

(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 I

A 6 1 K 35/17	(2015.01)	A 6 1 K 35/17	Z N A
A 6 1 K 48/00	(2006.01)	A 6 1 K 48/00	
A 6 1 K 31/675	(2006.01)	A 6 1 K 31/675	
A 6 1 P 31/18	(2006.01)	A 6 1 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】 H I V 予備免疫化および免疫療法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

H I V 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 C D 4 T 細胞 を含む組成物であって、前記方法が、

- (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 C D 4 T 細胞 を精製するステップ；
- (d) ex vivo において、前記 C D 4 T 細胞 を治療有効量の H I V 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 C D 4 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、H I V R N A 配列を標的とすることができるスモール R N A である、ステップ；
- (f) 前記形質導入された C D 4 T 細胞 を約 1 ~ 約 3 5 日間培養するステップ；および
- (g) 前記形質導入された C D 4 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 H I V ワクチンを含む、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 3】

10

20

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、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 4】

前記形質導入された C D 4 T 細胞 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、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 5】

前記形質導入された C D 4 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、C C R 5 を標的とすることができるスモール R N A をさらに含む、請求項 1 に記載の組成物。

10

【請求項 7】

H I V R N A 配列を標的とすることができる少なくとも 1 つの前記スモール R N A 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 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 C D 4 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 C D 4 T 細胞 が約 1 ～ 約 1 0 日間培養される、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 9】

20

H I V + 対象における H I V の機能的治癒を達成する方法において使用するための、形質導入された C D 4 T 細胞 を含む組成物であって、前記方法が、

(a) H I V + であ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 C D 4 T 細胞 を精製するステップ；

(d) e x v i v o において、前記 C D 4 T 細胞 を治療有効量の H I V ワクチンと接触させるステップ；

(e) e x v i v o において、少なくとも 1 つの遺伝子エレメントをコードするウイルス送達システムを用いて前記 C D 4 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、H I V R N A 配列を標的とすることができるスモール R N A である、

30

ステップ；

(f) 前記形質導入された C D 4 T 細胞 を、約 1 ～ 約 2 1 日間、培養するステップ；および

(g) 前記形質導入された C D 4 T 細胞 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、組成物。

【請求項 10】

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、請求項 9 に記載の組成物。

【請求項 11】

40

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、請求項 9 に記載の組成物。

【請求項 12】

前記形質導入された C D 4 T 細胞 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、請求項 9 に記載の組成物。

【請求項 13】

前記形質導入された C D 4 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、C C R 5 を標的とすることができるスモール R N A をさ

50

らに含む、請求項 9 に記載の組成物。

【請求項 15】

H I V R N A 配列を標的とすることができ、少なくとも 1 つの前記スモール R N A 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 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 C D 4 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 C D 4 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、H I V 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 ; c A R T) (高活性抗レトロウイルス療法 (Highly ActiveAntiretroviral Therapy) または H A A R T としても公知である) は、H I V - 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、H I V 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、A I D S 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】

H I V 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、H I V 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 (C T L) 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、H I V 感染においては一般的に規模が小さく、i n v i v o 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、H I V 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 H I V 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。H I V に対するワクチンを試験する研究はいくつかあったが、現在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 H I V 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。H I V 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、i n s i t u 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。

【 0 0 0 7 】

遺伝子治療は、ウイルスベクターの使用を含み得る新しい療法を創造する可能性を有する生物医学研究の最も成熟した領域の1つである。療法に利用可能な幅広い種類の潜在的な遺伝子を考慮すると、感染性疾患および非感染性疾患を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

【 0 0 0 8 】

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

【 0 0 0 9 】

したがって、毒性および安全性は、対象の治療のために *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

【 0 0 1 0 】

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

30

【 0 0 1 1 】

レンチウイルスベクターの使用に関する他の重要な問題は、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 】

【 0 0 1 2 】

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 】

【 0 0 1 3 】

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CD4⁺ 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HIV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、HAARTの離脱後のモニタリング期間、および機能的HIV治癒の診断の方法が含まれる。

【0014】

一態様では、開示される発明は、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；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(ステップ(b)で使用したHIVワクチンと同じであっても異なってもよい)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または約35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PBMCを対象に注入するステップを含む方法に関する。

【0015】

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HIV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。

【0016】

一部の実施形態では、形質導入されたPBMCを対象に注入する前に、対象はcARTまたはHAARTを受けていた。一部の実施形態では、形質導入されたPBMC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。

【0017】

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

【0018】

一部の実施形態では、形質導入されたPBMCを対象に注入する前に、形質導入されたPBMCは、約1～約7または約10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10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。

【0019】

別の態様では、開示される発明は、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に関するものであり、ここで、ウイルスベクターは、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、cARTまたはHAART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PBMCを対象に注入する前に、形質導入されたPBMC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。

【図面の簡単な説明】

【0031】

【図1】図1は、ワクチン接種、PBMC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。

【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。

【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miRクラスターのポジティブ（ゲノム）鎖配列は、CCR5指向性HIV株の拡散を阻害するために開発された。下線で示されていない配列は、このmiRクラスター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、miR30 CCR5（CCR5 mRNAにリダイレクトする天然のヒトmiR30の改変）、miR21 Vif（Vif RNA配列へのリダイレクト）およびmiR185 Tat（Tat RNA配列へのリダイレクト）からなるmiR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miRNA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。

【0035】

【図5】図5は、実験ベクターによるCCR5のノックダウンが、AGTc120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、AGT103レンチウイルスベクターを含むか、または含まないAGTc120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AGTc120細胞の感受性を示す。

【0036】

【図6】図6は、AGT103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】

10

20

30

40

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。

【 0 0 3 8 】

【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。

【 0 0 3 9 】

【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 - 4】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 H I V 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 H I V 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 H I V 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 H I V 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。

10

【発明を実施するための形態】

【 0 0 4 0 】

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 (H I V) 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、c A R 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。

【 0 0 4 1 】

20

療法用ウイルスベクター (例えば、レンチウイルスベクター)、免疫療法、および H I V 感染の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、H I V 特異的 C D 4 T 細胞の画分を濃縮する目的で、H A A R T の毎日の投与によるウイルス血症の安定な抑制を有する H I V 感染患者における H I V に対する強力な免疫応答を生成することを意図したワクチンによる最初の療法的免疫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 P B M C を静脈血から精製するステップ、(2) e x v i v o において、H I V ワクチンタンパク質で C D 4 T 細胞を再刺激するステップ、(3) 療法用レンチウイルス形質導入、e x v i v o において、T 細胞培養を行うステップ、および (4) 元のドナーへ再注入し戻すステップが、これに続く。

30

【 0 0 4 2 】

主に、防御的遺伝子改変を有する十分な数の H I V 特異的 C D 4 T 細胞を得ることができなかったために、H I V 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 H I V 再発が招かれ、続いて H I V 特異的 C D 4 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、H I V 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、H I V 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。

【 0 0 4 3 】

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、H I V 特異的 C D 4 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 B P V) 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 E B V) 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 H B V) 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 つのウイルストランス作用因子、例えば、B P V の場合は E 1、E B V の場合は E B N A - 1 もしくは H B V 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ンス作用因

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、未感染バイズ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、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tev) からなる。これらの遺伝子の3つのgag、pol、およびenvには、新しいウイルス粒子の構造タンパク質を作るために必要な情報が含まれている。

【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、疾患を治療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治療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HI

50

Vの完全な根絶を含んでもよいかまたは含まなくて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細胞クローン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力化する。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。

II. 遺伝子治療

【0055】

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

【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DNA配列、アンチセンス、短いホモロジーRNA、長い非コードRNA、低分子干渉RNAまたはその他を含む調節RNA分子をコードするDNA配列、および疾患状態を変化させるために重要な細胞因子について競合するように設計さ

れたRNAまたはタンパク質のいずれかをコードするデコイ配列を含むことができるが、それらに限定されない。遺伝子治療は、特定の疾患の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。

【0057】

HIV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。CCR5遺伝子の自発的欠失(CCR5 *delta* 32として公知である対立遺伝子)を有するまれなHIV患者において、少数の治療成功が得られた。

【0058】

レンチウイルスにより送達されたヌクレアーゼまたは遺伝子欠失/修飾のための他の機構を使用して、CCR5の全体的発現を低下させ、および/またはHIV複製を低下させるのを助けることができる。レンチウイルスがCCR5 *delta* 32の遺伝的背景を有する患者に投与された場合にこの疾患の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、CCR5 *delta* 32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HIV治療を達成するための戦略によるベクターの使用の改善の両方の点で、HIVに対するウイルス遺伝子治療の性能を改善する実質的な必要性がある。

【0059】

例えば、いくつかの既存の療法は、細胞をHIV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、CCR5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30%だけがヌクレアーゼによって改変されるのみであり、改変されたもののうち、全CD4⁺ T細胞集団のわずか10%がHIV感染を予防するように改変されただけであった。対照的に、開示された方法は、レンチウイルス導入遺伝子を保有する実質的にすべての細胞で、HIV感染を可能にするのに必要なレベル未満までCCR5発現が減少する結果となる。

【0060】

開示される方法の目的のために、遺伝子治療には、親和性が増強されたT細胞受容体、CD4⁺ T細胞上の(または代替的にCD8⁺ T細胞上の)キメラ抗原受容体、ウイルスタンパク質により引き起こされる細胞死を避けるためのシグナル伝達経路の改変、TREX、SAMHD1、MxAまたはMxBタンパク質、APOBEC複合体、TRIM5-アルファ複合体、テザリン(tetherin; BST2)、および哺乳類細胞における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。

【0061】

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))
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)
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)
テザリン	NM_004335 (ヒト) FJ943432.1 (マカク・ムラッタ)

10

20

30

I I I . 免疫療法

【 0 0 6 2 】

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、H I V については承認されているワクチンはない。H I V 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H I V 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。

【 0 0 6 3 】

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。

【 0 0 6 4 】

開示された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 細胞の集団を濃縮させるために、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。

IV. 本発明による方法

【0065】

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。

【0066】

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。

【0067】

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。

【0068】

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価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。

10

20

30

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CD4⁺T細胞のex vivo再刺激を含む。ex vivo再刺激は、in vivo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in vivo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細胞応答を有する場合、患者は、以前の療法ワクチン接種またはCD4⁺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】

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

20

【0071】

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

30

【0072】

PBMC画分は、in vivo免疫化のために以前に使用されたワクチンの成分と一致または相補的なHIVタンパク質と細胞を接触させることによって、HIV特異的CD4⁺T細胞について濃縮され得る。ex vivo再刺激は、HIV特異的CD4⁺T細胞の相対頻度を約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、ex vivoでのレンチウイルス形質導入および培養を用いた、in vivoでの療法的免疫化およびex vivoでのCD4⁺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、HIV特異的CD4⁺T細胞について濃縮された再刺激されたPBMC画分は、療法用抗HIV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できる。リバウンドが起こらない場合、アジュバント療法もまた取り除くことができ、対象はウイルスのリバウンドについて再び試験されることができる。

【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週間のアジュバント療法を減少させたか、または伴わない継続的なウイルス抑制は、HIVの機能的治癒と考えることができる。機能的治癒の他の定義は、本明細書に記載されている。

【0078】

開示された方法で使用す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産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。

【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。

【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ジョ (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モール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の型の遺伝子カージョは、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モールRNA分子を発現することができる構築物を含む。例示的な構造を図3に図示する。

【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

10

20

30

40

50

するマイクロRNAであり、時にはmiRNA 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に使用することができる追加のベクター構成成分である；および

・deltaU3 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。

【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miRNA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。

【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。

【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。

VI. 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

10

20

30

40

50

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。

10

【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。

20

【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、ウェスタンブロットティング、サザンブロットティング、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。

30

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 $10 \mu\text{g}$ ～約 $300 \mu\text{g}$ 、約 $25 \mu\text{g}$ ～約 $275 \mu\text{g}$ 、約 $50 \mu\text{g}$ ～約 $250 \mu\text{g}$ 、約 $75 \mu\text{g}$ ～約 225 、または約 $100 \mu\text{g}$ ～約 $200 \mu\text{g}$ のHIVタンパク質、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 $1 \mu\text{g}$ ～約 $100 \mu\text{g}$ 、約 $10 \mu\text{g}$ ～約 $90 \mu\text{g}$ 、約 $20 \mu\text{g}$ ～約 $80 \mu\text{g}$ 、約 $30 \mu\text{g}$ ～約 $70 \mu\text{g}$ 、約 $40 \mu\text{g}$ ～約 $60 \mu\text{g}$ または約 $50 \mu\text{g}$ の適切なアジュバント分子を含み、注射用量あたり $0.1 \sim 5 \text{ ml}$ の容量の油、生理食塩水、緩衝液または水に懸濁され、可溶性またはエマルション調製物であってもよい。いくつかのウイルスベクター化または細菌性ベクター化ワクチン、融合

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、腔分泌物、直腸分泌物、唾液または気管支肺胞洗浄液中のHIV特異的抗体を、ELISAまたは同様の方法を使用して試験することによって測定される。細胞性免疫応答は、ワクチン抗原を用いた*in vitro*刺激、続いて細胞内サイトカイン蓄積の染色、次いで、フローサイトメトリーまたはリンパ球増殖、リン酸化シグナル伝達タンパク質の発現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、または繰り返して行われてもよい。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、腔内、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されることができる。さらに、組成物は、制御放出製剤、持続放出製剤、即時放出製剤、またはそれらの任意の組合せであってもよい。さらに、組成物は、経皮送達システムであってもよい。

【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。

【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、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、オリーブ油のような植物油、またはオレイン酸エチルのような注射可能なエステルを含むことができる。坐剤のベースとして、ウィテプソール(witepsol)、マクロゴール(macrogol)、ツイーン61(tween 61)、カカオ油、ラウリン油またはグリセリン化ゼラチンを使用することができる。

【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、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 $10\text{ ng} \sim 5\text{ }\mu\text{g}$ 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 $1\text{ }\mu\text{g}$ 、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。

【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15～約35日の間隔の後に繰り返してもよい。例えば、繰り返しの投薬は、約15、約16、約17、約18、約19、約20、約21、約22、約23、約24、約25、約26、約27、約28、約29、約30、約31、約32、約33、約34、または約35日で行ってもよい。

【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 $1 \sim 1,000$ 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、 $1 \sim 1,000$ 個のウイルスゲノムの同じ範囲を使用し

10

20

30

40

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バントを包含する。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。

【0126】

培養されたPBM 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、CCR5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RNA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CD4⁺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】

cARTを受けている参加者のために、cARTは期間中維持され得る。注入後、血液中のHIVウイルス負荷および血液中のレンチウイルス形質導入CD4⁺T細胞の頻度をモニターする。

10

【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、HIV特異的CD4⁺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にしてもよい。

【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cARTレジメンにCCR5を標的とした治療法を加える。これは、T細胞上のCCR5受容体密度を低下させるCCR5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CCR5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、HIV複製を維持するのに必要なレベルよりも下にCCR5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、cART療法を中止し、参加者のHIVウイ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、cARTは彼らの担当医によって再導入され、管理される。

30

【0132】

HIVウイ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HIVの機能的治癒を達成したことになる。

【0134】

HIV特異的、レンチウイルス形質導入CD4⁺T細胞の数を治療有効性（潜伏HIV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HIV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HIV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RNAデザイン：ホモ・サピエンス（*Homo sapiens*）ケモカインC-Cモチーフ受容体5（CCR5）（GC03P046377）mRNAの配列を使用して、ヒト細胞のCCR5レベルをノックダウンする潜在的なsiRNAまたはshRNA候補を探索した。潜在的RNA干渉配列は、Broad Instituteからなどの

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 T h e r m o S c i e n t i f i c 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 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

【 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 T h e r m o S c i e n t i f i c 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&p id=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 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 ブロスで増殖させた。オリゴ配列の挿入をチェックするために、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。ポリプレンの存在下または非存在下で、レンチウイルス粒子を哺乳動物細胞に形質導入した。細胞を 2 ~ 4 日後に集めた；タンパク質および RNA を CCR5、TatまたはVif 発現について分析した。ウェスタンブロットアッセイまたは細胞を特異的蛍光抗体で標識すること (CCR5 アッセイ) によって、続いて CCR5 特異的抗体またはアイソタイプ対照抗体のいずれかを使用して改変および非改変細胞の蛍光を比較する分析フローサイトメトリーによって、タンパク質レベルを試験した。

【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 ユニット/ml、IL12 1 µg/ml、IL7 1 µg/ml、IL15 1 µg/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、適切な感染多重度 (MOI) のために加えるウイルス量を計算するために使用した。

【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 °C の培地 10 ml で 1200 rpm にて 10 分間洗浄し、37 °C の培地中で 2×10^6 個/ml の濃度で再懸濁した。37 °C で 5% CO₂ 中に、24 ウェルプレート内で 0.5 ml / 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 ユニット/ml、IL12 = 10 ng/ml、IL7 = 10 ng/ml、IL15 = 10 ng/ml、ペプチド = 5 µg/ml 個々のペプチド、MVA MOI = 1。

【0145】

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

【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 】

1 4 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

【 0 1 4 8 】

1 4 ~ 2 3 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 0.5×10^6 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 】

2 4 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、 1×10^6 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 ng / ml) 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 1×10^6 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 ($5 \mu \text{g / ml}$ の個々のペプチド) 、または P H A ($5 \mu \text{g / ml}$ 、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、A G T c 1 2 0を用いて形質導入した。m C h e r r y 蛍光タンパク質の遺伝子発現は、C M V (サイトメガロウイルス即時型初期プロモーター) 発現カセットによって制御された。A G T 1 0 3 / C M V - m C h e r r y が C C R 5、V i f および T a t に対する療法用 m i R N A を発現した一方で、L V - C M V - m C h e r r y ベクターはマイクロRNAクラスターを欠いていた。

【 0 1 5 5 】

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

【 0 1 5 6 】

図 5 B は、H I V の感染に対してのトランスフェクトされた A G T c 1 2 0 細胞の相対非感受性を示す。上のように、レンチウイルスベクターは m C h e r r y タンパク質を発現し、また H I V に感染した形質導入細胞 (G F P を発現する) は、偽色フローサイトメトリードットプロットの右上四分儀に二重陽性細胞として現れる。H I V が存在しない場合 (上パネル)、いかなる条件下においても G F P + 細胞は存在しなかった。H I V 感染後 (下パネル)、レンチウイルス形質導入の非存在下では 5 6 % の細胞が感染し、L V - C M V - m C h e r r y を用いて形質導入された A G T c 1 2 0 細胞では 5 3 . 6 % の細胞が感染した。療法用 A G T 1 0 3 / C M V - m C h e r r y ベクターを用いて細胞に形質導入した場合、0 . 8 3 % の細胞のみが二重陽性四分儀に現れ、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。

【 0 1 5 7 】

5 3 . 6 2 (対照ベクターとの二重陽性細胞の割合) を 0 . 8 3 (療法用ベクターとの二重陽性細胞の割合) で割ると、A G T 1 0 3 がこの実験システムにおいて H I V に対して 6 5 倍を超える防御を提供したことが示される。

(実施例 4)

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

【 0 1 5 8 】

例示的ベクター 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 および他の例示的ベクターは、以下の表 3 に定義される。

【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

【 0 1 5 9 】

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 R N A 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 8 5 0 から、A G T 1 0 3 / C M V - G F P の存在下でのおよそ 2 0 0 に減少し、> 4 倍減少した。

30

【 0 1 6 0 】

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ブ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

【 0 1 6 1 】

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。

【 0 1 6 2 】

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 - 12 または + / - インターロイキン - 7 / インターロイキン - 15 の培地で 12 日間培養した。T 細胞刺激のためのエピトープペプチドの供給源として、H I V - 1 の全 p 55 G a g タンパク質 (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 10 ~ 20 アミノ酸であり、その長さの 20 ~ 50 % が重複しており、H I V - 1 B a L 株由来の G a g 前駆体タンパク質 (p 55) 全体を表す。個々のペプチドの組成および配列は、主な循環 H I V 配列の領域変動を補償するために、または詳細な配列情報がこの療法を受けている個々の患者に利用可能である場合に、調整することができる。培養終了時に、細胞を回収し、抗 C D 4 または抗 C D 8 モノクローナル抗体で染色し、C D 3 + 集団をゲートし、ここに表示した。ワクチン接種前または接種後のいずれかの試料についての 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 - 12 は、抗原特異的 C D 4 T 細胞の最適な増殖のために提供された。図 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 . 43 から 0 . 69 % まで増加した。対照的に、ワクチン接種後の試料は、ペプチド刺激の結果として、全 C D 4 T 細胞の 0 . 62 から 1 . 76 % までのサイトカイン分泌細胞の増加を示した。これらのデータは、H I V 抗原に対する C D 4 T 細胞応答におけるワクチン接種の強い影響を実証する。

【 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 細胞を産生した (他の様々な態様および実施形態に応じて、A G T 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 . 11 % が回収され、このことは、細胞が H I V 抗原に特異的に応答し、これらの細胞に A G T 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、 4×10^8 個の抗原特異的な、レンチウイルス形質導入 C D 4 T 細胞を産生することができる。これは、細胞産生の標的を 4 倍超えており、およそ 40 細胞 / マイクロリットルの血液またはおよそ 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 における産生の結果を示す。

10

20

30

40

【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

10

【 0 1 6 6 】

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。

20

特定の実施形態では、例えば以下の項目が提供される。

(項目 1)

H I V 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 (P B M C) を精製するステップ；

(d) ex vivo において、前記 P B M C を治療有効量の H I V ワクチンと接触させるステップ；

30

(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 P B M C に形質導入するステップ；

(f) 前記形質導入された P B M C を約 1 ~ 約 3 5 日間培養するステップ；および

(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

を含む方法。

(項目 2)

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 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 H I V ワクチンを含む、項目 1 に記載の方法。

40

(項目 4)

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 1 に記載の方法。

(項目 5)

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 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 C C R 5 の産生を阻害す

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PBMCが前記対象に注入される前に、前記形質導入されたPBMC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。

(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

40

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 1 8)

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 1 8 に記載の方法。

(項目 1 9)

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 1 8 に記載の方法。

(項目 2 0)

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 1 8 に記載の方法。

(項目 2 1)

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 1 8 に記載の方法。

(項目 2 2)

前記少なくとも 1 つの遺伝子エレメントが、ケモカイン受容体 C C R 5 の産生を阻害することができるスモール R N A、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 1 8 に記載の方法。

(項目 2 3)

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 2 2 に記載の方法。

(項目 2 4)

前記形質導入された P B M C 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 1 8 に記載の方法。

10

20

【図 1】

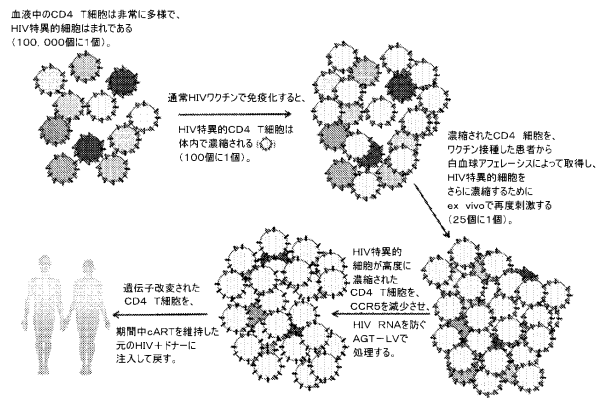
HIV特異的CD4⁺ T細胞の濃縮(ワクチン)および保護(AGT-LV)

Figure 1

【図 2】

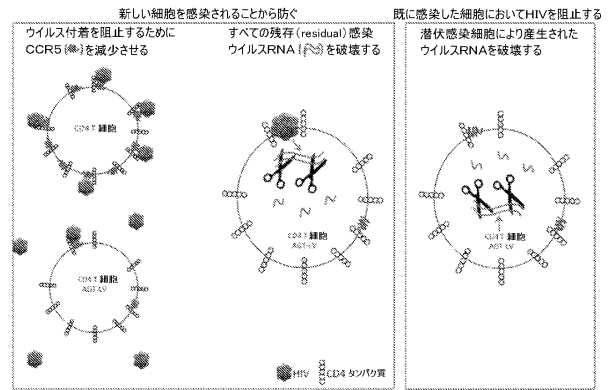


Figure 2

【図 3】

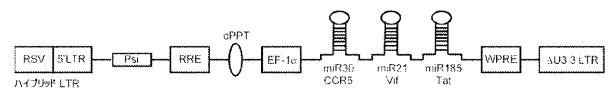


Figure 3

【図 4】

伸長因子-1アルファ(EF1-α)プロモーター(イタリック)

ACCGTGCCTAGAGAGGTTGGCGGGTAACTGGGAAAGTGATGCTGCTACTGGCTCCGCTTTTCCCGAG
GGTGGGGAGAACCGTATATAAGTGCACTAGTCGCCGTGAACGCTCTTTTCGCAAGGGTTTCCGCCAGAACAC
CAGGTAAGTGCCGTGTGTGTTCCCGCGGGGCTTGGCTCTTACGGGTTATGGCCCTTGGTGCCTTGAATTA
CCACGCCCCCTGGCTGACGTACGTGATCTTGATCCCGAGCTTGGGTTGGAAGTGGGTGGGAGAGTTCGAGGCCT
TGCGCTTAAGGAGCCCCCTCGCTCTGCTTGAAGTGGGCTGGCTGGGCGCTGGGCGCCGCGGTGCGAATC
TGCTGGCACCTTCGCGCTGTCTGCTCTCGATAAGTCTCTAGCCATTAAATTTTGTGATGACCTGCTGCGAC
GCTTTTTTCTGGCAAGATAGTCTGTAAATGCGGGCCAAGATCGATCTGCACACTGATATTTGGTTTTTGGGGC
GCGGGCGCGACGGGGCCGTTGCTGCCAGCGACATGTTGCGGCGAGCGGGGCTGCGAGCGCGGCCACCGA
GAATCGGACGGGGTGTAGTCTCAAGCTGGCGGCTGCTGCTGCTGCTGGCTCGCGCGCGTGTATCGCCCGC
CCTGGCGCGCAAGGCTGGCCGGTCGCGACCAAGTTGCGTGAGCGGAAAGATGGCCGCTTCCCGGCCCTGCTGCA
GGGAGCTCAAAATGAGGACGCGCGCTCGGAGAGCGGGCGGGTGATCACCCACACAAAGGAAAGGGGCT
TTCCGCTCTCAGCGCTGCTTCACTGACTCCAGGAGTACCGGGCGCGCTCCAGGACCTCGATTGCTCGAG
CTTTTGAAGTACGCTGCTTTAGGTTGGGGGAGGGGTTTATGCGATGGAGTTTCCACACTGAGTGGGTGGA
GACTGAAGTTAGGCGAGCTGGGCACTGTGTAATCTCTTGGAAITGGCCCTTTTGTGTTGATCTGGTTC
ATTCTCAAGCTCAGACAGTGGTTCAAGTGTCTTCTTCAATTCAGGTCGTGAGGAATTGGCGAAGCTAATTC

miR30 CCR5 開始

TGCAGATTGACTGTACAGGATATTTGCTGTGTGACAGTGAGCGACTGTAACTGAGCTTGCT
CTACTGTGAAGCCACAGATGGGTAGAGCAAGCACAGTTTACCGCTGCCTACTGCCTCGG

miR30 CCR5 終結

miR21 Vif 開始

ACTTCAAGGGGCTTCCCGGCTATCTCCATGGCTGTACCACCTTGTGGGGGATGTGTA
CTGAACCTGTGTTGAATCTCATGGAGTTCAGAAAGACATCCGCACTGACATTTTGGTA

miR21 Vif 終結

miR185 Tat 開始

CTTTTCATCTGACCTAGCGGGCTGGCTCGAGCAGGGGGCGAGGGGATCCGCTCTCTC
CTGCCATAGCGTGGTCCCTCTCCCTATGGCAGGCAGAAAGCGGCACCTTCCCTCCCAATGA

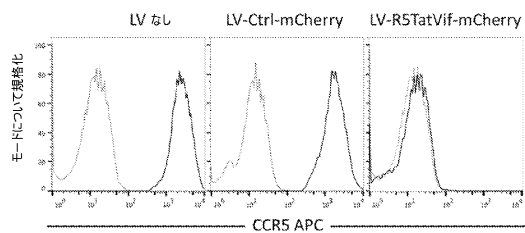
miR185 Tat 終結

CCGCGCTCTTCTGCTCGCGGCCCTCGAGCATGCAT

Figure 4

【図 5】

A



B

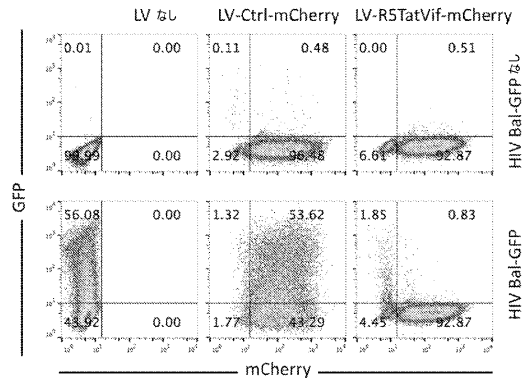


Figure 5

【図 6】

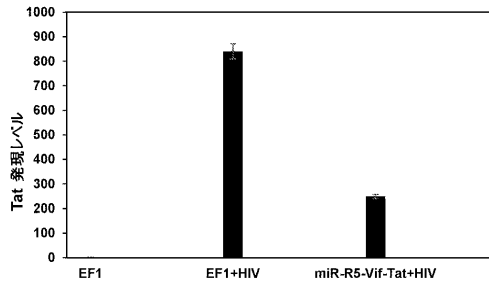


Figure 6

【図 7】

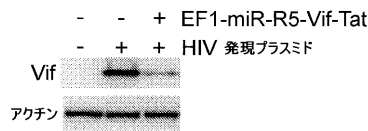


Figure 7

【図 8 A B】

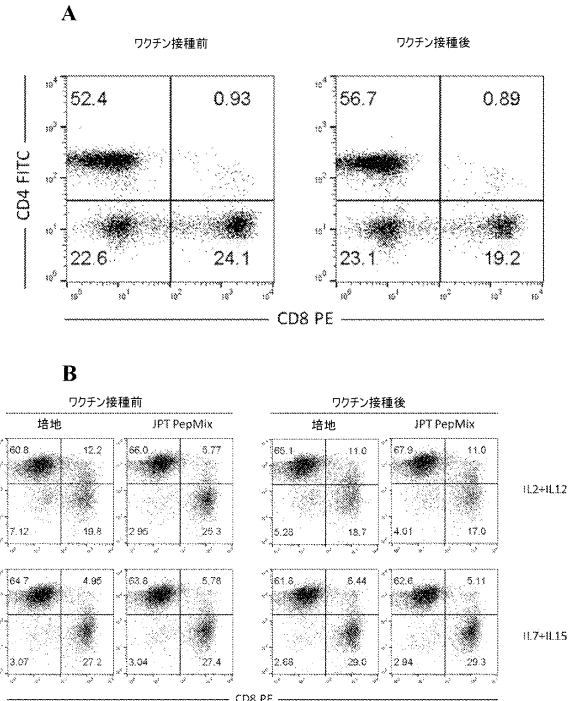


Figure 8

【図 8 C D】

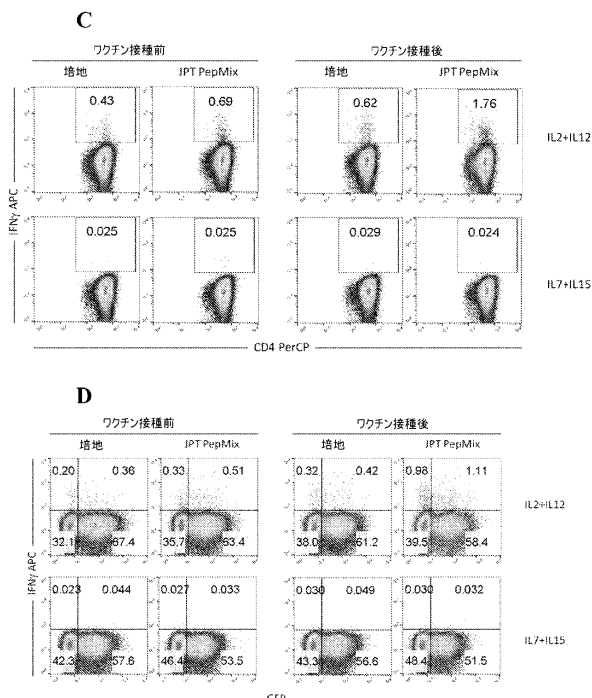


Figure 8 続き

【図 9 - 1】

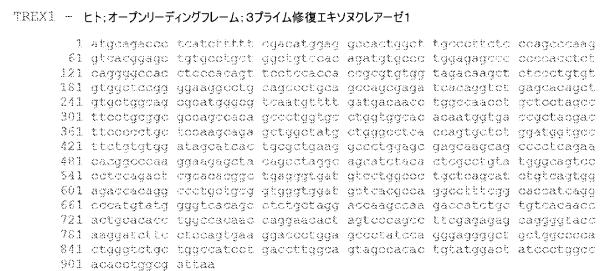


Figure 9

【図 9 - 2】

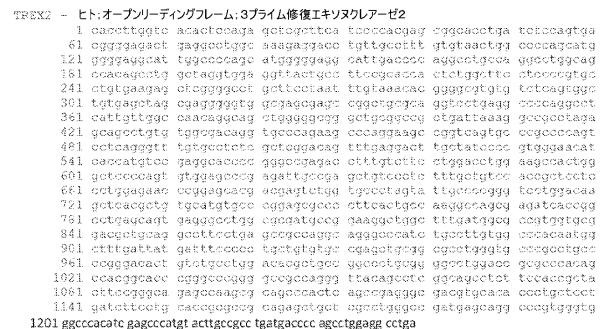


Figure 9 続き

【図 9 - 3】

SAMHD1 - ヒト:オープンリーディングフレーム: SAMDメインおよびUHDメイン-含有タンパク質

```

1 atctggccgtt cgcaggggac ccaaaagcaag agccgctaga ctggccctcc cgaagggctc
61 aactgtccgtt gaggctctgc agggagggcga taggtctgca atactccttg gactccctgc
121 caggccctgt ctgtctgtgc gactgggggc gggtccggcg ccagaggttt tgactctgtt
181 gcgggacgac aggtctgtgc atgcagcgag ccgattccga ggcagccctc aagctgtccc
241 gctgtcgtgc aagcccgagc accccctcaa accccctcaa ccagcaggca gactgtctcc
301 cgggctctga actccatccc gaatcaaaag catggggctc ggagcaggtt tgctctctcc
361 tcaggcgagg tggctttgaa ggcgcgggtg tgcctgaaga catccgagaa aatgaatcaa
421 caggcgcatc actgctctgt cttagtgagr ctgcgtttga aaatcttga gtaagttccc
481 tgggggagag gaagaagctg cttagtgata gacacattga gctccaccct ctctctctga
541 caatgaagt aatfaatgag tcttccatgt ttcgaacgct caaaagcgg ggaggtgggt
601 gaactctgga taactctcaa tcccaagctc ttcgaacgct caaaagcgg ggaggtgggt
661 actatctttt tccagagctc tcccaaacat gatttgaaga tagctctagg gtaggtctac
721 tagcaggtt tctagtttgc gacttgggtt ttgtgtgggt ttgtgtgggt ttgtgtgggt
781 gaagttctc actgtgttgc actgtgttgc ttgtgtgggt ttgtgtgggt ttgtgtgggt
841 ctacatctgt tgttgaagca ttatttccac ttgtctctcc ggggtgaa tgagcgttgc
901 aacagctctc acttatgagt tttaggcacc ttatttccac ttatttccac ttatttccac
961 ttgaaacata ttgtctctac cctgaagaag atatttgcct tacaagggaa caattttag
1021 gacacattga ataccctgtc gaagattcat ttgtgtgggt ttgtgtgggt ttgtgtgggt
1081 aagctctctc ttatgagata gtabctcata aagaagaatg ccttctgtgc gaaatcttgc
1141 atatttctc cagcagctgc catctatctg gaattctaaa taattttagt taatgaaggt
1201 ttattttagt cagcagctgc ttgtgaagtg acaatgagtt gggtatttgc gctaaagata
1261 aagaagttgt aaactctgat gacatgtctc caactgtgca ctctttacac cttagagctt
1321 atccacccaa agtttgcacc atatttgaat gaagaagaat tgcgtatttc ctccacatgc
1381 atgctctcac agagcttaca aggtcttgcg ataacattgc ttgtgaagat ttactctcta
1441 accgactgag agctcttgcg aggtcttgcg ataacattgc ttgtgaagat ttactctcta
1501 ctgactccaa atgaagaag cagcagagga tttaaaaaa aattgaatac ctgatactat
1561 tcaagtatgt ggttgagagc cagcagagga gacaaataaa gattaaaagg gaggactatg
1621 aactctctc taaaagaagt gccagtgcta aaccccaagt attgtctgac gtaaaactga
1681 agcgtgagca ttatctatgc gatgtttaca acatgtgata ttgaatgaa ctgaactgtt
1741 caatttgata ttgtagcttc ctgtctgaag ctggccccaa ccagcagcat aggtattact
1801 aaaaacaggt ttaccacact ttcgcagaga cgcagctgat cgaattctat cagttgtggt
1861 gtaagaaggt ggaacagaag agtttctgat ccgctgaggt agcccccata ataacacttc
1921 cagacagaaa tttaacaaag cgcagagatg tccaaactgc aaactgcctc cggagagcat
1981 aaaaaagga attgacagac agtacttcaa accaaactgc aaactgcctc cggagagcat
2041 ccaaaagga agtccagctt tttaagagtg accaaactgc aaactgcctc cggagagcat
2101 taacaaactc ctctctctga caatcttctt agaggtctca atactgcctc cggagagcat
2161 aatgacaaat catcttttaa ttctgttatt tgaattctca ccagctctga atactgcctc
2221 ctcttaataa aagaataaag aggttattag gaaacttcta ctatactga aagaacttga
2281 cctgtctctt tttaaatatt ttaaaagcct ttctctctca gtagtattat ttcttagaat
2341 aaaaactctc ttatcttctc ttgaactctat ttctctctc ttctctctc ttctctctc
2401 ctctgtctgc cagcttgcac ctgcaacttc caccaccccc agcttactt gacttttat
2461 ccccaagagt ctggagctaa ctgtctgagc caacaccccc agcttactt gacttttat
2521 gaaactatgt ttgtttttgt tttaactgta caacaccccc agcttactt gacttttat
2581 gaaactatgt ttgtttttgt tttaactgta caacaccccc agcttactt gacttttat
2641 gaaactatgt ttgtttttgt tttaactgta caacaccccc agcttactt gacttttat
2701 gaaactatgt ttgtttttgt tttaactgta caacaccccc agcttactt gacttttat
2761 gaaactatgt ttgtttttgt tttaactgta caacaccccc agcttactt gacttttat
2821 gaaactatgt ttgtttttgt tttaactgta caacaccccc agcttactt gacttttat
2881 gaaactatgt ttgtttttgt tttaactgta caacaccccc agcttactt gacttttat
2941 gaaactatgt ttgtttttgt tttaactgta caacaccccc agcttactt gacttttat
3001 gaaactatgt ttgtttttgt tttaactgta caacaccccc agcttactt gacttttat
3061 gaaactatgt ttgtttttgt tttaactgta caacaccccc agcttactt gacttttat
3121 gaaactatgt ttgtttttgt tttaactgta caacaccccc agcttactt gacttttat

```

Figure 9 続き

【図 9 - 4】

MxA - ヒト:オープンリーディングフレーム: インフルエンザウイルス耐性1

```

1 cgcagcagaaa tgaacccgaa actgaattgt cggggaaatt cgcagtggg cggggagcgc
61 cgcagcagaaa tgaacccgaa actgaattgt cggggaaatt cgcagtggg cggggagcgc
121 ctctccgalt cccattctat ccagaaagac cgaacacgac ttgtcccgga tcccacagtc
181 agcgggaccc agctgtggcc tgggtttgoc gcttgcaccc ttgttagcaga ttgttagcaga
241 ggcgcagcca gtgcacaaag gcaactaagt ccaactgtgc ctggagacag acaggttgcg
301 aagaataata tctcgggacg cccaaactcc ttatgctaac ttgaacatcg agcctggaga
361 ctgagccatc aaactgtgca tctttttccc caaacagacg cctgttgtca gaggtagcgc
421 cagagcgaat ccaacacggg tgcagtgcac agcaactcca tcttaaatag gactgtgtta
481 aagcagcgtc atactactg ggcctgaltc ccagacggca tagcagagag gtgtctgaag
541 ggcaggtttt ggagaatgat cacttgattt ggaacatgac ctctaccat atggaaacca
601 gctcttaagg cctgtgtctt ctatagga gaactgtgtt ataatctac tctctggga
661 ggtgtgtgtt taagcttttg accgcaattg ccgcagcaga alctcagttg gactctgaga
721 agctctctct agcgtctctg ccgcacacat gctcagccag ctacaggggt ctacaggggt
781 ggcgtccacc ttgcagagaa tgcgtctgtg agccacatct ccagagaggt gcaagagac
841 gaaactctg actgaagaac ggcgcacatc agcagaggtt ccagagaggt gcaagagac
901 agctctgtga taacttttaa ctgttgtaca ttacttttat ttgaaggaac gtaattatga
961 gcttactttt taagaagaaga agatgtgttg ttctcagagt gactctgaga actgtgtac
1021 agctgtctga tcccacatct tattactgaa ttgagagatg actgtgtgac actgtgtgac
1081 agcgtctgtg gctgaagaac actgtgtgac ccagatagag ccagatagag ccagatagag
1141 gacacttatt gactctctgc ggcctctagg ttgttgagag gactgtgtgc ttgcagcact
1201 agcgtctctc ggggacagga gctcggcgaa gactgtgtg ttgcagcact ttgcagcact
1261 ttgcctctcc agagggcagc ggaactgtga cagatgtgag ctgtgtctga aactgaagaa
1321 actgtgtgac gaagataagt ggagagggca gactgtgtac cagactgtac cagactgtac
1381 ttgcagaggt ctgagaggtg aagaagaatc taataaagcc cagatgtgca tgcgcgggag
1441 agaatgtgga actcagctat agcttaactac cctgtgagat agctctcaga atgtctcaga
1501 tctgaactca atagactctc ctggactaac cagatgtgct gtaggtgtgc agctctcaga
1561 catgtgttat aagatcaga cctcactcaa gtagtctat ccagagaggt agcactcag
1621 actgtgtgtg gtcctcagta atgtgtgtta cgcacacaga gtagctctca ctgtgtctca
1681 gtagctgtgc cccacagaga atagagacat cgtatctctg acgaagctgt atctgtgtga
1741 caagaagact gaagacagag ttgtgtgact gctcgtgag gactgtgttc actgaagaa
1801 gtagtctatgt atgtctcagt ggcgcggcca cagagagatc cagagagagc tgaagctgtg
1861 agcagcctgt cagagagaga agatctctt cagagagagc ccaattctat ggtgtctgt
1921 ggagagagga agagggcagc tctcctctat ggcagaaaaa ctacacagag agctctctc
1981 acatctctt aaactctctg cctgtttaga aaactcaact agagagactc acagagaat
2041 caacagagag ctacacagag atgtgtgtga ctacacagag gacagaaaaa aaaaaagttt
2101 ctctctgata gataaagtta atgcttttaa ttagagactc actgobolra tgaagagaa
2161 ggaactctga ggggaggaag acactctggt gtttaagagc cctcagagag actgtctca
2221 atgtgttaca taatgtgaaa caactttggt ttgaagagcat aaaaattgta agttaaaaa
2281 gtagtctatgt atgtctcagt atgtgtgtga agagctgtga gctgtgtgta gctgtgtgta
2341 atgtgtgaga atgtgtgtga agcaactgaa ggcctgtgaa ggcctgtgaa ggcctgtgta
2401 accacactgt accgactgtg tctgtgtgtg ttctcagat gttctgtca aaaaattgta
2461 aggtgttttt aaactccaca gaacgcggaa ctcacaaact gaaagacatg ggcagaaaa
2521 atgaagagaa actgaagagc tgaactgcgt caacttcag agagacacat tgcctactg
2581 ccagagacag gatacagagg gtgcactgca gaagctcaga gaaagagagc tgaagagaa
2641 aaaaagagag aaactctggt atttttgggc ttctcagagc actgtgtgaa cagactcttc
2701 catgtgtgag atctctcagc actgtgtgag ctatccagc gaggcagga agcgtctctc
2761 cagcactatc ctttgtatca tcaagtttat cactctcag actgtgtgag actgtgtgag
2821 gaagcagag ctgcagagct tgcagagaaa ggaacacaa agctgtgtga tgaagagagc
2881 gtagcagac agcagcagag ggaagtttct gaagagagc actgtgtgag tgaagagagc
2941 tggcgagag actgtgtgag tcccggttta accacactc gtcagagagc gtagcagagc
3001 agcagactg ttgcagagag ttcccggttta accacactc gtcagagagc gtagcagagc
3061 gtagcagag gtagcagag cgtgtgtgag gtagcagag gtagcagag gtagcagag
3121 gtagcagag gtagcagag gtagcagag gtagcagag gtagcagag gtagcagag
3181 gtagcagag gtagcagag gtagcagag gtagcagag gtagcagag gtagcagag
3241 tccacactgc agctctctcc ttctctgtat tcttagaagc tgaacactgc tgaacactgc

```

Figure 9 続き

【図 9 - 5】

MxB - ヒト:オープンリーディングフレーム

```

1 aagaagatgat ttctonacac tgaacgttgc gogagagttg ccaggaagtc ggaggtgtgca
61 agtagcagag aagcactccc ccaactgtgc cagggagaga gaaatgtgtt aagggccaaa
121 agccttgcgt aagcactccc ccaactgtgc cagggagaga gaaatgtgtt aagggccaaa
181 tgaactcttc ccaagacacg ccaacgagat tgggacacgt gaaacacaaa atagattttc
241 ccaacacacg cagggagaga gagaagagag ctggtttctt cgtcaagaga ttaacatttc
301 tcaattttaga caatcagaca ccaacgagga aagagagcca atggggccgc ctgagctgag
361 aagaacacac gtaacagcag taagcagaga aggtgcgcgc ctgacttga cctcagctgag
421 cactgtggag ggcagagagc tggccctgag agcactgagc gctcagctgag cctcagctgag
481 aagaagagat gggcagagag tctgtgtgag agcactgagc aggaagctgc ctgagctgag
541 gtagcagat gtagcagag ttgtcgtgag ttgtgaaat gaaaaagcag cctcagctgag
601 caggtgcagc aagcagag taacgggaaa ccaagctgag gactcagagc cctgagctgag
661 tggagagaga gatacagaaa ggcgcagag ctgagctgag gactcagagc cctgagctgag
721 atgagctatc caggtgtgag ttgtgtgaga acaactgtgc agactcagc ctgagctgag
781 ttccggagat caggtgtgag atcagagagc agagcagagc caactgtggt gtagcttctc
841 aggtctctc atcagagag atcagagagc agagcagagc caactgtggt gtagcttctc
901 gaaagctgga cactgtgagc agggagagc tgaactgtgc cactgtgagc gaaagcagag
961 gggcagagag cactgtgagc ctgacacaaa cagatctaat ggaaggggag actgagagag
1021 gctgtatgaa ttgtgtgag caactcagc acccctcaa gaagggctac atgatttga
1081 agtgcagag cagcagagga atcacaaca ggtgaggtt gcaagagaga ccaagagaaa
1141 aaattacatt ctctcaaaa catctattt ctgagattct cctgagagag ggtgtcagca
1201 cgttccagc actgagagaa agacttaca ctgaaactca catgatact caaaaaatgc
1261 tccgttgtt agaaagaaaa ataaagggga gcccacagaa ggcagacagag gaactgtgag
1321 gctgtgtgag ttactcagc ggcgcagagc ggaacagat gctcttcta attgagaaaa
1381 tcaagatgtt taactcagc atcagagag agaggttgc atgagagaa ttgtgtgag
1441 atgagacagc ttatacagc aaaaacagag agattttta aaactgtgta gtagatgtt
1501 caactacatc ccaaaagatt ccaaaatttc tccagagag agttgaaaa tatgaanaag
1561 agtctcagc caagagagct ctgggatttg tcaactcaca gactttgag atactgtgag
1621 atctagatga ccaagagctg ccaagagag cacttagact gctcagagaa gcaatgtgaa
1681 ttatccagca agcttctatt aagctgtgca aaaaacatt ttggcaatt ttcaacttca
1741 accaaactgt tgaagagag atctagagca taagagtga acaacagaaa agggagaaa
1801 actgatacca acttcaattc agaatggagc agatggtttt ttgttaagat cagatttaca
1861 gctgtgttct gaagaagtc agagagagga ttttaacac ttgtgggag ccttcaagaa
1921 atagagattt gaactctcat ttctcagata atgagttctc gattctccc ttactgaaa
1981 taggatttca actgtgtgag ttactcagc agactgtgag agactgtgag aagcagatg
2041 caactatatt caagtatttt atgtcagag agactgtgag agactgtgag aagcagatg
2101 tgcagatatt cagggaaaaa aatcgtattt cctgtgtgtt tcaagagagc agtgcagagc
2161 ctacacagag aagattctct aagagagaa ttacacagc cactcagagc agacacagac
2221 ttgttcaatt ctcaagaaaa gagatctcah gaagggagag gatgaggtgt gttgttttct
2281 ttgttcaatt ctcaagaaaa ggggtgaggt ggtgagaggt gactgtgtgt ctgtgtgtgt
2341 aaactcttct gtaactatca gttgtctat ctactgtact cactagagat cagagcagag
2401 atcaggggtg caaacagagc cagttctctc cccacacagc acttccagc taagatagag
2461 agggatgtgt ctacagctct ttgttccagt agacacagc taagatagag taagatagag
2521 ctactatct ttgttaattt gttattgtat tccctccc ctacagagtt atgagacac
2581 agggggggga ggtctgtgtt aaactctct ttgtattgt agttctctc cagagacat
2641 gaaatttct taactcagc atcagagag ttgtattgt agttctctc cagagacat
2701 atgagatct taactcagc ttgttaagc caggtgtgt agttctctc cagagacat
2761 ggttctcttc agatcaggt gcaactccac ctgtctccc ttgttcaagt taatttgtt
2821 tccagacatc tccacacac ggcagagag gaggtgtgt gattctctt tcttctgtt
2881 tccctgata ttgtagattt caattgtct gttaagttt gaagaggaat ttaataaag
2941 aagaagact tttaaaaag t

```

Figure 9 続き

【図 9 - 6】

APOBEC3G - ヒト:オープンリーディングフレーム: アポリポタン3 質B mRNA編集酵素、
船艚ペプチド様3G(APOBEC3G)

```

1 gtagctgtgt ggtcaagctt ggtgtggaac caactccgag ggcgtgggtt caatcaattt
61 ctctttccat ttgcaattgc cttgggtctt gcgcagagag ggggctgtc ttatcagag
121 gctcctctgc caggggggag gcccacagag aacacagaa ggggtgtgag gactgagag
181 gtaaaagag ctggaggttc actttaggag ggcgtgtgag ggcgtgtgag ggcgtgtgag
301 gaaagtcaaa cctgtgtgtt ccagacaaag actatagtc gtagtagagc gcaagagat
361 agactcaat tgaacacaaa agtagagaga atgtatcac accacttct ctacaaattt
421 tataatagac caactcttc tctgtgaat accctgtgac ttgtctgaga agtgaacaaa
481 aaggtctctc caagggcccc tttagagaga aagattcttc agagcagag gatttccag
541 cttaagtaac acaagagagc gaggattctc cactgtgtca gaaagtgag gaaagtgag
601 cgtgacagag agtatagag cactgtgtca atctctgag accctgtgac aagtgtagc
661 agggatagag caactgtctt ggcagagag ccagaggtta cctgtgacat ctgtgtgag
721 cgtctctat acttctgga ccaagattac cagagagagc ttgcagagc gtagcagaa
781 agactcagc cgtctgtcac catgaagat atgaattatg acaatttct gactgtgtg
841 agcaggttg ttgaacagca aagagagctc tttagagct gtaggtctt gatttccag
901 tataattat ttgcactcat gctgggggag atctcagag acagatgtg tcaacacaaa
961 ttcccttca actttaaaa tgaactgag ctcaagagc ggaatagag ttactgtgag
1021 tttagaggt cagagagag caatgacaaa ttgtgtgtgc ttgacacagc caggggtgtt
1081 ctatgaaa aggtctcaaa taacaaaggt ttctctgag cgcgcagtc agagctgtg
1141 ttctgtgtgt gtagttctct ttggaagct gacctgtgag ggcagagagc ttgttaattt
1201 ttctctctc ggaagccctg ctctcagctt gcccagagc ttgttaattt catltaaaa
1261 aaaaacacag ttgagctgtg catcttact gcccagat ctatgatca aagaagatg
1321 cagggagagc ttgcacacat ggagagaggt ggggcaaaa tttaactat gactatagc
1381 gactttaag actgctgga caactttct gaccacagag gactgtgag ccaagctgtg
1441 gctgtactag atgagacag ccaagacact agtggagagc ttgcagagc gtagagagc
1501 caggaacact gaagagtggt cctagttct taaggaagc agcagagct gtagagagc
1561 aaaaataaa atctcttcc aagaatgca aacagagct tcaacactt ctcaagatg
1621 tcaagagac caggaagca atgctctt gacaaagat gacaaagat atctttaa aatlagat
1681 gcttaactt gacttaaaa ttatttata tttaagat aagtagat aagtagat
1741 aatacagag aagtttcaa actactaat ccagcagaa tttagatg tttagaggt
1801 agagataaa aatgaatac taactttc ttgaaaaaa aaaaaaaa

```

Figure 9 続き

【図 9 - 7】

TRIM5 アルファ - ヒト:オープンリーディングフレーム; 三者モチーフ含有5(tripartite motif containing 5; TRIM5)

```

1 agttttatctt tcaactttcct ggccttgagtg tgagcaagaa ttctcttgagg ttctctttagg
61 aaatttctctt tggcagatkc aggcctggagg atttgttgagt gaactctaac caggtctcttc
121 ctggccttgc ttcaactcttc tcccagaagt caaccctttct gaactgttgt ctgaaagtggt
181 atcagatgat ttgttgtagg gcgaagatg gaagtctttg gacacaaact gtatttaact
241 tgggatctgt gaacagagag aaactcagca gccaggaag gcaggagcag tggatatagct
301 actatggctt ctggaaactct ggttaattga aaggaggagg tgacctgccc catctgcttg
361 gaactcctga cacaacccct gagcctggac tggggccaca gcttctgcca agcatgcttc
421 actgcaaac acaagagatc catctagac aaagggagga gtactgtccc tgttgccgg
481 atcagttacc agcctgagaa catacggcct aatcggcatg tagccaaact agtggagaag
541 ctcaaggagg toaagtttag cccagggggg cagaagaatt atcattgtgc acgccaatga
601 gagaaanttc tactcttctg tcaggaggac ggaaggttca ttgtctgctt ttgtgagcgg
661 tctcaggagg accgttggtca ccaacagcttc ctcaagagg aggttgcccg ggaatcacaa
721 gtaagctcc aggtagctct ggaagtgtc agcagaagc agcaggagc tgaadagfta
781 gaagctgaca tcaagagaga gaaagcttc tggaaattc aaatacagta tgcacaaacc
841 aaactcttgg cagattttga gcaactaaga gacatcttgg actgggaaga gagcaatgag
901 ctgcaaaacc tggagagaga ggagggaagc attctgaaaa gctttacgaa ctctgaaact
961 gagatggctg agcagaccca gtccttgaga gagctcatct cagatctgga gcatcggtc
1021 caagggctcg tgatggagct gcttcagggt gtggatggcg tcaataaaag gacggagaac
1081 gtgaaccttg aagagccaga aactttbcca aaaaatcaaa ggagagtggt tccagctcct
1141 gatctgaag gaatgctaga agtgttttag gactgacag atgtccagcg ctactggggtt
1201 gatgtgacag tggctccaaa caactcttca tgtgtgtcca ttcttgaga taagagacaa
1261 gtgagcttc cgaacccaca gataatata ggggcacgag gacacagata ccagacatit
1321 gtgaatttca attatgttac tggcatctgt ggcctcnaaa gtatcacatc agggaaacat
1381 tactgggagg tagactgttc caagaaaaat gctkagatcc tgggggtatg tgcctggctc
1441 caactgtatg caatgtgtta tttgaaaaa aatgaaaait atcaactcaa atagcctac
1501 tgggttatag ggttagagga agggagttaa tgaagtgtt tccagatag ttctctccat
1561 actcctcttg ttctttcact tgtgcccctc tctgtgatta ttgtctga tctgtgttga
1621 gttttcctag actatgagcg ttgcactgtc tctttcttca atatcacaaa ccatggattt
1681 actcatata agttttctca ctgttctttt tctcagctg tatttccata tttaactcct
1741 agaaaatgtg gactccacat gactctgtgc taccacagct ctggaacctt cttaacacat
1801 cagcaanttc tghacagcac ctcttgtcca ggtgcatctc atacacctga actcatttgc
1861 atcattttaa caatcttttc ctgtgctctt ccttcttctc takttgaaag tcttctcaatc
1921 atcagtaaaa tgaataaatt gcttctgtcc atattgtccc caatatttta ttgacatttg
1981 atagcaattt ttctcatcat ttctcgtact cctaaagaaa actgaacctat acctcataaa
2041 atgagacgcg tatttaggta ttactcttgc cagatatttc taccacaatt gctcttgaca
2101 ctgactaaga ayttagagaa aagcttttca aagcttttca tatatcatg ttgtgaaatt
2161 gttccacaat gaatgagtc cttagcctgt gtcagtctac cctcagtgcc cttaatttgc
2221 agttaaagag aaaaatcat aactggtata ctcttaagta tagaggtttt gtabctagag
2281 gttctcagtt caactcctgt ctctccatat accagcagtg taactgtgaa taacataactt
2341 aaatggcgtg gcttatttcc ttctcttttc tttttctttt tttttttttt ttgagatgaa
2401 gtittgtctt tgttcccag gcttgaggtg aatggcagca tctcgttcaa ctgcaacctc
2461 caactctcag attcagacaa ttctctgcgc tcaagctccc aagtayctgg gattacaggt
2521 gccacccacc acccctggct aaatttgtat tttaagtaga gacgggggtt ccccatgttg
2581 gttagctctg tctagaaact ctgacctcag gtgctccacc cgcctcggcc tcccaaaagt
2641 ctgggattac aggtgtgagc ccaggcgccc agcctgtgtc tattttctta aaataatttt
2701 tgtattcaaa acttcatatt aaataagtc taaktgttta ctgcatagta gggtagtag
2761 agttaacat accctattgc atattcttg aaatagtag aagagaggtt tttagaactt
2821 ctcaacacaa agaaatgaca catattttag gtgatgata tgcataatc ccttggttgc
2881 ttatttaacna atgtataact gtatccaaac atccacactg accacatasa tatgtatatt
2941 tattatttgt caattaaag caaaatcaaa caaaaaacct tcatctaaata ctttggatca
3001 ttgtgaaaaa ataaattcct gaagtataaa gcatctatct aagtgtcttg atctaaatag
3061 taactgttct acaattatbt gaaaacata aactctgtta atgtctcatg gaacaggtrg
3121 tgcttccagg gaaactagaa ttggatttac taatttctca ttttttagat ctcaatactt
3181 actgtcaaaa tgactcaat tctgctctct atatatata caccatata tttaggattt

```

Figure 9 続き

【図 9 - 8】

デザン (BST2) - ヒト:オープンリーディングフレーム

```

1 ataaaggggt ggcccgtaga agattccagc accctccctt aactccagc cagactcctt
61 tcaagctaaag ggaagatctg gatggcatct acttctatg actattgcag agtgcccatg
121 gaagacgggg ataagcctg taagcttctg ctggggatag gaattctggt gctcctgato
181 atctgtatct tgggggtgcc ctggattatc ttccacctca aggccaaacg cagggcctgc
241 cgggacggcc ttggggcagt gatggagat cggcaatgca ccaatctctt gcaacagag
301 ctgacgagag cccagagggg ctcttcaggat gtggaggccc aggcagccac ctgcaacac
361 actgtgatgg cctaataggg tctcctggat gcagagaggg cccaaggaca aaagaagtg
421 gaggagcttg agggagagat cactacatta aacctaagg ttcaaggagc gtctgagag
481 gtggagcgac tgaagagaga aaacccagtc ttaagctga gaatcgagc caagaagtac
541 taccacagct cccaggactc cagctccgtg gggggcccac agtctctgat tgtctgctg
601 ggcctcagcg ctctgtctga gtgagatccc aggaagctgg cacatcttg aaggtctgc
661 ctgctgggtt ttctgctga caattctctt gatctcaca gttctgagc ggtcactggg
721 caaacacggt agccagagga gcacggggtt gcccggaaag ggcctctgga ccaggtctga
781 agggcccatg ggaagctctt ggggtgtgag acaacagtcg gttcacccag ggcctctcc
841 ctccagagcc tccctccgga caatgagtc cccctctgt ctcccaacct gsgattggc
901 atgggggtgg gttgtggggg catgtgtctg ctgtttgtat ggggtttttt tgcggggggg
961 gttgtctttt tgggggtct ctgagctcaa aaaaaaaac actctcttg agggagagca
1021 cacttgaaaa aaaaaaaaca aaaaaaaa

```

Figure 9 続き

【配列表】

0006890831000001.app

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)

A61K 35/00

A61K 31/00

A61K 48/00

CAPLUS/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)