



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108026543 A

(43)申请公布日 2018.05.11

(21)申请号 201680042303.7

(22)申请日 2016.02.15

(30)优先权数据

62/163,332 2015.05.18 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2018.01.18

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2016/017931 2016.02.15

(87)PCT国际申请的公布数据

W02016/186708 EN 2016.11.24

(71)申请人 卡琳缪恩股份有限公司

地址 美国亚利桑那州

申请人 卡琳缪恩澳大利亚私人有限公司

圣文森特医院悉尼有限公司

新南创新私人有限公司

(72)发明人 K·铃木 A·D·凯莱赫

G·P·西蒙兹

C·L·E·阿伦斯蒂尔

(74)专利代理机构 深圳市百瑞专利商标事务所

(普通合伙) 44240

代理人 金辉

(51)Int. Cl.

C12N 15/867(2006.01)

C12N 15/86(2006.01)

A61K 39/12(2006.01)

A61K 48/00(2006.01)

C12N 15/82(2006.01)

C12N 15/113(2006.01)

权利要求书7页 说明书31页

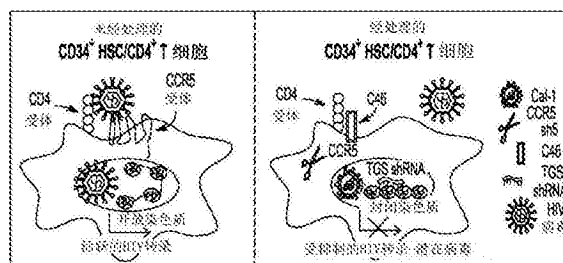
序列表14页 附图8页

(54)发明名称

用于HIV的治疗的基因疗法及其用途

(57)摘要

本发明提供了一种表达载体,包括(i)至少一种编码转录基因沉默元件的核酸序列;以及(ii)至少由编码抑制HIV共受体的核酸分子的核酸序列、编码HIV融合抑制蛋白的核酸序列、编码HIV复制抑制剂的核酸序列和编码病毒进入的抑制剂的核酸序列组成的组别中选择的另外两种核酸序列。在一个单独的表达载体中结合这三种机制提供了抑制HIV-1的新方法。



1. 一种表达载体,包括:

(i) 至少一种编码转录基因沉默元件的核酸序列;以及

(ii) 至少由编码抑制HIV共受体的核酸分子的核酸序列、编码HIV融合抑制蛋白的核酸序列、编码HIV复制抑制剂的核酸序列和编码病毒进入的抑制剂的核酸序列组成的组别中选择的另外两种核酸序列。

2. 如权利要求1所述的表达载体,其特征在于,所述至少一种编码转录基因沉默元件的核酸序列是将HIV的5'LTR的序列作为目标的沉默核酸。

3. 如权利要求1所述的表达载体,其特征在于,所述至少一种编码转录基因沉默元件的核酸序列选自由以下组成的组:(i) 沉默核酸,将HIV-1的5'LTR从位置约143到位置约161的序列作为目标,(ii) 沉默核酸,将HIV-1的5'LTR从位置约136到位置约154的序列作为目标,(iii) 沉默核酸,将HIV-1的5'LTR从位置约205到位置约223的序列作为目标,以及(iv) 沉默核酸,将HIV-1的5'LTR从位置约350到位置约368的序列作为目标。

4. 如权利要求1所述的表达载体,其特征在于,所述至少一种编码转录基因沉默元件的核酸序列选自由以下组成的组:(i) 沉默核酸,将序列SEQ ID NO:1作为目标,(ii) 沉默核酸,将序列SEQ ID NO:9作为目标,(iii) 沉默核酸,将序列SEQ ID NO:17作为目标,(iv) 沉默核酸,将序列SEQ ID NO:36作为目标,(v) 沉默核酸,将与序列SEQ ID NO:1有至少95%同一性的序列作为目标,(vi) 沉默核酸,将与序列SEQ ID NO:9有至少95%同一性的序列作为目标,(vii) 沉默核酸,将与序列SEQ ID NO:17有至少95%同一性的序列作为目标(viii) 沉默核酸,将与序列SEQ ID NO:36有至少95%同一性的序列作为目标。

5. 如权利要求1所述的表达载体,其特征在于,所述至少一种编码转录基因沉默元件的核酸序列是包括有义链和反义链的RNA双链,其中有义链包括与序列SEQ ID NO:6、序列SEQ ID NO:14、序列SEQ ID NO:22和序列SEQ ID NO:40中的一个有至少95%同一性的序列。

6. 如权利要求1所述的表达载体,其特征在于,所述至少一种编码转录基因沉默元件的核酸序列是siRNA,选自由以下组成的组:(i) siRNA,包括含有序列SEQ ID NO:6的有义链和包括含有序列SEQ ID NO:7的反义链;(ii) siRNA,包括含有序列SEQ ID NO:14的有义链和包括含有序列SEQ ID NO:15的反义链;(iii) siRNA,包括含有序列SEQ ID NO:22的有义链和包括含有序列SEQ ID NO:23的反义链;以及(iv) siRNA,包括含有序列SEQ ID NO:40的有义链和包括含有序列SEQ ID NO:41的序列的反义链。

7. 如权利要求1所述的表达载体,其特征在于,所述至少一种编码转录基因沉默元件的核酸序列是shRNA,选自由以下组成的组:(i) 具有序列SEQ ID NO:8的shRNA;(ii) 具有序列SEQ ID NO:16的shRNA;(iii) 具有序列SEQ ID NO:24的shRNA;以及(iv) 具有序列SEQ ID NO:42的shRNA。

8. 如权利要求1所述的表达载体,其特征在于,所述编码抑制HIV共受体的核酸分子的核酸序列是含有双链区域的siRNA或者shRNA,其中双链区域的第一部分包括与HIV共受体序列的一部分相同的序列,并且其中双链区域的第二部分包括与HIV共受体序列的另一部分互补的序列。

9. 如权利要求8所述的表达载体,其特征在于,所述HIV共受体为CCR5或CXCR4。

10. 如权利要求8所述的表达载体,其特征在于,所述shRNA含有序列SEQ ID NO:25。

11. 如权利要求8所述的表达载体,其特征在于,当载体在宿主细胞中加以表达时,所述

HIV共受体的抑制剂能够减少HIV共受体的表达。

12. 如权利要求1所述的表达载体,其特征在于,所述HIV融合抑制蛋白是C46蛋白质。

13. 如权利要求1所述的表达载体,其特征在于,所述HIV融合抑制蛋白含有序列SEQ ID NO:26。

14. 如权利要求1所述的表达载体,其特征在于,所述抑制HIV复制的蛋白质选自人类TRIM5 α 、猴TRIM5 α 、嵌合TRIM5 α 、人类TRIM5-亲环蛋白的融合蛋白、亲环蛋白、E3泛素、APOBEC3G和骨髓间基质细胞抗原2 (BST-2) 组成的组。

15. 如权利要求1所述的表达载体,其特征在于,所述至少两种其他的核酸序列包括(a) 编码抑制HIV共受体的核酸分子的核酸序列;以及(b) 编码HIV融合抑制蛋白的核酸序列或者编码HIV复制抑制剂的核酸序列中的一种。

16. 如权利要求1所述的表达载体,其特征在于,所述至少两种其他的核酸序列包括编码抑制HIV共受体的核酸分子的核酸序列以及编码HIV融合抑制蛋白的核酸序列。

17. 如权利要求1所述的表达载体,其特征在于,所述至少两种其他的核酸序列包括编码抑制HIV共受体的核酸分子的核酸序列以及编码HIV复制抑制剂的核酸序列。

18. 如权利要求1所述的表达载体,其特征在于,所述表达载体包括用来编码转录基因沉默元件的至少两种核酸。

19. 如权利要求1所述的表达载体,其特征在于,所述表达载体包括用来编码转录基因沉默元件的三种核酸。

20. 如权利要求1所述的表达载体,其特征在于,所述表达载体为病毒载体。

21. 如权利要求20所述的表达载体,其特征在于,所述病毒载体为慢病毒载体或逆转录病毒载体。

22. 如权利要求21所述的表达载体,其特征在于,所述慢病毒载体是自我失活型。

23. 如权利要求1所述的表达载体,其特征在于,当在宿主细胞中加以表达时,所述表达载体通过(1) X4-和R5-嗜性HIV病毒株,(2) 高效抗逆转录病毒疗法(HAART)耐药HIV病毒株或(3) X4-和R5-嗜性抗HAART的HIV病毒株,赋予抵抗感染的能力。

24. 如权利要求1所述的表达载体,其特征在于,所述每个核酸都由单独的启动子来表达。

25. 如权利要求1所述的表达载体,其特征在于,所述至少两个核酸由同一启动子表达。

26. 一种表达载体,包括编码能够减少HIV共受体表达的抑制性核酸的第一核酸序列;编码HIV融合抑制蛋白的第二核酸序列和编码沉默核酸,将HIV的5'LTR的序列作为目标的第三核酸序列,其中所述第三核酸选自以下组成的组:(i) 沉默核酸,将HIV-1的5'LTR从位置约143到位置约161的序列作为目标,(ii) 沉默核酸,将HIV-1的5'LTR从位置约136到位置约154的序列作为目标,(iii) 沉默核酸,将HIV-1的5'LTR从位置约205到位置约223的序列作为目标,以及(iv) 沉默核酸,将HIV-1的5'LTR从位置约350到位置约368的序列作为目标。

27. 如权利要求26所述的表达载体,其特征在于,所述第一核酸序列可操作地连接到第一启动子;所述第二核酸序列可操作地连接到第二启动子以及所述第三核酸序列可操作地连接到第三启动子。

28. 如权利要求27所述的表达载体,其特征在于,所述第一、第二和第三启动子中至少

有两个是相同的。

29. 如权利要求27所述的表达载体,其特征在于,所述第一、第二和第三启动子是不同的。

30. 如权利要求26所述的表达载体,还包括第四核酸,其特征在于,所述第四核酸选自自由以下组成的组:将HIV的5'LTR的序列作为目标的另外的核酸,编码HIV复制抑制剂的核酸序列以及编码病毒进入的抑制剂的核酸序列;其中所述第四核酸可操作地连接到第四启动子。

31. 如权利要求26所述的表达载体,其特征在于,所述表达载体包括至少两种沉默核酸,将HIV的5'LTR的序列作为目标。

32. 一种宿主细胞,包含如权利要求1-31中任一所述的表达载体。

33. 如权利要求32所述的宿主细胞,其特征在于,所述宿主细胞是造血祖细胞/干细胞、单核细胞、巨噬细胞、外周血单核细胞、CD4+T淋巴细胞、CD8+T淋巴细胞或树突状细胞。

34. 一种组合物,包含如权利要求1-31中任一所述的任一表达载体。

35. 如权利要求34所述的组合物,还包括药学上可接受的载剂。

36. 如权利要求34所述的组合物,其特征在于,所述组合物被配制成乳状液。

37. 如权利要求34所述的组合物,其特征在于,所述组合物与胶束或纳米颗粒配制。

38. 如权利要求34所述的组合物,其特征在于,所述组合物被封装在聚合物中。

39. 如权利要求34所述的组合物,其特征在于,所述组合物被封装在脂质体内。

40. 如权利要求34所述的组合物,其特征在于,所述组合物被封装在微型细胞、纳米颗粒或纳米胶囊中。

41. 一种抑制HIV基因在受HIV感染的细胞中转录或复制的方法,包括用有效量的如权利要求1-31中任一所述的表达载体或如权利要求34-40中任一所述的组合物与所述细胞接触。

42. 一种治疗受试者中HIV感染的方法,包括对受试者施用有效量的如权利要求1-31中任一所述的表达载体或如权利要求34-40中任一所述的组合物。

43. 一种预防或减少受试者中HIV感染的方法,包括对受试者施用有效量的如权利要求1-31中任一所述的表达载体或如权利要求34-40中任一所述的组合物。

44. 一种预防或减少没有感染HIV的受试者生产性HIV感染的方法,包括对受试者施用有效量的如权利要求1-31中任一所述的表达载体或如权利要求34-40中任一所述的组合物。

45. 一种组合物,包括(i)包括至少两种核酸的表达载体,其中所述至少两种核酸选自自由以下组成的组:编码抑制HIV共受体的核酸分子的核酸序列;编码HIV融合抑制蛋白的核酸序列;编码HIV复制抑制剂的核酸序列以及编码病毒进入抑制剂的核酸序列;和(ii)编码至少一种将HIV-1的5'LTR中的序列作为目标的转录基因沉默元件的核酸序列。

46. 如权利要求45所述的组合物,其特征在于,所述表达载体为慢病毒载体和包括编码抑制HIV共受体的核酸分子的核酸序列和编码HIV融合抑制蛋白的核酸序列。

47. 如权利要求46所述的组合物,其特征在于,所述HIV共受体为CCR5和所述HIV融合抑制蛋白为C46。

48. 如权利要求45所述的组合物,其特征在于,所述编码至少一种转录基因沉默元件的

核酸选自由以下组成的组：(i) 沉默核酸，将序列SEQ ID NO:1作为目标，(ii) 沉默核酸，将序列SEQ ID NO:9作为目标，(iii) 沉默核酸，将序列SEQ ID NO:17作为目标，(iv) 沉默核酸，将序列SEQ ID NO:36作为目标，(v) 沉默核酸，将与序列SEQ ID NO:1有至少95%同一性的序列作为目标，(vi) 沉默核酸，将与序列SEQ ID NO:9有至少95%同一性的序列作为目标，(vii) 沉默核酸，将与序列SEQ ID NO:17有至少95%同一性的序列作为目标以及(viii) 沉默核酸，将与序列SEQ ID NO:36有至少95%同一性的序列作为目标。

49. 如权利要求45所述的组合物，其特征在于，所述编码至少一种转录基因沉默元件的核酸是包括有义链和反义链的RNA双链，其中有义链包括与序列SEQ ID NO:6、序列SEQ ID NO:14、序列SEQ ID NO:22和序列SEQ ID NO:40中的一个有至少95%同一性的序列。

50. 如权利要求45所述的组合物，其特征在于，所述编码至少一种转录基因沉默元件的核酸是siRNA，选自由以下组成的组：(i) siRNA，包括含有序列SEQ ID NO:6的有义链和包括含有序列SEQ ID NO:7的反义链；(ii) siRNA，包括含有序列SEQ ID NO:14的有义链和包括含有序列SEQ ID NO:15的反义链；(iii) siRNA，包括含有序列SEQ ID NO:22的有义链和包括含有序列SEQ ID NO:23的反义链；以及(iv) siRNA，包括含有序列SEQ ID NO:40的有义链和包括含有序列SEQ ID NO:41的反义链。

51. 如权利要求45所述的组合物，其特征在于，所述编码至少一种转录基因沉默元件的核酸是shRNA，选自由以下组成的组：(i) 具有序列SEQ ID NO:8的shRNA；(ii) 具有序列SEQ ID NO:16的shRNA；(iii) 具有序列SEQ ID NO:24的shRNA；以及(iv) 具有序列SEQ ID NO:42的shRNA。

52. 如权利要求45所述的组合物，其特征在于，还包括药学上可接受的载剂。

53. 一种抑制HIV基因在受HIV感染的细胞中转录或复制的方法，包括用有效量的如权利要求45-52中任一所述的组合物与所述细胞接触。

54. 一种治疗受试者中HIV感染的方法，包括对受试者施用有效量的如权利要求45-52中任一所述的组合物。

55. 一种预防或减少受试者中HIV感染的方法，包括对受试者施用有效量的如权利要求45-52中任一所述的组合物。

56. 一种预防或减少没有感染HIV的受试者生产性HIV感染的方法，包括对受试者施用有效量的如权利要求45-52中任一所述的组合物。

57. 一种治疗受试者中HIV感染的方法，包括联合施用(i) 有效量的表达载体，所述表达载体包括至少两种核酸，其中所述至少两种核酸选自由以下组成的组：编码抑制HIV共受体的核酸分子的核酸序列；编码HIV融合抑制蛋白的核酸序列；编码HIV复制抑制剂的核酸序列以及编码病毒进入抑制剂的核酸序列；和(ii) 有效量的至少一种沉默核酸，选自由以下组成的组：(a) 沉默核酸，将序列SEQ ID NO:1作为目标，(b) 沉默核酸，将序列SEQ ID NO:9的序列作为目标，(c) 沉默核酸，将序列SEQ ID NO:17的序列作为目标，(d) 沉默核酸，将序列SEQ ID NO:36的序列作为目标，(e) 沉默核酸，将与序列SEQ ID NO:1有至少95%同一性的序列作为目标，(f) 沉默核酸，将与序列SEQ ID NO:9有至少95%同一性的序列作为目标，(g) 沉默核酸，将与序列SEQ ID NO:17有至少95%同一性的序列作为目标以及(h) 沉默核酸，将与序列SEQ ID NO:36有至少95%同一性的序列作为目标。

58. 如权利要求57所述的方法，其特征在于，所述联合施用是同步的。

59. 如权利要求57所述的方法,其特征在于,所述表达载体和所述至少一种转录基因沉默元件在不同的时间内被施用。

60. 如权利要求57所述的方法,其特征在于,所述表达载体包括编码抑制HIV共受体的核酸分子的核酸序列以及编码HIV融合抑制蛋白的核酸序列。

61. 如权利要求60所述的方法,其特征在于,所述HIV共受体为CCR5和所述HIV融合抑制蛋白为C46。

62. 一种预防或减少受试者中HIV感染的方法,包括联合施用(i)有效量的表达载体,所述表达载体包括至少两种核酸,其中所述至少两种核酸选自以下组成的组:编码抑制HIV共受体的核酸序列;编码抑制HIV与靶细胞融合的蛋白的核酸序列;编码抑制HIV复制的蛋白的核酸序列以及编码病毒进入抑制剂的核酸序列;和(ii)有效量的至少一种沉默核酸,选自以下组成的组:(a)沉默核酸,将序列SEQ ID NO:1作为目标,(b)沉默核酸,将序列SEQ ID NO:9作为目标,(c)沉默核酸,将序列SEQ ID NO:17作为目标,(d)沉默核酸,将序列SEQ ID NO:36作为目标,(e)沉默核酸,将与序列SEQ ID NO:1有至少95%同一性的序列作为目标,(f)沉默核酸,将与序列SEQ ID NO:9有至少95%同一性的序列作为目标,(g)沉默核酸,将与序列SEQ ID NO:17有至少95%同一性的序列作为目标,以及(h)沉默核酸,将与序列SEQ ID NO:36有至少95%同一性的序列作为目标。

63. 如权利要求62所述的方法,其特征在于,所述联合施用是同步的。

64. 如权利要求62所述的方法,其特征在于,所述表达载体和所述至少一种转录基因沉默元件在不同的时间内被施用。

65. 如权利要求62所述的方法,其特征在于,所述表达载体包括编码抑制HIV共受体的核酸分子的核酸序列以及编码HIV融合抑制蛋白的核酸序列。

66. 如权利要求65所述的方法,其特征在于,所述HIV共受体为CCR5和所述HIV融合抑制蛋白为C46。

67. 一种预防或减少受试者中HIV感染的方法,包括利用如权利要求1-31中任一所述的表达载体转导造血细胞以及在受试者中移植所述转导的造血细胞,其中所述转导的造血细胞对HIV感染有抵抗力。

68. 如权利要求34-40和45-52中任一所述的组合物在制造用于治疗被HIV感染的受试者的药物中的用途。

69. 如权利要求1-31中任一所述的病毒性表达载体在制造用于治疗被HIV感染的受试者的药物中的用途。

70. 一种表达载体,包括编码具有序列SEQ ID NO:25的shRNA的第一核酸;编码C46蛋白质的第二核酸序列以及编码沉默核酸,将HIV的5'LTR的序列作为目标的第三核酸序列,所述第三核酸选自以下组成的组:(i)沉默核酸,将HIV-1的5'LTR从位置约143到位置约161的序列作为目标,(ii)沉默核酸,将HIV-1的5'LTR从位置约136到位置约154的序列作为目标,(iii)沉默核酸,将HIV-1的5'LTR从位置约205到位置约223的序列作为目标,以及(iv)沉默核酸,将HIV-1的5'LTR从位置约350到位置约368的序列作为目标;其中,所述第一核酸序列可操作地连接到H1pol III启动子;所述第二核酸序列可操作地连接到泛素C pol II启动子;所述第三核酸序列可操作地连接到U6启动子。

71. 如权利要求70所述的表达载体,其特征在于,所述编码C46蛋白质的第二核酸序列

具有序列SEQ ID NO:26。

72. 如权利要求70-71中任一所述的表达载体,所述编码转录基因沉默元件的第三核苷酸序列为siRNA,选自由以下组成的组:(i) siRNA,包括含有序列SEQ ID NO:6的有义链和包括含有序列SEQ ID NO:7的反义链;(ii) siRNA,包括含有序列SEQ ID NO:14的有义链和包括含有序列SEQ ID NO:15的反义链;(iii) siRNA,包括含有序列SEQ ID NO:22的有义链和包括含有序列SEQ ID NO:23的反义链;以及(iv) siRNA,包括含有序列SEQ ID NO:40的有义链和包括含有序列SEQ ID NO:41的反义链。

73. 如权利要求70-71中任一所述的表达载体,所述编码转录基因沉默元件的第三核苷酸序列为shRNA,选自由以下组成的组:(i) 具有序列SEQ ID NO:8的shRNA;(ii) 具有序列SEQ ID NO:16的shRNA;(iii) 具有序列SEQ ID NO:24的shRNA;以及(iv) 具有序列SEQ ID NO:42的shRNA。

74. 如权利要求70-71中任一所述的表达载体,还包括第四核苷酸序列,所述第四核苷酸序列是HIV的5'LTR的序列中的另一种,选自由以下组成的组:(i) 沉默核酸,将HIV-1的5'LTR从位置约143到位置约161的序列作为目标,(ii) 沉默核酸,将HIV-1的5'LTR从位置约136到位置约154的序列作为目标,(iii) 沉默核酸,将HIV-1的5'LTR从位置约205到位置约223的序列作为目标,以及(iv) 沉默核酸,将HIV-1的5'LTR从位置约350到位置约368的序列作为目标;其中所述第四核苷酸序列可操作性地连接到U1启动子。

75. 如权利要求74所述的表达载体,其特征在于,所述编码转录沉默元件的第四核苷酸序列为siRNA,选自由以下组成的组:(i) siRNA,包括含有序列SEQ ID NO:6的有义链和包括含有序列SEQ ID NO:7的反义链;(ii) siRNA,包括含有序列SEQ ID NO:14的有义链和包括含有序列SEQ ID NO:15的反义链;(iii) siRNA,包括含有序列SEQ ID NO:22的有义链和包括含有序列SEQ ID NO:23的反义链;以及(iv) siRNA,包括含有序列SEQ ID NO:40的有义链和包括含有序列SEQ ID NO:41的反义链。

76. 如权利要求74所述的表达载体,其特征在于,所述编码转录沉默元件的第四核苷酸序列为shRNA,选自由以下组成的组:(i) 具有序列SEQ ID NO:8的shRNA;(ii) 具有序列SEQ ID NO:16的shRNA;(iii) 具有序列SEQ ID NO:24的shRNA;以及(iv) 具有序列SEQ ID NO:42的shRNA。

77. 一种表达载体,包括编码能够减少HIV共受体表达的抑制性核酸的第一核苷酸序列;编码HIV融合抑制蛋白的第二核苷酸序列,其中所述第二核苷酸序列不是T20;和编码沉默核酸,将HIV的5'LTR的序列作为目标的第三核苷酸序列,所述第三核苷酸选自由以下组成的组:(i) 沉默核酸,将HIV-1的5'LTR从位置约143到位置约161的序列作为目标,(ii) 沉默核酸,将HIV-1的5'LTR从位置约136到位置约154的序列作为目标,(iii) 沉默核酸,将HIV-1的5'LTR从位置约205到位置约223的序列作为目标,以及(iv) 沉默核酸,将HIV-1的5'LTR从位置约350到位置约368的序列作为目标。

78. 如权利要求77所述的表达载体,其特征在于,所述编码HIV融合抑制蛋白的第二核苷酸序列具有序列SEQ ID NO:26。

79. 一种在受试者中治疗HIV感染的方法,包括向受试者施用有效量的如权利要求70-78中任一所述的组合物。

80. 一种治疗HIV感染的宿主病人的方法,包括从宿主病人的循环血液或骨髓中提取造

血干细胞、利用如权利要求1-31中任一所述的表达载体来处理所述造血干细胞以及将所述处理过的造血干细胞施用或者移植到所述相同的宿主病人中。

用于HIV的治疗的基因疗法及其用途

[0001] 相关申请

[0002] 本申请要求申请号为“62/163,332”、申请日为2015年5月18号的美国临时申请的权益。在此通过引用,将其整体并入本文。

技术领域

[0003] 总体来说,本发明涉及分子生物学和病毒学领域。特别地,本发明涉及用于治疗 and 预防HIV感染的表达载体,以及在组织培养系统、在动物模型系统和HIV-1感染的受体中抑制HIV感染和复制的方法。

背景技术

[0004] HIV-1是获得性免疫缺陷综合征(AIDS)的病原体,在全世界有大约3000万人感染。HIV导致免疫系统衰退,并增加因机会性感染而死亡的可能性。HIV感染是一个重大的全球健康问题,世界卫生组织称其为大流行性疾病。大多数感染艾滋病毒的人,特别是在发展中国家,最终发展成艾滋病,每年有一百万多人死于艾滋病。

[0005] HIV-1属于病毒逆转录病毒家族,是一种包膜病毒,它的基因组由两条单链RNA分子(ssRNA)组成。HIV-1的主要靶点是CD4+表达细胞,如CD4+T细胞。HIV-1病毒的糖蛋白与靶细胞的CD4分子和趋化因子共受体、CCRS或CXCR4在靶细胞的表面相互作用。融合和进入到靶细胞后,包含病毒基因组的核壳体分解,将包括ssRNA的病毒的内容物释放进入细胞质。HIV-1的逆转录(RT)酶从ssRNA基因组合成双链DNA(dsDNA)。双链HIV-1DNA分子合成后,HIV-1的DNA被整合到宿主基因组中。

[0006] 整合的HIV-1DNA的两侧是相同的5'和3'长末端重复序列(LTR),在这里HIV-1可以启动整合HIV-1基因组的转录。病毒DNA的转录需要转录因子,比如在活化T细胞中被上调的NF- κ B。因此,T细胞活化后,T细胞内病毒转录最活跃,如感染期间。由整合的HIV-1基因组转录产生的病毒RNA随后被翻译并被包装成病毒颗粒,然后离开细胞成为传染性病毒。

[0007] HIV-1感染的治疗方法包括联合抗逆转录病毒疗法(cART)。cART减缓HIV发展,其包括核苷类逆转录酶抑制剂、蛋白酶抑制剂、非核苷类逆转录酶抑制剂、整合酶和融合抑制剂的联合。这相应地大大降低了世界上该种治疗方法存在的地区的HIV/AIDS的发病率和死亡率。然而,cART并不能治愈或者完全消除HIV/AIDS的所有病症。cART治疗方法也受到耐药突变的影响,并且有一系列副作用,这些副作用是严重的,而且似乎是累积的。此外,cART治疗方法的间断几乎总是导致可检测病毒复制的再次出现和AIDS的进展,并且已显示与所有死亡原因和严重非艾滋病事件的发生率增加有关。因此,以及cART的高成本和严格的依从性,这种治疗对于许多病人来说是相对无效的。

[0008] 基于HIV的慢病毒载体正在迅速成为用于研究和临床基因转移应用的所选择的逆转录病毒载体系统。增强能力的慢病毒载体转导静止期干细胞和非分裂终末分化细胞已经导致多种治疗基因递送载体的开发,以及有前途的研究工具的开发,比如短发夹RNA(shRNA)基因敲除库和在终末分化细胞诱导多能性的载体。早期的 γ 逆转录病毒的临床基

因治疗载体恢复了患有X连锁重症联合免疫缺陷 (SCID-X1) 的患者的免疫功能,但是它们随后被发现通过原癌基因的反式激活引起增殖性疾病。新的慢病毒载体设计可以显著降低这种风险,它们等待临床检验,以验证其被预测的安全性。该领域仍在不断变化,临床试验的结果是不可预测的。

[0009] 例如,Trobridge等,PLoS One,Vol.4:e7693,2009(以下简称“Trobridge”)教导在同一表达载体中插入聚合酶III驱动shRNA作为由一个独立的启动子驱动C46融合抑制剂基因导致与不包括shRNA的载体相比C46表达的明显降低(参见Trobridge第5页、左栏、第1段和图3)。因此,与独自编码C46融合抑制剂的载体相比(参见Id),双载体对抗HIV感染的效率是非常低的(超过27倍不太有效)。此外,与独自编码C46融合抑制剂的载体相比(参见第6和7页、表1和图6),双载体展示了抗HIV基因向造血细胞的转移速率大大降低。Trobridge认为C46的低表达归结为载体中包含shRNA编码序列(参见第7页、右栏、第一段和图9、左栏、第三段)。Trobridge还公开了低量基因转移水平是抗HIV基因治疗方法临床试验的主要障碍(参见摘要、第2页、左栏、第1段整段和第8页、右栏、第2段整段)。

发明内容

[0010] 本发明提供了一种用于治疗、预防和/或减少HIV感染的新的治疗方法,其中,在病毒感染中通过基因治疗的不同步骤的组合是靶向的。例如,本发明提供了编码病毒进入宿主细胞抑制剂、编码病毒融合抑制剂和/或编码病毒复制抑制剂和编码HIV-1基因转录抑制剂的载体。本发明的一些方面是表达载体。因此,根据本发明的一个方面是表达载体包括(i)至少一种编码转录基因沉默元件的核酸序列;以及(ii)至少由编码抑制HIV共受体的核酸分子的核酸序列、编码HIV融合抑制蛋白的核酸序列、编码HIV复制抑制剂的核酸序列和编码病毒进入的抑制剂的核酸序列组成的组别中选择的另外两种核酸序列。在一些实施例中,所述至少一种编码转录基因沉默元件的核酸序列是沉默核酸,将HIV的5'LTR的序列作为目标。在一些实施例中,所述至少一种编码转录基因沉默元件的核酸序列选自由以下组成的组:(i)沉默核酸,将HIV-1的5'LTR从位置约143到位置约161的序列作为目标,(ii)沉默核酸,将HIV-1的5'LTR从位置约136到位置约154的序列作为目标,(iii)沉默核酸,将HIV-1的5'LTR从位置约205到位置约223的序列作为目标,以及(iv)沉默核酸,将HIV-1的5'LTR从位置约350到位置约368的序列作为目标(本文中从位置350到位置368的序列也被称为“PromA”)。在一些实施例中,所述至少两种其他的核酸序列包括编码抑制HIV共受体的核酸分子的核酸序列以及编码HIV融合抑制蛋白的核酸序列。在其他实施例中,所述至少两种其他的核酸序列包括编码抑制HIV共受体的核酸分子的核酸序列以及编码HIV复制抑制剂的核酸序列。

[0011] 在一些实施例中,所述至少一种编码转录基因沉默元件的核酸序列选自由以下组成的组:(i)沉默核酸,将序列SEQ ID NO:1作为目标,(ii)沉默核酸,将序列SEQ ID NO:9作为目标,(iii)沉默核酸,将序列SEQ ID NO:17作为目标,(iv)沉默核酸,将与序列SEQ ID NO:1有至少95%同一性的序列作为目标,(v)沉默核酸,将与序列SEQ ID NO:9有至少95%同一性的序列作为目标,(vi)沉默核酸,将与序列SEQ ID NO:17有至少95%同一性的序列作为目标,(vii)沉默核酸,将序列SEQ ID NO:36作为目标,以及(viii)沉默核酸,将与序列SEQ ID NO:36有至少95%同一性的序列作为目标。

[0012] 在一些实施例中,所述至少一种编码转录基因沉默元件的核酸序列是包括有义链和反义链的RNA双链,其中有义链包括与序列SEQ ID NO:6、序列SEQ ID NO:14、序列SEQ ID NO:22或序列SEQ ID NO:40中的一个有至少95%同一性的序列。在一些实施例中,所述至少一种编码转录基因沉默元件的核酸序列是siRNA,选自由以下组成的组:(i) siRNA,包括含有序列SEQ ID NO:6的有义链和包括含有序列SEQ ID NO:7的反义链;(ii) siRNA,包括含有序列SEQ ID NO:14的有义链和包括含有序列SEQ ID NO:15的反义链;(iii) siRNA,包括含有序列SEQ ID NO:22的有义链和包括含有序列SEQ ID NO:23的反义链;以及(iv) siRNA,包括含有序列SEQ ID NO:40的有义链和包括含有序列SEQ ID NO:41的反义链。

[0013] 在一些实施例中,所述至少一种编码转录基因沉默元件的核酸序列是shRNA,选自由以下组成的组:(i) 具有序列SEQ ID NO:8的shRNA;(ii) 具有序列SEQ ID NO:16的shRNA;(iii) 具有序列SEQ ID NO:24的shRNA;以及(iv) 具有序列SEQ ID NO:42的shRNA。

[0014] 在一些实施例中,编码抑制HIV共受体的核酸分子的核酸序列是含有双链区域的siRNA或者shRNA,其中双链区域的第一部分包括与HIV共受体序列的一部分相同的序列,并且其中双链区域的第二部分包括与HIV共受体序列的另一部分互补的序列。在一些实施例中,HIV共受体为CCR5或CXCR4。在一些实施例中,编码抑制HIV共受体的核酸分子的核酸序列是含有序列SEQ ID NO:25的shRNA。在一些实施例中,当载体在宿主细胞中加以表达时,HIV共受体的抑制剂能够减少HIV共受体的表达。在一些实施例中,抑制HIV向宿主细胞融合的蛋白质是C46蛋白质。在一些实施例中,抑制HIV融合的蛋白质含有序列SEQ ID NO:26。在一些实施例中,抑制HIV复制的蛋白质选自由人类TRIM5 α 、猴TRIM5 α 、嵌合TRIM5 α 、人类TRIM5亲环蛋白的融合蛋白、亲环蛋白、E3泛素、APOBEC3G和骨髓基质细胞抗原2 (BST-2) 组成的组。

[0015] 在一些实施例中,表达载体包括用来编码转录基因沉默元件的至少两种核酸。在一些实施例中,表达载体包括用来编码转录基因沉默元件的三种核酸。在一些实施例中,表达载体为病毒载体。在一些实施例中,病毒载体为慢病毒载体或逆转录病毒载体。在一些实施例中,慢病毒载体是自我失活型。在一些实施例中,表达载体,当在宿主细胞中加以表达时,通过(1) X4-和R5-嗜性HIV病毒株,(2) 高效抗逆转录病毒疗法(HAART) 耐药HIV病毒株或(3) X4-和R5-嗜性抗HAART的HIV病毒株,赋予抵抗感染的能力。在一些实施例中,每个核酸都由单独的启动子来表达。在一些实施例中,至少两个核酸由同一启动子表达。

[0016] 本发明的另一方面是表达载体,包括编码能够减少HIV共受体表达的抑制性核酸的第一核酸序列;编码HIV融合抑制蛋白的第二核酸序列和编码沉默核酸,将HIV的5'LTR的序列作为目标的第三核酸序列,选自由以下组成的组:(i) 沉默核酸,将HIV-1的5'LTR从位置约143到位置约161的序列作为目标,(ii) 沉默核酸,将HIV-1的5'LTR从位置约136到位置约154的序列作为目标,(iii) 沉默核酸,将HIV-1的5'LTR从位置约205到位置约223的序列作为目标,以及(iv) 沉默核酸,将HIV-1的5'LTR从位置约350到位置约368的序列作为目标。在一些实施例中,第一核酸序列可操作地连接到第一启动子;第二核酸序列可操作地连接到第二启动子以及第三核酸序列可操作地连接到第三启动子。在一些实施例中,第一、第二和第三启动子中至少有两个是相同的。在一些实施例中,第一、第二和第三启动子是不同的。在一些实施例中,表达载体更一步包括第四核酸,其中第四核酸选自由将HIV的5'LTR的序列作为目标的另外的核酸,编码HIV复制抑制剂的核酸序列以及编码病毒进入的抑制剂

的核酸序列组成的组,其中第四核酸可操作地连接到第四启动子。在一些实施例中,表达载体包括至少两种沉默核酸,将HIV的5'LTR的序列作为目标。在一些实施例中,表达载体为慢病毒载体。

[0017] 本发明的另一方面是表达载体,包括编码含有序列SEQ ID NO:25的shRNA的第一核酸;编码C46蛋白质的第二核酸序列以及编码沉默核酸,将HIV的5'LTR的其中一种序列作为目标的第三核酸序列,选自由以下组成的组:(i)沉默核酸,将HIV-1的5'LTR从位置约143到位置约161的序列作为目标,(ii)沉默核酸,将HIV-1的5'LTR从位置约136到位置约154的序列作为目标,(iii)沉默核酸,将HIV-1的5'LTR从位置约205到位置约223的序列作为目标,以及(iv)沉默核酸,将HIV-1的5'LTR从位置约350到位置约368的序列作为目标,其中,第一核酸序列可操作地连接到一个H1po1 III启动子;第二核酸序列可操作地连接到一个po1 II启动子,比如泛素C po1 II启动子;第三核酸序列可操作地连接到U6、U6.1或U6.2启动子中的一个(本文中,U6、U6.1或U6.2可被统称为“U6”)。在一些实施例中,表达载体还包括第四核酸序列,其中第四核酸序列是HIV的5'LTR的序列中的另一种,选自由以下组成的组:(i)沉默核酸,将HIV-1的5'LTR从位置约143到位置约161的序列作为目标,(ii)沉默核酸,将HIV-1的5'LTR从位置约136到位置约154的序列作为目标,(iii)沉默核酸,将HIV-1的5'LTR从位置约205到位置约223的序列作为目标,以及(iv)沉默核酸,将HIV-1的5'LTR从位置约350到位置约368的序列作为目标,其中第四核酸序列可操作性地连接到U1启动子。在一些实施例中,表达载体是慢病毒载体。

[0018] 本发明的另外一方面为表达载体,包括编码能够减少HIV共受体表达的抑制性核酸的第一核酸序列;编码HIV融合抑制蛋白的第二核酸序列,其中第二核酸不是T20和编码沉默核酸,将HIV的5'LTR的序列作为目标的第三核酸序列,其中第三核酸选自由以下组成的组:(i)沉默核酸,将HIV-1的5'LTR从位置约143到位置约161的序列作为目标,(ii)沉默核酸,将HIV-1的5'LTR从位置约136到位置约154的序列作为目标,(iii)沉默核酸,将HIV-1的5'LTR从位置约205到位置约223的序列作为目标,以及(iv)沉默核酸,将HIV-1的5'LTR从位置约350到位置约368的序列作为目标。在一些实施例中,编码HIV融合抑制蛋白的第二核酸序列含有序列SEQ ID NO:26。

[0019] 本发明的另外一方面为包括表达载体的宿主细胞,所述表达载体包括编码能够减少HIV共受体表达的抑制性核酸的第一核酸序列;编码HIV融合抑制蛋白的第二核酸序列和编码沉默核酸,将HIV的5'LTR的序列作为目标的第三核酸序列,其中第三核酸选自由以下组成的组(i)沉默核酸,将HIV-1的5'LTR从位置约143到位置约161的序列作为目标,(ii)沉默核酸,将HIV-1的5'LTR从位置约136到位置约154的序列作为目标,(iii)沉默核酸,将HIV-1的5'LTR从位置约205到位置约223的序列作为目标,以及(iv)沉默核酸,将HIV-1的5'LTR从位置约350到位置约368的序列作为目标。在一些实施例中,宿主细胞是造血祖细胞/干细胞、单核细胞、巨噬细胞、外周血单核细胞、CD4+T淋巴细胞、CD8+T淋巴细胞或树突状细胞。

[0020] 本发明的另外一方面为组合物,比如含有一种表达载体的组合物,或者含有一种表达载体和另一种核酸分子的组合物。因此,根据本发明的另一个方面是一个组合物,包括一种药物组合物,包括一种表达载体,所述表达载体包括编码能够减少HIV共受体表达的抑制性核酸的第一核酸序列,编码HIV融合抑制蛋白的第二核酸序列和编码沉默核酸,将HIV

的5'LTR的序列作为目标的第三核酸序列,其中第三核酸选自由以下组成的组:(i)沉默核酸,将HIV-1的5'LTR从位置约143到位置约161的序列作为目标,(ii)沉默核酸,将HIV-1的5'LTR从位置约136到位置约154的序列作为目标,(iii)沉默核酸,将HIV-1的5'LTR从位置约205到位置约223的序列作为目标,以及(iv)沉默核酸,将HIV-1的5'LTR从位置约350到位置约368的序列作为目标。在一些实施例中,表达载体是慢病毒载体。在一些实施例中,组合物还包括药学上可接受的载剂(carrier)。在一些实施例中,所述组合物被配制成乳状液。在一些实施例中,所述组合物与胶束、纳米颗粒或纳米胶囊配制。在一些实施例中,所述组合物被封装在聚合物中。在一些实施例中,所述组合物被封装在脂质体内。在一些实施例中,所述组合物被封装在微型细胞中。在一些实施例中,编码HIV融合抑制剂的核酸不是T20。

[0021] 本发明的另外一方面是组合物,所述组合物包括(i)包括至少两种核酸的表达载体,其中所述至少两种核酸选自由以下组成的组:编码抑制HIV共受体的核酸分子的核酸序列;编码HIV融合抑制蛋白的核酸序列;编码HIV复制抑制剂的核酸序列以及编码病毒进入抑制剂的核酸序列;和(ii)编码至少一种将HIV-1的5'LTR作为目标的转录基因沉默元件的核酸。在一些实施例中,表达载体是慢病毒载体。

[0022] 在一些实施例中,所述至少一种编码转录基因沉默元件的核酸选自由以下组成的组:(i)沉默核酸,将序列SEQ ID NO:1作为目标,(ii)沉默核酸,将序列SEQ ID NO:9作为目标,(iii)沉默核酸,将序列SEQ ID NO:17作为目标,(iv)沉默核酸,将序列SEQ ID NO:36作为目标,(v)沉默核酸,将与序列SEQ ID NO:1有至少95%同一性的序列作为目标,(vi)沉默核酸,将与序列SEQ ID NO:9有至少95%同一性的序列作为目标,(vii)沉默核酸,将与序列SEQ ID NO:17有至少95%同一性的序列作为目标以及(viii)沉默核酸,将与序列SEQ ID NO:36有至少95%同一性的序列作为目标。在一些实施例中,所述至少一种编码转录基因沉默元件的核酸是包括有义链和反义链的RNA双链,其中有义链包括与序列SEQ ID NO:6、序列SEQ ID NO:14、序列SEQ ID NO:22或序列SEQ ID NO:40中的一个有至少95%同一性的序列。在一些实施例中,编码至少一种转录基因沉默元件的核酸是siRNA,选自由以下组成的组:(i)siRNA,包括含有序列SEQ ID NO:6的有义链和含有序列SEQ ID NO:7的反义链;(ii)siRNA,包括含有序列SEQ ID NO:14的有义链和含有序列SEQ ID NO:15的反义链;(iii)siRNA,包括含有序列SEQ ID NO:22的有义链和含有序列SEQ ID NO:23的反义链;以及(iv)siRNA,包括含有序列SEQ ID NO:40的有义链和含有序列SEQ ID NO:41的反义链。在一些实施例中,编码至少一种转录基因沉默元件的核酸序列是shRNA,选自由以下组成的组:(i)具有碱基序列SEQ ID NO:8的shRNA;(ii)具有序列SEQ ID NO:16的shRNA;(iii)具有序列SEQ ID NO:24的shRNA;以及(iv)具有序列SEQ ID NO:42的shRNA。在一些实施例中,所述组合物还包括药学上可接受的载剂。

[0023] 本发明的其他方面是方法,包括(i)抑制HIV转录的方法;(ii)抑制HIV复制的方法;(iii)治疗HIV感染的方法;(iv)预防HIV感染的方法;(v)减少HIV感染的方法以及(vi)预防和/或减少没有感染HIV的受试者生产性HIV感染的方法。这些方法是通过用表达载体施予或接触细胞来进行的,如本文所述,包含表达载体和/或其他成分或活性剂的组合物,或者联合施用包括(a)表达载体以及(b)另一种成分或活性剂的组合物。

[0024] 因此,根据本发明的另外一方面是用来抑制HIV基因在受HIV感染的细胞中转录的

方法,包括用有效量的表达载体与细胞接触,所述表达载体包括编码能够减少HIV共受体表达的抑制性核酸的第一核酸序列,编码HIV融合抑制蛋白的第二核酸序列和编码沉默核酸,将HIV的5'LTR的序列作为目标的第三核酸序列,其中第三核酸选自由以下组成的组:(i)沉默核酸,将HIV-1的5'LTR从位置约143到位置约161的序列作为目标,(ii)沉默核酸,将HIV-1的5'LTR从位置约136到位置约154的序列作为目标,(iii)沉默核酸,将HIV-1的5'LTR从位置约205到位置约223的序列作为目标,以及(iv)沉默核酸,将HIV-1的5'LTR从位置约350到位置约368的序列作为目标。

[0025] 根据本发明的另外一方面是用来抑制HIV基因在受HIV感染的细胞中复制的方法,包括用有效量的表达载体与细胞接触,所述表达载体包括编码能够减少HIV共受体表达的抑制性核酸的第一核酸序列,编码HIV融合抑制蛋白的第二核酸序列和编码沉默核酸,将HIV的5'LTR的序列作为目标的第三核酸序列,其中第三核酸选自由以下组成的组:(i)沉默核酸,将HIV-1的5'LTR从位置约143到位置161的序列作为目标,(ii)沉默核酸,将HIV-1的5'LTR从位置约136到位置约154的序列作为目标,(iii)沉默核酸,将HIV-1的5'LTR从位置约205到位置约223的序列作为目标,以及(iv)沉默核酸,将HIV-1的5'LTR从位置约350到位置约368的序列作为目标。在一些实施例中,编码HIV融合抑制剂的核酸不是T20。

[0026] 本发明的另外一方面是用来在受试者中治疗HIV感染的方法,包括向受体施用有效量的表达载体,所述表达载体包括编码能够减少HIV共受体表达的抑制性核酸的第一核酸序列,编码HIV融合抑制蛋白的第二核酸序列和编码沉默核酸,将HIV的5'LTR的序列作为目标的第三核酸序列,其中第三核酸选自由以下组成的组:(i)沉默核酸,将HIV-1的5'LTR从位置约143到位置约161的序列作为目标,(ii)沉默核酸,将HIV-1的5'LTR从位置约136到位置约154的序列作为目标,(iii)沉默核酸,将HIV-1的5'LTR从位置约205到位置约223的序列作为目标,以及(iv)沉默核酸,将HIV-1的5'LTR从位置约350到位置约368的序列作为目标。或者,本发明也包括这种表达载体在制造用于在受试者中治疗HIV感染的药物中的用途。在一些实施例中,编码HIV融合抑制剂的核酸不是T20。

[0027] 本发明的另外一方面是用来在受试者中预防和/或减少HIV感染的方法,包括向受体施用有效量的表达载体,所述表达载体包括编码能够减少HIV共受体表达的抑制性核酸的第一核酸序列,编码HIV融合抑制蛋白的第二核酸序列和编码沉默核酸,将HIV的5'LTR的序列作为目标的第三核酸序列,其中第三核酸选自由以下组成的组:(i)沉默核酸,将HIV-1的5'LTR从位置约143到位置约161的序列作为目标,(ii)沉默核酸,将HIV-1的5'LTR从位置约136到位置约154的序列作为目标,(iii)沉默核酸,将HIV-1的5'LTR从位置约205到位置约223的序列作为目标,以及(iv)沉默核酸,将HIV-1的5'LTR从位置约350到位置约368的序列作为目标。或者,本发明也包括这种表达载体在制造用于在受试者中预防和/或减少HIV感染的药物中的用途。在一些实施例中,编码HIV融合抑制剂的核酸不是T20。

[0028] 本发明的另外一方面是用来预防和/或减少没有感染HIV的受试者生产性HIV感染的方法,包括向受体施用有效量的表达载体,所述表达载体包括编码能够减少HIV共受体表达的抑制性核酸的第一核酸序列,编码HIV融合抑制蛋白的第二核酸序列和编码沉默核酸,将HIV的5'LTR的序列作为目标的第三核酸序列,其中第三核酸选自由以下组成的组:(i)沉默核酸,将HIV-1的5'LTR从位置约143到位置约161的序列作为目标,(ii)沉默核酸,将HIV-1的5'LTR从位置约136到位置约154的序列作为目标,(iii)沉默核酸,将HIV-1的5'LTR从位

置约205到位置约223的序列作为目标,以及(iv)沉默核酸,将HIV-1的5'LTR从位置约350到位置约368的序列作为目标。或者,本发明也包括这种表达载体在制造用于预防和/或减少没有感染HIV的受试者的生产性HIV感染药物中的用途。在一些实施例中,编码HIV融合抑制剂的核酸不是T20。

[0029] 本发明的另外一方面是用来抑制HIV基因在受HIV感染的细胞中转录的方法,包括用有效量的组合物与细胞接触,所述组合物包括(i)包括至少两种核酸的表达载体,其中所述至少两种核酸选自由以下组成的组:编码抑制HIV共受体的核酸分子的核酸序列;编码HIV融合抑制蛋白的核酸序列;编码HIV复制抑制剂的核酸序列以及编码病毒进入抑制剂的核酸序列;和(ii)编码至少一种将HIV的5'LTR的序列作为目标的转录基因沉默元件的核酸。

[0030] 本发明的另一方面是用来抑制HIV基因在受HIV感染的细胞中复制的方法,包括用有效量的组合物与细胞接触,所述组合物包括(i)包括至少两种核酸的表达载体,其中所述至少两种核酸选自由以下组成的组:编码抑制HIV共受体的核酸分子的核酸序列;编码HIV融合抑制蛋白的核酸序列;编码HIV复制抑制剂的核酸序列以及编码病毒进入抑制剂的核酸;和(ii)编码至少一种将HIV的5'LTR的序列作为目标的转录基因沉默元件的核酸序列。在一些实施例中,编码HIV融合抑制剂的核酸不是T20。

[0031] 本发明的另一方面是用来在受试者中治疗HIV感染的方法,包括向受试者施用有效量的组合物,所述组合物包括(i)包括至少两种核酸的表达载体,其中所述至少两种核酸选自由以下组成的组:编码抑制HIV共受体的核酸分子的核酸序列;编码HIV融合抑制蛋白的核酸序列;编码HIV复制抑制剂的核酸序列以及编码病毒进入抑制剂的核酸序列;和(ii)编码至少一种将HIV的5'LTR的序列作为目标的转录基因沉默元件的核酸。或者,本发明也包括这种组合物在制造用于对受试者治疗HIV感染的药物中的用途。

[0032] 本发明的另一方面是用来在受试者中减少和/或预防HIV感染的方法,包括向受体施用有效量的组合物,所述组合物包括(i)包括至少两种核酸的表达载体,其中所述至少两种核酸选自由以下组成的组:编码抑制HIV共受体的核酸分子的核酸序列;编码HIV融合抑制蛋白的核酸序列;编码HIV复制抑制剂的核酸序列以及编码病毒进入抑制剂的核酸序列;和(ii)编码至少一种将HIV的5'LTR的序列作为目标的转录基因沉默元件的核酸。或者,本发明也包括这种组合物在制造用于预防和/或减少受试者中HIV感染的药物中的用途。

[0033] 本发明的另一方面是一种用来预防和/或减少没有感染HIV的受试者生产性HIV感染的方法,包括向受试者施用有效量的组合物,所述组合物包括(i)包括至少两种核酸的表达载体,其中所述至少两种核酸选自由以下组成的组:编码抑制HIV共受体的核酸分子的核酸序列;编码HIV融合抑制蛋白的核酸序列;编码HIV复制抑制剂的核酸序列以及编码病毒进入抑制剂的核酸序列;和(ii)编码至少一种将HIV的5'LTR的序列作为目标的转录基因沉默元件的核酸。或者,本发明也包括这种组合物在制造用于预防和/或减少没有感染HIV的受试者的生产性HIV感染的药物中的用途。

[0034] 本发明的另一方面是用来治疗受试者HIV感染的方法,包括联合施用(i)有效量的表达载体,所述表达载体包括至少两种核酸,其中所述至少两种核酸选自由以下组成的组:编码抑制HIV共受体的核酸分子的核酸序列;编码HIV融合抑制蛋白的核酸序列;编码HIV复制抑制剂的核酸序列以及编码病毒进入抑制剂的核酸序列;和(ii)有效量的至少一种沉默

核酸,选自由以下组成的组:(a) 沉默核酸,将序列SEQ ID NO:1作为目标,(b) 沉默核酸,将碱基序列SEQ ID NO:9作为目标,(c) 沉默核酸,将序列SEQ ID NO:17作为目标,(d) 沉默核酸,将序列SEQ ID NO:36作为目标,(e) 沉默核酸,将与序列SEQ ID NO:1有至少95%同一性的序列作为目标,(f) 沉默核酸,将与序列SEQ ID NO:9有至少95%同一性的序列作为目标,(g) 沉默核酸,将与序列SEQ ID NO:17有至少95%同一性的序列作为目标以及(h) 沉默核酸,将与序列SEQ ID NO:36有至少95%同一性的序列作为目标。在一些实施例中,所述表达载体是慢病毒载体。在一些实施例中,联合施用是同步的。在一些实施例中,所述表达载体和所述至少一种转录基因沉默元件在不同的时间内被施用。在一些实施例中,所述表达载体包括编码抑制HIV共受体的核酸分子的核酸序列以及编码HIV融合抑制蛋白的核酸序列。在一些实施例中,HIV共受体为CCR5,和HIV融合抑制蛋白为C46。在一些实施例中,编码HIV融合抑制剂的核酸不是T20。

[0035] 本发明的另一方面是用来在受体中减少和/或预防HIV感染的方法,包括联合施用(i) 有效量的表达载体,所述表达载体包括至少两种核酸,其中所述至少两种核酸选自由以下组成的组:编码抑制HIV共受体的核酸分子的核酸序列;编码HIV融合抑制蛋白的核酸序列;编码HIV复制抑制剂的核酸序列以及编码病毒进入抑制剂的核酸序列;和(ii) 有效量的至少一种沉默核酸,选自由以下组成的组:(a) 沉默核酸,将碱基序列SEQ ID NO:1作为目标,(b) 沉默核酸,将碱基序列SEQ ID NO:9作为目标,(c) 沉默核酸,将碱基序列SEQ ID NO:17作为目标,(d) 沉默核酸,将序列SEQ ID NO:36作为目标,(e) 沉默核酸,将与碱基序列SEQ ID NO:1有至少95%同一性的序列作为目标,(f) 沉默核酸,将与碱基序列SEQ ID NO:9有至少95%同一性的序列作为目标,(g) 沉默核酸,将与碱基序列SEQ ID NO:17有至少95%同一性的序列作为目标以及(h) 沉默核酸,将与碱基序列SEQ ID NO:36有至少95%同一性的序列作为目标。在一些实施例中,所述表达载体是慢病毒载体。在一些实施例中,联合施用是同步的。在一些实施例中,所述表达载体和所述至少一种转录基因沉默元件在不同的时间内被施用。在一些实施例中,所述表达载体包括编码抑制HIV共受体的核酸分子的核酸序列以及编码HIV融合抑制蛋白的核酸序列。在一些实施例中,HIV共受体为CCR5,和HIV融合抑制蛋白为C46。在一些实施例中,编码HIV融合抑制剂的核酸不是T20。

[0036] 本发明的另一方面是一种在受试者中治疗HIV的方法,包括用表达载体转导造血细胞以及在受试者中移植转导的造血细胞,其中转导的造血细胞对HIV感染有抵抗力,其中表达载体包括编码能够减少HIV共受体表达的抑制性核酸的第一核酸序列,编码HIV融合抑制蛋白的第二核酸序列和编码沉默核酸,将HIV的5'LTR的序列作为目标的第三核酸序列,所述第三核酸选自由以下组成的组:(i) 沉默核酸,将HIV-1的5'LTR从位置约143到位置约161的序列作为目标,(ii) 沉默核酸,将HIV-1的5'LTR从位置约136到位置约154的序列作为目标,(iii) 沉默核酸,将HIV-1的5'LTR从位置约205到位置约223的序列作为目标,以及(iv) 沉默核酸,将HIV-1的5'LTR从位置约350到位置约368的序列作为目标。在一些实施例中,所述方法包括用本发明的表达载体转导造血细胞(例如HPSC、CD4+T淋巴细胞、CD8+T淋巴细胞或单核细胞/巨噬细胞),以及在病人中移植所述转导细胞,其中所述转导细胞对HIV感染具有抵抗力。在一些实施例中,造血细胞是产生粒细胞、单核细胞/巨噬细胞的造血祖/干细胞(HPSC)以及移植到病人体内后抵抗HIV感染的淋巴细胞。在一些实施例中,HPSC是自体的和CD34阳性细胞。在一些实施例中,转导的HPSC能够产生粒细胞、单核/巨噬细胞和淋

巴细胞来抵抗R5和X4嗜性HIV病毒株的感染。在一些实施例中,转导的HPSC能够产生粒细胞、单核/巨噬细胞和淋巴细胞来抵抗对cART有抵抗力的HIV病毒株的感染。或者,本发明也包括这种细胞在制造用于治疗 and/或预防受试者中HIV感染的药物中的用途。

[0037] 本发明的另外一个方面是一种用来在受试者中预防和/或减少HIV感染的方法,包括用表达载体转导造血细胞以及在受试者中移植转导的造血细胞,其中转导的造血细胞对HIV感染有抵抗力,其中表达载体包括编码能够减少HIV共受体表达的抑制性核酸的第一核酸序列,编码HIV融合抑制蛋白的第二核酸序列和编码沉默核酸,将HIV的5'LTR的序列作为目标的第三核酸序列,所述第三核酸选自以下组成的组:(i)沉默核酸,将HIV-1的5'LTR从位置约143到位置约161的序列作为目标,(ii)沉默核酸,将HIV-1的5'LTR从位置约136到位置约154的序列作为目标,(iii)沉默核酸,将HIV-1的5'LTR从位置约205到位置约223的序列作为目标,以及(iv)沉默核酸,将HIV-1的5'LTR从位置约350到位置约368的序列作为目标。在一些实施例中,所述方法包括用本发明的表达载体来转导造血细胞(比如HPSC、CD4+T淋巴细胞,CD8+T淋巴细胞或单核细胞/巨噬细胞),以及在病人中移植所述转导细胞,其中所述转导细胞对HIV感染具有抵抗力。在一些实施例中,造血细胞是产生粒细胞、单核/巨噬细胞的造血祖/干细胞(HPSC)以及移植到病人体内后抵抗HIV感染的淋巴细胞。在一些实施例中,HPSC是自体的和CD34阳性细胞。在一些实施例中,转导的HPSC能够产生粒细胞、单核细胞/巨噬细胞和淋巴细胞来抵抗R5和X4嗜性HIV病毒株的感染。在一些实施例中,转导的HPSC能够产生粒细胞、单核细胞/巨噬细胞和淋巴细胞来抵抗对cART有抵抗力的HIV病毒株的感染。或者,本发明也包括这种细胞在制造用于治疗 and/或预防受试者中HIV感染的药物中的用途。在一些实施例中,编码HIV融合抑制剂的核酸不是T20。

[0038] 本发明的另一方面是一种制备本文描述的表达载体以及包含新的表达载体的药物组合物的方法。在一些实施例中,产生病毒表达载体的方法,所述病毒表达载体当在细胞中出现时,能够抑制HIV与细胞结合,防止HIV融合到细胞中或抑制HIV复制,包括合成表达能够阻止HIV融合到细胞中或阻止HIV复制的蛋白质的基因的cDNA;在病毒载体中将合成的cDNA克隆到限制位点以及在载体中插入能够下调HIV共受体表达进入限制性位点的表达单元。

[0039] 本发明的另外一方面提供了一种包含本发明的表达载体的试剂盒。所述试剂盒可与受试者需要使用的另一种活性药物成分结合。

[0040] 本发明部分基于认识到针对非HIV基因和/或蛋白质(即宿主细胞基因和/或蛋白质)的治疗方法降低了抗抑制剂的新HIV病毒株会出现的可能性。在没有处理的CD34+造血干细胞(HPSC)和/或CD4+T细胞中,HIV与CD4和CCR5结合,然后与细胞膜融合。融合后,病毒RNA被引入,随后逆转录到成为双链的cDNA,它整合到宿主细胞基因组中,转录后产生更多的HIV。在(联合)经过处理后的CD34+HSC和/或CD4+T细胞中,HIV被阻止与CCR5结合并与细胞膜融合。不希望受到任何特定理论的束缚,人们相信,如果HIV克服了这两块,病毒RNA被引入并整合到宿主细胞基因组中作为DNA,由于转录基因沉默(TGS)-诱导shRNA而转录受阻,包含在本发明的表达载体内,导致HIV DNA被转录失活。

[0041] 此外,基于Trobridge的教导,将使本领域的普通技术人员远离包括编码融合抑制蛋白的核酸序列,在相同的载体中作为编码抑制核酸分子的核酸序列,更不用说包括编码转录基因沉默元件的第三核酸序列。将使本领域的技术人员远离,只是因为Trobridge明确

表明双组合载体在抑制HIV复制上比单独编码融合抑制蛋白的载体实际上更有效。因此,由双载体所显示的极低水平的造血细胞基因转移也会阻碍本领域的普通技术人员修改单个核酸编码的载体,以添加额外的核酸序列,因为基因转移水平低是临床试验中基因治疗失败的主要原因。鉴于此,阅读过Trobridge的技术人员一定会想到三个组合载体或四个组合载体,如本文所公开的,不奏效,并且肯定比任何单个载体或双载体系统的效果都要低。

[0042] 申请人承认与Trobridge相比本发明提供了更优的结果。事实上,申请人已经证明为各种造血细胞稳定地引入LVsh5/C46(在本文中也称为“Cal-1”)的能力,包括CD4+T淋巴细胞和CD34+HSPC,来允许CCR5靶向的shRNA (sh5) 和C46的表达。事实上,申请人已经证明用LVsh5/C46载体对宿主细胞进行处理没有显示任何毒性迹象。(参见,比如,Wolstein等,“Preclinical Safety and Efficacy Of An Anti-HIV-1Lentiviral Vector Containing A Short Hairpin RNA To CCR5and The C46Fusion Inhibitor,”*Molecular Therapy—Methods&Clinical Development* (2014) 1,11;doi:10.1038/mtm.2013.11;也可参见,Burke等,“Engineering Cellular Resistance To HIV-1Infection In Vivo Using A Dual Therapeutic Lentiviral Vector,”*Molecular Therapy—Nucleic Acids* (2015) 4,e236;doi:10.1038/mtna.2015.10,在此通过引用,将其整体并入本文)。

[0043] 如本文所述,高效抗逆转录病毒疗法(比如cART)使用2-3种活性药品成分有效地抑制HIV复制和减轻耐药性的发展。申请人相信三个或四个组合载体,如本文所公开的,同样可以提供有效治疗和/或抑制HIV的手段。因此,在不希望受到任何特定理论约束的情况下,申请者相信三个或四个组合载体可能与双载体结构一样安全,同时提供相对更优的结果。

附图说明

[0044] 图1说明了本发明的新组合载体如何抑制HIV病毒。复杂LV靶向机理模型构建了预防HIV感染保护。

[0045] 图2说明了TGS-诱导si/shRNAs的位置。包括位置Nuc-0和Nuc-1的5’LTR的模型以我们主要的候选者si/shRNAs的序列为目标。这些以NF-κB结合位点(PromA)和序列上游(si143)内的序列作为目标,在nuc-0区域。这些诱导出类似的表现遗传变化。我们已经表明这些分子通过Ago1的补充在细胞核中发挥作用,其次是HDAC 1和2s和HMTs,如Zeste强化子。

[0046] 图3显示了在亚型A-U中HIV-1 5’LTR的启动子中siRNA 143、136和205以及PromA靶序列的保守性。

[0047] 图4显示了自我灭活的慢病毒载体,包含了允许整合但不表达病毒基因组的修饰LTRs,基于Calimmune Cal-1骨架载体(参见美国申请US2012/0201794,在此全部引用,将其整体并入本文),包括H1、H1启动子和/或U6、U6启动子和/或U1、U1启动子;sh5,短发夹RNA CCR5;或者shPrA,短发夹RNA PromA和/或sh143,短发夹RNA143;UbC,泛素C启动子和C46,C46融合抑制剂。为了测量结构的表达,所有修改的结构都含有EGFP,增强绿色荧光蛋白。

[0048] TGS-诱导shRNA的结果。这些结果被呈现为一系列图。

[0049] 图5a是一个图表,显示了143、136、205和PromA siRNAs所针对HIV-1 5’LTR内的区域。箭头表示转录起始点,下划线的序列表示串联重复序列NF-κB结合位点,siPromA-M2和

si143T是不活跃的突变体,用作特异性对照。图5b是Si136T-、si143-、si205S-以及siPromA-转染培养基的图表,表示与灭活突变对照相比在感染后15天对HIV-1SF162病毒转录的有效抑制。*siRNA目标与HIV-1NL4.3株相同。**siRNA目标与HIV-1SF162株相同。

[0050] 总体来说,图5a-b显示被siRNAs作为目标的HIV LTR有效地抑制HIV转录。为了证明将HIV 5'LTR作为目标的siRNAs能够有效地抑制HIV-1的转录,HeLa T4+细胞被单个siRNAs转染,被HIV-1SF162感染以及在长期的感染过程中进行逆转录(RT)试验。siRNA 143目标序列与SF162株相同。为了确定单次错配是否对减少抑制效应至关重要,我们还包括了siRNA 143T,与SF162株相比,siRNA 143T有单个T不匹配。这种不匹配的siRNA 143T对应于在GenBank获得的SF162 3'LTR序列(登记号M65024.1)。还包括了序列特异性对照siPromA-M2。完全匹配的siRNAs、143和PromA有效抑制了HIV-1株SF162的生产性感染,与模拟转染细胞相比,RT活动的减少超过1000倍。有趣的是,在感染后的第6天,143T抑制病毒感染达到了与143和PromA相当的水平,但是然后不能维持病毒抑制。

[0051] 图6显示在siRNA抑制的HIV-1培养中观察到的异染色质标记。为了确认通过转录基因沉默(TGS)机制发生以LTR为目标的siRNAs的抑制作用,染色质免疫共沉淀(ChIP)试验是在用抑制的HIV-1的HeLa T4+培养基中进行的,在siRNA 143、136、205和PromA转染或有活性的HIV转录的培养基下进行了模拟转染后。在siRNA 143、136、205和PromA-转染培养的感染后第6天观察到异染色质标记与TGS一致,这包括了与模拟转染培养相比的组蛋白3赖氨酸27三甲基化(H3K27me3)的富集和组蛋白3赖氨酸9乙酰化(H3K9Ac)的减少。异染色质标记的ChIP分析也显示了在si143和siPromA转染细胞中H3K9me3的富集和Ago1的补充。

[0052] 如图6所示,在siRNA抑制的HIV-1培养中观察到的异染色质标记。异染色质标记的ChIP分析显示了si143和siPromA转染细胞中H3K27me3的富集和H3K9Ac的减少。

[0053] 图7显示了对shRNA重新激活刺激的强烈抵抗。为了调查在HIV-1潜在模型中siRNA143靶序列的效果,J-Lat 9.2细胞使用慢病毒载体稳定被短发夹(sh)143和/或shPromA转导。在J-Lat 9.2细胞中使用不同浓度的SAHA、TNF或SAHA/TNF的组合物尝试重新激活潜伏性HIV-1,当在48小时读出HIV转录时,测量GFP的表达量。观察到用sh143和/或shPromA转导的J-Lat 9.2细胞在生理浓度抵抗来自SAHA、TNF或者SAHA/TNF组合物的激活(Cillo et al.,2014PNAS;De Pablo-Bernal et al.,2014J Antimicrob Chemother)以及在超生理药物浓度表现出低水平的激活,然而那些用shRNA对照组转染的细胞表现出升高的GFP表达,意味着潜在HIV-1感染的激活。重要的是,双sh143/shPromA转导J-Lat 9.2细胞系似乎有一个稍微好的效果,以防止重新激活刺激。这些数据表明当用sh143和/或shPromA转导时,HIV-1潜在模型J-Lat 9.2细胞在很大程度上抵抗药物治疗的重新激活。这些发现在基因治疗应用的背景下很重要,病人可以接触到各种免疫和炎症刺激。

[0054] 图7显示了对shRNA重新激活刺激的强烈抵抗。与对照细胞相比,尤其是在生理药物浓度下,被sh143和shPromA转导的J-Lat 9.2细胞通过联合的TNF/SAHA治疗不太容易激活,正如重新激活时增加的GFP表达所示。

[0055] 图8a为细胞内HIV-1DNA的分析。

[0056] 图8b为HIV-1特异性LTR mRNA的分析。

[0057] 图9a为在PM-1细胞中HIV-1整合DNA的分析。

[0058] 图9b为HIV-1特异性gag mRNA的分析。

具体实施方式

[0059] 总体来说,本发明提供了表达载体、包含表达载体的组合物和通过施用这些表达载体或组合物来治疗受试者的方法。

[0060] 如本文所述,单数的术语“a”、“an”、“the”包括复数指称,除非上下文另有明确指示。类似地,单词“或者(or)”一词意在包括“和(and)”,除非上下文另有明确说明。

[0061] 术语“包含(comprising)”、“包括(including)”、“具有(having)”以及诸如此类的词语可以互换使用,意思相同。类似地,“包含(comprises)”、“包括(includes)”、“具有(has)”以及诸如此类的词语可交替使用,具有相同的意义。特别地,每一个术语的定义都与美国专利法中关于“包含(comprising)”的定义一致,因此被解释为一个开放的术语,意思是“至少是下述”,也被解释为不排除附加的特性、限制、方面等。因此,例如,“具有组件a、b和c的设备”意味着该设备至少包括a、b和c组件。类似地,短语:“涉及步骤a、b和c的方法”意味着该方法至少包括步骤a、b和c。此外,虽然步骤和过程可以以特定的顺序在这里概述,但本领域的技术人员将认识到排序步骤和过程可能会有所不同。

[0062] 如本文所述,“感染HIV的细胞”指的是一个细胞,所述细胞中的HIV基因组已被整合到所述细胞基因组中,并包括产生HIV病毒的细胞和潜伏感染HIV的细胞。如本文所述,潜伏感染HIV的细胞是一个细胞,所述细胞中的HIV基因组已被整合到宿主细胞基因组中,但是处于转录失活状态但是能够重新激活到转录活跃的状态。

[0063] 如本文所述,“接触细胞”指的是以产生有效结果(比如减少、减轻或消除HIV感染、转录或复制)的方式使组合物、配方或制剂与细胞接触。接触细胞还包括在细胞中引入成分、配方或制剂。

[0064] 如本文所述,短语“抑制HIV转录”指的是减少或防止一个或多个HIV基因转录到一定程度,使细胞内感染性HIV病毒颗粒的形成减少、减轻或消除。

[0065] 如本文所述,短语“抑制HIV复制”指的是减少或防止一个或多个HIV基因复制到一定程度,使细胞内感染性HIV病毒颗粒的形成减少、减轻或消除。

[0066] 如本文所述,术语“HIV”不仅包括HIV-1,还包括HIV-1的不同菌株(比如菌株BaL或菌株SF162)和HIV-1的不同亚型(比如亚型A、B、C、D、F、G、H、J和K)。

[0067] 如本文所述,术语“多核苷酸”是指单链或双链DNA/RNA,或者包括肽核酸和锁定核酸(LNA)的其修饰版本。

[0068] 如本文所述,“沉默核酸”指的是能够与特定序列相互作用以抑制基因表达的多核苷酸。沉默核酸的例子包括双链RNA(如siRNA和shRNA)、LNAs、反义RNA、编码siRNA或shRNA的有义和/或反义序列、DNA酶或核酶的DNA多核苷酸。基因表达的抑制不一定是来自特定枚举序列的基因表达,也可能是由特定序列控制的序列的基因表达。

[0069] 如本文所述,“转录基因沉默元件”为沉默的核酸序列,将在HIV(包括HIV-1)的5'长末端重复序列(LTR)区域内的序列作为目标。

[0070] 表达载体

[0071] 本发明提供表达载体,包括至少三种核酸序列,其中所述至少三种核酸序列选自以下组成的组:编码转录基因沉默元件的核酸序列,将HIV的5'LTR的序列作为目标;编码HIV共受体抑制剂的核酸序列;编码抑制HIV融合到靶细胞的蛋白质的核酸序列;编码抑制

HIV复制的蛋白质的核酸序列以及编码病毒进入的抑制剂的核酸序列。如本文所述,“表达载体”或“载体”指的是一种物质的组合物,可用于将感兴趣的核酸传递给细胞内部,以使它们由细胞表达。本领域中已知的许多载体包括但不限于线状多核苷酸、与离子或两亲性化合物相关联的多核苷酸、质粒和病毒载体。病毒载体的例子包括但不限于腺病毒载体、腺相关病毒载体、逆转录病毒载体(包括慢病毒载体)等。在一个实施例中,表达载体为病毒载体。优选地,病毒载体为逆转录病毒或慢病毒载体。

[0072] 在其他实施例中,表达载体包括至少第一、第二和第三核酸序列,其中,第一核酸序列包括编码转录基因沉默元件的核酸序列;其中,第二和第三核酸序列选自由以下组成的组:编码HIV共受体抑制剂的核酸序列;编码抑制HIV融合到靶细胞的蛋白质的核酸序列;编码抑制HIV复制的蛋白质的核酸序列以及编码病毒进入的抑制剂的核酸序列,并且所述第二和第三核酸序列是不同的。

[0073] 在另外其他的实施例中,表达载体包括(i)至少一个编码转录基因沉默元件的核酸序列;以及(ii)至少另外两个其他的核酸序列,选自由以下组成的组:编码HIV共受体抑制剂的核酸序列;编码抑制HIV融合到靶细胞的蛋白质的核酸序列;编码抑制HIV复制的蛋白质的核酸序列以及编码病毒进入的抑制剂的核酸序列。在一些实施例中,每个核酸序列在表达载体上由不同的启动子表达。在一些实施例中,每个启动子可以彼此相同或不同。例如,编码转录基因沉默元件的至少一个核酸序列可以从第一启动子来表达,并且至少两个其它核酸序列中的每一个都是由单独的启动子(例如第二和第三个启动子)表达的。在其它实施例中,三个核酸序列中的两个从单个启动子(即第一和第二核酸序列或第二和第三核酸序列)转录。在其它实施例中,从单个启动子转录三个核酸序列。

[0074] 在进一步的实施例中,每个启动子(例如,第一、第二、第三和任选的第四个启动子)可以是RNA聚合酶I(pol I)、聚合酶II(pol II)或聚合酶III(pol III)启动子。该启动子可以是本领域普通技术人员所知的组成型启动子或诱导型启动子。在一些实施例中,启动子包含HIV LTR(如TAR)的至少一部分,并且是由HIV感染诱导。在某些实施例中,第一启动子是RNA聚合酶III启动子。适用于本发明的在表达载体中的RNA聚合酶III启动子包括但不限于,人类U6,小鼠U6和人类H1等。在一个实施例中,第一启动子是H1RNA聚合酶III启动子。在其他实施例中,第二启动子是RNA聚合酶II启动子。在一个特定的实施例中,第二启动子是泛素C聚合酶II启动子。在一些实施例中,第二启动子可以是组织特异性启动子。比如,适宜的组织特异性启动子包括巨噬细胞特异性启动子(如MPG-1等)和T细胞启动子(如CD4等)。在一个实施例中,第三启动子是RNA聚合酶II启动子。在另外一个实施例中,第三启动子是泛素C聚合酶II启动子。在一些实施例中,第三启动子可以是组织特异性启动子。第一、第二和第三启动子可以是本文所述的任何启动子的组合。在某些实施例中,在核酸序列编码抑制性RNA分子,如siRNA或shRNA的情况下,优选RNA聚合酶III启动子。在其他实施例中,在核酸序列编码蛋白质的情况下,优选RNA聚合酶II启动子。

[0075] 在一些实施例中,表达载体为病毒载体。在一些实施例中,如本文所述,表达载体为慢病毒载体。在其他实施例中,也如本文所述,病毒载体为逆转录病毒载体。

[0076] “逆转录病毒”是通过逆转录病毒逆转录酶逆转录成整合到宿主细胞基因组中的cDNA拷贝的RNA基因组的病毒。逆转录病毒载体和制备逆转录病毒载体的方法在本领域中是已知的。简而言之,为了构建一种逆转录病毒载体,将感兴趣基因编码的核酸插入病毒基

基因组中,代替某些病毒序列产生复制缺陷的病毒。为了产生病毒颗粒,构建含有gag、pol和env基因但没有LTR和包装组件的包装细胞系(Mann等,Cell,Vol.33:153-159,1983)。当包括cDNA的重组质粒,连同逆转录病毒的LTR序列和包装序列被引入这种细胞系,包装序列允许重组质粒的RNA转录物被包装成病毒颗粒,然后将其分泌到培养基中。然后含重组逆转录病毒的培养基被收集,选择性地被浓缩,并用于基因转移。

[0077] “慢病毒”指的是能够感染分裂和非分裂细胞的逆转录病毒的一个属。慢病毒的一些例子包括HIV(人类免疫缺陷病毒:包括HIV 1型和HIV 2型),人类获得性免疫缺陷综合症(AIDS)的病原体;绵羊脱髓鞘性脑白质炎-maedi,导致绵羊的脑炎(visna)或肺炎(maedi),山羊关节炎脑炎病毒,导致山羊的免疫缺陷、关节炎和肝性脑病;马传染性贫血病毒,导致马的自身免疫性溶血性贫血和脑病;猫免疫缺陷病毒(FIV),导致猫的免疫缺陷;牛免疫缺陷病毒(BIV),导致牛的淋巴结肿大,淋巴细胞增多,可能是中枢神经系统感染以及猴免疫缺陷病毒(SIV),它导致亚灵长类动物的免疫缺陷和脑病。

[0078] 慢病毒基因组通常被组织成一个5'端的长末端重复序列(LTR)、gag基因、聚合酶基因,env基因和辅助基因(nef、vif、vpr和vpu)和一个3'端的LTR。病毒LTR被分割成3个区域,被称作U3、R和U5。U3区域包含增强子和启动元件。U5区域包含多聚腺苷酸化信号。R(重复)区域将U3和U5区域分开,和转录出现在病毒RNA的5'和3'端的R区域的序列。参见,比如,“RNA Viruses:A Practical Approach”(Alan J.Cann,Ed.,Oxford University Press,(2000));O Narayan and Clements(1989)J.Gen.Virology,Vol.70:1617-1639;Fields et al.(1990)Fundamental Virology Raven Press.;Miyoshi H,Blamer U,Takahashi M,Gage F H,Verma I M.(1998)J Virol.,Vol.72(10):8150-7和美国专利6,013,516”。

[0079] 慢病毒载体是本领域已知的技术,包括一些已被用来感染造血干/祖细胞(HPSC)的载体。比如,在下述的出版物中可以发现这些载体,在此通过引用,将其整体并入全文:

[0080] Evans et al.,Hum Gene Ther.,Vol.10:1479-1489,1999;Case et al.,Proc Natl Acad Sci USA,Vol.96:2988-2993,1999;Uchida et al.,Proc Natl Acad Sci USA,Vol.95:11939-11944,1998;Miyoshi et al.,Science,Vol.283:682-686,1999;and Sutton et al.,J.Virol.,Vol.72:5781-5788,1998。在一个实施例中,表达载体是修饰的慢病毒,能同时感染分裂细胞和非分裂细胞。这种慢病毒载体包括经修饰的慢病毒基因组,该基因组包括编码HIV共受体抑制剂的第一核酸序列和编码抑制HIV与靶细胞融合或HIV复制的蛋白质的第二核酸序列。此外,经修饰的慢病毒基因组最好缺乏病毒复制所需的慢病毒蛋白基因,从而防止不希望的复制,例如在靶细胞中复制。在重组逆转录病毒(或特异性慢病毒)的生产中,修饰的基因组复制所需的蛋白质最好在包装细胞系中以反式形式提供。在一个实施例中,所述包装细胞系是293T细胞系。优选地,慢病毒载体包括来自慢病毒的5'端和3'端的长末端重复(LTR)序列。在一个实施例中,病毒的结构包括来自慢病毒的5'端的LTR的R和U5序列以及来自慢病毒的灭活或自我失活3'端的LTR。LTR序列可以是来自任何病毒包括来自任何物种或菌株的LTR序列。例如,LTR可以是来自于HIV、猴免疫缺陷病毒(SIV)、猫免疫缺陷病毒(FIV)或牛免疫缺陷病毒(BIV)的LTR序列。优选地,LTR序列为HIVLTR序列。

[0081] 转录基因沉默元件

[0082] 在一些实施例中,本发明的表达载体包括一个或多个转录基因沉默元件,将HIV的

5'LTR的序列作为目标。在一些实施例中,表达载体包括至少两种沉默核酸,将HIV的5'LTR的序列作为目标。不想被任何特定理论束缚,我们认为,如本文所述,将HIV的5'LTR序列作为目标的沉默核酸对于抑制HIV基因组转录是有效的,因此代表一种可以抑制HIV复制的方法。通过本发明,沉默核酸的编号是在B亚型HXB2株中以5'LTR U3为起始位点(登记号K03455)(Wong-Staal,F.1985,Nature 313:277-284)。

[0083] 在一些实施例中,沉默核酸将与HIV-1的5'LTR从位置约143到位置约161有至少95%同一性的序列作为目标。在一些实施例中,沉默核酸将与序列SEQ ID NO:1有至少95%同一性的序列作为目标。在其他实施例中,沉默核酸将与序列SEQ ID NO:1有至少97%同一性的序列作为目标。在进一步的实施例中,沉默核酸将与序列SEQ ID NO:1有至少99%同一性的序列作为目标。然而在进一步的实施例中,沉默核酸将与序列SEQ ID NO:1有100%同一性的序列作为目标。

[0084] 在一些实施例中,沉默核酸将与HIV-1的5'LTR从位置约136到位置约154有至少95%同一性的序列作为目标。在一些实施例中,沉默核酸将与序列SEQ ID NO:9有至少95%同一性的序列作为目标。在其他实施例中,沉默核酸将与序列SEQ ID NO:9有至少97%同一性的序列作为目标。在进一步的实施例中,沉默核酸将与序列SEQ ID NO:9有至少99%同一性的序列作为目标。然而在进一步的实施例中,沉默核酸将与序列SEQ ID NO:9有100%同一性的序列作为目标。

[0085] 在一些实施例中,沉默核酸将与HIV-1的5'LTR从位置约205到位置约223有至少95%同一性的序列作为目标。在一些实施例中,沉默核酸将与序列SEQ ID NO:17有至少95%同一性的序列作为目标。在其他实施例中,沉默核酸将与序列SEQ ID NO:17有至少97%同一性的序列作为目标。在进一步的实施例中,沉默核酸将与序列SEQ ID NO:17有至少99%同一性的序列作为目标。然而在进一步的实施例中,沉默核酸将与序列SEQ ID NO:17有100%同一性的序列作为目标。

[0086] 在一些实施例中,沉默核酸将与HIV-1的5'LTR从位置约350到位置约368有至少95%同一性的序列作为目标。在一些实施例中,沉默核酸将与序列SEQ ID NO:36有至少95%同一性的序列作为目标。在其他实施例中,沉默核酸将与序列SEQ ID NO:36有至少97%同一性的序列作为目标。在进一步的实施例中,沉默核酸将与序列SEQ ID NO:36有至少99%同一性的序列作为目标。然而在进一步的实施例中,沉默核酸将与序列SEQ ID NO:36有100%同一性的序列作为目标。

[0087] 对于本领域技术人员来说,在HIV-1的毒株或亚型之间的5'LTR区域序列存在变异,从而有可能在HIV-1的靶序列上存在一些变化。在一些实施例中,沉默核酸将一个或多个序列作为目标,所述序列选自序列SEQ ID NO:2、序列SEQ ID NO:3、序列SEQ ID NO:4和序列SEQ ID NO:5或者与序列SEQ ID NO:2、序列SEQ ID NO:3、序列SEQ ID NO:4和序列SEQ ID NO:5有至少95%同一性的序列。在其他实施例中,沉默核酸将一个或多个序列作为目标,所述序列选自序列SEQ ID NO:10、序列SEQ ID NO:11、序列SEQ ID NO:12和序列SEQ ID NO:13或者与序列SEQ ID NO:10、序列SEQ ID NO:11、序列SEQ ID NO:12和序列SEQ ID NO:13有至少95%同一性的序列。然而在进一步的实施例中,沉默核酸将一个或多个序列作为目标,所述序列选自序列SEQ ID NO:18、序列SEQ ID NO:19、序列SEQ ID NO:20、序列SEQ ID NO:21和序列SEQ ID NO:33或者与序列SEQ ID NO:18、序列SEQ ID NO:19、序列SEQ ID NO:20、

序列SEQ ID NO:21和序列SEQ IDNO:33有至少95%同一性的序列。在进一步的实施例中,沉默核酸将一个或多个序列作为目标,所述序列选自序列SEQ ID NO:37、序列SEQ ID NO:38和序列SEQ ID NO:39或者与序列SEQ ID NO:37、序列SEQ ID NO:38和序列SEQ ID NO:39有至少95%同一性的序列。

[0088] 在一些实施例中,以HIV-1的5'LTR从位置约143到位置约161的序列作为目标的沉默核酸是包括有义链和反义链的RNA双链,其中有义链包括与序列SEQ ID NO:6有至少95%同一性的序列。在其他实施例中,沉默核酸是包括有义链和反义链的RNA双链,其中有义链包括与序列SEQ ID NO:6有至少97%同一性的序列。在进一步的实施例中,沉默核酸是包括有义链和反义链的RNA双链,其中有义链包括与序列SEQ ID NO:6有至少99%同一性的序列。然而在进一步的实施例中,沉默核酸是包括有义链和反义链的RNA双链,其中有义链包括与序列SEQ ID NO:6有100%同一性的序列。

[0089] 在一些实施例中,以HIV-1的5'LTR从位置约136到位置约154的序列作为目标的沉默核酸是包括有义链和反义链的RNA双链,其中有义链包括与序列SEQ ID NO:14有至少95%同一性的序列。在其他实施例中,沉默核酸是包括有义链和反义链的RNA双链,其中有义链包括与序列SEQ ID NO:14有至少97%同一性的序列。在进一步的实施例中,沉默核酸是包括有义链和反义链的RNA双链,其中有义链包括与序列SEQ ID NO:14有至少99%同一性的序列。然而在进一步的实施例中,沉默核酸是包括有义链和反义链的RNA双链,其中有义链包括与序列SEQ ID NO:14有100%同一性的序列。

[0090] 在一些实施例中,以HIV-1的5'LTR从位置约205到位置约223的序列作为目标的沉默核酸是包括有义链和反义链的RNA双链,其中有义链包括与序列SEQ ID NO:22有至少95%同一性的序列。在其他实施例中,沉默核酸是包括有义链和反义链的RNA双链,其中有义链包括与序列SEQ ID NO:22有至少97%同一性的序列。在进一步的实施例中,沉默核酸是包括有义链和反义链的RNA双链,其中有义链包括与序列SEQ ID NO:22有至少99%同一性的序列。然而在进一步的实施例中,沉默核酸是包括有义链和反义链的RNA双链,其中有义链包括与序列SEQ ID NO:22有100%同一性的序列。

[0091] 在一些实施例中,以HIV-1的5'LTR从位置约350到位置约368的序列作为目标的沉默核酸是包括有义链和反义链的RNA双链,其中有义链包括与序列SEQ ID NO:40有至少95%同一性的序列。在其他实施例中,沉默核酸是包括有义链和反义链的RNA双链,其中有义链包括与序列SEQ ID NO:40有至少97%同一性的序列。在进一步的实施例中,沉默核酸是包括有义链和反义链的RNA双链,其中有义链包括与序列SEQ ID NO:40有至少99%同一性的序列。然而在进一步的实施例中,沉默核酸是包括有义链和反义链的RNA双链,其中有义链包括与序列SEQ ID NO:40有100%同一性的序列。

[0092] 任何RNA双链的反义链包括与有义链互补的序列。如本文所述,如果序列的一部分用有义链能够形成双链,“与有义链互补的序列”将能够形成一个双链即使与有义链不是100%互补。在一些实施例中,反义链与有义链至少95%互补。在其他实施例中,反义链与有义链至少97%互补。在进一步的实施例中,反义链与有义链至少99%互补。然而在进一步的实施例中,反义链与有义链约100%互补。可以理解的是,RNA双链的有义链和反义链之间的识别程度不同于有义链和各自靶序列之间的识别程度。

[0093] 形成RNA双链的两条链可以是一个较大RNA分子的不同部分,或者它们可以是分开

的RNA分子。如果RNA双链的链是由分开的RNA分子形成，RNA双链可以是“小干扰RNA”（“siRNA”）。“小干扰RNA”或“siRNA”是双链RNA分子，能够抑制与其同源的基因的表达。基因或其他具有同源性的核苷酸序列的区域称为“目标区域”。如果两条链是一个较大分子的一部分，因此RNA双链的一条链的3'末端和另一条链的5'末端两条链通过一个核苷酸链被连接，RNA双链是一个“短发夹RNA”（“shRNA”）。

[0094] 在一些实施例中，RNA双链是包括有义链和反义链的siRNA。在一个实施例中，RNA双链是siRNA，具有序列SEQ ID NO:6的有义链和具有序列SEQ ID NO:7的反义链（本文中指的是“si143”或“siRNA143”）。在另一个实施例中，RNA双链是siRNA，具有序列SEQ ID NO:14的有义链和具有序列SEQ ID NO:15的反义链（本文中指的是“si136”或“siRNA136”）。在更一步的一个实施例中，RNA双链是siRNA，具有序列SEQ ID NO:22的有义链和具有序列SEQ ID NO:23的反义链（本文中指的是“si205”或“siRNA205”）。然而在更一步的一个实施例中，RNA双链是siRNA，具有序列SEQ ID NO:40的有义链和具有序列SEQ ID NO:41的反义链（本文中指的是“siRNA PromA”或“siPromA”）。

[0095] 在其他实施例中，RNA双链是包括有义链和反义链的shRNA。在一个实施例中，RNA双链是shRNA，具有序列SEQ ID NO:6的有义链（或者与序列SEQ ID NO:6有至少95%同一性的有义链）和具有序列SEQ ID NO:7的反义链。然而在另外一个实施例中，shRNA具有序列SEQ ID NO:8（本文中指的是“sh143”或“shRNA143”）。在另外一个实施例中，RNA双链是shRNA，具有序列SEQ ID NO:14的有义链（或者与序列SEQ ID NO:14有至少95%同一性的有义链）和具有序列SEQ ID NO:15的反义链。然而在另外一个实施例中，shRNA具有序列SEQ ID NO:16（本文中指的是“sh136”或“shRNA136”）。在进一步的实施例中，RNA双链是shRNA，具有序列SEQ ID NO:22的有义链（或者与序列SEQ ID NO:22有至少95%同一性的有义链）和具有序列SEQ ID NO:23的反义链。然而在另外一个实施例中，shRNA具有序列SEQ ID NO:24（本文中指的是“sh205”或“shRNA205”）。然而在进一步的实施例中，RNA双链是shRNA，具有序列SEQ ID NO:40的有义链（或者与序列SEQ ID NO:40有至少95%同一性的有义链）和具有序列SEQ ID NO:41的反义链。然而在另外一个实施例中，shRNA具有序列SEQ ID NO:42（本文中指的是“shPromA”或“shRNA PromA”）。

[0096] 在其他实施例中，至少一个沉默核酸是选自由以下组成的组的核酸：反义RNA、DNA或其混合物；DNA酶和核酶，将序列SEQ ID NO:1、序列SEQ ID NO:9、序列SEQ ID NO:17或序列SEQ ID NO:36中的至少一个作为目标。反义RNA和DNA分子，核酶和DNA酶的制备和使用方法本领域中是已知的和被描述，比如，Jakobsen等，2007，Retrovirology 4:29-41，在此通过引用，将其整体并入本文。

[0097] 在其他实施例中，沉默核酸可以是编码siRNA或shRNA的有义和/或反义序列的DNA多核苷酸。这样的DNA序列可以被插入到载体中，如质粒、病毒载体等，以实现siRNA或shRNA在细胞中的表达。在siRNA的情况下，可以从相同或不同的载体中表达siRNA的有义链和反义链。

[0098] 编码HIV共受体抑制剂的核酸序列

[0099] 在一些实施例中，HIV共受体的抑制剂是抑制性核酸，包括siRNA、shRNA、适配子、核酶以及反义寡核苷酸。因此，在一些实施例中，表达载体的核酸序列编码抑制性核酸，以HIV共受体为目标。“目标”指的是抑制剂与编码HIV共受体的内源性转录物结合和/或干扰

的能力。例如,抑制核酸可具有与编码HIV共受体的核酸基本互补的序列,使得抑制核酸与编码核酸的HIV共受体结合,从而阻断共受体核酸的表达或启动降解。因此,在一些实施例中,当编码抑制剂的表达载体在宿主细胞中表达时,HIV共受体抑制剂能够降低HIV共受体的表达。

[0100] 在一些实施例中,本发明中的表达载体包括编码具有与编码HIV共受体的核酸序列的至少一部分基本上互补的序列的反义寡核苷酸的核酸序列。HIV共受体的例子包括CCR5和/或CXCR4。如本文所述,“基本互补”指的是与目标多核苷酸序列至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%互补。在一个实施例中,反义寡核苷酸具有与编码CCR5或CXCR4的至少一部分核酸序列100%互补的序列。在一些实施例中,反义寡核苷酸的长度约为15~30个核苷酸。在其他实施例中,反义寡核苷酸的长度约为19~25个核苷酸。

[0101] 在某些实施例中,表达载体的核酸序列编码具有茎环结构的shRNA,其中,茎或双链区域包括双链区域的第一部分,其具有与HIV共受体的一部分序列相同的序列,其中双链区域的第二部分包括与HIV共受体序列的另一部分互补的序列。在一些实施例中,shRNA的环区可包括约2至约19个核苷酸。在一个特定的实施例中,第一核酸序列编码包括序列SEQ ID NO:25的shRNA。在另外一个特定的实施例中,shRNA环状结构包括序列SEQ ID NO:43。

[0102] 编码抑制HIV融合的蛋白质的核酸序列

[0103] 在一些实施例中,本发明的表达载体包括编码抑制HIV与靶细胞融合的蛋白质的核酸序列。在一些实施例中,抑制HIV与靶细胞融合的蛋白质是C46蛋白质。C46是一个锚定膜融合抑制剂,来自HIV gp41的C-末端的七肽重复融合人免疫球蛋白的铰链区和CD34的跨膜结构域。C46是一种有效的HIV融合抑制剂,本领域的技术人员可以理解,在某种意义上,是类似于FDA批准的可溶性药物恩夫韦地(T20)。尽管类似,但是C46蛋白质并不是T20(如C46肽比T20长约10个氨基酸)(参见,比如,Petit等,Human Gene Therapy Methods.August 2014,25(4):232-240.doi:10.1089/hgtb.2014.034和Felix等,Mutations in gp120Contribute to the Resistance of Human Immunodeficiency Virus Type 1to Membrane-Anchored C-Peptide maC46,J Virol.2009May;83(10):4844-4853,在此通过引用,将其整体并入本文)。技术人员也会理解编码抑制HIV融合的蛋白质(如C46或T20)的核酸序列作用于HIV生命周期的一个点,与CCR5或CXCR4共受体的附属物不同。在一些实施例中,C46的安全性是在I期临床试验中被测试,患者接受用C46逆转录病毒载体转导的自体T细胞输液测试。不想被任何特定的理论束缚,研究表明,患者均没有基因治疗相关的副作用,也没有明显的抗C46免疫反应。

[0104] 在一些实施例中,本发明的表达载体包括编码抑制HIV与靶细胞融合的蛋白质的核酸序列除了T20,也就是说编码HIV融合抑制剂的核酸不是T20。

[0105] 在一个实施例中,表达载体的核酸序列编码包含序列SEQ ID NO:26的C46蛋白质。

[0106] 在另一个实施例中,表达载体的核酸序列包括序列SEQ ID NO:27。

[0107] 本领域技术人员将会理解其他合适的抑制HIV融合到靶细胞的蛋白质,可通过本发明的表达载体的核酸序列编码,包括但不限于,T20及其相关蛋白恩夫韦地、CP32M和西夫韦肽(参见,如PCT/US2010/036247,在此通过引用,将其整体并入本文)。

[0108] 编码抑制HIV复制的蛋白质的核酸序列

[0109] 在一些实施例中,本发明中的表达载体包括编码抑制HIV复制的蛋白质的核酸序

列。在一些实施例中,核酸序列编码含有motif的5α (TRIM5α) 蛋白质或其衍生物或其融合物。在其他实施例中,核酸序列为嵌合体TRIM5α。“嵌合体TRIM5α”指的是TRIM5α蛋白质,包括来自两个或两个以上物种的TRIM5α蛋白质的域或片段。在一些实施例中,嵌合体TRIM5α包括来自人类TRIM5α蛋白质的氨基末端域和来自猕猴TRIM5α蛋白质的羧基端PRYSRY域。

[0110] 在一些实施例中,核酸序列编码TRIM5亲环蛋白融合蛋白。在一些实施例中,TRIM5亲环蛋白融合蛋白包括人类TRIM5α的1至大约309的氨基酸与大约全长的人类亲环蛋白A直接融合。在其他实施例中,TRIM5亲环蛋白融合蛋白包括人类TRIM5α的1至大约322的氨基酸与大约全长的人类亲环蛋白A直接融合。然而在其他实施例中,TRIM5亲环蛋白融合蛋白包括人类TRIM5α的1至大约331的氨基酸与大约全长的人类亲环蛋白A直接融合。进一步的适合抑制HIV复制的蛋白质,可以由第二核酸序列编码,包括但不限于,亲环蛋白、E3泛素、APOBEC3G和骨髓基质细胞抗原2 (BST-2)。在一些实施例中表达载体包括核酸序列,编码按序列SEQ ID NO:28提供的人类TRIM5α蛋白。在其他实施例中,表达载体包括具有序列SEQ ID NO:29的核酸序列。

[0111] 表达载体的例子

[0112] 在一些实施例中,本发明提供了一种表达载体,包括编码HIV共受体抑制剂的第三核酸序列,编码抑制HIV融合到靶细胞的第二核酸序列以及编码沉默核酸的第三核酸,所述沉默核酸以HIV-1的5'LTR的序列作为目标来抑制HIV-1基因转录,其中第一核酸序列可操作地连接到第一启动子;第二核酸序列可操作地连接到第二启动子以及第三核酸序列可操作地连接到第三启动子。在一些实施例中,第三核酸以HIV-1的5'LTR从位置约143到位置约161的序列、HIV-1的5'LTR从位置约136到位置约154的序列、HIV-1的5'LTR从位置约205到位置约223的序列或HIV-1的5'LTR从位置约350到位置约368的序列中的一个作为目标来抑制HIV-1基因转录。在一些实施例中,第一和第二核酸序列从单个启动子转录。在其他实施例中,三个核酸序列中的两个是从单个启动子转录的。在一些实施例中,编码抑制HIV与靶细胞融合的蛋白质的第二核酸序列选自除了T20以外的蛋白质,也就是说,蛋白质不是T20。在一些实施例中,除了T20以外的蛋白质是C46。

[0113] 在其他实施例中,本发明提供了一种表达载体,包括编码siRNA或shRNA分子的第一核酸序列,siRNA或shRNA分子包括具有与CCR5基本相同且互补的序列的双链区域;编码C46蛋白的第二核酸序列以及编码沉默核酸的第三核酸序列,所述第三核酸序列以HIV的5'LTR的序列作为目标来抑制HIV基因转录,其中第一核酸序列可操作地连接到第一启动子;第二核酸序列可操作地连接到第二启动子以及第三核酸序列可操作地连接到第三启动子。在一些实施例中,第三核酸以HIV-1的5'LTR从位置约143到位置约161的序列、HIV-1的5'LTR从位置约136到位置约154的序列、HIV-1的5'LTR从位置约205到位置约223的序列或HIV-1的5'LTR从位置约350到位置约368的序列中的一个作为目标来抑制HIV-1基因转录。在一些实施例中,第一和第二核酸序列从单个启动子转录。在其他实施例中,三个核酸序列中的两个是从单个启动子转录的。在一些实施例中,表达载体包含第四核酸序列,比如编码另一种转录基因沉默元件的核酸序列。

[0114] 然而,在其他的实施例中,本发明提供了一种表达载体,包括第一、第二、第三和第四核酸序列,其中第一核酸序列编码HIV共受体的抑制剂(如对CCR5或CXCR4的shRNA),第二核酸序列编码融合抑制剂(如C46),第三核酸序列编码HIV复制抑制剂(如TRIM5α蛋白或其

衍生物或其融合物)以及编码沉默核酸的第四核酸序列,所述第四核酸以HIV-1的5'LTR从位置约143到位置约161的序列、HIV-1的5'LTR从位置约136到位置约154的序列、HIV-1的5'LTR从位置约205到位置约223的序列或HIV-1的5'LTR从位置约350到位置约368的序列中的一个作为目标来抑制HIV-1基因转录。在本发明的一些实施例中,HIV-1基因转录抑制剂、HIV共受体抑制剂和HIV靶细胞融合抑制剂或HIV复制抑制剂在表达载体上由不同启动子表达。在一个实施例中,HIV共受体抑制剂(如CCR5或CXCR4)是从RNA聚合酶III启动子中表达的,而HIV融合和/或复制的抑制剂是从RNA聚合酶II启动子中表达的。本领域普通技术人员将会理解两种不同的抑制剂可以从表达结构中以不同的比率表达。

[0115] 本发明的表达载体的其他例子如图4所示。图4也说明了表达载体的每个核酸有效地链接到特定的启动子。

[0116] 组合物和药物组合物

[0117] 本发明也提供了组合物,包括药物组合物,包括一个或多个如本文所述的表达载体。举例来说,组合物可以包括表达载体,所述表达载体包括第一核酸、第二核酸以及第三核酸,所述第一核酸包括转录基因沉默元件,以HIV的5'LTR的序列作为目标;所述第二核酸编码抑制HIV与靶细胞融合或抑制HIV复制的蛋白;所述第三核酸编码HIV共受体的抑制剂。通过另外一个例子,在一些实施例中,组合物包括表达载体,具有编码以CCR5(或CXCR4)为目标的shRNA的第一核酸序列,编码C46蛋白的第二核酸序列以及第三核酸,也就是沉默核酸,将HIV的5'LTR的序列作为目标。

[0118] 在一些实施例中,本发明也提供了组合物,包括(i)在美国申请US 2012/0201794中披露的表达载体或组合物(在此通过引用,将其整体并入本文),以及(ii)至少一种转录基因沉默元件,如本文所述,以HIV的5'LTR的序列作为目标。比如,在一些实施例中,这样的组合物可以包括(i)表达载体,包括至少两种选自由以下组成的组的核酸序列:编码HIV共受体的抑制剂的核酸序列;编码抑制HIV复制的蛋白质的核酸序列和编码病毒进入的抑制剂的核酸序列;以及(ii)至少一种转录基因沉默元件或表达载体、细胞或包括至少一种转录基因沉默元件的组合物。举例来说,这种组合物可以包括(i)表达载体,具有编码以CCR5(或CXCR4)为目标的shRNA的第一核酸序列和编码C46蛋白的第二核酸序列以及(ii)沉默核酸,将HIV的5'LTR的序列作为目标。

[0119] 在一些实施例中,药物组合物包括如本文所述的有效量的至少一个表达载体或组合物和药学上可接受的载剂。例如,在某些实施例中,所述药物组合物包含有效量的表达载体和药学上可接受的载剂。如本文所述,“有效量”是足以抑制HIV基因表达的量。本领域的技术人员可以根据受试者的身体大小、体重、年龄、健康、性别、种族和病毒滴度等因素,很容易地确定有效量。

[0120] 本文所披露的任一表达载体(或其组合物)可以配制成药物组合物。短语“药学上可接受”或“药理学上可接受的”指的是在动物或人类身上不产生不良反应、过敏反应或其他不良反应的分子实体和成分。比如,沉默核酸可由药学上可接受的载剂配制。如本文所述,“药学上可接受的载剂”包括溶剂、缓冲剂、溶液、分散介质、包衣、抗菌剂和抗真菌剂、等渗剂和吸收延迟剂等,可用于配制药剂,如适合于人类施用的药物。具有药物载剂的化合物的制备方法在本领域中是已知的并且进行了说明,比如,在Remington's Pharmaceutical Science, (17th ed. Mack Publishing Company, Easton, Pa. 1985) 以及 Goodman & Gillman'

s: *The Pharmacological Basis of Therapeutics* (11th Edition, McGraw-Hill Professional, 2005), 在此通过引用, 将其整体并入本文。

[0121] 药物组合物可以包括在任何浓度下本发明所公开的(或其组合)的表达载体或组合物中的任何一种, 来允许施用的沉默核酸的浓度达到约0.1mg/kg至约1mg/kg。药物组合物可以包括表达载体(或其组合), 按重量计算约为0.1%至约99.9%。适于包含在任何药物组合物中的药学上可接受的载剂包括水、缓冲水、盐溶液如生理盐水或平衡盐溶液如(Hank's或Earle's均衡溶液)、甘氨酸、透明质酸等。药物组合物可配制用于胃肠外给药, 如静脉内、肌肉内或皮下给药。用于胃肠外给药的药物组合物可包括药学上可接受的无菌水溶液或非水溶液、分散剂、混悬剂或乳剂以及用于重新注入无菌注射溶液或分散剂的无菌粉末。合适的水性和非水性载剂、溶剂、稀释剂或载具的例子包括水、乙醇、多元醇(如甘油、丙二醇、聚乙二醇等)、羧甲基纤维素及其混合物、植物油(如橄榄油)和注射用有机酯(如油酸乙酯)。

[0122] 药物组合物可包括本文所披露的以封装形式的任一表达载体。比如, 表达载体可由生物可降解聚合物包封, 如聚乳酸聚乙交酯、聚(原酸酯)和聚(酸酐), 或者可以包裹在脂质体或微乳液中。脂质体可以是, 如转化脂或阳离子脂质体。另一个例子可包括本文披露的在无核细菌微细胞中的表达载体(或其组合)(Giacalone et al, *Cell Microbiology* 2006, 8(10):1624-33)。本文所披露的表达载体(或其组合)可以与纳米粒子结合。

[0123] 药物组合物可以被配制用于口服。口服固体制剂可包括, 例如药片、糖丸、胶囊、药片和颗粒剂。在这种固体剂型中, 组合物可包括至少一种药学上可接受的载剂比如柠檬酸钠和/或磷酸氢钙和/或填料或填充剂如淀粉、乳糖、蔗糖、葡萄糖、甘露醇和硅胶; 粘合剂如羧甲基纤维素、海藻酸钠、明胶、聚乙烯吡咯烷酮、蔗糖和树胶; 保湿剂如甘油; 崩解剂如琼脂、碳酸钙、马铃薯或木薯淀粉、褐藻酸、硅酸盐和碳酸钠; 润湿剂如乙醇、单硬脂酸甘油酯; 吸收剂如高岭土、膨润土; 和/或润滑剂, 如滑石、硬脂酸钙、硬脂酸镁、固体聚乙二醇、十二烷基硫酸钠及其混合物。口服液体剂型可包括, 例如, 药学上可接受的乳剂、溶液、混悬剂、糖浆和酞剂。液体剂量可包括惰性稀释剂, 如水或其他溶剂, 增溶剂和/或乳化剂, 如乙醇、异丙醇、碳酸乙酯、乙酸乙酯、苯甲醇、苯甲酸苄酯、丙二醇、1,3-丁二醇、二甲基甲酰胺、油(例如棉籽油、玉米油、胚芽油、蓖麻油、橄榄油、芝麻油等), 甘油、四氢糠醇、聚乙二醇和山梨糖醇酐脂肪酸酯, 以及它们的混合物。

[0124] 药物组合物可包括促渗剂以增强其递送。促渗剂包括脂肪酸如油酸、月桂酸、癸酸、肉豆蔻酸、棕榈酸、硬脂酸、亚油酸、亚麻酸、二癸酸酯、reclineate、甘油单油酸酯, 甘油二月桂酸酯, 辛酸、花生四烯酸、1-癸酸甘油酯、单和双甘油酯及其生理上可接受的盐。组合物还可包括螯合剂, 例如, 乙二胺四乙酸(EDTA)、柠檬酸、水杨酸盐类(如水杨酸钠、5-甲氧基水杨酸甲酯、homovanilate)。本发明所披露的表达载体(或其组合物)可结合微细胞或纳米颗粒递送。

[0125] 在一些实施例中, 组合物可以配制成纳米胶囊。纳米胶囊结构是由一种由核壳排列形成的纳米泡状系统构成的。一个典型的纳米胶囊的外壳是由聚合物膜或涂层组成的。在一些实施例中, 纳米胶囊是由可生物降解的或可生物溶蚀的聚合材料制成的。

[0126] 在一些实施例中, 纳米胶囊是一种酶降解纳米胶囊。在一些实施例中, 纳米胶囊由一种单蛋白核和一种由肽类交连的薄聚合物外壳组成。在一些实施例中, 可以选择一种纳

米胶囊,这样它就能被明确识别,并能被蛋白酶分解。在一些实施例中,可分解的交连物包括一种肽序列或结构,它是蛋白酶或另一种酶的基质。合适的纳米胶囊,合成方法和/或封装方法在美国专利申请2011/0274682中进一步被披露,在此通过引用,将其整体并入本文。

[0127] 在其他实施例中,这些组合物可以被配制为生物纳米胶囊,是由基因工程微生物产生的纳米尺寸的胶囊。作为一种生物纳米胶囊,它可以使用一种病毒蛋白质衍生的或修饰的病毒蛋白质衍生的粒子,例如病毒表面抗原颗粒(如乙型肝炎病毒表面抗原(HBsAg)颗粒)。作为一种生物纳米胶囊,它也可以使用包含脂质双层膜和病毒蛋白衍生或修饰的病毒蛋白衍生颗粒的纳米胶囊,例如病毒表面抗原颗粒(如乙型肝炎病毒表面抗原(HBsAg)颗粒)。这些粒子可以从真核细胞中提纯,如酵母、昆虫细胞和哺乳动物细胞。可以使用的胶囊的尺寸大约是10纳米到500纳米,优选地,20纳米到250纳米,更优选地,80纳米到150纳米。

[0128] 治疗方法

[0129] 总体来说,本发明提供了多种方法,包括(i)抑制HIV转录的方法;(ii)抑制HIV复制的方法;(iii)治疗HIV感染的方法;(iv)预防HIV感染的方法;(v)减少HIV感染的方法;(vi)预防和/或减少没有感染HIV的受试者生产性HIV感染的方法;(vii)抑制结合HIV共受体的方法以及(viii)抑制HIV与靶细胞融合的方法。这些方法是通过施用或接触细胞来实施或实现,用如本文所述的表达载体,包括表达载体和/或其它组分或活性剂的组合物或联合施用(a)包含表达载体的组合物和(b)其他的组分或活性剂。本发明也提供了目前表达载体、包含表达载体等的组合物,以抑制HIV基因转录、与HIV共受体结合、HIV与靶细胞的融合或HIV复制,在制造用于治疗或预防受试者中HIV感染的药物中的用途。

[0130] 更具体来说,本发明提供了一种治疗、预防和/或减少患者或受试者,如需要处理或治疗的那些的方法。如本文所述,“治疗”意味着影响受试者、组织或细胞以获得所需的药理和/或生理效果,包括抑制该状况,即阻止其发展;或减轻、缓和或改善状况的效果,即状况逆转或倒退的效果。“减少”意味着是在有可能处于这种状况的细胞或受试者中降低状况的程度或强度。如本文所述,“预防”意味着在可能发生这种情况的细胞或受试者中防止状况的发生,但这并不一定意味着这种状况最终不会发展,或者某一受试者最终不会发展成一种状况。预防包括在细胞或受试者中延迟状况的发生。在一个实施例中,治疗达到预防或减少HIV复制的效果。治疗也可以达到在接受者体内阻止潜伏的HIV1病毒被重新激活的效果。

[0131] 在一些实施例中,在受试者中预防和/或减少HIV感染包括预防和/或减少受HIV感染的受试者中的HIV感染。如本文所述,短语“预防或减少受HIV感染的受试者中的HIV感染”指的是在已经感染HIV的受体中消除、减少或延迟感染性的HIV病毒的产生,这样可以预防、减少或延迟受体中未受HIV感染组织的感染。在其他实施例中,在受试者中预防或减少HIV感染包括未受HIV感染的受试者中预防或减少生产性HIV感染。如本文所述,“未受HIV感染的受试者中预防或减少生产性HIV感染”指的是预防或减少HIV感染者的HIV感染的发展,这些人以前没有感染过HIV。

[0132] 如本文所述,术语“受试者”指的是易受HIV感染的哺乳动物,如人、鼠或灵长类动物。代表性地,哺乳动物是人类(智人)。

[0133] 如本文所述,术语“施用”意味着为需要治疗的受试者提供组合物、制剂或特定药剂,包括在本文中描述的制剂。

[0134] 据了解,对于任何特定受试者的特定剂量水平和剂量频率可以是多种多样的,并将取决于多种因素,包括所使用的特定化合物的活性、代谢稳定性和该化合物的作用长度,年龄,体重,一般健康,性别,饮食,施用模式和时间,排泄率,药物组合,特定病情的严重程度以及接受治疗的宿主。

[0135] 在一些实施例中,本发明所披露的方法包括向受试者施用有效量的如本文提供的表达载体或包括表达载体的药物组合物。这些组合物的使用可以通过HIV的R5和X4嗜性病毒株赋予抵抗感染的能力。在一些实施例中,受试者为人类。受试者可以是HIV阴性或HIV阳性。在一些实施例中,受试者对于cART疗法,接收cART疗法,在cART疗法中失败是无经验的。在其他实施例中,受试者已经发展为AIDs或者有一种AIDs定义的疾病(例如,AIDs/淋巴瘤)。

[0136] 举例来说,在一些实施例中,方法包括向受体施用包含表达载体的药物组合物,其中表达载体包括编码以CCR5(或CXCR4)为目标的shRNA的第一核酸序列,编码C46蛋白的第二核酸序列和编码以HIV的5'LTR中的序列为目标的沉默核酸的第三核酸序列。

[0137] 在一些实施例中是一种在受试者中治疗HIV感染的方法,包括向受体施用有效量的表达载体或包含表达载体的组合物,其中表达载体包括(i)至少一种编码沉默基因转录元件的核酸序列;以及(ii)至少两种其他的核酸序列,选自由以下组成的组:编码抑制HIV共受体的核酸分子的核酸序列;编码HIV融合抑制蛋白的核酸序列;编码HIV复制抑制剂的核酸序列以及编码病毒进入抑制剂的核酸序列。在其他实施例中是一种在受试者中预防或减少HIV感染的方法,包括向受试者施用有效量的表达载体或包含表达载体的组合物,其中表达载体包括(i)至少一种编码沉默基因转录元件的核酸序列;以及(ii)至少两种其他的核酸序列,选自由以下组成的组:编码抑制HIV共受体的核酸分子的核酸序列;编码HIV融合抑制蛋白的核酸序列;编码HIV复制抑制剂的核酸序列以及编码病毒进入抑制剂的核酸序列。

[0138] 在其他实施例中是一种在受试者中治疗、预防和/或减少HIV感染的方法,包括向受试者施用有效量的表达载体或包含表达载体的组合物,其中表达载体包括编码能够减少HIV共受体表达的抑制性核酸的第一核酸序列;编码HIV融合抑制蛋白的第二核酸序列和编码沉默核酸,以及将HIV的5'LTR的序列作为目标的第三核酸序列,其中第三核酸选自由以下组成的组:(i)沉默核酸,将HIV-1的5'LTR从位置约143到位置约161的序列作为目标,(ii)沉默核酸,将HIV-1的5'LTR从位置约136到位置154约的序列作为目标,(iii)沉默核酸,将HIV-1的5'LTR从位置约205到位置约223的序列作为目标,以及(iv)沉默核酸,将HIV-1的5'LTR从位置约350到位置约368的序列作为目标。在一些实施例中,编码HIV融合抑制剂的核酸不是T20。

[0139] 在其他实施例中是一种在受试者中治疗、预防和/或减少HIV感染的方法,包括向受试者施用有效量的组合物,包括(i)包括两种核酸的表达载体,其中至少两种核酸选自由以下组成的组:编码抑制HIV共受体的核酸分子的核酸序列;编码HIV融合抑制蛋白的核酸序列;编码HIV复制抑制剂的核酸序列以及编码病毒进入抑制剂的核酸序列;和(ii)编码至少一种转录基因沉默元件的核酸,以HIV的5'LTR的序列为目标。

[0140] 然而在其他实施例中,在受试者中治疗HIV感染的方法包括联合施用(i)有效量的表达载体,包括表达载体的药物组合物或包括至少两种核酸的细胞,其中所述至少两种核

酸选自以下组成的组：编码抑制HIV共受体的核酸序列；编码抑制HIV与靶细胞融合的蛋白的核酸序列；编码抑制HIV复制的蛋白的核酸序列以及编码病毒进入抑制剂的核酸序列；和(ii)有效量的至少一种沉默核酸，以HIV的5'LTR的序列为目标。在一些实施例中，联合施用是同步的。在其他实施例中，表达载体和至少一种转录基因沉默元件在不同的时间内被施用。

[0141] 然而在进一步的实施例中，在受试者中治疗、预防和/或减少HIV感染的方法包括联合施用(i)有效量的表达载体，包括表达载体的药物组合物或者美国申请2012/0201794中披露的细胞(其中本文中来自'794中的表达载体被称为“Ca1-1”)，以及(ii)有效量的至少一种转录基因沉默元件，包括至少一种转录基因沉默元件的组合物或结合物，或包括至少一种转录基因沉默元件的细胞。在一些实施例中，转录基因沉默元件选自PCT/AU2015/050507中描述的，申请于2015年8月28日，在此通过引用，将其整体并入本文。在一些实施例中，联合施用是同步的。在其他实施例中，表达载体和至少一种转录基因沉默元件在不同的时间内被施用。本领域技术人员将能够提供一个合适的给药方案和/或时间表来联合施用表达载体和转录基因沉默元件。

[0142] 然而在进一步的实施例中是一种在受试者中治疗和/或预防HIV感染的方法，包括用表达载体转导造血细胞以及在受体中移植转导的造血细胞，其中转导的造血细胞对HIV感染有抵抗力，其中表达载体包括编码能够减少HIV共受体表达的抑制性核酸的第一核酸序列，编码HIV融合抑制蛋白的第二核酸序列和编码沉默核酸，将HIV的5'LTR的序列作为目标的第三核酸序列，所述第三核酸选自以下组成的组：(i)沉默核酸，将HIV-1的5'LTR从位置约143到位置约161的序列作为目标，(ii)沉默核酸，将HIV-1的5'LTR从位置约136到位置约154的序列作为目标，(iii)沉默核酸，将HIV-1的5'LTR从位置约205到位置约223的序列作为目标，以及(iv)沉默核酸，将HIV-1的5'LTR从位置约350到位置约368的序列作为目标。在一些实施例中，方法包括用本发明中的表达载体转导造血细胞(如HPSC、CD4+T淋巴细胞、CD8+T淋巴细胞或单核/巨噬细胞)，在病人中移植转导的细胞，其中转导的造血细胞对HIV感染有抵抗力。在一些实施例中，造血细胞是产生粒细胞、单核细胞/巨噬细胞的造血祖/干细胞(HPSC)以及移植到病人体内抵抗HIV感染的淋巴细胞。在一些实施例中，HPSC是自体的和CD34阳性细胞。在一些实施例中，转导的HPSC能够产生粒细胞、单核/巨噬细胞和淋巴细胞来抵抗R5和X4嗜性HIV病毒株的感染。在一些实施例中，转导的HPSC能够产生粒细胞、单核/巨噬细胞和淋巴细胞来抵抗对cART有抵抗力的HIV病毒株的感染。或者，本发明也包括这种细胞在制造用于预防和/或减少受试者中HIV感染的药物中的用途。

[0143] 一种治疗HIV感染的宿主病人的方法，包括从宿主病人的循环血液或骨髓中提取造血干细胞、利用本发明披露的表达载体(或包含表达载体的组合物)来处理所述造血干细胞以及将处理过的造血干细胞重新施用或者移植到所述相同的病人中。在一些实施例中，表达载体包括编码能够减少HIV共受体表达的抑制性核酸的第一核酸序列，编码HIV融合抑制蛋白的第二核酸序列和编码沉默核酸，将HIV的5'LTR的序列作为目标的第三核酸序列，所述第三核酸选自以下组成的组：(i)沉默核酸，将HIV-1的5'LTR从位置约143到位置约161的序列作为目标，(ii)沉默核酸，将HIV-1的5'LTR从位置约136到位置约154的序列作为目标，(iii)沉默核酸，将HIV-1的5'LTR从位置约205到位置约223的序列作为目标，以及(iv)沉默核酸，将HIV-1的5'LTR从位置约350到位置约368的序列作为目标。

[0144] 宿主细胞和制作宿主细胞的方法

[0145] 本发明还提供了一种包含本发明新颖的表达载体的宿主细胞。“宿主细胞”或“目标细胞”意味着使用本发明的方法和表达载体进行转化的细胞。在一些实施例中，宿主细胞是哺乳动物细胞，在其中表达载体能够被表达。合适的哺乳动物宿主细胞包括但不限于人类细胞、小鼠细胞、非人灵长类动物细胞(如恒河猴细胞)、人前体细胞或干细胞、293细胞、HeLa细胞、D17细胞、MDCK细胞、BHK细胞和Cf2Th细胞。在某些实施例中，包含本发明表达载体的宿主细胞为造血细胞，比如造血祖/干细胞(如CD34-阳性造血祖/干细胞(HPSC))、单核细胞、巨噬细胞、外周血单核细胞、CD4+T淋巴细胞、CD8+T淋巴细胞或树突状细胞。在一些实施例中，宿主细胞为CCR5+造血细胞。在其他实施例中，宿主细胞可以是病人的宿主细胞，也可以是与病人匹配的宿主细胞。在某些实施例中，用本发明表达载体转导的宿主细胞对X4或R5嗜性HIV株的感染有抵抗力，包括HAART耐药菌株。

[0146] 用本发明的表达载体来转导的造血细胞(如HPSC、CD4+T淋巴细胞、CD8+T淋巴细胞和/或单核/巨噬细胞)可以是异体或自体。在一些实施例中，HPSC是CD-34阳性的，可以从病人的骨髓或外周血中加以分离。在一些实施例中，分离的CD34-阳性HPSC(和/或本发明描述的其他造血细胞)用本发明的表达载体转导。比如，在一个实施例中，表达载体包括编码HIV共受体抑制剂的第一核酸序列，编码抑制HIV与靶细胞融合的蛋白质的第二核酸序列和编码将HIV的5'LTR的序列作为目标的转录基因沉默元件的第三核酸序列。

[0147] 在用本发明所披露的表达载体转导造血细胞(如FIPSC、CD4+T淋巴细胞、CD8+T淋巴细胞或单核/巨噬细胞)后，转导的细胞被重新引入或植入到病人体内。转导后的细胞可以不经肠道被注射到病人体内，或者被本领域其他任何已知的途径重新引入。在一些实施例中，转导后的造血细胞静脉注射到病人体内。在一些实施例中，造血细胞是HPSC，并且有效的剂量是足以至少部分地用抗HIV细胞重新组成免疫系统的量。可以在一次或多次给药中给予所述剂量，并且所述剂量可以从每公斤病人体重中约 0.5×10^6 个HPSC到每公斤病人体重中约 1×10^9 个HPSC。在其他实施例中，造血细胞是CD4+T淋巴细胞、CD8+T淋巴细胞或单核/巨噬细胞，有效剂量可以从每个病人中约 1×10^9 个细胞到约 1×10^{11} 个细胞。然而，确切地确定有效剂量是多少可基于每个病人的个体因素，包括他们的身材大小、年龄、HIV感染的严重性(如病毒滴度)和病毒收缩后的时间。本领域的技术人员，特别是医生能够确定转导的造血细胞的数量，可以组成有效剂量而不进行过度的实验。

[0148] 试剂盒

[0149] 在一些实施例中，试剂盒包括如本文所述的表达载体或包含表达载体的组合物。试剂盒可包括容器，容器可以是包含表达载体或口服或非肠道剂型的组合物的瓶子，每种剂型包含单位剂量的表达载体的或包含表达载体的组合物。试剂盒可以包括标签等，表明根据本发明方法对受试者进行治疗。

[0150] 详细方法

[0151] 合成

[0152] 本发明也包括一种产生病毒表达载体的方法，所述病毒表达载体当在细胞中表达时，能够抑制HIV与细胞结合，防止HIV融合到细胞中或抑制HIV复制。在一个实施例中，方法包括合成一个基因的cDNA，所述基因的cDNA表达一种蛋白，其能够阻止HIV融合到细胞中或阻止HIV复制的蛋白质；在病毒载体中将合成的cDNA克隆到限制位点以及在载体中插入能

够下调HIV共受体表达进入限制性位点的表达单元。该cDNA可以来自任何表达本发明所描述的蛋白质融合或复制抑制剂的基因。在一些实施例中,cDNA是C46cDNA。在另一个实施例中,cDNA是TRIM5 α cDNA或亲环蛋白融合。能够下调HIV共受体表达的表达单元可以是本文所述的任一种抑制剂RNA分子,如siRNA、shRNA或反义靶向共受体。在一个实施例中,表达单元是以CCR5为目标的shRNA。

[0153] 在一些实施例中,以HIV-1启动子为目标的shRNA克隆到已有的载体中,比如表达以CCR5和/或C46为目标的shRNA的载体。在一些实施例中,现有质粒用限制性内切酶切割。然后融合酶可以通过同源重组来融合四组或更多组DNA片段,所述四组或更多组DNA片段包含约15bp同源序列来允许单个G块的重组。第一个G块,即G块1,包含一个U1启动子序列和半个shPromA序列。第二个G块,即G块2,包含其他半个shPromA序列。重组伴随着用抗生素选择的大肠杆菌的转化。

[0154] RNA双链。双链RNA被设计成以HIV-1的5'LTR区域为目标。RNA双链通过Invitrogen被合成。每个siRNA结构长度为19bp,设计与3'TT悬垂。

[0155] 细胞培养。用来细胞培养的培养基和试剂均购自Gibco。HeLa T4+细胞在Dulbecco改良的Eagle培养基生长(DMEM),包含10%的胎牛血清、5U/ml的青霉素和50mg/mL的链霉素(补充DMEM),在含有5%CO₂的加湿的孵化器中在37摄氏度的条件下培养。HeLa T4+细胞在分别经G418(500ug/mL)和潮霉素(300ug/mL)的选择下加以维持。

[0156] 活的HIV-1感染和siRNA转染。利用复制能力病毒进行时间过程实验的细胞培养有5x10⁴个HeLa-T4+细胞,过夜孵育,然后用50pM的合适的siRNA板转染。第二天HeLa-T4+siRNA转染的培养基感染上140pg/uL的HIV-1株SF162。在15天的时间内收集上清液,用下述的逆转录酶(RT)法分析病毒的产生。对于ChIP实验的培养接种2x10⁵个HeLa-T4+细胞,过夜培养,然后感染上1000pg/uL的HIV-1株SF162,感染被允许持续3天。然后,用300pM的siRNAs 143、136和205, PromA转染感染的培养基或在ChIP实验出结果之前模拟转染48h。根据制造商的说明,使用RNAiMAX(Invitrogen,Life Technologies)进行转染。

[0157] 病毒定量。在培养基上清液中逆转录酶(RT)的活性是根据之前的描述所确定(Suzuki,K.,Craddock,B.P.,Okamoto,N.,Kano,T.,Steigbigel,R.T.,J Virol Methods, 44:189-98,1993)。根据之前的描述(Suzuki et al.,J RNAi Gene Silencing,2005),使用对HIV-gag特异的实时RT-PCR试验对HIV-1mRNA进行定量。简单来说,使用SuperScript一步法RT-PCR(Invitrogen)进行RT-PCR反应,使用0.4uM的有义引物和0.4uM的反义引物,和0.1uM的序列特异性荧光Taqman探针。使用HIV-1的基因组HIV质粒pNL4-3和 β -肌动蛋白的TA-克隆的PCR片段(Invitrogen,Mount Waverley,Australia)来建立标准曲线。使用的这些引物和探针由序列SEQ ID NO:30、SEQ ID NO:31、SEQ ID NO:32、SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:34和SEQ ID NO:35所提供。

[0158] 药物治疗

[0159] J-Lat 9.2潜在细胞模型培养用不同浓度的SAHA(0-100uM)、TNF(0-100ng/mL)或SAHA/TNF(0-25uM,0-100ng/mL)的组合处理48h。采用流式细胞仪(LSRFortessa-BD)检测GFP的表达,检测整合的HIV-1原病毒的重新激活并使用FlowJo分析。

[0160] 染色质免疫沉淀(ChIP)试验。将HeLa T4+细胞(5x10⁵)接种到T-25烧瓶,24h后感染上如上所述的HIV-1株SF162。在感染第三天,siRNAs 143、143T、136和205中的每一个

培养基都转染上300pmol,培养基转染上当前的主要的siRNA PromA,或者如上所述的作为控制培养基的模拟转染。在48h的转染后,根据制造商的说明使用EZ MagnaA/G ChIP Kit (Millipore,Australia)为ChIP试验收集培养结果。根据制造商的说明,在COVARIS 5超声波中以5%占空比对颗粒超声20分钟(切断1分钟,运行1分钟):强度4,破裂/周期200,以及分离蛋白质。使用每个抗体的5ug/mL来进行免疫共沉淀,对于每种 2×10^6 的细胞等价物对来自Merck Millipore的组蛋白H3K27me3 (#17-622)和H3K9Ac (#17-658)有特异性。

[0161] 数据分析。运用非参数Mann Whitney检验对ChIP数据进行了显著性检验,以平均值 \pm SEM表示。 p 值小于0.05被看做统计学上显著。运用Graphpad Prism Version 6.0 (Graphpad Software,San Diego,CA)进行所有的分析。

[0162] 示例

[0163] 示例1。以U3域作为目标的siRNAs可以减少HIV-1的抑制。

[0164] 亚型B株HIV-1SF162被用来感染Hela T4+培养基和经过一个较长的时间过程收集上清液和测量上清液的逆转录酶(RT)。为了确认单个错配是否能减少抑制效应,将siRNA143T包括在内,其包括单个T错配当它对应于HIV-1亚型A、D、F、G和U(图5)的位置16和HIV-1SF162 3'LTR的GenBank序列(登记号M65024.1)的一个共同变化。siRNAs、143、136T、205S和PromA有效地抑制了HIV-1SF162的生产性感染,通过RT活性测试,有超过1000倍的减少与感染后15天的模拟转染细胞相比。有趣的是,在感染后的第6天,siRNA 143T抑制病毒感染类似于siRNA 143和PromA,但是超过这个时间点后不能维持病毒抑制。这些数据表明,单个靶失配足以干扰长时间siRNA诱导的HIV-1病毒抑制。

[0165] 为了确定siRNAs 143、136和205的序列保守性,对HIV-1亚型A至G和U进行序列比对,生成序列标记(图3)(Crooks,Hon,Chandonia,&Brenner,2004,Genome Res 14:1188-90;Schneider,&Stephens,1990,Nucleic Acids Res 18,6097-100)。比如,siRNA 143序列保守性显示,19个核苷酸位置上的平均同一性为94.9%,同一性范围是9/19的核苷酸有大于95%的保守性,13/19的核苷酸有大于90%的保守性和18/19的核苷酸有大于80%的保守性。如之前所报道的,siPromA在所有亚型中是非常保守的,除了C亚型中的一个bp缺失,显示19个核苷酸位置上的平均同一性为98.4%(图3)。

[0166] 示例2。异染色质的标记物在HIV-1培养基中被观察到,被新颖的siRNA候选143和PromA抑制。

[0167] 为了确定siRNA 143-介导HIV-1抑制是否与描述的PromA异染色质标记物有关,ChIP试验在5'LTR 48h转染后进行表观遗传修饰。在H3K27me3中观察到了显著的增加;在siRNA 143转染培养基中为10倍($p < 0.0001$)以及在siRNA PromA-转染培养基中为大于5倍($p < 0.0001$)与模拟转染培养基相比(图6a)。在H3K9me3中也观察到了显著的增加;与模拟转染培养基相比,在siRNA 143和siRNA PromA转染培养基中都为5倍(图6b)。与模拟转染培养基相比,在siRNA 143和siPromA转染培养基中都观察到了Ago1的显著补充(图6d)。在siRNA 143和PromA转染培养基中观察到了在组蛋白乙酰化标记物H3K9AC的显著减少(4倍和6倍, $p < 0.05$)(图6e)。类似地,与模拟转染培养基相比,在siRNA 136和si205转染培养基中报道了在H3K27me3中的显著增加(图6f)。最后,与模拟转染培养基相比,siRNA 136和si205转染培养基中报道了在显著降低(图6g)。同时,这些数据有力地表明,siRNA 143、136和205类似物都通过TGS机制模拟所有的沉默HIV。

[0168] 示例3。在潜在HIV-1J-Lat 9.2细胞中以5'LTR为目标的shRNA减少由药物治疗诱导的再生。

[0169] 在HIV-1潜在模型中,为了延伸我们对siRNA143靶序列影响的研究和调查,我们平稳地产生J-Lat 9.2细胞,用短发夹sh143、shPromA转导或者用各自的慢病毒载体用sh143和shPromA一起转导。然后我们试着在J-Lat 9.2细胞中用不同浓度的SAHA、TNF或者SAHA/TNF的组合再次激活整合的潜在HIV-1,在48h测量GFP的表达作为HIV转录的读出。观察到用sh143、shPromA或双sh143/shPromA转导J-Lat 9.2细胞在生理浓度在很大程度上抵抗来自SAHA、TNF或者SAHA/TNF的激活,在超生理药物浓度表现出低水平的再次激活,然而那些用shRNA对照组转染的细胞表现出高水平的GFP表达,意味着潜在HIV-1感染的再次激活(图7)。重要的是,双sh143/shPromA转导J-Lat 9.2细胞系似乎在保护免受重新激活刺激方面有一个稍微好的效果。这些数据表明当用sh143和/或shPromA转导时HIV-1潜在模型J-Lat 9.2细胞在很大程度上抵抗药物治疗的重新激活。

[0170] 示例4。用抗HIV慢病毒转基因分析细胞内的病毒DNA和mRNA-Ca1-1和TGS诱导shRNA慢病毒构建体的示例。

[0171] (1) 基于HIV-1进入抑制剂的Ca1-1慢病毒载体

[0172] 基于体外传染实验的MOLT-4。基于MOLT-4细胞准备了三组样本。

[0173] a. 仅没有经过任何Ca1-1慢病毒转导的MOLT-4细胞;

[0174] b. 80%没有经过Ca1-1转导的MOLT-4细胞和20%经过Ca1-1转导的MOLT-4细胞的混合物。转导细胞的程度由C46表达的流式分析决定。这种实验设置是为了监测没有经过转导的MOLT-4细胞(80%)和经过Ca1-1转导的MOLT-4细胞(20%)的混合群体的转基因效果;

[0175] c. 100%经Ca1-1转导的MOLT-4细胞,Ca1-1慢病毒通过流式细胞仪由C46表达所确定。

[0176] 这些细胞中的大约50万感染上HIV-1BaL,在第4、7、10和14天采集样品来分析细胞内DNA和病毒mRNA。

[0177] 细胞内HIV-1DNA的分析(图8a):利用HIV-1LTR区域的引物和探针组来分析HIV整合DNA。

[0178] 分析在MOLT-4细胞中的HIV-1整合DNA(图8a)。在时间过程中,在MOLT-4细胞中观察到在HIV-1DNA水平上的显著增加。这意味着在MOLT-4细胞中高水平的HIV-1的整合。

[0179] 用20%Ca1-1转导的混合的MOLT-4细胞培养表明在第10天和第14天检测出HIV-1DNA。然而,观察到的HIV-1DNA水平与没有经过转导的MOLT-4细胞相比低了10-50倍。在100%经Ca1-1转导的MOLT-4细胞中没有检测出HIV-1DNA。

[0180] 为了检测HIV-1细胞内RNA水平,分析了HIV-1特异性LTR mRNA(图8b)。在培养阶段,在MOLT-4细胞中检测出异常升高的HIV-1特异性细胞相关的HIV-1LTR mRNA(●)。

[0181] 与此相反,在100%经Ca1-1转导的MOLT-4细胞中观察到HIV-1细胞相关的HIV-1LTR mRNA的显著减少(■)。观察到这些水平的减少大于1000倍。在实验组中在用20%Ca1-1转导的混合的MOLT-4细胞中的HIV-1细胞相关的HIV-1LTR mRNA的这种水平的减少(10-100倍)(▲)表明部分保护免受HIV感染。这些观察证明Ca1-1慢病毒载体能够在MOLT-4细胞中诱导HIV转录降低1000倍以上。

[0182] 尽管在经Ca1-1转导的MOLT-4细胞中没有检测到HIV-1DNA水平,在图8b中与HIV-1

细胞相关的LTR-mRNA仍然被检出(■)。这表明很小水平的RNA转录发生于在MOLT-4细胞中的很小组群的HIV-1整合的DNA中。

[0183] 每次这种DNA PCR预计的细胞数量为每个PCR反应大约 $1-2 \times 10^5$ 个细胞当量DNA。因此,在这种试验模式下HIV-1检测灵敏度是每 $1-2 \times 10^5$ 个细胞2个拷贝数。如果HIV-1DNA整合频率低于每 $1-2 \times 10^5$ 个细胞2个拷贝数,在这种模式下试验将不能检测出HIV-1DNA。

[0184] 可能的是,观察到的HIV-1LTR-mRNA的水平是MOLT-4细胞中一个非常小的部分的结果,未能被转导Ca1-1。

[0185] (2) TGS-诱导shRNA慢病毒载体

[0186] 基于体外感染试验的PM-1。基于PM-1CD4+T细胞系准备了三组样本。

[0187] a. 没有使用任何shRNA慢病毒转导的PM-1细胞;

[0188] b. 用shPromA转导的PM-1细胞(shRNA以HIV-1启动子区域为目标(shPromA构建体的具体细节被描述:Suzuki K, et.al, Mol Ther Nucleic Acids 2013, 2:e137);

[0189] c. 用shPromA-Scrambled对照转导的PM-1细胞。

[0190] 这些细胞中的大约50万感染上HIV-1株JR-FL,在第10天采集样品来分析细胞内DNA和病毒mRNA分析。

[0191] 分析PM-1细胞中的HIV-1整合DNA(图9a)。三组实验条件下含有数量相当的HIV-1DNA。

[0192] 为了检测HIV-1细胞内RNA水平,分析了HIV-1特异性gag mRNA(图9b)。尽管在shPromA转导的PM-1细胞中出现了HIV-1DNA(图9a),但是HIV-1的转录被大大抑制。特别地,与没有被转导的PM-1模拟感染对照和shPromA-Scrambled对照相比观察到大约1000倍的降低。这些观察意味着使用PM-1细胞模型shPromA能够诱导大约1000倍的HIV-1转录的降低。

[0193] 基于以上数据,包括Ca1-1和TGS-诱导shRNA的一种组合方案被预计在转导的T细胞系中产生超过106的抑制率与没有经转导的模拟感染相比。因此,我们希望通过这种三重和/或四重联合抗HIV慢病毒载体系统观察完全抑制HIV-1转录的表达。

[0194] 示例5

[0195] 申请人相信根据本发明的三重和/或四联合载体至少像双载体结构一样安全且有效,如本文所述的Ca1-1。申请人已经表明利用Ca1-1慢病毒载体的自体移植是安全的,并且自体移植在单个移植后使用骨髓抑制的条件和无基因修饰细胞的选择方法在猕猴外周血调节稳定的基因标记。申请人还表明采用Ca1-1转导的CD34+细胞移植的动物表现出长期的、多系移植的基因标记细胞,这些细胞能够抵抗SHIV来自体外和体内的挑战。事实上,体外实验表明,CD34+细胞的Ca1-1转导效率与在感染前测量的移植动物的外周血和组织中基因标记水平有关,表明来自Ca1-1移植的动物的CD4+细胞对体外SHIV感染具有抵抗性,表明基因标记细胞经历病毒依赖阳性选择。申请人还表明在子集分类实验中存在着的在易受SHIV影响的子集的标记的优先增加,即在T细胞室中。

[0196] 基于至少这些发现,申请人相信在存在的Ca1-1载体中一个或多个转录基因沉默元件的合作会产生三重和/或四重构建载体,至少与Ca1-1载体一样安全且有效(或者与包括一个或多个转录基因沉默元件的载体一样安全且有效)。像这样的,三联和四联结合慢病毒(LV)构建体(见图10)的联合效力和毒性将在一系列体外和体内实验中得到检验,明确的目标是证明将包含对抗CCR5的shRNA和/或C46融合抑制剂)的表达载体的效果与来自相同

的慢病毒载体的诱导转录基因沉默 (TGS) 的 shRNAs 的效果联合对于病毒库的控制是否是互补的或甚至是协同的。现在有越来越多的证据表明,这种复用构建体能够有效地表达和允许使用 H1、U6 和 U1 启动子的结合物来处理复杂的 shRNAs。

[0197] 2a) 一旦本发明的慢病毒结构被合成,我们将会证明每一个 TGS 诱导和 CCR5 抑制 shRNAs 的表达都存在有效的和预期的水平,并且它们是有有效的被表达和被处理的。

[0198] 2b) 申请人将会证明本发明的慢病毒结构能够与单独的转录基因沉默元件一样有效地诱导 TGS,通过监测 CXCR4 嗜性病毒 (NL4.3) 和 VZV-G 假性病毒的动态感染。这些病毒都逃避 CCR5 shRNA 和后者逃避 C46,允许通过 shRNA-诱导的 TGS 来实现沉默的程度,这是由本发明的结构所表达出来的,可以在体外独立评估其他核酸成分的影响(如针对 CCR4 和/或 C46 等)。平行的,使用 β -内酰胺酶 (BLAM) 报告实验,我们将证明使用病毒抑制 CCR5 的进入以证明本发明的构建体与在美国专利申请 2012/0201794 中描述的那些构建体具有同等功效。这将通过在培养物中量化相对慢病毒标记和 HIV-1 DNA 来被证实。这些实验将证明每个 shRNA 的表达和效能的等价性,当单个 shRNA 被标准的(单个/双个代理构造)或复杂的(三重/四重代理)慢病毒结构被递交。

[0199] 2c) 一旦这被证明了,进行那些与 PCT/AU2015/050507 中描述相似的实验以在如下之间比较非目标效应的效力和范围:(1) 在美国申请 2012/0201794 中描述的表达载体或结构,(2) 来自 PCT/AU2015/050507 的主要的 TGS 候选以及(3) 本发明的构建体。这些实验将会证明本发明的任何一种构建体是否比美国申请 2012/0201794 或 PCT/AU2015/050507 中描述的更有影响,特别地,因为它们的生命周期的不同阶段发挥作用,所述效果是否是附加的,或者甚至是协同的。

[0200] 2d) 一旦体外实验证明了本发明的一个 LV 的至少附加效应,它们将被用于在如上所述的 BLT 小鼠模型在一个四臂实验 (four arm experiment) 中对疗效进行体内评估,将其效力直接与主要的来自 PCT/AU2015/050507、美国申请 2012/0201794 和空载体中的 TGSLV 构建体进行比较。最主要的终点是在来自于脾脏的 CD4+T 细胞中的整合性 HIV 库的大小。第二重要的终点包括 pVL 和 CD4+T 细胞计数。

[0201] 2e) 一旦本发明的 LV 构建体的潜在优势在体内得到证明,除了 CD34+HSC 转导和激发,我们将会用来自受 HIV 感染的供体中的转导的 CD4+T 细胞来重新构建 BLT 小鼠,证明在现有的病毒库存在的情况下,本发明主要的 LV 构建体可以有效地抑制预先存在的整合病毒。

[0202] 效果:我们希望 LV 结构(viii) 可以很好的实现 a) -c) 中的效果,由于多种病毒靶点,抑制效应将至少是附加的。体内实验被期望用来确认在外围和组织中病毒库、pVL 病毒和 CD4+T 细胞计数维持的更有效更持久的控制。也将包括初步毒性数据。

[0203] 工业实用性的声明

[0204] 本发明在医学领域具有适用性,例如基因疗法。

[0205] 在说明书中提到的所有公开物在此通过引用,将其整体并入本文。本领域技术人员将会理解如说明书中特定实施例所表现的对本发明所做的各种变化和/或修改不会背离本发明的精神或超出本发明的保护范围。因此,本发明实施例在所有方面都被认为是说明性的而不是限制性的。

[0206] 虽然本发明通过特定实施例和应用进行了说明,需要理解的是,这些实施例仅仅只是对本发明的原则和应用加以说明。因此,需要理解的是,可以对说明性实施例作出许多

修改,并可以在不偏离附加的权利要求所规定的本发明的精神和范围的情况下制定其他安排。

序列表

<110> 卡琳缪恩股份有限公司(CALIMMUNE, INC.)

卡琳缪恩澳大利亚私人有限公司(CALIMMUNE AUSTRALIA PTY LTD)

新南创新私人有限公司(NEWSOUTH INNOVATIONS PTY LIMITED)

悉尼圣文森特医院(ST. VINCENT'S HOSPITAL SYDNEY)

G·P·西蒙兹(SYMONDS, Geoffrey Phillip)

K·铃木(SUZUKI, Kazuo)

A·D·凯莱赫(KELLEHER, Anthony Dominic)

C·L·E·阿伦斯蒂尔(AHLENSTIEL, Chantelle Lisa Evelyn)

<120> 用于HIV的治疗的基因疗法及其用途(GENE THERAPEUTIC FOR THE TREATMENT OF HIV AND USES THEREOF)

<130> Cal-002W0

<150> US 62/163,332

<151> 2015-05-18

<160> 43

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 19

<212> DNA

<213> HIV-1

<220>

<221> misc_feature

<222> (1) .. (19)

<223> 143至161 5' LTR U3(143 to 161 5' LTR U3)

<400> 1

gctagtacca gttgagcca 19

<210> 2

<211> 19

<212> DNA

<213> HIV-1

<220>

<221> misc_feature

<222> (1) .. (19)

<223> BaL株, 亚型B, D, F, H, J, K (143至161 5' LTR U3) (strain BaL, subtypes B, D, F, H, J, K (143 to 161 5' LTR U3))

<400> 2

gctagtacca gttgagcca 19

<210> 3

<211> 19
<212> DNA
<213> HIV-1
<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(19)
<223> 亚型A (143至161 5' LTR U3) (subtype A (143 to 161 5' LTR U3))
<400> 3
gctagtacca gttgatcca 19
<210> 4
<211> 19
<212> DNA
<213> HIV-1
<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(19)
<223> 亚型C (143至161 5' LTR U3) (subtype C (143 to 161 5' LTR U3))
<400> 4
gctagtgccca gttgaccca 19
<210> 5
<211> 19
<212> DNA
<213> HIV-1
<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(19)
<223> 亚型G (143至161 5' LTR U3) (subtype G (143 to 161 5' LTR U3))
<400> 5
gctagtacca gtggaccca 19
<210> 6
<211> 19
<212> RNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成的: RNA双链有义链(143至161 5' LTR U3) (Synthetic: RNA duplex
sense strand (143 to 161 5' LTR U3))
<400> 6
gcuaguacca guugagcca 19
<210> 7

<211> 19
 <212> RNA
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <220>
 <223> 合成的: RNA双链反义链(143至161 5' LTR U3) (Synthetic: RNA duplex antisense strand (143 to 161 5' LTR U3))
 <400> 7
 uggcucaacu gguacuagc 19
 <210> 8
 <211> 57
 <212> RNA
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <220>
 <223> 合成的: shRNA (143至161 5' LTR U3) (Synthetic: shRNA (143 to 161 5' LTR U3))
 <400> 8
 gcuaguacca guugagccac ugugaagcca cagaugggug gcucaacugg uacuagc 57
 <210> 9
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> HIV-1
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(19)
 <223> 136至154 5' LTR U3(136 to 154 5' LTR U3)
 <400> 9
 gctacaagct agtaccagt 19
 <210> 10
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> HIV-1
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(19)
 <223> SF162株, 亚型A, B, F, H, J, K (136至154 5' LTR U3) (strain SF162, subtypes A, B, F, H, J, K (136 to 154 5' LTR U3))
 <400> 10
 gcttcaagct agtaccagt 19
 <210> 11

<211> 19
 <212> DNA
 <213> HIV-1
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1) .. (19)
 <223> 亚型C (136至154 5' LTR U3) (subtype C (136 to 154 5' LTR U3))
 <400> 11
 gcttcaagct agtgccagt 19
 <210> 12
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> HIV-1
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1) .. (19)
 <223> 亚型D (136至154 5' LTR U3) (subtype D (136 to 154 5' LTR U3))
 <400> 12
 gcttcgagct agtaccagt 19
 <210> 13
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> HIV-1
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1) .. (19)
 <223> 亚型G (136至154 5' LTR U3) (subtype G (136 to 154 5' LTR U3))
 <400> 13
 gcttcaaact agtaccaat 19
 <210> 14
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <220>
 <223> 合成的: RNA双链有义链(136至154 5' LTR U3) (Synthetic: RNA duplex
 sense strand (136 to 154 5' LTR U3))
 <400> 14
 gcuacaagcu aguaccagu 19
 <210> 15

<211> 19
 <212> RNA
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <220>
 <223> 合成的: RNA双链反义链(136至154 5' LTR U3) (Synthetic: RNA duplex antisense strand (136 to 154 5' LTR U3))
 <400> 15
 acugguacua gcuuguagc 19
 <210> 16
 <211> 57
 <212> RNA
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <220>
 <223> 合成的: shRNA (136至154 5' LTR U3) (Synthetic: shRNA (136 to 154 5' LTR U3))
 <400> 16
 gcuucaagcu aguaccaguc ugugaagcca cagaugggac ugguacuagc uugaagc 57
 <210> 17
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> HIV-1
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(19)
 <223> 205至223 5' LTR U3(205 to 223 5' LTR U3)
 <400> 17
 acaccctatg agcctgcat 19
 <210> 18
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> HIV-1
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(19)
 <223> SF162株, 亚型A, B, H, J, K (205至223 5' LTR U3) (strain SF162, subtypes A, B, H, J, K (205 to 223 5' LTR U3))
 <400> 18
 acaccctatg agcctgcat 19
 <210> 19

<211> 19
 <212> DNA
 <213> HIV-1
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1) .. (19)
 <223> 亚型C和亚型D (205至223 5' LTR U3) (subtype C and D (205 to 223 5'
 LTR U3))
 <400> 19
 acaccctatg agccagcat 19
 <210> 20
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> HIV-1
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1) .. (19)
 <223> 亚型F (205至223 5' LTR U3) (Subtype F (205 to 223 5' LTR U3))
 <400> 20
 acaccccatg agccaacat 19
 <210> 21
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> HIV-1
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1) .. (19)
 <223> 亚型G (205至223 5' LTR U3) (Subtype G (205 to 223 5' LTR U3))
 <400> 21
 acaccccatc tgccagcat 19
 <210> 22
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <220>
 <223> 合成的: RNA双链有义链 (205至223 5' LTR U3) (Synthetic: RNA duplex
 sense strand (205 to 223 5' LTR U3))
 <400> 22
 acaccugug agccugcau 19

Ile Glu Glu Ser Gln Asn Gln Gln Glu Lys Asn Glu Gln Glu Leu Leu
 50 55 60
 Glu Leu Asp Lys Trp Ala Ser Leu Trp Asn Trp Phe Arg Ser Glu Arg
 65 70 75 80
 Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly
 85 90 95
 Pro Leu Ile Ala Leu Val Thr Ser Gly Ala Leu Leu Ala Val Leu Gly
 100 105 110
 Ile Thr Gly Tyr Phe Leu Met Asn Arg Arg Ser Trp Ser Pro Thr Gly
 115 120 125
 Glu Arg Leu Glu Leu Glu Pro
 130 135

<210> 27

<211> 408

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成的: C46 HIV融合抑制剂(Synthetic: C46 HIV fusion inhibitor)

<400> 27

atgggagcag gagcaaccgg aagggaatg gacggaccac ggctgctgct gctgctgctg 60
 ctgggcgtga gcctgggcgg cgccccgagc tggatggagt gggaccggga gatcaacaac 120
 tacaccagcc tgatccacag cctgatcgag gagagccaga accagcagga gaagaacgag 180
 caggagctgc tggagctgga caagtgggcc agcctgtgga actggttccg gagcgagcgg 240
 aagtgctgcg tggagtgcc accatgccc gcaccaccag tggcaggacc cctgatcgca 300
 ctggtgacca gcgagccct gctggccgtg ctgggcatca caggctactt cctgatgaac 360
 cggcggagct ggagccccac cggcgagcgg ctggagctgg agccctga 408

<210> 28

<211> 493

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<220>

<221> misc_feature

<222> (1) .. (493)

<223> 人类TRIM5- α 蛋白(human TRIM5- α protein)

<400> 28

Met Ala Ser Gly Ile Leu Val Asn Val Lys Glu Glu Val Thr Cys Pro
 1 5 10 15
 Ile Cys Leu Glu Leu Leu Thr Gln Pro Leu Ser Leu Asp Cys Gly His
 20 25 30

Ser Phe Cys Gln Ala Cys Leu Thr Ala Asn His Lys Lys Ser Met Leu
 35 40 45
 Asp Lys Gly Glu Ser Ser Cys Pro Val Cys Arg Ile Ser Tyr Gln Pro
 50 55 60
 Glu Asn Ile Arg Pro Asn Arg His Val Ala Asn Ile Val Glu Gly Leu
 65 70 75 80
 Arg Glu Val Lys Leu Ser Pro Glu Gly Gln Lys Val Asp His Cys Ala
 85 90 95
 Arg His Gly Glu Lys Leu Leu Leu Phe Cys Gln Glu Asp Gly Lys Val
 100 105 110
 Ile Cys Trp Leu Cys Glu Arg Ser Gln Glu His Arg Gly His His Thr
 115 120 125
 Phe Leu Thr Glu Glu Val Ala Arg Glu Tyr Gln Val Lys Leu Gln Ala
 130 135 140
 Ala Leu Glu Met Leu Arg Gln Lys Gln Gln Glu Ala Glu Glu Leu Glu
 145 150 155 160
 Ala Asp Ile Arg Glu Glu Lys Ala Ser Trp Lys Thr Gln Ile Gln Tyr
 165 170 175
 Asp Lys Thr Asn Val Leu Ala Asp Phe Glu Gln Leu Arg Asp Ile Leu
 180 185 190
 Asp Trp Glu Glu Ser Asn Glu Leu Gln Asn Leu Glu Lys Glu Glu Glu
 195 200 205
 Asp Ile Leu Lys Ser Leu Thr Asn Ser Glu Thr Glu Met Val Gln Gln
 210 215 220
 Thr Gln Ser Leu Arg Glu Leu Ile Ser Asp Leu Glu His Arg Leu Gln
 225 230 235 240
 Gly Ser Val Met Glu Leu Leu Gln Gly Val Asp Gly Val Ile Lys Arg
 245 250 255
 Thr Glu Asn Val Thr Leu Lys Lys Pro Glu Thr Phe Pro Lys Asn Gln
 260 265 270
 Arg Arg Val Phe Arg Ala Pro Asp Leu Lys Gly Met Leu Glu Val Phe
 275 280 285
 Arg Glu Leu Thr Asp Val Arg Arg Tyr Trp Val Asp Val Thr Val Ala
 290 295 300
 Pro Asn Asn Ile Ser Cys Ala Val Ile Ser Glu Asp Lys Arg Gln Val
 305 310 315 320
 Ser Ser Pro Lys Pro Gln Ile Ile Tyr Gly Ala Arg Gly Thr Arg Tyr
 325 330 335
 Gln Thr Phe Val Asn Phe Asn Tyr Cys Thr Gly Ile Leu Gly Ser Gln

340	345	350
Ser Ile Thr Ser Gly Lys Ser Tyr Trp Glu Val Asp Val Ser Lys Lys		
355	360	365
Thr Ala Trp Ile Leu Gly Val Cys Ala Gly Phe Gln Pro Asp Ala Met		
370	375	380
Cys Asn Ile Glu Lys Asn Glu Asn Tyr Gln Pro Asn Tyr Gly Tyr Trp		
385	390	395
Val Ile Gly Leu Glu Glu Gly Val Lys Cys Ser Ala Phe Gln Asp Ser		
405	410	415
Ser Phe His Thr Pro Ser Val Pro Phe Ile Val Pro Leu Ser Val Leu		
420	425	430
Ile Cys Pro Asp Arg Val Gly Val Phe Leu Asp Tyr Glu Ala Cys Thr		
435	440	445
Val Ser Phe Phe Asn Ile Thr Asn His Gly Phe Leu Ile Tyr Lys Phe		
450	455	460
Ser His Cys Ser Phe Ser Gln Pro Val Phe Pro Tyr Leu Asn Pro Arg		
465	470	475
Lys Cys Gly Val Pro Met Thr Leu Cys Ser Pro Ser Ser		
485	490	

<210> 29

<211> 1482

<212> DNA

<213> 智人 (Homo sapiens)

<220>

<221> misc_feature

<222> (1) .. (1482)

<223> 人类TRIM5- α 蛋白核酸序列 (human TRIM5- α protein nucleic acid sequence)

<400> 29

```

atggcttctg gaatcctggt taatgtaaag gaggagtgta cctgccccat ctgacctggaa 60
ctcctgacac aaccctgag cctggactgc ggccacagct tctgccaage atgacctact 120
gcaaaccaca agaagtccat gctagacaaa ggagagagta gctgacctgt gtgccggatc 180
agttaccagc ctgagaacat acggcctaata cggcatgtag ccaacatagt ggagaagctc 240
aggagggtca agttgagccc agagggggcag aaagttgate attgtgcacg ccatggagag 300
aaacttctac tcttctgtca ggaggacggg aaggtcattt gctggctttg tgagcggctt 360
caggagcacc gtggtcacca cacgttcctc acagaggagg ttgcccgga gtaccaagtg 420
aagctccagg cagctctgga gatgetgagg cagaagcagc aggaagctga agagttagaa 480
gctgacatca gagaagagaa agcttctgga aagactcaaa tacagtatga caaaaccaac 540
gtcttggcag attttgagca actgagagac atcctggact gggaggagag caatgagctg 600

```

caaacctgg agaaggagga ggaagacatt ctgaaaagcc ttacgaactc tgaactgag 660
 atgggtgcagc agaccacagtc cctgagagag ctcatctcag atctggagca tcggctgcag 720
 gggtcagtga tggagctgct tcagggtgtg gatggcgtca taaaaggac ggagaacgtg 780
 accttgaaga agccagaaac ttttccaaa aatcaaagga gagtgtttcg agctcctgat 840
 ctgaaaggaa tgctagaagt gtttagagag ctgacagatg tccgacgcta ctgggttgat 900
 gtgacagtgg ctccaaacaa catttcatgt gctgtcattt ctgaagataa gagacaagtg 960
 agctctccga aaccacagat aatatatggg gcacgagga caagatacca gacatttgtg 1020
 aatttcaatt attgtactgg catcctgggc tctcaaagta tcacatcagg gaaacattac 1080
 tgggaggtag acgtgtccaa gaaaactgct tggatcctgg gggtatgtgc tggcttccaa 1140
 cctgatgcaa tgtgtaatat tgaaaaaat gaaaattatc aacctaaata cggctactgg 1200
 gttatagggg tagaggaagg agttaaagt agtgccttcc aggatagttc ctccatact 1260
 ccttctgttc ctttcattgt gcccctctct gtgattattt gtctgatcg tgttgagtt 1320
 ttctagact atgaggettg cactgtctca ttcttcaata tcacaaacca tggatttctc 1380
 atctataagt tttctcagtg ttctttttct cagcctgtat ttccatattt aaatcctaga 1440
 aaatgtggag tcccctgac tctgtgetca ccaagetctt ga 1482

<210> 30

<211> 30

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成的: HIV-gag有义引物(Synthetic: HIV-gag sense primer)

<400> 30

agtgggggga catcaagcag ccatgcaaat 30

<210> 31

<211> 28

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成的: HIV-gag反义引物(Synthetic: HIV-gag antisense primer)

<400> 31

tactagtagt tctgctatg tcaacttc 28

<210> 32

<211> 29

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成的: HIV-gag检测探针(Synthetic: HIV-gag detection probe)

<220>

<221> misc_feature

<223> 5' FAM / 3' TAMRA
<400> 32
atcaatgagg aagctgcaga atgggatag 29
<210> 33
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成的: β -肌动蛋白有义引物(Synthetic: Beta-actin sense primer)
<400> 33
tcaccacac tgtgccate tacga 25
<210> 34
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成的: β -肌动蛋白反义引物(Synthetic: Beta-actin anti-sense primer)
<400> 34
cagcgaacc gctcattgcc aatgg 25
<210> 35
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成的: β -肌动蛋白检测探针(Synthetic: Beta-actin detection probe)
<220>
<221> misc_feature
<223> 5' FAM / 3' TAMRA
<400> 35
atgccctccc ccatgccate ctgcg 25
<210> 36
<211> 19
<212> DNA
<213> HIV-1
<220>
<221> misc_feature
<222> (1) .. (19)
<223> 350至368 5' LTR U3-PromA(350 to 368 5' LTR U3-PromA)
<400> 36

gggactttcc gctggggac 19
 <210> 37
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> HIV-1
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(19)
 <223> NL4.3株, 亚型A, B, D, F, H, J, K (350至368 5LTR U3-PromA) (Strain NL4.3, subtypes A, B, D, F, H, J, K (350 to 368 5LTR U3-PromA))
 <400> 37
 gggactttcc gctggggac 19
 <210> 38
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> HIV-1
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(18)
 <223> 亚型C (350至368 5LTR U3-PromA) (Subtype C (350 to 368 5LTR U3-PromA))
 <400> 38
 gggactttcc actggggc 18
 <210> 39
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> HIV-1
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(19)
 <223> 亚型G (350至368 5LTR U3-PromA) (Subtype G (350 to 368 5LTR U3-PromA))
 <400> 39
 gggactttcc gcctggggac 19
 <210> 40
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <220>

<223> 合成的: RNA双链有义链 (350至368 5 LTR U3-PromA) (Synthetic: RNA duplex sense strand (350 to 368 5 LTR U3-PromA))

<400> 40

gggacuuucc gcuggggac 19

<210> 41

<211> 19

<212> RNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成的: RNA双链反义链 (350至368 5 LTR U3-PromA) (Synthetic: RNA duplex antisense strand (350 to 368 5 LTR U3-PromA))

<400> 41

guccccagcg gaaagucc 19

<210> 42

<211> 57

<212> RNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成的: shRNA (350至368 5LTR U3-PromA) (Synthetic: shRNA (350 to 368 5LTR U3-PromA))

<400> 42

gggacuuucc gcuggggacc ugugaagcca cagauggggu cccagcgga aagucc 57

<210> 43

<211> 19

<212> RNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220> 合成的: shRNA环路序列(Synthetic: shRNA Loop sequence)

<400> 43

cugugaagcc acagaugg 19

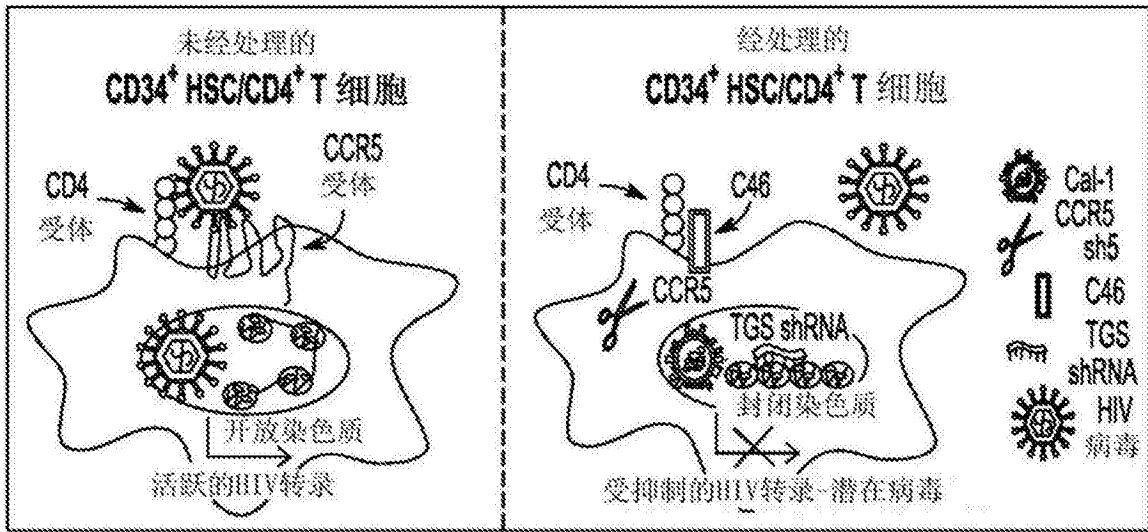


图1

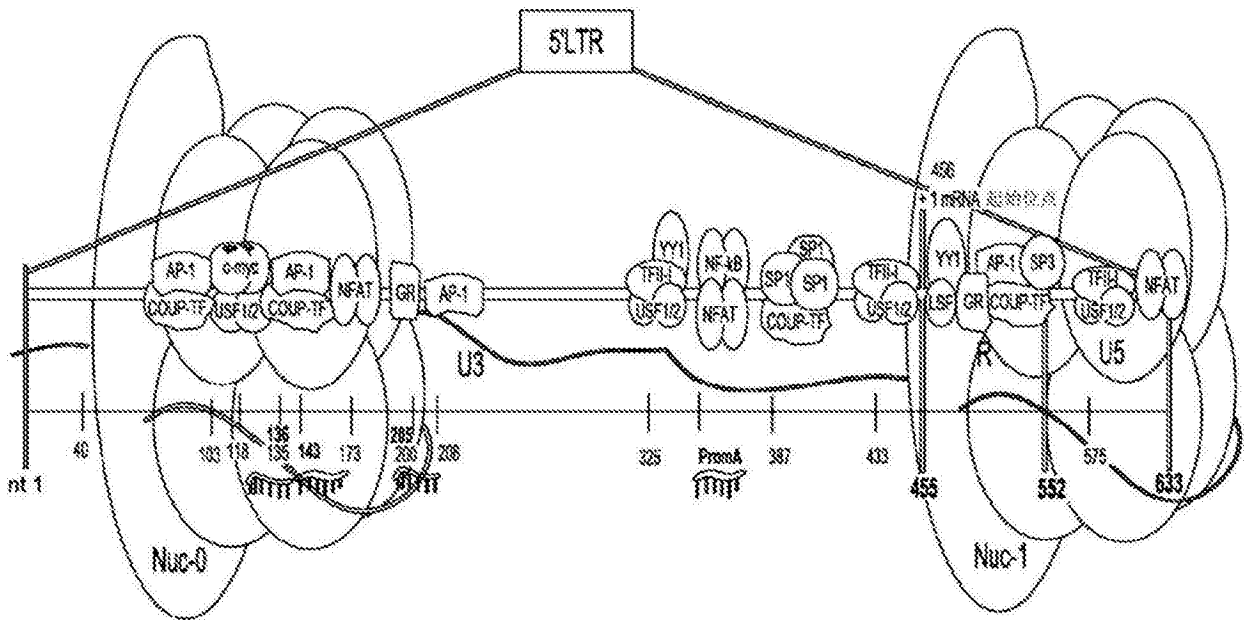


图2

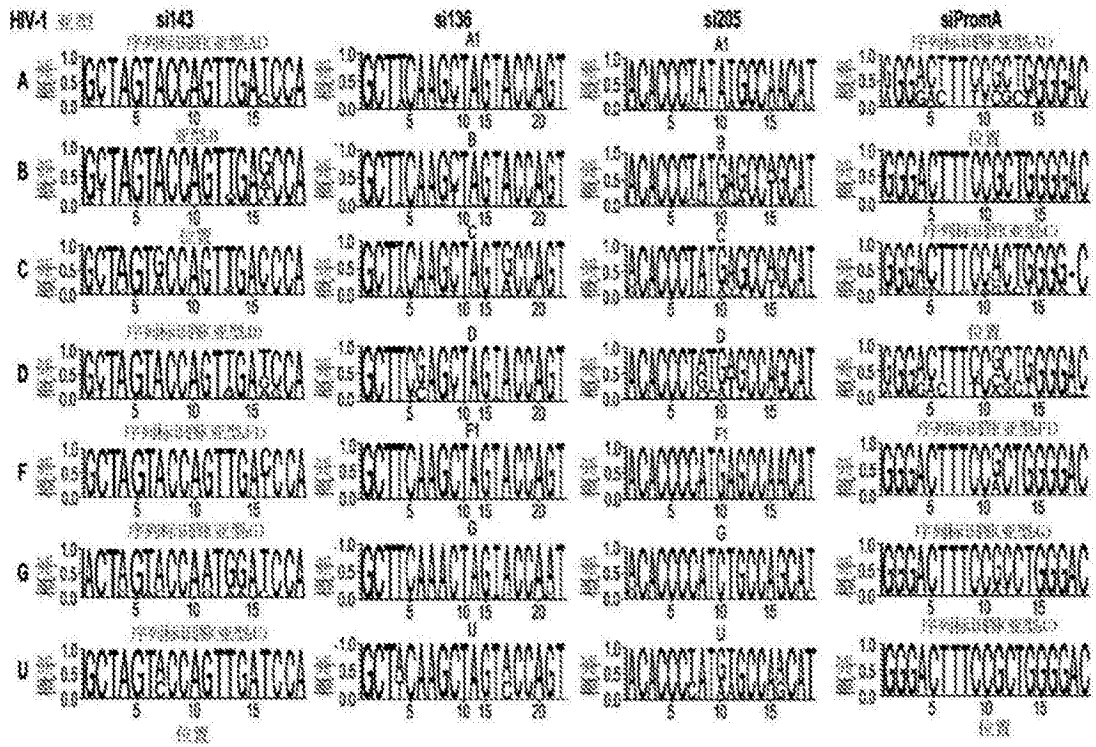


图3

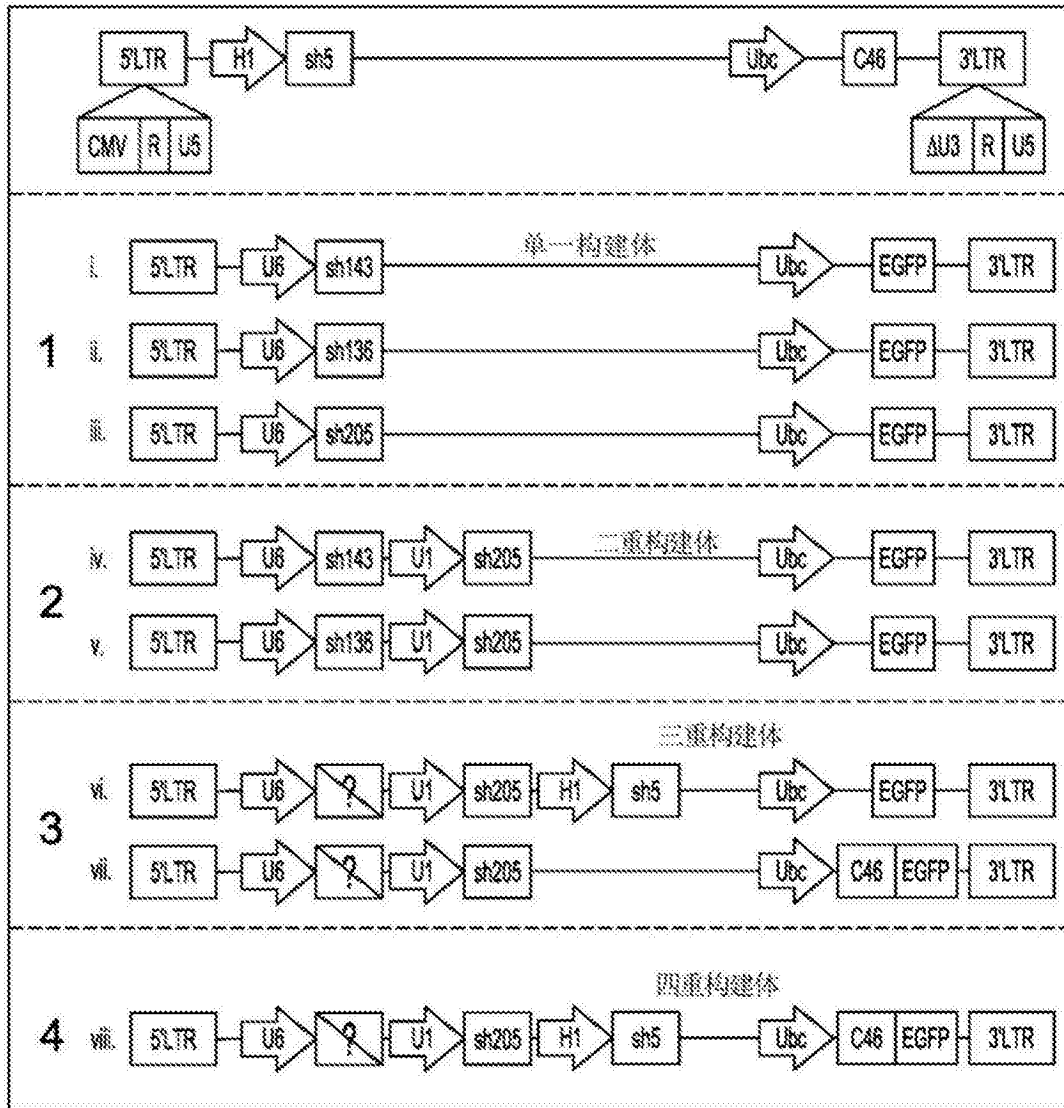


图4

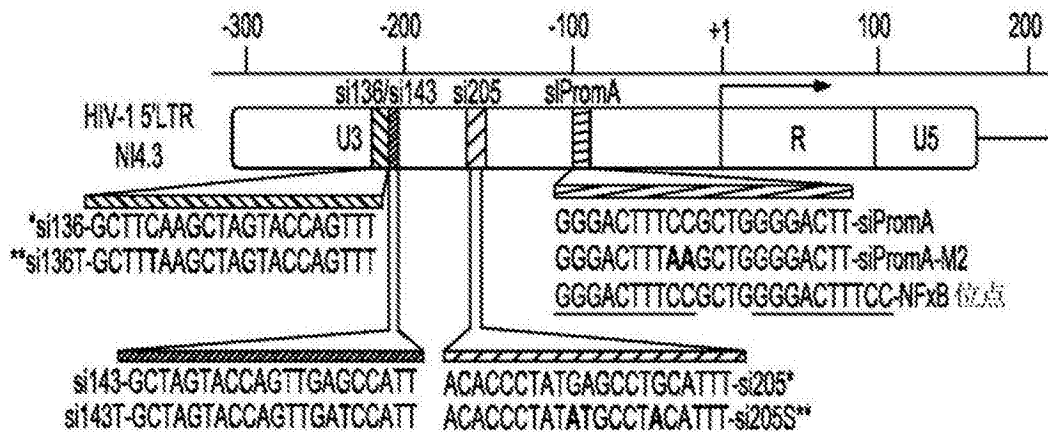


图5A

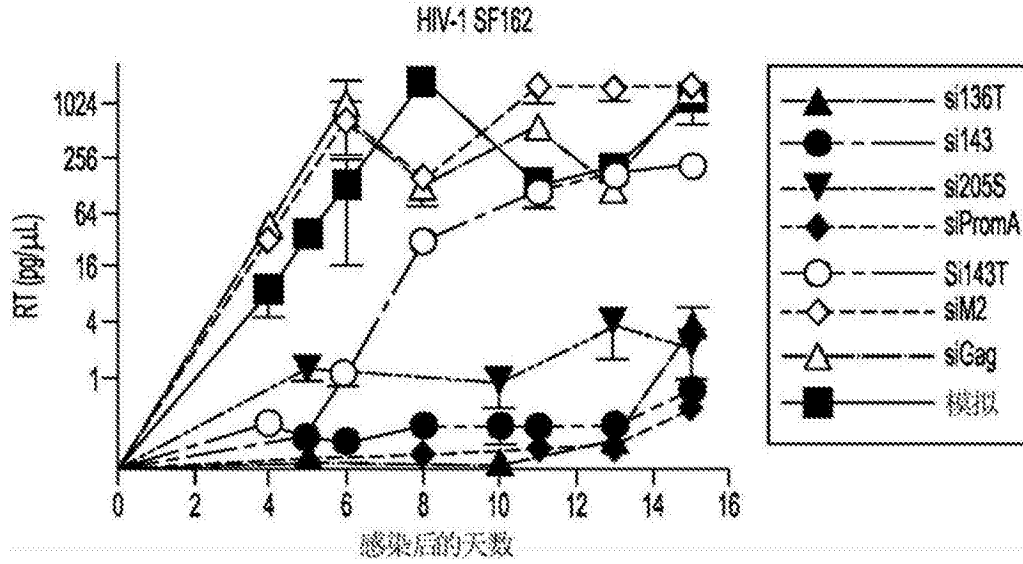


图5B

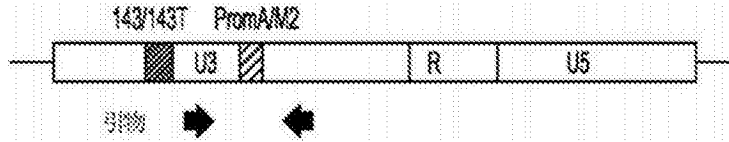


图6A

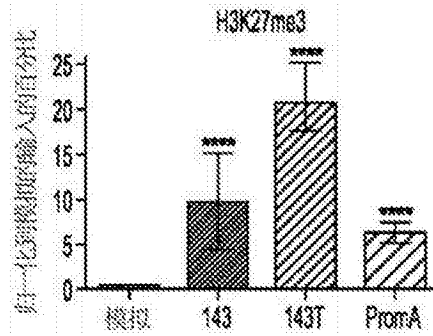


图6B

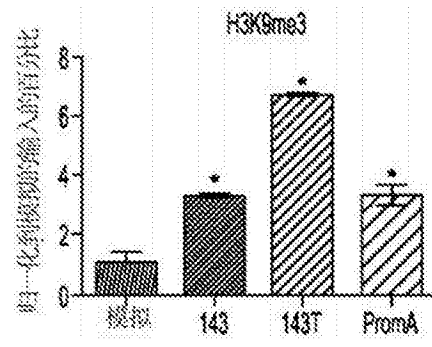


图6C

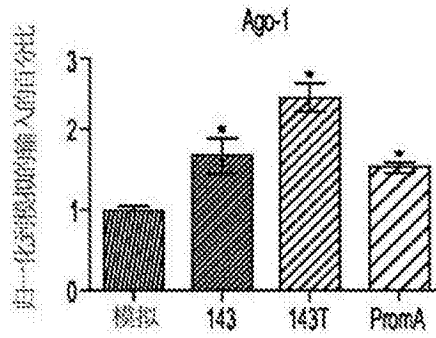


图6D

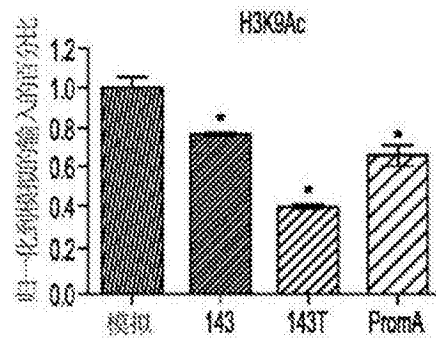


图6E

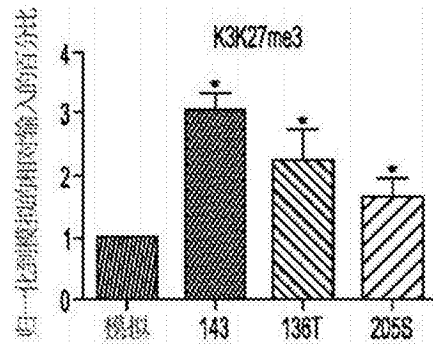


图6F

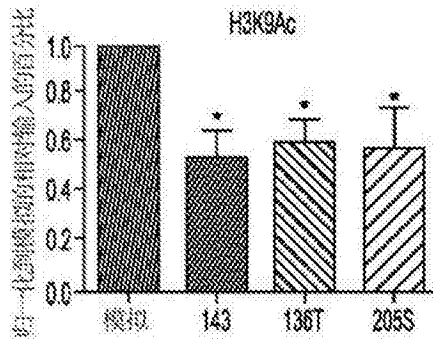


图6G

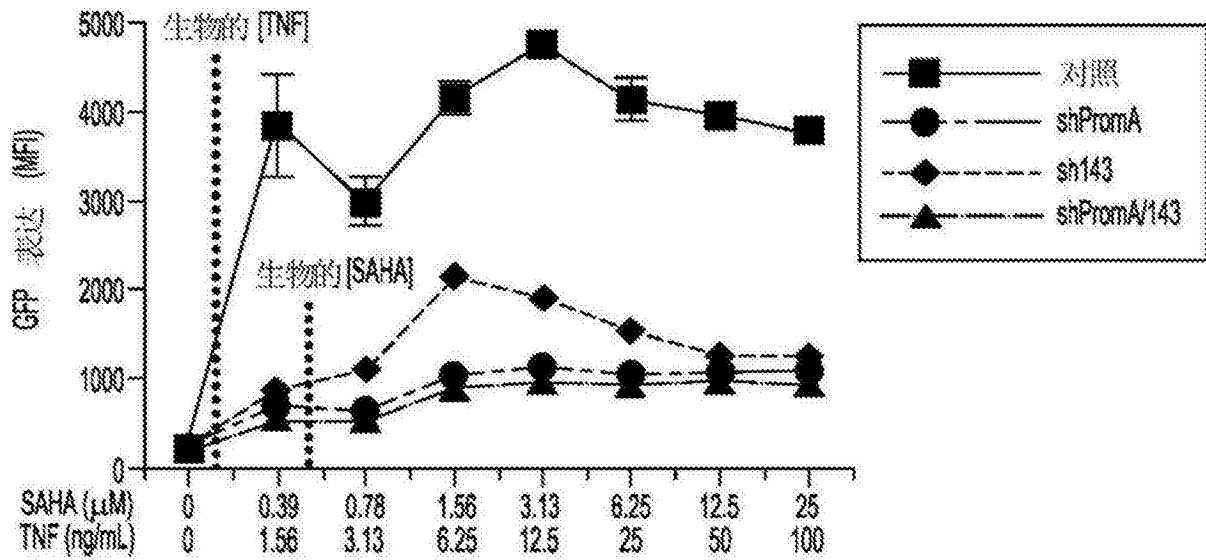


图7

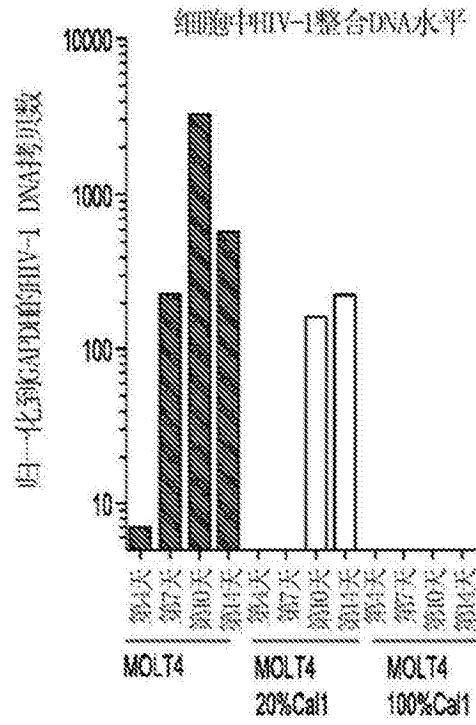


图8A

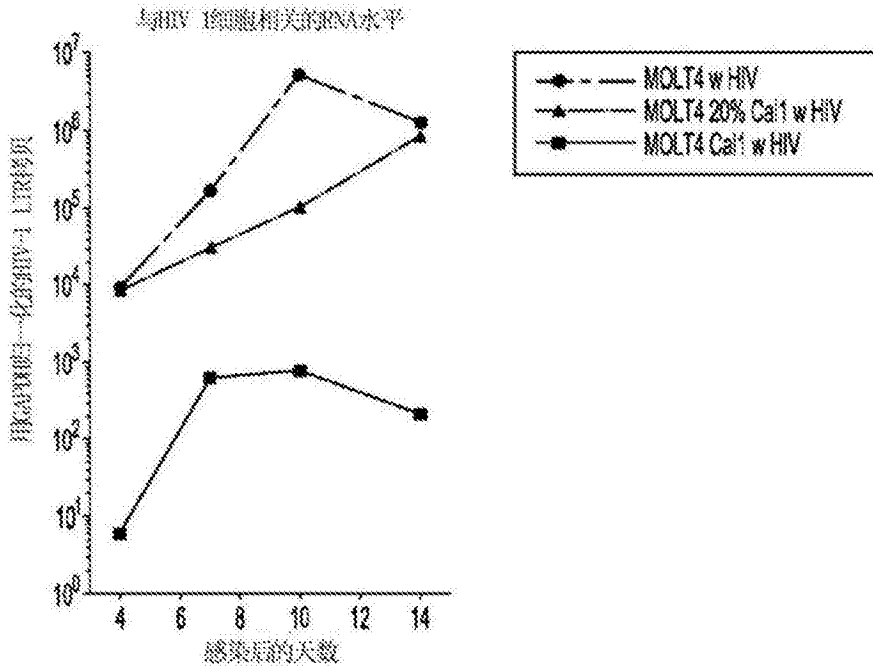


图8B

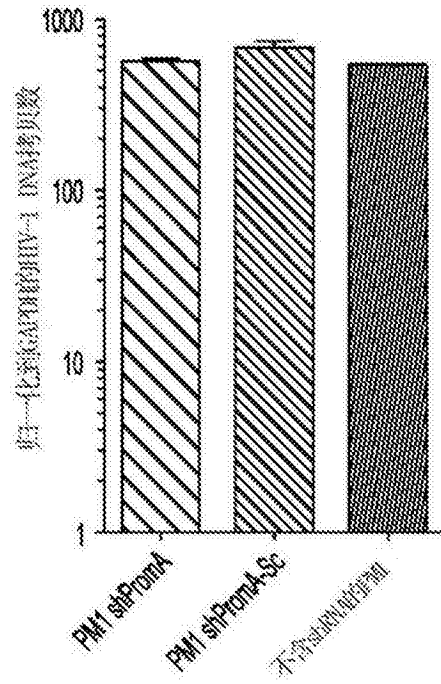


图9A

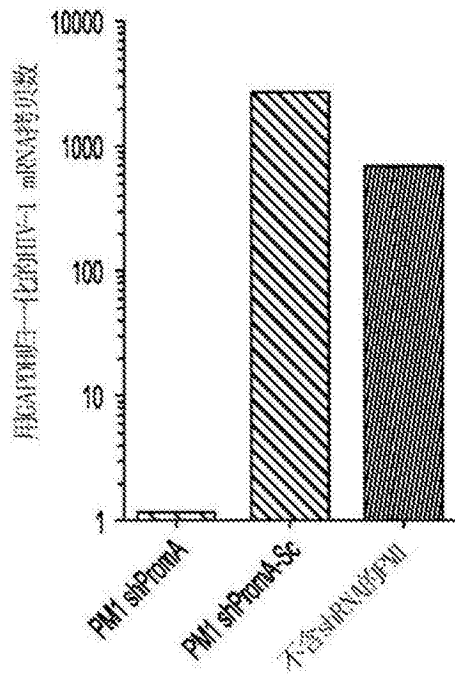


图9B