

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2018-516594  
(P2018-516594A)

(43) 公表日 平成30年6月28日(2018.6.28)

(51) Int.Cl.	F 1	テーマコード (参考)
<b>C 12 Q 1/6888 (2018.01)</b>	C 12 Q 1/6888	Z N A Z 4 B 0 6 3
<b>C 12 Q 1/6823 (2018.01)</b>	C 12 Q 1/6823	Z 4 C 0 8 7
<b>C 12 Q 1/686 (2018.01)</b>	C 12 Q 1/686	Z
<b>C 12 N 15/11 (2006.01)</b>	C 12 N 15/11	
<b>A 61 P 31/18 (2006.01)</b>	A 61 P 31/18	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 73 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2018-512815 (P2018-512815)
(86) (22) 出願日	平成28年5月16日 (2016.5.16)
(85) 翻訳文提出日	平成30年1月5日 (2018.1.5)
(86) 國際出願番号	PCT/US2016/032767
(87) 國際公開番号	W02016/187151
(87) 國際公開日	平成28年11月24日 (2016.11.24)
(31) 優先権主張番号	62/163,327
(32) 優先日	平成27年5月18日 (2015.5.18)
(33) 優先権主張国	米国(US)

(71) 出願人 512010890  
カリミューン、 インコーポレーティッド  
アメリカ合衆国 アリゾナ州 ツーソン  
イースト ブロードウェイ ブルバード  
5151 スイート 1020

(71) 出願人 517402997  
カリミューン オーストラリア ピーティ  
ーワイ リミテッド  
オーストラリア連邦 2010 ニューサ  
ウスウェールズ ダーリンハースト リバ  
プール ストリート 405 ローウィー  
パッカー ビルディング レベル 8

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 HIV-1 とレンチウイルスベクターとを識別する方法

## (57) 【要約】

本開示は、試料中に存在する核酸、たとえばHIVまたはレンチウイルスベクターに由来する核酸を検出および/または定量化するために特に有用である組成物(すなわち增幅プライマーおよびプローブ)、方法およびキットを提供する。

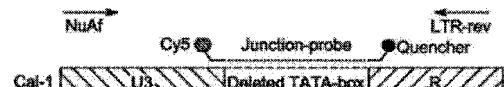


FIG. 2



**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

(a) SEQ ID NO: 14のヌクレオチド配列と少なくとも80%の同一性を有するヌクレオチド配列を含む、レポーター部分にコンジュゲートされたプローブ；(b) SEQ ID NO: 2のヌクレオチド配列と少なくとも80%の同一性を有するヌクレオチド配列を含むフォワードプライマー；および(c) SEQ ID NO: 6のヌクレオチド配列と少なくとも80%の同一性を有するヌクレオチド配列を含むリバースプライマーを含み、該フォワードプライマーおよび該リバースプライマーのそれぞれが、標的配列を増幅するために該標的配列にアニーリングすることができる、組成物。

**【請求項 2】**

レポーター部分が、Tex-615、Tye-563、Tye-665、Joe、Cy3、Max、Rox、Tet、Texas Red-X、Tamara、およびYakima Yellowからなる群より選択される、請求項1記載の組成物。

**【請求項 3】**

(a) SEQ ID NO: 10のヌクレオチド配列と少なくとも80%の同一性を有するヌクレオチド配列を含む、レポーター部分にコンジュゲートされたプローブ；(b) SEQ ID NO: 2のヌクレオチド配列と少なくとも80%の同一性を有するヌクレオチド配列を含むフォワードプライマー；および(c) SEQ ID NO: 6のヌクレオチド配列と少なくとも80%の同一性を有するヌクレオチド配列を含むリバースプライマーを含み、該フォワードプライマーおよび該リバースプライマーのそれぞれが、標的配列を増幅するために該標的配列にアニーリングすることができる、組成物。

**【請求項 4】**

レポーター部分が、Tex-615、Tye-563、Tye-665、Joe、Cy3、Max、Rox、Tet、Texas Red-X、Tamara、およびYakima Yellowからなる群より選択される、請求項3記載の組成物。

**【請求項 5】**

(a) SEQ ID NO: 8のヌクレオチド配列と少なくとも80%の同一性を有するヌクレオチド配列を含む、レポーター部分にコンジュゲートされたプローブ；(b) SEQ ID NO: 4のヌクレオチド配列と少なくとも80%の同一性を有するヌクレオチド配列を含むフォワードプライマー；および(c) SEQ ID NO: 6のヌクレオチド配列と少なくとも80%の同一性を有するヌクレオチド配列を含むリバースプライマーを含み、該フォワードプライマーおよび該リバースプライマーのそれぞれが、標的配列を増幅するために該標的配列にアニーリングすることができる、組成物。

**【請求項 6】**

レポーター部分が、Tex-615、Tye-563、Tye-665、Joe、Cy3、Max、Rox、Tet、Texas Red-X、Tamara、およびYakima Yellowからなる群より選択される、請求項5記載の組成物。

**【請求項 7】**

請求項1記載の組成物および請求項3または請求項5のいずれか1項記載の組成物を含む、試料中のレンチウイルス核酸とHIV核酸とを識別するためのキット。

**【請求項 8】**

第1の標的配列を定量化するための方法であって、該第1の標的配列を含む第1の試料を、請求項1記載の組成物のプローブおよびプライマーと接触させる工程；該第1の標的配列を鑄型として使用してリアルタイムポリメラーゼ連鎖反応を実施する工程；および産生された第1のアンプリコンの量を定量化する工程を含む、方法。

**【請求項 9】**

第2の標的配列を含む第2の試料を、請求項2または請求項3のいずれか1項記載の組成物のプローブおよびプライマーと接触させる工程；および該第2の標的配列を鑄型として使用してリアルタイムポリメラーゼ連鎖反応を実施する工程；および産生された第2のアンプリコンの量を定量化する工程

を含む、該第2の標的配列を定量化する工程をさらに含む、請求項8記載の方法。

**【請求項 10】**

第1および第2の試料が同じ供給源に由来し、かつ第1および第2の標的配列の定量化が1

10

20

30

40

50

つの反応チャンバ中で実施される、請求項9記載の方法。

【請求項 1 1】

第1および第2の試料が同じ供給源に由来し、かつ第1および第2の標的配列の定量化が別々の反応チャンバ中で実施される、請求項9記載の方法。

【請求項 1 2】

第1の標的配列がレンチウイルス核酸配列であり、かつ第2の標的配列がHIV核酸配列である、請求項9記載の方法。

【請求項 1 3】

産生された第1のアンプリコンの量を定量化する工程が、第1のレポーター部分からのシグナルを検出する工程を含み、かつ産生された第2のアンプリコンの量を定量化する工程が、第2のレポーター部分からのシグナルを検出する工程を含み、該第1のレポーター部分と該第2のレポーター部分とが異なる、請求項9記載の方法。

10

【請求項 1 4】

(i) 第1の時点における、産生された第2のアンプリコンの定量化量に対する産生された第1のアンプリコンの定量化量の第1の比率と；(ii) 第2の時点における、産生された第2のアンプリコンの定量化量に対する産生された第1のアンプリコンの定量化量の第2の比率を比較することによってレンチウイルスベクターからの遺伝子導入の効果を評価する工程をさらに含み、HIV核酸に対するレンチウイルス核酸の比率増大が治療効果を示す、請求項13記載の方法。

20

【請求項 1 5】

第1の標的配列および第2の標的配列が、独立してDNAまたはRNAである、請求項8記載の方法。

【請求項 1 6】

試料中のレンチウイルス核酸および／またはHIV核酸を検出する方法であって、

(a)

(i) SEQ ID NO: 2のヌクレオチド配列と少なくとも80%の同一性を有するヌクレオチド配列を有する第1のフォワードプライマー、

SEQ ID NO: 6の配列と少なくとも80%の同一性を有するヌクレオチド配列を有する第1のリバースプライマー、および

SEQ ID NO: 14のヌクレオチド配列と少なくとも80%の同一性を有するヌクレオチド配列を有し、第1のレポーター部分を有する第1のプローブ；

(ii) SEQ ID NO: 2のヌクレオチド配列と少なくとも80%の同一性を有するヌクレオチド配列を有する第2のフォワードプライマー、

SEQ ID NO: 6のヌクレオチド配列と少なくとも80%の同一性を有するヌクレオチド配列を有する第2のリバースプライマー、および

SEQ ID NO: 10のヌクレオチド配列と少なくとも80%の同一性を有するヌクレオチド配列を有し、第2のレポーター部分を有する第2のプローブ

を使用して、該試料中のレンチウイルス核酸鑄型およびHIV核酸鑄型を用いるマルチブレックスリアルタイムPCRを実施する工程であって、該第1のレポーター部分と該第2のレポーター部分とが異なる、工程；

30

(b)

(i) 第1のフォワードおよびリバースプライマー、ならびに(ii) 第2のフォワードおよびリバースプライマーによって産生されたアンプリコンを検出する工程を含み、検出する工程が、該第1および第2のレポーター部分からの第1および第2のシグナルを検出する工程を含む、方法。

40

【請求項 1 7】

試料中のレンチウイルス核酸および／またはHIV核酸を検出する方法であって、

(a)

(i) SEQ ID NO: 2のヌクレオチド配列と少なくとも80%の同一性を有するヌクレオチド配列を有する第1のフォワードプライマー、

50

SEQ ID NO: 6のヌクレオチド配列と少なくとも80%の同一性を有するヌクレオチド配列を有する第1のリバースプライマー、および

SEQ ID NO: 14のヌクレオチド配列と少なくとも80%の同一性を有するヌクレオチド配列を有し、第1のレポーター部分を有する第1のプローブ；

(ii) SEQ ID NO: 4のヌクレオチド配列と少なくとも80%の同一性を有するヌクレオチド配列を有する第2のフォワードプライマー、

SEQ ID NO: 6のヌクレオチド配列と少なくとも80%の同一性を有するヌクレオチド配列を有する第2のリバースプライマー、および

SEQ ID NO: 8のヌクレオチド配列と少なくとも80%の同一性を有するヌクレオチド配列を有し、第2のレポーター部分を有する第2のプローブ

10

を使用して、該試料中のレンチウイルス核酸鑄型およびHIV核酸鑄型を用いるマルチブレックスリアルタイムPCRを実施する工程であって、該第1のレポーター部分と該第2のレポーター部分とが異なる、工程；

(b)

(i) 第1のフォワードおよびリバースプライマー、ならびに(ii) 第2のフォワードおよびリバースプライマーによって産生されたアンプリコンを検出する工程を含み、検出する工程が、該第1および第2のレポーター部分からの第1および第2のシグナルを検出する工程を含む、方法。

【請求項 18】

試料中のレンチウイルス核酸の量を検出する方法であって、

20

(a) 該試料を第1のフォワードプライマーおよび第1のリバースプライマーと接触させる工程；

(b) 該試料を、該レンチウイルス核酸の3'LTR内のジャンクション部位に特異的なジャンクションプローブと接触させる工程であって、該ジャンクションプローブが、該レンチウイルス核酸3'LTRのU3領域内の配列の少なくとも一部分にハイブリダイズすることができる第1の部分および該レンチウイルス核酸3'LTRのR領域内の配列の少なくとも一部分にハイブリダイズすることができる第2の部分を含み、かつ該ジャンクションプローブが第1の検出可能な部分を含む、工程；ならびに

該第1の検出可能な部分からのシグナルを検出する工程

を含む、方法。

30

【請求項 19】

ジャンクションプローブの第1の部分が、SEQ ID NO: 12のヌクレオチド配列と少なくとも80%の同一性を有するヌクレオチド配列にハイブリダイズする、請求項18記載の方法。

【請求項 20】

ジャンクションプローブの第2の部分が、SEQ ID NO: 13のヌクレオチド配列にハイブリダイズする、請求項18記載の方法。

【請求項 21】

ジャンクションプローブが、SEQ ID NO: 14のヌクレオチド配列と少なくとも80%の同一性を有するヌクレオチド配列を含む、請求項18記載の方法。

【請求項 22】

ジャンクションプローブが、SEQ ID NO: 14のヌクレオチド配列と少なくとも90%の同一性を有するヌクレオチド配列を含む、請求項18記載の方法。

40

【請求項 23】

試料中のHIV核酸の量を検出する工程をさらに含む、請求項18記載の方法。

【請求項 24】

試料中のレンチウイルス核酸の量およびHIV核酸の量の検出が同じ反応チューブ中で実施される、請求項23記載の方法。

【請求項 25】

HIV核酸の量の検出が、

試料を、HIV核酸配列の3'LTR内のTATAボックス配列に特異的な第2のプローブと接触させ

50

る工程であって、第2のプローブが第2の検出可能な部分にコンジュゲートされている、工程；および

該第2の検出可能な部分からのシグナルを検出する工程  
を含む、請求項24記載の方法。

【請求項 26】

第2のプローブが、SEQ ID NO: 10のヌクレオチド配列と少なくとも90%の同一性を有するヌクレオチド配列を有する、請求項26記載の方法。

【請求項 27】

第1のフォワードプライマーがNuAfプライマーであり、第1のリバースプライマーがLTR-revプライマーである、請求項26記載の方法。

【請求項 28】

NuAfプライマーがSEQ ID NO: 2の配列を有する、請求項27記載の方法。

【請求項 29】

LTR-revプライマーがSEQ ID NO: 6の配列を有する、請求項27記載の方法。

【請求項 30】

試料中のレンチウイルス核酸の量およびHIV核酸の量の検出が異なる反応チューブ中で実施される、請求項23記載の方法。

【請求項 31】

HIV核酸の量の検出が、試料を、第2のフォワードプライマー、第2のリバースプライマー、および、SEQ ID NO: 8のヌクレオチド配列と少なくとも90%の同一性を有するヌクレオチド配列を有し、第2の検出可能な部分を含む第2のプローブと接触させる工程；ならびに該第2の検出可能な部分からのシグナルを検出する工程を含む、請求項30記載の方法。

【請求項 32】

第2のフォワードプライマーが、SEQ ID NO: 3のヌクレオチド配列にハイブリダイズする、請求項31記載の方法。

【請求項 33】

第2のフォワードプライマーが、SEQ ID NO: 4のヌクレオチド配列と少なくとも80%の同一性を有するヌクレオチド配列を含む、請求項31記載の方法。

【請求項 34】

第2のリバースプライマーがSEQ ID NO: 6の配列を含む、請求項31記載の方法。

【請求項 35】

試料中のレンチウイルス核酸を検出する方法であって、

(a) 該試料を第1のフォワードプライマーおよび第1のリバースプライマーと接触させる工程；

(b) 該試料を、該レンチウイルス核酸の3'LTR内のジャンクション部位に特異的なジャンクションプローブと接触させる工程

を含み、該レンチウイルス核酸の3'LTRがTATAボックス配列を含まず、該ジャンクション部位が、該レンチウイルス核酸3'LTRのU3領域の一部分および該レンチウイルス核酸3'LTRのR領域の一部分に及び、かつ該ジャンクションプローブの少なくとも一部分がSEQ ID NO: 13のヌクレオチド配列にハイブリダイズする、方法。

【請求項 36】

試料を、HIV核酸配列の3'LTR内のTATAボックス配列に特異的な第2のプローブと接触させる工程であって、第2のプローブが第2の検出可能な部分を有し、第1の検出可能な部分と第2の検出可能な部分とが異なる、工程、および、該第2の検出可能な部分からのシグナルを検出する工程をさらに含む、請求項35記載の方法。

【請求項 37】

試料を、第2のフォワードプライマー、第2のリバースプライマー、および、SEQ ID NO: 8のヌクレオチド配列と少なくとも80%の同一性を有するヌクレオチド配列を有する第2のプローブと接触させる工程であって、第2のプローブが第2の検出可能な部分を含み、第1の検出可能な部分と第2の検出可能な部分とが異なる、工程；ならびに該第2の検出可能

10

20

30

40

50

な部分からのシグナルを検出する工程をさらに含む、請求項35記載の方法。

【請求項 38】

試料中のレンチウイルス核酸の量およびHIV核酸の量を定量化する方法であって、該レンチウイルス核酸および該HIV核酸が異なる3'LTRを含み、該方法が、該レンチウイルス核酸および該HIV核酸の両方を、該レンチウイルス核酸の3'LTRおよび該HIV核酸の3'LTRの双方の内部の配列にハイブリダイズするフォワードプライマーならびに該レンチウイルス核酸の3'LTRおよび該HIV核酸の3'LTRの双方の内部の配列にハイブリダイズするリバースプライマーを用いて増幅する工程を含み、該レンチウイルス核酸および該HIV核酸の両方の増幅が1つの反応チューブ中で行われる、該方法。

【請求項 39】

レンチウイルス核酸の3'LTRが、HIV核酸の3'LTRよりも少ない、少なくとも50ヌクレオチドを含む、請求項38記載の方法。

【請求項 40】

レンチウイルス核酸の3'LTRがTATAボックス配列を含まない、請求項39記載の方法。

【請求項 41】

増幅が、第1のサイズを有するレンチウイルス核酸アンプリコンおよび第2のサイズを有するHIV核酸アンプリコンを產生し、該レンチウイルス核酸のアンプリコンが該HIV核酸のアンプリコンよりも小さい、請求項39記載の方法。

【請求項 42】

電気泳動分離を使用してレンチウイルス核酸アンプリコンとHIV核酸アンプリコンとを分離する、請求項41記載の方法。

【請求項 43】

レンチウイルス核酸3'LTRが、SEQ ID NO: 15のヌクレオチド配列を有するU3領域を含む、請求項38記載の方法。

【請求項 44】

HIV核酸3'LTRが、SEQ ID NO: 16のヌクレオチド配列を有するU3領域を含む、請求項38記載の方法。

【請求項 45】

レンチウイルス核酸含有試料から、一対のプライマーである、SEQ ID NO: 2を有するプライマーおよびSEQ ID NO: 6を有するプライマーを用いる増幅によって得られるアンプリコンであって、TATAボックス配列を含まない3'LTRを含む、アンプリコン。

【請求項 46】

SEQ ID NO: 14のヌクレオチド配列と少なくとも90%の同一性を有するヌクレオチド配列を含む、単離された核酸配列。

【請求項 47】

検出可能な部分にコンジュゲートされている、請求項46記載の単離された核酸配列。

【請求項 48】

SEQ ID NO: 15のヌクレオチド配列と少なくとも90%の同一性を有するヌクレオチド配列を含む、単離された核酸配列。

【請求項 49】

SEQ ID NO: 14のヌクレオチド配列と少なくとも70%の同一性を有するヌクレオチド配列を含み、SEQ ID NO: 15のヌクレオチド配列のフラグメントにハイブリダイズすることができる、単離された核酸配列。

【請求項 50】

SEQ ID NO: 12のヌクレオチド配列と少なくとも70%の同一性を有するヌクレオチド配列にハイブリダイズすることができる第1の部分、およびSEQ ID NO: 13のヌクレオチド配列にハイブリダイズすることができる第2の部分を有する、単離された核酸配列。

【請求項 51】

検出可能な部分にコンジュゲートされている、請求項50記載の単離された核酸配列。

【請求項 52】

10

20

30

40

50

SEQ ID NO: 8のヌクレオチド配列と少なくとも90%の同一性を有するヌクレオチド配列を含む、単離された核酸配列。

【請求項 5 3】

検出可能な部分にコンジュゲートされている、請求項52記載の単離された核酸配列。

【請求項 5 4】

SEQ ID NO: 10のヌクレオチド配列と少なくとも90%の同一性を有するヌクレオチド配列を含む、単離された核酸配列。

【請求項 5 5】

検出可能な部分にコンジュゲートされている、請求項54記載の単離された核酸配列。

【請求項 5 6】

HIV陽性患者を治療する方法であって、

(i) 該患者から細胞を得る工程；

(ii) 得られた細胞を、該細胞中へのCal-1の取り込みに好都合な条件下で、Cal-1レンチウイルスベクターで処理する工程；

(iii) 処理された細胞を、遺伝子修飾の存在についてアッセイする工程；

(iv) 該処理された細胞が該遺伝子修飾の存在について陽性とアッセイされる場合、該処理された細胞を該患者に投与する工程

を含む、方法。

【請求項 5 7】

遺伝子修飾の存在についてアッセイする工程が、処理された細胞内のジャンクション部位を検出する工程を含む、請求項56記載の方法。

【請求項 5 8】

ジャンクション部位の検出が、試料を、SEQ ID NO: 14の核酸配列と少なくとも90%の同一性を有する核酸配列を含むジャンクションプローブと接触させる工程を含む、請求項57記載の方法。

【請求項 5 9】

遺伝子修飾の検出がDNAまたはRNAレベルで実施される、請求項56記載の方法。

【請求項 6 0】

患者におけるHIVベースの組み換えベクターの治療効果を判定するための方法であって、

(i) 該患者から細胞を得る工程；

(ii) 得られた細胞を、該得られた細胞中へのCal-1の取り込みに好都合な条件下で、Cal-1レンチウイルスベクターで処理する工程；

(iii) 第1の時点において、得られた細胞中に存在する野生型HIV核酸のレベルをアッセイする工程；

(iv) 第2の時点において、該得られた細胞中に存在する該野生型HIV核酸のレベルをアッセイする工程；

(v) 第1の時点において、該得られた細胞中に存在するCal-1核酸のレベルをアッセイする工程；

(vi) 第2の時点において、該得られた細胞中に存在する該Cal-1核酸のレベルをアッセイする工程であって、該Cal-1核酸および該野生型HIV核酸のレベルのアッセイが、請求項16および17のいずれか1項に記載のように実施される、工程

を含み、第2の時点における該野生型HIV核酸のレベルの低下および該Cal-1核酸のレベルの上昇がCal-1の治療効果を示す、方法。

【請求項 6 1】

工程(iii)～(vi)をさらなる時点において繰り返す、請求項6記載の方法。

【請求項 6 2】

試料中のレンチウイルスRNAの量を検出する方法であって、(a) 該レンチウイルスRNAをcDNAに変換する工程；(b) 該試料を第1のフォワードプライマーおよび第1のリバースプライマーと接触させる工程；(c) 該試料を、レンチウイルス核酸の3'LTR内のジャンク

10

20

30

40

50

ション部位に特異的なジャンクションプローブと接触させる工程であって、該ジャンクションプローブが、レンチウイルス核酸3'LTRのU3領域内の配列の少なくとも一部分にハイブリダイズすることができる第1の部分および該レンチウイルス核酸3'LTRのR領域内の配列の少なくとも一部分にハイブリダイズすることができる第2の部分を含み、かつ該ジャンクションプローブが第1の検出可能な部分を含む、工程；ならびに該第1の検出可能な部分からのシグナルを検出する工程を含む、方法。

【請求項 6 3】

同一物中のHIV核酸の量を検出する工程をさらに含み、該HIV核酸がDNAまたはRNAである、請求項61記載の方法。

【発明の詳細な説明】

10

【技術分野】

【0 0 0 1】

関連出願の相互参照

本出願は、開示内容が参照により全体として本明細書に組み入れられる、2015年5月18日に出願された米国特許仮出願第62/163,327号の出願日の恩典を主張する。

【0 0 0 2】

開示の分野

本開示は概して分子生物学およびウイルス学の分野に関する。特に、本開示は、HIV-1とレンチウイルスベクターとを識別する方法に関する。

【0 0 0 3】

20

産業上の利用可能性の声明

本開示は、遺伝子治療および医療診断の分野に産業上の利用可能性を有する。

【背景技術】

【0 0 0 4】

開示の背景

HIV-1は、全世界で3000万人ほどが感染している後天性免疫不全症候群（AIDS）の原因因子である。HIVは、免疫系を機能不全にし、日和見感染症による死の確率を高める。HIV感染症は、世界保健機関によるパンデミック指定によって証明されるように、重大な全世界的健康問題である。特に途上国におけるHIV感染者の大部分は最終的にAIDSを発症し、それが毎年100万を超える人々の命を奪っている。

30

【0 0 0 5】

HIV-1はレトロウイルス科に属し、ゲノムが2つの一本鎖RNA分子（ssRNA）からなるエンベロープウイルスである。HIV-1の第1の標的はCD4+発現細胞、たとえばCD4+T細胞である。HIV-1ウイルスの糖タンパク質が標的細胞のCD4分子および標的細胞の表面上のケモカイン補助受容体CCR5またはCXCR4と相互作用する。標的細胞への融合および進入ののち、ウイルスゲノムを含むヌクレオカプシドが分離して、ssRNAを含むウイルスの内容物を細胞質中に放出する。HIV-1の逆転写酵素（RT）がssRNAゲノムからウイルス二本鎖DNA（dsDNA）を合成する。二本鎖HIV-1 DNA分子の合成ののち、HIV-1 DNAは宿主ゲノムに組み込まれる。

【0 0 0 6】

40

組み込まれたHIV-1 DNAは、同一の5'および3'末端反復配列（LTR）を両脇に有し、その配列から、HIV-1は組み込まれたHIV-1ゲノムの転写を開始することができる。ウイルスDNAの転写は、活性化T細胞中で上方制御される、NF-κBのような転写因子を必要とする。その結果、ウイルス転写は、T細胞の活性化ののち、たとえば感染中、T細胞中で非常に活動的である。組み込まれたHIV-1ゲノムの転写から生じるウイルスRNAはその後、翻訳され、ウイルス粒子中にパッケージングされたのち、そのウイルス粒子が細胞を出て感染性ウイルスになる。

【0 0 0 7】

HIV-1感染症の治療は多剤併用抗レトロウイルス療法（cART）を含む。ヌクレオシドアナログ逆転写酵素阻害剤、プロテアーゼ阻害剤、非ヌクレオシド逆転写酵素阻害剤、イン

50

テグラーぜおよび融合阻害剤の併用を含むcARTはHIV進行を遅らせる。これが、結果として、この療法が利用可能である世界の地域においてHIV/AIDSからの罹患率および死亡率を劇的に低下させる。しかし、cARTはHIV/AIDSのすべての症候を治癒または完全に消失させるわけではない。また、cART療法は、薬物耐性突然変異によって効果が損なわれることがあり、また、深刻になり得かつ累積するように思われる一定範囲の副作用を有する。さらに、cART療法の中止は、ほぼ決まって、検出可能なウイルス複製の再出現およびAIDSへの進行をもたらし、また、死亡率および深刻な非AIDS事象のすべての原因の発生率の増加と関連することが示されている。これらの理由ならびにcARTの高額なコストおよび厳格な遵守の必要性のため、このような療法は多数の患者にとって相対的に無効である場合もある。

10

#### 【0008】

HIVベースのレンチウイルスベクターが、急速に、研究用および臨床用遺伝子導入用途に選択されるレトロウイルスベクター系となりつつある。静止幹細胞および非分裂最終分化細胞の両方を形質導入するレンチウイルスベクターの高められた能力が、広い範囲の治療用遺伝子送達ベクターならびに有望な研究ツール、たとえば最終分化細胞における多分化能の誘導のためのショートヘアピンRNA (shRNA) 遺伝子ノックダウンライブラリーおよびベクターの開発につながった。初期のガンマレトロウイルス臨床遺伝子治療ベクターは、X連鎖重症複合免疫不全症 (SCID-X1) の患者において免疫機能を回復させたが、このベクターは、その後、がん原遺伝子のトランス活性化を介して増殖性障害を生じさせることができた。より新規なレトロウイルスベクター設計がそのリスクを有意に低減し得、予測される安全性の最終確認のための臨床試験を待っている。現場は依然として流動的であり、臨床試験の結果は予測不可能である。

20

#### 【0009】

抗HIV-1レンチウイルスベースの遺伝子療法（たとえば二剤併用抗HIV-1レンチウイルスベクター (Cal-1、LVsh5/C46)）を使用してHIV-1複製を阻害するとき、Cal-1 DNAを含む細胞および野生型HIV DNAを含む細胞を定量化することが不可欠である。これは、HIV-1感染患者から得られた細胞の場合に特に当てはまる。本発明者らは、DNAレベルでHIV-1とCal-1とを識別する困難さに直面する。現在の市販のPCRベースのアッセイは、HIV-1組み込みDNAとCal-1導入遺伝子組み込みDNAとを識別することができない。pol領域に対するPCRに基づいてHIV-1 DNAを同定するための、プライマーを使用して、レンチウイルスベクター内に存在しないHIV-1配列を検出するアッセイが報告されている (Burke BP, et al: Mol Ther Nucleic Acids 2015, 4:e236 (非特許文献1))。また、HIV-1内に存在しないC46プライマー領域を使用してCal-1導入遺伝子DNAを同定するための可能なアッセイが報告されている (Wolstein O, et al: Mol Ther Methods & Clinical Development 2014, 1, 11 (非特許文献2))。

30

#### 【先行技術文献】

#### 【非特許文献】

#### 【0010】

【非特許文献1】Burke BP, et al: Mol Ther Nucleic Acids 2015, 4:e236

【非特許文献2】Wolstein O, et al: Mol Ther Methods & Clinical Development 2014, 1, 11

40

#### 【発明の概要】

#### 【0011】

#### 開示の概要

本開示の1つの局面は、(a) SEQ ID NO: 14のヌクレオチド配列と少なくとも80%の同一性を有するヌクレオチド配列を含む、レポーター部分にコンジュゲートされたプローブ；(b) SEQ ID NO: 2のヌクレオチド配列と少なくとも90%の同一性を有するヌクレオチド配列を含むフォワードプライマー；および(c) SEQ ID NO: 6のヌクレオチド配列と少なくとも80%の同一性を有するヌクレオチド配列を含むリバースプライマーを含む、組成物であって、フォワードプライマーおよびリバースプライマーのそれぞれが、標的配列を

50

増幅するために標的配列にアニーリングすることができる、組成物である。

【0012】

本開示のもう1つの局面は、(a) SEQ ID NO: 10のヌクレオチド配列と少なくとも80%の同一性を有するヌクレオチド配列を含む、レポーター部分にコンジュゲートされたプローブ；(b) SEQ ID NO: 2のヌクレオチド配列と少なくとも90%の同一性を有するヌクレオチド配列を含むフォワードプライマー；および(c) SEQ ID NO: 6のヌクレオチド配列と少なくとも80%の同一性を有するヌクレオチド配列を含むリバースプライマーを含む、組成物であって、フォワードプライマーおよびリバースプライマーのそれぞれが、標的配列を増幅するために標的配列にアニーリングすることができる、組成物である。

【0013】

本開示のもう1つの局面は、(a) SEQ ID NO: 8のヌクレオチド配列と少なくとも80%の同一性を有するヌクレオチド配列を含む、レポーター部分にコンジュゲートされたプローブ；(b) SEQ ID NO: 4のヌクレオチド配列と少なくとも90%の同一性を有するヌクレオチド配列を含むフォワードプライマー；および(c) SEQ ID NO: 6のヌクレオチド配列と少なくとも80%の同一性を有するヌクレオチド配列を含むリバースプライマーを含む、組成物であって、フォワードプライマーおよびリバースプライマーのそれぞれが、標的配列を増幅するために標的配列にアニーリングすることができる、組成物である。

【0014】

本開示のもう1つの局面は、第1の組成物および第2の組成物を含むキットであって、第1の組成物が、(a) SEQ ID NO: 14のヌクレオチド配列と少なくとも80%の同一性を有するヌクレオチド配列を含む、レポーター部分にコンジュゲートされたプローブ；(b) SEQ ID NO: 2のヌクレオチド配列と少なくとも90%の同一性を有するヌクレオチド配列を含むフォワードプライマー；および(c) SEQ ID NO: 6のヌクレオチド配列と少なくとも80%の同一性を有するヌクレオチド配列を含むリバースプライマーを含み、フォワードプライマーおよびリバースプライマーのそれぞれが、標的配列を増幅するために標的配列にアニーリングすることができ；

第2の組成物が、

(i) (a) SEQ ID NO: 10のヌクレオチド配列と少なくとも80%の同一性を有するヌクレオチド配列を含む、レポーター部分にコンジュゲートされたプローブ；(b) SEQ ID NO: 2のヌクレオチド配列と少なくとも90%の同一性を有するヌクレオチド配列を含むフォワードプライマー；および(c) SEQ ID NO: 6のヌクレオチド配列と少なくとも80%の同一性を有するヌクレオチド配列を含むリバースプライマーを含む組成物であって、フォワードプライマーおよびリバースプライマーのそれぞれが、標的配列を増幅するために標的配列にアニーリングすることができる、組成物；または

(ii) (a) SEQ ID NO: 8のヌクレオチド配列と少なくとも80%の同一性を有するヌクレオチド配列を含む、レポーター部分にコンジュゲートされたプローブ；(b) SEQ ID NO: 4のヌクレオチド配列と少なくとも90%の同一性を有するヌクレオチド配列を含むフォワードプライマー；および(c) SEQ ID NO: 6のヌクレオチド配列と少なくとも80%の同一性を有するヌクレオチド配列を含むリバースプライマーを含む組成物であって、フォワードプライマーおよびリバースプライマーのそれぞれが、標的配列を増幅するために標的配列にアニーリングすることができる、組成物

の1つを含む、キットである。

【0015】

本開示のもう1つの局面は、第1の標的配列を定量化する方法であって、第1の標的配列を含む第1の試料を、(a) SEQ ID NO: 14のヌクレオチド配列と少なくとも80%の同一性を有するヌクレオチド配列を含む、レポーター部分にコンジュゲートされたプローブ；(b) SEQ ID NO: 2のヌクレオチド配列と少なくとも90%の同一性を有するヌクレオチド配列を含むフォワードプライマー；および(c) SEQ ID NO: 6のヌクレオチド配列と少なくとも80%の同一性を有するヌクレオチド配列を含むリバースプライマーを含む組成物と接触させる工程；第1の標的配列を鋳型として使用してリアルタイムポリメラーゼ連鎖反応

10

20

30

40

50

を実施する工程；および產生された第1のアンプリコンの量を定量化する工程を含む、方法である。

【0016】

いくつかの態様において、方法はさらに、第2の試料内の第2の標的配列を定量化する工程を含む。いくつかの態様において、第2の標的配列は、(a) SEQ ID NO: 10のヌクレオチド配列と少なくとも80%の同一性を有するヌクレオチド配列を含む、レポーター部分にコンジュゲートされたプローブ；(b) SEQ ID NO: 2のヌクレオチド配列と少なくとも90%の同一性を有するヌクレオチド配列を含むフォワードプライマー；および(c) SEQ ID NO: 6のヌクレオチド配列と少なくとも80%の同一性を有するヌクレオチド配列を含むリバースプライマーを含む組成物であって、フォワードプライマーおよびリバースプライマーのそれぞれが、標的配列を增幅するために標的配列にアニーリングすることができる、組成物を使用して検出される。他の態様において、第2の標的配列は、(a) SEQ ID NO: 8のヌクレオチド配列と少なくとも80%の同一性を有するヌクレオチド配列を含む、レポーター部分にコンジュゲートされたプローブ；(b) SEQ ID NO: 4のヌクレオチド配列と少なくとも90%の同一性を有するヌクレオチド配列を含むフォワードプライマー；および(c) SEQ ID NO: 6のヌクレオチド配列と少なくとも80%の同一性を有するヌクレオチド配列を含むリバースプライマーを含む組成物であって、フォワードプライマーおよびリバースプライマーのそれぞれが、標的配列を增幅するために標的配列にアニーリングすることができる、組成物を使用して定量化される。

10

【0017】

いくつかの態様において、第1および第2の試料は同じ供給源に由来し、かつ第1および第2の標的配列の定量化は1つの反応チャンバ内で実施される。いくつかの態様において、第1および第2の試料は同じ供給源に由来し、かつ第1および第2の標的配列の定量化は別々の反応チャンバ内で実施される。いくつかの態様において、第1の標的配列はレンチウイルス核酸配列であり、かつ第2の標的配列はHIV核酸配列である。いくつかの態様において、產生された第1のアンプリコンの量を定量化する工程は、第1のレポーター部分からのシグナルを検出する工程を含み；產生された第2のアンプリコンの量を定量化する工程は、第2のレポーター部分からのシグナルを検出する工程を含み、第1のレポーター部分と第2のレポーター部分とは異なる。いくつかの態様において、方法はさらに、(i) 第1の時点における、產生された第2のアンプリコンの定量化量に対する產生された第1のアンプリコンの定量化量の第1の比率を；(ii) 第2の時点における、產生された第2のアンプリコンの定量化量に対する產生された第1のアンプリコンの定量化量の第2の比率と、比較することによってレンチウイルスベクターからの遺伝子導入の効果を評価する工程を含む。いくつかの態様において、HIV核酸に対するレンチウイルス核酸の比率増大が治療効果を示す。

20

30

【0018】

本開示のもう1つの局面は、試料中のレンチウイルス核酸および/またはHIV核酸を検出する方法であって、

(a)

(i) SEQ ID NO: 2のヌクレオチド配列と少なくとも90%の同一性を有するヌクレオチド配列を有する第1のフォワードプライマー、

40

SEQ ID NO: 6のヌクレオチド配列と少なくとも90%の同一性を有するヌクレオチド配列を有する第1のリバースプライマー、および

SEQ ID NO: 14のヌクレオチド配列と少なくとも90%の同一性を有するヌクレオチド配列を有し、第1のレポーター部分を有する第1のプローブ；

(ii) SEQ ID NO: 2のヌクレオチド配列と少なくとも90%の同一性を有するヌクレオチド配列を有する第2のフォワードプライマー、

SEQ ID NO: 6の配列と少なくとも90%の同一性を有するヌクレオチド配列を有する第2のリバースプライマー、および

SEQ ID NO: 10のヌクレオチド配列と少なくとも90%の同一性を有するヌクレオチド配

50

列を有し、第2のレポーター部分を有する第2のプローブ

を使用して、試料中のレンチウイルス核酸鑄型およびHIV核酸鑄型を用いるマルチプレックスリアルタイムPCRを実施する工程であって、第1のレポーター部分と第2のレポーター部分とが異なる、工程；

(b)

(i) 第1のフォワードおよびリバースプライマー、および(ii) 第2のフォワードおよびリバースプライマーによって産生されたアンプリコンを検出する工程を含み、検出する工程が、第1および第2のレポーター部分からの第1および第2のシグナルを検出する工程を含む、方法である。

【0019】

10

本開示のもう1つの局面は、試料中のレンチウイルス核酸および/またはHIV核酸を検出する方法であって、

(a)

(i) SEQ ID NO: 2のヌクレオチド配列と少なくとも90%の同一性を有するヌクレオチド配列を有する第1のフォワードプライマー、

SEQ ID NO: 6のヌクレオチド配列と少なくとも90%の同一性を有するヌクレオチド配列を有する第1のリバースプライマー、および

SEQ ID NO: 14のヌクレオチド配列と少なくとも90%の同一性を有するヌクレオチド配列を有する、第1のレポーター部分を有する第1のプローブ；

(ii) SEQ ID NO: 4のヌクレオチド配列と少なくとも90%の同一性を有するヌクレオチド配列を有する第2のフォワードプライマー、

20

SEQ ID NO: 6のヌクレオチド配列と少なくとも90%の同一性を有するヌクレオチド配列を有する第2のリバースプライマー、および

SEQ ID NO: 8のヌクレオチド配列と少なくとも90%の同一性を有するヌクレオチド配列を有し、第2のレポーター部分を有する第2のプローブ

を使用して、試料中のレンチウイルス核酸鑄型およびHIV核酸鑄型を用いるマルチプレックスリアルタイムPCRを実施する工程であって、第1のレポーター部分と第2のレポーター部分とが異なる、工程；

(b)

(i) 第1のフォワードおよびリバースプライマー、および(ii) 第2のフォワードおよびリバースプライマーによって産生されたアンプリコンを検出する工程

30

を含み、検出する工程が、第1および第2のレポーター部分からの第1および第2のシグナルを検出する工程を含む、方法である。

【0020】

30

もう1つの局面は、試料中のレンチウイルス核酸の量を検出する方法であって、

(a) 試料を第1のフォワードプライマーおよび第1のリバースプライマーと接触させる工程；

(b) 試料を、レンチウイルス核酸の3'LTR内のジャンクション部位に特異的なジャンクションプローブと接触させる工程であって、ジャンクションプローブが、レンチウイルス核酸3'LTRのU3領域内の配列の少なくとも一部分にハイブリダイズすることができる第1の部分およびレンチウイルス核酸3'LTRのR領域内の配列の少なくとも一部分にハイブリダイズすることができる第2の部分を含み、ジャンクションプローブが第1の検出可能な部分を含む、工程；ならびに

40

第1の検出可能な部分からのシグナルを検出する工程

を含む、方法である。いくつかの態様において、ジャンクションプローブの第1の部分は、SEQ ID NO: 12のヌクレオチド配列と少なくとも80%の同一性を有するヌクレオチド配列にハイブリダイズする。いくつかの態様において、ジャンクションプローブの第2の部分はSEQ ID NO: 13のヌクレオチド配列にハイブリダイズする。いくつかの態様において、ジャンクションプローブは、SEQ ID NO: 14のヌクレオチド配列と少なくとも80%の同一性を有するヌクレオチド配列を含む。いくつかの態様において、ジャンクションプローブ

50

プは、SEQ ID NO: 14のヌクレオチド配列と少なくとも90%の同一性を有するヌクレオチド配列を含む。

【0021】

いくつかの態様において、方法はさらに、試料中のHIV核酸の量を検出する工程を含む。いくつかの態様において、試料中のレンチウイルス核酸の量およびHIV核酸の量の検出は同じ反応チューブ中で実施される。いくつかの態様において、HIV核酸の量の検出は、試料を、HIV核酸配列の3'LTR内のTATAボックス配列に特異的な第2のプローブと接触させる工程であって、第2のプローブが第2の検出可能な部分にコンジュゲートされている、工程；および第2の検出可能な部分からのシグナルを検出する工程を含む。いくつかの態様において、第2のプローブは、SEQ ID NO: 10のヌクレオチド配列と少なくとも90%の同一性を有するヌクレオチド配列を有する。いくつかの態様において、第1のフォワードプライマーはNuAfプライマーであり、第1のリバースプライマーはLTR-revプライマーである。いくつかの態様において、NuAfプライマーはSEQ ID NO: 2の配列を有する。いくつかの態様において、LTR-revプライマーはSEQ ID NO: 6の配列を有する。

10

【0022】

いくつかの態様において、試料中のレンチウイルス核酸の量およびHIV核酸の量の検出は異なる反応チューブ中で実施される。いくつかの態様において、HIV核酸の量の検出は、試料を、第2のフォワードプライマー、第2のリバースプライマー、および、SEQ ID NO: 8のヌクレオチド配列と少なくとも90%の同一性を有するヌクレオチド配列を有し、第2の検出可能な部分を含む第2のプローブと接触させる工程；ならびに第2の検出可能な部分からのシグナルを検出する工程を含む。いくつかの態様において、第2のフォワードプライマーはSEQ ID NO: 3のヌクレオチド配列にハイブリダイズする。いくつかの態様において、第2のフォワードプライマーは、SEQ ID NO: 4のヌクレオチド配列と少なくとも80%の同一性を有するヌクレオチド配列を含む。いくつかの態様において、第2のリバースプライマーはSEQ ID NO: 6の配列を含む。

20

【0023】

本開示のもう1つの局面は、試料中のレンチウイルス核酸を検出する方法であって、(a)試料を第1のフォワードプライマーおよび第1のリバースプライマーと接触させる工程；

30

(b)試料を、レンチウイルス核酸の3'LTR内のジャンクション部位に特異的なジャンクションプローブと接触させる工程であって、レンチウイルス核酸の3'LTRがTATAボックス配列を含まず、ジャンクション部位が、レンチウイルス核酸3'LTRのU3領域の一部分およびレンチウイルス核酸3'LTRのR領域の一部分に及び、ジャンクションプローブの少なくとも一部分がSEQ ID NO: 13のヌクレオチド配列にハイブリダイズする、工程を含む、方法である。いくつかの態様において、方法はさらに、試料を、HIV核酸配列の3'LTR内のTATAボックス配列に特異的な第2のプローブと接触させる工程であって、第2のプローブが第2の検出可能な部分を有し、第1の検出可能な部分と第2の検出可能な部分とが異なる、工程、および第2の検出可能な部分からのシグナルを検出する工程を含む。いくつかの態様において、方法はさらに、試料を、第2のフォワードプライマー、第2のリバースプライマー、および、SEQ ID NO: 8のヌクレオチド配列と少なくとも80%の同一性を有するヌクレオチド配列を有し、第2の検出可能な部分を含む第2のプローブと接触させる工程であって、第1の検出可能な部分と第2の検出可能な部分とが異なる、工程；ならびに第2の検出可能な部分からのシグナルを検出する工程を含む。

40

【0024】

本開示のもう1つの局面は、レンチウイルス核酸およびHIV核酸が異なる3'LTRを含む、試料中のレンチウイルス核酸の量およびHIV核酸の量を定量化する方法であって、レンチウイルス核酸およびHIV核酸の両方を、レンチウイルス核酸の3'LTRおよびHIV核酸の3'LTRの双方の内部の配列にハイブリダイズするフォワードプライマーならびにレンチウイルス核酸の3'LTRおよびHIV核酸の3'LTRの双方の内部の配列にハイブリダイズするリバースプライマーによって増幅する工程を含む、レンチウイルス核酸およびHIV核酸の両方の増幅

50

が1つの反応チューブ中で実施される、方法である。いくつかの態様において、レンチウイルス核酸の3'LTRは、HIV核酸の3'LTRよりも少ない、少なくとも50ヌクレオチドを含む。いくつかの態様において、レンチウイルス核酸の3'LTRはTATAボックス配列を含まない。いくつかの態様において、増幅は、第1のサイズを有するレンチウイルス核酸アンプリコンおよび第2のサイズを有するHIV核酸アンプリコンを産生し、レンチウイルス核酸のアンプリコンはHIV核酸のアンプリコンよりも小さい。いくつかの態様において、電気泳動分離を使用してレンチウイルス核酸アンプリコンとHIV核酸アンプリコンとを分離する。いくつかの態様において、レンチウイルス核酸3'LTRは、SEQ ID NO: 15のヌクレオチド配列を有するU3領域を含む。いくつかの態様において、HIV核酸3'LTRは、SEQ ID NO: 16のヌクレオチド配列を有するU3領域を含む。

10

#### 【0025】

本開示のもう1つの局面は、レンチウイルス核酸含有試料から、一対のプライマーである、SEQ ID NO: 2を有するプライマーおよびSEQ ID NO: 6を有するプライマーを用いる増幅によって得られるアンプリコンであって、TATAボックス配列を含まない3'LTRを含むアンプリコンである。

#### 【0026】

本開示のもう1つの局面は、SEQ ID NO: 14のヌクレオチド配列と少なくとも90%の同一性を有するヌクレオチド配列を含む、単離された核酸配列である。

#### 【0027】

本開示のもう1つの局面は、SEQ ID NO: 15のヌクレオチド配列と少なくとも90%の同一性を有するヌクレオチド配列を含む、単離された核酸配列である。

20

#### 【0028】

本開示のもう1つの局面は、SEQ ID NO: 14のヌクレオチド配列と少なくとも70%の同一性を有するヌクレオチド配列を含み、SEQ ID NO: 15のヌクレオチド配列のフラグメントにハイブリダイズすることができる、単離された核酸配列である。

#### 【0029】

本開示のもう1つの局面は、SEQ ID NO: 12のヌクレオチド配列と少なくとも70%の同一性を有するヌクレオチド配列にハイブリダイズすることができる第1の部分、およびSEQ ID NO: 13のヌクレオチド配列にハイブリダイズすることができる第2の部分を有する、単離された核酸配列である。

30

#### 【0030】

本開示のもう1つの局面は、レンチウイルス核酸が、野生型3'LTRと比べたとき、3'LTR中に欠失を有する、試料中のレンチウイルス核酸の量を定量化する方法であって、レンチウイルス核酸を、レンチウイルス核酸の3'LTR中の欠失に特異的なプローブを使用して増幅する工程を含む方法である。いくつかの態様において、レンチウイルス核酸の3'LTR中の欠失に特異的なプローブは、レンチウイルス核酸の3'LTRのU3領域内の配列にハイブリダイズする第1の部分およびレンチウイルス核酸の3'LTRのR領域内の配列にハイブリダイズする第2の部分を含む。いくつかの態様において、レンチウイルス核酸の3'LTRのU3領域内の配列は、(i) SEQ ID NO: 12の配列と少なくとも90%の同一性を有する配列；および(ii) SEQ ID NO: 12からなる群より選択される配列を含む。いくつかの態様において、レンチウイルスベクターの3'LTRのR領域内の配列はSEQ ID NO: 13の配列を含む。いくつかの態様において、レンチウイルス核酸の3'LTR中の欠失に特異的なプローブは、(i) SEQ ID NO: 14の配列と少なくとも90%の同一性を有する配列；および(ii) SEQ ID NO: 14からなる群より選択される配列を含む。

40

#### 【0031】

いくつかの態様において、レンチウイルスベクター核酸を増幅する工程はさらに、レンチウイルスベクター核酸の3'LTR内の配列に特異的なフォワードおよびリバースプライマーの導入を含む。いくつかの態様において、フォワードプライマーはSEQ ID NO: 2の配列を含む。いくつかの態様において、リバースプライマーはSEQ ID NO: 4の配列を含む。いくつかの態様において、方法はさらに、試料中に存在する野生型HIV核酸の量を定量化す

50

る工程を含む。いくつかの態様において、試料中に存在するHIV核酸の量の定量化は、野生型HIV核酸を増幅する工程を含み、野生型HIV核酸の増幅は、レンチウイルス核酸の増幅と同じ反応チューブ中で実施される。いくつかの態様において、HIV核酸の増幅は、野生型HIV核酸3'LTRのU3領域内のTATAボックス配列に特異的なプローブを利用する。いくつかの態様において、HIV核酸の増幅は、レンチウイルスベクター核酸の増幅に使用されるものと同じフォワードおよびリバースプライマーを含む。いくつかの態様において、レンチウイルスベクター核酸の3'LTRに特異的なプローブおよび野生型HIV核酸のU3領域内のTATAボックス配列に特異的なプローブはそれぞれ異なる検出可能な部分にコンジュゲートされている。

【0032】

10

いくつかの態様において、試料中に存在する野生型HIV核酸の増幅は、レンチウイルスベクター核酸の増幅とは異なる反応チューブ中で実施される。いくつかの態様において、野生型HIV核酸の増幅は、野生型HIV核酸の3'LTRのR領域内の配列に特異的なプローブを利用する。いくつかの態様において、HIV核酸の増幅は、レンチウイルスベクター核酸の増幅に使用されるものと同じリバースプライマーを含む。いくつかの態様において、野生型HIV核酸の増幅は、野生型HIV核酸の3'LTRのU3領域内のTATAボックス配列に特異的なフォワードプライマーを含む。いくつかの態様において、レンチウイルスベクター核酸の3'LTRに特異的なプローブおよび野生型HIV核酸のR領域内の配列に特異的なプローブはそれぞれ異なる検出可能な部分にコンジュゲートされている。

【0033】

20

本開示のもう1つの局面は、レンチウイルス核酸が、TATAボックス配列を含まないU3領域を有する3'LTRを含む、試料中に存在するレンチウイルス核酸とHIV核酸とを識別する方法であって、レンチウイルス核酸を、レンチウイルス核酸の3'LTR内の配列に特異的な第1のプローブによって増幅する工程、およびHIV核酸を、HIV核酸の3'LTR内の配列に特異的な第2のプローブによって増幅する工程を含む、方法である。

【図面の簡単な説明】

【0034】

30

【図1A】LVsh5/C46レンチウイルスベクターの略図であり、図中、CCR5 shRNA ( sh5 ) はヒトH1 RNAポリメラーゼIIIプロモーター下にあり；C46はユビキチンCプロモーター ( UbC ) 下にある。LVsh5/C46ベクターの他の成分は、5'および3'修飾HIV-1末端反復配列 ( LTR ) 、中央ポリプリントラクト ( cPPT ) およびウッドチャック肝炎ウイルス転写後調節エレメント ( WPRE ) を含む。特に、本明細書の中でさらに説明するように、LVsh5/C46中、U3領域のTATAボックスが欠失しており、それがそのU3領域を野生型U3領域から識別する。

【図1B-1I】ある特定のレンチウイルスベクター、すなわちCal-1の3'LTRのU3領域と、HIV-1 ( HXB2 ) に見られるような野生型3'LTRのU3領域との間のアライメントを提供する。図1Bは、Cal-1のU3領域中にTATAボックスが存在しないことを示し、それは、Cal-1のU3領域とHXB2のU3領域との間のミスマッチ配列を示す。ミスマッチ配列はドットによって示されている。図1Cもまた、Cal-1の3'LTRのR領域を示し、図中、Cal-1のR領域とHIVのR領域とは同じ配列を有する。図1CはCal-1の「ジャンクション部位」を示し、このジャンクション部位が、野生型U3領域中には存在するであろう配列を埋めている。図1Cはまた、Cal-1のU3領域と、HIVにおけるような野生型U3領域との差異を示す。図1D-1Iはさらに、Cal-1のU3領域とHIVのU3領域との差異を示す。

40

【図2】本明細書に開示されるようなマルチプレックス化「方法1」による、Cal-1のU3領域とHIV-1(HXB2)とのアライメントならびにプライマーおよびプローブの位置を示す。特に、HIV-1中には存在しない、Cal-1コンストラクトのU3およびR領域の固有のジャンクション部位に対して、Cy5標識されたプローブは設計されており；Cal-1中には存在しない、HIV-1中のTATAボックス領域に対して、FAM標識されたプローブは設計されている。

【図3】本明細書に開示されるような2チューブ式「方法2」による、Cal-1のU3領域とHIV-1 ( HXB2 ) とのアライメントならびにプライマーおよびプローブの位置を示す。特に、フォワードプライマー ( NUAf ) およびリバースプライマー ( LTR-rev ) はCal-1を増幅するこ

50

とができ；HIV-1中には存在しない、Cal-1コンストラクトのU3およびR領域の固有のジャンクション部位に対して、Cy5標識されたプローブは設計されている。同様に、フォワードプライマー（TATA）およびLTR-revプライマーはHIV-1だけを増幅することができ；FAM標識されたプローブはHIV配列を増幅することができる。

【図4】本明細書に開示されるようなマルチプレックス化「方法3」による、Cal-1のU3領域とHIV-1（HXB2）とのアライメントならびにプライマーおよびプローブの位置を示す。特に、フォワードプライマー（NUAf）およびリバースプライマー（LTR-rev）はCal-1およびHIV-1の両方を増幅することができる。Cal-1からのPCR増幅バンドはHIV-1からのPCR増幅バンドよりも短い。異なるサイズのアンプリコンの定量化が、反応内でのCal-1およびHIV-1のコピー数に関するデータの生成を可能にする。

【図5】レンチCal-1をMO12.5で形質導入したMOLT-4細胞に基づく初期インビトロ実験の結果を示すグラフを提供する。図5Aは逆転写酵素（RT）アッセイデータを示した。図5Bおよび5Cは、本明細書に記載されるマルチプレックス化「方法1」によるシングルチューブアッセイを使用した、HIV-1 RNAおよびCal-1 RNAコピー数の定量化結果を示す。

【図6】本明細書に記載されるような「方法1」にしたがってシングルチューブアッセイを使用した、HIV-1 DNAおよびCal-1 DNAコピー数の特定を可能にする実験の結果を示すグラフを提供する。

【図7】本明細書に記載されるような「方法3」にしたがってシングルチューブアッセイを使用した、Cal-1およびHIV-1からのアンプリコンのサイズ比較を示す。

【図8】本明細書に記載されるような「方法2」にしたがって2つの別々のチューブアッセイを使用した、HIV-1 DNAおよびCal-1 DNAコピー数の特定を可能にする実験の結果を示すグラフを提供する。

【図9】本明細書に記載されるような方法2にしたがって2つの別々のチューブアッセイを使用した、HIV-1 DNAコピー数の特定を可能にする実験の結果を示すグラフを提供する。

【図10A】レンチccr5およびCal-1（ccr5およびC46）を形質導入したMOLT-4細胞に基づく第2のインビトロ実験のフロー解析を提供する。MOLT4細胞にレンチsh5およびレンチCal-1をMO12.5で形質導入した。形質導入は、48時間のインキュベーション期間のうち、2F5染色、次いでフローサイトメトリー分析を利用して判定した。Lenti-sh5を形質導入したMOLT-4細胞はCCR5発現の75%の減少を示した。Lenti-Cal-1はCCR5の60%ノックダウンを示した。レンチCal-1の形質導入から72時間後、細胞の約89%がC46を発現し、形質導入したMOLT-4細胞のCCR5発現は60%減少した。

【図10B】HIV-1感染後、ccr5を有するMOLT4およびCal-1を有するMOLT4の逆転写酵素アッセイを提供する。形質導入から48時間後、MOLT-4細胞にBaLをMO10.2で形質導入した。形質導入から7日後、培養上清中の逆転写酵素活性を試験した。CCR5とC46融合阻害剤（Cal-1）との組み合わせは、レンチsh5形質導入MOLT4細胞および非形質導入MOLT4細胞の逆転写酵素活性と比べ、有意に抑えられた逆転写酵素活性を示した。

【図10C】3つの条件：（a）Cal-1でMOLT4を形質導入した場合；（b）80%非形質導入MOLT4と20%Cal-1形質導入MOLT4とを混合した場合；および（c）モック対照の、逆転写酵素アッセイの時間経過データを提供する。図は、14日目における20%Cal-1形質導入MOLT4細胞と80%非形質導入MOLT4細胞との混合培養物および非形質導入MOLT4細胞（モック対照）と比べ、14日目におけるCal-1形質導入MOLT4細胞において、逆転写酵素活性の対数値で2を超える減少が認められたことを示す。

【図10D】これら3つのインビトロ実験セットの逆転写酵素リアルタイムPCR分析の時間経過データを提供する。このTaqManベースの逆転写酵素リアルタイムPCRアッセイによって以前のRTデータを確認した。図は、20%Cal-1形質導入MOLT4細胞と80%非形質導入MOLT4細胞との混合培養物および非形質導入MOLT4細胞（モック対照）からのデータと比べ、14日目におけるCal-1形質導入MOLT4細胞の培養上清から抽出されたHIV-1 RNAにおいて対数値で2を超える減少が認められたことを示す。

【図11A】本明細書における方法2にしたがって2つの別々のチューブアッセイを使用した、本開示の態様によるCal-1検出の結果を示す。本明細書に開示されるアッセイ法に基

づくTaqManベースのDNA PCR法によってCal-1組み込みDNAを増幅した。3セットのMOLT4ベースの感染実験から抽出されたDNAを用いてリアルタイムDNA PCRを実施した。データは、4日目から14日目までの実験を通して、組み込まれたCal-1 DNAレベル（アクチンによって正規化）の一貫した存在がCal-1形質導入MOLT4細胞中に検出されたことを示す。MOLT4細胞（モック対照）中にCal-1 DNAは検出されなかった。4日目および7日目に、20%Cal-1形質導入MOLT4細胞と80%非形質導入MOLT4細胞との混合培養物中のCal-1 DNAの組み込みレベルの有意な低下が明らかに分かった。10日目および14日目までに、これらのレベルは検出不可能なレベルまでさらに低下した。1000コピーのアクチンDNAによってCal-1コピー数を正規化した。

【図11B】本明細書における方法2にしたがって2つの別々のチューブアッセイを使用した本開示の態様によるHIV-1検出の結果を示す。HIV-1感染後4日目から14日目まで、非形質導入MOLT4細胞と比べ、Cal-1形質導入MOLT4細胞において、HIV-1 DNAの組み込みレベルにおける対数値で3を超える減少が認められた。このデータは、Cal-1レンチウイルスベクターの形質導入のうち、HIV-1感染からのMOLT4細胞の保護を確認する。4日目および7日目と比べ、10日目および14日目における、20%Cal-1形質導入MOLT4細胞と80%非形質導入MOLT4細胞との混合培養物中のHIV-1 DNAの高められたレベル。10日目および14日目の、20%Cal-1形質導入MOLT4細胞と80%非形質導入MOLT4細胞との混合培養物中のCal-1 DNAデータは、これらの時点における組み込みCal-1 DNAの消失を示唆した。したがって、10日目および14日目に、混合培養物中のHIV-1 DNAレベルの上昇が認められた。これらのデータもまた、HIV-1感染を防御するCal-1導入遺伝子の機能を示唆している。1000コピーのアクチンDNAによってHIV-1コピー数を正規化した。

【図12A】本明細書における方法2による3'LTRアッセイに基づく、MOLT-4細胞中のHIV-1 RNAの細胞内分析を示す。HIV-1感染後4日目から14日目まで、非形質導入MOLT4細胞と比べ、Cal-1形質導入MOLT4細胞中のHIV-1ウイルスRNAの組み込みレベルの対数値で3を超える減少が認められた。

【図12B】スプライシングTatアッセイに基づく、MOLT-4細胞中のHIV-1 RNAの細胞内分析を示す。同様なレベルの大きな低下は、スプライシングTatアッセイに基づくCal-1形質導入MOLT4細胞中のRNAについても認められた。スプライシングTat mRNAによって產生されたTATタンパク質は、スプライシングされていない多量のHIV-1 mRNAを駆動することができる。スプライシングTat mRNAの検出は初期HIV-1転写物の決定的なマーカーである。1,000,000コピーのGAPDH mRNAによってHIV-1 RNAコピー数を正規化した。図12Aおよび12Bのデータは、HIV-1細胞内mRNAレベルの大きな低下が認められたことを示し、それは、Cal-1形質導入MOLT4細胞中の組み込みDNAレベルに認められた大きな低下によって裏付けられている（図11Aおよび11Bを参照）。

【図13A】健康なドナーからのPBMCに基づく逆転写酵素アッセイデータを示す。健康なドナーからのPBMCに基づくHIV-1感染実験を実施した。上記MOLT4ベースの実験と同じやり方でレンチCal-1形質導入を実施した。HIV-1感染後4日目および7日目に、非形質導入PBMCと比べ、Cal-1形質導入PBMCにおいて逆転写酵素活性のレベルが1/5未満に低下した。

【図13B】方法2による培養上清中のRNAに対する逆転写酵素リアルタイムPCR分析を示す。培養上清から抽出されたRNAを使用するTaqManベースの逆転写酵素リアルタイムPCRアッセイによって図13Aの逆転写酵素データを確認した。7日目および10日目に、非形質導入PBMC（モック対照）と比べ、Cal-1形質導入PBMCの培養上清からのHIV-1 RNAにおいて1/5に減少した。

【図14A】方法2にしたがって2つの別々のチューブアッセイを使用した、PBMC中のCal-1 DNA検出の結果を示す。本明細書に記載されるTaqManベースのDNA PCR法によってCal-1組み込みDNAを増幅した。2セットのPBMC感染実験からDNAを抽出した。データは、4日目から10日目まで、Cal-1形質導入PBMC中の組み込みCal-1 DNAレベル（アクチンによって正規化）の一貫した存在を示す。非形質導入PBMC（モック対照）中にCal-1 DNAは検出されなかった。1000コピーのアクチンDNAによってCal-1コピー数を正規化した。

【図14B】PBMC中のHIV-1 DNA検出を示す。方法2にしたがって2つの別々のチューブア

10

20

30

40

50

ッセイを使用するTaqManベースのDNA PCR法により、HIV-1組み込みDNAを増幅した。4日目に、非形質導入PBMCと比べ、Cal-1形質導入PBMC中でHIV-1 DNAの組み込みレベルが1/5に低下した。データは、Cal-1レンチウイルスベクターを形質導入したのちPBMCにおけるHIV-1感染からの防御を確認する。1000コピーのアクチンDNAによってHIV-1コピー数を正規化した。PBMCはCal-1を形質導入することが困難であるが、データはHIV-1からのCal-1による防御を肯定的に裏付けている。

【図14C】方法2による3'LTRアッセイに基づくPBMC中のHIV-1 RNAの細胞内分析の結果を示す。本明細書に記載されるTaqManベースの一工程逆転写酵素リアルタイムPCR法によってHIV-1細胞内mRNAを増幅した。4日目に、非形質導入PBMCと比べ、Cal-1形質導入PBMC中のHIV-1ウイルスRNAの組み込みレベルが1/4倍未満に低下した。1,000,000コピーのGAPDH mRNAによってHIV-1 RNAコピー数を正規化した。 10

【図14D】スプライシングTatアッセイに基づくPBMC中のHIV-1 RNAの細胞内分析の結果を示す。スプライシングTatアッセイに基づくCal-1形質導入PBMCにおいて同様なレベルの大きな低下が認められた。図14Aおよび14Bのデータは、Cal-1形質導入PBMC中の組み込みHIV-1 DNAレベルの低下の影響を確認する。したがって、Cal-1形質導入PBMCにおいてHIV-1細胞内mRNAレベルの実質的な低下が認められた(図14Cおよび図D)。1,000,000コピーのGAPDH mRNAによってHIV-1 RNAコピー数を正規化した。

【図15】96ウェルプレートの異なるウェル中に提供された異なる試薬の例を示す。

【発明を実施するための形態】

【0035】

詳細な説明

概して、本開示は、試料中に存在する核酸、たとえばHIVまたはレンチウイルスベクターに由来する核酸を検出および/または定量化するのに特に有用である組成物(すなわち増幅プライマーおよびプローブ)、方法およびキットを提供する。

【0036】

定義

本明細書の中で使用される単数形冠詞「1つの」、「ある」、および「その」は、文脈が明らかに別段指示しない限り、複数の指示対象を含む。同様に、語「または」は、文脈が明らかに別段指示しない限り、「および」を含むことを意図する。

【0037】

本明細書の中で使用される「アンプリコン」とは、核酸増幅技術によって產生された任意の核酸分子と定義される。特に、アンプリコンは、プライマーと接触するとそのプライマーとハイブリダイズする配列であって、かつ分子全体であることもできるし、その一部分であることもできる配列を含む。

【0038】

標的核酸配列「増幅」とは、標的配列がコピーされて、さらなる増幅サイクルのための鑄型として働くアンプリコンを產生する、インビトロ標的増幅技術をいう。

【0039】

本明細書の中で使用される「Cal-1」とは、ショートヘアピンRNA CCR5およびC46融合阻害剤を含むレンチウイルスベクターをいう。Cal-1に関するさらなる詳細は、開示内容が参照により全体として本明細書に組み入れられる、米国特許公開公報第US2012/0201794号として公開された同時係属出願に記載されている。

【0040】

用語「含み(comprising)」、「含み(including)」、「有し」などは互換可能に使用され、同じ意味を有する。同様に、「含む(comprise)」、「含む(include)」、「有する」なども互換可能に使用され、同じ意味を有する。具体的に、各用語は、一般的な米国特許法の「comprising」の定義と合致するものと定義され、したがって、「少なくとも以下」を意味する開放型の用語であると解釈され、また、さらなる特徴、限定、局面などを除外しないものと解釈される。したがって、たとえば、「部品a、bおよびcを有する装置」は、その装置が少なくとも部品a、bおよびcを含むことを意味する。同様に、語句「工程a

10

20

30

40

50

、bおよびcを含む方法」は、その方法が少なくとも工程a、bおよびcを含むことを意味する。そのうえ、工程およびプロセスは本明細書の中で特定の順序で概説され得るが、当業者は、工程およびプロセスの順序が異なり得ることを理解するであろう。

【0041】

本明細書の中で使用される用語「ヒト免疫不全症ウイルス」(HIV)とは、実験室株、野生型株、突然変異株および少なくとも1つのHIVウイルスを含む任意の生物学的試料、たとえば臨床HIV単離物を含む任意のHIVをいう。本方法と適合するHIV株は、哺乳動物、特にヒトに感染することができる任意のそのような株である。例はHIV-1、HIV-2およびSIVである。

【0042】

本明細書の中で使用される用語「レンチウイルスベクター」は、遺伝子物質を形質導入によって細胞の中に移入するために使用される、レンチウイルス由来の任意の形態の核酸を指すために使用される。この用語は、レンチウイルスベクター核酸、たとえばDNAおよびRNA、これらの核酸の封入形態およびウイルスベクター核酸がパッケージングされているウイルス粒子を含む。

【0043】

本明細書の中で使用される用語「末端反復配列」(LTR)は、レトロウイルスDNAの端部に位置する塩基対のドメインを指して使用される。これらのLTRは数百塩基対の長さであり得る。LTRは、多くの場合、大部分の真核生物遺伝子の発現に不可欠な機能(たとえば、促進、開始および転写物のポリアデニル化)を提供する。概して、LTRは、遺伝子発現のためのエンハンサーおよびプロモーター領域(U3)ならびにRNA開始部位および非翻訳RNA配列(R/U5)、たとえばゲノム反復およびポリアデニル化部位を含む。

【0044】

本明細書の中で使用される用語「プライマー」とは、(i)増幅条件下、増幅されるDNAまたはRNA配列の適当な部分にアニーリングし、(ii)ポリメラーゼ媒介合成を開始し、そのポリメラーゼ媒介合成によって自らが物理的に伸長する、DNAまたはDNA含有核酸分子の短いセグメントをいう。

【0045】

本明細書の中で使用される用語「プローブ」とは、関心対象となる別のオリゴヌクレオチドにハイブリダイズすることができる、精製された制限消化物中のような天然起源のものか、合成されたものかを問わないオリゴヌクレオチド(すなわち、ヌクレオチドの配列)をいう。プローブは、特定の遺伝子配列の検出、同定および単離に有用である。本開示に使用される任意のプローブは、任意の検出系、たとえば非限定的に酵素系(たとえばELISAおよび酵素ベースの組織化学的アッセイ)、蛍光系、放射性系、比色系および発光系において検出可能であるように「レポーター分子」または「検出可能な部分」によって標識されると考えられる。

【0046】

本明細書の中で使用される用語「TAR」とは、LTRのR領域に位置する「トランス活性化応答」遺伝子要素をいう。この要素は、ウイルストラנס活性化因子tatに物理的に結合することにより、tatの作用を媒介する。

【0047】

本明細書の中で使用される語句「標的配列」または「標的核酸」とは、それぞれ、増幅、検出または他のやり方で分析される核酸の領域をいう。

【0048】

本明細書の中で使用される「Tat」とは、伸長因子として機能する、ウイルスコード化されたトランス活性化タンパク質をいう。Tatは、HIV遺伝子発現を高めるための重要なウイルス要素として、ウイルス複製には不可欠である。

【0049】

本明細書の中で使用される用語「TATAボックス」は、真核生物構造遺伝子の開始点から約19~27塩基対上流に位置する、RNAポリメラーゼが結合するDNAのセグメントを参照して

10

20

30

40

50

使用される。TATAボックスは約7塩基対の長さであり、多くの場合、「TATAAAA」の配列を含む。TATAボックスはまた、「ホグネスボックス」と呼ばれることもある。

#### 【0050】

本明細書の中で使用される用語「形質導入する」または「形質導入」とは、ウイルスまたはレトロウイルスベクターを使用する、トランスフェクションではなく感染による遺伝子の送達をいう。たとえば、レトロウイルスベクター（細胞への核酸の導入のためにベクターとして使用される修飾されたレトロウイルス）によって運ばれる抗HIV遺伝子は、感染およびプロウイルス組み込みによって細胞に形質導入されることができる。したがって、「形質導入遺伝子」とは、レンチウイルスまたはベクター感染およびプロウイルス組み込みによって細胞に導入された遺伝子である。ウイルスベクター（たとえば「形質導入ベクター」）は、遺伝子を「標的細胞」または宿主細胞に形質導入する。

10

#### 【0051】

本明細書の中で使用される用語「導入遺伝子」とは、レンチウイルスベクターによって形質導入される細胞中に通常は存在しない、レンチウイルスベクター内の核酸配列である。レンチウイルスベクターは、この配列を形質導入細胞に導入するように働く。

#### 【0052】

本明細書の中で使用される用語「ベクター」は、核酸（たとえばDNA）セグメントを1つの細胞から別の細胞に移入する核酸分子を参照して使用される。

#### 【0053】

本明細書の中で使用される用語「野生型」とは、集団中でもっとも頻繁に見られる遺伝子または核酸配列をいい、したがって、任意に設計された、遺伝子または核酸配列の「通常」または「野生型」形態である。

20

#### 【0054】

#### レンチウイルスベクター

いくつかの態様において、レンチウイルスベクターは、不活性化または自己不活性化3'LTRを含む。「自己不活性化3'LTR」とは、LTR配列が下流側遺伝子の発現を誘導することを防ぐ突然変異、置換または欠失を含む3'LTRである。3'LTRからのU3領域のコピーが、組み込まれたプロウイルス中でLTRの產生のための鑄型として働くと考えられる。したがって、不活性化欠失または突然変異を有する3'LTRがプロウイルスの5'LTRとして組み込むとき、5'LTRからの転写は不可能である。これが、ウイルスエンハンサー／プロモーターと任意の内部エンハンサー／プロモーターとの競合を排除する。自己不活性化3'LTRは、たとえば、Zufferey et al., J. Virol., Vol. 72:9873-9880, 1998; Miyoshi et al., J. Virol., Vol. 72:8150-8157, 1998; およびIwakuma et al., Virology, Vol. 261:120-132, 1999に記載されている。3'LTRは、当技術分野において公知の任意の方法によって自己不活性化され得る。1つの態様において、3'LTRのU3要素または領域は、そのエンハンサー配列、好ましくはTATAボックス、Sp1およびNF-kappa B部位の欠失を含む。自己不活性化3'LTRの結果として、宿主細胞ゲノムに組み込まれるプロウイルスは不活性化5'LTRを含む。本開示のウイルス発現ベクターは、好ましくは、產生細胞におけるベクター產生を阻害しない。

30

#### 【0055】

概して、本開示の自己不活性化組み換えレンチウイルスベクター(SIN)は、U3領域内の配列の欠失のおかげで実質的に転写的に不活性化された3'LTRを含む。いくつかの態様において、レンチウイルスベクターは、TATAボックス配列の除去を含む、3'LTRのU3領域中の欠失を含む（たとえば、SEQ ID NO: 11の配列がレンチウイルスベクターの3'LTRのU3領域からなくなっている）。HIVベースのレンチウイルスベクターの場合、そのようなベクターは、ベクター力価を有意に低下することなく、LTR TATAボックスの除去を含む、有意なU3欠失を許容する。したがって、いくつかの態様において、レンチウイルスベクターは、野生型U3 3'LTR領域と比べ、3'LTRのU3領域からの約100個～約160個のヌクレオチドの除去を含む。他の態様において、レンチウイルスベクターは、野生型U3 3'LTR領域と比べ、3'LTRのU3領域からの約120個～約140個のヌクレオチドの除去を含む。いくつかの態様

40

50

において、レンチウイルスベクターは、野生型U3 3'LTR領域と比べ、3'LTRのU3領域からの約132ヌクレオチドの除去を含む。

【0056】

実例として、SEQ ID NO: 16は、野生型U3 3'LTR領域（本明細書の中では「野生型U3領域」または「野生型HIV」とも呼ばれる）を提供し；一方で、SEQ ID NO. 15は、レンチウイルスベクター中に見られるような修飾U3領域を提供する。SEQ ID NO: 15とSEQ ID NO: 16とを比較すると、当業者は、TATAボックスの除去を含め、約132ヌクレオチドがレンチウイルスベクター3'LTRのU3領域中で欠失していることを理解するであろう。いくつかの態様において、3'LTRのR領域は変化していない、すなわち野生型R領域である（たとえばSEQ ID NO: 17を参照）。

10

【0057】

TATAボックスを欠くU3領域を有するレンチウイルスベクターの一例が、図1Aに示された「Cal-1」（LVsh5/C46）レンチウイルスベクターである。図1Bおよび1D～1Iに示すように、Cal-1は、ヌクレオチド423から556に及ぶ3'LTRのU3領域内に欠失を含み、そのような欠失はTATAボックス（すなわち、SEQ ID NO: 11の配列）中に延びている。Cal-1と比べ、HIVの3'LTRの野生型U3領域は無傷のTATAボックスを含む（たとえば、図1Bおよび1D～1Iを参照）。事実、野生型HIVのU3領域は、細胞活性化に応答して、感染細胞中のHIVゲノムの基礎的および誘導的発現を変調するエンハンサーおよびプロモーター要素を含む。当然、当業者は、Cal-1は1つのレンチウイルスベクターを例示したものに過ぎないこと、他のベクターは異なる3'LTR領域を有し得、たとえば野生型U3領域と比べて異なる配列を有する、または異なるヌクレオチド欠失を含むU3領域を含み、これらの異なるレンチウイルスベクターが本明細書中に開示される方法にしたがって検出され得ることを理解するであろう。

20

【0058】

方法の概説

本明細書に開示されるアッセイ法は、レンチウイルスベクターおよび野生型HIVの3'LTRのU3領域の差異を利用し、したがって、本明細書に記載されるように、特異的に設計されたプライマーおよび／またはプローブが、レンチウイルスベクターにはハイブリダイズするが、野生型HIVにはハイブリダイズしない、およびその反対であることを可能にする。

30

【0059】

プライマー

当業者は、レンチウイルスベクターおよびHIVの3'LTRの構造に基づいて適当なハイブリダイゼーション特性を有するプライマー配列を設計することができることを理解するであろう。たとえば、当業者は、レンチウイルスベクターの3'LTRの配列に基づいて適当なハイブリダイゼーション特性を有するプライマーを設計し得ることを理解するであろう。本明細書に開示されるプライマーは、特に、本明細書に記載された標的特異的プライマーからいくつかのアンプリコン種を産生することができるマルチプレックス増幅反応の成分として企図される。

【0060】

いくつかの態様において、レンチウイルスベクターおよび／またはHIVの3'LTRのU3領域内の配列にハイブリダイズするようなフォワードプライマーが選択される。いくつかの態様において、本明細書の中で以下さらに詳細に説明されるように、レンチウイルスベクターおよびHIVの両方の増幅に同じフォワードプライマーが使用される（図2および4を参照）。他の態様において、レンチウイルスベクターおよびHIVを増幅するために異なるフォワードプライマーが使用される（図3を参照）。

40

【0061】

いくつかの態様において、3'LTRのU3領域内の、SEQ ID NO: 1の配列と少なくとも85%の同一性を有する配列にハイブリダイズするようなフォワードプライマーが選択される。他の態様において、3'LTRのU3領域内の、SEQ ID NO: 1の配列と少なくとも90%の同一性を有する配列にハイブリダイズするようなフォワードプライマーが選択される。さらに他の態様において、3'LTRのU3領域内の、SEQ ID NO: 1の配列と少なくとも95%の同一性を

50

有する配列にハイブリダイズするようなフォワードプライマーが選択される。

【0062】

いくつかの態様において、3'LTRのU3領域内の、SEQ ID NO: 3の配列と少なくとも85%の同一性を有する配列にハイブリダイズするようなフォワードプライマーが選択される。他の態様において、3'LTRのU3領域内の、SEQ ID NO: 3の配列と少なくとも90%の同一性を有する配列にハイブリダイズするようなフォワードプライマーが選択される。さらに他の態様において、3'LTRのU3領域内の、SEQ ID NO: 3の配列と少なくとも95%の同一性を有する配列にハイブリダイズするようなフォワードプライマーが選択される。

【0063】

本明細書に記載されるアッセイでの使用に適した1つのフォワードプライマーがNuAfプライマーである。当業者は、レンチウイルスベクターおよびHIVのU3配列に依存して、NuAfプライマーがレンチウイルスベクターおよびHIVの両方にハイブリダイズすることができることを理解するであろう。いくつかの態様において、NuAfプライマーは、SEQ ID NO: 2の配列またはSEQ ID NO: 2の配列と少なくとも90%の同一性を有する配列を含む（図2および4を参照）。

【0064】

本明細書に記載されるアッセイでの使用に適したもう1つのフォワードプライマーがTATAプライマーである。TATAプライマーは、HIVにはハイブリダイズすることができるが、3'LTRのU3領域中のTATAボックス配列がないかまたは欠失しているレンチウイルスベクターにはハイブリダイズすることができない。TATAプライマーは、SEQ ID NO: 4の配列またはSEQ ID NO: 4の配列と少なくとも90%の同一性を有する配列を含む（図3を参照）。

【0065】

いくつかの態様において、3'LTRのR領域内の配列にハイブリダイズするようなリバースプライマーが選択される。他の態様において、3'LTRのR領域の5'末端の配列にハイブリダイズするようなリバースプライマーが選択される。本明細書の中でさらに説明されるように、いくつかの態様において、レンチウイルスベクターおよび野生型HIVの両方の増幅に同じリバースプライマーが使用される。すなわち、リバースプライマーは、レンチウイルスベクターおよび野生型HIVの両方のR領域内の共通の配列に対して設計されている。

【0066】

いくつかの態様において、3'LTRのR領域内の、SEQ ID NO: 5の配列と少なくとも85%の同一性を有する配列にハイブリダイズするようなリバースプライマーが選択される。他の態様において、3'LTRのR領域内の、SEQ ID NO: 5の配列と少なくとも90%の同一性を有する配列にハイブリダイズするようなリバースプライマーが選択される。さらに他の態様において、3'LTRのR領域内の、SEQ ID NO: 5の配列と少なくとも95%の同一性を有する配列にハイブリダイズするようなリバースプライマーが選択される。

【0067】

開示されるアッセイでの使用に適した1つのリバースプライマーがLTR-revプライマーである。LTR-revプライマーはSEQ ID NO: 6の配列を含む。LTR-revプライマーは、レンチウイルスベクターおよびHIVの両方にハイブリダイズすることができる。

【0068】

プローブ

概して、本明細書に開示される方法に利用されるプローブは、「FRETプローブ」（Forssterまたは蛍光共鳴エネルギー移動）と呼ばれるプローブ、すなわち蛍光レポーター・クエンチャーペアを含むプローブのクラスに属する。いくつかの態様において、本明細書に記載される方法に利用されるプローブはTAQMAN（登録商標）プローブである。TAQMAN（登録商標）プローブ（Heid et al., 1996）は、Taqポリメラーゼの蛍光を発生させる5'エキソヌクレアーゼ活性を使用して、核酸試料中の標的配列の量を計測する。TAQMAN（登録商標）プローブは、通常は5'塩基またはその近くに蛍光色素を含み、かつ一般に3'塩基またはその近くにクエンチング部分を含むオリゴヌクレオチドである。クエンチャーペア部分は、TAMRAのような色素であってもよいし、または4-（4-ジメチルアミノフェニルアゾ）安息香

10

20

30

40

50

酸 (DABCYL) のような非蛍光分子であってもよい。照射を受けると、励起した蛍光色素は、蛍光を発するのではなく、エネルギーを近くのクエンチング色素分子に移動させる（上記FRET）。したがって、プローブが無傷であるとき、レポーターとクエンチャーレとの近接が任意の蛍光の放出を防ぐ。TAQMAN（登録商標）プローブは、PCR産物の内部領域にアニーリングするように設計されている。ポリメラーゼが、TAQMAN（登録商標）プローブが結合している鋳型を複製するとき、その5'エキソヌクレアーゼ活性がプローブを切断する。これがクエンチャーレの活性を終了させ（FRETなし）、レポーター色素が蛍光を発し始め、その蛍光が、プローブ切断の速度に比例して各サイクルで増大する。PCR産物の蓄積は、レポーター色素の蛍光の増加をモニターすることによって検出される（このプロセスにおいては、プローブだけがFRET標識され、プライマーは標識されない）。TAQMAN（登録商標）アッセイは、普遍的な熱サイクルパラメータおよびPCR反応条件を使用する。プローブが標的にハイブリダイズする場合のみ切断が起こるため、検出された蛍光は特異的な增幅に由来する。ハイブリダイゼーションおよび切断のプロセスは産物の指数蓄積を妨害しない。

10

#### 【0069】

他の態様において、開示される方法に利用されるプローブは分子ビーコンである。分子ビーコンは、細胞内に存在する特定のヌクレオチド配列の同定のためのプローブである（Tyagi et al., (1998) *Nature Biotechnology* 16:49-53）。分子ビーコンは、DNAもしくはRNAのような核酸だけで構成されることもできるし、またはペプチド核酸（PNA）コンジュゲートで構成されることもできる。特定のヌクレオチド配列への分子ビーコンの結合は、インビトロまたはインビボのいずれかでそれらの配列の存在の同定を可能にする。分子ビーコンは、コンジュゲート（たとえば、量子ドット標識ビーズのような構造）、プローブ、蛍光体およびクエンチング部分を含む。プローブは、親水性結合基が一本鎖オリゴヌクレオチドの一端に結合し、クエンチング部分がその一本鎖オリゴヌクレオチドの他端に結合しているシステム・ループ構造を含む、一本鎖オリゴヌクレオチドである。蛍光体は、任意の蛍光有機色素であることができるし、または発光が量子ドット標識ビーズの発光と重ならないような単一量子ドットであることができる。クエンチング部分は、望ましくは、蛍光体の発光をクエンチングする。蛍光体の発光をクエンチングする任意の適当なクエンチング部分を上記コンジュゲートにおいて使用することができる。

20

#### 【0070】

さらに他の態様において、開示される方法に利用されるプローブはデュアルハイブリダイゼーションプローブである。概して、デュアルハイブリダイゼーションプローブは、2つの配列特異的DNAプライマーに加えて、2つの配列特異的オリゴヌクレオチドプローブを使用する。2つのプローブは、標的中の隣接する配列に結合するように設計されている。デュアルハイブリダイゼーションプローブは、FRETを示す一対の色素で標識されている。ドナー色素が第1のプローブの3'末端に結合し、一方で、アクセプター色素が第2のプローブの5'末端に結合している。

30

#### 【0071】

リアルタイムPCRの間、ドナー色素に特異的な波長で励起が実施され、アクセプター色素の発光波長で反応がモニターされる。アニーリング工程において、プローブは、それらの標的配列と頭-尾配置でハイブリダイズする。このアニーリングがドナー色素とアクセプター色素とを近接させて、FRETを生じさせ、その結果、アクセプターによる蛍光発光を生じさせる。アクセプター蛍光の増加量は、存在するPCR産物の量に比例する。

40

#### 【0072】

当業者は、レンチウイルスベクターおよび野生型HIVの構造および配列に基づいて適当なハイブリダイゼーション特性を有するプローブを設計することができることを理解するであろう。たとえば、当業者は、レンチウイルスベクターまたはHIVに固有である3'LTRのU3およびR領域の配列に基づいてプローブを設計し得ることを理解するであろう。たとえば、野生型U3 3'LTR領域を除外してレンチウイルスベクターU3領域にハイブリダイズするプローブを設計し得るし、その逆のプローブも設計し得る。本明細書に記されるように、

50

特定のレンチウイルスベクターは、野生型U3領域と比べ、U3配列内に特定の欠失を含むU3領域を含み、当業者は、これらのレンチウイルスベクターU3領域にはハイブリダイズするが、野生型U3領域にはハイブリダイズしないプローブを設計することができる。

【0073】

いくつかの態様において、本明細書に開示される方法は、レンチウイルスベクターの3'LTRのU3領域およびR領域（すなわち「ジャンクション部位」）に及ぶ配列にアニーリングするジャンクションプローブを利用する。図1Cは、野生型U3領域と比べて特定の欠失を含むU3領域を含む、レンチウイルスベクターのジャンクション部位を示す。適切に設計されたジャンクションプローブは、このジャンクション部位またはこのジャンクション部位の一部分もしくはフラグメントにハイブリダイズする部分を含み得る。いくつかの態様において、ジャンクションプローブは第1の部分および第2の部分を含み、第1の部分は、レンチウイルスベクターの3'LTRのU3領域内のヌクレオチド配列の一部分またはフラグメントにハイブリダイズするように設計されており；第2の部分は、3'LTRのR領域内のヌクレオチド配列の一部分またはフラグメントにハイブリダイズするように設計されている。

10

【0074】

いくつかの態様において、ジャンクションプローブがハイブリダイズする3'LTRのU3領域は、SEQ ID NO: 12の配列と少なくとも80%の同一性を有する配列を含む。他の態様において、ジャンクションプローブがハイブリダイズするレンチウイルスベクターの3'LTRのU3領域は、SEQ ID NO: 12の配列と少なくとも90%の同一性を有する配列を含む。さらなる態様において、ジャンクションプローブがハイブリダイズするレンチウイルスベクターの3'LTRのU3領域は、SEQ ID NO: 12の配列と少なくとも95%の同一性を有する配列を含む。なおさらなる態様において、ジャンクションプローブがハイブリダイズするレンチウイルスベクターの3'LTRのU3領域はSEQ ID NO: 12の配列を含む。

20

【0075】

いくつかの態様において、ジャンクションプローブがハイブリダイズするレンチウイルスベクターの3'LTRのR領域は、SEQ ID NO: 13の配列と少なくとも90%の同一性を有する配列を含む。他の態様において、ジャンクションプローブがハイブリダイズするレンチウイルスベクターの3'LTRのR領域はSEQ ID NO: 13の配列を含む。

30

【0076】

当業者は、任意のレンチウイルスベクターの異なるU3領域およびR領域を受け入れるための任意のジャンクションプローブを設計し得ることを理解するであろう。いくつかの態様において、ジャンクションプローブは、SEQ ID NO: 14の配列またはSEQ ID NO: 14の配列と少なくとも90%の同一性を有する配列を含む。いくつかの態様において、ジャンクションプローブは、検出可能な部分、たとえば蛍光レポーターにコンジュゲートされている。いくつかの態様において、蛍光レポーターは、Tex-615、Tye-563、Tye-665、Joe、Cy3、Max、Rox、Tet、Texas Red-X、Tamara、およびYakima Yellowからなる群より選択される。他の態様において、蛍光レポーターはシアニン色素、たとえばインドジカルボシアニン(Cy5TM)を含む。

【0077】

開示されるアッセイでの使用に適したもう1つのプローブが、TARプローブ、すなわち、HIVの3'LTR中のTAR要素に特異的なプローブである。いくつかの態様において、TARプローブは、本明細書に記載されるようなTaqMan(登録商標)プローブである。いくつかの態様において、SEQ ID NO: 7の配列と少なくとも85%の同一性を有する3'LTR内の配列にハイブリダイズするようなプローブが選択される。他の態様において、SEQ ID NO: 7の配列と少なくとも90%の同一性を有する3'LTR内の配列にハイブリダイズするようなTARプローブが選択される。さらに他の態様において、SEQ ID NO: 7の配列と少なくとも95%の同一性を有する3'LTR内の配列にハイブリダイズするようなTARプローブが選択される。いくつかの態様において、TARプローブはSEQ ID NO: 8の配列を含む。いくつかの態様において、TARプローブは検出可能な部分、たとえば蛍光レポーターにコンジュゲートされている。いくつかの態様において、蛍光レポーターは、Tex-615、Tye-563、Tye-665、Joe、Cy3、Max

40

50

、Rox、Tet、Texas Red-X、Tamara、およびYakima Yellowからなる群より選択される。他の態様において、TARプローブは蛍光レポーターおよびクエンチャーを含む。いくつかの態様において、蛍光レポーターはフルオレセイン(CAS 2321-07-5)である。

#### 【0078】

開示されるアッセイでの使用に適したもう1つのプローブが、TATAプローブ、すなわち、野生型3'LTRのU3領域中のTATAボックスに特異的なプローブである。いくつかの態様において、TATAプローブはTaqMan(登録商標)プローブである。いくつかの態様において、TATAプローブは3'LTRのU3配列にハイブリダイズする(アンチセンス鎖を標的とする)。いくつかの態様において、SEQ ID NO: 9の配列と少なくとも85%の同一性を有する3'LTR内の配列にハイブリダイズするようなTATAプローブが選択される。他の態様において、SEQ ID NO: 9の配列と少なくとも90%の同一性を有する3'LTRのU3領域内の配列にハイブリダイズするようなTATAプローブが選択される。さらに他の態様において、SEQ ID NO: 9の配列と少なくとも95%の同一性を有する3'LTRのU3領域内の配列にハイブリダイズするようなTATAプローブが選択される。いくつかの態様において、TATAプローブはSEQ ID NO: 1の配列を含む。いくつかの態様において、TATAプローブは蛍光レポーターおよびクエンチャーを含む。いくつかの態様において、蛍光レポーターは、Tex-615、Tye-563、Tye-665、Joe、Cy3、Max、Rox、Tet、Texas Red-X、Tamara、およびYakima Yellowからなる群より選択される。他の態様において、TARプローブは蛍光レポーターおよびクエンチャーを含む。いくつかの態様において、蛍光レポーターはフルオレセイン(CAS 2321-07-5)である。

10

20

#### 【0079】

##### アッセイ法

試料は、市販され、かつ当業者に公知の標準的なDNA抽出キットを使用して回収され得る。いくつかの態様において、DNA抽出キットは、BioLine DNA抽出キット(BioLine, Tauton, MAから市販)である。いくつかの態様において、試料の非限定的な供給源は、血液試料、血漿試料、組織試料、生検試料、またはフローサイトメトリーによる選別後に創製された試料を含む。

#### 【0080】

DNA、たとえばプロウイルスDNAまたは導入遺伝子DNAは、当業者に公知の方法、たとえば開示内容が参照により全体として本明細書に組み入れられるManiatis et al., Molecular cloning: A laboratory manual, (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY), 1982によって記載されている手順を使用して試料から抽出され得る。手順は、細胞溶解物を調製したのち、プロテイナーゼKによって消化し、多段階フェノール抽出、エタノール沈殿およびリボヌクレアーゼ消化によってDNA精製を得る工程を含む。

30

#### 【0081】

DNAの代わりに、RNAを、本明細書に記載されるアッセイ法に使用してもよい。RNAを使用する場合、適当な逆転写酵素による相補的DNA(cDNA)への逆転写が必要である。したがって、DNAの増幅およびその後の分析を記載する以下の方法がRNA分析に応用可能である。いくつかの態様において、ウイルスRNAは、公知の方法、たとえばBoom, R. et al. (J. Clin. Microbiol. 28(3): 495-503 (1990); 参照により本明細書に組み入れられる)に記載されている方法または他の従来の方法、たとえば酸フェノール法(たとえば酸グアニン・フェノール・クロロホルム(AGPC)法)、たとえばChomczynski and Sacchiの方法(Anal. Biochem. 162, 156-159 (1987))を用いるグアニンイソチオシアネート法を使用して単離し得る。いくつかの態様において、cDNAは、SENSISCRIP(登録商標)RT(Qiagen)を用いて合成し得る。いくつかの態様において、1段階逆転写酵素およびTaqポリメラーゼキットが利用される。他の態様において、cDNAを合成したのち、リアルタイムDNA PCR法を実施する。

40

#### 【0082】

##### 増幅

核酸配列の増幅のための技術は当業者に公知である。標的配列を増幅する1つの方法は

50

、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）と呼ばれるポリメラーゼ媒介技術を用いる方法である。概して、PCRは、クローニングまたは精製することなく、ゲノムDNAの混合物中の標的配列のセグメントの濃度を高めるための方法である。標的配列を増幅するこの方法は、所望の標的配列を含むDNA混合物に大過剰量の2つのオリゴヌクレオチドプライマーを導入し、続いてDNAポリメラーゼの存在下、正確な一連の熱サイクルに供することからなる。2つのプライマーは二本鎖標的配列のそれぞれの鎖に相補的である。増幅を実施するために、混合物を変性させたのち、プライマーを標的分子内のそれらの相補的配列にアニーリングさせる。アニーリングののち、プライマーをポリメラーゼ（たとえばDNAポリメラーゼ）によって伸長させて新たな相補鎖の対を形成する。変性、プライマーアニーリング、およびポリメラーゼ伸長の工程を何度も繰り返して（すなわち、変性、アニーリング、および伸長は1つの「サイクル」を構成し；多数の「サイクル」が存在しうる）、所望の標的配列の、高濃度に増幅されたセグメント（アンブリコン）を得ることができる。所望の標的配列の増幅されたセグメントの長さは、プライマーの互いに対する相対位置によって決まり、したがって、この長さは制御可能なパラメータである。ポリメラーゼ連鎖反応（「PCR」）は、たとえば、米国特許第4,683,202号；米国特許第4,683,195号；米国特許第4,000,159号；米国特許第4,965,188号；米国特許第5,176,995号に記載されている。それぞれの開示内容が参照により全体として本明細書に組み入れられる。

10

## 【0083】

PCRは、定性的または定量的に使用し得る。1つの公知の定量的増幅技術が「リアルタイムPCR」である。本明細書の中で使用される用語「リアルタイムPCR」とは、反応中、PCRアッセイから放出されるシグナルが、各PCR増幅サイクル中に、すなわち、PCR反応の終点でアッセイシグナルが検出される従来のPCR法とは対照的に「リアルタイム」で、アンブリコン産生の指標としてモニターされることをいう。リアルタイムPCRは概して、本明細書に記載されるような蛍光レポーターの検出および定量に基づく。レポーターのシグナルは、反応中のPCR産物の量に正比例して増大する。したがって、各サイクルでの蛍光発光の量を記録することにより、PCR産物の量の最初の有意な増加が標的鑄型の初期量と相関する指数増殖期中のPCR反応をモニターすることが可能である。「リアルタイムPCR」の概説に関しては、Dehee et al. J. Virol. Meth. 102:37-51 (2002)；およびAldea et al. J. Clin. Microbiol., 40:1060-1062 (2002)を参照すること。これらの開示内容は参照により全体として本明細書に組み入れられる。

20

## 【0084】

逆転写酵素 - ポリメラーゼ連鎖反応とは、RNA鑄型から相補的DNAを產生し、さらにその相補的DNAを、PCRを実施するための鑄型として使用して、上記のようにDNAを複製し、増幅することをいう。逆転写酵素反応において、反応混合物は、RNA鑄型の全部または一部分に相補的なDNA分子を合成するのに十分な温度でインキュベートされる。逆転写反応ののち、反応は、合成されたDNA分子を増幅するのに十分な温度でインキュベートされる。

30

## 【0085】

レンチウイルス核酸の増幅

本開示の1つの局面は、レンチウイルス核酸、たとえばレンチウイルス導入遺伝子を増幅する方法である。いくつかの態様において、レンチウイルス核酸の増幅は、3'LTRのU3領域の一部分にハイブリダイズするフォワードプライマーおよび3'LTRのR領域の一部分にハイブリダイズするリバースプライマーを利用する。いくつかの態様において、レンチウイルス核酸の増幅はNuAf フォワードプライマーおよびLTR-revリバースプライマーを利用する。いくつかの態様において、増幅から產生されるアンブリコンは約100個～約600個の核酸を含む。いくつかの態様において、產生されたアンブリコンの量が定量化される。

40

## 【0086】

いくつかの態様において、レンチウイルス核酸の増幅は、レンチウイルスベクターの3'LTR内の配列に特異的なプローブの使用を含む。すなわち、プローブは、レンチウイルスベクターの3'LTRだけにハイブリダイズし、野生型3'LTR、たとえばHIVの3'LTRにはハイブリダイズしない。いくつかの態様において、プローブは、そのような欠失を含まない野生

50

型3'LTRと比べ、レンチウイルスベクターの3'LTRのU3領域中の欠失に最適化されている。いくつかの態様において、欠失は（ここでもまた、野生型U3領域と比べて）TATAボックス配列の欠失を含む。いくつかの態様において、3'LTRのU3領域中の欠失に最適化されたプローブは、レンチウイルスベクターの3'LTRのU3領域の一部分およびレンチウイルスベクターの3'LTRのR領域の一部分に及ぶように設計されている。いくつかの態様において、3'LTRのU3領域中の欠失に最適化されたプローブはジャンクションプローブである。いくつかの態様において、ジャンクションプローブは、配列番号14の配列と少なくとも90%の同一性を有する配列を含む。いくつかの態様において、レンチウイルス核酸またはレンチウイルス導入遺伝子の増幅は、たとえばプローブとコンジュゲートした蛍光レポーターの量を検出することにより、増幅された核酸の量を定量化する工程を含む。

10

#### 【0087】

いくつかの態様において、レンチウイルス核酸の増幅は、フォワードプライマー、リバースプライマーおよびジャンクションプローブを試料に導入し、当業者に公知の手順にしたがってPCRを実施する工程を含む。いくつかの態様において、フォワードプライマーはNuAfであり、リバースプライマーはLTR-revであり、ジャンクションプローブはSEQ ID NO: 14の配列を含む。いくつかの態様において、45～50サイクルのPCRが実施される。いくつかの態様において、PCR法はリアルタイムPCRまたは定量的リアルタイムPCRである。いくつかの態様において、核酸はRNAであり、RNAはまずcDNAに変換される。いくつかの態様において、核酸はRNAであり、逆転写酵素PCRまたは定量的逆転写酵素PCRのいずれかが利用される。

20

#### 【0088】

##### 一般的なマルチプレックスアッセイ法

本開示のもう1つの局面は、試料中のレンチウイルス核酸およびHIV核酸を検出および/または定量化するマルチプレックス法である。いくつかの態様において、マルチプレックス法は、1つの反応システムまたはチャンバ（本明細書中、以下「反応チューブ」）中で実施される。他の態様において、マルチプレックス法は別々の反応チューブ中で実施される。いくつかの態様において、レンチウイルス核酸はレンチウイルス導入遺伝子である。いくつかの態様において、HIV核酸はプロウイルスDNAである。いくつかの態様において、レンチウイルス核酸および/またはHIV核酸はRNAであり、RNAは、増幅の前に、（たとえば逆転写プロセスによって）まずcDNAに変換される。

30

#### 【0089】

いくつかの態様において、マルチプレックス法は、レンチウイルスベクターおよび/またはHIVの3'LTRのU3領域内の配列にハイブリダイズすることができるフォワードプライマーを利用する。いくつかの様態において、マルチプレックス法は、レンチウイルスベクターおよび/またはHIVの3'LTRのR領域内の配列にハイブリダイズすることができるリバースプライマーを利用する。いくつかの様態において、マルチプレックス法は、レンチウイルス核酸の増幅およびHIV核酸の増幅の両方に同じフォワードおよびリバースプライマーを利用する。これらの場合、当業者は、野生型HIV核酸およびレンチウイルスベクター核酸の両方のU3領域内の同じ配列にハイブリダイズすることができるフォワードプライマーを選択することができるであろう。他の態様において、マルチプレックス法は、異なるフォワードプライマーと、同じリバースプライマーとを利用する。いくつかの態様において、フォワードプライマーはNuAfプライマーおよびTATAプライマーから選択される。いくつかの態様において、リバースプライマーはLTR-revプライマーである。

40

#### 【0090】

いくつかの態様において、レンチウイルス核酸の量を増幅および/または定量化するためにレンチウイルス核酸に特異的な第1のプローブがPCR法（たとえばリアルタイムPCR法）に用いられ、HIV核酸の量を増幅および/または定量化するためにHIVに特異的な第2のプローブがPCR法に用いられ、第1および第2のプローブは異なる検出可能な部分を含む。いくつかの態様において、第1のプローブは、レンチウイルスベクターの3'LTR内の配列にはハイブリダイズすることができるが、野生型HIVの3'LTR内の配列にはハイブリダイズす

50

ることができないプローブである。いくつかの態様において、第1のプローブは、野生型3'LTR配列と比べ、レンチウイルス核酸の3'LTR中の配列欠失に最適化されている。

【0091】

いくつかの態様において、第1のプローブは、レンチウイルスベクターの3'LTR、たとえば3'LTR内のジャンクション部位に特異的なジャンクションプローブである。いくつかの態様において、ジャンクションプローブは、レンチウイルスベクターのU3領域内の配列の少なくとも一部分にハイブリダイズすることができ、レンチウイルスベクターのR領域内の配列の少なくとも一部分にハイブリダイズすることができるプローブである。いくつかの態様において、ジャンクションプローブは、SEQ ID NO: 12の配列と少なくとも90%の同一性を有する第1の配列にハイブリダイズすることができる第1の部分；およびSEQ ID NO: 13の配列にハイブリダイズすることができる第2の部分を含む。

10

【0092】

いくつかの態様において、第2のプローブはTATAプローブまたはTARプローブから選択される。

【0093】

いくつかの態様において、レンチウイルス核酸およびHIV核酸の増幅は、たとえば用いられるプローブにコンジュゲートされた異なる蛍光レポーターに対応するシグナルを検出することにより、増幅された核酸の量を定量化する工程を含む。他の態様において、レンチウイルス核酸アンプリコンおよびHIV核酸アンプリコンの電気泳動分離ののち、レンチウイルス核酸アンプリコンの量およびHIV核酸アンプリコンの量が定量化される。

20

【0094】

いくつかの態様において、マルチプレックス法は、試料中に存在するHIV核酸の量に対するレンチウイルス核酸の量の比率を決定する工程を含む。いくつかの態様において、決定された比率は、たとえばレンチウイルスベクターを形質導入した幹細胞を用いる治療または遺伝子療法の効果を評価するために使用される。いくつかの態様において、レンチウイルスの量およびHIV核酸の量は、治療効果を評価するために、治療の過程にわたって、すなわちいくつかの異なる時点において測定され得る（たとえば、第1の評価時点と第2の評価時点とを比較し得る場合、第1の評価時点から第2の評価時点までで、HIV核酸と比べて増加したレンチウイルス核酸の量が治療効率を示す場合）。いくつかの態様において、提供された評価に依存してさらなる治療が施される。

30

【0095】

マルチプレックス「方法1」

図2を参照すると、本開示の1つの局面は、試料中のレンチウイルス核酸およびHIV核酸を同じ反応チューブ中で検出および／または定量化するマルチプレックス法（「方法1」）である。いくつかの態様において、方法はまず、試料中に存在する核酸、すなわちDNAまたはRNAを増幅に備えて準備する工程を含む。RNAが試料内の出発原料であるならば、当業者に公知の手段にしたがってRNAをcDNAに変換する。

【0096】

ひとたび核酸を準備したならば、フォワードおよびリバースプライマーを試料に導入する。この特定の方法においては、レンチウイルス核酸およびHIV核酸の両方の増幅のために同じフォワードおよびリバースプライマーを使用する（図2を参照）。いくつかの態様において、フォワードプライマーはNuAfプライマーである。いくつかの態様において、フォワードプライマーはSEQ ID NO: 2の配列を有する。いくつかの態様において、リバースプライマーは、レンチウイルス核酸およびHIV核酸の両方の3'LTRのR領域内の配列にハイブリダイズする。いくつかの態様において、リバースプライマーはLTR-revプライマーである。いくつかの態様において、リバースプライマーはSEQ ID NO: 6の配列を有する。任意の特定の理論によって拘束されることを望まないが、この特定のアッセイ法の特異性はフォワードプライマーに基づくと考えられる。ここでもまた、任意の特定の理論によって拘束されることを望まないが、1つのプライマーセットのおかげで、レンチウイルス核酸の増幅効率とHIV核酸の増幅効率とは同じであると考えられる。

40

50

## 【0097】

試料へのプライマーの導入ののち、2つの異なるプローブが導入される。第1の検出可能な部分を含む第1のプローブはレンチウイルス核酸に特異的であり、第2の検出可能な部分を含む第2のプローブはHIV核酸に特異的である(図2を参照)。いくつかの態様において、レンチウイルス核酸に特異的な第1のプローブは、(第1のプローブが、レンチウイルス核酸にはハイブリダイズし得るが、HIV核酸にはハイブリダイズし得ないように、)野生型HIV核酸と比べ、レンチウイルスベクターの3'LTRのU3領域内の欠失に最適化されている。いくつかの態様において、プローブは、レンチウイルス核酸の3'LTR内のジャンクション部位、たとえば3'LTRのU3およびR領域に及ぶジャンクション部位に特異的なジャンクションプローブである。いくつかの態様において、ジャンクションプローブは、3'LTR内の第1の領域および3'LTR内の第2の領域にハイブリダイズすることができる。いくつかの態様において、ジャンクションプローブは、3'LTRのU3領域内のヌクレオチド配列の一部分またはフラグメント；および3'LTRのR領域内のヌクレオチド配列の一部分またはフラグメントにハイブリダイズすることができる。いくつかの態様において、ジャンクションプローブは、SEQ ID NO: 12の配列と少なくとも90%の同一性を有する第1の配列にハイブリダイズすることができる第1の部分；およびSEQ ID NO: 13の配列にハイブリダイズすることができる第2の部分を含む。いくつかの態様において、ジャンクションプローブは、SEQ ID NO: 14の配列と少なくとも80%の同一性を有する配列を含む。他の態様において、ジャンクションプローブは、SEQ ID NO: 14の配列と少なくとも90%の同一性を有する配列を含む。さらに他の態様において、ジャンクションプローブは、SEQ ID NO: 14の配列と少なくとも95%の同一性を有する配列を含む。

10

20

30

## 【0098】

いくつかの態様において、HIV核酸に特異的な第2のプローブはTATAプローブである。いくつかの態様において、第2のプローブは、SEQ ID NO: 10の配列またはSEQ ID NO: 10の配列と少なくとも90%の同一性を有する配列を有する。いくつかの態様において、第1のプローブはCy5で標識されている。いくつかの態様において、第2のプローブはFAMで標識されている。

## 【0099】

プローブの導入ののち、標準的なプロトコルにしたがって増幅を実施することができる。いくつかの態様において、約45～約50のPCRサイクルを実施することができる。いくつかの態様において、PCRはリアルタイムPCRである。RNAが出発原料である場合、はじめにRNAをcDNAに変換する代わりに、逆転写酵素PCRまたはリアルタイム逆転写酵素を利用してよい。

30

## 【0100】

いくつかの態様において、レンチウイルス核酸の量およびHIV核酸の量は、たとえば異なるプローブにコンジュゲートされた異なる検出可能な部分からのシグナルを検出することによって定量化される。いくつかの態様において、HIV核酸の量に対するレンチウイルス核酸の量の比率。いくつかの態様において、決定された比率は、たとえばレンチウイルスベクターを形質導入した幹細胞を用いる治療または遺伝子療法の効果を評価するために使用される。いくつかの態様において、レンチウイルスの量およびHIV核酸の量は、治療効果を評価するために、治療の過程にわたって、すなわちいくつかの異なる時点において測定され得る(たとえば、第1の評価時点と第2の評価時点とを比較し得る場合、第1の評価時点から第2の評価時点までで、HIV核酸と比べて増加したレンチウイルス核酸の量が治療効率を示す)。いくつかの態様において、提供された評価に依存してさらなる治療が施される。

40

## 【0101】

デュアルチューブ「方法2」

図3を参照すると、本開示の1つの局面は、試料中のレンチウイルス核酸およびHIV核酸を検出および/または定量化する、2つの別々の反応チューブ中で実施されるマルチプレックス法である(「方法2」)。第1の反応チューブは、レンチウイルス核酸の増幅に必要

50

なすべての成分を含む。第2の反応チューブは、HIV核酸の増幅に必要なすべての成分を含む。上記「方法1」と同様に、このアッセイもまた、3'LTRレンチウイルス核酸構造と野生型3'LTR HIV核酸構造との差異を利用し、特に、HIV核酸の増幅開始部位としてTATAボックスを利用する。

#### 【0102】

前記方法と同様に、方法はまず、試料中に存在する核酸、すなわちDNAまたはRNAを増幅に備えて準備する工程を含む。RNAが試料内の出発原料であるならば、RNAをcDNAに変換する。ひとたび核酸を準備したならば、フォワードおよびリバースプライマーを導入する。この特定の方法においては、レンチウイルス核酸の増幅とHIV核酸の増幅とで異なるフォワードを使用する(図3を参照)。レンチウイルス核酸の増幅の場合、フォワードプライマーはNuAfプライマーである。いくつかの態様において、フォワードプライマーはSEQ ID NO: 2の配列を有する。HIV核酸の増幅の場合、フォワードプライマーはTATAプライマーである。いくつかの態様において、フォワードプライマーはSEQ ID NO: 4の配列を有する。

10

#### 【0103】

いくつかの態様において、レンチウイルス核酸の増幅とHIV核酸の増幅との両方で同じリバースプライマーを使用する。いくつかの態様において、リバースプライマーは、レンチウイルス核酸およびHIV核酸の両方の3'LTRのR領域内の配列にハイブリダイズする。いくつかの態様において、リバースプライマーはLTR-revプライマーである。いくつかの態様において、リバースプライマーはSEQ ID NO: 6の配列を有する。任意の特定の理論によって拘束されることを望まないが、この特定のアッセイ法の特異性はフォワードプライマーに基づくと考えられる。ここでもまた、任意の特定の理論によって拘束されることを望まないが、1つのプライマーセットのおかげで、レンチウイルス核酸の増幅効率とHIV核酸の増幅効率との両方は同じであると考えられる。

20

#### 【0104】

任意の特定の理論によって拘束されることを望まないが、第1の反応チューブ中の反応(レンチウイルスベクター核酸の増幅)の特異性は、利用される特異性プローブに基づくと考えられる。任意の特定の理論によって拘束されることを望まないが、第2の反応チューブ中の反応(HIV核酸の増幅)の特異性は、利用されるフォワードプライマーに基づくと考えられる。ここでもまた、任意の特定の理論によって拘束されることを望まないが、これらのアッセイは共通のリバースプライマー(たとえばLTR-rev)に基づき、フォワードプライマーの位置は数百塩基の範囲で分離しているため、増幅効率は相対的に同一であり、アッセイは、LV核酸およびHIV核酸検出および/または定量化の両方において信頼し得る比較データを提供し得ると考えられる。

30

#### 【0105】

試料へのプライマーの導入ののち、2つの異なるプローブが導入される。第1の検出可能な部分を含む第1のプローブはレンチウイルス核酸に特異的であり、第2の検出可能な部分を含む第2のプローブはHIV核酸に特異的である(図3を参照)。いくつかの態様において、レンチウイルス核酸に特異的な第1のプローブは、(第1のプローブが、レンチウイルス核酸にはハイブリダイズし得るが、HIV核酸にはハイブリダイズし得ないように、)野生型HIV核酸と比べ、レンチウイルスベクターの3'LTRのU3領域内の欠失に最適化されている。いくつかの態様において、プローブは、レンチウイルス核酸の3'LTR内のジャンクション部位、たとえば3'LTRのU3およびR領域に及ぶジャンクション部位に特異的なジャンクションプローブである。いくつかの態様において、ジャンクションプローブは、3'LTR内の第1の領域および3'LTR内の第2の領域にハイブリダイズすることができる。いくつかの態様において、ジャンクションプローブは、3'LTRのU3領域内のヌクレオチド配列の一部分またはフラグメント；および3'LTRのR領域内のヌクレオチド配列の一部分またはフラグメントにハイブリダイズすることができる。いくつかの態様において、ジャンクションプローブは、SEQ ID NO: 12の配列と少なくとも90%の同一性を有する第1の配列にハイブリダイズすることができる第1の部分；およびSEQ ID NO: 13の配列にハイブリダイズすること

40

50

ができる第2の部分を含む。いくつかの態様において、ジャンクションプローブは、SEQ ID NO: 14の配列と少なくとも80%の同一性を有する配列を含む。他の態様において、ジャンクションプローブは、SEQ ID NO: 14の配列と少なくとも90%の同一性を有する配列を含む。さらに他の態様において、ジャンクションプローブは、SEQ ID NO: 14の配列と少なくとも95%の同一性を有する配列を含む。

#### 【0106】

いくつかの態様において、HIV核酸に特異的な第2のプローブはTARプローブである。いくつかの態様において、第2のプローブは、SEQ ID NO: 8の配列またはSEQ ID NO: 8の配列と少なくとも90%の同一性を有する。いくつかの態様において、第1のプローブはCy5で標識されている。いくつかの態様において、第2のプローブはFAMで標識されている。

10

#### 【0107】

プローブの導入ののち、標準的なプロトコルにしたがって増幅を実施することができる。いくつかの態様において、約45～約50のPCRサイクルを実施することができる。いくつかの態様において、PCRはリアルタイムPCRである。RNAが出発原料である場合、はじめにRNAをcDNAに変換する代わりに、逆転写酵素PCRまたはリアルタイム逆転写酵素を利用してよい。

#### 【0108】

いくつかの態様において、レンチウイルス核酸の量およびHIV核酸の量は、たとえば異なるプローブにコンジュゲートされた異なる検出可能な部分からのシグナルを検出することによって定量化される。いくつかの態様において、HIV核酸の量に対するレンチウイルス核酸の量の比率。いくつかの態様において、決定された比率は、たとえばレンチウイルススペクターを形質導入した幹細胞を用いる治療または遺伝子療法の効果を評価するために使用される。いくつかの態様において、レンチウイルスの量およびHIV核酸の量は、治療効果を評価するために、治療の過程にわたって、すなわちいくつかの異なる時点において測定され得る（たとえば、第1の評価時点と第2の評価時点とを比較し得る場合、第1の評価時点から第2の評価時点までで、HIV核酸と比べて増加したレンチウイルス核酸の量が治療効率を示す）。いくつかの態様において、提供された評価に依存してさらなる治療が施される。

20

#### 【0109】

##### マルチプレックス「方法3」

30

図4を参照すると、本開示の1つの局面は、試料中のレンチウイルス核酸およびHIV核酸を検出および/または定量化する、1つの反応チューブ中で実施されるマルチプレックス法である（「方法3」）。いくつかの態様において、方法はまず、試料中に存在する核酸、すなわちDNAまたはRNAを増幅に備えて準備する工程を含む。RNAが試料内の出発原料であるならば、RNAをcDNAに変換する。

#### 【0110】

ひとたび核酸を準備したならば、フォワードおよびリバースプライマーを導入する。この特定の方法においては、レンチウイルス核酸の増幅とHIV核酸の増幅との両方で同じフォワードおよびリバースプライマーを使用する（図4を参照）。いくつかの態様において、フォワードプライマーはNuAfプライマーである。いくつかの態様において、フォワードプライマーはSEQ ID NO: 2の配列を有する。いくつかの態様において、リバースプライマーは、レンチウイルス核酸およびHIV核酸の両方の3'LTRのR領域内の配列にハイブリダイズする。いくつかの態様において、リバースプライマーはLTR-revプライマーである。いくつかの態様において、リバースプライマーはSEQ ID NO: 6の配列を有する。この特定の方法においては、本明細書の方法1および方法2と比べ、プローブは利用されない。任意の特定の理論によって拘束されることを望まないが、1つのプライマーセットのおかげで、LV核酸の増幅効率とHIV核酸の増幅効率との両方は同じであると考えられる。

40

#### 【0111】

この方法において、増幅は、異なるサイズを有するレンチウイルス核酸アンプリコンおよびHIV核酸アンプリコンを産生する（本明細書の実施例1からの抽出されたDNAからのア

50

ンプリコンの相対的サイズを示す図7を参照）。いくつかの態様において、2つのアンプリコンの間のサイズ差は約100～約560塩基対の範囲であり、レンチウイルスペクターアンプリコンがHIVアンプリコンよりも短い（すなわち、比較的少ない塩基またはより低い分子量を有する）。他の態様において、2つのアンプリコンの間のサイズ差は約100～約550塩基対の範囲であり、レンチウイルスペクターアンプリコンがHIVアンプリコンよりも短い（すなわち、比較的少ない塩基またはより低い分子量を有する）。異なるサイズのアンプリコンは、任意の標準的な電気泳動分離法（たとえば、アガロースゲルをDNA染色法、たとえばSybr-green、EvaGreenとともに用いる電気泳動分離）を使用することにより、互いに区別されおよび／または分離することができる。そして、分離したアンプリコンを定量化すると、試料中のレンチウイルスペクター核酸およびHIV核酸の量を導出し得る。

10

#### 【0112】

いくつかの態様において、Droplet Digital PCR (BioRad) を使用して、正確な定量検出によって即座にEvaGreen色素のバンドのサイズを分離すると同時に、簡単なPCRプライマーセットによってLV核酸およびHIV核酸のコピー数の絶対量の定量を可能にし得る。

#### 【0113】

Droplet Digital PCR技術は、水 - 油エマルジョン液滴系を利用するデジタルPCR法である。水 - 油エマルジョン中に液滴が形成されて、鑄型DNA分子を分離する仕切りを形成する。液滴は、非常に小さいスケールではあるが、PCR反応が起こるプレート中の個々の試験管またはウェルと本質的に同じ機能を果たす。任意の特定の理論によって拘束されることを望まないが、Droplet Digital PCRシステムは核酸試料を数千個のナノリットルサイズの液滴に分割し、各液滴内でPCR增幅が実施されると考えられる。

20

#### 【0114】

液滴は、それらが含有する鑄型分子のPCR增幅を支持し、二本鎖DNAのEvaGreen染色に基づく従来のリアルタイムPCR法で使用されるものと同様な試薬およびワークフローを使用する。PCRののち、フローサイトメータと同様の概念で各液滴を分析して、または読み取って、元の試料中のPCR陽性液滴の割合を決定する。本発明者らが図4に記載された方法で使用した場合、2つのアンプリコンのサイドはLVアンプリコンとHIV-1アンプリコンとで異なる。インターラート色素EvaGreenは二本鎖DNAに結合する。HIV-1の場合のより長い二本鎖DNAアンプリコンは、Cal-1の場合のより短い二本鎖DNAアンプリコンから生成される強度よりもずっと高い強度を生じさせる。そして、ポアソン統計を使用してこれらのデータを分析して、元の試料中の標的DNA鑄型濃度を測定する。この方法により、本発明者らは、元の試料中のHIV-1およびCal-1アンプリコンのコピー数を特定することができた。

30

#### 【0115】

##### キット

本開示のもう1つの局面は、請求項に係る方法を実施するためのキットである。いくつかの態様において、本開示のキットは、少なくとも1つのフォワードプライマー、少なくとも1つのリバースプライマー、および少なくとも1つのプローブを提供する。いくつかの態様において、本開示のキットは、NuAfプライマー、LTR-revプライマー、およびレンチウイルスペクターに特異的なプローブを含む。他の態様において、本開示のキットは、NuAfプライマー、LTR-revプライマー、およびSEQ ID NO: 14の配列を有するプローブを含む。さらに他の態様において、本開示のキットは、NuAfプライマー、LTR-revプライマー、レンチウイルスペクターに特異的なプローブ、およびTATAプローブを含む。さらなる態様において、本開示のキットは、NuAfプライマー、LTR-revプライマー、SEQ ID NO: 14の配列を有するプローブ、およびTATAプローブを含む。

40

#### 【0116】

他の態様において、本開示のキットは、NuAfプライマー、TATAプライマー、LTR-revプライマー、レンチウイルスペクターに特異的なプローブ、およびTARプローブを含む。他の態様において、本開示のキットは、NuAfプライマー、TATAプライマー、LTR-revプライマー、SEQ ID NO: 14を有するプローブ、およびTARプローブを含む。

#### 【0117】

50

本開示のキットはさらに、反応チューブ、取り扱い指示、バッファー、試薬、およびオリゴヌクレオチドを含む他の構成要素を含み得る。

【実施例】

【0118】

本開示の特定の態様をさらに説明する一連の非限定的な実施例が本明細書に開示される。

【0119】

実施例1  
MOLT-4細胞に基づく3セットの試料を調製した：MOLT-4細胞に基づく初期インピトロ実験。

10

- a) Cal-1レンチウイルスを形質導入していない、ただのMOLT-4細胞；
- b) MOLT-4細胞80%とCal-1レンチウイルスを形質導入したMOLT-4細胞20%。形質導入細胞の程度は、C46発現のフローサイトメトリー分析によって決定した。この実験設定は、元のMOLT-4細胞（80%）とCal-1形質導入MOLT-4細胞（20%）との混合集団の導入遺伝子効果を判定するためのものであった；
- c) MOLT4 Cal-1 (100%)。フローサイトメトリーでのC46発現によって判定されるように細胞100%にCal-1を形質導入した。

【0120】

これらの細胞約50万個にHIV-1 BaLを感染させた。これらの細胞を、25cm<sup>2</sup>培養フラスコ中、10%FBSを1×GlutaMAXサプリメントとともに含有する標準的なRPMI-1640ベースの培地10mLを使用してCO<sub>2</sub>インキュベータ中で培養した。4、7、10、14日目に、RTアッセイ（図5A）および逆転写酵素リアルタイム（RT）-PCRアッセイ（図5BおよびC）のために培養上清試料（1mL）を取り出した。また、4、7、10、14日目に、DNA（図6AB）およびRNA（図6C）の細胞内分析のために培養細胞試料を調製した。各時点において、DNA分析のための培養細胞懸濁液0.6mLおよびRNA分析のための培養細胞懸濁液0.4mLを標準的なエッペンドルフチューブ2.0mLに移した。これらのチューブを900gで3分間遠心分離した。次いで、上清を取り出した。PBS 1mLを各チューブに加えたのち、900gで3分間遠心分離した。再び上清を取り出した。細胞ペレットをRNAおよびDNA分析に使用した。

20

【0121】

逆転写酵素アッセイ（RTアッセイ）（図5A）を使用して、感染したMOLT-4から放出された培養上清10 μL中のレンチウイルスの量を計測した。RTアッセイは、培養上清中のHIV-1およびレンチウイルスベクターを検出することができた（Suzuki K, et al: Poly A-link ed non-isotopic microtiter plate reverse transcriptase assay for sensitive detection of clinical human immunodeficiency virus isolates. J Virol Methods 1995, 55:347-356を参照。この開示内容は参照により全体として本明細書に組み入れられる）。

30

【0122】

MOLT-4（）は、10日目、14日目に大きく上昇したRTレベルを示し、培養日数とともに感染したMOLT-4から放出されるHIV-1の高い産生を示唆した。このデータは、このセットの感染実験が非常にうまく行くことを示した；

MOLT4 Cal20%（）は、14日目に、感染したMOLT-4から放出されるHIV-1の良好な減少（10ホールド）を示した；

40

MOLT4 Cal-1（）は、感染した細胞から放出されるHIV-1の大きな減少を示した；

RTアッセイはHIV-1のRT活性を検出することができ、RTアッセイはまた、MOLT-4形質導入の過程からのキャリーオーバーであると考えられるCal-1レンチウイルスを検出することができた。4日目の分析で、MOLT4 Cal-1（）のRT活性はMOLT4（）のRT活性よりも高かった。MOLT4 Cal20%（）のRT活性もまた、MOLT4（）のRT活性よりもわずかに高かった。

【0123】

本明細書に記載されるマルチプレックス化方法1にしたがってシングルチューブアッセイを使用するアッセイ法にしたがってシングルチューブアッセイに基づくHIV-1特異的RNA

50

検出(図5B)を実施した。自動抽出システム(EasyMag, bioMerieux)を溶出量設定60 μLで使用して、培養上清500 μLからRNAを抽出した。

【0124】

注記：一工程逆転写酵素リアルタイム(RT)-PCR分析には、LightCycler 480 (Roche)およびLightCycler-480用の白色96ウェルプレートを使用した。

【0125】

8つ標準および試料分析のためにプロトコルごとにマスターミックスを作製した。

【0126】

マスターミックス：HIV-1 RNAおよびCal-1 RNAを検出するための二重検出用

【0127】

(表1A) HIV-1 RNAおよびCal-1 RNAの二重検出用のマスターミックス(ミックスの全量は34マイクロリットルであった)

DNアーゼRNアーゼフリー水	10.60
2 x B(キット由来)	20.00
NuAf(20μM)	0.50
Imai-LTR-Rev(20μM)	0.50
HIV-1 Tataプローブ(5 μM) FAM 標識付き	0.60
Cal-1プローブ(5 μM) Cy5標識付き	0.60
RT酵素(キット由来)	0.40
RNアーゼ阻害剤(キット由来)	0.80

10

20

30

40

【0128】

以下のアッセイフォーマットにおけるように、マスターミックス34 μLのアリコートを、設計された配置の96ウェルプレート(図15Aを参照)の各ウェルの中に小分けした。設計された配置の各ウェルにHIV-1およびCal-1標準の両方ならびに試験試料の6 μLを添加したのち、以下の条件を使用してRT-PCRを実施した：45℃で20分、95℃で2分、(94℃で7秒、60℃で30秒)の45サイクル。

【0129】

試薬

SensiFAST Probe One step kit (BioLine #BIO-76005)

【0130】

標準

HIV-1標準：0、4、4×10、4×102、4×103、4×104、4×105、4×106コピー/μL

Cal-1標準：0、2、2×10、2×102、2×103、2×104、2×105、2×106コピー/μL

【0131】

HIV-1特異的RNA検出データ(図5B)は、4日目に、3つの実験すべてが、方法1にしたがってシングルチューブアッセイを使用して上清から抽出されたRNA中に同じレベルのHIV-1を示すことを明らかにした。10日目および14日目に、MOLT4 Cal-1( )中のHIV-1の量は、感染したMOLT-4( )から放出されたHIV-1の1/1000未満に減少した。14日目に、MOLT4 Cal20%( )は、感染したMOLT-4から放出されたHIV-1の約1/10に減少し、これはRTアッセイデータと同一であった。

【0132】

方法1にしたがってシングルチューブアッセイを使用したCal-1特異的RNA検出(図5C)は、Cal-1形質導入MOLT4細胞( )において培養時間とともにCal-1 RNAレベルの低下が認められることを示した。Cal-1の量は、おそらくは、0日目にMOLT-4細胞にCal-1を形質導入したときキャリーオーバーされたレンチウイルスの結果であった。非形質導入MOLT-4細胞中にCal-1 RNAは検出されなかった。4日目、MOLT4 Cal20%( )群から少量のCal-1 RNAが4日目に検出されただけであった。

【0133】

50

4日目に、RTデータは、MOLT4細胞のみ( )と比べてわずかに上昇したMOLT4 Cal-1( )のRTレベルを示した。これは、レンチウイルスキャリーオーバに起因したものであろう。また、MOLT-4感染と比べ、MOLT4 Cal20%( )において非常に小さなRTレベル上昇が認められた。このわずかに上昇したRTは、レンチウイルスキャリーオーバからの低レベルの寄与を示したものであろう。14日目の試料の上清中のCal-1 RNAのレベルは、培養上清中のHIV-1 RNAレベルの約1/1000であり、きわめて低いレベルのCal-1 RNAキャリーオーバを示した。

【0134】

実施例2A

方法1にしたがって、本明細書中さらに記載されるように、シングルチューブアッセイに基づいてHIV-1組み込みDNA(図6A)およびCal-1組み込みDNA(図6B)を產生した。4、7、10、14日目に、PurLink Genomic DNA kits (ThermoFisher)を溶出量60 μLで使用して、調製された細胞ペレットからDNAを抽出した。

【0135】

注記：この一工程リアルタイムPCR分析には、LightCycler 480 (Roche)およびLightCycler-480用の白色96ウェルプレートを使用した。

【0136】

8つ標準および試料分析のためにプロトコルごとに2つのマスターミックスを作製した。

【0137】

i) マスターミックス1は、HIV-1 DNAおよびCal-1 DNAを検出するための二重検出用である。

ii) マスターミックス2はアクチン検出用である。

【0138】

(表2)PCRマスター1ミックス：マスターミックスは、HIV-1 DNAおよびCal-1 DNAを検出するための二重検出用である。

DNアーゼRNアーゼフリー水	11.7
10 x B	2.0
MgSO <sub>4</sub> (5mM)	0.8
NuAf (20μM)	0.25
Imai-LTR-Rev (20μM)	0.25
Tataプローブ (5 μM) FAM標識付き	0.3
Cal-1プローブ (5 μM) Cy5標識付き	0.3
ACCUPRIME TAQ	0.4

【0139】

(表3)PCRマスターミックス2はアクチン検出用である。

DNアーゼRNアーゼフリー水	12.0
10 x B	2.0
MgSO <sub>4</sub> (5mM)	0.8
アクチンフォワードプライマー (20 μM)	0.25
アクチンフォワードプライマー (20μM)	0.25
アクチンTaqプローブ (5 μM) Cy5標識付き	0.3
ACCUPRIME TAQ	0.4

【0140】

以下のアッセイフォーマットにおけるように、マスターミックス1 (HIV-1およびCal-1検出) 34 μLのアリコートを、設計された配置の96ウェルプレートの各ウェルの中に小分けし、以下のアッセイフォーマットにおけるように、マスター2ミックス (アクチン検出) 16 μLのアリコートを別個の96ウェルプレートの各ウェルの中に小分けした (図15Bを参照)。

10

20

30

40

50

## 【0141】

設計された配置の各ウェルにHIV-1およびCal-1標準の両方ならびに試験試料の6  $\mu$ Lを添加し、設計された配置の各ウェルにアクチン標準および試験試料の3  $\mu$ Lを添加したのち、以下の条件でPCRを開始した：95 ℃で2分、(94 ℃で15秒、60 ℃で30秒)の45サイクル。

## 【0142】

試薬

ACCUPRIME TAQ (Life-Technology #12339016)

## 【0143】

標準

HIV-1標準：0、4、4×10、4×102、4×103、4×104、4×105、4×106コピー /  $\mu$ L

10

Cal-1標準：0、2、2×10、2×102、2×103、2×104、2×105、2×106コピー /  $\mu$ L

アクチン標準：0、2、2×10、2×102、2×103、2×104、2×105、2×106コピー /  $\mu$ L

## 【0144】

HIV-1組み込みDNAデータを10<sup>6</sup>コピーのGAPDHで正規化した(図6A)。培養期間中、MOLT4細胞においてHIV-1 DNAレベルの有意な上昇が認められた。これは、MOLT4細胞中のHIV-1組み込みの高いレベルを示す。

## 【0145】

10日目および14日目に、MOLT4 Cal-1-20%は、HIV-1 DNAが検出可能であることを示した。しかし、HIV-1 DNAのレベルは、MOLT4細胞のみと比べ、約10~50倍の低さであることが認められた。HIVチャレンジCal-1 100%形質導入MOLT4細胞中にHIV-1 DNAは検出されなかつた。形質導入されたCal-1ベクターがMOLT-4細胞をHIV-1感染から保護したと考えられる。

20

## 【0146】

Cal-1組み込みDNAデータを106コピーのGAPDHで正規化した(図6B)。培養期間中、Cal-1 100%形質導入MOLT4細胞においてCal-1 DNAレベルの有意な上昇が認められた。これは、MOLT4細胞中のHIV-1組み込みの高いレベルを示すものであった。

## 【0147】

4日目および7日目に、MOLT4 Cal-1-20%は、HIV-1 DNAが検出されたことを示した。しかし、Cal-1 DNAのレベルは、Cal-1 100%形質導入MOLT4細胞と比べ、20~60倍の低さであることが認められた。10日目および14日目に、MOLT4 Cal-1-20%においてCal-1 DNAのレベルの低下が認められた。これはHIV-1 DNAデータと相關していた。この実験設定でのCal-1 DNAの消失のせいで、10日目および14日目にHIV-1 DNAレベルは上昇した(図6A)。MOLT4細胞のみの中にCal-1 DNAは検出されなかつた。Cal-1

30

## 【0148】

実施例2B

図6Cは、方法1を使用する、HIV-1 RNAコピー数の特定を可能にする実験の結果を示すグラフを提供する。HIV-1細胞内RNAレベルを検出するために、HIV-1特異的LTR mRNAを分析した(図6C)。4、7、10、14日目に、ReliaPrep RNA Miniprep system (Promega)を溶出量60uLで使用して、調製された細胞ペレットからRNAを抽出した。

## 【0149】

注記：この一工程逆転写酵素リアルタイム(RT)-PCR分析には、LightCycler 480 (Roche)およびLightCycler-480用の白色96ウェルプレートを使用した。

40

## 【0150】

8つ標準および試料分析のためにプロトコルごとに2つのマスター・ミックスを作製した。

## 【0151】

PCRマスター1ミックス：マスター・ミックスはHIV-1 mRNA検出用である。

PCRマスター2ミックス：マスター・ミックスはGAPDH mRNA検出用である。

## 【0152】

(表4) PCRマスター1ミックスはHIV-1 mRNA検出用である。

DNアーゼRNアーゼフリー水	11.20
2 x B (キット由来)	20.00
Tataフォワードプライマー (20 $\mu$ M)	0.50
Imai-LTR-Rev (20 $\mu$ M)	0.50
HIV-1 Tataプローブ (5 $\mu$ M) FAM 標識付き	0.60
RT酵素 (キット由来)	0.40
RNアーゼ阻害剤 (キット由来)	0.80

## 【0153】

10

(表5) マスター ミックス2はGAPDH mRNA検出用である

DNアーゼRNアーゼフリー水	5.60
2 x B (キット由来)	10.00
GAPDH フォワードプライマー (20 $\mu$ M)	0.25
GAPDH フォワードプライマー (20 $\mu$ M)	0.25
GAPDH Taqプローブ (5 $\mu$ M) Cy5標識付き	0.30
RT酵素 (キット由来)	0.20
RNアーゼ阻害剤 (キット由来)	0.40

## 【0154】

20

以下のアッセイフォーマットにおけるように、マスター ミックス1 (HIV-1検出) 34  $\mu$ Lのアリコートを、設計された配置の96ウェルプレートの各ウェルの中に小分けし、以下のアッセイフォーマットにおけるように、マスター2ミックス (GAPDH検出) 16  $\mu$ Lのアリコートを別個の96ウェルプレートの各ウェルの中に小分けした (図15Cを参照)。

## 【0155】

設計された配置の各ウェルにHIV-1標準および試験試料の6  $\mu$ Lを添加し、設計された配置の各ウェルにGAPDH標準および試験試料の3  $\mu$ Lを添加したのち。以下の条件でRT-PCRを開始した：45 で20分、95 で2分、(94 で7秒、60 で30秒) の45サイクル。

## 【0156】

試薬

30

SensiFAST Probe One step kit (BioLine #BIO-76005)

## 【0157】

標準HIV-1標準：0、4、4×10、4×102、4×103、4×104、4×105、4×106コピー /  $\mu$ LGAPDH標準：0、2、2×10、2×102、2×103、2×104、2×105、2×106コピー /  $\mu$ L

## 【0158】

HIV-1 mRNA分析データを106コピーのGAPDHのmRNA発現で正規化した (図6C)。培養期間中、非形質導入MOLT4細胞 ( ) 中に高レベルのHIV-1特異的細胞会合HIV-1 LTR mRNAが検出された。

## 【0159】

40

他方、10日目および14日目に、Cal-1 100%形質導入MOLT4細胞 ( ) においてHIV-1細胞会合HIV-1 LTR mRNAの有意な減少 (約1/1000) が認められた。10日目に、HIV-1細胞会合HIV-1 LTR mRNA ( ) におけるMOLT4 Cal-1-20%実験群のレベル低下 (1/10 ~ 1/100) は、HIV感染からの部分的保護を示すものであった。これらの観察結果は、Cal-1がMOLT4細胞におけるHIV感染の1/1000未満への減少を誘発することができることを示唆した。

## 【0160】

Cal-1形質導入MOLT4細胞中にHIV DNAレベルが検出されないにもかかわらず、図6Cに示すように、HIV-1細胞会合LTR-mRNAはなおも検出可能であった ( )。これは、おそらくはMOLT-4細胞中のHIV-1組み込みDNAの非常に小さな集団から非常に低いレベルのRNA転写が起こっているという指示であった。

50

**【 0 1 6 1 】**

各PCR反応に加えられるDNAの量は、 $1 \sim 2 \times 10^{e5}$ 細胞の推定細胞当量を有するものであつた。したがつて、このアッセイ法におけるHIV-1検出感度は $1 \sim 2 \times 10^{e5}$ 細胞あたり2コピーであつた。HIV-1組み込み度数が $1 \sim 2 \times 10^{e5}$ 細胞あたり2コピー未満であつたならば、アッセイは、このアッセイ法を使用してHIV-1 DNAを検出することができなかつた。

**【 0 1 6 2 】**

認められたHIV-1 LTR-mRNAレベルは、Cal-1を形質導入することができなかつたMOLT4細胞の非常に小さな割合の結果であると考えることができた。

**【 0 1 6 3 】**実施例3

実施例3は、本明細書の実施例1から得られたDNAを使用して方法を比較した、図2(方法1)および図3(方法2)に示す2つの異なるアッセイ法の結果を示す。表6の結果は、1つの反応チューブの中で実施されるマルチプレックスアッセイ法(方法1)を利用し；一方で、表7および8の結果は、2つの別々のチューブの中で実施されるマルチプレックス法(方法2)を利用する。表6、7および8のデータに基づくと、両アッセイは同様な性能を示す。すなわち、両方法から得られた定量データは類似していた。したがつて、本明細書に開示される両方法は、レンチウイルス核酸およびHIV核酸を増幅し、増幅されたレンチウイルス核酸および増幅されたHIV核酸のレベルを定量化することができる。

**【 0 1 6 4 】**

(表6) Cy5標識Cal-1およびFAM標識HIV-1特異的プローブの両方を有する1つのプライマーセットを1つのPCRチューブ中で使用するアッセイ

Cy5標識Cal-1データ			Cq	コピー数 / μL	正規化コピー数／1000コピーGAPDH
A02	Cy5	NTC	N/A	N/A	
B02	Cy5	Cal-1 Std-01	N/A	2	
C02	Cy5	Std-02	38.3 4	20	
D02	Cy5	Std-03	34.2	200	
E02	Cy5	Std-04	29.8 2	2000	
F02	Cy5	Std-05	27.2 5	20000	
G02	Cy5	Std-06	25.5 4	200000	
H02	Cy5	Std-07	18.6 8	200000 0	
A04	Cy5	MOLT4のみ	N/A	N/A	
B04	Cy5	MOLT4のみ	N/A	N/A	
C04	Cy5	HIV-1を感染させたMOLT4	N/A	N/A	
D04	Cy5	HIV-1を感染させたMOLT4	N/A	N/A	
E04	Cy5	Cat1を形質導入したMOLT4	22.8 5	308600	48575
F04	Cy5	Cat1を形質導入したMOLT4	23.0 1	279000	43916
FAM標識HIV-1データ			Cq	SQ	
A03	FAM	NTC	N/A	N/A	
B03	FAM	HIV Std-11	N/A	2	
C03	FAM	Std-12	38.6 7	20	
D03	FAM	Std-13	34.6 7	200	
E03	FAM	Std-14	30.6 4	2000	
F03	FAM	Std-15	27.2 7	20000	
G03	FAM	Std-16	23.3	200000	

10

20

30

40

H03	FAM	Std-17	18.1 7	200000 0	
A04	FAM	MOLT4のみ	N/A	N/A	
B04	FAM	MOLT4のみ	N/A	N/A	
C04	FAM	HIV-1を感染させたMOLT4	30.6 7	2134	818
D04	FAM	HIV-1を感染させたMOLT4	29.0 1	2003	768
E04	FAM	Cat1を形質導入したMOLT4	N/A	N/A	
F04	FAM	Cat1を形質導入したMOLT4	N/A	N/A	

【 0 1 6 5 】

(表7) Cy5標識Cal-1特異的プローブを有するプライマーセットの1つチューブの使用

ウェル	蛍光体	内容物	Cq	コピー数/µL	正規化 コピー数 /1000 コピー GAPDH
A05	Cy5	NTC	N/A	N/A	
B05	Cy5	Std-21	N/A	2	
C05	Cy5	Std-22	37.75	20	
D05	Cy5	Std-23	34.75	200	
E05	Cy5	Std-24	30.23	2000	
F05	Cy5	Std-25	28.18	20000	
G05	Cy5	Std-26	26.06	200000	
H05	Cy5	Std-27	19.83	2000000	
A06	Cy5	MOLT4のみ	N/A	N/A	
B06	Cy5	MOLT4のみ	N/A	N/A	
C06	Cy5	HIV-1を感染させたMOLT4	N/A	N/A	
D06	Cy5	HIV-1を感染させたMOLT4	N/A	N/A	
E06	Cy5	Cat1を形質導入したMOLT4	23.45	388000	61074
F06	Cy5	Cat1を形質導入したMOLT4	23.26	441300	69463

【 0 1 6 6 】

(表8) FAM標識プローブを有するHIV-1特異的プライマーセットのもう1つのチューブを使用する反応

10

20

30

40

ウェル	蛍光体	内容物	Cq	正規化 コピー数 /1000 コピー GAPDH	
				μL	コピー数 / 1000 コピー
A08	FAM	NTC	N/A	N/A	
B08	FAM	HIV Std-31	N/A	2	
C08	FAM	Std-32	38.65	20	
D08	FAM	Std-33	33.86	200	
E08	FAM	Std-34	30.13	2000	
F08	FAM	Std-35	25.66	20000	
G08	FAM	Std-36	21.74	200000	
H08	FAM	Std-37	17.61	2000000	
A09	FAM	MOLT4 のみ	N/A	N/A	
B09	FAM	MOLT4 のみ	N/A	N/A	
C09	FAM	HIV-1を感染させたMOLT4	31.35	966	370
D09	FAM	HIV-1を感染させたMOLT4	31.55	862	331
E09	FAM	Cat1を形質導入したMOLT4	N/A	N/A	
F09	FAM	Cat1を形質導入したMOLT4	N/A	N/A	
ウェル	蛍光体	内容物	Cq	正規化 コピー数 /1000 コピー GAPDH	
				μL	コピー数 / 1000 コピー
A08	FAM	NTC	N/A	N/A	
B08	FAM	HIV Std-31	N/A	2	
C08	FAM	Std-32	38.65	20	
D08	FAM	Std-33	33.86	200	
E08	FAM	Std-34	30.13	2000	
F08	FAM	Std-35	25.66	20000	
G08	FAM	Std-36	21.74	200000	
H08	FAM	Std-37	17.61	2000000	
A09	FAM	MOLT4 のみ	N/A	N/A	
B09	FAM	MOLT4 のみ	N/A	N/A	
C09	FAM	HIV-1を感染させたMOLT4	31.35	966	370
D09	FAM	HIV-1を感染させたMOLT4	31.55	862	331
E09	FAM	Cat1を形質導入したMOLT4	N/A	N/A	
F09	FAM	Cat1を形質導入したMOLT4	N/A	N/A	

【 0 1 6 7 】

実施例4

新たに開発されたLTRベースのアッセイのHIV-1検出感度を評価するために、HIV-1臨床試料を試験した。概して、試験は、開発されたHIV-1アッセイの検出感度を評価し、HIV-1 DNAに対する任意の交差反応性を確認するために実施し、臨床HIV-1患者試料を使用した。HIV-1検出感度を評価するために、14のHIV-1臨床試料を試験した。QIAamp DNA Blood Mini kit (Qiagen Cat No. 51104) を60 μLの溶出量で用いて患者の血液試料1mLからDNAを

10

20

30

40

50

抽出した。実施例5で提供されたプロトコルのようにしてPCR分析を実施した。

【0168】

目的

1) HIV-1アッセイが、方法2のアッセイでHIV-1陽性患者から抽出されたHIV-1 DNAを検出するのに十分な感度を有するかどうかを判定する。

2) Cal-1アッセイが、HIV-1陽性患者から抽出されたDNAに対して任意の交差反応を起こすことがないかどうかを判定する。

【0169】

試料の準備

14のHIV-1陽性試料を分析に使用した。HIV-1およびCal-1検出の分析のために、血液1mL (約 $0.3 \sim 0.7 \times 10^6$  CD4 $^+$ 細胞) からDNAを抽出した。 10

【0170】

結果

HIV-1およびCal-1コピー数を標準によって計算し、1,000,000コピーのアクチンDNAによって正規化した。両標準とも直線を生成した(図9を参照)。HIV-1およびCal-1アッセイはいずれも有効であった。図9に示すように、HIV-1 DNAアッセイは14の試料(試料A~N)中14の試料を検出することができた。Cal-1 DNAアッセイは14の試料のいずれでも検出されなかった。Cal-1アッセイは、HIV-1陽性患者から抽出されたDNAに対して任意の交差反応性を有しなかった。臨床試料中のHIV-1 DNAアッセイのレベルは、2および20個のU1細胞スパイクデータで得られたものと同様のレベルであり、本明細書の実施例4の実験設定が実際の臨床設定と同様のレベルであることを示した。 20

【0171】

実施例5

方法2にしたがってHIV-1およびCal-1 DNAコピー数の特定を2つの別々のチューブアッセイで可能にする実験の結果を示す、実施例5に基づくもう1つの実験を実施した

【0172】

一人のドナーから得られたエクスピボCD4 $^+$ T細胞試料に基づく3セットの試料を調製した：

- a) 非形質導入CD4 $^+$ T細胞
- b) Cal-1レンチをMO12(細胞 $5 \times 10^6$ 個)で形質導入したCD4
- c) Cal-1レンチをMO110(細胞 $5 \times 10^6$ 個)で形質導入したCD4。 30

【0173】

設定a)は実験の負の対照である。設定b)はMO12のCal-1形質導入CD4 $^+$ T細胞である。設定c)はMO110のCal-1形質導入CD4 $^+$ T細胞である。

【0174】

標準的なCal-1形質導入プロトコルで、CD4 $^+$ T細胞へのCal-1レンチの形質導入から14日後にこれらの試料を得た。14日目、非形質導入および形質導入CD4 $^+$ T細胞の3つのソースの5百万個の細胞を液体窒素の気相中で凍結保存した。

【0175】

U1細胞を計数した。U1細胞2、20、200、2000個のアリコートを、細胞 $1 \times 10^6$ 個を含むCD4細胞中にスパイクした。CD4細胞 $1 \times 10^6$ 個のもう1つのアリコートをスパイク対照なしで使用した(形質導入CD4の細胞 $5 \times 10^6$ 個を、アリコートあたり細胞 $1 \times 10^6$ 個を含む等しい量の5つのアリコートに分割したことに留意されたい)。PuriLink Genomic DNA kit (ThermoFisher)を $60 \mu\text{L}$ の溶出量で用いてDNAを抽出した。基本的に、本発明者らは、U1細胞を上記3つの群のCD4 $^+$ T細胞中にスパイクすることによって模擬臨床試料を創製した。U1細胞は、1つの細胞中に組み込みHIV-1ゲノムの2つのコピーを運ぶという理由で、これを選択した。実験設定は以下のとおりである：

- a) 非形質導入CD4 $^+$ T細胞 $1 \times 10^6$ 個あたりU1細胞0、2、20、200および2000個
- b) Cal-1レンチをMO12で形質導入したCD4細胞 $1 \times 10^6$ 個あたりU1細胞0、2、20、200および2000個 50

c) Cal-1レンチをMOI10で形質導入したCD4細胞 $1 \times 10^6$ 個あたりU1細胞0、2、20、200および2000個。

【0176】

方法2にしたがって2つの別々のチューブアッセイを使用してHIV-1組み込みDNA(図8A)およびCal-1組み込みDNA(図8B)データを得た。

【0177】

8つの標準および試料分析のためにプロトコルごとに3つのマスターミックスを作製した。

【0178】

- i) マスターミックス1はHIV-1 DNA検出用である(表9)。
- ii) マスターミックス2はCal-1 DNA検出用である(表10)。
- iii) マスターミックス3はアクチン検出用である(表11)。

10

【0179】

(表9) HIV-1 DNAを検出するためのPCRマスターミックス1(全量は34マイクロリットルであった)。

DNアーゼRNアーゼフリー水	12.40
2 x B(キット由来)	20.00
Tataフォワードプライマー(20 $\mu$ M)	0.50
Imai-LTR-Rev(20 $\mu$ M)	0.50
TARプローブ(5 $\mu$ M) FAM標識付き	0.60

20

【0180】

(表10) Cal-1 DNAを検出するためのPCRマスターミックス2(全量は34マイクロリットルであった)。

DNアーゼRNアーゼフリー水	12.40
2 x B(キット由来)	20.00
NuAf(20 $\mu$ M)	0.50
Imai-LTR-Rev(20 $\mu$ M)	0.50
Cal-1プローブ(5 $\mu$ M) Cy5標識付き	0.60

30

【0181】

(表11) アクチンを検出するためのPCRマスター3ミックス3(全量は17マイクロリットルであった)。

DNアーゼRNアーゼフリー水	6.20
2 x B(キット由来)	10.00
アクチンフォワードプライマー(20 $\mu$ M)	0.25
アクチシリバースプライマー(20 $\mu$ M)	0.25
アクチンプローブ(5 $\mu$ M) FAM付き	0.30

30

【0182】

以下のアッセイフォーマットにおけるように、マスターミックス1(HIV-1検出)およびマスターミックス2(Cal-1検出)の34 $\mu$ Lのアリコートを、設計された配置の96ウェルプレートの各ウェルの中に小分けし、以下のアッセイフォーマットにおけるように、マスター3ミックス(アクチン検出)16 $\mu$ Lのアリコートを別個の96ウェルプレートの各ウェルの中に小分けした(図15Dおよび15Eを参照)。

40

【0183】

設計された配置の各ウェルにHIV-1およびCal-1標準ならびに試験試料の6 $\mu$ Lを添加し、設計された配置の各ウェルにアクチン標準および試験試料の3 $\mu$ Lを添加したのち。以下の条件を使用してPCRを実施した: 95℃で2分、(94℃で7秒、60℃で30秒)の45サイクル。

【0184】

50

試薬

SentiFast Probe kit (Line Cat No. BIO-86005)

## 【0185】

標準

HIV-1標準：0、4、4×10、4×102、4×103、4×104、4×105、4×106コピー /  $\mu$ L

Cal-1標準：0、2、2×10、2×102、2×103、2×104、2×105、2×106コピー /  $\mu$ L

アクチン標準：0、2、2×10、2×102、2×103、2×104、2×105、2×106コピー /  $\mu$ L

## 【0186】

HIV-1組み込みDNAデータを106コピーのアクチンで正規化した（図8A）。

## 【0187】

分析

非形質導入CD4細胞の分析は、1×10e6個のCD4細胞中にスパイクされた2つのU1細胞がこのアッセイによって検出されたこと、ならびに20、200および2000個のU1細胞が検出されることを示した。線形に増加したHIV-1 DNAコピー数が、U1細胞のスパイク量の割合に検出された。

## 【0188】

Cal-1形質導入CD4細胞（MO12）の分析において、結果は、スパイクされた2、20、200、2000個のU1細胞が線形に検出されたことを示した。

## 【0189】

Cal-1形質導入CD4細胞（MO110）の分析において、結果は、スパイクされた2、20、200、2000個のU1細胞もまた線形に検出されたことを示した。

## 【0190】

2、20、200、2000個のU1細胞の分析におけるHIV-1検出値は、3つの群にわたって等しいデータを示し、これは組み込まれたCal-1 DNAがHIV-1検出を妨げないことを示唆した（図8A）。

## 【0191】

Cal-1の組み込みDNAデータを106コピーのアクチンによって正規化した（図8B）。

## 【0192】

Cal-1 DNAアッセイは、CD4細胞中へのU1細胞のスパイクにもかかわらず、非形質導入CD4細胞中にCal-1 DNAを検出しなかった。

## 【0193】

Cal-1形質導入CD4細胞（MO12）の分析の場合、Cal-1 DNAレベルの一貫した検出が認められた。

## 【0194】

「Cal-1形質導入CD4細胞（MO110）」の分析の場合にも、Cal-1 DNAレベルの一貫した検出が認められた。MOI = 10でのCal-1検出値は、MOI = 2でのCal-1検出値の約50倍の高さであり、CD4+T細胞へのより多くのCal-1 DNAの組み込みを示した。

## 【0195】

結論

1) HIV-1アッセイは、患者からの血液1mLから得られたHIV-1 DNAを検出するのに十分な感度を有する（14のHIV-1陽性試料のうち14）。

2) Cal-1アッセイは、HIV-1から抽出されたDNAに対して任意の交差反応性を有しなかった。

## 【0196】

実施例6

3つの試料を試験した：

1. 非形質導入CD4細胞

2. Cal-1レンチをMO12で形質導入したCD4

3. Cal-1レンチをMO110で形質導入したCD4。

## 【0197】

10

20

30

40

50

これらの試料は同じドナーから調製した。

【0198】

試料1は実験の負の対照であり、試料2は、MO12のCal-1形質導入CD4+細胞であり、試料3は、MO110のCal-1形質導入CD4+細胞である。これらの試料は、Cal-1レンチをCD4細胞に形質導入してから14日後に得られた。

【0199】

目的

A) LTR領域に基づく新規なアッセイの評価は、実際のドナー試料を使用してCAL-1組み込みDNAを検出することができる。

B) より高いMOIの形質導入細胞でCAL-1組み込みDNAレベルのコピー数増加を確認する。 10

C) HIV-1アッセイの交差反応性の確認：HIV-1 LTRアッセイは、CAL-1組み込みDNAのみを有するこれらの臨床試料において任意のHIVレベルを検出するはずがない。理由は、これらの試料はHIV-1感染を有しないからである。

D) 社内対照性能のチェック：実際の試料分析のアッセイ妥当化を評価するには、社内対照の確立が重要である。

【0200】

3つの社内対照：

No. 1 < MOLT4 と Cal-1 > MOLT4細胞にCal-1を形質導入した。

No. 2 < 80% MOLT4、20% MOLT4 - Cal-1 > 形質導入した細胞の程度をC46発現のフロー分析によって決定した。この実験設定は、元のMOLT-4細胞（80%）およびCal-1形質導入MOL T-4細胞（20%）の混合集団の導入遺伝子効果のための設定である。 20

No.3 < MOLT4 (Cal-1なし) > Cal-1を形質導入されていない、ただのMOLT4細胞。

【0201】

これらの3つの群の試料にBaL HIV-1を感染させた。MOLT-4の感染から14日後にDNA試料を調製した。

【0202】

2つの別々のチューブアッセイ（方法2）を使用してHIV-1およびCal-1 DNAコピー数の特定を可能にする実験の結果を示す結果（表12、13および14）。

【0203】

HIV-1アッセイ

HIV標準は4~4,000,000コピー/μLからのHIV-1 DNAの良好な線形検出を示した 30

【0204】

同じドナーの3つの試料はHIV-1 DNA検出を示さなかった：（a）対照No.1 < MOLT4 と Cal-1 > はHIVを示さなかった；（b）対照No.2 < 80% MOLT4、20% MOLT4 - Cal-1 > はいくらかのレベルのHIV検出を示した；（c）対照No.3 < Cal-1なしのMOLT4 > は非常に高いHIV検出レベルを示した。

【0205】

Cal-1アッセイ

Cal-1標準は、2~2,000,000コピー/μLからのCal-1 DNAの良好な線形検出を示した：（a）JE #1~3はCal-1組み込みを示さない；（b）MOI = 2で形質導入されたJE #1~3は70.5コピーのCal-1組み込みを示す；（c）MOI = 10で形質導入されたJE #1~3は、MO12の場合の値の2倍である160コピーのCal-1組み込みを示す；（d）対照No.1 < MOLT4 と CAL-1 > はCAL-1 DNA773コピーの高いレベルを示した；（d）対照No.2 < 80% MOLT4、20% MOLT4 - Cal-1 > は非常に低いレベルのCAL-1 DNAコピーを示した；（e）対照No.3 < Cal-1なしのMOLT4 > はCal-1検出のレベルを示さなかった。 40

【0206】

結論

A) LTR領域に基づく新規なアッセイは、同じドナーの実際の臨床試料を使用してCAL-1組み込みDNAを検出することができる。

B) 新規なアッセイは、MO12でのデータとMO110でのデータとを比較することにより、よ 50

り高いMOIの形質導入細胞を有するCAL-1組み込みDNAレベルの増加したコピー数を検出することができる。

C) HIV-1 LTR領域に基づく新規なアッセイは、試料へのCAL-1組み込みDNAの任意の交差反応性を示さない。

D) この新規なアッセイを評価するために、3つの新たな社内対照が非常にうまく作用している。これらの3つの対照は、Cal-1およびHIV-1分析の実施のたびに有用である。

#### 【0207】

HIV-1アッセイの場合：(a) 試料中のHIV-1コピー数はHIV-1標準によって計算され；(b) HIV-1コピー数は同じ抽出DNA中のアクチンDNAコピー数によって正規化され、正規化HIVコピー数は1000コピーのアクチンによって計算され、それが最後の列の青い文字で強調されている。

#### 【0208】

Cal-1アッセイの場合：(a) 試料中のCal-1コピー数はCal-1標準によって計算され；(b) Cal-1コピー数は同じ抽出DNA中のアクチンDNAコピー数で正規化され、正規化Cal-1コピー数は1000コピーのアクチンによって計算され、それが最後の列の青い文字で強調されている。

#### 【0209】

アクチンアッセイの場合：(a) 試料中のアクチンコピー数はアクチン標準によって計算され；(b) これらのコピー数を試料中のHIV-1およびCal-1コピー数の正規化に使用した。

#### 【0210】

表12は、HIV-1標準によって計算された試料中のHIV-1コピー数を提供し；HIV-1コピー数は、同じ抽出されたDNA中のアクチンDNAコピー数によって正規化された。正規化されたHIVコピー数は、最後の列に記載されている1000コピーのアクチンによって計算された。注記：cp（交差点 - PCRサイクル）値は、蛍光が規定のしきい値を達成したサイクルである。HIV標準は4~4,000,000コピー /  $\mu$ LからHIV-1 DNAの良好な線形検出を示した。同じドナーの3つの試料（非形質導入、MOI2で形質導入、MOI10で形質導入）はHIV-1 DNA検出を示さなかった。HIV感染試料の社内対照No. 1 <Cal1ありのMOLT4> はHIVを示さなかった。HIV感染試料の社内対照No. 2 <80% MOLT4、20% MOLT4-Cal1> はいくらかのレベルのHIV検出を示した。HIV感染試料の社内対照No. 3 <Cal1なしのMOLT4> は非常に高いレベルのHIV検出を示した。

#### 【0211】

表13はCal-1分析データを提供する。試料中のCal-1コピー数はCal-1標準によって計算された。Cal-1コピー数は、同じ抽出されたDNA中のアクチンDNAコピー数によって正規化された。正規化されたCal-1コピー数は、最後の列に記載されている1000コピーのアクチンによって計算された。Cal-1標準は2~2,000,000コピー /  $\mu$ LからCal-1 DNAの良好な線形検出を示した。非形質導入JE #1~3はCAL1の組み込みを示さなかった。MOI = 2で形質導入されたJE #1~3は70.5コピーのCAL1組み込みを示した。MOI = 10で形質導入されたJE #1~3は160コピーのCAL1組み込みを示し、これはMOI2の場合の値の2倍である。HIV感染試料の社内対照No. 1 <Cal1ありのMOLT4> は高レベルのCAL1 DNA 773コピーを示した。HIV感染試料の社内対照No. 2 <80% MOLT4、20% MOLT4-Cal1> は非常に低いレベルのCAL1 DNAコピーを示した。HIV感染試料の社内対照No. 3 <Cal1なしのMOLT4> はCal-1検出のレベルを示さなかった。

#### 【0212】

表14はアクチン分析データを提供する。試料中のアクチンコピー数はアクチン標準によって計算された。これらのコピー数を試料中のHIV-1およびCal-1コピー数の正規化に使用した。

#### 【0213】

(表12) HIV CAL アクチンアッセイ

10

20

30

40

位置	名称	Cp	HIV-1 濃度	アクチン	10(3)アクチンコピー あたりのHIV-1コピー
A2	NC		0		
B2	HIV 標準	38.2 2	4		
C2	HIV 標準	33.2 1	40		
D2	HIV 標準	29.8 8	400		
E2	HIV 標準	27.4 4	4000		
F2	HIV 標準	23.4 1	40000		
G2	HIV 標準	20.3 3	400000		
H2	HIV 標準	16.7 3	4000000		
A3	<非形質導入JE #1~3> 5×10 <sup>6</sup> 個を使用		0	111371 66	0
B3	<MOI=2で形質導入された JE #1~3>5×10 <sup>6</sup> 個		0	870510 0	0
C3	<MOI=10で形質導入された JE #1~3>5×10 <sup>6</sup> 個		0	390172 4	0
D3	No. 1対照<Call1ありの MOLT4>HIV14日目		0	44498	0
E3	No. 2対照<80%MOLT4、 20%MOLT4-Ca11> HIV14日目	25.5 7	10598	67407	157
F3	No. 3対照<Ca11なしの MOLT4>HIV14日目	22.3 5	90697	86849	1,044

10

20

30

【 0 2 1 4 】

(表13) HIV CAL アクチンアッセイ

位置	名称	Cp	Cal-1 濃度	アクチン	10(3)アクチンコピー あたりのCal-1コピー
A5	NC		0		
B5	Cal 標準	37.7	2		
C5	Cal 標準	36.8	20		
D5	Cal 標準	34.13	200		
E5	Cal 標準	30.76	2000		
F5	Cal 標準	27.48	20000		
G5	Cal 標準	23.6	200000		
H5	Cal 標準	20.45	2000000		
A6	<非形質導入JE #1~3> 5×10 <sup>6</sup> 個を使用			1113716 6	0.0
B6	<MOI=2で形質導入された JE #1~3>5×10 <sup>6</sup> 個	22.6	613511	8705100	70.5
C6	<MOI=10で形質導入された JE #1~3>5×10 <sup>6</sup> 個	22.58	622911	3901724	159.7
D6	No. 1対照<Cal1ありの MOLT4>HIV14日目	26.39	34388	44498	772.8
E6	No. 2対照<80%MOLT4、 20%MOLT4-Cal1> HIV14日目	32.29	388	67407	5.7
F6	No. 3対照<Cal1なしの MOLT4>HIV14日目		0	86849	0.0

10

20

30

【 0 2 1 5 】

(表14) HIV CAL アクチンアッセイ

位置	名称	Cp	アクチン濃度
A8	NC		0
B8	アクチン標準	39.56	2
C8	アクチン標準	39.56	20
D8	アクチン標準	34.78	200
E8	アクチン標準	30.85	2000
F8	アクチン標準	28.03	20000
G8	アクチン標準	24.26	200000
H8	アクチン標準	21.48	2000000
A9	<非形質導入JE #1~3>5×10 <sup>6</sup> 個を使用	18.97	11137166
B9	<MOI=2で形質導入されたJE #1~3>5×10 <sup>6</sup> 個	19.32	8705100
C9	<MOI=10で形質導入されたJE #1~3>5×10 <sup>6</sup> 個	20.46	3901724
D9	No. 1対照<Cal1ありのMOLT4> HIV 14日目	26.81	44498
E9	No. 2対照<80%MOLT4、20% MOLT4-Cal1>HIV 14日目	26.22	67407
F9	No. 3対照<Cal1なしのMOLT4>HIV 14日目	25.86	86849

## 【0216】

## 実施例7

MOLT-4感染モデルに基づく3セットの試料を調製した。図10は、MOLT-4細胞における形質導入効率（図10A）を示すグラフ、ならびにHIV-1感染MOLT-4細胞から放出されたHIV-1ウイルスの量をRTアッセイ（図10B、C）および一工程逆転写酵素リアルタイム（RT）-PCR分析（図10D）によって検出するための培養上清分析を示すグラフを提供する。

## 【0217】

HIV-1感染からのCal-1保護の影響を見るために、MOLT-4細胞に基づく3セットの試料を調製した。

## 【0218】

- A) Cal-1レンチベクターを形質導入されていない、ただのMOLT-4細胞；
- B) レンチccr5ベクターを形質導入したMOLT-4細胞；
- C) Cal-1レンチベクターを形質導入したMOLT-4細胞。

## 【0219】

MOLT-4細胞にレンチsh5およびレンチCal-1をMOI2.5で形質導入した。48時間のインキュベーションののち、MOLT-4細胞に対して2F5およびccr5染色を利用して、フローサイトメトリー分析によって形質導入を判定した。

## 【0220】

図10Aは、レンチccr5およびCal-1（ccr5およびC46）を有するMOLT-4細胞のフロー分析を提供する。レンチccr5だけを形質導入したMOLT-4細胞はCCR5発現の約75%の減少を示した。レンチCal-1を形質導入したMOLT-4細胞のデータは、細胞の約89%がC46を発現し、CCR5発現の約68%の減少が認められることを明らかにした。

## 【0221】

10

20

30

40

50

図10Bは、方法2にしたがって2つの別々のチューブアッセイを使用した、HIV-1感染後、レンチccr5を有するMOLT4およびCal-1を有するMOLT4の逆転写酵素アッセイを提供する。形質導入から48時間後、MOLT4細胞にBaLをMOI 0.2で感染させた。形質導入から7日後、培養上清における逆転写酵素活性を試験した。CCR5とC46融合阻害剤（Cal-1）との組み合わせは、レンチccr5形質導入MOLT4細胞および非形質導入MOLT4細胞の逆転写酵素活性と比べ、有意に抑えられた逆転写酵素活性を示した。

#### 【0222】

本発明者らは、この反復実験によって以前のデータを確認するために、実施例1に記載された実験設定と同一である、MOLT-4細胞に基づいて調製されたさらに3セットの試料をセットアップした。

10

#### 【0223】

- a. Cal-1レンチウイルスを形質導入されていない、ただのMOLT-4細胞；
- b. MOLT-4細胞80%と、Cal-1レンチウイルスを形質導入したMOLT-4細胞20%。形質導入細胞の程度は、C46発現のフローサイトメトリー分析によって決定した。この実験設定は、元のMOLT-4細胞（80%）とCal-1形質導入MOLT-4細胞（20%）との混合集団の導入遺伝子効果のための設定である；
- c. MOLT4 Cal-1（100%）。フローサイトメトリーでのC46発現によって判定されるように細胞100%にCal-1を形質導入した。

#### 【0224】

実験手順は本明細書の実施例1と同じであった。簡潔にいうと、これらの細胞約50万個にHIV-1 BaLを感染させた。これらの細胞を、25cm<sup>2</sup>培養フラスコ中、10% FBSを1×GlutaMAXサプリメントとともに含有する標準的なRPMI-1640ベースの培地10mLを使用してCO2インキュベータ中で培養した。4、7、10、14日目に、RTアッセイ（図10C）および逆転写酵素リアルタイム（RT）-PCRアッセイ（図10D）のために培養上清試料（1mL）を取り出した。また、4、7、10、14日目に、DNA（図11AB）およびRNA（図12AB）両方の細胞内分析のために培養細胞試料を調製した。各時点において、DNA分析のための培養細胞懸濁液0.6mLおよびRNA分析のための培養細胞懸濁液0.4mLを標準的なエッペンドルフチューブ2.0mLに移した。これらのチューブを900gで3分間遠心分離した。上清を取り出した。PBS 1mLを各チューブに加えたのち、900gで3分間遠心分離した。上清を取り出した。細胞ペレットをRNAおよびDNA分析に使用した。

20

#### 【0225】

図10Cは、3つの条件：(a) MOLT4にCal-1を形質導入した場合；(b) 80%非形質導入MOLT4と20%Cal-1形質導入MOLT4とを混合した場合；および(c) モック対照の、逆転写酵素アッセイの時間経過データを提供する。データは、14日目に20%Cal-1形質導入MOLT4細胞と80%非形質導入MOLT4細胞との混合培養物および非形質導入MOLT4細胞（モック対照）と比べ、14日目にCal-1形質導入MOLT4細胞において、逆転写酵素活性の対数値で2を超える減少が認められたことを明らかにする。

30

#### 【0226】

逆転写酵素アッセイ（RTアッセイ）（図10C）を使用して、感染したMOLT-4から放出された培養上清10μL中のHIV-1の量を計測した（Suzuki K, et al: Poly A-linked non-isotopic microtiter plate reverse transcriptase assay for sensitive detection of clinical human immunodeficiency virus isolates. J Virol Methods 1995, 55:347-356）。

40

#### 【0227】

図10Dは、培養上清500μLを使用した、方法2によるHIV-1 RNAコピー数の特定を可能にする実験の結果を示すグラフを提供する。自動抽出システム（EasyMag, bioMerieux）を溶出量設定60μLで使用して、培養上清からRNAを抽出した。

#### 【0228】

一工程逆転写酵素リアルタイムPCR分析には、LightCycler-480（Roche）およびLightCycler-480用の白色96ウェルプレートを使用した。

50

## 【0229】

8つ標準および試料分析のためにプロトコルごとにマスターMixを作製した（表15を参照）。

## 【0230】

（表15）HIV-1 mRNA検出用のPCRマスターMix（Mixの全量は34マイクロリットルであった）。

DNアーゼRNアーゼフリー水	11.20
2 x B（キット由来）	20.00
Tataフォワードプライマー (20 μM)	0.50
Imai-LTR-Rev (20μM)	0.50
HIV-1 Tataプローブ (5 μM) FAM 標識付き	0.60
RT酵素（キット由来）	0.40
RNアーゼ阻害剤（キット由来）	0.80

10

## 【0231】

マスターMix 34 μLのアリコートを96ウェルプレートの各ウェルの中に小分けした。

## 【0232】

指定された配置の各ウェルに標準および試料6 μLを添加したのち。

20

## 【0233】

以下の条件を使用してRT-PCRを開始した：45 ℃で20分、95 ℃で2分、（94 ℃で7秒、60 ℃で30秒）の45サイクル。

## 【0234】

試薬

SensiFAST Probe One step kit ( BioLine #BIO-76005 )

## 【0235】

標準

HIV-1標準：0、4、4×10、4×102、4×103、4×104、4×105、4×106コピー / μL

30

## 【0236】

図10Dは、一工程逆転写酵素リアルタイム（RT）-PCR分析の時間経過データを提供する。このTaqManベースのリアルタイムPCRアッセイによって以前のRTデータを確認した。図は、14日目に、細胞20%Cal-1形質導入MOLT4と80%非形質導入MOLT4細胞との混合培養物および非形質導入MOLT4細胞（モック対照）からのデータと比べ、Cal-1形質導入MOLT4細胞の培養上清から抽出されたHIV-1 RNAにおいて対数値で2を超える減少が認められたことを明らかにする。

## 【0237】

注記：これらの試料に関してはCal-1アッセイを実施しなかった。これらの試料に関してはHIV-1特異的検出だけを実施した。

## 【0238】

実施例8

図11Aおよび11Bは、方法2にしたがって2つの別々のチューブアッセイを使用した、HIV-1 DNAおよびCal-1 DNAコピー数の特定を可能にする実験の結果を示すグラフを提供する。

40

## 【0239】

4、7、10、14日目に、PurLink Genomic DNA kit ( ThermoFisher ) を溶出量60uLで使用して、調製された細胞ペレットからDNAを抽出した。

## 【0240】

注記：この一工程リアルタイムPCR分析には、LightCycler 480 ( Roche ) およびLightCycler-480用の白色96ウェルプレートを使用した。

50

## 【0241】

8つ標準および試料分析のためにプロトコルごとに3つのマスター・ミックスを作製した(表16、17および18を参照)。

【0242】

- i) マスター・ミックス1はHIV-1 DNA検出用である。
- ii) マスター・ミックス2はCal-1 DNA検出用である。
- iii) マスター・ミックス3はアクチン検出用である。

【0243】

(表16) HIV-1 DNA検出用のPCRマスター1ミックス(ミックスの全量は34マイクロリットルであった)。

DNアーゼRNアーゼフリー水	12.40
2 x B(キット由来)	20.00
Tataフォワードプライマー(20 μM)	0.50
Imai-LTR-Rev(20μM)	0.50
TARプローブ(5 μM) FAM標識付き	0.60

10

【0244】

(表17) Cal-1 DNA検出用のPCRマスター・ミックス2(ミックスの全量は34マイクロリットルであった)。

DNアーゼRNアーゼフリー水	12.40
2 x B(キット由来)	20.00
NuAf(20μM)	0.50
Imai-LTR-Rev(20μM)	0.50
Cal-1Rプローブ(5 μM) Cy5標識付き	0.60

20

【0245】

(表18) アクチン検出用のPCRマスター・ミックス3(ミックスの全量は17マイクロリットルであった)。

DNアーゼRNアーゼフリー水	6.20
2 x B(キット由来)	10.00
アクチンフォワードプライマー(20 μM)	0.25
アクチンリバースプライマー(20 μM)	0.25
アクチンプローブ(5 μM) FAM付き	0.30

30

【0246】

マスター1ミックス34 μLのアリコートを96ウェルプレートの各ウェルの中にウェルの設計された配置で小分けした。マスター2ミックス34 μLのアリコートを96ウェルプレートの各ウェルの中に小分けし、マスター3ミックス17 μLのアリコートを96ウェルプレートの各ウェルの中に小分けした。

【0247】

マスター1ミックスおよびマスター2の各ウェルに標準および試料の6 μLを添加し、マスター3ミックスの各ウェルに標準および試料の3 μLを添加したのち

40

【0248】

以下の条件でPCRを開始した：95 で2分、(94 で7秒、60 で30秒)の45サイクル。

【0249】

試薬

SentiFast Probe kit (Line Cat No. B10-86005)

【0250】

標準

HIV-1標準：0、4、4×10、4×102、4×103、4×104、4×105、4×106コピー/μL

50

Cal-1標準：0、2、2×10、2×102、2×103、2×104、2×105、2×106コピー/μL

アクチン標準：0、2、2×10、2×102、2×103、2×104、2×105、2×106コピー /  $\mu$ L

【0251】

Cal-1組み込みDNAおよびHIV-1組み込みDNAデータを1000コピーのアクチンで正規化した（図11AB）。

【0252】

図11Aは、本開示の態様によるCal-1検出の結果を示す。本明細書に開示される、図3に示すアッセイ法に基づくTaqManベースのDNA PCR法によってCal-1組み込みDNAを増幅した。3セットのMOLT4ベースの感染実験から抽出されたDNAを用いてリアルタイムDNA PCRを実施した。データは、4日目から14日目までの実験を通して、組み込みCal-1 DNAレベル（アクチンによって正規化）の一貫した存在がCal-1形質導入MOLT4細胞中に検出されたことを示す。MOLT4細胞（モック対照）中にCal-1 DNAは検出されなかった。4日目および7日目に明白なように、20%Cal-1形質導入MOLT4細胞と80%非形質導入MOLT4細胞との混合培養物中にCal-1 DNAの組み込みレベルの有意な低下が認められた。10日目および14日目までに、これらのレベルは検出不可能なレベルまでさらに低下した。1000コピーのアクチンDNAによってCal-1コピー数を正規化した。

10

【0253】

図11Bは本開示の態様のHIV-1検出の結果を示す。HIV-1感染後4日目から14日目に、非形質導入MOLT4細胞と比べ、Cal-1形質導入MOLT4細胞において、HIV-1 DNAの組み込みレベルにおける対数値で3を超える減少が認められた。このデータは、Cal-1レンチウイルスベクターの形質導入のうち、HIV-1感染からのMOLT4細胞の保護を確認する。4日目および7日目と比べ、10日目および14日目における、20%Cal-1形質導入MOLT4細胞と80%非形質導入MOLT4細胞との混合培養物中のHIV-1 DNAの高められたレベル。10日目および14日目の、20%Cal-1形質導入MOLT4細胞と80%非形質導入MOLT4細胞との混合培養物中のCal-1 DNAデータは、これらの時点における組み込みCal-1 DNAの消失を示唆した。したがって、10日目および14日目に、混合培養物中のHIV-1 DNAレベルの上昇が認められた。これらのデータもまた、HIV-1感染から保護するCal-1導入遺伝子の機能を示唆する。1000コピーのアクチンDNAによってHIV-1コピー数を正規化した。

20

【0254】

実施例9

図12Aは、方法2を用いた、HIV-1 RNAコピー数の特定を可能にする実験の結果を示すグラフを提供する。HIV-1細胞内RNAレベルを検出するために、HIV-1特異的LTR mRNAを分析した（図12A）。4、7、10、14日目に、ReliaPrep RNA Miniprep system (Promega) を溶出量60uLで使用して、調製された細胞ペレットからRNAを抽出した。

30

【0255】

注記：この一工程逆転写酵素リアルタイム（RT）-PCR分析には、LightCycler 480およびLightCycler-480用の白色96ウェルプレートを使用した。

【0256】

8つ標準および試料分析のためにプロトコルごとに2マスター・ミックスを作製した（表19および20を参照）。

40

【0257】

PCRマスター1ミックス：マスター・ミックスはHIV-1 mRNA検出用である。

PCRマスター2ミックス：マスター・ミックスはGAPDH mRNA検出用である。

【0258】

（表19）HIV mRNA検出用PCRマスター1ミックス（ミックスは34マイクロリットルの全量を有した）。

DNアーゼRNアーゼフリー水	11.20
2 x B (キット由来)	20.00
NuAf (20μM)	0.50
Imai-LTR-Rev (20μM)	0.50
HIV-1 Tataプローブ (5 μM) FAM 標識付き	0.60
RT酵素 (キット由来)	0.40
RNアーゼ阻害剤 (キット由来)	0.80

## 【0259】

10

(表20) GAPDH mRNA検出用PCRマスター2ミックス (ミックスは17マイクロリットルの全量を有した)。

DNアーゼRNアーゼフリー水	5.60
2 x B (キット由来)	10.00
GAPDHフォワードプライマー (20 μM)	0.25
GAPDHフォワードプライマー (20 μM)	0.25
GAPDH Taqプローブ (5 μM) Cy5標識付き	0.30
RT酵素 (キット由来)	0.20
RNアーゼ阻害剤 (キット由来)	0.40

20

## 【0260】

マスター1ミックス34 μLのアリコートを96ウェルプレートの各ウェルの中に小分けし、マスター2ミックス17 μLのアリコートを、96ウェルプレートの各ウェルの中に、ウェルの設計された配置で小分けした。

## 【0261】

マスター1ミックスの各ウェルに標準および試料の6 μLを添加し、マスター2ミックスの各ウェルに標準および試料の3 μLを添加したのち、以下の条件でPCRを開始した：45 で20分、95 で2分、(94 で7秒、60 で30秒)の45サイクル。

## 【0262】

30

試薬

SensiFAST Probe One step kit (BioLine #BIO-76005)

## 【0263】

標準

HIV-1標準：0、4、4×10、4×102、4×103、4×104、4×105、4×106コピー / μL

GAPDH標準：0、2、2×10、2×102、2×103、2×104、2×105、2×106コピー / μL

## 【0264】

HIV-1 mRNA分析データをGAPDHのmRNA発現の10<sup>6</sup>コピーで正規化した(図12A)。

## 【0265】

実施例10

PBMC感染モデルに基づく2セットの試料を調製した。HIV-1感染PBMCから放出されたHIV-1ウイルスの量をRTアッセイ(図13A)および一工程逆転写酵素リアルタイム(RT)-PCR分析(図13B)によって検出するための培養上清分析。

40

## 【0266】

HIV-1感染からのCal-1保護の影響を見るために、PBMCに基づく2セットの試料を調製した。

## 【0267】

A) Cal-1レンチウイルスベクターを形質導入していない、ただのPBMC。

B) Cal-1レンチウイルスベクターを形質導入したPBMC。

## 【0268】

一人の健康なドナーによってPBMCを調製した。培養前3日間、標準的なPHA刺激法を使用

50

してPNMCを刺激したのち、レンチCal-1をMOI 2.5で形質導入した。

#### 【0269】

実験手順は以下のとおりであった。形質導入されたPBMCおよび形質導入なしのただのPBMCのそれぞれ300万個にHIV-1 BaLに感染させた。これらの細胞を、6ウェル培養プレート中、10%FBSを1×GlutaMAXサプリメントとともに含有する標準的なRPMI-1640ベースの培地4mLを使用してCO2インキュベータ中で培養した。4、7、10、14日目に、RTアッセイ(図13A)および逆転写酵素リアルタイム( RT ) - PCRアッセイ(図13B)両方の分析のために培養上清試料(1mL)を取り出した。また、4、7、10、14日目に、DNA(図14AB)およびRNA(図14C)両方の細胞内分析の分析ために培養細胞試料を調製した。各時点において、DNA分析のための培養細胞懸濁液0.6mLおよびRNA分析のための培養細胞懸濁液0.4mLを標準的なエッペンドルフチューブ2.0mLに移した。これらのチューブを900gで3分間遠心分離した。上清を取り出した。PBS 1mLを各チューブに加えたのち、900gで3分間遠心分離した。上清を取り出した。細胞ペレットをRNAおよびDNA分析に使用した。

#### 【0270】

図13Bは、方法2にしたがって培養された上清中のRNAに対する逆転写酵素リアルタイムPCR分析を示す。培養上清から抽出されたRNAを使用して、TaqManベースのリアルタイム逆転写酵素PCRアッセイによって図14aの逆転写酵素データを確認した。7日目および10日目に、非形質導入PBMC(モック対照)と比べ、Cal-1形質導入PBMCの培養上清からのHIV-1 RNAにおいて1/5に減少した。

#### 【0271】

逆転写酵素アッセイ( RTアッセイ ) (図13A)を使用して、感染したPBMCから放出された培養上清10 μL中のHIV-1の量を計測した( Suzuki K, et al: Poly A-linked non-isotopic micro titer plate reverse transcriptase assay for sensitive detection of clinical human immunodeficiency virus isolates. J Virol Methods 1995, 55:347-356 )。

#### 【0272】

図13Aは、健康なドナーからのPBMCに基づく逆転写酵素アッセイデータを示す。HIV-1感染後4日目および7日目に、非形質導入PBMCと比べ、Cal-1形質導入PBMCにおいて逆転写酵素活性のレベルが1/5未満に低下した。

#### 【0273】

本明細書に挙げられたすべての刊行物が参考により全体として本明細書に組み入れられる。広義に記載された開示の精神または範囲を逸脱することなく、特定の態様において示されたような開示に対して数多くの変更および/または修飾を加え得ることが当業者によって理解されよう。したがって、本態様は、あらゆる点において限定的ではなく例示的なものとみなされなければならない。

#### 【0274】

特定の態様を参考しながら本明細書の開示を説明したが、これらの態様は単に本開示の原理および用途を例示するものであることが理解されよう。したがって、添付の特許請求の範囲によって画定される本開示の精神および範囲を逸脱することなく、例示的な態様に対して数多くの修飾を加え得、他の構成を考案し得ることが理解されなければならない。

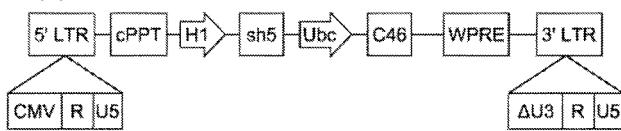
10

20

30

40

【図 1 A】



【図 1 B】

Cal-1 U3 領域  
TCACATGccccAGAAcTgcATccccACTcACTggCTCTCTGG

HIV-1 U3 領域  
TCACATGccccAGAAcTgcATccccA : : gACTTCAGAAATgcTACA : :  
T460 T470 T480 T490 T495 T500 T505 T510 T515 T520 T525 T530 T535 T540

TCACATGccccAGAAcTgcATccccACTcACTggCTCTCTGG

差異：

【図 1 C】

TccAGctTccTACAAcggACTTccGCTggggACTTCCA  
1450 1460 1470 1480  
AccAaCTTSWRcMWggACKYTccKCTggggACTWcYA

【図 1 C】

① A

【図 1 D】

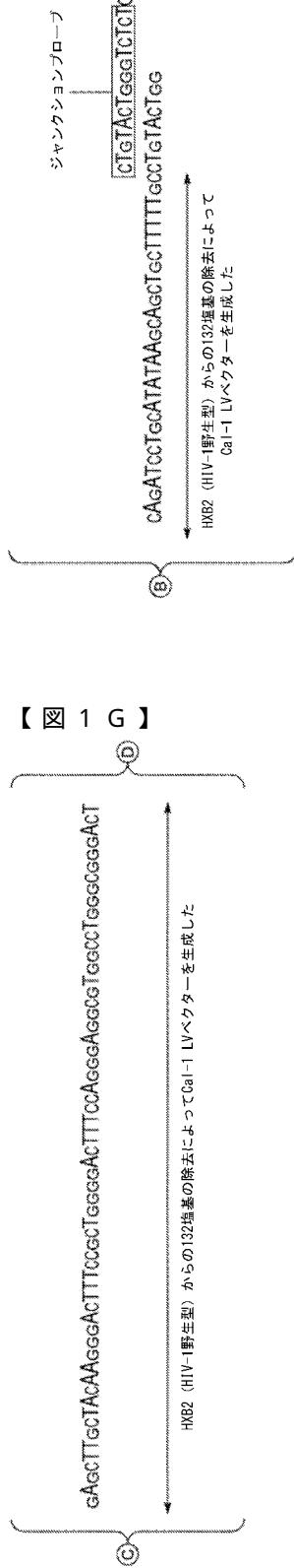
ジャンクションプローブ  
CATTTcATCACATGccccAGAAcTgcATccccA

② Cal-1 U3 領域  
③ Cal-1 R 開始領域  
④ U3 領域 HX32a

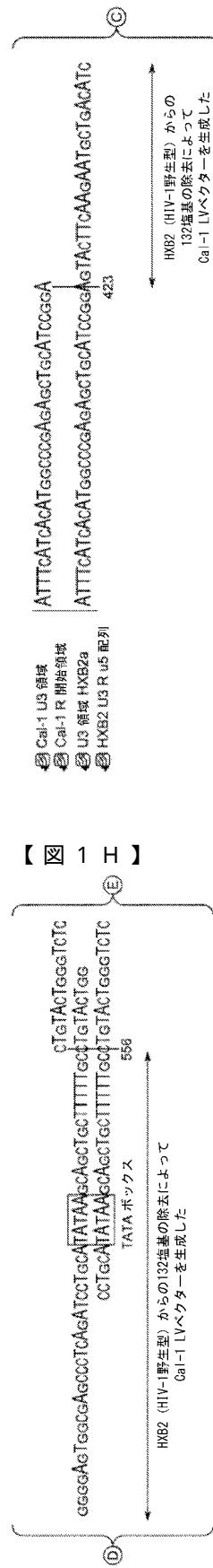
HMB2 (HIV-1野生型) からの  
132塩基の除去によって  
Cal-1 いべクターを  
生成した

【図 1 D】

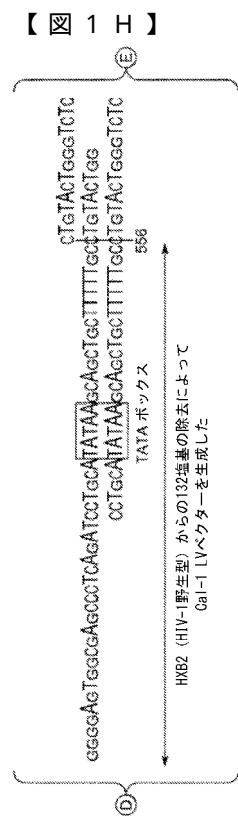
【 図 1 E 】



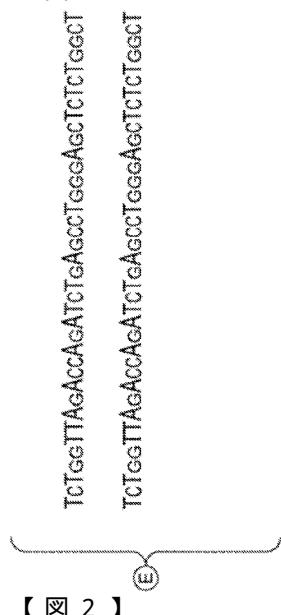
【 図 1 F 】



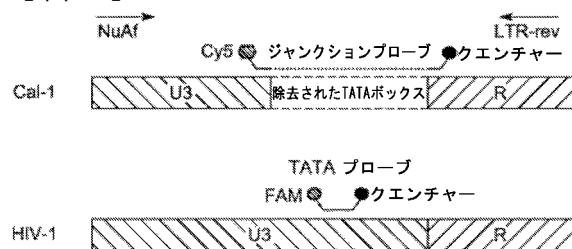
## 【図1G】



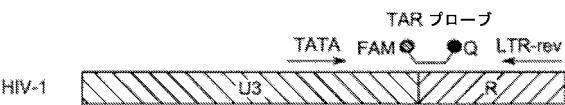
【図1】



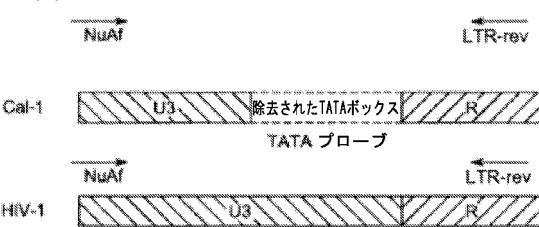
【図2】



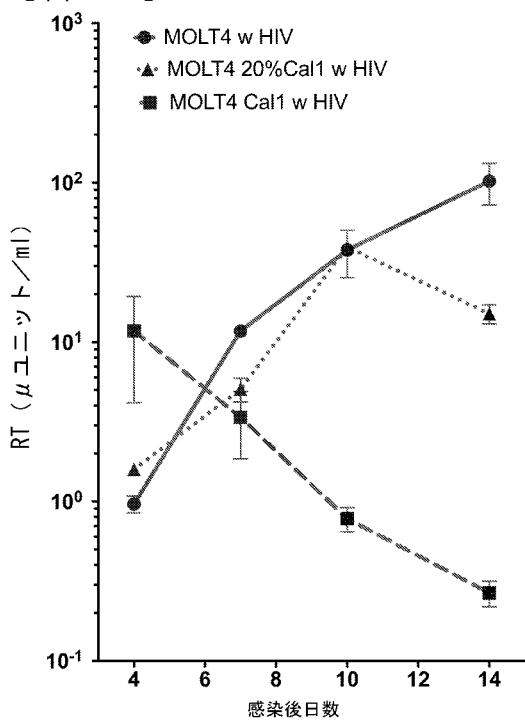
【図3】



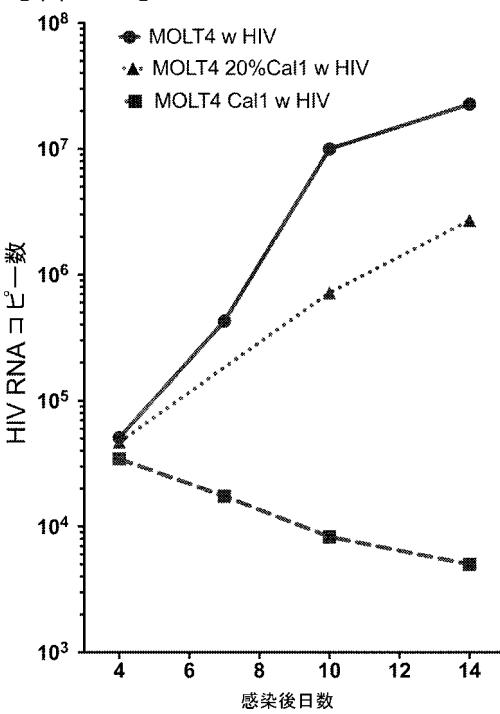
【図4】



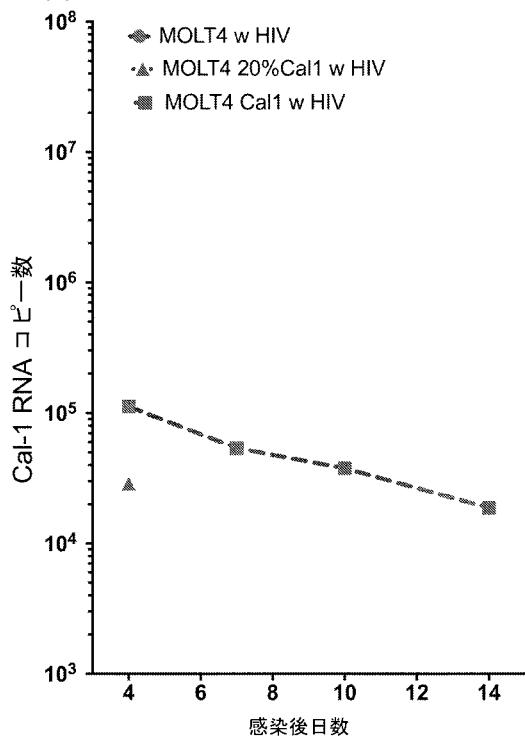
【図5】



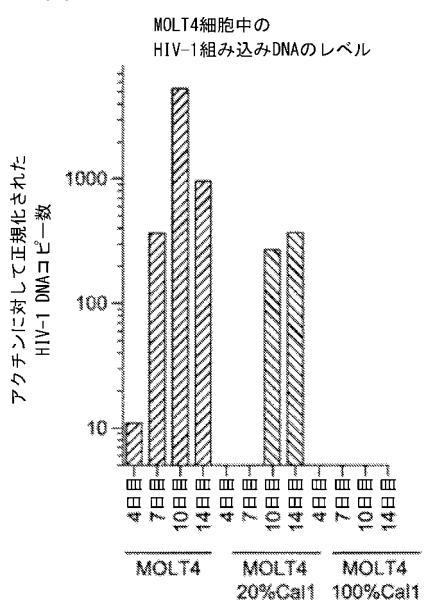
【図5】



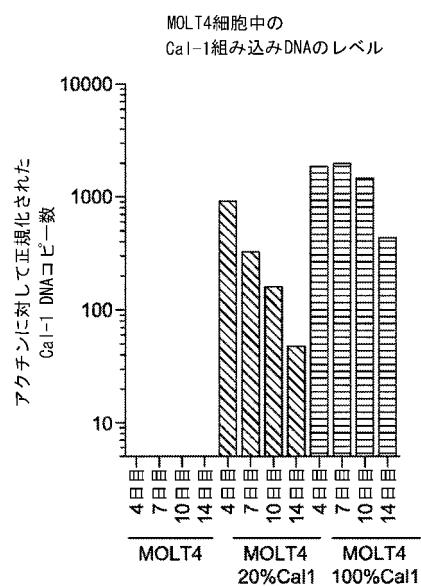
【図 5 C】



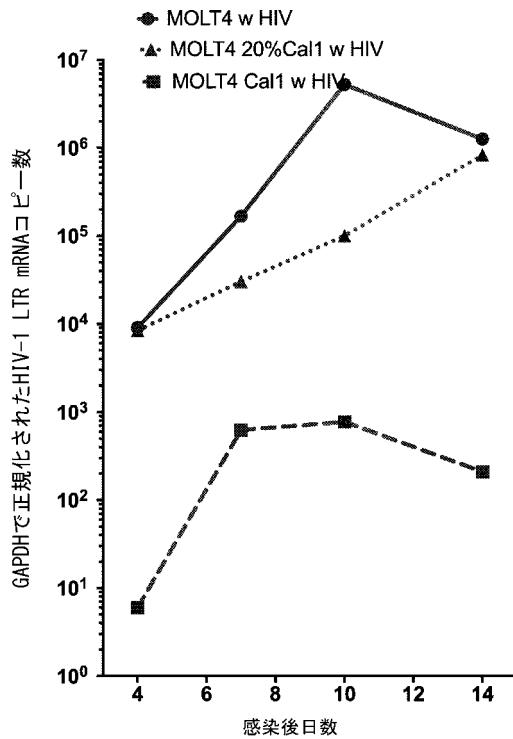
【図 6 A】



【図 6 B】



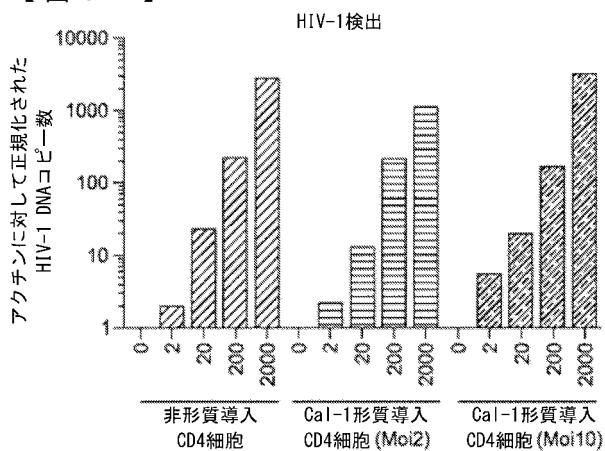
【図 6 C】



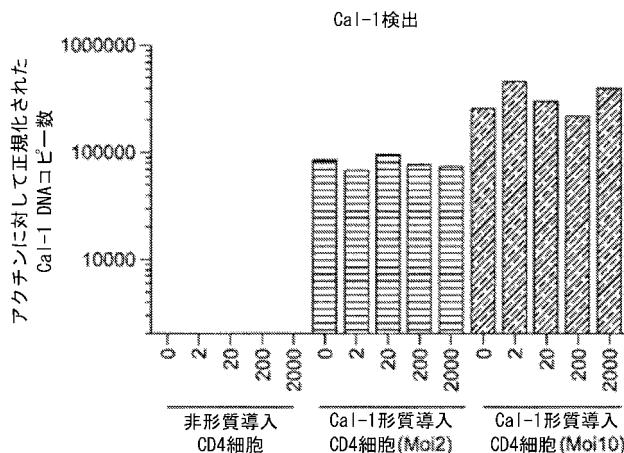
【図7】

H<sub>2</sub>O Cal-1 HIV-1

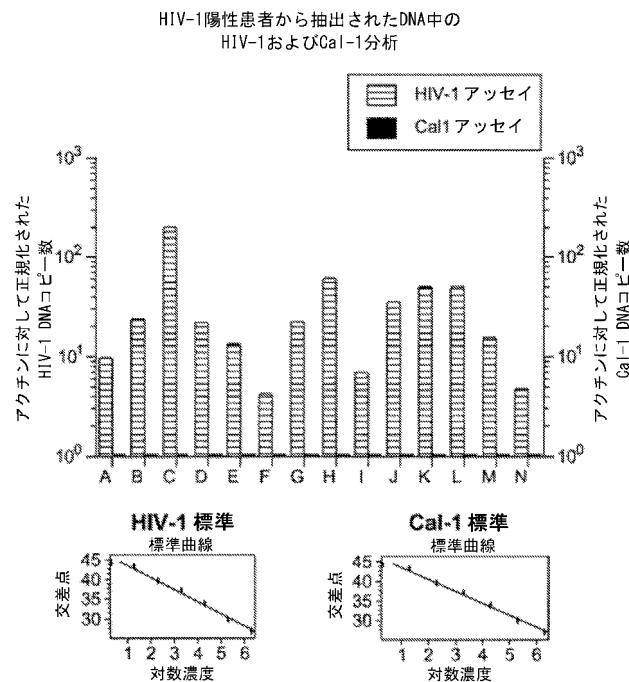
【図8 A】



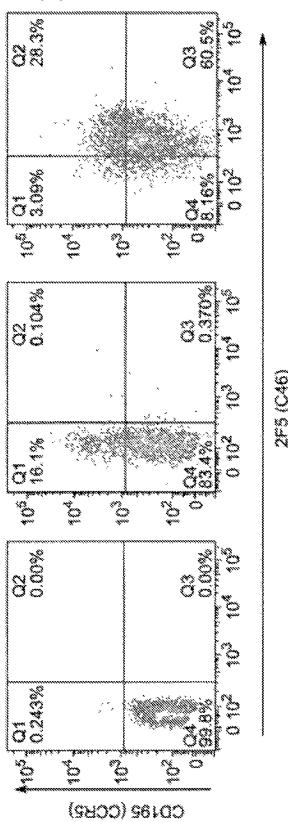
【図8 B】



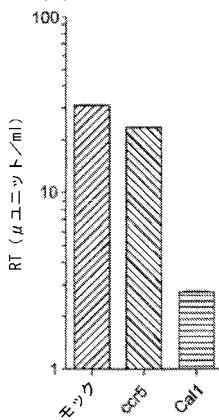
【図9】



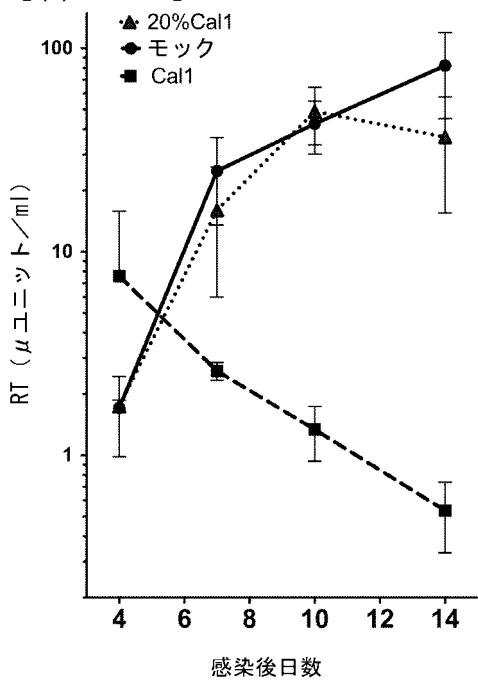
【図 10 A】



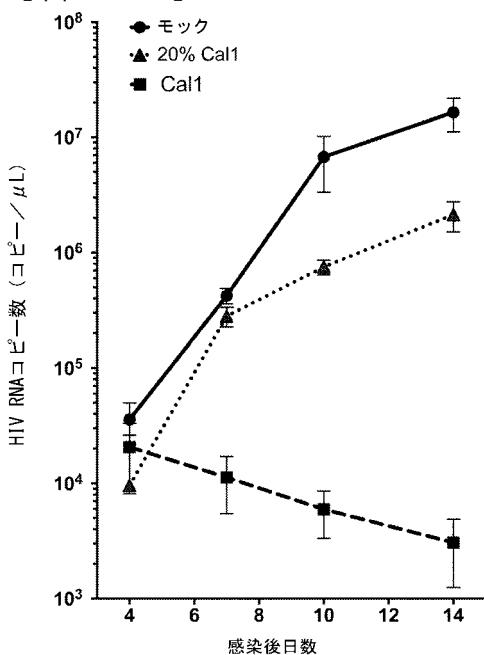
【図 10 B】



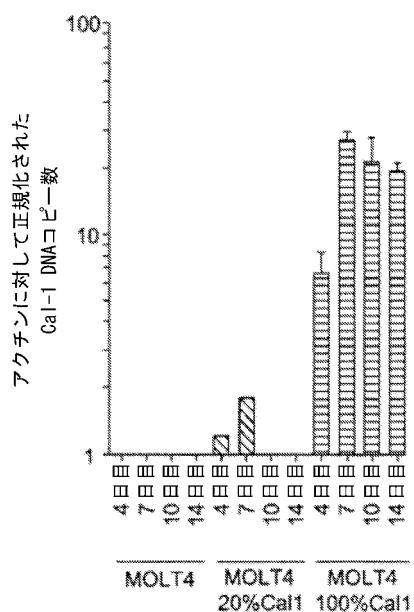
【図 10 C】



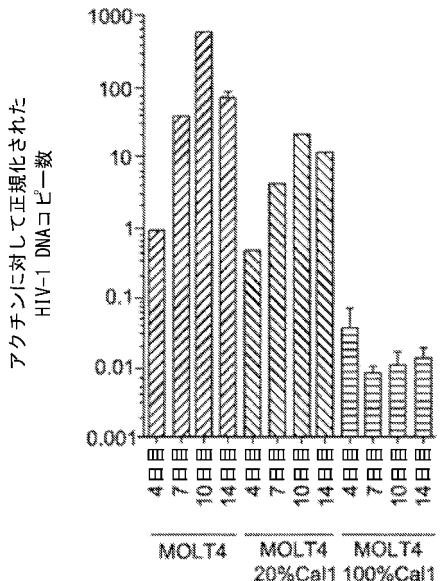
【図 10 D】



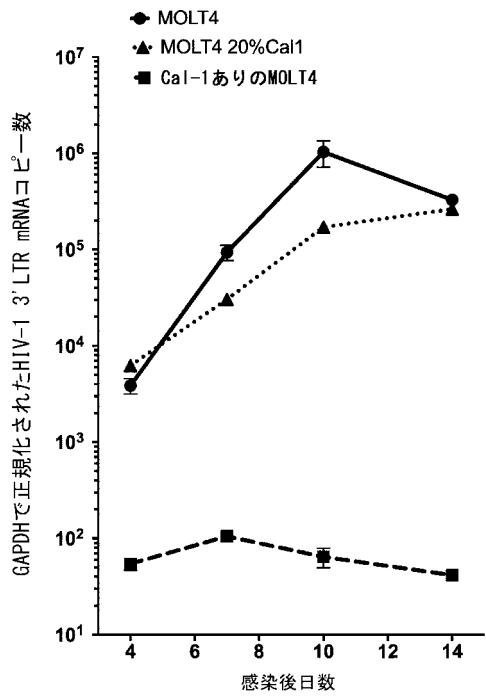
【図 1 1 A】



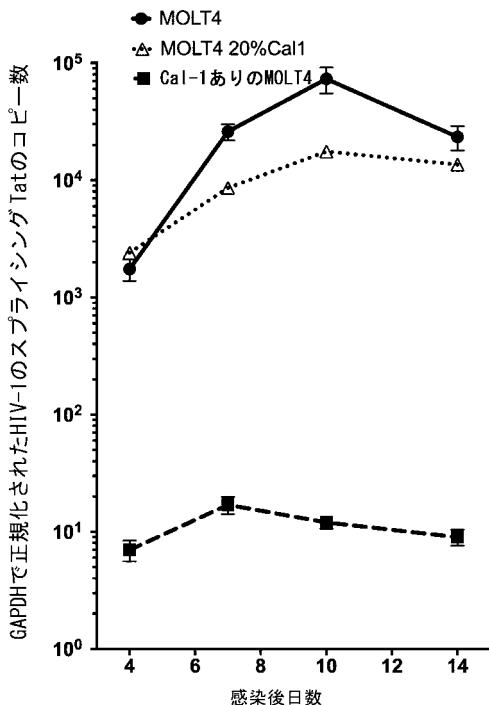
【図 1 1 B】

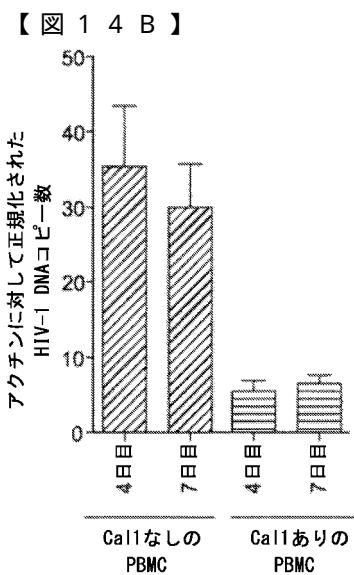
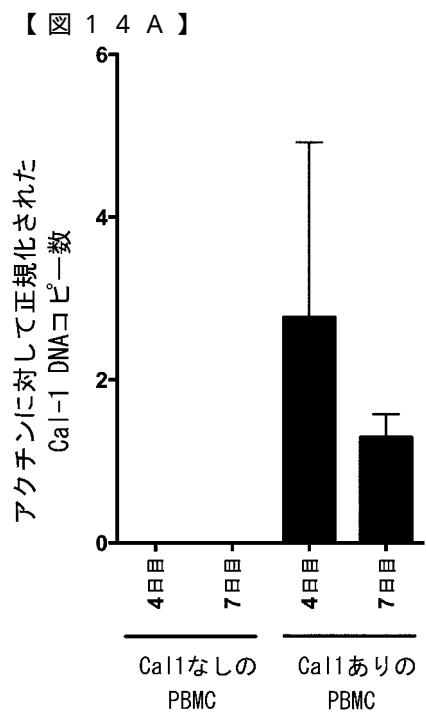
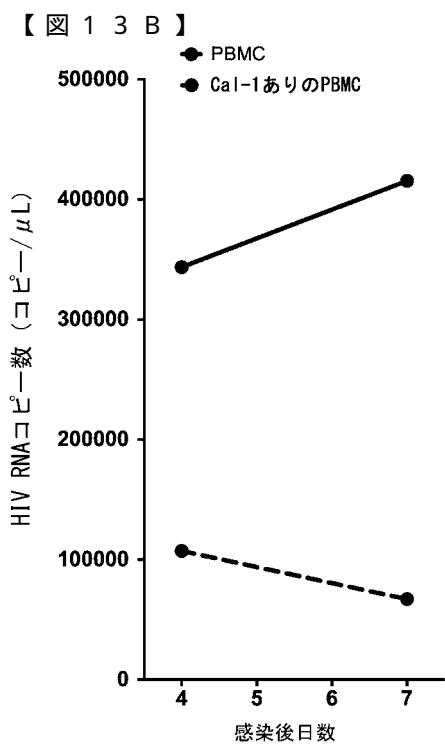
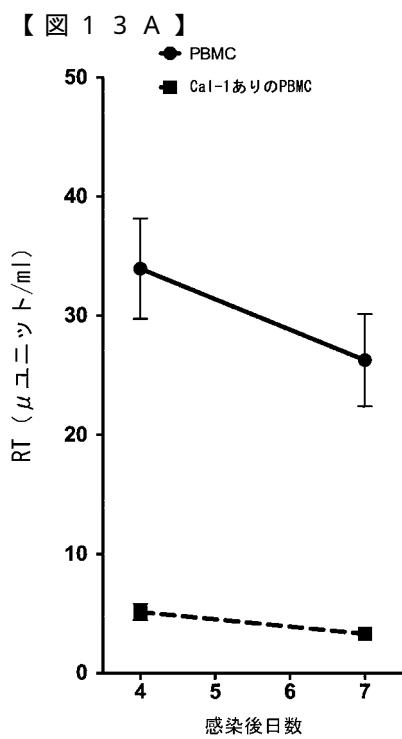


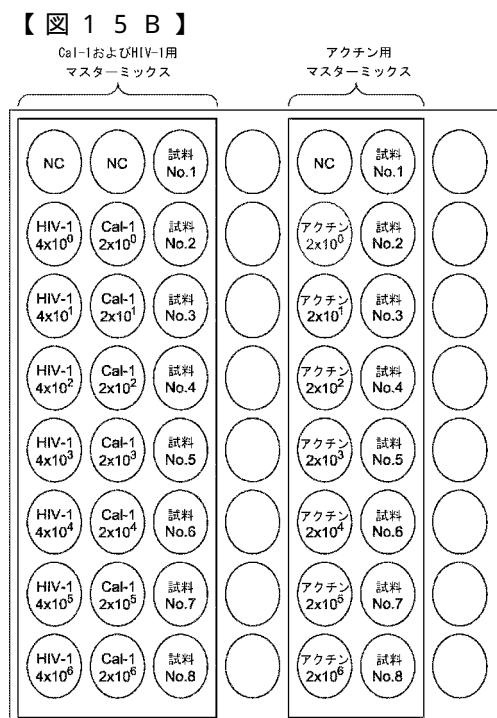
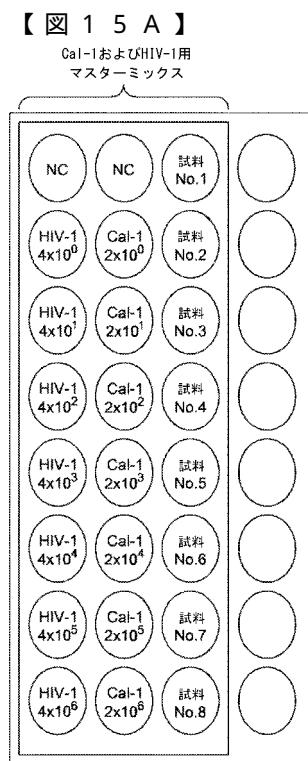
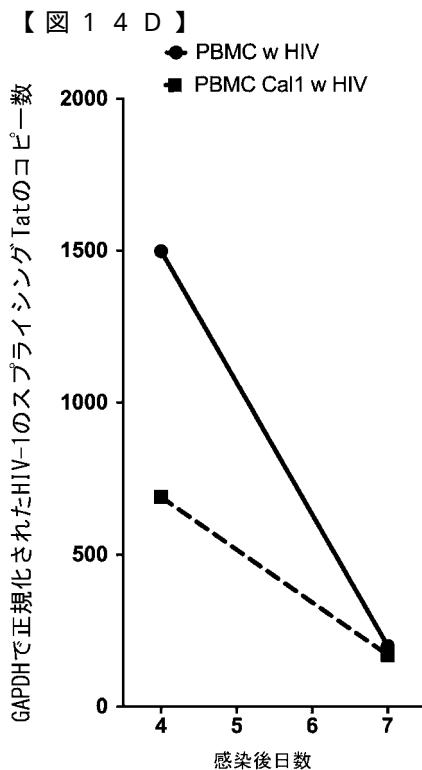
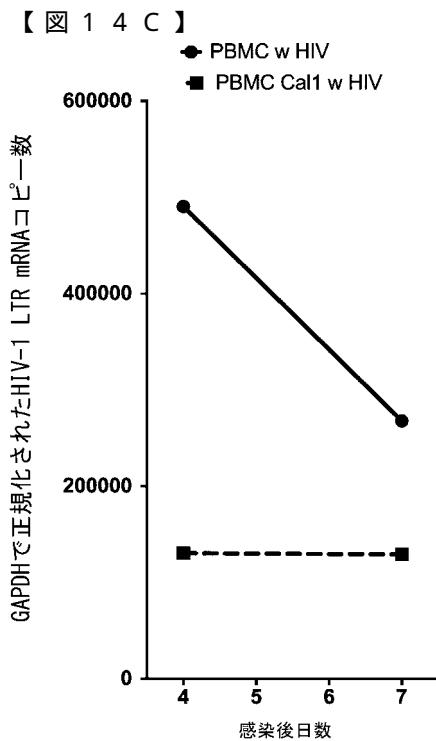
【図 1 2 A】



【図 1 2 B】







【図 15 C】

HIV-1用 マスター ミックス		GAPDH用 マスター ミックス		
NC	試料 No.1	NC	試料 No.1	
HIV-1 $4 \times 10^0$	試料 No.2	GAPDH $2 \times 10^0$	試料 No.2	
HIV-1 $4 \times 10^1$	試料 No.3	GAPDH $2 \times 10^1$	試料 No.3	
HIV-1 $4 \times 10^2$	試料 No.4	GAPDH $2 \times 10^2$	試料 No.4	
HIV-1 $4 \times 10^3$	試料 No.5	GAPDH $2 \times 10^3$	試料 No.5	
HIV-1 $4 \times 10^4$	試料 No.6	GAPDH $2 \times 10^4$	試料 No.6	
HIV-1 $4 \times 10^5$	試料 No.7	GAPDH $2 \times 10^5$	試料 No.7	
HIV-1 $4 \times 10^6$	試料 No.8	GAPDH $2 \times 10^6$	試料 No.8	

【図 15 D】

HIV-1用 マスター ミックス		Cal-1用 マスター ミックス		
NC	試料 No.1	試料 No.9	NC	試料 No.9
HIV-1 $4 \times 10^0$	試料 No.2	試料 No.10	Cal-1 $2 \times 10^0$	試料 No.10
HIV-1 $4 \times 10^1$	試料 No.3	試料 No.11	Cal-1 $2 \times 10^1$	試料 No.11
HIV-1 $4 \times 10^2$	試料 No.4	試料 No.12	Cal-1 $2 \times 10^2$	試料 No.12
HIV-1 $4 \times 10^3$	試料 No.5	試料 No.13	Cal-1 $2 \times 10^3$	試料 No.13
HIV-1 $4 \times 10^4$	試料 No.6	試料 No.14	Cal-1 $2 \times 10^4$	試料 No.14
HIV-1 $4 \times 10^5$	試料 No.7	試料 No.15	Cal-1 $2 \times 10^5$	試料 No.15
HIV-1 $4 \times 10^6$	試料 No.8		Cal-1 $2 \times 10^6$	試料 No.8

(P)

【図 15 E】

アクチン用 マスター ミックス			
	NC	試料 No.1	試料 No.9
	アクチン $2 \times 10^0$	試料 No.2	試料 No.10
	アクチン $2 \times 10^1$	試料 No.3	試料 No.11
	アクチン $2 \times 10^2$	試料 No.4	試料 No.12
	アクチン $2 \times 10^3$	試料 No.5	試料 No.13
	アクチン $2 \times 10^4$	試料 No.6	試料 No.14
	アクチン $2 \times 10^5$	試料 No.7	試料 No.15
	アクチン $2 \times 10^6$	試料 No.8	

(P)

【配列表】

2018516594000001.app

## 【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/US2016/032767

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
INV. C12Q1/70 A61K48/00  
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
C12Q A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, EMBASE, Sequence Search

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2011/008348 A2 (CALIMMUNE INC [US]; CHEN IRVIN [US]; AN DONG SUNG [US]; MILLINGTON MIC) 20 January 2011 (2011-01-20) cited in the application the whole document -----	46-54
X	ORIT WOLSTEIN ET AL: "Preclinical safety and efficacy of an anti-HIV-1 lentiviral vector containing a short hairpin RNA to CCR5 and the C46 fusion inhibitor", MOLECULAR THERAPY - METHODS & CLINICAL DEVELOPMENT, vol. 1, 12 February 2014 (2014-02-12), page 11, XP055270561, DOI: 10.1038/mtn.2013.11 the whole document ----- -/-	46-55

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

## \* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

Date of mailing of the international search report

15 July 2016

01/08/2016

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel: (+31-70) 340-2040,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Bradbrook, Derek

1

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2016/032767

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	BRYAN P BURKE ET AL: "Engineering Cellular Resistance to HIV-1 Infection In Vivo Using a Dual Therapeutic Lentiviral Vector", MOLECULAR THERAPY-NUCLEIC ACIDS, vol. 4, no. 4, 14 April 2015 (2015-04-14), page e236, XP055270563, DOI: 10.1038/mtna.2015.10 the whole document	46-57,59
X	----- BRYAN BURKE ET AL: "CCR5 as a Natural and Modulated Target for Inhibition of HIV", VIRUSES, vol. 6, no. 1, 30 December 2013 (2013-12-30), pages 54-68, XP055287500, CH ISSN: 1999-4915, DOI: 10.3390/v6010054 the whole document	46-57,59
X	----- DATABASE Geneseq [Online]  25 March 2003 (2003-03-25), "Viral DNA R2 primer.", XP002759930, retrieved from EBI accession no. GSN:AAQ31821 Database accession no. AAQ31821 abstract; sequence & WO 92/20813 A1 (DANA FARBER CANCER INST INC [US]) 26 November 1992 (1992-11-26) SEQ ID NO.5	52,53
X	----- DATABASE Geneseq [Online]  1 April 1997 (1997-04-01), "HIV TAR fragment detection probe 1, (TAR loop probe).", XP002759931, retrieved from EBI accession no. GSN:AAT58845 Database accession no. AAT58845 abstract; sequence & US 5 576 176 A (ADAMS MELANIE [US] ET AL) 19 November 1996 (1996-11-19) column 20, lines 2-5; sequence 5 ----- -/-	52,53
1		

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2016/032767

## C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DATABASE Geneseq [Online]  25 March 2003 (2003-03-25), "Human immunodeficiency virus region 1 probe.", XP002759932, retrieved from EBI accession no. GSN:AAT15554 Database accession no. AAT15554 abstract; sequence & US 5 480 784 A (KACIAN DANIEL L [US] ET AL) 2 January 1996 (1996-01-02) -----	54,55
X	DATABASE Geneseq [Online]  6 December 2012 (2012-12-06), "Human immunodeficiency virus 1 U3 region coding sequence, SEQ ID 21.", XP002759933, retrieved from EBI accession no. GSN:BAD81538 Database accession no. BAD81538 abstract; sequence & WO 2012/141984 A1 (IMMUNE DESIGN CORP [US]; DUBENSKY THOMAS W [US]; ROBBINS SCOTT H [US]) 18 October 2012 (2012-10-18) -----	48
X	DATABASE Geneseq [Online]  29 December 2005 (2005-12-29), "HIV-1 5' LTR TATA box/TAR sequence, from AF102206-G.", XP002759934, retrieved from EBI accession no. GSN:AED60207 Database accession no. AED60207 abstract; sequence -----	49
X	DATABASE EMBL [Online]  22 June 2005 (2005-06-22), "Sequence 20 from Patent WO2005051986.", XP002759935, retrieved from EBI accession no. EM_PAT:CS108612 Database accession no. CS108612 abstract; sequence ----- -/-	50,51

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/US2016/032767

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	MIYOSHI H ET AL: "DEVELOPMENT OF A SELF-INACTIVATING LENTIVIRUS VECTOR", JOURNAL OF VIROLOGY, THE AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, US, vol. 72, no. 10, 1 January 1998 (1998-01-01), pages 8150-8157, XP000886313, ISSN: 0022-538X the whole document -----	1-63

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No  
PCT/US2016/032767

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO 2011008348	A2	20-01-2011	AU 2010274031 A1	02-02-2012
			CA 2767972 A1	20-01-2011
			EP 2453735 A2	23-05-2012
			EP 2949208 A1	02-12-2015
			ES 2546663 T3	25-09-2015
			HK 1168509 A1	18-12-2015
			JP 5828838 B2	09-12-2015
			JP 2012533299 A	27-12-2012
			JP 2016013128 A	28-01-2016
			RU 2012105281 A	20-08-2013
			US 2012201794 A1	09-08-2012
			WO 2011008348 A2	20-01-2011

## フロントページの続き

(51) Int.Cl. F I テーマコード(参考)  
**A 6 1 K 35/12 (2015.01) A 6 1 K 35/12**

(81) 指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,R0,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,D0,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,JP,KE,KG,KN,KP,KR,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US

(71) 出願人 517403019  
 セント ヴィンセント ホスピタル シドニー リミテッド  
 オーストラリア連邦 2010 ニューサウスウェールズ ダーリンハースト ピクトリア スト  
 リート 390

(71) 出願人 505167794  
 ニューサウス イノベイションズ ピーティーワイ リミテッド  
 オーストラリア連邦 2052 ニューサウスウェールズ州 シドニー ユーエヌエスダブリュ  
 ベイカー ストリート ゲート 14 ルパート マイヤズ ビルディング

(74) 代理人 100102978  
 弁理士 清水 初志  
 (74) 代理人 100102118  
 弁理士 春名 雅夫  
 (74) 代理人 100160923  
 弁理士 山口 裕孝  
 (74) 代理人 100119507  
 弁理士 刑部 俊  
 (74) 代理人 100142929  
 弁理士 井上 隆一  
 (74) 代理人 100148699  
 弁理士 佐藤 利光  
 (74) 代理人 100128048  
 弁理士 新見 浩一  
 (74) 代理人 100129506  
 弁理士 小林 智彦  
 (74) 代理人 100205707  
 弁理士 小寺 秀紀  
 (74) 代理人 100114340  
 弁理士 大関 雅人  
 (74) 代理人 100114889  
 弁理士 五十嵐 義弘

(74) 代理人 100121072  
 弁理士 川本 和弥  
 (72) 発明者 鈴木 一雄  
 オーストラリア連邦 2073 ニューサウスウェールズ ピンブル ミードウェー クロース  
 2  
 (72) 発明者 ケレハー アンソニー ドミニク  
 オーストラリア連邦 2234 ニューサウスウェールズ バンガーラ イランバ プレイス 6

(72)発明者 シモンズ ジェフリー フィリップ  
オーストラリア連邦 2029 ニューサウスウェールズ ローズ ベイ ハミルトン ストリー  
ト 15

F ターム(参考) 4B063 QA01 QA18 QA19 QQ03 QQ08 QQ42 QQ52 QR08 QR42 QR50  
QR56 QR62 QS03 QS25 QS34 QX02  
4C087 AA01 AA02 BB65 CA04 NA05 ZB33 ZC55