCAGATCTG AGCCTGGGAGCTCTCTGGCTAACTAGGGAACCCACTGCT TAAGCCTCAATAAAGCTTGCCTTGAGTGCCTCAAGTAGTG TGTGCCCCGTCTGTTGTGTGACTCTGGTAACTAGAGATCCC TCAGACCCCTTTTAGTCAGTGTGGAAAATCTCTAGCAGTAG TAGTTCATGTCA
40, 49	ヘルパー /Rev;CMV 初期 (CAG)エンハンサ ー:転写を増強す る	TAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCAT AGCCCATATATGGAGTTCCGCGTTACATAACTTACGGTAA ATGGCCCCGCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCCGCCCAT TGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAAT AGGGACTTTCATTGACGTCAATGGGTGGACTATTACGG TAAACTGCCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGC CAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGC CCGCTTGGCATTATGCCAGTACATGACCTTATGGGACTT TCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATC
41, 50	ヘルパー/Rev;ニワ トリベータアクチン (CAG)プロモータ ー:転写	GCTATTACCATGGGTCGAGGTGAGCCCCACGTTCTGCTTC ACTCTCCCCATCTCCCCCCCCCTCCCAACCCCAATTTTGTA TTAATTTATTTTAAATATTTTGTGCAGCGATGGGGGCGG GGGGGGGGGGGGCGCGCCAGGCGGGGCGGGGCGGGG CGAGGGGCGGGGCGGGGCGAGGCGGAGAGGTGCGGCGG CAGCCAATCAGAGCGGCGGCTCCGAAAGTTTCCTTTTAT GGCGAGGCGGCGGCGGCGGCGGCCCTATAAAAAGCGAA GCGCGCGGCGGGCG
42, 51	ヘルパー/Rev;ニワ トリベータアクチンイ ントロン:遺伝子発 現を増強する	GGAGTCGCTGCGTTGCCTTCGCCCCGTGCCCCGCTCCGCG CCGCCTCGCGCCGCCCCGCCCCGGCTCTGACTGACCGCGTT ACTCCACAGGTGAGCGGGCGGGACGGCCCTTCTCCTCC GGGCTGTAATTAGCGCTTGGTTAATGACGGCTCGTTTCT TTTCTGTGGCTGCGTGAAAGCCTTAAAGGGCTCCGGGAG GGCCCTTTGTGCGGGGGGAGCGGCTCGGGGGGTGCGTG CGTGTGTGTGTGCGTGGGGAGCGCCGCGTGCGGCCCGCG CTGCCCCGGCGGCTGTGAGCGCTGCGGGCGCGGCGGGG CTTGTGCGCTCCGCGTGTGCGCGAGGGGAGCGCGGCCG GGGGCGGTGCCCGCGGTGCGGGGGGCTGCGAGGGGA ACAAAGGCTGCGTGCGGGGTGTGTGCGTGGGGGGGTGAG

10

20

30

40

		<p>CAGGGGGGTGTGGGGCGGGCGGTGTTAAACCCCCCTGACACCCCTCCCCGAGTTGCTGAGCACGGCCCCGGCTTCGGGTGCGGGGCTCCGTGCGGGGCGTGCGCGGGGGCTGCCGTGCCGGGCGGGGGGTGGCGGCAGGTGGGGGTGCCGGCGGGGCGGGGCCCTCGGGCCGGGAGGGCTCGGGGGAGGGGCGCGGCCCGGAGCGCCGGCGGGTGTGAGGGCGGGGAGCCGAGCCATTGCCTTTATGGTAATCGTGCGAGAGGGCGCAGGGACTTCCTTTGTCCAAATCTGCGGAGCCGAAATCTGGGAGGCGCCGCCGACCCCCCTAGCGGGCGCGGGCGAAGCGGTGCGGCGCCGGCAGGAAGGAAATGGGCGGGGAGGGCCTTCGTGCGTCGCCGCGCCGCGTCCCCCTTCCATCTCCAGCCTCGGGGCTGCCGAGGGGGACGGCTGCCTTCGGGGGGACGGGGCAGGGCGGGGTTCGGCTTCTGGCGTGTGACCGGCGG</p>
43, 52	ヘルパー/Rev;HIV Gag;ウイルスカプシド	<p>ATGGGTGCGAGAGCGTCAGTATTAAGCGGGGGAGAATTAGATCGATGGGAAAAAATTCGGTTAAGGCCAGGGGGAAAGAAAAATATAAATTAACATATAGTATGGGCAAGCAGGGAGCTAGAACGATTGCGAGTTAATCCTGGCCTGTTAGAACATCAGAAGGCTGTAGACAAATACTGGGACAGCTACAACCATCCCTTCAGACAGGATCAGAAGAACTTAGATCATTATATAATACAGTAGCAACCCTCTATTGTGTGCATCAAGGATAGAGATAAAAGACACCAAGGAAGCTTTAGACAAGATAGAGGAAGAGCAAAACAAAAGTAAGAAAAAAGCACAGCAAGCAGCAGCTGACACAGGACACAGCAATCAGGTCAGCCAAAATTACCCTATAGTGCAGAACATCCAGGGGCAAATGTACATCAGGCCATATCACCTAGAACTTTAAATGCATGGGTAAAAGTAGTAGAAGAGAAGGCTTTCAGCCAGAAGTGATACCCATGTTTTAGCATTATCAGAAGGAGCCACCCACAAGATTTAAACACCATGCTAAACACAGTGGGGGGACATCAAGCAGCCATGCAAATGTTAAAAGAGACCATCAATGAGGAAGCTGCGAATGGGATAGAGTGCATCCAGTGCATGCAGGCTATTGCACCAGGCCAGATGAGAGAACCAAGGGGAAGTGACATAGCAGGAACCTACTAGTACCCTTCAGGAACAAATAGGATGGATGACACATAATCCACCTATCCAGTAGGAGAAATCTATAAAAGATGGATAATCCTGGGATTAAATAAATAGTAAGAATGTATAGCCCTACCAGCATTCTGGACATAGACAAGGACCAAGGAACCTTTAGAGACTATGTAGACGATTCTATAAACTCTAAGAGCCGAGCAAGCTTCACAAAGGTAATAAAATTTGGATGACAGAAACCTTGTTGGTCCAA</p>

40

【表 5 - 9】

		AATGCGAACCCAGATTGTAAGACTATTTTAAAAGCATTG GGACCAGGAGCGGACACTAGAAGAAATGATGACAGCATG TCAGGGAGTGGGGGGACCCGGCCATAAAGCAAGAGTTT GGCTGAAGCAATGAGCCAAGTAACAAATCCAGCTACCAT AATGATACAGAAAAGGCAATTTTAGGAACCAAAGAAAAGA CTGTTAAGTGTTTCAATTGTGGCAAAGAAGGGCACATAG CCAAAAATTGCAGGGCCCTAGGAAAAAGGGCTGTTGGA AATGTGGAAAGGAAGGACACCAAATGAAAGATTGTACTG AGAGACAGGCTAATTTTTTAGGGAAGATCTGGCCTTCCC ACAAGGGAAGGCCAGGGAATTTTCTTCAGAGCAGACCAG AGCCAACAGCCCCACCAGAAGAGAGCTTCAGGTTTGGGG AAGAGACAACAACTCCCTCTCAGAAGCAGGAGCCGATAG ACAAGGAACTGTATCCTTTAGCTTCCCTCAGATCACTCTT TGGCAGCGACCCCTCGTCACAATAA
44, 53	ヘルパー/Rev;HIV Pol;プロテアーゼお よび逆転写酵素	ATGAATTTGCCAGGAAGATGGAAACCAAAAATGATAGGG GGAATTGGAGGTTTTATCAAAGTAGGACAGTATGATCAG ATACTCATAGAAATCTGCGGACATAAAGCTATAGGTACA GTATTAGTAGGACCTACACCTGTCAACATAATTGGAAGA AATCTGTTGACTCAGATTGGCTGCACTTTAAATTTCCCA TTAGTCCTATTGAGACTGTACCAGTAAAATTAAAGCCAG GAATGGATGGCCCCAAAAGTTAAACAATGGCCATTGACAG AAGAAAAAATAAAAAGCATTAGTAGAAATTTGTACAGAAA TGGAAAAGGAAGGAAAAATTTCAAAAATTGGGCCTGAA AATCCATACAATACTCCAGTATTTGCCATAAAGAAAAAA GACAGTACTAAATGGAGAAAATTAGTAGATTTTCAGAGAA CTTAATAAGAGAACTCAAGATTCTGGAAGTTCAATTA GGAATACCACATCCTGCAGGGTTAAAAACAGAAAAAATCA GTAAACAGTACTGGATGTGGGCGATGCATATTTTTCAGTTC CCTTAGATAAAGACTTCAGGAAGTATACTGCATTTACCAT ACCTAGTATAAACAATGAGACACCAGGGATTAGATATCA GTACAATGTGCTTCCACAGGGATGGAAAAGGATCACCAGC AATATTCCAGTGTAGCATGACAAAAATCTTAGAGCCTTT AGAAAACAAAATCCAGACATAGTCATCTATCAATACATG GATGATTTGTATGTAGGATCTGACTTAGAAATAGGGCAG CATAGAACAAAAATAGAGGAACTGAGACAACATCTGTTG AGGTGGGGATTACCACACCAGACAAAAACATCAGAAA GAACCTCCATTCTTTGGATGGGTTATGAACTCCATCCTG ATAAATGGACAGTACAGCCTATAGTGCTGCCAGAAAAGG ACAGCTGGACTGTCAATGACATACAGAAATTAGTGGGAA

10

20

30

40

50

【表 5 - 10】

		AATTGAATTGGGCAAGTCAGATTATGCAGGGATTAAAG TAAGGCAATTATGTAACTTCTTAGGGGAACCAAAGCAC TAACAGAAGTAGTACCACTAACAGAAGAAGCAGAGCTA GAACTGGCAGAAAACAGGGAGATTCTAAAAGAACCGGT ACATGGAGTGTATTATGACCCATCAAAAGACTTAATAGC AGAAATACAGAAGCAGGGGCAAGGCCAATGGACATATC AAATTTATCAAGAGCCATTTAAAAATCTGAAAACAGGAA AATATGCAAGAATGAAGGGTGCCCACTAATGATGTGA AACAATTAACAGAGGCAGTACAAAAATAGCCACAGAA AGCATAGTAATATGGGGAAAGACTCCTAAATTTAAATTA CCCATACAAAAGGAAACATGGGAAGCATGGTGGACAGA GTATTGGCAAGCCACCTGGATTCTGAGTGGGAGTTTGTC AATACCCCTCCCTTAGTGAAGTTATGGTACCAGTTAGAGA AAGAACCATAATAGGAGCAGAACTTTCTATGTAGATG GGGCAGCCAATAGGGAAACTAAATTAGGAAAAGCAGGA TATGTAAGTACAGAGGAAGACAAAAAGTTGTCCCCCTA ACGGACACAACAAATCAGAAGACTGAGTTACAAGCAATT CATCTAGCTTTGCAGGATTCTGGGATTAGAAGTAAACATA GTGACAGACTCACAATATGCATTGGGAATCATTCAAGCA CAACCAGATAAGAGTGAATCAGAGTTAGTCAGTCAAATA ATAGAGCAGTTAATAAAAAAGGAAAAAGTCTACCTGGCA TGGGTACCAGCACACAAAGGAATTGGAGGAAATGAACA AGTAGATGGGTTGGTCAGTGTGGAATCAGGAAAGTACT A	10
45, 54	ヘルパー Rev:HIV インテグ ラーゼ:ウイルス RNA の組み込み	TTTTAGATGGAATAGATAAGGCCCAAGAAGAACATGAG AAATATCACAGTAATTGGAGAGCAATGGCTAGTGATTTT AACCTACCACCTGTAGTAGCAAAAAGAAATAGTAGCCAGC TGTGATAAATGTCAGCTAAAAGGGGAAGCCATGCATGGA CAAGTAGACTGTAGCCCAGGAATATGGCAGCTAGATTGT ACACATTTAGAAGGAAAAGTTATCTTGGTAGCAGTTCAT GTAGCCAGTGGATATATAGAAGCAGAAGTAATTCCAGCA GAGACAGGGCAAGAAACAGCATACTTCCTCTTAAATTA GCAGGAAGATGGCCAGTAAAAACAGTACATACAGACAA TGGCAGCAATTTACCAGTACTACAGTTAAGGCCGCCTGT TGGTGGGCGGGGATCAAGCAGGAATTTGGCATTCCCTAC AATCCCCAAAGTCAAGGAGTAATAGAATCTATGAATAAA GAATTAAGAAAATTATAGGACAGGTAAGAGATCAGGCT GAACATCTTAAGACAGCAGTACAAATGGCAGTATTTCATC CACAATTTTAAAGAAAAGGGGGGATTGGGGGGTACAGT	20 30 40

10

20

30

40

50



【表 5 - 1 1】

		GCAGGGGAAAAGAATAGTAGACATAATAGCAACAGACAT ACAAACTAAAGAATTACAAAAACAAATTACAAAAATTCA AAATTTTCGGGTTTATTACAGGGACAGCAGAGATCCAGT TTGGAAAGGACCAGCAAAGCTCCTCTGGAAAGGTGAAGG GGCAGTAGTAATACAAGATAATAGTGACATAAAAGTAGT GCCAAGAAGAAAAGCAAAGATCATCAGGGATTATGGAA AACAGATGGCAGGTGATGATTGTGTGGCAAGTAGACAGG ATGAGGATTAA	
46, 55	ヘルパー/Rev;HIV RRE;Rev エレメン トに結合する	AGGAGCTTTGTTTCCTTGGGTTCTTGGGAGCAGCAGGAAG CACTATGGGCGCAGCGTCAATGACGCTGACGGTACAGGC CAGACAATTATTGTCTGGTATAGTGCAGCAGCAGAACAA TTTGCTGAGGGCTATTGAGGCGCAACAGCATCTGTTGCA ACTCACAGTCTGGGGCATCAAGCAGCTCCAGGCAAGAAT CCTGGCTGTGGAAAGATACCTAAAGGATCAACAGCTCCT	10
47, 57, 58	ヘルパー/Rev;HIV Rev;核外輸送、お よびウイルス mRNA を安定化 する	ATGGCAGGAAGAAGCGGAGACAGCGACGAAGAACTCCT CAAGGCAGTCAGACTCATCAAGTTTCTCTATCAAAGCAA CCCACCTCCAATCCCAGGGGACCCGACAGGCCCGAAG GAATAGAAGAAGAAGGTGGAGAGAGAGACAGAGACAGA TCCATTGATTAGTGAACGGATCCTTAGCACTTATCTGGG ACGATCTGCGGAGCCTGTGCCTCTTCAGCTACCACCGCTT GAGAGACTTACTCTTGATTGTAACGAGGATTGTGGAACCT CTGGGACGCAGGGGGTGGGAAGCCCTCAAATATTGGTGG AATCTCCTACAATATTGGAGTCAGGAGCTAAAGAATAG	20
48, 56	ヘルパー/Rev;ウサ ギベータグロビン ポリ A:RNA 安定性	AGATCTTTTTCCCTCTGCCAAAAATTATGGGGACATCATG AAGCCCTTGAGCATCTGACTTCTGGCTAATAAAGGAAA TTTATTTTCATTGCAATAGTGTGTGGAAATTTTGTGTCT CTCACTCGGAAGGACATATGGGAGGGCAAATCATTTAAA ACATCAGAATGAGTATTTGGTTTAGAGTTTGGCAACATAT GCCATATGCTGGCTGCCATGAACAAAGGTGGCTATAAAG AGGTCATCAGTATATGAAACAGCCCCCTGCTGTCCATTCC TTATTCATAGAAAAGCCTTGACTTGAGGTTAGATTTTTT TTATATTTTGTGTTGTGTTATTTTTTCTTTAACATCCCTAA AATTTTCCTTACATGTTTTACTAGCCAGATTTTCTCCTC TCCTGACTACTCCAGTCATAGCTGTCCCTCTTCTTTAIG AAGATC	30
59, 63	Rev;ウサギベータグ ロビンポリ A:RNA 安定性	AGATCTTTTTCCCTCTGCCAAAAATTATGGGGACATCATG AAGCCCTTGAGCATCTGACTTCTGGCTAATAAAGGAAA TTTATTTTCATTGCAATAGTGTGTGGAAATTTTGTGTCT CTCACTCGGAAGGACATATGGGAGGGCAAATCATTTAAA	40

10

20

30

40

50

		ACATACAGAATGAGTATTTGGTTTAGAGTTTGGCAACATAT GCCCATATGCTGGCTGCCATGAACAAAGGTTGGCTATAA AGAGGTCATCAGTATATGAAACAGCCCCCTGCTGTCCATT CCTTATTCCATAGAAAAGCCTTGACTTGAGGTTAGATTTT TTTTATATTTTGTGTTTGTGTTATTTTCTTTAACATCCCT AAAATTTTCTTACATGTTTACTAGCCAGATTTTCTCTCC TCTCTGACTACTCCAGTCATAGCTGTCCCTCTTCTCTTA TGGAGATC
60	エンベロープ;CMV プロモーター;転写	ACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACG GGGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCGCGTTA CATAACTTACGGTAAATGGCCCGCTGGCTGACCGCCA ACGACCCCCGCCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCC CATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATG GGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACA TCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTC AATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCCAGTAC ATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACG TATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGATGCGGTTTTGGCA GTACATCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTGACTCACGGGG ATTTCCAAGTCTCCACCCCATTGACGTCAATGGGAGTTTG TTTTGGCACCAAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTCGTA ACAACCTCCGCCCCATTGACGCAAATGGGCGGTAGGCGTG TACGGTGGGAGGTCTATATAAGC
61	エンベロープ;ベータ グロビンイントロン; 遺伝子発現を増 強する	GTGAGTTTGGGGACCCTTGATTGTTCTTTCTTTTCGCTAT TGIAAAATTCATGTTATATGGAGGGGGCAAAGTTTTCAG GGTGTTGTTTAGAATGGGAAGATGTCCCTTGATCACCAT GGACCCCTCATGATAATTTTGTTTCTTTCACTTTCTACTCTG TTGACAACCATTGTCCTCTTATTTTCTTTTCATTTTCTGT AACTTTTTCGTATAAACTTTAGCTTGCATTTGTAACGAATT TTAAATTCACTTTGTGTTATTTGTGAGATTGTAAGTACTTT CTCTAATCACTTTTTTTTCAAGGCAATCAGGGTATATTAT ATTGTACTTCAGCACAGTTTATAGAGAACAATTGTTATAAT TAAATGATAAGGTAGAATATTCTGCATATAAATTTCTGGC TGGCGTGGAAATATTCTTATTGGTAGAAACAACTACACC CTGGTCATCATCCTGCCTTTCTCTTTATGGTTACAATGATA TACACTGTTTGAGATGAGGATAAAAATACTCTGAGTCCAA ACCGGGCCCCCTCTGCTAACCATGTTTCATGCCCTTCTCTCTT TCCTACAG
62	エンベロープ;VSV-	ATGAAGTGCCTTTTGTACTTAGCCTTTTATTTCATTGGGGT

40

【表 5 - 1 3】

G;糖タンパク質エ ンペローブ-細胞進 入	GAATTGCAAGTTCACCATAGTTTTTCCACACAACCAAAA AGGAAACTGGAAAAATGTTCCCTCTAATTACCATATTGTC CCGTCAAGCTCAGATTAAATTGGCATAATGACTTAATAG GCACAGCCTTACAAGTCAAAATGCCAAGAGTCACAAGG CTATTCAAGCAGACGGTTGGATGTGTCATGCTTCCAAATG GGTCACTACTTGTGATTTCCGCTGGTATGGACCGAAGTAT ATAACACATTCCATCCGATCCTTCACTCCATCTGTAGAAC AATGCAAGGAAAGCATTGAACAAACGAAACAAGGAACT TGGCTGAATCCAGGCTTCCCTCCTCAAAGTTGTGGATATG CAACTGTGACGGATGCCGAAGCAGTGATTGTCCAGGTGA CTCCTCACCATGTGCTGGTTGATGAATACACAGGAGAAT GGGTTGATTACAGTTCATCAACGGAAAAATGCAGCAATT ACATATGCCCCACTGTCCATAACTCTACAACCTGGCATTCT TGACTATAAGGTCAAAGGGCTATGTGATTCTAACCTCATT TCCATGGACATCACCTTCTTCTCAGAGGACGGAGAGCTAT CATCCCTGGGAAAGGAGGGCACAGGGTTCAGAAGTAACT ACTTTGCTTATGAACTGGAGGCAAGGCCTGCAAAATGC AATACTGCAAGCATTGGGGAGTCAGACTCCCATCAGGTG TCTGGTTCGAGATGGCTGATAAGGATCTCTTTGCTGCAGC CAGATTCCCTGAATGCCCAGAAGGGTCAAGTATCTCTGCT CCATCTCAGACCTCAGTGGATGTAAGTCTAATTCAGGAC GTTGAGAGGATCTTGGATTATTCCTCTGCCAAGAAACCT GGAGCAAAATCAGAGCGGGTCTTCCAATCTCTCCAGTGG ATCTCAGCTATCTTGCTCCTAAAAACCCAGGAACCGGTCC TGCTTTCACCATAATCAATGGTACCCTAAAATACTTTGAG ACCAGATACATCAGAGTCGATATTGCTGCTCCAATCCTCT CAAGAATGGTCGGAATGATCAGTGGAATACCACAGAAA GGGAACTGTGGGATGACTGGGCACCATATGAAGACGTGG AAATTGGACCCAATGGAGTTCTGAGGACCAGTTCAGGAT ATAAGTTTCCTTTATACATGATTGGACATGGTATGTTGGA CTCCGATCTTCATCTTAGCTCAAAGGCTCAGGTGTTGAA CATCCTCACATTCAAGACGCTGCTTCGCAACTTCTGATG ATGAGAGTTTATTTTTTGGTGATACTGGGCTATCCAAAAA TCCAATCGAGCTTGTAGAAGGTTGGTTCAGTAGTTGGAA AAGCTCTATTGCCTCTTTTTCTTTATCATAGGGTTAATCA TTGGACTATTCTTGGTTCTCCGAGTTGGTATCCATCTTTGC ATTAAATTAAAGCACACCAAGAAAAGACAGATTATACA GACATAGAGATGA
65	プロモーター;PGK

10

20

30

40

50

【表 5 - 1 4】

		GCGCAGGGACGCGGCTGCTCTGGGCGTGGTTCCGGGAAA CGCAGCGGCGCCGACCCTGGGTCTCGCACATTCTTCACGT CCGTTCGCAGCGTCACCCGGATCTTCGCCGCTACCCCTGT GGGCCCCCGGCGACGCTTCCTGCTCCGCCCTAAGTCGG GAAGGTTCTTGCGGTTCGCGGCGTGCCGGACGTGACAA ACGGAAGCCGCACGTCTCACTAGTACCCTCGCAGACGGA CAGCGCCAGGGAGCAATGGCAGCGCGCCGACCGCGATG GGCTGTGGCCAATAGCGGCTGCTCAGCAGGGCGCGCCGA GAGCAGCGGCCGGGAAGGGGCGGTGCGGGAGGCGGGGT GTGGGGCGGTAGTGTGGGCCCTGTTCTGCCCGCGCGGT GTTCGCGATTCTGCAAGCCTCCGGAGCGCACGTGGCAG TCGGCTCCCTCGTTGACCGAATCACCGACCTCTCTCCCA G	10
66	プロモーター;Ubc	GCGCCGGGTTTTTGGCGCCTCCCGGGGCGCCCCCTCCTC ACGGCGAGCGCTGCCACGTGACAGCAAGGGCGCAGGAG CGTTCCTGATCCTTCGCCCGGACGCTCAGGACAGCGGCC CGCTGCTCATAAGACTCGGCCTTAGAACCCAGTATCAG CAGAAGGACATTTTAGGACGGGACTTGGGTGACTCTAGG GCACTGGTTTTCTTTCCAGAGAGCGGAACAGGCGAGGAA AAGTAGTCCCTTCTCGGCGATTCTGCGGAGGGATCTCCGT GGGGCGGTGAACGCCGATGATTATATAAGGACGCGCCGG GTGTGGCACAGCTAGTTCCGTGCGAGCCGGGATTGGGT CGCGGTTCTTGTGTGGATCGCTGTGATCGTCACTTGGT GAGTTGCGGGCTGCTGGGCTGGCCGGGGCTTTCGTGGCC GCCGGGCGCTCGGTGGGACGGAAGCGTGTGGAGAGACC GCCAAGGGCTGTAGTCTGGGTCCGCGAGCAAGGTTGCC TGAAGTGGGGGTTGGGGGAGCGCACAAAATGGCGGCTG TTCCCAGTCTTGAATGGAAGACGCTTGAAGGCGGGCT GTGAGGTCGTTGAAACAAGGTGGGGGCGATGGTGGGCGG CAAGAACCAAGGTCTTGAGGCCTTCGCTAATGCGGGAA AGCTCTTATTCTGGGTGAGATGGGCTGGGGCACCATCTGG GGACCCTGACGTGAAGTTTGTCACTGACTGGAGAACTCG GGTTTGTCTGCTGGTTGCGGGGGCGGCAGTTATGCGGTGC CGTTGGGCAGTGCACCCGTACCTTTGGGAGCGCGCGCCT CGTCGTGTCGTGACGTACCCGTTCTGTTGGCTTATAATG CAGGGTGGGGCCACCTGCCGGTAGGTGTGCGGTAGGCTT TTCTCCGTCGCAGGACGCAGGGTTCGGGCCTAGGGTAGG CTCTCCTGAATCGACAGGCGCCGGACCTCTGGTGAGGGG AGGGATAAGTGAGGCGTCAGTTTCTTTGGTCGGTTTTATG	20 30 40

【表 5 - 1 5】

		TACCTATCTTCTTAAGTAGCTGAAGCTCCGGTTTTGAACT ATGCGCTCGGGGTTGGCGAGTGTGTTTTGTGAAGTTTTTT AGGCACCTTTTGAAATGTAATCATTTGGGTCAATATGTAA TTTTCAGTGTTAGACTAGTAAA
67	ポリ A;SV40	GTTTATTGCAGCTTATAATGGTTACAAATAAAGCAATAGC ATCACAAATTTACAAATAAAGCATTTTTTTTCACTGCATT CTAGTTGTGGTTTGTCCAAACTCATCAATGTATCTTATCA
68	ポリ A;bGH	GACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCCC TCCCCGTGCCTTCCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCA CTGTCCTTTCTAATAAAAATGAGGAAATTGCATCGCATTG TCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGG GCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCA GGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGG
69	HIV Gag; Bal	ATGGGTGCGAGAGCGTCAGTATTAAGCGGGGAGAATTA GATAGGTGGGAAAAAATTCGGTTAAGGCCAGGGGGAAA GAAAAAATATAGATTAACATATAGTATGGGCAAGCAG GGAAGTAGAAAGATTTCGAGTCAATCCTGGCCTGTTAGA AACATCAGAAGGCTGCAGACAAATACTGGGACAGCTACA ACCATCCCTTCAGACAGGATCAGAAGAACTTAGATCATT ATATAATACAGTAGCAACCTCTATTGTGTACATCAAAA GATAGAGGTAAAAGACACCAAGGAAGCTTTAGACAAAA TAGAGGAAGAGCAAAACAAATGTAAGAAAAAGGCACAG CAAGCAGCAGCTGACACAGGAAACAGCGGTCAGGTCAG CCAAAATTTCCCTATAGTGCAGAACCTCCAGGGGCAAAT GGTACATCAGGCCATATCACCTAGAACTTTAAATGCATG GGTAAAAGTAATAGAAGAGAAAGCTTTCAGCCCAGAAGT AATACCCATGTTTTTCAGCATTATCAGAAGGAGCCACCCC ACAAGATTTAAACACCATGCTAAACACAGTGGGGGGACA TCAAGCAGCCATGCAAATGTAAAAAGAACCCATCAATGA GGAAGCTGCAAGATGGGATAGATTGCATCCCGTGCAGGC AGGGCCTGTTGCACCAGGCCAGATAAGAGATCCAAGGGG AAGTGACATAGCAGGAACTACCAGTACCCTTCAGGAACA AATAGGATGGATGACAAGTAATCCACCTATCCAGTAGG AGAAATCTATAAAAGATGGATAATCCTGGGATTAAATAA AATAGTAAGGATGTATAGCCCTACCAGCATTTTGGACAT AAGACAAGGACCAAAGGAACCTTTAGAGACTATGTAGA CCGGTTCTATAAACTCTAAGAGCCGAGCAAGCTTCACA GGAGGTAAAAAATTGGATGACAGAAACCTTGTGGTCCA AAATGCGAACCCAGATTGTAAGACTATTTTAAAGCATT

10

20

30

40

50

【表 5 - 1 6】

		GGGACCAGCAGCTACACTAGAAGAAATGATGACAGCATG TCAGGGAGTGGGAGGACCCAGCCATAAAGCAAGAATTT GGCAGAAGCAATGAGCCAAGTAACAAATTCAGCTACCAT AATGATGCAGAAAGGCAATTTTAGGAACCAAGAAAGAT TGTTAAATGTTTCAATTGTGGCAAAGAAGGGCACATAGC CAGAACTGCAGGGCCCCTAGGAAAAGGGGCTGTTGGAA ATGTGGAAAGGAAGGACACCAATGAAAGACTGTACTG AGAGACAGGCTAATTTTTTAGGGAAAATCTGGCCTTCCC ACAAAGGAAGGCCAGGGAATTTCTTCAGAGCAGACCAG AGCCAACAGCCCCACCAGCCCCACCAGAAGAGAGCTTCA GGTTTGGGAAGAGACAACAACCTCCTCTCAGAAGCAGG AGCTGATAGACAAGGAAGTGTATCCTTTAGCTTCCCTCAG ATCACTCTTTGGCAACGACCCCTCGTCACAATAA	10
70	HIV Pol; Bal	ATGAATTTGCCAGGAAGATGGAAACCAAAAATGATAGGG GGAATTGGAGGTTTTATCAAAGTAAGACAGTATGATCAG ATACTCATAGAAATCTGTGGACATAAAGCTATAGGTACA GTATTAATAGGACCTACACCTGTCAACATAATTGGAAGA AATCTGTTGACTCAGATTGGTTGCACTTTAAATTTTCCCA TTAGTCCTATTGAACTGTACCAGTAAAATTAACCAG GAATGGATGGCCCAAAGTTAAACAATGGCCACTGACAG AAGAAAAAATAAAGCATTAAATGGAAATCTGTACAGAA ATGGAAAAGGAAGGGAAAATTTCAAAAATTGGGCCTGA AAATCCATACAATACTCCAGTATTTGCCATAAAGAAAAA AGACAGTACTAAATGGAGAAAATTAGTAGATTTAGAGA ACTTAATAAGAAAACCTCAAGACTTCTGGGAAGTACAATT AGGAATACACATCCCGCAGGGGTAAAAAAGAAAAAAT CAGTAACAGTACTGGATGTGGGTGATGCATATTTTTCAGT TCCCTTAGATAAAGAATTCAGGAAGTATACTGCATTTACC ATACCTAGTATAAACAATGAAACACCAGGGATCAGATAT CAGTACAATGTACTTCCACAGGGATGGAAAGGATCACC GCAATATTTCAAAGTAGCATGACAAGAATCTTAGAGCCT TTAGAAAACAAAATCCAGAAATAGTGATCTATCAATAC ATGGATGATTTGTATGTAGGATCTGACTTAGAAATAGGG CAGCATAGAACAAAATAGAGGAAGTACAGACAACATCT GTTGAGGTGGGGATTTACCACACCAGACAAAAAACATCA GAAAGAACCCTCATTCTTTGGATGGGTATGAACTCCAT CCTGATAAATGGACAGTACAGCCTATAGTGCTGCCAGAA AAAGACAGCTGGACTGTCAATGACATACAGAAGTTAGTG GGAAAATTGAATTGGGCAAGTCAGATTTACCCAGGAATT	20 30 40

10

20

30

40

50

【表 5 - 17】

		AAAGTAAAGCAATTATGTAGGCTCCTTAGGGGAACCAAG GCATTAACAGAAAGTAATACCACTAACAAAAGAAACAGA GCTAGAACTGGCAGAGAACAGGGAAATTCTAAAAGAAC CAGTACATGGGGTGTATTATGACCCATCAAAGACTTAA TAGCAGAAATACAGAAGCAGGGGCAAGGCCAATGGACA TATCAAATTTATCAAGAGCCATTTAAAAATCTGAAAACA GGAAAATATGCAAGAATGAGGGGTGCCACACTAATGAT GTAAAACAATTAACAGAGGCAGTGCAAAAAATAACCAC AGAAAGCATAGTAATATGGGGAAAGACTCCTAAATTTAA ACTACCCATACAAAAAGAAACATGGGAAACATGGTGGAC AGAGTATTGGCAAGCCACCTGGATTCTTGAGTGGGAGTT TGTCATACCCCTCCCTTAGTGAAATTATGGTACCAGTTA GAGAAAGAACCATAATAGGAGCAGAAACATTCTATGTA GATGGAGCAGCTAACCGGGAGACTAAATTAGGAAAAAGC AGGATATGTTACTAACAGAGGAAGACAAAAAGTTGTCTC CCTAACTGACACAACAAATCAGAAGACTGAGTTACAAGC AATTCATCTAGCTTTACAAGATTCAGGATTAGAAGTAAA CATAGTAACAGACTCACAATATGCATTAGGAATCATTCA AGCACAACCAGATAAAAGTGAATCAGAGTTAGTCAGTCA AATAATAGAACAGTTAATAAAAAAGGAAAAGGTCTACCT GGCATGGGTACCAGCGCACAAAGGAATTGGAGGAAATG AACAAGTAGATAAATTAGTCAGTACTGGAATCAGGAAAG TACTA	10
71	HIV インテグラー ゼ;Bal	TTTTAGATGGAATAGATATAGCCCAAGAAGAACATGAG AAATATCACAGTAATTGGAGAGCAATGGCTAGTGATTTT AACCTGCCACCTGTGGTAGCAAAAGAAAATAGTAGCCAGC TGTGATAAATGTCAGCTAAAAGGAGAAGCCATGCATGGA CAAGTAGACTGTAGTCCAGGAATATGGCAACTAGATTGT ACACATTTAGAAGGAAAAATTATCCTGGTAGCAGTTCAT GTAGCCAGTGGATATATAGAAGCAGAAGTTATTCCAGCA GAGACAGGGCAGGAAACAGCATACTTTCTTTAAATTA GCAGGAAGATGGCCAGTAAAAACAATACATACAGACAA TGGCAGCAATTTCACTAGTACTACAGTCAAGGCCGCCTGT TGGTGGGCGGGGATCAAGCAGGAATTTGGCATTCCCTAC AATCCCCAAAGTCAGGGAGTAGTAGAATCTATAAATAAA GAATTAAAGAAAAATTATAGGACAGGTAAGAGATCAGGCT GAACATCTTAAACAGCAGTACAAATGGCAGTATTCATC CACAATTTTAAAGAAAAGGGGGGATTGGGGGGTATAGT GCAGGGGAAAGAATAGTAGACATAATAGCAACAGACAT	30
			40

【表 5 - 1 8】

		ACAACTAAAGAATTACAAAACAAATTACAAAAATTCA AAATTTTCGGGTTTATTACAGGGACAGCAGAGATCCACTT TGGAAAGGACCAGCAAAGCTTCTCTGAAAGGTGAAGGG GCAGTAGTAATACAAGATAATAGTGACATAAAAGTAGTA CCAAGAAGAAAAGCAAAGATCATTAGGGATTATGAAAA ACAGATGGCAGGTGATGATTGTGTGGCAAGTAGACAGGA TGAGGATTAG
72	エンペロー ブ:RD114	ATGAAACTCCCAACAGGAATGGTCATTTTATGTAGCCTA ATAATAGTTCGGGCAGGGTTTGACGACCCCCGCAAGGCT ATCGCATTAGTACAAAAACAACATGGTAAACCATGCGAA TGCAGCGGAGGGCAGGTATCCGAGGCCCCACCGAACTCC ATCCAACAGGTAACCTTGCCAGGCAAGACGGCCTACTTA ATGACCAACCAAAAATGGAAATGCAGAGTCACTCCAAAA AATCTCACCCCTAGCGGGGGGAGAACTCCAGAACTGCCCC TGTAACACTTTCCAGGACTCGATGCACAGTTCTTGTTATA CTGAATACCGGCAATGCAGGGCGAATAATAAGACATACT ACACGGCCACCTTGCTTAAAATACGGTCTGGGAGCCTCA ACGAGGTACAGATATTACAAAACCCCAATCAGCTCCTAC AGTCCCCTTGTAGGGGCTCTATAAATCAGCCCGTTTGCTG GAGTGCCACAGCCCCATCCATATCTCCGATGGTGGAGG ACCCCTCGATACTAAGAGAGTGTGGACAGTCCAAAAAAG GCTAGAACAAATTCATAAGGCTATGCATCCTGAACTICA ATACCACCCCTTAGCCCTGCCCAAAGTCAGAGATGACCTT AGCCTTGATGCACGGACTTTTGATATCCTGAATACCACTT TTAGGTTACTCCAGATGTCCAATTTTAGCCTTGCCCAAGA TTGTTGGCTCTGTTTAAAACTAGGTACCCCTACCCCTCTT GCGATACCCACTCCCTCTTTAACCTACTCCCTAGCAGACT CCCTAGCGAATGCCTCCTGTCAGATTATACCTCCCCCTCTT GGTTCAACCGATGCAGTTCTCCAACCTCGTCCTGTTTATCT TCCCCTTTCATTAACGATACGGAACAAATAGACTTAGGTG CAGTCACCTTTACTAACTGCACCTCTGTAGCCAATGTCAG TAGTCCTTTATGTGCCCTAAACGGGTCAGTCTTCTCTGT GGAAATAACATGGCATAACCTATTTACCCCAAACTGG ACAGGACTTTGCGTCCAAGCCTCCCTCCTCCCGACATTG ACATCATCCCGGGGATGAGCCAGTCCCATTCCTGCCAT TGATCATTATATACATAGACCTAAACGAGCTGTACAGTTC ATCCCTTTACTAGCTGGACTGGGAATCACCGCAGCATTCA CCACCGGAGCTACAGGCCTAGGTGCTCCGTCACCCAGT ATACAAAATTATCCCATCAGTTAATATCTGATGTCCAAGT

10

20

30

40

50



		<p>CTTATCCCGGTACCATACAGAAGATTACAAAGACCAGGAGTAGA  CTCGTTAGCTGAAGTAGTTCTCCAAAATAGGAGGGGACT  GGACCTACTAACGGCAGAACAAGGAGGAATTTGTTTAGC  CTTACAAGAAAAATGCTGTTTTATGCTAACAAAGTCAGG  AATTGTGAGAAAACAAAATAAGAACCCTACAAGAAGAATT  ACAAAAACGCAGGGAAAGCCTGGCATCCAACCTCTCTG  GACCGGGTGCGAGGGCTTTCTCCGTACCTCCTACCTCTC  CTGGGACCCCTACTCACCTCCTACTCATACTAACCATTG  GGCCATGCGTTTTCAATCGATTGGTCCAATTTGTTAAAGA  CAGGATCTCAGTGGTCCAGGCTCTGGTTTTGACTCAGCAA  TATCACAGCTAAAACCCATAGAGTACGAGCCATGA</p>
73	エンペロー ブ;GALV	<p>ATGCTTCTCACCTCAAGCCCGCACCACCTTCGGCACCAGA  TGAGTCCTGGGAGCTGGAAAAGACTGATCATCCTCTTAA  GCTGCGTATTCGGAGACGGCAAAACGAGTCTGCAGAATA  AGAACCCCAACAGCCTGTGACCCCTACCTGGCAGGTAC  TGTCCTCAAACCTGGGGACGTTGTCTGGGACAAAAAGGCAG  TCCAGCCCCTTTGGACTTGGTGGCCCTCTCTTACACCTGA  TGTATGTGCCCTGGCGGCCGGTCTTGAGTCCTGGGATATC  CCGGGATCCGATGTATCGTCCTCTAAAAGAGTTAGACCTC  CTGATTCAGACTATACTGCCGCTTATAAGCAAATCACCTG  GGGAGCCATAGGGTGCAGCTACCCCTCGGGCTAGGACCAG  GATGGCAAATTCCCCCTTCTACGTGTGTCCCCGAGCTGGC  CGAACCCATTAGAAGCTAGGAGGTGTGGGGGGCTAGAA  TCCCTATACTGTAAAGAATGGAGTTGTGAGACCACGGGT  ACCGTTTATTGGCAACCCAAGTCCTCATGGGACCTCATAA  CTGTAAAAATGGGACCAAAATGTGAAATGGGAGCAAAAAAT  TTCAAAAGTGTGAACAAACCGGCTGGTGTAAACCCCTCA  AGATAGACTTCACAGAAAAAGGAAAACTCTCCAGAGATT  GGATAACGGAAAAAACCTGGGAATTAAGGTCTATGTAT  ATGGACACCCAGGCATACAGTTGACTATCCGCTTAGAGG  TACTAACATGCCGGTTGTGGCAGTGGGCCACAGACCCTG  TCCTTGCGGAACAGGGACCTCTAGCAAGCCCCCTCACTCT  CCCTCTCTCCCCACGAAAAGCGCCGCCACCCCTCTACCC  CCGGCGGCTAGTGAGCAAACCCCTGCGGTGCATGGAGAA  ACTGTTACCCTAAACTCTCCGCTCCCAACAGTGGCGACC  GACTCTTTGGCCTTGTGCAGGGGGCCTTCCTAACCTTGAA  TGCTACCAACCCAGGGGCCACTAAGTCTTGCTGGCTCTGT  TTGGGCATGAGCCCCCTTATTATGAAGGGATAGCCTCTT  CAGGAGAGGTCGCTTATACCTCCAACCATACCCGATGCC</p>

40

【表 5 - 2 0】

		<p>ACTGGGGGGCCCAAGGAAAGCTTACCCTCACTGAGGTCT  CCGGACTCGGGTCATGCATAGGGAAGGTGCCTCTTACCC  ATCAACATCTTTGCAACCAGACCTTACCCATCAATTCCTC  TAAAAACCATCAGTATCTGCTCCCCCTCAAACCATAGCTGG  TGGGCCTGCAGCACTGGCCTCACCCCCTGCCTCTCCACCT  CAGTTTTTAATCAGTCTAAAGACTTCTGTGTCCAGGTCCA  GCTGATCCCCCGCATCTATTACCATCTGAAGAAAACCTTG  TTACAAGCCTATGACAAATCACCCCCCAGGTTTAAAAGA  GAGCCTGCCTCACTTACCCTAGCTGTCTTCTGGGGTTAG  GGATTGCGGCAGGTATAGGTACTGGCTCAACCGCCCTAA  TTAAAGGGCCCATAGACCTCCAGCAAGGCCTAACCAGCC  TCCAAATCGCCATTGACGCTGACCTCCGGGCCCTTCAGGA  CTCAATCAGCAAGCTAGAGGACTCACTGACTTCCCTATCT  GAGGTAGTACTCCAAAATAGGAGAGGCCTTGACTTACTA  TTCCTTAAAGAAGGAGGCCTCTGCGCGGCCCTAAAAGAA  GAGTGCTGTTTTATGTAGACCACTCAGGTGCAGTACGAG  ACTCCATGAAAAAACTTAAAGAAAGACTAGATAAAAGAC  AGTTAGAGCGCCAGAAAAACCAAACTGGTATGAAGGGT  GGTTCAATAACTCCCCTTGGTTTACTACCCTACTATCAAC  CATCGCTGGGCCCTATTGCTCCTCCTTTTGTIACCTACTC  TTGGGCCCTGCATCATCAATAAATTAATCCAATTCATCAA  TGATAGGATAAGTGCAGTCAAAATTTTAGTCCTTAGACA  GAAATATCAGACCCTAGATAACGAGGAAAACCTTTAA</p>	10
74	エンベロープ;FUG	<p>ATGGTTCCGCAGGTTCCTTTGTTTGTACTCCTTCTGGGTTT  TTCGTTGTGTTTCGGGAAGTTCCTTACACGATACCA  GACGAACTTGGTCCCTGGAGCCCTATTGACATACACCATC  TCAGCTGTCAAATAACCTGGTTGTGGAGGATGAAGGAT  GTACCAACCTGTCCGAGTCTCCTACATGGAACCTCAAAGT  GGGATACATCTCAGCCATCAAAGTGAACGGGTTCACTTG  CACAGGTGTTGTGACAGAGGCAGAGACCTACACCAACTT  TGTTGGTTATGTCACAACCACATTCAAGAGAAAGCATTTC  CGCCCCACCCAGACGCATGTAGAGCCGCGTATAACTGG  AAGATGGCCGGTGACCCAGATATGAAGAGTCCCTACAC  AATCCATACCCGACTACCCTGGCTTCGAACTGTAAGA  ACCACCAAAGAGTCCCTCATTATCATATCCCAAGTGTA  CAGATTGGACCCATATGACAAATCCCTTCACTCAAGGGT  CTCCCTGGCGGAAAGTGCTCAGGAATAACGGTGTCTCT  ACCTACTGCTCAACTAACCATGATTACACCATTTGGATGC  CCGAGAATCCGAGACCAAGGACACCTTGTGACATTTTA</p>	20
			30
			40

【表 5 - 2 1】

		CCAATAGCAGAGGGAAGAGAGCATCCAACGGGAACAAG ACTTGCGGCTTTGTGGATGAAAGAGGCCTGTATAAGTCTC TAAAAGGAGCATGCAGGCTCAAGTTATGTGGAGTTCTTG GACTTAGACTTATGGATGGAACATGGGTCGCGATGCAAA CATCAGATGAGACCAAATGGTGCCCTCCAGATCAGTTGG TGAATTTGCACGACTTTCGCTCAGACGAGATCGAGCATCT CGTTGTGGAGGAGTTAGTTAAGAAAAGAGAGGAATGTCT GGATGCATTAGAGTCCATCATGACCACCAAGTCAGTAAG TTTCAGACGTCTCAGTCACCTGAGAAAACCTGTCCAGGG TTTGGAAGCATATACCATATTCAACAAAACCTTGATG GAGGCTGATGCTCACTACAAGTCAGTCCGGACCTGGAAT GAGATCATCCCCCTCAAAAGGGTGTTTGAAAGTTGGAGGA AGGTGCCATCCTCATGTGAACGGGGTGTTTTCAATGGTA TAATATTAGGGCCTGACGACCATGTCCTAATCCAGAGA TGCAATCATCCCTCCTCCAGCAACATATGGAGTTGTTGGA ATCTTCAGTTATCCCCCTGATGCACCCCTGGCAGACCCT TCTACAGTTTTCAAAGAAGGTGATGAGGCTGAGGATTTT GTTGAAGTTCACCTCCCCGATGTGTACAAACAGATCTCAG GGGTTGACCTGGGTCTCCCGAACTGGGGAAAGTATGTAT TGATGACTGCAGGGGCCATGATTGGCCTGGTGTGATATT TTCCCTAATGACATGGTGCAGAGTTGGTATCCATCTTTGC ATTAAATTAAAGCACACCAAGAAAAGACAGATTTATACA GACATAGAGATGAACCGACTTGGAAGTAA	10
75	エンペロー ブ;LCMV	ATGGGTCAGATTGTGACAATGTTTGAGGCTCTGCCTCACA TCATCGATGAGGTGATCAACATTGTATTATTGTGCTTAT CGTGATCACGGGTATCAAGGCTGTCTACAATTTGCCACC TGTGGGATATTTCGATTGATCAGTTTCCTACTTCTGGCTG GCAGGTCCTGTGGCATGTACGGTCTTAAGGGACCCGACA TTTACAAAGGAGTTTACCAATTTAAGTCAGTGAGTTTGA TATGTCACATCTGAACCTGACCATGCCCAACGCATGTTCA GCCAACAACTCCCACCATTACATCAGTATGGGGACTTCTG GACTAGAATTGACCTTCACCAATGATTCCATCATCAGTCA CAACTTTTGCAATCTGACCTCTGCCTTCAACAAAAAGACC TTTGACCACACACTCATGAGTATAGTTTCGAGCCTACACC TCAGTATCAGAGGGAACCTCAACTATAAGGCAGTATCCT GCGACTTCAACAATGGCATAACCATCCAATACAACCTGA CATCTCAGATCGACAAAGTGCTCAGAGCCAGTGTAGAA CCTTCAGAGGTAGAGTCCTAGATATGTTTAGAACTGCCTT CGGGGGGAAATACATGAGGAGTGGCTGGGGCTGGACAG	30
			40

【表 5 - 2 2】

		GCTCAGATGGCAAGACCACCTGGTGTAGCCAGACGAGTT ACCAATACCTGATTATACAAAATAGAACCTGGGAAAACC ACTGCACATATGCAGGTCCTTTTGGGATGTCCAGGATTCT CCTTTCCCAAGAGAAGACTAAGTTCTTCACTAGGAGACT AGCGGGCACATTACCTGGACTTTGTCAGACTCTTCAGGG GTGGAGAATCCAGGTGGTTATTGCCTGACCAAATGGATG ATTCTTGCTGCAGAGCTTAAGTGTTTCGGGAACACAGCA GTTGCGAAATGCAATGTAAATCATGATGCCGAATTCTGT GACATGCTGCGACTAATTGACTACAACAAGGCTGCTTTG AGTAAGTTCAAAGAGGACGTAGAATCTGCCTTGCACTTA TTCAAAACAACAGTGAATTCTTTGATTTCAGATCAACTAC TGATGAGGAACCACTTGAGAGATCTGATGGGGGTGCCAT ATTGCAATTACTCAAAGTTTTGGTACCTAGAACATGCAAA GACCGGCGAAACTAGTGTCCCAAGTGCTGGCTTGTAC CAATGGTTCTTACTTAAATGAGACCCACTTCAGTGATCAA ATCGAACAGGAAGCCGATAACATGATTACAGAGATGTTG AGGAAGGATTACATAAAGAGGCAGGGGAGTACCCCTTA GCATTGATGGACCTTCTGATGTTTTCCACATCTGCATATC TAGTCAGCATCTTCTGCACCTTGTCAAAATACCAACACA CAGGCACATAAAAGGTGGCTCATGTCCAAAGCCACACCG ATTAACCAACAAAGGAATTTGTAGTTGTGGTGCATTAA GGTGCCTGGTGTA AAAACCGTCTGGA AAAGACGCTGA	10
76	エンベロープ;FPV	ATGAACACTCAAATCCTGGTTTTCGCCCTTGTGGCAGTCA TCCCCACAAATGCAGACAAAATTGTCTTGACATCATGC TGTATCAAATGGCACCAAAGTAAACACACTCACTGAGAG AGGAGTAGAAGTTGTCAATGCAACGGAACAGTGGAGC GGACAAACATCCCCAAAATTGCTCAAAAGGGAAAAGAA CCACTGATCTTGGCCAATGCGGACTGTTAGGGACCATTAC CGGACCACCTCAATGCGACCAATTTCTAGAATTTTCAGCT GATCTAATAATCGAGAGACGAGAAGGAAATGATGTTGT TACCCGGGGAAGTTTGTAAATGAAGAGGCATTGCGACAA ATCCTCAGAGGATCAGGTGGGATTGACAAAGAAACAATG GGATTACATATAGTGGAATAAGGACCAACGGAACAAC AGTGCATGTAGAAGATCAGGGTCTTCATTCTATGCAGAA ATGGAGTGGCTCCTGTCAAATACAGACAATGCTGCTTTCC CACAAATGACAAAATCATACAAAACACAAGGAGAGAA TCAGCTCTGATAGTCTGGGGAATCCACCATTGAGGATCA ACCACCGAACAGACCAAACTATATGGGAGTGGAAATAAA CTGATAACAGTCGGGAGTTCCAAATATCATCAATCTTTTG	30
			40

【表 5 - 2 3】

		<p>             TGCCGAGTCCAGGAACACGACCGCAGATAAATGGCCAGT              CCGGACGGATTGATTTTCATTGGTTGATCTTGGATCCCAA              TGATACAGTTACTTTTAGTTTCAATGGGGCTTTCATAGCT              CCAAATCGTGCCAGCTTCTTGAGGGGAAAAGTCCATGGGG              ATCCAGAGCGATGTGCAGGTTGATGCCAATTGCGAAGGG              GAATGCTACCACAGTGGAGGGACTATAACAAGCAGATTG              CCTTTTCAAACATCAATAGCAGAGCAGTTGGCAAATGC              CCAAGATATGTAAAACAGGAAAGTTTATTATTGGCAACT              GGGATGAAGAACGTTCCCGAACCTTCAAAAAAAGGAAA              AAAAGAGGCCTGTTTGGCGCTATAGCAGGGTTTATTGAA              AATGGTTGGGAAGGTCTGGTCGACGGGTGGTACGGTTTC              AGGCATCAGAATGCACAAGGAGAAGGAACTGCAGCAGA              CTACAAAAGCACCCAATCGGCAATTGATCAGATAACCGG              AAAGTTAAATAGACTCATTGAGAAAACCAACCAGCAATT              TGAGCTAATAGATAATGAATTCAGTGGTGGAAAAGCA              GATTGGCAATTTAATTAAGTGGACCAAGACTCCATCAC              AGAAGTATGGTCTTACAATGCTGAAGTTCTTGTGGCAATG              GAAAACCAGCACACTATTGATTGGCTGATTAGAGATG              AACAAGCTGTATGAGCGAGTGAGGAAACAATTAAGGGA              AAATGCTGAAGAGGATGGCACTGGTTGCTTTGAAATTTT              CATAAATGTGACGATGATTGTATGGCTAGTATAAGGAAC              AATACTTATGATCACAGCAAATACAGAGAAGAAGCGATG              CAAAATAGAATACAAATTGACCCAGTCAAATTGAGTAGT              GGCTACAAAGATGTGATACTTTGGTTTAGCTTCGGGGCAT              CATGCTTTTTGCTTCTTGCCATTGCAATGGGCCTTGTTTC              ATATGTGTGAAGAACGGAACATGCGGTGCACTATTTGT              ATATAA           </p>	10
77, 78	エンベロープ;RRV	<p>             AGTGTAACAGAGCACTTTAATGTGTATAAGGCTACTAGA              CCATACCTAGCACATTGCGCCGATTGCGGGGACGGGTAC              TTCTGCTATAGCCCAGTTGCTATCGAGGAGATCCGAGATG              AGGCGTCTGATGGCATGCTTAAAGATCCAAGTCTCCGCCC              AAATAGGTCTGGACAAGGCAGGCACCCACGCCACACGA              AGCTCCGATATATGGCTGGTCATGATGTTTCAAGGAATCTAA              GAGAGATTCTTGAGGGTGTACACGTCCGCAGCGTGCTC              CATACTGGGACGATGGGACACTTCATCGTCGCACACTG              TCCACCAGGCGACTACCTCAAGGTTTCGTTTCGAGGACGC              AGATTCGCACGTGAAGGCATGTAAGGTCCAATACAAGCA              CAATCCATTGCCGGTGGGTAGAGAGAAGTTCGTGGTTAG              ACCACACTTTGGCGTAGAGCTGCCATGCACCTCATACCA           </p>	30
			40

【表 5 - 2 4】

		GCTGACAACGGCTCCACCGACGAGGAGATTGACATGCA TACACCGCCAGATATACCGGATCGCACCTGCTATCACA GACGGCGGGCAACGTCAAAATAACAGCAGGCGGCAGGA CTATCAGGTACAACGTACCTGCGGCCGTGACAACGTAG GCACTACCAGTACTGACAAGACCATCAACACATGCAAGA TTGACCAATGCCATGCTGCCGTCACCAGCCATGACAAAT GGCAATTACCTCTCCATTGTTCCCAGGGCTGATCAGAC AGCTAGGAAAAGGCAAGGTACACGTTCCGTTCCCTCTGAC TAACGTCACCTGCCGAGTGCCGTTGGCTCGAGCGCCGGA TGCCACCTATGGTAAGAAGGAGGTGACCCTGAGATTACA CCCAGATCATCCGACGCTCTTCTCCTATAGGAGTTTAGGA GCCGAACCGCACCCGTACGAGGAATGGGTTGACAAGTTC TCTGAGCGCATCATCCAGTGACGGAAGAAGGGATTGAG TACCAGTGGGGCAACAACCCGCCGGTCTGCCTGTGGGCG CAACTGACGACCGAGGGCAAACCCATGGCTGGCCACAT GAAATCATTCACTACTATTATGGACTATACCCGCCGCCA CTATTGCCGAGTATCCGGGGCGAGTCTGATGGCCCTCCT AACTTGCGGCCACATGCTGCATGCTGGCCACCGCGAG GAGAAAGTGCCTAACACCGTACGCCCTGACGCCAGGAGC GGTGGTACCGTTGACACTGGGGCTGCTTTGCTGCGCACCG AGGGCGAATGCA
79	エンペロープ;エボラ	ATGGGTGTTACAGGAATATTGCAGTTACCTCGTGATCGAT TCAAGAGGACATCATTCTTCTTTGGGTAATTATCCTTTTC CAAAGAACATTTCCATCCCACTTGGAGTCATCCACAATA GCACATTACAGGTTAGTGATGTCGACAACTGGTTTGCC GTGACAACTGTCATCCACAAATCAATTGAGATCAGTTG GACTGAATCTCGAAGGGAATGGAGTGGCAACTGACGTGC CATCTGCAACTAAAAGATGGGGCTTCAGGTCCGGTGTCC CACCAAAGGTGGTCAATTATGAAGCTGGTGAATGGGCTG AAAAGTCTACAATCTTGAAATCAAAAAACCTGACGGGA GTGAGTGTCTACCAGCAGCGCCAGACGGGATTTCGGGGCT TCCCCCGGTGCCGGTATGTGCACAAAGTATCAGGAACGG GACCGTGTGCCGGAGACTTTGCCTTCCACAAAGAGGGTG CTTCTTCTCTGTATGACCGACTTGCTTCCACAGTTATCTAC CGAGGAACGACTTTCGCTGAAGGTGTCGTTGCATTTCTGA TACTGCCCCAAGCTAAGAAGGACTTCTTCAGCTCACACCC CTTGAGAGAGCCGGTCAATGCAACGGAGGACCCGTCTAG TGGCTACTATTCTACCACAATTAGATATCAAGCTACCGGT TTTGAACCAATGAGACAGAGTATTGTTTCGAGGTTGAC

10

20

30

40

50

【表 5 - 2 5】

		AATTTGACCTACGTCCAATTGAATCAAGATTCACACCAC AGTTTCTGCTCCAGCTGAATGAGACAATATATACAAGTG GGAAAAGGAGCAATACCACGGGAAAATAATTTGGAAG GTCAACCCCGAAATTGATACAACAATCGGGGAGTGGGCC TTCTGGGAACTAAAAAACCTCACTAGAAAAATTCGCA GTGAAGAGTTGTCTTTCACAGCTGTATCAAACAGAGCCA AAAACATCAGTGGTCAGAGTCCGGCGCGAACTTCTCCG ACCCAGGGACCAACACAACAACCTGAAGACCACAAAATC ATGGCTTCAGAAAATTCCTCTGCAATGGTTCAAGTGCACA GTCAAGGAAGGGAAGCTGCAGTGTGCGCATCTGACAACCC TTGCCACAATCTCCACGAGTCCTCAACCCCCACAACCAA ACCAGGTCCGGACAACAGCACCCACAATACACCCGTGTA TAACTTGACATCTCTGAGGCAACTCAAGTTGAACAACA TCACCGCAGAACAGACAACGACAGCACAGCCTCCGACAC TCCCCCGCCACGACCGCAGCCGGACCCCTAAAAGCAGA GAACACCAACACGAGCAAGGGTACCGACCTCCTGGACCC CGCCACCACAACAAGTCCCCAAAACCACAGCGAGACCGC TGGCAACAACAACACTCATCACCAGATACCGGAGAAGA GAGTGCCAGCAGCGGGAAGCTAGGCTTAATTACCAATAC TATTGCTGGAGTCGAGGACTGATCACAGGCGGGAGGAG AGCTCGAAGAGAAGCAATTGTCAATGCTCAACCCAAATG CAACCCTAATTTACATTACTGGACTACTCAGGATGAAGGT GCTGCAATCGGACTGGCCTGGATACCATATTTCCGGCCA GCAGCCGAGGGAATTTACATAGAGGGGCTGATGCACAAT CAAGATGGTTTAATCTGTGGGTTGAGACAGCTGGCCAAC GAGACGACTCAAGCTCTCAACTGTTCTGAGAGCCACA ACCGAGCTACGCACCTTTTCAATCCTCAACCGTAAGGCA ATGATTTCTTGCTGCAGCGATGGGGCGGCACATGCCAC ATTTTGGGACCGGACTGCTGTATCGAACCACATGATTGG ACCAAGAACATAACAGACAAAATTGATCAGATTATTCAT GATTTTGTTGATAAAACCTTCCGGACCAGGGGGACAAT GACAATTGGTGGACAGGATGGAGACAATGGATACCGGCA GGTATTGGAGTTACAGGCGTTATAATTGCAGTTATCGCTT TATTCTGTATATGCAAATTTGTCTTTTAG	10
80	短鎖 WPRE 配列	AATCAACCTCTGGATTACAAAATTTGTGAAAGATTGACT GATATTCTTAACTATGTTGCTCCTTTTACGCTGTGTGGATA TGCTGCTTTAATGCCTCTGTATCATGCTATTGCTTCCGTA CGGCTTTCGTTTTCTCCTCCTTGTATAAATCCTGGTTGCTG TCTCTTTATGAGGAGTTGTGGCCCGTTGTCCGTCAACGTG	20
			30
			40

10

20

30

40

50

【表 5 - 2 6】

		GCGTGGTGTGCTCTGTGTTTGCTGACGCAACCCCACTGG CTGGGGCATTGCCACCACCTGTCAACTCCTTTCTGGGACT TTCGCTTTCCCCCTCCCGATCGCCACGGCAGAACTCATCG CCGCCTGCCTTGCCCGCTGCTGGACAGGGGCTAGGTTGCT GGGCACTGATAATTCCGTGGTGTGTC
81	プライマー	TAAGCAGAATTC ATGAATTTGCCAGGAAGAT
82	プライマー	CCATACAATGAATGGACACTAGGCGGCCGCACGAAT
83	Gag、Pol、インテグ ラーゼ断片	GAATTCATGAATTTGCCAGGAAGATGGAAACCAAAAATG ATAGGGGGAATTGGAGGTTTATCAAAGTAAGACAGTAT GATCAGATACTCATAGAAATCTGCGGACATAAAGCTATA GGTACAGTATTAGTAGGACCTACACCTGTCAACATAATT GGAAGAAATCTGTTGACTCAGATTGGCTGCACTTTAAATT TTCCATTAGTCCTATTGAGACTGTACCAGTAAAATTAAA GCCAGGAATGGATGGCCCAAAAGTTAAACAATGGCCATT GACAGAAGAAAAAATAAAAGCATTAGTAGAAATTTGTAC AGAAATGGAAAAGGAAGGAAAAATTTCAAAAATTGGGC CTGAAAATCCATACAATACTCCAGTATTTGCCATAAAGA AAAAAGACAGTACTAAATGGAGAAAATTAGTAGATTTC GAGAACTTAATAAGAGAACTCAAGATTTCTGGGAAGTTC AATTAGGAATACCACATCCTGCAGGGTTAAACAGAAAA AATCAGTAACAGTACTGGATGTGGGCGATGCATATTTTC AGTTCCCTTAGATAAAAGACTTCAGGAAGTATACTGCATTT ACCATACCTAGTATAAACAATGAGACACCAGGGATTAGA TATCAGTACAATGTGCTTCCACAGGGATGGAAAGGATCA CCAGCAATATTCCAGTGTAGCATGACAAAAATCTTAGAG CCTTTTAGAAAACAAAATCCAGACATAGTCATCTATCAAT ACATGGATGATTTGTATGTAGGATCTGACTTAGAAATAG GGCAGCATAGAACAAAAATAGAGGAACTGAGACAACAT CTGTTGAGGTGGGGATTACCACACCAGACAAAAAACAT CAGAAAAGAACCTCCATTCTTTGGATGGGTTATGAACTCC ATCCTGATAAATGGACAGTACAGCCTATAGTGCTGCCAG AAAAGGACAGCTGGACTGTCAATGACATACAGAAATTAG TGGGAAAATTGAATTGGGCAAGTCAGATTTATGCAGGGA TTAAAGTAAGGCAATTATGTAACTTCTTAGGGGAACCA AAGCACTAACAGAAGTAGTACCACTAACAGAAGAAGCA GAGCTAGAACTGGCAGAAAACAGGGAGATTCTAAAAGA ACCGGTACATGGAGTGTATTATGACCCATCAAAAGACTT AATAGCAGAAATACAGAAGCAGGGGCAAGGCCAATGGA CATATCAAATTTATCAAGAGCCATTTAAAAATCTGAAAA

10

20

30

40

50



【表 5 - 2 7】

	<p> CAGGAAAAGTATGCAAGAATGAAGGGTGCCCACTAATG  ATGTGAAACAATTAACAGAGGCAGTACAAAAATAGCCA  CAGAAAGCATAGTAATATGGGGAAAGACTCCTAAATTTA  AATTACCCATACAAAAGGAAACATGGGAAGCATGGTGGA  CAGAGTATTGGCAAGCCACCTGGATTCTGAGTGGGAGT  TTGTCAATACCCCTCCCTTAGTGAAGTTATGGTACCAGTT  AGAGAAAGAACCATAATAGGAGCAGAACTTTCTATGT  AGATGGGGCAGCCAATAGGGAACTAAATTAGGAAAAG  CAGGATATGTAAGTACAGAGGAAGACAAAAGTTGTCC  CCCTAACGGACACAACAAATCAGAAGACTGAGTTACAAG  CAATTCATCTAGCTTTCAGGATTCGGGATTAGAAGTAA  ACATAGTGACAGACTCACAATATGCATTGGGAATCATT  AAGCACAAACCAGATAAGAGTGAATCAGAGTTAGTCAGTC  AAATAATAGAGCAGTTAATAAAAAAGGAAAAAGTCTACC  TGGCATGGGTACCAGCACACAAAGGAATTGGAGGAAATG  AACAAGTAGATAAATTGGTCAGTGCTGGAATCAGGAAAG  TACTATTTTATAGTGAATAGATAAGGCCAAGAAGAAC  ATGAGAAATATCACAGTAATTGGAGAGCAATGGCTAGTG  ATTTTAACCTACCACCTGTAGTAGCAAAGAAATAGTAG  CCAGCTGTGATAAATGTCAGCTAAAAGGGGAAGCCATGC  ATGGACAAGTAGACTGTAGCCAGGAATATGGCAGCTAG  ATTGTACACATTTAGAAGGAAAAGTTATCTTGGTAGCAG  TTCATGTAGCCAGTGGATATATAGAAGCAGAAGTAATTC  CAGCAGAGACAGGGCAAGAAACAGCATACTTCTCTTAA  AATTAGCAGGAAGATGGCCAGTAAAAACAGTACATACAG  ACAATGGCAGCAATTTACACAGTACTACAGTTAAGGCCG  CCTGTTGGTGGGCGGGGATCAAGCAGGAATTTGGCATT  CCTACAATCCCCAAAGTCAAGGAGTAATAGAATCTATGA  ATAAAGAATTAAAGAAAATTATAGGACAGGTAAGAGATC  AGGCTGAACATCTTAAGACAGCAGTACAAATGGCAGTAT  TCATCCACAATTTTAAAAAGAAAAGGGGGGATTGGGGGT  ACAGTGCAGGGGAAAGAATAGTAGACATAATAGCAACA  GACATACAACTAAAGAATTACAAAACAAATTACAAAA  ATTCAAAATTTTCGGGTTTATTACAGGGACAGCAGAGAT  CCAGTTTGGAAAGGACCAGCAAAGCTCCTTGAAAGGT  GAAGGGGCAGTAGTAATACAAGATAATAGTGACATAAA  AGTAGTGCCAAGAAGAAAAGCAAAGATCATCAGGGATT  ATGGAAAAACAGATGGCAGGTGATGATTGTGTGGCAAGTA  GACAGGATGAGGATTAA </p>
--	---

10

20

30

40

50

【表 5 - 2 8】

84	Rev、RRE および ウサギベータグロビ ンポリ A を含む DNA 断片	<p>TCTAGAATGGCAGGAAGAAGCGGAGACAGCGACGA AGAGCTCATCAGAACAGTCAGACTCATCAAGCTTCT CTATCAAAGCAACCCACCTCCCCAATCCCCGAGGGGAC CCGACAGGCCCGAAGGAATAGAAGAAGAAGGTGGA GAGAGAGACAGAGACAGATCCATTGATTAGTGAA CGGATCCTTGGCACTTATCTGGGACGATCTGCGGAG CCTGTGCCTCTTCAGCTACCACCGCTTGAGAGACTTA CTCTTGATTGTAACGAGGATTGTGGAACCTTCTGGGA CGCAGGGGGGTGGGAAGCCCTCAAATATTGGTGGAAAT CTCCTACAATATTGGAGTCAGGAGCTAAAGAATAGA GGAGCTTTGTTCCCTTGGGTTCTTGGGAGCAGCAGGA AGCACTATGGGCGCAGCGTCAATGACGCTGACGGTA CAGGCCAGACAATTATTGTCTGGTATAGTGCAGCAG CAGAACAATTTGCTGAGGGCTATTGAGGCGCAACAG CATCTGTTGCAACTCACAGTCTGGGGCATCAAGCAG CTCCAGGCAAGAATCCTGGCTGTGAAAAGATACCTA AAGGATCAACAGCTCCTAGATCTTTTCCCTCTGCCA AAAATTATGGGGACATCATGAAGCCCCTTGAGCATC TGACTTCTGGCTAATAAAGGAAATTTATTTTCATTGC AATAGTGTGTTGGAATTTTTTGTGTCTCTCACTCGGA AGGACATATGGGAGGGCAAATCATTTAAAACATCA GAATGAGTATTTGGTTTAGAGTTTGGCAACATATGC CATATGCTGGCTGCCATGAACAAAGGTGGCTATAAA GAGGTCATCAGTATATGAAACAGCCCCCTGCTGTCC ATTCCTTATTCATAGAAAAGCCTTGACTTGAGGTTA GATTTTTTTTATATTTTGTTTTGTGTTATTTTTTCTTT AACATCCCTAAAATTTTCCTTACATGTTTTACTAGCC AGATTTTTCCTCCTCTCCTGACTACTCCCAGTCATAG CTGTCCCTCTCTCTTATGAAGATCCCTCGACCTGCA GCCCAAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTC CTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAATTCCACACA ACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAGCCTGG GGTGCCCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCG TTGCGCTCACTGCCCCGCTTCCAGTCGGGAAACCTGT CGTGCCAGCGGATCCGCATCTCAATTAGTCAGCAAC CATAGTCCCGCCCCTAACTCCGCCCATCCCGCCCCTA</p>
----	---	---

10

20

30

40

50

【表 5 - 2 9】

		ACTCCGCCCAGTTCCGCCCATTCTCCGCCCCATGGCT GACTAATTTTTTTTATTTATGCAGAGGCCGAGGCCGC CTCGGCCTCTGAGCTATTCCAGAAGTAGTGAGGAGG CTTTTTGGAGGCCTAGGCTTTTGCAAAAAGCTAACT TGTATTATGCAGCTTATAATGGTTACAAATAAAGCA ATAGCATCACAAATTCACAAATAAAGCATTTTTTTC ACTGCATTCTAGTTGTGGTTGTCCAAACTCATCAAT GTATCTTATCAGCGGCCGCCCCGGG
85	CAG エンハンサー/ プロモーター/イント ロン配列を含む DNA 断片	ACGCGTTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTC ATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCCGCGTTAC ATAAC TTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCC CAACGACCCCCCGCCATTGACGTCAATAATGACGTA TGTTC CATAGTAACGCCAATAGGGACTTCCATTG ACGTCAATGGGTGGACTATTTACGGTAAACTGCCCA CTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTAC GCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGC CTGGCATTATGCCCAGTACATGACCTTATGGGACTTT CCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTA TTACCATGGGTGCGAGGTGAGCCCCACGTTCTGCTTC ACTCTCCCCATCTCCCCCCCCCTCCCCACCCCAATTT TGTATTTATTTATTTTTTAATTATTTTGTGCAGCGATG GGGGCGGGGGGGGGGGGGGGCGCGCGCCAGGCGGGG CGGGGCGGGGCGAGGGGCGGGGCGGGGCGAGGCGG AGAGGTGCGGCGGCAGCCAATCAGAGCGGCGCGCT CCGAAAGTTTCCTTTTATGGCGAGGCGGCGGCGGCG GCGGCCCTATAAAAAGCGAAGCGCGCGGCGGCGG GAGTCGCTGCGTTGCCTTCGCCCCGTGCCCCGCTCCG CGCCGCCTCGCGCCGCCCGCCCCGGCTCTGACTGAC CGCGTTACTCCACAGGTGAGCGGGCGGGACGGCCC TTCTCTCCGGGCTGTAATTAGCGCTTGGTTTAATGA CGGCTCGTTTCTTTTCTGTGGCTGCGTGAAAGCCTTA AAGGGCTCCGGGAGGGCCCTTTGTGCGGGGGGAG CGGCTCGGGGGGTGCGTGCGTGTGTGTGCGTGGG GAGCGCCGCGTGCGGCCCGCGCTGCCCGGCGGCTGT GAGCGCTGCGGGCGCGGCGCGGGGCTTTGTGCGCTC CGCGTGTGCGCGAGGGGAGCGCGGCCGGGGGCGGT

10

20

30

40

50

【表 5 - 3 0】

		GCCCCGCGGTGCGGGGGGGCTGCGAGGGGAACAAA GGCTGCGTGCGGGGTGTGTGCGTGGGGGGGTGAGC AGGGGGTGTGGGCGCGGCGGTGCGGCTGTAACCCCC CCCTGCACCCCCCTCCCCGAGTTGCTGAGCACGGCC CGGCTTCGGGTGCGGGGCTCCGTGCGGGGCGTGCGC CGGGGCTCGCCGTGCCGGGCGGGGGGTGGCGGCAG GTGGGGGTGCCGGGCGGGGCGGGGCCGCCTCGGGC CGGGGAGGGCTCGGGGAGGGGCGCGGCGGCCCG GAGCGCCGGCGGCTGTGAGGCGCGGCGAGCCGA GCCATTGCCTTTTATGTAATCGTGCGAGAGGGCGC AGGGAATTCCTTTGTCCCAAATCTGGCGGAGCCGAA ATCTGGGAGGCGCCGCGCACCCCCCTCTAGCGGGCG CGGGCGAAGCGGTGCGGCGCCGGCAGGAAGGAAAT GGGCGGGGAGGGCCTTCGTGCGTCGCCGCGCCCG TCCCTTCTCCATCTCCAGCCTCGGGGCTGCCGAGG GGGACGGCTGCCTTCGGGGGGGACGGGGCAGGGCG GGGTTCGGCTTCTGGCGTGTGACCGGCGGGAATTC
86	VSV-G を含む DNA 断片	GAATTCATGAAGTGCTTTTGTACTTAGCCTTTTATTCAT TGGGGTGAATTGCAAGTTCACCATAGTTTTCCACACAAC CAAAAAGGAACTGGAAAAATGTTCTTCTAATTACCAT TATTGCGCGTCAAGCTCAGATTAAATTGGCATAATGACT TAATAGGCACAGCCTTACAAGTCAAAATGCCAAGAGTC ACAAGGCTATTCAAGCAGACGGTTGGATGTGTCATGCTT CCAAATGGGTCACTACTTGTGATTCCGCTGGTATGGACC GAAGTATATAACACATTCCATCCGATCCTTCACTCCATCT GTAGAACAATGCAAGGAAAGCATTGAACAAACGAAACA AGGAACTTGGCTGAATCCAGGCTTCCCTCCTCAAAGTTGT GGATATGCAACTGTGACGGATGCCGAAGCAGTGATTGTC CAGGTGACTCCTCACCATGTGCTGGTTGATGAATACACA GGAGAATGGGTTGATTACAGTTCATCAACGGAAAAATGC AGCAATTACATATGCCCCACTGTCCATAACTCTACAACCT GGCATTCTGACTATAAGGTCAAAGGGCTATGTGATTCTA ACCTCATTCCATGGACATCACCTTCTTCTCAGAGGACGG AGAGCTATCATCCCTGGGAAAGGAGGGCACAGGGTTCAG AAGTAATACTTTGCTTATGAACTGGAGGCAAGGCCTG CAAAATGCAATACTGCAAGCATTGGGGAGTCAGACTCCC ATCAGGTGCTGGTTCGAGATGGCTGATAAGGATCTCTTT GCTGCAGCCAGATTCCTGAATGCCCAGAAGGGTCAAGT

10

20

30

40

50

		<p>ATCTCTGCTCCATCTCAGACCTCAGACCTGTAAGTCTAA  TTCAGGACGTTGAGAGGATCTTGGATTATTCCTCTGCCA  AGAAACCTGGAGCAAAATCAGAGCGGGTCTTCCAATCTC  TCCAGTGGATCTCAGCTATCTTGCTCCTAAAAACCCAGGA  ACCGGTCTCTGCTTTACCATCAATGGTACCCTAAAAAT  ACTTTGAGACCAGATACATCAGAGTCGATATTGTGCTCC  AATCCTCTCAAGAATGGTCGGAATGATCAGTGGAACTAC  CACAGAAAGGGAACGTGGGATGACTGGGCACCATATGA  AGACGTGGAAATTGGACCCAATGGAGTTCTGAGGACCAG  TTCAGGATATAAGTTTCCTTTATACATGATTGGACATGGT  ATGTTGGACTCCGATCTTCATCTTAGCTCAAAGGCTCAGG  TGTTCGAACATCCTCACATTCAAGACGCTGCTTCGCAACT  TCCTGATGATGAGAGTTTATTTTTGGTGATACTGGGCTA  TCCAAAAATCCAATCGAGCTTGTAAGGTTGGTTCAGT  AGTTGGAAAAGCTCTATTGCCCTTTTTTCTTTATCATAGG  GTAAATCATTGGACTATTCTTGGTCTCCGAGTTGGTATC  CATCTTTGCATTAAATTAAGCACACCAAGAAAAGACAG  ATTTATACAGACATAGAGATGAGAATTC</p>
87	RRE およびウサギ ベータグロビンポリ A を含むヘルパー プラスミド	<p>TCTAGAAGGAGCTTTGTTCTTGGGTTCTTGGGAGCAGCA  GGAAGCACTATGGGCGCAGCGTCAATGACGCTGACGGTA  CAGGCCAGACAAATTATTGTCTGGTATAGTGCAGCAGCAG  AACAATTTGCTGAGGGCTATTGAGGCGCAACAGCATCTG  TTGCAACTCACAGTCTGGGGCATCAAGCAGCTCCAGGCA  AGAATCCTGGCTGTGGAAAGATACCTAAAGGATCAACAG  CTCCTAGATCTTTTTCCCTCTGCCAAAAATTATGGGGACA  TCATGAAGCCCCCTTGAGCATCTGACTTCTGGCTAATAAAG  GAAATTTATTTTCATTGCAATAGTGTGTGGAATTTTTGT  GTCTCTCACTCGGAAGGACATATGGGAGGGCAAAATCATT  TAAAACATCAGAATGAGTATTTGGTTTAGAGTTTGGCAA  CATATGCCATATGCTGGCTGCCATGAACAAAGGTGGCTA  TAAAGAGGTCATCAGTATATGAAACAGCCCCCTGCTGTC  CATTCCTTATTCATAGAAAAGCCTTGACTTGAGGTTAGA  TTTTTTTTATATTTTGTTTTGTGTTATTTTTTCTTTAACAT  CCCTAAAATTTCCCTTACATGTTTACTAGCCAGATTTTTCT  CTCCTCTCCTGACTACTCCAGTCATAGCTGTCCCTCTTCT  CTTATGAAGATCCCTCGACCTGCAGCCCAAGCTTGCGGTA  ATCATGGTCATAGCTGTTTCTGTGTGAAATTGTTATCCG  CTCACAAATTCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAG  TGTAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCACA</p>

40

【表 5 - 3 2】

		TTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCCGCTTCCAGTCGGGAA ACCTGTCGTGCCAGCGGATCCGCATCTCAATTAGTCAGCA ACCATAGTCCCCGCCCCTAACTCCGCCCATCCCGCCCCTAA CTCCGCCCAGTTCCGCCCATTCTCCGCCCCATGGCTGACT AATTTTTTTTATTTATGCAGAGGCCGAGGCCGCCTCGGCC TCTGAGCTATTCCAGAAGTAGTGAGGAGGCTTTTTTGGAG GCCTAGGCTTTTGCAAAAAGCTAACTTGTTATTGCAGCT TATAATGGTTACAAATAAAGCAATAGCATCACAAATTTC ACAAATAAAGCATTTTTTTTCTACTGCATTCTAGTTGTGGTT TGTCCAAACATCAATGTATCTTATCACCCGGG
88	RSV プロモーター および HIV Rev	CAATTGCGATGTACGGGCCAGATATACGCGTATCTGAGG GGACTAGGGTGTGTTTAGGCGAAAAGCGGGGCTTCGGTT GTACGCGGTTAGGAGTCCCTCAGGATATAGTAGTTTCGC TTTTGCATAGGGAGGGGAAATGTAGTCTTATGCAATAC ACTTGTAGTCTTGCAACATGGTAACGATGAGTTAGCAAC ATGCCTTACAAGGAGAGAAAAAGCACCGTGCATGCCGAT TGGTGGAAGTAAGGTGGTACGATCGTGCCTTATTAGGAA GGCAACAGACAGGTCTGACATGGATTGGACGAACCACTG AATCCGCATTGCAGAGATAATTGTATTTAAGTGCCTAGC TCGATACAATAAACGCCATTTGACCATTACACATTGGT GTGCACCTCCAAGCTCGAGCTCGTTTAGTGAACCGTCAG ATCGCCTGGAGACGCCATCCACGCTGTTTGACCTCCATA GAAGACACCGGGACCGATCCAGCCTCCCCTCGAAGCTAG CGATTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAGCGGAGACAG CGACGAAGAACTCCTCAAGGCAGTCAGACTCATCAAGTT TCTCTATCAAAGCAACCCACCTCCCAATCCCAGAGGGGAC CCGACAGGCCCCGAAGGAATAGAAGAAGAAGGTGGAGAG AGAGACAGAGACAGATCCATTTCGATTAGTGAACGGATCC TTAGCACTTATCTGGGACGATCTGCGGAGCCTGTGCCTCT TCAGCTACCACCGCTTGAGAGACTTACTCTTGATTGTAAC GAGGATTGTGGAACCTCTGGGACGCAGGGGGTGGGAAGC CCTCAAATATTGGTGGAACTCTCCTACAATATTGGAGTCAG GAGCTAAAGAATAGTCTAGA
89	標的配列	ATGGCAGGAAGAAGCGGAG
90	shRNA 配列	ATGGCAGGAAGAAGCGGAGTTCAAGAGACTCCGCTTCTT CCTGCCATTTTTT
91	H1 プロモーターお よび shRT 配列	GAACGCTGACGTCATCAACCCGCTCCAAGGAATCGCGGG CCCAGTGTCACTAGGCGGGAACACCCAGCGCGCTGCGC CCTGGCAGGAAGATGGCTGTGAGGGACAGGGGAGTGGC

10

20

30

40

50

【表 5 - 3 3】

		GCCCTGCAATATTTGCATGTCGCTATGTGTTCTGGGAAAT CACCATAAACGTGAAATGTCTTTGGATTGGGAACTTAT AAGTTCTGTATGAGACCACTTGGATCCGCGGAGACAGCG ACGAAGAGCTTCAAGAGAGCTCTTCGTCGCTGICTCCGCT TTTT
92	H1 CCR5 配列	GAACGCTGACGTCATCAACCCGCTCCAAGGAATCGCGGG CCCAGTGTCACTAGGCGGGAACACCCAGCGCGCTGCGC CCTGGCAGGAAGATGGCTGTGAGGGACAGGGGAGTGGC GCCCTGCAATATTTGCATGTCGCTATGTGTTCTGGGAAAT CACCATAAACGTGAAATGTCTTTGGATTGGGAACTTAT AAGTTCTGTATGAGACCACTTGGATCCGTGTCAAGTCCAA TCTATGTTCAAGAGACATAGATTGGACTTGACACTTTTT
93	CCR5 フォワードプ ライマー	AGGAATTGATGGCGAGAAGG
94	CCR5 リバースプ ライマー	CCCCAAAGAAGGTCAAGGTAATCA
95	アクチンフォワードプ ライマー	AGCGCGGCTACAGCTTCA
96	アクチンリバースプ ライマー	GGCGACGTAGCACAGCTTCT
97	AGT103 CCR5 miR30	TGTAAACTGAGCTTGCTCTA
98	AGT103-R5-1	TGTAAACTGAGCTTGCTCGC
99	AGT103-R5-2	CATAGATTGGACTTGACAC
100	CAG プロモーター	TAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCAT AGCCCATATATGGAGTTCGCGTTACATAACTTACGGTAA ATGGCCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCCGCCAT TGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAAT AGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGACTATTTACGG TAAACTGCCCCTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGC CAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGC CCGCTGGCATTATGCCCAGTACATGACCTTATGGGACTT TCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATT ACCATGGGTGAGGTGAGCCCCACGTTCTGCTTCACTCTC CCCATCTCCCCCCCCCTCCCCACCCCAATTTTGTATTTATT TATTTTAAATTATTTGTGCAGCGATGGGGGCGGGGGGG GGGGGGGCGCGGCCAGGCGGGGCGGGGCGGGGCGAGG GGCGGGGCGGGGCGAGGCGGAGAGGTGCGGCGGCAGCC

10

20

30

40

50

【表 5 - 3 4】

		AATCAGAGCGGCGCGCTCCGAAAGTTTCCTTTTATGGCG AGGCGGCGGCGGCGGCGGCCCTATAAAAAGCGAAGCGC GCGGCGGGCG
101	H1 エlement	GAACGCTGACGTCATCAACCCGCTCCAAGGAATCGCGGG CCCAGTGTCACTAGGCGGGAACACCCAGCGCGCGTGCGC CCTGGCAGGAAGATGGCTGTGAGGGACAGGGGAGTGGC GCCCTGCAATATTTGCATGTCGCTATGTGTTCTGGGAAAT CACCATAAACGTGAAATGTCTTTGGATTGGGAATCTTAT AAGTTCTGTATGAGACCACTT
103	7SK プロモーター	CTGCAGTATTTAGCATGCCCCACCCATCTGCAAGGCATTC TGGATAGTGTCAAAACAGCCGAAATCAAGTCCGTTTAT CTCAAACCTTTAGCATTTTGGGAATAAATGATATTTGCTAT GCTGGTTAAATTAGATTTTAGTTAAATTTCTGCTGAAGC TCTAGTACGATAAGCAACTTGACCTAAGTGTAAGTTGA GATTTCCTTCAGGTTTATATAGCTTGTGCGCCGCCTGGCT ACCTC
104	miR155 Tat	CTGGAGGCTTGCTGAAGGCTGTATGCTGTCCGCTTCTCC TGCCATAGGGTTTTGGCCACTGACTGACCCTATGGGGAA GAAGCGGACAGGACACAAGGCCTGTTACTAGCACTCACA TGGAACAAATGGCC
105	伸長因子-1アルファ (EF1-アルファ) プロモーター	CCGGTGCCTAGAGAAGGTGGCGCGGGGTAAACTGG GAAAGTGATGTCGTGTACTGGCTCCGCCTTTTCCC GAGGGTGGGGGAGAACCGTATATAAGTGCAGTAGT CGCCGTGAACGTTCTTTTTCGCAACGGGTTTGCCGC CAGAACACAGGTAAGTGCCGTGTGTGGTTCCCGCG GGCCTGGCCTCTTTACGGGTTATGGCCCTTGCGTGC CTTGAATTACTTCCACGCCCCCTGGCTGCAGTACGTG ATTCTTGATCCCGAGCTTCGGGTTGGAAGTGGGTGG GAGAGTTCGAGGCCTTGCCTTAAGGAGCCCCCTTCG CCTCGTGCTTGAGTTGAGGCCTGGCCTGGGCGCTGG GGCCGCCGCGTGCGAATCTGGTGGCACCTTCGCGCC TGTCTCGCTGCTTTGATAAGTCTCTAGCCATTAAA ATTTTGTATGACCTGCTGCGACGCTTTTTTCTGGCA

10

20

30

40

50



【表 5 - 3 5】

		AGATAGTCTTGTAATGCGGGCCAAGATCTGCACAC TGGTATTTTCGGTTTTTGGGGCCGCGGGCGGCGACGG GGCCCGTGCGTCCCAGCGCACATGTTTCGGCGAGGC GGGGCCTGCGAGCGCGGCCACCGAGAATCGGACGG GGGTAGTCTCAAGCTGGCCGGCCTGCTCTGGTGCCT GGCCTCGCGCCGCCGTGTATCGCCCCGCCCTGGGCG GCAAGGCTGGCCCCGGTCGGCACCAAGTTGCGTGAGC GGAAAGATGGCCGCTTCCCGGCCCTGCTGCAGGGA GCTCAAAATGGAGGACGCGGCGCTCGGGAGAGCGG GCGGGTGAGTCACCCACACAAAGGAAAAGGGCCTT TCCGTCCTCAGCCGTCGCTTCATGTGACTCCACGGA GTACCGGGCGCCGTCCAGGCACCTCGATTAGTTCTC GAGCTTTTGGAGTACGTCGTCTTTAGGTTGGGGGGA GGGGTTTTATGCGATGGAGTTTCCCCACACTGAGTG GGTGGAGACTGAAGTTAGGCCAGCTTGGCACTTGAT GTAATTCTCCTTGGAATTTGCCCTTTTTGAGTTTGA TCTTGGTTCATTCTCAAGCCTCAGACAGTGGTTCAA AGTTTTTTTCTTCCATTTCAAGGTGTCGTGATGTACA	10
106	5'制限認識部位を 伴うmiR21 Vif コーディング配列	CCCGGGCATCTCCATGGCTGTACCACCTTGTCGGGG GATGTGTACTTCTGAACTTGTGTTGAATCTCATGGA GTTTCAAGAAGACACATCCGCACTGACATTTTGGTAT CTTTCATCTGACCA	20
107	5'制限認識部位を 伴うmiR185 Tat コーディング配列	GCTAGCGGGCCTGGCTCGAGCAGGGGGCGAGGGAT TCCGCTTCTTCCCTGCCATAGCGTGGTCCCCCTCCCCTA TGGCAGGCAGAAGCGGCACCTTCCCTCCCAATGACC GCGTCTTCGTC	30
108	miR185 Tat コーディング配列	GGGCCTGGCTCGAGCAGGGGGCGAGGGATTCCGCT TCTTCCCTGCCATAGCGTGGTCCCCCTCCCCTATGGCA GGCAGAAGCGGCACCTTCCCTCCCAATGACCGCGTC TTCGTC	40

## 【 0 3 4 3 】

上に本発明の好ましい実施形態についていくつか説明し、具体的に例示してきたが、本発明はそのような実施形態に限定されることを意図していない。本発明の範囲および精神から逸脱することなく、様々な改変をそこに施してもよい。

特定の実施形態では、例えば以下の項目が提供される。

( 項目 1 )

H I V に感染した細胞を処置する方法であって、

( a ) H I V に感染した対象から単離された末梢血単核細胞 ( P B M C ) を、治療有効量の刺激性作用剤と接触させるステップであって、前記接触が e x v i v o で実施され

10

20

30

40

50

るステップ；

（b）*ex vivo*において、少なくとも1つの遺伝子エレメントをコードするウイルス送達システムを用いて前記P B M Cに形質導入するステップ；および

（c）前記形質導入されたP B M Cを、少なくとも1日間培養するステップを含む方法。

（項目2）

前記形質導入されたP B M Cが、約1～約35日間培養される、項目1に記載の方法。

（項目3）

前記形質導入されたP B M Cを対象に注入するステップをさらに含む、項目1に記載の方法。

（項目4）

前記対象がヒトである、項目3に記載の方法。

（項目5）

前記刺激性作用剤がペプチドを含む、項目1に記載の方法。

（項目6）

前記ペプチドが、*gag*ペプチドを含む、項目5に記載の方法。

（項目7）

前記刺激性作用剤がワクチンを含む、項目1に記載の方法。

（項目8）

前記ワクチンが、H I Vワクチンを含む、項目7に記載の方法。

（項目9）

前記H I Vワクチンが、M V A / H I V 6 2 Bワクチンまたはそのバリエーションを含む、項目8に記載の方法。

（項目10）

前記ウイルス送達システムが、レンチウイルス粒子を含む、項目1に記載の方法。

（項目11）

前記少なくとも1つの遺伝子エレメントが、ケモカイン受容体C C R 5の産生を阻害することができるスモールRNA、またはH I V RNA配列を標的とすることができる少なくとも1つのスモールRNAを含む、項目1に記載の方法。

（項目12）

前記少なくとも1つの遺伝子エレメントが、ケモカイン受容体C C R 5の産生を阻害することができるスモールRNA、およびH I V RNA配列を標的とすることができる少なくとも1つのスモールRNAを含む、項目1に記載の方法。

（項目13）

前記H I V RNA配列が、H I V *Vif*配列、H I V *Tat*配列、またはそれらのバリエーションを含む、項目11または12に記載の方法。

（項目14）

前記少なくとも1つの遺伝子エレメントが、マイクロRNAまたは*shRNA*を含む、項目11または12に記載の方法。

（項目15）

前記少なくとも1つの遺伝子エレメントが、マイクロRNAクラスターを含む、項目14に記載の方法。

（項目16）

前記少なくとも1つの遺伝子エレメントが、

【化55】

AGGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCGACTGTAACTGAGCTTGCTCTACTGT  
GAAGCCACAGATGGGTAGAGCAAGCACAGTTTACCGCTGCCTACTGCCTCG  
GACTTCAAGGGGCTT ( 配列番号 1)

10

20

30

40

50

と少なくとも 80 %、または少なくとも 85 %、または少なくとも 90 %、または少なくとも 95 %の同一性パーセントを有するマイクロRNAを含む、項目 14 に記載の方法。  
(項目 17)

前記少なくとも 1 つの遺伝子エレメントが、  
【化 56】

AGGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCGACTGTAAACTGAGCTTGCTCTACTGT  
GAAGCCACAGATGGGTAGAGCAAGCACAGTTTACCGCTGCCTACTGCCTCG  
GACTTCAAGGGGCTT ( 配列番号 1)

10

を含む、項目 14 に記載の方法。  
(項目 18)

前記少なくとも 1 つの遺伝子エレメントが、  
a .  
【化 57】

CATCTCCATGGCTGTACCACCTTGTCGGGGGATGTGTACTTCTGAAC  
TTGTGTTGAATCTCATGGAGTTCAGAAGAACACATCCGCACTGACAT  
TTTGGTATCTTTCATCTGACCA ( 配列番号 2)

20

;  
と少なくとも 80 %、もしくは少なくとも 85 %、もしくは少なくとも 90 %、もしくは  
少なくとも 95 %の同一性パーセントを有するか、または  
b .

【化 58】  
GGGCCTGGCTCGAGCAGGGGGCGAGGGATTCCGCTTCTTCCTGCCAT  
AGCGTGGTCCCCTCCCCTATGGCAGGCAGAAGCGGCACCTTCCCTCC  
CAATGACCGCGTCTTCGTCG ( 配列番号 3)

30

と少なくとも 80 %、もしくは少なくとも 85 %、もしくは少なくとも 90 %、もしくは  
少なくとも 95 %の同一性パーセントを有する  
マイクロRNAを含む、項目 14 に記載の方法。  
(項目 19)

前記少なくとも 1 つの遺伝子エレメントが、  
a .  
【化 59】

CATCTCCATGGCTGTACCACCTTGTCGGGGGATGTGTACTTCTGAAC  
TTGTGTTGAATCTCATGGAGTTCAGAAGAACACATCCGCACTGACAT  
TTTGGTATCTTTCATCTGACCA ( 配列番号 2)

40

; または  
b .

【化 60】  
GGGCCTGGCTCGAGCAGGGGGCGAGGGATTCCGCTTCTTCCTGCCAT  
AGCGTGGTCCCCTCCCCTATGGCAGGCAGAAGCGGCACCTTCCCTCC  
CAATGACCGCGTCTTCGTCG ( 配列番号 3)

50

を含む、項目 1 4 に記載の方法。

( 項目 2 0 )

前記マイクロRNAクラスターが、

【化 6 1】

AGGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCGACTGTAAACTGAGCTTGCTCTACTGT  
GAAGCCACAGATGGGTAGAGCAAGCACAGTTTACCGCTGCCTACTGCCTCG  
GACTTCAAGGGGCTTCCCGGGCATCTCCATGGCTGTACCACCTTGTCGGGG  
GATGTGTA CT TCTGAACTTGTGTTGAATCTCATGGAGTTCAGAAGAACACA  
TCCGCACTGACATTTTGGTATCTTTCATCTGACCAGCTAGCGGGCCTGGCTC  
GAGCAGGGGGCGAGGGATTCCGCTTCTTCTGCCATAGCGTGGTCCCCTCC  
CCTATGGCAGGCAGAAGCGGCACCTTCCCTCCCAATGACCGCGTCTTCGTC

( 配列番号 31)

と少なくとも 8 0 %、または少なくとも 8 5 %、または少なくとも 9 0 %、または少なくとも 9 5 %の同一性パーセントを有する配列を含む、項目 1 5 に記載の方法。

( 項目 2 1 )

前記マイクロRNAクラスターが、

【化 6 2】

AGGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCGACTGTAAACTGAGCTTGCTCTACTGT  
GAAGCCACAGATGGGTAGAGCAAGCACAGTTTACCGCTGCCTACTGCCTCG  
GACTTCAAGGGGCTTCCCGGGCATCTCCATGGCTGTACCACCTTGTCGGGG  
GATGTGTA CT TCTGAACTTGTGTTGAATCTCATGGAGTTCAGAAGAACACA  
TCCGCACTGACATTTTGGTATCTTTCATCTGACCAGCTAGCGGGCCTGGCTC  
GAGCAGGGGGCGAGGGATTCCGCTTCTTCTGCCATAGCGTGGTCCCCTCC  
CCTATGGCAGGCAGAAGCGGCACCTTCCCTCCCAATGACCGCGTCTTCGTC

( 配列番号 31)

を含む、項目 1 5 に記載の方法。

( 項目 2 2 )

対象の HIV 感染を処置する方法であって、

( a ) 前記対象から白血球を取り出し、末梢血単核細胞 ( P B M C ) を精製するステップ；

( b ) e x v i v o において、前記 P B M C を治療有効量の刺激性作用剤と接触させるステップ；

( c ) e x v i v o において、少なくとも 1 つの遺伝子エレメントをコードするウイルス送達システムを用いて前記 P B M C に形質導入するステップ；および

( d ) 前記形質導入された P B M C を、少なくとも 1 日間培養するステップ

を含む方法。

( 項目 2 3 )

前記形質導入された P B M C が、約 1 ~ 約 3 5 日間培養される、項目 2 2 に記載の方法。

( 項目 2 4 )

前記形質導入された P B M C を前記対象に注入するステップをさらに含む、項目 2 2 に記載の方法。

( 項目 2 5 )

前記対象がヒトである、項目 2 2 から 2 4 のいずれか一項に記載の方法。

( 項目 2 6 )

10

20

30

40

50

前記刺激性作用剤がペプチドを含む、項目 2 2 に記載の方法。

(項目 2 7)

前記刺激性作用剤が、g a g ペプチドを含む、項目 2 6 に記載の方法。

(項目 2 8)

前記刺激性作用剤がワクチンを含む、項目 2 2 に記載の方法。

(項目 2 9)

前記ワクチンが、H I V ワクチンを含む、項目 2 8 に記載の方法。

(項目 3 0)

前記 H I V ワクチンが、M V A / H I V 6 2 B ワクチンまたはそのバリエーションを含む、  
項目 2 9 に記載の方法。

(項目 3 1)

前記ウイルス送達システムが、レンチウイルス粒子を含む、項目 2 2 に記載の方法。

(項目 3 2)

前記少なくとも 1 つの遺伝子エレメントが、ケモカイン受容体 C C R 5 の産生を阻害する  
ことができるスモール R N A、または H I V R N A 配列を標的とすることができる少  
なくとも 1 つのスモール R N A を含む、項目 2 2 に記載の方法。

(項目 3 3)

前記少なくとも 1 つの遺伝子エレメントが、ケモカイン受容体 C C R 5 の産生を阻害する  
ことができるスモール R N A、および H I V R N A 配列を標的とすることができる少  
なくとも 1 つのスモール R N A を含む、項目 2 2 に記載の方法。

(項目 3 4)

前記 H I V R N A 配列が、H I V V i f 配列、H I V T a t 配列、またはそれらの  
バリエーションを含む、項目 3 2 または 3 3 に記載の方法。

(項目 3 5)

前記少なくとも 1 つの遺伝子エレメントが、マイクロ R N A または s h R N A を含む、  
項目 3 2 または 3 3 に記載の方法。

(項目 3 6)

前記少なくとも 1 つの遺伝子エレメントが、マイクロ R N A クラスターを含む、項目 3  
5 に記載の方法。

(項目 3 7)

前記少なくとも 1 つの遺伝子エレメントが、

a .

【化 6 3】

AGGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCGACTGTAAACTGAGCTTGCTCT

ACTGTGAAGCCACAGATGGGTAGAGCAAGCACAGTTTACCGCTGCC

TACTGCCTCGGACTTCAAGGGGCTT ( 配列番号 1)

と少なくとも 8 0 %、または少なくとも 8 5 %、または少なくとも 9 0 %、または少なく  
とも 9 5 % の同一性パーセントを有するマイクロ R N A を含む、項目 3 5 に記載の方法。

(項目 3 8)

前記少なくとも 1 つの遺伝子エレメントが、

【化 6 4】

AGGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCGACTGTAAACTGAGCTTGCTCTACTGT

GAAGCCACAGATGGGTAGAGCAAGCACAGTTTACCGCTGCCTACTGCCTCG

GACTTCAAGGGGCTT ( 配列番号 1)

を含む、項目 3 5 に記載の方法。

(項目 3 9)

10

20

30

40

50

前記少なくとも 1 つの遺伝子エレメントが、

a .

【化 6 5】

CATCTCCATGGCTGTACCACCTTGTCGGGGGATGTGTACTTCTGAAC  
TTGTGTTGAATCTCATGGAGTTCAGAAGAACACATCCGCACTGACAT  
TTTGGTATCTTTCATCTGACCA ( 配列番号 2)

;

と少なくとも 8 0 %、もしくは少なくとも 8 5 %、もしくは少なくとも 9 0 %、もしくは  
少なくとも 9 5 %の同一性パーセントを有するか、または

10

b .

【化 6 6】

GGGCCTGGCTCGAGCAGGGGGCGAGGGATTCCGCTTCTTCCTGCCAT  
AGCGTGGTCCCCTCCCCTATGGCAGGCAGAAGCGGCACCTTCCCTCC  
CAATGACCGCGTCTTCGTCG ( 配列番号 3)

と少なくとも 8 0 %、もしくは少なくとも 8 5 %、もしくは少なくとも 9 0 %、もしくは  
少なくとも 9 5 %の同一性パーセントを有する

20

マイクロRNAを含む、項目 3 5 に記載の方法。

( 項目 4 0 )

前記少なくとも 1 つの遺伝子エレメントが、

a .

【化 6 7】

CATCTCCATGGCTGTACCACCTTGTCGGGGGATGTGTACTTCTGAAC  
TTGTGTTGAATCTCATGGAGTTCAGAAGAACACATCCGCACTGACAT  
TTTGGTATCTTTCATCTGACCA ( 配列番号 2)

30

; または

b .

【化 6 8】

GGGCCTGGCTCGAGCAGGGGGCGAGGGATTCCGCTTCTTCCTGCCAT  
AGCGTGGTCCCCTCCCCTATGGCAGGCAGAAGCGGCACCTTCCCTCC  
CAATGACCGCGTCTTCGTCG ( 配列番号 3)

を含む、項目 3 5 に記載の方法。

( 項目 4 1 )

40

前記マイクロRNAクラスターが、

## 【化 6 9】

AGGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCGACTGTAAACTGAGCTTGCTCTACTGT  
 GAAGCCACAGATGGGTAGAGCAAGCACAGTTTACCGCTGCCTACTGCCTCG  
 GACTTCAAGGGGCTTCCCGGGCATCTCCATGGCTGTACCACCTTGTCTGGGG  
 GATGTGTACTTCTGAACTTGTGTTGAATCTCATGGAGTTCAGAAGAACACA  
 TCCGCACTGACATTTTGGTATCTTTCATCTGACCAGCTAGCGGGCCTGGCTC  
 GAGCAGGGGGCGAGGGATTCCGCTTCTTCCTGCCATAGCGTGGTCCCCTCC  
 CCTATGGCAGGCAGAAGCGGCACCTTCCCTCCCAATGACCGCGTCTTCGTC  
 ( 配列番号 31)

10

と少なくとも 8 0 %、または少なくとも 8 5 %、または少なくとも 9 0 %、または少なくとも 9 5 %の同一性パーセントを有する配列を含む、項目 3 6 に記載の方法。

( 項目 4 2 )

前記マイクロRNAクラスターが、

## 【化 7 0】

AGGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCGACTGTAAACTGAGCTTGCTCTACTGT  
 GAAGCCACAGATGGGTAGAGCAAGCACAGTTTACCGCTGCCTACTGCCTCG  
 GACTTCAAGGGGCTTCCCGGGCATCTCCATGGCTGTACCACCTTGTCTGGGG  
 GATGTGTACTTCTGAACTTGTGTTGAATCTCATGGAGTTCAGAAGAACACA  
 TCCGCACTGACATTTTGGTATCTTTCATCTGACCAGCTAGCGGGCCTGGCTC  
 GAGCAGGGGGCGAGGGATTCCGCTTCTTCCTGCCATAGCGTGGTCCCCTCC  
 CCTATGGCAGGCAGAAGCGGCACCTTCCCTCCCAATGACCGCGTCTTCGTC  
 ( 配列番号 31)

20

を含む、項目 3 6 に記載の方法。

( 項目 4 3 )

少なくとも 1 つのコードされた遺伝子エレメントを含むレンチウイルスベクターであって、前記少なくとも 1 つのコードされた遺伝子エレメントが、ケモカイン受容体 C C R 5 の産生を阻害することができるスモールRNA、またはH I V RNA配列を標的とすることができる少なくとも 1 つのスモールRNAを含み、前記H I V RNA配列が、H I V V i f 配列、H I V T a t 配列、またはそれらのバリエーションを含む、レンチウイルスベクター。

30

( 項目 4 4 )

少なくとも 1 つのコードされた遺伝子エレメントを含むレンチウイルスベクターであって、前記少なくとも 1 つのコードされた遺伝子エレメントが、ケモカイン受容体 C C R 5 の産生を阻害することができるスモールRNA、およびH I V RNA配列を標的とすることができる少なくとも 1 つのスモールRNAを含み、前記H I V RNA配列が、H I V V i f 配列、H I V T a t 配列、またはそれらのバリエーションを含む、レンチウイルスベクター。

40

( 項目 4 5 )

前記少なくとも 1 つのコードされた遺伝子エレメントが、マイクロRNAまたはs h RNAを含む、項目 4 3 または 4 4 に記載のレンチウイルスベクター。

( 項目 4 6 )

前記少なくとも 1 つのコードされた遺伝子エレメントが、マイクロRNAクラスターを含む、項目 4 5 に記載のレンチウイルスベクター。

( 項目 4 7 )

50

前記少なくとも 1 つのコードされた遺伝子エレメントが、  
a .

【化 7 1】

AGGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCGACTGTAAACTGAGCTTGCTCT  
ACTGTGAAGCCACAGATGGGTAGAGCAAGCACAGTTTACCGCTGCC  
TACTGCCTCGGACTTCAAGGGGCTT ( 配列番号 1)

と少なくとも 8 0 %、または少なくとも 8 5 %、または少なくとも 9 0 %、または少なく  
とも 9 5 %の同一性パーセントを有するマイクロRNAを含む、項目 4 5 に記載のレンチ  
ウイルススペクター。

10

( 項目 4 8 )

前記少なくとも 1 つのコードされた遺伝子エレメントが、  
【化 7 2】

AGGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCGACTGTAAACTGAGCTTGCTCTACTGT  
GAAGCCACAGATGGGTAGAGCAAGCACAGTTTACCGCTGCCTACTGCCTCG  
GACTTCAAGGGGCTT ( 配列番号 1)

を含む、項目 4 7 に記載のレンチウイルススペクター。

20

( 項目 4 9 )

前記少なくとも 1 つのコードされた遺伝子エレメントが、  
a .

【化 7 3】

CATCTCCATGGCTGTACCACCTTGTCGGGGGATGTGTACTTCTGAAC  
TTGTGTTGAATCTCATGGAGTTCAGAAGAACACATCCGCACTGACAT  
TTTGGTATCTTTCATCTGACCA ( 配列番号 2)

と少なくとも 8 0 %、もしくは少なくとも 8 5 %、もしくは少なくとも 9 0 %、もしくは  
少なくとも 9 5 %の同一性パーセントを有するか、または

30

b .

【化 7 4】

GGGCCTGGCTCGAGCAGGGGGCGAGGGATTCCGCTTCTTCCTGCCAT  
AGCGTGGTCCCCTCCCCTATGGCAGGCAGAAGCGGCACCTTCCCTCC  
CAATGACCGCGTCTTCGTCG ( 配列番号 3)

と少なくとも 8 0 %、もしくは少なくとも 8 5 %、もしくは少なくとも 9 0 %、もしくは  
少なくとも 9 5 %の同一性パーセントを有する  
マイクロRNAを含む、項目 4 5 に記載のレンチウイルススペクター。

40

( 項目 5 0 )

前記少なくとも 1 つのコードされた遺伝子エレメントが、  
a .

【化 7 5】

CATCTCCATGGCTGTACCACCTTGTCGGGGGATGTGTACTTCTGAAC  
TTGTGTTGAATCTCATGGAGTTCAGAAGAACACATCCGCACTGACAT  
TTTGGTATCTTTCATCTGACCA ( 配列番号 2)

50



；または

b .

【化 7 6】

GGGCCTGGCTCGAGCAGGGGGCGAGGGATTCCGCTTCTTCCTGCCAT  
AGCGTGGTCCCCCTCCCCTATGGCAGGCAGAAGCGGCACCTTCCCTCC  
CAATGACCGCGTCTTCGTCG ( 配列番号 3)

を含む、項目 4 5 に記載のレンチウイルスベクター。

( 項目 5 1 )

前記マイクロRNAクラスターが、

【化 7 7】

AGGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCGACTGTAAACTGAGCTTGCTCTACTGT  
GAAGCCACAGATGGGTAGAGCAAGCACAGTTTACCGCTGCCTACTGCCTCG  
GACTTCAAGGGGCTTCCCGGGCATCTCCATGGCTGTACCACCTTGTCGGGG  
GATGTGTACTTCTGAACTTGTGTTGAATCTCATGGAGTTCAGAAGAACACA  
TCCGCACTGACATTTTGGTATCTTTCATCTGACCAGCTAGCGGGCCTGGCTC  
GAGCAGGGGGCGAGGGATTCCGCTTCTTCCTGCCATAGCGTGGTCCCCTCC  
CCTATGGCAGGCAGAAGCGGCACCTTCCCTCCCAATGACCGCGTCTTCGTC  
( 配列番号 31)

と少なくとも 8 0 %、または少なくとも 8 5 %、または少なくとも 9 0 %、または少なくとも 9 5 % の同一性パーセントを有する配列を含む、項目 4 6 に記載のレンチウイルスベクター。

( 項目 5 2 )

前記マイクロRNAクラスターが、

【化 7 8】

AGGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCGACTGTAAACTGAGCTTGCTCTACTGT  
GAAGCCACAGATGGGTAGAGCAAGCACAGTTTACCGCTGCCTACTGCCTCG  
GACTTCAAGGGGCTTCCCGGGCATCTCCATGGCTGTACCACCTTGTCGGGG  
GATGTGTACTTCTGAACTTGTGTTGAATCTCATGGAGTTCAGAAGAACACA  
TCCGCACTGACATTTTGGTATCTTTCATCTGACCAGCTAGCGGGCCTGGCTC  
GAGCAGGGGGCGAGGGATTCCGCTTCTTCCTGCCATAGCGTGGTCCCCTCC  
CCTATGGCAGGCAGAAGCGGCACCTTCCCTCCCAATGACCGCGTCTTCGTC  
( 配列番号 31)

を含む、項目 4 6 に記載のレンチウイルスベクター。

( 項目 5 3 )

レンチウイルス粒子を発現するためのレンチウイルスベクターシステムであって、

a . 項目 4 3 から 5 2 のいずれか一項に記載のレンチウイルスベクター；

b . 細胞への感染が最適化されているエンベロープタンパク質を発現するためのエンベローププラスミド；ならびに

c . g a g、p o l、および r e v 遺伝子を発現するための少なくとも 1 つのヘルパープラスミド

を含み、前記レンチウイルスベクター、前記エンベローププラスミド、および前記少なくとも 1 つのヘルパープラスミドがパッケージング細胞株にトランスフェクトされると、前

10

20

30

40

50

記パッケージング細胞株によってレンチウイルス粒子が産生され、前記レンチウイルス粒子が、ケモカイン受容体 CCR5 の産生を阻害することができるかまたは HIV RNA 配列を標的とすることができる、レンチウイルスベクターシステム。

(項目 54)

前記 gag および pol 遺伝子を発現するための第 1 のヘルパープラスミド、ならびに前記 rev 遺伝子を発現するための第 2 のプラスミドを含む、項目 53 に記載のレンチウイルスベクターシステム。

(項目 55)

細胞に感染することができるレンチウイルス粒子であって、細胞への感染が最適化されたエンベロープタンパク質、および項目 43 から 52 のいずれか一項に記載のレンチウイルスベクターを含むレンチウイルス粒子。

10

(項目 56)

前記エンベロープタンパク質が、T 細胞への感染のために最適化されている、項目 55 に記載のレンチウイルス粒子。

(項目 57)

前記エンベロープタンパク質が、CD4 + T 細胞への感染のために最適化されている、項目 56 に記載のレンチウイルス粒子。

(項目 58)

CD4 + T 細胞を含む改変細胞であって、前記 CD4 + T 細胞が、項目 55 から 57 のいずれか一項に記載のレンチウイルス粒子に感染している、改変細胞。

20

(項目 59)

前記 CD4 + T 細胞が、HIV 抗原もまた認識する、項目 58 に記載の改変細胞。

(項目 60)

前記 HIV 抗原が、gag 抗原を含む、項目 59 に記載の改変細胞。

(項目 61)

前記 CD4 + T 細胞が、前記レンチウイルス粒子による感染後に、減少したレベルの CCR5 を発現する、項目 58 に記載の改変細胞。

(項目 62)

治療処置のために対象を選択する方法であって、

(a) 前記対象から白血球を取り出し、末梢血単核細胞 (PBMC) を精製し、前記 PBMC に関連する少なくとも 1 つの因子に関連する第 1 の定量化可能な測定値を決定するステップ；および

30

(b) ex vivo において、前記 PBMC を、治療有効量の第 2 の刺激性作用剤と接触させ、前記 PBMC に関連する前記少なくとも 1 つの因子に関連する第 2 の測定値を決定するステップ

を含み、前記第 2 の定量化可能な測定値が、前記第 1 の定量化可能な測定値よりも高い場合、前記対象が、前記処置レジメンのために選択される、方法。

(項目 63)

前記 PBMC に関連する前記少なくとも 1 つの因子が T 細胞増殖である、項目 62 に記載の方法。

40

(項目 64)

前記少なくとも 1 つの因子が IFN ガンマ産生である、項目 62 に記載の方法。

(項目 65)

前記 PBMC から細胞の少なくとも 1 つのサブセットを枯渇させるステップをさらに含み、細胞の前記少なくとも 1 つのサブセットが、CD8 + T 細胞、細胞、NK 細胞、B 細胞、好中球、好塩基球、好酸球、調節性 T 細胞、NKT 細胞、および赤血球の任意の 1 つまたは複数を含む、項目 1 に記載の方法。

(項目 66)

前記枯渇させるステップが、白血球を取り出した後に行われる、項目 65 に記載の方法。

(項目 67)

50

前記枯渇させるステップが、白血球を取り出すのと同様に行われる、項目 6 5 に記載の方法。

( 項目 6 8 )

前記 P B M C から細胞の少なくとも 1 つのサブセットを枯渇させるステップをさらに含み、細胞の前記少なくとも 1 つのサブセットが、C D 8 + T 細胞、細胞、N K 細胞、B 細胞、好中球、好塩基球、好酸球、調節性 T 細胞、N K T 細胞、および赤血球の任意の 1 つまたは複数を含む、項目 2 2 に記載の方法。

( 項目 6 9 )

前記枯渇させるステップが、前記白血球を取り出した後に行われる、項目 6 8 に記載の方法。

( 項目 7 0 )

前記枯渇させるステップが、前記白血球を取り出すのと同様に行われる、項目 6 8 に記載の方法。

( 項目 7 1 )

前記 P B M C から細胞の少なくとも 1 つのサブセットを枯渇させるステップをさらに含み、細胞の前記少なくとも 1 つのサブセットが、C D 8 + T 細胞、細胞、N K 細胞、B 細胞、好中球、好塩基球、好酸球、調節性 T 細胞、N K T 細胞、および赤血球の任意の 1 つまたは複数を含む、項目 6 2 に記載の方法。

( 項目 7 2 )

前記枯渇させるステップが、前記白血球を取り出した後に行われる、項目 7 1 に記載の方法。

( 項目 7 3 )

前記枯渇させるステップが、前記白血球を取り出すのと同様に行われる、項目 7 1 に記載の方法。

【 図面 】

【 図 1 】

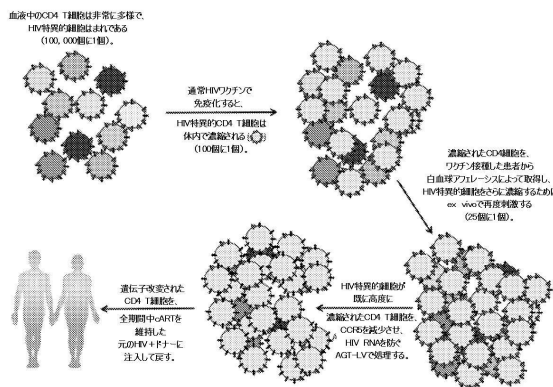


Figure 1

【 図 2 】

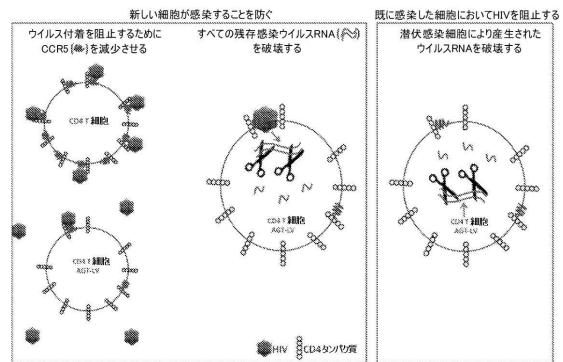


Figure 2

10

20

30

40

50

【図 3】

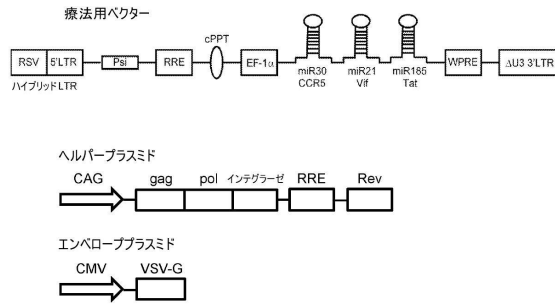


Figure 3

【図 4】

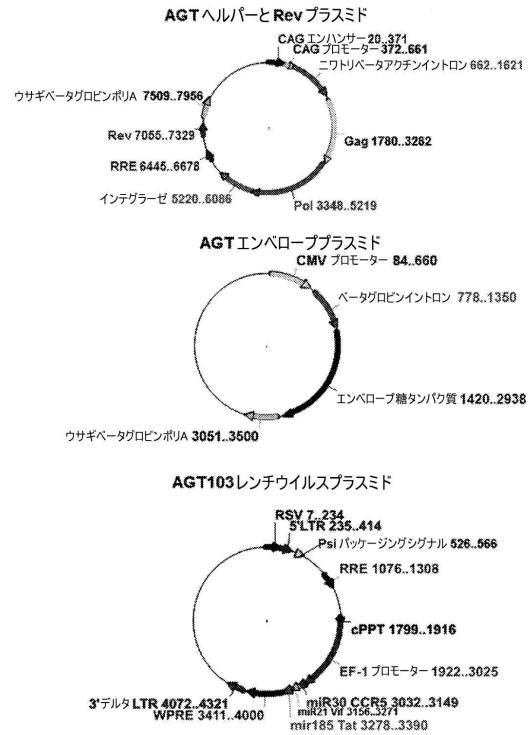


Figure 4

【図 5】

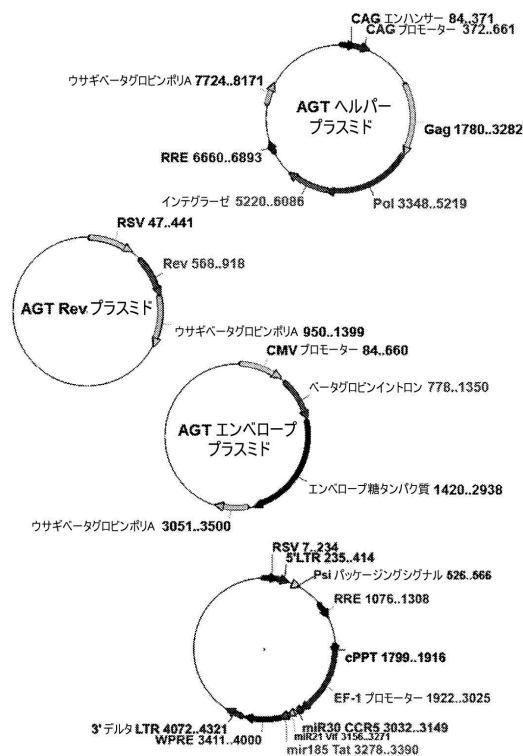


Figure 5

【図 6】

伸長因子-1 アルファ(EF1-アルファ) プロモーター (配列番号105)

```
CCGGTGCTAGAGAAGGTGGCGGGGTAAGTGGGAAAGTGTGCTGCTACTGGCTCGGCTT
TTTCCCGAGGGTGGGGGAGAACCGTATATAAGTGCAGTAGTCGCCGTGAACGCTCTTTTCGCAA
CGGGTTTCCCGCAGAACACAGGTAAGTGCCTGTGTGGTTCCCGCGGGCCTGGCCTCTTACGG
GTTATGGCCCTTGCCTGCTGAATTACTTCCACGCCCTTGGCTGCAGTACGTGATCTTGTATCC
CGAGCTTCGGTTGGAAGTGGGTGGGAGAGTTCGAGGCTTGGCTTAAGGAGCCCTTCGCCTC
GTGCTTGAGTTGAGGCTTGGCTTGGGCTGGGCGCGCGCTGCGCAATCGTGGCACCTTCGC
GCCTTCTGCTGCTTTCGATAAGTCTTAGCCATTAAATTTTGTATGACCTGCTGGCACGCT
TTTTTCTGGCAAGATAGTCTTGTAAATCGGGCCAAAGATCGCACACTGCTATTCGGTTTTTG
GGCCCGCGGGCGGCGAGCGGGCCGCTGCTGCCAGCGCACATGTTCCGCGAGGCGGGGCTGCGA
CGCGCGCCAGGAGATCGGACGGGGTAGTCTCAAGCTGGCGGCTGCTGCTGCTGGCTGGCT
CGCGCCCGCTGTATCGCCCGCGCTGGCGGGCAAGGCTGGCCCGCTCGGACACAGTTGCTGAG
CGGAAAGATGGCGCTTCCCGGCTGCTGAGGAGGCTCAAAATGGAGACCGGCGCTCGGA
GAGCGGGCGGGTGAATCACACACAAAGGAAAGGGCTTCCGCTCAGCCGCTCGCTTCAATG
TGACTCCAGGAGTACCGGCGCGCTGAGGCACTCGATAGTCTGAGCTTTGGAGTACGT
CGTCTTAGTTGGGGGAGGGTTTTATGCGATGGAGTTCCCGCACACTGAGTGGGTGGAGACT
GAAGTTAGGCGAGCTTGGCACTTGTATTAATTCCTTGAATTTGCCCTTTTGAAGTTGGATC
TTGGTTCAATCTCAAGCTCAGACAGTGGTTCAAAGTTTTTCTTCCATTTCAAGTTCGCTGAT
GTACA
```

miR30 CCR5 (配列番号1)

```
AGGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCGACTGTAAGTGAAGCTTGTCTACTGTGAAGCCACAGATG
GGTAGAGCAAGCACAGTTTACCGCTGCTACTGCTCGGACTTCAAGGGGCTT
```

miR21 Vif (配列番号106)

```
CCCGGGCATCTCCATGGCTGTACCACTTGTGGGGGATGTGTAATCTGAAGTGTGTTGAATC
TCATGGAGTTGAGAAGACACATCCGACTGACATTTGGTATCTTTCACTGACCA
```

miR185 Tat (配列番号107;配列番号108(下線部分))

```
GCTAGCGGCTTGCCTCGAGCAAGGGGCGAGGGATTCCGCTTCTTCCTGCATAGCGTGGTCCCG
TCCCTATGGCAGGCAAGCGGACCTTCCCTCCCAATGACCGGCTTCTGCT
```

Figure 6

10

20

30

40

50

【図 7】

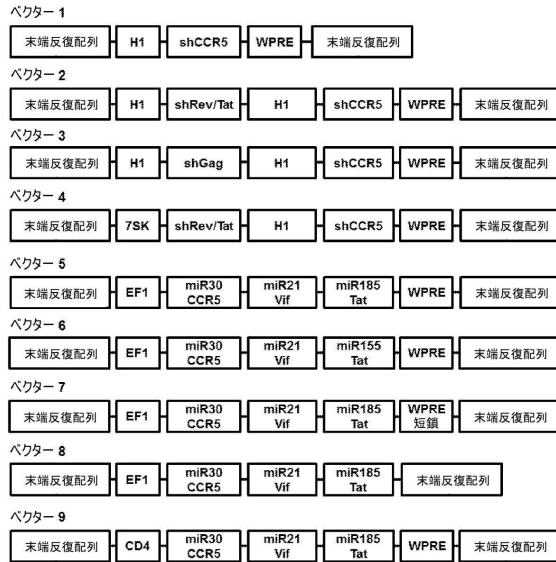


Figure 7

【図 8】

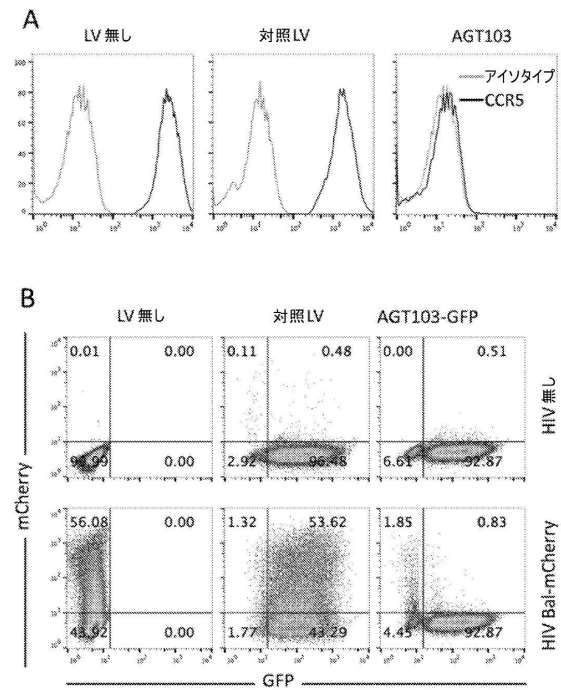
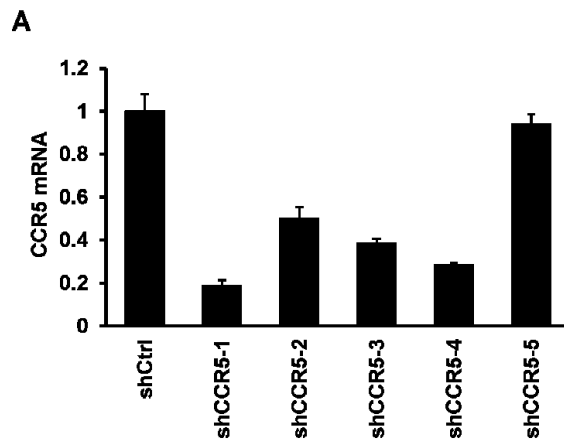
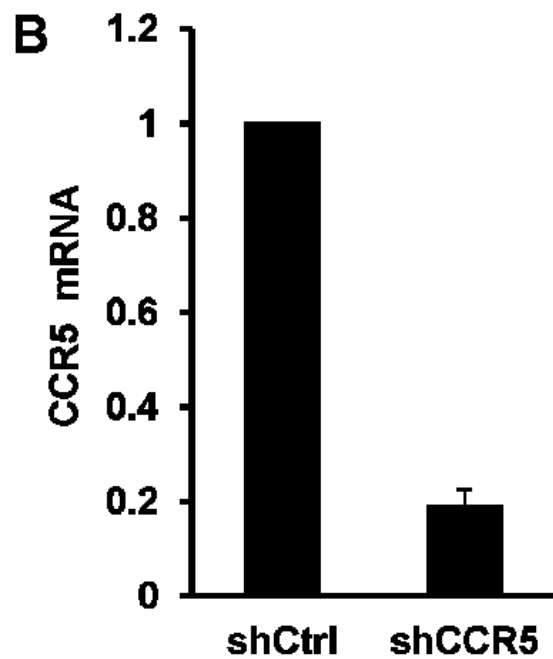


Figure 8

【図 9 A】



【図 9 B】



10

20

30

40

50

【図 10】

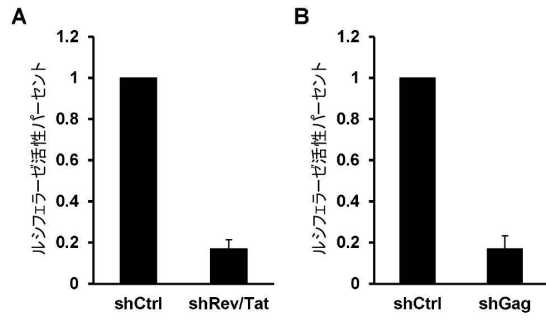


Figure 10

【図 11】

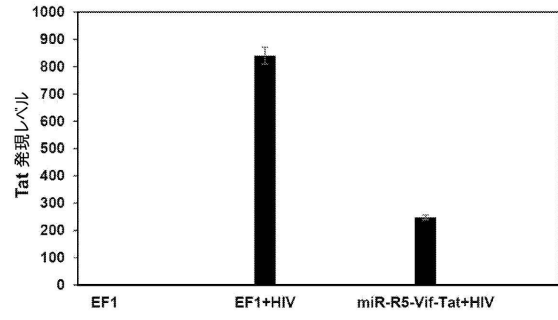


Figure 11

【図 12】

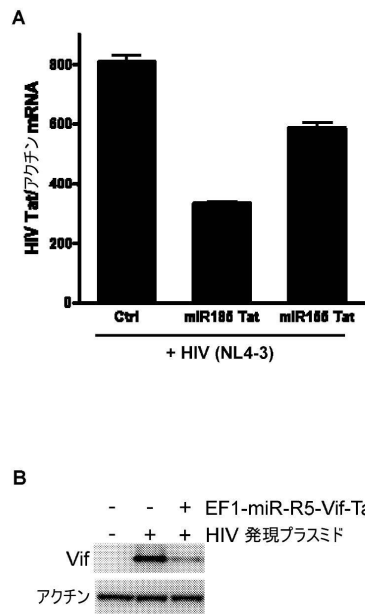


Figure 12

【図 13】

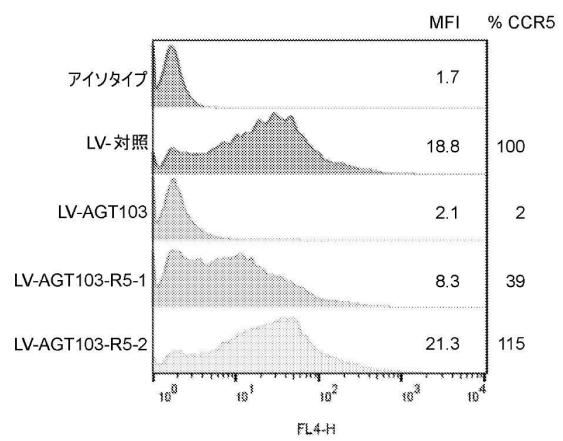


Figure 13

10

20

30

40

50

【図 14】

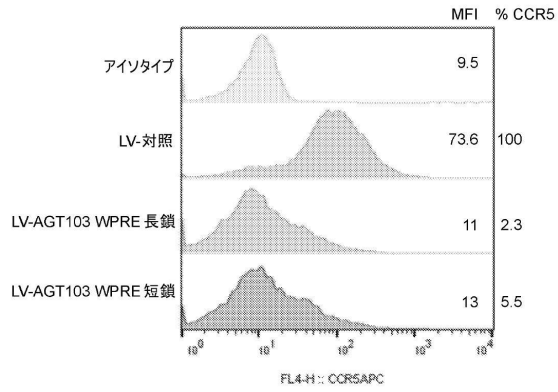


Figure 14

【図 15】

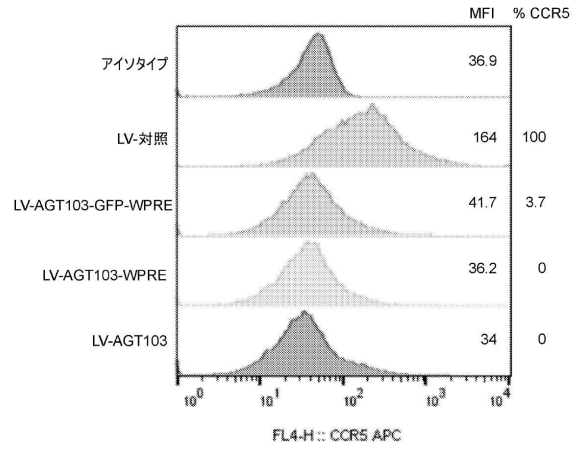


Figure 15

【図 16】

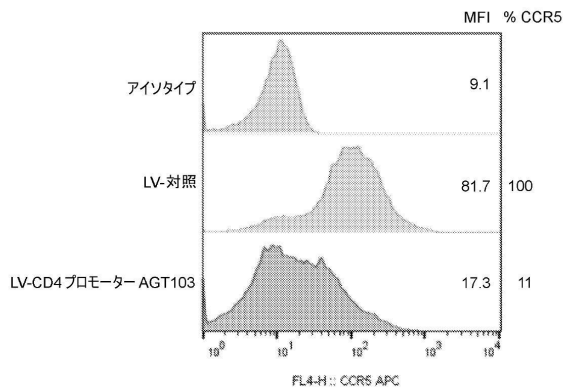


Figure 16

【図 17】

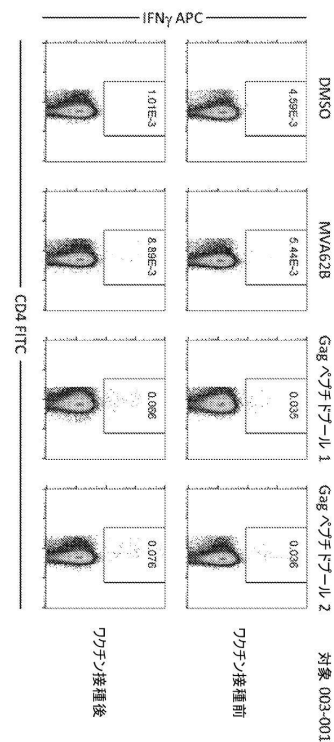


Figure 17

10

20

30

40

50

【図 18】

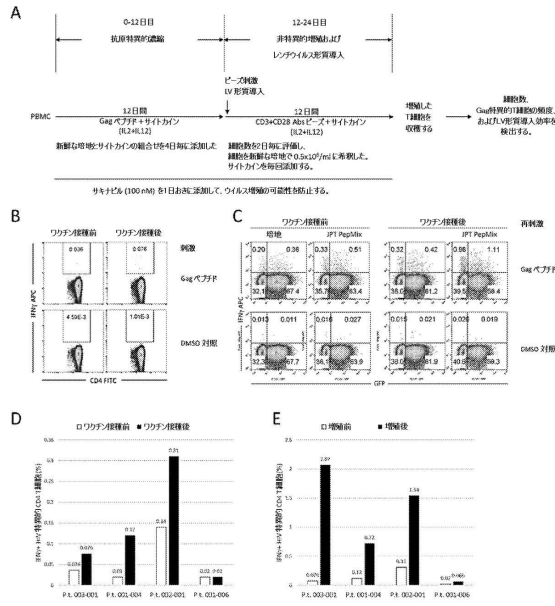


Figure 18

【図 19】

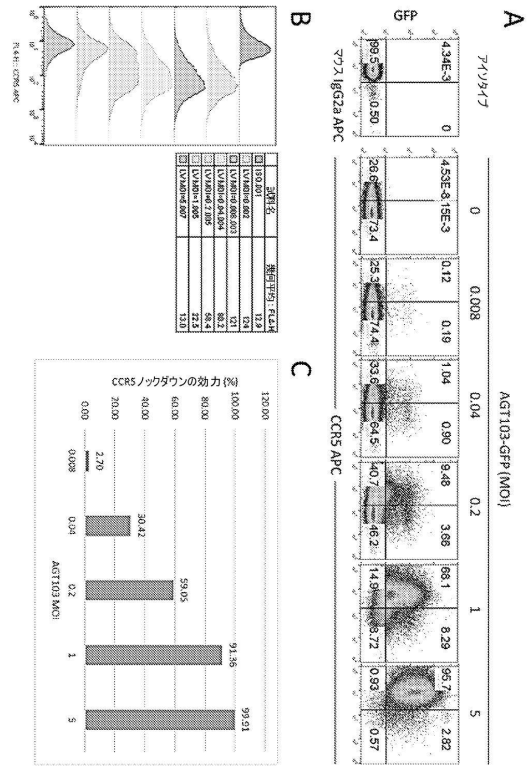


Figure 19

【図 20】

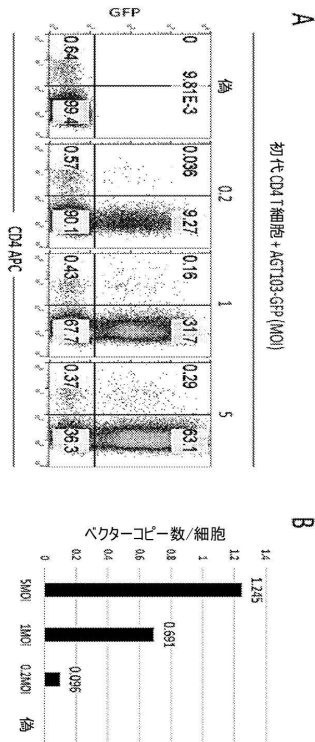


Figure 20

【図 21】

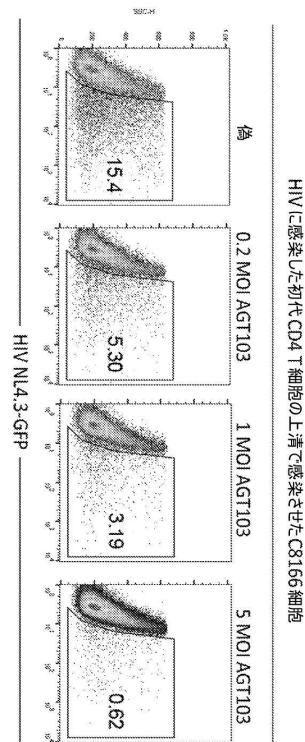


Figure 21

10

20

30

40

50



【図 22】

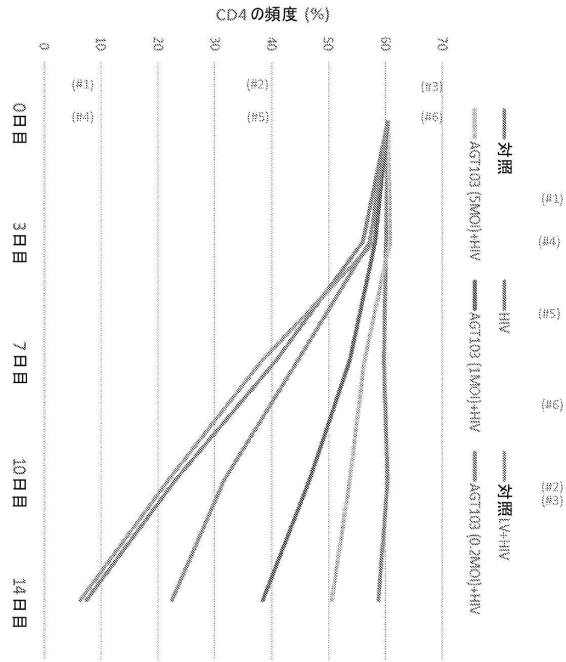


Figure 22

【図 23 - 1】

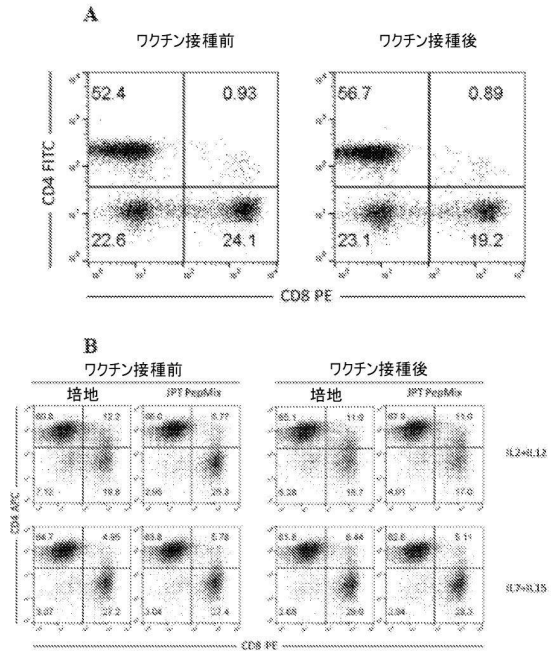


Figure 23

【図 23 - 2】

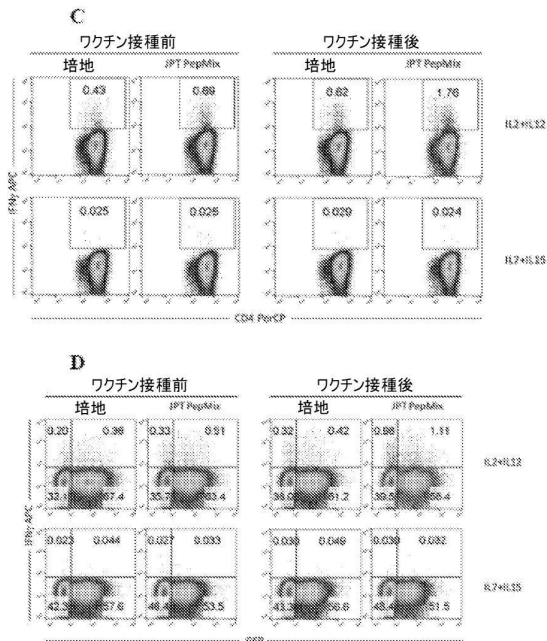


Figure 23 続き

【図 24】

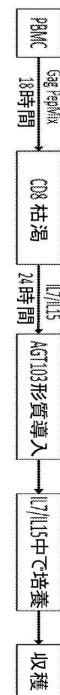


Figure 24

10

20

30

40

50

【図 25 - 1】

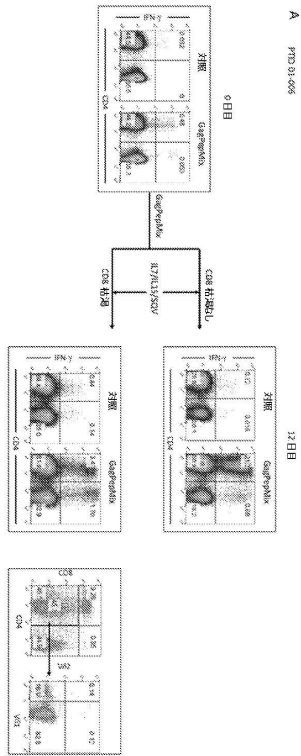


Figure 25

【図 25 - 2】

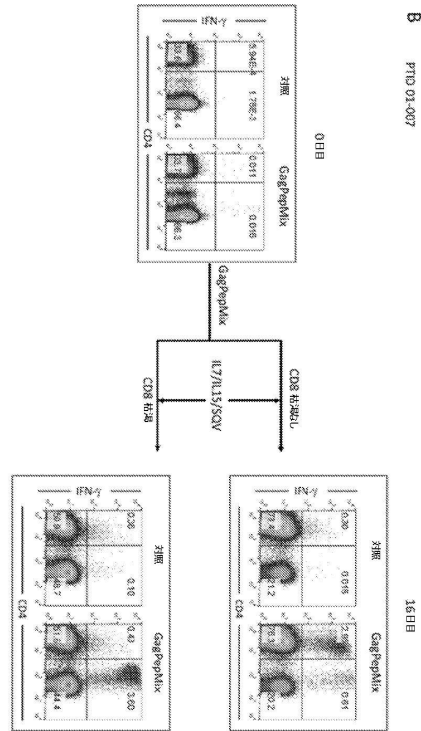


Figure 25 続き

【図 25 - 3】

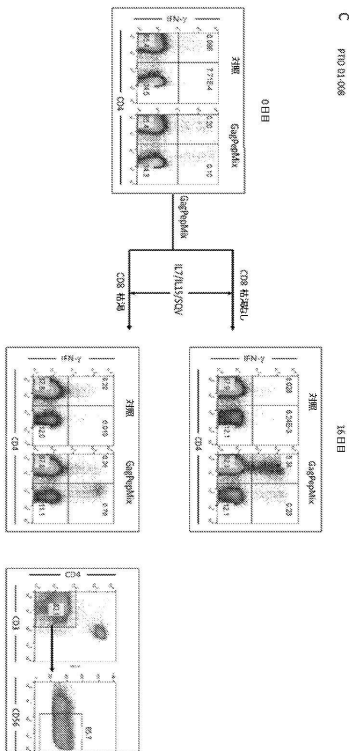


Figure 25 続き

【図 26】

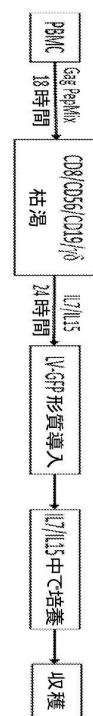


Figure 26

10

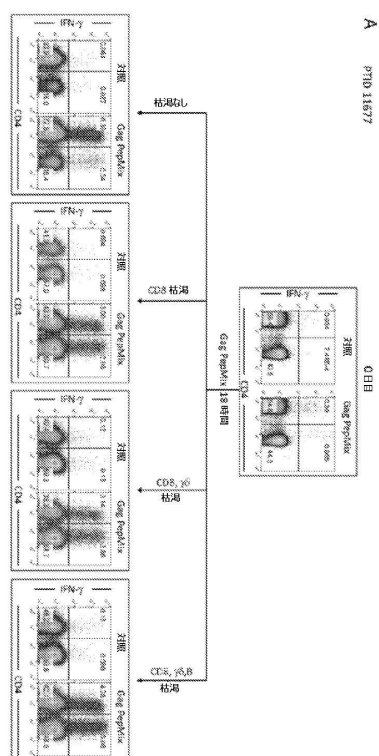
20

30

40

50

【 図 2 7 - 1 】



**Figure 27**

【图 27-2】

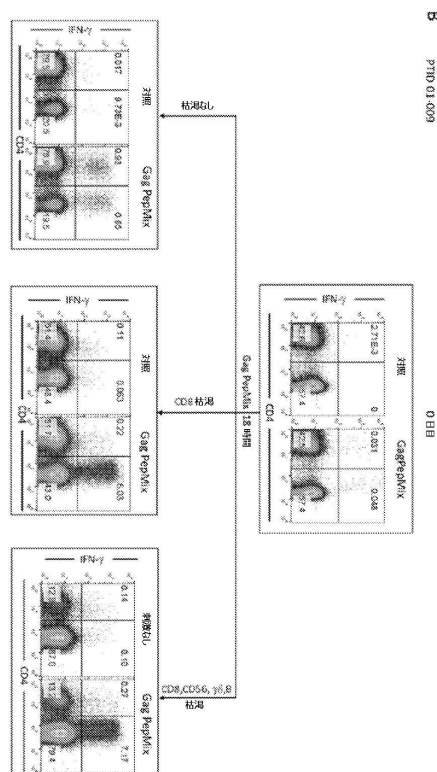
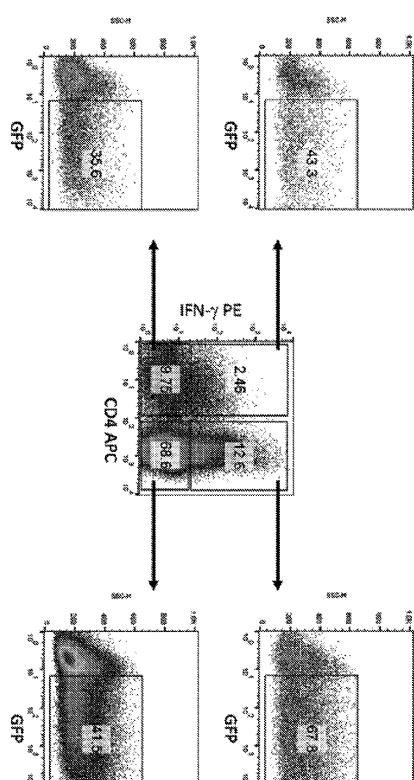


Figure 27 続き

【圖 28】



**Figure 28**

【圖 29】

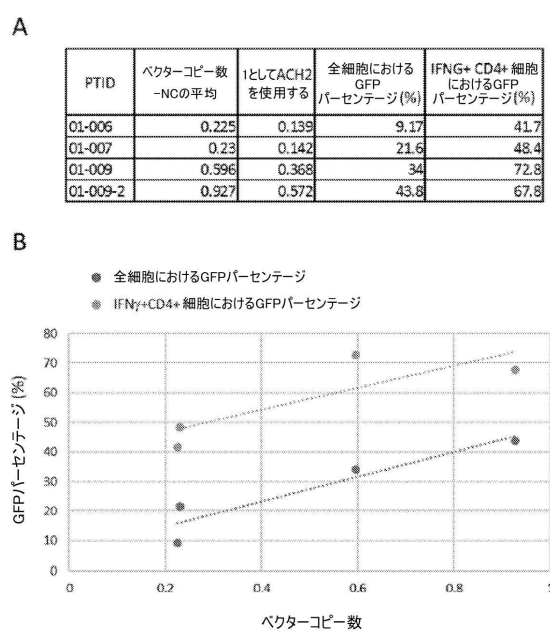


Figure 29

【配列表】

0007260170000001.app

10

20

30

40

50

## フロントページの続き

## (51)国際特許分類

F I

A 6 1 K 35/15 (2015.01)

C 1 2 N 5/078

Z N A

A 6 1 K 35/17 (2015.01)

A 6 1 K 35/15

A 6 1 P 31/18 (2006.01)

A 6 1 K 35/17

A 6 1 P 31/18

弁護士 山本 健策

(72)発明者 リ, ハイシャン

アメリカ合衆国 メリーランド 2 0 8 5 0 , ロックビル, メディカル センター ドライブ 9 6 4 0

(72)発明者 ラフーゼン, テイラー

アメリカ合衆国 メリーランド 2 0 8 5 0 , ロックビル, メディカル センター ドライブ 9 6 4 0

(72)発明者 シャオ, リンジ

アメリカ合衆国 メリーランド 2 0 8 5 0 , ロックビル, メディカル センター ドライブ 9 6 4 0

(72)発明者 パウザ, チャールズ デイビッド

アメリカ合衆国 メリーランド 2 0 8 5 0 , ロックビル, メディカル センター ドライブ 9 6 4 0

審査官 西 賢二

(56)参考文献 特表 2 0 1 2 - 5 3 3 2 9 9 ( J P , A )

国際公開第 2 0 1 0 / 1 2 7 1 6 6 ( W O , A 2 )

国際公開第 2 0 1 6 / 0 6 1 2 3 2 ( W O , A 2 )

Molecular Therapy , Vol. 23 , 2015年 , pp. 310-320, Supplementary materials

AIDS Res Hum Retroviruses , 2000年 , Vol. 16, No. 3 , pp. 259-271

CLINICAL AND VACCINE IMMUNOLOGY , 2007年 , Vol. 14, No. 9 , pp. 1196-1202

The Journal of Infectious Diseases , 2014年 , Vol. 210 , pp. 99-110

(58)調査した分野 (Int.Cl. , D B 名)

C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 1 5 / 9 0

C 1 2 N 1 / 0 0 - 7 / 0 8

A 6 1 K 3 5 / 0 0 - 3 5 / 7 6 8

C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S ( S T N )

G e n B a n k / E M B L / D D B J / G e n e S e q