

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6971492号  
(P6971492)

(45) 発行日 令和3年11月24日(2021.11.24)

(24) 登録日 令和3年11月5日(2021.11.5)

(51) Int.Cl.		F I	
<b>C 1 2 N</b>	<b>15/113</b>	<b>(2010.01)</b>	C 1 2 N 15/113 1 4 O Z
<b>A 6 1 K</b>	<b>31/7105</b>	<b>(2006.01)</b>	A 6 1 K 31/7105
<b>A 6 1 K</b>	<b>35/76</b>	<b>(2015.01)</b>	A 6 1 K 35/76
<b>A 6 1 K</b>	<b>39/21</b>	<b>(2006.01)</b>	A 6 1 K 39/21
<b>A 6 1 K</b>	<b>45/00</b>	<b>(2006.01)</b>	A 6 1 K 45/00

請求項の数 27 (全 153 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2019-500475 (P2019-500475)
(86) (22) 出願日	平成29年1月11日 (2017.1.11)
(65) 公表番号	特表2019-527055 (P2019-527055A)
(43) 公表日	令和1年9月26日 (2019.9.26)
(86) 国際出願番号	PCT/US2017/013019
(87) 国際公開番号	W02018/009246
(87) 国際公開日	平成30年1月11日 (2018.1.11)
審査請求日	令和2年1月7日 (2020.1.7)
(31) 優先権主張番号	62/385,864
(32) 優先日	平成28年9月9日 (2016.9.9)
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)
(31) 優先権主張番号	62/409,270
(32) 優先日	平成28年10月17日 (2016.10.17)
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)

(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

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 HIV予備免疫化および免疫療法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

コードされたマイクロRNAクラスターを含むレンチウイルスベクターであって、前記コードされたマイクロRNAクラスターは、配列番号31と少なくとも90%の配列同一性を有する配列を含み、前記コードされたマイクロRNAクラスターは、ケモカイン受容体CCR5の産生を阻害することができ、かつHIV Vif配列およびHIV Tat配列をターゲティングすることができる、レンチウイルスベクター。

【請求項2】

前記コードされたマイクロRNAクラスターは、配列番号31と少なくとも95%の配列同一性を有する配列を含む、請求項1に記載のレンチウイルスベクター。

【請求項3】

パッケージング細胞によって生成され、かつ標的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、

a. 前記標的細胞に感染することができるエンベロープタンパク質；および

b. 配列番号31と少なくとも90%の配列同一性を有する配列を含むコードされたマイクロRNAクラスター

を含み、前記コードされたマイクロRNAクラスターは、ケモカイン受容体CCR5の産生を阻害することができ、かつHIV Vif配列およびHIV Tat配列をターゲティングすることができる、レンチウイルス粒子。

【請求項4】

前記コードされたマイクロRNAクラスターは、配列番号31と少なくとも95%の配列同一性を有する配列を含む、請求項3に記載のレンチウイルス粒子。

【請求項5】

前記標的細胞が、CD4+T細胞である、請求項3に記載のレンチウイルス粒子。

【請求項6】

レンチウイルス粒子に感染した初代T細胞を含む改変細胞であって、前記レンチウイルス粒子は、

a. 前記標的細胞に感染することができるエンベロープタンパク質；および

b. 配列番号31と少なくとも90%の配列同一性を有する配列を含むコードされたマイクロRNAクラスター

を含み、前記コードされたマイクロRNAクラスターは、ケモカイン受容体CCR5の産生を阻害することができ、かつHIV Vif配列およびHIV Tat配列をターゲティングすることができる、改変細胞。

【請求項7】

前記コードされたマイクロRNAクラスターは、配列番号31と少なくとも95%の配列同一性を有する配列を含む、請求項6に記載の改変細胞。

【請求項8】

前記初代T細胞が、初代CD4+T細胞である、請求項6に記載の改変細胞。

【請求項9】

形質導入された末梢血単核細胞(PBMC)をex vivoで産生する方法であって

a. ex vivoで行われる、HIVに感染した被験体から単離されたPBMCを、ex vivo刺激剤と接触させてHIV特異的CD4T細胞の画分を高めるステップと

b. 前記PBMCを、ex vivoでレンチウイルス粒子によって形質導入するステップであって、ここで、前記レンチウイルス粒子は、

i. 前記PBMCに感染することができるエンベロープタンパク質；および

ii. 配列番号31と少なくとも90%の配列同一性を有する配列を含むコードされたマイクロRNAクラスター

を含み、前記コードされたマイクロRNAクラスターは、ケモカイン受容体CCR5の産生を阻害することができ、かつHIV Vif配列およびHIV Tat配列をターゲティングすることができる、ステップと、

c. 少なくとも約1日間にわたって、形質導入された前記PBMCを培養するステップとを含む、方法。

【請求項10】

前記コードされたマイクロRNAクラスターは、配列番号31と少なくとも95%の配列同一性を有する配列を含む、請求項9に記載の方法。

【請求項11】

請求項9に記載の方法によって産生された形質導入されたPBMCを含む組成物であって、前記組成物が、被験体に注入されることを特徴とする、組成物。

【請求項12】

前記PBMCからHIV特異的CD4+T細胞を陽性選択するステップをさらに含む、請求項9に記載の方法。

【請求項13】

コードされたマイクロRNAクラスターを含むレンチウイルスベクターであって、前記コードされたマイクロRNAクラスターは、(i)配列番号1と少なくとも90%の配列同一性、(ii)配列番号2と少なくとも90%の配列同一性、および(iii)配列番号108と少なくとも90%の配列同一性を有する配列を含み、前記コードされたマイクロRNAクラスターは、ケモカイン受容体CCR5の産生を阻害することができ、かつHIV Vif配列およびHIV Tat配列をターゲティングすることができる、レンチウ

10

20

30

40

50

イルスベクター。

【請求項 1 4】

前記コードされたマイクロRNAクラスターは、(i)配列番号1と少なくとも95%の配列同一性、(ii)配列番号2と少なくとも95%の配列同一性、または(iii)配列番号108と少なくとも95%の配列同一性を含む配列を含む、請求項13に記載のレンチウイルスベクター。

【請求項 1 5】

前記コードされたマイクロRNAクラスターは、配列番号1、配列番号2、または配列番号108を含む配列を含む、請求項13に記載のレンチウイルスベクター。

【請求項 1 6】

標的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、

a. 前記標的細胞に感染することができるエンベロープタンパク質；および

b. (i)配列番号1と少なくとも90%の配列同一性、(ii)配列番号2と少なくとも90%の配列同一性、および(iii)配列番号108と少なくとも90%の配列同一性を含む配列を含むコードされたマイクロRNAクラスター

を含み、前記コードされたマイクロRNAクラスターは、ケモカイン受容体CCR5の産生を阻害することができ、かつHIV Vif配列およびHIV Tat配列をターゲティングすることができる、レンチウイルス粒子。

【請求項 1 7】

前記コードされたマイクロRNAクラスターは、(i)配列番号1と少なくとも95%の配列同一性、(ii)配列番号2と少なくとも95%の配列同一性、または(iii)配列番号108と少なくとも95%の配列同一性を含む配列を含む、請求項16に記載のレンチウイルス粒子。

【請求項 1 8】

前記コードされたマイクロRNAクラスターは、配列番号1、配列番号2、または配列番号108を含む配列を含む、請求項16に記載のレンチウイルス粒子。

【請求項 1 9】

前記標的細胞が、CD4+T細胞である、請求項16に記載のレンチウイルス粒子。

【請求項 2 0】

レンチウイルス粒子に感染した初代T細胞を含む改変細胞であって、前記レンチウイルス粒子は、

a. 前記標的細胞に感染することができるエンベロープタンパク質；および

b. (i)配列番号1と少なくとも90%の配列同一性、(ii)配列番号2と少なくとも90%の配列同一性、および(iii)配列番号108と少なくとも90%の配列同一性を含む配列を含むコードされたマイクロRNAクラスター

を含み、前記コードされたマイクロRNAクラスターは、ケモカイン受容体CCR5の産生を阻害することができ、かつHIV Vif配列およびHIV Tat配列をターゲティングすることができる、改変細胞。

【請求項 2 1】

前記コードされたマイクロRNAクラスターは、(i)配列番号1と少なくとも95%の配列同一性、(ii)配列番号2と少なくとも95%の配列同一性、または(iii)配列番号108と少なくとも95%の配列同一性を含む配列を含む、請求項20に記載の改変細胞。

【請求項 2 2】

前記コードされたマイクロRNAクラスターは、配列番号1、配列番号2、または配列番号108を含む配列を含む、請求項20に記載の改変細胞。

【請求項 2 3】

末梢血単核細胞(PBMC)をex vivoで産生する方法であって、

a. ex vivoで行われる、HIVに感染した被験体から単離されたPBMCを、ex vivo刺激剤と接触させてHIV特異的CD4T細胞の画分を高めるステップと

10

20

30

40

50

b. 前記PBM Cを、*ex vivo*でレンチウイルス粒子によって形質導入するステップであって、ここで、前記レンチウイルス粒子は、

i. 前記PBM Cに感染することができるエンベロープタンパク質；および

ii. (i) 配列番号1と少なくとも90%の配列同一性、(ii) 配列番号2と少なくとも90%の配列同一性、および(iii) 配列番号108と少なくとも90%の配列同一性を含む配列を含むコードされたマイクロRNAクラスター

を含み、前記コードされたマイクロRNAクラスターは、ケモカイン受容体CCR5の産生を阻害することができ、かつHIV *Vif* 配列およびHIV *Tat* 配列をターゲティングすることができる、ステップとを含む、方法。

10

【請求項24】

前記コードされたマイクロRNAクラスターは、(i) 配列番号1と少なくとも95%の配列同一性、(ii) 配列番号2と少なくとも95%の配列同一性、または(iii) 配列番号108と少なくとも95%の配列同一性を含む配列を含む、請求項23に記載の方法。

【請求項25】

前記コードされたマイクロRNAクラスターは、配列番号1、配列番号2、または配列番号108を含む配列を含む、請求項23に記載の方法。

【請求項26】

請求項23に記載の方法によって産生された形質導入されたPBM Cを含む組成物であって、前記組成物が、被験体に注入されることを特徴とする、組成物。

20

【請求項27】

前記PBM CからHIV特異的CD4+T細胞を陽性選択するステップをさらに含む、請求項23に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願への相互参照

この出願は、「HIV PRE-IMMUNIZATION AND IMMUNOTHERAPY」との表題の2016年7月8日に出願された米国仮特許出願第62/360,185号、「HIV PRE-IMMUNIZATION AND IMMUNOTHERAPY」との表題の2016年9月9日に出願された米国仮特許出願第62/385,864号、および「HIV PRE-IMMUNIZATION AND IMMUNOTHERAPY」との表題の2016年10月17日に出願された米国仮特許出願第62/409,270号(これらの開示は、参考として本明細書に援用される)に対する優先権を主張する。

30

【0002】

本発明は、概して、HIVの処置および防止のための免疫化および免疫療法の分野に関する。特に、開示されている処置および防止方法は、遺伝子送達および他の治療、診断、または研究上の使用のためのウイルスベクターおよび系の投与に関する。

40

【背景技術】

【0003】

抗レトロウイルス薬併用療法(Combination antiretroviral therapy)(cART)(高活性抗レトロウイルス薬療法(Highly Active Antiretroviral Therapy)またはHAARTとしても公知)は、HIV-1の複製を制限し、疾患進行を遅らせるが、薬物の毒性および薬物耐性ウイルスの出現が、HIV感染者の長期制御における課題である。さらに、伝統的な抗レトロウイルス薬療法は、AIDS発症または死の遅延には成功しているものの、機能的治癒をもたらすには至っていない。代替的な処置戦略が必要である。

50

## 【0004】

免疫系がHIV複製の制限において通常は不十分であるとはいえ主要な役割を果たすことを示すデータの出現により、HIV感染のための免疫療法には強い関心が寄せられている。細胞溶解性T細胞(CTL)の機能の維持に重要であるウイルス特異的Tヘルパー細胞が一定の役割を果たしている可能性が高い。ウイルス血症も中和抗体に影響されるが、これらは概してHIV感染における重要性が低く、*in vivo*で進化するウイルスバリエーションに後れを取る。

## 【0005】

まとめると、このデータは、HIV特異的細胞性免疫応答の強度および幅の増加は、いわゆるHIV免疫療法による臨床的有用性を有し得ることを示す。いくつかの研究においてHIVに対するワクチンが試験されたが、今日まで十分な成功を収めていない。さらに、遺伝子療法技術を利用することによるHIV免疫療法の強化に関心が示されているが、他の免疫療法のアプローチと同じく、十分な成功を収めていない。

## 【0006】

ウイルスベクターは、特異的なウイルスエンベロープと宿主細胞受容体の相互作用および遺伝子発現についてのウイルスの機構のために、標的細胞に遺伝子を形質導入するために使用され得る。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を含む多くの異なる細胞型、ならびに胚、受精卵、単離組織試料、*in situ*の組織標的および培養細胞に遺伝子を移入するためのビヒクルとして使用されてきた。外来遺伝子または変更した遺伝子を細胞に導入し発現させる能力は、遺伝子療法、誘導多能性幹細胞の体細胞リプログラミング、および様々なタイプの免疫療法などの治療介入に有用である。

## 【0007】

遺伝子療法は、ウイルスベクターの使用を伴い得る新しい治療薬を作り出す可能性のある、生物医学研究の中で最も成熟した分野のうちの1つである。療法に利用可能な多種多様な可能性のある遺伝子を考慮すると、感染性および非感染性疾患を処置する手段としての遺伝子療法の期待に応えるためには、これらの遺伝子を送達する効率的な手段が必要である。マウスのレトロウイルス、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系が、治療用の遺伝子移入ベクターとして提唱されてきた。

## 【0008】

ウイルスベクターを開発する際には、組織向性、ウイルス調製物の安定性、発現の安定性および制御、ゲノムのパッケージング容量、ならびに構築物依存性ベクター安定性を含め、考慮しなければならない多くの要因がある。加えて、ウイルスベクターの*in vivo*での適用は、ウイルス構造タンパク質および/または形質導入された遺伝子産物に対する宿主免疫応答によって限定されることが多い。

## 【0009】

このように、毒性および安全性が、被験体の処置のためにウイルスベクターを*in vivo*で使用するために克服しなければならない主なハードルである。ヒトにおける遺伝子療法の適用においては、遺伝子送達ビヒクルまたは治療用遺伝子産物に対する宿主免疫応答に関連する問題に直面した歴史的な例が多数存在する。いくつかのウイルス遺伝子を1つまたは複数の治療用遺伝子と併せて共形質導入(*co-transduce*)するウイルスベクター(例えば、アデノウイルス)には特に問題がある。

## 【0010】

レンチウイルスベクターは概して細胞傷害を誘導せず、強力な宿主免疫応答を誘発しないものの、いくつかの免疫刺激性遺伝子産物を有するHIV-1などの一部のレンチウイルスベクターは、*in vivo*で細胞傷害をもたらし、強力な免疫応答を誘導する可能性を有する。しかしながら、形質導入後の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関しては、これは懸念事項にならない場合がある。当然ながら、これは常に当てはまるとは限らない。というのも、場合により、ベクターの目的は、臨床的に有用な免疫応答を誘起するタンパク質をコードすることであるからである。

10

20

30

40

50

## 【 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、一部の細胞傷害性ウイルスタンパク質に曝露された際の細胞変性の可能性の問題である。ある特定のHIV-1タンパク質への曝露は、T細胞の細胞死または機能的無反応性を誘導し得る。同様に、多くの場合、組換えにより複製可能な毒性ウイルスが発生する可能性が懸念される。したがって、改善されたHIV処置が依然として必要とされている。

## 【 発明の概要 】

## 【 課題を解決するための手段 】

## 【 0 0 1 2 】

一態様では、HIVに感染した細胞を処置する方法が提供される。本方法は、*ex vivo*で行われる、HIVに感染した被験体から単離された末梢血単核細胞(PBMC)を治療有効量の刺激剤と接触させるステップと、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系をPBMCに*ex vivo*で形質導入するステップと、適度な形質導入を確実にするために十分な期間にわたって、形質導入されたPBMCを培養するステップとを様々に含む。諸実施形態では、形質導入されたPBMCは約1~約35日間培養され得る。本方法は、形質導入されたPBMCを被験体に注入するステップをさらに含む。被験体はヒトであり得る。刺激剤は、被験体においてT細胞応答を刺激するのに好適な任意の薬剤を含んでよい。諸実施形態では、刺激剤は、ペプチドまたはペプチドの混合物であり、また諸実施形態では、*gag*ペプチドを含む。刺激剤はワクチンを含む場合もある。ワクチンはHIVワクチンであってよく、諸実施形態では、HIVワクチンは、MVA/HIV62Bワクチンまたはそのバリエーションである。諸実施形態では、ウイルス送達系はレンチウイルス粒子を含む。諸実施形態では、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CCR5の産生を阻害することができる低分子RNA(*small RNA*)を含む。さらなる実施形態では、少なくとも1つの遺伝子エレメントは、HIV RNA配列をターゲティングすることができる少なくとも1つの低分子RNAを含む。さらなる実施形態では、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CCR5の産生を阻害することができる低分子RNAと、HIV RNA配列をターゲティングすることができる少なくとも1つの低分子RNAとを含み得る。HIV RNA配列は、ウイルス送達系によるターゲティングに好適な任意のHIV配列を含む。諸実施形態では、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のうちの1つまたは複数を含む。少なくとも1つの遺伝子エレメントは、ウイルス送達系により発現させることができる任意の遺伝子エレメントを含む。諸実施形態では、少なくとも1つの遺伝子エレメントは、マイクロRNAまたは*shRNA*を含む。さらなる実施形態では、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。

## 【 0 0 1 3 】

別の態様では、少なくとも1つの遺伝子エレメントは、

A G G T A T A T T G C T G T T G A C A G T G A G C G A C T G T A A A C T G A G C  
T T G C T C T A C T G T G A A G C C A C A G A T G G G T A G A G C A A G C A C A  
G T T T A C C G C T G C C T A C T G C C T C G G A C T T C A A G G G G C T T (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%のパーセント同一性を有するマイクロRNAを含む。好ましい実施形態では、

A G G T A T A T T G C T G T T G A C A G T G A G C G A C T G T A A A C T G A G C  
T T G C T C T A C T G T G A A G C C A C A G A T G G G T A G A G C A A G C A C A  
G T T T A C C G C T G C C T A C T G C C T C G G A C T T C A A G G G G C T T (配  
列番号1)

を含む。

## 【 0 0 1 4 】

10

20

30

40

50

別の態様では、少なくとも1つの遺伝子エレメントは、

C A T C T C C A T G G C T G T A C C A C C T T G T C G G G G G A T G T G T A C T  
T C T G A A C T T G T G T T G A A T C T C A T G G A G T T C A G A A G A A C A C  
A T C C G C A C T G A C A T T T T G G T A T C T T T C A T C T G A C C A (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%のパーセント同一性、または

G G G C C T G G C T C G A G C A G G G G G C G A G G G A T T C C G C T T C T T C  
C T G C C A T A G C G T G G

T C C C C T C C C C T A T G G C A G G C A G A A G C G G C A C C T T C C C T C C  
C A A T G A C C G C G T C T T C G T C G (配列番号3)

10

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%のパーセント同一性を有するマイクロ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、

C A T C T C C A T G G C T G T A C C A C C T T G T C G G G G G A T G T G T A C T  
T C T G A A C T T G T G T T G A A T C T C A T G G A G T T C A G A A G A A C A C  
A T C C G C A C T G A C A T T T T G G T A T C T T T C A T C T G A C C A (配列番  
号2)

;または G G G C C T G G C T C G A G C A G G G G G C G A G G G A T T C C G  
C T T C T T C C T G C C A T A G C G T G G T C C C C T C C C C T A T G G C A G

G C A G A A G C G G C A C C T T C C C T C C C A A T G A C C G C G T C T T C G T  
C G (配列番号3)

20

を含む。

【0015】

別の態様では、マイクロRNAクラスターは、

A G G T A T A T T G C T G T T G A C A G T G A G C G A C T G T A A A C T G A G C  
T T G C T C T A C T G T G A A G C C A C A G A T G G G T A G A G C A A G C A C A  
G T T T A C C G C T G C C T A C T G C C T C G G A C T T C A A G G G G C T T C C  
C G G G C A T C T C C A T G G C T G T A C C A C C T T G T C G G G G G A T G T G

T A C T T C T G A A C T T G T G T T G A A T C T C A T G G A G T T C A G A A G A  
A C A C A T C C G C A C T G A C A T T T T G G T A T C T T T C A T C T G A C C A

G C T A G C G G G C C T G G C T C G A G C A G G G G G C G A G G G A T T C C G C  
T T C T T C C T G C C A T A G C G T G G T C C C C T C C C C T A T G G C A G G C

A G A A G C G G C A C C T T C C C T C C C A A T G A C C G C G T C T T C G T C (

配列番号31)

30

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%のパーセント同一性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、

A G G T A T A T T G C T G T T G A C A G T G A G C G A C T G T A A A C T G A G C  
T T G C T C T A C T G T G A A G C C A C A G A T G G G T A G A G C A A G C A C  
A G T T T A C C G C T G C C T A C T G C C T C G G A C T T C A A G G G G C T T C

C C G G G C A T C T C C A T G G C T G T A C C A C C T T G T C G G G G G A T G T  
G T A C T T C T G A A C T T G T G T T G A A T C T C A T G G A G T T C A G A A G

A A C A C A T C C G C A C T G A C A T T T T G G T A T C T T T C A T C T G A C C  
A G C T A G C G G G C C T G G C T C G A G C A G G G G G C G A G G G A T T C C G

C T T C T T C C T G C C A T A G C G T G G T C C C C T C C C C T A T G G C A G G  
C A G A A G C G G C A C C T T C C C T C C C A A T G A C C G C G T C T T C G T C

(配列番号31)

40

を含む。

【0016】

別の態様では、被験体においてHIV感染を処置する方法が開示される。本方法は、有

50

効量の第1の刺激剤で被験体を免疫化するステップと、被験体から白血球を取り出し、末梢血単核細胞（P B M C）を得るステップとを様々に含む。本方法は、P B M Cを治療有効量の第2の刺激剤と *ex vivo* で接触させるステップと、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系をP B M Cに *ex vivo* で形質導入するステップと、適度な形質導入を確実にするために十分な期間にわたって、形質導入されたP B M Cを培養するステップとをさらに含む。諸実施形態では、形質導入されたP B M Cは約1～約35日間培養され得る。諸実施形態では、本方法は、形質導入されたP B M Cを被験体に注入するステップをさらに伴う。被験体はヒトであり得る。第1および第2の刺激剤は、同じであっても異なってもよい。第1および第2の刺激剤は、ペプチドまたはペプチドの混合物のうちの1つまたは複数を含み得る。諸実施形態では、第1および第2の刺激剤のうちの少なくとも1つは、g a g ペプチドを含む。第1および第2の刺激剤のうちの少なくとも1つは、ワクチンを含み得る。ワクチンはH I V ワクチンであってよく、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、ウイルス送達系はレンチウイルス粒子を含む。諸実施形態では、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低分子RNAを含む。諸実施形態では、少なくとも1つの遺伝子エレメントは、H I V RNA配列をターゲティングすることができる少なくとも1つの低分子RNAを含む。諸実施形態では、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低分子RNAと、H I V RNA配列をターゲティングすることができる少なくとも1つの低分子RNAとを含む。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み得る。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を含み得る。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。

【0017】

別の態様では、少なくとも1つの遺伝子エレメントは、

A G G T A T A T T G C T G T T G A C A G T G A G C G A C T G T A A A C T G A G C  
T T G C T C T A C T G T G A A G C C A C A G A T G G G T A G A G C A A G C A C A  
G T T T A C C G C T G C C T A C T G C C T C G G A C T T C A A G G G G C T T (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%のパーセント同一性を有するマイクロRNAを含む。好ましい実施形態では、

A G G T A T A T T G C T G T T G A C A G T G A G C G A C T G T A A A C T G A G C  
T T G C T C T A C T G T G A A G C C A C A G A T G G G T A G A G C A A G C A C A  
G T T T A C C G C T G C C T A C T G C C T C G G A C T T C A A G G G G C T T (配列番号1)

を含む。

【0018】

別の態様では、少なくとも1つの遺伝子エレメントは、

C A T C T C C A T G G C T G T A C C A C C T T G T C G G G G G A T G T G T A C T  
T C T G A A C T T G T G T T G A A T C T C A T G G A G T T C A G A A G A A C A C  
A T C C G C A C T G A C A T T T T G G T A T C T T T C A T C T G A C C A (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%のパーセント同一性、または

G G G C C T G G C T C G A G C A G G G G G C G A G G G A T T C C G C T T C T T C  
C T G C C A T A G C G T G G  
T C C C C T C C C C T A T G G C A G G C A G A A G C G G C A C C T T C C C T C C  
C A A T G A C C G C G T C T T C G T C G (配列番号3)

10

20

30

40

50

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%のパーセント同一性を有するマイクロ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、

C A T C T C C A T G G C T G T A C C A C C T T G T C G G G G G A T G T G T A C T  
T C T G A A C T T G T G T T G A A T C T C A T G G A G T T C A G A A G A A C A C  
A T C C G C A C T G A C A T T T T G G T A T C T T T C A T C T G A C C A (配列番  
号2) ; または G G G C C T G G C T C G A G C A G G G G G C G A G G G A T T C C G  
C T T C T T C C T G C C A T A G C G T G G T C C C C T C C C C T A T G G C A G  
G C A G A A G C G G C A C C T T C C C T C C C A A T G A C C G C G T C T T C G T  
C G (配列番号3)

10

を含む。

【0019】

別の態様では、マイクロRNAクラスターは、

A G G T A T A T T G C T G T T G A C A G T G A G C G A C T G T A A A C T G A G C  
T T G C T C T A C T G T G A A G C C A C A G A T G G G T A G A G C A A G C A C A  
G T T T A C C G C T G C C T A C T G C C T C G G A C T T C A A G G G G C T T C C  
C G G G C A T C T C C A T G G C T G T A C C A C C T T G T C G G G G G A T G T G  
T A C T T C T G A A C T T G T G T T G A A T C T C A T G G A G T T C A G A A G A  
A C A C A T C C G C A C T G A C A T T T T G G T A T C T T T C A T C T G A C C A  
G C T A G C G G G C C T G G C T C G A G C A G G G G G C G A G G G A T T C C G C  
T T C T T C C T G C C A T A G C G T G G T C C C C T C C C C T A T G G C A G G C  
A G A A G C G G C A C C T T C C C T C C C A A T G A C C G C G T C T T C G T C (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%のパーセント同一性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、

A G G T A T A T T G C T G T T G A C A G T G A G C G A C T G T A A A C T G A G C  
T T G C T C T A C T G T G A A G C C A C A G A T G G G T A G A G C A A G C A C  
A G T T T A C C G C T G C C T A C T G C C T C G G A C T T C A A G G G G C T T C  
C C G G G C A T C T C C A T G G C T G T A C C A C C T T G T C G G G G G A T G T  
G T A C T T C T G A A C T T G T G T T G A A T C T C A T G G A G T T C A G A A G  
A A C A C A T C C G C A C T G A C A T T T T G G T A T C T T T C A T C T G A C C  
A G C T A G C G G G C C T G G C T C G A G C A G G G G G C G A G G G A T T C C G  
C T T C T T C C T G C C A T A G C G T G G T C C C C T C C C C T A T G G C A G G  
C A G A A G C G G C A C C T T C C C T C C C A A T G A C C G C G T C T T C G T C  
(配列番号31)

30

を含む。

【0020】

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低分子RNAを含む。少なくとも1つのコードされた遺伝子エレメントは、HIV RNA配列をターゲットリングすることができる少なくとも1つの低分子RNAを含んでもよい。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低分子RNAと、HIV RNA配列をターゲットリングすることができる少なくとも1つの低分子RNAとを含む。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み得る。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を含み得る。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クラスターを含み得る。

40

。

50

【0021】

別の態様では、少なくとも1つの遺伝子エレメントは、

AGGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCGACTGTAAACTGAGC  
TTGCTCTACTGTGAAGCCACAGATGGGTAGAGCAAGCAC  
GTTTACCGCTGCCTACTGCCTCGGACTTCAAGGGGCTT (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%のパーセント同一性を有するマイクロ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、

AGGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCGACTGTAAACTGAGC  
TTGCTCTACTGTGAAGCCACAGATGGGTAGAGCAAGCAC  
GTTTACCGCTGCCTACTGCCTCGGACTTCAAGGGGCTT (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、

CATCTCCATGGCTGTACCACCTTGTCGGGGGATGTGTACT  
TCTGAAC TTGTGTTGAATCTCATGGAGTTCAGAAGAACAC  
ATCCGCACCTGACATTTTGGTATCTTTTCATCTGACCA (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%のパーセント同一性、または

GGGCCCTGGCTCGAGCAGGGGGCGAGGGATTCCGCTTCTTC  
CTGCCATAGCGTGG  
TCCCCCTCCCCCTATGGCAGGCAGAAAGCGGCACCTTCCCTCC  
CAATGACCGCGTCTTCGTCG (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%のパーセント同一性を有するマイクロ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、

CATCTCCATGGCTGTACCACCTTGTCGGGGGATGTGTACT  
TCTGAAC TTGTGTTGAATCTCATGGAGTTCAGAAGAACAC  
ATCCGCACCTGACATTTTGGTATCTTTTCATCTGACCA (配列番  
号2) ; またはGGGCCCTGGCTCGAGCAGGGGGCGAGGGATTCCG  
CTTCTTC CTGCCATAGCGTGGTCCCCCTCCCCCTATGGCAG  
GCAGAAGCGGCACCTTCCCTCCCAATGACCGCGTCTTCGT  
CG (配列番号3)

を含む。

【0023】

別の態様では、マイクロRNAクラスターは、

AGGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCGACTGTAAACTGAGC  
TTGCTCTACTGTGAAGCCACAGATGGGTAGAGCAAGCAC  
GTTTACCGCTGCCTACTGCCTCGGACTTCAAGGGGCTTCC  
CGGGCATCTCCATGGCTGTACCACCTTGTCGGGGGATGTG  
TACTTCTGAAC TTGTGTTGAATCTCATGGAGTTCAGAAGA  
ACACATCCGCACCTGACATTTTGGTATCTTTTCATCTGACCA  
GCTAGCGGGCCTGGCTCGAGCAGGGGGCGAGGGGATTCCGC  
TTCTTCCCTGCCATAGCGTGGTCCCCCTCCCCCTATGGCAGGC  
AGAAGCGGCACCTTCCCTCCCAATGACCGCGTCTTCGTC (配  
列番号31)

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

10

20

30

40

50

とも95%のパーセント同一性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、

```

A G G T A T A T T G C T G T T G A C A G T G A G C G A C T G T A A A C T G A G C
T T G C T C T   A C T G T G A A G C C A C A G A T G G G T A G A G C A A G C A C
A G T T T A C C G C T G C C T A C T G C C T C G G A C T T C A A G G G G C T T C
C C G G G C A T C T C C A T G G C T G T A C C A C C T T G T C G G G G G A T G T
G T A C T T C T G A A C T T G T G T T G A A T C T C A T G G A G T T C A G A A G
A A C A C A T C C G C A C T G A C A T T T T G G T A T C T T T C A T C T G A C C
A G C T A G C G G G C C T G G C T C G A G C A G G G G G C G A G G G A T T C C G
C T T C T T C C T G C C A T A G C G T G G T C C C C T C C C C T A T G G C A G G
C A G A A G C G G C A C C T T C C C T C C C A A T G A C C G C G T C T T C G T C
(配列番号31)

```

を含む。

#### 【0024】

別の態様では、レンチウイルス粒子を発現させるためのレンチウイルスベクター系が開示される。この系は、本明細書に記載されるレンチウイルスベクターと、好ましくは細胞に感染するように最適化されたエンベロープタンパク質を発現させるためのエンベローププラスミドと、目的の遺伝子を発現させるための少なくとも1つのヘルパープラスミドを含む。諸実施形態では、目的の遺伝子は、gag、pol、およびrev遺伝子のうちの1つまたは複数を含む。諸実施形態では、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は、パッケージング細胞株にトランスフェクトされる。さらなる実施形態では、レンチウイルス粒子は、パッケージング細胞株によって産生される。諸実施形態では、レンチウイルス粒子は、目的の標的の産生を調整することができる。諸実施形態では、目的の標的は、ケモカイン受容体CCR5またはHIV RNA配列のうちのいずれかである。この系は、第1のヘルパープラスミドおよび第2のヘルパープラスミドをさらに含んでよい。諸実施形態では、第1のヘルパープラスミドはgagおよびpol遺伝子を発現し、第2のヘルパープラスミドはrev遺伝子を発現する。

#### 【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提供される。レンチウイルス粒子は、好ましくは細胞に感染するように最適化されたエンベロープタンパク質と、本明細書に記載されるレンチウイルスベクターとを含む。諸実施形態では、エンベロープタンパク質は、T細胞に感染するように最適化されていてよい。好ましい実施形態では、エンベロープタンパク質は、CD4+T細胞に感染するように最適化されている。

#### 【0026】

別の態様では、改変細胞が提供される。改変細胞は、本態様および実施形態に従って使用するための、レンチウイルスベクター系に感染することができる任意の細胞を含む。諸実施形態では、細胞は、レンチウイルス粒子に感染したCD4+T細胞である。諸実施形態では、CD4+T細胞はまた、HIV抗原を認識するように選択されたものである。諸実施形態では、HIV抗原は、gag抗原を含む。諸実施形態では、CD4+T細胞は、レンチウイルス粒子に感染した後に低下したレベルのCCR5を発現する。

#### 【0027】

別の態様では、治療処置レジメンのための被験体を選択する方法が提供される。本方法は、有効量の第1の刺激剤で被験体を免疫化するステップと；被験体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つの因子に関連付けられる第1の定量化可能な測定値を決定するステップと；PBMCを治療有効量の第2の刺激剤とex vivoで接触させ、PBMCに関連する少なくとも1つの因子に関連付けられる第2の測定値を決定するステップとを様々に含み、ここで、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高い場合、被験体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細胞の増殖またはIFNガンマ産生のうちの

いずれかを含み得る。

【0028】

前出の全体的な説明、ならびに以下の図面の簡単な説明および詳細な説明は、例示的かつ説明的なものであり、特許請求され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、および新規の特徴は、以下の図面の簡単な説明および本発明の詳細な説明から当業者に容易に明らかになるであろう。

【図面の簡単な説明】

【0029】

【図1】図1は、本開示の *ex vivo* 処置方法のフロー図を示す。

【0030】

【図2】図2は、本開示に従う CD4 + T 細胞の変更および新しい感染の防止を示す。

【0031】

【図3】図3は、治療用ベクター、ヘルパープラスミド、およびエンベローププラスミドからなる、例示的なレンチウイルスベクター系を示す。ここで示されている治療用ベクターは、本明細書において AGT103 と呼ばれる好ましい治療用ベクターであり、miR30CCR5 - miR21Vif - miR185 - Tat を含有する。

【0032】

【図4】図4は、環状化形態の例示的な3ベクターのレンチウイルスベクター系を示す。

【0033】

【図5】図5は、環状化形態の例示的な4ベクターのレンチウイルスベクター系を示す。

【0034】

【図6】図6は、例示的なベクター配列を示す。CCR5 向性 HIV 株の伝播を阻害するためのプロモーターおよび miR クラスターのプラス（すなわち、ゲノム）鎖配列を開発した。下線のない配列は、この miR クラスターに対して好ましいプロモーターとして選択された転写の EF-1 アルファプロモーター（配列番号 105）を含む。下線のある配列は、miR30 CCR5（配列番号 1）、miR21 Vif（配列番号 2）、および miR185 Tat（配列番号 108）（配列番号 33 に集合的に示されている）からなる miR クラスターを示す。

【0035】

【図7】図7は、本開示の様々な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。

【0036】

【図8】図8は、AGTc120 細胞における実験的ベクターによる CCR5 のノックダウン、および対応する R5 向性 HIV 感染の防止を示す。（A）AGT103 レンチウイルスベクターありまたはなしでの AGTc120 細胞における CCR5 の発現を示す。（B）HIV の *NeF* 遺伝子に融合した緑色蛍光タンパク質（GFP）を発現していた HIV BaL ウイルスストックによる感染に対する形質導入された AGTc120 細胞の感受性を示す。

【0037】

【図9】図9は、本開示のレンチウイルスベクターにおける、shRNA 阻害剤配列による CCR5 発現の調節を実証するデータを示す。（A）潜在的候補のスクリーニングデータが示されている。（B）CCR5 shRNA-1（配列番号 16）の形質導入後の CCR5 ノックダウンデータが示されている。

【0038】

【図10】図10は、本開示のレンチウイルスベクターにおける、shRNA 阻害剤配列による HIV 成分の調節を実証するデータを示す。（A）*rev/tat* 標的遺伝子のノックダウンデータが示されている。（B）*gag* 標的遺伝子のノックダウンデータが示されている。

【0039】

【図11】図11は、本明細書に記載されるように、HIV 発現プラスミドをトランスフ

10

20

30

40

50

エクトした細胞における Tat タンパク質の発現を AGT103 が低減させることを実証するデータを示す。

【0040】

【図12】図12は、本開示のレンチウイルスベクターにおける、合成マイクロRNA配列による HIV 成分の調節を実証するデータを示す。(A) Tat ノックダウンデータが示されている。(B) Vif ノックダウンデータが示されている。

【0041】

【図13】図13は、本開示のレンチウイルスベクターにおける、合成マイクロRNA配列による CCR5 発現の調節を実証するデータを示す。

【0042】

【図14】図14は、長鎖または短鎖の WPRE 配列のいずれかを含有する本開示のレンチウイルスベクターにおける、合成マイクロRNA配列による CCR5 発現の調節を実証するデータを示す。

【0043】

【図15】図15は、WPRE 配列ありまたはなしの本開示のレンチウイルスベクターにおける、合成マイクロRNA配列による CCR5 発現の調節を実証するデータを示す。

【0044】

【図16】図16は、本開示のレンチウイルスベクターにおける、合成マイクロRNA配列を調節する CD4 プロモーターによる CCR5 発現の調節を実証するデータを示す。

【0045】

【図17】図17は、HIV Gag 特異的 CD4<sup>+</sup> T細胞の検出を実証するデータを示す。

【0046】

【図18】図18は、HIV 特異的な CD4<sup>+</sup> T細胞の拡大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) 処置の例示的なスケジュールが示されている。(B) 本明細書に記載される、CD4 でゲーティングした T細胞における IFNγ 産生が示されている。(C) 本明細書に記載される、CD4 でゲーティングした T細胞における IFNγ 産生および GFP 発現が示されている。(D) 本明細書に記載される HIV 特異的 CD4<sup>+</sup> T細胞の頻度が示されている。(E) 本明細書に記載される ワクチン接種後の PBM C からの IFNγ 産生が示されている。

【0047】

【図19】図19は、漸増する AGT103 - GFP の用量応答および CCR5 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) 漸増量の AGT103 - GFP に関する用量応答データが示されている。(B) CCR5 発現という点で正規分布した集団が示されている。(C) 漸増用量の AGT103 - GFP による CCR5 発現の阻害パーセンテージが示されている。

【0048】

【図20】図20は、初代ヒト CD4<sup>+</sup> T細胞に対する AGT103 の形質導入効率を実証するデータを示す。(A) 本明細書に記載されるように、形質導入された細胞 (GFP 陽性) の頻度が FACS により示されている。(B) 本明細書に記載される細胞あたりのベクターコピー数が示されている。

【0049】

【図21】図21は、本明細書に記載される、初代 CD4<sup>+</sup> T細胞における HIV 複製の AGT103 阻害を実証するデータを示す。

【0050】

【図22】図22は、HIV 誘導性枯渇からの初代ヒト CD4<sup>+</sup> T細胞の AGT103 保護を実証するデータを示す。

【0051】

【図23-1】図23は、HIV 特異的な、AGT103 を形質導入した CD4<sup>+</sup> T細胞が高度に濃縮された CD4<sup>+</sup> T細胞集団の生成を実証するデータを示す。(A) 本明細

10

20

30

40

50

書に記載される細胞集団に関するCD4およびCD8の発現プロファイルを示す。(B)本明細書に記載される細胞集団に関するCD4およびCD8の発現プロファイルを示す。(C)本明細書に記載される細胞集団に関するIFNガンマおよびCD4の発現プロファイルを示す。(D)本明細書に記載される細胞集団に関するIFNガンマおよびGFPの発現プロファイルを示す。

【図23-2】図23は、HIV特異的な、AGT103を形質導入したCD4 T細胞が高度に濃縮されたCD4+ T細胞集団の生成を実証するデータを示す。(A)本明細書に記載される細胞集団に関するCD4およびCD8の発現プロファイルを示す。(B)本明細書に記載される細胞集団に関するCD4およびCD8の発現プロファイルを示す。(C)本明細書に記載される細胞集団に関するIFNガンマおよびCD4の発現プロファイルを示す。(D)本明細書に記載される細胞集団に関するIFNガンマおよびGFPの発現プロファイルを示す。

10

#### 【発明を実施するための形態】

##### 【0052】

###### 概説

本明細書では、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)疾患を処置および/または防止して機能的治癒を達成するための方法および組成物が開示される。本方法および組成物は、後述するように、組み込みレンチウイルス、非組み込みレンチウイルス、および関連するウイルスベクター技術を含む。

##### 【0053】

20

本明細書では、治療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HIV感染を処置するためにそれらを使用する方法が開示される。諸実施形態では、HIV感染の機能的治癒を達成するための方法および組成物が提供される。本明細書の図1に示されるように、様々な態様および実施形態は、第1の刺激事象、例えば、HIV感染患者において、例えばHAARTの毎日の投与によるウイルス血症の安定な抑制と共に、HIVに対する強力な免疫応答をもたらすことを意図するワクチンを用いた、第1の治療的免疫化を含む。諸実施形態では、第1の刺激事象により、HIV特異的CD4 T細胞の画分が濃縮される。この後には、(1)白血球除去または静脈血からPBMCを精製することによる末梢白血球の単離、(2)第2の刺激事象、例えば、任意のワクチンまたはタンパク質、例えばHIVまたはHIV関連ペプチドなどの好適な刺激剤によるCD4 T細胞のex vivoでの再刺激、(3)治療用レンチウイルス形質導入、ex vivoのT細胞培養の実施、および(4)元の患者への再注入が続く。

30

##### 【0054】

CD4+ T細胞などの新しい細胞がHIVに感染することを防止するには、様々な方法および組成物を使用することができる。例えば、図2に解説されているように、新しい細胞が感染するのを防止するためには、CCR5発現をターゲティングしてウイルスの付着を防止することができる。さらに、残存するあらゆる感染性ウイルスRNAの破壊をターゲティングすることもできる。前出のことに、また本明細書の図2を参照すると、HIVに既に感染している細胞におけるHIVウイルスのサイクルを止める組成物および方法が提供される。HIVウイルスのサイクルを止めるためには、潜伏感染CD4+ 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RNAをターゲティングする。

40

##### 【0055】

HIVの治癒を達成しようとするこれまでの試みは、とりわけ、保護的な遺伝子改変を有するHIV特異的CD4 T細胞が十分な数だけ得られなかったことが原因で不成功に終わっている。この数が臨界閾値を下回っていると、本明細書に記載される機能的治癒は達成されない。例えば、抗レトロウイルス薬療法が終了すると、通常、HIVの再出現が続いて起こる。その後、患者は多くの場合、HIV特異的CD4 T細胞の急速な破壊を経験し、また、過去の遺伝子療法にもかかわらず、疾患進行の再開が続く。本明細書に記載される組成物および方法に従う治療的免疫化を用いることにより、様々な実施形態において機能的治癒を含む、新しいHIV処置レジメンが開発された。

50

## 【0056】

## 定義および解釈

本明細書で別途定義されない限り、本開示との関連で使用される科学および技術用語は、当業者により一般的に理解されている意味を有するものとする。さらに、文脈により別途必要とされない限り、単数形用語は複数形を含み、複数形用語は単数形を含むものとする。概して、本明細書に記載される、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の化学、およびハイブリダイゼーションに関連して使用される命名法、ならびにこれらの技術は、当技術分野で周知であり一般的に使用されているものである。特記なき限り、本開示の方法および技術は概して、当技術分野で周知であり、かつ本明細書随所で引用され、論じられる様々な一般的参考文献およびより具体的な参考文献に記載されている、従来の方法に従って行われる。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. (2000年)、Ausubelら、*Short Protocols in Molecular Biology: A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology*, Wiley, John & Sons, Inc. (2002年)、Harlowおよび Lane *Using Antibodies: A Laboratory Manual*; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1998年)、および Coliganら、*Short Protocols in Protein Science*, Wiley, John & Sons, Inc. (2003年)を参照されたい。任意の酵素反応または精製技術は、製造元の仕様に従って、当技術分野で一般的に実行されるように、または本明細書に記載されるように行われる。本明細書に記載される、分析化学、合成有機化学、ならびに医薬品および製薬化学に関連して使用される命名法、ならびにこれらの検査手技および技術は、当技術分野で周知であり一般的に使用されているものである。

10

20

## 【0057】

本明細書で使用される場合、「約」という用語は、当業者には理解され、この用語が使用される文脈に応じてある程度異なるであろう。「約」という用語が使用される文脈を考慮して、その用語の使用が当業者にとって明確でない場合、「約」は、特定の用語の最大プラス10%またはマイナス10%を意味する。

30

## 【0058】

本明細書で使用される場合、活性剤「の投与」または「を投与すること」という用語は、処置を必要とする被験体に、この個体の身体に治療上有用な形態および治療有効量で導入され得る形態で、本発明の活性剤を提供することを意味する。

## 【0059】

本明細書で使用される場合、「AGT103」という用語は、本明細書で詳述される、miR30-CCR5/miR21-Vif/miR185-TatマイクロRNAクラスター配列を含有するレンチウイルスベクターの特定の実施形態を指す。

40

## 【0060】

本明細書で使用される場合、「AGT103T」という用語は、AGT103レンチウイルスベクターを含有するレンチウイルスが形質導入された細胞を指す。

## 【0061】

本明細書および特許請求の範囲の全体において、「comprise (含む)」という単語、または「comprises (含む)」もしくは「comprising (含む)」などの変形は、記載された整数または整数群の包含を暗示するが、いかなる他の整数または整数群の除外も暗示するものではないと理解される。さらに、本明細書で使用される場合、「includes (含む)」という用語は、限定することなく含むことを意味す

50

る。

【0062】

本明細書で使用される場合、「生着(engraftment)」という用語は、細胞供給源の注入後の被験体における持続的生着の定量的レベルを決定することが当業者にとって可能であることを指す(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)を参照されたい)。

【0063】

「発現」、「発現される」、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がその後ペプチド、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む場合がある。

【0064】

上記に言及した、また本明細書でさらに定義される「機能的治癒」という用語は、cARTまたはHAARTなどの継続的なHIV療法を過去に必要としたHIV+の個体が、そのようなHIV療法のより低い用量を使用するか、断続的な用量を使用するか、またはその投薬を中止した場合に、ウイルス複製が低いかまたは検出不可能な状態で生存し得るような状況または状態を指す。個体は、低レベルのウイルス複製を維持し、疾患進行を減速または終結させるために補助療法が未だ必要であっても「機能的に治癒した」と言われる場合がある。機能的治癒の起こり得る転帰は、特定される時間枠、例えば1か月間、3か月間、6か月間、1年間、3年間、および5年間、ならびに定義され得るその他すべての時間枠内に再発が検出されないような、HIVのすべてまたは実質的にすべての最終的な根絶である。

【0065】

「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する、免疫原と、ピヒクルと、アジュバントを包含する。「HIVワクチン」という用語は、本明細書に記載される「刺激剤」という用語の意味に含まれる。「HIVワクチン」は、HIVであり得る精製された不活化ウイルス粒子もしくは不活化ウイルス粒子全体、または、特異的免疫を誘発することができるHIVタンパク質、糖タンパク質もしくはタンパク質断片を産生するように細胞を指向することができる組換え細菌ベクター、プラスミドDNAもしくはRNAに加えて、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グリコペプチドを発現することができる組換えウイルスベクターを含み得る。代わりに、形質導入の前にHIV特異的CD4 T細胞を濃縮する目的で、またはレンチウイルスを形質導入したCD4 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、マイトジェン、スーパー抗原、および他の化学的または生物学的刺激をはじめとする免疫刺激のための特定の方法を使用して、樹状細胞、T細胞またはB細胞を活性化してもよい。活性化物質は、可溶性であってもよく、ポリマー集合体であってもよく、リポソームもしくはエンドソームベースであってもよく、またはビーズに連結していてもよい。刺激に対する細胞の応答を改善し、かつ/または培養および形質導入の間のCD4 T細胞の生存を改善するために、インターロイキン2、6、7、12、15、23、またはその他を含むサイトカインを付加してもよい。前出のいずれも限定するものではないが、代わりに、「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した二重組換えMVAワクチンである。MVA/HIV62Bワクチンは、公知のMVAベクターにHIV-1 gag-polおよびenv配列を挿入することによって構築された(例えば、Goepfertら(2014年)J. Infect. Dis.、210巻(1号):99~110頁を参照されたい

10

20

30

40

50

。また、W O 2 0 0 6 0 2 6 6 6 7 も参照されたい。これらはいずれも参照により本明細書に組み込まれている)。「H I V ワクチン」という用語は、以下の表 1 に提供される任意の 1 つまたは複数のワクチンも含む。

【表 1 - 1】

表 1

IAVI 臨床治験 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/IPCAVD003	Ad26.EnvA-01
Ad5HVR48.ENVA.01	Ad5HVR48.ENVA.01
ANRS VAC 01	ALVAC vCP125
ANRS VAC 02	rgp 160 + 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
ANRS VAC 18	LIPO-5
APL 400-003RX101	APL 400-003 GENEVAX-HIV
AVEG 002	HIVAC-1e
AVEG 002A	HIVAC-1e

10

20

30

40

【表 1 - 2】

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)	10
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	20
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	30
AVEG 015	rgp120/HIV-1 SF-2	
AVEG 016	MN rgp120	
AVEG 016A	MN rgp120	
AVEG 016B	MN rgp120	
AVEG 017	UBI HIV-1 ペプチドワクチン、一価微粒子	
AVEG 018	UBI HIV-1 ペプチドワクチン、一価微粒子	
AVEG 019	p17/p24:Ty- VLP	40
AVEG 020	gp120 C4-V3	
AVEG 021	P3C541b リポペプチド	
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	

【表 1 - 3】

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)	10
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	20
頸腔部 CN54gp140-hsp70 コンジュゲートワクチン(TL01)	CN54gp140	
CM235 および SF2gp120	CM235 (ThaiE) gp120 および SF2(B) gp120	
CM235gp120 および SF2gp120	CM235 (ThaiE) gp120 および SF2(B) gp120	
CombiHIVvac (KombiVICHvak)	CombiHIVvac	
CRC282	P2G12	
CRO2049/ CUT*HIVAC001	GTU-MultiHIV	
CUTHIVAC002	DNA-C CN54ENV	30
DCVax-001	DCVax-001	
DNA-4	DNA-4	
DP6?001	DP6?001 DNA	
DVP-1	EnvDNA	
EN41-UGR7C	EN41-UGR7C	
EnvDNA	EnvDNA	
EnvPro	EnvPro	40
EuroNeut41	EN41-FPA2	
EV01	NYVAC-C	
EV02 (EuroVacc 02)	DNA-C	
EV03/ANRSVAC20	DNA-C	
延長 (Extention) HVTN 073E/SAAVI 102	Sub C gp140	

【表 1 - 4】

F4/AS01	F4/AS01
FIT Biotech	GTU-Nef
Guangxi CDC DNA ワクチン	中国人の 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)
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

10

20

30

40

【表 1 - 5】

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
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	20
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	30
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	40
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	

【表 1 - 6】

HVTN 204	VRC-HIVDNA016-00-VP	
HVTN 205	pGA2/JS7 DNA	
HVTN 502/Merck 023 (Step 試験)	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	10
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	20
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	30
IAVI B001	Ad35-GRIN/ENV	
IAVI B002	アジュバント化 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	40
IAVI C004/DHO-614	ADVAX	
IAVI D001	TBC-M4	
IAVI N004 HIV-CORE 004	Ad35-GRIN	
IAVI P001	ADVAX	
IAVI P002	ADVAX	
IAVI R001	rcAd26.MOS1.HIVEnv	

【表 1 - 7】

IAVI S001	SeV-G	
IAVI V001	VRC-HIVDNA016-00-VP	
IAVI V002	VRC-HIVDNA016-00-VP	
IDEA EV06	DNA-HIV-PT123	
IHV01	全長一本鎖(FLSC)	
IMPAACT P1112	VRC-HIVMAB060-00-AB	
IPCAVD006	MVA モザイク	10
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	20
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	30
NCHECR-AE1	pHIS-HIV-AE	
PACTG 230	AIDSVAX B/E	
PAVE100	VRC-HIVDNA016-00-VP	
PEACHI-04	ChAdV63.HIVconv	
PedVacc001 & PedVacc002	MVA.HIVA	
PolyEnv1	PolyEnv1	
PXVX-HIV-100-001	Ad4-mgag	40
RISVAC02	MVA-B	
RisVac02 追加免疫	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)	

【表 1 - 8】

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	10
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	20
TAMOVAC-01-MZ	HIVIS-DNA	
Tiantan ワクシニア HIV ワクチン	中国人の DNA	
Tiantan ワクシニア HIV ワクチンおよび DNA	中国人の 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	30
UBI V106	UBI HIV-1 ペプチドワクチン、一価微粒子	
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	40
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 Trigene 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	

【表 1 - 9】

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	10
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	
VRC 607	VRCHIVMAB080-00-AB	
VRC01LS	VRCHIVMAB080-00-AB	20
VRI01	MVA-B	
X001	CN54gp140	

\*IAVIは国際エイズワクチン構想(International AIDS Vaccine Initiative)であり、その臨床治験データベースは <http://www.iavi.org/trials-database/trials> にて公的に利用可能である。

\*\*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で参照される所与の臨床治験において免疫学的接種材料として最初に使用される組成物を指す。

## 【 0 0 6 6 】

「*in vivo*」という用語は、生きている生物において起こるプロセスを指す。「*ex vivo*」という用語は、生きている生物の外側で起こるプロセスを指す。例えば、*in vivo* 処置とは、患者の体内で起こる処置を指し、一方で *ex vivo* 処置とは、患者の体外で起こるが、それでもその患者由来の組織を使用するか、その組織に接近するか、またはその組織と相互作用する処置である。*ex vivo* 処置ステップはその後、後続の *in vivo* 処置ステップを含んでもよい。

## 【 0 0 6 7 】

「*miRNA*」という用語はマイクロRNAを指し、本明細書では「*miR*」と呼ばれる場合もある。「マイクロRNAクラスター」という用語は、ベクター上で互いの近傍に位置し、かつ共発現する、少なくとも2つのマイクロRNAを指す。

## 【 0 0 6 8 】

「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させるために使用され得る任意の細胞株を指す。

## 【 0 0 6 9 】

「パーセント同一性」という用語は、2つまたはそれよりも多い核酸またはポリペプチド配列の文脈では、後述の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）のうちの1つを使用して、または目視検査により測定して、最大の一致のために比較およびアラインメントしたとき、同じであるヌクレオチドまたはアミノ酸残基の特定のパーセンテージを有する、2つまたはそれよりも多い配列またはサブ配列を指す。適用に応じて、「パーセント同一性」は、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する場合もあれば、または代替的に、比較される2つの配列の全長にわたって存在する場合もある。配列比

10

20

30

40

50

較では、典型的には1つの配列が参照配列としての機能を果たし、これに対して試験配列が比較される。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、必要に応じてサブ配列の座標を指定し、配列アルゴリズムプログラムパラメータを指定する。次いで、配列比較アルゴリズムが、指定されたプログラムパラメータに基づき、参照配列に対する試験配列のパーセント配列同一性を算出する。

**【0070】**

比較のための配列の最適なアラインメントは、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、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、Pearson  
10  
およびLipman、Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA、85巻：2444頁(1988年)の類似性検索方法、これらのアルゴリズム(Wisconsin Genetics Software Package、Genetics Computer Group、575 Science Dr.、Madison、Wis.のGAP、BESTFIT、FASTA、およびTFASTA)のコンピュータによる実装、または目視検査(Ausubelら、下記を全体的に参照されたい)によって実施することができる。

**【0071】**

パーセント配列同一性および配列類似性を決定するために好適なアルゴリズムの一例は、Altschulら、J. Mol. Biol.、215巻：403~410頁(1990年)に記載されているBLASTアルゴリズムである。BLAST分析を行うためのソフトウェアは、National Center for Biotechnology Informationのウェブサイトから公的に利用可能である。

**【0072】**

2つのヌクレオチド配列間のパーセント同一性はGCGソフトウェアパッケージ(<http://www.gcg.com>にて利用可能)のGAPプログラムを使用し、NWSgapdna.CMPマトリクスと、40、50、60、70、または80のギャップ重みと、1、2、3、4、5、または6の長さ重みとを使用して決定することができる。2つのヌクレオチドまたはアミノ酸配列間のパーセント同一性は、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のアル  
30  
ゴリズム(CABIOS、4巻：11~17頁(1989年))を使用し、PAM120残基重み表(weight residue table)、12のギャップ長さペナルティ、および4のギャップペナルティを使用して決定することもできる。加えて、2つのアミノ酸配列間のパーセント同一性は、GCGソフトウェアパッケージ(<http://www.gcg.com>にて利用可能)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、Blossum62マトリクスまたはPAM250マトリクスのいずれかと、16、14、12、10、8、6、または4のギャップ重みと、1、2、3、4、5、または6の長さ重みとを使用して決定することができる。  
40

**【0073】**

本開示の核酸およびタンパク質配列は、公開データベースに対する検索を行うための「クエリー配列」としてさらに使用して、例えば、関連する配列を特定することができる。このような検索は、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)を使用して行うことができる。NBLASTプログラム、スコア=100、ワード長=12を用いてBLASTのヌクレオチド検索を行うと、本発明の核酸分子と相同なヌクレオチド配列を得ることができる。XBLASTプログラム、スコア=50、ワード長=3を用いてBLASTのタンパク質検索を行うと、本発明のタンパク質分子と相同なア  
50  
ミノ酸配列を得ることができる。比較目的のためのギャップありアラインメントを得るた

めには、Altschulら(1997年)、Nucleic Acids Res.、25巻(17号):3389~3402頁に記載されているGapped BLASTを利用することができる。BLASTおよびGapped BLASTプログラムを利用する際は、それぞれのプログラム(例えば、XBLASTおよびNBLAST)のデフォルトパラメータを使用してよい。http://www.ncbi.nlm.nih.govを参照されたい。

【0074】

本明細書で使用される場合、「薬学的に許容される」とは、健全な医学的判断の範囲内で、合理的な利益/リスク比に見合った、過度の毒性、刺激作用、アレルギー応答、または他の問題もしくは合併症を伴わずに、ヒトおよび動物の組織、臓器、および/または体液と接触させて使用するのに好適な化合物、物質、組成物、および/または剤形を指す。

10

【0075】

本明細書で使用される場合、「薬学的に許容される担体」とは、生理学的に適合性のある、ありとあらゆる溶剤、分散媒、コーティング、抗菌剤および抗真菌剤、等張剤および吸収遅延剤などを指し、これらを含む。本組成物は、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含み得る(例えば、Bergerら(1977年)、J Pharm Sci、66巻:1~19頁を参照されたい)。

【0076】

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。

20

【0077】

本明細書で使用される場合、「低分子RNA」とは、概して約200ヌクレオチドまたはそれ未満よりも短い長さであり、サイレンシングまたは干渉機能を有する非コードRNAを指す。他の実施形態では、低分子RNAは、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の長さである。このようなRNAは、マイクロRNA(miRNA)、低分子干渉RNA(siRNA)、二本鎖RNA(dsRNA)、および低分子ヘアピン型RNA(shRNA)を含む。本開示の「低分子RNA」は、標的遺伝子の遺伝子発現を、例えば標的遺伝子のmRNAの破壊をもたらす経路によって阻害またはノックダウンすることができなければならない。

30

【0078】

本明細書で使用される場合、「刺激剤」という用語は、免疫応答を刺激することができるあらゆる外因性因子を指し、限定されるものではないが、ワクチン、HIVワクチン、およびHIVまたはHIV関連ペプチドを含む。刺激剤は、好ましくは、T細胞応答を刺激することができる。

【0079】

本明細書で使用される場合、「被験体」という用語は、ヒト患者を含むが、他の哺乳動物も含む。「被験体」、「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される場合がある。

40

【0080】

「治療有効量」という用語は、所与の病気、傷害、疾患、または状態を患う患者に見られる合併症の症状、進行、または発症を処置または防止するために十分な、好適な組成物および好適な剤形における本発明の活性剤の分量を指す。治療有効量は、患者の状態またはその重症度、および処置される被験体の年齢、体重などの状態に応じて異なる。治療有効量は、例えば、投与経路、被験体の状態、ならびに当業者に理解される他の要素を含む、いくつかの要素のうちの一つに依りて異なる。

【0081】

本明細書で使用される場合、「治療用ベクター」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。

50

## 【 0 0 8 2 】

「処置」または「処置すること」という用語は、概して、処置されている被験体の自然経過を変更することを試みる介入を指し、予防のために行われてもよいし、または臨床病理過程に行われてもよい。望ましい効果としては、疾患の発症または再発を防止すること、症状を緩和すること、疾患の何らか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、病状を回復または軽減させること、および寛解または改善された予後を引き起こすことが挙げられるが、これらに限定されない。

## 【 0 0 8 3 】

「ワクチン」という用語は、「治療用ワクチン」という用語と交換可能に使用され、個体において免疫応答を誘発することができる外因性因子を指し、限定されるものではないが、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 (virally vectored protein)、細菌ベクター化タンパク質 (bacterially vectored protein)、ペプチドもしくはペプチド断片、またはウイルス様粒子 (VLP) を含む。

10

## 【 0 0 8 4 】

本開示の諸態様の説明

本明細書で詳述されるように、一態様では、HIVに感染した細胞を処置する方法が提供される。本方法は、概して、*ex vivo*で行われる、HIVに感染した被験体から単離された末梢血単核細胞 (PBMC) を治療有効量の刺激剤と接触させるステップと、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系をPBMCに *ex vivo* で形質導入するステップと、そのような形質導入を達成するために十分な期間にわたって、形質導入されたPBMCを培養するステップとを含む。諸実施形態では、形質導入されたPBMCは約1～約35日間培養される。本方法は、形質導入されたPBMCを被験体に注入するステップをさらに含み得る。被験体はヒトであり得る。刺激剤は、ペプチドまたはペプチドの混合物を含んでよく、好ましい実施形態では、*gag* ペプチドを含む。刺激剤はワクチンを含む場合がある。ワクチンはHIVワクチンであってよく、好ましい実施形態では、HIVワクチンは、MVA/HIV62B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、ウイルス送達系はレンチウイルス粒子を含む。諸実施形態では、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CCR5の産生を阻害することができる低分子RNAを含み得る。諸実施形態では、少なくとも1つの遺伝子エレメントは、HIV RNA配列をターゲティングすることができる少なくとも1つの低分子RNAを含む。他の実施形態では、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CCR5の産生を阻害することができる低分子RNAと、HIV RNA配列をターゲティングすることができる少なくとも1つの低分子RNAとを含む。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み得る。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shRNAのうちの少なくとも1つを含み得る。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 8 5 】

別の態様では、少なくとも1つの遺伝子エレメントは、

AGGTATAATTGCTGTTGACAGTGAGCGACTGTAAACTGAGC  
TTGCTCTACTGTGAAGCCACAGATGGGTAGAGCAAGCACAG  
TTTTACCCTGCTACTGCTCTCGGACTTCAAGGGGCTT (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パーセント同一性を有するマイクロ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

AGGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCGACTGTAAACTGAGC  
 TTGCTCTACTGTGAAGCCACAGATGGGTAGAGCAAGCAC  
 GTTTACCGCTGCCTACTGCCTCGGACTTCAAGGGGCTT (配  
 列番号1)

を含む。

【0086】

別の態様では、少なくとも1つの遺伝子エレメントは、

CATCTCCATGGCTGTACCACCTTGTCGGGGGATGTGTACT  
 TCTGAACCTTGTGTTGAATCTCATGGAGTTCAAGAAGAACAC  
 ATCCGCACCTGACATTTTGGTATCTTTTCATCTGACCA (配列番  
 号2)

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%、もしくはそれよりも高いパーセン  
 ト同一性、または

GGGCCCTGGCTCGAGCAGGGGGCGAGGGATTCCGCTTCTTC  
 CTGCCATAGCGTGG  
 TCCCTCCCTATGGCAGGCAGAAAGCGGCACCTTCCCTCC  
 CAATGACCGCGTCTTCGTCG (配列番号3)

20

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パーセン  
 ト同一性を有するマイクロ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、

CATCTCCATGGCTGTACCACCTTGTCGGGGGATGTGTACT  
 TCTGAACCTTGTGTTGAATCTCATGGAGTTCAAGAAGAACAC  
 ATCCGCACCTGACATTTTGGTATCTTTTCATCTGACCA (配列番  
 号2) ; またはGGGCCCTGGCTCGAGCAGGGGGCGAGGGATTCCG  
 CTTCTTC CTGCCATAGCGTGGTCCCTCCCTATATGGCAG  
 GCAGAAAGCGGCACCTTCCCTCCCAATGACCGCGTCTTCGT  
 CG (配列番号3)

30

を含む。

【0087】

別の態様では、マイクロRNAクラスターは、

AGGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCGACTGTAAACTGAGC  
 TTGCTCTACTGTGAAGCCACAGATGGGTAGAGCAAGCAC  
 GTTTACCGCTGCCTACTGCCTCGGACTTCAAGGGGCTTCC  
 CGGGCATCTCCATGGCTGTACCACCTTGTCGGGGGATGTG  
 TACTTCTGAACCTTGTGTTGAATCTCATGGAGTTCAAGAAGA  
 ACACATCCGCACCTGACATTTTGGTATCTTTTCATCTGACCA  
 GCTAGCGGGCCTGGCTCGAGCAGGGGGCGAGGGATTCCGC  
 TTCTTCTGCCATAGCGTGGTCCCTCCCTATATGGCAGGC  
 AGAAGCGGCACCTTCCCTCCCAATGACCGCGTCTTCGTC (配  
 列番号31)

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パーセント

50

同一性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、  
 A G G T A T A T T G C T G T T G A C A G T G A G C G A C T G T A A A C T G A G C  
 T T G C T C T A C T G T G A A G C C A C A G A T G G G T A G A G C A A G C A C  
 A G T T T A C C G C T G C C T A C T G C C T C G G A C T T C A A G G G G C T T C  
 C C G G G C A T C T C C A T G G C T G T A C C A C C T T G T C G G G G G A T G T  
 G T A C T T C T G A A C T T G T G T T G A A T C T C A T G G A G T T C A G A A G  
 A A C A C A T C C G C A C T G A C A T T T T G G T A T C T T T C A T C T G A C C  
 A G C T A G C G G G C C T G G C T C G A G C A G G G G G C G A G G G A T T C C G  
 C T T C T T C C T G C C A T A G C G T G G T C C C C T C C C C T A T G G C A G G  
 C A G A A G C G G C A C C T T C C C T C C C A A T G A C C G C G T C T T C G T C

10

(配列番号31)

を含む。

【0088】

別の態様では、被験体においてHIV感染を処置する方法が開示される。本方法は、概して、有効量の第1の刺激剤で被験体を免疫化するステップと、被験体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とを含む。本方法は、PBMCを治療有効量の第2の刺激剤と*ex vivo*で接触させるステップと、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系をPBMCに*ex vivo*で形質導入するステップと、形質導入を達成するために十分な期間にわたって、形質導入されたPBMCを培養するステップとをさらに含む。本方法は、例えば、好ましくはCD4+T細胞についてPBMCを濃縮することによる、PBMCのさらなる濃縮をさらに含んでよい。諸実施形態では、形質導入されたPBMCは約1~約35日間培養される。本方法は、形質導入されたPBMCを被験体に注入するステップをさらに伴い得る。被験体はヒトであり得る。第1および第2の刺激剤は、互いと同じであっても異なってもよい。第1および第2の刺激剤のうちの少なくとも1つは、ペプチドまたはペプチドの混合物を含み得る。諸実施形態では、第1および第2の刺激剤のうちの少なくとも1つが、gagペプチドを含む。第1および第2の刺激剤のうちの少なくとも1つは、ワクチンを含み得る。ワクチンはHIVワクチンであってよく、好ましい実施形態では、HIVワクチンは、MVA/HIV62Bワクチンまたはそのバリエーションである。諸実施形態では、第1の刺激剤はHIVワクチンであり、第2の刺激剤はgagペプチドである。

20

30

【0089】

諸実施形態では、ウイルス送達系はレンチウイルス粒子を含む。諸実施形態では、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CCR5の産生を阻害することができる低分子RNAを含む。諸実施形態では、少なくとも1つの遺伝子エレメントは、HIV RNA配列をターゲティングすることができる少なくとも1つの低分子RNAを含む。諸実施形態では、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CCR5の産生を阻害することができる低分子RNAと、HIV RNA配列をターゲティングすることができる少なくとも1つの低分子RNAとを含む。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み得る。少なくとも1つの遺伝子エレメントは、マイクロRNAもしくはshRNA、またはそれらのクラスターを含み得る。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。

40

【0090】

別の態様では、少なくとも1つの遺伝子エレメントは、  
 A G G T A T A T T G C T G T T G A C A G T G A G C G A C T G T A A A C T G A G C  
 T T G C T C T A C T G T G A A G C C A C A G A T G G G T A G A G C A A G C A C A  
 G T T T A C C G C T G C C T A C T G C C T C G G A C T T C A A G G G G C T T (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パーセント同一性を有するマイクロ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、

AGGTATAATTGCTGTTGACAGTGAGCGACTGTAAACTGAGC  
TTGCTCTACTGTGAAGCCACAGATGGGTAGAGCAAGCAC  
GTTTACCCTGCTACTGCTCTCGGACTTCAAGGGGCTT (配  
列番号1)

を含む。

【0091】

別の態様では、少なくとも1つの遺伝子エレメントは、

CATCTCCAATGGCTGTACCACCTTGTCTGGGGGATGTGTACT  
TCTGAACCTTGTGTTGAATCTCATGGAGTTCAGAAGAACAC  
ATCCGCACCTGACATTTTGGTATCTTTTCATCTGACCA (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%のパーセント同一性、または

GGGCTTGGCTCGAGCAGGGGGCGAGGGGATTCCTTCTTC  
CTGCCATAGCGTGG  
TCCCCCTCCCCCTATGGCAGGCAGAAAGCGGCACCTTCCCTCC  
CAATGACCGCGTCTTCGTCTG (配列番号3)

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パーセント同一性を有するマイクロ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、

CATCTCCAATGGCTGTACCACCTTGTCTGGGGGATGTGTACT  
TCTGAACCTTGTGTTGAATCTCATGGAGTTCAGAAGAACAC  
ATCCGCACCTGACATTTTGGTATCTTTTCATCTGACCA (配列番  
号2)

;またはGGGCTTGGCTCGAGCAGGGGGCGAGGGGATTCCT  
CTTCTTC CTGCCATAGCGTGGTCCCCCTCCCCCTATGGCAG  
GCAGAAGCGGCACCTTCCCTCCCAATGACCGCGTCTTCGT  
CTG (配列番号3)

を含む。

【0092】

別の態様では、マイクロRNAクラスターは、

AGGTATAATTGCTGTTGACAGTGAGCGACTGTAAACTGAGC  
TTGCTCTACTGTGAAGCCACAGATGGGTAGAGCAAGCAC  
GTTTACCCTGCTACTGCTCTCGGACTTCAAGGGGCTTCC  
CGGGCATCTCCATGGCTGTACCACCTTGTCTGGGGGATGTG  
TACTTCTGAACCTTGTGTTGAATCTCATGGAGTTCAGAAGAA  
ACACATCCGCACCTGACATTTTGGTATCTTTTCATCTGACCA  
GCTAGCGGGGCTGGCTCGAGCAGGGGGCGAGGGGATTCCTGC  
TTCTTCTGCTCATAGCGTGGTCCCCCTCCCCCTATGGCAGGC  
AGAAGCGGCACCTTCCCTCCCAATGACCGCGTCTTCGTCTG  
TCTG (配列番号31)

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

10

20

30

40

50

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パーセント同一性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、  
 A G G T A T A T T G C T G T T G A C A G T G A G C G A C T G T A A A C T G A G C  
 T T G C T C T A C T G T G A A G C C A C A G A T G G G T A G A G C A A G C A C  
 A G T T T A C C G C T G C C T A C T G C C T C G G A C T T C A A G G G G C T T C  
 C C G G G C A T C T C C A T G G C T G T A C C A C C T T G T C G G G G G A T G T  
 G T A C T T C T G A A C T T G T G T T G A A T C T C A T G G A G T T C A G A A G  
 A A C A C A T C C G C A C T G A C A T T T T G G T A T C T T T C A T C T G A C C  
 A G C T A G C G G G C C T G G C T C G A G C A G G G G G C G A G G G A T T C C G  
 C T T C T T C C T G C C A T A G C G T G G T C C C C T C C C C T A T G G C A G G  
 C A G A A G C G G C A C C T T C C C T C C C A A T G A C C G C G T C T T C G T C  
 (配列番号31)

10

を含む。

【0093】

別の態様では、レンチウイルスベクターが開示される。この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低分子RNA、またはHIV RNA配列をターゲティングすることができる少なくとも1つの低分子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が、ケモカイン受容体CCR5の産生を阻害することができる低分子RNAと、HIV RNA配列をターゲティングすることができる少なくとも1つの低分子RNAとを含む、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、またはそれらのバリエーションを含み得る。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を含み得る。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クラスターを含み得る。

20

【0094】

別の態様では、少なくとも1つの遺伝子エレメントは、  
 A G G T A T A T T G C T G T T G A C A G T G A G C G A C T G T A A A C T G A G C  
 T T G C T C T A C T G T G A A G C C A C A G A T G G G T A G A G C A A G C A C A  
 G T T T A C C G C T G C C T A C T G C C T C G G A C T T C A A G G G G C T T (配  
 列番号1)

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%、またはそれよりも高いパーセント同一性を有するマイクロ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、

A G G T A T A T T G C T G T T G A C A G T G A G C G A C T G T A A A C T G A G C  
 T T G C T C T A C T G T G A A G C C A C A G A T G G G T A G A G C A A G C A C A  
 G T T T A C C G C T G C C T A C T G C C T C G G A C T T C A A G G G G C T T (配  
 列番号1)

40

を含む。

【0095】

別の態様では、少なくとも1つの遺伝子エレメントは、  
 C A T C T C C A T G G C T G T A C C A C C T T G T C G G G G G A T G T G T A C T  
 T C T G A A C T T G T G T T G A A T C T C A T G G A G T T C A G A A G A A C A C  
 A T C C G C A C T G A C A T T T T G G T A T C T T T C A T C T G A C C A (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

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%、もしくはそれよりも高いパーセント同一性、または

GGGCCCTGGCTCGAGCAGGGGGCGAGGGATTCCGCTTCTTCTGCCATAGCGTGG

TCCCCCTCCCCCTATGGCAGGGCAGAAAGCGGCACCTTCCCTCCCAATGACCGCGTCTTCGTTCG (配列番号3)

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パーセント同一性を有するマイクロ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、

CATCTCCATGGCTGTACCACTTGTTCGGGGGATGTGTACTTCTGAACCTTGTGTTGAATCTCATGGAGTTCAGAAGAACAACATCCGCACCTGACATTTTGGTATCTTTCATCTGACCA (配列番号2)

;またはGGGCCCTGGCTCGAGCAGGGGGCGAGGGATTCCGCTTCTTCTGCCATAGCGTGGTCCCCCTCCCCCTATGGCAGGCAGAAGCGGCACCTTCCCTCCCAATGACCGCGTCTTCGTTCG (配列番号3)

を含む。

【0096】

別の態様では、マイクロRNAクラスターは、

AGGTATATTTGCTGTTGACAGTGAGCGACTGTAAACTGAGCTTGCTCTACTGTGAAGCCACAGATGGGTAGAGCAAGCACAGTTTACCCTGCTGCTACTGCTCGGACTTCAAGGGGCTTCCCGGGCATCTCCATGGCTGTACCACTTGTTCGGGGGATGTGTACTTCTGAACCTTGTGTTGAATCTCATGGAGTTCAGAAGAACACATCCGCACCTGACATTTTGGTATCTTTCATCTGACCAAGCTAGCGGGGCTGGCTCGAGCAGGGGGCGAGGGATTCCGCTTCTTCTGCCATAGCGTGGTCCCCCTCCCCCTATGGCAGGCAGAAGCGGCACCTTCCCTCCCAATGACCGCGTCTTCGTTC (配列番号31)

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パーセント同一性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、

AGGTATATTTGCTGTTGACAGTGAGCGACTGTAAACTGAGCTTGCTCTACTGTGAAGCCACAGATGGGTAGAGCAAGCACAGTTTACCCTGCTGCTACTGCTCGGACTTCAAGGGGCTTCCCGGGCATCTCCATGGCTGTACCACTTGTTCGGGGGATGTGTACTTCTGAACCTTGTGTTGAATCTCATGGAGTTCAGAAGAACACATCCGCACCTGACATTTTGGTATCTTTCATCTGACCAAGCTAGCGGGGCTGGCTCGAGCAGGGGGCGAGGGATTCCGCTTCTTCTGCCATAGCGTGGTCCCCCTCCCCCTATGGCAGGCAGAAGCGGCACCTTCCCTCCCAATGACCGCGTCTTCGTTC (配列番号31)

を含む。

【0097】

10

20

30

40

50

別の態様では、レンチウイルス粒子を発現させるためのレンチウイルスベクター系が提供される。この系は、本明細書に記載されるレンチウイルスベクターと；好ましくは細胞に感染するように最適化されたエンベロープタンパク質を発現させるための少なくとも1つのエンベローププラスミドと；目的の遺伝子、例えば *gag*、*pol*、および *rev* 遺伝子のいずれかを発現させるための少なくとも1つのヘルパープラスミドとを含み、レンチウイルスベクター、少なくとも1つの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にトランスフェクトされると、レンチウイルス粒子がパッケージング細胞によって産生され、このレンチウイルス粒子は、目的の標的配列の調整、例えばケモカイン受容体 *CCR5* の産生の阻害、または *HIV RNA* 配列のターゲティングが可能である。

10

## 【0098】

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、好ましくは細胞に感染するように最適化された少なくとも1つのエンベロープタンパク質と、本明細書に記載されるレンチウイルスベクターとを含む。エンベロープタンパク質は、T細胞に感染するように最適化されていてよい。好ましい実施形態では、エンベロープタンパク質は、*CD4* + T細胞に感染するように最適化されている。

## 【0099】

別の態様では、改変細胞が開示される。諸実施形態では、改変細胞は *CD4* + T細胞である。諸実施形態では、*CD4* + T細胞は、本明細書に記載されるレンチウイルス粒子に感染している。諸実施形態では、*CD4* + T細胞はまた、刺激剤による過去の免疫化に基づいて *HIV* 抗原を認識するように選択されたものである。さらなる好ましい実施形態では、*CD4* + T細胞により認識される *HIV* 抗原は、*gag* 抗原を含む。さらなる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感染した後に低下したレベルの *CCR5* を発現する。

20

## 【0100】

別の態様では、治療処置レジメンのための被験体を選択する方法が開示される。本方法は、概して、有効量の第1の刺激剤で被験体を免疫化するステップと；被験体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つの因子に関連付けられる第1の定量化可能な測定値を決定するステップと；*PBMC* を治療有効量の第2の刺激剤と *ex vivo* で接触させ、*PBMC* に関連する少なくとも1つの因子に関連付けられる第2の測定値を決定するステップとを含み、ここで、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と異なる（例えば、より高い）場合、被験体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細胞の増殖または *IFN* ガンマ産生であり得る。

30

## 【0101】

ヒト免疫不全ウイルス (*HIV*)

一般的に「*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* とは、免疫系の進行性不全が生命に関わる日和見感染およびがんを蔓延させる状態である。処置しなければ、*HIV* 感染後の平均生存期間は、*HIV* サブタイプに応じて9~11年と推定される。*HIV* による感染は、血液、精液、膣液、尿道球腺液 (*pre-ejaculate*)、唾液、涙、リンパ液もしくは脳脊髄液、または母乳を含むがこれらに限定されない体液の移入によって起こる。*HIV* は、感染した個体において遊離ウイルス粒子として存在する場合もあれば、感染した免疫細胞内に存在する場合もある。

40

## 【0102】

*HIV* は、ヘルパーT細胞などのヒト免疫系に不可欠な細胞に感染するが、向性は *HIV* サブタイプ間で異なり得る。*HIV* 感染に対して特に感受性であり得る免疫細胞としては、*CD4* + T細胞、マクロファージ、および樹状細胞が挙げられるが、これらに限定されない。*HIV* 感染は、感染していないバ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による殺傷、および感染細胞を認識する *CD8* 細胞傷害性リンパ球によ

50

る感染CD4 + T細胞の殺傷を含むがこれらに限定されないいくつかの機構により、低レベルのCD4 + T細胞をもたらす。CD4 + T細胞数が臨界レベル未満に低下すると、細胞媒介性免疫が失われ、日和見感染およびがんに対して身体が、次第により感受性になる。

#### 【0103】

HIVは構造的に多くの他のレトロウイルスと異なる。RNAゲノムは、少なくとも7つの構造的目印(LTR、TAR、RRE、PE、SLIP、CRS、およびINS)、および19種のタンパク質をコードする少なくとも9つの遺伝子(gag、pol、env、tat、rev、nef、vif、vpr、vpu、ならびに場合によってはtat、envおよびrevの融合物である10番目のtev)からなる。これらの遺伝子のうちの3つ、すなわちgag、pol、およびenvは、新しいウイルス粒子のための構造タンパク質を作るのに必要な情報を含む。

10

#### 【0104】

HIVは主にCD4 + T細胞において複製し、細胞の破壊または調節不全を引き起こして宿主免疫を低下させる。HIV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この細胞に影響する細胞病理または宿主免疫系による検出のレベル未満に減少する潜伏状態に入る場合があるため、HIVは処置が困難であり、長期間の高活性抗レトロウイルス薬療法(HAART)の後でさえも根絶されていない。大多数の症例において、HAARTによって生存が延長され得るとはいえ、HIV感染は致命的疾患を引き起こす。

20

#### 【0105】

HIVとの闘いの主な目標は、疾患を治癒するための戦略を展開することである。長期のHAARTはこの目標を遂げていないため、研究者らは代替的手技に目を向けている。治療的免疫化(感染が起こった後のワクチンの使用)により宿主免疫を改善しようとする初期の取り組みによる影響は、僅かまたは皆無であった。同様に、処置強化による影響は、中程度または皆無であった。

#### 【0106】

遺伝子療法の使用により多少の進歩があったが、前向きな結果は散発的であり、宿主細胞へのウイルスの侵入において決定的な役割を果たす、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稀なヒトの間でしか見出されていない。しかしながら、多くの研究者は、遺伝子療法がHIVの治癒をいずれ達成する見込みが最も高いと楽観している。

30

#### 【0107】

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、すべてのHIVの身体からの完全な根絶を含む場合も含まない場合もある機能的治癒を達成することができる。上記に言及したように、機能的治癒は、HAARTを過去に必要としたHIV+の個体が、HAARTをより低い用量もしくは断続的な用量で使用した場合に、ウイルス複製が低いもしくは検出不可能な状態で生存し得るか、またはHAARTを完全に中止できる可能性があるような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場合、機能的治癒は、低レベルのウイルス複製を維持し、疾患進行を減速または終結させるために補助療法が未だ必要である可能性があり得る。機能的治癒の起こり得る転帰は、再発の可能性のすべてを防止するような、HIVの最終的な根絶である。

40

#### 【0108】

機能的治癒の達成における主な障害は、HIV自体の基礎生物学にある。ウイルス感染は、ほぼすべての免疫機能に重要なCD4 + T細胞を欠失させる。最も重要なことには、HIV感染およびCD4 + T細胞の枯渇は、個々の細胞の活性化を必要とする。活性化は、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 + T細胞クローンの特異的な機構である。

#### 【0109】

HIVの場合、感染により、HIV特異的T細胞の集団が活性化されて感染し、結果と

50

して、ウイルスに対してさほど特異的でない他のT細胞より先に枯渇するため、ウイルスに対する免疫系の防御が効果的に損なわれる。HIV特異的T細胞の応答能は長期HART中に復元されるが、HARTが中断されると、ウイルス感染のリバウンドによってこのプロセスが繰り返され、ウイルス特異的細胞が再度欠失させ、疾患進行の時間軸が元に戻る。

#### 【0110】

明らかに、機能的治癒は、HARTが中断されたら宿主の自然免疫がHIVに対抗してこれを制御できるよう、十分なHIV特異的CD4 T細胞が保護されている場合のみ可能である。一実施形態では、本発明は、遺伝子療法の有効性を改善してHIV疾患の機能的治癒をもたらすための方法および組成物を提供する。別の実施形態では、本発明は、HIVに対する宿主免疫を増強して機能的治癒をもたらすための方法および組成物を提供する。さらに別の実施形態では、本発明は、患者においてHIV特異的CD4 T細胞を濃縮して機能的治癒を達成するための方法および組成物を提供する。

10

#### 【0111】

本発明の一実施形態では、処置は、被験体のHIV特異的CD4 T細胞を、約100%、約200%、約300%、約400%、約500%、約600%、約700%、約800%、約900%、または約1000%濃縮する。

#### 【0112】

##### 遺伝子療法

ウイルスベクターは、疾患を治療または防止する目的で遺伝子構築物を宿主細胞に送達するために使用される。

20

#### 【0113】

遺伝子構築物は、既存の欠損を補正または補完する機能性遺伝子または遺伝子の一部分、調節タンパク質をコードするDNA配列、アンチセンス、短鎖相同RNA、長鎖非コードRNA、低分子干渉RNAなどを含む調節RNA分子をコードするDNA配列、および病状を変更するのに重要な細胞因子について競合するようにデザインされた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み得るが、これらに限定されない。遺伝子療法は、これらの治療用遺伝子構築物を標的細胞に送達して、特定の疾患の処置または緩和をもたらすことを伴う。

#### 【0114】

HIV疾患の処置において遺伝子療法を利用する複数の取り組みが進行中であるが、これまでの結果は不十分である。CCR5遺伝子(CCR5デルタ32として公知の対立遺伝子)の自発的な欠失を有する稀なHIV患者においては、少数の処置成功例が得られた。

30

#### 【0115】

CCR5の全体的な発現を低下させ、かつ/またはHIV複製の低下に役立てるため、レンチウイルスにより送達されるヌクレアーゼまたは遺伝子欠失/改変の他の機構を使用することができる。少なくとも1つの研究は、CCR5デルタ32の遺伝的バックグラウンドを有する患者にレンチウイルスが投与されたとき、疾患の処置が成功したと報告している。しかしながら、これは唯一の成功例であり、CCR5デルタ32の遺伝子型を有しない多くの他の患者は処置に成功していない。結果として、個々のウイルスベクター構築物の性能、および機能的なHIVの治癒を達成するための戦略を通じたベクターの使用の改善の両方の点から、HIVに対するウイルス遺伝子療法の性能を改善させる実質的な必要性が存在する。

40

#### 【0116】

例えば、一部の既存の療法は、細胞をHIV感染に耐性にする試みにおいて、CCR5の一部を欠失させるジンクフィンガーヌクレアーゼに依拠する。しかしながら、最適な処置の後でさえ、T細胞の30%しかヌクレアーゼによって改変されておらず、改変されたもののうち、HIV感染を防止するように改変されていたのは、CD4 T細胞集団全体の10%のみであった。対照的に、開示されている方法では、実質的にすべての細胞が

50

、H I V感染を可能にするために必要なレベル未満にC C R 5発現が低減しているレンチウイルス導入遺伝子を有することになる。

【 0 1 1 7 】

開示されている方法の目的では、遺伝子療法は、親和性増強T細胞受容体、C D 4 T細胞上(または代替的にはC D 8 T細胞上)のキメラ抗原受容体、ウイルスタンパク質に起因する細胞死を回避するためのシグナル伝達経路の改変、T R E X、S A M H D 1、M x AまたはM x Bタンパク質、A P O B E C複合体、T R I M 5アルファ複合体、テザリン(B S T 2)、および哺乳動物細胞においてH I V複製を低減させることができると特定された同様のタンパク質を含むH I V制限エレメントの発現増加を含み得るが、これらに限定されない。

10

【 0 1 1 8 】

免疫療法

歴史的に、ワクチンは、天然痘、ポリオ、麻疹、および黄熱病をはじめとする致命的な感染性疾患に対する対抗手段の主力であった。残念ながら、現在認可されているH I V用ワクチンはない。H I Vウイルスは、免疫系から逃れる独特の方法を有し、ヒトの身体は、これに対して有効な免疫応答を確立することができないと思われる。結果として、科学者らは、H I Vからの保護を提供するために何が必要かを明確に把握していない。

【 0 1 1 9 】

しかしながら、免疫療法は、従来のワクチンのアプローチによってこれまで対処されなかった解決策を提供し得る。生物学的療法とも呼ばれる免疫療法は、感染またはがんと闘うために身体の自然防御能を後押しするようにデザインされた処置の一種である。免疫療法は、免疫系機能の改善、ターゲティング、または復旧のために、身体または実験室のいずれかで作られる材料を使用する。

20

【 0 1 2 0 】

開示される本発明の一部の実施形態では、宿主の抗H I V免疫を増加させる目的でH I V特異的C D 4 T細胞集団を濃縮するために、免疫療法のアプローチが使用され得る。開示される本発明の一部の実施形態では、宿主の抗H I V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、組み込み型または非組み込み型のレンチウイルスベクターが使用され得る。本発明のさらに別の実施形態では、宿主の免疫応答を増加させるために好適なビヒクルおよび/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、死滅粒子、ウイルス様粒子、H I Vペプチドまたはペプチド断片、組換えウイルスベクター、組換え細菌ベクター、精製されたサブユニットまたはプラスミドD N Aを含むがこれらに限定されない、H I Vタンパク質を含むワクチンが、ウイルス特異的T細胞または抗体の集団を濃縮するために使用される場合があり、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H I Vにターゲティングされた遺伝子療法の使用により、さらに増強することができる。

30

【 0 1 2 1 】

方法

一態様では、本開示は、ウイルスベクターを使用してH I V疾患の機能的治癒を達成するための方法を提供する。本方法は、概して、H I V特異的C D 4 T細胞の割合を増やすための免疫療法と、その後に必要な応じてH I VならびにC C R 5およびC X C R 4の阻害剤を送達するためのレンチウイルス形質導入とを含む。

40

【 0 1 2 2 】

一実施形態では、本方法は、H I V特異的C D 4 T細胞の割合を増やすための第1の刺激事象を含む。第1の刺激は、ワクチンを含むがこれに限定されない、患者のH I V特異的C D 4 + T細胞を濃縮するために好適な任意の薬剤のうちの1つまたは複数の投与を含み得る。

【 0 1 2 3 】

治療用ワクチンは、処置が行われている地理的領域の優勢なウイルス型を代表するタンパク質配列を有する1つまたは複数のH I Vタンパク質を含み得る。治療用ワクチンは、

50

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、ならびに免疫化の方法を含む。ワクチン接種は、当技術分野で公知の標準的方法に従って施してよく、HIV患者は、免疫化とその後のレンチウイルス形質導入を含むex vivoでのリンパ球の培養との間の中間期(interval)中に抗レトロウイルス薬療法を継続してよい。

#### 【0124】

一部の実施形態では、HIV+患者をHIVワクチンで免疫化すると、HIV特異的CD4 T細胞の頻度が、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)だけ増加する。ワクチンは、開示されているレンチウイルスベクター、他のウイルスベクター、またはワクチン送達系として使用される他の細菌ベクターを含む、いずれの臨床的に利用されるまたは実験用の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、ウイルス様粒子(VLP)をコードして、より高力価の中和抗体を誘導する。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に関するペプチドまたはペプチド断片をコードする。代替的に、開示されている方法で使用されるHIVワクチンは、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み得る。

#### 【0125】

一実施形態では、本方法は、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、ビヒクル、ならびに再刺激の方法を使用した、治療用ワクチン接種により過去に免疫化された個人または患者由来のCD4 T細胞のex vivoでの再刺激を含む。ex vivoでの再刺激は、in vivoでの免疫化に使用されたものと同じワクチンもしくは免疫刺激性の化合物を使用して行われてもよく、またはin vivoでの免疫化に使用されたものとは異なるワクチンもしくは免疫刺激性の化合物を使用して行われてもよい。さらに一部の実施形態では、患者は、この個体がHIVタンパク質に対して十分に高い抗原特異的CD4 T細胞応答を有していれば、治療用ワクチン接種またはCD4 T細胞の再刺激を事前に必要としない。これらの実施形態では、このような患者は、機能的治癒を達成するために、開示されているウイルスベクターの投与しか必要としない場合がある。

#### 【0126】

諸実施形態では、末梢血単核細胞(PBMC)が白血球除去によって得られ、ex vivoで処置されて、約 $1 \times 10^{10}$ 個のCD4 T細胞が得られ、このうち約0.1%、約1%、約5%、または約10%、または約30%が、抗原応答という点でHIV特異的であり、また、開示されているレンチウイルスベクターにより送達された治療用導入遺伝子を有することからHIV耐性でもある。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細胞が再刺激のために単離され得る。ex vivoでの再刺激のためには、任意の好適な量のCD4 T細胞が単離される。

#### 【0127】

単離されたCD4 T細胞は、過去の治療用ワクチン接種に存在した抗原を含み得るHIVワクチン抗原による再刺激の間中、適切な培地において培養され得る。長期のex vivo培養中のウイルスの再出現を防止するため、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治療薬を添加してもよい。CD4 T細胞の再刺激は、培養物中のHIV特異的CD4 T細胞の割合を増やすために使用される

10

20

30

40

50

。同じ手順は、精製により得られた末梢血単核細胞を含むより少ない血液量を使用してHIV特異的T細胞を特定し、この亜集団の頻度を測定する、分析目的で使用することもできる。

#### 【0128】

PBMC画分は、HIV特異的CD4 T細胞について、*in vivo*免疫化のために過去に使用されたワクチンの成分と一致するかまたはこれを補完するHIVタンパク質とこれらの細胞を接触させることによって濃縮することができる。*ex vivo*での再刺激は、HIV特異的CD4 T細胞の相対的な頻度を約5、約10、25、約50、約75、約100、約125、約150、約175、または約200倍増加させ得る。

#### 【0129】

本方法は、CD4 T細胞の*in vivo*での治療的免疫化および*ex vivo*での再刺激を、*ex vivo*でのレンチウイルス形質導入および培養と組み合わせるステップをさらに含む。

#### 【0130】

よって、一実施形態では、HIV特異的CD4 T細胞が濃縮されている再刺激したPBMC画分は、治療用抗HIVレンチウイルスまたは他のベクターを形質導入され、そのような形質導入のために十分な期間、例えば約1～約21日間、最大約35日間などにわたって培養下に維持され得る。代替的に、これらの細胞は、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日間にわたって培養されてもよい。よって、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日間にわたって培養され得る。

#### 【0131】

さらなる実施形態では、形質導入された細胞が十分な期間にわたって培養されたら、形質導入されたCD4 T細胞は、元の患者に注入し戻される。注入は、当技術分野で公知の様々なデバイスおよび方法を使用して行うことができる。一部の実施形態では、注入には、再生着の効率を上昇させるためにシクロホスファミドまたは同様の化合物による前処置が付随する場合がある。

#### 【0132】

一部の実施形態では、処置プロセスの間中継続された被験体の抗レトロウイルス薬療法レジメンに、CCR5にターゲティングされた療法が付加され得る。CCR5にターゲティングされた療法の例としては、マラビロク(CCR5アンタゴニスト)またはラパマイシン(CCR5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、抗レトロウイルス薬療法が停止される場合があり、被験体がウイルスのリバウンドについて試験される場合がある。リバウンドが起こらなければ、アジュバント療法を除去してもよく、被験体をウイルスのリバウンドについて再度試験することができる。

#### 【0133】

様々な実施形態では、cARTもしくはHAARTを含む抗レトロウイルス薬療法を低減した場合またはこれを使用しない場合、かつアジュバント療法を低減した場合またはこれを使用しない場合に、約26週間にわたってウイルス抑制が持続すれば、HIVの機能的治癒とみなすことができる。機能的治癒の他の定義は本明細書に記載されている。

#### 【0134】

開示されている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、目的の、少なくとも1種、少なくとも2種、少なくとも3種、少なくとも4種、もしくは少なくとも5種の遺伝子、または少なくとも6種の遺伝子、または少なくとも7種の遺伝子、または少なくとも8種の遺伝子、または少なくとも9種の遺伝子、または少なくとも10種の遺伝子、または少なくとも11種の遺伝子、または少なくとも12種の遺伝子をコー

10

20

30

40

50

ドし得る。H I Vにターゲティングされた遺伝子療法の多用途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って産生される毒素に対する抗体、( i i ) 免疫細胞の成長または機能に必要なとされ、かつ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において遭遇される免疫調節不全に対する治療薬であり得る、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*でH I Vの成長を抑制する因子、( 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に関連する特定の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するアンチセンスD N AまたはR N A、( v i ) H I Vに関連する特定の受容体もしくはペ 10  
 プチドまたはH I Vに関連する宿主タンパク質に対する低分子干渉R N A、あるいは( v i i ) H I VまたはA I D Sを処置するために使用され得る多様な他の治療上有用な配列を含むがこれらに限定されない、遺伝子または核酸配列をコードし得る。

#### 【 0 1 3 5 】

開示されている方法で使用され得るH I Vにターゲティングされた遺伝子療法のさらなる例としては、親和性増強T細胞受容体、C D 4 T細胞上(または代替的にはC D 8 T細胞上)のキメラ抗原受容体、ウイルスタンパク質に起因する細胞死を回避するためのシグナル伝達経路の改変、T R E X、S A M H D 1、M x AまたはM x Bタンパク質、A P O B E C複合体、T R I M 5アルファ複合体、テザリン(B S T 2)、および哺乳動物細胞においてH I V複製を低減させることができると特定された同様のタンパク質を含む 20  
 H I V制限エレメントの発現増加が挙げられるが、これらに限定されない。

#### 【 0 1 3 6 】

一部の実施形態では、患者は、本発明の方法に従う処置を受けると同時にc A R TまたはH A A R T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処置された後にc A R TまたはH A A R Tを受けてもよい。一部の実施形態では、c A R TまたはH A A R Tは、本発明の方法に従う処置の間中維持され、患者は、血液中のH I Vウイルス負荷および血液中のレンチウイルスを形質導入したC D 4 T細胞の頻度についてモニタリングされ得る。好ましくは、本発明の方法に従って処置される前にc A R TまたはH A A R Tを受けた患者は、本発明の方法に従う処置の後にc A R TまたはH A A R Tを中止または低減することができる。 30

#### 【 0 1 3 7 】

有効度の目的上、形質導入されたH I V特異的C D 4 T細胞の頻度は、遺伝子療法の効果の新規の代替マーカーであり、本明細書においてより詳細に論じられるように決定することができる。

#### 【 0 1 3 8 】

##### 組成物

様々な態様では、本開示は、感受性細胞へのH I Vの侵入を阻害する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。例として、本明細書による1つの作用機構は、感受性細胞へのウイルス進入速度を低減させるため、C C R 5および/またはC X C R 4ケモカイン受容体に対するm R N Aレベルを低下させることである。 40

#### 【 0 1 3 9 】

代替的に、開示されているレンチウイルスベクターは、入ってくるH I VゲノムR N Aの安定性を低減させることによってH I V感染細胞の形成を阻害することができる。また、さらに別の実施形態では、開示されているレンチウイルスベクターは、潜伏感染細胞からのH I V産生を防止することができ、その作用機構は、短鎖相同R N A、低分子干渉R N A、または他の調節R N A種を含む阻害性R N Aの作用により、ウイルスR N A配列の不安定性を引き起こすことである。

#### 【 0 1 4 0 】

開示されている治療用レンチウイルスは概して、2種類の遺伝子カーゴのうち少なくとも1種を含む。第1に、このレンチウイルスは、感受性細胞へのH I Vの侵入に重要なケ 50

モカイン受容体 C C R 5 および / または C X C R 4 の産生を阻害することができる低分子 R N A の発現を指向する遺伝子エレメントをコードし得る。第 2 の種類の遺伝子カーゴは、逆転写、R N A スプライシング、タンパク質を産生する R N A 翻訳、または粒子を産生し感染を伝播するウイルスゲノム R N A のパッケージングを防止する目的で、H I V の R N A 配列をターゲティングする低分子 R N A 分子を発現することができる構築物を含む。例示的な構造が図 3 に図示されている。

#### 【 0 1 4 1 】

図 3 (上パネル) に示されるように、例示的な構築物は、多数のセクションまたは成分を含み得る。例えば、一実施形態では、例示的な L V 構築物は、以下のセクションまたは成分を含み得る。

- ・ R S V (ラウス肉腫ウイルス末端反復配列 (long terminal repeat))、
- ・ 5' L T R (染色体組み込み後にベクターの複製を防止するために切り詰めることができる H I V 末端反復配列の一部)、
- ・ P s i (パッケージング中のウイルス粒子へのベクター R N A ゲノムの組み込みを可能にするパッケージングシグナル)、
- ・ R R E (Rev 応答エレメントを付加すると、R N A を細胞の核から細胞質に動員することによって導入遺伝子からの発現を改善することができる)、
- ・ c P P T (宿主細胞染色体への導入遺伝子の組み込みの前に第二鎖 D N A 合成を促進するポリプリンクトラクト (poly purine tract))、
- ・ プロモーター (プロモーターは、組み込まれた導入遺伝子からの R N A 転写を開始してマイクロ R N A クラスター (または構築物の他の遺伝子エレメント) を発現し、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得る)、
- ・ 抗 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 をターゲティングして細胞表面上のその発現を低減させるマイクロ R N A)、
- ・ 抗 Rev / Tat (H I V の Rev コード領域と Tat コード領域との間の接合部における H I V のゲノム R N A またはメッセンジャー R N A をターゲティングするマイクロ R N A。本出願では、miRNA Tat と呼称されるか、または同様の説明が与えられる場合がある)、
- ・ 抗 Vif (Vif コード領域内の H I V のゲノム R N A またはメッセンジャー R N A をターゲティングするマイクロ R N A)、
- ・ 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は、核の R N A 輸送を促進するために使用され得るさらなるベクター成分である)、および
- ・ デルタ U 3 3' L T R (ベクターの安全性を改善するために U 3 領域の一部を欠失させた、H I V の 3' 末端反復配列の改変バージョン)。

#### 【 0 1 4 2 】

上記の成分は単なる例であること、また、構築物が H I V 遺伝子の発現を防止し、感染の伝播を減少させることができる限り、このような成分を再編成したり、他のエレメントと置換したり、または別様に変更したりしてよいことは、当業者には認識されよう。

#### 【 0 1 4 3 】

本発明のベクターは、上記のいずれかまたは両方の種類の遺伝子カーゴ (すなわち、遺伝子の発現を指向する遺伝子エレメント、または翻訳もしくは転写を防止することができる siRNA、shRNA、もしくは miRNA などの低分子 R N A) を含んでよく、本発明のベクターは、H I V の処置または診断の目的でさらに有用な産物をコードしてもよい。例として、一部の実施形態では、これらのベクターは、遺伝子改変細胞を in vivo で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ことを目的として、緑色蛍光タンパク質 (GFP) をコードしてもよい。

#### 【 0 1 4 4 】

開示されているベクターに組み込まれる遺伝子エレメントの組み合わせは、特に限定されない。例えば、本明細書におけるベクターは、単一の低分子 R N A、2 個の低分子 R N

10

20

30

40

50

A、3個の低分子RNA、4個の低分子RNA、5個の低分子RNA、6個の低分子RNA、7個の低分子RNA、8個の低分子RNA、9個の低分子RNA、または10個の低分子RNA、または11個の低分子RNA、または12個の低分子RNAをコードしてよい。このようなベクターは、低分子RNAと共働して機能してHIVの発現および感染を防止するように他の遺伝子エレメントをさらにコードしてもよい。

【0145】

治療用レンチウイルスが、プロモーター領域、調節RNAのターゲティング、および調節RNAの種類代わりに代替配列を使用し得ることは、当業者には理解されよう。さらに、本開示の治療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の変化を含む場合があり、これらの変化は、*in vitro*の産生レベルを上昇させるために必要とされる。

10

【0146】

レンチウイルスベクター系

本明細書の様々な態様および実施形態に従うレンチウイルスピリオン(粒子)は、ピリオン(ウイルス粒子)を産生するために必要なウイルスタンパク質をコードするベクター系によって発現される。様々な実施形態では、逆転写および組み込みのための、プロモーターに作動可能に連結した、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有する1つのベクターが提供される。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。他の実施形態では、ウイルスカプシドを形成するための、プロモーターに作動可能に連結した、レンチウイルスGagタンパク質をコードする核酸配列を含有するベクターが提供される。諸実施形態では、このgag核酸配列は、pol核酸配列の少なくとも一部とは別個のベクター上にある。他の実施形態では、gag核酸は、polタンパク質をコードする全てのpol核酸配列とは別個のベクター上にある。

20

【0147】

本明細書のベクターには多数の改変を行ってよく、これらを使用して粒子を作り出すと、野生型復帰変異体を得る機会がさらに最小限に抑えられる。これらは、LTRのU3領域の欠失、tat欠失、およびマトリクス(MA)欠失を含むが、これらに限定されない。諸実施形態では、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のヌクレオチドを含有しない。

30

【0148】

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の核酸配列を含有しない。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有する別個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有しない。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。

【0149】

別の実施形態では、エンベロープタンパク質は、レンチウイルスに由来しないが、異なるウイルスに由来する。結果として得られる粒子は、シュードタイプ化粒子と呼ばれる。エンベロープの適切な選択により、実質的に任意の細胞に「感染」することができる。例えば、インフルエンザウイルス、VSV-G、アルファウイルス(セムリキ森林ウイルス、シンドビスウイルス)、アレナウイルス(リンパ球性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、デングウイルス、C型肝炎ウイルス、GBウイルス)、ラプトウイルス(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(ムンプスまたは麻疹)、およびオルソミクソウイルス(インフルエンザウイルス)のものなどの細胞内区画をターゲティング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。好ましくは使用することができる他のエンベロープとしては、MLV-E、MLV-A、およびGALVなどのモロニー白血病ウイルス由来のものが挙げられる。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に特に好ましい。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、脳へ

40

50

の送達には、ドーパミン受容体などの特定の受容体のターゲティングを使用することができる。別の標的は血管内皮であり得る。これらの細胞は、フィロウイルスエンベロープを使用してターゲティングすることができる。例えば、転写後修飾によってGPになるエボラのGP、およびGP<sub>2</sub>糖タンパク質である。別の実施形態では、シュードタイプ化エンベロープ（例えば、FIVまたはSHIV [米国特許第5,654,195号]）を有する異なるレンチウイルスカプシドを使用することができる。SHIVシュードタイプ化ベクターは、サルなどの動物モデルにおいて容易に使用することができる。

#### 【0150】

本明細書に提供されるレンチウイルスベクター系は、典型的には、gag、pol、またはrev遺伝子のうちの少なくとも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。gag、pol、およびrev遺伝子は、それぞれが個々のプラスミドで提供される場合もあれば、1つまたは複数の遺伝子が同じプラスミドと一緒に提供される場合もある。一実施形態では、gag、pol、およびrev遺伝子は、同じプラスミドで提供される（例えば図4）。別の実施形態では、gagおよびpol遺伝子が第1のプラスミドで提供され、rev遺伝子が第2のプラスミドで提供される（例えば図5）。したがって、3ベクター系および4ベクター系はいずれも、本明細書に記載されるレンチウイルスを産生するために使用され得る。諸実施形態では、治療用ベクター、少なくとも1つの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、例えば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、293T/17 HEK細胞株である。治療用ベクター、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。

#### 【0151】

別の態様では、レンチウイルス粒子を発現させるためのレンチウイルスベクター系が開示される。この系は、本明細書に記載されるレンチウイルスベクターと；細胞に感染するように最適化されたエンベロープタンパク質を発現させるためのエンベローププラスミドと；gag、pol、およびrev遺伝子が発現させるための少なくとも1つのヘルパープラスミドとを含み、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、レンチウイルス粒子がパッケージング細胞株によって産生され、このレンチウイルス粒子は、ケモカイン受容体CCR5の産生の阻害、またはHIV RNA配列のターゲティングが可能である。

#### 【0152】

別の態様では、本明細書では治療用ベクターとも呼ばれるレンチウイルスベクターは、次のエレメント：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）を含む。別の態様では、置換、欠失、付加、または変異による配列変化を使用して、本明細書で参照される配列を改変することができる。

#### 【0153】

別の態様では、ヘルパープラスミドは、次のエレメント：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）を含む。別の態様では、gagおよびpol遺伝子が発現させるための第1のヘルパープラスミドと、rev遺伝子が発現させるための第2の別個のプラスミドとを含むように、ヘルパープラスミドを改変してよい。別の態様では、置換、欠失、付加、または変異による配列変化を使用して、本明細書で参照される配列を改変することが

10

20

30

40

50

できる。

【0154】

別の態様では、エンベローププラスミドは、次のエレメント：RNAポリメラーゼI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）を含む。別の態様では、置換、欠失、付加、または変異による配列変化を使用して、本明細書で参照される配列を改変することができる。

【0155】

様々な態様では、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、ベクターの機能を損失することなく、様々なエレメントの置換、付加、除去、または変異によって改変される。例えば、限定されるものではないが、次のエレメントは、パッケージング系を構成するプラスミドにおいて同様のエレメントに取って代わることができる：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）プロモーターは、CMVまたはCAGプロモーターに取って代わることができる。SV40ポリAおよびbGHポリAは、ウサギベータグロビンポリAに取って代わることができる。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されていてよい。VSV-G糖タンパク質は、ネコ内在性ウイルス（RD114）、テナガザル白血病ウイルス（GALV）、狂犬病（FUG）、リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス（LCMV）、インフルエンザA家禽ペストウイルス（fowl plague virus）（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）の膜糖タンパク質で置換され得る。

【0156】

様々なレンチウイルスパッケージング系を商業的に取得することができ（例えば、Origene Technologies, Inc.、Rockville、MDのLenti-vpakパッケージングキット）、本明細書に記載されるようにデザインすることもできる。さらに、レンチウイルス粒子の産生効率を含め、任意の数の関連要素を改善するためにレンチウイルスパッケージング系の諸態様を置換または改変することは、当業者の技能の範囲内である。

【0157】

バイオアッセイ

様々な態様では、本発明は、機能的治癒の達成するための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特異的なCD4 T細胞の頻度を測定することにより、開示されている免疫化および処置の方法の有効度を測定するための方法を提供する。HIV特異的CD4 T細胞が認識可能である。なぜなら、とりわけ、これらが増殖し、細胞表面マーカーの組成を変更し、リン酸化を含むシグナル伝達経路を誘導し、かつ/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定のマーカータンパク質を発現するからである。特定の応答するCD4 T細胞は、例えば、フローサイトメトリーソーティング、磁性ビーズ分離、または抗原特異的CD4 T細胞の単離の他の認識されている方法を使用したHIV特異的細胞のソーティングを可能にする、標識されたモノクローナル抗体またはmRNA配列の特異的なinsitu増幅を使用して認識される。単離されたCD4 T細胞を試験すると、組み込まれた治療用レンチウイルスを有する細胞の頻度が決定される。質量分析、PCR、ELISAまたは抗体染色と併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を使用して、HIVに対する応答性および組み込まれた治療用レンチウイルスの存在を確認することもできる。

【0158】

よって、様々な実施形態では、本発明による処置の適用（例えば、（a）免疫化、（b）ex vivoでの白血球/リンパ球の培養、（c）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、ビヒクルによる再刺激、なら

びに (d) 濃縮された形質導入 T 細胞の注入) の後に続いて患者をアッセイすることで、処置の有効度を決定することができる。体内の標的 T 細胞の閾値は、所定値における、例えば、治療用レンチウイルスからの遺伝子改変を有する約  $1 \times 10^8$  個の HIV 特異的 CD4 T 細胞における機能的治癒を測定するように確立してよい。代替的に、この閾値は、患者の体内で約  $1 \times 10^5$ 、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 T 細胞であってもよい。

#### 【0159】

治療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 T 細胞は、フローサイトメトリー、セルソーティング、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、ハイスループットシーケンシング、RNA シーケンシング、オリゴヌクレオチドプライマー伸長、または当技術分野で公知の他の方法などであるがこれらに限定されない、任意の好適な方法を使用して決定することができる。

#### 【0160】

遺伝子改変を有する抗原特異的 T 細胞を定義するための方法は当技術分野で公知であるが、このような方法を利用し、有効度の標準的な尺度として組み込み型または非組み込み型の遺伝子療法構築物を含む HIV 特異的 T 細胞を特定することを組み合わせることは、本明細書において様々に記載されるように、HIV 処置の分野において新規の概念である。

#### 【0161】

##### 用量および剤形

開示されている方法および組成物は、HIV + 患者をその疾患の様々な段階で処置するために使用され得る。したがって、投薬レジメンは、患者の状態および投与方法に基づいて異なり得る。

#### 【0162】

様々な実施形態では、初回の *in vivo* 免疫化のための HIV 特異的ワクチンは、必要とする被験体に様々な用量で投与される。一般に、筋肉内注射により送達されるワクチンは、不活化ウイルス粒子から調製された全ウイルスタンパク質、ウイルス様粒子、または組換え系から精製されたウイルスタンパク質もしくはウイルス調製物から精製されたもののいずれかの HIV タンパク質を、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  $200 \mu\text{g}$  含む。組換えウイルスベクターまたは細菌ベクターは、記載されるありとあらゆる経路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  $50 \mu\text{g}$  の好適なアジュバント分子を含み、注射 1 用量あたり  $0.1$  ~  $5 \text{ml}$  の体積の油、食塩水、緩衝液、または水に懸濁され、可溶性調製物であってもエマルジョン調製物であってもよい。一部のウイルスベクター化もしくは細菌ベクター化ワクチン、融合タンパク質、リボソーム製剤、または同様の調製物を含む、経口的、直腸、口腔、性器粘膜、または鼻腔内に送達されるワクチンは、より高い量のウイルスタンパク質およびアジュバントを含有してもよい。真皮、真皮下 (*sub-dermal*)、または皮下のワクチンは、経口的、直腸、または鼻腔内に送達されるワクチンにより似ている量のタンパク質およびアジュバントを利用する。初回免疫化に対する応答に応じて、ワクチン接種は、同じかまたは代替の送達経路を使用して 1 ~ 5 回繰り返され得る。間隔は、免疫化の間で 2 ~ 24 週間であり得る。ワクチン接種に対する免疫応答は、ELISA または同様の方法論を使用して、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、ワクチン抗原による *in vitro* 刺激に続いて、細胞内のサイトカインの蓄積について染色を行った後、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してよく、各個々の製品または製品口

10

20

30

40

50

ットに関する毒性 / 安全性プロファイルに依存する。

【 0 1 6 3 】

免疫化は、1回、2回、3回、または繰り返し行ってよい。例として、H I V免疫化のための薬剤は、必要とする被験体に、1週間に1回、1週間おきに1回、3週間ごとに1回、1か月に1回、1か月おきに、3か月ごとに、6か月ごとに、9か月ごとに、1年に1回、18か月ごとに、2年ごとに、36か月ごとに、または3年ごとに投与してよい。

【 0 1 6 4 】

免疫化は概して、C D 4 T細胞の *e x v i v o* での拡大増殖および濃縮前に少なくとも1回行われ、免疫化は、*e x v i v o* での白血球 / リンパ球の培養 / 再刺激および注入後に1回、2回、3回、またはそれよりも多く行われ得る。

10

【 0 1 6 5 】

一実施形態では、免疫化のためのH I V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、H I Vワクチンを含む医薬組成物は、臨床適用のための多様な経鼻、肺、経口、外用、または非経口剤形で製剤化される。剤形はそれぞれ、様々な崩壊剤、界面活性剤、充填剤、増粘剤 (*t h i c k e n e r*)、結合剤、希釈剤、例えば湿潤剤、または他の薬学的に許容される賦形剤を含み得る。H I Vワクチンを含む医薬組成物は、注射用に製剤化されてもよい。

【 0 1 6 6 】

免疫化を目的とするH I Vワクチン組成物は、任意の薬学的に許容される方法、例えば、鼻腔内投与、口腔投与、舌下投与、経口投与、直腸投与、眼投与、非経口投与 ( 静脈内投与、皮内投与、筋肉内投与、皮下投与、大槽内投与、腹腔内 ) 投与、肺投与、膈内投与、局所投与、外用投与、乱切後の外用投与、粘膜投与、エアロゾルによる、または口腔もしくは経鼻スプレー製剤による投与を使用して投与することができる。

20

【 0 1 6 7 】

さらに、H I Vワクチン組成物は、固体剤形、錠剤、丸剤、ロゼンジ、カプセル、液体分散物、ゲル、エアロゾル、肺エアロゾル、経鼻エアロゾル、軟膏、クリーム、半固体剤形、および懸濁物など、任意の薬学的に許容される剤形に製剤化することができる。さらに、本組成物は、制御放出製剤、持続放出製剤、即時放出製剤、またはこれらの任意の組み合わせであってよい。さらに、本組成物は、経皮送達系であってよい。

【 0 1 6 8 】

別の実施形態では、H I V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、この固体剤形は、粉末、顆粒、カプセル、錠剤、または丸剤であり得る。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、ラクトース、微結晶性セルロース、またはゼラチンなどの1つまたは複数の賦形剤を含む。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などの滑沢剤を含み得る。一部の実施形態では、経口剤形は、即時放出形態または改変放出形態である。改変放出剤形は、制御放出または延長放出、腸内放出などを含む。改変放出剤形に使用される賦形剤は、一般的に当業者に公知である。

30

【 0 1 6 9 】

さらなる実施形態では、H I Vワクチンを含む医薬組成物は、舌下または口腔剤形として製剤化される。このような剤形は、舌下に投与される舌下錠剤または溶液組成物、および頬と歯肉との間に配置される口腔錠剤を含む。

40

【 0 1 7 0 】

なおもさらなる実施形態では、H I Vワクチンを含む医薬組成物は、経鼻剤形として製剤化される。このような本発明の剤形は、経鼻送達のための溶液、懸濁物、およびゲル組成物を含む。

【 0 1 7 1 】

一実施形態では、医薬組成物は、懸濁物、エマルジョン、またはシロップなど、経口投与のための液体剤形で製剤化される。他の実施形態では、液体剤形は、水および流動パラフィンなどの一般的に使用されている単純な希釈剤に加えて、保水剤 (*h u m e c t a n*

50

t)、甘味料、芳香族化合物、または保存料などの様々な賦形剤を含み得る。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好適であるように製剤化される。

#### 【0172】

一実施形態では、医薬組成物は、滅菌水溶液、懸濁物、エマルジョン、非水性溶液、または坐薬など、非経口投与のための剤形で製剤化される。他の実施形態では、非水性溶液または懸濁物は、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、オリーブ油などの植物油、またはオレイン酸エチルなどの注射可能なエステルを含む。坐薬の基剤としては、ウィテップゾール(witepsol)、マクロゴール、Tween 61、カカオ脂、ラウリン油、またはグリセリンゼラチンが使用され得る。

10

#### 【0173】

医薬組成物の投与量は、患者の体重、年齢、性別、投与時間および方式、排出速度、ならびに疾患の重症度に応じて異なり得る。

#### 【0174】

再刺激の目的では、概して、リンパ球、PBMC、および/またはCD4 T細胞を患者から取り出し、再刺激および培養のために単離する。単離した細胞は、免疫化に使用したのと同じHIVワクチンもしくは活性化剤と接触させても、または異なるHIV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、単離した細胞は、培養物中の約 $10^6$ 個の細胞あたり約 $10\text{ ng} \sim 5\text{ }\mu\text{g}$ (または任意の他の好適な量)のHIVワクチンまたは活性化剤と接触させる。より具体的には、単離した細胞は、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HIVワクチンまたは活性化剤と接触させてもよい。

20

#### 【0175】

活性化剤またはワクチンは、概して、各*in vitro*細胞培養で1回使用されるが、約15～約35日の間隔の後に繰り返されてもよい。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日目に行われ得る。

30

#### 【0176】

濃縮され再刺激した細胞の形質導入では、例えば図4に開示されているレンチウイルスベクターまたは他の公知のベクター系を細胞に形質導入してよい。形質導入される細胞は、培養物中の標的細胞あたり約 $1 \sim 1,000$ 個(または任意の他の好適な量)のウイルスゲノム(レンチウイルスベクターを含有する培養液のRT-PCRアッセイにより測定)と接触させてよい。レンチウイルス形質導入は、培養物中の標的細胞あたり $1 \sim 1,000$ 個という同じ範囲のウイルスゲノムを使用し、1～5回繰り返してよい。

#### 【0177】

##### 細胞の濃縮

様々な実施形態では、T細胞などの細胞がHIV感染患者から得られ、培養される。培養は、マルチウェルプレートにて馴化培地(「CM」)を含む培養培地中で行われ得る。上清 $p24^{agg}$ のレベル(「 $p24$ 」)およびウイルスRNAレベルが標準的手段によって評価され得る。CM培養細胞が $1\text{ ng/ml}$ 未満の上清 $p24$ レベルのピークを有する患者は、さらなる抗ウイルス剤の使用ありまたはなしのCMにおける大規模なT細胞の拡大増殖に好適な患者であり得る。さらに、異なる薬物または目的の薬物の組み合わせを異なるウェルに加えてよく、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することができる。適度なウイルス抑制をもたらす薬物の組み合わせは、治療上有用な組み合わせである。特定の被験体に関する適度なウイルス抑制を構成するものが何かを決定することは、適格な技師の能力の範囲内である。ウイルスの拡大増殖を制限することにおける目的の薬物の有効性を試験するために、抗CD3抗体などのさらなる因子を培養

40

50

物に添加してウイルス産生を刺激してもよい。当技術分野で公知のH I V感染細胞試料の培養方法とは異なり、C Mでは2か月超の期間にわたるT細胞の培養が可能であり、これにより、長期の薬物有効性をアッセイする有効な系がもたらされる。

【0178】

このアプローチにより、C Mを含む培地中の細胞の培養による、細胞集団内のH I V L T R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が可能になる。C M4における培養は、転写媒介性タンパク質とH I V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り、H I V L T Rにより駆動される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は、A P - 1、N FカップパB、N F - A T、I R F、L E F - 1、およびS p 1などの宿主細胞がコードするタンパク質、ならびにH I Vがコードするタンパク質であるT a tを含む。目的のH I V遺伝子発現調節エレメントは、A P - 1、N FカップパB、N F - A T、I R F、L E F - 1、およびS p 1の結合部位、ならびにT a tと相互作用するトランス作用応答エレメント(「T A R」)を含む。

10

【0179】

好ましい実施形態では、H I V感染細胞は、感受性の転写媒介性タンパク質配列および感受性のH I V調節エレメント配列を有する被験体から得られる。より好ましい実施形態では、H I V感染細胞は、野生型の転写媒介性タンパク質配列および野生型のH I V調節配列を有する被験体から得られる。

【0180】

T細胞を濃縮する別の方法は、免疫親和性に基づく選択を利用する。この方法は、第1および第2の細胞集団、例えばC D 4 +およびC D 8 +細胞集団の同時の濃縮または選択を含む。初代ヒトT細胞を含有する細胞は、インキュベーション組成物中で、C D 4に特異的に結合する第1の免疫親和性試薬およびC D 8に特異的に結合する第2の免疫親和性試薬と、これらの免疫親和性試薬が試料中の細胞表面でそれぞれC D 4およびC D 8分子に特異的に結合する条件下で接触される。第1および/または第2の免疫親和性試薬に結合した細胞が回収され、これにより、C D 4 +細胞およびC D 8 +細胞を含む濃縮された組成物が生成される。このアプローチは、最適以下の収量の濃度である第1および/または第2の免疫親和性試薬の濃度を用いた組成物のインキュベーションを含み得る。注目すべきことに、一部の実施形態では、形質導入された細胞は、混合された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、混合されたT細胞集団ではない。

20

30

【0181】

一部の実施形態では、固体支持体が球体、例えばビーズ、例えばマイクロビーズまたはナノビーズである、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、ビーズは磁性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た結合試薬と可逆的結合を形成することができる1つまたは複数の結合パートナーを含有し、抗体は、固体表面に可逆的に動員される。一部の実施形態では、前記固体表面で抗体が結合した細胞表面マーカーを発現する細胞は、結合試薬と結合パートナーとの間の可逆的結合の破壊によりマトリクスから回収可能である。一部の実施形態では、結合試薬は、ストレプトアビジンであるか、またはストレプトアビジン類似体もしくは変異体である。

40

【0182】

造血系および/または造血幹細胞の初代細胞の安定な形質導入は、細胞の表面をレンチウイルスベクターと、細胞表面に結合する少なくとも1つの分子との両方と*i n v i t r o*または*e x v i v o*で接触させることによって得ることができる。これらの細胞は、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備える通気された容器において培養してよい。一部の実施形態では、このアプローチは、非C D 4 + T細胞の枯渇および/または広いポリクローナルな拡大増殖と併せて使用され得る。

【0183】

T細胞を濃縮する別のアプローチでは、P B M Cをペプチドで刺激し、インターフェロ

50

ンガンマなどのサイトカインを分泌する細胞を濃縮する。このアプローチは、概して、T細胞を含有する細胞の混合物を抗原で刺激し、抗原で刺激した細胞の分離を、これらが産物で標識されている程度に従って行うことを伴う。抗原刺激は、少なくとも1つのT細胞の抗原特異的な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って達成される。産物による標識は、少なくとも1つの捕捉部分を含有するように細胞の表面を改変し、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(captured)」または「封入される(entrapped)」)条件下で細胞を培養すること、および捕捉された産物を標識部分で標識することによって達成され、標識された細胞は、標識手順の一環としても分離手順の一環としても溶解されない。捕捉部分は、濃縮ステップを洗練し、概して抗原特異的T細胞の、特にCD4 + 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の検出を組み込む場合がある。

10

#### 【0184】

以下の実施例は、本発明の諸態様を解説するために提示するものである。しかしながら、本発明はこれらの実施例に記載される特定の条件または詳細に限定されないことを理解されたい。本明細書で言及される刊行物はすべて、参照により明示的に組み込まれている。

#### 【実施例】

#### 【0185】

(実施例1：レンチウイルスベクター系の開発)

20

図3(直鎖形態)および図4(環状化形態)にまとめたとようにレンチウイルスベクター系を開発した。まず図3の上部を参照すると、左から右に、次のエレメント：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U33'LTR(配列番号39)を有する代表的な治療用ベクターをデザインし産生した。図3で詳述されている治療用ベクターは、本明細書ではAGT103とも呼ばれる。

30

#### 【0186】

次に図3の中央部を参照すると、左から右に、次のエレメント：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)、HIVInt(配列番号45)、HIVRRE(配列番号46)、およびHIVRev(配列番号47)を有するヘルパープラスミドをデザインし産生した。

#### 【0187】

次に図3の下部を参照すると、左から右に、次のエレメント：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)を有するエンベローププラスミドをデザインし産生した。

#### 【0188】

40

293T/17 HEK細胞(American Type Culture Collection, Manassas, VAから購入)において、治療用ベクター、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に示したものを)をトランスフェクションした後、レンチウイルス粒子を産生した。機能的な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、プラスミドDNAの取り込み効率を上昇させるために試薬ポリ(エチレンジアミン)(PEI)を用いた。プラスミドおよびDNAは最初に、血清を含まない培養培地に3:1の比(PEIのDNAに対する質量比)で別々に添加した。2~3日後、細胞培地を収集し、高速遠心分離および/または濾過の後、アニオン交換クロマトグラフィーを行うことにより、レンチウイルス粒子を精製した。レンチウイルス粒子の濃度は、形質導入単位/ml(TU/ml)の点から表すことがで

50

きる。TUの決定は、培養液中のHIV p24レベルを測定し(p24タンパク質がレンチウイルス粒子に組み込まれている)、定量的PCR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をコードする場合)、細胞あたりのウイルスDNAコピー数を測定することによって達成した。

【0189】

上記に言及したように、レンチウイルス粒子の産生のための3ベクター系(すなわち、2ベクターレンチウイルスパッケージング系)をデザインした。この3ベクター系の概略は図4に示されている。図4の概略は、これまでに図3に記載した直鎖系の環状化バージョンである。図4を参照しながら簡潔に述べると、最上部のベクターは、この場合はRevを含むヘルパープラスミドである。図4の中央にあるベクターは、エンベローププラスミドである。最下部のベクターは、これまでに記載した治療用ベクターである。

10

【0190】

より具体的に図4を参照すると、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。

【0191】

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

【0192】

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系の合成。

材料および方法:

ヘルパープラスミドの構築: 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 Reagent Program)からのDNA断片の初回PCR増幅によってヘルパープラスミドを構築した。pCDNA3プラスミド(Invitrogen)の同じ部位に挿入するために使用され得る、EcoRIおよびNotI制限部位を有する断片を増幅するためのプライマーをデザインした。フォワードプライマーは(5'-TAAGCAGAAATTC ATGAATTTGCCAGGAAGAT-3')(配列番号81)であり、リバースプライマーは(5'-CATACAATGAATGGACACTAGGCGGGCCGCACGAAT-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次の通りであった。

30

GAATTCATGAATTTGCCAGGAAGATGGAAACCAAAAATGATAGGGGGGAATTTGGAGGTTTTATCAAAGTAAGACAGTATGATCAGATACTCATAGAAATCTGCGGACATAAAGCTATAGGTACAGTATTTAGTAGGACCTACACCTGTCAACATAATTTGGAA  
GAAATCTGTTGACTCAGATTTGGCTGCACTTTAAATTTTCC  
CATTAGTCCCTATTGAGACTGTACCAGTAAAATTTAAAGCCA  
GGAAATGGATGGCCCAAAAGTTAAACAATGGCCATTGACAG  
AAGAAAAAATAAAAGCATTAGTAGAAATTTGTACAGAAAT  
GGAAAAGGAAGGAATAAATTTCAAATAATTTGGGCCTGAAAAAT  
CCATACAATACTCCAGTATTTGCCATAAAGAAAAAGACA  
GTACTAAAATGGAGAAAAATTAGTAGATTTTCAGAGAACTTAA  
TAAGAGAACTCAAGATTTCTGGGAAGTTCAATTAGGAATA  
CCACATCCTGCAGGGTTAAAACAGAAAAAATCAGTAACAG  
TACTGGATGTGGGCGATGCATAATTTTTCAGTTCCCTTAGA  
TAAAGACTTTCAGGAAGTATACTGCATTTTACCATACCTAGT

40

50

A T A A A C A A T G A G A C A C C A G G G A T T A G A T A T C A G T A C A A T G  
T G C T T C C A C A G G G A T G G A A A G G A T C A C C A G C A A T A T T C C A  
G T G T A G C A T G A C A A A A A T C T T A G A G C C T T T T A G A A A C A A  
A A T C C A G A C A T A G T C A T C T A T C A A T A C A T G G A T G A T T T G T  
A T G T A G G A T C T G A C T T A G A A A T A G G G C A G C A T A G A A C A A A  
A A T A G A G G A A C T G A G A C A A C A T C T G T T G A G G T G G G G A T T T  
A C C A C A C C A G A C A A A A A C A T C A G A A A G A A C C T C C A T T C C  
T T T G G A T G G G T T A T G A A C T C C A T C C T G A T A A A T G G A C A G T  
A C A G C C T A T A G T G C T G C C A G A A A A G G A C A G C T G G A C T G T C  
A A T G A C A T A C A G A A A T T A G T G G G A A A A T T G A A T T G G G C A A  
G T C A G A T T T A T G C A G G G A T T A A A G T A A G G C A A T T A T G T A A  
A C T T C T T A G G G G A A C C A A A G C A C T A A C A G A A G T A G T A C C A  
C T A A C A G A A G A A G C A G A G C T A G A A C T G G C A G A A A A C A G G G  
A G A T T C T A A A A G A A C C G G T A C A T G G A G T G T A T T A T G A C C C  
A T C A A A A G A C T T A A T A G C A G A A A T A C A G A A G C A G G G G C A A  
G G C C A A T G G A C A T A T C A A A T T T A T C A A G A G C C A T T T A A A A  
A T C T G A A A A C A G G A A A G T A T G C A A G A A T G A A G G G T G C C C A  
C A C T A A T G A T G T G A A A C A A T T A A C A G A G G C A G T A C A A A A A  
A T A G C C A C A G A A A G C A T A G T A A T A T G G G G A A A G A C T C C T A  
A A T T T A A A T T A C C C A T A C A A A A G G A A A C A T G G G A A G C A T G  
G T G G A C A G A G T A T T G G C A A G C C A C C T G G A T T C C T G A G T G G  
G A G T T T G T C A A T A C C C C T C C C T T A G T G A A G T T A T G G T A C C  
A G T T A G A G A A A G A A C C C A T A A T A G G A G C A G A A A C T T T C T A  
T G T A G A T G G G G C A G C C A A T A G G G A A A C T A A A T T A G G A A A A  
G C A G G A T A T G T A A C T G A C A G A G G A A G A C A A A A A G T T G T C C  
C C C T A A C G G A C A C A A C A A A T C A G A A G A C T G A G T T A C A A G C  
A A T T C A T C T A G C T T T G C A G G A T T C G G G A T T A G A A G T A A A C  
A T A G T G A C A G A C T C A C A A T A T G C A T T G G G A A T C A T T C A A G  
C A C A A C C A G A T A A G A G T G A A T C A G A G T T A G T C A G T C A A A T  
A A T A G A G C A G T T A A T A A A A A A G G A A A A A G T C T A C C T G G C A  
T G G G T A C C A G C A C A C A A A G G A A T T G G A G G A A A T G A A C A A G  
T A G A T A A A T T G G T C A G T G C T G G A A T C A G G A A A G T A C T A T T  
T T T A G A T G G A A T A G A T A A G G C C C A A G A A G A A C A T G A G A A A  
T A T C A C A G T A A T T G G A G A G C A A T G G C T A G T G A T T T T A A C C  
T A C C A C C T G T A G T A G C A A A A G A A A T A G T A G C C A G C T G T G A  
T A A A T G T C A G C T A A A A G G G G A A G C C A T G C A T G G A C A A G T A  
G A C T G T A G C C C A G G A A T A T G G C A G C T A G A T T G T A C A C A T T  
T A G A A G G A A A A G T T A T C T T G G T A G C A G T T C A T G T A G C C A G  
T G G A T A T A T A G A A G C A G A A G T A A T T C C A G C A G A G A C A G G G  
C A A G A A A C A G C A T A C T T C C T C T T A A A A T T A G C A G G A A G A T  
G G C C A G T A A A A A C A G T A C A T A C A G A C A A T G G C A G C A A T T T  
C A C C A G T A C T A C A G T T A A G G C C G C C T G T T G G T G G G C G G G G  
A T C A A G C A G G A A T T T G G C A T T C C C T A C A A T C C C C A A A G T C  
A A G G A G T A A T A G A A T C T A T G A A T A A A G A A T T A A A G A A A A T  
T A T A G G A C A G G T A A G A G A T C A G G C T G A A C A T C T T A A G A C A  
G C A G T A C A A A T G G C A G T A T T C A T C C A C A A T T T T A A A A G A A  
A A G G G G G G A T T G G G G G G T A C A G T G C A G G G G A A A G A A T A G T  
A G A C A T A A T A G C A A C A G A C A T A C A A A C T A A A G A A T T A C A A  
A A A C A A A T T A C A A A A A T T C A A A A T T T T C G G G T T T A T T A C A  
G G G A C A G C A G A G A T C C A G T T T G G A A A G G A C C A G C A A A G C T

10

20

30

40

50

CCTCTGGAAAGGTGAAGGGGCAGTAGTAATACAAGATAAT  
 AGTGACATAAAGTAGTGGCCAGAAGAAAAGCAAAGATCA  
 TCAGGGATTATGGAAACAGATGGCAGGTGATGATTGTGT  
 GGCAAGTAGACAGGATGAGGATTA A (配列番号 83)

【0193】

次に、XbaIおよびXmaI隣接制限部位を有する、Rev、RRE、およびウサギ  
 ベータグロビンポリA配列を含有するDNA断片を、MWG Operonによって合成  
 した。次いでこのDNA断片を、XbaIおよびXmaI制限部位においてプラスミドに  
 挿入した。DNA配列は次の通りであった。

TCTAGAATGGCAGGAAGAAGCGGAGACAGCGACGAAGAGC  
 TCATCAGAACAGTCAGACTCATCAAGCTTCTCTATCAAG  
 CAACCCACCTCCCAATCCCGAGGGGACCCGACAGGCCCGA  
 AGGAATAGAAGAAGAAGGTGGAGAGAGAGACAGAGACAGA  
 TCCATTTCGATTAGTGAACGGATCCTTGGCCTTATCTGGG  
 ACGATCTGCGGAGCCTGTGCCTCTTCAGCTACCACCGCTT  
 GAGAGACTTACTCTTGATTGTAACGAGGATTGTGGAACCTT  
 CTGGGACGCAAGGGGGTGGGAAGCCCTCAAATAATTGGTGG  
 ATCTCCTACAAATAATTGGAGTCAGGAGCTAAAGAATAGAGG  
 AGCTTTGTTCCTTGGGTTCCTTGGGAGCAGCAGGAAGCACT  
 ATGGGCGCAGCGTCAATGACGCTGACGGTACAGGCCAGAC  
 AATTATTGTCTGGTATAGTGCAGCAGCAGAACAAATTTGCT  
 GAGGGCTATTGAGGCGCAACAGCATCTGTTGCAACTCAC  
 GTCTGGGGCATCAAGCAGCTCCAGGCCAAGAATCCTGGCTG  
 TGGAAAGATACCTAAAGGATCAACAGCTCCTAGATCTTTT  
 TCCCTCTGCCAAAATAATGAGGGACATCATGAAGCCCTT  
 GAGCATCTGACTTCTGGCTAATAAAGGAATAATTTATTTTCA  
 TTGCAATAGTGTGTTGGAATTTTTTTGTGTCTCTCACTCGG  
 AAGGACATATGGGAGGGCAAAATCATTTAAACATCAGAAAT  
 GAGTATTTGGTTTAGAGTTTGGCAACATATGCCATATGCT  
 GGCTGCCATGAACAAAGGTGGCTATAAAGAGGTCATCAGT  
 ATATGAACAGCCCCCTGCTGTCCATTCCTTATTCCATAG  
 AAAAGCCTTGACTTGAGGTTAGATTTTTTTTATATTTTGT  
 TTTGTGTTATTTTTTTCTTTAAACATCCCTAAAATTTTCTCT  
 TACATGTTTTACTAGCCAGATTTTTCTCTCTCTCTGACT  
 ACTCCCAGTCAATAGCTGTCCCTCTCTTATGAAGATCC  
 CTCGACCTGCAGCCCAAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAG  
 CTGTTTCTCTGTGTGAAATTTGTTATCCGCTCACAATTCAC  
 ACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAGCCCTGGGG  
 TGCCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGC  
 TCACTGCCCGCTTTCCAGTCGGGAAACCTGTGCTGCCAGC  
 GGATCCGCATCTCAATTAGTCAGCAACCATAGTCCCGCCC  
 CTAACCTCCGCCCATCCCGCCCTAACTCCGCCCAGTTCCG  
 CCCATTTCTCCGCCCCCATGGCTGACTAATTTTTTTTATTTA  
 TGCAGAGGCCGAGGCCGCTCTGGCCTCTGAGCTATTCCAG  
 AAGTAGTGAGGAGGCTTTTTTTGGAGGCCTAGGCTTTTGC  
 AAAAGCTAACTTGTTTTATTTGCAGCTTATAATGGTTACAAA  
 TAAAGCAATAGCATCACAAATTTCACAAATAAAGCATTTT  
 TTTCACTGCATTCTAGTTGTGGTTTTGTCCAAACTCATCAA  
 TGTATCTTATCAGCGGCCGCCCCGGG (配列番号 84)

【0194】

10  
 20  
 30  
 40  
 50

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に置き換えた。MluIおよびEcoRI隣接制限部位を有する、CAGエンハンサー/プロモーター/イントロン配列を含有するDNA断片を、MWG Operonによって合成した。次いでこのDNA断片を、MluIおよびEcoRI制限部位においてプラスミドに挿入した。DNA配列は次の通りであった。

```

ACGCGTTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCAATTA
GTTTCATAGCCCATATATGGAGTTCCGCGTTACATAACTTA
CGGTA AATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCCG
CCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACG
CCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGACTATT
TACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCA
TATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAA
TGGCCCGCCTGGCATTATGCCCAGTACATGACCTTATGGG
ACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCAATCGC
TATTACCATGGGTGAGGGTGAAGCCCAAGTTCCTGCTTCA
TCTCCCATCTCCCCCCCCCTCCCCACCCCAATTTTGTAT
TTATTTATTTTAAATTTTGTGCGAGCGATGGGGGGCGG
GGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG
AGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG
CAATCAGAGCGGCGCGCTCCGA AAGTTTCTTTTATGGCG
AGGCGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG
GGCGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG
GCTCCGCGGCCGCTCGCGCCGCGCCCGGGCTCTGACTG
ACCGCGTTACTCCACAGGTGAGCGGGGGGGGGGGGGGGGG
CTCCTCCGGGGCTGTAATTAGCGCTTGGTTTAATGACGGCT
CGTTTCTTTTCTGTGGCTGCGGTGAAAGCCTTAAAGGGCTC
CGGGAGGGGCCCTTTGTGCGGGGGGGGGGGGGGGGGGGT
GCGTGC GTGTGTGTGTGTGCGTGGGGAGCGCCGCGTGC GGCC
CGCGCTGCCCGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG
GGGCTTTGTGCGCTCCGCGTGTGCGCGAGGGGGAGCGGGC
CGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG
ACAAAGGCTGCGTGC GGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG
AGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG
GCACCCCCCTCCCGAGTTGCTGAGCACGGCCCGGGCTTCG
GGTGC GGGGGGCTCCGTGCGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG
TGCCGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG
GGCGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG
CGCGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG
GAGCCGCAAGCCATTGCTTTTATGGTAATCGTGC GAGAGG
GCGCAGGGACTTCTTTTGTCCCAAATCTGGCGGGAGCCGAA
ATCTGGGAGGGCGCCGCGCCGCA CCCCCTCTAGCGGGCGCGGG
CGAAGCGGGTGC GGCGCGCCGGCAGGAAGGAAATGGGGCGGGGA
GGGCCCTTCGTGCGTCCGCGCGCCGGTCCCTTCTCCAT
CTCCAGCCTCGGGGGCTGCCGCAAGGGGGACGGCTGCCCTTCG
GGGGGGGACGGGGGCAAGGGCGGGGGTTCGGCTTCTGGCGTGTG
ACCGGCGGGGAATTC (配列番号85)

```

【0195】

VSV-Gエンベローププラスミドの構築：  
 隣接するEcoRI制限部位を有する水疱性口内炎Indianaウイルス糖タンパク

10  
20  
30  
40  
50

質 (VSV - G) 配列を、MWG Operonによって合成した。次いでこのDNA断片をEcoRI制限部位においてpCDNA3.1プラスミド (Invitrogen) に挿入し、CMV特異的なプライマーを使用したシーケンシングによって正しい方向を決定した。DNA配列は次の通りであった。

```

G A A T T C A T G A A G T G C C T T T T G T A C T T A G C C T T T T T A T T C A
T T G G G G T G A A T T G C A A G T T C A C C A T A G T T T T T C C A C A C A A
C C A A A A A G G A A A C T G G A A A A A T G T T C C T T C T A A T T A C C A T
T A T T G C C C G T C A A G C T C A G A T T T A A A T T G G C A T A A T G A C T
T A A T A G G C A C A G C C T T A C A A G T C A A A A T G C C C A A G A G T C A
C A A G G C T A T T C A A G C A G A C G G T T G G A T G T G T C A T G C T T C C
A A A T G G G T C A C T A C T T G T G A T T T C C G C T G G T A T G G A C C G A
A G T A T A T A A C A C A T T C C A T C C G A T C C T T C A C T C C A T C T G T
A G A A C A A T G C A A G G A A A G C A T T G A A C A A A C G A A A C A A G G A
A C T T G G C T G A A T C C A G G C T T C C C T C C T C A A A G T T G T G G A T
A T G C A A C T G T G A C G G A T G C C G A A G C A G T G A T T G T C C A G G T
G A C T C C T C A C C A T G T G C T G G T T G A T G A A T A C A C A G G A G A A
T G G G T T G A T T C A C A G T T C A T C A A C G G A A A A T G C A G C A A T T
A C A T A T G C C C C A C T G T C C A T A A C T C T A C A A C C T G G C A T T C
T G A C T A T A A G G T C A A A G G G C T A T G T G A T T C T A A C C T C A T T
T C C A T G G A C A T C A C C T T C T T C T C A G A G G A C G G A G A G C T A T
C A T C C C T G G G A A A G G A G G G C A C A G G G T T C A G A A G T A A C T A
C T T T G C T T A T G A A A C T G G A G G C A A G G C C T G C A A A A T G C A A
T A C T G C A A G C A T T G G G G A G T C A G A C T C C C A T C A G G T G T C T
G G T T C G A G A T G G C T G A T A A G G A T C T C T T T G C T G C A G C C A G
A T T C C C T G A A T G C C C A G A A G G G T C A A G T A T C T C T G C T C C A
T C T C A G A C C T C A G T G G A T G T A A G T C T A A T T C A G G A C G T T G
A G A G G A T C T T G G A T T A T T C C C T C T G C C A A G A A A C C T G G A G
C A A A A T C A G A G C G G G T C T T C C A A T C T C T C C A G T G G A T C T C
A G C T A T C T T G C T C C T A A A A A C C C A G G A A C C G G T C C T G C T T
T C A C C A T A A T C A A T G G T A C C C T A A A A T A C T T T G A G A C C A G
A T A C A T C A G A G T C G A T A T T G C T G C T C C A A T C C T C T C A A G A
A T G G T C G G A A T G A T C A G T G G A A C T A C C A C A G A A A G G G A A C
T G T G G G A T G A C T G G G C A C C A T A T G A A G A C G T G G A A A T T G G
A C C C A A T G G A G T T C T G A G G A C C A G T T C A G G A T A T A A G T T T
C C T T T A T A C A T G A T T G G A C A T G G T A T G T T G G A C T C C G A T C
T T C A T C T T A G C T C A A A G G C T C A G G T G T T C G A A C A T C C T C A
C A T T C A A G A C G C T G C T T C G C A A C T T C C T G A T G A T G A G A G T
T T A T T T T T T G G T G A T A C T G G G C T A T C C A A A A A T C C A A T C G
A G C T T G T A G A A G G T T G G T T C A G T A G T T G G A A A A G C T C T A T
T G C C T C T T T T T C T T T A T C A T A G G G T T A A T C A T T G G A C T A
T T C T T G G T T C T C C G A G T T G G T A T C C A T C T T T G C A T T A A A T
T A A A G C A C A C C A A G A A A A G A C A G A T T T A T A C A G A C A T A G A
G A T G A G A A T T C ( 配列番号 8 6 )

```

【 0 1 9 6 】

本明細書に記載される方法および材料を使用し、4ベクター系 (すなわち、3ベクターレンチウイルスパッケージング系) もデザインし、産生した。この4ベクター系の概略は図5に示されている。図5を参照しながら簡潔に述べると、最上部のベクターは、この場合はRevを含まないヘルパープラスミドである。上から2番目のベクターは、別個のRevプラスミドである。下から2番目のベクターは、エンベローププラスミドである。最下部のベクターは、これまでに記載した治療用ベクターである。

【0197】

図5を部分的に参照すると、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 Int（配列番号54）、HIV RRE（配列番号55）、およびウサギベータグロビンポリA（配列番号56）を含む。

【0198】

Revプラスミドは、RSVプロモーター（配列番号57）、HIV Rev（配列番号58）、およびウサギベータグロビンポリA（配列番号59）を含む。

【0199】

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。

【0200】

ヘルパー、Rev、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系の合成。

材料および方法：

Revを含まないヘルパープラスミドの構築：

RREおよびウサギベータグロビンポリA配列を含有するDNA断片を挿入することにより、Revを含まないヘルパープラスミドを構築した。隣接するXbaIおよびXmaI制限部位を有するこの配列は、MWG Operonによって合成した。次いでこのRRE/ウサギポリAベータグロビン配列を、XbaIおよびXmaI制限部位においてヘルパープラスミドに挿入した。DNA配列は次の通りである。

TCTAGAAAGGAGCTTTGTTCCCTTGGGTTCTTGGGAGCAGCA  
GGAAGCACTATGGGCGCAGCGTCAATGACGCTGACGGTAC  
AGGCCAGACAATTAATTGTCTGGTATAGTGCAGCAGCAGAA  
CAATTTGCTGAGGGCTAATTGAGGCGCAACAGCATCTGTTG  
CAACTCACAGTCTGGGGCATCAAGCAGCTCCAGGCAAGAA  
TCCTGGCTGTGGAAGATACCTAAAGGATCAACAGCTCCT  
AGATCTTTTTTCCCTCTGCCAAAATTAATGGGGACATCATG  
AAGCCCTTGAGCATCTGACTTCTGGCTAATAAAGGAAAT  
TTATTTTTCATTTGCAATAGTGTGTTGGAAATTTTTTGTGTCT  
CTCACTCGGAAGGACATATGGGAGGGCAAAATCATTTAAA  
CATCAGAAATGAGTATTTGGTTTAGAGTTTGGCAACATATG  
CCATATGCTGGCTGCCATGAACAAGGTGGCTATAAAGAG  
GTCATCAGTATATGAAACAGCCCCCTGCTGTCCATTCCTT  
ATTCATAGAAAAGCCTTGACTTGAGGTTAGATTTTTTTTT  
ATATTTTTGTTTTTGTGTTATTTTTTTTTCTTTAACATCCCTAA  
AATTTTTCTTTACATGTTTTACTAGCCAGATTTTTTCTCCT  
CTCCTGACTACTCCAGTCAATAGCTGTCCCTCTTCTCTTA  
TGAAAGATCCCTCGACCCTGCAGCCCAAGCTTGGCGTAATCA  
TGGTCAATAGCTGTTTTCTGTGTGAAATTTGTTATCCGCTCA  
CAATTCACACAACAATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTA  
AGCCTGGGGTGCCATAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATT  
GCGTTGCGCTCACTGCCCGCTTTCCAGTCGGGAAACCTGT  
CGTGCCAGCGGATCCGCATCTCAATTAGTCAAGCAACCATA  
GTCCTCGCCCTAACTCCGCCCATCCCGCCCTAACTCCGC  
CCAGTTCCGCCCATTCTCCGCCCCATGGCTGACTAATTTT  
TTTTATTTATGCAGAGGCCGAGGCCGCTCGGCCCTCTGAG  
CTATTCAGAAAGTAGTGAGGAGGCTTTTTTTGGAGGCCCTAG

10

20

30

40

50

GCTTTTGC AAAAGCTAACTTGTTTTATTGCAGCTTATAAT  
 GGTTACAAATAAAGCAATAGCATCACAAATTTACAAATA  
 AAGCATTTTTTTCACTGCATTCTAGTTGTGGTTTGTCCAA  
 ACTCATCAATGTATCTTATCACCCGGG (配列番号87)

## 【0201】

Revプラスミドの構築：

隣接するMfeIおよびXbaI制限部位を有するRSVプロモーターおよびHI  
 V Rev配列を、MWG Operonにより、単一のDNA断片として合成した。次いで  
 このDNA断片を、CMVプロモーターが、RSVプロモーターに置き換えられているM  
 feIおよびXbaI制限部位においてpCDNA3.1プラスミド(Invitrog  
 en)に挿入した。DNA配列は次の通りであった。

CAATTGCGATGTACGGGCCAGATAATACGCGTATCTGAGGG  
 GACTAGGGTGTGTTTAGGCCGAAAAGCGGGGCTTCGGTTGT  
 ACGCGGTTTAGGAGTCCCTCAGGATATAGTAGTTTTCGCTT  
 TTGCATAGGGAGGGGGAATGTAGTCTTATGCAATACACT  
 TGTAGTCTTGCAACATGGTAACGATGAGTTAGCAACATGC  
 CTTACAAGGAGAGAAAAGCACCGTGCAATGCCGATTGGTG  
 GAAGTAAGGTGGTACGATCGTGCCTTATTAGGAAGGCCAAC  
 AGACAGGTCTGACATGGATTGGACGAACCACTGAATTCCG  
 CATTGCGAGAGATAATTGTATTTAAGTGCCTAGCTCGATAC  
 AATAAACGCCATTTGACCATTCACCAACATTGGTGTGCACC  
 TCCAAGCTCGAGCTCGTTTAGTGAACCGTCAGATCGCCTG  
 GAGACGCCATCCACGCTGTTTGGACCTCCATAGAAGACAC  
 CGGGACCGATCCAGCCTCCCTCGAAGCTAGCGATTAGGC  
 ATCTCCTATGGCAGGAAGAAGCGGAGACAGCGACGAAGAA  
 CTCCTCAAGGCAGTCAAGACTCATCAAGTTTCTCTATCAAA  
 GCAACCCACCTCCCAATCCCGAGGGGACCCGACAGGCCCCG  
 AAGGAATAGAAAGAAGAAGGTGGAGAGAGAGACAGAGACAG  
 ATCCATTCGATTAGTGAACGGATCCTTAGCACTTATCTGG  
 GACGATCTGCGGAGCCTGTGCTCTTTCAGCTACCACCGCT  
 TGAGAGACTTACTCTTGAATTGTAACGAGGATTGTGGAAC  
 TCTGGGACGCAAGGGGGTGGGAAGCCCTCAAAATATTGGTGG  
 AATCTCCTACAATAATTGGAGTCAAGGAGCTAAAGAAATAGTC  
 TAGA (配列番号88)

## 【0202】

2ベクターおよび3ベクターのパッケージング系のためのプラスミドは、同様のエレ  
 メントで変更することができ、イントロン配列は、ベクターの機能を損失することなく除去  
 できる可能性があった。例えば、以下のエレメントは、2ベクターおよび3ベクターのパ  
 ッケージング系において同様のエレメントに取って代わることができた。

## 【0203】

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)は、C  
 MV(配列番号60)またはCAGプロモーター(配列番号100)に取って代わること  
 ができる。これらの配列は、付加、置換、欠失、または変異によってさらに変化させるこ  
 ともできる。

## 【0204】

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)は  
 、ウサギベータグロビンポリA(配列番号48)に取って代わることができる。これらの  
 配列は、付加、置換、欠失、または変異によってさらに変化させることもできる。

## 【0205】

10

20

30

40

50

H I V G a g、P o l、およびインテグラーゼ配列：ヘルパープラスミド中のH I V配列は、異なるH I V株またはクレードから構築されていてよい。例えば、B a l株由来のH I V G a g（配列番号69）、H I V P o l（配列番号70）、およびH I V I n t（配列番号71）は、本明細書に概説されるヘルパー/ヘルパー+R e vプラスミドに含有されるg a g、p o l、およびi n t配列と交換することができる。これらの配列は、付加、置換、欠失、または変異によってさらに変化させることもできる。

#### 【0206】

エンベロープ：V S V - G糖タンパク質は、ネコ内在性ウイルス（R D 1 1 4）（配列番号72）、テナガザル白血病ウイルス（G A L V）（配列番号73）、狂犬病（F U G）（配列番号74）、リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス（L C M V）（配列番号75）、インフルエンザA家禽ペストウイルス（F P V）（配列番号76）、ロスリバーアルファウイルス（R R V）（配列番号77）、マウス白血病ウイルス10A1（M L V）（配列番号78）、またはエボラウイルス（E b o V）（配列番号79）由来の膜糖タンパク質で置換され得る。これらのエンベロープの配列は、本明細書の配列の部分において特定される。さらに、これらの配列は、付加、置換、欠失、または変異によってさらに変化させることもできる。

#### 【0207】

まとめると、3ベクター系対4ベクター系は、部分的には次のように比較および対比することができる。3ベクターのレンチウイルスベクター系は、1．ヘルパープラスミド：H I V G a g、P o l、インテグラーゼ、およびR e v / T a t；2．エンベローププラスミド：V S V - G / F U Gエンベロープ；ならびに3．治療用ベクター：R S V 5' L T R、P s iパッケージングシグナル、G a g断片、R R E、E n v断片、c P P T、W P R E、および3'デルタL T Rを含有する。4ベクターのレンチウイルスベクター系は、1．ヘルパープラスミド：H I V G a g、P o l、およびインテグラーゼ；2．R e vプラスミド：R e v；3．エンベローププラスミド：V S V - G / F U Gエンベロープ；ならびに4．治療用ベクター：R S V 5' L T R、P s iパッケージングシグナル、G a g断片、R R E、E n v断片、c P P T、W P R E、および3'デルタL T Rを含有する。上記の要素に対応する配列は、本明細書の配列表の部分において特定される。

#### 【0208】

（実施例2：抗H I Vレンチウイルスベクターの開発）

この実施例の目的は、抗H I Vレンチウイルスベクターを開発することであった。

#### 【0209】

阻害性RNAのデザイン。H o m o s a p i e n sケモカインC - Cモチーフ受容体5（C C R 5）（G C 0 3 P 0 4 6 3 7 7）のmRNA配列を使用して、ヒト細胞においてC C R 5レベルをノックダウンする潜在的なs i RNAまたはs h RNA候補を検索した。B r o a d I n s t i t u t eのプログラムまたはT h e r m o S c i e n t i f i cのB L O C K - i T R N A i D e s i g n e rなどのs i RNAまたはs h RNAデザインプログラムによって選択された候補から、潜在的なRNA干渉配列を選択した。選択された個々のs h RNA配列を、レンチウイルスベクターのRNAポリメラーゼI I Iプロモーター、例えばH 1、U 6、または7 S Kのすぐ3'側に挿入して、s h RNA発現を調節した。これらのレンチウイルス-s h RNA構築物を使用して細胞の形質導入を行い、特異的なmRNAレベルの変化を測定した。mRNAレベルを低下させるために最も強力なs h RNAをマイクロRNA骨格内に個々に包埋して、C M VまたはE F - 1アルファRNAポリメラーゼI I Iプロモーターのいずれかによる発現を可能にした。マイクロRNA骨格は、m i r b a s e . o r gから選択した。RNA配列を合成s i RNAオリゴヌクレオチドとしても合成し、レンチウイルスベクターを使用せずに細胞に直接導入した。

#### 【0210】

ヒト免疫不全ウイルス1型のB a l株（H I V - 1 8 5 U S \_ B a l、受託番号A Y

713409) のゲノム配列を使用して、ヒト細胞における HIV 複製レベルをロックダウンする潜在的な siRNA または shRNA 候補を検索した。配列相同性および経験に基づいて、この検索では HIV の Tat および Vif 遺伝子の領域に焦点を合わせたが、当業者には、これらの領域の使用は非限定的であり、他の潜在的な標的が選択され得ることは理解されよう。重要なことに、gag または pol 遺伝子の高度に保存された領域は、ベクターの製造に必要なパッケージング系補完プラスミドにこれらと同じ配列が存在したため、shRNA によってターゲティング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、Broad Institute が主催している Gene-ESoftware Suite (broadinstitute.org/mai/public) または Thermo Scientific の BLOCK-iT RNAi Designer (rnadesigner.thermofisher.com/rnaiexpress/setOption.do?designOption=shrna&pid=6712627360706061801) などの siRNA または shRNA デザインプログラムによって選択された候補から、潜在的な HIV 特異的 RNA 干渉配列を選択した。選択された個々の shRNA 配列を、レンチウイルスベクターの RNA ポリメラーゼ III プロモーター、例えば H1、U6、または 7SK のすぐ 3' 側に挿入して、shRNA 発現を調節した。これらのレンチウイルス-shRNA 構築物を使用して細胞の形質導入を行い、特異的な mRNA レベルの変化を測定した。mRNA レベルを低下させるために最も強力な shRNA をマイクロRNA 骨格内に個々に包埋して、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した。

#### 【0211】

ベクターの構築。CCR5、Tat、または Vif の shRNA について、BamHI および EcoRI 制限部位を含有するオリゴヌクレオチド配列を、Eurofins MWG Operon, LLC によって合成した。重複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、セ氏 70 度から室温に冷却中にアニールした。レンチウイルスベクターを、セ氏 37 度で 1 時間にわたり、制限酵素 BamHI および EcoRI で消化した。消化されたレンチウイルスベクターをアガロースゲル電気泳動によって精製し、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、ベクターとオリゴ (3:1 比) を混合し、アニールさせ、ライゲートした。ライゲーション反応は、室温で 30 分間 T4 DNA リガーゼを用いて行った。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。セ氏 42 度での熱ショック後に形質転換が達成された。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 プロスにおいて拡大増殖させた。オリゴ配列の挿入を調べるために、採取した細胞培養物から Invitrogen の DNA ミニプレップキットを用いてプラスミド DNA を抽出した。shRNA 発現を調節するために使用したプロモーターに特異的なプライマーを使用した DNA シーケンシングにより、レンチウイルスベクターにおける shRNA 配列の挿入を検証した。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。例えば、CCR5、Tat、または Vif 遺伝子発現に対する活性が最も高い shRNA 配列を、次いで、EF-1 アルファプロモーターの制御下でマイクロRNA (miR) クラスタにアSEMBL した。プロモーターおよび miR 配列は図 6 に示されている。

#### 【0212】

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る技術を使用して、本明細書の図 7 に示されるように、一連のレンチウイルスベクターを開発した。

#### 【0213】

ベクター 1 を開発し、これは、左から右に、末端反復配列 (LTR) 部分 (配列番号 3

10

20

30

40

50

5) ; H1 エlement ( 配列番号 101 ) ; shCCR5 ( 配列番号 16、18、20、22、または 24 - Y ) ; ウッドチャック肝炎ウイルスの転写後調節Element ( WPRE ) ( 配列番号 32、80 ) ; および末端反復配列部分 ( 配列番号 102 ) を含有する。

【0214】

ベクター2を開発し、これは、左から右に、末端反復配列 ( LTR ) 部分 ( 配列番号 35 ) ; H1 エlement ( 配列番号 101 ) ; shRev / Tat ( 配列番号 10 ) ; H1 エlement ( 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Element ( WPRE ) ( 配列番号 32、80 ) ; および末端反復配列部分 ( 配列番号 102 ) を含有する。

【0215】

ベクター3を開発し、これは、左から右に、末端反復配列 ( LTR ) 部分 ( 配列番号 35 ) ; H1 エlement ( 配列番号 101 ) ; shGag ( 配列番号 12 ) ; H1 エlement ( 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Element ( WPRE ) ( 配列番号 32、80 ) ; および末端反復配列部分 ( 配列番号 102 ) を含有する。

【0216】

ベクター4を開発し、これは、左から右に、末端反復配列 ( LTR ) 部分 ( 配列番号 35 ) ; 7SK Element ( 配列番号 103 ) ; shRev / Tat ( 配列番号 10 ) ; H1 エlement ( 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Element ( WPRE ) ( 配列番号 32、80 ) ; および末端反復配列部分 ( 配列番号 102 ) を含有する。

【0217】

ベクター5を開発し、これは、左から右に、末端反復配列 ( LTR ) 部分 ( 配列番号 35 ) ; EF1 Element ( 配列番号 4 ) ; miR30CCR5 ( 配列番号 1 ) ; MiR21Vif ( 配列番号 2 ) ; miR185Tat ( 配列番号 3 ) ; ウッドチャック肝炎ウイルスの転写後調節Element ( WPRE ) ( 配列番号 32、80 ) ; および末端反復配列部分 ( 配列番号 102 ) を含有する。

【0218】

ベクター6を開発し、これは、左から右に、末端反復配列 ( LTR ) 部分 ( 配列番号 35 ) ; EF1 Element ( 配列番号 4 ) ; miR30CCR5 ( 配列番号 1 ) ; MiR21Vif ( 配列番号 2 ) ; miR155Tat ( 配列番号 104 ) ; ウッドチャック肝炎ウイルスの転写後調節Element ( WPRE ) ( 配列番号 32、80 ) ; および末端反復配列部分 ( 配列番号 102 ) を含有する。

【0219】

ベクター7を開発し、これは、左から右に、末端反復配列 ( LTR ) 部分 ( 配列番号 35 ) ; EF1 Element ( 配列番号 4 ) ; miR30CCR5 ( 配列番号 1 ) ; MiR21Vif ( 配列番号 2 ) ; miR185Tat ( 配列番号 3 ) ; ウッドチャック肝炎ウイルスの転写後調節Element ( WPRE ) ( 配列番号 32、80 ) ; および末端反復配列部分 ( 配列番号 102 ) を含有する。

【0220】

ベクター8を開発し、これは、左から右に、末端反復配列 ( LTR ) 部分 ( 配列番号 35 ) ; EF1 Element ( 配列番号 4 ) ; miR30CCR5 ( 配列番号 1 ) ; MiR21Vif ( 配列番号 2 ) ; miR185Tat ( 配列番号 3 ) ; および末端反復配列部分 ( 配列番号 102 ) を含有する。

【0221】

ベクター9を開発し、これは、左から右に、末端反復配列 ( LTR ) 部分 ( 配列番号 35 ) ; CD4 Element ( 配列番号 30 ) ; miR30CCR5 ( 配列番号 1 ) ; miR21Vif ( 配列番号 2 ) ; miR185Tat ( 配列番号 3 ) ; ウッドチャック肝炎ウイルスの転写後調節Element ( WPRE ) ( 配列番号 32、80 ) ; および末端反復配列部分 ( 配列番号 102 ) を含有する。

10

20

30

40

50

## 【0222】

## ベクターの開発

これらの実験のために開発したベクターのすべてが必ずしも予想され得た通りに機能したとは限らないことに留意されたい。より具体的には、HIVに対するレンチウイルスベクターは、1) 標的細胞表面上のHIV結合タンパク質(受容体)のレベルを低下させて初期のウイルスの付着および侵入を遮断する阻害性RNA、2) ウイルスTat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、HIV TAR配列の過剰発現、および3) HIVゲノム内の重要な保存配列を攻撃する阻害性RNAという、3つの主要な成分を含み得る。

## 【0223】

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な細胞表面上の必須の糖タンパク質であるため、その発現レベルを操作するための標的として、これは選択しなかった。しかしながら、CCR5遺伝子のヌル変異のホモ接合体として生まれ、受容体発現が完全に欠如している人々は、いくつかの感染性疾患に対する感受性の増強および稀な自己免疫が発生する可能性を除いては通常的生活を送る。よって、CCR5の調整は比較的安全なアプローチであると決定され、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であった。

## 【0224】

上記の第2の点に関して、ウイルスTAR配列は、ウイルスTatタンパク質と密に結合するHIVゲノムRNAの高度に構造化された領域である。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のレベルを低下させる、デコイ分子として想定された。しかしながら、TARは、レンチウイルス粒子の製造に使用された細胞を含め、ほとんどの哺乳動物細胞に対して毒性があることが証明された。さらにTARは、他の実験室においてウイルス遺伝子発現を阻害するのに非効率的であり、HIV遺伝子療法において実行可能な成分としては却下された。

## 【0225】

様々な実施形態では、i) 一連のHIV単離物にわたり合理的に保存されている配列が、目的の地理的領域における流行を代表すること；ii) ウイルスベクター中の阻害性RNAの活性に起因するRNAレベルの低下により、対応するタンパク質レベルが、HIV複製を有意に低減させるのに十分な量だけ低下すること；およびiii) 阻害性RNAによりターゲティング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のパッケージングおよびアセンブリに必要とされる遺伝子に存在しないことという、3つの基準を満たすウイルス遺伝子配列が特定された。様々な実施形態では、HIV TatおよびRev遺伝子の接合部における配列、ならびにHIV Vif遺伝子内の第2の配列が、阻害性RNAによってターゲティングされた。Tat/Revのターゲティングは、この領域はHIVゲノム内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の発現を低減させるというさらなる利益を有する。

## 【0226】

ベクターの開発および試験のための様々な方法は、まず好適な標的(本明細書に記載されている)を特定した後、細胞モデルで試験するための個々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、最後に、抗HIV機能が証明された阻害性RNAを含有するレンチウイルスベクターを構築することに依拠する。レンチウイルスベクターは、毒性、in vitro産生中の収量、およびCCR5発現レベルの低下またはウイルス遺伝子産物の低減によるウイルス複製の阻害という点でのHIVに対する有効性について試験される。

## 【0227】

以下の表2は、複数のバージョンの阻害性構築物を通して臨床候補に到達するまでの進

10

20

30

40

50

行を実証する。最初に s h R N A ( 短鎖相同 R N A ) 分子をデザインし、プラスミド D N A 構築物から発現させた。

【 0 2 2 8 】

以下の表 2 で詳述するプラスミド 1 ~ 4 は、H I V の G a g 、 P o l 、 および R T 遺伝子に対する s h R N A 配列を試験した。各 s h R N A は細胞モデルにおいてウイルスタンパク質発現を抑制するのに活性であったが、さらなる開発を妨げた 2 つの重要な問題があった。第 1 に、これらの配列は、北米および欧州で現在循環しているクレード B H I V 株を代表するものではない H I V の実験室単離物に対してターゲティングされた。第 2 に、これらの s h R N A は、レンチウイルスベクターパッケージング系において重要な成分をターゲティングし、製造中のベクター収量を大きく低減させることになる。表 2 で詳述するプラスミド 5 は、C C R 5 をターゲティングするために選択され、リード候補配列をもたらした。表 2 で詳述するプラスミド 6、7、8、9、10、および 11 は、T A R 配列を組み込んだものであり、レンチウイルスベクター製造に使用された細胞を含む哺乳動物細胞に対して許容されない毒性をもたらしたことが分かった。表 2 で詳述するプラスミド 2 は、T a t R N A 発現を低減させることができるリード s h R N A 配列を特定した。表 2 で詳述するプラスミド 12 は、レンチウイルスベクターにおいてマイクロ R N A ( m i R ) として発現される s h C C R 5 の有効性を実証し、これが最終産物に存在するはずであることを裏付けた。表 2 で詳述するプラスミド 13 は、レンチウイルスベクターにおいてマイクロ R N A ( m i R ) として発現される s h V i f の有効性を実証し、これが最終産物に存在するはずであることを裏付けた。表 2 で詳述するプラスミド 14 は、レンチウイルスベクターにおいてマイクロ R N A ( m i R ) として発現される s h T a t の有効性を実証し、これが最終産物に存在するはずであることを裏付けた。表 2 で詳述するプラスミド 15 は、単一のプロモーターから発現された m i R クラスターの形態で、m i R C C R 5、m i R T a t および m i R V i f を含有した。これらの m i R は、レンチウイルスベクターパッケージング系において重要な成分をターゲティングせず、哺乳動物細胞に対して無視できる毒性を有することが証明された。クラスター内の m i R は、以前に試験された個々の m i R に対して等しく有効であり、全体的な影響は、C C R 5 向性 H I V B a L 株の複製の実質的な低減であった。

10

20

【表 2 - 1】

表 2: HIV ベクターの開発

	内部コード	物質	説明	所見	決定
1	SIH-H1-shRT-1,3	レンチウイルスベクター	LAI 株の RT のための shRNA 構築物	誤った標的、実験室ウイルス、ウイルス試験なし	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 重複	Tat タンパク質ノックダウン>90%	リード
<p>ベクターの構築:Rev/Tat(RT)shRNA について、BamHI および EcoRI 制限部位を含有するオリゴヌクレオチド配列を、MWG Operon によって合成した。Tat mRNA 発現を減少させる能力について、2 つの異なる Rev/Tat 標的配列を試験した。RT1,3 標的配列は、(5'-ATGGCAGGAAGAAGCGGAG-3')(配列番号 89)であり、shRNA 配列は、(5'-ATGGCAGGAAGAAGCGGAGTTCAAGAGACTCCGCTTCTTCCTGCCATTTTTT-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。pSIH レンチウイルスベクター(System Biosciences)にオリゴヌクレオチド配列を挿入した。</p> <p>Rev/Tat に対する shRNA の機能試験:3'-UTR(mRNA の非翻訳領域)に挿入された Rev/Tat 標的配列を含有するルシフェラーゼレポータープラスミドを使用し、Tat 発現を低減させるベクターの能力を試験した。ルシフェラーゼおよび Rev/Tar 標的配列を含有するプラスミドを、shRT1,3 または shRT43 プラスミドのいずれかとともに共トランスフェクトした。shRT43 shRNA 配列の強力な機能を示す発光の 90%の低減があったが、shRT1,3 プラスミドでは 10%未満であった。</p> <p>結論:ルシフェラーゼアッセイ系における mRNA レベルの低下という点で、SIH-H1-shRT43 は SIH-H1-shRT-1,3 よりも優れていた。これは shRT43 配列の強力な阻害活性を示し、さらなる開発のためのリード候補としてこれを選択した。</p>					
3	SIH-H1-shGag-1	レンチウイルスベクター	LAI Gag のための 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	放棄
<p>ベクターの構築:Gag shRNA について、BamHI および EcoRI 制限部位を含有するオリゴヌクレオチド配列を、MWG Operon によって合成した。Gag mRNA 発現を減少させる能力について、Gag 標的配列を試験した。Gag 標的配列は、(5'-GAAGAAATGATGACAGCAT-3')(配列番号 11)であり、shRNA 配列は、(5'-GAAGAAATGATGACAGCATTTC AAGAGAATGCTGTCATCATTCTTCTTTTT-3')(配列番号 12)である。pSIH レンチウイルスベクター(System Biosciences)にオリゴヌクレオチド配列を挿入した。</p> <p>Gag に対する shRNA の機能試験:3'-UTR(mRNA の非翻訳領域)に挿入された Gag 標的配列を含有するルシフェラーゼレポータープラスミドを使用し、Gag 発現を低減させるベクターの能力を試験した。ルシフェラーゼおよび Gag 標的配列を含有するプラスミドを、Gag プラスミドに共トランスフェクトした。発光が約 90%低減し、shGag shRNA 配列の強力な効果が示された。</p> <p>結論:この shRNA 配列は、HIV Gag 発現に対して強力であるが、放棄された。レンチウイルスパッケージング系は、ヘルパープラスミドからの Gag の産生を必要とし、Gag の</p>					

10

20

30

40

【表 2 - 2】

shRNA による阻害は、レンチウイルスベクターの収量を低減させる。この shRNA 配列は、HIV のオリゴヌクレオチド阻害剤として使用してもよいし、または、異なるベクターゲノムを使用するか、もしくはこの shRNA による阻害に抵抗するように改変された、代替のウイルスベクターパッケージング系に組み込んでもよい。					
4	SIH-H1-shPol-1	レンチウイルスベクター	Pol のための shRNA 構築物	Pol 発現を阻害するがパッケージングを阻害する	放棄
<p>ベクターの構築:MWG Operon によって合成された BamHI および EcoRI 制限部位を含有するオリゴヌクレオチド配列を有する Pol shRNA を構築した。Pol mRNA 発現を減少させる能力について、Pol 標的配列を試験した。Pol 標的配列は、(5'-CAGGAGCAGATGATACAG-3')(配列番号 13)であり、shRNA 配列は、(5'-CAGGAGATGATACAGTTCAAGAGACTGTATCATCTGCTCCTGTTTT-3')(配列番号 14)である。pSIH レンチウイルスベクター(System Biosciences)にオリゴヌクレオチド配列を挿入した。</p> <p>HIV Pol に対する shRNA の機能試験:3'-UTR(mRNA の非翻訳領域)に挿入された Pol 標的配列を含有するルシフェラーゼレポータープラスミドを使用し、Pol 発現を低減させるベクターの能力を試験した。ルシフェラーゼおよび Pol 標的配列を含有するプラスミドを、Pol プラスミドに共トランスフェクトした。発光が 60%低減し、shPol shRNA 配列の強力な効果が示された。</p> <p>結論:この shRNA 配列は、HIV Pol 発現に対して強力であるが、放棄された。レンチウイルスパッケージング系は、ヘルパープラスミドからの Pol の産生を必要とし、Pol の shRNA による阻害は、レンチウイルスベクターの収量を低減させる。この shRNA 配列は、HIV のオリゴヌクレオチド阻害剤として使用してもよいし、または、異なるベクターゲノムを使用するか、もしくはこの shRNA による阻害に抵抗するように改変された、代替のウイルスベクターパッケージング系に組み込んでもよい。</p>					
5	SIH-H1-shCCR5-1	レンチウイルスベクター	CCR5 のための shRNA 構築物	5 つの候補の中で最良、細胞外 CCR5 タンパク質の低減>90%	リード
<p>ベクターの構築:MWG Operon によって合成された BamHI および EcoRI 制限部位を含有するオリゴヌクレオチド配列を有する CCR5 shRNA を構築した。pSIH レンチウイルスベクター(System Biosciences)にオリゴヌクレオチド配列を挿入した。CCR5 遺伝子配列 1(配列番号 25)に焦点を合わせる CCR5 標的配列 1 番は、(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)に焦点を合わせる CCR5 標的配列 2 番は、(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)に焦点を合わせる CCR5 標的配列 3 番は、(5'-GTAGCTCTAACAGGTTGGA-3')(配列番号 19)であり、shRNA 配列は、(5'-GTAGCTCTAACAGGTTGGATTCAAGAGATCCAACCTGTTAGAGCTACTTTTT-3')(配列番号 20)である。CCR5 遺伝子配列 4(配列番号 28)に焦点を合わせる CCR5 標的配列 4 番は、(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)に焦点を合わせる CCR5 標的配列 5 番は、(5'-GAGCAAGCTCAGTTTACACC-3')(配列番号 23)であり、shRNA 配列は、(5'-GAGCAAGCTCAGTTTACACCTTCAAGAGAGGTGTAACCTGAGCTTGCTCTTTTT-3')(配列番号 24)である。</p>					

【表 2 - 3】

<p>番号 24)である。</p> <p>CCR5 に対する shRNA の機能試験:最初に、各プラスミドに関する別々の実験で、5つの CCR5 標的配列のうちの1つを含有するレンチウイルスプラスミドのそれぞれを、ヒト CCR5 遺伝子を発現するプラスミドと共トランスフェクトすることにより、CCR5 RNA 発現をノックダウンする CCR5 shRNA 配列の能力を試験した。次いで、CCR5 特異的プライマーを使用した qPCR 分析により、CCR5 mRNA 発現を評価した。</p> <p>結論:CCR5 mRNA レベルの低下に基づく、shRNACCR5-1 が CCR5 遺伝子発現を低減させるの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>						10
6	SIH-U6-TAR	レンチウイルスベクター	U6 プロモーター-TAR	細胞に対して毒性	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	細胞に対して毒性	放棄	
8	U6-TAR-H1-shRT	レンチウイルスベクター	U6 プロモーター-TAR-H1-RT	HIV を抑制する、細胞に対して毒性、パッケージング不良	放棄	20
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 に変更する	毒性、パッケージング不良	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、パッケージング不良、H1 反復	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 に変更する	毒性、パッケージング不良	放棄	
<p>ベクターの構築:隣接する KpnI 制限部位を含有する TAR デコイ配列を MWG operon によって合成し、pSIH レンチウイルスベクター(System Biosciences)の KpnI 部位に挿入した。このベクターにおいて、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'-</p> <p>CTTGCAATGATGTCGTAATTTGCGTCTTACCTCGTTCTCGACAGCGACCAGATCTGAGCC TGGGAGCTCTCTGGCTGTCAGTAAGCTGGTACAGAAGGTTGACGAAAATTCTTACTGAG CAAGAAA-3')配列番号 8)である。TAR 配列に特異的なプライマーを使用した qPCR 分析によって TAR デコイ配列の発現を決定した。同じく TAR 配列を含有するさらなるベクターを構築した。このベクターの XhoI 部位に H1 プロモーターおよび shRT 配列を挿入した。H1 shRT 配列は、(5'-</p> <p>GAACGCTGACGTCATCAACCCGCTCCAAGGAATCGCGGGCCAGTGTCAGTACTAGGCGGGA ACACCCAGCGCGTGCGCCCTGGCAGGAAGATGGCTGTGAGGGACAGGGGAGTGGCG CCCTGCAATATTTGCATGTCGCTATGTGTTCTGGGAAATCACCATAAACGTGAAATGTCT TTGGATTGGGAATCTTATAAGTTCTGTATGAGACCACTTGGATCCGCGGAGACAGCGA CGAAGAGCTTCAAGAGAGCTCTTCGTCGCTGCTCCGCTTTTT-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、shRT 発現を調節するため、7SK プロモーターを、H1 プロモーターの代わりに使用した。U6 TAR、H1 shRT、および H1 shCCR5 を含有する別のベクターを構築した。U6 TAR および H1 shRT を含有するプラスミドの SpeI 部位に H1 shCCR5 配列を挿入した。H1 CCR5 配列は、(5'-</p> <p>GAACGCTGACGTCATCAACCCGCTCCAAGGAATCGCGGGCCAGTGTCAGTACTAGGCGGGA ACACCCAGCGCGTGCGCCCTGGCAGGAAGATGGCTGTGAGGGACAGGGGAGTGGCG CCCTGCAATATTTGCATGTCGCTATGTGTTCTGGGAAATCACCATAAACGTGAAATGTCT TTGGATTGGGAATCTTATAAGTTCTGTATGAGACCACTTGGATCCGCTGTCAGTCAAGTCCAAT</p>						30
<p>ベクターの構築:隣接する KpnI 制限部位を含有する TAR デコイ配列を MWG operon によって合成し、pSIH レンチウイルスベクター(System Biosciences)の KpnI 部位に挿入した。このベクターにおいて、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'-</p> <p>CTTGCAATGATGTCGTAATTTGCGTCTTACCTCGTTCTCGACAGCGACCAGATCTGAGCC TGGGAGCTCTCTGGCTGTCAGTAAGCTGGTACAGAAGGTTGACGAAAATTCTTACTGAG CAAGAAA-3')配列番号 8)である。TAR 配列に特異的なプライマーを使用した qPCR 分析によって TAR デコイ配列の発現を決定した。同じく TAR 配列を含有するさらなるベクターを構築した。このベクターの XhoI 部位に H1 プロモーターおよび shRT 配列を挿入した。H1 shRT 配列は、(5'-</p> <p>GAACGCTGACGTCATCAACCCGCTCCAAGGAATCGCGGGCCAGTGTCAGTACTAGGCGGGA ACACCCAGCGCGTGCGCCCTGGCAGGAAGATGGCTGTGAGGGACAGGGGAGTGGCG CCCTGCAATATTTGCATGTCGCTATGTGTTCTGGGAAATCACCATAAACGTGAAATGTCT TTGGATTGGGAATCTTATAAGTTCTGTATGAGACCACTTGGATCCGCTGTCAGTCAAGTCCAAT</p>						40

【表 2 - 4】

<p>CTATGTTCAAGAGACATAGATTGGACTTGACACTTTTT-3')(配列番号 92)である。また、shRT 発現を調節するため、7SK プロモーターを、HI プロモーターの代わりに使用した。</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 の効果を試験した。TAR 配列を含めたとき、SIH パッケージング系におけるベクターの収量は実質的に低減した。</p> <p>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、商業的開発に適さない。これらの構築物は放棄された。</p>					
12	shCCR5	レンチウイルスベクター	マイクロ RNA 配列	細胞外 CCR5 タンパク質の低減>90%	リード
<p>ベクターの構築:MWG Operon によって合成された BsrGI および NotI 制限部位を含有する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。pCDH レンチウイルスベクター(System Biosciences)にオリゴヌクレオチド配列を挿入した。プラスミド構築物試験物質 5 に使用した CMV プロモーターを EF-1 プロモーターで置換した。隣接する ClaI および BsrGI 制限部位を含有する EF-1 プロモーターを MWG Operon によって合成し、shCCR5-1 を含有する pCDH ベクターに挿入した。EF-1 プロモーター配列は、(5'-CCGGTGCCTAGAGAAGGTGGCGCGGGTAAACTGGGAAAGTGATGTCGTGTACTGGCTCGCCTTTTTCCCGAGGGTGGGGGAGAACCGTATATAAGTGCAGTAGTCGCCGTGAACGTCTTTTTTCGCAACGGGTTTGCCGCCAGAACACAGGTAAGTGCCGTGTGTGGTTCCCGCGG GCCTGGCCTCTTACGGGTTATGGCCCTTGCGTGCCTTGAATTACTTCCACGCCCTGGC TGCAGTACGTGATTCTTGATCCCAGCTTCGGGTTGGAAGTGGGTGGGAGAGTTCGAGG CCTTGCGCTTAAGGAGCCCTTCGCCTCGTGTGAGTTGAGGCTGGCCTGGCGCTGG GCGCCGCGCGTGCGAATCTGGTGGCACCTTCGCGCCTGTCTCGTGTCTTTCGATAAGTCT CTAGCCATTTAAAATTTTTGATGACCTGCTGCGACGCTTTTTTCTGGCAAGATAGTCTTG TAAATGCGGGCCAAGATCTGCACACTGGTATTTTCGGTTTTTGGGGCCGCGGGCGGCCGAC GGGGCCCGTGCCTCCAGCGCACATGTTTCGGCGAGGCGGGGCTGCGAGCGCGGCCACC GAGAATCGGACGGGGGTAGTCTCAAGCTGGCCGGCCTGCTCTGGTGCCTGGCCTCGCGC CGCCGTGTATCCCGCCCTGGGCGGCAAGGCTGGCCCGGTCCGGCACCACTGATGCTGA CCGGAAAGATGGCCGCTTCCCGGCCCTGCTGCAGGGAGCTCAAAATGGAGGACGCGGC GCTCGGGAGAGCGGGCGGGTGAGTCACCCACACAAAGGAAAAGGGCCTTTCGTCCTCA GCCGTCGCTTCAITGTACTCCACGGAGTACCGGGCGCCGTCCAGGCACCTCGATTAGTTC TCGAGCTTTTGGAGTACGTCGTCTTTAGGTTGGGGGAGGGGTTTTATGCGATGGAGTTT CCCCACACTGAGTGGGTGGAGACTGAAGTTAGGCCAGCTTGGCACTTGATGTAATTCTC CTTGGAATTTGCCCTTTTTGAGTTTGGATCTTGGTTCATTCTCAAGCCTCAGACAGTGGTT CAAAGTTTTTTTCTTCCATTTAGGTGTCGIGA-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:CEM-CCR5 T 細胞に形質導入を行い、CCR5 に対する蛍光標識モノクローナル抗体で染色した後に細胞表面 CCR5 発現を測定し、細胞表面 CCR5 分子の数に正比例する染色の強度を分析的フローサイトメトリーによって測定することにより、CCR5 発現をノックダウンする miR CCR5 配列の能力を決定した。CCR5 をターゲティングするのに最も有効な shRNA 配列は、CCR5 shRNA 配列 1 番であった。しかしながら、合成マイクロ RNA 配列を構築するのに最も有効な CCR5 ターゲティング配列は、CCR5 配列 5 番と重複していた;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、(5'-AGGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCGACTGTAAGTGGCTGCTCTACTGTGAAGCCA CAGATGGGTAGAGCAAGCACAGTTTACCGCTGCCTACTGCCTCGGACTTCAAGGGGCTT-3')(配列番号 1)である合成 miR30 CCR5 配列を構築した。miR CCR5 標的配列は、(5'-GAGCAAGCTCAGTTTACA-3')(配列番号 5)である。細胞 1 個あたり平均で 1.25 個の組み込まれたレンチウイルスのゲノムコピーを生成する、5 に等しい感染多重度において、CCR5 発現レベルは<math>\geq 90\%</math>低下し、レンチウイルスベクターにおける miR30CCR5 マイクロ RNA</p>					

10

20

30

40

【表 2 - 5】

構築物による CCR5 mRNA の強力な阻害を示した。					
結論:miR30CCR5 構築物は、CCR5 細胞表面発現を低減させるのに強力であり、HIV の治療用レンチウイルスのリード候補である。					
13	shVif	レンチウイルスベクター	マイクロ RNA 配列	Vif タンパク質の低減>80%	リード
<p>ベクターの構築:MWG Operon によって合成された BsrGI および NotI 制限部位を含有する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。EF-1 プロモーターを含有する pCDH レンチウイルスベクター(System Biosciences)にオリゴヌクレオチド配列を挿入した。配列アラインメントおよび合成 miRNA の構築の経験に基づき、miR21 ヘアピン配列を使用して、(5'-CATCTCCATGGCTGTACCACCTTGTCTGGGGGATGTGTACTTCTGAACTTGTGTTGAATCTCATGGAGTTCAGAAGAACACATCCGCACTGACATTTTGGTATCTTTCATCTGACCA-3')(配列番号 2)である合成 miR21 Vif 配列を構築した。miR Vif 標的配列は、(5'-GGGATGTGTACTTCTGAACTT-3')(配列番号 6)である。</p> <p>miR21Vif の効力に関する機能試験: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免疫ブロット分析によって Vif タンパク質発現を測定することにより、Vif 発現をノックダウンする miR Vif 配列の能力を決定した。</p> <p>結論:免疫ブロットデータの定量的画像解析によって決定した場合、miR21Vif は、Vif タンパク質発現を<math>\geq 10</math> 倍低減させた。これは、miR21Vif が本発明者らの治療用レンチウイルスのリード候補として正当化す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 の低減 >80%	リード
<p>ベクターの構築:MWG Operon によって合成された BsrGI および NotI 制限部位を含有する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。EF-1 プロモーターを含有する pCDH レンチウイルスベクター(System Biosciences)にマイクロ RNA クラスターを挿入した。配列アラインメントおよび合成 miRNA の構築の経験に基づき、(5'-GGGCCTGGCTCGAGCAGGGGCGAGGGATTCCGCTTCTTCTGCCATAGCGTGGTCCCC TCCCCTATGGCAGGCAGAAGCGGCACCTTCCCTCCCAATGACCGCGTCTTCGTCG-3')である合成 miR185 Tat 配列を構築するため、miR185 ヘアピン配列を選択した。miR Tat 標的配列は、(5'-TCCGCTTCTTCTGCCATAG-3')(配列番号 3)である。</p> <p>miR185Tat の効力に関する機能試験:Tat 特異的プライマーを使用した RT-PCR 分析によって Tat mRNA 発現を測定することにより、Tat 発現をノックダウンする miR Tat の能力を決定した。本発明者らは、Tat mRNA の相対レベルを低下させることに基づいて miR185Tat を同様の miR155Tat と比較した。</p> <p>結論:miR185Tat は、miR155Tat と比較して Tat mRNA を低減させる効力がおよそ 2 倍高く、本発明者らの治療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 の低減 >90%、Vif タンパク質の低減 >80%、Tat RNA の低減 >80%、HIV 複製の >95%の阻害	候補

10

20

30

40

## 【表 2 - 6】

ベクターの構築:MWG Operon によって合成された BsrGI および NotI 制限部位を含有する合成 DNA 断片を用い、miR30CCR5 miR21Vif miR185Tat マイクロ RNA クラスター配列を構築した。EF-1 プロモーターを含有する pCDH レンチウイルスベクター(System Biosciences)に DNA 断片を挿入した。miR クラスター配列は、(5'-AGGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCGACTGTAAGCTGAGCTTGCTCTACTGTGAAGCCA CAGATGGGTAGAGCAAGCACAGTTTACCGCTGCCTACTGCCTCGGACTTCAAGGGGCTT CCCGGGCATCTCCATGGCTGTACCACCTTGTCTGGGGGATGTGTACTTCTGAACTTGTGTT GAATCTCATGGAGTTT CAGAAGAACACATCCGCACTGACATTTTGGTATCTTTCATCTGAC CAGCTAGCGGGCCTGGCTCGAGCAGGGGGCGAGGGATTCCGCTTCTTCCTGCCATAGCG TGGTCCCCTCCCCTATGGCAGGCAGAAGCGGCACCTTCCCTCCCAATGACCGCGTCTTCG TC-3')(配列番号 31)であり、EF-1 プロモーターの制御下で発現可能な単一のクラスターに試験物質 12、試験物質 13、および試験物質 14 が組み込まれている。

10

miR30CCR5、miR21Vif、および miR185Tat のマイクロ RNA クラスターを含有するレンチウイルスベクター AGT103 の効力に関する機能試験:細胞表面 CCR5 発現の低減に関するアッセイを使用して、CCR5 に対する効力について AGT103 ベクターを試験した(試験物質 12)。細胞表面 Vif 発現の低減に関するアッセイを使用して、Vif に対する効力について AGT103 ベクターを試験した(試験物質 13)。細胞表面 Tat 発現の低減に関するアッセイを使用して、Tat に対する効力について AGT103 ベクターを試験した(試験物質 14)。

20

結論:miRNA クラスターによる CCR5 発現を低減させる効力は、miR30CCR5 単独で観察された効力と同様であった。miRNA クラスターによる Vif 発現を低減させる効力は、miR21Vif 単独で観察された効力と同様であった。miRNA クラスターによる Tat 発現を低減させる効力は、miR185Tat 単独で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 レベルを低下させ、2つの HIV 遺伝子を阻害するのに強力である。よって、この miRNA クラスターを含有する AGT103 を、本発明者らの HIV 機能的治療プログラムのための治療用ベクター構築物として選択した。

## 【 0 2 2 9】

機能アッセイ。CCR5、Tat、または Vif shRNA 配列を含有する個々のレンチウイルスベクター、ならびに、実験の目的で、CMV 最初期プロモーターの制御下で緑色蛍光タンパク質(GFP)を発現し、AGT103/CMV-GFP と呼称されるレンチウイルスベクターを、CCR5、Tat、または Vif の発現をノックダウンする能力について試験した。ポリプレンの存在下または非存在下のいずれかで、哺乳動物細胞にレンチウイルス粒子を形質導入した。2~4日後に細胞を収集し、タンパク質およびRNAをCCR5、Tat、または Vif の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特異的な蛍光抗体による細胞の標識(CCR5アッセイ)後、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、改変および非改変細胞の蛍光を比較する分析的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

## 【 0 2 3 0】

レンチウイルス試験の開始。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 細胞培養培地を作った。IL2 10,000 単位/ml、IL-12 1 µg/ml、IL-7 1 µg/ml、IL-15 1 µg/ml のサイトカインストックも事前に調製した。

40

## 【 0 2 3 1】

レンチウイルスを形質導入する前に、感染性ウイルス力価を決定し、適切な感染多重度(MOI)になるように添加するためのウイルスの量を算出した。

## 【 0 2 3 2】

0~12日目:抗原特異的濃縮。0日目、凍結保存された PBMC を解凍し、10分間 1200 rpm にて 10 ml の 37 培地で洗浄し、 $2 \times 10^6$  / ml の濃度で 37 培地に再懸濁した。この細胞を、24 ウェルプレート中 0.5 ml / ウェルにて、37、

50

5% CO<sub>2</sub>で培養した。最適な刺激条件を定義するために、以下の表3に列挙した試薬の組み合わせで細胞を刺激した。

【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

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

10

【0233】

4日目および8日目、0.5mlの新鮮培地およびサイトカインを列挙した濃度で（濃度はすべて培養物中の最終濃度を示す）、刺激した細胞に添加した。

【0234】

12~24日目：非特異的拡大増殖およびレンチウイルス形質導入。12日目、刺激した細胞をピペット操作によりプレートから取り出し、新鮮なT細胞培養培地に $1 \times 10^6$ /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、製造元の説明に従い、DYNABEADS（登録商標）Human T-Activator CD3/CD28と、それに加えて上記に列挙したサイトカインで刺激した。フラスコを垂直姿勢でインキュベートした。

20

【0235】

14日目、AGT103/CMV-GFPをMOI20で添加し、培養物を2日間インキュベーターに戻した。このとき、細胞をピペット操作により回収し、1300rpmで10分間の遠心分離によって収集し、同じ体積の新鮮培地に再懸濁し、再び遠心分離して緩い細胞ペレットを形成した。この細胞ペレットを、先行ステップで使用したのと同じサイトカインを含む新鮮培地に、1mlあたりの生存細胞 $0.5 \times 10^6$ 個の細胞で再懸濁した。

【0236】

14~23日目にかけて、細胞の数を2日ごとに評価し、細胞を新鮮培地で $0.5 \times 10^6$ /mlに希釈した。サイトカインは毎回添加した。

30

【0237】

24日目に細胞を収集し、細胞からビーズを除去した。ビーズを除去するため、2分間にわたり、選別用磁石に入れた好適な管に細胞を移した。細胞を含有する上清を新しい管に移した。次いで細胞を新鮮培地中 $1 \times 10^6$ /mlで1日間培養した。アッセイを行い、抗原特異的T細胞およびレンチウイルスを形質導入した細胞の頻度を決定した。

【0238】

可能性のあるウイルス増大を防止するため、アンブレナビル（0.5ng/ml）を刺激の第1日目および培養中1日おきに培養物に添加した。

40

【0239】

IFNガンマの細胞内サイトカイン染色により抗原特異的T細胞を調査する。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（5μg/mlの個々のペプチド）、またはPHA（5μg/ml、陽性対照）で刺激した。4時間後、BD GolgiPlug（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、製造元の説明に従ってBD Cytofix/Cytoperm（商標）キットを用い、細胞外抗体（CD3、CD4またはCD8；BD Biosciences）および細胞内抗体（IFNガンマ；BD Biosciences）で染色した。BD FACSCalibur（商標）Flow Cytometerで試料を分析し

50

た。適切なアイソタイプ適合抗体で標識した対照試料を各実験に含めた。FlowJoソフトウェアを使用してデータを分析した。

#### 【0240】

レンチウイルス形質導入率をGFP+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細胞をCD3+CD4+GFP+IFNガンマ+細胞の頻度によって決定する。CD3+CD8+GFP+IFNガンマ+細胞の試験は対照として含まれている。

#### 【0241】

これらの結果は、HIV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デザインされたレンチウイルスを標的T細胞集団のCD4<sup>+</sup>T細胞に形質導入することにより、ウイルスに対して免疫があるT細胞の拡大増殖可能な集団が産生され得ることを示す。この実施例は、開示されているレンチウイルス構築物をワクチン接種と組み合わせて使用するとHIV患者の機能的治癒がもたらされ得ることを示す概念の証拠として機能する。

10

#### 【0242】

(実施例4：実験的ベクターによるCCR5のノックダウン)

AGTc120は、多量のCD4およびCCR5を安定に発現するHeLa細胞株である。LV-CMV-mCherry(CMV最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mCherry)またはAGT103/CMV-mCherryありまたはなしでAGTc120に形質導入を行った。mCherry蛍光タンパク質の遺伝子発現は、CMV(サイトメガロウイルス最初期プロモーター)発現カセットによって制御された。LV-CMV-mCherryベクターはマイクロRNAクラスターを欠いていたが、AGT103/CMV-mCherryは、CCR5、Vif、およびTatに対する治療用miRNAを発現した。

20

#### 【0243】

図8Aに示されるように、形質導入効率は>90%であった。7日後、細胞を収集し、CCR5に対する蛍光モノクローナル抗体で染色し、分析的フローサイトメトリーに供した。CCR5 APCの平均蛍光強度(x軸)を最頻値に正規化した細胞数(y軸)に対してプロットするこれらのヒストグラムにおいて、アイソタイプ対照は灰色で示されている。細胞表面CCR5について染色した後、レンチウイルスなしまたは対照レンチウイルス(mCherryマーカーのみを発現する)で処置した細胞はCCR5密度の変化を示さなかったが、AGT103(右のセクション)は、CCR5染色強度をアイソタイプ対照のレベル近くまで低減させた。7日後、R5向性HIVレポーターウイルスBal-GFPありまたはなしで細胞を感染させた。3日後に細胞を収集し、フローサイトメトリーによって分析した。90%超の細胞が形質導入されていた。AGT103-CMV/CMVmCherryは、対照ベクターで処置された細胞と比較して、形質導入されたAGTc120細胞におけるCCR5発現を低減させ、R5向性HIV感染を遮断した。

30

#### 【0244】

図8Bは、トランスフェクトされたAGTc120細胞のHIV感染に対する相対的な非感受性を示す。上記のように、レンチウイルスベクターはmCherryタンパク質を発現し、HIVにも感染した(GFPを発現する)形質導入細胞は、フォールスカラーフローサイトメトリードットプロットの右上象限に二重陽性細胞として現れることになる。HIVの非存在下(上パネル)では、いかなる条件下でもGFP+細胞は存在しなかった。HIV感染後(下パネル)、レンチウイルス形質導入の非存在下で56%の細胞が感染し、LV-CMV-mCherryが形質導入されたAGTc120細胞では53.6%の細胞が感染した。治療用AGT103/CMV-mCherryベクターを細胞に形質導入したとき、細胞が形質導入され感染したことを示す二重陽性象限には、細胞の0.83%しか現れなかった。

40

#### 【0245】

53.62(対照ベクターを含む二重陽性細胞の割合)を0.83(治療用ベクターを含む二重陽性細胞の割合)で割ると、この実験系においてAGT103が65倍超のHI

50

Vからの保護をもたらしたことが示される。

【0246】

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

阻害性RNAのデザイン。Homo sapiensケモカイン受容体CCR5 (CCR5、NC 000003.12)の配列を使用して、ヒト細胞においてCCR5レベルをノックダウンする潜在的なsiRNAまたはshRNA候補を検索した。Broad InstituteのプログラムまたはThermo ScientificのBLOCK-IT RNA i DesignerなどのsiRNAまたはshRNAデザインプログラムによって選択された候補から、潜在的なRNA干渉配列を選択した。shRNA配列を、RNAポリメラーゼIIIプロモーター、例えばH1、U6、または7SKのすぐ後にプラスミドに挿入し、shRNA発現を調節することができる。shRNA配列は、CMVまたは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、同様のプロモーターを使用してレンチウイルスベクターに挿入するか、またはマイクロRNA骨格内に包埋してもよい。RNA配列は、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から独立して利用することもできる。

10

【0247】

プラスミドの構築。CCR5 shRNAについて、BamHIおよびEcoRI制限部位を含有するオリゴヌクレオチド配列を、MWG Operonによって合成した。オリゴヌクレオチド配列を70でインキュベートすることによってアニールし、次いで室温に冷ました。アニールしたオリゴヌクレオチドを37で1時間にわたり制限酵素BamHIおよびEcoRIで消化し、次いで70で20分間にわたり酵素を不活化した。並行して、プラスミドDNAを、37で1時間にわたり、制限酵素BamHIおよびEcoRIで消化した。消化されたプラスミドDNAをアガロースゲル電気泳動によって精製し、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、血漿とオリゴヌクレオチド配列を3:1のインサート対ベクター比でライゲートした。ライゲーション反応は、室温で30分間T4 DNAリガーゼを用いて行った。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での熱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Lプロスにおいて拡大増殖させた。オリゴ配列の挿入を調べるために、採取した細胞培養物からInvitrogenのDNAMiniプレップキットを使用してプラスミドDNAを抽出し、制限酵素消化によって試験した。shRNA発現を調節するために使用したプロモーターに特異的なプライマーを使用したDNAシーケンシングにより、プラスミドへのshRNA配列の挿入を検証した。

20

30

【0248】

CCR5 mRNAの低減に関する機能アッセイ：CCR5発現の阻害に関するアッセイでは、2つのプラスミドの共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に対して指向された5つの異なるshRNA配列のうちの1つを含有する。第2のプラスミドは、ヒトCCR5遺伝子のcDNA配列を含有する。プラスミドを293T細胞に共トランスフェクトした。48時間後、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SuperScript Kitを使用し、RNAからcDNAを合成した。次いで、Applied Biosystems Step One PCR機械を使用した定量的RT-PCRにより、試料を分析した。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'-CCCCAAGAAGGTCAAGGTAATCA-3') (配列番号94)を使用し、InvitrogenのSYBR Greenを用いてCCR5発現を検出した。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'-AGCGCGGCTACAGCTTCA-3') (配列番号95)お

40

50

よびリバースプライマー (5' - GGCGACGTAGCACAGCTTCTP - 3') (配列番号96) を使用し、ベータアクチン遺伝子発現に関する mRNA に対して試料を正規化した。各試料についてアクチンメッセンジャー RNA のレベルに正規化した Ct 値によって CCR5 mRNA の相対発現を決定した。結果を図9に示す。

【0249】

図9Aに示されるように、CCR5 shRNA構築物およびCCR5発現プラスミドの共トランスフェクションにより、293T細胞におけるCCR5のノックダウンを試験した。対照試料には、いずれのヒト遺伝子もターゲティング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、試料を採取し、定量的PCRによってCCR5 mRNAレベルを測定した。さらに、図9Bに示されるように、CCR5 shRNA-1 (配列番号16) を発現するレンチウイルスの形質導入後のCCR5ノックダウン。

10

【0250】

(実施例6：レンチウイルスベクターにおけるshRNA阻害剤配列によるHIV成分の調節)

阻害性RNAのデザイン。

HIV1型Rev/Tat (5' - GCGGAGACAGCGACGAAGAGGC - 3') (配列番号9) およびGag (5' - GAAGAAATGATGACAGCAT - 3') (配列番号11) の配列を使用して、

Rev/Tat :

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

20

Gag :

(5' GAAGAAATGATGACAGCATTTCAAGAGAATGCTGTCAATCATTTCTTCTTTTT - 3') (配列番号12) のshRNAをデザインした。これらは、上述のように合成し、プラスミドにクローニングした。

【0251】

プラスミドの構築。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的に使用されてい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。さらに、1つのプラスミドは、Rev/Tat shRNAを発現するように構築し、第2のプラスミドは、Gag shRNAを発現するように構築した。プラスミドの構築は上述の通りであった。

30

【0252】

Rev/TatまたはGag mRNAのshRNAターゲティングに関する機能アッセイ：本発明者らはプラスミドの共トランスフェクションを使用し、shRNAプラスミドが、共トランスフェクトされた細胞においてルシフェラーゼメッセンジャーRNAを分解し、発光の強度を減少させることができるかどうかを試験した。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最大光収量を確立した。3' - UTR (mRNAの非翻訳領域) に挿入されたRev/Tat標的配列を含有するルシフェラーゼ構築物を、Rev/Tat shRNA配列とともに共トランスフェクトすると、発光が約90%低減し、shRNA配列の強力な機能が示された。3' - UTRにGag標的配列を含有するルシフェラーゼ構築物を、Gag shRNA配列とともに共トランスフェクトしたとき、同様の結果が得られた。これらの結果は、shRNA配列の強力な活性を示す。

40

【0253】

図10Aに示されるように、293T細胞における一過性のトランスフェクションによって3' UTR内の標的mRNA配列に融合したRev/Tat標的遺伝子のノックダウンを、ルシフェラーゼ活性の低減によって測定した。図10Bは、ルシフェラーゼ遺伝子に融合したGag標的遺伝子配列のノックダウンを示す。結果は、それぞれ三連で行った3つ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。

50

## 【 0 2 5 4 】

(実施例 7 : A G T 1 0 3 は T a t および V i f の発現を減少させる)

例示的なベクター A G T 1 0 3 / C M V - G F P を細胞にトランスフェクトした。A G T 1 0 3 および他の例示的なベクターは、以下の表 3 に定義してある。

## 【表 3 - 2】

表 3

ベクターの呼称	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-細胞表面上の 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 タンパク質の発現レベルを低下させることができる合成マイクロ RNA	
miR185Tat-HIV RNA および Tat タンパク質の発現レベルを低下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最初期転写プロモーター	
mCherry-mCherry 赤色蛍光タンパク質のコード領域	
GFP-緑色蛍光タンパク質のコード領域	
WPRE-ウッドチャック肝炎ウイルス転写後調節エレメント	

## 【 0 2 5 5 】

T リンバ芽球様細胞株 ( C E M ; C C R F - C E M ; A m e r i c a n T y p e C u l t u r e C o l l e c t i o n カタログ番号 C C L 1 1 9 ) に A G T 1 0 3 / C M V - G F P を形質導入した。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、細胞から RNA を抽出し、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 T a t 配列のレベルを試験した。図 1 1 に示されるように、インタクトな T a t RNA の相対発現レベルは、対照レンチウイルスベクターの存在下でおおよそ 8 5 0 から、A G T 1 0 3 / C M V - G F P の存在下でおおよそ 2 0 0 まで低下し、全体で > 4 分の 1 の低下であった。

## 【 0 2 5 6 】

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

阻害性 RNA のデザイン。H I V - 1 T a t および V i f 遺伝子の配列を使用して、ヒト細胞において T a t または V i f レベルをノックダウンする潜在的な s i R N A または s h R N A 候補を検索した。B r o a d I n s t i t u t e のプログラムまたは T h e r m o S c i e n t i f i c の B L O C K - I T R N A i D e s i g n e r などの s i R N A または s h R N A デザインプログラムによって選択された候補から、潜在的な RNA 干渉配列を選択した。T a t または V i f のノックダウンに最も強力である選択した s h R N A 配列を、C M V または E F - I アルファなどの RNA ポリメラーゼ I I 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 骨格内に包埋した。RNA 配列は、s i R N A 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から独立して使用することもできる。

## 【 0 2 5 7 】

プラスミドの構築。T a t 標的配列 ( 5 ' - T C C G C T T C T T C C T G C C A T A G - 3 ' ) ( 配列番号 7 ) を m i R 1 8 5 の骨格に組み込んで、T a t m i R N A ( 5 ' - G G G C C T G G C T C G A G C A G G G G G C G A G G G A T T C C G C T T C T

10

20

30

40

50

T C C T G C C A T A G C G T G G T C C C C T C C C C T A T G G C A G G C A G A A  
 G C G G C A C C T T C C C T C C C A A T G A C C G C G T C T T C G T C G - 3 ' )  
 ( 配列番号 3 ) を作り出し、こ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、V i f 標的配列 ( 5 ' - G G G A T G T G  
 T A C T T C T G A A C T T - 3 ' ) ( 配列番号 6 ) を mi R 2 1 の骨格に組み込んで、  
 V i f mi R N A ( 5 ' - C A T C T C C A T G G C T G T A C C A C C T T G T C G  
 G G G A T G T G T A C T T C T G A A C T T G T G T T G A A T C T C A T G G A G  
 T T C A G A A G A A C A C A T C C G C A C T G A C A T T T T G G T A T C T T T C  
 A T C T G A C C A - 3 ' ) ( 配列番号 2 ) を作り出し、こ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。結果として得られた V  
 i f / T a t mi R N A 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  
 ケージング系を使用して 2 9 3 T 細胞内で産生した。V i f および T a t mi R N A を  
 、すべて EF - 1 プロモーターの制御下で発現される mi R C C R 5、mi R V i f  
 、および mi R T a t からなるマイクロ RNA クラスターに包埋した。

10

## 【 0 2 5 8 】

T a t mRNA の蓄積の mi R 1 8 5 T a t による阻害に関する機能アッセイ。2 9  
 3 T 細胞に形質導入するため、mi R 1 8 5 T a t を発現するレンチウイルスベクター  
 ( L V - E F 1 - mi R - C C R 5 - V i f - T a t ) を、5 に等しい感染多重度で使用  
 した。形質導入の 2 4 時間後、標準的条件下で L i p o f e c t a m i n e 2 0 0 0 を使  
 用し、H I V 株 N L 4 - 3 を発現するプラスミド ( p N L 4 - 3 ) を細胞にトランスフェ  
 クトした。2 4 時間後、RNA を抽出し、T a t 特異的プライマーを使用した R T - P C  
 R によって T a t メッセンジャー RNA のレベルを試験し、対照のアクチン mRNA レベ  
 ルと比較した。

20

## 【 0 2 5 9 】

V i f タンパク質の蓄積の mi R 2 1 V i f による阻害に関する機能アッセイ。2 9  
 3 T 細胞に形質導入するため、mi R 2 1 V i f を発現するレンチウイルスベクター ( L  
 V - E F 1 - mi R - C C R 5 - V i f - T a t ) を、5 に等しい感染多重度で使用し  
 た。形質導入の 2 4 時間後、L i p o f e c t a m i n e 2 0 0 0 を使用し、H I V 株 N  
 L 4 - 3 を発現するプラスミド ( p N L 4 - 3 ) を細胞にトランスフェクトした。2 4 時  
 間後、細胞を溶解し、全可溶性タンパク質を試験して、V i f タンパク質の含有量を測定  
 した。確立された技術に従い、S D S - P A G E によって細胞溶解物を分離した。分離し  
 たタンパク質をナイロン膜に移し、V i f 特異的モノクローナル抗体またはアクチン対照  
 抗体でプローブした。

30

## 【 0 2 6 0 】

図 1 2 A に示されるように、対照レンチウイルスベクターか、または合成 mi R 1 8 5  
 T a t もしくは mi R 1 5 5 T a t のいずれかのマイクロ 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 2 9 3 T 細胞において、T a t のノックダウ  
 N を試験した。2 4 時間後、H I V ベクター p N L 4 - 3 を L i p o f e c t a m i n e 2  
 0 0 0 と共に 2 4 時間トランスフェクトし、次いで、T a t に対するプライマーを用いた  
 q P C R 分析のために RNA を抽出した。図 1 2 B に示されるように、対照レンチウ  
 イルスベクターか、または合成 mi R 2 1 V i f のマイクロ 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 2 9 3 T 細胞において、V i f のノックダウ  
 N を試験した。2 4 時間後、H I V ベクター p N L 4 - 3 を L i p o f e c t a m i n e 2 0 0  
 0 と共に 2 4 時間トランスフェクトし、次いで、H I V V i f に対する抗体を用いた免  
 疫プロット分析のためにタンパク質を抽出した。

40

## 【 0 2 6 1 】

( 実施例 9 : レンチウイルスベクターにおける合成マイクロ RNA 配列による C C R 5  
 発現の調節 )

C C R 5 の合成 mi R 3 0 配列 ( A G T 1 0 3 : T G T A A A C T G A G C T T G C T  
 C T A ( 配列番号 9 7 )、A G T 1 0 3 - R 5 - 1 : T G T A A A C T G A G C T T G C

50

T C G C ( 配列番号 9 8 )、または A G T 1 0 3 - R 5 - 2 : C A T A G A T T G G A C T T G A C A C ( 配列番号 9 9 ) を含有するレンチウイルスベクターを、C E M - C C R 5 細胞に形質導入した。6 日後、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 C C R 5 発現を決定し、平均蛍光強度 ( M F I ) によって定量化した。C C R 5 レベルは、1 0 0 % に設定した L V - 対照を用いて % C C R 5 として表した。A G T 1 0 3 および A G T 1 0 3 - R 5 - 1 の標的配列は、C C R 5 標的配列 5 番と同じ領域内にある。A G T 1 0 3 - R 5 - 2 の標的配列は、C C R 5 標的配列 1 番と同じである。A G T 1 0 3 ( 全 C C R 5 の 2 % ) は、A G T 1 0 3 - R 5 - 1 ( 全 C C R 5 の 3 9 % )、および C C R 5 レベルを低下させない A G T 1 0 3 - R 5 - 2 と比較して、C C R 5 レベルを低下させるのに最も有効である。このデータは本明細書で図 1 3 に実証されている。

10

【 0 2 6 2 】

( 実施例 1 0 : 長鎖または短鎖の W P R E 配列のいずれかを含有するレンチウイルスベクターにおける、合成マイクロRNA配列による C C R 5 発現の調節 )

ベクターの構築。レンチウイルスベクターは、多くの場合、治療用遺伝子または遺伝子構築物の最適な発現のためにRNA調節エレメントを必要とする。一般的な選択肢は、ウッドチャック肝炎ウイルス転写後調節エレメント ( W P R E ) を使用することである。本発明者らは、全長 W P R E :

```
( 5 ' A A T C A A C C T C T G A T T A C A A A A T T T G T G A A A G A T T G A C
T G G T A T T C T T A A C T A T G T T G C T C C T T T T A C G C T A T G T G G A
T A C G C T G C T T T A A T G C C T T T G T A T C A T G C T A T T G C T T C C C
G T A T G G C T T T C A T T T T C T C C T C C T T G T A T A A A T C C T G G T T
G C T G T C T C T T T A T G A G G A G T T G T G G C C C G T T G T C A G G C A A
C G T G G C G T G G T G T G C A C T G T G T T T G C T G A C G C A A C C C C C A
C T G G T T G G G G C A T T G C C A C C A C C T G T C A G C T C C T T T C C G G
G A C T T T C G C T T T C C C C C T C C C T A T T G C C A C G G C G G A A C T C
A T C G C C G C C T G C C T T G C C C G C T G C T G G A C A G G G G C T C G G C
T G T T G G G C A C T G A C A A T T C C G T G G T G T T G T C G G G G A A A T C
A T C G T C C T T T C C T T G G C T G C T C G C C T G T G T T G C C A C C T G G
A T T C T G C G C G G G A C G T C C T T C T G C T A C G T C C C T T C G G C C C
T C A A T C C A G C G G A C C T T C C T T C C C G C G G C C T G C T G C C G G C
T C T G C G G C C T C T T C C G C G T C T T C G C C T T C G C C C T C A G A C G
A G T C G G A T C T C C C T T T G G G C C G C C T C C C C G C C T - 3 ' ) ( 配列
番号 3 2 )
```

20

30

を含有する A G T 1 0 3 を、短縮された W P R E エレメント

```
( 5 ' A A T C A A C C T C T G G A T T A C A A A A T T T G T G A A A G A T T G A
C T G A T A T T C T T A A C T A T G T T G C T C C T T T T A C G C T G T G T G G
A T A T G C T G C T T T A A T G C C T C T G T A T C A T G C T A T T G C T T C C
C G T A C G G C T T T C G T T T T C T C C T C C T T G T A T A A A T C C T G G T
T G C T G T C T C T T T A T G A G G A G T T G T G G C C C G T T G T C C G T C A
A C G T G G C G T G G T G T G C T C T G T G T T T G C T G A C G C A A C C C C C
A C T G G C T G G G G C A T T G C C A C C A C C T G T C A A C T C C T T T C T G
G G A C T T T C G C T T T C C C C C T C C C G A T C G C C A C G G C A G A A C T
C A T C G C C G C C T G C C T T G C C C G C T G C T G G A C A G G G G C T A G G
T T G C T G G G C A C T G A T A A T T C C G T G G T G T T G T C - 3 ' ) ( 配列
番号 8 0 )
```

40

を含有する改変された A G T 1 0 3 ベクターと比較した。

【 0 2 6 3 】

ベクター配列における長鎖対短鎖 W P R E エレメントに応じた細胞表面 C C R 5 発現の調整に関する機能アッセイ。長鎖または短鎖の W P R E エレメントを含有する A G T 1 0 3 を、5 に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

50

。形質導入の6日後に細胞を収集し、細胞表面CCR5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。この抗体は蛍光マーカースにコンジュゲートされており、その染色の強度は、細胞表面上のCCR5のレベルに正比例する。対照レンチウイルスは細胞表面CCR5レベルに影響を及ぼさず、平均蛍光強度が73.6単位の単一集団をもたらされた。長鎖WPREエレメントを有する従来のAGT103は、CCR5発現を11単位の平均蛍光強度レベルまで低減させた。短鎖WPREエレメントを組み込むように改変されたAGT103は、平均蛍光強度が13単位の単一の細胞集団をもたらした。したがって、短鎖WPREエレメントの置換は、細胞表面CCR5発現を低減させるAGT103の能力に、ほとんどまたは全く影響しなかった。

**【0264】**

図14に示されるように、長鎖または短鎖のいずれかのWPRE配列を含有するAGT103をCEM-CCR5細胞に形質導入した。6日後、APCコンジュゲートCCR5抗体を用いたFACS分析によってCCR5発現を決定し、平均蛍光強度(MFI)として定量化した。CCR5レベルは、100%に設定したLV-対照を用いて%CCR5として表した。CCR5レベルの低下は、短鎖WPRE配列(全CCR5の5.5%)または長鎖WPRE配列(全CCR5の2.3%)のいずれかを有するAGT103でも同様であった。

**【0265】**

(実施例11: WPRE配列ありまたはなしのレンチウイルスベクターにおける合成マイクロRNA配列によるCCR5発現の調節)

ベクターの構築。CCR5発現のAGT103による下方調節にWPREが必要であるかどうかを試験するため、本発明者らは、WPREエレメント配列を有しない改変ベクターを構築した。

**【0266】**

AGT103ベクターに長鎖WPREエレメントを含むか含まないかに応じた細胞表面CCR5発現の調整に関する機能アッセイ。CCR5発現レベルのAGT103による調整にWPREが必要であるかどうかを試験するため、本発明者らは、5に等しい感染多重度を使用し、AGT103、またはWPREを欠いた改変ベクターを、CEM-CCR5 T細胞に形質導入した。形質導入の6日後に細胞を収集し、細胞表面CCR5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。このモノクローナル抗体は蛍光マーカースに直接コンジュゲートされており、その染色の強度は、細胞表面あたりのCCR5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CCR5レベルに影響を及ぼさず、平均蛍光強度が164の均一な集団をもたらした。レンチウイルスベクター(長鎖WPREを有し、またGFPマーカータンパク質を発現するAGT103)、GFPを欠いているが長鎖WPREエレメントを含有するAGT103、またはGFPおよびWPREの両方を欠いているAGT103はすべて、細胞表面CCR5発現を調整するのに同様に有効であった。GFPを除去した後、WPREエレメントありまたはなしのAGT103は、細胞表面CCR5発現を調整する能力という点で区別不能であった。

**【0267】**

GFPおよびWPREありまたはなしのAGT103をCEM-CCR5細胞に形質導入した。6日後、APCコンジュゲートCCR5抗体を用いたFACS分析によってCCR5発現を決定し、平均蛍光強度(MFI)として定量化した。CCR5レベルは、100%に設定したLV-対照を用いて%CCR5として表した。CCR5レベルの低下は、WPRE配列あり(全CCR5の0%)またはなし(全CCR5の0%)のAGT103で同様であった。このデータは図15に実証されている。

**【0268】**

(実施例12: レンチウイルスベクターにおける合成マイクロRNA配列を調節するCD4プロモーターによるCCR5発現の調節。)

ベクターの構築。CCR5、Vif、およびTatの遺伝子発現を抑制するマイクロRNAクラスターを発現させるために代替のプロモーターを代わりに用いることの影響を試

10

20

30

40

50

験するため、改変バージョンのAGT103を構築した。通常のEF-1プロモーターの代わりに、本発明者らは、配列：

```
( 5 ' T G T T G G G G T T C A A A T T T G A G C C C C A G C T G T T A G C C C T
C T G C A A A G A A A A A A A A A A A A A A A A A A G A A C A A A G G G C C T A
G A T T T C C C T T C T G A G C C C C A C C C T A A G A T G A A G C C T C T T C
T T T C A A G G G A G T G G G G T T G G G G T G G A G G C G G A T C C T G T C A
G C T T T G C T C T C T C T G T G G C T G G C A G T T T C T C C A A A G G G T A
A C A G G T G T C A G C T G G C T G A G C C T A G G C T G A A C C C T G A G A C
A T G C T A C C T C T G T C T T C T C A T G G C T G G A G G C A G C C T T T G T
A A G T C A C A G A A A G T A G C T G A G G G G C T C T G G A A A A A A G A C A
G C C A G G G T G G A G G T A G A T T G G T C T T T G A C T C C T G A T T T A A
G C C T G A T T C T G C T T A A C T T T T T C C C T T G A C T T T G G C A T T T
T C A C T T T G A C A T G T T C C C T G A G A G C C T G G G G G G T G G G G A A
C C C A G C T C C A G C T G G T G A C G T T T G G G G C C G G C C C A G G C C T
A G G G T G T G G A G G A G C C T T G C C A T C G G G C T T C C T G T C T C T C
T T C A T T T A A G C A C G A C T C T G C A G A - 3 ' ) ( 配列番号 3 0 )
```

10

を使用し、CD4糖タンパク質発現のためのT細胞特異的プロモーターを置換した。

【0269】

細胞表面でのCCR5タンパク質の発現を低減させる効力という点でEF-1およびCD4遺伝子プロモーターを比較する機能アッセイ。通常のEF-1プロモーターの代わりにCD4遺伝子プロモーターを用いることにより改変されたAGT103を、CEM-CCR5 T細胞の形質導入に使用した。形質導入の6日後に細胞を収集し、細胞表面CCR5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。この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おり、染色強度は、細胞表面CCR5タンパク質のレベルに正比例する。対照レンチウイルスの形質導入は、CCR5特異的モノクローナル抗体で染色されたCEM-CCR5 T細胞の集団をもたらし、81.7単位の平均蛍光強度をもたらした。マイクロRNAを発現させるためにEF-1プロモーターの代わりにCD4遺伝子プロモーターを使用して改変されたAGT103は、平均蛍光強度が17.3単位にほぼ等しい広い染色の分布を示した。この結果に基づくと、EF-1プロモーターは、マイクロRNAの発現に関してCD4遺伝子プロモーターと少なくとも同様であり、これより優れている可能性が高い。所望の標的細胞集団に応じて、EF-1プロモーターは、すべての細胞型で普遍的に活性があり、CD4プロモーターは、Tリンパ球においてのみ活性がある。

20

30

【0270】

CCR5、Vif、およびTatの合成マイクロRNA配列を調節するCD4プロモーターを含有するレンチウイルスベクター(AGT103)を、CEM-CCR5細胞に形質導入した。6日後、APCコンジュゲートCCR5抗体を用いたFACS分析によってCCR5発現を決定し、平均蛍光強度(MFI)として定量化した。CCR5レベルは、100%に設定したLV-対照を用いて%CCR5として表した。LV-CD4-AGT103を形質導入した細胞において、CCR5レベルは全CCR5の11%であった。これは、EF1プロモーターを含有するLV-AGT103で観察されたものと同様である。このデータは図16に実証されている。

40

【0271】

(実施例13：HIV Gag特異的CD4 T細胞の検出)

細胞および試薬。凍結された生存可能な末梢血単核細胞(PBMC)をワクチン会社から得た。候補HIV治療用ワクチンを試験する早期臨床試験(治験登録：clinicaltrials.gov NCT01378156)に登録したHIV+の個体に由来する代表的な検体を用い、データを得た。「ワクチン接種前」および「ワクチン接種後」の研究のために2つの検体を得た。細胞培養製品、サプリメント、およびサイトカインは商業的供給元から得た。Thompson, M., S. L. Heath, B. Sw

50

eeton, K. Williams, P. Cunningham, B. F. Kelele, S. Sen, B. E. Palmer, N. Chomont, Y. Xu, R. Basu, M. S. Hellerstein, S. KwaおよびH. L. Robinson (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の組換え改変ワクシニアAnkara 62Bに対する応答について、細胞を試験した。HIV-1 Gagポリタンパク質の全体を表す合成ペプチドをGeoVaxから得て、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、それぞれ15アミノ酸長であり、11個のアミノ酸が重複している、150個のペプチドを含有する。これらを化学的に合成し、次いで精製し、液体クロマトグラフィー-質量分析によって分析した。集合的に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性領域を表し、公知のHIV株の間で57.8%の平均カバレッジ(coverage)となるようデザインされている。ペプチド配列は、Los Alamos National LaboratoryのHIV配列データベース(<http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/NEWALIGN/align.html>)に基づいている。各ペプチドにつき25マイクログラムの乾燥したトリフルオロ酢酸塩としてペプチドを提供し、およそ40マイクロリットルのDMSOに溶解させ、次いで最終濃度までPBSで希釈する。CD4および細胞質の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て、インターフェロンガンマに対してBD PharmingenのIntracellular Staining Kitを用いて細胞内染色を行った。ペプチドをDMSOに再懸濁した。DMSOのみの対照条件が含まれる。

#### 【0272】

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、サプリメント、およびサイトカインを含有するRPMI培地に再懸濁した。ワクチン接種前または後に収集した、培養されたPBMCを、Golgi Stop試薬の存在下で20時間にわたり、DMSO対照、MVA GeoVax(細胞あたり1プラーク形成単位に等しい感染多重度)、Peptides 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)で処置した。細胞を収集し、洗浄し、固定し、透過処理し、そして細胞表面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。染色された細胞をFACSCalibur分析用フローサイトメーターで分析し、CD4+T細胞サブセットでデータをゲーティングした。四角で囲まれた領域内の強調された細胞は二重陽性であり、MVAまたはペプチドでの刺激後のインターフェロンガンマ発現に基づいてHIV特異的CD4+T細胞と指定される。四角で囲まれた領域内の数字は、全CD4のうちHIV特異的と特定されたもののパーセンテージを示す。DMSOまたはMVAに対する強い応答は検出されなかった。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細胞を誘発したが、差異はわずかであり、有意ではなかった。

#### 【0273】

図17に示されるように、ワクチン接種前または後のHIV陽性患者由来の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(GA

10

20

30

40

50

G) Ultra、本明細書ではGagペプチドプール2とも呼ばれる)で20時間刺激した。標準的な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り、IFN $\gamma$ 産生を検出した。フローサイトメトリーデータは、CD4<sup>+</sup>T細胞に対してゲーティングした。四角内に捕捉された数字は、全CD4<sup>+</sup>T細胞のうち、抗原特異的的刺激に対するサイトカイン応答に基づいて「HIV特異的」と指定されたもののパーセンテージである。

#### 【0274】

(実施例14：HIV特異的CD4<sup>+</sup>T細胞の拡大増殖およびレンチウイルスの形質導入)

PBMCを濃縮してHIV特異的CD4<sup>+</sup>T細胞の割合を増加させ、これらの細胞にAGT103を形質導入して細胞産物AGT103Tを産生するための方法のデザインおよび試験。

#### 【0275】

治療用HIVワクチンを受けたHIV陽性患者のPBMC(末梢血単核細胞)のex vivo培養のためのプロトコールをデザインした。この実施例において、治療用ワクチンは、3用量のHIV Gag、Pol、およびEnv遺伝子を発現するプラスミドDNAに続いて、2用量の同じHIV Gag、Pol、およびEnv遺伝子を発現するMVA 62-B(改変ワクシニアAnkara番号62-B)からなった。このプロトコールはワクチン製品に特異的でなく、免疫化後のHIV特異的CD4<sup>+</sup>T細胞の十分なレベルしか必要としない。静脈血を収集し、Ficoll-Paque密度勾配遠心分離によってPBMCを精製した。代わりに、抗体カクテルを使用した陽性または陰性選択方法および蛍光活性化または磁性ビーズソーティングによって、PBMCまたは規定の細胞トラクション(cellular traction)を調製してもよい。精製されたPBMCを洗浄し、サプリメント、抗生物質、およびウシ胎仔血清を含有する標準的な培地で培養する。これらの培養物に、HIV Gagポリタンパク質内の可能性のあるT細胞エピトープを代表する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の組み合わせを試験した後に選択されたインターロイキン2およびインターロイキン12のサイトカインを添加することにより、培養物を補完する。ペプチド刺激には、およそ12日間の培養期間が続く。12日間の培養中、新鮮培地および新鮮なサイトカインサプリメントをおよそ4日ごとに1回添加した。

#### 【0276】

ペプチド刺激期間は、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デザインされている。これらのHIV特異的CD4<sup>+</sup>T細胞は、事前の治療的免疫化によって活性化させた。これらは、合成ペプチドへの曝露によって再刺激し、増殖させてもよい。本発明者らの目標は、全体の1%を超えるかまたはこれに等しいCD4<sup>+</sup>T細胞がペプチド刺激培養期間の終わりまでにHIV特異的であることを達成することである。

#### 【0277】

培養のおよそ12日目に細胞を洗浄して、残存する材料を除去し、次いで、CD4<sup>+</sup>T細胞表面タンパク質のCD3およびCD28に対する抗体で修飾された合成ビーズで刺激する。T細胞のポリクロナル刺激のためのこの十分に確立された方法は、細胞を再活性化し、AGT103レンチウイルスの形質導入に対して細胞をより感受性にする。レンチウイルス形質導入は培養のおよそ13日目に行われ、1から5の間の感染多重度を使用する。形質導入後、細胞を洗浄して残存する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を含有する培地中で培養し、新鮮培地およびサイトカインを培養のおよそ24日目までおよそ4日ごとに1回添加する。

#### 【0278】

培養期間の間中、抗レトロウイルス薬のサキナビルをおよそ100nMの濃度で添加し、あらゆる可能性のあるHIVの増大を抑制する。

10

20

30

40

50

## 【0279】

培養のおよそ24日目に細胞を採取し、洗浄し、効力およびリリース(release)アッセイのために試料を取っておき、次いで残りの細胞を凍結保存培地に懸濁してから、AGT103が形質導入されたおよそ $1 \times 10^8$ 個のHIV特異的CD4 T細胞を含有する、1用量あたり細胞およそ $1 \times 10^{10}$ 個の単一のアリコートにおいて凍結する。

## 【0280】

2つの交互の効力アッセイのうちの一つにおいて、細胞産物(AGT103T)の効力を試験する。効力アッセイ1では、CD4 T細胞1個あたりのゲノムコピー(組み込まれたAGT103ベクター配列)の平均数を試験する。産物をリリースするための最小の効力は、CD4 T細胞1個あたりおよそ0.5個のゲノムコピーである。このアッセイは、磁性ビーズで標識したモノクローナル抗体を使用してCD3陽性/CD4陽性T細胞の陽性選択を行い、全細胞DNAを抽出し、定量的PCR反応を使用してAGT103ベクターに特有の配列を検出することにより行う。効力アッセイ2では、HIV特異的CD4 T細胞の亜集団内における組み込まれたAGT103のゲノムコピーの平均数を試験する。このアッセイは、まず、HIV Gagタンパク質を代表する合成ペプチドのプールでPBMCを刺激することにより達成される。次いで、CD4 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捕捉することもできる特異的抗体試薬で細胞を染色する。CD4陽性/インターフェロンガンマ陽性細胞を磁性ビーズ選択によって捕捉し、全細胞DNAを調製し、細胞1個あたりのAGT103のゲノムコピー数を定量的PCR反応によって決定する。アッセイ2を使用した効力に基づくリリース基準は、HIV特異的CD4 T細胞1個あたり0.5個を超えるかまたはこれと等しいゲノムコピーがAGT103細胞産物中に存在することを必要とする。

10

20

## 【0281】

治療用HIVワクチンを受けたHIV陽性患者のPBMCからHIV特異的CD4 T細胞を濃縮し形質導入するための機能試験。HIV特異的CD4 T細胞の頻度に対する治療用ワクチン接種の影響をペプチド刺激アッセイによって試験した(図14パネルB)。ワクチン接種前のHIV特異的CD4 T細胞の頻度は、この代表的個体において0.036%であった。ワクチン接種後、HIV特異的CD4 T細胞の頻度は、0.076%の値までおよそ2倍増加した。細胞質のインターフェロンガンマの蓄積により特定される応答細胞(HIV特異的)は、特異的ペプチド刺激後にしか検出されなかった。

30

## 【0282】

本発明者らはまた、HIV特異的CD4 T細胞を濃縮するためのペプチド刺激の後にAGT103形質導入を行った場合、培養物中の全CD4 T細胞のうち、HIV特異的であり、かつAGT103が形質導入されたものをおよそ1%生成するという本発明者らの目標が達成されるかどうかを試験した。この場合において本発明者らは、緑色蛍光タンパク質(GFPを参照)を発現する実験用バージョンのAGT103を使用した。図14、パネルCでは、ペプチド刺激(HIV(GAG)Ultra)およびAGT103形質導入後の、ワクチン接種後の培養により、全CD4 T細胞の1.11%がHIV特異的であり(ペプチド刺激に応答したインターフェロンガンマの発現に基づく)、かつAGT103が形質導入された(GFPの発現に基づく)ことが実証された。

40

## 【0283】

治療用HIVワクチン研究における数名の患者を試験して、ペプチド刺激への応答の範囲を評価し、将来のヒトでの臨床試験における遺伝子療法アームに参加するための適格性基準の定義付けを開始した。図18パネルDは、4名のワクチン治療参加者のワクチン接種前および後の検体を比較し、これらの参加者におけるHIV特異的CD4 T細胞の頻度を示す。3つの事例において、ワクチン接種後の検体は、全CD4 T細胞の0.076%を超えるかまたはこれと等しいHIV特異的CD4 T細胞の値を示す。この値に達する能力は、ワクチン接種前の検体からは予想されなかった。なぜなら、患者001-004および患者001-006の両方で、ワクチン接種前のHIV特異的CD4 T細胞の値は0.02%から開始したが、一方ではワクチン接種後のHIV特異的CD4 T細胞

50

胞の最終的な値が0.12%に達し、他方の個体ではワクチン接種後にこの値が増加していないためである。HIV特異的CD4<sup>+</sup>T細胞の頻度を増加させるという点でワクチンに良好に応答した同患者3名は、ペプチド刺激および培養後のHIV特異的CD4<sup>+</sup>T細胞の実質的な濃縮も示した。図18パネルEに示される3つの事例では、ペプチド刺激およびその後の培養により、それぞれ、全CD4<sup>+</sup>T細胞の2.07%、0.72%、または1.54%がHIV特異的であった試料が生成された。これらの値は、治療用HIVワクチンに応答する個体の大多数が、全CD4<sup>+</sup>T細胞のうちおよそ1%が、最終的な細胞産物においてHIV特異的でありAGT103が形質導入されたものであることを達成する本発明者らの目標を可能にするために、ペプチド刺激に対して十分に大きな*ex vivo* 応答を有することを示す。

10

## 【0284】

図18に示されるように、パネルAには処置のスケジュールが記載されている。パネルBは、PBMCをGagペプチドまたはDMSO対照で20時間にわたって刺激したことを実証する。IFNガンマ産生をFACSによる細胞内染色によって検出した。CD4<sup>+</sup>T細胞を分析のためにゲーティングした。パネルCは、CD4<sup>+</sup>T細胞を拡大増殖し、パネルAに示される方法を使用してAGT103-GFPを形質導入したことを実証する。拡大増殖したCD4<sup>+</sup>T細胞は、サイトカインを全く含まない新鮮培地中で2日間静置し、GagペプチドまたはDMSO対照で20時間にわたって再刺激した。IFNガンマ産生およびGFP発現をFACSによって検出した。CD4<sup>+</sup>T細胞を分析のためにゲーティングした。パネルDは、HIV特異的CD4<sup>+</sup>T細胞(IFNガンマ陽性、ワクチン接種前および後)の頻度が4名の患者から検出されたことを実証する。パネルEは、4名の患者由来のワクチン接種後のPBMCを拡大増殖し、HIV特異的CD4<sup>+</sup>T細胞を調査したことを実証する。

20

## 【0285】

(実施例15：用量応答)

ベクターの構築。AGT103の改変バージョンを構築して、漸増するAGT103に対する用量応答および細胞表面CCR5レベルに対するその影響を試験した。AGT103は、CMVプロモーターの制御下の緑色蛍光タンパク質(GFP)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、miR30CCR5 miR21Vif miR185TatマイクロRNAクラスターを発現し、GFPの発現に起因して緑色光を発する。

30

## 【0286】

漸増するAGT103-GFPの用量応答およびCCR5発現の阻害に関する機能アッセイ。細胞あたり0~5の感染多重度を使用して、CEM-CCR5<sup>+</sup>T細胞にAGT103-GFPを形質導入した。細胞表面CCR5に特異的な蛍光コンジュゲート(APC)モノクローナル抗体で、形質導入された細胞を染色した。染色の強度は、細胞表面あたりのCCR5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AGT103-GFPコピー数に比例する。

## 【0287】

図19に示されるように、パネルAは、漸増するAGT103-GFPに対する用量応答および細胞表面CCR5発現に対するその影響を実証する。0.4に等しい感染多重度では、細胞のうち1.04%だけが、緑色であり(形質導入を示す)、かつ著しく低減したCCR5発現を示す。1に等しい感染多重度では、CCR5<sup>low</sup>, GFP+細胞数は、68.1%に増加する/5に等しい感染多重度では、CCR5<sup>low</sup>, GFP+細胞数は、95.7%に増加した。これらのデータは、AGT103-GFPの漸増用量と共により低い平均蛍光強度に向かう、CCR5染色という点で正規分布の集団を示す図19のパネルBにおいて、ヒストグラム形態で提示されている。AGT103-GFPの効力は、AGT103-GFPの漸増用量に伴うCCR5発現の阻害パーセンテージを示す図19のパネルCにグラフ形態で提示されている。5に等しい感染多重度では、CCR5発現レベルが99%を超えて低下した。

40

50

## 【0288】

(実施例16: AGT103は初代ヒトCD4<sup>+</sup>T細胞を効率的に形質導入する)

AGT103レンチウイルスベクターでの初代CD4<sup>+</sup>T細胞の形質導入。緑色蛍光タンパク質マーカ(GFP)を含有する改変されたAGT103ベクターを、精製された初代ヒトCD4<sup>+</sup>T細胞に形質導入するため、0.2から5の間の感染多重度で使用した。

## 【0289】

初代ヒトCD4<sup>+</sup>T細胞におけるAGT103の形質導入効率に関する機能アッセイ。磁性ビーズ標識抗体および標準的な手順を使用して、CD4<sup>+</sup>T細胞をヒトPBMC(HIV陰性ドナー)から単離した。精製されたCD4<sup>+</sup>T細胞をCD3/CD28ビーズで *ex vivo*にて刺激し、AGT103形質導入前にインターロイキン2を含有する培地で1日培養した。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間の関係は、図20パネルAに実証されており、0.2に等しい感染多重度ではCD4陽性T細胞のうち9.27%にAGT103が形質導入され、5に等しい感染多重度ではCD4陽性T細胞の63.1%にAGT103が形質導入されて、この値が増加したことが示されている。初代CD4陽性T細胞の効率的な形質導入を達成することに加えて、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20パネルBでは、細胞あたりのゲノムコピー数を決定するために、いくつかの感染多重度で形質導入した初代ヒトCD4<sup>+</sup>T細胞の全細胞DNAを定量的PCRによって試験した。0.2に等しい感染多重度では、パネルAにおける9.27%のGFP陽性CD4<sup>+</sup>T細胞と十分一致する、細胞1個あたり0.096個のゲノムコピーが測定された。1に等しい感染多重度では、細胞1個あたり0.691個のゲノムコピーが生成され、5に等しい感染多重度では、細胞1個あたり1.245個のゲノムコピーが生成された。

## 【0290】

図20に示されるように、PBMCから単離したCD4<sup>+</sup>T細胞をCD3/CD28ビーズとIL-2で1日間刺激し、様々な濃度でAGT103を形質導入した。2日後にビーズを除去し、CD4<sup>+</sup>T細胞を収集した。パネルAに示されるように、形質導入された細胞(GFP陽性)の頻度をFACSによって検出した。パネルBに示されるように、細胞あたりのベクターコピー数をqPCRによって決定した。5の感染多重度(MOI)では、CD4<sup>+</sup>T細胞の63%に、細胞あたり平均1個のベクターコピーが形質導入された。

## 【0291】

(実施例17: AGT103は初代CD4<sup>+</sup>T細胞におけるHIV複製を阻害する)

初代ヒトCD4陽性T細胞にAGT103を形質導入することによる細胞のHIV感染からの保護。治療用レンチウイルスAGT103を、初代ヒトCD4陽性T細胞に形質導入するため、細胞あたり0.2から5の間の感染多重度で使用した。次いで形質導入された細胞に、侵入のために細胞表面CCR5を必要としないCXCR4向性HIV株NL4.3を負荷した。このアッセイは、初代CD4陽性T細胞における増殖性感染を防止するという点での、HIVのVifおよびTat遺伝子に対するマイクロRNAの効力を試験するが、感染した初代ヒトCD4<sup>+</sup>T細胞から放出されるHIVの量を検出するためには、間接的な方法を使用する。

## 【0292】

初代ヒトCD4陽性T細胞のCXCR4向性HIV感染からのAGT103による保護に関する機能アッセイ。磁性ビーズ標識抗体および標準的な手順を使用して、CD4<sup>+</sup>T細胞をヒトPBMC(HIV陰性ドナー)から単離した。精製されたCD4<sup>+</sup>T細胞をCD3/CD28ビーズで *ex vivo*にて刺激し、0.2から5の間の感染多重度を使用して、AGT103形質導入前にインターロイキン2を含有する培地で1日培養した。形質導入の2日後、CD4陽性T細胞培養物に、緑色蛍光タンパク質(GFP)を発現するように操作されたHIV株NL4.3を負荷した。形質導入しHIVに曝露した初代CD4<sup>+</sup>T細胞培養物を7日間維持してから、HIVを含有する無細胞培養液を収集した。

この無細胞培養液を使用して、高度に許容性のT細胞株C8166を2日間にわたって感染させた。HIVに感染したC8166細胞の割合を、フローサイトメトリーでGFPの蛍光を検出することによって決定した。模擬レンチウイルス感染では、感染多重度0.1の用量のNL4.3 HIVについて、C8166 T細胞の15.4%において増殖性感染を確立することができる量のHIVが培養液中に放出された。感染多重度0.2の用量のAGT103について、C8166細胞のHIV感染に関するこの値は5.3%に低減し、1に等しい感染多重度のAGT103では、C8166 T細胞の3.19%しかHIVに感染しなかった。C8166感染は、5に等しい感染多重度を使用したAGT103形質導入後に、さらに0.62%に低減した。形質導入に使用されるAGT103の量と、培養培地中に放出されるHIVの量との間には、明らかな用量応答関係がある。

10

## 【0293】

図21に示されるように、PBMCから単離したCD4<sup>+</sup>T細胞をCD3/CD28ビーズとIL-2で1日間刺激し、様々な濃度(MOI)でAGT103を形質導入した。2日後にビーズを除去し、CD4<sup>+</sup>T細胞を0.1MOIのHIV NL4.3-GFPに感染させた。24時間後、細胞をPBSで3回洗浄し、IL-2(30U/ml)と共に7日間培養した。培養の最後に上清を収集して、HIV許容性細胞株C8166を2日間にわたって感染させた。HIVに感染したC8166細胞(GFP陽性)をFACSによって検出した。C8166細胞の感染低下によって観察されるように、AGT103の感染多重度の増加に伴い、生存可能なHIVが低減した(MOI 0.2 = 65.6%、MOI 1 = 79.3%、およびMOI 5 = 96%)。

20

## 【0294】

(実施例18: AGT103は初代ヒトCD4<sup>+</sup>T細胞をHIV誘導性枯渇から保護する)

HIV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CD4<sup>+</sup>T細胞へのAGT103の形質導入。健康なHIV陰性ドナーからPBMCを得て、CD3/CD28ビーズで刺激し、次いでインターロイキン2を含有する培地で1日培養してから、0.2から5の間の感染多重度を使用したAGT103の形質導入を行った。

## 【0295】

HIV媒介性細胞病理からの初代ヒトCD4<sup>+</sup>T細胞のAGT103による保護に関する機能アッセイ。AGT103を形質導入した初代ヒトCD4<sup>+</sup>T細胞を、細胞進入のためにCCR5を必要としないHIV NL4.3株(CXCR4向性)に感染させた。CXCR4向性NL4.3を使用する場合、HIV複製に対するVifおよびTatマイクロRNAの影響のみが試験されている。HIV NL4.3の用量は感染多重度0.1であった。HIV感染の1日後、細胞を洗浄して残存ウイルスを除去し、インターロイキン2を加えた培地で培養した。14日間の培養中3日ごとに細胞を収集し、次いで、CD4に特異的であり、かつ蛍光マーカーに直接コンジュゲートされたモノクローナル抗体で染色して、PBMC中のCD4陽性T細胞の割合の測定を可能にした。無処置のCD4<sup>+</sup>T細胞、または対照レンチウイルスベクターを形質導入したCD4<sup>+</sup>T細胞は、HIV負荷に対して高度に感受性であり、PBMC中のCD4陽性T細胞の割合は、培養14日目までに10%未満に下がった。対照的に、AGT103には、HIV負荷による細胞枯渇の防止に対して用量依存的効果があった。感染多重度0.2のAGT103用量では、培養14日目までにPBMCの20%超がCD4<sup>+</sup>T細胞であったが、この値は、5に等しい感染多重度のAGT103用量では、PBMCの50%超が培養14日目までにCD4陽性T細胞となるまで増加した。繰り返すが、AGT103には、ヒトPBMCにおけるHIV細胞変性に対して明らかな用量応答効果がある。

30

40

## 【0296】

図22に示されるように、PBMCをCD3/CD28ビーズとIL-2で1日間刺激し、様々な濃度(MOI)でAGT103を形質導入した。2日後にビーズを除去し、細胞を0.1MOIのHIV NL4.3に感染させた。24時間後、細胞をPBSで3回洗浄し、IL-2(30U/ml)と共に培養した。細胞を3日ごとに収集し、CD4<sup>+</sup>

50

T細胞の頻度をFACSによって分析した。HIVに14日間曝露した後、LV-対照を形質導入したCD4<sup>+</sup>T細胞は87%低減し、AGT103 MOI0.2では60%低減し、AGT103 MOI1では37%低減し、AGT103 MOI5では17%低減した。

【0297】

(実施例19：HIV特異性について濃縮され、AGT103/CMV-GFPが形質導入されたCD4<sup>+</sup>T細胞集団の生成)

HIVに対する治療用ワクチン接種がCD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>、およびCD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>T細胞の分布に及ぼした影響は最小限であった。図23Aに示されるように、CD4<sup>+</sup>T細胞集団は、分析的フローサイトメトリドットプロットの左上象限に示されており、一連のワクチン接種後に全T細胞の52%から57%に変化している。これらは代表的なデータである。

【0298】

HIV治療用ワクチン治験の参加者由来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において12日間にわたり培養した。一部の培養物は、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の、HIV-1のp55 Gagタンパク質全体を表す重複するペプチド(HIV(GAG)Ultraペプチド混合物)で刺激した。これらのペプチドは10~20アミノ酸長であり、HIV-1 Bal株のGag前駆体タンパク質(p55)の全体を表すようにそれらの長さの20~50%が重複している。個々のペプチドの組成および配列は、主な循環HIV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関して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CD4または抗CD8モノクローナル抗体で染色し、CD3<sup>+</sup>集団をゲーティングし、ここに表示した。ワクチン接種前または後のいずれの試料についても、HIV(GAG)Ultraペプチド混合物による刺激は培地対照と同様であり、HIV(GAG)Ultraペプチド混合物は細胞に対して毒性ではなく、ポリクローナルマイトジェンとして作用していなかったことが示された。この分析の結果は図23Bに見出すことができる。

【0299】

HIV(GAG)Ultra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CD4<sup>+</sup>T細胞の最適な拡大増殖をもたらした。図23Cの上パネルに示されるように、HIV(GAG)Ultraペプチド混合物に曝露されたワクチン接種後の検体では、サイトカイン(インターフェロンガンマ)を分泌する細胞が増加した。ワクチン接種前の試料では、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%に増加した。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CD4<sup>+</sup>T細胞のうち0.62から1.76%へ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、HIV抗原へのCD4<sup>+</sup>T細胞の応答に対するワクチン接種の強い影響を実証する。

【0300】

最後に、抗原で拡大増殖したCD4<sup>+</sup>T細胞にAGT103/CMV-GFPを形質導入すると、HIVの機能的治癒の一環として患者に注入するために必要であるHIV特異的でHIV耐性のヘルパーCD4<sup>+</sup>T細胞が産生された(他の様々な態様および実施形態によれば、AGT103単独が使用される;例えば、臨床的实施形態はCMV-GFPセグメントを含まなくてもよい)。図23Cの上パネルは、培養物中のCD4<sup>+</sup>T細胞集団を分析した結果を示す。図23Cのx軸は、個々の細胞にAGT103/CMV-GFPが形質導入されたことを示す、緑色蛍光タンパク質(GFP)の発光を示す。ワクチン接種後の試料では、全CD4<sup>+</sup>T細胞のうち、両方のサイトカインを分泌するものが1.11%回収され、これらの細胞がHIV抗原に特異的に応答し、またAGT103/CMV-GFPが形質導入されていることが示された。これが標的細胞集団であり、注入およびHIVの機能的治癒のために意図される臨床産物である。抗原刺激およびその後のex

10

20

30

40

50

v i v o 培養のポリクローナル拡大増殖期の間細胞拡大増殖の効率により、 $4 \times 10^8$  個の抗原特異的な、レンチウイルスを形質導入した CD4 T 細胞が産生され得る。これは細胞産生の標的を 4 倍上回り、これにより、抗原特異的で HIV 耐性の CD4 T 細胞が、血液 1 マイクロリットルあたり細胞およそ 40 個、または全循環 CD4 T 細胞の約 5.7% という数が達成できるであろう。

【0301】

以下の表 4 は、開示されているベクターおよび方法を使用した、HIV 特異的で HIV 耐性の CD4 T 細胞の ex vivo 産生の結果を示す。

【表 4】

材料/操作	全 CD4 T 細胞	HIV 特異的のパーセンテージ	HIV 特異的および HIV 耐性のパーセンテージ
HIV+患者の白血球除去パック	約 $7 \times 10^8$	約 0.12	該当なし
ペプチド拡大増殖 ex vivo	約 $8 \times 10^8$	約 2.4	該当なし
マイトジェン拡大増殖	約 $1.5 \times 10^{10}$	約 2.4	該当なし
レンチウイルス形質導入	約 $1.5 \times 10^{10}$	約 2.4	約 1.6

10

20

【0302】

(実施例 20 : HIV の処置のための臨床研究)

AGT103T は、AGT103 レンチウイルスベクターも形質導入されている、 $> 5 \times 10^7$  個の HIV 特異的 CD4 T 細胞を含有する、遺伝子改変された自己 PBMC である。

【0303】

第 I 相臨床試験では、cART を受けている間に、HIV 感染、血液  $1 \text{ mm}^3$  あたり CD4 + T 細胞数  $> 600$  個の細胞、および血漿 1 ml あたり 200 個未満のコピーの安定なウイルス抑制が確認された、成人の研究参加者に、ex vivo で改変された自己 CD4 T 細胞 (AGT103T) を注入することの安全性および実現可能性を試験する。研究参加者はすべて、第 I 相臨床試験の間、各自の標準的な抗レトロウイルス薬物適用を継続して受けることになる。最大 40 名の研究参加者が、HIV Gag、Pol、および Env タンパク質を発現する組換え改変ワクシニア Ankara (rMVA) の筋肉内注射による 2 用量を 8 週間おいて受ける。第 2 の免疫化の 7 ~ 10 日後、in vitro 試験のために血液試料を収集し、HIV-1 Gag ポリタンパク質を代表する重複する合成ペプチドのプールによる刺激にตอบสนองする CD4 + T 細胞の頻度を測定する。Gag 特異的 CD4 T 細胞の頻度の測定に基づき、ワクチン応答者のうち上位半数の被験体を遺伝子療法アームに登録し、応答者のうち下位半数の被験体は研究を継続しない。上位の応答者のカットオフは、全 CD4 T 細胞のうち 0.065% の HIV 特異的 CD4 + T 細胞の頻度であることが予測される。本発明者らの試験の遺伝子療法アームに登録された被験体に白血球除去を施し、これに続いて、ex vivo で培養し、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 日間刺激し、次いで CD3 / CD28 二重特異性抗体で修飾されたビーズで再度刺激した、PBMC の精製を行う (Ficoll 密度勾配遠心分離または抗体による陰性選択を使用する)。ex vivo 培養中の自己 HIV の出現を防止するため、抗レトロウイルス薬のサキナビルを 100 nM で含める。CD3 / CD28 刺激の 1 日後、1 から 10 の間の感染多重度で AGT103 を細胞に形質導入する。形質導入された細胞をさらに 7 ~ 14 日間培養し、この間

30

40

50

それらはポリクローナル増殖によって拡大増殖する。培養期間は、細胞を採取および洗浄し、効力および安全性リリースアッセイのためにアリコートを取っておき、残りの細胞を凍結保存培地に再懸濁することによって終了する。単回用量は、 $1 \times 10^{10}$  個の自己 P B M C である。効力アッセイは、インターフェロンガンマを発現することによりペプチド刺激に応答する C D 4 T 細胞の頻度を測定する。他のリリース基準としては、H I V 特異的であり A G T 1 0 3 も形質導入されている C D 4 T 細胞が  $0.5 \times 10^7$  個以上生成物に含まれて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 A G T 1 0 3 ゲノムコピー数が 3 を超えてはならないことである。A G T 1 0 3 T 注入の 5 日前、被験体は、1 用量のブスルフラム ( b u s u l f u r a m ) ( または C y t o x a n ) の馴化レジメンの後、遺伝子改変された C D 4 T 細胞を含有する  $1 \times 10^{10}$  個の P B M C の注入を受ける。

10

#### 【 0 3 0 4 】

第 I I 相研究では、A G T 1 0 3 T 細胞療法の有効度を評価する。第 I I 相研究の参加者には、本発明者らの第 I 相研究に既に登録しており、遺伝子改変された自己の H I V 特異的 C D 4 T 細胞の成功裏かつ安定な生着を有し、有効度評価 ( 1 . 3 . ) に記載されるようにモニタリングされるパラメータの肯定的な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。研究参加者は、各自の既存の抗レトロウイルス薬物適用のレジメンにマラビロクを加えるよう求められる。マラビロクは、C C R 5 レベルの低下を目的とする遺伝子療法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実施されたら、被験体は、それまでの抗レトロウイルス薬物レジメンを中止し、28 日間にわたり、または 2 回の連続した毎週の採血時の血漿中ウイルス R N A レベルが 1 m l あたり 1 0 , 0 0 0 を超えるまで、マラビロク単独療法のみを維持するよう求められる。ウイルス血症が持続的に高い場合、参加者は、各自の H I V ケアの医師の推奨に従ってマラビロクありまたはなしで、各自の元の抗レトロウイルス薬物レジメンに戻るよう要請される。

20

#### 【 0 3 0 5 】

マラビロク単独療法中に > 28 日間にわたって参加者の H I V が抑制されたままである場合 ( 血漿 1 m l あたり 2 , 0 0 0 未満の v R N A コピー )、4 週間にわたってマラビロクの投薬を徐々に低減させるよう求められ、その後さらに 28 日間にわたって集中的なモニタリングが行われる。マラビロク単独療法による H I V の抑制が維持された被験体は、機能的治癒を有するとみなされる。マラビロク退薬後でさえ H I V の抑制が維持される被験体も、機能的治癒を有する。6 か月にわたって毎月モニタリングし、その後はさほど集中的でないモニタリングにより、機能的治癒の耐久性が確立される。

30

#### 【 0 3 0 6 】

患者の選択

組み入れ基準：

- ・ 年齢 18 ~ 60 歳。
- ・ 研究登録前に記録された H I V 感染。
- ・ 研究期間中に抗レトロウイルス薬物レジメンを変更しないこと ( 医療上の指示がある場合を除く ) を含め、研究により強制される評価に従う意志がなければならない。
- ・ 1 立方ミリメートルあたり C D 4 + T 細胞数 > 600 個の細胞 ( 細胞 / m m 3 )
- ・ > 400 個の細胞 / m m 3 の C D 4 + T 細胞最下点
- ・ H I V ウイルス量 < 1 , 0 0 0 コピー / ミリリットル ( m L )

40

#### 【 0 3 0 7 】

除外基準：

- ・ 何らかのウイルス肝炎
- ・ 急性 H I V 感染
- ・ H I V ウイルス量 > 1 , 0 0 0 コピー / m L
- ・ 活発または最近 ( 過去 6 か月 ) の A I D S を定義する合併症
- ・ 研究登録から 12 週間以内における H I V 薬物適用の何らかの変化

50

- ・ 処置に成功した皮膚の基底細胞癌を除く、少なくとも5年間にわたって寛解していないがんまたは悪性疾患
- ・ NYHAグレード3もしくは4のうっ血性心不全または制御不良の狭心症もしくは不整脈の現在の診断
- ・ 出血障害歴
- ・ 過去30日間の慢性的なステロイドの使用
- ・ 妊娠中または授乳中
- ・ 能動的な薬物またはアルコールの乱用
- ・ 過去30日間の深刻な病気
- ・ 別の臨床試験に現在参加しているか、または何らかの以前の遺伝子療法

10

## 【0308】

## 安全性評価

- ・ 急性注入反応
- ・ 注入後安全性追跡調査

## 【0309】

## 有効度評価 - 第I相

- ・ 変更CD4 T細胞の数および頻度。
- ・ 変更CD4 T細胞の耐久性。
- ・ 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後の時点と比較した多機能性の抗HIV CD8 T細胞応答。
- ・ *in vitro* 刺激後に二重プライミングされたHIV mRNAを作るCD4 T細胞の頻度。

20

## 【0310】

## 有効度評価 - 第II相

- ・ 遺伝子変更CD4 T細胞の数および頻度。
- ・ マラビロク単独療法によるウイルス抑制の維持 (1mlあたり < 2,000個のvRNAコピー、ただし2回連続した毎週の採血で1mlあたりのvRNAコピーが  $5 \times 10^4$  を超えない場合は許容される)。
- ・ マラビロク投与中および退薬後のウイルス抑制の持続。
- ・ 安定なCD4 T細胞数。

30

## 【0311】

AGT103Tは、 $5 \times 10^7$  個のHIV特異的CD4 T細胞を含有し、AGT103レンチウイルスベクターも形質導入されている、最大  $1 \times 10^{10}$  個の遺伝子変更された自己CD4 + T細胞からなる。第I相臨床試験では、cARTを受けている間に、HIV感染、血液  $1 \text{ mm}^3$  あたりCD4 + T細胞数  $> 600$  個の細胞、および血漿1mlあたり200個未満のコピーの安定なウイルス抑制が確認された、成人の研究参加者において、*ex vivo* で変更された自己CD4 T細胞 (AGT103T) を注入することの安全性および実現可能性を試験する。最大40名の研究参加者が、HIV Gag、Pol、およびEnvタンパク質を発現する組換え改変ワクシニアAnkara (rMVA) の筋肉内注射による2回の用量を8週間おいて受ける。第2の免疫化の7~10日後、*in vitro* 試験のために血液試料を収集し、HIV-1 Gagポリタンパク質を代表する重複する合成ペプチドのプールによる刺激に応答するCD4 + T細胞の頻度を測定する。Gag特異的CD4 T細胞の頻度の測定に基づき、ワクチン応答者のうち上位半数の被験体を遺伝子療法アームに登録し、応答者のうち下位半数の被験体は研究を継続しない。上位の応答者のカットオフは、全CD4 T細胞のうち0.065%のHIV特異的CD4 + T細胞の頻度であることが予測される。本発明者らの試験の遺伝子療法アームに登録された被験体に白血球除去を施し、CD4 + T細胞を陰性選択によって濃縮する。濃縮されたCD4サブセットをCD4陰性サブセットの細胞数の10%と混合して、

40

50

供給源および抗原提示細胞を提供する。濃縮されたCD4 T細胞を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日間刺激し、次いで、CD3/CD28二重特異性抗体で修飾されたビーズで再度刺激する。ex vivo培養中の自己HIVの出現を防止するため、抗レトロウイルス薬のサキナビルを100nMで含める。CD3/CD28刺激の1日後、1から10の間の感染多重度でAGT103を細胞に形質導入する。形質導入された細胞をさらに7~14日間培養し、この間それらはポリクローナル増殖によって拡大増殖する。培養期間は、細胞を採取および洗浄し、効力および安全性リリースアッセイのためにアリコートを取っておき、残りの細胞を凍結保存培地に再懸濁することによって終了する。単回用量は、CD4+T細胞サブセットが濃縮された $1 \times 10^{10}$ 個の自己細胞である。効力アッセイは、インターフェロンガンマを発現することによりペプチド刺激に応答するCD4 T細胞の頻度を測定する。他のリリース基準としては、HIV特異的でありAGT103も形質導入されているCD4 T細胞が $0.5 \times 10^7$ 個以上生成物に含まれて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を超えてはならないことである。AGT103T注入の5日前、被験体は、1用量のプスルフラム(またはCytosixan)の馴化レジメンの後、 $1 \times 10^{10}$ 個の濃縮され遺伝子改変されたCD4 T細胞の注入を受ける。

10

#### 【0312】

第II相研究では、AGT103T細胞療法の有効度を評価する。第II相研究の参加者には、本発明者らの第I相研究に既に登録しており、遺伝子改変された自己のHIV特異的CD4 T細胞の成功裏かつ安定な生着を有し、有効度評価(1.3.)に記載されるようにモニタリングされるパラメータの肯定的な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。研究参加者は、各自の既存の抗レトロウイルス薬物適用のレジメンにマラビロクを加えるよう求められる。マラビロクは、CCR5レベルの低下を目的とする遺伝子療法の有効性を増強するCCR5アンタゴニストである。マラビロクレジメンが実施されたら、被験体は、それまでの抗レトロウイルス薬物適用のレジメンを中止し、28日間にわたり、または2回の連続した毎週の採血時の血漿中ウイルスRNAレベルが1mlあたり10,000を超えるまで、マラビロク単独療法のみを維持するよう求められる。ウイルス血症が持続的に高い場合、参加者は、各自のHIVケアの医師の推奨に従ってマラビロクありまたはなしで、各自の元の抗レトロウイルス薬物レジメンに

20

30

#### 【0313】

マラビロク単独療法中に>28日間にわたって参加者のHIVが抑制されたままである場合(血漿1mlあたり2,000未満のvRNAコピー)、4週間にわたってマラビロクの投薬を徐々に低減させるよう求められ、その後さらに28日間にわたって集中的なモニタリングが行われる。マラビロク単独療法によるHIVの抑制が維持された被験体は、機能的治癒を有するとみなされる。マラビロク退薬後でさえHIVの抑制が維持される被験体も、機能的治癒を有する。6か月にわたって毎月モニタリングし、その後はさほど集中的でないモニタリングにより、機能的治癒の耐久性が確立される。

#### 【0314】

40

【表 5 - 1】

**配列**

本明細書では、以下の配列が参照される。

配列番号	説明	配列
1	miR30 CCR5	AGGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCGACTGTAAACT GAGCTTGCTCTACTGTGAAGCCACAGATGGGTAGA GCAAGCACAGTTTACCGCTGCCTACTGCCTCGGACT TCAAGGGGCTT
2	miR21 Vif	CATCTCCATGGCTGTACCACCTTGTCGGGGGATGTG TACTTCTGAACTTGTGTTGAATCTCATGGAGTTCAG AAGAACACATCCGCACTGACATTTTGGTATCTTTCA TCTGACCA
3	miR185 Tat	GGGCCTGGCTCGAGCAGGGGGCGAGGGATTCCGCT TCTTCTGCCATAGCGTGG TCCCCTCCCCTATGGCAGGCAGAAGCGGCACCTTCC

10

20



【表 5 - 3】

5	CCR5 標的配列	GAGCAAGCTCAGTTTACA	
6	Vif 標的配列	GGGATGTGTACTTCTGAACTT	
7	Tat 標的配列	TCCGCTTCTTCCTGCCATAG	
8	TAR デコイ配列	CTTGCAATGATGTCGTAATTTGCGTCTTACCTCGTTC TCGACAGCGACCAGATCTGAGCCTGGGAGCTCTCTG GCTGTCAGTAAGCTGGTACAGAAGGTTGACGAAAA TTCTTACTGAGCAAGAAA	10
9	Rev/Tat 標的配列	GCGGAGACAGCGACGAAGAGC	
10	Rev/Tat shRNA 配列	GCGGAGACAGCGACGAAGAGCTTCAAGAGAGCTCT TCGTCGCTGTCTCCGCTTTTT	20
11	Gag 標的配列	GAAGAAATGATGACAGCAT	20
12	Gag shRNA 配列	GAAGAAATGATGACAGCATTTC AAGAGAATGCTGT CATCATTTCTTCTTTTT	
13	Pol 標的配列	CAGGAGCAGATGATACAG	
14	Pol shRNA 配列	CAGGAGATGATACAGTTCAAGAGACTGTATCATCTG CTCCTGTTTTT	30
15	CCR5 標的配列1番	GTGTCAAGTCCAATCTATG	30
16	CCR5 shRNA 配列1番	GTGTCAAGTCCAATCTATGTTCAAGAGACATAGATT GGACTTGACACTTTTT	
17	CCR5 標的配列2番	GAGCATGACTGACATCTAC	
18	CCR5 shRNA 配列2番	GAGCATGACTGACATCTACTTCAAGAGAGTAGATGT CAGTCATGCTCTTTTT	40
19	CCR5 標的配列3番	GTAGCTCTAACAGGTTGGA	40

【表 5 - 4】

20	CCR5 shRNA 配列3番	GTAGCTCTAACAGGTTGGATTCAAGAGATCCAACCT GTTAGAGCTACTTTTT
21	CCR5 標の配列4番	G TTCAGAAACTACCTCTTA
22	CCR5 shRNA 配列4番	G TTCAGAAACTACCTCTTATTCAAGAGATAAGAGGT AGTTTCTGAACTTTTT
23	CCR5 標の配列5番	GAGCAAGCTCAGTTTACACC
24	CCR5 shRNA 配列5番	GAGCAAGCTCAGTTTACACCTTCAAGAGAGGTGTA AACTGAGCTTGCTCTTTTT
25	Homo sapiens CCR5 遺伝子、配列1	ATGGATTATCAAGTGTCAAGTCCAATCTATGACATC AATTATTATACATCGGAGCCCTGCCAAAAAATCAAT GTGAAGCAAATCGCAGCCCGCCTCCTGCCTCCGCTC TACTCACTGGTGTTTCATCTTTGGTTTTGTGGGC
26	Homo sapiens CCR5 遺伝子、配列2	AACATGCTGGTCATCCTCATCCTGATAAACTGCAAA AGGCTGAAGAGCATGACTGACATCTACCTGCTCAAC CTGGCCATCTCTGACCTGTTTTTCCTTCTTACTGTCC CCTTCTGGGCTCACTATGCTGCCGCCAGTGGGACT TTGGAAATACAATGTGTCAACTCTTGACAGGGCTCT ATTTTATAGGCTTCTTCTCTGGAATCTTCTTCATCAT CCTCCTGACAATCGATAGGTACCTGGCTGTCTGTTCA TGCTGTGTTTGCTTTAAAAGCCAGGACGGTCACCTT TGGGGTGGTGACAAGTGTGATCACTTGGGTGGTGGC TGTGTTTGCGTCTCTCCCAGGAATCATCTTTACCAG ATCTCAAAAAGAAGGTCTTCATTACACCTGCAGCTC TCATTTTCCATACAGTCAGTATCAATTCTGGAAGAA TTCCAGACATTAAGATAGTCATCTTGGGGCTGGT CCTGCCGCTGCTTGTCATGGTCATCTGCTACTCGGG AATCCTAAAACTCTGCTTCGGTGTGAAATGAGAA GAAGAGGCACAGGGCTGTGAGGCTTATCTTACCAT CATGATTGTTTATTTCTCTTCTGGGCTCCCTACAAC ATTGTCCTTCTCCTGAAC

10

20

30

40

【表 5 - 5】

27	Homo sapiens CCR5 遺伝子、配列3	ACCTTCCAGGAATTCTTTGGCCTGAATAATTGCAGT AGCTCTAACAGGTTGGACCAAGCTATGCAGGTGA
28	Homo sapiens CCR5 遺伝子、配列4	CAGAGACTCTTGGGATGACGCACTGCTGCATCAACC CCATCATCTATGCCTTTGTCGGGGAGAAGTTCAGAA ACTACCTCTTAGTCTTCTTCCAAAAGCACATTGCCA AACGCTTCTGCAAATGCTGTTCTATTTTCCAG
29	Homo sapiens CCR5 遺伝子、配列5	CAAGAGGCTCCCAGCGAGCAAGCTCAGTTTACAC CCGATCCACTGGGGAGCAGGAAATATCTGTGGGCTT GTGA
30	CD4 プロモーター配列	TGTTGGGGTTCAAATTTGAGCCCCAGCTGTTAGCCC TCTGCAAAGAAAAAAAAAAAAAAAAAAGAACAAA GGGCCTAGATTTCCCTTCTGAGCCCCACCCTAAGAT GAAGCCTCTTCTTCAAGGGAGTGGGGTTGGGGTGG AGGCGGATCCTGTCAGCTTTGCTCTCTCTGTGGCTG GCAGTTTCTCCAAAGGGTAACAGGTGTCAGCTGGCT GAGCCTAGGCTGAACCCTGAGACATGCTACCTCTGT CTTCTCATGGCTGGAGGCAGCCTTTGTAAGTCACAG AAAGTAGCTGAGGGGCTCTGGAAAAAGACAGCCA GGGTGGAGGTAGATTGGTCTTTGACTCCTGATTTAA GCCTGATTCTGCTTAACTTTTTCCCTTGACTTTGGCA TTTTCACTTTGACATGTTCCCTGAGAGCCTGGGGGG TGGGGAACCCAGCTCCAGCTGGTGACGTTTGGGGCC GGCCCAGGCCTAGGGTGTGGAGGAGCCTTGCCATC GGGCTTCCCTGTCTCTCTTCATTTAAGCACGACTCTGC AGA
31	miR30- CCR5/miR21- Vif/miR185 Tat マイクロRNA クラスター配列	AGGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCGACTGTAAACT GAGCTTGCTCTACTGTGAAGCCACAGATGGGTAGA GCAAGCACAGTTTACCGCTGCCTACTGCCTCGGACT TCAAGGGGCTTCCCGGGCATCTCCATGGCTGTACCA CCTTGTCGGGGATGTGTACTTCTGAACCTGTGTTG AATCTCATGGAGTTCAGAAGAACACATCCGCACTG

10

20

30

40

【表 5 - 6】

		ACATTTTGGTATCTTTCATCTGACCAGCTAGCGGGC CTGGCTCGAGCAGGGGGCGAGGGATTCCGCTTCTTC CTGCCATAGCGTGGTCCCCTCCCCTATGGCAGGCAG AAGCGGCACCTTCCCTCCCAATGACCGCGTCTTCGT C	
32	長鎖WPRE配列	AATCAACCTCTGATTACAAAATTTGTGAAAGATTGA CTGGTATTCTTAACTATGTTGCTCCTTTTACGCTATG TGGATACGCTGCTTTAATGCCTTTGTATCATGCTATT GCTTCCCGTATGGCTTTCATTTTCTCCTCCTTGTATA AATCCTGGTTGCTGTCTCTTTATGAGGAGTTGTGGC CCGTTGTCAGGCAACGTGGCGTGGTGTGCACTGTGT TTGCTGACGCAACCCCCACTGGTTGGGGCATTGCCA CCACCTGTCAGCTCCTTTCCGGGACTTTCGCTTTCCC CCTCCCTATTGCCACGGCGGAACTCATCGCCGCCTG CCTTGCCCGCTGCTGGACAGGGGCTCGGCTGTTGGG CACTGACAATTCCGTGGTGTGTCGGGGAAATCATC GTCCTTTCCTTGGCTGCTCGCCTGTGTTGCCACCTGG ATTCTGCGCGGGACGTCCTTCTGCTACGTCCTTCG GCCCTCAATCCAGCGGACCTTCCTTCCC GCGGCCTG CTGCCGGCTCTGCGGCCTTTCGCGCTTTCGCCTTC GCCCTCAGACGAGTCGGATCTCCCTTTGGGCGCCT CCCCGCCT	10 20
33	伸長因子1アルファ (EF1アルファ)プロ モーター； miR30CCR5; miR21 Vif; miR185 Tat	CCGGTGCCTAGAGAAGGTGGCGCGGGGTAAACTGG GAAAGTGATGTCGTGTAAGTGGCTCCGCCTTTTCCC GAGGGTGGGGGAGAACCCTATATAAGTGCAGTAGT CGCCGTGAACGTTCTTTTTCGCAACGGGTTTGCCGC CAGAACACAGGTAAGTGCCGTGTGTTCCCGCG GGCCTGGCCTCTTACGGGTTATGGCCCTTGCGTGC CTTGAATTACTTCCACGCCCTGGCTGCAGTACGTG ATTCTTGATCCCAGCTTCGGGTTGGAAGTGGGTGG GAGAGTTCGAGGCCCTGCGCTTAAGGAGCCCCTTCG CCTCGTGCTTGAGTTGAGGCCTGGCCTGGGCGCTGG	30 40

【表 5 - 7】

		<p>GGCCGCCGCGTGCGAATCTGGTGGCACCTTCGCGCC  TGTCTCGCTGCTTTCGATAAGTCTCTAGCCATTAAA  ATTTTTGATGACCTGCTGCGACGCTTTTTTCTGGCA  AGATAGTCTTGTAATGCGGGCCAAGATCTGCACAC  TGGTATTTTCGGTTTTTGGGGCCGCGGGCGGCGACGG  GGCCCGTGCCTCCAGCGCACATGTTCCGGCGAGGC  GGGGCCTGCGAGCGCGGCCACCGAGAATCGGACGG  GGGTAGTCTCAAGCTGGCCGGCCTGCTCTGGTGCCT  GGCTCGCGCCGCGTGTATCGCCCCGCCCTGGGCG  GCAAGGCTGGCCCGGTCCGGCACAGTTGCGTGAGC  GGAAAGATGGCCGCTTCCCGGCCCTGCTGCAGGGA  GCTCAAATGGAGGACGCGGCGCTCGGGAGAGCGG  GCGGGTGAGTACCCACACAAAGGAAAAGGGCCTT  TCCGTCTCAGCCGTCGCTTCATGTGACTCCACGGA  GTACCGGGCGCCGTCAGGCACCTCGATTAGTTCTC  GAGCTTTTGGAGTACGTCGCTTTAGGTTGGGGGA  GGGGTTTTATGCGATGGAGTTTCCCCACACTGAGTG  GGTGGAGACTGAAGTTAGGCCAGCTTGGCACTTGAT  GTAATTCTCCTTGAATTTGCCCTTTTTGAGTTTGGGA  TCTTGGTTCATTCTCAAGCCTCAGACAGTGGTTCAA  AGTTTTTTTCTTCCATTTAGGTGTCGTGATGTACA  <u>AGGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCGACTGTAAACT</u>  <u>GAGCTTGCTCTACTGTGAAGCCACAGATGGGTAGA</u>  <u>GCAAGCACAGTTTACCGCTGCCTACTGCCTCGGACT</u>  <u>TCAAGGGGCTTCCCGGGCATCTCCATGGCTGTACCA</u>  <u>CCTTGTCGGGGGATGTGTACTTCTGAACTTGTGTTG</u>  <u>AATCTCATGGAGTTCAGAAGAACACATCCGCACTG</u>  <u>ACATTTTGGTATCTTTCATCTGACCAGCTAGCGGGC</u>  <u>CTGGCTCGAGCAGGGGGCGAGGGATTCCGCTTCTTC</u>  <u>CTGCCATAGCGTGGTCCCCTCCCCTATGGCAGGCAG</u>  <u>AAGCGGCACCTTCCCTCCCAATGACCGCGTCTTCGT</u>  <u>C</u></p>
--	--	---

10

20

30

40

【表 5 - 8】

34	ラウス肉腫ウイルス (RSV)プロモーター	GTAGTCTTATGCAATACTCTTGTAGTCTTGCAACAT GGTAACGATGAGTTAGCAACATGCCTTACAAGGAG AGAAAAAGCACCGTGCATGCCGATTGGTGGAAGTA AGGTGGTACGATCGTGCCTTATTAGGAAGGCAACA GACGGGTCTGACATGGATTGGACGAACCACTGAAT TGCCGCATTGCAGAGATATTGTATTTAAGTGCCTAG CTCGATAACAATAACG	10
35	5'末端反復配列(LTR)	GGTCTCTCTGGTTAGACCAGATCTGAGCCTGGGAGC TCTCTGGCTAACTAGGGAACCCACTGCTTAAGCCTC AATAAAGCTTGCCTTGAGTGTCTCAAGTAGTGTGTG CCCGTCTGTTGTGTGACTCTGGTAACTAGAGATCCC TCAGACCCTTTTAGTCAGTGTGGAAAATCTCTAGCA	
36	Psiパッケージング シグナル	TACGCCAAAAATTTGACTAGCGGAGGCTAGAAGG AGAGAG	20
37	Rev応答エレメント (RRE)	AGGAGCTTTGTTCCTTGGGTTCTTGGGAGCAGCAGG AAGCACTATGGGCGCAGCCTCAATGACGCTGACGG TACAGGCCAGACAATTATTGTCTGGTATAGTGCAGC AGCAGAACAATTTGCTGAGGGCTATTGAGGCGCAA CAGCATCTGTTGCAACTCACAGTCTGGGGCATCAAG CAGCTCCAGGCAAGAATCCTGGCTGTGGAAAGATA CCTAAAGGATCAACAGCTCC	20
38	中心ポリプリン トラクト(ePPT)	TTTTAAAAGAAAAGGGGGGATTGGGGGGTACAGTG CAGGGGAAAGAATAGTAGACATAATAGCAACAGAC ATACAAACTAAAGAATTACAAAAACAATTACAAA ATTCAAAATTTTA	30
39	3' デルタ LTR	TGGAAGGGCTAATTCCTCCCAACGAAGATAAGAT CTGCTTTTTGCTTGTACTGGGTCTCTCTGGTTAGACC AGATCTGAGCCTGGGAGCTCTCTGGCTAACTAGGGA ACCCACTGCTTAAGCCTCAATAAAGCTTGCCTTGAG TGCTTCAAGTAGTGTGTGCCCGTCTGTTGTGTGACT CTGGTAACTAGAGATCCCTCAGACCCTTTTAGTCAG TGTGGAAAATCTCTAGCAGTAGTAGTTCATGTCA	40

【表 5 - 9】

40	ヘルパー/Rev,CMV 初期(CAG)エンハン サー;転写を増強する	TAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGT TCATAGCCCATATATGGAGTTCCGCGTTACATAACT TACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACG ACCCCGCCCATGACGTCAATAATGACGTATGTTT CCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTC AATGGGTGGACTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGG CAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCC CTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGC ATTATGCCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCTTA CTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATC
41	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	GCTATTACCATGGGTGCGAGGTGAGCCCCACGTTCTG CTTCACTCTCCCCATCTCCCCCCCCCTCCCCACCCCA ATTTTGTATTTATTTATTTTTTAATTATTTTGTGCAGC GATGGGGGCGGGGGGGGGGGGGCGCGCGCCAGG CGGGGCGGGGCGGGGCGAGGGGCGGGGCGGGGCG AGGCGGAGAGGTGCGGCGGCAGCCAATCAGAGCGG CGCGCTCCGAAAGTTTCTTTTATGGCGAGGCGGCG GCGGCGGCGGCCCTATAAAAAGCGAAGCGCGCGGC GGGCG
42	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	GGAGTCGCTGCGTTGCCTTCGCCCCGTGCCCGCTC CGCGCCGCTCGCGCCGCCCGCCCCGGCTCTGACTG ACCGCGTTACTCCACAGGTGAGCGGGCGGGACGG CCCTTCTCCTCCGGGCTGTAATTAGCGCTTGGTTTAA TGACGGCTCGTTCTTTTCTGTGGCTGCGTGAAAGC CTTAAAGGGCTCCGGGAGGGCCCTTTGTGCGGGGG GGAGCGGCTCGGGGGGTGCGTGCGTGTGTGTGTC GTGGGGAGCGCCGCGTGC GGCCCGCGCTGCCCGGC GGCTGTGAGCGCTGCGGGCGCGGCGCGGGGCTTTG TGCGCTCCGCGTGTGCGCGAGGGGAGCGCGGCCGG GGGCGGTGCCCGCGGTGCGGGGGGGCTGCGAGGG GAACAAAGGCTGCGTGC GGGGTGTGTGCGTGGGG GGTGAGCAGGGGGTGTGGGCGCGGCGGTCGGGCTG

10

20

30

40

【表 5 - 1 0】

		<p>TAACCCCCCTGCACCCCCCTCCCCGAGTTGCTGA  GCACGGCCCCGGCTTCGGGTGCGGGGCTCCGTGCGG  GGCGTGGCGCGGGGCTCGCCGTGCCGGGCGGGGGG  TGGCGGCAGGTGGGGGTGCCGGGCGGGGCGGGGCC  GCCTCGGGCCGGGAGGGCTCGGGGGAGGGGCGCG  GCGGCCCCGGAGCGCCGGCGGCTGTCGAGGCGCGG  CGAGCCGCAGCCATTGCCTTTTATGGTAATCGTGCG  AGAGGGCGCAGGGACTTCCTTTGTCCAAATCTGGC  GGAGCCGAAATCTGGGAGGCGCCGCCACCCCCCT  CTAGCGGGCGCGGGCGAAGCGGTGCGGCGCCGGCA  GGAAGGAAATGGGCGGGGAGGGCCTTCGTGCGTCG  CCGCGCCGCGTCCCCTTCTCCATCTCCAGCCTCGG  GGCTGCCGCAGGGGGACGGCTGCC TTCGGGGGGGA  CGGGGCAGGGCGGGGTTCGGCTTCTGGCGTGTGAC  CGGCGG</p>
43	ヘルパー/Rev.HIV Gag,ウイルスカプシド	<p>ATGGGTGCGAGAGCGTCAGTATTAAGCGGGGGAGA  ATTAGATCGATGGGAAAAAATTCGGTTAAGGCCAG  GGGGAAAGAAAAAATATAAATTA AACATATAGTA  TGGGCAAGCAGGGAGCTAGAACGATTTCGAGTTAA  TCCTGGCCTGTTAGAAACATCAGAAGGCTGTAGACA  AATACTGGGACAGCTACAACCATCCCTTCAGACAG  GATCAGAAGAACTTAGATCATTATATAATACAGTAG  CAACCTCTATTGTGTGCATCAAAGGATAGAGATAA  AAGACACCAAGGAAGCTTTAGACAAGATAGAGGAA  GAGCAAAACAAAAGTAAGAAAAAAGCACAGCAAG  CAGCAGCTGACACAGGACACAGCAATCAGGTCAGC  CAAATTACCTATAGTGCAGAACATCCAGGGGCA  AATGGTACATCAGGCCATATCACCTAGA ACTTTAAA  TGCATGGGTAAAAGTAGTAGAAGAGAAGGCTTTCA  GCCCAGAAGTGATACCCATGTTTTTCAGCATTATCAG  AAGGAGCCACCCACAAGATTTAAACACCATGCTA  AACACAGTGGGGGGACATCAAGCAGCCATGCAAAT</p>

10

20

30

40

【表 5 - 1 1】

		<p>GTTAAAAGAGACCATCAATGAGGAAGCTGCAGAAT  GGGATAGAGTGCATCCAGTGCATGCAGGGCCTATT  GCACCAGGCCAGATGAGAGAACCAAGGGGAAGTGA  CATAGCAGGAACTACTAGTACCCTTCAGGAACAAA  TAGGATGGATGACACATAATCCACCTATCCCAGTAG  GAGAAATCTATAAAAAGATGGATAATCCTGGGATTA  AATAAAATAGTAAGAATGTATAGCCCTACCAGCATT  CTGGACATAAGACAAGGACCAAGGAACCCTTTAG  AGACTATGTAGACCGATTCTATAAAACTCTAAGAGC  CGAGCAAGCTTCACAAGAGGTAAAAAATTGGATGA  CAGAAACCTTGTGGTCCAAAATGCGAACCCAGATT  GTAAGACTATTTTAAAAGCATTGGGACCAGGAGCG  ACACTAGAAGAAATGATGACAGCATGTCAGGGAGT  GGGGGGACCCGGCCATAAAGCAAGAGTTTTGGCTG  AAGCAATGAGCCAAGTAACAAATCCAGCTACCATA  ATGATACAGAAAGGCAATTTTAGGAACCAAAGAAA  GACTGTAAAGTGTTCATTGTGGCAAAGAAGGGCA  CATAGCCAAAAATTGCAGGGCCCCTAGGAAAAAGG  GCTGTTGGAAATGTGGAAAGGAAGGACACCAAATG  AAAGATTGTA CTGAGAGACAGGCTAATTTTTTAGGG  AAGATCTGGCCTCCCACAAGGGAAGGCCAGGGAA  TTTTCTTCAGAGCAGACCAGAGCCAACAGCCCCACC  AGAAGAGAGCTTCAGGTTTGGGGAAGAGACAACAA  CTCCCTCTCAGAAGCAGGAGCCGATAGACAAGGAA  CTGTATCCTTTAGCTTCCCTCAGATCACTCTTTGGCA  GCGACCCCTCGTCAATAA</p>	10 20 30
44	ヘルパー/Rev,HIV Pol;プロテアーゼおよ び逆転写酵素	<p>ATGAATTTGCCAGGAAGATGGAAACCAAAAATGAT  AGGGGGAATTGGAGGTTTTATCAAAGTAGGACAGT  ATGATCAGATACTCATAGAAATCTGCGGACATAAA  GCTATAGGTACAGTATTAGTAGGACCTACACCTGTC  AACATAATTGGAAGAAATCTGTTGACTCAGATTGGC  TGCACTTTAAATTTCCATTAGTCCTATTGAGACTG</p>	40

【表 5 - 1 2】

		<p>TACCAGTAAAATTAAGCCAGGAATGGATGGCCCA  AAAGTTAAACAATGGCCATTGACAGAAGAAAAAAT  AAAAGCATTAGTAGAAATTTGTACAGAAATGGAAA  AGGAAGGAAAAATTTCAAAAATTGGGCCTGAAAAT  CCATACAATACTCCAGTATTTGCCATAAAGAAAAAA  GACAGTACTAAATGGAGAAAATTAGTAGATTTTCAG  AGAACTTAATAAGAGAACTCAAGATTTCTGGGAAG  TTCAATTAGGAATACCACATCCTGCAGGGTTAAAAC  AGAAAAATCAGTAACAGTACTGGATGTGGGCGAT  GCATATTTTTTCAGTTCCCTTAGATAAAGACTTCAGG  AAGTATACTGCATTTACCATACCTAGTATAAAACAAT  GAGACACCAGGGATTAGATATCAGTACAATGTGCTT  CCACAGGGATGGAAAGGATCACCAGCAATATTCCA  GTGTAGCATGACAAAAATCTTAGAGCCTTTTAGAAA  ACAAAATCCAGACATAGTCATCTATCAATACATGGA  TGATTTGTATGTAGGATCTGACTTAGAAAATAGGGCA  GCATAGAACAAAAATAGAGGAACTGAGACAACATC  TGTTGAGGTGGGGATTTACCACACCAGACAAAAAA  CATCAGAAAGAACCTCCATTCCTTTGGATGGGTTAT  GAACTCCATCCTGATAAATGGACAGTACAGCCTATA  GTGCTGCCAGAAAAGGACAGCTGGACTGTCAATGA  CATACAGAAATTAGTGGGAAAATTGAATTGGGCAA  GTCAGATTTATGCAGGGATTAAGTAAGGCAATTAT  GTAAACTTCTTAGGGGAACCAAAGCACTAACAGAA  GTAGTACCACTAACAGAAGAAGCAGAGCTAGAACT  GGCAGAAAACAGGGAGATTCTAAAAGAACCGGTAC  ATGGAGTGTATTATGACCCATCAAAGACTTAATAG  CAGAAATACAGAAGCAGGGGCAAGGCCAATGGACA  TATCAAATTTATCAAGAGCCATTTAAAAATCTGAAA  ACAGGAAAATATGCAAGAATGAAGGGTGCCACAC  TAATGATGTGAAACAATTAACAGAGGCAGTACAAA  AAATAGCCACAGAAAGCATAGTAATATGGGGAAAG</p>
--	--	---

10

20

30

40

【表 5 - 1 3】

		<p>ACTCCTAAATTTAAATTACCCATACAAAAGGAAACA  TGGGAAGCATGGTGGACAGAGTATTGGCAAGCCAC  CTGGATTCTGAGTGGGAGTTTGTCAATACCCCTCC  CTTAGTGAAGTTATGGTACCAGTTAGAGAAAAGAAC  CCATAATAGGAGCAGAACTTTCTATGTAGATGGG  GCAGCCAATAGGGAACTAAATTAGGAAAAGCAGG  ATATGTAAGTACAGAGGAAGACAAAAAGTTGTCC  CCCTAACGGACACAACAAATCAGAAGACTGAGTTA  CAAGCAATTCATCTAGCTTTGCAGGATTCGGGATTA  GAAGTAAACATAGTGACAGACTCACAATATGCATT  GGGAATCATTCAAGCACAACCAGATAAGAGTGAAT  CAGAGTTAGTCAGTCAAATAATAGAGCAGTTAATA  AAAAAGGAAAAAGTCTACCTGGCATGGGTACCAGC  ACACAAAGGAATTGGAGGAAATGAACAAGTAGATG  GGTTGGTCAGTGCTGGAATCAGGAAAGTACTA</p>
45	ヘルパーRev,HIVイン テグラーゼ,ウイルス RNAの組み込み	<p>TTTTTAGATGGAATAGATAAGGCCCAAGAAGAACA  TGAGAAATATCACAGTAATTGGAGAGCAATGGCTA  GTGATTTTAACTACCACCTGTAGTAGCAAAAGAAA  TAGTAGCCAGCTGTGATAAATGTCAGCTAAAAGGG  GAAGCCATGCATGGACAAGTAGACTGTAGCCCAGG  AATATGGCAGCTAGATTGTACACATTTAGAAGGAA  AAGTTATCTTGGTAGCAGTTCATGTAGCCAGTGGAT  ATATAGAAGCAGAAGTAATCCAGCAGAGACAGGG  CAAGAAACAGCATACTTCTCTTAAAATTAGCAGGA  AGATGGCCAGTAAAAACAGTACATACAGACAATGG  CAGCAATTTACCAGTACTACAGTTAAGGCCGCCTG  TTGGTGGGCGGGGATCAAGCAGGAATTTGGCATTCC  CTACAATCCCCAAAGTCAAGGAGTAATAGAATCTAT  GAATAAAGAATTAAGAAAATTATAGGACAGGTAA  GAGATCAGGCTGAACATCTTAAGACAGCAGTACAA  ATGGCAGTATTCATCCACAATTTTAAAAGAAAAGG  GGGGATTGGGGGGTACAGTGCAGGGGAAAGAATAG</p>

10

20

30

40

【表 5 - 1 4】

		TAGACATAATAGCAACAGACATACAACTAAAGAA TTACAAAAACAAATTACAAAAATTCAAAATTTTCGG GTTTATTACAGGGACAGCAGAGATCCAGTTTGGAA AGGACCAGCAAAGCTCCTCTGGAAAGGTGAAGGGG CAGTAGTAATACAAGATAATAGTGACATAAAAGTA GTGCCAAGAAGAAAAGCAAAGATCATCAGGGATTA TGGAAAACAGATGGCAGGTGATGATTGTGTGGCAA GTAGACAGGATGAGGATTA	10
46	ヘルパー/Rev;HIV RRE;Rev.エレメントに結 合する	AGGAGCTTTGTTCCTTGGGTTCTTGGGAGCAGCAGG AAGCACTATGGGCGCAGCGTCAATGACGCTGACGG TACAGGCCAGACAATTATTGTCTGGTATAGTGCAGC AGCAGAACAATTTGCTGAGGGCTATTGAGGCGCAA CAGCATCTGTTGCAACTCACAGTCTGGGGCATCAAG CAGCTCCAGGCAAGAATCCTGGCTGTGGAAAGATA CCTAAAGGATCAACAGCTCCT	20
47	ヘルパー/Rev;HIV Rev;核外輸送およびウ イルスmRNAの安定化	ATGGCAGGAAGAAGCGGAGACAGCGACGAAGAAC TCCTCAAGGCAGTCAGACTCATCAAGTTTCTCTATC AAAGCAACCCACCTCCCAATCCCGAGGGGACCCGA CAGGCCCGAAGGAATAGAAGAAGAAGGTGGAGAG AGAGACAGAGACAGATCCATTCGATTAGTGAACGG ATCCTTAGCACTTATCTGGGACGATCTGCGGAGCCT GTGCCTCTTCAGCTACCACCGCTTGAGAGACTTACT CTTGATTGTAACGAGGATTGTGGAACCTCTGGGACG CAGGGGGTGGGAAGCCCTCAAATATTGGTGGAAATC TCCTACAATATTGGAGTCAGGAGCTAAAGAATAG	30
48	ヘルパー/Rev;ウサギ ベータグロビンポリ A;RNA安定性	AGATCTTTTTCCCTCTGCCAAAAATTATGGGGACAT CATGAAGCCCCTTGAGCATCTGACTTCTGGCTAATA AAGGAAATTTATTTTCATTGCAATAGTGTGTTGGAA TTTTTTGTGTCCTCACTCGGAAGGACATATGGGAG GGCAAATCATTTAAAACATCAGAATGAGTATTTGGT TTAGAGTTTGGCAACATATGCCATATGCTGGCTGCC ATGAACAAAGGTGGCTATAAAGAGGTCATCAGTAT	40

【表 5 - 1 5】

		ATGAAACAGCCCCCTGCTGTCCATTTCCTTATTCCAT AGAAAAGCCTTGACTTGAGGTTAGATTTTTTTTATA TTTTGTTTTGTGTTATTTTTTTCTTTAACATCCCTAAA ATTTTCCTTACATGTTTTACTAGCCAGATTTTTCCTC CTCTCCTGACTACTCCAGTCATAGCTGTCCCTCTTC TCTTATGAAGATC		
49	ヘルパー;GMV初期 (CAG)エンハンサー; 転写を増強する	TAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGT TCATAGCCCATATATGGAGTTCGCGGTTACATAACT TACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACG ACCCCGCCCATGACGTCAATAATGACGTATGTTT CCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTC AATGGGTGGACTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGG CAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCC CTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGC ATTATGCCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCTTA CTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATC	10          20	
50	ヘルパー;ニワトリ ベータアクチン(CAG)プロ モーター;転写	GCTATTACCATGGGTCGAGGTGAGCCCCACGTTCTG CTTCACTCTCCCCATCTCCCCCCCCCTCCCCACCCCA ATTTTGTATTTATTTATTTTTTAATTATTTTGTGCAGC GATGGGGGCGGGGGGGGGGGGGCGCGCGCCAGG CGGGGCGGGGCGGGGCGAGGGGCGGGGCGGGGCG AGGCGGAGAGGTGCGGCGGCAGCCAATCAGAGCGG CGCGCTCCGAAAGTTTCCTTTATGGCGAGGCGGGCG GCGGCGGCGGCCCTATAAAAAGCGAAGCGCGCGGC GGGCG		30
51	ヘルパー;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	GGAGTCGCTGCGTTGCCTTCGCCCCGTGCCCGCTC CGCGCCGCTCGCGCCGCCCGCCCCGGCTCTGACTG ACCGCGTTACTCCACAGGTGAGCGGGCGGGACGG CCCTTCTCCTCCGGGCTGTAATTAGCGCTTGGTTTAA TGACGGCTCGTTTCTTTTCTGTGGCTGCGTGAAAGC CTTAAAGGGCTCCGGGAGGGCCCTTTGTGCGGGGG GGAGCGGCTCGGGGGGTGCGTGCGTGTGTGTGTGC		40

【表 5 - 1 6】

		<p>GTGGGGAGCGCCGCGTGCGGCCCGCGCTGCCCGGC  GGCTGTGAGCGCTGCGGGCGCGGCCGCGGGGCTTTG  TGCGCTCCGCGTGTGCGCGAGGGGAGCGCGGCCGG  GGGCGGTGCCCGCGGTGCGGGGGGGCTGCGAGGG  GAACAAAGGCTGCGTGCGGGGTGTGTGCGTGGGGG  GGTGAGCAGGGGGTGTGGGCGCGGCCGTGCGGGCTG  TAACCCCCCTGCACCCCCCTCCCCGAGTTGCTGA  GCACGGCCCCGGCTTCGGGTGCGGGGCTCCGTGCGG  GGCGTGGCGCGGGGCTCGCCGTGCCGGGCGGGGGG  TGGCGGCAGGTGGGGGTGCCGGGCGGGGCGGGGCC  GCCTCGGGCCGGGAGGGCTCGGGGAGGGGCGCG  GCGGCCCCGGAGCGCCGGCGGCTGTCGAGGCGCGG  CGAGCCGCAGCCATTGCCTTTTATGGTAATCGTGCG  AGAGGGCGCAGGGACTTCCTTTGTCCCAAATCTGGC  GGAGCCGAAATCTGGGAGGCGCCGCCGCACCCCT  CTAGCGGGCGCGGGCGAAGCGGTGCGGCGCCGGCA  GGAAGGAAATGGGCGGGGAGGGCCTTCGTGCGTCG  CCGCGCCCGCGTCCCCTTCTCCATCTCCAGCCTCGG  GGCTGCCGCAGGGGGACGGCTGCCCTCGGGGGGA  CGGGGCAGGGCGGGGTTCGGCTTCTGGCGTGTGAC  CGGCGG</p>	10
52	ヘルパー-HIV Gag,ウ イルスカプシド	<p>ATGGGTGCGAGAGCGTCAGTATTAAGCGGGGGAGA  ATTAGATCGATGGGAAAAAATTCGGTTAAGGCCAG  GGGGAAAGAAAAATATAAATTA AACATATAGTA  TGGGCAAGCAGGGAGCTAGAACGATTTCGAGTTAA  TCCTGGCCTGTTAGAAACATCAGAAGGCTGTAGACA  AATACTGGGACAGCTACAACCATCCCTTCAGACAG  GATCAGAAGAACTTAGATCATTATATAATACAGTAG  CAACCCCTCTATTGTGTGCATCAAAGGATAGAGATAA  AAGACACCAAGGAAGCTTTAGACAAGATAGAGGAA  GAGCAAAACAAAAGTAAGAAAAAAGCACAGCAAG  CAGCAGCTGACACAGGACACAGCAATCAGGTCAGC</p>	30  40

【表 5 - 17】

		<p>           CAAAATTACCTATAGTGCAGAACATCCAGGGGCA            AATGGTACATCAGGCCATATCACCTAGAACTTTAAA            TGCATGGGTAAAAGTAGTAGAAGAGAAGGCTTTC            GCCCAGAAGTGATACCCATGTTTTTCAGCATTATCAG            AAGGAGCCACCCACAAGATTTAAACACCATGCTA            AACACAGTGGGGGGACATCAAGCAGCCATGCAAAT            GTTAAAAGAGACCATCAATGAGGAAGCTGCAGAAT            GGGATAGAGTGCATCCAGTGCATGCAGGGCCTATT            GCACCAGGCCAGATGAGAGAACCAAGGGGAAGTGA            CATAGCAGGAACTACTAGTACCCTTCAGGAACAAA            TAGGATGGATGACACATAATCCACCTATCCCAGTAG            GAGAAATCTATAAAAGATGGATAATCCTGGGATTA            AATAAAATAGTAAGAATGTATAGCCCTACCAGCATT            CTGGACATAAGACAAGGACCAAGGAACCCTTTAG            AGACTATGTAGACCGATTCTATAAACTCTAAGAGC            CGAGCAAGCTTCACAAGAGGTAAAAAATTGGATGA            CAGAAACCTTGTTGGTCCAAAATGCGAACCCAGATT            GTAAGACTATTTTAAAAGCATTGGGACCAGGAGCG            AACTAGAAAGAAATGATGACAGCATGTCAGGGAGT            GGGGGGACCCGGCCATAAAGCAAGAGTTTTGGCTG            AAGCAATGAGCCAAGTAACAAATCCAGCTACCATA            ATGATACAGAAAGGCAATTTTAGGAACCAAAGAAA            GACTGTTAAGTGTTCATTGTGGCAAAGAAGGGCA            CATAGCCAAAATTGCAGGGCCCCTAGGAAAAAGG            GCTGTTGGAAATGTGGAAAGGAAGGACACCAAATG            AAAGATTGTA CTGAGAGACAGGCTAATTTTTTAGGG            AAGATCTGGCCTTCCCACAAGGGAAGGCCAGGGAA            TTTCTTCAGAGCAGACCAGAGCCAACAGCCCCACC            AGAAGAGAGCTTCAGGTTTGGGGAAGAGACAACAA            CTCCCTCTCAGAAGCAGGAGCCGATAGACAAGGAA            CTGTATCCTTTAGCTTCCCTCAGATCACTCTTTGGCA            GCGACCCCTCGTCACAATAA         </p>
--	--	--

10

20

30

40

【表 5 - 1 8】

53	ヘルパー; HIV Pol; プロテアーゼおよび逆転写酵素	<p>ATGAATTTGCCAGGAAGATGGAAACCAAAAATGAT  AGGGGGAATTGGAGGTTTTATCAAAGTAGGACAGT  ATGATCAGATACTCATAGAAATCTGCGGACATAAA  GCTATAGGTACAGTATTAGTAGGACCTACACCTGTC  AACATAATTGGAAGAAATCTGTTGACTCAGATTGGC  TGCACTTTAAATTTTCCCATTAGTCCTATTGAGACTG  TACCAGTAAAATTAAGCCAGGAATGGATGGCCCA  AAAGTTAAACAATGGCCATTGACAGAAGAAAAAAT  AAAAGCATTAGTAGAAATTTGTACAGAAATGGAAA  AGGAAGGAAAAATTTCAAAAATTGGGCCTGAAAAT  CCATACAATACTCCAGTATTTGCCATAAAGAAAAAA  GACAGTACTAAATGGAGAAAATTAGTAGATTTTCAG  AGAACTTAATAAGGAACTCAAGATTTCTGGGAAG  TTCAATTAGGAATACCACATCCTGCAGGGTTAAAC  AGAAAAATCAGTAACAGTACTGGATGTGGGCGAT  GCATATTTTTTCAGTTCCCTTAGATAAAGACTTCAGG  AAGTATACTGCATTTACCATACCTAGTATAAACAAT  GAGACACCAGGGATTAGATATCAGTACAATGTGCTT  CCACAGGGATGGAAAGGATCACCAGCAATATTCCA  GTGTAGCATGACAAAAATCTTAGAGCCTTTTAGAAA  ACAAAATCCAGACATAGTCATCTATCAATACATGGA  TGATTTGTATGTAGGATCTGACTTAGAAATAGGGCA  GCATAGAACAAAAATAGAGGAACTGAGACAACATC  TGTTGAGGTGGGGATTTACCACACCAGACAAAAAA  CATCAGAAAGAACCTCCATTCCTTTGGATGGGTTAT  GAACTCCATCCTGATAAATGGACAGTACAGCCTATA  GTGCTGCCAGAAAAGGACAGCTGGACTGTCAATGA  CATACAGAAATTAGTGGGAAAATTGAATTGGGCAA  GTCAGATTTATGCAGGGATTAAGTAAGGCAATTAT  GTAAACTTCTTAGGGGAACCAAGCACTAACAGAA  GTAGTACCACTAACAGAAGAAGCAGAGCTAGAACT  GGCAGAAAACAGGGAGATTCTAAAAGAACCGGTAC</p>	<p>10 20 30 40</p>
----	-------------------------------	--	--------------------------------

【表 5 - 19】

		<p>ATGGAGTGTATTATGACCCATCAAAGACTTAATAG  CAGAAATACAGAAGCAGGGGCAAGGCCAATGGACA  TATCAAATTTATCAAGAGCCATTTAAAAATCTGAAA  ACAGGAAAATATGCAAGAATGAAGGGTGCCACAC  TAATGATGTGAAACAATTAACAGAGGCAGTACAAA  AAATAGCCACAGAAAGCATAGTAATATGGGGAAAG  ACTCCTAAATTTAAATTACCCATACAAAAGGAAACA  TGGGAAGCATGGTGGACAGAGTATTGGCAAGCCAC  CTGGATTCTGAGTGGGAGTTTGTCAATACCCCTCC  CTTAGTGAAGTTATGGTACCAGTTAGAGAAAAGAAC  CCATAATAGGAGCAGAACTTTCTATGTAGATGGG  GCAGCCAATAGGGAACTAAATTAGGAAAAGCAGG  ATATGTAECTGACAGAGGAAGACAAAAAGTTGTCC  CCCTAACGGACACAACAAATCAGAAGACTGAGTTA  CAAGCAATTCATCTAGCTTTGCAGGATTCGGGATTA  GAAGTAAACATAGTGACAGACTCACAATATGCATT  GGGAATCATTCAAGCACAACCAGATAAGAGTGAAT  CAGAGTTAGTCAGTCAAATAATAGAGCAGTTAATA  AAAAAGGAAAAAGTCTACCTGGCATGGGTACCAGC  ACACAAAGGAATTGGAGGAAATGAACAAGTAGATG  GGTTGGTCAGTGCTGGAATCAGGAAAGTACTA</p>	<p>10 20</p>
54	ヘルパー-HIVインテグラーゼ、ウイルスRNAの組み込み	<p>TTTTTAGATGGAATAGATAAGGCCCAAGAAGAACA  TGAGAAATATCACAGTAATTGGAGAGCAATGGCTA  GTGATTTTAACCTACCACCTGTAGTAGCAAAGAAA  TAGTAGCCAGCTGTGATAAATGTCAGCTAAAAGGG  GAAGCCATGCATGGACAAGTAGACTGTAGCCCAGG  AATATGGCAGCTAGATTGTACACATTTAGAAGGAA  AAGTTATCTTGGTAGCAGTTCATGTAGCCAGTGGAT  ATATAGAAGCAGAAGTAATCCAGCAGAGACAGGG  CAAGAAACAGCATACTTCCTCTTAAAATTAGCAGGA  AGATGGCCAGTAAAAACAGTACATACAGACAATGG  CAGCAATTTACCAGTACTACAGTTAAGGCCGCCTG</p>	<p>30 40</p>

【表 5 - 2 0】

		<p>TTGGTGGGCGGGGATCAAGCAGGAATTTGGCATTCC  CTACAATCCCCAAAGTCAAGGAGTAATAGAATCTAT  GAATAAAGAATTAAGAAAATTATAGGACAGGTAA  GAGATCAGGCTGAACATCTTAAGACAGCAGTACAA  ATGGCAGTATTCATCCACAATTTTAAAAGAAAAGG  GGGGATTGGGGGTACAGTGCAGGGGAAAGAATAG  TAGACATAATAGCAACAGACATACAACTAAAGAA  TTACAAAAACAAATTACAAAAATTCAAAATTTTCGG  GTTTATTACAGGGACAGCAGAGATCCAGTTTGGAA  AGGACCAGCAAAGCTCCTCTGGAAAGGTGAAGGGG  CAGTAGTAATACAAGATAATAGTGACATAAAAGTA  GTGCCAAGAAGAAAAGCAAAGATCATCAGGGATTA  TGGAAAACAGATGGCAGGTGATGATTGTGTGGCAA  GTAGACAGGATGAGGATTA</p>	10
55	ヘルパー;HIV RRE;Revエレメントに 結合する	<p>AGGAGCTTTGTTCCTTGGGTTCTTGGGAGCAGCAGG  AAGCACTATGGGCGCAGCGTCAATGACGCTGACGG  TACAGGCCAGACAATTATTGTCTGGTATAGTGCAGC  AGCAGAACAATTTGCTGAGGGCTATTGAGGCGCAA  CAGCATCTGTTGCAACTCACAGTCTGGGGCATCAAG  CAGCTCCAGGCAAGAATCCTGGCTGTGGAAAGATA  CCTAAAGGATCAACAGCTCCT</p>	20
56	ヘルパー;ウサギペー タグロビンポリA;RNA 安定性	<p>AGATCTTTTTCCCTCTGCCAAAATTATGGGGACAT  CATGAAGCCCCTTGAGCATCTGACTTCTGGCTAATA  AAGGAAATTTATTTTCATTGCAATAGTGTGTTGGAA  TTTTTTGTGCTCTCACTCGGAAGGACATATGGGAG  GGCAAATCATTAAAACATCAGAATGAGTATTTGGT  TTAGAGTTTGGCAACATATGCCATATGCTGGCTGCC  ATGAACAAAGGTGGCTATAAAGAGGTCATCAGTAT  ATGAAACAGCCCCCTGCTGTCCATTCTTATTCCAT  AGAAAAGCCTTGACTTGAGGTTAGATTTTTTTTATA  TTTTGTTTTGTGTTATTTTTTTCTTTAACATCCCTAAA  ATTTTCCTTACATGTTTTACTAGCCAGATTTTTTCCTC</p>	30 40

【表 5 - 2 1】

		CTCTCCTGACTACTCCCAGTCATAGCTGTCCCTCTTC TCTTATGAAGATC	
57	Rev; RSV プロモーター;転写	ATGGCAGGAAGAAGCGGAGACAGCGACGAAGAAC TCCTCAAGGCAGTCAGACTCATCAAGTTTCTCTATC AAAGCAACCCACCTCCCAATCCCGAGGGGACCCGA CAGGCCCGAAGGAATAGAAGAAGAAGGTGGAGAG AGAGACAGAGACAGATCCATTTCGATTAGTGAACGG ATCCTTAGCACTTATCTGGGACGATCTGCGGAGCCT GTGCCTCTTCAGCTACCACCGCTTGAGAGACTTACT CTTGATTGTAACGAGGATTGTGGAACCTCTGGGACG CAGGGGGTGGGAAGCCCTCAAATATTGGTGGGAATC TCCTACAATATTGGAGTCAGGAGCTAAAGAATAG	10
58	Rev; HIV Rev; 核外輸 送およびウイルス mRNAの安定化	ATGGCAGGAAGAAGCGGAGACAGCGACGAAGAAC TCCTCAAGGCAGTCAGACTCATCAAGTTTCTCTATC AAAGCAACCCACCTCCCAATCCCGAGGGGACCCGA CAGGCCCGAAGGAATAGAAGAAGAAGGTGGAGAG AGAGACAGAGACAGATCCATTTCGATTAGTGAACGG ATCCTTAGCACTTATCTGGGACGATCTGCGGAGCCT GTGCCTCTTCAGCTACCACCGCTTGAGAGACTTACT CTTGATTGTAACGAGGATTGTGGAACCTCTGGGACG CAGGGGGTGGGAAGCCCTCAAATATTGGTGGGAATC TCCTACAATATTGGAGTCAGGAGCTAAAGAATAG	20
59	Rev;ウサギベータグ ロピンポリA;RNA安定 性	AGATCTTTTTCCCTCTGCCAAAAATTATGGGGACAT CATGAAGCCCCTTGAGCATCTGACTTCTGGCTAATA AAGGAAATTTATTTTCATTGCAATAGTGTGTTGGAA TTTTTGTGCTCTCACTCGGAAGGACATATGGGAG GGCAAATCATTTAAAACATCAGAATGAGTATTTGGT TTAGAGTTTGGCAACATATGCCCATATGCTGGCTGC CATGAACAAAGGTTGGCTATAAAGAGGTCATCAGT ATATGAAACAGCCCCCTGCTGTCCATTCTTATTCC ATAGAAAAGCCTTGACTTGAGGTTAGATTTTTTTTA TATTTTGTGTTGTTATTTTTTTCTTTAACATCCCTA	30 40

【表 5 - 2 2】

		AAATTTTCCTTACATGTTTTACTAGCCAGATTTTTCC TCCTCTCCTGACTACTCCCAGTCATAGCTGTCCCTCT TCTCTTATGGAGATC	
60	エンベロープ;GMVプロ モーター;転写	ACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATCAAT TACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTT CCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGG CTGACCGCCCAACGACCCCCGCCATTGACGTC AAT AATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGAC TTCCATTGACGTC AATGGGTGGAGTATTTACGGTA AACTGCCC ACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATAT GCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTC AATGACGGTAA ATGGCCCGCCTGGCATTATGCCCAGTACATGACCTT ATGGGACTTTCTACTTGGCAGTACATCTACGTATT AGTCATCGCTATTACCATGGTGATGCGGTTTTGGCA GTACATCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTGACTCAG GGGATTTCCAAGTCTCCACCCCATGACGTC AATGG GAGTTTGT TTTGGCACCAAAATCAACGGGACTTTCC AAAATGTCGTAACAAC TCCGCCCCATTGACGCA AAT GGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAA GC	10 20
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	GTGAGTTTGGGGACCC TTGATTGTTCTTTCTTTTCG CTATTGTA AAAATTCATGTTATATGGAGGGGGCAAAG TTTT CAGGGTGT TGT TTAGAATGGGAAGATGTCCCT TGTATCACCATGGACCC TCATGATAATTTTGT TTTCTT TCACTTTCTACTCTGTTGACAACCATTGTCTCCTCTT ATTTTCTTTTCATTTTCTGTA ACTTTTTCGTTAAACTT TAGCTTGCATTTGTAAACGAATTTTTAAATTC ACTTTT GTTTATTTGTCAGATTGTAAGTACTTTCTCTAATCAC TTTTTTTTCAAGGCAATCAGGGTATATTATATTGTAC TTCAGCACAGTTTTAGAGAACAATTGTTATAATTA ATGATAAGGTAGAATATTTCTGCATATAAATTC TGG CTGGCGTGGAAATATCTTATTGGTAGAAACA ACTA	30 40

【表 5 - 2 3】

		CACCCTGGTCATCATCCTGCCTTCTCTTTATGGTTA CAATGATATACACTGTTTGAGATGAGGATAAAATAC TCTGAGTCCAAACCGGGCCCTCTGCTAACCATGTT CATGCCTTCTTCTCTTTCCTACAG
62	エンベロープ,VSV-G; 糖タンパク質エンベ ロープ-細胞進入	ATGAAGTGCCTTTTGTACTTAGCCTTTTTTATTCATTG GGGTGAATTGCAAGTTCACCATAGTTTTTCCACACA ACCAAAAAGGAAACTGGAAAAATGTTCCCTTCTAATT ACCATTATTGCCCGTCAAGCTCAGATTTAAATTGGC ATAATGACTTAATAGGCACAGCCTTACAAGTCAAA ATGCCCAAGAGTCACAAGGCTATTCAAGCAGACGG TTGGATGTGTCATGCTTCCAAATGGGTCACTACTTG TGATTTCCGCTGGTATGGACCGAAGTATATAACACA TTCCATCCGATCCTTCACTCCATCTGTAGAACAATG CAAGGAAAGCATTGAACAAACGAAACAAGGAACTT GGCTGAATCCAGGCTTCCCTCCTCAAAGTTGTGGAT ATGCAACTGTGACGGATGCCGAAGCAGTGATTGTCC AGGTGACTCCTCACCATGTGCTGGTTGATGAATACA CAGGAGAATGGGTTGATTCACAGTTCATCAACGGA AAATGCAGCAATTACATATGCCCCACTGTCCATAAC TCTACAACCTGGCATTCTGACTATAAGGTCAAAGGG CTATGTGATTCTAACCTCATTTCATGGACATCACCT TCTTCTCAGAGGACGGAGAGCTATCATCCCTGGGAA AGGAGGGCACAGGGTTCAGAAGTAACTACTTTGCTT ATGAAACTGGAGGCAAGGCCTGCAAAATGCAATAC TGCAAGCATTGGGGAGTCAGACTCCCATCAGGTGTC TGGTTCGAGATGGCTGATAAGGATCTCTTTGCTGCA GCCAGATTCCCTGAATGCCCAGAAGGGTCAAGTATC TCTGCTCCATCTCAGACCTCAGTGGATGTAAGTCTA ATTCAGGACGTTGAGAGGATCTTGGATTATCCCTC TGCCAAGAAACCTGGAGCAAAATCAGAGCGGGTCT TCCAATCTCTCCAGTGGATCTCAGCTATCTTGCTCCT AAAAACCCAGGAACCGGTCCTGCTTTCACCATAATC

10

20

30

40

【表 5 - 2 4】

		AATGGTACCCTAAAATACTTTGAGACCAGATACATC AGAGTCGATATTGCTGCTCCAATCCTCTCAAGAATG GTCGGAATGATCAGTGGAACCTACCACAGAAAGGGA ACTGTGGGATGACTGGGCACCATATGAAGACGTGG AAATTGGACCCAATGGAGTTCTGAGGACCAGTTCA GGATATAAGTTTCCTTTATACATGATTGGACATGGT ATGTTGGACTCCGATCTTCATCTTAGCTCAAAGGCT CAGGTGTTCGAACATCCTCACATTCAAGACGCTGCT TCGCAACTTCTGATGATGAGAGTTTATTTTTGGTG ATACTGGGCTATCCAAAATCCAATCGAGCTTGTAG AAGGTTGGTTCAGTAGTTGGAAAAGCTCTATTGCCT CTTTTTCTTTATCATAGGGTTAATCATTGGACTATT CTTGGTTCCTCGAGTTGGTATCCATCTTTCATTA TTAAAGCACACCAAGAAAAGACAGATTTATACAGA CATAGAGATGA	10 20
63	エンペローブ;ウサギ ベータグロビンポリ A;RNA安定性	AGATCTTTTTCCCTCTGCCAAAATTATGGGGACAT CATGAAGCCCCCTGAGCATCTGACTTCTGGCTAATA AAGGAAATTTATTTTCATTGCAATAGTGTTGGAA TTTTTTGTGTCTCTCACTCGGAAGGACATATGGGAG GGCAAATCATTTAAAACATCAGAATGAGTATTTGGT TTAGAGTTTGGCAACATATGCCCATATGCTGGCTGC CATGAACAAAGGTTGGCTATAAAGAGGTCATCAGT ATATGAAACAGCCCCCTGCTGTCCATTCTTATTCC ATAGAAAAGCCTTGACTTGAGGTTAGATTTTTTTTA TATTTTGTFTTGTGTTATTTTTTTCTTTAACATCCCTA AAATTTTCCTTACATGTTTTACTAGCCAGATTTTCC TCCTCTCCTGACTACTCCAGTCATAGCTGTCCCTCT TCTCTTATGGAGATC	30
64	プロモーター; EF-1	CCGGTGCCTAGAGAAGGTGGCGCGGGGTAAACTGG GAAAGTGATGTCGTGACTGGCTCCGCCTTTTTCCC GAGGGTGGGGGAGAACCGTATATAAGTGCAGTAGT CGCCGTGAACGTTCTTTTTTCGCAACGGGTTTGCCGC	40

【表 5 - 2 5】

		<p>CAGAACACAGGTAAGTGCCGTGTGTGGTTCCCGCG  GGCCTGGCCTCTTTACGGGTTATGGCCCTTGCGTGC  CTTGAATTACTTCCACGCCCTGGCTGCAGTACGTG  ATTCTTGATCCCGAGCTTCGGGTTGGAAGTGGGTGG  GAGAGTTCGAGGCCCTGCGCTTAAGGAGCCCCTTCG  CCTCGTGCCTTGAGTTGAGGCCCTGGCCTGGGCGCTGG  GGCCGCCCGGTGCGAATCTGGTGGCACCTTCGCGCC  TGTCTCGCTGCTTTCGATAAGTCTCTAGCCATTTAAA  ATTTTTGATGACCTGCTGCGACGCTTTTTTTCTGGCA  AGATAGTCTTGTAATGCGGGCCAAGATCTGCACAC  TGGTATTTTCGGTTTTTTGGGGCCGCGGGCGGCGACGG  GGCCCGTGCCTCCAGCGCACATGTTTCGGCGAGGC  GGGGCCTGCGAGCGCGGCCACCGAGAATCGGACGG  GGGTAGTCTCAAGCTGGCCGGCCTGCTCTGGTGCCT  GGCCTCGCGCCCGCTGTATCGCCCCGCCCTGGGCG  GCAAGGCTGGCCCGGTTCGGCACCAAGTTGCGTGAGC  GGAAAGATGGCCGCTTCCCGGCCCTGCTGCAGGGA  GCTCAAATGGAGGACGCGGCGCTCGGGAGAGCGG  GCGGGTGAGTACCCACACAAAGGAAAAGGGCCTT  TCCGTCTCAGCCGTCGCTTCATGTGACTCCACGGA  GTACCGGGCGCCGTCCAGGCACCTCGATTAGTTCTC  GAGCTTTTGGAGTACGTCGCTTTTAGGTTGGGGGGA  GGGGTTTTATGCGATGGAGTTTCCCCACACTGAGTG  GGTGGAGACTGAAGTTAGGCCAGCTTGGCACTTGAT  GTAATTCTCCTTGGAATTTGCCCTTTTTGAGTTTGGGA  TCTTGGTTCATTCTCAAGCCTCAGACAGTGGTTCAA  AGTTTTTTTCTTCCATTTTCAGGTGTCGTGA</p>	10
65	プロモーター; PGK	<p>GGGGTTGGGGTTGCGCCTTTTCCAAGGCAGCCCTGG  GTTTTCGCGAGGGACGCGGCTGCTCTGGGCGTGGTTC  CGGGAAACGCAGCGGCGCCGACCCTGGGTCTCGCA  CATTCTTCACGTCCGTTTCGCGAGCGTCACCCGGATCT  TCGCCGCTACCCTTGTGGGCCCCCGGCGACGCTTC</p>	20 30 40

【表 5 - 2 6】

		<p>CTGCTCCGCCCTAAGTCGGGAAGGTTCTTGC  TCGCGGCGTGCCGGACGTGACAAACGGAAGCCGCA  CGTCTACTAGTACCCTCGCAGACGGACAGCGCCAG  GGAGCAATGGCAGCGCGCCGACCGCGATGGGCTGT  GGCCAATAGCGGCTGCTCAGCAGGGCGCGCCGAGA  GCAGCGGCCGGGAAGGGGCGGTGCGGGAGGCGGG  GTGTGGGGCGGTAGTGTGGGCCCTGTTCTGCCCGC  GCGGTGTTCCGCATTCTGCAAGCCTCCGGAGCGCAC  GTCGGCAGTCGGCTCCCTCGTTGACCGAATCACCGA  CCTCTCTCCCCAG</p>	10
66	プロモーター; UbC	<p>GCGCCGGGTTTTGGCGCCTCCCGCGGGCGCCCCCT  CCTCACGGCGAGCGCTGCCACGTCAGACGAAGGGC  GCAGGAGCGTTCCTGATCCTTCCGCCGGACGCTCA  GGACAGCGGCCCGCTGCTCATAAGACTCGGCCTTAG  AACCCAGTATCAGCAGAAGGACATTTTAGGACGG  GACTTGGGTGACTCTAGGGCACTGGTTTTCTTTCCA  GAGAGCGGAACAGGCGAGGAAAAGTAGTCCCTTCT  CGGCGATTCTGCGGAGGGATCTCCGTGGGGCGGTG  AACGCCGATGATTATATAAGGACGCGCCGGGTGTG  GCACAGCTAGTTCCGTCGCAGCCGGGATTTGGGTG  CGGTTCTTGTTTGTGGATCGCTGTGATCGTCACTTGG  TGAGTTGCGGGCTGCTGGGCTGGCCGGGGCTTTCGT  GGCCGCCGGGCCGCTCGGTGGGACGGAAGCGTGTG  GAGAGACCGCCAAGGGCTGTAGTCTGGGTCCGCGA  GCAAGGTTGCCCTGAACTGGGGGTTGGGGGGAGCG  CACAAAATGGCGGCTGTTCCCGAGTCTTGAATGGAA  GACGCTTGTAAGGCGGGCTGTGAGGTGTTGAAAC  AAGGTGGGGGGCATGGTGGGCGGCAAGAACCCAAG  GTCTTGAGGCCCTTCGCTAATGCGGGAAAGCTCTTAT  TCGGGTGAGATGGGCTGGGGCACCATCTGGGGACC  CTGACGTGAAGTTTGTCACTGACTGGAGAACTCGGG  TTTGTCTGCTGGTTGCGGGGGCGGCAGTTATGCGGT</p>	20 30 40

【表 5 - 2 7】

		GCCGTTGGGCAGTGCACCCGTACCTTTGGGAGCGCG CGCCTCGTCGTGTCGTGACGTCACCCGTTCTGTTGG CTTATAATGCAGGGTGGGGCCACCTGCCGGTAGGTG TGCGGTAGGCTTTTCTCCGTCGCAGGACGCAGGGTT CGGGCCTAGGGTAGGCTCTCCTGAATCGACAGGGC CCGGACCTCTGGTGAGGGGAGGGATAAGTGAGGGC TCAGTTTCTTTGGTCGGTTTTATGTACCTATCTTCTT AAGTAGCTGAAGCTCCGGTTTTGAACTATGCGCTCG GGGTTGGCGAGTGTGTTTTGTGAAGTTTTTTAGGCA CCTTTTGAAATGTAATCATTGGGTCAATATGTAAT TTTCAGTGTTAGACTAGTAAA	10
67	ポリ A; SV40	GTTTATTGCAGCTTATAATGGTTACAAATAAAGCAA TAGCATCACAAATTTACAAATAAAGCATTTTTTTTC ACTGCATTCTAGTTGTGGTTTTGTCCAAACTCATCAA TGTATCTTATCA	20
68	ポリ A; bGH	GACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGC CCCTCCCCCGTGCCTTCCTTGACCCTGGAAGGTGCC ACTCCCCTGTCCTTTCCTAATAAAAATGAGGAAATT GCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTG GGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGG ATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCG GTGGGCTCTATGG	30
69	HIV Gag; Bal	ATGGGTGCGAGAGCGTCAGTATTAAGCGGGGGAGA ATTAGATAGGTGGGAAAAAATTCGGTTAAGGCCAG GGGGAAAGAAAAAATATAGATTA AACATATAGTA TGGGCAAGCAGGGA ACTAGAAAGATTCGCAGTCAA TCCTGGCCTGTTAGAAACATCAGAAGGCTGCAGAC AAATACTGGGACAGCTACAACCATCCCTTCAGACA GGATCAGAAGA ACTTAGATCATTATATAATACAGTA GCAACCCTCTATTGTGTACATCAAAAGATAGAGGTA AAAGACACCAAGGAAGCTTTAGACAAAATAGAGGA AGAGCAAAACAAATGTAAGAAAAAGGCACAGCAA	40

【表 5 - 2 8】

		GCAGCAGCTGACACAGGAAACAGCGGTCAGGTCAG CCAAAATTTCCCTATAGTGCAGAACCTCCAGGGGCA AATGGTACATCAGGCCATATCACCTAGAACTTTAAA TGCATGGGTAAAAGTAATAGAAGAGAAAGCTTTCA GCCCAGAAGTAATACCCATGTTTTTCAGCATTATCAG AAGGAGCCACCCACAAGATTTAAACACCATGCTA AACACAGTGGGGGGACATCAAGCAGCCATGCAAAT GTAAAAGAACCCATCAATGAGGAAGCTGCAAGAT GGGATAGATTGCATCCCGTGCAGGCAGGGCCTGTTG CACCAGGCCAGATAAGAGATCCAAGGGGAAGTGAC ATAGCAGGAECTACCAGTACCCTTCAGGAACAAAT AGGATGGATGACAAGTAATCCACCTATCCCAGTAG GAGAAATCTATAAAAAGATGGATAATCCTGGGATTA AATAAAATAGTAAGGATGTATAGCCCTACCAGCATT TTGGACATAAGACAAGGACCAAAGGAACCCTTTAG AGACTATGTAGACCGGTTCTATAAAACTCTAAGAGC CGAGCAAGCTTACAGGAGGTAAAAAATTGGATGA CAGAAACCTTGTGGTCCAAAATGCGAACCCAGATT GTAAGACTATTTTAAAAGCATTGGGACCAGCAGCTA CACTAGAAGAAATGATGACAGCATGTCAGGGAGTG GGAGGACCCAGCCATAAAGCAAGAATTTTGGCAGA AGCAATGAGCCAAGTAACAAATTCAGCTACCATAA TGATGCAGAAAGGCAATTTTAGGAACCAAAGAAAG ATTGTTAAATGTTTCAATTGTGGCAAAGAAGGGCAC ATAGCCAGAACTGCAGGGCCCCTAGGAAAAGGGG CTGTTGGAAATGTGGAAAGGAAGGACACCAAATGA AAGACTGTACTGAGAGACAGGCTAATTTTTTAGGGA AAATCTGGCCTTCCCACAAAGGAAGGCCAGGGAAT TTCCTTCAGAGCAGACCAGAGCCAACAGCCCCACC AGCCCCACCAGAAGAGAGCTTCAGGTTTGGGGAAG AGACAACAACCTCCCTCTCAGAAGCAGGAGCTGATA GACAAGGAACTGTATCCTTTAGCTTCCCTCAGATCA
--	--	---

10

20

30

40

【表 5 - 2 9】

		CTCTTTGGCAACGACCCCTCGTCACAATAA
70	HIV Pol; Bal	ATGAATTTGCCAGGAAGATGGAAACCAAAAATGAT AGGGGGAATTGGAGGTTTTATCAAAGTAAGACAGT ATGATCAGATACTCATAGAAATCTGTGGACATAAA GCTATAGGTACAGTATTAATAGGACCTACACCTGTC AACATAATTGGAAGAAATCTGTTGACTCAGATTGGT TGCACTTTAAATTTTCCCATTAGTCCTATTGAAACTG TACCAGTAAAATTTAAAACCAGGAATGGATGGCCCA AAAGTTAAACAATGGCCACTGACAGAAGAAAAAAT AAAAGCATTAAATGGAAATCTGTACAGAAATGGAAA AGGAAGGGAAAATTTCAAAAATTGGGCCTGAAAAT CCATACAATACTCCAGTATTTGCCATAAAGAAAAAA GACAGTACTAAATGGAGAAAATTAGTAGATTTTCAG AGAACTTAATAAGAAAACCTCAAGACTTCTGGGAAG TACAATTAGGAATACACATCCCGCAGGGGTTAAAA AAGAAAAAATCAGTAACAGTACTGGATGTGGGTGA TGCATATTTTTCAGTTCCTTAGATAAAGAATTCAG GAAGTATACTGCATTTACCATACCTAGTATAAACAA TGAAACACCAGGGATCAGATATCAGTACAATGTAC TTCCACAGGGATGGAAAGGATCACCAGCAATATTTT AAAGTAGCATGACAAGAATCTTAGAGCCTTTTAGA AAACAAAATCCAGAAATAGTGATCTATCAATACAT GGATGATTTGTATGTAGGATCTGACTTAGAAATAGG GCAGCATAGAACA AAAATAGAGGAACTGAGACAAC ATCTGTTGAGGTGGGGATTTACCACACCAGACAAA AAACATCAGAAAGAACCTCCATTCTTTGGATGGGT TATGAACTCCATCCTGATAAATGGACAGTACAGCCT ATAGTGCTGCCAGAAAAAGACAGCTGGACTGTCAA TGACATACAGAAGTTAGTGGGAAAATTGAATTGGG CAAGTCAGATTTACCCAGGAATTAAGTAAAGCAA TTATGTAGGCTCCTTAGGGGAACCAAGGCATTAACA GAAGTAATACCACTAACAAAAGAAACAGAGCTAGA

10

20

30

40

【表 5 - 3 0】

		<p>ACTGGCAGAGAACAGGGAAATTCCTAAAAGAACCAG  TACATGGGGTGTATTATGACCCATCAAAGACTTAA  TAGCAGAAATACAGAAGCAGGGGCAAGGCCAATGG  ACATATCAAATTTATCAAGAGCCATTTAAAAATCTG  AAAACAGGAAAATATGCAAGAATGAGGGGTGCCCA  CACTAATGATGTAAAACAATTAACAGAGGCAGTGC  AAAAAATAACACAGAAAGCATAGTAATATGGGGA  AAGACTCCTAAATTTAAACTACCCATACAAAAAGA  AACATGGGAAACATGGTGGACAGAGTATTGGCAAG  CCACCTGGATTCCCTGAGTGGGAGTTTGTCAATACCC  CTCCCTTAGTGAAATTATGGTACCAGTTAGAGAAAG  AACCCATAATAGGAGCAGAAACATTCTATGTAGAT  GGAGCAGCTAACCGGGAGACTAAATTAGGAAAAGC  AGGATATGTTACTAACAGAGGAAGACAAAAAGTTG  TCTCCCTAACTGACACAACAATCAGAAGACTGAGT  TACAAGCAATTCATCTAGCTTTACAAGATTCAGGAT  TAGAAGTAAACATAGTAACAGACTCACAATATGCA  TTAGGAATCATTCAAGCACAACCAGATAAAAAGTGA  ATCAGAGTTAGTCAGTCAAATAATAGAACAGTTAAT  AAAAAAGGAAAAGGTCTACCTGGCATGGGTACCAG  CGCACAAAGGAATTGGAGGAAATGAACAAGTAGAT  AAATTAGTCAGTACTGGAATCAGGAAAGTACTA</p>	10
71	HIV インテグラーゼ; Bal	<p>TTTTTAGATGGAATAGATATAGCCCAAGAAGAACAT  GAGAAATATCACAGTAATTGGAGAGCAATGGCTAG  TGATTTTAACTGCCACCTGTGGTAGCAAAGAAAT  AGTAGCCAGCTGTGATAAATGTCAGCTAAAAGGAG  AAGCCATGCATGGACAAGTAGACTGTAGTCCAGGA  ATATGGCAACTAGATTGTACACATTTAGAAGGAAA  AATTATCCTGGTAGCAGTTCATGTAGCCAGTGGATA  TATAGAAGCAGAAGTTATTCCAGCAGAGACAGGGC  AGGAAACAGCATACTTTCTCTTAAAATTAGCAGGAA  GATGGCCAGTAAAAACAATACATACAGACAATGGC</p>	30 40

【表 5 - 3 1】

		AGCAATTTCACTAGTACTACAGTCAAGGCCGCCTGT TGGTGGGCGGGGATCAAGCAGGAATTTGGCATTCC CTACAATCCCCAAAGTCAGGGAGTAGTAGAATCTAT AAATAAAGAATTAAGAAAATTATAGGACAGGTAA GAGATCAGGCTGAACATCTTAAAACAGCAGTACAA ATGGCAGTATTCATCCACAATTTTAAAAGAAAAGG GGGGATTGGGGGTATAGTGCAGGGGAAAGAATAG TAGACATAATAGCAACAGACATACAACTAAAGAA TTACAAAACAAATTACAAAATTCAAAATTTTCGG GTTTATTACAGGGACAGCAGAGATCCACTTTGGAAA GGACCAGCAAAGCTTCTCTGGAAAGGTGAAGGGGC AGTAGTAATACAAGATAATAGTGACATAAAAGTAG TACCAAGAAGAAAAGCAAAGATCATTAGGGATTAT GGAAAACAGATGGCAGGTGATGATTGTGTGGCAAG TAGACAGGATGAGGATTAG	10 20
72	エンペローブ ; RD114	ATGAAACTCCCAACAGGAATGGTCATTTTATGTAGC CTAATAATAGTTCGGGCAGGGTTTGACGACCCCCGC AAGGCTATCGCATTAGTACAAAACAACATGGTAA ACCATGCGAATGCAGCGGAGGGCAGGTATCCGAGG CCCCACCGAACTCCATCCAACAGGTAACCTTGCCCAG GCAAGACGGCCTACTTAATGACCAACCAAAAATGG AAATGCAGAGTCACTCCAAAAATCTCACCCCTAGC GGGGGAGAACTCCAGAACTGCCCTGTAACTTTTC CAGGACTCGATGCACAGTTCTTGTTATACTGAATAC CGGCAATGCAGGGCGAATAATAAGACATACTACAC GGCCACCTTGCTTAAAATACGGTCTGGGAGCCTCAA CGAGGTACAGATATTACAAAACCCCAATCAGCTCCT ACAGTCCCCTTGTAGGGGCTCTATAAATCAGCCCCT TTGCTGGAGTGCCACAGCCCCATCCATATCTCCGA TGGTGGAGGACCCCTCGATACTAAGAGAGTGTGGA CAGTCCAAAAAGGCTAGAACAATTCATAAGGCT ATGCATCCTGAACTTCAATACCACCCCTTAGCCCTG	30 40



【表 5 - 3 3】

GALV	<p>CAGATGAGTCCTGGGAGCTGGAAAAGACTGATCAT  CCTCTTAAGCTGCGTATTCGGAGACGGCAAAACGA  GTCTGCAGAATAAGAACCCCCACCAGCCTGTGACCC  TCACCTGGCAGGTAAGTGTCCCAAAGTGGGGACGTTG  TCTGGGACAAAAAGGCAGTCCAGCCCCCTTTGGACTT  GGTGGCCCTCTCTTACACCTGATGTATGTGCCCTGG  CGGCCGGTCTTGAGTCCTGGGATATCCCGGGATCCG  ATGTATCGTCCTCTAAAAGAGTTAGACCTCCTGATT  CAGACTATACTGCCGCTTATAAGCAAATCACCTGGG  GAGCCATAGGGTGCAGCTACCCTCGGGCTAGGACC  AGGATGGCAAATCCCCCTTCTACGTGTGTCCCCGA  GCTGGCCGAACCCATTCAGAAGCTAGGAGGTGTGG  GGGGCTAGAATCCCTATACTGTAAAGAATGGAGTT  GTGAGACCACGGGTACCGTTTATTGGCAACCCAAGT  CCTCATGGGACCTCATAACTGTAAAATGGGACCAA  AATGTGAAATGGGAGCAAAAATTTCAAAGTGTGA  ACAAACCGGCTGGTGTAAACCCCTCAAGATAGACTT  CACAGAAAAAGGAAAACCTCTCCAGAGATTGGATAA  CGGAAAAACCTGGGAATTAAGGTTCTATGTATATG  GACACCCAGGCATACAGTTGACTATCCGCTTAGAGG  TACTAACATGCCGGTTGTGGCAGTGGGCCAGACC  CTGTCCCTGCGGAACAGGGACCTCCTAGCAAGCCCC  TACTCTCCCTCTCTCCCCACGGAAAGCGCCGCCA  CCCCCTACCCCCGGCGGCTAGTGAGCAAACCCCTG  CGGTGCATGGAGAACTGTTACCCTAACTCTCCGC  CTCCCACCAGTGGCGACCGACTCTTTGGCCTTGTGC  AGGGGGCCTTCCTAACCTTGAATGCTACCAACCCAG  GGGCCACTAAGTCTTGCTGGCTCTGTTTGGGCATGA  GCCCCCTTATTATGAAGGGATAGCCTCTTCAGGAG  AGGTGCTTATACCTCCAACCATAACCCGATGCCACT  GGGGGGCCCAAGGAAAGCTTACCCTCACTGAGGTC  TCCGGACTCGGGTCATGCATAGGGAAGGTGCCTCTT</p>
------	--

10

20

30

40

【表 5 - 3 4】

		ACCCATCAACATCTTTGCAACCAGACCTTACCCATC AATTCCTCTAAAAACCATCAGTATCTGCTCCCCTCA AACCATAGCTGGTGGGCCTGCAGCACTGGCCTCACC CCCTGCCTCTCCACCTCAGTTTTTAATCAGTCTAAAG ACTTCTGTGTCCAGGTCCAGCTGATCCCCGCATCT ATTACCATTCTGAAGAAACCTTGTTACAAGCCTATG ACAAATCACCCCCCAGGTTTAAAAGAGAGCCTGCCT CACTTACCCTAGCTGTCTTCCTGGGGTTAGGGATTG CGGCAGGTATAGGTACTGGCTCAACCGCCCTAATTA AAGGGCCCATAGACCTCCAGCAAGGCCTAACCAGC CTCCAAATCGCCATTGACGCTGACCTCCGGGCCCTT CAGGACTCAATCAGCAAGCTAGAGGACTCACTGAC TTCCTATCTGAGGTAGTACTCCAAAATAGGAGAGG CCTTGACTTACTATTCCTTAAAGAAGGAGGCCTCTG CGCGGCCCTAAAAGAAGAGTGCTGTTTTTATGTAGA CCACTCAGGTGCAGTACGAGACTCCATGAAAAAAC TTAAAGAAAGACTAGATAAAAGACAGTTAGAGCGC CAGAAAAACCAAACTGGTATGAAGGGTGGTTCAA TAACTCCCCTTGGTTTACTACCCTACTATCAACCATC GCTGGGCCCTATTGCTCCTCCTTTTGTACTCACTC TTGGGCCCTGCATCATCAATAAATTAATCCAATTCA TCAATGATAGGATAAGTGCAGTCAAATTTTAGTCC TTAGACAGAAATATCAGACCCTAGATAACGAGGAA AACCTTTAA	10 20 30
74	エンペローブ;FUG	ATGGTTCGCGCAGGTTCTTTTGTGTGACTCCTTCTGG GTTTTTCGTTGTGTTTCGGGAAGTTCCCCATTTACAC GATACCAGACGAACCTGGTCCCTGGAGCCCTATTGA CATACACCATCTCAGCTGTCCAAATAACCTGGTTGT GGAGGATGAAGGATGTACCAACCTGTCCGAGTTCTC CTACATGGAACCTCAAAGTGGGATACATCTCAGCCAT CAAAGTGAACGGGTTCACTTGCACAGGTGTTGTGAC AGAGGCAGAGACCTACACCAACTTTGTTGGTTATGT	40

【表 5 - 3 5】

		<p>CACAACCACATTCAAGAGAAAGCATTTCGGCCCCAC  CCCAGACGCATGTAGAGCCGCGTATAACTGGAAGA  TGGCCGGTGACCCCAGATATGAAGAGTCCCTACAC  AATCCATACCCCGACTACCACTGGCTTCGAACTGTA  AGAACCACCAAAGAGTCCCTCATTATCATATCCCCA  AGTGTGACAGATTTGGACCCATATGACAAATCCCTT  CACTCAAGGGTCTTCCCTGGCGGAAAGTGCTCAGGA  ATAACGGTGTCTCTACCTACTGCTCAACTAACCAT  GATTACACCATTGGATGCCCGAGAATCCGAGACCA  AGGACACCTTGTGACATTTTTACCAATAGCAGAGGG  AAGAGAGCATCCAACGGGAACAAGACTTGCGGCTT  TGTGGATGAAAGAGGCCTGTATAAGTCTCTAAAAG  GAGCATGCAGGCTCAAGTTATGTGGAGTTCTTGGAC  TTAGACTTATGGATGGAACATGGGTCGCGATGCAA  ACATCAGATGAGACCAAATGGTGCCCTCCAGATCA  GTTGGTGAATTTGCACGACTTTCGCTCAGACGAGAT  CGAGCATCTCGTTGTGGAGGAGTTAGTTAAGAAAA  GAGAGGAATGTCTGGATGCATTAGAGTCCATCATG  ACCACCAAGTCAGTAAGTTTCAGACGTCTCAGTCAC  CTGAGAAAACCTGTCCCAGGGTTTGGAAAAGCATAT  ACCATATTCAACAAAACCTTGATGGAGGCTGATGCT  CACTACAAGTCAGTCCGGACCTGGAATGAGATCATC  CCCTCAAAGGGTGTGTTGAAAGTTGGAGGAAGGTG  CCATCCTCATGTGAACGGGGTGTGTTTTCAATGGTAT  AATATTAGGGCCTGACGACCATGTCCTAATCCCAGA  GATGCAATCATCCCTCCTCCAGCAACATATGGAGTT  GTTGGAATCTTCAGTTATCCCCCTGATGCACCCCT  GGCAGACCCTTCTACAGTTTTCAAAGAAGGTGATGA  GGCTGAGGATTTTGTGTAAGTTCACCTCCCCGATGT  GTACAAACAGATCTCAGGGGTTGACCTGGGTCTCCC  GAACTGGGGAAAGTATGTATTGATGACTGCAGGGG  CCATGATTGGCCTGGTGTGATATTTCCCTAATGA</p>
--	--	---

10

20

30

40

【表 5 - 3 6】

		CATGGTGCAGAGTTGGTATCCATCTTTGCATTAAT TAAAGCACACCAAGAAAAGACAGATTTATACAGAC ATAGAGATGAACCGACTTGGAAAGTAA
75	エンペローブ ; LCMV	ATGGGTGAGATTGTGACAATGTTTGAGGGCTCTGCCT CACATCATCGATGAGGTGATCAACATTGTCATTATT GTGCTTATCGTGATCACGGGTATCAAGGCTGTCTAC AATTTTGCCACCTGTGGGATATTCGCATTGATCAGT TTCCTACTTCTGGCTGGCAGGTCCTGTGGCATGTAC GGTCTTAAGGGACCCGACATTTACAAAGGAGTTTAC CAATTTAAGTCAGTGGAGTTTGATATGTCACATCTG AACCTGACCATGCCAACGCATGTTTCAGCCAACAAC TCCCACCATTACATCAGTATGGGGACTTCTGGACTA GAATTGACCTTCACCAATGATTCCATCATCAGTCAC AACTTTTGCAATCTGACCTCTGCCTTCAACAAAAG ACCTTTGACCACACTCATGAGTATAGTTTCGAGC CTACACCTCAGTATCAGAGGGAACCTCCAACTATAAG GCAGTATCCTGCGACTTCAACAATGGCATAACCATC CAATACAACCTTGACATTCTCAGATCGACAAAGTGCT CAGAGCCAGTGTAGAACCTTCAGAGGTAGAGTCCT AGATATGTTTAGAACTGCCTTCGGGGGGAAATACAT GAGGAGTGGCTGGGGCTGGACAGGCTCAGATGGCA AGACCACCTGGTGTAGCCAGACGAGTTACCAATAC CTGATTATACAAAATAGAACCTGGGAAAACCACTG CACATATGCAGGTCTTTTGGGATGTCCAGGATTCT CCTTTCCCAAGAGAAGACTAAGTTCTTCACTAGGAG ACTAGCGGGCACATTCACCTGGACTTTGTCAGACTC TTCAGGGGTGGAGAATCCAGGTGGTTATTGCCTGAC CAAATGGATGATTCTTGCTGCAGAGCTTAAGTGTTT CGGGAACACAGCAGTTGCGAAATGCAATGTAAATC ATGATGCCGAATTCTGTGACATGCTGCGACTAATTG ACTACAACAAGGCTGCTTTGAGTAAGTTCAAAGAG GACGTAGAATCTGCCTTGCACTTATTCAAACAACA

10

20

30

40

【表 5 - 3 7】

		<p>GTGAATTCCTTTGATTCAGATCAACTACTGATGAGG  AACCACCTTGAGAGATCTGATGGGGGTGCCATATTGC  AATTACTCAAAGTTTTGGTACCTAGAACATGCAAAG  ACCGGCGAAACTAGTGTCCCAAGTGCTGGCTTGTC  ACCAATGGTTCTTACTTAAATGAGACCCACTTCAGT  GATCAAATCGAACAGGAAGCCGATAACATGATTAC  AGAGATGTTGAGGAAGGATTACATAAAGAGGCAGG  GGAGTACCCCCCTAGCATTGATGGACCTTCTGATGT  TTCCACATCTGCATATCTAGTCAGCATCTTCCTGCA  CCTTGTCAAAATACCAACACACAGGCACATAAAAG  GTGGCTCATGTCCAAAGCCACACCGATTAACCAACA  AAGGAATTTGTAGTTGTGGTGCATTTAAGGTGCCTG  GTGTAAAAACCGTCTGGAAAAGACGCTGA</p>	10
76	エンペローブ ;FPV	<p>ATGAACACTCAAATCCTGGTTTTTCGCCCTTGTGGCA  GTCATCCCCACAAATGCAGACAAAATTTGTCTTGGA  CATCATGCTGTATCAAATGGCACCAAAGTAAACAC  ACTCACTGAGAGAGGAGTAGAAGTTGTCAATGCAA  CGGAAACAGTGGAGCGGACAAACATCCCCAAAATT  TGCTCAAAGGGAAAAGAACCACTGATCTTGGCCA  ATGCGGACTGTTAGGGACCATTACCGGACCACCTCA  ATGCGACCAATTTCTAGAATTTTCAGCTGATCTAAT  AATCGAGAGACGAGAAGGAAATGATGTTTGTACC  CGGGGAAGTTTGTAAATGAAGAGGCATTGCGACAA  ATCCTCAGAGGATCAGGTGGGATTGACAAAGAAAC  AATGGGATTCACATATAGTGAATAAGGACCAACG  GAACAACACTAGTGCATGTAGAAGATCAGGGTCTTCAT  TCTATGCAGAAATGGAGTGGCTCCTGTCAAATACAG  ACAATGCTGCTTTCCACAAATGACAAAATCATACA  AAAACACAAGGAGAGAATCAGCTCTGATAGTCTGG  GGAATCCACCATTTCAGGATCAACCACCGAACAGAC  CAAACATATGGGAGTGGAAATAAACTGATAACAG  TCGGGAGTTCCAAATATCATCAATCTTTTGTGCCGA</p>	20 30 40

【表 5 - 3 8】

		<p>GTCCAGGAACACGACCGCAGATAAATGGCCAGTCC  GGACGGATTGATTTTCATTGGTTGATCTTGGATCCC  AATGATACAGTTACTTTTAGTTTCAATGGGGCTTTC  ATAGCTCCAAATCGTGCCAGCTTCTTGAGGGGAAAAG  TCCATGGGGATCCAGAGCGATGTGCAGGTTGATGCC  AATTGCGAAGGGGAATGCTACCACAGTGGAGGGAC  TATAACAAGCAGATTGCCTTTTCAAACATCAATAG  CAGAGCAGTTGGCAAATGCCCAAGATATGTAAAAC  AGGAAAGTTTATTATTGGCAACTGGGATGAAGAAC  GTTCCCGAACCTTCCAAAAAAGGAAAAAAGAGG  CCTGTTTGGCGCTATAGCAGGGTTTATTGAAAATGG  TTGGGAAGGTCGGTTCGACGGGTGGTACGGTTTCAG  GCATCAGAATGCACAAGGAGAAGGAACTGCAGCAG  ACTACAAAAGCACCCAATCGGCAATTGATCAGATA  ACCGGAAAGTTAAATAGACTCATTGAGAAAACCAA  CCAGCAATTTGAGCTAATAGATAATGAATTCACTGA  GGTGGAAAAGCAGATTGGCAATTTAATTAAGTGA  CCAAAGACTCCATCACAGAAGTATGGTCTTACAATG  CTGAACTTCTTGTGGCAATGGAAAACCAGCACACTA  TTGATTTGGCTGATTCAGAGATGAACAAGCTGTATG  AGCGAGTGAGGAAACAATTAAGGGAAAATGCTGAA  GAGGATGGCACTGGTTGCTTTGAAATTTTTCATAAA  TGTGACGATGATTGTATGGCTAGTATAAGGAACAAT  ACTTATGATCACAGCAAATACAGAGAAGAAGCGAT  GCAAAATAGAATACAAATTGACCCAGTCAAATTGA  GTAGTGGCTACAAAGATGTGATACTTTGGTTTAGCT  TCGGGGCATCATGCTTTTGGCTTCTTGCCATTGCAAT  GGGCCTTGTTTTTCATATGTGTGAAGAACGGAAACAT  GCGGTGCACTATTTGTATATAA</p>	10
77	エンペローフ ;RRV	<p>AGTGTAACAGAGCACTTTAATGTGTATAAGGCTACT  AGACCATACCTAGCACATTGCGCCGATTGCGGGGA  CGGGTACTTCTGCTATAGCCCAGTTGCTATCGAGGA</p>	40

【表 5 - 3 9】

		<p>GATCCGAGATGAGGGCGTCTGATGGCATGCTTAAGAT          CCAAGTCTCCGCCCAAATAGGTCTGGACAAGGCAG          GCACCCACGCCACACGAAGCTCCGATATATGGCTG          GTCATGATGTTCAAGGAATCTAAGAGAGATTCCCTGA          GGGTGTACACGTCCGCAGCGTGCTCCATACATGGGA          CGATGGGACACTTCATCGTCGCACACTGTCCACCAG          GCGACTACCTCAAGGTTTCGTTTCGAGGACGCAGATT          CGCACGTGAAGGCATGTAAGGTCCAATACAAGCAC          AATCCATTGCCGGTGGGTAGAGAGAAGTTCGTGGTT          AGACCACACTTTGGCGTAGAGCTGCCATGCACCTCA          TACCAGCTGACAACGGCTCCCACCGACGAGGAGAT          TGACATGCATACACCGCCAGATATAACCGGATCGCAC          CCTGCTATCACAGACGGCGGGCAACGTCAAATAA          CAGCAGGCGGCAGGACTATCAGGTACAACGTACC          TGCGGCCGTGACAACGTAGGCACTACCAGTACTGA          CAAGACCATCAACACATGCAAGATTGACCAATGCC          ATGCTGCCGTCACCAGCCATGACAAATGGCAATTTA          CCTCTCCATTTGTTCCCAGGGCTGATCAGACAGCTA          GGAAAGGCAAGGTACACGTTCCGTTCCCTCTGACTA          ACGTCACCTGCCGAGTGCCGTTGGCTCGAGCGCCGG          ATGCCACCTATGGTAAGAAGGAGGTGACCCTGAGA          TTACACCCAGATCATCCGACGCTCTTCTCCTATAGG          AGTTTAGGAGCCGAACCGCACCCGTACGAGGAATG          GGTTGACAAGTTCTCTGAGCGCATCATCCCAGTGAC          GGAAGAAGGGATTGAGTACCAGTGGGGCAACAACC          CGCCGGTCTGCCTGTGGGCGCAACTGACGACCGAG          GGCAAACCCCATGGCTGGCCACATGAAATCATTCA          GTACTATTATGGACTATACCCCGCCGCCACTATTGC          CGCAGTATCCGGGGCGAGTCTGATGGCCCTCCTAAC          TCTGGCGGCCACATGCTGCATGCTGGCCACCGCGAG          GAGAAAGTGCCTAACACCGTACGCCCTGACGCCAG          GAGCGGTGGTACCGTTGACACTGGGGCTGCTTTGCT</p>
--	--	---

10

20

30

40

【表 5 - 4 0】

		GCGCACCCGAGGGCGAATGCA
78	エンペローブ ; MLV 10A1	AGTGTAACAGAGCACTTTAATGTGTATAAAGGCTACT AGACCATACCTAGCACATTGCGCCGATTGCGGGGA CGGGTACTTCTGCTATAGCCCAGTTGCTATCGAGGA GATCCGAGATGAGGCGTCTGATGGCATGCTTAAGAT CCAAGTCTCCGCCCAAATAGGTCTGGACAAGGCAG GCACCCACGCCACACGAAGCTCCGATATATGGCTG GTCATGATGTTCAAGGAATCTAAGAGAGATTCCCTTGA GGGTGTACACGTCCGCAGCGTGCTCCATACATGGGA CGATGGGACACTTCATCGTCGCACACTGTCCACCAG GCGACTACCTCAAGGTTTCGTTTCGAGGACGCAGATT CGCACGTGAAGGCATGTAAGGTCCAATACAAGCAC AATCCATTGCCGGTGGGTAGAGAGAAGTTCGTGGTT AGACCACACTTTGGCGTAGAGCTGCCATGCACCTCA TACCAGCTGACAACGGCTCCCACCGACGAGGAGAT TGACATGCATACACCGCCAGATATAACCGGATCGCAC CCTGCTATCACAGACGGCGGGCAACGTCAAATAA CAGCAGGCGGCAGGACTATCAGGTACAACGTACC TGCGGCCGTGACAACGTAGGCACTACCAGTACTGA CAAGACCATCAACACATGCAAGATTGACCAATGCC ATGCTGCCGTCACCAGCCATGACAAATGGCAATTTA CCTCTCCATTTGTTCCAGGGCTGATCAGACAGCTA GGAAAGGCAAGGTACACGTTCCGTTCCCTCTGACTA ACGTCACCTGCCGAGTGCCGTTGGCTCGAGCGCCGG ATGCCACCTATGGTAAGAAGGAGGTGACCCTGAGA TTACACCCAGATCATCCGACGCTCTTCTCCTATAGG AGTTTAGGAGCCGAACCGCACCCGTACGAGGAATG GGTTGACAAGTTCTCTGAGCGCATCATCCAGTGAC GGAAGAAGGGATTGAGTACCAGTGGGGCAACAACC CGCCGGTCTGCCTGTGGGCGCAACTGACGACCGAG GGCAAACCCCATGGCTGGCCACATGAAATCATTCA GTACTATTATGGACTATACCCCGCCGCACTATTGC

10

20

30

40

【表 5 - 4 1】

		CGCAGTATCCGGGGCGAGTCTGATGGCCCTCCTAAC TCTGGCGGCCACATGCTGCATGCTGGCCACCGCGAG GAGAAAGTGCCTAACACCGTACGCCCTGACGCCAG GAGCGGTGGTACCGTTGACACTGGGGCTGCTTTGCT GCGCACCGAGGGCGAATGCA	
79	エンベロープ, エボラ。	ATGGGTGTTACAGGAATATTGCAGTTACCTCGTGAT CGATTCAAGAGGACATCATTCTTTCTTTGGGTAATT ATCCTTTTCCAAAGAACATTTTCCATCCCACTTGGGA GTCATCCACAATAGCACATTACAGGTTAGTGATGTC GACAAACTGGTTTGCCGTGACAACTGTCATCCACA AATCAATTGAGATCAGTTGGACTGAATCTCGAAGG GAATGGAGTGGCAACTGACGTGCCATCTGCAACTA AAAGATGGGGCTTCAGGTCCGGTGTCCACC AAAG GTGGTCAATTATGAAGCTGGTGAATGGGGCTGAAAA CTGCTACAATCTTGAAATCAAAAAACCTGACGGGA GTGAGTGTCTACCAGCAGCGCCAGACGGGATTCGG GGCTTCCCCCGGTGCCGGTATGTGCACAAAGTATCA GGAACGGGACCGTGTGCCGGAGACTTTGCCTTCCAC AAAGAGGGTGCTTTCTTCTGTATGACCGACTTGCT TCCACAGTTATCTACCGAGGAACGACTTTCGCTGAA GGTGTGCTTGCATTTCTGATACTGCCCAAGCTAAG AAGGACTTCTTCAGCTCACACCCCTTGAGAGAGCCG GTCAATGCAACGGAGGACCCGTCTAGTGGCTACTAT TCTACCACAATTAGATATCAAGCTACCGGTTTTGGA ACCAATGAGACAGAGTATTTGTTTCGAGGTTGACAAT TTGACCTACGTCCAACCTGAATCAAGATTCACACCA CAGTTTCTGCTCCAGCTGAATGAGACAATATATACA AGTGGGAAAAGGAGCAATACCACGGGAAA ACTAAT TTGGAAGGTCAACCCCGAAATTGATACAACAATCG GGGAGTGGGCCTTCTGGGAAACTAAAAAACCTCA CTAGAAAAATTCGCAGTGAAGAGTTGTCTTTCACAG CTGTATCAAACAGAGCCAAAAACATCAGTGGTCAG	10          20          30          40

【表 5 - 4 2】

		AGTCCGGCGCGAACTTCTTCCGACCCAGGGACCAAC ACAACA ACTGAAGACCACAAAATCATGGCTTCAGA AAATTCCTCTGCAATGGTTCAAGTGCACAGTCAAGG AAGGGAAGCTGCAGTGTGCGATCTGACAACCCTTGC CACAATCTCCACGAGTCCTCAACCCCCACAACCAA ACCAGGTCCGGACAACAGCACCCACAATACACCCG TGTATAAACTTGACATCTCTGAGGCAACTCAAGTTG AACAACATCACCGCAGAACAGACAACGACAGCACA GCCTCCGACACTCCCCCGCCACGACCGCAGCCGGA CCCCTAAAAGCAGAGAACACCAACACGAGCAAGGG TACCGACCTCTGGACCCCGCCACCACAACAAGTCC CCAAAACCACAGCGAGACCGCTGGCAACAACAACA CTCATCACCAAGATACCGGAGAAGAGAGTGCCAGC AGCGGGAAGCTAGGCTTAATTACCAATACTATTGCT GGAGTCGCAGGACTGATCACAGGCGGGAGGAGAGC TCGAAGAGAAGCAATTGTCAATGCTCAACCCAAAT GCAACCCTAATTTACATTACTGGACTACTCAGGATG AAGGTGCTGCAATCGGACTGGCCTGGATACCATATT TCGGGCCAGCAGCCGAGGGAATTTACATAGAGGGG CTGATGCACAATCAAGATGGTTTAATCTGTGGGTTG AGACAGCTGGCCAACGAGACGACTCAAGCTCTTCA ACTGTTCTGAGAGCCACAACCGAGCTACGCACCTT TTCAATCCTCAACCGTAAGGCAATTGATTTCTTGCT GCAGCGATGGGGCGGCACATGCCACATTTTGGGAC CGGACTGCTGTATCGAACCACATGATTGGACCAAG AACATAACAGACAAAATTGATCAGATTATTCATGAT TTTGTTGATAAAACCCTTCCGGACCAGGGGGACAAT GACAATTGGTGGACAGGATGGAGACAATGGATACC GGCAGGTATTGGAGTTACAGGCGTTATAATTGCAGT TATCGCTTTATTCTGTATATGCAAATTTGTCTTTTAG	10 20 30
80	短鎖WPRE配列	AATCAACCTCTGGATTACAAAATTTGTGAAAGATTG ACTGATATTCTTAACTATGTTGCTCCTTTTACGCTGT	40

【表 5 - 4 3】

		GTGGATATGCTGCTTTAATGCCTCTGTATCATGCTAT TGCTTCCCGTACGGCTTTCGTTTTCTCCTCCTTGAT AAATCCTGGTTGCTGTCTCTTTATGAGGAGTTGTGG CCCGTTGTCCGTC AACGTGGCGTGGTGTGCTCTGTG TTTGCTGACGCAACCCCACTGGCTGGGGCATTGCC ACCACCTGTCAACTCCTTCTGGGACTTTCGCTTTCC CCCTCCCGATCGCCACGGCAGAACTCATCGCCGCCT GCCTTGCCCCGCTGCTGGACAGGGGCTAGGTTGCTGG GCACTGATAATTCCGTGGTGTGTC	10
81	プライマー	TAAGCAGAATTC ATGAATTTGCCAGGAAGAT	
82	プライマー	CCATACAATGAATGGACACTAGGCGGCCGCACGAA T	
83	Gag, Pol, インテグラーゼ 断片	GAATTCATGAATTTGCCAGGAAGATGGAAACCAAA AATGATAGGGGGAATTGGAGTTTTATCAAAGTAA GACAGTATGATCAGATACTCATAGAAATCTGCGGA CATAAAGCTATAGGTACAGTATTAGTAGGACCTACA CCTGTCAACATAATTGGAAGAAATCTGTTGACTCAG ATTGGCTGCACTTTAAATTTCCATTAGTCCTATTG AGACTGTACCAGTAAAATTAAGCCAGGAATGGAT GGCCCAAAAGTTAAACAATGGCCATTGACAGAAGA AAAAATAAAAGCATTAGTAGAAATTTGTACAGAAA TGGAAAAGGAAGGAAAAATTTCAAAAATTGGGCCT GAAAATCCATACAATACTCCAGTATTTGCCATAAAG AAAAAAGACAGTACTAAATGGAGAAAATTAGTAGA TTTCAGAGAACTTAATAAGAGAACTCAAGATTTCTG GGAAGTTCAATTAGGAATACCACATCCTGCAGGGTT AAAACAGAAAAATCAGTAACAGTACTGGATGTGG GCGATGCATATTTTTAGTTCCCTTAGATAAAGACT TCAGGAAGTATACTGCATTTACCATACCTAGTATAA ACAATGAGACACCAGGGATTAGATATCAGTACAAT GTGCTTCCACAGGGATGGAAAGGATCACCAGCAAT ATTCCAGTGTAGCATGACAAAAATCTTAGAGCCTTT	20 30 40

【表 5 - 4 4】

		<p>TAGAAAACAAAATCCAGACATAGTCATCTATCAAT  ACATGGATGATTTGTATGTAGGATCTGACTTAGAAA  TAGGGCAGCATAGAACAAAATAGAGGAACTGAGA  CAACATCTGTTGAGGTGGGGATTTACCACACCAGAC  AAAAAACATCAGAAAGAACCTCCATTCTTTGGATG  GGTTATGAACTCCATCCTGATAAATGGACAGTACAG  CCTATAGTGCTGCCAGAAAAGGACAGCTGGACTGT  CAATGACATACAGAAATTAGTGGGAAAATTGAATT  GGGCAAGTCAGATTTATGCAGGGATTAAGTAAGG  CAATTATGTAACTTCTTAGGGGAACCAAAGCACTA  ACAGAAGTAGTACCACTAACAGAAGAAGCAGAGCT  AGAACTGGCAGAAAACAGGGAGATTCTAAAAGAAC  CGGTACATGGAGTGTATTATGACCCATCAAAGACT  TAATAGCAGAAATACAGAAGCAGGGGCAAGGCCAA  TGGACATATCAAATTTATCAAGAGCCATTTAAAAAT  CTGAAAACAGGAAAGTATGCAAGAATGAAGGGTGC  CCACACTAATGATGTGAAACAATTAACAGAGGCAG  TACAAAAAATAGCCACAGAAAGCATAGTAATATGG  GGAAAGACTCCTAAATTTAAATTACCCATACAAAA  GGAAACATGGGAAGCATGGTGGACAGAGTATTGGC  AAGCCACCTGGATTCTGAGTGGGAGTTTGTCAATA  CCCCTCCCTTAGTGAAGTTATGGTACCAGTTAGAGA  AAGAACCCATAATAGGAGCAGAACTTTCTATGTA  GATGGGGCAGCCAATAGGGAACTAAATTAGGAAA  AGCAGGATATGTAAGTACAGAGGAAGACAAAAAG  TTGTCCCCTAACGGACACAACAAATCAGAAGACT  GAGTTACAAGCAATTCATCTAGCTTTGCAGGATTCG  GGATTAGAAGTAAACATAGTGACAGACTCACATA  TGCATTGGGAATCATTCAAGCACAACCAGATAAGA  GTGAATCAGAGTTAGTCAGTCAAATAATAGAGCAG  TTAATAAAAAAGGAAAAAGTCTACCTGGCATGGGT  ACCAGCACACAAAGGAATTGGAGGAAATGAACAAG</p>
--	--	--

10

20

30

40



【表 5 - 4 6】

		<p>GCCTGTGCCTCTTCAGCTACCACCGCTTGAGAGACT  TACTCTTGATTGTAACGAGGATTGTGGAACCTTCTGG  GACGCAGGGGGTGGGAAGCCCTCAAATATTGGTGG  AATCTCCTACAATATTGGAGTCAGGAGCTAAAGAAT  AGAGGAGCTTTGTTCTTGGGTTCTTGGGAGCAGCA  GGAAGCACTATGGGCGCAGCGTCAATGACGCTGAC  GGTACAGGCCAGACAATTATTGTCTGGTATAGTGCA  GCAGCAGAACAATTTGCTGAGGGCTATTGAGGCGC  AACAGCATCTGTTGCAACTCACAGTCTGGGGCATCA  AGCAGCTCCAGGCAAGAATCCTGGCTGTGGAAAGA  TACCTAAAGGATCAACAGCTCCTAGATCTTTTTCCC  TCTGCCAAAAATTATGGGGACATCATGAAGCCCCTT  GAGCATCTGACTTCTGGCTAATAAAGGAAATTTATT  TTCATTGCAATAGTGTGTTGGAATTTTTTGTGTCTCT  CACTCGGAAGGACATATGGGAGGGCAAATCATTTA  AAACATCAGAATGAGTATTTGGTTTAGAGTTTGGCA  ACATATGCCATATGCTGGCTGCCATGAACAAAGGTG  GCTATAAAGAGGTCATCAGTATATGAAACAGCCCC  CTGCTGTCCATTCCCTTATTCCATAGAAAAGCCTTGA  CTTGAGGTTAGATTTTTTTTATATTTTGTTTGTGTT  ATTTTTTCTTTAACATCCCTAAAATTTTCCTTACAT  GTTTTACTAGCCAGATTTTTCCTCCTCCTGACTAC  TCCCAGTCATAGCTGTCCCTCTTCTCTTATGAAGATC  CCTCGACCTGCAGCCCAAGCTTGGCGTAATCATGGT  CATAGCTGTTTCCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCAC  AATTCCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGT  GTAAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTC  ACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCCGCTTTCCAG  TCGGGAAACCTGTCTGTGCCAGCGGATCCGCATCTCA  ATTAGTCAGCAACCATAGTCCC GCCCCTAACTCCGC  CCATCCCGCCCCCTAACTCCGCCAGTTCCGCCATT  CTCCGCCCATGGCTGACTAATTTTTTTTATTTATGC</p>
--	--	--

10

20

30

40

【表 5 - 4 7】

		AGAGGCCGAGGCCGCCTCGGCCTCTGAGCTATTCCA GAAGTAGTGAGGAGGCTTTTTGGAGGCCTAGGCTT TTGCAAAAAGCTAACTTGTTTATTGCAGCTTATAAT GGTTACAAATAAAGCAATAGCATCACAAATTCAC AAATAAAGCATTTTTTTCACTGCATTCTAGTTGTGGT TTGTCCAAACTCATCAATGTATCTTATCAGCGGCCG CCCCGGG
85	GAGエンハンサー/プ ロモーター/イントロン 配列を含有するDNA 断片	ACGCGTTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTGC ATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCGCGGTTAC ATAACTTACGGTAAATGGCCCCGCCTGGCTGACCGCC CAACGACCCCCGCCATTGACGTCAATAATGACGTA TGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTG ACGTCAATGGGTGGACTATTTACGGTAACTGCCCA CTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTAC GCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCCG CTGGCATTATGCCCAGTACATGACCTTATGGGACTT TCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGC TATTACCATGGGTGCGAGGTGAGCCCCACGTTCTGCT TCACTCTCCCCATCTCCCCCCCCTCCCCACCCCAAT TTTGTATTTATTTATTTTTTAATTATTTTGTGCAGCG ATGGGGGCGGGGGGGGGGGGGGGCGCGGCCAGGC GGGGCGGGGCGGGGCGAGGGGCGGGGCGGGGCGA GGCGGAGAGGTGCGGCGGCAGCCAATCAGAGCGGC GCGCTCCGAAAGTTTCTTTTATGGCGAGGCGGGCGG CGGCGGCGGCCCTATAAAAAGCGAAGCGCGGGCG GGCGGGAGTCGCTGCGTTGCCTTCGCCCCGTGCCCC GCTCCGCGCCGCCTCGCGCCGCCCGCCCCGGCTCTG ACTGACCGCGTTACTCCCACAGGTGAGCGGGCGGG ACGGCCCTTCTCCTCCGGGCTGTAATTAGCGCTTGG TTTAATGACGGCTCGTTTCTTTTCTGTGGCTGCGTGA AAGCCTTAAAGGGCTCCGGGAGGGCCCTTTGTGCG GGGGGGAGCGGCTCGGGGGGTGCGTGCGTGTGTGT

10

20

30

40



【表 5 - 4 9】

		<p>GTGGATATGCAACTGTGACGGATGCCGAAGCAGTG  ATTGTCCAGGTGACTCCTCACCATGTGCTGGTTGAT  GAATACACAGGAGAATGGGTTGATTCACAGTTCATC  AACGGAAAATGCAGCAATTACATATGCCCCACTGTC  CATAACTCTACAACCTGGCATTCTGACTATAAGGTC  AAAGGGCTATGTGATTCTAACCTCATTTCATGGAC  ATCACCTTCTTCTCAGAGGACGGAGAGCTATCATCC  CTGGGAAAGGAGGGCACAGGGTTCAGAAGTAACTA  CTTTGCTTATGAAACTGGAGGCAAGGCCTGCAAAT  GCAATACTGCAAGCATTGGGGAGTCAGACTCCCATC  AGGTGTCTGGTTCGAGATGGCTGATAAGGATCTCTT  TGCTGCAGCCAGATTCCCTGAATGCCCAGAAGGGTC  AAGTATCTCTGCTCCATCTCAGACCTCAGTGGATGT  AAGTCTAATTCAGGACGTTGAGAGGATCTTGGATTA  TCCCTCTGCCAAGAAACCTGGAGCAAATCAGAG  CGGGTCTTCCAATCTCTCCAGTGGATCTCAGCTATC  TTGCTCCTAAAAACCCAGGAACCGGTCCTGCTTCA  CCATAATCAATGGTACCCTAAAATACTTTGAGACCA  GATACATCAGAGTCGATATTGCTGCTCCAATCCTCT  CAAGAATGGTCGGAATGATCAGTGGAACTACCACA  GAAAGGGAAGTGTGGGATGACTGGGCACCATATGA  AGACGTGGAAATTGGACCCAATGGAGTTCTGAGGA  CCAGTTCAGGATATAAGTTTCTTTATACATGATTG  GACATGGTATGTTGGACTCCGATCTTCATCTTAGCT  CAAAGGCTCAGGTGTTTGAACATCCTCACATTC AAG  ACGCTGCTTCGCAACTTCCTGATGATGAGAGTTTAT  TTTTTGGTGATACTGGGCTATCCAAAAATCCAATCG  AGCTTG TAGAAGGTTGGTTCAGTAGTTGGAAAAGCT  CTATTGCCCTTTTTTCTTTATCATAGGGTTAATCAT  TGGACTATTCTTGGTTCTCCGAGTTGGTATCCATCTT  TGCATTA AATTAAGCACACCAAGAAAAGACAGAT  TTATACAGACATAGAGATGAGAATTC</p>
--	--	---

10

20

30

40



【表 5 - 5 1】

		TTTCACAAATAAAGCATTTTTTTCACTGCATTCTAGT TGTGGTTTGTCCAAACTCATCAATGTATCTTATCACC CGGG
88	RSVプロモーター およびHIV Rev	CAATTGCGATGTACGGGCCAGATATACGCGTATCTG AGGGGACTAGGGTGTGTTTAGGGCGAAAAGCGGGGC TTCGGTTGTACGCGGTTAGGAGTCCCCTCAGGATAT AGTAGTTTCGCTTTTGCATAGGGAGGGGGAAATGTA GTCTTATGCAATACACTTGTAGTCTTGCAACATGGT AACGATGAGTTAGCAACATGCCTTACAAGGAGAGA AAAAGCACCGTGCATGCCGATTGGTGGAAGTAAGG TGGTACGATCGTGCCTTATTAGGAAGGCAACAGAC AGGTCTGACATGGATTGGACGAACCACTGAATTCCG CATTGCAGAGATAATTGTATTTAAGTGCCTAGCTCG ATACAATAAACGCCATTTGACCATTACCACATTGG TGTGCACCTCCAAGCTCGAGCTCGTTTGTGAACCG TCAGATCGCCTGGAGACGCCATCCACGCTGTTTTGA CCTCCATAGAAGACACCGGGACCGATCCAGCCTCCC CTCGAAGCTAGCGATTAGGCATCTCCTATGGCAGGA AGAAGCGGAGACAGCGACGAAGAACTCCTCAAGGC AGTCAGACTCATCAAGTTTCTCTATCAAAGCAACCC ACCTCCAATCCCGAGGGGACCCGACAGGCCCGAA GGAATAGAAGAAGAAGGTGGAGAGAGAGACAGAG ACAGATCCATTTCGATTAGTGAACGGATCCTTAGCAC TTATCTGGGACGATCTGCGGAGCCTGTGCCTCTTCA GCTACCACCGCTTGAGAGACTTACTCTTGATTGTAA CGAGGATTGTGGAACCTTCTGGGACGCAGGGGGTGG GAAGCCCTCAAATATTGGTGGAATCTCCTACAATAT TGGAGTCAGGAGCTAAAGAATAGTCTAGA
89	標的配列	ATGGCAGGAAGAAGCGGAG
90	shRNA配列	ATGGCAGGAAGAAGCGGAGTTCAAGAGACTCCGCT TCTTCCTGCCATTTTTT
91	H1プロモーター	GAACGCTGACGTCATCAACCCGCTCCAAGGAATCG

10

20

30

40

【表 5 - 5 2】

	およびshRT配列	CGGGCCCAGTGTCCTAGGCGGGAACACCCAGCGC GCGTGCGCCCTGGCAGGAAGATGGCTGTGAGGGAC AGGGGAGTGGCGCCCTGCAATATTTGCATGTCGCTA TGTGTTCTGGGAAATCACCATAAACGTGAAATGTCT TTGGATTTGGGAATCTTATAAGTTCTGTATGAGACC ACTTGGATCCGCGGAGACAGCGACGAAGAGCTTCA AGAGAGCTCTTCGTCGCTGTCTCCGCTTTTT	10
92	H1 CCR5 配列	GAACGCTGACGTCATCAACCCGCTCCAAGGAATCG CGGGCCCAGTGTCCTAGGCGGGAACACCCAGCGC GCGTGCGCCCTGGCAGGAAGATGGCTGTGAGGGAC AGGGGAGTGGCGCCCTGCAATATTTGCATGTCGCTA TGTGTTCTGGGAAATCACCATAAACGTGAAATGTCT TTGGATTTGGGAATCTTATAAGTTCTGTATGAGACC ACTTGGATCCGTGTCAAGTCCAATCTATGTTCAAGA GACATAGATTGGACTTGACACTTTTT	20
93	プライマー	AGGAATTGATGGCGAGAAGG	
94	プライマー	CCCCAAGAAGGTCAAGGTAATCA	
95	プライマー	AGCGCGGCTACAGCTTCA	
96	プライマー	GGCGACGTAGCACAGCTTCP	
97	AGT103 CCR5 miR30	TGTAAACTGAGCTTGCTCTA	
98	AGT103-R5-1	TGTAAACTGAGCTTGCTCGC	
99	AGT103-R5-2	CATAGATTGGACTTGACAC	30
100	CAG プロモーター	TAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGT TCATAGCCCATATATGGAGTTCCGCGTTACATAACT TACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACG ACCCCGCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTT CCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTC AATGGGTGGACTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGG CAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCC CTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGC ATTATGCCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTTCTTA	40

【表 5 - 5 3】

		CTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTA CCATGGGTTCGAGGTGAGCCCCACGTTCTGCTTCACT CTCCCCATCTCCCCCCCCCTCCCCACCCCCAATTTTGT ATTTATTTATTTTTTAATTATTTTGTGTCAGCGATGGG GGCGGGGGGGGGGGGGGGCGCGCGCCAGGCGGGGC GGGGCGGGGCGAGGGGCGGGGCGGGGCGAGGCGG AGAGGTGCGGCGGCAGCCAATCAGAGCGGCGCGCT CCGAAAGTTTCCTTTTATGGCGAGGCGGCGGGCGG GCGGCCCTATAAAAAGCGAAGCGCGGGCGGGCG	10
101	H1 エlement	GAACGCTGACGTCATCAACCCGCTCCAAGGAATCG CGGGCCCAGTGTCAGTACTAGGCGGGAACACCCAGCGC GCGTGCGCCCTGGCAGGAAGATGGCTGTGAGGGAC AGGGGAGTGGCGCCCTGCAATATTTGCATGTCGCTA TGTGTTCTGGGAAATCACCATAAACGTGAAATGTCT TTGGATTTGGGAATCTTATAAGTTCTGTATGAGACC ACTT	20
102	3' LTR	TGGAAGGGCTAATTCACCTCCCAACGAAGATAAGAT CTGCTTTTTGCTTGTACTGGGTCTCTCTGGTTAGACC AGATCTGAGCCTGGGAGCTCTCTGGCTAACTAGGGA ACCCACTGCTTAAGCCTCAATAAAGCTTGCCTTGAG TGCTTCAAGTAGTGTGTGCCCCGCTGTGTTGTGTGACT CTGGTAACTAGAGATCCCTCAGACCCTTTTAGTCAG TGTGGAAAATCTCTAGCAGTAGTAGTTCATGTCA	30
103	7SK プロモーター	CTGCAGTATTTAGCATGCCCCACCCATCTGCAAGGC ATTCTGGATAGTGTCAAACAGCCGGAAATCAAGT CCGTTTATCTCAAACCTTAGCATTTTGGGAATAAAT GATATTTGCTATGCTGGTTAAATTAGATTTTAGTTA AATTTCTGCTGAAGCTCTAGTACGATAAGCAACTT GACCTAAGTGTAAGTTGAGATTTCTTCAGGTTTA TATAGCTTGTGCGCCGCTGGCTACCTC	
104	miR155 Tat	CTGGAGGCTTGGCTGAAGGCTGTATGCTGTCCGCTTC TTCCTGCCATAGGGTTTTGGCCACTGACTGACCCTA	40

【表 5 - 5 4】

		TGGGAAGAAGCGGACAGGACACAAGGCCTGTTAC TAGCACTCACATGGAACAAATGGCC	
105	伸長因子-1アルファ (EF1アルファ) プロモーター	CCGGTGCCTAGAGAAGGTGGCGCGGGGTAAAC TGGGAAAGTGATGTCGTGTACTGGCTCCGCCT TTTTCCCGAGGGTGGGGGAGAACCGTATATAA GTGCAGTAGTCGCCGTGAACGTTCTTTTTTCGC AACGGGTTTGCCGCCAGAACACAGGTAAGTGC CGTGTGTGGTCCCGCGGGCCTGGCCTCTTTA CGGGTTATGGCCCTTGCCTGAATTACT TCCACGCCCTGGCTGCAGTACGTGATTCTTG ATCCCGAGCTTCGGGTGGAAGTGGGTGGGAG AGTTCGAGGCCTTGCCTTAAGGAGCCCCTTC GCCTCGTGCTTGAGTTGAGGCCTGGCCTGGGC GCTGGGGCCCGCGCTGCGAATCTGGTGGCAC CTTCGCGCCTGTCTCGCTGCTTTTCGATAAGTCT CTAGCCATTTAAAATTTTGTATGACCTGCTGC GACGCTTTTTTCTGGCAAGATAGTCTTGTA ATGCGGGCCAAGATCTGCACACTGGTATTTTCG GTTTTTGGGGCCCGGGCGGGACGGGGCCCC TGCGTCCAGCGCACATGTTTCGCGAGGCGGG GCCTGCGAGCGCGGCCACCGAGAATCGGACGG GGTAGTCTCAAGCTGGCCGGCCTGCTCTGGT GCCTGGCCTCGCGCCGCGGTATCGCCCCGC CCTGGGCGGCAAGGCTGGCCCGGTCCGGACCA GTTGCGTGAGCGGAAAGATGGCCGCTTCCCGG CCCTGCTGCAGGGAGCTCAAAATGGAGGACGC GGCGCTCGGGAGAGCGGGCGGGTGAGTACCC ACACAAAGGAAAAGGGCCTTTCGTCCTCAGC CGTCGCTTCATGTGACTCCACGGAGTACCGGG CGCCGTCCAGGCACCTCGATTAGTTCTCGAGC TTTTGGAGTACGTCTTTAGGTTGGGGGGA GGGTTTTATGCGATGGAGTTCCCCACACTGAGTG GGTGGAGACTGAAGTTAGGCCAGCTTGGCACTTGAT GTAATTCTCCTTGAATTTGCCCTTTTTGAGTTTGA TCTTGTTCAATTCTCAAGCCTCAGACAGTGGTTCAA AGTTTTTTCTTCCATTTCAAGGTGTCGTGATGTACA	10 20 30
106	5'制限認識部位 を含む miR21 Vif コード化配列	CCCGGCATCTCCATGGCTGTACCACCTTGTCCGGG GATGTGTAATTCTGAACTGTGTTGAATCTCATGGA GTTCAGAAGAACACATCCGCACTGACATTTTGGTAT CTTTCATCTGACCA	
107	5'制限認識部位 を含む miR185 Tat コード化配列	GCTAGCGGGCCTGGCTCGAGCAGGGGGCGAGGGAT TCCGCTTCTTCTGCCATAGCGTGGTCCCTCCCCTA TGGCAGGCAGAAGCGGCACCTTCCCTCCCAATGACC GCGTCTTCGTC	40
108	miR185 Tat コード化配列	GGCCTGGCTCGAGCAGGGGGCGAGGGATTCCGCT TCTTCTGCCATAGCGTGGTCCCTCCCCTATGGCA GGCAGAAGCGGCACCTTCCCTCCCAATGACCGCGTC TTCGTC	

以上、本発明の好ましい実施形態のうちのいくつかを記載し、具体的に例示したが、本発明がこのような実施形態に限定されることは意図していない。本発明の範囲および趣旨から逸脱することなく、これに様々な改変を行ってよい。

本発明の実施形態の例として、以下の項目が挙げられる。

(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 ) e x v i v oで行われる、H I Vに感染した被験体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剤と接触させるステップと、

( b ) 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系を前記P B M C に e x v i v oで形質導入するステップであって、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低分子R N A、またはH I V R N A配列をターゲティングすることができる少なくとも1つの低分子R N Aを含む、ステップと、

( c ) 少なくとも1日間にわたって、形質導入された前記P B M Cを培養するステップとを含む、方法。

(項目2)

形質導入された前記P B M Cを被験体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3)

前記被験体がヒトである、項目2に記載の方法。

(項目4)

前記刺激剤がペプチドを含む、項目1に記載の方法。

(項目5)

前記ペプチドがg a gペプチドを含む、項目4に記載の方法。

(項目6)

前記刺激剤がワクチンを含む、項目1に記載の方法。

(項目7)

前記ワクチンがH I Vワクチンを含む、項目6に記載の方法。

(項目8)

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7に記載の方法。

(項目9)

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低分子R N Aと、H I V R N A配列をターゲティングすることができる少なくとも1つの低分子R N Aとを含む、項目1に記載の方法。

(項目10)

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1または9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、マイクロR N Aまたはs h R N Aを含む、項目1または9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、マイクロR N Aクラスターを含む、項目11に記載の方法。

(項目13)

前記少なくとも1つの遺伝子エレメントが、

A G G T A T A T T G C T G T T G A C A G T G A G C G A C T G T A A A C T G A G C T T G C T C T A C T G T G A A G C C A C A G A T G G G T A G A G C A A G C A C A G T T A C C G C T G C C T A C T G C C T C G G A C T T C A A G G G G C T T (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%のパーセント同一性を有するマイクロRNAを含む、項目11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、

AGGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCGACTGTAAACTGAGC  
TTGCTCTACTGTGAAGCCACAGATGGGTAGAGCAAGCAC  
GTTTACCGCTGCCTACTGCCTCGGACTTCAAGGGGCTT (配

列番号1)

を含む、項目11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、

a. CATCTCCATGGCTGTACCCACCTTGTCTGGGGGATGTGTA  
CTTCTGAACCTTGTGTTGAATCTCATGGAGTTCAGAAAGAAC  
ACATCCGCACTGACATTTTGGTATCTTTTCATCTGACCA (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%のパーセント同一性、または

b. GGGCCTGGCTCGAGCAGGGGGCGAGGGATTCCGCTTCT  
TCCTGCCATAGCGTGGTCCCCTCCCCTATGGCAGGCAGAA  
GCGGCACCTTCCCTCCCAATGACC GCGTCTTCGTCG (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%のパーセント同一性を有するマイクロRNAを含む、項目11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、

a. CATCTCCATGGCTGTACCCACCTTGTCTGGGGGATGTGTA  
CTTCTGAACCTTGTGTTGAATCTCATGGAGTTCAGAAAGAAC  
ACATCCGCACTGACATTTTGGTATCTTTTCATCTGACCA (配

列番号2) ; または

b. GGGCCTGGCTCGAGCAGGGGGCGAGGGATTCCGCTTCT  
TCCTGCCATAGCGTGGTCCCCTCCCCTATGGCAGGCAGAA  
GCGGCACCTTCCCTCCCAATGACC GCGTCTTCGTCG (配列番

号3)

を含む、項目14に記載の方法。

(項目17)

前記マイクロRNAクラスターが、

AGGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCGACTGTAAACTGAGC  
TTGCTCTACTGTGAAGCCACAGATGGGTAGAGCAAGCAC  
GTTTACCGCTGCCTACTGCCTCGGACTTCAAGGGGCTTCC

CGGGCATCTCCATGGCTGTACCCACCTTGTCTGGGGGATGTG  
TACTTCTGAACCTTGTGTTGAATCTCATGGAGTTCAGAAAG  
ACACATCCGCACTGACATTTTGGTATCTTTTCATCTGACCA

GCTAGCGGGCCTGGCTCGAGCAGGGGGCGAGGGATTCCGC  
TTCTTCCCTGCCATAGCGTGGTCCCCTCCCCTATGGCAGGC  
AGAAAGCGGCACCTTCCCTCCCAATGACC GCGTCTTCGTC (

配列番号31)

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%のパーセント同一性を有する配列を含む、項目12に記載の方法。

(項目18)

10

20

30

40

50

前記マイクロRNAクラスターが、

A G G T A T A T T G C T G T T G A C A G T G A G C G A C T G T A A A C T G A G C  
T T G C T C T A C T G T G A A G C C A C A G A T G G G T A G A G C A A G C A C A  
G T T T A C C G C T G C C T A C T G C C T C G G A C T T C A A G G G G C T T C C  
C G G G C A T C T C C A T G G C T G T A C C A C C T T G T C G G G G G A T G T G  
T A C T T C T G A A C T T G T G T T G A A T C T C A T G G A G T T C A G A A G A  
A C A C A T C C G C A C T G A C A T T T T G G T A T C T T T C A T C T G A C C A  
G C T A G C G G G C C T G G C T C G A G C A G G G G G C G A G G G A T T C C G C  
T T C T T C C T G C C A T A G C G T G G T C C C C T C C C C T A T G G C A G G C  
A G A A G C G G C A C C T T C C C T C C C A A T G A C C G C G T C T T C G T C (  
配列番号 3 1 )

10

を含む、項目 1 2 に記載の方法。

( 項目 1 9 )

被験体において HIV 感染を処置する方法であって、

( a ) 有効量の第 1 の刺激剤で前記被験体を免疫化するステップと、

( b ) 前記被験体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と、

( c ) 前記 P B M C を治療有効量の第 2 の刺激剤と e x v i v o で接触させるステップと、

( d ) 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系を前記 P B M C に e x v i v o で形質導入するステップと、

20

( e ) 少なくとも 1 日間にわたって、形質導入された前記 P B M C を培養するステップとを含む、方法。

( 項目 2 0 )

形質導入された前記 P B M C を前記被験体に注入するステップをさらに含む、項目 1 9 に記載の方法。

( 項目 2 1 )

前記第 1 の刺激剤および前記第 2 の刺激剤が同じである、項目 1 9 に記載の方法。

( 項目 2 2 )

前記第 1 の刺激剤および前記第 2 の刺激剤のうちの少なくとも 1 つが、H I V ワクチンを含む、項目 1 9 に記載の方法。

30

( 項目 2 3 )

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 2 に記載の方法。

( 項目 2 4 )

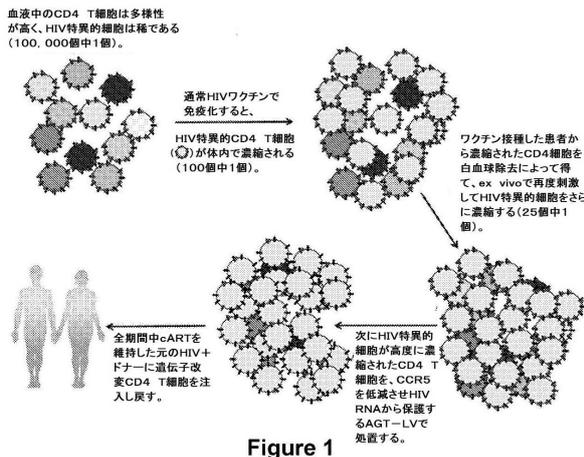
前記ウイルス送達系がレンチウイルス粒子を含む、項目 1 9 に記載の方法。

( 項目 2 5 )

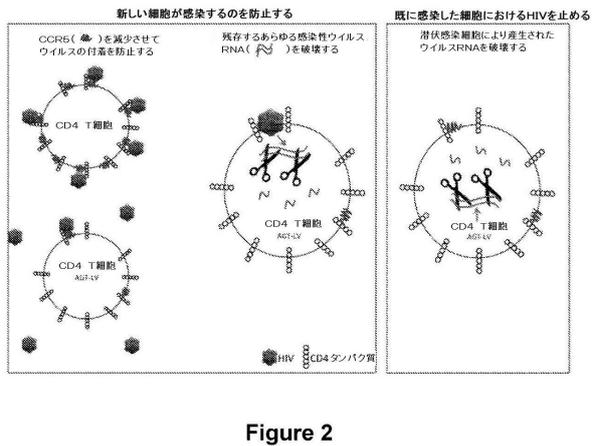
前記少なくとも 1 つの遺伝子エレメントが、ケモカイン受容体 C C R 5 の産生を阻害することができる低分子 RNA、または H I V RNA 配列をターゲティングすることができる少なくとも 1 つの低分子 RNA を含む、項目 1 9 に記載の方法。

40

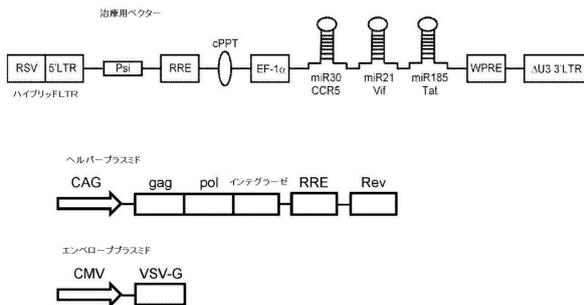
【図1】



【図2】



【図3】



【図4】

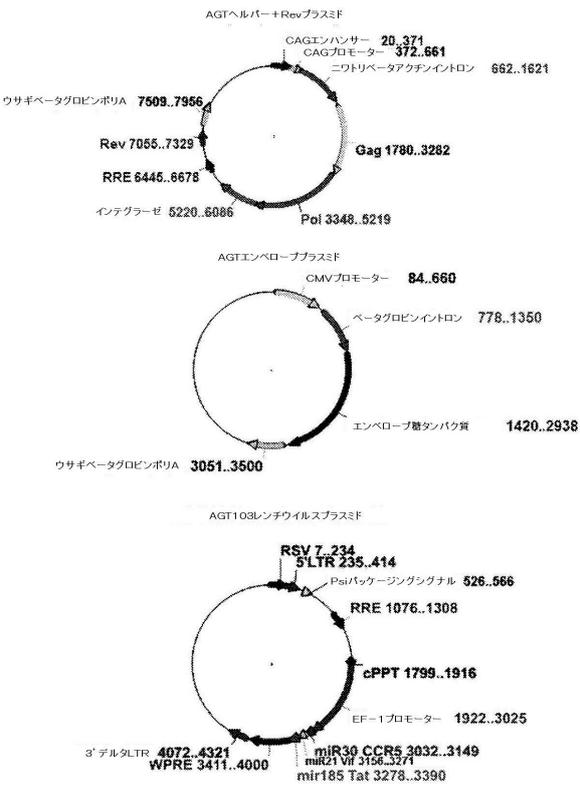


Figure 3

Figure 4

【 図 5 】

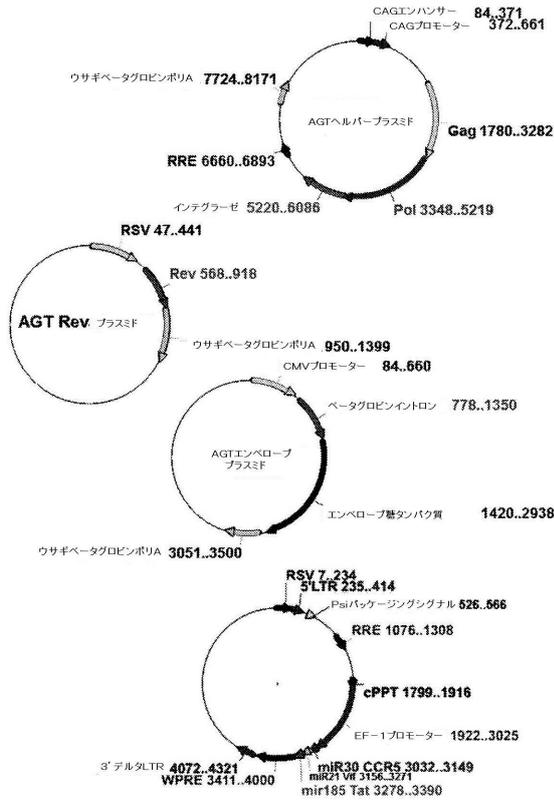


Figure 5

【 図 7 】

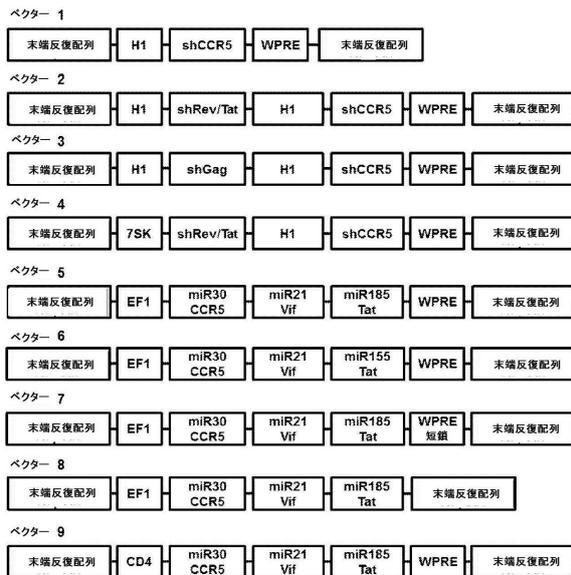


Figure 7

【 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)

```

CCGGTGCCTAGAGAAGTGGCGCGGGTAAACTGGGAAAGTATGTCGTACTGGTCCGCCCT
TTTCCCGAGGGTGGGGGAGAACCGTATATAAGTGCAGTAGTCGCCGTGAACGTTCTTTTCGCAA
CGGGTTTGCOCGCAGAACACAGGTAAGTCCCGTGGTGGTCCCGCGGGCCTGGCCCTTTACGG
GTTATGGCCCTTGCCTGCCTGAATTACTTCCACGCCCTGGCTGCAGTACGTGATCTTTGATCC
CGAGCTTCGGGTTGGAAGTGGGTGGGAGTTCGAGCCCTTGGCTTAAAGAGCCCTTCGCCTC
GTCTTTAGTTGAGGCTGGCCTGGCCCTGGCCCTGGCCCTGGCAATCTGGTGGCACTTCGC
GCCTGTCTCGCTGCTTCGATAAGTCTTAGCCATTTAAAAATTTTGTAGCACTGCTGCACGCCT
TTTTTCTGGCAAGATAGTCTTGTAAATCGGGCCAAGATCTGCACACTGGTATTTCCGTTTTTG
GGCCCGGGCCGCGACGGGCCCTGCGTCCAGCCACATGTCGGCCAGCCGGGGCTCGCA
GCGCCGCCACCGAGAATCGGACGGGGTGTCTCAAGCTGGCCGGCTGCTCTGTGCTGGCCT
CGCCCGCCGTATATCGCCCGCCCTGGGGCCAGGCTGGCCGGTGGCCACAGTTGCGTGTAG
CGAAAGATGGCCCTTCCCGCCCTGCTGCAGGGAGCTCAAAATGGAGACCGCGCTCGGGA
GAGCGGGCGGGTGTGTCACCCACAAAGAAAAGGCCCTTTCCGCTTCAGCCGTGCTTCAATG
TGACTCCAGGAGTACCGGGCCCGTCCAGGCACCTCGATTAGTTCGAGCTTTGGAGTACGT
CGTCTTTAGGTTGGGGGAGGGGTTTTATGCGATGGAGTTCCCCACACTGAGTGGGTGAGACT
GAAGTTAGGCAGCTTGGCACTTGTATTAATTCCTTGGAAATTTGCCCTTTTGTGTTGGATC
TTGGTTTCATTCAGCCCTCAGACAGTGGTCAAAGTTTTTTTCTCCATTCAGGTGTCGTGAT
GTACA

```

miR30 CCR5 (配列番号1)

```

AGCTATATTGCTGTGTACACTGAGCCACTGTAACTGAGCTTGCCTACTGTGAAGCCACAGATG
GGTAGAGCAAGCACAGTTTACCCTGCTACTGCCTCGGACTTCAAGGGGCTT

```

miR21 Vif (配列番号106)

```

CCCCGGGCTCCATGGCTGTACCACCTTGTGGGGGATGTGACTTCTGAACCTGTGTTGAATC
TCATGGAGTTCAGAGAACAACATCCGCACTGACATTTGGTATCTTTCTCATCTGACCA

```

miR185 Tat (配列番号107; 配列番号108(下線部分))

```

GCTAGGGGCTGGCTCGAGCAGGGGCGAGGGATTCCGCTTCTTCTCCGCAATAGCCGTGTCGCC
TCCCCTATGGCAGGCAGAAGCGGCACTTCCCTCCCAATGACCGGCTTCGCT

```

Figure 6

【 図 8 】

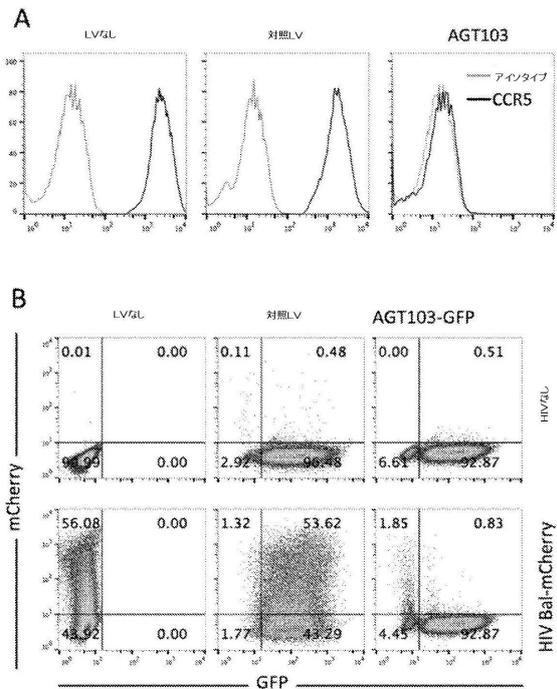
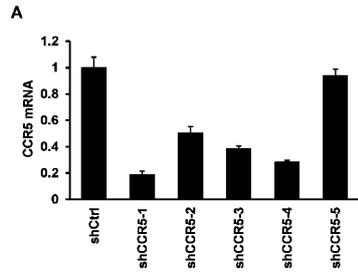
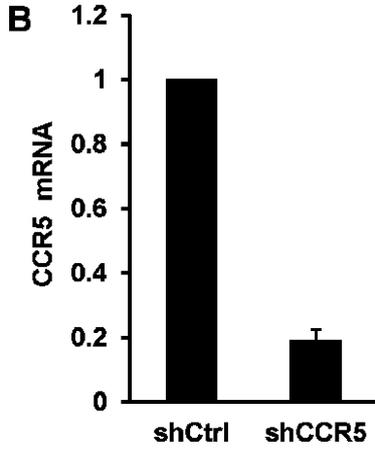


Figure 8

【 9 A 】



【 9 B 】



【 10 】

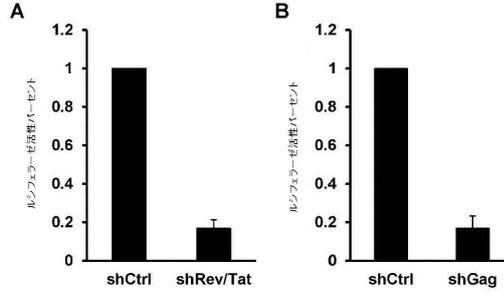
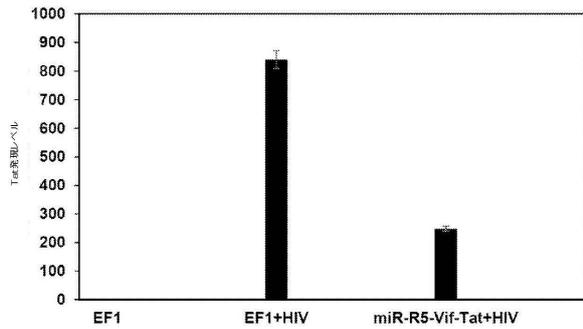


Figure 10

【 11 】



【 12 】

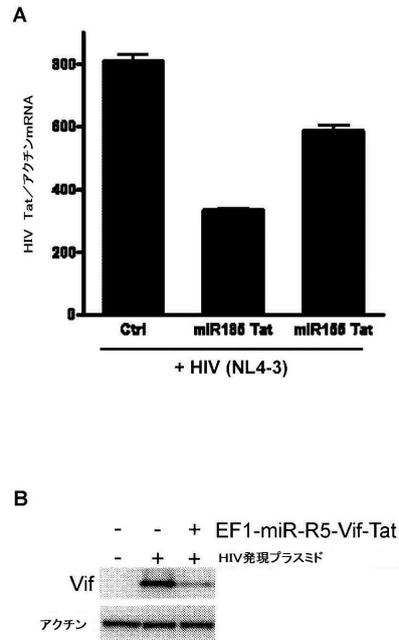


Figure 11

Figure 12

【 図 13 】

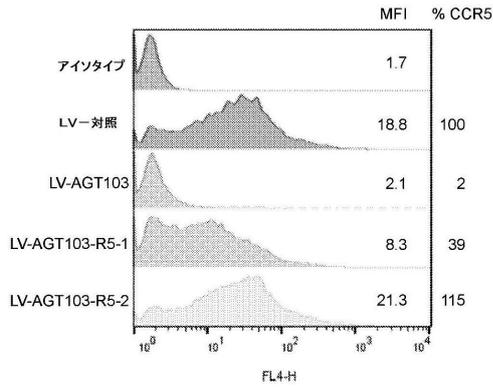


Figure 13

【 図 14 】

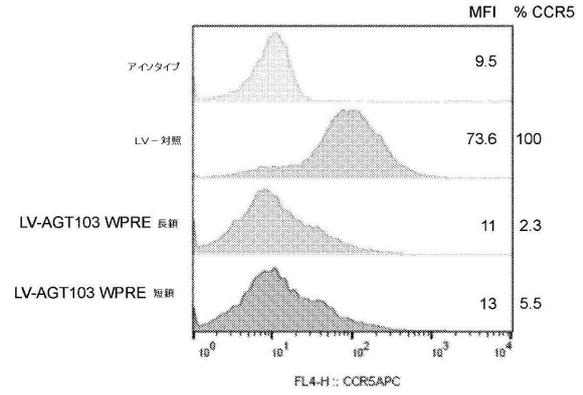


Figure 14

【 図 15 】

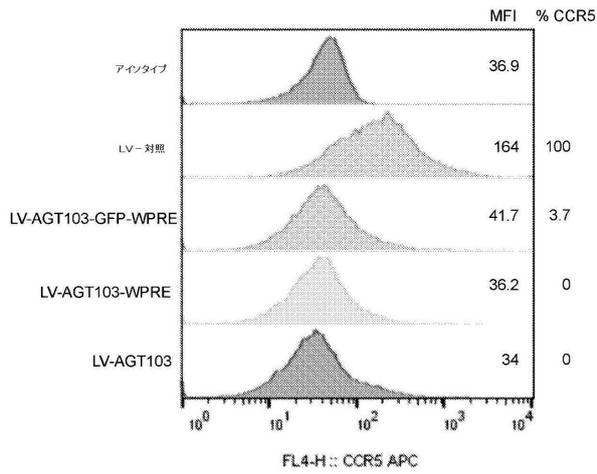


Figure 15

【 図 16 】

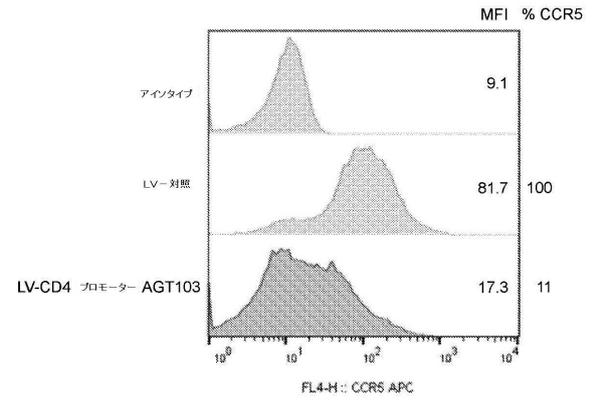


Figure 16

【 図 17 】

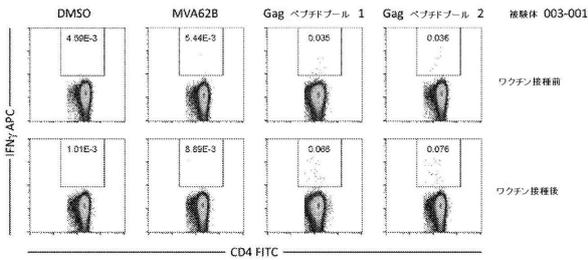


Figure 17

【 図 18 】

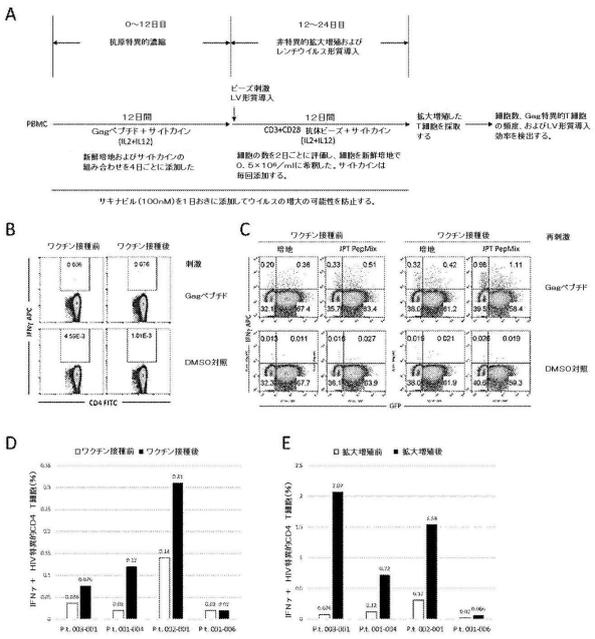


Figure 18

【 図 19 】

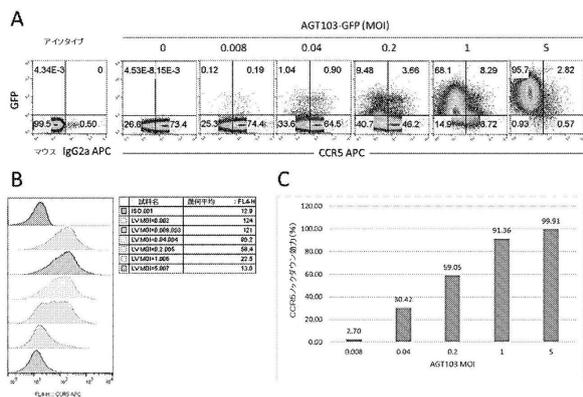


Figure 19

【 図 20 】

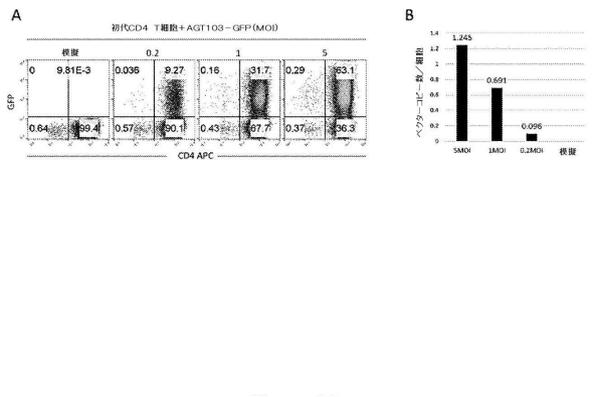


Figure 20

【 図 21 】

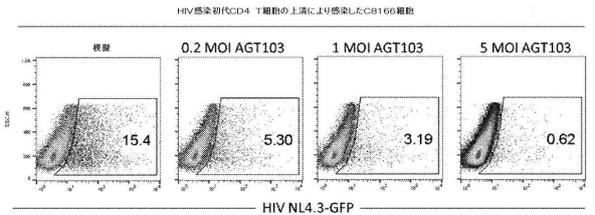


Figure 21

【 図 2 2 】

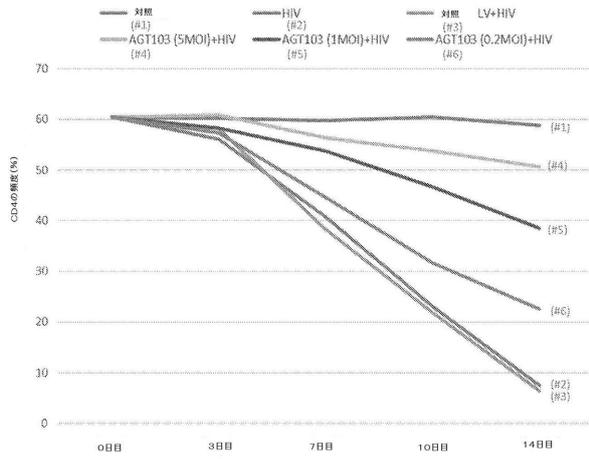


Figure 22

【 図 2 3 - 1 】

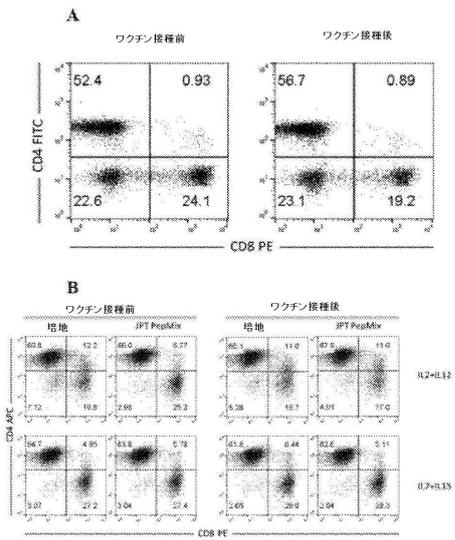


Figure 23

【 図 2 3 - 2 】

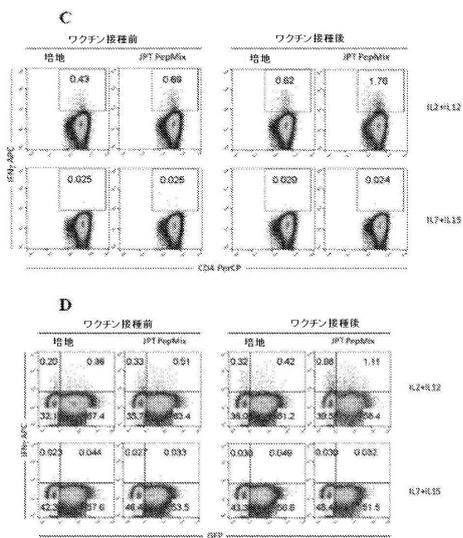


Figure 23 続き

**【配列表】**

0006971492000001.app

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
A 6 1 K	48/00 (2006.01)	A 6 1 K	48/00
A 6 1 P	31/18 (2006.01)	A 6 1 P	31/18 Z N A
A 6 1 P	37/04 (2006.01)	A 6 1 P	37/04
A 6 1 P	43/00 (2006.01)	A 6 1 P	43/00 1 1 1
C 1 2 N	5/0783 (2010.01)	C 1 2 N	5/0783
C 1 2 N	7/01 (2006.01)	C 1 2 N	7/01
C 1 2 N	15/867 (2006.01)	C 1 2 N	15/113 1 0 2 Z
C 1 2 N	5/0786 (2010.01)	C 1 2 N	15/867 Z
		C 1 2 N	5/0786

(31)優先権主張番号 62/360,185

(32)優先日 平成28年7月8日(2016.7.8)

(33)優先権主張国・地域又は機関  
米国(US)

## 早期審査対象出願

(74)代理人 230113332

弁護士 山本 健策

(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 20850, ロックビル, メディカル センター ドライブ  
9640, 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 気付

(72)発明者 リ, ハイシャン

アメリカ合衆国 メリーランド 20850, ロックビル, メディカル センター ドライブ  
9640, 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 気付

(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 20850, ロックビル, メディカル センター ドライブ  
9640, 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 気付

審査官 田中 晴絵

(56)参考文献 国際公開第2016/069518(WO, A2)

特表2013-507107(JP, A)

特表2011-517409(JP, A)

国際公開第2016/054654(WO, A1)

Molecular Therapy, vol.23,no.2, 2015年, p.310-320, Supplementary materials

Mol.Ther.Nucleic Acids, 2016年04月19日, vol.5,e312, p.1-12

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 1 2 N 15 / 0 0 - 15 / 9 0

C 1 2 N 5 / 0 7 8 6

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 ( J D r e a m I I I )

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