

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6890831号
(P6890831)

(45) 発行日 令和3年6月18日(2021.6.18)

(24) 登録日 令和3年5月28日(2021.5.28)

(51) Int.Cl.	F 1
A 61 K 35/17	(2015.01)
A 61 K 48/00	(2006.01)
A 61 K 31/675	(2006.01)
A 61 P 31/18	(2006.01)

A 61 K	35/17	A 61 K	35/17	Z N A
A 61 K	48/00	A 61 K	48/00	
A 61 K	31/675	A 61 K	31/675	
A 61 P	31/18	A 61 P	31/18	

請求項の数 16 (全 38 頁)

(21) 出願番号	特願2017-567175 (P2017-567175)
(86) (22) 出願日	平成28年7月8日(2016.7.8)
(65) 公表番号	特表2018-524335 (P2018-524335A)
(43) 公表日	平成30年8月30日(2018.8.30)
(86) 国際出願番号	PCT/US2016/041456
(87) 国際公開番号	W02017/007994
(87) 国際公開日	平成29年1月12日(2017.1.12)
審査請求日	令和1年7月5日(2019.7.5)
(31) 優先権主張番号	62/190,139
(32) 優先日	平成27年7月8日(2015.7.8)
(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 ウエスト 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】

HIV感染を治療する方法において使用するための、形質導入されたCD4 T細胞を含む組成物であって、前記方法が、

- (a) HIV感染の治療を必要とする対象を識別するステップ；
- (b) HIVワクチンの治療有効量で前記対象を免疫化するステップ；
- (c) 前記対象からリンパ球を取り出し、そしてCD4 T細胞を精製するステップ；
- (d) ex vivoにおいて、前記CD4 T細胞を治療有効量のHIVワクチンと接触させるステップ；
- (e) ex vivoにおいて、少なくとも1つの遺伝子エレメントをコードするウイルス送達システムを前記CD4 T細胞に形質導入するステップであって、前記遺伝子エレメントが、HIV RNA配列を標的とすることができるスマールRNAである、ステップ；
- (f) 前記形質導入されたCD4 T細胞を約1～約35日間培養するステップ；および
- (g) 前記形質導入されたCD4 T細胞を前記対象に注入するステップを含む、組成物。

【請求項 2】

ステップ(b)およびステップ(d)が同じHIVワクチンを含む、請求項1に記載の組成物。

【請求項 3】

ステップ(b)およびステップ(d)が異なるHIVワクチンを含む、請求項1に記載の組成物。

【請求項4】

前記形質導入されたCD4 T細胞を前記対象に注入する前に、前記対象がcARTまたはHARTを受けていた、請求項1に記載の組成物。

【請求項5】

前記形質導入されたCD4 T細胞を前記対象に注入する前に、前記対象がシクロホスファミド前治療を受ける、請求項1に記載の組成物。

【請求項6】

前記ウイルス送達システムが、CCR5を標的とすることができるスモールRNAをさらに含む、請求項1に記載の組成物。 10

【請求項7】

HIV RNA配列を標的とすることができる少なくとも1つの前記スモールRNAが、gag、pol、env、tat、rev、nef、vif、vpr、vpu、tev、LTR、TAR、RRE、PE、SLIP、CRS、またはINSの1つまたは複数を含む、請求項6に記載の組成物。

【請求項8】

前記形質導入されたCD4 T細胞が前記対象に注入される前に、前記形質導入されたCD4 T細胞が約1～約10日間培養される、請求項1に記載の組成物。

【請求項9】

HIV+対象におけるHIVの機能的治癒を達成する方法において使用するため、形質導入されたCD4 T細胞を含む組成物であって、前記方法が、 20

(a) HIV+である対象を識別するステップ；

(b) HIVワクチンの治療有効量で前記対象を免疫化するステップ；

(c) 前記対象からリンパ球を取り出し、そしてCD4 T細胞を精製するステップ；

(d) ex vivoにおいて、前記CD4 T細胞を治療有効量のHIVワクチンと接触させるステップ；

(e) ex vivoにおいて、少なくとも1つの遺伝子エレメントをコードするウイルス送達システムを用いて前記CD4 T細胞に形質導入するステップであって、前記遺伝子エレメントが、HIV RNA配列を標的とすることができるスモールRNAである、ステップ； 30

(f) 前記形質導入されたCD4 T細胞を、約1～約21日間、培養するステップ；および

(g) 前記形質導入されたCD4 T細胞を前記対象に注入するステップであって、前記HIV+対象は機能的治癒を達成する、ステップを含む、組成物。

【請求項10】

ステップ(b)およびステップ(d)が、同じHIVワクチンを含む、請求項9に記載の組成物。

【請求項11】

ステップ(b)およびステップ(d)が、異なるHIVワクチンを含む、請求項9に記載の組成物。

【請求項12】

前記形質導入されたCD4 T細胞を前記対象に注入する前に、前記対象がcARTまたはHARTを受けていた、請求項9に記載の組成物。

【請求項13】

前記形質導入されたCD4 T細胞を前記対象に注入する前に、前記対象がシクロホスファミド前治療を受ける、請求項9に記載の組成物。

【請求項14】

前記ウイルス送達システムが、CCR5を標的とすることができるスモールRNAをさ 50

らに含む、請求項9に記載の組成物。

【請求項15】

HIV RNA配列を標的とすることができる少なくとも1つの前記スモールRNAが、gag、pol、env、tat、rev、nef、vif、vpr、vpu、tev、LTR、TAR、RRE、PE、SLIP、CRS、またはINSの1つまたは複数を含む、請求項14に記載の組成物。

【請求項16】

前記形質導入されたCD4 T細胞が前記対象に注入される前に、前記形質導入されたCD4 T細胞が約1～約7日間、培養される、請求項9に記載の組成物。

【発明の詳細な説明】

10

【技術分野】

【0001】

関連出願への相互参照

本出願は、2015年7月8日に出願された米国仮特許出願番号第62/190,139号に基づく優先権の利益を主張しており、その開示は詳細に参考として援用される。

【0002】

発明の分野

本発明は、一般に、HIVの治療および予防のための免疫化および免疫療法の分野に関する。特に、開示された治療および予防の方法は、ウイルスベクターの投与ならびに遺伝子および他の療法用または診断用組成物の送達のためのシステムに関する。

20

【背景技術】

【0003】

発明の背景

抗レトロウイルス併用療法(Combination antiretroviral therapy; cART)(高活性抗レトロウイルス療法(Highly ActiveAntiretroviral Therapy)またはHAARTとしても公知である)は、HIV-1複製を制限し、疾患の進行を遅らせるが、薬物毒性および薬剤耐性ウイルスの出現は、HIV感染者における長期間制御に対する課題である。さらに、伝統的な抗レトロウイルス療法は、AIDSの発症または死亡を遅らせることに成功しているが、機能的治癒法を提供するには至っていない。代替的な治療戦略が明らかに必要である。

30

【0004】

HIV複製を制限するために、通常は不十分ではあるが、免疫システムが主要な役割を有することを示す新たなデータによって、HIV感染に対する免疫療法への強い関心が誘起されてきている。細胞溶解性T細胞(CTL)機能の維持に重要なウイルス特異的Tヘルパー細胞が、役割を有すると思われる。ウイルス血症もまた中和抗体の影響を受けるが、HIV感染においては一般的に規模が小さく、in vivoで進化するウイルス変異体に追いつかない。

【0005】

これらのデータは、まとめると、HIV特異的細胞性免疫応答の強度および幅の増加が、いわゆるHIV免疫療法を介して臨床的利益をもたらし得ることを示している。HIVに対するワクチンを試験する研究はいくつかあったが、今までのところ成功は限定的である。さらに、遺伝子治療技術を利用することによってHIV免疫療法を増強する関心はこれまであったが、他の免疫療法アプローチと同様に、成功は限定的である。HIV特異的免疫療法または遺伝子治療を行うそのような方法の1つとして、特別に設計されたウイルスベクターによるものがあり得る。

40

【0006】

特定のウイルスエンベロープ-宿主細胞受容体相互作用および遺伝子発現についてのウイルス機構の故に、標的細胞に遺伝子を形質導入するためにウイルスベクターを使用することができる。結果として、ウイルスベクターは、全T細胞または他の免疫細胞ならびに胚、受精卵、単離された組織試料、in situの組織標的、および培養細胞を含む多

50

くの異なる細胞型への遺伝子の移入のためのビヒクルとして使用されてきている。細胞内に外来遺伝子または改変遺伝子を導入および発現する能力は、遺伝子治療、誘導多能性幹細胞の体細胞再プログラミング、および様々な型の免疫療法のような療法介入に有用である。

【0007】

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

10

【0008】

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

【0009】

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

20

【0010】

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

30

【0011】

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

【発明の概要】

40

【発明が解決しようとする課題】

【0012】

明らかに、HIVの治療の改善が必要とされており、本発明はこの必要性を満たす。

【課題を解決するための手段】

【0013】

発明の要旨

療法的免疫化戦略および方法、ならびに非常に有効な療法用レンチウイルス、およびHIVを阻害し、特定の標的の発現を減少または変化させることができる他のベクターが、本明細書において開示される。開示された発明の方法および組成物は、HIVの機能的治癒を達成するために有用である。より具体的には、本発明には、患者の療法的免疫化、患

50

者の C D 4 T 細胞の *ex vivo* 再刺激、濃縮された T 細胞の *ex vivo* レンチウイルス形質導入、細胞の *ex vivo* 培養、および濃縮された遺伝子改変細胞の再注入を最適に組み合わせた H I V の機能的治癒のための方法が含まれる。さらに、本発明には、治療効力を測定するためのバイオアッセイ、療法薬投与の連続的变化、H A A R T の離脱後のモニタリング期間、および機能的 H I V 治癒の診断の方法が含まれる。

【 0 0 1 4 】

一態様では、開示される発明は、H I V 感染を治療する方法であって、(a) H I V 感染の治療を必要とする対象を識別するステップ；(b) H I V ワクチンの治療有効量で対象を免疫化するステップ；(c) 対象からリンパ球を取り出し、そして末梢血単核細胞(peripheral blood mononuclear cells ; P B M C)を精製するステップ；(d) *ex vivo* において、P B M C を治療有効量の H I V ワクチン(ステップ(b)で使用したH I V ワクチンと同じであっても異なっていてもよい)で接触させるステップ；(e) *ex vivo* において、少なくとも 1 つの遺伝子エレメントをコードするウイルス送達システムを用いて P B M C に形質導入するステップ；(f) 形質導入された P B M C を約 1 ~ 約 2 1 または約 3 5 日間(または、例えば約 2 、約 3 、約 4 、約 5 、約 6 、約 7 、約 8 、約 9 、約 1 0 、約 1 1 、約 1 2 、約 1 3 、約 1 4 、約 1 5 、約 1 6 、約 1 7 、約 1 8 、約 1 9 、約 2 0 、約 2 1 、約 2 2 、約 2 3 、約 2 4 、約 2 5 、約 2 6 、約 2 7 、約 2 8 、約 2 9 、約 3 0 、約 3 1 、約 3 2 、約 3 3 、約 3 4 または約 3 5 日のような、これらのパラメーターの間の任意の時間枠)まで、培養するステップ、および(g)形質導入された P B M C を対象に注入するステップを含む方法に関する。 10 20

【 0 0 1 5 】

一部の実施形態では、ステップ(b)およびステップ(d)は同じ H I V ワクチンを利用する一方で、他の実施形態では、ステップ(b)およびステップ(d)は異なる H I V ワクチンを利用する。一部の実施形態では、患者は、ステップ(b)および/またはステップ(d)を必要としないことがある。したがって、一部の実施形態では、開示された方法は、ステップ(a)、(c)、(d)、(e)、(f)および(g)、またはそれらのいくつかの組合せのみを含み得る。

【 0 0 1 6 】

一部の実施形態では、形質導入された P B M C を対象に注入する前に、対象は c A R T または H A A R T を受けている。一部の実施形態では、形質導入された P B M C を対象に注入する前に、対象はシクロホスファミド前治療を受けている。 30

【 0 0 1 7 】

一部の実施形態では、少なくとも 1 つの遺伝子エレメントは、ケモカイン受容体 C C R 5 の産生を阻害することができるスモール R N A 、ケモカイン受容体 C X C R 4 の産生を阻害することができるスモール R N A 、および H I V R N A 配列を標的とするスモール R N A 分子からなる群から選択される。一部の実施形態では、H I V R N A 配列を標的とするスモール R N A 分子は、g a g 、p o l 、e n v 、t a t 、r e v 、n e f 、v i f 、v p r 、v p u 、t e v 、L T R 、T A R 、R R E 、P E 、S L I P 、C R S 、または I N S を対象とする。 40

【 0 0 1 8 】

一部の実施形態では、形質導入された P B M C を対象に注入する前に、形質導入された P B M C は、約 1 ~ 約 7 または約 1 0 日間(または、例えば約 2 、約 3 、約 4 、約 5 、約 6 、約 7 、約 8 、約 9 、または約 1 0 日間のような、これらのパラメーターの間の任意の時間枠)まで培養される。

【 0 0 1 9 】

別の態様では、開示される発明は、H I V 特異的 C D 4 T 細胞に形質導入するためのウイルスペクターに関するものであり、ここで、ウイルスペクターは、ケモカイン受容体 C C R 5 の産生を阻害することができるスモール R N A 、ケモカイン受容体 C X C R 4 の産生を阻害することができるスモール R N A 、および H I V R N A 配列を標的とするスモール R N A 分子からなる群から選択される少なくとも 1 つの遺伝子エレメントをコード 50

するものである。

【0020】

一部の実施形態では、ベクターはレンチウイルスであるが、他の実施形態では、ベクターはDNAプラスミド、アデノ随伴ウイルス、または遺伝子送達のための他の組み込みまたは非組み込みベクターシステムである。

【0021】

一部の実施形態では、HIV RNA配列を標的とするスモールRNA分子は、gag、pol、env、tat、rev、nef、vif、vpr、vpu、tev、LTR、TAR、RRE、PE、SLIP、CRS、またはINSを対象とする。

【0022】

別の態様では、開示される発明は、HIV+対象が機能的に治癒しているか否かを決定するためのバイオアッセイに関する。そのようなバイオアッセイには、療法用レンチウイルスによる遺伝子改変を有するHIV特異的CD4 T細胞の数を決定するステップが含まれ、療法用レンチウイルスによる遺伝子改変を有するHIV特異的CD4 T細胞の数が、開示された方法に従った治療後の特定の時間後に閾値を上回る場合に、対象は機能的に治癒している。

【0023】

一部の実施形態では、閾値は、約 1×10^8 個の、療法用レンチウイルスによる遺伝子改変を有するHIV特異的CD4 T細胞であるが、閾値はこの値より高くまたは低く決定されてもよい。

【0024】

一部の実施形態では、治療後の特定の時間は約30～約60日（またはこれら2つの値の間の任意の時間枠）であり、他の実施形態では、治療後の特定の時間は約12～約26週間（またはこれらの2つの値の間の任意の時間枠）である。

【0025】

さらに別の態様では、開示された発明は、HIV+対象におけるHIVの機能的治癒を達成する方法に関する。方法は：(a) HIV+である対象を識別するステップ；(b) HIVワクチンの治療有効量で対象を免疫化するステップ；(c) 対象からリンパ球を取り出し、そして末梢血単核細胞(PBMC)を精製するステップ；(d) ex vivoにおいて、PBMCを治療有効量のHIVワクチンと接触させるステップ；(e) ex vivoにおいて、少なくとも1つの遺伝子エレメントをコードするウイルス送達システムを用いてPBMCに形質導入するステップ；(f) 形質導入されたPBMCを、約1～約21日または35日間まで（またはこれらの値の間の任意の時間枠）培養するステップ；および(g) 形質導入されたPBMCを対象に注入するステップであって、HIV+対象は機能的治癒を達成する、ステップを含む。

【0026】

一部の実施形態では、ステップ(b)およびステップ(d)は同じHIVワクチンを含む一方で、他の実施形態では、ステップ(b)およびステップ(d)は異なるHIVワクチンを含む。

【0027】

一部の実施形態では、対象は、形質導入されたPBMCを対象に注入する前に、CARまたはHARTを受けていた。一部の実施形態では、対象は、形質導入されたPBMCを対象に注入する前に、T細胞生着を改善するために、シクロホスファミド前治療または代替条件付け療法を受ける。

【0028】

一部の実施形態では、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スモールRNA、ケモカイン受容体CXCR4の産生を阻害することができるスモールRNA、およびHIV RNA配列を標的とするスモールRNA分子からなる群から選択される。一部の実施形態では、HIV RNA配列を標的とするスモールRNA分子は、gag、pol、env、tat、rev、nef、vi

10

20

30

40

50

f、vpr、vpu、tev、LTR、TAR、RRE、PE、SLIP、CRS、またはINSを対象とする。

【0029】

一部の実施形態では、形質導入されたPBM Cを対象に注入する前に、形質導入されたPBM Cを約1～約7または約12日間まで（または、これらの2つの値の間の任意の時間枠、または本明細書に記載の他の期間）培養する。

【0030】

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

10

【図面の簡単な説明】

【0031】

【図1】図1は、ワクチン接種、PBM CおよびCD4 T細胞を得るための細胞収集、成長サイトカイン（インターロイキン-2、インターロイキン-12、インターロイキン-15、インターロイキン-6、インターロイキン-7およびインターロイキン-23を含むが、これらに限定されない）の支援の存在下でのワクチン免疫原ならびに/またはCD3/CD28刺激および/もしくは分裂促進因子刺激を用いて刺激した後のex vivoにおけるT細胞培養物、抗HIV遺伝子構築物を送達するためのレンチウイルス形質導入、形質導入された細胞の短期間培養、および元の対象へ注入し戻すことを取り込んだ、可能な臨床療法のフローチャート図を示す。

20

【0032】

【図2】図2は、遺伝子治療を使用してどのようにCD4 T細胞が変化して、他の細胞が感染するのを防ぐか、またはウイルス複製を防ぐかを示す。

【0033】

【図3】図3は、例示的な療法用レンチウイルス構築物の概略を示す。療法用レンチウイルス構築物は、プロモーター領域、調節RNAの標的化、および調節RNAの型に対して代替配列を置換し得る。さらに、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は、生産の要求に応じて変更することができる。

30

【0034】

【図4】図4は、例示的なベクター配列を示す。プロモーターおよびm i Rクラスターのポジティブ（ゲノム）鎖配列は、CCR5指向性HIV株の拡散を阻害するために開発された。下線で示されていない配列は、このm i Rクラスターのために最良に選択された転写のEF-1アルファプロモーターを含む。下線で示した配列は、m i R 3 0 C C R 5 (C C R 5 m R N A にリダイレクトする天然のヒト m i R 3 0 の変更)、m i R 2 1 V i f (V i f R N A 配列へのリダイレクト) および m i R 1 8 5 T a t (T a t R N A 配列へのリダイレクト) からなるm i Rクラスターを示す。下線で示されていない、より小さなフォントの配列は、各々のm i R N A構築物についてのオリゴヌクレオチドプライマーに組み込まれた制限エンドヌクレアーゼ切断部位である。

40

【0035】

【図5】図5は、実験ベクターによるCCR5のノックダウンが、AGT c 1 2 0細胞におけるR5指向性HIV感染を防ぐことを示す。パネル(A)は、AGT 1 0 3レンチウイルスベクターを含むか、または含まないAGT c 1 2 0細胞におけるCCR5発現を示す。パネル(B)は、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AGT c 1 2 0細胞の感受性を示す。

【0036】

【図6】図6は、AGT 1 0 3が、HIV発現プラスミドをトランスフェクトした細胞内のTatタンパク質発現の発現を減少させることを示す。

【0037】

50

【図7】図7は、A G T 1 0 3が、全長H I V発現プラスミドをトランスフェクトした細胞内のV i fタンパク質発現のレベルを減少させることを示す。細胞は非処理であるか(左レーンおよび中央レーン)またはA G T 1 0 3を用いて形質導入した(左レーン)ものである。

【0038】

【図8 A B】図8は、H I V特異的A G T 1 0 3形質導入C D 4 T細胞について高度に濃縮したC D 4 + T細胞集団の生成を示す。パネル(A)は、H I Vに対する療法ワクチン接種がC D 4 +、C D 8 +およびC D 4 + / C D 8 + T細胞の分布に最小限の影響しか及ぼさないことを示す。重要なC D 4 T細胞集団は、これらの分析フローサイトメトリードットプロットの左上四分儀に示され、ワクチン接種系列の後、全T細胞の5 2 %から5 7 %に変化する。これらは代表的なデータである。パネル(B)は、+ / - インターロイキン-2 / インターロイキン-1 2または+ / - インターロイキン-7 / インターロイキン-1 5培地内で1 2日間培養されたH I V療法ワクチン試験の参加者からの末梢血単核細胞のC D 3 +集団におけるC D 4およびC D 8の発現を示す。H I V - 1の全p 5 5 G a gタンパク質(J P T P e p M i x)を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代表する重複ペプチドで、いくつかの培養物を刺激した。パネル(C)は、P e p M i xおよびインターロイキン-2 / インターロイキン-1 2の組合せが、抗原特異的C D 4 T細胞の最適な増殖をもたらすことを示す。上のパネルは、P e p M i xに曝露されたワクチン接種後の検体におけるサイトカイン(インターフェロン-ガンマ)分泌細胞の増加を示す。パネル(D)は、H I Vのための機能的治癒の一部として患者に注入するためのH I V特異的およびH I V耐性ヘルパーC D 4 T細胞を産生することができる抗原増殖したC D 4 T細胞のA G T 1 0 3形質導入を示す。上のパネルは、培養物中のC D 4 + T細胞集団を分析した結果を含む。x軸は、個々の細胞にA G T 1 0 3が形質導入されたことを示す緑色蛍光タンパク質(G F P)発光である。

【図8 C D】図8は、H I V特異的A G T 1 0 3形質導入C D 4 T細胞について高度に濃縮したC D 4 + T細胞集団の生成を示す。パネル(A)は、H I Vに対する療法ワクチン接種がC D 4 +、C D 8 +およびC D 4 + / C D 8 + T細胞の分布に最小限の影響しか及ぼさないことを示す。重要なC D 4 T細胞集団は、これらの分析フローサイトメトリードットプロットの左上四分儀に示され、ワクチン接種系列の後、全T細胞の5 2 %から5 7 %に変化する。これらは代表的なデータである。パネル(B)は、+ / - インターロイキン-2 / インターロイキン-1 2または+ / - インターロイキン-7 / インターロイキン-1 5培地内で1 2日間培養されたH I V療法ワクチン試験の参加者からの末梢血単核細胞のC D 3 +集団におけるC D 4およびC D 8の発現を示す。H I V - 1の全p 5 5 G a gタンパク質(J P T P e p M i x)を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代表する重複ペプチドで、いくつかの培養物を刺激した。パネル(C)は、P e p M i xおよびインターロイキン-2 / インターロイキン-1 2の組合せが、抗原特異的C D 4 T細胞の最適な増殖をもたらすことを示す。上のパネルは、P e p M i xに曝露されたワクチン接種後の検体におけるサイトカイン(インターフェロン-ガンマ)分泌細胞の増加を示す。パネル(D)は、H I Vのための機能的治癒の一部として患者に注入するためのH I V特異的およびH I V耐性ヘルパーC D 4 T細胞を産生することができる抗原増殖したC D 4 T細胞のA G T 1 0 3形質導入を示す。上のパネルは、培養物中のC D 4 + T細胞集団を分析した結果を含む。x軸は、個々の細胞にA G T 1 0 3が形質導入されたことを示す緑色蛍光タンパク質(G F P)発光である。

【0039】

【図9 - 1】図9は、開示されたベクターに組み込まれてもよいH I V複製を制限することができる公知である様々な例示的な細胞エレメントの配列を示す。

【図9 - 2】図9は、開示されたベクターに組み込まれてもよいH I V複製を制限することができる公知である様々な例示的な細胞エレメントの配列を示す。

【図9 - 3】図9は、開示されたベクターに組み込まれてもよいH I V複製を制限することができる公知である様々な例示的な細胞エレメントの配列を示す。

10

20

30

40

50

【図9-4】図9は、開示されたベクターに組み込まれてもよいHIV複製を制限することが公知である様々な例示的な細胞エレメントの配列を示す。

【図9-5】図9は、開示されたベクターに組み込まれてもよいHIV複製を制限することが公知である様々な例示的な細胞エレメントの配列を示す。

【図9-6】図9は、開示されたベクターに組み込まれてもよいHIV複製を制限することが公知である様々な例示的な細胞エレメントの配列を示す。

【図9-7】図9は、開示されたベクターに組み込まれてもよいHIV複製を制限することが公知である様々な例示的な細胞エレメントの配列を示す。

【図9-8】図9は、開示されたベクターに組み込まれてもよいHIV複製を制限することが公知である様々な例示的な細胞エレメントの配列を示す。

【発明を実施するための形態】

【0040】

好適な実施形態の詳細な説明

機能的治癒を達成するためにヒト免疫不全ウイルス(HIV)疾患を治療および/または予防するための方法および組成物が、本明細書において開示される。機能的治癒は、CAR-Tの必要性を低減または排除し、補助療法の支援を必要とする場合としない場合がある、開示された治療および方法から生じる状態として定義される。本発明の方法には、以下に記載されるレンチウイルス、非組み込みレンチウイルス、および関連ウイルスベクター技術を組み込むことによる遺伝子送達が含まれる。

【0041】

療法用ウイルスベクター(例えば、レンチウイルスベクター)、免疫療法、およびHIV感染のための機能的治癒を達成するための戦略におけるそれらの使用の方法が、本明細書において開示される。一般的な戦略は、HIV特異的CD4 T細胞の画分を濃縮する目的で、HAARTの毎日の投与によるウイルス血症の安定な抑制を有するHIV感染患者におけるHIVに対する強力な免疫応答を生成することを意図したワクチンによる最初の療法的免疫を含むことができる。(1)末梢白血球を白血球アフェレーシスによって単離するか、またはPBM Cを静脈血から精製するステップ、(2)ex vivoにおいて、HIVワクチンタンパク質でCD4 T細胞を再刺激するステップ、(3)療法用レンチウイルス形質導入、ex vivoにおいて、T細胞培養を行うステップ、および(4)元のドナーへ再注入し戻すステップが、これに続く。

【0042】

主に、防御的遺伝子改変を有する十分な数のHIV特異的CD4 T細胞を得ることができなかったために、HIVの治癒を達成するためのこれまでの努力が及ばなかった。この値が臨界閾値を下回ると、抗レトロウイルス療法を取り辞めることによりHIV再発が招かれ、続いてHIV特異的CD4 T細胞が急速に破壊され、その後も以前の遺伝子治療にもかかわらず疾患の進行の再開となる。本明細書に記載の戦略における療法的免疫化を使用し、HIVを阻害することができる非常に有効な療法用レンチウイルスを提供することにより、HIVの機能的治癒を達成するための新たな戦略が開発された。

【0043】

レンチウイルスベクターおよび非組み込み、エピソーム性複製ウイルスベクターを含む、HIV特異的CD4 T細胞を増強するための新規なウイルスベクターならびにそれらを使用する方法もまた、本明細書において開示される。本発明のようなエピソーム性複製ベクターは、パポバウイルス科(例えばウシパピローマウイルスまたはBPV)またはヘルペスウイルス科(例えばエプスタインバールウイルス(Epstein Barr Virus)またはEBV)またはヘパドナウイルス科(例えばB型肝炎ウイルスまたはHBV)のようなウイルス由来のウイルス成分を含むことができる。これらのウイルス由来のエピソーム性複製ベクターは、複製オリジンおよび少なくとも1つのウイルストラ_ns作用因子、例えば、BPVの場合はE1、EBVの場合はEBNA-1もしくはHBVポリメラーゼのような開始タンパク質、またはアデノウイルスの末端結合タンパク質を含むことができる。エピソーム複製のプロセスは、典型的には、宿主細胞複製機構およびウイルストラ_ns作用因

10

20

30

40

50

子の両方を組み込む。

I. ヒト免疫不全ウイルス (HIV)

【0044】

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

10

【0045】

HIVは、ヘルパーT細胞のようなヒト免疫システムの生体細胞に感染するが、指向性はHIVサブタイプ内で様々である可能性がある。HIV感染に特異的に感受性であり得る免疫細胞には、CD4+ T細胞、マクロファージ、および樹状細胞が含まれるが、これらに限定されない。HIV感染は、未感染バイスタンダー細胞のアポトーシス、感染細胞の直接的なウイルス死滅、および感染細胞を認識するCD8細胞傷害性リンパ球による感染CD4+ T細胞の死滅を含むが、これに限定されない数多くのメカニズムにより、CD4+ T細胞のレベルの低下をもたらす。CD4+ T細胞数が臨界レベル以下に低下すると、細胞性免疫が失われ、身体が日和見感染症およびがんに、進行性で、より感受性となる。

20

【0046】

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

【0047】

HIVは主にCD4 T細胞において複製し、宿主免疫を低下させる細胞破壊または調節不全を引き起こす。HIVは、統合プロウイルスとして感染を確立し、特定の細胞におけるウイルス発現が、その細胞に影響を及ぼす細胞病理のレベルまたは宿主免疫システムによる検出のレベル以下にまで低下する、潜伏感染状態に移行する可能性があるため、HIVは治療が困難であり、長期間の高活性抗レトロウイルス療法 (HAART) の後でさえも根絶されていない。生存期間はHAARTによって延長される可能性があるが、ほとんどの場合、HIV感染は致命的な疾患を引き起こす。

30

【0048】

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

40

【0049】

遺伝子治療を用いることで、いくらかの進歩がみられたが、ポジティブな結果は孤発性であり、宿主細胞のウイルス浸透に重要な役割を果たすCCR5 (ケモカイン受容体) をコードする遺伝子の1つまたは両方の対立遺伝子に欠損を有するまれなヒトの間でのみ見出された。しかしながら、多くの研究者は、遺伝子治療が最終的にHIV治癒を達成するための最高の将来性を持っていると楽観的である。

【0050】

本明細書に開示されるように、本発明の方法および組成物は、身体からのすべてのHIV

50

Vの完全な根絶を含んでもよいかまたは含まないでもよい機能的治癒を達成することができる。機能的治癒は、以前にH A A R Tを必要としていたH I V+個体が、低いまたは検出不可能なウイルス複製とともに生存し、より低いまたは断続的な用量のH A A R Tを使用しているか、または潜在的にH A A R Tを完全に中止することができる、状況または状態として定義される。本明細書で使用されるように、機能的治癒は、低レベルのウイルス複製を維持し、疾患の進行を遅らせるかまたは排除するために、補助療法を必要とする可能性がなお、あるかもしれない。機能的治癒の可能な予後は、すべての再発の可能性を防ぐためのH I Vの最終的な根絶である。

【0051】

機能的治癒を達成するための主な障害は、H I V自体の基本的な生物学に存する。ウイルス感染は、すべての免疫機能にとって重要なC D 4 T細胞を欠失させる。最も重要なことに、H I V感染およびC D 4 T細胞の枯渇は、個々の細胞の活性化を必要とする。活性化とは、再編成されたT細胞受容体を使用して病原体または他の分子を認識する個々のC D 4 T細胞クローニングに特異的な機構である。

【0052】

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

【0053】

明らかに、機能的治癒は、十分なH I V特異的C D 4 T細胞が保護されて、H A A R Tが中断されたら宿主の自然免疫がH I Vに対抗して制御するようになる場合にのみ可能である。一実施形態では、本発明は、H I V疾患の機能的治癒を提供するための遺伝子治療の有効性を改善する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、機能的治癒を提供するために、H I Vに対する宿主免疫を増強するための方法および組成物を提供する。さらに別の実施形態では、本発明は、機能的治癒を達成するために、患者のH I V特異的C D 4 T細胞を濃縮するための方法および組成物を提供する。

【0054】

本発明の一実施形態では、治療は、対象のH I V特異的C D 4 T細胞を、約100%、約200%、約300%、約400%、約500%、約600%、約700%、約800%、約900%、約1000%、約1500%、約2000%、約2500%、約3000%、約3500%、約4000%、約4500%、約5000%、約5500%、約6000%、約6500%、約7000%、約7500%、約8000%、約8500%、約9000%、約9500%、約10000%、約11000%、約12000%、約13000%、約14000%、約15000%、約16000%、約17000%、約18000%、約19000%、約20000%、約25000%、約30000%、約35000%、約40000%、約45000%、約50000%、約55000%、約60000%、約65000%、約70000%、約75000%、約80000%、約85000%、約90000%、約95000%、約100000%またはその間の任意の値、濃縮する結果となる。

I I . 遺伝子治療

【0055】

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

【0056】

遺伝子構築物は、機能的遺伝子または既存の欠陥を修正または補完する遺伝子の一部、調節タンパク質をコードするD N A配列、アンチセンス、短いポモロジーR N A、長い非コードR N A、低分子干渉R N Aまたはその他を含む調節R N A分子をコードするD N A配列、および疾患状態を変化させるために重要な細胞因子について競合するように設計さ

10

20

30

40

50

れた R N A またはタンパク質のいずれかをコードするデコイ配列を含むことができるが、それらに限定されない。遺伝子治療は、特定の疾患の治療または緩和を提供するために、これらの療法用遺伝子構築物を標的細胞に送達することを含む。

【 0 0 5 7 】

H I V 疾患の治療において遺伝子治療を利用する努力は複数行われてきているが、これまでのところ、結果は貧弱である。 C C R 5 遺伝子の自発的欠失 (C C R 5 d e l t a 3 2 として公知である対立遺伝子) を有するまれな H I V 患者において、少数の治療成功が得られた。

【 0 0 5 8 】

レンチウイルスにより送達されたヌクレアーゼまたは遺伝子欠失 / 修飾のための他の機構を使用して、 C C R 5 の全体的発現を低下させ、および / または H I V 複製を低下させるのを助けることができる。レンチウイルスが C C R 5 d e l t a 3 2 の遺伝的背景を有する患者に投与された場合にこの疾患の治療に成功したことを報じる研究が、少なくとも 1 つある。しかしながら、これは成功のわずか一例に過ぎず、 C C R 5 d e l t a 3 2 遺伝子型を持たない多くの他の患者はうまく治療されていない。その結果、個々のウイルスベクター構築物の性能および機能的 H I V 治癒を達成するための戦略によるベクターの使用の改善の両方の点で、 H I V に対するウイルス遺伝子治療の性能を改善する実質的な必要性がある。

【 0 0 5 9 】

例えば、いくつかの既存の療法は、細胞を H I V 感染に対して抵抗性にする試みにおいて、ジンクフィンガーヌクレアーゼに依存して、 C C R 5 の一部を欠失させる。しかしながら、最適な治療の後でさえも、 T 細胞の 3 0 % だけがヌクレアーゼによって改変されるのみであり、改変されたもののうち、全 C D 4 T 細胞集団のわずか 1 0 % が H I V 感染を予防するように改変されただけであった。対照的に、開示された方法は、レンチウイルス導入遺伝子を保有する実質的にすべての細胞で、 H I V 感染を可能にするのに必要なレベル未満まで C C R 5 発現が減少する結果となる。

【 0 0 6 0 】

開示される方法の目的のために、遺伝子治療には、親和性が増強された T 細胞受容体、 C D 4 T 細胞上の（または代替的に 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より引き起こされる細胞死を避けるためのシグナル伝達経路の改変、 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 (tetherin ; B S T 2) 、および哺乳類細胞における H I V 複製を減少させることができるものと識別された類似のタンパク質を含む H I V 制限エレメントの発現の増加を含むことができるが、それらに限定されない。

【 0 0 6 1 】

例えば、一部の実施形態では、開示されるベクターは、下の表 1 に見出される制限エレメントを含み得るが、それらに限定されない。これらの例示的な制限エレメントの配列は、図 9 にさらに開示されている。

10

20

30

【表1】

表1

遺伝子	受託番号	
TREX1	NM_016381(ヒト) XM_015128506.1(マカク・ムラッタ(Macaca mulatta))	10
TREX2	NM_080701/NM_007205(ヒト) XM_015128506.1(マカク・ムラッタ)	
SAMHD1	NM_015474(ヒト) JN936895.1(マカク・ムラッタ)	
MxA	NM_001144925(ヒト) JX297237.1(マカク・ムラッタ)	
MxB	NM_002463(ヒト)	20
APOBEC3G	NM_021822(ヒト) XM_015150306(マカク・ムラッタ)	
TRIM5-アルファ	NM_033034(ヒト) NM_001032910.1(マカク・ムラッタ)	
デザリン	NM_004335(ヒト) FJ943432.1(マカク・ムラッタ)	30

I I I . 免疫療法

【0062】

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

【0063】

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

【0064】

開示された発明の一部の実施形態では、宿主の抗HIV免疫を増加させる目的で、HIV特異的CD4 T細胞の集団を濃縮するために、免疫療法アプローチを使用することができる。開示された発明の一部の実施形態では、宿主の抗HIV免疫を増加させる目的で、宿主の免疫細胞に形質導入するために、組み込みまたは非組み込みのレンチウイルス

40

50

ベクターを使用することができる。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の適切なビヒクルおよび／または生物学的もしくは化学的アジュバントと組み合わせた、死滅粒子、ウイルス様粒子、HIVペプチド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、精製サブユニットまたはプラスミドDNAを含むがこれらに限定されないHIVタンパク質を含むワクチンは、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することができ、ならびにこれらの方法は、レンチウイルスまたは他のウイルスベクターを使用したHIV標的遺伝子治療の使用によってさらに増強され得る。

I V . 本発明による方法

【 0 0 6 5 】

一態様では、開示される発明は、HIV疾患の機能的治癒を達成するためにウイルスベクターを使用する方法を提供する。この方法はさらに、HIV特異的CD4 T細胞の割合を濃縮させるための免疫療法、続く、必要に応じてHIVの阻害剤ならびにCCR5およびCXCR4を送達するためのレンチウイルス形質導入を含む。

10

【 0 0 6 6 】

一実施形態では、本方法は、HIV特異的CD4 T細胞の割合を濃縮するための方法としての療法的免疫化を含む。療法的免疫化には、精製タンパク質、不活性化ウイルス、ウイルスベクター化タンパク質、細菌性ベクター化タンパク質、ペプチドまたはペプチド断片、ウイルス様粒子(VLP)、サイトカインおよび／もしくはケモカインを含む生物学的または化学的アジュバント、ビヒクル、ならびに免疫化のための方法を含むことができる。

20

【 0 0 6 7 】

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

30

【 0 0 6 8 】

一部の実施形態では、HIV+患者をHIVワクチンで免疫化して、HIV特異的CD4 T細胞の頻度を約2、約25、約250、約500、約750、約1000、約1250、または約1500倍(またはこれらの値の間の任意の量)増加させることができる。ワクチンは、ワクチン送達システムとして使用される、開示されたレンチウイルス、他のウイルスベクターまたは他の細菌ベクターを含む、臨床的に利用されるかまたは実験的なHIVワクチンであってもよい。例えば、開示されるベクターは、HIV VLPを発現する組換えウシ型弱毒結核菌ワクチン(Bacille Calmette Guerin; BCG)株を含んでもよい。BCGは結核に対するヒトワクチンとしての使用のために弱毒化されたマイコバクテリウム・ボビス(mycobacterium bovis)である。別の実施形態では、ベクターは、中和抗体のより高い力値を誘導するためにウイルス様粒子(VLP)をコードすることができる。別の実施形態では、ベクターは、gag、pol、およびenv、tat、rev、nef、vif、vpr、vpuおよびtevならびにLTR、TAR、RRE、PE、SLIP、CRS、およびINSを含むがこれらに限定されないHIVに関連するペプチドまたはペプチド断片をコードすることができる。代替的には、開示された方法で使用されるHIVワクチンは、精製タンパク質、不活性化ウイルス、ウイルスベクター化タンパク質、細菌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)、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または化学的アジュバントを含んでもよい。

40

50

【0069】

一実施形態では、本方法は、精製タンパク質、不活性化ウイルス、ウイルスベクター化タンパク質、細菌性ベクター化タンパク質、サイトカインおよび／もしくはケモカインを含む生物学的または化学的アジュバント、ビヒクル、および再刺激のための方法を使用して、療法ワクチン接種により以前に免疫化された人または患者からのC D 4 T細胞のe x v i v o再刺激を含む。e x v i v o再刺激は、i n v i v o免疫化のために使用されるものと同じワクチンまたは免疫刺激化合物を使用して実施され得るか、またはi n v i v o免疫化のために使用されるものとは異なるワクチンまたは免疫刺激化合物を使用して実施され得る。さらに、一部の実施形態では、個体がH I Vタンパク質に対して十分に高い抗原特異的C D 4 T細胞応答を有する場合、患者は、以前の療法ワクチン接種またはC D 4 T細胞の再刺激を必要としないことがある。これらの実施形態では、そのような患者は、機能的治癒を達成するために、開示されたウイルスベクターの投与のみを必要とすることがある。10

【0070】

例え、末梢血単核細胞（P B M C）は、白血球アフェレーシスによって得られ、e x v i v oで処理され、 1×10^{10} 個のC D 4 T細胞を得ることができ、その約0.1%、約1%、約5%または約10%または約30%は、抗原応答の点でH I V特異的であり、かつ開示されたレンチウイルスベクターによって送達される療法用導入遺伝子を有することによりH I V耐性である。代替的には、約 1×10^7 、約 1×10^8 、約 1×10^9 、約 1×10^{10} 、約 1×10^{11} 、または約 1×10^{12} 個のC D 4 T細胞を再刺激のために単離することができる。e x v i v oにおける再刺激のために、任意の適切な量のC D 4 T細胞を単離することができる。20

【0071】

単離されたC D 4 T細胞は、以前の療法用ワクチン接種に存在する抗原を含み得る、H I Vワクチン抗原による再刺激を通して、適切な培地で培養することができる。逆転写酵素、プロテアーゼまたはインテグラーゼの阻害剤を含む抗レトロウイルス療法薬は、長期のe x v i v oでの培養中のウイルス再出現を防ぐために添加することができる。C D 4 T細胞再刺激は、培養物中のH I V特異的C D 4 T細胞の割合を濃縮するために使用される。同じ手順を、精製によって得られた末梢血単核細胞を有する少量の血液量を使用して、H I V特異的T細胞を識別し、この亜集団の頻度を測定する分析目的にもまた使用することができる。30

【0072】

P B M C画分は、i n v i v o免疫化のために以前に使用されたワクチンの成分と一致または相補的なH I Vタンパク質と細胞を接触させることによって、H I V特異的C D 4 T細胞について濃縮され得る。e x v i v o再刺激は、H I V特異的C D 4 T細胞の相対頻度を約25、約50、約75、約100、約125、約150、約175、または約200倍増加させることができる。

【0073】

本方法はさらに、e x v i v oでのレンチウイルス形質導入および培養を用いた、i n v i v oでの療法的免疫化およびe x v i v oでのC D 4 T細胞の再刺激を組み合わせることを含む。40

【0074】

したがって、一実施形態では、H I V特異的C D 4 T細胞について濃縮された再刺激されたP B M C画分は、療法用抗H I Vレンチウイルスまたは他のベクターを用いて形質導入され、約1～約21日または約35日まで、培養物中に保持された。代替的には、細胞は、約1～約18日間、約1～約15日間、約1～約12日間、約1～約9日間、または約3～約7日間培養され得る。したがって、形質導入された細胞は、約1、約2、約3、約4、約5、約6、約7、約8、約9、約10、約11、約12、約13、約14、約15、約16、約17、約18、約19、約20、約21、約22、約23、約24、約25、約26、約27、約28、約29、約30、約31、約32、約33、約34、ま50

たは約35日間、培養されてもよい。

【0075】

形質導入された細胞が十分に培養されると、形質導入されたCD4 T細胞が元の患者に注入し、戻される。注入は、当該技術分野において公知の様々な機械および方法を使用して実施することができる。一部の実施形態では、注入は、再移植の効率を高めるために、シクロホスファミドまたは同様の化合物での前治療を伴ってもよい。

【0076】

一部の実施形態では、CCR5標的療法は、治療プロセスを通して継続して、対象の抗レトロウイルス療法レジメンに加えられてもよい。CCR5標的療法の例としては、マラビロク (Maraviroc ; CCR5アンタゴニスト) またはラパマイシン (Rapamycin ; 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、抗レトロウイルス療法は中止され、対象はウイルスのリバウンドについて試験されることがある。リバウンドが起こらない場合、アジュvant療法もまた取り除くことができ、対象はウイルスのリバウンドについて再び試験ができる。

【0077】

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

【0078】

開示された方法で使用されるレンチウイルスベクターおよび他のベクターは、少なくとも1つ、少なくとも2つ、少なくとも3つ、少なくとも4つ、または少なくとも5つの目的の遺伝子をコードし得る。HIV標的遺伝子治療の多様性および治療可能性を考慮すると、本発明のウイルスベクターは、(i) 感染性疾患に関連する抗原または感染性病原体により產生された毒素に対する抗体、(ii) 免疫細胞の増殖または機能に必要で、HIVおよび他の慢性または急性のヒトウイルスまたは細菌病原体で遭遇する免疫調節不全のための療法であり得る、インターロイキンを含むサイトカイン、(iii) CD8抑制因子を含むin vivoにおいてHIVの増殖を抑制する因子、(iv) ケモカイン受容体CCR5の突然変異もしくは欠失、ケモカイン受容体CXCR4の突然変異もしくは欠失、またはケモカイン受容体CXCR5の突然変異もしくは欠失、(v) HIVに関連する特異的受容体もしくはペプチドまたはHIVに関連する宿主タンパク質に対するアンチセンスDNAまたはRNA、(vi) HIVに関連する特異的受容体もしくはペプチドまたはHIVに関連する宿主タンパク質に対する低分子干渉RNA、または(vii) HIVまたはAIDSを治療するために使用され得る様々な他の療法的に有用な配列を含むがそれらに限定されない遺伝子または核酸配列をコードしてもよい。

【0079】

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

【0080】

一部の実施形態では、患者は、本発明の方法に従って治療されている間に同時にcARTまたはHAARTを受けていてもよい。他の実施形態では、患者は、本発明の方法に従って治療される前または後に、cARTまたはHAARTを受けてもよい。一部の実施形態では、cARTまたはHAARTは、本発明の方法に従った治療を通して維持され、患者は血液中のHIVウイルス負荷についておよび血液中のレンチウイルス形質導入CD4

10

20

30

40

50

T細胞の頻度についてモニターされてもよい。好ましくは、本発明の方法に従って治療される前にcARTまたはHAARTを受けている患者は、本発明の方法に従った治療の後にcARTまたはHAARTを中止または減少することができる。

【0081】

有効性の目的のために、遺伝子治療効果についての新規の代用マーカーである形質導入されたHIV特異的CD4 T細胞の頻度を、セクションVIにおいてより詳細に議論されるように決定してもよい。

V. 本発明による組成物

【0082】

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

10

【0083】

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

20

【0084】

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

30

【0085】

図3に示すように、例示的な構築物は、多数のセクションまたは構成要素を含むことができる。例えば、一実施形態では、例示的なLV構築物は、以下のセクションまたは構成要素を含み得る：

- RSV - ラウス肉腫ウイルス (Rous Sarcoma virus) 末端反復配列；
- 5'LTR - 染色体組み込み後にベクターの複製を阻止するために切断され得るHIV末端反復配列の一部；
- Psi - パッケージング中にベクターRNAゲノムをウイルス粒子に取り込むことを可能にするパッケージングシグナル；
- RRE - Rev反応性エレメントは、RNAを核から細胞の細胞質に移動することによって導入遺伝子からの発現を改善するために添加することができる；
- cPPT - 宿主細胞の染色体に導入遺伝子を組み込む前に、第2鎖DNA合成を促進するポリプリントラクト (Poly purine tract)；
- プロモーター - プロモーターとは、マイクロRNAクラスター（または構築物の他の遺伝子エレメント）を発現するために、組み込まれた導入遺伝子からRNA転写を開始するものであり、一部の実施形態では、ベクターはEF-1プロモーターを使用してもよい；
- Anti-CCR5 - 宿主細胞因子CCR5のメッセンジャーRNAを標的として、細胞表面上の発現を減少させるマイクロRNA；
- Anti-Rev/Tat - HIV Revコーディング領域とTatコーディング領域の間の接合部にあるHIVゲノムRNAまたはメッセンジャーRNAを標的と

40

50

するマイクロRNAであり、時にはm i RNA Tatと称されるか、またはこの出願において同様の記載が与えられる；

・Anti - Vif - Vifコーディング領域内のHIVゲノムRNAまたはメッセンジャーRNAを標的とするマイクロRNA；

・WPRE - ウッドチャック肝炎ウイルス転写後調節エレメント(woodchuckhepatitis virus post-transcriptional regulatory element)は、核のRNA輸送を促進するため使用することができる追加のベクター構成成分である；および

・delta U3 3'LTR - ベクターの安全性を改善するためにU3領域の一部が欠失している、HIV 3'-プライム末端反復配列の改変バージョン。

当業者であれば、上記の構成成分は単なる例であり、そのような構成成分は、構築物がHIV遺伝子の発現を阻止し、感染の蔓延を減少させることができる限り、他のエレメントで再編成され、置換され、さもなければ改変され得ることを、認識し得る。 10

【0086】

本発明のベクターは、上に議論した遺伝子カーゴの型(すなわち、遺伝子の発現を導く遺伝子エレメントまたは翻訳もしくは転写を阻止することができるsiRNA、shRNAもしくはm i RNAのようなスモールRNA)の一方または両方を含んでもよく、本発明のベクターはまた、HIVの治療または診断の目的のためにさらなる有用な産物をコードしてもよい。例えば、一部の実施形態では、これらのベクターはまた、in vivoで遺伝子改変細胞を選択的に維持する目的で、ベクターまたは抗生物質耐性遺伝子を追跡する目的で、緑色蛍光タンパク質(GFP)をコードしてもよい。 20

【0087】

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

【0088】

当業者は、療法用レンチウイルスが、プロモーター領域、調節RNAの標的化、および調節RNAの型に対して代替配列を置換し得ることを理解し得る。さらに、本発明の療法用レンチウイルスは、レンチウイルス粒子をパッケージングするために使用されるプラスミド内に改変を含んでもよい；これらの改変は、in vitroにおける産生のレベルを増加させるために必要となる。 30

【0089】

一部の実施形態では、開示される方法において使用されるベクターは、DNAプラスミド、アデノ随伴ウイルス、または遺伝子送達のための他の組み込みまたは非組み込みベクターシステムであってもよい。

VII.バイオアッセイ

【0090】

一態様では、本発明は、機能的治癒を達成するためのHIV治療の成功を決定するためのバイオアッセイを含む。これらのアッセイは、患者における形質導入されたHIV特異的CD4 T細胞の頻度を測定することによって、開示された免疫化および治療の方法の有効性を測定するための方法を提供し得る。HIV特異的CD4 T細胞は、増殖するか、細胞表面マーカーの組成を改変させるか、リン酸化を含むシグナル伝達経路を誘導するか、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/もしくは核構成成分であり得る特異的マーカータンパク質を発現するため、認識できる。特異的応答CD4 T細胞は、例えば、フローサイトメトリー・ソーティング、磁気ビーズ分離または抗原特異的CD4 T細胞単離についての他の認識された方法を使用して、HIV特異的細胞の選別を可能にする、標識モノクローナル抗体または 40

mRNA配列の特異的 *in situ* 増幅を使用して、認識される。単離した CD4 T 細胞を試験して、統合療法用レンチウイルスを有する細胞の頻度を決定する。HIVに対する応答性および統合療法用レンチウイルスの存在を確認するための質量分析法、PCR、ELISA または抗体染色と組み合わせた、個々の細胞のマイクロ流体分離を含む、単一細胞試験法もまた、使用してもよい。

【0091】

したがって、一実施形態では、本発明による治療（例えば、（a）免疫化、（b）*ex vivo* リンパ球培養；（c）精製タンパク質、不活性化ウイルス、ウイルスベクター化タンパク質、細菌性ベクター化タンパク質、サイトカインおよび／もしくはケモカインを含む生物学的または化学的アジュバント、ビヒクルによる再刺激；および（d）濃縮され形質導入された T 細胞の注入）の適用の後、治療の有効性を決定するために患者を次いで、アッセイしてもよい。体内の標的 T 細胞の閾値は、機能的治癒を測定するために、例えば、約 1×10^8 個の、療法用レンチウイルスによる遺伝子改変を有する HIV 特異的 CD4 T 細胞として確立してもよい。細胞の閾値の値は、全身の内容を指す。それは直接測定することはできないが、代わりに標準的な補正を使用して血液 CD4 T 細胞数から外挿してもよい。例えば、組織中に CD4 T 細胞の 90% が存在し、血液中には 10% しか見つからないと仮定することは、当該技術分野では一般的である。

【0092】

代替的には、閾値は、患者の体内において、約 1×10^5 、約 1×10^6 、約 1×10^7 、約 1×10^9 、または約 1×10^{10} 個の CD4 T 細胞であってもよい。

【0093】

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

【0094】

遺伝的改変を有する抗原特異的 T 細胞を規定するための方法は、当該技術分野において公知である。しかしながら、有効性の標準的な尺度として、識別する HIV 特異的 T 細胞を統合または非統合遺伝子治療構築物と組み合わせるこのような方法を利用することは、HIV 治療の分野における新しい概念である。

VII. 用量および剤形

【0095】

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

【0096】

一実施形態では、最初の *in vivo* 免疫化のための HIV 特異的ワクチンは、様々な用量で、必要とする対象に投与され得る。一般に、筋肉内注射によって送達されるワクチンは、約 10 μg ~ 約 300 μg、約 25 μg ~ 約 275 μg、約 50 μg ~ 約 250 μg、約 75 μg ~ 約 225、または約 100 μg ~ 約 200 μg の HIV タンパク質、あるいは不活性化されたウイルス粒子、ウイルス様粒子、もしくは組換えシステムからの精製ウイルスタンパク質から調製されたか、またはウイルス調製物から精製された全ウイルスタンパク質を含む。組換えウイルスまたは細菌ベクターは、記載されたいかなるルートによって投与されてもよい。筋肉内ワクチンは、約 1 μg ~ 約 100 μg、約 10 μg ~ 約 90 μg、約 20 μg ~ 約 80 μg、約 30 μg ~ 約 70 μg、約 40 μg ~ 約 60 μg または約 50 μg の適切なアジュバント分子を含み、注射用量あたり 0.1 ~ 5 ml の容量の油、生理食塩水、緩衝液または水に懸濁され、可溶性またはエマルション調製物であってもよい。いくつかのウイルスベクター化または細菌性ベクター化ワクチン、融合

10

20

30

40

50

タンパク質、リポソーム製剤または同様の調製物を含む、口腔、直腸、頬、生殖器粘膜または鼻腔内に送達されるワクチンは、より多量のウイルスタンパク質およびアジュバントを含んでもよい。経皮、真皮下または皮下ワクチンは、経口、直腸または鼻腔内送達ワクチンにより類似したタンパク質およびアジュバントの量を利用する。最初の免疫化に対する応答に依存して、ワクチン接種は、送達のための同じまたは代替的なルートを使用して、1～5回繰り返してもよい。間隔は、免疫化間で2～24週間であってもよい。ワクチン接種に対する免疫応答は、血清、血漿、膿分泌物、直腸分泌物、唾液または気管支肺胞洗浄液中のHIV特異的抗体を、ELISAまたは同様の方法を使用して試験することによって測定される。細胞性免疫応答は、ワクチン抗原を用いたin vitro刺激、続いて細胞内サイトカイン蓄積の染色、次いで、フローサイトメトリーまたはリンパ球増殖、リン酸化シグナル伝達タンパク質の発現または細胞表面活性化マーカーの変化を含む同様の方法によって試験される。投薬の上限は、個々の患者に基づいて決定されてもよく、個々の製品または製品ロットの毒性／安全性プロファイルに依存し得る。

【0097】

免疫化は、1回、2回、3回、または繰り返しで行われてもよい。例えば、HIV免疫化のための薬剤は、週1回、隔週に1回、3週間に1回、1ヶ月に1回、隔月に1回、3ヶ月に1回、6ヶ月に1回、9ヶ月に1回、1年に1回、18ヶ月に1回、2年に1回、36ヶ月に1回、または3年に1回、必要な対象に投与されてもよい。

【0098】

免疫化は、CD4 T細胞のex vivoでの増殖および濃縮の前に、少なくとも1回行われるであろうし、ex vivoでのリンパ球の培養／再刺激および注入後は、1回、2回、3回、またはそれ以上の回数で、免疫化を行ってもよい。

【0099】

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

【0100】

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

【0101】

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

【0102】

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

10

20

30

40

50

【0103】

さらなる実施形態では、HIVワクチンを含む医薬的組成物は、舌下または頬側の剤形として製剤化することができる。そのような剤形は、頬と歯茎との間に位置した舌下および頬側錠剤の下で投与される、舌下錠剤または溶液組成物を含む。

【0104】

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

【0105】

一実施形態では、医薬組成物は、懸濁液、エマルションまたはシロップのような経口投与用の液体剤形で製剤化することができる。他の実施形態では、液体剤形は、水および流動パラフィンのような一般的に使用される単純希釈剤に加えて、保湿剤、甘味料、芳香剤または防腐剤のような様々な賦形剤を含むことができる。特定の実施形態では、HIVワクチンを含む組成物またはその薬学的に許容される塩は、小児患者への投与に適するよう10に製剤化することができる。

【0106】

一実施形態では、医薬組成物は、滅菌水溶液、懸濁液、エマルション、非水性溶液または坐剤などの非経口投与のための剤形で製剤化することができる。他の実施形態では、非水性溶液または懸濁液は、プロピレン glycole、ポリエチレン glycole、オリーブ油20のような植物油、またはオレイン酸エチルのような注射可能なエステルを含むことができる。坐剤のベースとして、Witepsol (witepsol)、マクロゴル (macrogol)、ツイーン 61 (tween 61)、カカオ油、ラウリン油またはグリセリン化ゼラチンを使用することができる。

【0107】

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

【0108】

再刺激の目的のために、リンパ球、PBM C 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。単離された細胞は、免疫化に使用されたものと同じ HIVワクチンもしくは活性化剤または異なる 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、単離された細胞は、培養物中の約 10^6 個の細胞 (または任意の他の適切な量) あたり約 10 ng ~ 5 μ g の HIVワクチンまたは活性化剤と接触される。より具体的には、単離された細胞は、培養物中の約 10^6 個の細胞あたり、約 50 ng、約 100 ng、約 200 ng、約 300 ng、約 400 ng、約 500 ng、約 600 ng、約 700 ng、約 800 ng、約 900 ng、約 1 μ g、約 1.5 μ g、約 2 μ g、約 2.5 μ g、約 3 μ g、約 3.5 μ g、約 4 μ g、約 4.5 μ g、または約 5 μ g の HIVワクチンまたは活性化剤と接触させてもよい。30

【0109】

活性化剤またはワクチンは、一般に、各々の *in vitro* 細胞培養に 1 回使用されるが、約 1.5 ~ 約 3.5 日の間隔の後に繰り返してもよい。例えば、繰り返しの投薬は、約 1.5、約 1.6、約 1.7、約 1.8、約 1.9、約 2.0、約 2.1、約 2.2、約 2.3、約 2.4、約 2.5、約 2.6、約 2.7、約 2.8、約 2.9、約 3.0、約 3.1、約 3.2、約 3.3、約 3.4、または約 3.5 日で行ってもよい。

【0110】

濃縮され、再刺激された細胞の形質導入のために、細胞は、レンチウイルスベクターまたはセクション V および図 3 に開示される他の公知のベクターシステムを用いて形質導入されてもよい。形質導入される細胞は、培養中の標的細胞 (または任意の他の適切な量) あたり、(レンチウイルスベクターを含む培養液の RT - PCR アッセイにより測定された) 約 1 ~ 1,000 個のウイルスゲノムと接触させてもよい。レンチウイルスの形質導入は、培養中の標的細胞あたり、1 ~ 1,000 個のウイルスゲノムの同じ範囲を使用し50

て、1～5回繰り返してもよい。

V I I I . 定義

【0111】

本明細書で使用される場合、「約」という用語は、当業者によって理解され、使用される文脈に依存してある程度変化し得る。使用される文脈を考慮しても、当業者に明確ではない用語の使用がある場合には、「約」は特定の用語のプラスまたはマイナス10%を意味し得る。

【0112】

「治療」は、疾患状態を標的とし、これと闘う、すなわち疾患状態を改善または予防することを意図する。したがって、特定の治療は、標的とされる疾患状態および医薬療法および療法アプローチの現在または将来の状態に依存し得る。治療は関連する毒性を有する可能性がある。

10

【0113】

活性剤の「投与」または「投与する」という用語は、本発明の活性剤を、治療の必要な対象に療法上有用な形態で治療有効量をその個体の体内に導入することができる形態で、提供することを意味すると理解されるべきである。

【0114】

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

20

【0115】

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

30

【0116】

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

【0117】

「HIVワクチン」という用語は、HIV特異的免疫応答を誘発することを意図した免疫原とビヒクルとアジュvantを包含する。ワクチンは、HIVであってもよい精製された不活性化ウイルス粒子もしくは不活性化ウイルス粒子全体、またはHIVタンパク質、タンパク質断片またはペプチド、糖タンパク質断片もしくは糖ペプチドを発現することができる組換えウイルスベクター、組換え細菌ベクターに加えて、細胞をHIVタンパク質、特定の免疫を誘発することができる糖タンパク質またはタンパク質断片を産生するように誘導することができるプラスミドDNAまたはRNAを含んでもよい。代替的には、形質導入の前にHIV特異的CD4+T細胞を濃縮する目的のために、または、レンチウイルス形質導入CD4+T細胞のin vitroアッセイのために、抗CD3/CD28ビーズ、T細胞受容体特異的抗体、分裂促進因子、スーパー抗原および他の化学的または生物学的刺激を含む免疫刺激のための特定の方法を使用して、樹状TもしくはB細胞を

40

50

活性化することができる。活性化物質は、可溶性、ポリマー性集合体、リポソームまたはエンドソームベースのまたは連結されたビーズであってもよい。インターロイキン-2、6、7、12、15、23または他を含むサイトカインを添加して、刺激に対する細胞応答を改善し、ならびに／または培養および形質導入間隔を通じてCD4 T細胞の生存を改善することができる。

【0118】

「個体」、「宿主」、「対象」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。

【0119】

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

【0120】

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

【0121】

以下の実施例は、本発明を説明するために与えられる。しかしながら、本発明は、これらの実施例において記載された特定の条件または詳細に限定されるものではないことが理解されるべきである。本明細書で参照されるすべての刊行物は、参照により具体的に組み込まれる。

【実施例】

【0122】

(実施例1)

HIVの治療のための臨床研究

スクリーニングおよびインフォームドコンセント。ウイルス負荷の抑制が安定した、抗レトロウイルス併用療法(CART)を受けた特定のHIV+参加者が選択され参加する。

【0123】

療法用HIVワクチンによる免疫化。既にIND状態であり、HIV+参加者を含む臨床試験に使用されているワクチンが参加者に投与される。このステップは、HIV特異的CD4 T細胞の相対頻度をおよそ1,000倍増加させ得る。

【0124】

次に、白血球アフェレーシスによって血液リンパ球を取り出し、さらに精製して末梢血単核細胞(PBMC)画分とする。代替的には、細胞は、カラムまたは密度勾配法によって静脈血から精製してもよい。

【0125】

培養されたPBMCは、療法用ワクチン中の成分と一致または補完するHIVタンパク質またはペプチドで刺激される(おそらく、その組成に依存して同じワクチンを使用する)。このステップは、HIV特異的CD4 T細胞の相対頻度をおよそ100倍増加させ得る。

10

20

30

40

50

【0126】

培養されたP B M C 細胞に、療法用レンチウイルスまたは他の開示されたベクター、例えば、C C R 5 およびウイルス複製タンパク質の翻訳を干渉するためのスモールR N A をコードするベクターを感染させる。形質導入後、細胞を培養物中で3～7日維持する。

【0127】

形質導入されたC D 4 T 細胞は元の参加者に注入し戻される。注入は、当該技術分野で公知の方法に従って実施することができる。これは、再移植の効率を高めるためにシクロホスファミドでの前処理を必要とすることがある。

【0128】

c A R T を受けている参加者のために、c A R T は期間中維持され得る。注入後、血液 10 中のH I V ウィルス負荷および血液中のレンチウイルス形質導入C D 4 T 細胞の頻度をモニターする。

【0129】

参加者が適格基準（血液および組織区画の総量に $> 10^6$ 、 $> 10^7$ 、 $> 10^8$ 個の、レンチウイルス形質導入、H I V 特異的C D 4 T 細胞を有することを含む）を満たす場合、彼らは有効性の研究に移ってよい。参加者が適格基準を満たしていない場合、同じプロトコールを使用して療法用レンチウイルスの2回目の投与を受けることができるようとしてもよい。

【0130】

さらなる研究およびバイオアッセイ。形質導入されたT 細胞注入の30～60日後に適格参加者のために、遺伝子治療の有効性を試験することを開始する。最初に、彼らの既存のc A R T レジメンにC C R 5 を標的とした治療法を加える。これは、T 細胞上のC C R 5 受容体密度を低下させるC C R 5 遮断薬マラビロクまたは免疫抑制薬ラパマイシンであってもよい。療法用レンチウイルスもまたC C R 5 を標的とし、レンチウイルスとマラビロクまたはラパマイシンの併用効果は、H I V 複製を維持するのに必要なレベルよりも下にC C R 5 を低下させるはずである。 20

【0131】

マラビロクまたはラパマイシンを添加して2週間後に、c A R T 療法を中止し、参加者のH I V ウィルスのリバウンドを念入りにモニターする。リバウンドした場合には、c A R T は彼らの担当医によって再導入され、管理される。 30

【0132】

H I V ウィルスがリバウンドしない場合、治療が中止されるまで、マラビロクまたはラパマイシンのステップダウンが2週間間隔で開始される。

【0133】

ウイルス血症が12～26週間以内に戻らない場合、参加者がH I V の機能的治癒を達成したことになる。

【0134】

H I V 特異的、レンチウイルス形質導入C D 4 T 細胞の数を治療有効性（潜伏H I V 感染または他のマーカーを有する細胞の頻度を含む）に関連付ける値のデータベースは、他の遺伝子治療プロトコールを判定することができるゴールドスタンダードを確立し得る 40。

（実施例2）

抗H I V レンチウイルスベクターの開発

【0135】

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。

【0136】

阻害性R N A デザイン：ホモ・サピエンス（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 ）m R N A の配列を使用して、ヒト細胞のC C R 5 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 候補を探査した。潜在的R N A 干渉配列は、B r o a d I n s t i t u t e からなどの 50

s i R N A または s h R N A デザインプログラムまたは Thermo Scientific からの B L O C K - i T R N A i D e s i g n e r によって選択された候補から選んだ。 s h R N A 発現を調節するために、 H 1 、 U 6 、または 7 S K のような R N A ポリメラーゼ I I I プロモーターのすぐ 3' 側へ、個々の選択した s h R N A 配列をレンチウイルスベクターに挿入した。これらのレンチウイルス - s h R N A 構築物を使用して、細胞に形質導入し、特異的 m R N A レベルの変化を測定した。 m R N A レベルを減少させるために最も強力な s h R N A は、 C M V または E F - 1 アルファ R N A ポリメラーゼ I I プロモーターのいずれかによる発現を可能にするために、マイクロ R N A 骨格内に個々に埋め込んだ。マイクロ R N A 骨格は mirbase.org/ から選択された。 R N A 配列はまた、合成 s i R N A オリゴヌクレオチドとして合成され、レンチウイルスベクターを使用せず 10 に直接細胞内に導入された。

【 0 1 3 7 】

ヒト免疫不全ウイルス 1 型 (H I V - 1 8 5 U S _ B a L 、受託番号 A Y 7 1 3 4 0 9) の B a l 株のゲノム配列を使用して、ヒト細胞における H I V 複製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 候補を探索した。配列相同性および経験に基づいて、 H I V の T a t および V i f 遺伝子の領域に探索の焦点を合わせたが、当業者はこれらの領域の使用が非限定的であり、他の潜在的な標的が選択され得ることを理解し得る。 G a g またはポリメラーゼ遺伝子の高保存領域は、これらの同配列がベクター製造に必要なパッケージングシステム相補性プラスミドに存在したため、 s h R N A によって標的化することができなかった。 C C R 5 (N M 0 0 0 5 7 9 . 3 、 N M 0 0 1 1 0 0 1 6 8 . 1 特異的 R N A) と同様に、潜在的な H I V 特異的 R N A 干渉配列は、 B r o a d I n s t i t u t e (broadinstitute.org/mai/public) が主催する G e n e - E ソフトウェアスイートからなどの s i R N A または s h R N A デザインプログラムまたは Thermo Scientific からの B L O C K - i T R N A i D e s i g n e r (rnadesigner.thermofisher.com/rnaiexpress/setOption.do?designOption=shRNA&pid=6712627360706061801) によって選択された候補から選択された。 s h R N A 発現を調節するために、 H 1 、 U 6 、または 7 S K のような R N A ポリメラーゼ I I I プロモーターのすぐ 3' 側へ、個々の選択した s h R N A 配列をレンチウイルスベクターに挿入した。これらのレンチウイルス - s h R N A 構築物を使用して、細胞に形質導入し、特異的 m R N A レベルの変化を測定した。 m R N A レベルを減少させるために最も強力な s h R N A は、 C M V または E F - 1 アルファ R N A ポリメラーゼ I I プロモーターのいずれかによる発現を可能にするために、マイクロ R N A 骨格内に個々に埋め込んだ。 20 30

【 0 1 3 8 】

ベクター構築 : C C R 5 、 T a t または V i f s h R N A について、 B a m H I および E c o R I 制限部位を含むオリゴヌクレオチド配列が、 E u r o f i n s M W G O p e r o n , L L C によって合成された。オーバーラップするセンスおよびアンチセンスオリゴヌクレオチド配列を混合し、 7 0 から室温まで冷却する間にアニールさせた。レンチウイルスベクターを制限酵素 B a m H I および E c o R I で、 3 7 で 1 時間、消化した。消化したレンチウイルスベクターをアガロースゲル電気泳動で精製し、 I n v i t r o g e n の D N A ゲル抽出キットを使用してゲルから抽出した。 D N A 濃度を決定し、ベクター対オリゴ (3 : 1 の比) を混合し、アニールさせ、ライゲーションした。ライゲーション反応は T 4 D N A リガーゼを用いて室温で 3 0 分間実施した。 2 . 5 マイクロリットルのライゲーションミックスを 2 5 マイクロリットルの S T B L 3 コンピテントバクテリア細胞に添加した。形質転換は、 4 2 でのヒートショック後に達成された。アンピシリンを含有する寒天プレート上にバクテリア細胞を広げ、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、 L B プロスで増殖させた。オリゴ配列の挿入をチェックするために、 I n v i t r o g e n D N A ミニプレップキットを用いて、収穫した細菌培養物からプラスミド D N A を抽出した。レンチウイルスベクター中の s h R N A 配列の挿入を、 s h R N A 発現を調節するために使用されるプロモーターのための特異的プライマーを使用した D N A 配列決定によって確認した。 H I V 複製を 40 50

制限することが公知である例示的なベクター配列および細胞エレメントは、それぞれ図4および9において見出すことができる。

【0139】

例えば、CCR5、TatまたはVif遺伝子発現に対して最も高い活性を有するshRNA配列を、EF-1アルファプロモーターの制御下でマイクロRNA(miR)クラスターに組み入れた。プロモーターおよびmiR配列を図4に示す。

【0140】

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

【0141】

レンチウイルスの試験の開始：10%FBSおよび1%ペニシリン-ストレプトマイシンを補充した RPMI 1640を使用して、T細胞培養培地を作製した。IL2 10000ユーニット/ml、IL12 1μg/ml、IL7 1μg/ml、IL15 1μg/mlのサイトカインストックもまた、前もって調製した。

【0142】

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

【0143】

0~12日目：抗原特異的濃縮：0日目に、凍結保存したPBMCを解凍し、37の培地10mlで1200rpmにて10分間洗浄し、37の培地中で 2×10^6 個/mlの濃度で再懸濁した。37で5%CO₂中に、24ウェルプレート内で0.5ml/ウェルで細胞を培養した。最適刺激条件を定義するために、以下の表2に列挙される試薬の組合せで細胞を刺激した：

【表2】

表2

1	2	3	4	5	6
IL2+IL12	IL7+IL15	ペプチド+ IL2+IL12	ペプチド+ IL7+IL15	MVA+ IL2+IL12	MVA+ IL7+IL15

【0144】

最終濃度：IL2 = 20ユーニット/ml、IL12 = 10ng/ml、IL7 = 10ng/ml、IL15 = 10ng/ml、ペプチド = 5μg/ml 個々のペプチド、MVA MOI = 1。

【0145】

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

【0146】

12~24日目：非特異的な増殖およびレンチウイルスの形質導入：12日目に、刺激された細胞をピペットでプレートから取り出し、新鮮なT細胞培地に 1×10^6 個/mlの濃度で再懸濁した。再懸濁した細胞をT25培養フラスコに移し、製造業者の取扱説明書に従ってDYNABEADS(登録商標)Human T-Activator CD

10

20

30

40

50

3 / C D 2 8 および上に列挙したサイトカインで刺激した；フラスコを垂直位置でインキュベートした。

【 0 1 4 7 】

14日目に、A G T 1 0 3 / C M V - G F P を M O I 2 0 で加え、培養物をインキュベーターに2日間で戻した。この時点で、細胞をピペッティングにより回収し、1 3 0 0 r p m で 1 0 分間の遠心分離によって集め、同じ容量の新鮮な培地に再懸濁し、再び遠心分離して緩やかな細胞ペレットを形成した。その細胞ペレットを、前のステップで使用したのと同じサイトカインを含む新鮮な培地に、1 m l あたり $0 . 5 \times 1 0 ^ 6$ 個の生存可能な細胞で再懸濁した。

【 0 1 4 8 】

14～23日目まで、2日ごとに細胞の数を評価し、細胞を新鮮な培地で $0 . 5 \times 1 0 ^ 6$ 個 / m l に希釈した。サイトカインは毎回、添加された。

【 0 1 4 9 】

24日目に細胞を集め、ビーズを細胞から除去した。ビーズを除去するために、細胞を適切なチューブに移し、ソーティング・マグネット (sorting magnet) 中に2分間置いた。細胞を含む上清を新しいチューブに移した。その後、新鮮な培地中で1日間、 $1 \times 1 0 ^ 6$ 個 / m l で細胞を培養した。抗原特異的 T 細胞およびレンチウイルス形質導入細胞の頻度を決定するためにアッセイを実施した。

【 0 1 5 0 】

起こり得るウイルスの増殖を阻止するために、刺激の初日および培養中の隔日にアンブレナビル (amprenavir ; 0 . 5 n g / m l) を培養物に添加した。

【 0 1 5 1 】

I F N - ガンマについての細胞内サイトカイン染色により抗原特異的 T 細胞を調べる：ペプチド刺激後または $1 \times 1 0 ^ 6$ 細胞 / m l 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) 、 G a g ペプチド (5 μ g / m l の個々のペプチド) 、または P H A (5 μ g / m l 、陽性対照) で刺激した。4時間後、 B D G O L G I P L U G (商標) (1 : 1 0 0 0 、 B D B i o s c i e n c e s) を添加して、ゴルジ輸送を遮断した。8時間後、細胞を洗浄し、製造業者の取扱説明書に従って B D C Y T O F I X / C Y T O P E R M (商標) キットを用いて、細胞外 (C D 3 、 C D 4 または C D 8 ; B D B i o s c i e n c e s) 抗体および細胞内 (I F N - ガンマ ; B D B i o s c i e n c e s) 抗体で染色した。試料を B D F A C S C A L I B U R (商標) フローサイトメーターで分析した。適切なアイソタイプ適合抗体で標識された対照試料を各々の実験に含めた。データは、 F l o w j o ソフトウェアを使用して分析した。

【 0 1 5 2 】

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

【 0 1 5 3 】

これらの結果は、標的 T 細胞集団である C D 4 T 細胞に、 H I V 特異的タンパク質の発現を特異的にノックダウンするようにデザインされたレンチウイルスを用いて形質導入することができ、したがって、ウイルスに対して免疫性である T 細胞の増殖可能な集団を生成することを示す。この例は、 H I V 患者において機能的治癒を生じさせるために、開示されたレンチウイルス構築物をワクチン接種と組み合わせて使用することができることを示す概念の証明となる。

(実施例 3)

実験的ベクターでの C C R 5 ノックダウン

【 0 1 5 4 】

A G T c 1 2 0 は、大量の C D 4 および C C R 5 を安定して発現する H e l a 細胞株である。 L V - C M V - m C h e r r y (C M V 即時型初期プロモーターの制御下で発現される赤色蛍光タンパク質 m C h e r r y) または A G T 1 0 3 / C M V - m C h e r r y

10

20

30

40

50

を用いて、または用いずに、AGTc120を用いて形質導入した。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即時型初期プロモーター）発現カセットによって制御された。AGT103/CMV-mCherryがCCR5、VifおよびTatに対する療法用mRNAを発現した一方で、LV-CMV-mCherryベクターはマイクロRNAクラスターを欠いていた。

【0155】

図5Aに示すように、形質導入効率は>90%であった。7日後、細胞を集め、CCR5に対する蛍光モノクローナル抗体で染色し、分析フローサイトメトリーに供した。CCR5 APCの平均蛍光強度（x軸）に対してモードについて規格化した細胞数（y軸）をプロットしたこれらのヒストグラムにおいて、アイソタイプ対照を灰色で示す。細胞表面CCR5の染色後、レンチウイルス無しまたは対照レンチウイルス（mCherryマークのみを発現する）で処理した細胞は、CCR5密度の変化を示さなかった一方で、AGT103（右側のセクション）はCCR5染色強度をほぼアイソタイプ対照のレベルまで低下させた。7日後、細胞をR5指向性HIVレポーターウィルスBal-GFPを用いてまたは用いずに感染させた。3日後、細胞を集め、フローサイトメトリーにより分析した。90%を超える細胞が形質導入された。AGT103- CMV/CMVmCherryは、形質導入されたAGTc120細胞におけるCCR5発現を低下させ、対照ベクターで処理した細胞と比較してR5指向性HIV感染を遮断した。

【0156】

図5Bは、HIVの感染に対してのトランスフェクトされたAGTc120細胞の相対非感受性を示す。上のように、レンチウイルスベクターはmCherryタンパク質を発現し、またHIVに感染した形質導入細胞（GFPを発現する）は、偽色フローサイトメトリードットプロットの右上四分儀に二重陽性細胞として現れる。HIVが存在しない場合（上パネル）、いかなる条件下においても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は5.6%の細胞が感染し、LV- CMV-mCherryを用いて形質導入されたAGTc120細胞では53.6%の細胞が感染した。療法用AGT103/CMV-mCherryベクターを用いて細胞に形質導入した場合、0.83%の細胞のみが二重陽性四分儀に現れ、このことはそれらが形質導入され、感染したことを示している。

【0157】

53.62（対照ベクターとの二重陽性細胞の割合）を0.83（療法用ベクターとの二重陽性細胞の割合）で割ると、AGT103がこの実験システムにおいてHIVに対して65倍を超える防御を提供したことが示される。

（実施例4）

AGT103はTatおよびVifの発現を減少させる

【0158】

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

10

20

30

【表3】

表3

ベクター名	組成
AGT 103	EF 1-miR30CCR5-miR21 Vif-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 タンパク質を低下させることができる合成マイクロ RNA

miR21 Vif - HIV RNA および Vif タンパク質発現の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 タンパク質発現の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即時型初期転写プロモーター

mCherry - mCherry 赤色蛍光タンパク質のコーディング領域

GFP - 緑色蛍光タンパク質のコーディング領域

WPRE - ウッドチャック肝炎ウイルス転写後調節エレメント

10

20

【0159】

Tリンパ芽球様細胞株 (C E M ; C C R F - C E M ; アメリカ合衆国培養細胞系統保存機関カタログ番号 C C L 1 1 9) に A G T 1 0 3 / C M V - G F P を用いて形質導入した。48時間後、ウイルス配列全体をコードする H I V 発現プラスミドを細胞にトランスフェクトした。24時間後、RNA を細胞から抽出し、逆転写酵素ポリメラーゼ連鎖反応を使用してインタクトな T a t 配列のレベルについて試験した。インタクトな T a t RNA の相対発現レベルは、図 6 に示すように、対照レンチウイルスベクターの存在下でのおよそ 850 から、A G T 1 0 3 / C M V - G F P の存在下でのおよそ 200 に減少し、> 4 倍減少した。

30

【0160】

同様の実験において、H E K 2 9 3 T 細胞 (ヒト胎児腎臓 2 9 3 T ; アメリカ合衆国培養細胞系統保存機関カタログ番号 C R L - 3 2 1 6) 細胞に A G T 1 0 3 / C M V - G F P を用いて形質導入し、その後、形質導入の 7 日後に、H I V 発現プラスミドを細胞にトランスフェクトした (対照は H I V をトランスフェクトされていない)。トランスフェクションの 24 時間後、細胞を溶解し、アクチン (細胞のローディング対照) または H I V V i f タンパク質に特異的な抗体を使用してウェスタンプロットにより分析した。図 7 に示すように、A G T 1 0 3 / C M V - G F P (右レーン) の存在は、V i f タンパク質発現レベルの劇的な低下を引き起こした。

40

(実施例 5)

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

【0161】

H I V に対する療法用ワクチン接種は、C D 4 + 、 C D 8 + および C D 4 + / C D 8 + T 細胞の分布に最小限の影響しか及ぼさなかった。図 8 A に示されるように、C D 4 T 細胞集団は、分析フローサイトメトリードットプロットの左上四分儀に示され、ワクチン接種系列後、全 T 細胞の 5 2 % から 5 7 % に変化する。これらは代表的なデータである。

【0162】

H I V 療法用ワクチン試験における参加者からの末梢血単核細胞を、+ / - インターロ

50

イキン - 2 / インターロイキン - 1 2 または + / - インターロイキン - 7 / インターロイキン - 1 5 の培地で 1 2 日間培養した。T 細胞刺激のためのエピトープペプチドの供給源として、H I V - 1 の全 p 5 5 Gag タンパク質 (J P T P e p M i x) を表す重複ペプチドで、いくつかの培養物を刺激した。これらのペプチドは、長さが 1 0 ~ 2 0 アミノ酸であり、その長さの 2 0 ~ 5 0 % が重複しており、H I V - 1 B a L 株由来の G a g 前駆体タンパク質 (p 5 5) 全体を表す。個々のペプチドの組成および配列は、主な循環 H I V 配列の領域変動を補償するために、または詳細な配列情報がこの療法を受けている個々の患者に利用可能である場合に、調整することができる。培養終了時に、細胞を回収し、抗 C D 4 または抗 C D 8 モノクローナル抗体で染色し、C D 3 + 集団をゲートし、ここに表示した。ワクチン接種前または接種後のいずれかの試料についての P e p M i x 刺激は培地対照と同様であり、このことは、P e p M i x が細胞に対して有毒ではなく、ポリクローナル分裂促進因子としては作用しなかったことを示している。この分析の結果は図 8 B に見出すことができる。

【 0 1 6 3 】

P e p M i x およびインターロイキン - 2 / インターロイキン - 1 2 は、抗原特異的 C D 4 T 細胞の最適な増殖のために提供された。図 8 C の上のパネルに示されるように、P e p M i x に曝露されたワクチン接種後検体において、サイトカイン (インターフェロン - ガンマ) 分泌細胞の増加があった。ワクチン接種前の試料において、抗原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 . 4 3 から 0 . 6 9 % まで増加した。対照的に、ワクチン接種後の試料は、ペプチド刺激の結果として、全 C D 4 T 細胞の 0 . 6 2 から 1 . 7 6 % までのサイトカイン分泌細胞の増加を示した。これらのデータは、H I V 抗原に対する C D 4 T 細胞応答におけるワクチン接種の強い影響を実証する。

【 0 1 6 4 】

最後に、抗原増殖した C D 4 T 細胞の A G T 1 0 3 / C M V - G F P 形質導入は、H I V に対する機能的治癒の一部として患者に注入するために必要とされる H I V 特異的および H I V 耐性ヘルパー C D 4 T 細胞を產生した (他の様々な態様および実施形態に応じて、A G T 1 0 3 は単独で、またはさらなる追加のエレメントなしで使用されてもよい ; 例えば、臨床実施形態は C M V - G F P セグメントを含まなくてもよい)。図 8 D の上のパネルは、培養物中の C D 4 + T 細胞集団を分析した結果を示す。図 8 D の x 軸は、緑色蛍光タンパク質 (G F P) 放出を示しており、このことは、個々の細胞に A G T 1 0 3 / C M V - G F P が形質導入されたことを示している。ワクチン接種後の試料において、両方のサイトカイン分泌であった全 C D 4 T 細胞の 1 . 1 1 % が回収され、このことは、細胞が H I V 抗原に特異的に応答し、これらの細胞に A G T 1 0 3 / C M V - G F P が形質導入されることを示している。これは、H I V の注入および機能的治癒を意図した標的細胞集団および臨床産物である。e x v i v o 培養の抗原刺激およびその後のポリクローナル増殖期の間の細胞増殖の効率で、4 × 1 0 ⁸ 個の抗原特異的な、レンチウイルス形質導入 C D 4 T 細胞を產生することができる。これは、細胞產生の標的を 4 倍超えており、およそ 4 0 細胞 / マイクロリットルの血液またはおよそ 5 . 7 % の全循環 C D 4 T 細胞の抗原特異的および H I V 耐性 C D 4 T 細胞の数を達成することができるであろう。

【 0 1 6 5 】

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

【表4】

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

【0166】

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

特定の実施形態では、例えば以下の項目が提供される。

(項目1)

HIV 感染を治療する方法であって、

(a) HIV 感染の治療を必要とする対象を識別するステップ；

(b) HIV ワクチンの治療有効量で前記対象を免疫化するステップ；

(c) 前記対象からリンパ球を取り出し、そして末梢血単核細胞 (PBM C) を精製するステップ；

(d) ex vivo において、前記 PBM C を治療有効量の HIV ワクチンと接触させるステップ；

(e) ex vivo において、少なくとも 1 つの遺伝子エレメントをコードするウイルス送達システムを前記 PBM C に形質導入するステップ；

(f) 前記形質導入された PBM C を約 1 ~ 約 35 日間培養するステップ；および

(g) 前記形質導入された PBM C を前記対象に注入するステップ

を含む方法。

(項目2)

ステップ (b) およびステップ (d) が同じ HIV ワクチンを含む、項目 1 に記載の方法。

(項目3)

ステップ (b) およびステップ (d) が異なる HIV ワクチンを含む、項目 1 に記載の方法。

(項目4)

前記形質導入された PBM C を前記対象に注入する前に、前記対象が cART または HART を受けている、項目 1 に記載の方法。

(項目5)

前記形質導入された PBM C を前記対象に注入する前に、前記対象がシクロホスファミド前治療を受ける、項目 1 に記載の方法。

(項目6)

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 CCR5 の産生を阻害す

10

20

30

40

50

ることができるスモールRNA、ケモカイン受容体CXCR4の産生を阻害することができるスモールRNA、およびHIV RNA配列を標的とするスモールRNA分子からなる群から選択される、項目1に記載の方法。

(項目7)

HIV RNA配列を標的とする前記スモールRNA分子が、gag、pol、env、tat、rev、nef、vif、vpr、vpu、tev、LTR、TAR、RRE、PE、SLIP、CRS、またはINSを対象とする、項目6に記載の方法。

(項目8)

前記形質導入されたPBM Cが前記対象に注入される前に、前記形質導入されたPBM Cが約1～約10日間培養される、項目1に記載の方法。

10

(項目9)

ケモカイン受容体CCR5の産生を阻害することができるスモールRNA、ケモカイン受容体CXCR4の産生を阻害することができるスモールRNA、およびHIV RNA配列を標的とするスモールRNA分子からなる群から選択される、少なくとも1つの遺伝子エレメントをコードする、HIV特異的CD4 T細胞に形質導入するためのウイルスベクター。

(項目10)

レンチウイルスである、項目9に記載のウイルスベクター。

(項目11)

ベクター内ベクターシステム(vector-in-vector system)である、項目9に記載のウイルスベクター。

20

(項目12)

HIV RNA配列を標的とする前記スモールRNA分子が、gag、pol、env、tat、rev、nef、vif、vpr、vpu、tev、LTR、TAR、RRE、PE、SLIP、CRS、またはINSを対象とする、項目9に記載のウイルスベクター。

(項目13)

療法用レンチウイルスによる遺伝子改変を有するHIV特異的CD4 T細胞の数を決定するステップを含む、HIV+対象が機能的に治癒しているか否かを決定するためのバイオアッセイであって、前記療法用レンチウイルスによる遺伝子改変を有するHIV特異的CD4 T細胞の数が、項目1に記載の治療の後の特定の時間後に閾値を上回る場合に、前記対象が機能的に治癒している、バイオアッセイ。

30

(項目14)

前記閾値が、約 1×10^8 個の、療法用レンチウイルスによる遺伝子改変を有するHIV特異的CD4 T細胞である、項目13に記載の方法。

(項目15)

治療の後の特定の前記時間が約30～約60日間である、項目13に記載の方法。

(項目16)

治療の後の特定の前記時間が約12～約26週間である、項目13に記載の方法。

40

(項目17)

HIV+対象におけるHIVの機能的治癒を達成する方法であって、

(a) HIV+である対象を識別するステップ；

(b) HIVワクチンの治療有効量で前記対象を免疫化するステップ；

(c) 前記対象からリンパ球を取り出し、そして末梢血単核細胞(PBMC)を精製するステップ；

(d) ex vivoにおいて、前記PBMCを治療有効量のHIVワクチンと接触させるステップ；

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

(f) 前記形質導入されたPBMCを、約1～約21日間、培養するステップ；および

50

(g) 前記形質導入されたP B M Cを前記対象に注入するステップであって、前記H I V + 対象は機能的治癒を達成する、ステップを含む方法。

(項目18)

ステップ(b)およびステップ(d)が、同じH I Vワクチンを含む、項目18に記載の方法。

(項目19)

ステップ(b)およびステップ(d)が、異なるH I Vワクチンを含む、項目18に記載の方法。

(項目20)

前記形質導入されたP B M Cを前記対象に注入する前に、前記対象がc A R TまたはH A A R Tを受けていた、項目18に記載の方法。

(項目21)

前記形質導入されたP B M Cを前記対象に注入する前に、前記対象がシクロホスファミド前治療を受ける、項目18に記載の方法。

(項目22)

前記少なくとも1つの遺伝子エレメントが、ケモカイン受容体C C R 5の産生を阻害することができるスモールR N A、ケモカイン受容体C X C R 4の産生を阻害することができるスモールR N A、およびH I V R N A配列を標的とするスモールR N A分子からなる群から選択される、項目18に記載の方法。

(項目23)

H I V R N A配列を標的とする前記スモールR N A分子が、g a g、p o l、e n v、t a t、r e v、n e f、v i f、v p r、v p u、t e v、L T R、T A R、R R E、P E、S L I P、C R S、またはI N Sを対象とする、項目22に記載の方法。

(項目24)

前記形質導入されたP B M Cが前記対象に注入される前に、前記形質導入されたP B M Cが約1～約7日間、培養される、項目18に記載の方法。

10

20

【図1】

HIV特異的CD4 T細胞の濃縮(ワクチン)および保護(AGT-LV)

血液中のCD4 T細胞は非常に多様で、
HIV特異的細胞はまれである
(100,000個に1個)。

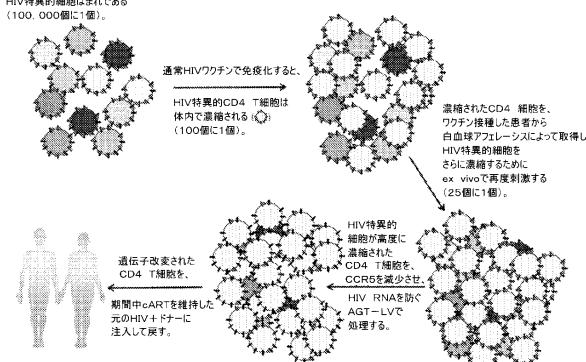


Figure 1

【図2】

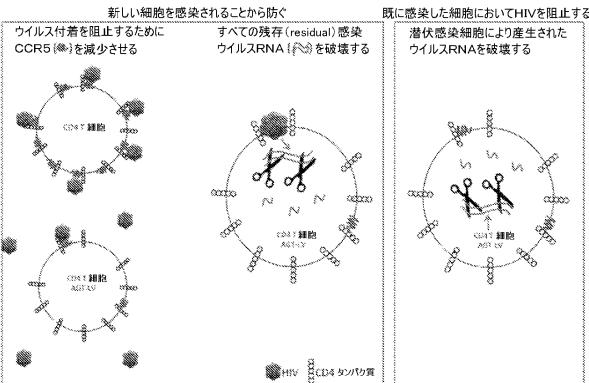


Figure 2

【図3】

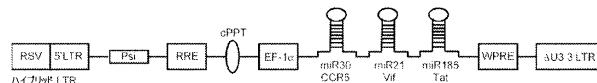


Figure 3

【図4】

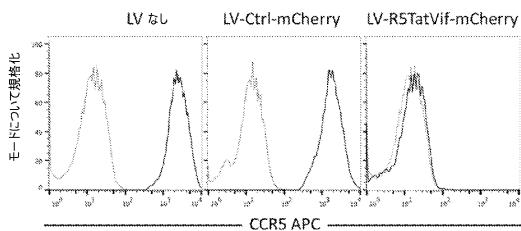
伸長因子-1アルファ(EF1-アルファ)プロモーター(イタリック)

ACCGGTGCTTAGAGAAGGTTGGCGGGGTAACACTGGAAAGTGATGTCGTGATGGCTCCGCTTTTCCCAG
GGTGGGGGAGAACGTTATAAGTCAGTAGTCGCGCTGAAACGTTCTTTCGCAACGGGTTTGCGCCAGAACAA
CAGGTAAGTGGCTGTTGGTGGTCCCAGGGCTCTGGCTTACGGGTTATGGCTTGCCTGCTTGAATTACT
CCAGGCCCCCTGGCTGAGTAGCTGATTTCTGATCCCGAGCTGGGTTGGAAGTGGGTTGGGAGAGTTCGAAGGGCT
TCCGCTTAAGGAGGCCCTTCGCGCTCGCTGCTGCTTGCATAAGTCTCTAGCCATTAAAATTTTGATGACCTGCGCAG
TGGTGGCACCTTCGCGCTGCTGCGCTGCTTGCATAAGTCTCTAGCCATTAAAATTTTGATGACCTGCGCAG
GCTTTTTCTGGCAAGAGTAGCTGTTAAATGGGGGCAAGATGATCTGACACTGGTATTCTGGGTTGGGGCC
GGGGGGCGGAGCGGGGGCTGGCTCCAGCGCACATGTCGGGAGGGCGGGGCTGCGAGCGCGGGGACCC
GAATGGAGACGGGGTAGGCTCAAGCTGGGGGCTGCTGGTGGCTGGCTGGCGCCGCGCTGATCGCCCG
CTCTGGCGCAAGGCTGGGGGCTGGCGCACAGTGGCTGAGCGGAAAGATGGCGCTTCCGGGCTGCTGCA
GGGAGCTAAATGGGGGAGCGGGGCTGGGAGAGCGGGGGGGTGGAGTCACCCACACAAAGGAAAGGGCT
TTCCTGGCTCAGCGCTGCTTCAATGTAAGTCCACGGAGTACCGGGCGCGCTCAGGACCTCGATTAGTCTCGAG
CTTTGGAGTACGTCGTCCTAGGTTGGGGGGGGGGTTTATGCGATGGAGTTCCCACTAGTGGGGTGG
GACTGAAGTTAGGGCAGCTGGGACTGATGTAATTCTCTGGAAATTGCCCTTGTGAGTTGGATCTGGTC
ATTCTCAAGCTCAGACAGTGGTCAAGGTTTTCTCCATTCAGGTTGCTGAGGAATTGGCGAAGCTAATC
TGCAGATTGAGGGTAGAGAGCAAGCACAGTTACCGCTGCCACTGACATTTGGT
CTACTGTGAAGGCCACAGATGGTAGAGAGCAAGCACAGTTACCGCTGCCACTGACATTTGGT
miR30 CCR5 開始
TGCAGATTGAGGGTAGAGAGCAAGCACAGTTACCGCTGCCACTGACATTTGGT
CTACTGTGAAGGCCACAGATGGTAGAGAGCAAGCACAGTTACCGCTGCCACTGACATTTGGT
miR30 CCR5 終結
ACTTCAAGGGGCTTCCGGCATCTCCATGGCTGTACCAACCTTGTGGGGGATGTGACTT
CTGAACTTGTGTTGAATCTCATGGAGGTTCAAGAAGAACACATCCGACTGACATTTGGT
miR21 Vif 開始
TCTTCATCTGACCAAGCTGGCTGGCTGAGCAGGGGGCGAGGGGATTCCGCTTCTC
CTGCCATAGCGTGGTCCCCCTATGGCAGGCAGAAGCGGCACCTCCCTCCAAATGA
miR21 Vif 終結
mR185 Tat 開始
CCCCTCTCGTCCCCTGGCTGAGCATGCA
mR185 Tat 終結

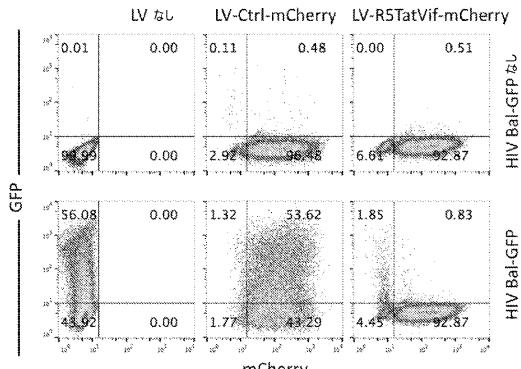
Figure 4

【図5】

A



B



【図6】

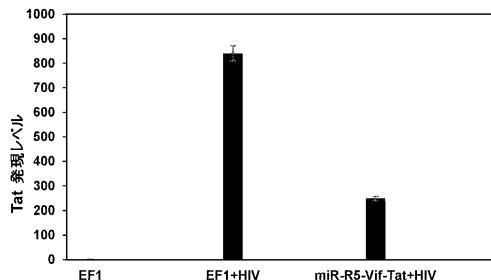


Figure 6

【図7】

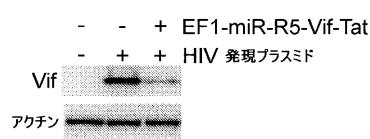


Figure 7

【図8 A B】

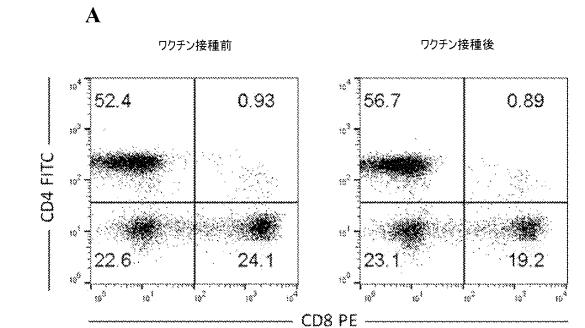


Figure 6

B

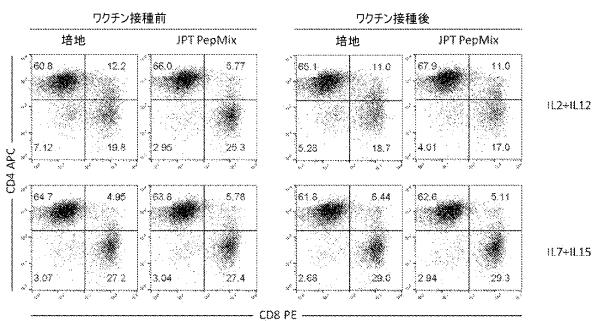
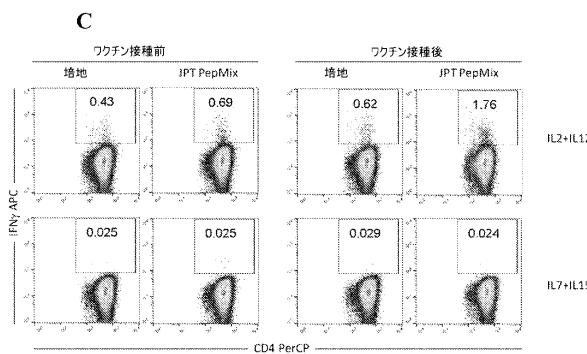


Figure 8

【図8 C D】



D

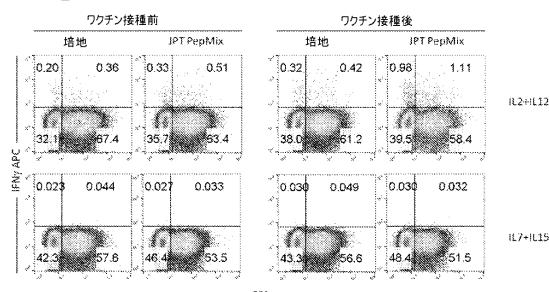


Figure 8 続き

【図9 - 1】

TREX1 - ヒト:オーブンリーディングフレーム:3プライム修復エキソヌクレアーゼ1

1 atggcggccatc ttcattttttt cccatgggg gggccatggg gggccatggg tggccatggc tccggccatgg
 61 gttccggccgg tggccatggc agatgtggcc tggggggggcc cccggccatgg
 121 cccggccatgg ctcggccatgg tccggccatgg tggccatggc tccggccatgg
 181 gttccggccgg tggccatggc cccggccatgg tggccatggc tccggccatgg
 241 gttccggccgg cccggccatgg tccggccatgg tggccatggc tccggccatgg
 301 ttcggccatgg gggccatggc tccggccatgg tggccatggc tccggccatgg
 361 ttcggccatgg tccggccatgg gggccatggc tccggccatgg tggccatggc
 421 ttcggccatgg atccggccatgg tccggccatgg gggccatggc tccggccatgg
 481 cccggccatgg cccggccatgg tccggccatgg tggccatggc tccggccatgg
 541 cccggccatgg cccggccatgg tccggccatgg tggccatggc tccggccatgg
 601 aacccggccatgg aacccggccatgg tccggccatgg tggccatggc tccggccatgg
 661 aacccggccatgg tggccatggc tccggccatgg aacccggccatgg tggccatggc
 721 aacccggccatgg tggccatggc tccggccatgg aacccggccatgg tggccatggc
 781 aacccggccatgg tggccatggc tccggccatgg aacccggccatgg tggccatggc
 841 cccggccatgg tggccatggc tccggccatgg aacccggccatgg tggccatggc
 901 aacccggccatgg tggccatggc tccggccatgg aacccggccatgg tggccatggc

Figure 9

【図9 - 2】

TREX2 - ヒト:オーブンリーディングフレーム:3プライム修復エキソヌクレアーゼ2

1 cccggccatgg aacccggccatgg tccggccatgg aacccggccatgg tggccatggc
 61 cccggccatgg aacccggccatgg tccggccatgg aacccggccatgg tggccatggc
 121 cccggccatgg tccggccatgg tggccatggc tccggccatgg aacccggccatgg
 181 cccggccatgg tccggccatgg tggccatggc tccggccatgg aacccggccatgg
 241 cccggccatgg tccggccatgg tggccatggc tccggccatgg tggccatggc
 301 ttcggccatgg cccggccatgg tccggccatgg tggccatggc tccggccatgg
 361 ttcggccatgg cccggccatgg tccggccatgg tggccatggc tccggccatgg
 421 ttcggccatgg tccggccatgg tggccatggc tccggccatgg aacccggccatgg
 481 cccggccatgg tccggccatgg tggccatggc tccggccatgg aacccggccatgg
 541 cccggccatgg tccggccatgg tggccatggc tccggccatgg aacccggccatgg
 601 aacccggccatgg aacccggccatgg tccggccatgg tggccatggc tccggccatgg
 661 aacccggccatgg tccggccatgg tggccatggc tccggccatgg aacccggccatgg
 721 aacccggccatgg tccggccatgg tggccatggc tccggccatgg aacccggccatgg
 781 aacccggccatgg tccggccatgg tggccatggc tccggccatgg aacccggccatgg
 841 aacccggccatgg tccggccatgg tggccatggc tccggccatgg aacccggccatgg
 901 aacccggccatgg tccggccatgg tggccatggc tccggccatgg aacccggccatgg
 961 cccggccatgg tccggccatgg aacccggccatgg tccggccatgg tggccatggc
 1021 cccggccatgg tccggccatgg aacccggccatgg tccggccatgg aacccggccatgg
 1081 cccggccatgg tccggccatgg aacccggccatgg tccggccatgg aacccggccatgg
 1141 gatccggccatgg aacccggccatgg tccggccatgg aacccggccatgg tccggccatgg

Figure 9 続き

【図9-3】

MxD - ヒト:オープンリーディングフレーム: SAMドメインおよびHDドメイン含有タンパク質

1 attgcgcgtt cgaggggcgc cccggggcaag wccgcgttgg ctgcgttgcg cggagggttc
 61 aactctgtgtt ggcgcgttgg agggggccas tagtgcgttca atacttctttt gacccggcc
 121 caggcccttctt ctgttcgttgcg gcttgcgttc ggttccggcc cggagggttt tgatgtgt
 181 gccggccgttcc aggttggatcc atggggggccgg cggatgtttttt ggggggggg
 241 gttggcgatcc cccggggatcc acaccccttc cggagggtttt ggttgcgtcc
 301 cggggccgttgc aatccatccg gacttacggaa catgggttcc gggagggtttt tgccgttcc
 361 tcaggccgttgg tggttttttcc gggccgttgc tgctggatcc cttccggatcc aatggaaatcc
 421 cggggccgttgc aatccatccg ctgtatgtttt cttccggatcc aatggaaatcc
 481 tgccggatccgg gggggggatcc ctgtatgtttt cttccggatcc aatggaaatcc
 541 caatggatccgg aatggaaatcc
 601 gaaatggatccgg aatggaaatcc
 661 actatgtttt tccggatccgg aatggaaatcc
 721 tagccggatccgg tccggatccgg aatggaaatcc
 781 gatccggatccgg tccggatccgg aatggaaatcc
 841 tccggatccgg tccggatccgg aatggaaatcc
 901 tccggatccgg tccggatccgg aatggaaatcc
 961 tggggatccgg aatggaaatcc
 1021 gatccggatccgg tccggatccgg aatggaaatcc
 1081 aatggatccgg tccggatccgg aatggaaatcc
 1141 attatggatccgg tccggatccgg aatggaaatcc
 1201 ttatggatccgg tccggatccgg aatggaaatcc
 1261 aatggatccgg aatggaaatcc
 1321 attatggatccgg aatggaaatcc
 1381 attatggatccgg aatggaaatcc
 1441 acggatccgg aatggaaatcc
 1501 tttatggatccgg aatggaaatcc
 1561 tccatgtttt ggttggatccgg
 1621 aatccatggatccgg aatggaaatcc
 1681 tttatggatccgg aatggaaatcc
 1741 aatccatggatccgg aatggaaatcc
 1801 aatccatggatccgg aatggaaatcc
 1861 tttatggatccgg aatggaaatcc
 1921 aatccatggatccgg aatggaaatcc
 1981 aatccatggatccgg aatggaaatcc
 2041 aatccatggatccgg aatggaaatcc
 2101 tttatggatccgg aatggaaatcc
 2161 aatccatggatccgg aatggaaatcc
 2221 tttatggatccgg aatggaaatcc
 2281 tttatggatccgg aatggaaatcc
 2341 aatccatggatccgg aatggaaatcc
 2401 ctgtatgtttt ctgtatgtttt tttatggatccgg aatggaaatcc
 2461 ccccaatgtttt ctgtatgtttt tttatggatccgg aatggaaatcc
 2521 gatccatgtttt ctgtatgtttt tttatggatccgg aatggaaatcc
 2581 gatccatgtttt ctgtatgtttt tttatggatccgg aatggaaatcc
 2641 gatccatgtttt ctgtatgtttt tttatggatccgg aatggaaatcc
 2701 tttatggatccgg aatggaaatcc
 2761 tttatggatccgg aatggaaatcc
 2821 gatccatgtttt ctgtatgtttt tttatggatccgg aatggaaatcc
 2881 gatccatgtttt ctgtatgtttt tttatggatccgg aatggaaatcc
 2941 gatccatgtttt ctgtatgtttt tttatggatccgg aatggaaatcc
 3001 tttatggatccgg aatggaaatcc
 3061 tttatggatccgg aatggaaatcc
 3121 tttatggatccgg aatggaaatcc
 3181 tttatggatccgg aatggaaatcc
 3241 tttatggatccgg aatggaaatcc

Figure 9 続き

【図9-5】

MxD - ヒト:オープンリーディングフレーム

1 aatggatccgg tttatggatccgg gatccatgtttt ctgtatgtttt tttatggatccgg aatggaaatcc
 61 aatggatccgg tttatggatccgg gatccatgtttt ctgtatgtttt tttatggatccgg aatggaaatcc
 121 aatggatccgg tttatggatccgg gatccatgtttt ctgtatgtttt tttatggatccgg aatggaaatcc
 181 tttatggatccgg aatggaaatcc
 241 ctgtatgtttt ctgtatgtttt tttatggatccgg aatggaaatcc
 301 tttatggatccgg aatggaaatcc
 361 aatggatccgg tttatggatccgg aatggaaatcc
 421 ctgtatgtttt ctgtatgtttt tttatggatccgg aatggaaatcc
 481 aatggatccgg tttatggatccgg aatggaaatcc
 541 gatccatgtttt ctgtatgtttt tttatggatccgg aatggaaatcc
 601 gatccatgtttt ctgtatgtttt tttatggatccgg aatggaaatcc
 661 gatccatgtttt ctgtatgtttt tttatggatccgg aatggaaatcc
 721 gatccatgtttt ctgtatgtttt tttatggatccgg aatggaaatcc
 781 gatccatgtttt ctgtatgtttt tttatggatccgg aatggaaatcc
 841 gatccatgtttt ctgtatgtttt tttatggatccgg aatggaaatcc
 901 gatccatgtttt ctgtatgtttt tttatggatccgg aatggaaatcc
 961 gatccatgtttt ctgtatgtttt tttatggatccgg aatggaaatcc
 1021 gatccatgtttt ctgtatgtttt tttatggatccgg aatggaaatcc
 1081 aatggatccgg tttatggatccgg aatggaaatcc
 1141 aatggatccgg tttatggatccgg aatggaaatcc
 1201 ctgtatgtttt ctgtatgtttt tttatggatccgg aatggaaatcc
 1261 ctgtatgtttt ctgtatgtttt tttatggatccgg aatggaaatcc
 1321 ctgtatgtttt ctgtatgtttt tttatggatccgg aatggaaatcc
 1381 ctgtatgtttt ctgtatgtttt tttatggatccgg aatggaaatcc
 1441 ctgtatgtttt ctgtatgtttt tttatggatccgg aatggaaatcc
 1501 ctgtatgtttt ctgtatgtttt tttatggatccgg aatggaaatcc
 1561 ctgtatgtttt ctgtatgtttt tttatggatccgg aatggaaatcc
 1621 ctgtatgtttt ctgtatgtttt tttatggatccgg aatggaaatcc
 1681 ctgtatgtttt ctgtatgtttt tttatggatccgg aatggaaatcc
 1741 ctgtatgtttt ctgtatgtttt tttatggatccgg aatggaaatcc
 1801 ctgtatgtttt ctgtatgtttt tttatggatccgg aatggaaatcc
 1861 ctgtatgtttt ctgtatgtttt tttatggatccgg aatggaaatcc
 1921 ctgtatgtttt ctgtatgtttt tttatggatccgg aatggaaatcc
 1981 ctgtatgtttt ctgtatgtttt tttatggatccgg aatggaaatcc
 2041 ctgtatgtttt ctgtatgtttt tttatggatccgg aatggaaatcc
 2101 ctgtatgtttt ctgtatgtttt tttatggatccgg aatggaaatcc
 2161 ctgtatgtttt ctgtatgtttt tttatggatccgg aatggaaatcc
 2221 ctgtatgtttt ctgtatgtttt tttatggatccgg aatggaaatcc
 2281 ctgtatgtttt ctgtatgtttt tttatggatccgg aatggaaatcc
 2341 ctgtatgtttt ctgtatgtttt tttatggatccgg aatggaaatcc
 2401 ctgtatgtttt ctgtatgtttt tttatggatccgg aatggaaatcc
 2461 ctgtatgtttt ctgtatgtttt tttatggatccgg aatggaaatcc
 2521 ctgtatgtttt ctgtatgtttt tttatggatccgg aatggaaatcc
 2581 ctgtatgtttt ctgtatgtttt tttatggatccgg aatggaaatcc
 2641 ctgtatgtttt ctgtatgtttt tttatggatccgg aatggaaatcc
 2701 ctgtatgtttt ctgtatgtttt tttatggatccgg aatggaaatcc
 2761 ctgtatgtttt ctgtatgtttt tttatggatccgg aatggaaatcc
 2821 ctgtatgtttt ctgtatgtttt tttatggatccgg aatggaaatcc
 2881 ctgtatgtttt ctgtatgtttt tttatggatccgg aatggaaatcc

Figure 9 続き

【図9-4】

MxD - ヒト:オープンリーディングフレーム: SAMドメインおよびHDドメイン含有タンパク質

1 cgaggccggaa tttatggatccgg actgtatgtttt ctgtatgtttt tttatggatccgg aatggaaatcc
 61 tttatggatccgg aatggaaatcc
 121 ctgtatgtttt ctgtatgtttt tttatggatccgg aatggaaatcc
 181 aatggatccgg aatggaaatcc
 241 gttggatccgg aatggaaatcc
 301 aatggatccgg aatggaaatcc
 361 ctgtatgtttt ctgtatgtttt tttatggatccgg aatggaaatcc
 421 ctgtatgtttt ctgtatgtttt tttatggatccgg aatggaaatcc
 481 aatggatccgg aatggaaatcc
 541 gttggatccgg aatggaaatcc
 601 ctgtatgtttt ctgtatgtttt tttatggatccgg aatggaaatcc
 661 aatggatccgg aatggaaatcc
 721 aatggatccgg aatggaaatcc
 781 aatggatccgg aatggaaatcc
 841 aatggatccgg aatggaaatcc
 901 aatggatccgg aatggaaatcc
 961 aatggatccgg aatggaaatcc
 1021 aatggatccgg aatggaaatcc
 1081 aatggatccgg aatggaaatcc
 1141 aatggatccgg aatggaaatcc
 1201 aatggatccgg aatggaaatcc
 1261 aatggatccgg aatggaaatcc
 1321 aatggatccgg aatggaaatcc
 1381 aatggatccgg aatggaaatcc
 1441 aatggatccgg aatggaaatcc
 1501 aatggatccgg aatggaaatcc
 1561 aatggatccgg aatggaaatcc
 1621 aatggatccgg aatggaaatcc
 1681 aatggatccgg aatggaaatcc
 1741 aatggatccgg aatggaaatcc
 1801 aatggatccgg aatggaaatcc
 1861 aatggatccgg aatggaaatcc
 1921 aatggatccgg aatggaaatcc
 1981 aatggatccgg aatggaaatcc
 2041 aatggatccgg aatggaaatcc
 2101 aatggatccgg aatggaaatcc
 2161 aatggatccgg aatggaaatcc
 2221 aatggatccgg aatggaaatcc
 2281 aatggatccgg aatggaaatcc
 2341 aatggatccgg aatggaaatcc
 2401 aatggatccgg aatggaaatcc
 2461 aatggatccgg aatggaaatcc
 2521 aatggatccgg aatggaaatcc
 2581 aatggatccgg aatggaaatcc
 2641 aatggatccgg aatggaaatcc
 2701 aatggatccgg aatggaaatcc
 2761 aatggatccgg aatggaaatcc
 2821 aatggatccgg aatggaaatcc
 2881 aatggatccgg aatggaaatcc

Figure 9 続き

【図9-6】

APOBEC3G - ヒト:オープンリーディングフレーム: アポボンバク質 B mRNA編集酵素、触媒ポリペプチド3G (APOBEC3G)

1 tttatggatccgg aatggaaatcc
 61 ctgtatgtttt ctgtatgtttt tttatggatccgg aatggaaatcc
 121 ctgtatgtttt ctgtatgtttt tttatggatccgg aatggaaatcc
 181 gttggatccgg aatggaaatcc
 241 gttggatccgg aatggaaatcc
 301 gttggatccgg aatggaaatcc
 361 aatggatccgg aatggaaatcc
 421 aatggatccgg aatggaaatcc
 481 aatggatccgg aatggaaatcc
 541 aatggatccgg aatggaaatcc
 601 aatggatccgg aatggaaatcc
 661 aatggatccgg aatggaaatcc
 721 aatggatccgg aatggaaatcc
 781 aatggatccgg aatggaaatcc
 841 aatggatccgg aatggaaatcc
 901 aatggatccgg aatggaaatcc
 961 aatggatccgg aatggaaatcc
 1021 aatggatccgg aatggaaatcc
 1081 aatggatccgg aatggaaatcc
 1141 aatggatccgg aatggaaatcc
 1201 aatggatccgg aatggaaatcc
 1261 aatggatccgg aatggaaatcc
 1321 aatggatccgg aatggaaatcc
 1381 aatggatccgg aatggaaatcc
 1441 aatggatccgg aatggaaatcc
 1501 aatggatccgg aatggaaatcc
 1561 aatggatccgg aatggaaatcc
 1621 aatggatccgg aatggaaatcc
 1681 aatggatccgg aatggaaatcc
 1741 aatggatccgg aatggaaatcc
 1801 aatggatccgg aatggaaatcc
 1861 aatggatccgg aatggaaatcc
 1921 aatggatccgg aatggaaatcc
 1981 aatggatccgg aatggaaatcc
 2041 aatggatccgg aatggaaatcc
 2101 aatggatccgg aatggaaatcc
 2161 aatggatccgg aatggaaatcc
 2221 aatggatccgg aatggaaatcc
 2281 aatggatccgg aatggaaatcc
 2341 aatggatccgg aatggaaatcc
 2401 aatggatccgg aatggaaatcc
 2461 aatggatccgg aatggaaatcc
 2521 aatggatccgg aatggaaatcc
 2581 aatggatccgg aatggaaatcc
 2641 aatggatccgg aatggaaatcc
 2701 aatggatccgg aatggaaatcc
 2761 aatggatccgg aatggaaatcc
 2821 aatggatccgg aatggaaatcc
 2881 aatggatccgg aatggaaatcc
 1801 aatggatccgg aatggaaatcc

Figure 9 続き

【図 9 - 7】

TRIM5 アルファ … ヒト:オーブンリーティングフレーム; 三者モチーフ含有5 (tripartite motif containing 5; TRIM5)

Figure 9 続き

【 図 9 - 8 】

テザリン (BST2) … ヒト;オープンリー・ディングフレーム

Figure 9 続き

フロントページの続き

(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

審査官 小堀 麻子

(56)参考文献 Mol Ther, 2009年, Vol.17, No.12, p.2103-14

Curr Med Chem, 2012年, Vol.19, No.29, p.5044-51

J Immunol Methods, 2014年, Vol.414, p.1-10

J Immunol Res, 2015年 5月, Vol.2015, Article ID 503978

Blood, 2005年, Vol.106, p.818-826

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A 61 K 35 / 00

A 61 K 31 / 00

A 61 K 48 / 00

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)