

(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2021-519069
(P2021-519069A)

(43) 公表日 令和3年8月10日(2021.8.10)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/113 (2010.01)	C 1 2 N 15/113 1 0 2 Z	4 B 0 6 5
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/10 Z N A	4 C 0 8 7
C 1 2 N 5/078 (2010.01)	C 1 2 N 5/078	4 H 0 4 5
C 0 7 K 14/155 (2006.01)	C 0 7 K 14/155	
C 1 2 N 5/0783 (2010.01)	C 1 2 N 15/113 1 4 0 Z	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 113 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2020-551499 (P2020-551499)
 (86) (22) 出願日 平成31年3月27日 (2019. 3. 27)
 (85) 翻訳文提出日 令和2年11月19日 (2020. 11. 19)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2019/024410
 (87) 国際公開番号 W02019/191314
 (87) 国際公開日 令和1年10月3日 (2019. 10. 3)
 (31) 優先権主張番号 62/648, 804
 (32) 優先日 平成30年3月27日 (2018. 3. 27)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関
 米国 (US)

(71) 出願人 517428713
 アメリカン ジーン テクノロジーズ インターナショナル インコーポレイテッド
 アメリカ合衆国 メリーランド 20850, ロックビル, キー ウェスト アベニュー 9713, フィフス フロア
 (74) 代理人 100078282
 弁理士 山本 秀策
 (74) 代理人 100113413
 弁理士 森下 夏樹
 (74) 代理人 100181674
 弁理士 飯田 貴敏
 (74) 代理人 100181641
 弁理士 石川 大輔

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 遺伝子改変リンパ球の製造方法

(57) 【要約】

本開示は、概して、HIVの処置または防止のための免疫化および免疫療法に関する。特に、本方法は、末梢血単核細胞 (PBMC) を供給源から精製するステップと、少なくとも1つのHIV特異的ペプチドでPBMCを刺激するステップと、少なくとも1サブセットの細胞をPBMCから枯渇させるステップであって、少なくとも1サブセットの細胞が、CD8+T細胞、CD4+T細胞、細胞、NK細胞、B細胞、T制御性細胞、およびNK T細胞のいずれか1つまたは複数を含むステップと、枯渇させたPBMCに、少なくとも1つの遺伝子エレメントをコードするウイルス送達システムで形質導入するステップと、少なくとも1日間にわたって、形質導入されたPBMCを培養するステップと、培養されたPBMCを採取するステップとを含む。

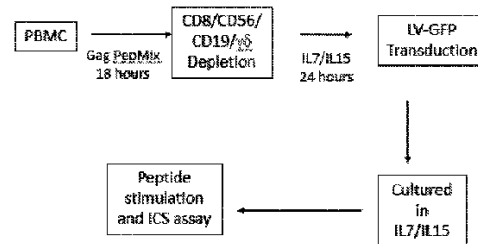


Figure 14

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

末梢血単核細胞（P B M C）を供給源から精製するステップと、
 前記 P B M C を少なくとも 1 つの H I V 特異的ペプチドで刺激するステップと、
 少なくとも 1 サブセットの細胞を前記 P B M C から枯渇させるステップであって、前記
 少なくとも 1 サブセットの細胞が、C D 8 + T 細胞、細胞、N K 細胞、B 細胞、T 制
 御性細胞、および N K T 細胞のいずれか 1 つまたは複数を含む、ステップと、
 枯渇させた前記 P B M C に、少なくとも 1 つの遺伝子エレメントをコードするウイルス
 送達システムで形質導入するステップと、
 少なくとも 1 日間にわたって、形質導入された前記 P B M C を培養するステップと、
 培養された前記 P B M C を採取するステップと
 を含む、方法。

10

【請求項 2】

前記培養が、静置培養システムまたは半静置培養システムで行われる、請求項 1 に記載
 の方法。

【請求項 3】

前記少なくとも 1 つの H I V 特異的ペプチドが、合成の重複ペプチドのプールを含む、
 請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

前記合成の重複ペプチドのプールが、H I V G a g ポリタンパク質を含む、請求項 3
 に記載の方法。

20

【請求項 5】

前記枯渇させるステップが、前記少なくとも 1 サブセットの細胞を、枯渇させた前記 P
 B M C から分離することを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6】

前記分離することが、磁気ビーズ分離を含む、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

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

30

【請求項 8】

前記 H I V R N A 配列が、H I V V i f 配列、H I V T a t 配列、またはそれら
 のパリアントを含む、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】

前記少なくとも 1 つの遺伝子エレメントが、マイクロ R N A または s h R N A を含む、
 請求項 7 に記載の方法。

【請求項 10】

前記少なくとも 1 つの遺伝子エレメントが、配列番号 1、配列番号 2、配列番号 3、ま
 たは配列番号 30 の少なくとも 1 つと、少なくとも 80%、または少なくとも 85%、ま
 たは少なくとも 90%、または少なくとも 95% の同一性を有するマイクロ R N A を含む
 、請求項 7 に記載の方法。

40

【請求項 11】

H I V に感染した被験体を処置するための遺伝子改変リンパ球であって、
 末梢血単核細胞（P B M C）を前記被験体から精製するステップであって、前記 P B M
 C が少なくとも 1 つのリンパ球を含む、ステップと、
 前記少なくとも 1 つのリンパ球を、少なくとも 1 つの H I V 特異的ペプチドで刺激する
 ステップと、
 少なくとも 1 サブセットの細胞を前記 P B M C から枯渇させるステップであって、前記
 少なくとも 1 サブセットの細胞が、C D 8 + T 細胞、C D 4 + T 細胞、細胞、N K 細
 胞、B 細胞、T 制御性細胞、および N K T 細胞のいずれか 1 つまたは複数を含む、ステッ

50

ブと、

前記少なくとも1つのリンパ球に、少なくとも1つの遺伝子エレメントをコードするウイルス送達システムで形質導入するステップと、

少なくとも1日間にわたって、前記P B M Cを培養するステップと、

培養された前記P B M Cを採取するステップと

を含むプロセスによって調製される、遺伝子改変リンパ球。

【請求項12】

予防用または治療用H I Vワクチンで免疫した被験体を処置するための遺伝子改変リンパ球であって、

末梢血単核細胞(P B M C)を前記被験体から精製するステップであって、前記P B M Cが少なくとも1つのリンパ球を含む、ステップと、

前記少なくとも1つのリンパ球を、少なくとも1つのH I V特異的ペプチドで刺激するステップと、

少なくとも1サブセットの細胞を前記P B M Cから枯渇させるステップであって、前記少なくとも1サブセットの細胞が、C D 8 + T細胞、C D 4 + T細胞、細胞、N K細胞、B細胞、T制御性細胞、およびN K T細胞のいずれか1つまたは複数を含む、ステップと、

前記少なくとも1つのリンパ球に、少なくとも1つの遺伝子エレメントをコードするウイルス送達システムで形質導入するステップと、

少なくとも1日間にわたって、前記P B M Cを培養するステップと、

培養された前記P B M Cを採取するステップと

を含むプロセスによって調製される、遺伝子改変リンパ球。

【請求項13】

H I Vに曝露されたが感染していない被験体を処置するための遺伝子改変リンパ球であって、

末梢血単核細胞(P B M C)を前記被験体から精製するステップであって、前記P B M Cが少なくとも1つのリンパ球を含む、ステップと、

前記P B M Cを少なくとも1つのH I V特異的ペプチドで刺激するステップと、

少なくとも1サブセットの細胞を前記P B M Cから枯渇させるステップであって、前記少なくとも1サブセットの細胞が、C D 8 + T細胞、C D 4 + T細胞、細胞、N K細胞、B細胞、T制御性細胞、およびN K T細胞のいずれか1つまたは複数を含む、ステップと、

前記少なくとも1つのリンパ球に、少なくとも1つの遺伝子エレメントをコードするウイルス送達システムで形質導入するステップと、

少なくとも1日間にわたって、前記P B M Cを培養するステップと、

培養された前記P B M Cを採取するステップと

を含むプロセスによって調製される、遺伝子改変リンパ球。

【請求項14】

P B M Cを少なくとも1つのH I V特異的ペプチドで刺激するステップと、

少なくとも1サブセットの細胞を前記P B M Cから枯渇させるステップであって、前記少なくとも1サブセットの細胞が、C D 8 + T細胞、細胞、N K細胞、B細胞、T制御性細胞、およびN K T細胞のいずれか1つまたは複数を含むステップと、

枯渇させた前記P B M Cに、少なくとも1つの遺伝子エレメントをコードするウイルス送達システムで形質導入するステップと

を含む、方法。

【請求項15】

前記少なくとも1つのH I V特異的ペプチドが、H I V g a g ペプチドを含む、請求項14に記載の方法。

【請求項16】

前記少なくとも1つの遺伝子エレメントが、ケモカイン受容体C C R 5の産生を阻害す

10

20

30

40

50

ることができる低分子RNA、またはHIV RNA配列をターゲティングすることができる少なくとも1つの低分子RNAを含む、請求項14に記載の方法。

【請求項17】

前記HIV RNA配列が、HIV Vif配列、HIV Tat配列、またはそれらのバリエーションを含む、請求項16に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願への相互参照

この出願は、「METHODS OF MANUFACTURING GENETICALLY-MODIFIED LYMPHOCYTES」との表題の2018年3月27日に出願された米国仮特許出願第62/648,804号(この開示は、参考として本明細書に援用される)に基づく優先権を主張する。

10

【0002】

分野

本発明は、概して、HIVの処置および防止のための免疫化および免疫療法の分野に関する。特に、開示されている方法は、そのようなHIV+の個体に注入するのに好適な細胞産物を調製するために、非標的細胞を枯渇させるステップを含む、治癒を求めるHIV+の個体から白血球を得るステップと、処理するステップと、増殖させるステップとに関する。

20

【背景技術】

【0003】

背景

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

30

【0004】

免疫系がHIV複製の制限において通常は不十分であるとはいえ主要な役割を果たすことを示すデータの出現により、HIV感染のための免疫療法には強い関心が寄せられている。いくつかの研究においてHIVに対するワクチンが試験されたが、今日まで十分な成功を収めていない。さらに、遺伝子療法技術を利用することによるHIV免疫療法の強化に関心が示されているが、他の免疫療法のアプローチと同じく、十分な成功を収めていない。

【0005】

遺伝子療法は、ウイルスベクターの使用を伴い得る新しい治療薬を作り出す可能性のある、生物医学研究の中で最も成熟した分野のうちの1つである。療法に利用可能な多種多様な可能性のある遺伝子を考慮すると、感染性および非感染性疾患を処置する手段としての遺伝子療法の期待に応えるためには、これらの遺伝子を送達する効率的な手段が必要である。マウスのレトロウイルス、アデノウイルス、パルボウイルス(アデノ随伴ウイルス)、コクサッキーウイルス、麻疹ウイルス、ピコルナウイルス、フラビウイルス、ワクシニアウイルス、およびヘルペスウイルスを含むいくつかのウイルスシステムが、治療用の遺伝子移入ベクターとして提唱されてきた。しかし、ウイルスベクターのin vivoでの適用は、ウイルス構造タンパク質および/または形質導入された遺伝子産物に対する宿主免疫応答によって限定されることが多い。

40

【0006】

レンチウイルスベクターは概して細胞傷害を誘導せず、強力な宿主免疫応答を誘発しな

50

いものの、いくつかの免疫刺激性遺伝子産物をコードするH I V - 1などの一部のレンチウイルスは、*in vivo*で細胞傷害をもたらし、強力な免疫応答を誘導する可能性を有する。レンチウイルスベクターの使用に関する別の重要な問題は、ある特定の細胞傷害性ウイルスタンパク質に曝露された際のT細胞の細胞変性または機能的無応答性の可能性の問題である。同様に、多くの場合、組換えにより、複製可能な毒性レンチウイルスが発生する可能性が懸念される。遺伝子療法技法を使用したH I V免疫療法では、保護的な遺伝子改変を有する十分な数のH I V特異的C D 4 T細胞を得られないことにより、典型的には、抗レトロウイルス療法を中止した際にH I Vの迅速な再出現をもたらされる。

【0007】

H I Vの治癒を達成しようとするこれまでの努力は、とりわけ、こうした理由で十分ではない。したがって、改善されたH I V処置が依然として必要とされている。

10

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0008】

要旨

一態様では、方法が提供される。本方法は、末梢血単核細胞(P B M C)を供給源から精製するステップと、少なくとも1つのH I V特異的ペプチドでP B M Cを刺激するステップと、少なくとも1サブセットの細胞をP B M Cから枯渇させるステップであって、少なくとも1サブセットの細胞が、C D 8 + T細胞、C D 4 + T細胞、細胞、N K細胞、B細胞、T制御性細胞、およびN K T細胞のいずれか1つまたは複数を含む、ステップと、枯渇させたP B M Cに、少なくとも1つの遺伝子エレメントをコードするウイルス送達システムで形質導入するステップと、少なくとも1日間にわたって、形質導入されたP B M Cを培養するステップと、培養されたP B M Cを採取するステップとを含む。複数の実施形態では、少なくとも1サブセットの細胞は、C D 8 + T細胞、細胞、N K細胞、B細胞、好中球、好塩基球、好酸球、肥満細胞、樹状細胞、およびN K T細胞のいずれか1つまたは複数を含む。

20

【0009】

複数の実施形態では、培養は、静置培養システムまたは半静置培養システムで行われる。複数の実施形態では、少なくとも1つのH I V特異的ペプチドは、合成の重複ペプチドのプールを含む。複数の実施形態では、合成の重複ペプチドのプールは、H I V G a gポリタンパク質を含む。複数の実施形態では、枯渇は、枯渇させたP B M Cから少なくとも1サブセットの細胞を分離することを含む。複数の実施形態では、分離は、磁気ビーズ分離を含む。複数の実施形態では、少なくとも1つの遺伝子エレメントは、ケモカイン受容体C C R 5の産生を阻害することができる低分子R N A、またはH I V R N A配列をターゲティングすることができる少なくとも1つの低分子R N Aを含む。複数の実施形態では、H I V R N A配列は、H I V V i f配列、H I V T a t配列、またはそれらのバリエーションを含む。複数の実施形態では、少なくとも1つの遺伝子エレメントは、マイクロR N Aまたはs h R N Aを含む。複数の実施形態では、少なくとも1つの遺伝子エレメントは、配列番号1、配列番号2、配列番号3、または配列番号30の少なくとも1つと、少なくとも80%、または少なくとも85%、または少なくとも90%、または少なくとも95%の同一性を有するマイクロR N Aを含む。

30

40

【0010】

別の態様では、H I Vに感染した被験体を処置するための遺伝子改変リンパ球が提供される。遺伝子改変リンパ球は、少なくとも1つのリンパ球を含む末梢血単核細胞(P B M C)を被験体から精製するステップと、少なくとも1つのH I V特異的ペプチドで少なくとも1つリンパ球を刺激するステップと、少なくとも1サブセットの細胞をP B M Cから枯渇させるステップであって、少なくとも1サブセットの細胞が、C D 8 + T細胞、C D 4 + T細胞、細胞、N K細胞、B細胞、T制御性細胞、およびN K T細胞のいずれか1つまたは複数を含む、ステップと、少なくとも1つのリンパ球に、少なくとも1つの遺伝子エレメントをコードするウイルス送達システムで形質導入するステップと、少なくと

50

も1日間にわたって、P B M Cを培養するステップと、培養されたP B M Cを採取するステップとを含むプロセスによって調製される。

【0011】

別の態様では、予防用または治療用H I Vワクチンで免疫された被験体を処置するための遺伝子改変リンパ球が提供される。遺伝子改変リンパ球は、少なくとも1つのリンパ球を含む末梢血単核細胞(P B M C)を被験体から精製するステップと、少なくとも1つのH I V特異的ペプチドで少なくとも1つリンパ球を刺激するステップと、少なくとも1サブセットの細胞をP B M Cからの枯渇させるステップであって、少なくとも1サブセットの細胞が、C D 8 + T細胞、C D 4 + T細胞、細胞、NK細胞、B細胞、T制御性細胞、およびN K T細胞のいずれか1つまたは複数を含む、ステップと、少なくとも1つのリンパ球に、少なくとも1つの遺伝子エレメントをコードするウイルス送達システムで形質導入するステップと、少なくとも1日間にわたって、P B M Cを培養するステップと、培養されたP B M Cを採取するステップとを含むプロセスによって調製される。

10

【0012】

別の態様では、H I Vに曝露されたが感染していない被験体を処置するための遺伝子改変リンパ球が提供される。遺伝子改変リンパ球は、少なくとも1つのリンパ球を含む末梢血単核細胞(P B M C)を被験体から精製するステップと、少なくとも1つのH I V特異的ペプチドで少なくとも1つリンパ球を刺激するステップと、少なくとも1サブセットの細胞をP B M Cからの枯渇させるステップであって、少なくとも1サブセットの細胞が、C D 8 + T細胞、C D 4 + T細胞、細胞、NK細胞、B細胞、T制御性細胞、およびN K T細胞のいずれか1つまたは複数を含む、ステップと、少なくとも1つのリンパ球に、少なくとも1つの遺伝子エレメントをコードするウイルス送達システムで形質導入するステップと、少なくとも1日間にわたって、P B M Cを培養するステップと、培養されたP B M Cを採取するステップとを含むプロセスによって調製される。

20

【0013】

別の態様では、少なくとも1つのH I V特異的ペプチドでP B M Cを刺激するステップと、少なくとも1サブセットの細胞をP B M Cからの枯渇させるステップであって、少なくとも1サブセットの細胞が、C D 8 + T細胞、C D 4 + T細胞、細胞、NK細胞、B細胞、T制御性細胞、およびN K T細胞のいずれか1つまたは複数を含む、ステップと、枯渇させたP B M Cに、少なくとも1つの遺伝子エレメントをコードするウイルス送達システムで形質導入するステップとを含む方法が提供される。複数の実施形態では、少なくとも1つのH I V特異的ペプチドは、H I V g a gペプチドを含む。複数の実施形態では、少なくとも1つの遺伝子エレメントは、ケモカイン受容体C C R 5の産生を阻害することができる低分子R N A、またはH I V R N A配列をターゲティングすることができる少なくとも1つの低分子R N Aを含む。複数の実施形態では、H I V R N A配列は、H I V V i f配列、H I V T a t配列、またはそれらのバリエーションを含む。

30

【図面の簡単な説明】

【0014】

【図1】図1は、本開示のe x v i v o処置方法のフロー図を示す。

【0015】

【図2】図2は、本開示に従うC D 4 + T細胞の変更および新しい感染の防止を示す。

40

【0016】

【図3】図3は、治療用ベクター、ヘルパープラスミド、およびエンベローププラスミドからなる、例示的なレンチウイルスベクターシステムを示す。ここで示されている治療用ベクターは、本明細書においてA G T 1 0 3とも呼ばれる好ましい治療用ベクターであり、m i R 3 0 C C R 5 - m i R 2 1 V i f - m i R 1 8 5 - T a tを含有する。

【0017】

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

【0018】

50

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

【0019】

【図6】図6は、環状化形態の、さらなる例示的な3ベクターのレンチウイルスベクターシステムを示す。

【0020】

【図7】図7は、例示的なベクター配列を示す。CCR5向性HIV株の伝播を阻害するためのプロモーターおよびmiRクラスターのプラス(すなわち、ゲノム)鎖配列を開発した。上段の配列(配列番号86)は、その3'末端に制限認識部位を含むEF-1アルファプロモーターである。下段の3つの配列は、制限認識部位を含むmiR30 CCR5(配列番号87)、miR21 Vif(配列番号88)、およびmiR185 Tat(配列番号89)配列である。下線のない配列の部分は、制限認識部位を表わす。

10

【0021】

【図8】図8は、CD8+T細胞を枯渇させるステップを含む、CD4+T細胞を産生するための例示的な方法のフロー図を示す。

【0022】

【図9】図9は、Gagペプチド刺激細胞からCD8+T細胞が枯渇させた場合、CD4+T細胞が実質的に増加することを実証するデータを示す。

【0023】

【図10】図10は、CD8+T細胞を枯渇させた場合、CD4+細胞が増加し、V1細胞が増大することを実証するデータを示す。

20

【0024】

【図11】図11は、CD8+T細胞枯渇が、標的細胞の収量をおよそ6倍増加させたことを実証するデータを示す。

【0025】

【図12】図12は、Gagペプチド刺激細胞からCD8+T細胞を枯渇させた場合、CD4+T細胞が3倍増加することを実証するデータを示す。

【0026】

【図13】図13は、CD8+T細胞枯渇が、CD56+NK細胞の拡大増殖をもたらしたことを実証するデータを示す。

30

【0027】

【図14】図14は、CD8+T細胞、CD56+細胞、CD19+B細胞、および細胞を枯渇させるステップを含む、CD4+T細胞を産生する例示的な方法のフロー図を示す。

【0028】

【図15】図15は、(i)枯渇無し、(ii)CD8+T細胞枯渇；(iii)CD8+T細胞枯渇および細胞枯渇；ならびに(iv)CD8+T細胞枯渇、細胞枯渇、およびB細胞枯渇を含む様々な細胞枯渇戦略を使用して、CD4+T細胞収量に対する効果を実証するデータを示す。

【0029】

【図16】図16は、(i)枯渇無し、(ii)CD8+T細胞枯渇；ならびに(iii)CD8+T細胞枯渇、CD56+細胞枯渇、細胞枯渇、およびB細胞枯渇を含む様々な細胞枯渇戦略を使用して、CD4+T細胞収量に対する効果を実証するデータを示す。

40

【0030】

【図17】図17は、CD8+T細胞、CD56+細胞、CD19+細胞、および細胞を枯渇させる4種細胞枯渇ステップを含む、CD4+T細胞を産生する例示的な方法のフロー図を示す。

【0031】

【図18】図18は、4種細胞枯渇プロセスを使用したCD4+T細胞発現の結果を実証

50

するデータを示す。

【発明を実施するための形態】

【0032】

詳細な説明

概説

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

【0033】

本明細書では、治療用ウイルスベクター（例えば、レンチウイルスベクター）、免疫療法、およびHIV感染を処置するためにそれらを使用する方法が開示される。複数の実施形態では、HIV感染の機能的治癒を達成するための方法および組成物が提供される。本明細書の図1に示されるように、本開示の様々な態様および実施形態は、第1の刺激事象、例えば、HIV感染患者において、例えばHAARTの毎日の投与によるウイルス血症の安定な抑制と共に、HIVに対する強力な免疫応答をもたらすことを意図するワクチンを用いた、第1の治療的免疫化を含み得る。複数の実施形態では、白血球画分が、アフエレンシス産物から精製される。これに続いて、(1)精製された白血球を、免疫原性HIVタンパク質である少なくとも1つの合成ペプチドで刺激すること、(2)物理的分離方法により不必要な細胞を枯渇させること、(3)刺激および枯渇された白血球集団を治療用レンチウイルスベクターで形質導入すること、(4)形質導入された細胞を、少なくとも1日間にわたって成長させるために静置培養ベッセルに移すこと、(5)静置培養ベッセルから細胞を採取すること、(6)成長培地を、注入用の凍結保存溶液および凍結細胞と置換すること、ならびに(7)元の患者に再注入して戻すことが続く。

【0034】

様々な方法および組成物を使用して、CD4+T細胞などの注入された細胞が、HIV感染を有する個人の体内に再び存在してもHIVに感染することを防止することができる。例えば、図2に解説されているように、注入された細胞が感染するのを防止するためには、CCR5発現をモジュレートしてウイルスの侵入を防止することができる。さらに、残存するあらゆる感染性ウイルスRNAの破壊をターゲティングすることもできる。前出のことに、また本明細書の図2を参照すると、CCR5の非存在下でさえHIVに感染した細胞、または形質導入前に既に感染しており、感染性ウイルスの放出を防止することが必要である細胞におけるHIVウイルスのサイクルを止める組成物および方法が提供される。HIVウイルスのサイクルを止めるためには、潜伏感染CD4+T細胞などの潜伏感染細胞によって産生されるウイルスRNAをターゲティングする。

【0035】

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

【0036】

定義および解釈

本明細書で別途定義されない限り、本開示との関連で使用される科学および技術用語は、当業者により一般的に理解されている意味を有するものとする。さらに、文脈により別途必要とされない限り、単数形用語は複数形を含み、複数形用語は単数形を含むものとする。概して、本明細書に記載される、細胞および組織培養、分子生物学、免疫学、微

10

20

30

40

50

生物学、遺伝学ならびにタンパク質および核酸の化学、およびハイブリダイゼーションに関連して使用される命名法、ならびにこれらの技術は、当技術分野で周知であり一般的に使用されているものである。特記なき限り、本開示の方法および技術は概して、当技術分野で周知であり、かつ本明細書随所で引用され、論じられる様々な一般的参考文献およびより具体的な参考文献に記載されている、従来の方法に従って行われる。例えば、Sambrook J.およびRussell D. Molecular Cloning: A Laboratory Manual、第3版、Cold Spring Harbor Laboratory Press、Cold Spring Harbor、N.Y. (2000年)、Ausubelら、Short Protocols in Molecular Biology: A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology、Wiley、John & Sons、Inc. (2002年)、HarlowおよびLane Using Antibodies: A Laboratory Manual; Cold Spring Harbor Laboratory Press、Cold Spring Harbor、N.Y. (1998年)、およびColiganら、Short Protocols in Protein Science、Wiley、John & Sons、Inc. (2003年)を参照されたい。任意の酵素反応または精製技術は、製造元の仕様に従って、当技術分野で一般的に実行されるように、または本明細書に記載されるように行われる。本明細書に記載される、分析化学、合成有機化学、ならびに医薬品および製薬化学に関連して使用される命名法、ならびにこれらの検査手技および技術は、当技術分野で周知であり一般的に使用されているものである。

10

【0037】

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

20

【0038】

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

【0039】

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

30

【0040】

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

【0041】

本明細書で使用される場合、「CCR5」という用語は、C-Cケモカイン受容体5を指す。本明細書における「CCR5デルタ32」への言及は、CCR5遺伝子における変異体遺伝子型への言及である。

【0042】

本明細書で使用される場合、「CD」という用語は、特定の表面抗原分類タンパク質を指す。本明細書で使用されるこの用語の非限定的な例は、CD4タンパク質発現である。このようなタンパク質の例としては、CD4が挙げられるが、これに限定されない。

40

【0043】

本明細書で使用される場合、「cART」という用語は、抗レトロウイルス薬併用療法 (combination antiretroviral therapy) を指す。「cART」という用語は、HAART (高活性抗レトロウイルス薬療法) と同義的に使用される場合がある。

【0044】

本明細書で使用される場合、語句「コード配列」は、転写または逆転写され得る任意のウイルスベクター配列を記述する。「コード配列」は、限定されるものないが、転写または逆転写され得る外因性配列 (例えば、細胞に形質導入またはトランスフェクトされてい

50

るベクターにある配列)を含む。

【0045】

本明細書で使用される場合、組成物および方法を規定するために使用される際の移行句「含む (comprising)」は、組成物および方法が、記載されている要素を含むが、他のものを除外しないことを意味する。本明細書で使用される場合、組成物および方法を規定するために使用される際の「からなる (consisting of)」は、組成物および方法が、組成物の微量要素よりも多くの他の成分および実質的な方法ステップを除外することを意味する。こうした移行句の各々によって規定される複数の実施形態は、本開示の範囲内にある。例えば、方法および組成物が、追加のステップおよび成分を含んでいてもよく (含む (comprising))、またはその代わりに重要ではないステップおよび組成物を含む (から本質的になる (consisting essentially of))、またはその代わりに表記の方法ステップもしくは組成物のみを意図する (からなる (consisting of)) ことが意図される。さらに、本明細書で使用される場合、「includes (含む)」という用語は、限定することなく含むことを意味する。

10

【0046】

本明細書で使用される場合、「生着 (engraftment)」という用語は、細胞供給源の注入後の被験体における持続的生着の定量的レベルを決定することが当業者にとって可能であることを指す (例えば、Rosenbergら、N. Engl. J. Med.、323巻: 570~578頁 (1990年)、Dudleyら、J. Immunother.、24巻: 363~373頁 (2001年)、Yeeら、Curr. Opin. Immunol.、13巻: 141~146頁 (2001年)、Rooneyら、Blood、92巻: 1549~1555頁 (1998年)を参照されたい)。

20

【0047】

本明細書で使用される場合、「発現」、「発現される」、または「コードする」という用語は、ポリヌクレオチドがmRNAに転写されるプロセス、および/または転写されたmRNAがその後ペプチド、ポリペプチド、もしくはタンパク質に翻訳されるプロセスを指す。発現は、真核細胞におけるmRNAのスプライシング、または他の形態の転写後修飾もしくは翻訳後修飾を含む場合がある。

【0048】

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

30

40

【0049】

本明細書で使用される場合、語句「HIV特異的ペプチド」は、CD4+T細胞を含むT細胞において抗HIV応答を生成することができるか、またはそうでなければ、限定されるものではないが任意のGAGペプチドを含む、HIVに関するか、もしくは発現されるか、もしくはコードされる任意のペプチドを指す。

【0050】

本明細書で使用される場合、「HIVワクチン」という用語は、HIV特異的免疫応答を誘発することを意図する、免疫原と、ビヒクルと、アジュバントを包含する。「HIVワクチン」という用語は、本明細書に記載される「刺激剤」という用語の意味に含まれる。「HIVワクチン」は、HIVであり得る精製された不活化ウイルス粒子もしくは不活

50

化ウイルス粒子全体、または、特異的免疫を誘発することができるHIVタンパク質、糖タンパク質もしくはタンパク質断片を産生するように細胞を指向することができる組換え細菌ベクター、プラスミドDNAもしくはRNAに加えて、HIVタンパク質、タンパク質断片もしくはペプチド、糖タンパク質断片もしくはグリコペプチドを発現することができる組換えウイルスベクターを含み得る。代わりに、形質導入の前にHIV特異的CD4 T細胞を濃縮する目的で、またはレンチウイルスを形質導入したCD4 T細胞の*in vitro*アッセイのために、抗CD3/CD28ビーズ、T細胞受容体特異的抗体、マイトジェン、スーパー抗原、サイトカイン、および他の化学的または生物学的刺激をはじめとする免疫刺激のための特定の方法を使用して、樹状細胞、T細胞またはB細胞を活性化してもよい。活性化物質は、可溶性であってもよく、ポリマー集合体であってもよく、リポソームもしくはエンドソームベースであってもよく、またはビーズに連結していてもよい。刺激に対する細胞の応答を改善し、かつ/または培養および形質導入の間のCD4 T細胞の生存を改善するために、インターロイキン2、6、7、12、15、23、またはその他を含むサイトカインを付加してよい。前出のいずれも限定するものではないが、代わりに、「HIVワクチン」という用語は、MVA/HIV62Bワクチンならびにそのバリエーションおよび類似体を包含する。MVA/HIV62Bワクチンは、公知の高度に弱毒化した二重組換えMVAワクチンである。MVA/HIV62Bワクチンは、公知のMVAベクターにHIV-1 gag-polおよびenv配列を挿入することによって構築された(例えば、Goepfertら(2014年)J. Infect. Dis., 210巻(1号):99~110頁を参照されたい。また、WO2006026667も参照されたい。これらはいずれも参照により本明細書に組み込まれている)。「HIVワクチン」という用語には、以下の表1、および優先権書類(そのすべてはその全体が本明細書に組み込まれている)に含まれる任意の同様の表に提供される、任意の1つまたは複数のワクチンも含まれる。

【表1-1】

表1

IAVI臨床治験ID*	プライム**
HVTN 704 AMP	VRC-HIVMAB060-00-AB
VAC89220HPX2004	Ad26.Mos.HIV 三価
01-I-0079	VRC4302
04/400-003-04	APL 400-003 GENEVAX-HIV
10-1074	10-1074
87 I-114	gp160 ワクチン (Immuno-AG)
ACTG 326; PACTG 326	ALVAC vCP1452

10

20

30

【表 1 - 2】

Ad26.ENVA.01	Ad26.EnvA-01
Ad5HVR48.ENVA.01	Ad5HVR48.ENVA.01
ANRS VAC 02	rgp 160 +ペプチドV3 ANRS VAC 02
ANRS VAC 04	LIPO-6
ANRS VAC 05	ALVAC vCP125
ANRS VAC 07	ALVAC vCP300
ANRS VAC 08	ALVAC-HIV MN120TMG 株 (vCP205)
ANRS VAC 09 bis	LIPO-6
ANRS VAC 12	LPHIV1
ANRS VAC 14	gp160 MN/LAI
ANRS VAC 16	LPHIV1
ANRS VAC 18	LIPO-5
APL 400-003RX101	APL 400-003 GENEVAX-HIV
AVEG 002	HIVAC-1e
AVEG 003	VaxSyn gp160 ワクチン (MicroGeneSys)
AVEG 004	gp160 ワクチン (Immuno-AG)
AVEG 005A/B	Env 2-3
AVEG 006X; VEU 006	MN rgp120
AVEG 007A/B	rgp120/HIV-1 SF-2
AVEG 011	UBI HIV-1 ペプチド免疫原、多価
AVEG 013A	gp160 ワクチン (Immuno-AG)
AVEG 014A/B	TBC-3B
AVEG 017	UBI HIV-1 ペプチドワクチン、一価微粒子
AVEG 019	p17/p24:Ty- VLP
AVEG 020	gp120 C4-V3
AVEG 021	P3C541b リポペプチド
AVEG 022	ALVAC-HIV MN120TMG 株 (vCP205)
AVEG 028	Salmonella typhi CVD 908-HIV-1 LAI gp 120
AVEG 031	APL 400-047
AVEG 034/034A	ALVAC vCP1433
C060301	GTU-MultiHIV

10

20

30

40

【表 1 - 3】

C86P1	HIV gp140 ZM96
頸腔部CN54gp140-hsp70 コンジュゲートワクチン(TL01)	CN54gp140
CM235 および SF2gp120	CM235 (ThaiE) gp120 および SF2(B) gp120
CombiHIVvac (KombiVICHvak)	CombiHIVvac
CRC282	P2G12
CUTHIVAC002	DNA-C CN54ENV
DCVax-001	DCVax-001
DNA-4	DNA-4
DP6?001	DP6?001 DNA
DVP-1	EnvDNA
EN41-UGR7C	EN41-UGR7C
EnvPro	EnvPro
EuroNeut41	EN41-FPA2
EV01	NYVAC-C
EV02 (EuroVacc 02)	DNA-C
延長 HVTN 073E/SAAVI 102	Sub C gp140
F4/AS01	F4/AS01
FIT Biotech	GTU-Nef
Guangxi CDC DNA ワクチン	中国人のDNA
HGP-30 メモリー応答	HGP-30
HIV-CORE002	ChAdV63.HIVconsv
HIV-POL-001	MVA-mBN32
HIVIS 01	HIVIS-DNA
HIVIS 02	MVA-CMDR
HVRF-380-131004	Vichrepol
HVTN 040	AVX101
HVTN 041	rgp120w61d
HVTN 044	VRC-HIVDNA009-00-VP
HVTN 045	pGA2/JS7 DNA
HVTN 048	EP HIV-1090
HVTN 049	GagおよびEnv DNA/PLG微粒子

10

20

30

40

【表 1 - 4】

HVTN 050/Merck 018	MRKAd5 HIV-1 gag
HVTN 052	VRC-HIVDNA009-00-VP
HVTN 054	VRC-HIVADV014-00-VP
HVTN 055	TBC-M335
HVTN 056	MEP
HVTN 059	AVX101
HVTN 060	HIV-1 gag DNA
HVTN 064	EP HIV-1043
HVTN 065	pGA2/JS7 DNA
HVTN 067	EP-1233
HVTN 070	PENNVAX-B
HVTN 072	VRC-HIVDNA044-00-VP
HVTN 073	SAAVI DNA-C2
HVTN 076	VRC-HIVDNA016-00-VP
HVTN 077	VRC-HIVADV027-00-VP
HVTN 078	NYVAC-B
HVTN 082	VRC-HIVDNA016-00-VP
HVTN 084	VRC-HIVADV054-00-VP
HVTN 086, SAAVI 103	SAAVI MVA-C
HVTN 087	HIV-MAG
HVTN 088	オリゴマー-gp140/MF59
HVTN 090	VSV-Indiana HIV gagワクチン
HVTN 092	DNA-HIV-PT123
HVTN 094	GEO-D03
HVTN 096	DNA-HIV-PT123
HVTN 097	ALVAC-HIV vCP1521
HVTN 100	ALVAC-HIV-C (vCP2438)
HVTN 101	DNA-HIV-PT123
HVTN 104	VRC-HIVMAB060-00-AB
HVTN 105	AIDSVAX B/E
HVTN 106	DNA Nat-B env

10

20

30

40

【表 1 - 5】

HVTN 110	Ad4-mgag	
HVTN 112	HIV-1 nef/tat/vif, env pDNA ワクチン	
HVTN 116	VRC-HIVMAB060-00-AB	
HVTN 205	pGA2/JS7 DNA	
HVTN 702	ALVAC-HIV-C (vCP2438)	
HVTN 703 AMP	VRC-HIVMAB060-00-AB	
HVTN 908	pGA2/JS7 DNA	10
IAVI 001	DNA.HIVA	
IAVI 016	MVA.HIVA	
IAVI A001	tgAAC09	
IAVI A003	AAV1-PG9	
IAVI B001	Ad35-GRIN/ENV	
IAVI B002	アジュバント化GSK研究用HIVワクチン製剤1	20
IAVI B003	Ad26.EnvA-01	
IAVI B004	HIV-MAG	
IAVI C001	ADVAX	
IAVI C002	ADMVA	
IAVI D001	TBC-M4	
IAVI N004 HIV-CORE 004	Ad35-GRIN	
IAVI R001	rcAd26.MOS1.HIVEnv	
IAVI S001	SeV-G	30
IDEA EV06	DNA-HIV-PT123	
IHV01	全長一本鎖 (FLSC)	
IMPAACT P1112	VRC-HIVMAB060-00-AB	
IPCAVD006	MVA モザイク	
IPCAVD008	三量体 gp140	
IPCAVD009	Ad26.Mos.HIV 三価	
ISS P-001	Tat ワクチン	
LFn-p24 ワクチン	LFn-p24	40
MCA-0835	3BNC117	
Mucovac2	CN54gp140	

【表 1 - 6】

MV1-F4	麻疹ベクター - GSK
MYM-V101	ピロソーム-Gp41
NCHECR-AE1	pHIS-HIV-AE
PEACHI-04	ChAdV63.HIVconsv
PedVacc001 & PedVacc002	MVA.HIVA
PolyEnv1	PolyEnv1
PXVX-HIV-100-001	Ad4-mgag
RISVAC02	MVA-B
RV 151 / WRAIR 984	LFn-p24
RV 158	MVA-CMDR
SG06RS02	HIV gp140 ZM96
TAB9	TAB9
TaMoVac II	HIVIS-DNA
UBI V106	UBI HIV-1 ペプチドワクチン、一価微粒子
UCLA MIG-001	TBC-3B
UKHVCSpoke003	DNA - CN54ENV および ZM96GPN
V3-MAPS	V3-MAPS
VAX 002	AIDSVAX B/B
VAX 003	AIDSVAX B/E
VRC 602	VRC-HIVMAB060-00-AB
VRC 607	VRCHIVMAB080-00-AB

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

**本明細書で使用される場合、「プライム」という用語は、本明細書の表1で参照される所与の臨床治験において免疫学的接種材料として最初に使用される組成物を指す。

【0051】

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

【0052】

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

【0053】

本明細書で使用される場合、「パッケージング細胞株」という用語は、レンチウイルス粒子を発現させるために使用され得る任意の細胞株を指す。

【0054】

本明細書で使用される場合、「P B M C」という用語は末梢血単核細胞を指す。

【0055】

本明細書で使用される場合、「パーセント同一性」という用語は、2つまたはそれよりも多い核酸またはポリペプチド配列の文脈では、後述の配列比較アルゴリズム（例えば、BLASTPおよびBLASTN、または当業者に利用可能な他のアルゴリズム）のうちの1つを使用して、または目視検査により測定して、最大の一致のために比較およびアラインメントしたとき、同じであるヌクレオチドまたはアミノ酸残基の特定のパーセンテージを有する、2つまたはそれよりも多い配列またはサブ配列を指す。適用に応じて、「パーセント同一性」は、比較されている配列の領域にわたって、例えば機能的ドメインにわたって存在する場合もあれば、または代替的に、比較される2つの配列の全長にわたって存在する場合もある。配列比較では、典型的には1つの配列が参照配列としての機能を果たし、これに対して試験配列が比較される。配列比較アルゴリズムを使用する場合、試験配列および参照配列をコンピュータに入力し、必要に応じてサブ配列の座標を指定し、配列アルゴリズムプログラムパラメータを指定する。次いで、配列比較アルゴリズムが、指定されたプログラムパラメータに基づき、参照配列に対する試験配列のパーセント配列同一性を算出する。

10

【0056】

比較のための配列の最適なアラインメントは、例えば、SmithおよびWaterman、Adv.Appl. Math.、2巻：482頁（1981年）の局所相同性アルゴリズム、NeedlemanおよびWunsch、J. Mol. Biol.、48巻：443頁（1970年）の相同性アラインメントアルゴリズム、PearsonおよびLipman、Proc.Nat'l. Acad. Sci. USA、85巻：2444頁（1988年）の類似性検索方法、これらのアルゴリズム（Wisconsin Genetics Software Package、Genetics Computer Group、575 Science Dr.、Madison、Wis.のGAP、BESTFIT、FASTA、およびTFASTA）のコンピュータによる実装、または目視検査（Ausubelら、下記を全体的に参照されたい）によって実施することができる。

20

【0057】

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

30

【0058】

2つのヌクレオチド配列間のパーセント同一性はGCGソフトウェアパッケージ（<http://www.gcg.com>にて利用可能）のGAPプログラムを使用し、NWSgapdna.CMPマトリクスと、40、50、60、70、または80のギャップ重みと、1、2、3、4、5、または6の長さ重みとを使用して決定することができる。2つのヌクレオチドまたはアミノ酸配列間のパーセント同一性は、ALIGNプログラム（バージョン2.0）に組み込まれているE. MeyersおよびW. Millerのアルゴリズム（CABIOS、4巻：11～17頁（1989年））を使用し、PAM120残基重み表（weight residue table）、12のギャップ長さペナルティ、および4のギャップペナルティを使用して決定することもできる。加えて、2つのアミノ酸配列間のパーセント同一性は、GCGソフトウェアパッケージ（<http://www.gcg.com>にて利用可能）のGAPプログラムに組み込まれているNeedlemanおよびWunsch（J. Mol. Biol.（48巻）：444～453頁（1970年））のアルゴリズムを使用し、Blossum62マトリクスまたはPAM250マトリクスのいずれかと、16、14、12、10、8、6、または4のギャップ重みと、1、2、3、4、5、または6の長さ重みとを使用して決定することができる。

40

50

【0059】

本開示の核酸およびタンパク質配列は、公開データベースに対する検索を行うための「クエリー配列」としてさらに使用して、例えば、関連する配列を特定することができる。このような検索は、Altschulら（1990年）、*J. Mol. Biol.*、215巻：403～10頁のNBLASTおよびXBLASTプログラム（バージョン2.0）を使用して行うことができる。NBLASTプログラム、スコア＝100、ワード長＝12を用いてBLASTのヌクレオチド検索を行うと、本開示の核酸分子と相同なヌクレオチド配列を得ることができる。XBLASTプログラム、スコア＝50、ワード長＝3を用いてBLASTのタンパク質検索を行うと、本開示のタンパク質分子と相同なアミノ酸配列を得ることができる。比較目的のためのギャップありアラインメントを得るためには、Altschulら（1997年）、*Nucleic Acids Res.*、25巻（17号）：3389～3402頁に記載されているGapped BLASTを利用することができる。BLASTおよびGapped BLASTプログラムを利用する際は、それぞれのプログラム（例えば、XBLASTおよびNBLAST）のデフォルトパラメータを使用してよい。<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>を参照されたい。

10

【0060】

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

20

【0061】

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

【0062】

本明細書で使用される場合、「物理的選択方法」という用語は、細胞のより大きな混合物（例えばP BMC）中の細胞型を陽性選択または陰性選択するために使用され得る任意の物理的方法を指す。物理的選択方法の非限定的な例は、磁性ビーズによるソーティングである。

30

【0063】

本明細書で使用される場合、「配列番号（SEQ ID NO）」という用語は、「配列番号（Sequence ID No）」という用語と同義である。

【0064】

本明細書で使用される場合、「低分子RNA」という用語は、概して約200ヌクレオチドまたはそれ未満よりも短い長さであり、サイレンシングまたは干渉機能を有する非コードRNAを指す。他の実施形態では、低分子RNAは、約175ヌクレオチドもしくはそれ未満、約150ヌクレオチドもしくはそれ未満、約125ヌクレオチドもしくはそれ未満、約100ヌクレオチドもしくはそれ未満、または約75ヌクレオチドもしくはそれ未満の長さである。このようなRNAは、マイクロRNA（miRNA）、低分子干渉RNA（siRNA）、二本鎖RNA（dsRNA）、および低分子ヘアピン型RNA（shRNA）を含む。本開示の「低分子RNA」は、標的遺伝子の遺伝子発現を、例えば標的遺伝子のmRNAの破壊をもたらす経路によって阻害またはノックダウンすることができる。

40

【0065】

本明細書で使用される場合、用語「静置培養」は、細胞培養期間の継続期間にわたって、物理的に攪拌、揺動されないか、またはそうでなければ意図的な運動に供されない細胞培養環境を指す。

50

【 0 0 6 6 】

本明細書で使用される場合、用語「半静置培養」は、細胞培養期間の継続期間にわたって、最小限の意図的な運動、揺動、または物理的攪拌に供される細胞培養環境を指す。

【 0 0 6 7 】

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

【 0 0 6 8 】

本明細書で使用される場合、「被験体」という用語は、ヒト患者を含むが、他の哺乳動物も含む。「被験体」、「個体」、「宿主」、および「患者」という用語は、本明細書では交換可能に使用される場合がある。

10

【 0 0 6 9 】

本明細書で使用される場合、用語「T制御性細胞」は、骨髄中の前駆細胞に由来し、胸腺中で成熟する免疫抑制性T細胞の部分集団を指す。T制御性細胞は、マーカーC D 4、C D 2 5、および/またはF O X P 3の発現によって特定することができる。

【 0 0 7 0 】

本明細書で使用される場合、語句「標的配列」は、制御因子によってターゲティングされ得る任意のヌクレオチド配列を含む。標的配列の例としては、m R N A が挙げられるが、これに限定されない。制御因子の例としては、これらに限定されないが、マイクロR N A およびs h R N A など、任意の制御性R N A が挙げられる。

20

【 0 0 7 1 】

本明細書で使用される場合、「T a t」という用語は、H I V t a t 遺伝子およびその遺伝子産物、ならびにそれらのバリエーションを指す。

【 0 0 7 2 】

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

30

【 0 0 7 3 】

本明細書で使用される場合、「治療用ベクター」という用語は、A G T 1 0 3 ベクターなどのレンチウイルスベクターと同義である。

【 0 0 7 4 】

本明細書で使用される場合、「処置」または「処置すること」という用語は、概して、処置されている被験体の自然経過を変更することを試みる介入を指し、予防のために行われてもよいし、または臨床病理過程で行われてもよい。望ましい効果としては、疾患の発症または再発を防止すること、症状を緩和すること、疾患の何らかの直接的もしくは間接的な病理学的帰結を抑制、減少、または阻害すること、病状を回復または軽減させること、および寛解または改善された予後を引き起こすことが挙げられるが、これらに限定されない。

40

【 0 0 7 5 】

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

【 0 0 7 6 】

50

本明細書で使用される場合、用語「バリエーション」は、参照配列と比較して、一塩基多型、単一塩基変異、転換、反転、複製、欠失、または置換の少なくとも1つを含むヌクレオチド配列を指す。「バリエーション」は、「バリエーション」ヌクレオチド配列ならびにそれに関する転写後修飾および翻訳後修飾に由来するアミノ酸配列を含む。

【0077】

「Vif」という用語は、HIV vif 遺伝子およびその遺伝子産物、ならびにそれらのバリエーションを指す。

【0078】

本開示の複数の態様の説明

本明細書で詳述されるように、一態様では、HIVに感染した細胞を処置する方法が提供される。本方法は、概して、ex vivoで行われる、HIVに感染した被験体から単離された末梢血単核細胞(PBMC)を治療有効量の刺激剤と接触させるステップと、非標的細胞集団を枯渇させるステップと、少なくとも1つの遺伝子エレメントをコードするウイルス送達システムをPBMCにex vivoで形質導入するステップと、そのような形質導入を達成するために十分な期間にわたって、形質導入されたPBMCを培養するステップとを含む。複数の実施形態では、形質導入されたPBMCは約1~約35日間培養される。複数の実施形態では、本方法は、形質導入されたPBMCを被験体に注入するステップをさらに含む。複数の実施形態では、被験体はヒトである。複数の実施形態では、刺激剤は、ペプチドまたはペプチドの混合物であり、また複数の実施形態では、gagペプチドを含む。さらなる実施形態では、刺激剤はワクチンを含む。複数の実施形態では、ワクチンはHIVワクチンであり、さらなる実施形態では、HIVワクチンは、MVA/HIV62Bワクチンまたはそのバリエーションまたは類似体である。複数の実施形態では、ウイルス送達システムはレンチウイルス粒子を含む。複数の実施形態では、少なくとも1つの遺伝子エレメントは、ケモカイン受容体CCR5の産生を阻害することができる低分子RNAを含む。複数の実施形態では、少なくとも1つの遺伝子エレメントは、HIV RNA配列をターゲティングすることができる少なくとも1つの低分子RNAを含む。他の実施形態では、少なくとも1つの遺伝子エレメントは、ケモカイン受容体CCR5の産生を阻害することができる低分子RNAと、HIV RNA配列をターゲティングすることができる少なくとも1つの低分子RNAとを含む。複数の実施形態では、HIV RNA配列は、HIV感染を予防するかまたは既に感染している細胞でのウイルス発現を低減するHIV Vif配列、HIV Tat配列、それらのバリエーション、または他のHIV遺伝子に由来するRNA配列を含む。複数の実施形態では、少なくとも1つの遺伝子エレメントは、マイクロRNAまたはshRNAのうちの少なくとも1つを含む。さらなる実施形態では、少なくとも1つの遺伝子エレメントは、マイクロRNAクラスターを含む。

【0079】

複数の実施形態では、少なくとも1つの遺伝子エレメントは、配列番号1と少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、またはそれよりも高いパーセント同一性を有するマイクロRNAを含む。複数の実施形態では、マイクロRNAは、配列番号1と80%未満の配列同一性を有する。複数の実施形態では、マイクロRNAは、配列番号1と95%よりも大きな配列同一性を有する。複数の実施形態では、少なくとも1つの遺伝子エレメントは、配列番号1を含む。

【0080】

複数の実施形態では、少なくとも1つの遺伝子エレメントは、配列番号2と少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%

10

20

30

40

50

、少なくとも94%、少なくとも95%、もしくはそれよりも高いパーセント同一性を有するマイクロRNAを含む。複数の実施形態では、マイクロRNAは、配列番号2と80%未満の配列同一性を有する。複数の実施形態では、マイクロRNAは、配列番号2と95%よりも大きな配列同一性を有する。複数の実施形態では、少なくとも1つの遺伝子エレメントは、配列番号2を含む。

【0081】

複数の実施形態では、少なくとも1つの遺伝子エレメントは、配列番号3と少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、もしくはそれよりも高いパーセント同一性を有するマイクロRNAを含む。複数の実施形態では、マイクロRNAは、配列番号3と80%未満の配列同一性を有する。複数の実施形態では、マイクロRNAは、配列番号3と95%よりも大きな配列同一性を有する。複数の実施形態では、少なくとも1つの遺伝子エレメントは、配列番号3を含む。

10

【0082】

複数の実施形態では、マイクロRNAクラスターは、配列番号30と少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、またはそれよりも高いパーセント同一性を有する配列を含む。複数の実施形態では、マイクロRNAクラスターは、配列番号30と80%未満の配列同一性を有する。複数の実施形態では、マイクロRNAクラスターは、配列番号30と95%よりも大きな配列同一性を有する。複数の実施形態では、マイクロRNAクラスターは配列番号30を含む。

20

【0083】

別の態様では、HIV+個体から末梢血を得るステップと；血液を分画してPBMC集団を得るステップと；PBMC集団を、精製された抗原提示細胞またはHIVの成分を代表するペプチドもしくはタンパク質と接触させるステップと；接触させたPBMC集団を約1～約12日間培養して抗原特異的集団を拡大増殖させるステップと；1つもしくは複数の非標的細胞集団を枯渇させて、ペプチド刺激に应答する細胞が濃縮された画分を生成するステップと；本明細書で詳述されるウイルス送達システムを、濃縮された細胞画分に*ex vivo*で形質導入するステップと；適度な細胞増殖を確実にするために十分な期間にわたって、形質導入された細胞画分を培養するステップと；形質導入された細胞を採取するステップとを含む方法が開示される。

30

【0084】

複数の実施形態では、PBMC集団をさらに精製して、PBMCの精製画分を生成する。複数の実施形態では、PBMCのさらに精製した画分を、HIVの成分を代表するペプチドまたはタンパク質と接触させる。

【0085】

別の態様では、リンパ球を少なくとも1つのHIVペプチドと接触させるステップと、少なくとも1つの遺伝子エレメントをコードするウイルス送達システムをリンパ球に形質導入するステップとを含む方法が開示される。

40

【0086】

複数の実施形態では、接触させるリンパ球は、T細胞、B細胞、およびNK細胞のいずれか1つまたは複数を含む。複数の実施形態では、接触させるリンパ球はT細胞のみを含む。複数の実施形態では、T細胞は、CD4+T細胞、CD8+T細胞、および細胞のいずれか1つまたは複数を含む。複数の実施形態では、T細胞はCD4+T細胞のみを含む。

【0087】

50

複数の実施形態では、接触させるリンパ球はP B M Cに由来する。複数の実施形態では、本方法は、P B M C中の少なくとも1サブセットの細胞を枯渇させるステップをさらに含む。複数の実施形態では、枯渇させる少なくとも1サブセットの細胞は、B細胞、NK細胞、C D 8 + T細胞、および細胞のいずれか1つまたは複数を含む。

【0088】

複数の実施形態では、接触させるリンパ球は、白血球の集団に由来する。複数の実施形態では、本方法は、白血球中の少なくとも1サブセットの細胞を枯渇させるステップをさらに含む。複数の実施形態では、枯渇させる少なくとも1サブセットの細胞は、好中球、好酸球、好塩基球、単球、ならびにNK細胞、B細胞、C D 8 + T細胞、および細胞のいずれか1つまたは複数を含むある特定のリンパ球のいずれか1つまたは複数を含む。

10

【0089】

複数の実施形態では、接触させるリンパ球は、細胞の集団に由来する。複数の実施形態では、本方法は、細胞の集団から少なくとも1サブセットの細胞を枯渇させるステップをさらに含む。複数の実施形態では、枯渇させる少なくとも1サブセットの細胞は、C D 8 + T細胞、細胞、NK細胞、B細胞、好中球、好塩基球、肥満細胞、単球、樹状細胞、T制御性細胞、NK T細胞、および赤血球のいずれか1つまたは複数を含む。複数の実施形態では、枯渇させる少なくとも1サブセットの細胞は、C D 4 + T細胞ではない任意の細胞型のいずれか1つまたは複数を含む。

【0090】

複数の実施形態では、ウイルス送達システムはレンチウイルス粒子を含む。複数の実施形態では、レンチウイルス粒子は、本明細書に記載の任意のレンチウイルス粒子である。

20

【0091】

別の態様では、被験体においてH I V感染を処置するための細胞産物を製造する方法が開示される。本方法は、概して、血中白血球を得るステップと、被験体から白血球を取り出すステップと、末梢血単核細胞(P B M C)またはP B M Cの画定画分を精製するステップとを含む。複数の実施形態では、本方法は、P B M CまたはP B M Cの精製画分を治療有効量の刺激剤とe x v i v oで接触させるステップと；抗原特異的T細胞の割合を増加させるために、1つまたは複数の非標的集団を枯渇させるステップと；少なくとも1つの遺伝子エレメントをコードするウイルス送達システムをP B M CまたはP B M Cの精製画分にe x v i v oで形質導入するステップと；改変細胞集団の形質導入および成長を達成するために十分な期間にわたって、形質導入されたP B M CまたはP B M Cの精製画分を培養するステップと；形質導入されたP B M CまたはP B M Cの精製画分を採取するステップとをさらに含む。複数の実施形態では、形質導入されたP B M CまたはP B M Cの精製画分は、約1～約35日間培養される。複数の実施形態では、本方法は、形質導入されたP B M CまたはP B M Cの精製画分を被験体に注入するステップをさらに含む。複数の実施形態では、被験体はヒトである。複数の実施形態では、第1の刺激剤の少なくとも1つは、ペプチドまたはペプチドの混合物を含み、H I Vゲノムによってコードされるタンパク質の1つ、2つ、3つ、またはそれよりも多くを代表し、処置が意図されている国または地域に由来する公知のH I V分離株間の配列変異を代表するか、または特定の患者集団の組織適合性遺伝子間のまれな変異を含む個々のペプチドの複数の例を含む。複数の実施形態では、第1の刺激剤の少なくとも1つは、g a gペプチドを含む。複数の実施形態では、第1の刺激剤の少なくとも1つは、ワクチンを含む。複数の実施形態では、ワクチンはH I Vワクチンであり、さらなる実施形態では、H I Vワクチンは、M V A / H I V 6 2 B ワクチンまたはそのバリエーションもしくは類似体である。複数の実施形態では、第1の刺激剤は、g a gペプチドの混合物である。

30

40

【0092】

複数の実施形態では、ウイルス送達システムはレンチウイルス粒子を含む。複数の実施形態では、少なくとも1つの遺伝子エレメントは、ケモカイン受容体C C R 5の産生を阻害することができる低分子R N Aを含む。複数の実施形態では、少なくとも1つの遺伝子エレメントは、H I V R N A配列をターゲティングすることができる少なくとも1つの

50

低分子RNAを含む。複数の実施形態では、少なくとも1つの遺伝子エレメントは、ケモカイン受容体CCR5の産生を阻害することができる低分子RNAと、HIV RNA配列をターゲティングすることができる少なくとも1つの低分子RNAとを含む。複数の実施形態では、HIV RNA配列は、HIV Vif配列、HIV Tat配列、またはそれらのバリエーションを含む。複数の実施形態では、少なくとも1つの遺伝子エレメントは、マイクロRNAもしくはshRNA、またはそれらのクラスターを含む。複数の実施形態では、少なくとも1つの遺伝子エレメントは、合成マイクロRNAクラスターを含む。

【0093】

複数の実施形態では、少なくとも1つの遺伝子エレメントは、配列番号1と少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、またはそれよりも高いパーセント同一性を有するマイクロRNAを含む。複数の実施形態では、マイクロRNAは、配列番号1と80%未満の配列同一性を有する。複数の実施形態では、マイクロRNAは、配列番号1と95%よりも大きな配列同一性を有する。複数の実施形態では、少なくとも1つの遺伝子エレメントは、配列番号1を含む。

10

【0094】

複数の実施形態では、少なくとも1つの遺伝子エレメントは、配列番号2と少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、またはそれよりも高いパーセント同一性を有するマイクロRNAを含む。複数の実施形態では、マイクロRNAは、配列番号2と80%未満の配列同一性を有する。複数の実施形態では、マイクロRNAは、配列番号2と95%よりも大きな配列同一性を有する。複数の実施形態では、少なくとも1つの遺伝子エレメントは配列番号2を含む。

20

【0095】

複数の実施形態では、少なくとも1つの遺伝子エレメントは、配列番号3と少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、またはそれよりも高いパーセント同一性を有するマイクロRNAを含む。複数の実施形態では、マイクロRNAは、配列番号3と80%未満の配列同一性を有する。複数の実施形態では、マイクロRNAは、配列番号3と95%よりも大きな配列同一性を有する。複数の実施形態では、少なくとも1つの遺伝子エレメントは配列番号3を含む。

30

【0096】

複数の実施形態では、マイクロRNAクラスターは、配列番号30と少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、またはそれよりも高いパーセント同一性を有する配列を含む。複数の実施形態では、マイクロRNAクラスターは、配列番号30と80%未満の配列同一性を有する。複数の実施形態では、マイクロRNAクラスターは、配列番号30と95%よりも大きな配列同一性を有する。複数の実施形態では、マイクロRNAクラスターは、配列番号30を含む。

40

【0097】

別の態様では、被験体においてHIVを処置するための細胞産物を製造する方法が開示される。複数の実施形態では、本方法は、PBMCまたはPBMCの精製画分を少なくと

50

も1つの抗原と接触させるステップと、P B M C中の1つまたは複数の非標的細胞集団を枯渇させるステップとを含む。複数の実施形態では、1つまたは複数の非標的細胞集団は、B細胞、NK細胞、C D 8 + T細胞、および細胞のいずれか1つまたは複数を含む。複数の実施形態では、少なくとも1つの抗原は、H I Vゲノムによってコードされるペプチドまたはペプチドの混合物である。複数の実施形態では、ペプチドは、g a g ペプチドであるか、またはペプチドの混合物はg a g ペプチドを含む。

【0098】

別の態様では、被験体においてH I Vを処置するための細胞産物を製造する方法が開示される。複数の実施形態では、本方法は、白血球または白血球の精製画分を少なくとも1つの抗原と接触させるステップと、白血球中の1つまたは複数の非標的細胞集団を枯渇させるステップとを含む。複数の実施形態では、1つまたは複数の非標的細胞集団は、好中球、好塩基球、好酸球および単球のいずれか1つまたは複数を含む。複数の実施形態では、1つまたは複数の非標的細胞集団は、B細胞、NK細胞、およびC D 8 + T細胞のいずれか1つまたは複数を含む特定のリンパ球をさらに含む。複数の実施形態では、少なくとも1つの抗原は、H I Vゲノムによってコードされるペプチドまたはペプチドの混合物である。複数の実施形態では、ペプチドはg a g ペプチドであるか、またはペプチドの混合物はg a g ペプチドを含む。

10

【0099】

別の態様では、レンチウイルスベクターが開示される。このレンチウイルスベクターは、少なくとも1つのコードされた遺伝子エレメントを含み、少なくとも1つのコードされた遺伝子エレメントは、ケモカイン受容体C C R 5の産生を阻害することができる低分子RNA、またはH I V RNA配列をターゲティングすることができる少なくとも1つの低分子RNAを含む。

20

【0100】

別の態様では、少なくとも1つのコードされた遺伝子エレメントが、ケモカイン受容体C C R 5の産生を阻害することができる低分子RNAと、H I V RNA配列をターゲティングすることができる少なくとも1つの低分子RNAとを含むレンチウイルスベクターが開示される。H I V RNA配列は、H I V V i f配列、H I V T a t配列、H I Vゲノムの別の部分に由来する配列、またはそれらのバリエーションを含み得る。少なくとも1つのコードされた遺伝子エレメントは、マイクロRNAまたはs h RNAを含み得る。少なくとも1つのコードされた遺伝子エレメントは、マイクロRNAクラスターを含み得る。

30

【0101】

複数の実施形態では、少なくとも1つの遺伝子エレメントは、配列番号1と少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、またはそれよりも高いパーセント同一性を有するマイクロRNAを含む。複数の実施形態では、マイクロRNAは、配列番号1と80%未満の配列同一性を有する。複数の実施形態では、マイクロRNAは、配列番号1と95%よりも大きな配列同一性を有する。複数の実施形態では、少なくとも1つの遺伝子エレメントは配列番号1を含む。

40

【0102】

複数の実施形態では、少なくとも1つの遺伝子エレメントは、配列番号2と少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、またはそれよりも高いパーセント同一性を有するマイクロRNAを含む。複数の実施形態では、マイクロRNAは、配列番号2と80%未満の配列同一性を有する。複数の実施形態では、マイクロRNAは、配列番号2と95

50

%よりも大きな配列同一性を有する。複数の実施形態では、少なくとも1つの遺伝子エレメントは配列番号2を含む。

【0103】

複数の実施形態では、少なくとも1つの遺伝子エレメントは、配列番号3と少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、またはそれよりも高いパーセント同一性を有するマイクロRNAを含む。複数の実施形態では、マイクロRNAは、配列番号3と80%未満の配列同一性を有する。複数の実施形態では、マイクロRNAは、配列番号3と95%よりも大きな配列同一性を有する。複数の実施形態では、少なくとも1つの遺伝子エレメントは配列番号3を含む。

10

【0104】

複数の実施形態では、マイクロRNAクラスターは、配列番号30と少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、またはそれよりも高いパーセント同一性を有する配列を含む。複数の実施形態では、マイクロRNAクラスターは、配列番号30と80%未満の配列同一性を有する。複数の実施形態では、マイクロRNAクラスターは、配列番号30と95%よりも大きな配列同一性を有する。複数の実施形態では、マイクロRNAクラスターは配列番号30を含む。

20

【0105】

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

30

【0106】

複数の実施形態では、エンベロプタンパク質は、細胞内区画に感染するように最適化されている。複数の実施形態では、エンベロプタンパク質は、本明細書に記載のエンベロプタンパク質のいずれかである。

【0107】

別の態様では、細胞に感染することができるレンチウイルス粒子が開示される。レンチウイルス粒子は、好ましくは細胞に感染するように最適化された少なくとも1つのエンベロプタンパク質と、本明細書に記載されるレンチウイルスベクターとを含む。エンベロプタンパク質は、T細胞に感染するように最適化されていてよい。複数の実施形態では、エンベロプタンパク質は、CD4+T細胞に感染するように最適化されている。

40

【0108】

複数の実施形態では、粒子は、シュードタイプ化粒子である。複数の実施形態では、シュードタイプ化粒子は、本明細書に記載の任意のシュードタイプ化粒子である。複数の実施形態では、シュードタイプ化粒子は、レンチウイルスではないウイルスに由来するエンベロプタンパク質を含む。複数の実施形態では、エンベロプタンパク質が由来するウイルスは、本明細書に記載の任意のウイルスである。

【0109】

50

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

【0110】

別の態様では、改変細胞が開示される。複数の実施形態では、改変細胞は、レンチウイルス粒子および外因性抗原に感染しているCD4 + T細胞である。複数の実施形態では、レンチウイルス粒子は、本明細書に記載の任意のレンチウイルス粒子である。複数の実施形態では、外因性抗原は、HIVに由来する抗原である。複数の実施形態では、HIVに由来する抗原は、本明細書に記載の任意のHIV抗原である。

10

【0111】

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

20

【0112】

別の態様では、方法が開示される。本方法は、末梢血単核細胞(PBMC)を供給源から精製するステップと、少なくとも1つのHIV特異的ペプチドでPBMCを刺激するステップと、少なくとも1サブセットの細胞をPBMCから枯渇させるステップであって、少なくとも1サブセットの細胞が、CD8 + T細胞、CD4 + T細胞、細胞、NK細胞、B細胞、T制御性細胞、およびNKT細胞のいずれか1つまたは複数を含む、ステップと、枯渇させたPBMCに、少なくとも1つの遺伝子エレメントをコードするウイルス送達システムで形質導入するステップと、少なくとも1日間にわたって、形質導入されたPBMCを培養するステップと、培養されたPBMCを採取するステップとを含む。

30

【0113】

複数の実施形態では、PBMCの精製は、残留赤血球細胞、残留血小板、および残留炎症細胞のいずれか1つまたは複数を含む。複数の実施形態では、精製は、細胞密度に基づいて、残留赤血球細胞、残留血小板、および残留炎症細胞のいずれか1つまたは複数を含む。複数の実施形態では、細胞密度に基づく分離は、分画遠心分離を含む。しかしながら、PBMCを精製および/または分離する任意の好適な方法が企図される。

【0114】

複数の実施形態では、精製は、磁気ビーズ分離を使用して、残留赤血球細胞、残留血小板、および残留炎症細胞のいずれか1つまたは複数を含む。複数の実施形態では、精製は、磁気ビーズ分離を使用してPBMCから他の夾雑物を分離することを含む。複数の実施形態では、磁気ビーズ分離は、白血球の陽性選択を助けるために抗体を使用することを含む。複数の実施形態では、磁気ビーズ分離は、残留赤血球細胞、残留血小板、残留炎症細胞、および/または他の夾雑物の陰性選択を助けるために抗体を使用することを含む。複数の実施形態では、抗体は、モノクローナル抗体である。複数の実施形態では、PBMCの精製は、自動化システムを使用することを含む。

40

【0115】

複数の実施形態では、形質導入されたPBMCは、1日間よりも長期間にわたって、例

50

えば、24時間よりも長期間にわたって、30時間よりも長期間にわたって、36時間よりも長期間にわたって、42時間よりも長期間にわたって、48時間よりも長期間にわたって、48時間よりも長期間にわたって、54時間よりも長期間にわたって、60時間よりも長期間にわたって、66時間よりも長期間にわたって、72時間よりも長期間にわたって、78時間よりも長期間にわたって、84時間よりも長期間にわたって、90時間よりも長期間にわたって、または96時間よりも長期間にわたって培養される。

【0116】

複数の実施形態では、培養は、静置培養システムで行われる。複数の実施形態では、培養は、半静置培養システムで行われる。複数の実施形態では、培養細胞は、培養皿またはフラスコに付着する。複数の実施形態では、培養細胞は、懸濁される。複数の実施形態では、培養細胞の一部は、培養皿またはフラスコに付着し、一部の細胞は懸濁される。

10

【0117】

複数の実施形態では、少なくとも1つのHIV特異的ペプチドは、合成ペプチドのプールを含む。複数の実施形態では、合成ペプチドのプールの合成ペプチドは、重複している。複数の実施形態では、合成ペプチドのプールの合成ペプチドは、重複していない。複数の実施形態では、合成ペプチドのプールは、およそ150個の個々のペプチドを含む。複数の実施形態では、ペプチドのプールは、特定の領域または部分集団に見出される流行性HIV配列と一致するように、または主要組織適合遺伝子クラスター中の特定のハプロタイプによって決定されるペプチド結合およびT細胞受容体認識の要件とより良好に一致するように含まれる個々のペプチドの配列バリエーションを含んでいてもよい。複数の実施形態では、合成ペプチドのプールは、150個未満の個々のペプチド、例えば、140個未満の個々のペプチド、130個未満の個々のペプチド、120個未満の個々のペプチド、110個未満の個々のペプチド、100個未満の個々のペプチド、90個未満の個々のペプチド、80個未満の個々のペプチド、70個未満の個々のペプチド、60個未満の個々のペプチド、または50個未満の個々のペプチドを含む。複数の実施形態では、合成ペプチドのプールは、150個よりも多くの個々のペプチド、例えば、160個よりも多くの個々のペプチド、170個よりも多くの個々のペプチド、180個よりも多くの個々のペプチド、190個よりも多くの個々のペプチド、200個よりも多くの個々のペプチド、210個よりも多くの個々のペプチド、220個よりも多くの個々のペプチド、230個よりも多くの個々のペプチド、240個よりも多くの個々のペプチド、または250個よりも多くの個々のペプチドを含む。

20

30

【0118】

複数の実施形態では、合成ペプチドのプールは、HIV Gagポリタンパク質である。しかしながら、合成ペプチドのプールは、任意のHIV特異的ペプチドであってもよい。

【0119】

複数の実施形態では、少なくとも1つのHIV特異的ペプチドによるPBMCの刺激は、組換えワクシニアをPBMCに感染させることを含む。複数の実施形態では、ワクシニアは、Gagタンパク質を発現する。複数の実施形態では、ワクシニアは、Gagタンパク質、Polタンパク質、およびEnvタンパク質のいずれか1つまたは複数を含む。複数の実施形態では、ワクシニアは、白血球細胞をターゲティングする。複数の実施形態では、ワクシニアは、好中球、好酸球、好塩基球、リンパ球、および単球のいずれか1つまたは複数を選択的にターゲティングする。複数の実施形態では、ワクシニアは、マクロファージをターゲティングする。複数の実施形態では、ワクシニアは、任意の抗原提示細胞をターゲティングする。複数の実施形態では、抗原提示細胞はB細胞である。複数の実施形態では、抗原提示細胞は樹状細胞である。

40

【0120】

複数の実施形態では、少なくとも1つのHIV特異的ペプチドによるPBMCの刺激は、精製Gagタンパク質をPBMC培養物に直接添加することを含む。複数の実施形態では、精製Gagタンパク質はワクチンを含む。複数の実施形態では、精製Gagタンパク

50

質は、Gag p24タンパク質ワクチンを含む。複数の実施形態では、少なくとも1つのHIV特異的ペプチドによるPBM Cの刺激は、精製Envタンパク質をPBM C培養物に直接添加することを含む。複数の実施形態では、少なくとも1つのHIV特異的ペプチドによるPBM Cの刺激は、精製Polタンパク質をPBM C培養物に直接添加することを含む。

【0121】

複数の実施形態では、少なくとも1つのHIV特異的ペプチドによるPBM Cの刺激は、公知のHIV配列の様々な配列変異を含む、カスタマイズされたペプチドを添加することを含む。複数の実施形態では、カスタマイズされたペプチドは、ペプチドのアレイを含む。

10

【0122】

複数の実施形態では、枯渇は、枯渇させたPBM Cから少なくとも1サブセットの細胞を分離することを含む。複数の実施形態では、少なくとも1サブセットの細胞はCD8+T細胞を含む。複数の実施形態では、少なくとも1サブセットの細胞は、CD8+T細胞、CD56+NK細胞、B細胞、および細胞を含む。複数の実施形態では、少なくとも1サブセットの細胞は、CD8+T細胞および細胞を含む。複数の実施形態では、少なくとも1サブセットの細胞は、CD8+T細胞、細胞、およびB細胞を含む。しかしながら、少なくとも1サブセットの細胞は、限定されるものではないが、CD8+T細胞、CD4+T細胞、細胞、NK細胞、B細胞、T制御性細胞、およびNK T細胞のいずれか1つまたは複数を含む、PBM C中に存在する任意のサブセットの細胞を含んでいてもよい。

20

【0123】

複数の実施形態では、分離は、磁気ビーズ分離を含む。複数の実施形態では、枯渇は、細胞表面マーカーに対する鉄標識抗体を使用して、任意の不要なサブセットの細胞を特定する方法を含む。複数の実施形態では、本方法は、それらを磁気カラムに保持させることによって不要なサブセットの細胞を除去するステップをさらに含む。

【0124】

複数の実施形態では、枯渇は、インターフェロン-ガンマを分泌しているGag応答細胞の陽性選択を含む。複数の実施形態では、Gag応答細胞は、マクロファージ、Bリンパ球、および/またはTリンパ球である。複数の実施形態では、Gag応答細胞は、インターフェロン-アルファ、インターフェロン-ベータ、またはインターフェロン-ガンマなどの他のタイプのインターフェロンを分泌する。

30

【0125】

複数の実施形態では、枯渇は、不要な細胞型を特定する未標識抗体を利用することを含む。複数の実施形態では、本方法は、抗体結合細胞をカラムに保持するステップをさらに含む。複数の実施形態では、カラムは、プロテインAでコーディングされている。複数の実施形態では、カラムはプロテインGでコーディングされている。複数の実施形態では、カラムは、抗免疫グロブリン、またはターゲティング抗体と結合した細胞を効果的に除去する化合物と結合する別の免疫グロブリンでコーディングされている。

40

【0126】

複数の実施形態では、枯渇は、密度に基づいて標的細胞を精製することを含む。複数の実施形態では、枯渇は、密度勾配遠心分離を使用することを含む。

【0127】

複数の実施形態では、枯渇は、不要な白血球を一次抗体で標識すること、およびモノクローナル抗体の定常領域と結合する二次抗体で細胞を死滅させることを含む。複数の実施形態では、二次抗体は、毒素と化学的に連結されている。複数の実施形態では、毒素は、ジフテリア毒素である。複数の実施形態では、抗体は、モノクローナルである。複数の実施形態では、抗体は、ポリクローナルである。

【0128】

複数の実施形態では、少なくとも1つの遺伝子エレメントは、ケモカイン受容体CCR

50

5の産生を阻害することができる低分子RNA、またはHIV RNA配列をターゲティングすることができる少なくとも1つの低分子RNAを含む。複数の実施形態では、HIV RNA配列は、HIV Vif配列、HIV Tat配列、またはそれらのバリエーションを含む。

【0129】

複数の実施形態では、少なくとも1つの遺伝子エレメントは、非コードRNAを含む。複数の実施形態では、非コードRNAは、マイクロRNAである。複数の実施形態では、非コードRNAは、siRNAである。複数の実施形態では、非コードRNAは、piRNAである。複数の実施形態では、非コードRNAは、snRNAである。複数の実施形態では、非コードRNAは、snoRNAである。複数の実施形態では、非コードRNAは、snRNAである。複数の実施形態では、非コードRNAは、exRNAである。複数の実施形態では、少なくとも1つの遺伝子エレメントは、マイクロRNAまたはshRNAを含む。

10

【0130】

複数の実施形態では、少なくとも1つの遺伝子エレメントは、配列番号1、配列番号2、配列番号3、または配列番号30の少なくとも1つと、少なくとも80%、または少なくとも85%、または少なくとも90%、または少なくとも95%の同一性を有するマイクロRNAを含む。複数の実施形態では、少なくとも1つの遺伝子エレメントは、配列番号1、配列番号2、配列番号3、または配列番号30の少なくとも1つと、80%未満の同一性、例えば、75%同一性、70%同一性、65%同一性、60%同一性、55%同一性、または50%同一性を有するマイクロRNAを含む。

20

【0131】

別の態様では、HIVに感染した被験体を処置するための遺伝子改変リンパ球が開示される。遺伝子改変リンパ球は、末梢血単核細胞(PBMC)を被験体から精製するステップと、少なくとも1つのHIV特異的ペプチドでPBMCを刺激するステップと、少なくとも1サブセットの細胞をPBMCからの枯渇させるステップであって、少なくとも1サブセットの細胞が、CD8+T細胞、CD4+T細胞、細胞、NK細胞、T制御性細胞、およびNKT細胞のいずれか1つまたは複数を含む、ステップと、枯渇させたPBMCに、少なくとも1つの遺伝子エレメントをコードするウイルス送達システムで形質導入するステップと、少なくとも1日間にわたって、形質導入されたPBMCを培養するステップと、培養されたPBMCを採取するステップとを含むプロセスによって調製される。

30

【0132】

複数の実施形態では、HIVに感染した被験体は、HIV感染の潜伏期にある。複数の実施形態では、HIVに感染した被験体は、HIV感染の臨床症状をほとんどまたは全く経験していない。複数の実施形態では、HIVに感染した被験体は、HIV感染の急性期にある。複数の実施形態では、HIVに感染した被験体は、HIV感染の慢性期にある。複数の実施形態では、HIVに感染した被験体は、HIVが血流に進入したウイルス血症を経験したことがある。複数の実施形態では、HIVに感染した被験体は、HIV感染の結果として、CD4+T細胞が枯渇されている。複数の実施形態では、HIVに感染した被験体は、末梢血、胃腸管、リンパ節、およびリンパ組織のいずれか1つまたは複数においてCD4+細胞が枯渇されている。複数の実施形態では、CD4+T細胞は、胃腸管で優先的に枯渇される。複数の実施形態では、HIVに感染した被験体は、末梢血、胃腸管、リンパ節、およびリンパ組織のいずれか1つまたは複数においてCCR5+CD4+T細胞が枯渇されている。

40

【0133】

別の態様では、予防用または治療用HIVワクチンで免疫された被験体を処置するための遺伝子改変リンパ球が開示される。遺伝子改変リンパ球は、末梢血単核細胞(PBMC)を被験体から精製するステップと、少なくとも1つのHIV特異的ペプチドでPBMCを刺激するステップと、少なくとも1サブセットの細胞をPBMCから枯渇させるステップであって、少なくとも1サブセットの細胞が、CD8+T細胞、CD4+T細胞、細胞、NK細胞、B細胞、好中球、T制御性細胞、およびNKT細胞のいずれか1つまた

50

は複数を含む、ステップと、枯渇させたP B M Cに、少なくとも1つの遺伝子エレメントをコードするウイルス送達システムで形質導入するステップと、少なくとも1日間にわたって、形質導入されたP B M Cを培養するステップと、培養されたP B M Cを採取するステップとを含むプロセスによって調製される。

【0134】

複数の実施形態では、予防用または治療用ワクチンで免疫された被験体は、生物全体を含むワクチンで免疫されている。複数の実施形態では、予防用または治療用ワクチンで免疫された被験体は、生弱毒化生物を含むワクチンで免疫されている。複数の実施形態では、予防用または治療用ワクチンで免疫された被験体は、抗レトロウイルス剤を含むワクチンで免疫されている。複数の実施形態では、予防用または治療用ワクチンで免疫された被験体は、抗体を含むワクチンで免疫されている。複数の実施形態では、予防用または治療用ワクチンで免疫された被験体は、T細胞免疫の刺激を引き起こすワクチンで免疫されている。複数の実施形態では、予防用または治療用ワクチンで免疫された被験体は、内在性抗体を刺激するワクチンで免疫されている。複数の実施形態では、予防用または治療用H I Vワクチンで免疫されている被験体は、R V 1 4 4 プライムおよびブーストワクチンで免疫されている。

10

【0135】

別の態様では、H I Vに曝露されたが感染してない被験体または予防用ワクチン接種によりH I Vに対して免疫された被験体を処置するための遺伝子改変リンパ球が開示される。これらの個体は、特に生殖流体との接触により感染性H I Vに1回または複数回曝露されており、その後H I Vに対する免疫応答を発生させ得るが、血漿ウイルスRNAのアッセイまたはP B M Cからの感染性ウイルスの単離を含む診断基準では感染していない。これらの個体は、単一または複数用量の1つまたは複数のH I V予防ワクチンを受けている場合がある。これらの個体は検出可能なH I V免疫を有するため、A G T 1 0 3 - T製品を製造し、遺伝子改変リンパ球を注入することにより、H I V免疫のレベルを増加させ、H I V免疫のレベルを、感染性H I Vへのその後の曝露に耐えるのに十分な程度に耐久性にすることが可能である。複数の実施形態では、遺伝子改変リンパ球は、末梢血単核細胞(P B M C)を被験体から精製するステップと、少なくとも1つのH I V特異的ペプチドでP B M Cを刺激するステップと、少なくとも1サブセットの細胞をP B M Cからの枯渇させるステップであって、少なくとも1サブセットの細胞が、C D 8 + T細胞、C D 4 + T細胞、細胞、N K細胞、B細胞、T制御性細胞、およびN K T細胞のいずれか1つまたは複数を含む、ステップと、枯渇させたP B M Cに、少なくとも1つの遺伝子エレメントをコードするウイルス送達システムで形質導入するステップと、少なくとも1日間にわたって、形質導入されたP B M Cを培養するステップと、培養されたP B M Cを採取するステップとを含むプロセスによって調製される。

20

30

【0136】

ヒト免疫不全ウイルス(H I V)

一般的に「H I V」とも呼ばれるヒト免疫不全ウイルスは、ヒトにおいて後天性免疫不全症候群(A I D S)を引き起こすレトロウイルスである。A I D Sとは、免疫系の進行性不全が、生命を脅かす日和見感染およびがんを蔓延させる状態である。処置しなければ、H I V感染後の平均生存期間は、H I Vサブタイプおよび宿主集団の遺伝的特質に応じて9~11年と推定される。H I Vによる感染は、血液、精液、膣液、尿道球腺液(p r e - e j a c u l a t e)、唾液、涙、リンパ液もしくは脳脊髄液、または母乳を含むがこれらに限定されない体液の移入、あるいは汚染された血液または組織産物の使用によって起こる。H I Vは、感染した個体において遊離ウイルス粒子として存在する場合もあれば、感染した免疫細胞内に存在する場合もある。

40

【0137】

H I Vは、ヘルパーT細胞などのヒト免疫系に不可欠な細胞に感染するが、向性はH I Vサブタイプ間で異なり得る。H I V感染に対して特に感受性であり得る免疫細胞としては、C D 4 + T細胞、マクロファージ、および樹状細胞が挙げられるが、これらに限定さ

50

れない。H I V感染は、感染していないパイスタンダー細胞のアポトーシス、感染細胞の直接的なウイルスによる殺傷、および感染細胞を認識する細胞傷害性リンパ球による感染C D 4 + T細胞の殺傷を含むがこれらに限定されないいくつかの機構により、低レベルのC D 4 + T細胞をもたらす。C D 4 + T細胞数が臨界レベル未満に低下すると、細胞媒介性免疫が失われ、日和見感染およびがんに対して身体が、次第により感受性になる。

【0138】

H I Vは構造的に多くの他のレトロウイルスと異なる。R N Aゲノムは、少なくとも7つの構造的目印(L T R、T A R、R R E、P E、S L I P、C R S、およびI N S)、および19種のタンパク質をコードする少なくとも9つの遺伝子(g a g、p o l、e n v、t a t、r e v、n e f、v i f、v p r、v p u、ならびに場合によってはt a t、e n vおよびr e vの融合物である10番目のt e v)からなる。これらの遺伝子のうちの3つ、すなわちg a g、p o l、およびe n vは、新しいウイルス粒子のための構造タンパク質を作るのに必要な情報を含む。

10

【0139】

H I Vは主にC D 4 T細胞において複製し、細胞の破壊または調節不全を引き起こして宿主免疫を低下させる。H I Vは、組み込まれたプロウイルスとして感染を確立し、特定の細胞におけるウイルス発現がこの細胞に影響する細胞病理または宿主免疫系による検出に必要とされるレベル未満に減少する潜伏状態に入る場合があるため、H I Vは処置が困難であり、長期間の抗レトロウイルス薬併用療法(c A R T)の後でさえも根絶されていない。ほとんどの場合、c A R Tによって生存が延長され得るとはいえ、H I V感染は致命的疾患を引き起こす。

20

【0140】

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

【0141】

遺伝子療法の使用により多少の進歩があったが、前向きな結果は散発的であり、宿主細胞へのウイルスの侵入において決定的な役割を果たす、C C R 5をコードする遺伝子の一方または両方の対立遺伝子に欠損を有する稀なヒトの間でしか見出されていない。しかしながら、多くの研究者は、遺伝子療法がH I Vの治癒をいずれ達成する見込みが最も高いと楽観している。

30

【0142】

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

40

【0143】

治癒の達成における主な障害は、H I V自体の基礎生物学にある。ウイルス感染は、ほぼすべての免疫機能に重要なC D 4 T細胞を欠失させる。最も重要なことには、H I V感染およびC D 4 T細胞の枯渇は、個々の細胞の活性化を必要とする。活性化は、再編成されたT細胞受容体を使用して病原体または他の分子を認識する、個々のC D 4 T細胞クローンの特異的な機構である。

【0144】

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

50

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

【0145】

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

10

【0146】

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

【0147】

遺伝子療法

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

20

【0148】

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

【0149】

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

30

【0150】

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

40

【0151】

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

50

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

【0152】

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

10

【0153】

免疫療法

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

【0154】

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

20

【0155】

複数の実施形態では、宿主の抗H I V免疫を増加させる目的でH I V特異的C D 4 T細胞集団を濃縮するために、免疫療法のアプローチが使用され得る。複数の実施形態では、宿主の抗H I V免疫を増加させる目的で宿主の免疫細胞に形質導入するために、組み込み型または非組み込み型のレンチウイルスベクターが使用され得る。複数の実施形態では、宿主の免疫応答を増加させるために好適なビヒクルおよび/または生物学的もしくは化学的アジュバントと組み合わせた、死滅粒子、ウイルス様粒子、H I Vペプチドまたはペプチド断片、組換えウイルスベクター、組換え細菌ベクター、精製されたサブユニットまたはプラスミドD N Aを含むがこれらに限定されない、H I Vタンパク質を含むワクチンが、ウイルス特異的T細胞または抗体の集団を濃縮するために使用される場合があり、これらの方法は、レンチウイルスまたは他のウイルスベクターを使用したH I Vにターゲティングされた遺伝子療法の使用により、さらに増強することができる。

30

【0156】

方法

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

40

【0157】

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

【0158】

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

50

パク質、ペプチドまたはペプチド断片、ウイルス様粒子 (VLP)、サイトカインおよび/またはケモカインを含む生物学的または化学的アジュバント、ビヒクル、ならびに免疫化の方法を含む。ワクチン接種は、当技術分野で公知の標準的方法に従って施してよく、HIV患者は、免疫化とその後のレンチウイルス形質導入を含む *ex vivo* でのリンパ球の培養との間の中間期 (*interval*) 中に抗レトロウイルス薬療法を継続してよい。

【0159】

一部の実施形態では、HIV+患者をHIVワクチンで免疫化すると、HIV特異的CD4 T細胞の頻度が、約2、約25、約250、約500、約750、約1000、約1250、または約1500倍(またはこれらの値の間の任意の量)だけ増加する。ワクチンは、開示されているレンチウイルスベクター、他のウイルスベクター、またはワクチン送達システムとして使用される他の細菌ベクターを含む、いずれの臨床的に利用されるまたは実験用のHIVワクチンであってもよい。別の実施形態では、ベクターは、ウイルス様粒子(VLP)をコードして、より高力価の中和抗体を誘導する。別の実施形態では、ベクターは、*gag*、*pol*、および*env*、*tat*、*rev*、*nef*、*vif*、*vpr*、*vpu*、および*tev*、ならびにLTR、TAR、RRE、PE、SLIP、CRS、およびINSを含むがこれらに限定されない、HIVに関するペプチドまたはペプチド断片をコードする。代替的に、開示されている方法で使用されるHIVワクチンは、精製タンパク質、不活化ウイルス、ウイルスベクター化タンパク質(HIV特異的抗体または抗体様分子またはCD4様分子を含む)、細菌ベクター化タンパク質、ペプチドもしくはペプチド断片、ウイルス様粒子(VLP)、またはサイトカインおよび/もしくはケモカインを含む生物学的もしくは化学的アジュバントを含み得る。

10

20

【0160】

一実施形態では、本方法は、精製タンパク質、不活化ウイルス、ウイルスベクター化タンパク質、細菌ベクター化タンパク質、サイトカインおよび/またはケモカインを含む生物学的または化学的アジュバント、ビヒクル、ならびに再刺激の方法を使用した、治療用ワクチン接種により過去に免疫化された個人または患者由来のCD4 T細胞の *ex vivo* での再刺激を含む。 *ex vivo* での再刺激は、 *in vivo* での免疫化に使用されたものと同じワクチンもしくは免疫刺激性の化合物を使用して行われてもよく、または *in vivo* での免疫化に使用されたものとは異なるワクチンもしくは免疫刺激性の化合物を使用して行われてもよい。さらに一部の実施形態では、患者は、この個体がHIVタンパク質に対して十分に高い抗原特異的CD4 T細胞応答を有していれば、治療用ワクチン接種またはCD4 T細胞の再刺激を事前に必要としない。これらの実施形態では、そのような患者は、ウイルス抗原、ワクチン、またはペプチドでCD4 T細胞を *ex vivo* にて刺激した後、刺激への応答に基づいてHIV特異的T細胞を選択することのみを必要とする場合がある。濃縮細胞調製物は、1%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、またはそれよりも多くのHIV特異的CD4+T細胞を含んでよく、HIV媒介性枯渇から保護することができる遺伝子のレンチウイルス形質導入のために使用される。ポリクロナルマイトジェンとサイトカインによる刺激は、濃縮された形質導入T細胞の数を、元の患者に注入し戻すのに適切なレベルに達するまで増加させる。

30

40

【0161】

複数の実施形態では、末梢血単核細胞(PBMC)が白血球除去によって得られ、 *ex vivo* で処置されて、約 1×10^9 個のCD4 T細胞が得られ、このうち約0.1%、約1%、約5%、または約10%、または約30%、または約40%、または約50%が、抗原応答という点でHIV特異的であり、また、開示されているレンチウイルスベクターにより送達された治療用導入遺伝子を有することからHIV耐性でもある。代替的には、約 1×10^7 、約 1×10^8 、約 1×10^9 、約 1×10^{10} 、約 1×10^{11} 、または約 1×10^{12} 個のCD4 T細胞が再刺激のために単離され得る。 *ex vivo* での再刺激のためには、任意の好適な量のCD4 T細胞が単離される。

【0162】

50

単離されたCD4 T細胞は、過去の治療用ワクチン接種に存在した抗原を含み得るHIVワクチン抗原による再刺激の間中、適切な培地において培養され得る。長期の*ex vivo*培養中のウイルスの再出現を防止するため、逆転写酵素、プロテアーゼ、またはインテグラーゼの阻害剤を含む抗レトロウイルス治療薬を添加してもよい。CD4 T細胞の再刺激は、培養物中のHIV特異的CD4 T細胞の割合を増やすために使用され得る。同じ手順は、精製により得られた末梢血単核細胞を含むより少ない血液量を使用してHIV特異的T細胞を特定し、この亜集団の頻度を測定する、分析目的で使用することもできる。培養物中のHIV特異的CD4 T細胞の割合は、1つまたは複数の他の細胞サブセットを枯渇させることにより濃縮または増加させることができる。

【0163】

10

PBMC画分は、HIV特異的CD4 T細胞について、*in vivo*免疫化のために過去に使用されたワクチンの成分と一致するかまたはこれを補完するHIVタンパク質とこれらの細胞を接触させることによって濃縮することができる。*ex vivo*での再刺激は、HIV特異的CD4 T細胞の相対的な頻度を約2、約5、約10、約25、約50、約75、約100、約125、約150、約175、または約200倍増加させ得る。本方法は、CD4 T細胞の*in vivo*での治療的免疫化および*ex vivo*での再刺激を、*ex vivo*でのレンチウイルス形質導入および培養と組み合わせるステップをさらに含み得る。

【0164】

20

よって、一実施形態では、HIV特異的CD4 T細胞が濃縮されている再刺激したPBMCまたはPBMCの画分は、1、2、3、4、5、または最大12、20、もしくは30日間培養した後、ポリクローナルマイトジェンまたは他の植物もしくは真菌ベースのアグルチニン、または、細胞表面CD3およびCD28を認識してこれらの分子を架橋し、ポリクローナルT細胞活性化を引き起こすことができる他の試薬を用いて、再度活性化させることができる。ポリクローナル刺激後、細胞は、治療用抗HIVレンチウイルスまたは他のベクターで形質導入され、そのような形質導入のために十分な期間、例えば約1~約21日間、最大約35日間などにわたって培養下に維持され得る。代替的に、これらの細胞は、約1~約18日間、約1~約15日間、約1~約12日間、約1~約9日間、または約3~約7日間にわたって培養されてもよい。よって、形質導入された細胞は、約1、約2、約3、約4、約5、約6、約7、約8、約9、約10、約11、約12、約13、約14、約15、約16、約17、約18、約19、約20、約21、約22、約23、約24、約25、約26、約27、約28、約29、約30、約31、約32、約33、約34、または約35日間にわたって培養され得る。ポリクローナルマイトジェンを用いた活性化は、細胞産物製造プロセスに含まれる場合もあれば、含まれない場合もある。

30

【0165】

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

40

【0166】

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

50

【0167】

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

【0168】

開示されている方法で使用されるレンチウイルスベクターおよび他のベクターは、目的の、少なくとも1種、少なくとも2種、少なくとも3種、少なくとも4種、もしくは少なくとも5種の遺伝子、または少なくとも6種の遺伝子、または少なくとも7種の遺伝子、または少なくとも8種の遺伝子、または少なくとも9種の遺伝子、または少なくとも10種の遺伝子、または少なくとも11種の遺伝子、または少なくとも12種の遺伝子をコードし得る。HIVにターゲティングされた遺伝子療法の多用途性および治療可能性を考慮すると、本開示のウイルスベクターは、(i)感染性疾患に関連する抗原または感染性病原体によって産生される毒素に対する抗体、(ii)免疫細胞の成長または機能に必要とされ、かつHIVおよび他の慢性または急性のヒトウイルスまたは細菌病原体において遭遇される免疫調節不全に対する治療薬であり得る、インターロイキンを含むサイトカイン、(iii)CD8抑制因子を含む、*in vivo*でHIVの成長を抑制する因子、(iv)ケモカイン受容体CCR5の変異もしくは欠失、ケモカイン受容体CXCR4の変異もしくは欠失、またはケモカイン受容体CXCR5の変異もしくは欠失、(v)HIVに関連する特定の受容体もしくはペプチドまたはHIVに関連する宿主タンパク質に対するアンチセンスDNAまたはRNA、(vi)HIVに関連する特定の受容体もしくはペプチドまたはHIVに関連する宿主タンパク質に対する低分子干渉RNA、あるいは(vii)HIVまたはAIDSを処置するために使用され得る多様な他の治療上有用な配列を含むがこれらに限定されない、遺伝子または核酸配列をコードし得る。

【0169】

開示されている方法で使用され得るHIVにターゲティングされた遺伝子療法のさらなる例としては、親和性増強T細胞受容体、CD4 T細胞上(または代替的にはCD8 T細胞上)のキメラ抗原受容体、ウイルスタンパク質に起因する細胞死を回避するためのシグナル伝達経路の改変、TREX、SAMHD1、MxAまたはMxBタンパク質、APOBEC複合体、TRIM5アルファ複合体、テザリン(BST2)、および哺乳動物細胞においてHIV複製を低減させることができると特定された同様のタンパク質を含むHIV制限エレメントの発現増加が挙げられるが、これらに限定されない。

【0170】

一部の実施形態では、患者は、本開示の方法に従う処置を受けると同時にcARTまたはHAARTを受けていてもよい。他の実施形態では、患者は、本開示の方法に従って処置される前または処置された後にcARTまたはHAARTを受けてもよい。一部の実施形態では、cARTまたはHAARTは、本開示の方法に従う処置の間中維持され、患者は、血液中のHIVウイルス負荷および血液中のレンチウイルスを形質導入したCD4 T細胞の頻度についてモニタリングされ得る。好ましくは、本開示の方法に従って処置される前にcARTまたはHAARTを受けた患者は、本開示の方法に従う処置の後にcARTまたはHAARTを中止または低減することができる。

【0171】

有効度の目的上、形質導入されたHIV特異的CD4 T細胞の頻度は、遺伝子療法の効果の新規の代替マーカーであり、本明細書においてより詳細に論じられるように決定することができる。

【0172】

組成物

様々な態様では、本開示は、感受性細胞へのHIVの侵入を阻害する遺伝子構築物を送達することができるレンチウイルスベクターを提供する。例として、本明細書による1つの作用機構は、感受性細胞へのウイルス進入速度を低減させるため、CCR5および/ま

10

20

30

40

50

たは C X C R 4 ケモカイン受容体に対する m R N A レベルを低下させることである。

【 0 1 7 3 】

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

【 0 1 7 4 】

開示されている治療用レンチウイルスは概して、2種類の遺伝子カージのうち少なくとも1種を含む。第1に、このレンチウイルスは、感受性細胞への H I V の侵入に重要なケモカイン受容体 C C R 5 および / または C X C R 4 の産生を阻害することができる低分子 R N A の発現を指向する遺伝子エレメントをコードし得る。第2の種類の遺伝子カージは、逆転写、R N A スプライシング、タンパク質を産生する R N A 翻訳、または粒子を産生し感染を伝播するウイルスゲノム R N A のパッケージングを防止する目的で、H I V の R N A 配列をターゲティングする低分子 R N A 分子を発現することができる構築物を含む。例示的な構造が図3に図示されている。

10

【 0 1 7 5 】

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

20

- ・ R S V (ラウス肉腫ウイルス末端反復配列 (long terminal repeat))、
- ・ 5' L T R (染色体組み込み後にベクターの複製を防止するために切り結めることができる H I V 末端反復配列の一部)、
- ・ P s i (パッケージング中のウイルス粒子へのベクター R N A ゲノムの組み込みを可能にするパッケージングシグナル)、
- ・ R R E (R e v 応答エレメントを付加すると、R N A を細胞の核から細胞質に動員することによって導入遺伝子からの発現を改善することができる)、
- ・ c P P T (宿主細胞染色体への導入遺伝子の組み込みの前に第二鎖 D N A 合成を促進するポリプリンクトラクト (poly purine tract))、
- ・ プロモーター (プロモーターは、組み込まれた導入遺伝子からの R N A 転写を開始してマイクロ R N A クラスター (または構築物の他の遺伝子エレメント) を発現し、一部の実施形態では、ベクターは E F - 1 プロモーターを使用し得る)、
- ・ 抗 C C R 5 (宿主細胞因子 C C R 5 のメッセンジャー R N A をターゲティングして細胞表面上のその発現を低減させるマイクロ R N A)、
- ・ 抗 R e v / T a t (H I V の R e v コード領域と T a t コード領域との間の接合部における H I V のゲノム R N A またはメッセンジャー R N A をターゲティングするマイクロ R N A。本出願では、m i R N A T a t と呼称されるか、または同様の説明が与えられる場合がある)、
- ・ 抗 V i f (V i f コード領域内の H I V のゲノム R N A またはメッセンジャー R N A
- をターゲティングするマイクロ R N A)、
- ・ W P R E (ウッドチャック肝炎ウイルス転写後調節エレメントは、核の R N A 輸送を促進するために使用され得るさらなるベクター成分である)、および
- ・ デルタ U 3 3' L T R (ベクターの安全性を改善するために U 3 領域の一部を欠失させた、H I V の 3' 末端反復配列の改変バージョン)。

30

40

【 0 1 7 6 】

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

【 0 1 7 7 】

50

本開示のベクターは、上記のいずれかまたは両方の種類の遺伝子カーゴ（すなわち、遺伝子の発現を指向する遺伝子エレメント、または翻訳もしくは転写を防止することができる *siRNA*、*shRNA*、もしくは *miRNA* などの低分子 RNA）を含んでよく、本開示のベクターは、HIV の処置または診断の目的でさらに有用な産物をコードしてもよい。例として、一部の実施形態では、これらのベクターは、遺伝子改変細胞を *in vivo* で選択的に維持する目的でベクターまたは抗生物質耐性遺伝子を追跡することを目的として、緑色蛍光タンパク質（GFP）または切り詰められ生物学的に不活化された細胞表面分子をコードしてもよい。

【0178】

開示されているベクターに組み込まれる遺伝子エレメントの組み合わせは、特に限定されない。例えば、本明細書におけるベクターは、単一の低分子 RNA、2 個の低分子 RNA、3 個の低分子 RNA、4 個の低分子 RNA、5 個の低分子 RNA、6 個の低分子 RNA、7 個の低分子 RNA、8 個の低分子 RNA、9 個の低分子 RNA、または 10 個の低分子 RNA、または 11 個の低分子 RNA、または 12 個の低分子 RNA をコードしてよい。このようなベクターは、低分子 RNA と共働して機能して HIV の発現および感染を防止するように他の遺伝子エレメントをさらにコードしてもよい。

10

【0179】

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

20

【0180】

レンチウイルスベクターシステム

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

30

【0181】

本明細書のベクターには多数の改変を行ってよく、これらを使用して粒子を作り出すと、野生型復帰変異体を得る機会がさらに最小限に抑えられる。これらは、LTR の U3 領域の欠失、*tat* 欠失、およびマトリクス（MA）欠失を含むが、これらに限定されない。複数の実施形態では、*gag*、*pol*、および *env* ベクターは、レンチウイルスパッケージング配列と呼ばれる、レンチウイルス RNA をパッケージングするレンチウイルスゲノム由来のヌクレオチドを含有しない。

40

【0182】

粒子を形成するベクターは、好ましくは、エンベロープタンパク質を発現するレンチウイルスゲノム由来の核酸配列を含有しない。好ましくは、プロモーターに作動可能に連結したエンベロープタンパク質をコードする核酸配列を含有する別個のベクターが使用される。この *env* ベクターも、レンチウイルスパッケージング配列を含有しない。一実施形態では、*env* 核酸配列は、レンチウイルスエンベロープタンパク質をコードする。

【0183】

別の実施形態では、エンベロープタンパク質は、レンチウイルスに由来しないが、異な

50

るウイルスに由来する。結果として得られる粒子は、シュードタイプ化粒子と呼ばれる。エンベロープの適切な選択により、実質的に任意の細胞に「感染」することができる。例えば、細胞内区画をターゲティングするエンベロープタンパク質をコードする *env* 遺伝子を使用することができる。そのような *env* 遺伝子およびエンベロープタンパク質が由来し得るウイルスの例としては、インフルエンザウイルス（例えば、インフルエンザ A 型ウイルス、インフルエンザ B 型ウイルス、インフルエンザ C 型ウイルス、インフルエンザ D 型ウイルス、イサウイルス、クアランジャウイルス、およびトゴトウイルス）、ベシクロウイルス（例えば、インディアナベシクロウイルス）、アルファウイルス（例えば、とりわけ、セムリキ森林ウイルス、シンドビスウイルス、アウラウイルス、パーマ森林ウイルス、ベバルウイルス、カバソウウイルス (*Cabassou virus*)）、ゲタウイルス、ハイランド J ウイルス (*Highlands J virus*)、トロカラウイルス (*Trocaravirus*)、ウナウイルス、ヌドゥムウイルス、およびミドレブルグウイルス）、アレナウイルス（例えば、リンパ球脈絡髄膜炎ウイルス、マチュポウイルス、フニンウイルス、およびラッサ熱ウイルス）、フラビウイルス（例えば、とりわけ、ダニ媒介性脳炎ウイルス、デング熱ウイルス、C 型肝炎ウイルス、GB ウイルス、アポイウイルス、バガザウイルス (*Bagaza virus*)）、エッジヒルウイルス、ジュグラウイルス (*Jugra virus*)、カダムウイルス、ダカールコウモリウイルス、モドックウイルス、ポワサンウイルス、ウスツウイルス (*Usutu virus*)、およびサルヴィエヤウイルス (*Sal Vieja virus*)）、ラブドウイルス（例えば、水疱性口内炎ウイルス、狂犬病ウイルス）、パラミクソウイルス（例えば、耳下腺炎または麻疹）、およびオルトミクソウイルス（例えば、インフルエンザウイルス）が挙げられる。

10

20

30

40

50

【0184】

好ましくは使用することができる他の *env* 遺伝子エンベロープタンパク質としては、内在性レトロウイルス（例えば、ネコ科動物内在性レトロウイルスおよびヒヒ内在性レトロウイルス）および密接に関連するガンマレトロウイルス（例えば、とりわけ、モロニー白血病ウイルス、MLV-E、MLV-A、ギボン類人猿白血病ウイルス、GALV、ネコ白血病ウイルス、コアラレトロウイルス、トレーガーアヒル脾臓壊死ウイルス、毒蛇レトロウイルス、ひよこ合胞体ウイルス、ガードナー-アーンシュタインネコ肉腫ウイルス、およびブタ C 型オンコウイルス）に由来するものが挙げられる。これらのガンマレトロウイルスは、初代細胞をターゲティングするための *env* 遺伝子およびエンベロープタンパク質の供給源として使用することができる。ガンマレトロウイルスは、宿主細胞が初代細胞である場合に特に好ましい。

【0185】

エンベロープタンパク質を選択して、特定の所望の宿主細胞をターゲティングすることができる。例えば、脳への送達には、ドーパミン受容体などの特定の受容体のターゲティングを使用することができる。別の標的は血管内皮であり得る。これらの細胞は、フィロウイルス科（例えば、クエバウイルス (*Cuevavirus*)、ディアンロウイルス (*Dianlovirus*)、エボラウイルス、およびマールブルグウイルス）の任意のウイルスに由来するエンベロープタンパク質を使用してターゲティングすることができる。エボラウイルスの種としては、タイ森林エボラウイルス、ザイールエボラウイルス、スーダンエボラウイルス、ブンディブギョエボラウイルス、およびレ斯顿エボラウイルスが挙げられる。

【0186】

加えて、複数の実施形態では、糖タンパク質は、転写後修飾を受ける場合がある。例えば、実施形態では、エボラの GP は、翻訳後に修飾されて、GP1 および GP2 糖タンパク質になり得る。別の実施形態では、シュードタイプ化エンベロープ（例えば、FIV または SHIV [米国特許第 5,654,195 号]）を有する異なるレンチウイルスカプシドを使用することができる。SHIV シュードタイプ化ベクターは、サルなどの動物モデルにおいて容易に使用することができる。

【0187】

本明細書に提供されるレンチウイルスベクターシステムは、典型的には、gag、pol、またはrev遺伝子のうちの少なくとも1つを含む少なくとも1つのヘルパープラスミドを含む。gag、pol、およびrev遺伝子は、それぞれが個々のプラスミドで提供される場合もあれば、1つまたは複数の遺伝子が同じプラスミドと一緒に提供される場合もある。一実施形態では、gag、pol、およびrev遺伝子は、同じプラスミドで提供される（例えば図4）。別の実施形態では、gagおよびpol遺伝子が第1のプラスミドで提供され、rev遺伝子が第2のプラスミドで提供される（例えば図5）。したがって、3ベクターシステム（例えば図4および6）および4ベクターシステム（例えば図5）はいずれも、本明細書に記載されるレンチウイルスを産生するために使用され得る。複数の実施形態では、治療用ベクター、少なくとも1つのエンベローププラスミド、および少なくとも1つのヘルパープラスミドは、パッケージング細胞、例えばパッケージング細胞株にトランスフェクトされる。パッケージング細胞株の非限定的な例は、293T/17 HEK細胞株である。治療用ベクター、エンベローププラスミド、および少なくとも1つのヘルパープラスミドがパッケージング細胞株にトランスフェクトされると、最終的にレンチウイルス粒子が産生される。

10

【0188】

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

20

【0189】

別の態様では、本明細書では治療用ベクターとも呼ばれるレンチウイルスベクターは、次のエレメント：ハイブリッド5'末端反復配列(RSV/5'LTR)（配列番号33～34）、Psi配列(RNAパッケージング部位)（配列番号35）、RRE(Rev応答エレメント)（配列番号36）、cPPT(ポリプリントラクト)（配列番号37）、EF-1プロモーター（配列番号4）、miR30CCR5（配列番号1）、miR21Vif（配列番号2）、miR185Tat（配列番号3）、ウッドチャック転写後調節エレメント(WPRE)（配列番号31または67）、およびU3 3'LTR（配列番号38）を含む。別の態様では、置換、欠失、付加、または変異による配列変化を使用して、本明細書で参照される配列を改変することができる。

30

【0190】

別の態様では、ヘルパープラスミドは、次のエレメント：CAGプロモーター（配列番号40）、HIV成分gag（配列番号42）、HIV成分pol（配列番号43）、HIV Int（配列番号44）、HIV RRE（配列番号45）、およびHIV Rev（配列番号46）を含む。別の態様では、gagおよびpol遺伝子が発現させるための第1のヘルパープラスミドと、rev遺伝子が発現させるための第2の別個のプラスミドとを含むように、ヘルパープラスミドを改変してよい。別の態様では、置換、欠失、付加、または変異による配列変化を使用して、本明細書で参照される配列を改変することができる。

40

【0191】

別の態様では、エンベローププラスミドは、次のエレメント：RNAポリメラーゼIIプロモーター(CMV)（配列番号49）および水疱性口内炎ウイルスG糖タンパク質(VSV-G)（配列番号51）を含む。別の態様では、置換、欠失、付加、または変異による配列変化を使用して、本明細書で参照される配列を改変することができる。

50

【0192】

様々な態様では、レンチウイルスパッケージングに使用されるプラスミドは、ベクターの機能を損失することなく、様々なエレメントの置換、付加、除去、または変異によって改変される。例えば、限定されるものではないが、次のエレメントは、パッケージング系を構成するプラスミドにおいて同様のエレメントに取って代わることができる：伸長因子1 (EF-1)、ホスホグリセリン酸キナーゼ (PGK)、およびユビキチンC (Ubc) プロモーターは、CMVまたはCAGプロモーターに取って代わることができる。SV40ポリAおよびbGHポリAは、ウサギベータグロビンポリAに取って代わることができる。

【0193】

別の態様では、ヘルパープラスミド中のHIV配列は、異なるHIV株またはクレードから構築されていてよい。例えば、VSV-G糖タンパク質は、ガンマレトロウイルス（例えば、とりわけ、テナガザル類人猿白血病ウイルス、GALV、マウス白血病ウイルス10A1、MLV、コアラレトロウイルス、トレーガーアヒル脾臓壊死ウイルス、毒蛇レトロウイルス、ひよこ合胞体ウイルス、ガードナー-アーンシュタインネコ肉腫ウイルス、およびブタC型オンコウイルス）、内在性レトロウイルス（例えば、とりわけ、ネコ科動物内在性ウイルス(RD114)、HERV-Wなどのヒト内在性レトロウイルス、およびヒト内在性レトロウイルス、BaEV）、リッサウイルス（例えば、狂犬病ウイルス、FUG）、マンマレナウイルス (mammarynavirus)（例えば、リンパ球脈絡髄膜炎ウイルス、LCMV、インフルエンザA型ウイルス、インフルエンザA型家禽ペストウイルス、FPV、インフルエンザB型ウイルス、インフルエンザC型ウイルス、インフルエンザD型ウイルスなどのインフルエンザウイルス、イサウイルス、クアランジャウイルス、およびトゴトウイルス）、アルファウイルス（例えば、ロスリバーアルファウイルス、RRV、またはスーダンエボラウイルス、タイ森林エボラウイルス、ザイルエボラウイルス、ブンディブギョエボラウイルス、およびレストンエボラウイルスなどのエボラウイルス、EbOv）に由来する膜糖タンパク質で置換され得る。

【0194】

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

【0195】

バイオアッセイ

様々な態様では、本開示は、機能的治癒の達成するためのHIV処置の成功を決定するためのバイオアッセイを含む。これらのアッセイは、患者における形質導入されたHIV特異的なCD4 T細胞の頻度を測定することにより、開示されている免疫化および処置の方法の有効度を測定するための方法を提供する。HIV特異的CD4 T細胞が認識可能である。なぜなら、とりわけ、これらが増殖し、細胞表面マーカーの組成を変更し、リン酸化を含むシグナル伝達経路を誘導し、かつ/あるいは、サイトカイン、ケモカイン、カスパーゼ、リン酸化シグナル伝達分子、または他の細胞質および/もしくは核成分であり得る特定のマーカータンパク質を発現するからである。特定の応答するCD4 T細胞は、例えば、フローサイトメトリーソーティング、磁性ビーズ分離、または抗原特異的CD4 T細胞の単離の他の認識されている方法を使用したHIV特異的細胞のソーティングを可能にする、標識されたモノクローナル抗体またはmRNA配列の特異的なinsitu増幅を使用して認識される。単離されたCD4 T細胞を試験すると、組み込まれた治療用レンチウイルスを有する細胞の頻度が決定される。質量分析、PCR、ELISAまたは抗体染色と併せた個々の細胞のマイクロ流体分離を含む単一細胞試験法を使用して、HIVに対する応答性および組み込まれた治療用レンチウイルスの存在を確認するこ

10

20

30

40

50

ともできる。

【0196】

よって、様々な実施形態では、本開示による処置の適用（例えば、（a）免疫化、（b）*ex vivo*での白血球/リンパ球の培養および/または非標的細胞の枯渇、（c）精製タンパク質、不活化ウイルス、ウイルスベクター化タンパク質、細菌ベクター化タンパク質、サイトカインおよび/またはケモカインを含む生物学的または化学的アジュバント、ビヒクルによる再刺激、（d）濃縮されたT細胞へのウイルス送達システムの形質導入、ならびに（e）濃縮され形質導入されたT細胞の注入）に続いて、その後患者をアッセイすることで、処置の有効度を決定することができる。体内の標的T細胞の閾値は、所定値における、例えば、治療用レンチウイルスからの遺伝子改変を有する約 1×10^8 個のHIV特異的CD4⁺T細胞における機能的治癒を測定するように確立してよい。代替的に、この閾値は、患者の体内で約 1×10^5 、約 1×10^6 、約 1×10^7 、約 1×10^8 、約 1×10^9 、または約 1×10^{10} 個のCD4⁺T細胞であってもよい。

10

【0197】

治療用レンチウイルスによる遺伝子改変を有するHIV特異的CD4⁺T細胞は、フローサイトメトリー、セルソーティング、FACS分析、DNAクローニング、PCR、RT-PCRもしくはQ-PCR、ELISA、FISH、ウェスタンブロットティング、サザンブロットティング、ハイスループットシーケンシング、RNAシーケンシング、オリゴヌクレオチドプライマー伸長、または当技術分野で公知の他の方法などであるがこれらに限定されない、任意の好適な方法を使用して決定することができる。

20

【0198】

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

【0199】

用量および剤形

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

30

【0200】

様々な実施形態では、初回の*in vivo*免疫化のためのHIV特異的ワクチンは、必要とする被験体に様々な用量で投与される。一般に、筋肉内注射により送達されるワクチンは、不活化ウイルス粒子から調製された全ウイルスタンパク質、ウイルス様粒子、または組換え系から精製されたウイルスタンパク質もしくはウイルス調製物から精製されたもののいずれかのHIVタンパク質を、約 $10 \mu\text{g}$ ～約 $300 \mu\text{g}$ 、約 $25 \mu\text{g}$ ～約 $275 \mu\text{g}$ 、約 $50 \mu\text{g}$ ～約 $250 \mu\text{g}$ 、約 $75 \mu\text{g}$ ～約 $225 \mu\text{g}$ 、または約 $100 \mu\text{g}$ ～約 $200 \mu\text{g}$ 含む。組換えウイルスベクターまたは細菌ベクターは、記載されるありとあらゆる経路によって投与されてもよい。筋肉内ワクチンは、約 $1 \mu\text{g}$ ～約 $100 \mu\text{g}$ 、約 $10 \mu\text{g}$ ～約 $90 \mu\text{g}$ 、約 $20 \mu\text{g}$ ～約 $80 \mu\text{g}$ 、約 $30 \mu\text{g}$ ～約 $70 \mu\text{g}$ 、約 $40 \mu\text{g}$ ～約 $60 \mu\text{g}$ 、または約 $50 \mu\text{g}$ の好適なアジュバント分子を含み、注射1用量あたり0.1～5mlの体積の油、食塩水、緩衝液、または水に懸濁され、可溶性調製物であってもエマルジョン調製物であってもよい。一部のウイルスベクター化もしくは細菌ベクター化ワクチン、融合タンパク質、リポソーム製剤、または同様の調製物を含む、経口的、直腸、口腔、性器粘膜、または鼻腔内に送達されるワクチンは、より高い量のウイルスタンパク質およびアジュバントを含有してもよい。真皮、真皮下（*sub-dermal*）、または皮下のワクチンは、経口的、直腸、または鼻腔内に送達されるワクチンにより似ている量のタンパク質およびアジュバントを利用する。初回免疫化に対する応答に応じて、ワクチン接種は、同じかまたは代替の送達経路を使用して1～5回繰り返され得る。間隔

40

50

は、免疫化の間で2～24週間であり得る。ワクチン接種に対する免疫応答は、ELISAまたは同様の方法論を使用して、血清、血漿、腔分泌物、直腸分泌物、唾液、または気管支肺胞洗浄液中のHIV特異的抗体を試験することによって測定される。細胞性免疫応答は、ワクチン抗原による*in vitro*刺激に続いて、細胞内のサイトカインの蓄積について染色を行った後、フローサイトメトリーまたはリンパ球増殖、リン酸化シグナル伝達タンパク質の発現、もしくは細胞表面活性化マーカーの変化を含む同様の方法によって試験される。投薬の上限は個々の患者に基づいて決定してよく、各個々の製品または製品ロットに関する毒性/安全性プロファイルに依存する。

【0201】

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

10

【0202】

免疫化は概して、CD4 T細胞の*ex vivo*での拡大増殖および濃縮前に少なくとも1回行われ、免疫化は、*ex vivo*での白血球/リンパ球の培養/再刺激および注入後に1回、2回、3回、またはそれよりも多く行われ得る。

【0203】

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

20

【0204】

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

30

【0205】

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

【0206】

別の実施形態では、HIVワクチンを含む医薬組成物は、経口投与のための固体剤形で製剤化され、この固体剤形は、粉末、顆粒、カプセル、錠剤、または丸剤であり得る。さらに別の実施形態では、固体剤形は、炭酸カルシウム、デンプン、スクロース、ラクトース、微結晶性セルロース、またはゼラチンなどの1つまたは複数の賦形剤を含む。さらに、固体剤形は、賦形剤に加えて、タルクまたはステアリン酸マグネシウムなどの滑沢剤を含み得る。一部の実施形態では、経口剤形は、即時放出形態または改変放出形態である。改変放出剤形は、制御放出または延長放出、腸内放出などを含む。改変放出剤形に使用される賦形剤は、一般的に当業者に公知である。

40

【0207】

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

【0208】

50

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

【0209】

一実施形態では、医薬組成物は、懸濁物、エマルジョン、またはシロップなど、経口投与のための液体剤形で製剤化される。他の実施形態では、液体剤形は、水および流動パラフィンなどの一般的に使用されている単純な希釈剤に加えて、保水剤 (h u m e c t a n t)、甘味料、芳香族化合物、または保存料などの様々な賦形剤を含み得る。特定の実施形態では、H I V ワクチンまたはその薬学的に許容される塩を含む組成物は、小児患者への投与に好適であるように製剤化される。

10

【0210】

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

【0211】

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

20

【0212】

再刺激の目的では、概して、リンパ球、P B M C、および/またはC D 4 T細胞を患者から取り出し、再刺激および培養のために単離する。単離した細胞は、免疫化に使用したのと同じH I V ワクチンもしくは活性化剤と接触させても、または異なるH I V ワクチンもしくは活性化剤と接触させてもよい。一実施形態では、単離した細胞は、培養物中の約106個の細胞あたり約10ng ~ 5μg (または任意の他の好適な量) のH I V ワクチンまたは活性化剤と接触させる。より具体的には、単離した細胞は、培養物中の約106個の細胞あたり約50ng、約100ng、約200ng、約300ng、約400ng、約500ng、約600ng、約700ng、約800ng、約900ng、約1μg、約1.5μg、約2μg、約2.5μg、約3μg、約3.5μg、約4μg、約4.5μg、または約5μgのH I V ワクチンまたは活性化剤と接触させてもよい。

30

【0213】

活性化剤またはワクチンは、概して、各 i n v i t r o 細胞培養で1回使用されるが、約15 ~ 約35日の間隔の後に繰り返されてもよい。例えば、繰り返しの投薬は、約15、約16、約17、約18、約19、約20、約21、約22、約23、約24、約25、約26、約27、約28、約29、約30、約31、約32、約33、約34、または約35日目に行われ得る。

【0214】

濃縮され再刺激した細胞の形質導入では、例えば図4または図6に開示されているレンチウイルスベクターまたは他の公知のベクターシステムを細胞に形質導入してよい。形質導入される細胞は、培養物中の標的細胞あたり約1 ~ 1,000個 (または任意の他の好適な量) のウイルスゲノム (レンチウイルスベクターを含有する培養液のR T - P C R アッセイにより測定) と接触させてよい。レンチウイルス形質導入は、培養物中の標的細胞あたり1 ~ 1,000個という同じ範囲のウイルスゲノムを使用し、1 ~ 5回繰り返してよい。

40

【0215】

細胞の濃縮

様々な実施形態では、T細胞などの細胞がH I V 感染患者から得られ、培養される。培養は、マルチウェルプレートにて馴化培地 (「C M」) を含む培養培地中で行われ得る。上清 p 2 4 g a g のレベル (「p 2 4」) およびウイルスR N A レベルが標準的手段によ

50

って評価され得る。CM培養細胞が1ng/ml未満の上清p24レベルのピークを有する患者は、さらなる抗ウイルス剤の使用ありまたはなしのCMにおける大規模なT細胞の拡大増殖に好適な患者であり得る。さらに、異なる薬物または目的の薬物の組み合わせを異なるウェルに加えてよく、試料中のウイルスレベルに対する影響を標準的手段によって評価することができる。適度なウイルス抑制をもたらす薬物の組み合わせは、治療上有用な組み合わせである。特定の被験体に関する適度なウイルス抑制を構成するものが何かを決定することは、適格な技師の能力の範囲内である。ウイルスの拡大増殖を制限することにおける目的の薬物の有効性を試験するために、抗CD3抗体などのさらなる因子を培養物に添加してウイルス産生を刺激してもよい。当技術分野で公知のHIV感染細胞試料の培養方法とは異なり、CMでは2か月超の期間にわたるT細胞の培養が可能であり、これにより、長期の薬物有効性をアッセイする有効な系がもたらされる。

10

【0216】

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

【0217】

造血系および/または造血幹細胞の初代細胞の安定な形質導入は、細胞の表面をレンチウイルスベクターと、細胞表面に結合する少なくとも1つの分子との両方と*in vitro*または*ex vivo*で接触させることによって得ることができる。これらの細胞は、成長および/または増殖を促す条件下で、2つまたはそれよりも多くの層を備える通気された容器において培養してよい。一部の実施形態では、このアプローチは、非CD4+T細胞の枯渇および/または広いポリクローナルな拡大増殖と併せて使用され得る。

20

【0218】

T細胞を濃縮する別のアプローチでは、PBMCをペプチドで刺激し、インターフェロンガンマなどのサイトカインを分泌する細胞を濃縮する。このアプローチは、概して、T細胞を含有する細胞の混合物を抗原で刺激し、抗原で刺激した細胞の分離を、これらが産物で標識されている程度に従って行うことを伴う。抗原刺激は、少なくとも1つのT細胞の抗原特異的な刺激を誘発するのに有効な条件下で、細胞を少なくとも1つの抗原に曝露することによって達成される。産物による標識は、少なくとも1つの捕捉部分を含有するように細胞の表面を改変し、産物が分泌され、放出され、前記捕捉部分に特異的に結合する(「捕捉される(captured)」または「封入される(entrapped)」)条件下で細胞を培養すること、および捕捉された産物を標識部分で標識することによって達成され、標識された細胞は、標識手順の一環としても分離手順の一環としても溶解されない。捕捉部分は、濃縮ステップを洗練し、概して抗原特異的T細胞の、特にCD4+T細胞の割合を増加させるために、細胞表面糖タンパク質CD3またはCD4の検出を組み込む場合がある。

30

【0219】

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

40

【実施例】

【0220】

(実施例1：レンチウイルスベクターシステムの開発)

図3(直鎖形態)および図4(環状化形態)にまとめたようにレンチウイルスベクターシステムを開発した。まず図3の上部を参照すると、左から右に、次のエレメント：ハイブリッド5'末端反復配列(RSV/5'LTR)(配列番号33~34)、Psi配列(RNAパッケージング部位)(配列番号35)、RRE(Rcv応答エレメント)(配列番号36)、cPPT(ポリプリントラクト)(配列番号37)、EF-1プロモーター(配列番号4)、miR30CCR5(配列番号1)、miR21Vif(配列番号

50

2)、miR185 Tat (配列番号3)、ウッドチャック転写後調節エレメント(WPRE) (配列番号31または67)、およびU3 3'LTR (配列番号38)を有する代表的な治療用ベクターをデザインし産生した。図3で詳述されている治療用ベクターは、本明細書ではAGT103とも呼ばれる。

【0221】

次に図3の中央部を参照すると、左から右に、次のエレメント：CAGプロモーター(配列番号40)、HIV成分gag (配列番号42)、HIV成分pol (配列番号43)、HIV Int (配列番号44)、HIV RRE (配列番号45)、およびHIV Rev (配列番号46)を有するヘルパープラスミドをデザインし産生した。

【0222】

次に図3の下部を参照すると、左から右に、次のエレメント：RNAポリメラーゼIIプロモーター(CMV) (配列番号49)および水疱性口内炎ウイルスG糖タンパク質(VSV-G) (配列番号51)を有するエンベローププラスミドをデザインし産生した。

【0223】

293T/17 HEK細胞(American Type Culture Collection、Manassas、VAから購入)において、治療用ベクター、エンベローププラスミド、およびヘルパープラスミド(図3に示したものを)をトランスフェクションした後、レンチウイルス粒子を産生した。機能的なウイルス粒子を産生した293T/17 HEK細胞のトランスフェクションでは、プラスミドDNAの取り込み効率を上昇させるために試薬ポリ(エチレンジイミン)(PEI)を用いた。プラスミドおよびDNAは最初に、血清を含まない培養培地に3:1の比(PEIのDNAに対する質量比)で別々に添加した。2~3日後、細胞培地を収集し、高速遠心分離および/または濾過の後にアニオン交換クロマトグラフィーを行うことにより、レンチウイルス粒子を精製した。レンチウイルス粒子の濃度は、形質導入単位/ml(TU/ml)の点から表すことができる。TUの決定は、培養液中のHIV p24レベルを測定し(p24タンパク質がレンチウイルス粒子に組み込まれている)、定量的PCRにより、または細胞を感染させ光を使用することにより(ベクターがルシフェラーゼまたは蛍光タンパク質マーカーをコードする場合)、細胞あたりのウイルスDNAコピー数を測定することによって達成した。

【0224】

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

【0225】

より具体的に図4を参照すると、ヘルパー+Revプラスミドは、CAGエンハンサー(配列番号39)、CAGプロモーター(配列番号40)、ニワトリベータアクチンイントロン(配列番号41)、HIV gag (配列番号42)、HIV Pol (配列番号43)、HIV Int (配列番号44)、HIV RRE (配列番号45)、HIV Rev (配列番号46)、およびウサギベータグロビンポリA (配列番号47)を含む。

【0226】

エンベローププラスミドは、CMVプロモーター(配列番号49)、ベータグロビンイントロン(配列番号50)、VSV-G (配列番号51)、およびウサギベータグロビンポリA (配列番号56)を含む。

【0227】

代替のベクターシステムにおいて、また図6に関して、本明細書においてベクター配列は配列番号81~83として提供される。

【0228】

10

20

30

40

50

ヘルパー (+ Rev) およびエンベローププラスミドを含む 2 ベクターレンチウイルスパッケージ系の合成。

【0229】

材料および方法：

【0230】

ヘルパープラスミドの構築：Gag、Pol、およびインテグラーゼ遺伝子を含む pNL4-3 HIV プラスミド (NIH Aids Reagent Program) からの DNA 断片の初回 PCR 増幅によってヘルパープラスミドを構築した。pCDNA3 プラスミド (Invitrogen) の同じ部位に挿入するために使用され得る、EcoRI および NotI 制限部位を有する断片を増幅するためのプライマーをデザインした。フォワードプライマーは (5' - T A A G C A G A A T T C A T G A A T T T G C C A G G A A G A T - 3') (配列番号 68) であり、リバースプライマーは (5' - C C A T A C A A T G A A T G G A C A C T A G G C G G C C G C A C G A A T - 3') (配列番号 69) であった。Gag、Pol、インテグラーゼ断片の配列は次の通りであった：

10

20

30

40

50

【0231】

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

A A A T T T A A A T T A C C C A T A C A A A A G G A A A C A T G G G A A G C A T
 G G T G G A C A G A G T A T T G G C A A G C C A C C T G G A T T C C T G A G T G
 G G A G T T T G T C A A T A C C C C T C C C T T A G T G A A G T T A T G G T A C
 C A G T T A G A G A A A G A A C C C A T A A T A G G A G C A G A A A C T T T C T
 A T G T A G A T G G G G C A G C C A A T A G G G A A A C T A A A T T A G G A A A
 A G C A G G A T A T G T A A C T G A C A G A G G A A G A C A A A A A G T T G T C
 C C C C T A A C G G A C A C A A C A A A T C A G A A G A C T G A G T T A C A A G
 C A A T T C A T C T A G C T T T G C A G G A T T C G G G A T T A G A A G T A A A
 C A T A G T G A C A G A C T C A C A A T A T G C A T T G G G A A T C A T T C A A
 G C A C A A C C A G A T A A G A G T G A A T C A G A G T T A G T C A G T C A A A
 T A A T A G A G C A G T T A A T A A A A A A G G A A A A A G T C T A C C T G G C
 A T G G G T A C C A G C A C A C A A A G G A A T T G G A G G A A A T G A A C A A
 G T A G A T A A A T T G G T C A G T G C T G G A A T C A G G A A A G T A C T A T
 T T T T A G A T G G A A T A G A T A A G G C C C A A G A A G A A C A T G A G A A
 A T A T C A C A G T A A T T G G A G A G C A A T G G C T A G T G A T T T T A A C
 C T A C C A C C T G T A G T A G C A A A A G A A A T A G T A G C C A G C T G T G
 A T A A A T G T C A G C T A A A A G G G G A A G C C A T G C A T G G A C A A G T
 A G A C T G T A G C C C A G G A A T A T G G C A G C T A G A T T G T A C A C A T
 T T A G A A G G A A A A G T T A T C T T G G T A G C A G T T C A T G T A G C C A
 G T G G A T A T A T A G A A G C A G A A G T A A T T C C A G C A G A G A C A G G
 G C A A G A A A C A G C A T A C T T C C T C T T A A A A T T A G C A G G A A G A
 T G G C C A G T A A A A C A G T A C A T A C A G A C A A T G G C A G C A A T T
 T C A C C A G T A C T A C A G T T A A G G C C G C C T G T T G G T G G G C G G G
 G A T C A A G C A G G A A T T T G G C A T T C C C T A C A A T C C C C A A A G T
 C A A G G A G T A A T A G A A T C T A T G A A T A A A G A A T T A A A G A A A A
 T T A T A G G A C A G G T A A G A G A T C A G G C T G A A C A T C T T A A G A C
 A G C A G T A C A A A T G G C A G T A T T C A T C C A C A A T T T T A A A A G A
 A A A G G G G G G A T T G G G G G G T A C A G T G C A G G G G A A A G A A T A G
 T A G A C A T A A T A G C A A C A G A C A T A C A A A C T A A A G A A T T A C A
 A A A A C A A A T T A C A A A A A T T C A A A A T T T C G G G T T T A T T A C
 A G G G A C A G C A G A G A T C C A G T T T G G A A A G G A C C A G C A A A G C
 T C C T C T G G A A A G G T G A A G G G G C A G T A G T A A T A C A A G A T A A
 T A G T G A C A T A A A A G T A G T G C C A A G A A G A A A A G C A A A G A T C
 A T C A G G G A T T A T G G A A A A C A G A T G G C A G G T G A T G A T T G T G
 T G G C A A G T A G A C A G G A T G A G G A T T A A (配列番号 70)

10

20

30

【 0 2 3 2 】

次に、X b a I および X m a I 隣接制限部位を有する、R e v、R R E、およびウサギ
 ベータグロビンポリA配列を含有するDNA断片を、M W G O p e r o n によって合成
 した。次いでこのDNA断片を、X b a I および X m a I 制限部位においてプラスミドに
 挿入した。DNA配列は次の通りであった：

40

【 0 2 3 3 】

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

50

G A G C T T T G T T C C T T G G G T T C T T G G G A G C A G C A G G A A G C A C
T A T G G G C G C A G C G T C A A T G A C G C T G A C G G T A C A G G C C A G A
C A A T T A T T G T C T G G T A T A G T G C A G C A G C A G A A C A A T T T G C
T G A G G G C T A T T G A G G C G C A A C A G C A T C T G T T G C A A C T C A C
A G T C T G G G G C A T C A A G C A G C T C C A G G C A A G A A T C C T G G C T
G T G G A A A G A T A C C T A A A G G A T C A A C A G C T C C T A G A T C T T T
T T C C C T C T G C C A A A A A T T A T G G G G A C A T C A T G A A G C C C C T
T G A G C A T C T G A C T T C T G G C T A A T A A A G G A A A T T T A T T T T C
A T T G C A A T A G T G T G T T G G A A T T T T T T G T G T C T C T C A C T C G
G A A G G A C A T A T G G G A G G G C A A A T C A T T T A A A A C A T C A G A A 10
T G A G T A T T T G G T T T A G A G T T T G G C A A C A T A T G C C A T A T G C
T G G C T G C C A T G A A C A A A G G T G G C T A T A A A G A G G T C A T C A G
T A T A T G A A A C A G C C C C C T G C T G T C C A T T C C T T A T T C C A T A
G A A A A G C C T T G A C T T G A G G T T A G A T T T T T T T A T A T T T T G
T T T T G T G T T A T T T T T T T C T T T A A C A T C C C T A A A A T T T T C C
T T A C A T G T T T T A C T A G C C A G A T T T T T C C T C C T C T C C T G A C
T A C T C C C A G T C A T A G C T G T C C C T C T T C T C T T A T G A A G A T C
C C T C G A C C T G C A G C C C A A G C T T G G C G T A A T C A T G G T C A T A
G C T G T T T C C T G T G T G A A A T T G T T A T C C G C T C A C A A T T C C A
C A C A A C A T A C G A G C C G G A A G C A T A A A G T G T A A A G C C T G G G 20
G T G C C T A A T G A G T G A G C T A A C T C A C A T T A A T T G C G T T G C G
C T C A C T G C C C G C T T T C C A G T C G G G A A A C C T G T C G T G C C A G
C G G A T C C G C A T C T C A A T T A G T C A G C A A C C A T A G T C C C G C C
C C T A A C T C C G C C C A T C C C G C C C C T A A C T C C G C C C A G T T C C
G C C C A T T C T C C G C C C C A T G G C T G A C T A A T T T T T T T A T T T
A T G C A G A G G C C G A G G C C G C C T C G G C C T C T G A G C T A T T C C A
G A A G T A G T G A G G A G G C T T T T T T G G A G G C C T A G G C T T T T G C
A A A A A G C T A A C T T G T T T A T T G C A G C T T A T A A T G G T T A C A A
A T A A A G C A A T A G C A T C A C A A A T T T C A C A A A T A A A G C A T T T
T T T T C A C T G C A T T C T A G T T G T G G T T T G T C C A A A C T C A T C A 30
A T G T A T C T T A T C A G C G G C C G C C C C G G G (配列番号 7 1)

【 0 2 3 4 】

最後に、pCDNA3.1のCMVプロモーターを、CAGエンハンサー/プロモーター+ニワトリベータアクチンイントロン配列に置き換えた。MluIおよびEcoRI隣接制限部位を有する、CAGエンハンサー/プロモーター/イントロン配列を含有するDNA断片を、MWG Operonによって合成した。次いでこのDNA断片を、MluIおよびEcoRI制限部位においてプラスミドに挿入した。DNA配列は次の通りであった：

【 0 2 3 5 】

A C G C G T T A G T T A T T A A T A G T A A T C A A T T A C G G G G T C A T T 40
A G T T C A T A G C C C A T A T A T G G A G T T C C G C G T T A C A T A A C T T
A C G G T A A A T G G C C C G C C T G G C T G A C C G C C C A A C G A C C C C C
G C C C A T T G A C G T C A A T A A T G A C G T A T G T T C C C A T A G T A A C
G C C A A T A G G G A C T T T C C A T T G A C G T C A A T G G G T G G A C T A T
T T A C G G T A A A C T G C C C A C T T G G C A G T A C A T C A A G T G T A T C
A T A T G C C A A G T A C G C C C C C T A T T G A C G T C A A T G A C G G T A A
A T G G C C C G C C T G G C A T T A T G C C C A G T A C A T G A C C T T A T G G
G A C T T T C C T A C T T G G C A G T A C A T C T A C G T A T T A G T C A T C G
C T A T T A C C A T G G G T C G A G G T G A G C C C C A C G T T C T G C T T C A
C T C T C C C C A T C T C C C C C C C T C C C C A C C C C C A A T T T T G T A 50

T T T A T T T A T T T T T T A A T T A T T T T G T G C A G C G A T G G G G G C G
 G G G G G G G G G G G G C G C G C G C C A G G C G G G G C G G G G C G G G G C
 G A G G G G C G G G G C G G G G C G A G G C G G A G A G G T G C G G C G G C A G
 C C A A T C A G A G C G G C G C G C T C C G A A A G T T T C C T T T T A T G G C
 G A G G C G G C G G C G G C G G C G G C C C T A T A A A A A G C G A A G C G C G
 C G G C G G G C G G G A G T C G C T G C G T T G C C T T C G C C C C G T G C C C
 C G C T C C G C G C C G C C T C G C G C C G C C C G C C C G G C T C T G A C T
 G A C C G C G T T A C T C C C A C A G G T G A G C G G G C G G G A C G G C C C T
 T C T C C T C C G G G C T G T A A T T A G C G C T T G G T T T A A T G A C G G C
 T C G T T T C T T T T C T G T G G C T G C G T G A A A G C C T T A A A G G G C T
 C C G G G A G G G C C C T T T G T G C G G G G G G G A G C G G C T C G G G G G G
 T G C G T G C G T G T G T G T G T G C G T G G G G A G C G C C G C G T G C G G C
 C C G C G C T G C C C G G C G G C T G T G A G C G C T G C G G G C G C G G C G C
 G G G G C T T T G T G C G C T C C G C G T G T G C G C G A G G G G A G C G C G G
 C C G G G G G C G G T G C C C C G C G G T G C G G G G G G G C T G C G A G G G G
 A A C A A A G G C T G C G T G C G G G G T G T G T G C G T G G G G G G G T G A G
 C A G G G G G T G T G G G C G C G G C G G T C G G G C T G T A A C C C C C C C C
 T G C A C C C C C C T C C C C G A G T T G C T G A G C A C G G C C C G G C T T C
 G G G T G C G G G G C T C C G T G C G G G G C G T G G C G C G G G G C T C G C C
 G T G C C G G G C G G G G G G T G G C G G C A G G T G G G G G T G C C G G G C G
 G G G C G G G G C C G C C T C G G G C C G G G G A G G G C T C G G G G G A G G G
 G C G C G G C G G C C C C G G A G C G C C G G C G G C T G T C G A G G C G C G G
 C G A G C C G C A G C C A T T G C C T T T T A T G G T A A T C G T G C G A G A G
 G G C G C A G G G A C T T C C T T T G T C C C A A A T C T G G C G G A G C C G A
 A A T C T G G G A G G C G C C G C C G C A C C C C C T C T A G C G G G C G C G G
 G C G A A G C G G T G C G G C G C C G G C A G G A A G G A A A T G G G C G G G G
 A G G G C C T T C G T G C G T C G C C G C G C C G C C G T C C C C T T C T C C A
 T C T C C A G C C T C G G G G C T G C C G C A G G G G G A C G G C T G C C T T C
 G G G G G G G A C G G G G C A G G G C G G G G T T C G G C T T C T G G C G T G T
 G A C C G G C G G G A A T T C (配列番号 7 2)

10

20

30

【 0 2 3 6 】
 V S V - G エンベローププラスミドの構築：

【 0 2 3 7 】
 隣接する E c o R I 制限部位を有する水疱性口内炎 I n d i a n a ウイルス糖タンパク質 (V S V - G) 配列を、 M W G O p e r o n によって合成した。次いでこの DNA 断片を E c o R I 制限部位において p C D N A 3 . 1 プラスミド (I n v i t r o g e n) に挿入し、 C M V 特異的なプライマーを使用したシーケンシングによって正しい方向を決定した。DNA 配列は次の通りであった。

【 0 2 3 8 】
 G A A T T C A T G A A G T G C C T T T T G T A C T T A G C C T T T T T A T T C
 A T T G G G G T G A A T T G C A A G T T C A C C A T A G T T T T T C C A C A C A
 A C C A A A A A G G A A A C T G G A A A A A T G T T C C T T C T A A T T A C C A
 T T A T T G C C C G T C A A G C T C A G A T T T A A A T T G G C A T A A T G A C
 T T A A T A G G C A C A G C C T T A C A A G T C A A A A T G C C C A A G A G T C
 A C A A G G C T A T T C A A G C A G A C G G T T G G A T G T G T C A T G C T T C
 C A A A T G G G T C A C T A C T T G T G A T T T C C G C T G G T A T G G A C C G
 A A G T A T A T A A C A C A T T C C A T C C G A T C C T T C A C T C C A T C T G
 T A G A A C A A T G C A A G G A A A G C A T T G A A C A A A C G A A A C A A G G
 A A C T T G G C T G A A T C C A G G C T T C C C T C C T C A A A G T T G T G G A
 T A T G C A A C T G T G A C G G A T G C C G A A G C A G T G A T T G T C C A G G

40

50

T G A C T C C T C A C C A T G T G C T G G T T G A T G A A T A C A C A G G A G A
A T G G G T T G A T T C A C A G T T C A T C A A C G G A A A A T G C A G C A A T
T A C A T A T G C C C A C T G T C C A T A A C T C T A C A A C C T G G C A T T
C T G A C T A T A A G G T C A A A G G G C T A T G T G A T T C T A A C C T C A T
T T C C A T G G A C A T C A C C T T C T T C T C A G A G G A C G G A G A G C T A
T C A T C C C T G G G A A A G G A G G G C A C A G G G T T C A G A A G T A A C T
A C T T T G C T T A T G A A A C T G G A G G C A A G G C C T G C A A A A T G C A
A T A C T G C A A G C A T T G G G G A G T C A G A C T C C C A T C A G G T G T C
T G G T T C G A G A T G G C T G A T A A G G A T C T C T T T G C T G C A G C C A
G A T T C C C T G A A T G C C C A G A A G G G T C A A G T A T C T C T G C T C C
A T C T C A G A C C T C A G T G G A T G T A A G T C T A A T T C A G G A C G T T
G A G A G G A T C T T G G A T T A T T C C C T C T G C C A A G A A A C C T G G A
G C A A A A T C A G A G C G G G T C T T C C A A T C T C T C C A G T G G A T C T
C A G C T A T C T T G C T C C T A A A A A C C C A G G A A C C G G T C C T G C T
T T C A C C A T A A T C A A T G G T A C C C T A A A A T A C T T T G A G A C C A
G A T A C A T C A G A G T C G A T A T T G C T G C T C C A A T C C T C T C A A G
A A T G G T C G G A A T G A T C A G T G G A A C T A C C A C A G A A A G G G A A
C T G T G G G A T G A C T G G G C A C C A T A T G A A G A C G T G G A A A T T G
G A C C C A A T G G A G T T C T G A G G A C C A G T T C A G G A T A T A A G T T
T C C T T T A T A C A T G A T T G G A C A T G G T A T G T T G G A C T C C G A T
C T T C A T C T T A G C T C A A A G G C T C A G G T G T T C G A A C A T C C T C
A C A T T C A A G A C G C T G C T T C G C A A C T T C C T G A T G A T G A G A G
T T T A T T T T T T G G T G A T A C T G G G C T A T C C A A A A A T C C A A T C
G A G C T T G T A G A A G G T T G G T T C A G T A G T T G G A A A A G C T C T A
T T G C C T C T T T T T C T T T A T C A T A G G G T T A A T C A T T G G A C T
A T T C T T G G T T C T C C G A G T T G G T A T C C A T C T T T G C A T T A A A
T T A A A G C A C A C C A A G A A A A G A C A G A T T T A T A C A G A C A T A G
A G A T G A G A A T T C (配列番号 7 3)

10

20

【 0 2 3 9 】

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

30

【 0 2 4 0 】

図5を部分的に参照すると、ヘルパープラスミドは、CAGエンハンサー(配列番号39)、CAGプロモーター(配列番号40)、ニワトリベータアクチンイントロン(配列番号41)、HIV gag(配列番号42)、HIV Pol(配列番号43)、HIV Int(配列番号44)、HIV RRE(配列番号45)、およびウサギベータグロビンポリA(配列番号47)を含む。

40

【 0 2 4 1 】

Revプラスミドは、RSVプロモーターおよびHIV Rev(配列番号75)、ならびにウサギベータグロビンポリA(配列番号60)を含む。

【 0 2 4 2 】

エンベローププラスミドは、CMVプロモーター(配列番号49)、ベータグロビンイントロン(配列番号50)、VSV-G(配列番号51)、およびウサギベータグロビンポリA(配列番号56)を含む。

【 0 2 4 3 】

ヘルパー、Rev、およびエンベローププラスミドを含む3ベクターレンチウイルスバ

50

パッケージ系の合成。

【0244】

材料および方法：

【0245】

Revを含まないヘルパープラスミドの構築：

【0246】

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

10

【0247】

TCTAGAAAGGAGCTTTGTTCCCTTGGGTTCCTTGGGAGCAGC
 AGGAAGCACTATGGGCGCAGCGTCAATGACGCTGACGGTA
 CAGGCCAGACAATTATTGTCTGGTATAGTGCAGCAGCAGA
 ACAATTTGCTGAGGGCTATTGAGGCGCAACAGCATCTGTT
 GCAACTCACAGTCTGGGGCATCAAGCAGCTCCAGGCCAAGA
 ATCCTGGCTGTGGAAGAATACCTAAAGGATCAACAGCTCC
 TAGATCTTTTTCCTCTGCCAAAATTTATGGGGACATCAT
 GAAGCCCTTGTGAGCATCTGACTTCTGGCTAATAAAGGAAA
 TTTATTTTTCATTTGCAATAGTGTGTTGGAATTTTTTTGTGTC
 TCTCACTCGGAAGGACATATGGGAGGGCAAAATCATTTA
 ACATCAGAAATGAGTATTTGGTTTAGAGTTTGGCAACATAT
 GCCATATGCTGGCTGCCATGAACAAAGGTGGCTATAAAGA
 GGTCATCAGTATATGAAACAGCCCTGCTGTCCATTCCT
 TATTCATAGAAAAGCCTTGACTTGAAGTTAGATTTTTTT
 TATATTTTGTTTTGTGTTATTTTTTTCTTTAACATCCCTA
 AAATTTTCTTTACATGTTTTACTAGCCAGATTTTTTCTCTC
 TCTCCTGACTACTCCCAGTCATAGCTGTCCCTCTCTCTT
 ATGAAGATCCCTCGACCTGCAGCCCAAGCTTGGCGTAATC
 ATGGTCATAGCTGTTTCTCTGTGTGAAATTTGTTATCCGCTC
 ACAATTCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTA
 AAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAAGCTAACTCACATTAAT
 TGC GTTGC GCTCACTGCCCGCTTTTCCAGTCGGGAAACCTG
 TCGTGCCAGCGGATCCGCATCTCAATTAGTCAAGCAACCAT
 AGTCCCGCCCTAACTCCGCCCATCCCGCCCTAACTCCG
 CCCAGTTCCGCCCATCTCCGCCCATGGCTGACTAATTT
 TTTTTATTTATGCAAGAGGCCGAGGCCGCTCAGGCCTCTGA
 GCTATTTCCAGAAGTAGTGAAGGAGGCTTTTTTTGGAGGCCTA
 GGCTTTTTGCAAAAGCTAACTTGTTTATTGCAAGCTTATAA
 TGGTTACAAAATAAAGCAATAGCATCACAAAATTTACAAAAT
 AAAGCATTTTTTTCACTGCATTTCTAGTTGTGGTTTTGTCCA
 AACTCATCAATGTATCTTATCACCCGGG (配列番号74)

20

30

40

【0248】

Revプラスミドの構築：

【0249】

隣接するMfeIおよびXbaI制限部位を有するRSVプロモーターおよびHIV Rev配列を、MWG Operonにより、単一のDNA断片として合成した。次いでこのDNA断片を、CMVプロモーターが、RSVプロモーターに置き換えられているMfeIおよびXbaI制限部位においてpCDNA3.1プラスミド(Invitrog

50

e n) に挿入した。DNA 配列は次の通りであった :

【 0 2 5 0 】

CAATTGCGATGTACGGGCCAGATATACGCGTATCTGAGG
 GGACTAGGGTGTGTTTAGGCGAAAAGCGGGGCTTCGGTTG
 TACGCGGTTAGGAGTCCCTCAGGATATAGTAGTTTCGCT
 TTTGCATAGGGAGGGGGA AATGTAGTCTTATGCAATACAC
 TTGTAGTCTTGCAACATGGTAACGATGAGTTAGCAACATG
 CCTTACAAGGAGAGAAAAGCACCGTG CATGCCGATTGGT
 GGAAGTAAGGTGGTACGATCGTGCCTTATTAGGAAGGCA
 CAGACAGGTCTGACATGGATTGGACGAACCACTGAATTCC
 GCATTTGCAGAGATAATTGTATTTAAGTGCCTAGCTCGATA
 CAATAAACGCCATTTGACCATTCACCAACATTGGTGTGCAC
 CTCCAAGCTCGAGCTCGTTTTAGTGAACCGTCAAGATCGCCT
 GGAGACGCCATCCACGCTGTTTTGACCTCCATAGAAAGACA
 CCGGGACCGATCCAGCCTCCCTCGAAGCTAGCGATTAGG
 CATCTCCTATGGCAGGAAGAAGCGGAGACAGCGACGAAGA
 ACTCCTCAAGGCAGTCAAGACTCATCAAGTTTTCTCTATCAA
 AGCAAACCCACCTCCCAATCCCGAAGGGGACCCGACAGGCC
 GAAGGAATAGAAAGAAAGAAAGGTGGAGAGAGAGACAGAGACA
 GATCCATTTCGATTAGTGAACGGATCCTTAGCACTTATCTG
 GGACGATCTGCGGAGCCTGTGCCTCTTCA GCTACCAACCGC
 TTGAGAGACTTACTCTTGATTGTAAACGAGGATTGTGGAAC
 TTCTGGGACGCAAGGGGGTGGGAAGCCCTCAAATATTGGTGG
 GAATCTCCTACAATAATTGGAGTCAAGGAGCTAAAGAATAGT
 CTAGA (配列番号 7 5)

10

20

30

40

50

【 0 2 5 1 】

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

【 0 2 5 2 】

プロモーター : 伸長因子 1 (E F - 1) (配列番号 4)、ホスホグリセリン酸キナーゼ (P G K) (配列番号 5 2)、およびユビキチン C (U b C) (配列番号 5 3) は、CMV (配列番号 4 9) または C A G プロモーター (配列番号 8 0) に取って代わることができる。これらの配列は、付加、置換、欠失、または変異によってさらに変化させることもできる。

【 0 2 5 3 】

ポリ A 配列 : S V 4 0 ポリ A (配列番号 5 4) および b G H ポリ A (配列番号 5 5) は、ウサギベータグロビンポリ A (配列番号 4 7) に取って代わることができる。これらの配列は、付加、置換、欠失、または変異によってさらに変化させることもできる。

【 0 2 5 4 】

H I V G a g、P o l、およびインテグラーゼ配列 : ヘルパープラスミド中の H I V 配列は、異なる H I V 株またはクレードから構築されていてよい。例えば、B a l 株由来の H I V G a g (配列番号 5 6)、H I V P o l (配列番号 5 7)、および H I V I n t (配列番号 5 8) は、本明細書に概説されるヘルパー/ヘルパー + R e v プラスミドに含有される g a g、p o l、および i n t 配列と交換することができる。これらの配列は、付加、置換、欠失、または変異によってさらに変化させることもできる。

【 0 2 5 5 】

エンベロープ : V S V - G 糖タンパク質は、ネコ内在性ウイルス (R D 1 1 4) (配列番号 5 9)、テナガザル白血病ウイルス (G A L V) (配列番号 6 0)、狂犬病 (F U G

) (配列番号61)、リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス(LCMV)(配列番号62)、インフルエンザA家禽ペストウイルス(FPV)(配列番号63)、ロスリバーアルファウイルス(RRV)(配列番号64)、マウス白血病ウイルス10A1(MLV)(配列番号65)、またはエボラウイルス(EboV)(配列番号66)由来の膜糖タンパク質で置換され得る。これらのエンベロープの配列は、本明細書の配列の部分において特定される。さらに、これらの配列は、付加、置換、欠失、または変異によってさらに変化させることもできる。

【0256】

まとめると、3ベクターシステム対4ベクターシステムは、部分的には次のように比較および対比することができる。3ベクターのレンチウイルスベクターシステムは、1.ヘルパープラスミド: HIV Gag、Pol、インテグラーゼ、およびRev/Tat; 2.エンベローププラスミド: VSV-G/FUGエンベロープ; ならびに3.治療用ベクター: RSV 5'LTR、Psiパッケージングシグナル、Gag断片、RRE、Env断片、cPPT、WPRE、および3'デルタLTRを含有する。4ベクターのレンチウイルスベクターシステムは、1.ヘルパープラスミド: HIV Gag、Pol、およびインテグラーゼ; 2. Revプラスミド: Rev; 3.エンベローププラスミド: VSV-G/FUGエンベロープ; ならびに4.治療用ベクター: RSV 5'LTR、Psiパッケージングシグナル、Gag断片、RRE、Env断片、cPPT、WPRE、および3'デルタLTRを含有する。上記のエレメントに対応する配列は、本明細書の配列表の部分において特定される。

10

20

【0257】

(実施例2: 抗HIVレンチウイルスベクターの開発)

この実施例の目的は、抗HIVレンチウイルスベクターを開発することであった。

【0258】

阻害性RNAのデザイン。Homo sapiensケモカインC-Cモチーフ受容体5(CCR5)(GC03P046377)のmRNA配列を使用して、ヒト細胞においてCCR5レベルをロックダウンする潜在的なsiRNAまたはshRNA候補を検索した。Broad InstituteのプログラムまたはThermo ScientificのBLOCK-iT RNAi DesignerなどのsiRNAまたはshRNAデザインプログラムによって選択された候補から、潜在的なRNA干渉配列を選択した。選択された個々のshRNA配列を、レンチウイルスベクターのRNAポリメラーゼIIIプロモーター、例えばH1、U6、または7SKのすぐ3'側に挿入して、shRNA発現を調節した。これらのレンチウイルス-shRNA構築物を使用して細胞の形質導入を行い、特異的なmRNAレベルの変化を測定した。mRNAレベルを低下させるために最も強力なshRNAをマイクロRNA骨格内に個々に包埋して、CMVまたはEF-1アルファRNAポリメラーゼIIIプロモーターのいずれかによる発現を可能にした。マイクロRNA骨格は、mirbase.orgから選択した。RNA配列を合成siRNAオリゴヌクレオチドとしても合成し、レンチウイルスベクターを使用せずに細胞に直接導入した。

30

40

【0259】

ヒト免疫不全ウイルス1型のBal株(HIV-1 85US__Bal、受託番号AY713409)のゲノム配列を使用して、ヒト細胞におけるHIV複製レベルをロックダウンする潜在的なsiRNAまたはshRNA候補を検索した。配列相同性および経験に基づいて、この検索ではHIVのTatおよびVif遺伝子の領域に焦点を合わせた。当業者には、これらの領域の使用は非限定的であり、他の潜在的な標的が選択され得ることは理解されよう。重要なことに、gagまたはpol遺伝子の高度に保存された領域は、ベクターの製造に必要なパッケージング系補完プラスミドにこれらと同じ配列が存在したため、shRNAによってターゲティングすることができなかった。CCR5(NM000579.3、NM001100168.1特異的)RNAと同様に、Broad Instituteが主催しているGene-E Software Suite(br

50

oadinstitute.org/mai/public) または *Thermo Scientific* の *BLOCK-iT RNAi Designer* (rnadesigner.thermofisher.com/rnaiexpress/setOption.do?designOption=shrna&pid=6712627360706061801) などの *shRNA* または *shRNA* デザインプログラムによって選択された候補から、潜在的な *HIV* 特異的 *RNA* 干渉配列を選択した。選択された個々の *shRNA* 配列を、レンチウイルスベクターの *RNA* ポリメラーゼ *III* プロモーター、例えば *H1*、*U6*、または *7SK* のすぐ側へ挿入して、*shRNA* 発現を調節した。これらのレンチウイルス-*shRNA* 構築物を使用して細胞の形質導入を行い、特異的な *mRNA* レベルの変化を測定した。*mRNA* レベルを低下させるために最も強力な *shRNA* をマイクロ *RNA* 骨格内に個々に包埋して、*CMV* または *EF-1* アルファ *RNA* ポリメラーゼ *III* プロモーターのいずれかによる発現を可能にした。

【0260】

ベクターの構築。*CCR5*、*Tat*、または *Vif* の *shRNA* について、*BamHI* および *EcoRI* 制限部位を含有するオリゴヌクレオチド配列を、*Eurofins MWG Operon*、*LLC* によって合成した。重複するセンスおよびアンチセンスオリゴヌクレオチド配列を混合し、セ氏 70 度から室温に冷却中にアニールした。レンチウイルスベクターを、セ氏 37 度で 1 時間にわたり、制限酵素 *BamHI* および *EcoRI* で消化した。消化されたレンチウイルスベクターをアガロースゲル電気泳動によって精製し、*Invitrogen* の *DNA* ゲル抽出キットを使用してゲルから抽出した。*DNA* 濃度を決定し、ベクターとオリゴ (3 : 1 比) を混合し、アニールさせ、ライゲートした。ライゲーション反応は、室温で 30 分間 *T4 DNA* リガーゼを用いて行った。2.5 マイクロリットルのライゲーションミックスを、25 マイクロリットルの *STBL3* コンピテント細菌細胞に添加した。セ氏 42 度での熱ショック後に形質転換が達成された。アンピシリンを含有する寒天プレート上に細菌細胞を広げ、薬物耐性コロニー (アンピシリン耐性プラスミドの存在を示す) を回収し、精製し、*LB* プロスにおいて拡大増殖させた。オリゴ配列の挿入を調べるために、採取した細胞培養物から *Invitrogen* の *DNA* ミニプレップキットを用いてプラスミド *DNA* を抽出した。*shRNA* 発現を調節するために使用したプロモーターに特異的なプライマーを使用した *DNA* シーケンシングにより、レンチウイルスベクターにおける *shRNA* 配列の挿入を検証した。*HIV* 複製を制限することが決定された例示的なベクター配列は図 7 に見出すことができる。*CCR5*、*Tat*、および *Vif* 遺伝子発現に対する最も高い活性を有する *shRNA* 配列を、*miR30*、*miR21*、および *miR185* 骨格にアッセンブルした。これは、*miR30 CCR5* (配列番号 87)、*miR21 Vif* (配列番号 88)、および *miR185 Tat* (配列番号 89) 配列に帰着した。配列番号 87、88、および 89 の下線のある配列は、*shRNA* 配列を有する骨格を表わす。配列番号 87、88、89 の下線のない配列は、制限認識配列を表わす。

【0261】

ベクターの開発

【0262】

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

【0263】

上記の第 1 の点に関して、重要な細胞表面 *HIV* 結合タンパク質は、ケモカイン受容体 *CCR5* である。*HIV* 粒子は、*CD4* および *CCR5* 細胞表面タンパク質に結合することにより、感受性 *T* 細胞に付着する。*CD4* は、*T* 細胞の免疫学的機能に重要な細胞表面

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

【0264】

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

10

【0265】

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

20

【0266】

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

30

【0267】

以下の表2は、複数のバージョンの阻害性構築物を通して臨床候補に到達するまでの進行を実証する。最初に shRNA（短鎖相同 RNA）分子をデザインし、プラスミド DNA 構築物から発現させた。

【0268】

以下の表2で詳述するプラスミド1~4は、HIV の Gag、Pol、および RT 遺伝子に対する shRNA 配列を試験した。各 shRNA は細胞モデルにおいてウイルスタンパク質発現を抑制するのに活性であったが、さらなる開発を妨げた2つの重要な問題があった。第1に、これらの配列は、北米および欧州で現在循環しているクレード B HIV 株を代表するものではない HIV の実験室単離物に対してターゲティングされた。第2に、これらの shRNA は、レンチウイルスベクターパッケージング系において重要な成分をターゲティングし、製造中のベクター収量を大きく低減させることになる。表2で詳述するプラスミド5は、CCR5 をターゲティングするために選択され、リード候補配列をもたらした。表2で詳述するプラスミド6、7、8、9、10、および11は、TAR 配列を組み込んだものであり、レンチウイルスベクター製造に使用された細胞を含む哺乳動

40

50

物細胞に対して許容されない毒性をもたらしたことが分かった。表2で詳述するプラスミド2は、Tat RNA発現を低減させることができるリードshRNA配列を特定した。表2で詳述するプラスミド12は、レンチウイルスベクターにおいてマイクロRNA(miR)として発現されるshCCR5の有効性を実証し、これが最終産物に存在するはずであることを裏付けた。表2で詳述するプラスミド13は、レンチウイルスベクターにおいてマイクロRNA(miR)として発現されるshVifの有効性を実証し、これが最終産物に存在するはずであることを裏付けた。表2で詳述するプラスミド14は、レンチウイルスベクターにおいてマイクロRNA(miR)として発現されるshTatの有効性を実証し、これが最終産物に存在するはずであることを裏付けた。表2で詳述するプラスミド15は、単一のプロモーターから発現されたmiRクラスターの形態で、miRCCR5、miRTatおよびmiRVifを含有した。これらのmiRは、レンチウイルスベクターパッケージング系において重要な成分をターゲティングせず、哺乳動物細胞に対して無視できる毒性を有することが証明された。クラスター内のmiRは、以前に試験された個々のmiRに対して等しく有効であり、全体的な影響は、CCR5向性HIVBaL株の複製の実質的な低減であった。

【表 2 - 1】

表 2:ベクターの開発

プラスミド	配列	物質	説明	所見	決定
1	配列番号 9	レンチウイルスベクター	LAI 株の RT のための shRNA 構築物	誤った標的、実験室ウイルス、ウイルス試験なし	放棄
2	配列番号 76	レンチウイルスベクター	H1 プロモーター shRNA Tat/Rev 重複	Tat タンパク質ノックダウン>90%	リード
<p>ベクター構築:Rev/Tat shRNA の場合、BamHI および EcoRI 制限部位を含むオリゴヌクレオチド配列は、MWG Operon によって合成された。合成された 2 つの Rev/Tat shRNA 配列は、Rev/Tat shRNA コード配列#1(5'-GCGGAGACAGCGACGAAGAGCTTCAAGAGAGCTCTTCGTCGCTGTCTCCGCTTTTT-3')(配列番号 10)および Rev/Tat shRNA コード配列#2(5'-ATGGCAGGAAGAAGCGGAGTTCAAGAGACTCCGCTTCTTCCTGCCATTTTT-3')(配列番号 77)であった。2 つの異なる Rev/Tat 標的配列を、Tat mRNA 発現を減少させるそれらの能力について試験した:Rev/Tat shRNA 標的配列#1(5'-GCGGAGACAGCGACGAAGAGC-3')(配列番号 9)および Rev/Tat shRNA 標的配列#2(5'-ATGGCAGGAAGAAGCGGAG-3')(配列番号 76)。</p> <p>Rev/Tat に対する shRNA の機能試験:Tat 発現の低減を、3'-UTR(mRNA の非翻訳領域)に挿入された Rev/Tat 標的配列を含んでいたルシフェラーゼレポータープラスミドを使用して試験した。Rev/Tat shRNA 標的配列#1(配列番号 9)および Rev/Tat shRNA 標的配列#2(配列番号 76)を含む個別のルシフェラーゼレポータープラスミドを試験した。Rev/Tat shRNA コード配列#1(配列番号 10)を、Rev/Tat shRNA 標的配列#1(配列番号 9)を含むルシフェラーゼレポータープラスミドとともに共トランスフェクトした。Rev/Tat shRNA コード配列#2(配列番号 77)を、Rev/Tat shRNA 標的配列#2(配列番号 76)を含むルシフェラーゼレポータープラスミドとともに共トランスフェクトした。</p> <p>Rev/Tat shRNA 標的配列#1(配列番号 9)を含むルシフェラーゼレポータープラスミドの発光が 90%低減された。これは、Rev/Tat 標的配列#2(配列番号 76)を含むルシフェラーゼレポータープラスミドの発光の低減が 10%未満であったことと対照的である。</p> <p>結論:Rev/Tat shRNA コード配列#1(配列番号 10)は、ルシフェラーゼアッセイシステムにおいて mRNA レベルを下げる点で Rev/Tat shRNA コード配列#2(配列番号 77)より優れていた。これは、Rev/Tat shRNA コード配列#1(配列番号 10)の強力な阻害活性を示し、これをさらなる開発のリード候補として選択した。</p>					
3	配列番号 12	レンチウイルスベクター	LAI Gag のための shRNA 構築物	Gag 発現を阻害するがパッケージングを阻害する	放棄
<p>ベクター構築:Gag shRNA の場合、BamHI および EcoRI 制限部位を含むオリゴヌクレオチド配列は、MWG Operon によって合成され、Gag mRNA 発現を減少させるその能力について試験した。合成された Gag shRNA 配列は、Gag shRNA コード配列(5'-GAAGAAATGATGACAGCATTTC AAGAGAATGCTGTCATCATTTCTTCTTTTT-3')(配列番号 12)であった。Gag shRNA 標的配列(5'-GAAGAAATGATGACAGCAT-3')(配列番号 11)を、Gag mRNA 発現を低減するその能力について試験した。オリゴヌクレオチド配列を、pSIH レンチウイ</p>					

10

20

30

40

【表 2 - 2】

<p>ルスベクター(System Biosciences)に挿入した。</p> <p>Gag に対する shRNA の機能試験:Gag 発現の低減を、3'-UTR(mRNA の非翻訳領域)に挿入された Gag shRNA 標的配列(配列番号 11)を含んでいたルシフェラーゼレポータープラスミドを使用して試験した。Gag shRNA コード配列(配列番号 12)を、ルシフェラーゼを含むルシフェラーゼレポータープラスミドおよび Gag shRNA 標的配列(配列番号 11)とともに共トランスフェクトした。これらの配列の共トランスフェクションは、対照処置と比較して、ルシフェラーゼレポータープラスミドからの発光のほぼ 90%低減をもたらした。</p> <p>結論:この Gag shRNA コード配列(配列番号 12)は、HIV Gag 発現に対して強力であるが、放棄した。レンチウイルスパッケージングシステムは、ヘルパープラスミドからの Gag の産生を必要とし、Gag の shRNA 阻害は、レンチウイルスベクター収量を低減するだろう。この shRNA コード配列を、HIV のオリゴヌクレオチド阻害剤として使用してもよく、または異なるベクターゲノムを使用するか、もしくはこの shRNA による阻害に抵抗するように修飾されている代替ウイルスベクターパッケージングシステムに組み込んでもよい。</p>					
4	配列番号 14	レンチウイルスベクター	Pol のための shRNA 構築物	Pol 発現を阻害するがパッケージングを阻害する	放棄
<p>ベクター構築:Pol shRNA を、MWG Operon によって合成された BamHI および EcoRI 制限部位を含むオリゴヌクレオチド配列で構築し、Pol mRNA 発現を減少させるその能力について試験した。合成された Pol shRNA 配列は、Pol shRNA コード配列(5'-CAGGAGATGATACAGTTCAAGAGACTGTATCATCTGCTCCTGTTTT-3')(配列番号 14)であった。Pol shRNA 標的配列(5'-CAGGAGCAGATGATACAG-3')(配列番号 13)を、Pol mRNA 発現を低減するその能力について試験した。オリゴヌクレオチド配列を、pSIH レンチウイルスベクター(System Biosciences)に挿入した。</p> <p>HIV Pol に対する shRNA の機能試験:Pol 発現の低減を、3'-UTR(mRNA の非翻訳領域)に挿入された Pol shRNA 標的配列(配列番号 13)を含んでいたルシフェラーゼレポータープラスミドを使用して試験した。Pol shRNA コード配列(配列番号 14)を、ルシフェラーゼを含むルシフェラーゼレポータープラスミドおよび Pol shRNA 標的配列(配列番号 13)とともに共トランスフェクトした。これらの配列の共トランスフェクションは、対照処置と比較して、ルシフェラーゼレポータープラスミドからの発光の 60%低減をもたらした。</p> <p>結論:この Pol shRNA コード配列(配列番号 14)は、HIV Pol 発現に対して強力であるが、放棄した。レンチウイルスパッケージングシステムは、ヘルパープラスミドからの Pol の産生を必要とし、Pol の shRNA 阻害は、レンチウイルスベクター収量を低減するだろう。この shRNA 配列を、HIV のオリゴヌクレオチド阻害剤として使用してもよく、または異なるベクターゲノムを使用するか、もしくはこの shRNA による阻害に抵抗するように修飾されている代替ウイルスベクターパッケージングシステムに組み込んでもよい。</p>					
5	配列番号 16	レンチウイルスベクター	CCR5 のための shRNA 構築物	5 つの候補の中で最良、細胞外 CCR5 タンパク質の低減>90%	リード
<p>ベクター構築:様々な CCR5 shRNA コード配列を、MWG Operon によって合成された BamHI および EcoRI 制限部位を含むオリゴヌクレオチド配列で構築した。オリゴヌクレオチド配列を、pSIH レンチウイルスベクター(System Biosciences)に挿入した。</p> <p>CCR5 shRNA 標的配列#1 は、(5'-GTGTCAAGTCCAATCTATG-3')(配列番号 15)である。これは、CCR5 shRNA コード配列#1(5'-GTGTCAAGTCCAATCTATGTTCAAGAGACATAGATTGGACTTGACACTTTTT-3')(配列番号 16)に対応する。CCR5 標的配列#1(配列番号 15)は、Homo Sapiens CCR5 mRNA 標的配列</p>					

10

20

30

40

【表 2 - 3】

<p>#1(配列番号 25)内に位置する。</p> <p>CCR5 shRNA 標的配列#2 は、(5'-GAGCATGACTGACATCTAG-3')(配列番号 17)である。これは、CCR5 shRNA コード配列#2(5'-GAGCATGACTGACATCTACTTCAAGAGAGTAGATGTCAGTCATGCTCTTTTT-3')(配列番号 18)に対応する。CCR5 標的配列#2(配列番号 17)は、Homo Sapiens CCR5 mRNA 標的配列#2(配列番号 26)内に位置する。</p> <p>CCR5 shRNA 標的配列#3 は、(5'-GTAGCTCTAACAGGTTGGA-3')(配列番号 19)である。これは、CCR5 shRNA コード配列#3(5'-GTAGCTCTAACAGGTTGATTCAAGAGATCCAACCTGTTAGAGCTACTTTTT-3')(配列番号 20)に対応する。CCR5 標的配列#3(配列番号 19)は、Homo Sapiens CCR5 mRNA 標的配列#3(配列番号 27)内に位置する。</p> <p>CCR5 shRNA 標的配列#4 は、(5'-GTTTCAGAACTACCTCTTA-3')(配列番号 21)である。これは、CCR5 shRNA コード配列#4(5'-GTTTCAGAACTACCTCTTATTCAAGAGATAAGAGGTAGTTTCTGAACTTTTT-3')(配列番号 22)に対応する。CCR5 標的配列#4(配列番号 21)は、Homo Sapiens CCR5 mRNA 標的配列#4(配列番号 28)内に位置する。</p> <p>CCR5 shRNA 標的配列#5 は、(5'-GAGCAAGCTCAGTTTACACC-3')(配列番号 23)である。これは、CCR5 shRNA コード配列#5(5'-GAGCAAGCTCAGTTTACACCTTCAAGAGAGGTGTAAGCTGAGCTTGCTCTTTTT-3')(配列番号 24)に対応する。CCR5 標的配列#5(配列番号 23)は、Homo Sapiens CCR5 mRNA 標的配列#5(配列番号 29)内に位置する。</p> <p>CCR5 に対する shRNA の機能試験:CCR5 RNA 発現をノックダウンする CCR5 shRNA 配列の能力を、まず、CCR5 shRNA 標的配列(配列番号 15、17、19、21、および 23)の各々を、その対応する CCR5 shRNA コード配列(配列番号 16、18、20、22、24、および 26)とともに別々に共トランスフェクトすることによって試験した。次いで、CCR5 mRNA 発現を、CCR5 特異的プライマーを使用して qPCR 分析によって評価した。</p> <p>結論:CCR5 mRNA レベルの低減に基づき、CCR5 shRNA コード配列#1(配列番号 16)が、CCR5 遺伝子発現の低減に最も強力であった。この shRNA をリード候補として選択した。</p>					
6	SIH-U6-TAR	レンチウイルスベクター	U6 プロモーター-TAR	細胞に対して毒性	放棄
7	SIH-U6-TAR-H1-shCCR5	レンチウイルスベクター	U6 プロモーター-TAR-H1-shCCR5	細胞に対して毒性	放棄
8	U6-TAR-H1-shRT	レンチウイルスベクター	U6 プロモーター-TAR-H1-RT	HIV を抑制する、細胞に対して毒性、パッケージング不良	放棄
9	U6-TAR-7SK-shRT	レンチウイルスベクター	shRNA プロモーターを 7SK に変更する	毒性、パッケージング不良	放棄
10	U6-TAR-H1-shRT-H1-shCCR5	レンチウイルスベクター	U6 プロモーター-TAR-H1-RT-H1-shCCR5	毒性、パッケージング不良、H1 回復	放棄

10

20

30

40

【表 2 - 4】

11	U6-TAR-7SK-shRT-H1-CCR5	レンチウイルスベクター	shRNA プロモーターを 7SK に変更する	毒性、パッケージング不良	放棄
<p>ベクターの構築:隣接する KpnI 制限部位を含有する TAR デコイ配列を MWG operon によって合成し、pSIH レンチウイルスベクター(System Biosciences)の KpnI 部位に挿入した。このベクターにおいて、TAR 発現は U6 プロモーターによって調節される。TAR デコイ配列は、(5' - CTTGCAATGATGTCGTAATTTGCGTCTTACCTCGTTCTCGACAGCGACCAGATCTGAGCCTGG GAGCTCTCTGGCTGTCAGTAAGCTGGTACAGAAGGTTGACGAAAATTCTTACTGAGCAAGAAA -3') (配列番号 8)である。TAR 配列に特異的なプライマーを使用した qPCR 分析によって TAR デコイ配列の発現を決定した。同じく TAR 配列を含有するさらなるベクターを構築した。このベクターの XhoI 部位に H1 プロモーターおよび shRT 配列を挿入した。H1 プロモーターおよび shRT 配列は(5' - GAACGCTGACGTCATCAACCCGCTCCAAGGAATCGCGGGCCCAGTGCTACTAGGCGGGAACA CCCAGCGCGCGTGCGCCCTGGCAGGAAGATGGCTGTGAGGGACAGGGGAGTGGCGCCCTGC AATATTTGCATGTCGCTATGTGTTCTGGGAAATCACCATAAACGTGAAATGTCTTTGGATTTGG GAATCTTATAAGTTCTGTATGAGACCACTTGGATCCGCGGAGACAGCGACGAAGAGCTTCAAG AGAGCTCTTCGTCGCTGTCTCCGCTTTTT-3') (配列番号 78)である。このベクターは TAR を発現し、RT をノックダウンすることができた。また、shRT 発現を調節するため、7SK プロモーターを、H1 プロモーターの代わりに使用した。U6 TAR、H1 shRT、および H1 shCCR5 を含有する別のベクターを構築した。U6 TAR および H1 shRT を含有するプラスミドの SpeI 部位に H1 shCCR5 配列を挿入した。H1 CCR5 配列は、(5' - GAACGCTGACGTCATCAACCCGCTCCAAGGAATCGCGGGCCCAGTGCTACTAGGCGGGAACA CCCAGCGCGCGTGCGCCCTGGCAGGAAGATGGCTGTGAGGGACAGGGGAGTGGCGCCCTGC AATATTTGCATGTCGCTATGTGTTCTGGGAAATCACCATAAACGTGAAATGTCTTTGGATTTGG GAATCTTATAAGTTCTGTATGAGACCACTTGGATCCGCGTCAAGTCCAATCTATGTTCAAGAGA CATAGATTGGACTTGACACTTTTT-3') (配列番号 79)である。また、shRT 発現を調節するため、7SK プロモーターを、H1 プロモーターの代わりに使用した。</p> <p>TAR デコイ活性の機能試験:本発明者らは、パッケージング効率に対する SIH-U6-TAR の効果を試験した。TAR 配列を含めたとき、SIH パッケージング系におけるベクターの収量は実質的に低減した。</p> <p>結論:TAR デコイ配列を発現するレンチウイルスベクターは、ベクター収量が低いため、商業的開発に適さない。これらの構築物は放棄された。</p>					
12	配列番号 1	レンチウイルスベクター	マイクロ RNA 配列	細胞外 CCR5 タンパク質の低減 >90%	リード

10

20

30

40

【表 2 - 5】

<p>ベクターの構築:MWG Operon によって合成された BsrGI および NotI 制限部位を含有するオリゴヌクレオチド配列を有する CCR5 マイクロ RNA を構築した。pCDH レンチウイルスベクター (System Biosciences) にオリゴヌクレオチド配列を挿入した。プラスミド構築物試験物質 5 に使用した CMV プロモーターを EF-1 プロモーターで置換した。隣接する ClaI および BsrGI 制限部位を含有する EF-1 プロモーターを MWG Operon によって合成し、shCCR5-1 を含有する pCDH ベクターに挿入した。EF-1 プロモーター配列は、(5'-</p> <p>CCGGTGCCTAGAGAAGGTGGCGCGGGGTAAGTGGGAAAGTGATGTCGTGTAAGTGGCTCCGC CTTTTTCCCGAGGGTGGGGGAGAACCGTATATAAGTGCAGTAGTCGCCGTGAACGTTCTTTTT CGCAACGGGTTTTGCCGCCAGAACACAGGTAAGTGCCGTGTGTGGTCCCGCGGGCCTGGCCT CTTTACGGGTTATGGCCCTTGCCTGCTTGAATTACTTCCACGCCCTGGCTGCAGTACGTGA TTCTTGATCCCGAGCTTCGGGTTGGAAGTGGGTGGGAGAGTTCCGAGCCTTGCCTTAAGGAG CCCCTTCGCCTCGTGCCTGAGTTGAGGCCTGGCCTGGGCGCTGGGGCCGCCCGTGCGAATC TGGTGGCACCTTCGCGCCTGTCTCGCTGCTTTCGATAAGTCTCTAGCCATTTAAAATTTTTGAT GACCTGCTGCGACGCTTTTTTCTGGCAAGATAGTCTTGTAAATGCGGGCCAAGATCTGCACA CTGGTATTTCCGTTTTTGGGGCCGCGGGCGGCGACGGGGCCCGTGCCTCCAGCGCACATGT TCGGCGAGGCGGGGCTGCGAGCGCGGCCACCGAGAATCGGACGGGGGTAGTCTCAAGCTG GCCGGCCTGCTCTGGTGCCTGGCCTCGCGCCCGCTGTATCGCCCCGCCCTGGGCGGCAAG GCTGGCCCCGTCGGCACCAGTTGCGTGAGCGGAAAGATGGCCGCTTCCCGGCCCTGCTGCAG GGAGCTCAAAATGGAGGACGCGGCGCTCGGGAGAGCGGGCGGGTGGAGTACCCACACAAAG GAAAAGGGCCTTTCCGTCCAGCCGTCGCTTCATGTGACTCCACGGAGTACCGGGCGCCGT CCAGGCACCTCGATTAGTTCTCGAGCTTTTGGAGTACGTCGCTTTAGGTTGGGGGAGGGGT TTTATGCGATGGAGTTTCCCGACACTGAGTGGGTGGAGACTGAAGTTAGGCCAGCTTGGCACT TGATGTAATTCTCCTTGAATTTGCCCTTTTTGAGTTTGGATCTTGGTTCATTCTCAAGCCTCA GACAGTGGTTCAAAGTTTTTTTCTTCCATTTAGGTGTCGTGA-3') (配列番号 4)である。</p> <p>レンチウイルス CDH-shCCR5-1 の機能試験:CCR5 発現をノックダウンする CCR5 miR および CCR5 shRNA 配列の能力を、CEM-CCR5 T 細胞に CCR5 miR または shRNA 配列で形質導入することによって決定した。CCR5 に対する蛍光標識モノクローナル抗体で染色し、分析的フローサイトメトリーによる染色の強度を測定することによって、細胞表面 CCR5 発現を測定した。CCR5 をターゲティングするために最も効果的な shRNA 配列は、CCR5 shRNA コード配列 #1(配列番号 16)であった。しかしながら、合成マイクロ RNA 配列を構築するために最も効果的な CCR5 標的配列は、CCR5 shRNA コード配列 #5(配列番号 24)と重複していた。この結論は、配列アラインメントおよび miRNA 構築の経験に基づいていた。最後に、miR30 ヘアピン配列を使用して、(5'-</p> <p>AGGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCGACTGTAAACTGAGCTTGCTCTACTGTGAAGCCACA GATGGGTAGAGCAAGCACAGTTTACCGCTGCCTACTGCCTCGGACTTCAAGGGGCTT- 3')(配列番号 1)である合成 miR30 CCR5 コード配列を構築した。CCR5 miRNA 標的配列は、(5'-GAGCAAGCTCAGTTTACA-3')(配列番号 5)である。</p> <p>1 細胞当たり平均して 1.25 ゲノムコピーの組込みレンチウイルスを生成させる、5 と等しい感染多重度では、CCR5 発現レベルは、$\geq 90\%$ 低減された。これは、レンチウイルスベクターの一部として細胞に形質導入した場合、miR30 CCR5 コード配列(配列番号 1)によって CCR5 mRNA が強力に阻害されたことを示す。</p> <p>結論:miR30 CCR5 コード配列(配列番号 1)は、CCR5 細胞表面発現を低減させるのに強力であり、HIV の治療用レンチウイルスのリード候補である。</p>					
10					
20					
30					
40					
13	配列番号 2	レンチウイルスベクター	マイクロ RNA 配列	Vif タンパク質低減 >80%	リード
<p>ベクター構築:Vif マイクロ RNA を、MWG Operon によって合成された BsrGI および NotI 制限部位を含むオリゴヌクレオチド配列で構築した。オリゴヌクレオチド配列を、EF-1 プロモーターを含む pCDH レンチウイルスベクター (System Biosciences) に挿入した。配列アラインメントお</p>					

【表 2 - 6】

<p>よび合成 miRNA 構築の経験に基づき、miR21 ヘアピン配列を使用して、(5'-CATCTCCATGGCTGTACCACCTTGTCTGGGGGATGTGTACTTCTGAACCTGTGTTGAATCTCATGGAGTTCAGAAGAACACATCCGCACTGACATTTTGGTATCTTTCATCTGACCA-3')(配列番号 2)である合成 miR21 Vif コード配列を構築した。Vif miRNA コード配列は、(5'-GGGATGTGTACTTCTGAACCT-3')(配列番号 6)である。Vif miRNA 標的配列は、(5'-AAGTTCAGAAGTACACATCCC)(配列番号 84)である。</p> <p>miR21Vif の効力に関する機能試験:miR21 Vif コード配列(配列番号 2)をトランスフェクションした後、Vif タンパク質を特定するための抗 Vif モノクローナル抗体を使用した免疫プロット分析によって Vif タンパク質発現を測定することによって、Vif 発現を決定した。</p> <p>結論:miR21 Vif コード配列(配列番号 2)は、免疫プロットデータの定量的画像解析によって決定したところ、対照処置と比較して、Vif タンパク質発現を 10 分の 1 以下に低減させた。これは、miR21 Vif コード配列(配列番号 2)を、本発明者らの治療用レンチウイルスのリード候補として正当化することを証明するのに十分であった。</p>					
14	配列番号 3	レンチウイルスベクタ	マイクロ RNA 配列	Tat RNA 低減 >80%	リード
<p>ベクター構築:Tat マイクロ RNA を、MWG Operon によって合成された BsrGI および NotI 制限部位を含むオリゴヌクレオチド配列で構築した。マイクロ RNA クラスター(配列番号 30-miR30CCR5 miR21Vif miR185 Tat クラスターコード配列)を、EF-1 プロモーターを含む pCDH レンチウイルスベクター(System Biosciences)に挿入した。配列アラインメントおよび合成 miRNA 構築の経験に基づき、miR185 ヘアピン配列を、(5'-GGGCCTGGCTCGAGCAGGGGCGAGGGATTCCGCTTCTTCTGCCATAGCGTGGTCCCCTCCCCTATGGCAGGCAGAAGCGGCACCTTCCCTCCCAATGACCGCGTCTTCGTCG-3')(配列番号 3)である合成 miR185 Tat コード配列の構築のために選択した。Tat miRNA コード配列は、(5'-TCGCTTCTTCTGCCATAG-3')(配列番号 7)である。Tat miRNA 標的配列は、(5'-CTATGGCAGGAAGAAGCGGA-3')(配列番号 85)である。</p> <p>miR185 Tat の効力に関する機能試験:miR30CCR5 miR21Vif miR185Tat クラスターコード配列(配列番号 30)を含む pCDH レンチウイルスベクターをトランスフェクションした後、Tat 発現を、Tat 特異的プライマーを使用した RT-PCR 分析によって Tat mRNA 発現を測定することによって決定した。Tat mRNA 発現をノックダウンする miR185 Tat コード配列(配列番号 3)の能力を、Tat コード配列が miR155 骨格に挿入された同様のマイクロ RNA に対して分析した。</p> <p>結論:miR185 Tat コード配列(配列番号 3)は、Tat miRNA コード配列を含む miR155 骨格の使用と比較して、Tat mRNA の低減がおよそ 2 倍強力であった。したがって、miR185 Tat コード配列(配列番号 3)を、本発明者らの治療用レンチウイルスのリード候補として選択した。</p>					
15	配列番号 30	レンチウイルスベクタ	マイクロ RNA クラスター配列	CCR5 の低減 >90%、Vif タンパク質の低減 >80%、Tat RNA の低減>80%、HIV 複製の>95%の阻害	候補
<p>ベクター構築:miR30CCR5 miR21Vif miR185Tat マイクロ RNA クラスターコード配列(配列番号 30)を、MWG Operon によって合成された BsrGI および NotI 制限部位を含む合成 DNA 断片で構築した。DNA 断片を、EF-1 プロモーターを含む pCDH レンチウイルスベクター(System Biosciences)に挿入した。miR クラスター配列は、(5'-AGGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCGACTGTAAACTGAGCTTGCTCTACTGTGAAGCCACA</p>					

10

20

30

40

【表 2 - 7】

GATGGGTAGAGCAAGCACAGTTTACCGCTGCCTACTGCCTCGGACTTCAAGGGGCTTCCC
GGGCATCTCCATGGCTGTACCACCTTGTTCGGGGGATGTGTACTTCTGAACCTGTGTTGAAT
CTCATGGAGTTTCAGAAGAACACATCCGCACTGACATTTTGGTATCTTTCATCTGACCAGCT
AGCGGGCCTGGCTCGAGCAGGGGGCGAGGGATTCCGCTTCTTCTGCCATAGCGTGGTCC
CCTCCCCTATGGCAGGCAGAAGCGGCACCTTCCCTCCCAATGACCGCGTCTTCGTC-3)(配
列番号 30)であり、試験物質 12、試験物質 13、および試験物質 14 が、EF-1 プロモーターの
制御下で発現させることができる単一のクラスターに組み込まれている。

miR30CCR5 miR21Vif miR185Tat マイクロ RNA クラスターコード配列(配列番号 30)を含むレン
チウイルスベクターAGT103 の効力に関する機能試験:AGT103 ベクターを、細胞表面 CCR5
発現の低減に関するアッセイを使用して、CCR5 に対する効力について試験した(試験物質
12)。AGT103 ベクターを、細胞表面 Vif 発現の低減に関するアッセイを使用して、Vif に対する
効力について試験した(試験物質 13)。AGT103 ベクターを、細胞表面 Tat 発現の低減に関す
るアッセイを使用して、Tat に対する効力について試験した(試験物質 14)。

結論:miRNA クラスターによって CCR5 発現を低減するための効力は、miR30CCR5 単独の場
合に観察された効力と同様であった。miRNA クラスターによって Vif 発現を低減するための効
力は、miR21Vif 単独の場合に観察された効力と同様であった。miRNA クラスターによって Tat
発現を低減するための効力は、miR185Tat 単独の場合に観察された効力と同様であった。
miR30CCR5 miR21Vif miR Vif miR185 Tat マイクロ RNA クラスターコード配列(配列番号 30)
は、細胞表面 CCR5 レベルを低減し、2 つの HIV 遺伝子を阻害するのに強力であった。したが
って、この miRNA クラスターを含む AGT103 を、本発明者らの HIV 機能的治癒プログラムのた
めの治療用ベクター構築物として選択した。

10

20

【 0 2 6 9 】

機能アッセイ。CCR5、Tat、またはVif shRNAコード配列(例えば、配
列番号 1、2 および 3)を含有する個々のレンチウイルスベクター、ならびに、実験の目
的で、CMV 最初期プロモーターの制御下で緑色蛍光タンパク質(GFP)を発現し、A
GT103/CMV-GFP と呼称されるレンチウイルスベクターを、CCR5、Tat
、またはVifの発現をノックダウンする能力について試験した。ポリプレンの存在下ま
たは非存在下のいずれかで、哺乳動物細胞にレンチウイルス粒子を形質導入した。2~4
日後に細胞を収集し、タンパク質およびRNAをCCR5、Tat、またはVifの発現
について分析した。ウェスタンブロットアッセイまたは特異的な蛍光抗体による細胞の標
識(CCR5アッセイ)後、CCR5特異的抗体またはアイソタイプ対照抗体のいずれか
を使用し、改変および非改変細胞の蛍光を比較する分析的フローサイトメトリーによっ
て、タンパク質レベルを試験した。

30

【 0 2 7 0 】

レンチウイルス試験の開始。10% FBSおよび1%ペニシリン-ストレプトマイシ
ンを補充したRPMI 1640を使用してT細胞培養培地を作った。IL-2 10,
000単位/ml、IL-12 1µg/ml、IL-7 1µg/ml、IL-15
1µg/mlのサイトカインストックも事前に調製した。

40

【 0 2 7 1 】

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

【 0 2 7 2 】

0~12日目:抗原特異的濃縮。0日目、凍結保存されたPBMCを解凍し、10分間
1200rpmにて10mlの37培地で洗浄し、 2×10^6 /mlの濃度で37培
地に再懸濁した。この細胞を、24ウェルプレート中0.5ml/ウェルにて、37、
5%CO₂で培養した。最適な刺激条件を定義するために、以下の表3に列挙した試薬
の組み合わせで細胞を刺激した。

【表 3】

表 3

1	2	3	4	5	6
IL-2+IL-12	IL-7+IL-15	ペプチド+ IL-2+IL-12	ペプチド+ IL-7+IL-15	MVA+ IL- 2+IL-12	MVA+ IL- 7+IL-15

【0273】

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

10

【0274】

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

【0275】

12 ~ 24 日目：非特異的拡大増殖およびレンチウイルス形質導入。12 日目、刺激した細胞をピペット操作によりプレートから取り出し、新鮮な T 細胞培養培地に 1×10^6 / ml の濃度で再懸濁した。再懸濁した細胞を T25 培養フラスコに移し、製造元の説明に従い、DYNABEADS（登録商標）Human T-Activator CD3 / CD28 と、それに加えて上記に列挙したサイトカインで刺激した。フラスコを垂直姿勢でインキュベートした。

20

【0276】

14 日目、AGT103 / CMV - GFP を MOI 20 で添加し、培養物を 2 日間インキュベーターに戻した。このとき、細胞をピペット操作により回収し、1300 rpm で 10 分間の遠心分離によって収集し、同じ体積の新鮮培地に再懸濁し、再び遠心分離して緩い細胞ペレットを形成した。この細胞ペレットを、先行ステップで使用したのと同じサイトカインを含む新鮮培地に、1 ml あたりの生存細胞 0.5×10^6 個の細胞で再懸濁した。

【0277】

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

30

【0278】

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

【0279】

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

【0280】

IFN ガンマの細胞内サイトカイン染色により抗原特異的 T 細胞を調査する。ペプチド刺激後または 1×10^6 細胞 / ml のレンチウイルス形質導入後の培養細胞を、培地単独（陰性対照）、Gag ペプチド (5 μg / ml の個々のペプチド)、または PHA (5 μg / ml、陽性対照) で刺激した。4 時間後、BD Golgi Plug（商標）（1 : 1000、BD Biosciences）を添加してゴルジ輸送を遮断した。8 時間後、細胞を洗浄し、製造元の説明に従って BD Cytofix / Cytoperm（商標）キットを用い、細胞外抗体（CD3、CD4 または CD8；BD Biosciences）および細胞内抗体（IFN ガンマ；BD Biosciences）で染色した。BD FACSCalibur（商標）Flow Cytometer で試料を分析した。適切なアイソタイプ適合抗体で標識した対照試料を各実験に含めた。Flow j o s

40

50

ソフトウェアを使用してデータを分析した。

【0281】

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

【0282】

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

10

【0283】

(実施例 3 : HIV の処置のための臨床研究)

AGT103 - T は、AGT103 レンチウイルスベクターも形質導入されている、 $> 1 \times 10^7$ 個の HIV 特異的 CD4 T 細胞を含有する、遺伝子改変された自己 PBMC である。

【0284】

第 I 相臨床試験では、cART を受けている間に、HIV 感染、血液 1 mm^3 あたり CD4 + T 細胞数 > 500 個の細胞、および血漿 1 ml あたり 200 個未満のコピーの安定なウイルス抑制が確認された、成人の研究参加者に、*ex vivo* で改変された自己 CD4 T 細胞 (AGT103 - T) を注入することの安全性および実現可能性を試験する。研究参加者はすべて、第 I 相臨床試験の間、各自の標準的な抗レトロウイルス薬物適用を継続して受けることになる。最大 40 名の研究参加者が、HIV Gag、Pol、および Env タンパク質を発現する組換え改変ワクチニア Ankara (rMVA) の筋肉内注射による 2 用量を 8 週間おいて受ける。第 2 の免疫化の 7 ~ 10 日後、*in vitro* 試験のために血液試料を収集し、HIV-1 Gag ポリタンパク質を代表する重複する合成ペプチドのプールによる刺激に応答する CD4 + T 細胞の頻度を測定する。Gag 特異的 CD4 T 細胞の頻度の測定に基づき、ワクチン応答者のうち上位半数の被験体を遺伝子療法アームに登録し、応答者のうち下位半数の被験体は研究を継続しない。上位の応答者のカットオフは、全 CD4 T 細胞のうち 0.065% の HIV 特異的 CD4 + T 細胞の頻度であることが予測される。本発明者らの試験の遺伝子療法アームに登録された被験体に白血球除去を施し、これに続いて、*ex vivo* で培養し、HIV Gag ペプチドとインターロイキン 2 およびインターロイキン 12 で 12 日間刺激し、次いで CD3 / CD28 二重特異性抗体で修飾されたビーズで再度刺激した、PBMC の精製を行う (Ficoll 密度勾配遠心分離または抗体による陰性選択を使用する)。*ex vivo* 培養中の自己 HIV の出現を防止するため、抗レトロウイルス薬のサキナビルを 100 nM で含める。CD3 / CD28 刺激の 1 日後、1 から 10 の間の感染多重度で AGT103 を細胞に形質導入する。形質導入された細胞をさらに 7 ~ 14 日間培養し、この間それらはポリクローナル増殖によって拡大増殖する。培養期間は、細胞を採取および洗浄し、効力および安全性リリースアッセイのためにアリコートを取っておき、残りの細胞を凍結保存培地に再懸濁することによって終了する。単回用量は、 1×10^{10} 個の自己 PBMC である。効力アッセイは、インターフェロンガンマを発現することによりペプチド刺激に応答する CD4 T 細胞の頻度を測定する。他のリリース基準としては、HIV 特異的であり AGT103 も形質導入されている CD4 T 細胞が 0.5×10^7 個以上生成物に含まれていなければならないことが挙げられる。別のリリース基準は、細胞あたりの AGT103 ゲノムコピー数が 3 を超えてはならないことである。AGT103 - T 注入の 5 日前、被験体は、1 用量のブスルフラム (busulfuram) (または Cytoxan) の馴化レジメンの後、遺伝子改変された CD4 T 細胞を含有する 1×10^{10} 個の PBMC の注入を受ける。

20

30

40

50

【0285】

第ⅠⅠ相研究では、AGT103-T細胞療法の有効度を評価する。第ⅠⅠ相研究の参加者には、本発明者らの第Ⅰ相研究に既に登録しており、遺伝子改変された自己のHIV特異的CD4 T細胞の成功裏かつ安定な生着を有し、有効度評価(1.3.)に記載されるようにモニタリングされるパラメータの肯定的な変化として定義される臨床応答を有すると判断された個体が含まれる。研究参加者は、各自の既存の抗レトロウイルス薬物適用のレジメンにマラビロクを加えるよう求められる。マラビロクは、CCR5レベルの低下を目的とする遺伝子療法の有効性を増強するCCR5アンタゴニストである。マラビロクレジメンが実施されたら、被験体は、それまでの抗レトロウイルス薬物適用のレジメンを中止し、28日間にわたり、または2回の連続した毎週の採血時の血漿中ウイルスRNAレベルが1mlあたり10,000を超えるまで、マラビロク単独療法のみを維持するよう求められる。ウイルス血症が持続的に高い場合、参加者は、各自のHIVケアの医師の推奨に従ってマラビロクありまたはなしで、各自の元の抗レトロウイルス薬物レジメンに戻るよう要請される。

10

【0286】

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

20

【0287】

患者の選択

【0288】

組み入れ基準：

- ・ 年齢18～60歳。
- ・ 研究登録前に記録されたHIV感染。
- ・ 研究期間中に抗レトロウイルス薬物レジメンを変更しないこと(医療上の指示がある場合を除く)を含め、研究により強制される評価に従う意志がなければならない。
- ・ 1立方ミリメートルあたりCD4+T細胞数>500個の細胞(細胞/mm³)
- ・ >400個の細胞/mm³のCD4+T細胞最下点
- ・ HIVウイルス量<1,000コピー/ミリリットル(mL)

30

除外基準：

- ・ 何らかのウイルス肝炎
- ・ 急性HIV感染
- ・ HIVウイルス量>1,000コピー/mL
- ・ 活発または最近(過去6か月)のAIDSを定義する合併症
- ・ 研究登録から12週間以内におけるHIV薬物適用の何らかの変化
- ・ 処置に成功した皮膚の基底細胞癌を除く、少なくとも5年間にわたって寛解していないがんまたは悪性疾患
- ・ NYHAグレード3もしくは4のうっ血性心不全または制御不良の狭心症もしくは不整脈の現在の診断
- ・ 出血障害歴
- ・ 過去30日間の慢性的なステロイドの使用
- ・ 妊娠中または授乳中
- ・ 能動的な薬物またはアルコールの乱用
- ・ 過去30日間の深刻な病気
- ・ 別の臨床試験に現在参加しているか、または何らかの以前の遺伝子療法

40

【0289】

50

安全性評価

- ・ 急性注入反応
- ・ 注入後安全性追跡調査

【0290】

有効度評価 - 第I相

- ・ 改変CD4 T細胞の数および頻度。
- ・ 改変CD4 T細胞の耐久性。
- ・ メモリーT細胞機能の尺度としてのGagペプチド再刺激に対する*in vitro* 応答(ICSアッセイ)。
- ・ ワクチン接種前および後の時点と比較した多機能性の抗HIV CD8 T細胞応答
- ・ *in vitro* 刺激後に二重スプライシングされたHIV mRNAを作るCD4 T細胞の頻度。

【0291】

有効度評価 - 第II相

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

【0292】

AGT103-Tは、 1×10^7 個のHIV特異的CD4 T細胞を含有し、AGT103レンチウイルスベクターも形質導入されている、最大 1×10^{10} 個の遺伝子改変された自己CD4+T細胞からなる。第I相臨床試験では、cARTを受けている間に、HIV感染、血液 1 mm^3 あたりCD4+T細胞数 > 500 個の細胞、および血漿1mlあたり200個未満のコピーの安定なウイルス抑制が確認された、成人の研究参加者において、*ex vivo*で改変された自己CD4 T細胞(AGT103-T)を注入することの安全性および実現可能性を試験する。最大40名の研究参加者が、HIV Gag、Pol、およびEnvタンパク質を発現する組換え改変ワクシニアAnkara(rMVVA)の筋肉内注射による2回の用量を8週間おいて受ける。第2の免疫化の7~10日後、*in vitro*試験のために血液試料を収集し、HIV-1 Gagポリタンパク質を代表する重複する合成ペプチドのプールによる刺激に应答するCD4+T細胞の頻度を測定する。Gag特異的CD4 T細胞の頻度の測定に基づき、ワクチン应答者のうち上位半数の被験体を遺伝子療法アームに登録し、应答者のうち下位半数の被験体は研究を継続しない。上位の应答者のカットオフは、全CD4 T細胞のうち0.065%のHIV特異的CD4+T細胞の頻度であることが予測される。本発明者らの試験の遺伝子療法アームに登録された被験体に白血球除去を施し、CD4+T細胞を陰性選択によって濃縮する。濃縮されたCD4サブセットをCD4陰性サブセットの細胞数の10%と混合して、供給源および抗原提示細胞を提供する。濃縮されたCD4 T細胞をHIV Gagペプチドとインターロイキン2およびインターロイキン12で12日間刺激し、次いで、CD3/CD28二重特異性抗体で修飾されたビーズで再度刺激する。*ex vivo*培養中の自己HIVの出現を防止するため、抗レトロウイルス薬のサキナビルを 100 nM で含める。CD3/CD28刺激の1日後、1から10の間の感染多重度でAGT103を細胞に形質導入する。形質導入された細胞をさらに7~14日間培養し、この間それらはポリクローナル増殖によって拡大増殖する。培養期間は、細胞を採取および洗浄し、効力および安全性リリースアッセイのためにアリコートを取っておき、残りの細胞を凍結保存培地に再懸濁することによって終了する。単回用量は、CD4+T細胞サブセットが濃縮された 1×10^{10} 個の自己細胞である。効力アッセイは、インターフェロンガンマを発現することによりペプチド刺激に应答するCD4 T細胞の頻度を測定する。他のリ

リリース基準としては、HIV特異的でありAGT103も形質導入されているCD4 T細胞が 0.5×10^7 個以上生成物に含まれていなければならないことが挙げられる。別のリリース基準は、細胞あたりのAGT103ゲノムコピー数が3を超えてはならないことである。AGT103-T注入の5日前、被験体は、1用量のブスルファミン（またはCytotaxan）の馴化レジメンの後、 1×10^{10} 個の濃縮され遺伝子改変されたCD4 T細胞の注入を受ける。

【0293】

第II相研究では、AGT103-T細胞療法の有効度を評価する。第II相研究の参加者には、本発明者らの第I相研究に既に登録しており、遺伝子改変された自己のHIV特異的CD4 T細胞の成功裏かつ安定な生着を有し、有効度評価(1.3.)に記載されるようにモニタリングされるパラメータの肯定的な変化として定義される臨床応答を有すると判断された個体が含まれる。研究参加者は、各自の既存の抗レトロウイルス薬物適用のレジメンにマラビロクを加えるよう求められる。マラビロクは、CCR5レベルの低下を目的とする遺伝子療法の有効性を増強するCCR5アンタゴニストである。マラビロクレジメンが実施されたら、被験体は、それまでの抗レトロウイルス薬物レジメンを中止し、28日間にわたり、または2回の連続した毎週の採血時の血漿中ウイルスRNAレベルが1mlあたり10,000を超えるまで、マラビロク単独療法のみを維持するよう求められる。ウイルス血症が持続的に高い場合、参加者は、各自のHIVケアの医師の推奨に従ってマラビロクありまたはなしで、各自の元の抗レトロウイルス薬物レジメンに戻るよう要請される。

10

20

【0294】

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

【0295】

(実施例4：ペプチド刺激前のCD8+T細胞の枯渇によるCD4+T細胞集団の生成)

30

CD8+T細胞過剰成長は、標的CD4+T細胞の拡大増殖に著しい影響を及ぼしたため、CD8+T細胞を、細胞拡大増殖の始めに枯渇させて、それがCD4+T細胞の拡大増殖を改善させることになるか否かを決定した。現行のCD8+T細胞枯渇法では、細胞を磁気カラムに通すことが必要である。その手順が抗原提示細胞およびCD4+T細胞に及ぼす可能性のある影響を回避するために、ペプチド刺激後かつレンチウイルス形質導入前の、細胞が機械的ストレスにより良好に耐えることができる時点で、細胞枯渇を実施した。目的は、CD4+T細胞の最終収量を増加させること、また標的細胞(AGT103レンチウイルスベクターも形質導入したHIV gagタンパク質CD4+T細胞)の収量を増加させることであった。図8は、CD8+T細胞枯渇プロトコルの模式図を示す。CD8+T細胞を枯渇させるために使用される方法は、実施例8に記載されている。

40

【0296】

図9、11、および12に示されているように、CD8+T細胞枯渇は、CD8+T細胞が枯渇されなかった対照処置と比べて、Gag特異的CD4+T細胞のパーセンテージの実質的な増加をもたらした。Gag特異的細胞は、インターフェロン- γ を発現し、標的細胞は、インターフェロン- γ +およびCD4+である(右上象限)。PTID:01-006の場合、CD8+枯渇後、値は、CD8+T細胞が枯渇されなかった対照処置での0.69%と比較して、全T細胞の1.7%であった(図9、15日目GagPeptideの右上象限)。図9を参照して、0日目では、対照の左下象限、右下象限、左上象限、および右上象限は、ペプチド刺激培養(1日)の44.2%、55.3%、0.48%

50

、および0.053%と比較して、それぞれ44.5%、55.5%、0.032%、および0%の蛍光強度を有していた。15日目では、CD8を枯渇させない場合、対照の左下象限、右下象限、左上象限、および右上象限は、それぞれ、79.8%、20.1%、0.12%、および0.018%の蛍光強度を有していた。15日目では、CD8を枯渇させない場合、GagPeptideの左下象限、右下象限、左上象限、および右上象限は、それぞれ、58.9%、19.2%、21.2%、および0.69%の蛍光強度を有していた。15日目では、CD8を枯渇させた場合、対照の左下象限、右下象限、左上象限、および右上象限は、それぞれ、64.4%、35.0%、0.44%、および0.14%の蛍光強度を有していた。15日目では、CD8を枯渇させた場合、GagPeptideの左下象限、右下象限、左上象限、および右上象限は、それぞれ、61.9%、32.9%、3.47%、および1.70%の蛍光強度を有していた。CD8を枯渇させない場合のCD4+T細胞の割合は、CD8+T細胞を枯渇させた場合の35.1%(15日目の対照、右上および右下象限の合計)と比較して、20.1%であった(15日目の対照、右上および右下象限の合計)。本発明者らは、最終産物に存在するCD3+/CD4陰性/CD8陰性細胞の大きな集団がサブクラスV₁のT細胞であると特定した(図10)。したがって、CD8+T細胞の枯渇に加えて、T細胞も欠失させることが必要であり得る。

【0297】

PTID:01-007では、CD8+T細胞枯渇は、標的細胞の収量を、CD8+T細胞が枯渇されなかった対照処置細胞と比べておよそ6倍増加させた(図11)。図11を参照して、0日目では、対照の左下象限、右下象限、左上象限、および右上象限は、それぞれ、33.6%、66.4%、5.9E-4%、および1.78E-3%の蛍光強度を有していた。0日目では(Gagペプチドに曝露された16時間後)、GagPeptideの左下象限、右下象限、左上象限、および右上象限は、それぞれ、33.7%、66.3%、0.011%、および0.016%の蛍光強度を有していた。15日目では、CD8を枯渇させない場合、対照の左下象限、右下象限、左上象限、および右上象限は、それぞれ、78.4%、21.2%、0.30%、および0.018%の蛍光強度を有していた。15日目では、CD8を枯渇させない場合、GagPeptideの左下象限、右下象限、左上象限、および右上象限は、それぞれ、76.3%、20.2%、2.95%、および0.61%の蛍光強度を有していた。15日目では、CD8を枯渇させた場合、対照の左下象限、右下象限、左上象限、および右上象限は、それぞれ、50.9%、48.7%、0.36%、および0.10%の蛍光強度を有していた。15日目では、CD8を枯渇させた場合、GagPeptideの左下象限、右下象限、左上象限、および右上象限は、それぞれ、51.6%、44.4%、0.43%、および3.60%の蛍光強度を有していた。

【0298】

PTID:01-008では、CD8+T細胞の枯渇は、標的細胞の収量を、CD8+T細胞が枯渇されなかった対照処置細胞と比較しておよそ3倍増加させた(図12)。図12を参照して、0日目では、対照の左下象限、右下象限、左上象限、および右上象限は、それぞれ、65.4%、34.5%、0.096%、および7.71E-4%の蛍光強度を有していた。0日目では、GagPeptideの左下象限、右下象限、左上象限、および右上象限は、それぞれ、65.4%、34.3%、0.20%、および0.10%の蛍光強度を有していた。15日目では、CD8を枯渇させない場合、対照の左下象限、右下象限、左上象限、および右上象限は、それぞれ、87.9%、12.1%、0.028%、および6.24E-3%の蛍光強度を有していた。15日目では、CD8を枯渇させない場合、GagPeptideの左下象限、右下象限、左上象限、および右上象限は、それぞれ、82.3%、12.1%、5.38%、および0.23%の蛍光強度を有していた。16日目では、CD8を枯渇させた場合、対照の左下象限、右下象限、左上象限、および右上象限は、それぞれ、87.8%、12.0%、0.22%、および0.013%の蛍光強度を有していた。16日目では、CD8を枯渇させた場合、GagPeptide

の左下象限、右下象限、左上象限、および右上象限は、それぞれ、87.8%、11.1%、0.30%、および0.78%の蛍光強度を有していた。PTID: 01-008では、プロセスの終了時に存在する夾雑細胞は、CD3+/CD4陰性/CD56+であると特定された。これは、それらがNK細胞である可能性が最も高いことを意味する(図13)。

【0299】

まとめると、これらのデータは、CD8+T細胞枯渇が、HIV+患者PBMC試料中のGag応答性CD4+T細胞を増加させる一貫した効果を有していたことを示す。

【0300】

(実施例5: CD8細胞枯渇は、Gag特異的CD4+T細胞のパーセンテージを増加させたが、V1細胞およびCD56+NK細胞の増大は、標的細胞集団の成長を妨害した)

PTID: 01-006では、実施例8に記載のプロトコールを使用したCD8+T細胞枯渇は、50%未満のCD4+T細胞であり、V1+T細胞の増大を含んでいた最終産物をもたらした(図10)。この結果は、CD8+T細胞およびV1+T細胞の両方の枯渇が、CD4+T細胞の収量を増加させることができ、標的細胞の収量も増加させることができることを示唆する。リンパ球のゲート制御データは、77.6%の蛍光強度を示した(図10の最も左側のグラフ)。CD3発現のパラメーターを使用すると、蛍光強度は75.3%であった(図10の中央左側のグラフ)。CD4発現のパラメーターを使用して、4つ別々の象限の蛍光を測定した(図10の中央グラフ)。左下象限は、45.3%(上限値)および45.5%(下限値)の蛍光強度を示した。右下象限は、44.9%の蛍光強度を示した。左上象限は、9.26%の蛍光強度を示した。左下象限は、0.35%の蛍光強度を示した。PANのパラメーターを使用すると、蛍光強度は73.8%であった(図10の中央右側のグラフ)。V1のパラメーターを使用して、4つ別々の象限の蛍光を測定した。左下象限は、16.9%の蛍光強度を示した。右下象限は、82.8%の蛍光強度を示した。左上象限は、0.14%の蛍光強度を示した。右上象限は、0.12%の蛍光強度を示した。

【0301】

PTID: 01-008では、CD8+T細胞の枯渇は、CD4+T細胞の低収量をもたらした。それは、CD56+NK細胞の拡大増殖による可能性が高かった(図13)。CD3およびCD4を変数として使用した左側グラフの蛍光強度は、83.1%の細胞がCD3発現およびCD4発現の両方に陰性であり、NK細胞である可能性が最も高いと画定した。CD56を変数として使用した右側グラフの蛍光強度は、65.7%であった。それらの拡大増殖により、CD56+NK細胞は、培養培地にてCD4+T細胞と競合した。この結果は、CD56+NK細胞の日常的な枯渇が、CD4+T細胞の製造における別の重要なステップであり得ることを示唆する。

【0302】

(実施例6: 様々な枯渇プロトコールを使用したCD4+T細胞の集団の生成)

CD8+T細胞枯渇は単独でV1およびCD56+NK細胞の増大をもたらしたため、様々な枯渇プロトコールを開発した。CD8+T細胞、CD56+NK細胞、CD19+B細胞、および細胞を全て枯渇させた枯渇プロトコールを開発した。このスキームのフロー図は図14に示されている。

【0303】

図15は、「未枯渇」対照; CD8+T細胞枯渇; CD8+T細胞およびT細胞枯渇; ならびにCD8+T細胞、T細胞、およびB細胞枯渇を含む、様々な細胞枯渇戦略の比較を示す。標的細胞は、インターフェロン-ガンマのその後の細胞内蓄積によるペプチド再刺激に対するそれらの応答により特定した。ex vivo試料は、CD4+であり、HIV gagペプチドに対する応答に特異的であった全T細胞の0.055%を含んでいた。実施例8の細胞枯渇のプロトコールを使用して、異なるファクターの細胞を枯渇させた。手短に述べれば、細胞をPBMC+Gagペプチドと共に18時間培養し、

続いて細胞枯渇を行った（または「未枯渇」対照）。細胞枯渇後、細胞をさらに12日間培養し、その間細胞には、IL-7およびIL-15サイトカインを定期的に給送して補完した。CD8+T細胞、T細胞、およびCD19+B細胞の枯渇は、標的細胞（CD4+T細胞およびインターフェロン-ガンマ+細胞）の最も高い収量をもたらした（図15）。

【0304】

図15を参照して、0日目では、対照の左下象限、右下象限、左上象限、および右上象限は、それぞれ、56.4%、43.5%、0.034%、および 7.44×10^{-4} %の蛍光強度を有していた。0日目では、GagPeptideの左下象限、右下象限、左上象限、および右上象限は、それぞれ、54.8%、44.8%、0.30%、および0.055%の蛍光強度を有していた。18時間後では、枯渇させなかった場合、対照の左下象限、右下象限、左上象限、および右上象限は、それぞれ、83.9%、16.0%、0.061%、および0.027%の蛍光強度を有していた。18時間後では、枯渇させなかった場合、GagPeptideの左下象限、右下象限、左上象限、および右上象限は、それぞれ、77.6%、15.4%、6.39%、および0.54%の蛍光強度を有していた。18時間後では、CD8を枯渇させた場合、対照の左下象限、右下象限、左上象限、および右上象限は、それぞれ、41.9%、57.9%、0.094%、および0.099%の蛍光強度を有していた。18時間後では、CD8を枯渇させた場合、GagPeptideの左下象限、右下象限、左上象限、および右上象限は、それぞれ、43.3%、50.7%、3.00%、および2.98%の蛍光強度を有していた。18時間後では、CD8およびT細胞を枯渇させた場合、対照の左下象限、右下象限、左上象限、および右上象限は、それぞれ、40.4%、59.3%、0.12%、および0.13%の蛍光強度を有していた。18時間後では、CD8およびT細胞を枯渇させた場合、GagPeptideの左下象限、右下象限、左上象限、および右上象限は、それぞれ、38.3%、54.7%、3.14%、および3.86%の蛍光強度を有していた。18時間後では、CD8、T細胞、およびB細胞を枯渇させた場合、対照の左下象限、右下象限、左上象限、および右上象限は、それぞれ、46.2%、53.6%、0.13%、および0.080%の蛍光強度を有していた。18時間後では、CD8、T細胞、およびB細胞を枯渇させた場合、GagPeptideの左下象限、右下象限、左上象限、および右上象限は、それぞれ、42.1%、48.5%、4.28%、および5.06%の蛍光強度を有していた。

【0305】

図16は、「未枯渇」対照；CD8+T細胞枯渇；ならびにCD8+T細胞、CD56+NK細胞、T細胞、およびB細胞を含む4細胞型の枯渇を含む、様々な細胞枯渇戦略の比較を示す。4細胞型の枯渇後、CD4+T細胞/インターフェロン-ガンマ+標的細胞の収量の実質的な増加が観察された。

【0306】

図16を参照して、0日目では、対照の左下象限、右下象限、左上象限、および右上象限は、それぞれ、42.6%、57.4%、 2.71×10^{-3} %、および0.0%の蛍光強度を有していた。0日目では、GagPeptideの左下象限、右下象限、左上象限、および右上象限は、それぞれ、42.5%、57.4%、0.031%、および0.048%の蛍光強度を有していた。18時間後では、枯渇させなかった場合、対照の左下象限、右下象限、左上象限、および右上象限は、それぞれ、79.5%、20.5%、0.017%、および 9.73×10^{-3} %の蛍光強度を有していた。18時間後では、枯渇させなかった場合、GagPeptideの左下象限、右下象限、左上象限、および右上象限は、それぞれ、78.9%、19.5%、0.93%、および0.65%の蛍光強度を有していた。18時間後では、CD8を枯渇させた場合、対照の左下象限、右下象限、左上象限、および右上象限は、それぞれ、51.4%、48.4%、0.11%、および0.063%の蛍光強度を有していた。18時間後では、CD8を枯渇させた場合、GagPeptideの左下象限、右下象限、左上象限、および右上象限は、それぞれ、51.7%、43.0%、0.22%、および5.03%の蛍光強度を有していた。18時間後では、CD

8、CD56、
、およびBを枯渇させた場合、刺激しなかった細胞の左下象限、右下象限、左上象限、および右上象限は、それぞれ、12.8%、87.0%、0.14%、および0.10%の蛍光強度を有していた。18時間後では、CD8、CD56、
、およびBを枯渇させた場合、GagPepMixの左下象限、右下象限、左上象限、および右上象限は、それぞれ、13.2%、79.4%、0.27%、および7.17%の蛍光強度を有していた。

【0307】

(実施例7：4種細胞枯渇プロトコールを使用したCD4+T細胞の集団の生成)

図17は、CD8+T細胞、CD56+NK細胞、CD19+B細胞、および
T細胞を枯渇させる、4種細胞枯渇を使用した実験のためのフロー図を示す。LV-GFP代
用ウイルスベクターを使用して、細胞で形質導入する。このベクターは、AGT103に
対して同一の細胞向性を有するが、形質導入効率を容易に評価することができるように、
緑色蛍光タンパク質マーカーを発現する。T細胞を、CD3/CD28ビーズで刺激して
、形質導入効率を増加させた。インターフェロン-ガンマ発現を測定するアッセイを使用
して、複数の細胞サブセットでの形質導入効率を測定した。

10

【0308】

図18に示されているように、効率的なレンチウイルス形質導入には、ペプチド刺激の
みを行い、続いて競合する細胞を枯渇させることのみで十分であり、効率は、CD4+/
Gag特異的標的細胞が最も高かった。この典型的な結果では、標的細胞の68%には、
LV-GFPベクターが形質導入されていた。図18を参照すると、中央のグラフでは、
右下象限(68.6%蛍光)および右上象限(12.6%蛍光)は、それぞれ41.5%
(右下グラフ)および67.8%(右上グラフ)のGFP形質導入効率を有していた。こ
れは、それぞれ35.6%(左下グラフ)および43.3%(左上グラフ)のGFP形質
導入効率を有していた中央グラフの左下象限(9.75%蛍光)および左上象限(2.4
6%蛍光)とは対照的である。

20

【0309】

(実施例8：細胞枯渇の実験室プロトコール)

0日目：HIV陽性参加者の静脈血に由来するおよそ 1×10^7 個の生存可能な末梢血
単核細胞(PBMC)を、24ウェルプレート中に5%ヒト血清(Gemini Bio
Products、West Sacramento、CA)、10ng/mL IL
7/IL15(Miltenyi Biotec、Auburn、CA)、および100
nMサキナビル(NIH AIDS Reagent Program、Germant
own、MD)を含む1mLのTexMACS GMP培地(Miltenyi Bio
tec、Auburn、CA)で培養した。細胞を、37
で16~18時間1μg/mL
PepMix HIV-1(GAG)Ultra(JPT Peptide Tec
hnologies、Berlin、Germany)と共にインキュベートした。1μ
g/mLは、最終刺激条件での各々の個々のペプチドの濃度であった。

30

【0310】

1日目：16~18時間のインキュベーション後、製造元の説明に従って、CD8、C
D56、CD19、および/または
細胞を、PE抗ヒトCD8 Abクローンsk1
(BioLegend、San Diego、CA)、PE抗ヒトCD56 Abクロー
ン5.1H11(BioLegend、San Diego、CA)、PE抗ヒトCD1
9 AbクローンHIB19(BioLegend、San Diego、CA)、およ
びPE抗ヒトTCR AbクローンB1(BioLegend、San Diego、
CA)、および抗PEマイクロビーズ(例えば、抗PEマイクロビーズUltroPur
e、Miltenyi Biotec、Auburn、CA)で枯渇させた。細胞を、氷
上にて10分間PEコンジュゲート抗体で染色した。標識細胞を、抗PEマイクロビーズ
で15分間氷上にて洗浄およびインキュベートし、次いで磁場で分離した。この場合、標
的の表面タンパク質を発現する細胞はカラムに保持され、未標識(陰性選択された)細胞は
通過して、収集された。およそ 1×10^6 個の生存可能な陰性選択されたPBMCを、5

40

50

%ヒト血清、10 ng/mL IL7/IL15、および100 nMサキナビルを含む0.5 mLのTexMACS GMP培地に播種した。

【0311】

2日目：細胞に、GFPを有するレンチウイルスベクターを5~10のMOIで形質導入した。

【0312】

4日目：細胞に、5%ヒト血清、20 ng/mL IL7/IL15（最終10 ng/mL）、および200 nMサキナビル（最終100 nM）を含む0.5 mLのTexMACS GMP培地を給送した。

【0313】

7日目：細胞に、5%ヒト血清、20 ng/mL IL7/IL15（最終10 ng/mL）、および200 nMサキナビル（最終100 nM）を含む1 mLのTexMACS GMP培地を給送した。

【0314】

10日目：ウェルの底部にある細胞塊を含む細胞をよく混合した。混合後、細胞の容積全体を12ウェルプレートに移した。次いで、細胞に、5%ヒト血清、20 ng/mL IL7/IL15（最終10 ng/mL）、および200 nMサキナビル（最終100 nM）を含む2 mLのTexMACS GMP培地を給送した。

【0315】

14~16日目：細胞計数を実施し、細胞をペプチド刺激アッセイで刺激した。1×10⁶個の拡大増殖された細胞を、96ウェルプレート中で4時間にわたって、1 μg/mL PepMix HIV-1 (GAG) Ultraを用いずにまたは用いて刺激した。

【0316】

細胞内IFN- γ を検出するために、タンパク質輸送阻害剤Golgi Plug（プレフェルジンAを含む）（BD Biosciences, San Jose, CA）を添加した。細胞を、FITC抗ヒトCD3 AbクローンOKT3、PE抗ヒトCD4 AbクローンOKT4、およびPerCP抗ヒトCD8 AbクローンSK1で染色した。染色後、細胞を固定し、透過処理し、APC抗ヒトIFN- γ クローンB27を用いて45分間4℃にてインキュベートした。細胞内染色溶液は、Cytotoxicity/Cytopeptide Kit（BD Biosciences, San Jose, CA）から得た。

【0317】

GFP発現を分析して、HIV特異的CD4⁺T細胞の形質導入効率を決定した。IFN- γ 分泌アッセイ細胞濃縮および検出キット（PE）（Miltenyi Biotec, Auburn, CA）を製造元の説明に従って使用して、IFN- γ 分泌細胞を検出した。細胞を、IFN- γ 捕捉試薬で5分間氷上にて標識した。標識細胞を、ゆっくりと連続的に回転させながら45分間37℃にて閉管中でインキュベートし、次いでPE抗IFN- γ 検出Ab、PerCP抗ヒトCD3 AbクローンOKT3、およびAPC抗ヒトCD4 AbクローンOKT4で染色した。

【0318】

データは、FACSCaliburフローサイトメーター（BD Biosciences, San Jose, CA）を使用して、各試料に由来する少なくとも1×10⁵リンパ球について取得した（前方および側方散乱プロファイルに基づいてゲート制御した）。試料は全て、FlowJoソフトウェア（FlowJo 10.1r1, Tree Star, San Carlos, CA）を使用して分析した。

【0319】

（実施例9：細胞枯渇の商業的プロトコール）

AGT103-Tを製造するための商業型のプロトコールでは、PBMC精製、ペプチド刺激、および細胞枯渇を上記に記載のように実施し、2日間培養してから、総培養液（200 mL）を、IL-7およびIL-15サイトカインを含むおよそ5リットルの培養培地を含むGREX 500M静置培養フラスコまたは攪拌がないかもしくは最小限であ

10

20

30

40

50

る細胞培養用の類似の容器に移した。充填したフラスコを37℃にて5%CO₂で7日間
 攪拌せずにインキュベートし、次いで全量を収集し、細胞を洗浄し、1mL当たりおよそ
 1×10⁸個の総有核細胞で凍結保存溶液に再懸濁し、次いで凍結させ、液体N₂の気相
 に保管した。静的相培養を含めることにより、標的細胞の収量がさらに増加する。これは
 、この細胞サブセットが壊れやすく、非静的培養システムの機械的収集および/または培
 養攪拌中に枯渇しやすいことが、実験室研究で実証されているためである。

配列

本明細書では、以下の配列が参照される。

【表4-1】

配列 番号	説明	配列
1	miR30 CCR5 コード配列	AGGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCGACTGTAAGCTGAGCTTGCT CTACTGTGAAGCCACAGATGGGTAGAGCAAGCACAGTTTACCGC TGCTACTGCCTCGGACTTCAAGGGGCTT
2	miR21 Vif コード配列	CATCTCCATGGCTGTACCACCTTGTCTGGGGGATGTGTACTTCTGA ACTTGTGTTGAATCTCATGGAGTTCAGAAGAACACATCCGCACT GACATTTTGGTATCTTTCATCTGACCA
3	miR185 Tat コード配列	GGGCCTGGCTCGAGCAGGGGGCGAGGGATTCCGCTTCTTCCTGC CATAGCGTGGTCCCCTCCCCTATGGCAGGCAGAAGCGGCAC CTTCCCCTCCAATGACCGCGTCTTCGTCG
4	伸長因子-1 アルファ(EF1 -アルファ) プロモーター	CCGGTGCCTAGAGAAGGTGGCGCGGGTAAACTGGGAAAGTGA TGTCGTGTACTGGCTCCGCTTTTTCCCGAGGGTGGGGGAGAACC GTATATAAGTGCAGTAGTCGCCGTGAACGTTCTTTTTCGCAACGG GTTTGCCGCCAGAACACAGGTAAGTGCCGTGTGTGGTTCCCGCG GGCCTGGCCTCTTACGGGTTATGGCCCTTGCCTGCCTTGAATTA CTTCCACGCCCTGGCTGCAGTACGTGATTCTTGATCCCGAGCTT CGGGTTGGAAGTGGGTGGGAGAGTTCGAGGCCTTGCCTTAAGG AGCCCCTTCGCCTCGTGCTTGAGTTGAGGCCTGGCCTGGGCGCTG GGGCCGCCGCGTGCGAATCTGGTGGCACCTTCGCGCCTGTCTCGC TGCTTTCGATAAGTCTCTAGCCATTTAAAATTTTTGATGACCTGC TGCGACGCTTTTTTCTGGCAAGATAGTCTTGAAATGCGGGCCA AGATCTGCACACTGGTATTTCCGGTTTTTGGGGCCGCGGGCGGCG ACGGGGCCCGTGCCTCCAGCGCACATGTTCCGGCGAGGCGGGGC CTGCGAGCGCGGCCACCGAGAATCGGACGGGGGTAGTCTCAAGC TGGCCGGCCTGCTCTGGTGCCTGGCCTCGCGCCGCGTGTATCGC CCCGCCCTGGGCGGCAAGGCTGGCCCGGTCCGGCACCAAGTTGCGT GAGCGGAAAGATGGCCGCTTCCCGGCCCTGCTGCAGGGAGCTCA AAATGGAGGACGCGGCGCTCGGGAGAGCGGGCGGGTGGAGTCA CCACACAAAGGAAAAGGGCCTTCCGTCCTCAGCCGTCGCTTCA TGTGACTCCACGGAGTACCGGGCGCCGTCCAGGCACCTCGATTA GTTCTCGAGCTTTTTGGAGTACGTCGTCTTTAGGTTGGGGGGAGGG GTTTTATGCGATGGAGTTTCCCCACACTGAGTGGGTGGAGACTG AAGTTAGGCCAGCTTGGCACTTGATGTAATTCTCCTTGGAAATTTG CCCTTTTTGAGTTTGGATCTTGGTTTCATTCTCAAGCCTCAGACAG TGGTTCAAAGTTTTTTTTCTTCCATTTCAAGGTGTCGTGA
5	CCR5 miRNA 標的配列	GAGCAAGCTCAGTTTACA
6	Vif miRNA	GGGATGTGTAAGTTTCTGAACTT

10

20

30

40

【表 4 - 2】

	コード配列	
7	Tat miRNA コード配列	TCCGCTTCTTCCTGCCATAG
8	TAR デコイ配列	CTTGCAATGATGTCGTAATTTGCGTCTTACCTCGTTCTCGACAGC GACCAGATCTGAGCCTGGGAGCTCTCTGGCTGTCAGTAAGCTGG TACAGAAGGTTGACGAAAATTCTTACTGAGCAAGAAA
9	Rev/Tat shRNA 標的配列 #1	GCGGAGACAGCGACGAAGAGC
10	Rev/Tat shRNA コード配列 #1	GCGGAGACAGCGACGAAGAGCTTCAAGAGAGCTCTTCGTCGCTG TCTCCGCTTTTT
11	Gag shRNA 標的配列	GAAGAAATGATGACAGCAT
12	Gag shRNA コード配列	GAAGAAATGATGACAGCATTTC AAGAGAATGCTGTCATCATTTC TTCTTTTT
13	Pol shRNA 標的配列	CAGGAGCAGATGATACAG
14	Pol shRNA コード配列	CAGGAGATGATACAGTTCAAGAGACTGTATCATCTGCTCCTGTTT TT
15	CCR5 shRNA 標的配列 #1	GTGTCAAGTCCAATCTATG
16	CCR5 shRNA コード配列 #1	GTGTCAAGTCCAATCTATGTTCAAGAGACATAGATTGGACTTGA CACTTTTT
17	CCR5 shRNA 標的配列 #2	GAGCATGACTGACATCTAC
18	CCR5 shRNA コード配列 #2	GAGCATGACTGACATCTACTTCAAGAGAGTAGATGTCAGTCATG CTCTTTTT
19	CCR5 shRNA 標的配列 #3	GTAGCTCTAACAGGTTGGA
20	CCR5 shRNA コード配列 #3	GTAGCTCTAACAGGTTGGATTCAAGAGATCCAACCTGTTAGAGC TACTTTTT
21	CCR5 shRNA 標的配列 #4	G TTCAGAAACTACCTCTTA
22	CCR5 shRNA コード配列 #4	G TTCAGAAACTACCTCTTATTCAAGAGATAAGAGGTAGTTTCTGA ACTTTTT
23	CCR5 shRNA 標的配列 #5	GAGCAAGCTCAGTTTACACC
24	CCR5 shRNA コード配列	GAGCAAGCTCAGTTTACACCTTCAAGAGAGGTGTA AACTGAGCT TGCTTTTT

10

20

30

40

【表 4 - 3】

	#5		
25	Homo sapiens CCR5 mRNA 標的配列 1	ATGGATTATCAAGTGTCAAGTCCAATCTATGACATCAATTATTAT ACATCGGAGCCCTGCCAAAAAATCAATGTGAAGCAAATCGCAGC CCGCCTCTGCCTCCGCTCTACTCACTGGTGTTCATCTTTGGTTTT GTGGGC	
26	Homo sapiens CCR5 mRNA 標的配列 2	AACATGCTGGTCATCCTCATCCTGATAAACTGCAAAAGGCTGAA GAGCATGACTGACATCTACCTGCTCAACCTGGCCATCTCTGACCT GTTTTTCCTTCTTACTGTCCCCTTCTGGGCTCACTATGCTGCCGCC CAGTGGGACTTTGGAATAACAATGTGTCAACTCTTGACAGGGCT CTATTTTATAGGCTTCTTCTCTGGAATCTTCTTCATCATCCTCCTG ACAATCGATAGGTACCTGGCTGTCGTCCATGCTGTGTTTGCTTTA AAAGCCAGGACGGTCACTTTGGGGTGGTGACAAGTGTGATCAC TTGGGTGGTGGCTGTGTTGCGTCTCTCCAGGAATCATCTTTAC CAGATCTCAAAAAGAAGGTCTTCATTACACCTGCAGCTCTCATTT TCCATACAGTCAGTATCAATTCTGGAAGAATTTCCAGACATTA GATAGTCATCTTGGGGCTGGTCCTGCCGCTGCTTGTGATGGTCAT CTGCTACTCGGGAATCCTAAAACTCTGCTTCGGTGTGAAATGA GAAGAAGAGGCACAGGGCTGTGAGGCTTATCTTCACCATCATGA TTGTTTATTTTCTTCTGCGGCTCCCTACAACATTGTCTTCTCTCT GAAC	10
27	Homo sapiens CCR5 mRNA 標的配列 3	ACCTTCCAGGAATTTCTTTGGCCTGAATAATTGCAGTAGCTCTAAC AGGTTGGACCAAGCTATGCAGGTGA	20
28	Homo sapiens CCR5 mRNA 標的配列 4	CAGAGACTCTTGGGATGACGCACTGCTGCATCAACCCCATCATCT ATGCCTTTGTCGGGGAGAAGTTTCAGAACTACCTCTTAGTCTTCT TCCAAAAGCACATTGCCAAACGCTTCTGCAAATGCTGTTCTATTT TCCAG	
29	Homo sapiens CCR5 mRNA 標的配列 5	CAAGAGGCTCCCGAGCGAGCAAGCTCAGTTTACACCCGATCCAC TGGGGAGCAGGAAATATCTGTGGGCTTGTGA	
30	miR30- CCR5/miR21- Vif/miR185 Tat マイクロRNA クラスター コード配列	AGGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCGACTGTAACTGAGCTTGCT CTACTGTGAAGCCACAGATGGGTAGAGCAAGCACAGTTTACCGC TGCTACTGCCTCGGACTTCAAGGGGCTTCCCGGGCATCTCCATG GCTGTACCACCTTGTGCGGGGATGTGTACTTCTGAACTTGTGTTG AATCTCATGGAGTTCAGAAGAACACATCCGCACTGACATTTTGG TATCTTTCATCTGACCAGCTAGCGGGCCTGGCTCGAGCAGGGGG CGAGGGATTCCGCTTCTTCCCTGCCATAGCGTGGTCCCCTCCCCTA TGGCAGGCAGAAGCGGCACCTTCCCTCCCAATGACCAGCGTCTTC GTC	30
31	長鎖 WPRE 配列	AATCAACCTCTGGATTACAAAATTTGTGAAAGATTGACTGGTATT CTTAACTATGTTGCTCCTTTTACGCTATGTGGATACGCTGCTTTAA TGCCTTTGTATCATGCTATTGCTTCCCGTATGGCTTTCATTTTCTC CTCCTTGTATAAATCCTGGTTGCTGTCTTTATGAGGAGTTGTG GCCCGTTGTCAGGCAACGTGGCGTGGTGTGCACTGTGTTTGCTGA CGCAACCCCACTGGTTGGGGCATTGCCACCACCTGTCAGCTCCT TTCCGGGACTTTTCGCTTTCCTCCCTCCTATTGCCACGGCGGAACT CATCGCCGCTGCTTGGCCGCTGCTGGACAGGGGCTCGGCTGTT GGGCACTGACAATCCGTGGTGTGTCGGGGAAATCATCGTCTT TCTTGGCTGCTCGCTGTGTTGCCACCTGGATTCTGCGCGGGAC GTCCTTCTGCTACGCTCCCTTCGGCCCTCAATCCAGCGGACCTTCC TTCCCGCGGCTGCTGCCGGCTCTGCGGCCTCTTCCGCGTCTTCG	40

【表 4 - 4】

		CCTTCGCCCTCAGACGAGTCGGATCTCCCTTTGGGCCGCCTCCCC GCCT	
32	伸長因子-1 アルファ(EF1- アルファ) プロモーター miR30CCR5; miR21Vif; miR185 Tat クラスター コード配列	CCGGTGCCTAGAGAAGGTGGCGCGGGTAAACTGGGAAAGTGA TGTCGTGTACTGGCTCCGCCTTTTTCCCGAGGGTGGGGGAGAACC GTATATAAGTGCAGTAGTCGCCGTGAACGTTCTTTTTCGCAACGG GTTTGCCGCCAGAACACAGGTAAGTGCCGTGTGTGGTTCCCGCG GGCCTGGCCTCTTTACGGGTTATGGCCCTTGCCTGCCTTGAATTA CTTCCACGCCCTGGCTGCAGTACGTGATTCTTGATCCCGAGCTT CGGTTGGAAGTGGGTGGGAGAGTTCGAGGCCTTGCCTTAAGG AGCCCCTTCGCCTCGTGCTTGAGTTGAGGCCTGGCCTGGGCGCTG GGGCCGCCCGTGC GAATCTGGTGGCACCTTCGCGCCTGTCTCGC TGCTTTTCGATAAGTCTCTAGCCATTTAAAATTTTTGATGACCTGC TGCGACGCTTTTTTTCTGGCAAGATAGTCTTGTAATGCGGGCCA AGATCTGCACACTGGTATTTTCGGTTTTTTGGGGCCGCGGGCGGCG ACGGGGCCCGTGCCTCCAGCGCACATGTTGCGGCGAGGCGGGGC CTGCGAGCGCGGCCACCAGAAATCGGACGGGGGTAGTCTCAAGC TGGCCGGCCTGCTCTGGTGCCTGGCCTCGCGCCGCCGTGTATCGC CCCGCCCTGGGCGGCAAGGCTGGCCCGGTCGGCACCAGTTGCGT GAGCGGAAAGATGGCCGCTTCCCAGCCCTGCTGCAGGGAGCTCA AAATGGAGGACGCGGCGCTCGGGAGAGCGGGCGGGTGGAGTAC CCACACAAAGGAAAAGGGCCTTTCCGTCTCAGCCGTCGCTTCA TGTGACTCCACGGAGTACCGGGCGCCGTCCAGGCACCTCGATTA GTTCTCGAGCTTTTGGAGTACGTCGCTTTAGGTTGGGGGGAGGG GTTTTATGCGATGGAGTTTCCCACACTGAGTGGGTGGAGACTG AAGTTAGGCCAGCTTGGCACTTGATGTAATTCTCCTTGGAAATTTG CCCTTTTTGAGTTTGGATCTTGGTTCATTCTCAAGCCTCAGACAG TGGTTCAAAGTTTTTTCTTCCATTTAGGTGTCGTGATGTACA AGGTATATTGCTGTTGACAGTGGGAGGACTGTAAGTGGAGCTTGCT CTACTGTGAAGCCACAGATGGGTAGAGCAAGCACAGTTTACCGC TGCTACTGCCTCGGACTTCAAGGGGCTTCCCAGGCATCTCCATG GCTGTACCACCTTGTGCGGGGATGTGTACTTCTGAACTTGTGTTG AATCTCATGGAGTTCAGAAGAACACATCCGCACTGACATTTTGG TATCTTTCATCTGACCAGCTAGCGGGCCTGGCTCGAGCAGGGGG CGAGGGATTCCGCTTCTTCCCTGCCATAGCGTGGTCCCCTCCCCTA TGGCAGGCAGAAGCGGCACCTTCCCCTCCAATGACCGCGTCTTC GTC	10 20 30
33	ラウス肉腫 ウイルス(RSV) プロモーター	GTAGTCTTATGCAATACTCTTGTAGTCTTGCAACATGGTAACGAT GAGTTAGCAACATGCCTTACAAGGAGAGAAAAGCACCCGTGCAT GCCGATTGGTGGAAAGTAAGGTGGTACGATCGTGCTTATTAGGA AGGCAACAGACGGGTCTGACATGGATTGGACGAACCACTGAATT GCCGCATTGCAGAGATATTGTATTTAAGTGCCTAGCTCGATACAA TAAACG	
34	5' Long 末端反復配列 (LTR)	GGTCTCTCTGGTTAGACCAGATCTGAGCCTGGGAGCTCTCTGGCT AACTAGGGAACCCACTGCTTAAGCCTCAATAAAGCTTGCCTTGA GTGCTTCAAGTAGTGTGTGCCCGTCTGTTGTGTGACTCTGGTAAC TAGAGATCCCTCAGACCCTTTTAGTCAGTGTGGAAAATCTCTAGC A	40
35	Psi パッケージ ジンゲシグナル	TACGCCAAAAATTTTACTAGCGGAGGCTAGAAGGAGAGAG	
36	Rev 応答 エレメント(RRE)	AGGAGCTTTGTTCTTGGGTTCTTGGGAGCAGCAGGAAGCACTA TGGGCGCAGCCTCAATGACGCTGACGGTACAGGCCAGACAATTA TTGTCTGGTATAGTGCAGCAGCAGAACAATTTGCTGAGGGCTATT GAGGCGCAACAGCATCTGTTGCAACTCACAGTCTGGGGCATCAA	

【表 4 - 5】

		GCAGCTCCAGGCAAGAATCCTGGCTGTGGAAAGATACCTAAAGG ATCAACAGCTCC
37	中心ポリプリ ントラクト (cPPT)	TTTTAAAAGAAAAGGGGGGATTGGGGGGTACAGTGCAGGGGAA AGAATAGTAGACATAATAGCAACAGACATACAAATAAAGAATT ACAAAAACAAATTACAAAATTCAAAATTTTA
38	3'デルタLTR	TGGAAGGGCTAATTCACTCCCAACGAAGATAAGATCTGCTTTTTG CTTGTACTGGGTCTCTCTGGTTAGACCAGATCTGAGCCTGGGAGC TCTCTGGCTAACTAGGGAACCCACTGCTTAAGCCTCAATAAAGCT TGCCTTGAGTGCTTCAAGTAGTGTGTGCCCGTCTGTTGTGTGACT CTGGTAACTAGAGATCCCTCAGACCCTTTTAGTCAGTGTGGAAA ATCTCTAGCAGTAGTAGTTCATGTCA
39	CMV初期 (CAG)エンハン サー;転写を 増強する	TAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCC ATATATGGAGTTCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCC TGGCTGACCGCCCAACGACCCCGCCATTGACGTCAATAATGA CGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTC AATGGGTGGACTATTTACGGTAAACTGCCACTTGGCAGTACAT CAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGAC GGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCAGTACATGACCTTATG GGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATC
40	ニワトリベータ アクチン(CAG) プロモーター; 転写	GCTATTACCATGGGTTCGAGGTGAGCCCCACGTTCTGCTTCACTCT CCCCATCTCCCCCCCCCTCCCCACCCCAATTTTGTATTTATTTATT TTTTAATTATTTTGTGCAGCGATGGGGGCGGGGGGGGGGGGGGC GCGCGCCAGGGGGGCGGGGCGGGGCGAGGGGCGGGGCGGGGC GAGGCGGAGAGGTGCGGCGGCAGCCAATCAGAGCGGCGCGCTC CGAAAGTTTCCTTTTATGGCGAGGCGGCGGCGGCGGCGGCCCTA TAAAAGCGAAGCGCGCGGGCGG
41	ニワトリベータ アクチンイント ロン;遺伝子発 現を増強する	GGAGTCGCTGCGTTGCCTTCGCCCGTGCCCCGCTCCGCGCCGCC TCGCGCCGCCC GCCCGGCTCTGACTGACCGGTTACTCCACAG GTGAGCGGGCGGGACGGCCCTTCTCCTCCGGGCTGTAATTAGCG CTTGTTTTAATGACGGCTCGTTTCTTTTCTGTGGCTGCGTGAAAG CCTTAAAGGGCTCCGGGAGGGCCCTTTGTGCGGGGGGAGCGGC TCGGGGGGTGCCTGCGTGTGTGTGCGTGGGAGCGCCGCGTG CGCCCGCGCTGCCCGCGGCTGTGAGCGCTGCGGGCGCGGGCG GGGGCTTTGTGCGCTCCGCGTGTGCGGAGGGGAGCGCGGCCGG GGGCGGTGCCCGCGGTGCGGGGGGCTGCGAGGGGAACAAAG GCTGCGTGCGGGTGTGTGCGTGGGGGGTGTGAGCAGGGGGTGTG GGCGCGGCGGTGCGGCTGTAACCCCCCTGCACCCCCCTCCC GAGTTGCTGAGCACGGCCCGGCTTCGGGTGCGGGGCTCCGTGCG GGGCGTGCGCGGGGCTCGCCGTGCCGGGCGGGGGGTGCGGGC AGGTGGGGGTGCCGGGCGGGGCGGGGCGCCTCGGGCCGGGGA GGGCTCGGGGAGGGGCGCGGCGGCCCGGAGCGCCGGCGGCT GTCGAGGCGGCGAGCCGAGCCATTGCCTTTTATGGTAATCG TGCAGAGGGGCGAGGACTTCCTTTGTCCAAATCTGGCGGAG CCGAAATCTGGGAGGCGCCGCCGACCCCTCTAGCGGGCGCGG GCGAAGCGGTGCGGCGCCGCGAGGAAGGAAATGGGCGGGGAGG GCCTTCGTGCGTGC CGCGCCGCGGCTCCCTTCTCCATCTCCAGC CTCGGGGCTGCCGAGGGGACGGCTGCCTTCGGGGGGGACGGG GCAGGGCGGGGTTCGGCTTCTGGCGTGTGACCGGCGG
42	HIV Gag; ウイルス カプシド	ATGGGTGCGAGAGCGTCAGTATTAAGCGGGGAGAATTAGATCG ATGGGAAAAAATTCGGTTAAGGCCAGGGGAAAGAAAAAATAT AAATTAACATATAGTATGGCAAGCAGGGAGCTAGAACGATT CGCAGTTAATCCTGGCCTGTTAGAAACATCAGAAGGCTGTAGAC AAATACTGGGACAGCTACAACCATCCCTTCAGACAGGATCAGAA

10

20

30

40

【表 4 - 6】

		<p>GAACCTAGATCATTATATAAATACAGTAGCAACCCTCTATTGTGTG CATCAAAGGATAGAGATAAAAGACACCAAGGAAGCTTTAGACA AGATAGAGGAAGAGCAAAAACAAAAGTAAGAAAAAGCACAGCA AGCAGCAGCTGACACAGGACACAGCAATCAGGTCAGCCAAAATT ACCCTATAGTGCAGAACATCCAGGGGCAAATGGTACATCAGGCC ATATCACCTAGAACTTTAAATGCATGGGTAAAAGTAGTAGAAGA GAAGGCTTTCAGCCCAGAAAGTGATACCCATGTTTTTCAGCATTATC AGAAGGAGCCACCCACAAGATTTAAACACCATGCTAAACACAG TGGGGGGACATCAAGCAGCCATGCAAATGTTAAAAGAGACCATC AATGAGGAAGCTGCAGAATGGGATAGAGTGCATCCAGTGCATGC AGGGCCTATTGCACCAGGCCAGATGAGAGAACCAAGGGGAAGT GACATAGCAGGAACTACTAGTACCCTTCAGGAACAAATAGGATG GATGACACATAATCCACCTATCCCAGTAGGAGAAATCTATAAAA GATGGATAATCCTGGGATTAATAAAAATAGTAAGAATGTATAGC CCTACCAGCATTCTGGACATAAGACAAGGACCAAAGGAACCCTT TAGAGACTATGTAGACCGATTCTATAAAAATCTAAGAGCCGAGC AAGCTTCACAAGAGGTAATAAAATTTGGATGACAGAAACCTTGTTG GTCCAAAATGCGAACCCAGATTGTAAGACTATTTTAAAAGCATT GGGACCAGGAGCGACACTAGAAGAAATGATGACAGCATGTCAG GGAGTGGGGGGACCCGGCCATAAAGCAAGAGTTTTGGCTGAAGC AATGAGCCAAGTAACAAATCCAGCTACCATAATGATACAGAAAG GCAATTTTAGGAACCAAAGAAAGACTGTAAAGTGTTCATTGT GGCAAAGAAGGGCACATAGCCAAAAATTGCAGGGCCCCTAGGA AAAAGGGCTGTTGGAATGTGGAAAGGAAGGACACCAAATGAA AGATTGTAAGGAGACAGGCTAATTTTTTAGGGAAGATCTGGC CTTCCACAAGGGAAGGCCAGGGAATTTTCTCAGAGCAGACCA GAGCCAACAGCCCCACCAGAAGAGAGCTTCAGGTTTGGGGAAG AGACAACAACCTCCTCTCAGAAGCAGGAGCCGATAGACAAGGA ACTGTATCCTTTAGCTTCCCTCAGATCACTCTTTGGCAGCGACCC CTCGTACAATAA</p>	<p>10 20</p>
43	HIV Pol; プロテアーゼ および逆転写 酵素	<p>ATGAATTTGCCAGGAAGATGGAAACCAAAAATGATAGGGGGAA TTGGAGGTTTTATCAAAGTAGGACAGTATGATCAGATACTCATA GAAATCTGCGGACATAAAGCTATAGGTACAGTATTAGTAGGACC TACACCTGTCAACATAATTGGAAGAAATCTGTTGACTCAGATTG GCTGCACTTTAAATTTTCCATTAGTCCTATTGAGACTGTACCAG TAAAATTAAGCCAGGAATGGATGGCCAAAAGTTAAACAATGG CCATTGACAGAAGAAAAAATAAAAGCATTAGTAGAAATTTGTAC AGAAATGGAAAAGGAAGGAAAAATTTCAAAAATTGGGCCTGAA AATCCATAACAATACTCCAGTATTTGCCATAAAGAAAAAAGACAG TACTAAATGGAGAAAATTAGTAGATTTTCAGAGAACCTTAATAAGA GAACTCAAGATTTCTGGGAAGTTCAATTAGGAATACCACATCCT GCAGGGTTAAAACAGAAAAAATCAGTAACAGTACTGGATGTGG GCGATGCATATTTTTTCAGTTCCCTTAGATAAAGACTTCAGGAAGT ATACTGCATTTACCATACTAGTATAAACAATGAGACACCAGGG ATTAGATATCAGTACAATGTGCTTCCACAGGGATGGAAAGGATC ACCAGCAATATTCCAGTGTAGCATGACAAAAATCTTAGAGCCTT TTAGAAAACAAAATCCAGACATAGTCATCTATCAATACATGGAT GATTTGTATGTAGGATCTGACTTAGAAATAGGGCAGCATAGAAC AAAAATAGAGGAACTGAGACAACATCTGTTGAGGTGGGGATTTA CCACACCAGACAAAAAATCAGAAAGAACCTCCATTCCTTTGG ATGGGTTATGAACTCCATCCTGATAAATGGACAGTACAGCCTAT AGTGCTGCCAGAAAAGGACAGCTGGACTGTCAATGACATACAGA AATTAGTGGGAAAATTGAATTGGGCAAGTCAGATTTATGCAGGG ATTAAAGTAAGGCAATTATGTAACCTTCTTAGGGGAACCAAAGC</p>	<p>30 40</p>

【表 4 - 7】

		ACTAACAGAAGTAGTACCACTAACAGAAGAAGCAGAGCTAGAA CTGGCAGAAAACAGGGAGATTCTAAAAGAACCGGTACATGGAG TGTATTATGACCCATCAAAAGACTTAATAGCAGAAATACAGAAG CAGGGGCAAGGCCAATGGACATATCAAATTTATCAAGAGCCATT TAAAAATCTGAAAACAGGAAAATATGCAAGAATGAAGGGTGCC CACACTAATGATGTGAAACAATTAACAGAGGCAGTACAAAAAAT AGCCACAGAAAGCATAGTAATATGGGGAAAGACTCCTAAATTTA AATTACCCATACAAAAGGAAACATGGGAAGCATGGTGGACAGA GTATTGGCAAGCCACCTGGATTCTGAGTGGGAGTTTGTCAATAC CCCTCCCTTAGTGAAGTTATGGTACCAGTTAGAGAAAGAACCCA TAATAGGAGCAGAACTTTCTATGTAGATGGGGCAGCCAATAGG GAAACTAAATTAGGAAAAGCAGGATATGTAAGTACAGAGGAA GACAAAAAGTTGTCCCCCTAACGGACACAACAAATCAGAAGACT GAGTTACAAGCAATTCATCTAGCTTTGCAGGATTGGGATTAGA AGTAAACATAGTGACAGACTCACAATATGCATTGGGAATCATT AAGCACAACCAGATAAGAGTGAATCAGAGTTAGTCAGTCAAATA ATAGAGCAGTTAATAAAAAAGGAAAAAGTCTACCTGGCATGGGT ACCAGCACACAAAGGAATTGGAGGAAATGAACAAGTAGATGGG TTGGTCAGTGCTGGAATCAGGAAAGTACTA	10
44	HIVインテグ ラーゼ;ウイルス RNAの組み込み	TTTTTAGATGGAATAGATAAGGCCCAAGAAGAACATGAGAAATA TCACAGTAATTGGAGAGCAATGGCTAGTGATTTAACCTACCAC CTGTAGTAGCAAAAGAAATAGTAGCCAGCTGTGATAAATGTCAG CTAAAAGGGGAAGCCATGCATGGACAAGTAGACTGTAGCCCAG GAATATGGCAGCTAGATTGTACACATTTAGAAGGAAAAGTTATC TTGGTAGCAGTTCATGTAGCCAGTGGATATATAGAAGCAGAAGT AATTCCAGCAGAGACAGGGCAAGAAACAGCATACTTCCTCTTAA AATTAGCAGGAAGATGGCCAGTAAAAACAGTACATACAGACAA TGCCAGCAATTTACCAGTACTACAGTTAAGGCCGCCTGTTGGTG GGCGGGGATCAAGCAGGAATTTGGCATTCCCTACAATCCCCAAA GTCAAGGAGTAATAGAATCTATGAATAAAGAATTAAGAAAATT ATAGGACAGGTAAGAGATCAGGCTGAACATCTTAAGACAGCAGT ACAAATGGCAGTATTCATCCACAATTTTAAAAGAAAAGGGGGGA TTGGGGGGTACAGTGCAGGGGAAAGAATAGTAGACATAATAGC AACAGACATACAACTAAAGAATTACAAAAACAATTACAAAA ATTCAAAATTTTCGGGTTTATTACAGGGACAGCAGAGATCCAGTT TGGAAGGACCAGCAAAGCTCCTCTGGAAAGGTGAAGGGGCAG TAGTAATACAAGATAATAGTGACATAAAAGTAGTGCCAAGAAGA AAAGCAAAGATCATCAGGGATTATGGAAAACAGATGGCAGGTG ATGATTGTGTGGCAAGTAGACAGGATGAGGATTA	20
45	HIV RRE; Revエレメント に結合する	AGGAGCTTTGTTCCCTGGGTTCTTGGGAGCAGCAGGAAGCACTA TGGGCGCAGCGTCAATGACGCTGACGGTACAGGCCAGACAATTA TTGTCTGGTATAGTGCAGCAGCAGAACAATTTGCTGAGGGCTATT GAGGCGCAACAGCATCTGTTGCAACTCACAGTCTGGGGCATCAA GCAGCTCCAGGCAAGAATCCTGGCTGTGGAAAGATACCTAAAGG ATCAACAGCTCCT	30
46	HIV Rev; ウイルスmRNA を核外移行 および安定 させる	ATGGCAGGAAGAAGCGGAGACAGCGACGAAGAACTCCTCAAGG CAGTCAGACTCATCAAGTTTCTCTATCAAAGCAACCCACCTCCCA ATCCCGAGGGGACCCGACAGGCCCGAAGGAATAGAAGAAGAAG GTGGAGAGAGAGACAGAGACAGATCCATTGATTAGTGAACGG ATCCTTAGCACTTATCTGGGACGATCTGCGGAGCCTGTGCCTCTT CAGCTACCACCGCTTGAGAGACTTACTCTTGATTGTAACGAGGAT TGTGGAACCTCTGGGACGCAGGGGGTGGGAAGCCCTCAAATATT GGTGAATCTCCTACAATATTGGAGTCAGGAGCTAAAGAATAG	40

【表 4 - 8】

47	ウサギベータ グロビンポリA; RNA安定性	AGATCTTTTTCCCTCTGCCAAAAATTATGGGGACATCATGAAGCC CCTTGAGCATCTGACTTCTGGCTAATAAAGGAAATTTATTTTCAT TGCAATAGTGTGTTGGAATTTTTGTGTCTCTCACTCGGAAGGAC ATATGGGAGGGCAAATCATTTAAAACATCAGAATGAGTATTTGG TTTAGAGTTTGGCAACATATGCCATATGCTGGCTGCCATGAACAA AGGTGGCTATAAAGAGGTCATCAGTATATGAAACAGCCCCCTGC TGCCATTCCCTATTCCATAGAAAAGCCTTGACTTGAGGTTAGAT TTTTTTTATATTTGTTTTGTGTTATTTTTTTCTTTAACATCCCTAA AATTTTCCTTACATGTTTTACTAGCCAGATTTTTCTCCTCTCCTG ACTACTCCAGTCATAGCTGTCCCTCTTCTCTTATGAAGATC	10
48	ウサギベータ グロビンポリA; RNA安定性	AGATCTTTTTCCCTCTGCCAAAAATTATGGGGACATCATGAAGCC CCTTGAGCATCTGACTTCTGGCTAATAAAGGAAATTTATTTTCAT TGCAATAGTGTGTTGGAATTTTTGTGTCTCTCACTCGGAAGGAC ATATGGGAGGGCAAATCATTTAAAACATCAGAATGAGTATTTGG TTTAGAGTTTGGCAACATATGCCATATGCTGGCTGCCATGAACA AAGGTTGGCTATAAAGAGGTCATCAGTATATGAAACAGCCCCCT GCTGTCCATTCCCTATTCCATAGAAAAGCCTTGACTTGAGGTTAG ATTTTTTTTATATTTGTTTTGTGTTATTTTTTTCTTTAACATCCCT AAAATTTTCCTTACATGTTTTACTAGCCAGATTTTTCTCCTCTCCT TGACTACTCCAGTCATAGCTGTCCCTCTTCTCTTATGGAGATC	20
49	CMV プロモーター; 転写	ACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTGC ATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCGCGTTACATAACTTAC GGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCGCCCAT TGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGG ACTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCC CACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCT ATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCCA GTACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGT ATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGATGCGGTTTTGGCAGTACAT CAATGGGCGTGGATAGCGGTTTGACTCACGGGGATTTCCAAGTC TCCACCCCATTTGACGTCAATGGGAGTTTGTGTTGGCACCAAAATC AACGGGACTTTCCAAAATGTCGTAACAACCTCCGCCCATTTGACG CAAATGGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGC	30
50	ベータグロビン イントロン; 遺伝子発現を 増強する	GTGAGTTTGGGGACCCTTGATTGTTCTTTCTTTTTTCGCTATTGTAA AATTCATGTTATATGGAGGGGGCAAAGTTTTTCAGGGTGTGTTTA GAATGGGAAGATGTCCCTTGATCACCATGGACCCTCATGATAA TTTTGTTTCTTTCACTTTCTACTCTGTTGACAACCATTGTCTCCTCT TATTTTCTTTTCATTTTCTGTAACCTTTTTCGTTAAACTTTAGCTTGC ATTTGTAACGAATTTTTAAATTCATTTTTGTTTATTTGTCAGATTG TAAGTACTTTCTCTAATCACTTTTTTTTTCAAGGCAATCAGGGTAT ATTATATTGTACTTCAGCACAGTTTTAGAGAACAATTGTTATAAT TAAATGATAAGGTAGAATATTTCTGCATATAAATTCCTGGCTGGCG TGAAATATTCTTATTGGTAGAAACAACCTACCCCTGGTCATCAT CCTGCCTTTCTCTTTATGGTTACAATGATATACACTGTTTGAGAT GAGGATAAAATACTCTGAGTCCAAACCGGGCCCCCTCTGCTAACC ATGTTTATGCCTTCTTCTTTCTTCTACAG	40
51	VSV-G; 糖タンパク質 エンベロップ 細胞進入	ATGAAGTGCCTTTTGTACTTAGCCTTTTTATTCATTGGGGTGAATT GCAAGTTCACCATAGTTTTTCCACACAACCAAAAAGGAAACTGG AAAAATGTTCCCTTCTAATTACCATTATTGCCCGTCAAGCTCAGAT TTAAATTGGCATAATGACTTAATAGGCACAGCCTTACAAGTCAA AATGCCCAAGAGTCACAAGGCTATTCAAGCAGACGGTTGGATGT GTCATGCTTCCAAATGGGTCACTACTTGTGATTTCCGCTGGTATG GACCGAAGTATATAACACATTCCATCCGATCCTTCACTCCATCTG	

【表 4 - 9】

		<p>TAGAACAATGCAAGGAAAGCATTGAACAAACGAAACAAGGAAC TTGGCTGAATCCAGGCTTCCCTCCTCAAAGTTGTGGATATGCAAC TGTGACGGATGCCGAAGCAGTGATTGTCCAGGTGACTCCTCACC ATGTGCTGGTTGATGAATACACAGGAGAATGGGTTGATTCACAG TTCATCAACGGAAAATGCAGCAATTACATATGCCCCACTGTCCAT AACTCTACAACCTGGCATTCTGACTATAAGGTCAAAGGGCTATG TGATTCTAACCTCATTTCATGGACATCACCTTCTTCTCAGAGGA CGGAGAGCTATCATCCCTGGGAAAGGAGGGGCACAGGGTTCAGA AGTAACTACTTTGCTTATGAAACTGGAGGCAAGGCCTGCAAAAT GCAATACTGCAAGCATTGGGGAGTCAGACTCCCATCAGGTGTCT GGTTCGAGATGGCTGATAAGGATCTCTTTGCTGCAGCCAGATTCC CTGAATGCCCAGAAGGGTCAAGTATCTCTGCTCCATCTCAGACCT CAGTGGATGTAAGTCTAATTCAGGACGTTGAGAGGATCTTGGAT TATCCCTCTGCCAAGAAACCTGGAGCAAAATCAGAGCGGGTCT TCCAATCTCTCCAGTGGATCTCAGCTATCTTGCTCCTAAAAACC AGGAACCGGTCTCTTTACCATAATCAATGGTACCCTAAAAAT ACTTTGAGACCAGATACATCAGAGTCGATATTGCTGCTCCAATCC TCTCAAGAATGGTCGGAATGATCAGTGGAACACCACAGAAAGG GAACTGTGGGATGACTGGGCACCATATGAAGACGTGGAAATTGG ACCAATGGAGTTCTGAGGACCAGTTCAGGATATAAGTTTCCTTT ATACATGATTGGACATGGTATGTTGGACTCCGATCTTCATCTTAG CTCAAAGGCTCAGGTGTTTGAACATCCTCACATTCAAGACGCTG CTTCGCAACTTCTGATGATGAGAGTTTATTTTTTGGTGATACTG GGCTATCCAAAAATCCAATCGAGCTTGTAGAAGGTTGGTTCAGT AGTTGGAAAAGCTCTATTGCCTCTTTTTTCTTTATCATAGGGTTA ATCATTGGACTATTCTTGGTTCTCCGAGTTGGTATCCATCTTTGCA TTAAATTAAGCACACCAAGAAAAGACAGATTTATACAGACATA GAGATGA</p>	10
52	プロモーター ; PGK	<p>GGGGTTGGGGTTGCGCCTTTTCCAAGGCAGCCCTGGGTTTGC GGACGCGGCTGCTCTGGGCGTGGTTCCGGGAAACGCAGCGGCG CCGACCCTGGGTCTCGCACATTCTTCACGTCCGTTTCGACGCTCA CCCGGATCTTCGCCGCTACCCTTGTGGGCCCCCGGCGACGCTTC CTGCTCCGCCCTAAGTCGGGAAGGTTCCCTTGCAGGTTTCGCGGCGT GCCGGACGTGACAAACGGAAGCCGCACGTCTACTAGTACCCTC GCAGACGGACAGCGCCAGGGAGCAATGGCAGCGCGCCGACCGC GATGGGCTGTGGCCAATAGCGGCTGCTCAGCAGGGCGCGCCGAG AGCAGCGGCCGGGAAGGGGCGGTGCGGGAGGCGGGGTGTGGGG CGGTAGTGTGGGCCCTGTTCCCTGCCCGCGCGGTGTTCCGCATTCT GCAAGCCTCCGGAGCGCACGTCCGCAGTCGGCTCCCTCGTTGAC CGAATCACCGACCTCTCTCCCCAG</p>	30
53	プロモーター ; Ubc	<p>GCGCCGGGTTTTGGCGCCTCCCGCGGGCGCCCCCTCCTCACGGC GAGCGCTGCCACGTCAGACGAAGGGCGCAGGAGCGTTCCTGATC CTTCCGCCCGGACGCTCAGGACAGCGGCCCGCTGCTCATAAGAC TCGGCCTTAGAACCCAGTATCAGCAGAAGGACATTTTAGGACG GGACTTGGGTGACTCTAGGGCACTGGTTTTCTTTCCAGAGAGCGG AACAGGCGAGGAAAAGTAGTCCCTTCTCGGCGATTCTGCGGAGG GATCTCCGTGGGGCGGTGAACGCCGATGATTATATAAGGACGCG CCGGGTGTGGCACAGCTAGTTCGTCGCAGCCGGGATTTGGGTC GCGGTTCTTGTGTGGATCGCTGTGATCGTCACTTGGTGAGTTG CGGGCTGCTGGGCTGGCCGGGGCTTTCGTGGCCGCCGGGCCGCT CGGTGGGACGGAAGCGTGTGGAGAGACCGCCAAGGGCTGTAGT CTGGGTCCGCGAGCAAGGTTGCCCTGAACTGGGGGTTGGGGGGA GCGCACAAAATGGCGGCTGTTCCCAGTCTTGAATGGAAGACGC TTGTAAGGCGGGCTGTGAGGTCGTTGAAACAAGGTGGGGGGCAT</p>	40

【表 4 - 1 0】

		GGTGGGCGGCAAGAACCCAAGGTCTTGAGGCCTTCGCTAATGCG GGAAAGCTCTTATTCGGGTGAGATGGGCTGGGGCACCATCTGGG GACCCTGACGTGAAGTTTGTCACTGACTGGAGAACTCGGGTTTGT CGTCTGGTTGCGGGGGCGGCAGTTATGCGGTGCCGTTGGGCAGT GCACCCGTACCTTTGGGAGCGCGGCCTCGTCGTGTCGTGACGTC ACCCGTTCTGTTGGCTTATAATGCAGGGTGGGGCCACCTGCCGGT AGGTGTGCGGTAGGCTTTTCTCCGTGCGAGGACGCAGGGTTCGG GCCTAGGGTAGGCTCTCCTGAATCGACAGGCGCCGGACCTCTGG TGAGGGGAGGGATAAGTGAGGCGTCAGTTTCTTTGGTCCGTTTT ATGTACCTATCTTCTAAGTAGCTGAAGCTCCGTTTTTGAAGTAT GCGCTCGGGGTTGGCGAGTGTGTTTTGTGAAGTTTTTLAGGCACC TTTTGAAATGTAATCATTTGGGTCAATATGTAATTTTCAGTGTA GACTAGTAAA	10
54	ポリ A; SV40	GTTTATTGCAGCTTATAATGGTTACAAATAAAGCAATAGCATCAC AAATTCACAAATAAAGCATTTTTTTCACTGCATTCTAGTTGTGG TTTGTCCAAACTCATCAATGTATCTTATCA	
55	ポリ A; bGH	GACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTGCCCTCCCC GTGCCTTCCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCACTGTCCTTCC TAATAAAATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCA TTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAG GATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTC TATGG	20
56	HIV Gag; Bal	ATGGGTGCGAGAGCGTCAGTATTAAGCGGGGGAGAATTAGATAG GTGGGAAAAAATTCGGTTAAGGCCAGGGGGAAAGAAAAAATAT AGATTA AACATATAGTATGGGCAAGCAGGGAAGTAAAGATT CGCAGTCAATCCTGGCCTGTTAGAAACATCAGAAGGCTGCAGAC AAATACTGGGACAGCTACAACCATCCCTTCAGACAGGATCAGAA GAACTTAGATCATTATATAATACAGTAGCAACCCTCTATTGTGTA CATCAAAGATAGAGGTAAGAACACCAAGGAAGCTTTAGACA AAATAGAGGAAGAGCAAAACAAATGTAAGAAAAAGGCACAGCA AGCAGCAGCTGACACAGGAAACAGCGGTGAGGTGAGCCAAAAT TTCCCTATAGTGCAGAACCTCCAGGGGCAAATGGTACATCAGGC CATATCACCTAGAACTTTAAATGCATGGGTAAAAGTAATAGAAG AGAAAGCTTTCAGCCCAGAAGTAATACCCATGTTTTTCAGCATTAT CAGAAGGAGCCACCCACAAGATTTAAACACCATGCTAAACACA GTGGGGGACATCAAGCAGCCATGCAAATGTTAAAAGAACCAT CAATGAGGAAGCTGCAAGATGGGATAGATTGCATCCCGTGCAGG CAGGGCCTGTTGCACCAGGCCAGATAAGAGATCCAAGGGGAAGT GACATAGCAGGAAGTACCAGTACCCTTCAGGAACAAATAGGATG GATGACAAGTAATCCACCTATCCAGTAGGAGAAATCTATAAAA GATGGATAATCCTGGGATTAATAAAATAGTAAGGATGTATAGC CCTACCAGCATTGTTGGACATAAGACAAGGACCAAGGAACCCTT TAGAGACTATGTAGACCGGTTCTATAAACTCTAAGAGCCGAGC AAGCTTCACAGGAGGTA AAAAATTGGATGACAGAAACCTTGTTG GTCCAAAATGCGAACCCAGATTGTAAGACTATTTTAAAAGCATT GGGACCAGCAGCTACACTAGAAGAAATGATGACAGCATGTCAG GGAGTGGGAGGACCCAGCCATAAAGCAAGAATTTTGGCAGAAG CAATGAGCCAAGTAACAAATTCAGCTACCATAATGATGCAGAAA GGCAATTTTAGGAACCAAGAAAGATTGTTAAATGTTTCAATTG TGCCAAAGAAGGGCACATAGCCAGAAACTGCAGGGCCCTAGG AAAAGGGGCTGTTGGAAATGTGGAAAGGAAGGACACCAAAATGA AAGACTGTACTGAGAGACAGGCTAATTTTTTAGGGAAAATCTGG CCTTCCACAAAGGAAGGCCAGGGAATTTCTTCAGAGCAGACC	30 40

【表 4 - 1 1】

		AGAGCCAACAGCCCCACCAGCCCCACCAGAAGAGAGCTTCAGGT TTGGGGAAGAGACAACAACCTCCCTCTCAGAAGCAGGAGCTGATA GACAAGGAACTGTATCCTTTAGCTTCCCTCAGATCACTCTTTGGC AACGACCCCTCGTCACAATAA	
57	HIV Pol; Bal	ATGAATTTGCCAGGAAGATGGAAACCAAAAATGATAGGGGGAA TTGGAGGTTTTATCAAAGTAAGACAGTATGATCAGATACTCATA GAAATCTGTGGACATAAAGCTATAGGTACAGTATTAATAGGACC TACACCTGTCAACATAATTGGAAGAAATCTGTTGACTCAGATTG GTTGCACTTTAAATTTTCCCATTAGTCCTATTGAACTGTACCAG TAAAATTA AAAACCAGGAATGGATGGCCCAAAAGTTAAACAATGG CCACTGACAGAAGAAAAATAAAAAGCATTAAATGGAAATCTGTAC AGAAATGGAAAAGGAAGGGAAAATTTCAAAAATTGGGCCTGAA AATCCATAACAATACTCCAGTATTTGCCATAAAGAAAAAGACAG TACTAAATGGAGAAAATTAGTAGATTTTCAGAGA ACTTAATAAGA AAACTCAAGACTTCTGGGAAGTACAATTAGGAATACACATCCCG CAGGGGTTAAAAAAGAAAAAATCAGTAACAGTACTGGATGTGG GTGATGCATATTTTTTCAGTTCCTTAGATAAAGAATTCAGGAAGT ATACTGCATTTACCATACTAGTATAAACAATGAAACACCAGGG ATCAGATATCAGTACAATGTACTTCCACAGGGATGGAAAGGATC ACCAGCAATATTTCAAAGTAGCATGACAAGAATCTTAGAGCCTT TTAGAAAACAAAATCCAGAAATAGTGATCTATCAATACATGGAT GATTTGTATGTAGGATCTGACTTAGAAATAGGGCAGCATAGAAC AAAAATAGAGGAACTGAGACAACATCTGTTGAGGTGGGGATTTA CCACACCAGACAAAAACATCAGAAAGAACCTCCATTCCTTTGG ATGGGTTATGAACTCCATCCTGATAAATGGACAGTACAGCCTAT AGTGCTGCCAGAAAAGACAGCTGGACTGTCAATGACATACAGA AGTTAGTGGGAAAATTGAATTGGGCAAGTCAGATTTACCCAGGA ATTAAAGTAAAGCAATTATGTAGGCTCCTTAGGGGAACCAAGGC ATTAACAGAAGTAATACCACTAACAAAAGAAACAGAGCTAGAA CTGGCAGAGAACAGGGAAATTCTAAAAGAACCAGTACATGGGG TGTATTATGACCCATCAAAGACTTAATAGCAGAAATACAGAAG CAGGGGCAAGGCCAATGGACATATCAAATTTATCAAGAGCCATT TAAAATCTGAAAACAGGAAAATATGCAAGAATGAGGGGTGCC CACACTAATGATGTAAAACAATTAACAGAGGCAGTGCAAAAAAT AACCACAGAAAGCATAGTAATATGGGGAAAGACTCCTAAATTTA AACTACCCATACAAAAGAAACATGGGAAACATGGTGGACAGA GTATTGGCAAGCCACCTGGATTCTGAGTGGGAGTTTGTCAATAC CCCTCCCTTAGTGAAATTATGGTACCAGTTAGAGAAAGAACCCA TAATAGGAGCAGAAACATTCTATGTAGATGGAGCAGCTAACCGG GAGACTAAATTAGGAAAAGCAGGATATGTTACTAACAGAGGAA GACAAAAGTTGTCTCCCTAACTGACACAACAATCAGAAGACT GAGTTACAAGCAATTCATCTAGCTTTACAAGATTGAGGATTAGA AGTAAACATAGTAACAGACTCACAAATATGCATTAGGAATCATT AAGCACAACCAGATAAAAAGTGAATCAGAGTTAGTCAGTCAAATA ATAGAACAGTTAATAAAAAAGGAAAAGGTCTACCTGGCATGGGT ACCAGCGCACAAAGGAATTGGAGGAAATGAACAAGTAGATAAA TTAGTCAGTACTGGAATCAGGAAAGTACTA	10 20 30 40
58	HIV インテグラーゼ; Bal	TTTTTAGATGGAATAGATATAGCCCAAGAAGAACATGAGAAATA TCACAGTAATTGGAGAGCAATGGCTAGTGATTTAACCTGCCAC CTGTGGTAGCAAAAAGAAATAGTAGCCAGCTGTGATAAATGTCAG CTAAAAGGAGAAGCCATGCATGGACAAGTAGACTGTAGTCCAGG AATATGGCAACTAGATTGTACACATTTAGAAGGAAAAATTATCC TGGTAGCAGTTTCATGTAGCCAGTGGATATATAGAAGCAGAAGTT ATTCCAGCAGAGACAGGGCAGGAAACAGCATACTTTCTCTTAAA	

【表 4 - 1 2】

		<p>ATTAGCAGGAAGATGGCCAGTAAAAACAATACATACAGACAAT GGCAGCAATTTCACTAGTACTACAGTCAAGGCCGCCTGTTGGTG GGCGGGGATCAAGCAGGAATTTGGCATTCCCTACAATCCCCAAA GTCAGGGAGTAGTAGAATCTATAAATAAAGAATTAAGAAAATT ATAGGACAGGTAAGAGATCAGGCTGAACATCTTAAAAACAGCAGT ACAAATGGCAGTATTCATCCACAATTTTAAAAGAAAAGGGGGGA TTGGGGGGTATAGTGCAGGGGAAAGAATAGTAGACATAATAGC AACAGACATACAACTAAAGAATTACAAAAACAATTACAAAA ATTCAAAATTTTCGGGTTTATTACAGGGACAGCAGAGATCCACTT TGGAAAGGACCAGCAAAGCTTCTCTGGAAAGGTGAAGGGGCAG TAGTAATACAAGATAATAGTGACATAAAAGTAGTACCAAGAAGA AAAGCAAAGATCATTAGGGATTATGGAAAACAGATGGCAGGTG ATGATTGTGTGGCAAGTAGACAGGATGAGGATTAG</p>	10
59	エンベロープ; RD114	<p>ATGAAACTCCCAACAGGAATGGTCATTTTATGTAGCCTAATAAT AGTTTCGGGCAGGGTTTGACGACCCCCGCAAGGCTATCGCATTAG TACAAAAACAACATGGTAAACCATGCGAATGCAGCGGAGGGCA GGTATCCGAGGCCCCACCGAACTCCATCCAACAGGTAACCTGGC CAGGCAAGACGGCCTACTTAATGACCAACCAAAAATGGAAATGC AGAGTCACTCCAAAAAATCTCACCCCTAGCGGGGGAGAACTCCA GAACTGCCCTGTAACTTTCCAGGACTCGATGCACAGTTCTTG TTATACTGAATACCGGCAATGCAGGGCGAATAATAAGACATACT ACACGGCCACCTTGCTTAAAATACGGTCTGGGAGCCTCAACGAG GTACAGATATTACAAAACCCCAATCAGCTCCTACAGTCCCCTTGT AGGGGCTCTATAAATCAGCCCGTTTGCTGGAGTGCCACAGCCCC CATCCATATCTCCGATGGTGGAGGACCCCTCGATACTAAGAGAG TGTGGACAGTCCAAAAAAGGCTAGAACAATTCATAAGGCTATG CATCCTGAACTTCAATACCACCCCTTAGCCCTGCCCAAAGTCAGA GATGACCTTAGCCTTGATGCACGGACTTTTGATATCCTGAATACC ACTTTTAGGTTACTCCAGATGTCCAATTTTAGCCTTGCCCAAGAT TGTTGGCTCTGTTTAAAAGTGGTACCCCTACCCCTCTTGCGATA CCCCTCCCTCTTTAACCTACTCCCTAGCAGACTCCCTAGCGAAT GCCTCCTGTCAGATTATACCTCCCCTCTTGGTTCAACCGATGCAG TTCTCCAACCTCGTCTGTTTATCTTCCCCTTTCATTAACGATACGG AACAAATAGACTTAGGTGCAGTCACCTTTACTAACTGCACCTCTG TAGCCAATGTCAGTAGTCCTTTATGTGCCCTAACGGGTGAGTCT TCCTCTGTGGAAATAACATGGCATAACCTATTTACCCAAAAGT GGACAGGACTTTGCGTCCAAGCCTCCCTCCTCCCCGACATTGACA TCATCCCGGGGGATGAGCCAGTCCCATTCTGCCATTGATCATT ATATACATAGACCTAAACGAGCTGTACAGTTCATCCCTTTACTAG CTGGACTGGGAATCACCGCAGCATTACCACCGGAGCTACAGGC CTAGGTGTCTCCGTCACCCAGTATAAAAATTATCCCATCAGTTA ATATCTGATGTCCAAGTCTTATCCGGTACCATAACAAGATTTACAA GACCAGGTAGACTCGTTAGCTGAAGTAGTTCTCCAAAATAGGAG GGGACTGGACCTACTAACGGCAGAACAAGGAGGAATTTGTTTAG CCTTACAAGAAAAATGCTGTTTTTATGCTAACAAGTCAGGAATTG TGAGAAACAAAATAAGAACCCTACAAGAAGAATTACAAAAACG CAGGGAAAGCCTGGCATCAACCCTCTCTGGACCGGGCTGCAGG GCTTTCTTCCGTACCTCCTACCTCTCCTGGGACCCCTACTCACCT CCTACTCATACTAACCATTGGGCCATGCGTTTTCAATCGATTGGT CCAATTTGTTAAAGACAGGATCTCAGTGGTCCAGGCTCTGGTTTT GACTCAGCAATATCACCAGCTAAAACCCATAGAGTACGAGCCAT GA</p>	20
			30
			40
60	エンベロープ; GALV	<p>ATGCTTCTCACCTCAAGCCCGCACCACCTTCGGCACCAGATGAGT CCTGGGAGCTGGAAAAGACTGATCATCCTCTTAAGCTGCGTATTC</p>	

【表 4 - 1 3】

		<p>GGAGACGGCAAAACGAGTCTGCAGAATAAGAACCCCCACCAGC CTGTGACCCTCACCTGGCAGGTAAGTCCCAAAGTGGGGACGTT GTCTGGGACAAAAAGGCAGTCCAGCCCCTTTGGACTTGGTGGCC CTCTCTTACACCTGATGTATGTGCCCTGGCGGCCGGTCTTGAGTC CTGGGATATCCCGGGATCCGATGTATCGTCCTCTAAAAGAGTTA GACCTCCTGATTACAGACTATACTGCCGCTTATAAGCAAATCACCT GGGGAGCCATAGGGTGCAGCTACCCTCGGGCTAGGACCAGGATG GCAAATCCCCCTTCTACGTGTGTCCCCGAGCTGGCCGAACCCAT TCAGAAGCTAGGAGGTGTGGGGGGCTAGAATCCCTATACTGTAA AGAATGGAGTTGTGAGACCACGGGTACCGTTTATTGGCAACCCA AGTCCTCATGGGACCTCATAACTGTAAAATGGGACCAAATGTG AAATGGGAGCAAAAATTTCAAAGTGTGAACAAACCGGCTGGTG TAACCCCTCAAGATAGACTTCACAGAAAAAGGAAAACCTCTCCA GAGATTGGATAACGGAAAAAACCTGGGAATTAAGGTTCTATGTA TATGGACACCCAGGCATACAGTTGACTATCCGCTTAGAGGTCAC TAACATGCCGGTTGTGGCAGTGGGCCAGACCCTGTCCTTGCGG AACAGGGACCTCCTAGCAAGCCCCTCACTCTCCCTCTCTCCCCAC GGAAAGCGCCGCCACCCCTTACCCCGGCGGCTAGTGAGCAA ACCCCTGCGGTGCATGGAGAACTGTTACCCTAAACTCTCCGCCT CCCACCAGTGGCGACCGACTCTTTGGCCTTGTGCAGGGGGCCTTC CTAACCTTGAATGCTACCAACCCAGGGGCCACTAAGTCTTGCTG GCTCTGTTTGGGCATGAGCCCCCTTATTATGAAGGGATAGCCTC TTCAGGAGAGGTCGCTTATACCTCCAACCATACCCGATGCCACTG GGGGGCCCAAGGAAAGCTTACCCTCACTGAGGTCTCCGGACTCG GGTCATGCATAGGGAAGGTGCCTCTTACCCATCAACATCTTTGCA ACCAGACCTTACCATCAATTCTCTAAAAACCATCAGTATCTGC TCCCCTCAAACCATAGCTGGTGGGCCTGCAGCACTGGCCTCACCC CCTGCCTCTCCACCTCAGTTTTTAATCAGTCTAAAGACTTCTGTGT CCAGGTCCAGCTGATCCCCGCATCTATTACCATTCTGAAGAAAC CTTGTTACAAGCCTATGACAAATCACCCCCAGGTTTAAAAGAG AGCCTGCCTCACTTACCCTAGCTGTCTTCCCTGGGGTTAGGGATTG CGGCAGGTATAGGTAAGTGGCTCAACCGCCCTAATTAAGGGCCC ATAGACCTCCAGCAAGGCCTAACCAGCCTCAAATCGCCATTGA CGCTGACCTCCGGGCCCTTCAGGACTCAATCAGCAAGCTAGAGG ACTCACTGACTTCCCTATCTGAGGTAGTACTCCAAAATAGGAGA GGCCTTGACTTACTATTCTTAAAGAAGGAGGCCTCTGCGCGGCC CTAAAAGAAGAGTGCTGTTTTTATGTAGACCACTCAGGTGCAGT ACGAGACTCCATGAAAAACTTAAAGAAAGACTAGATAAAAAGA CAGTTAGAGCGCCAGAAAAACCAAACCTGGTATGAAGGGTGGTT CAATAACTCCCCTTGGTTTACTACCCTACTATCAACCATCGCTGG GCCCCTATTGCTCCTCCTTTTGTACTCACTCTTGGGCCCTGCATC ATCAATAAATTAATCCAATTCATCAATGATAGGATAAGTGCAGT CAAATTTTAGTCCTTAGACAGAAATATCAGACCCTAGATAACG AGGAAAACCTTTAA</p>	<p>10 20 30</p>
61	エンベロープ ; FUG	<p>ATGGTTCGCGAGGTTCTTTTGTGTTGTAAGTCCCTTCTGGGTTTTCGT TGTGTTTCGGGAAGTTCCTTACACGATACCAGACGAACCTTG GTCCCTGGAGCCCTATTGACATACACCATCTCAGCTGTCCAAATA ACCTGGTTGTGGAGGATGAAGGATGTACCAACCTGTCCGAGTTC TCCTACATGGAACCTCAAAGTGGGATACATCTCAGCCATCAAAGT GAACGGGTTCACTTGCACAGGTGTTGTGACAGAGGCAGAGACCT ACACCAACTTTGTTGGTTATGTCACAACCACATTCAAGAGAAAG CATTTCCGCCCCACCCAGACGCATGTAGAGCCGCGTATAACTG GAAGATGGCCGGTGACCCAGATATGAAGAGTCCCTACACAATC CATACCCCGACTACCCTGGCTTCGAACTGTAAGAACCACCAA</p>	40

【表 4 - 15】

		GAGTACCCCCCTAGCATTGATGGACCTTCTGATGTTTTCCACATC TGCATATCTAGTCAGCATCTTCCTGCACCTTGTCAAATACCAAC ACACAGGCACATAAAAGGTGGCTCATGTCCAAAGCCACACCGAT TAACCAACAAAGGAATTTGTAGTTGTGGTGCATTTAAGGTGCCT GGTGTA AAAACCGTCTGGAAAAGACGCTGA	
63	エンペロープ ; FPV	ATGAACACTCAAATCCTGGTTTTCGCCCTTGTGGCAGTCATCCCC ACAAATGCAGACAAAATTTGTCTTGGACATCATGCTGTATCAAA TGGCACCAAAGTAAACACACTCACTGAGAGAGGAGTAGAAGTTG TCAATGCAACGGAAACAGTGGAGCGGACAAACATCCCCAAAATT TGCTCAAAGGGAAAAGAACCCTGATCTTGGCCAATGCGGACT GTTAGGGACCATTACCGGACCACCTCAATGCGACCAATTTCTAG AATTTTCAGCTGATCTAATAATCGAGAGACGAGAAGGAAATGAT GTTTGTACCCGGGGAAGTTTGTAAATGAAGAGGCATTGCGACA AATCCTCAGAGGATCAGGTGGGATTGACAAAGAAACAATGGGAT TCACATATAGTGGATAAGGACCAACGGAACA ACTAGTGCATGT AGAAGATCAGGGTCTTCATTCTATGCAGAAATGGAGTGGCTCCT GTCAAATACAGACAATGCTGCTTTCCACAAATGACAAAATCAT ACAAAACACAAGGAGAGAATCAGCTCTGATAGTCTGGGGAATC CACCATT CAGGATCAACCACCGAACAGACCAAACTATATGGGAG TGGAATAAACTGATAACAGTCGGGAGTTCCAAATATCATCAAT CTTTTGTGCCGAGTCCAGGAACACGACCCGAGATAAATGGCCAG TCCGGACGGATTGATTTTCATTGGTTGATCTTGGATCCCAATGAT ACAGTTACTTTTAGTTTTCAATGGGGCTTTCATAGCTCCAAATCGT GCCAGCTTCTTGAGGGGAAAGTCCATGGGGATCCAGAGCGATGT GCAGGTTGATGCCAATTGCGAAGGGGAATGCTACCACAGTGGAG GGACTATAACAAGCAGATTGCCTTTTCAAACATCAATAGCAGA GCAGTTGGCAAATGCCAAGATATGTA AACAGGAAAGTTTATT ATTGGCAACTGGGATGAAGAACGTTCCCGAACCTTCCAAAAAAA GGAAAAAAGAGGGCCTGTTTGGCGCTATAGCAGGGTTTATTGAA AATGGTTGGGAAGGTCTGGTTCGACGGGTGGTACGGTTTCAGGCA TCAGAATGCACAAGGAGAAGGAACTGCAGCAGACTACAAAAGC ACCCAATCGGCAATTGATCAGATAACCGGAAAGTTAAATAGACT CATTGAGAAAACCAACCAGCAATTTGAGCTAATAGATAATGAAT TCACTGAGGTGGAAAAGCAGATTGGCAATTTAATTA ACTGGACC AAAGACTCCATCACAGAAGTATGGTCTTACAATGCTGAACTTCTT GTGGCAATGGAAAACCAGCACACTATTGATTTGGCTGATTCAGA GATGAACAAGCTGTATGAGCGAGTGAGGAAACAATTAAGGGAA AATGCTGAAGAGGATGGCACTGGTTGCTTTGAAATTTTTCATAAA TGTGACGATGATTGTATGGCTAGTATAAGGAACAATACTTATGA TCACAGCAAATACAGAGAAGAAGCGATGCAAAATAGAATACAA ATTGACCCAGTCAAATTTGAGTAGTGGCTACAAAGATGTGATACT TTGGTTTAGCTTCGGGGCATCATGCTTTTTGCTTCTTGCCATTGCA ATGGGCCTTGTTTTCATATGTGTGAAGAACGGAACATGCGGGTG CACTATTTGTATATAA	10 20 30
64	エンペロープ ; RRV	AGTGTAACAGAGCACTTTAATGTGTATAAGGCTACTAGACCATA CCTAGCACATTTGCGCCGATTGCGGGGACGGGTACTTCTGCTATA GCCCAGTTGCTATCGAGGAGATCCGAGATGAGGCGTCTGATGGC ATGCTTAAGATCCAAGTCTCCGCCCAAATAGGTCTGGACAAGGC AGGCACCCACGCCACACGAAGCTCCGATATATGGCTGGTCATG ATGTT CAGGAATCTAAGAGAGATTCCTT GAGGGTGTACACGTCC GCAGCGTGCTCCATACATGGGACGATGGGACACTTCATCGTCCG ACACTGTCCACCAGGCGACTACCTCAAGGTTTCGTTCCGAGGACG CAGATTCGCACGTGAAGGCATGTAAGGTCCAATACAAGCAAT CCATTGCCGGTGGGTAGAGAGAAGTTCTGTGGTTAGACCACACTT	40

【表 4 - 1 6】

		<p>TGGCGTAGAGCTGCCATGCACCTCATACCAGCTGACAACGGCTC CCACCGACGAGGAGATTGACATGCATACACCGCCAGATATACCG GATCGCACCCCTGCTATCACAGACGGCGGGCAACGTCAAATAAC AGCAGGCGGCAGGACTATCAGGTACAACGTACCTGCGGCCGTG ACAACGTAGGCACTACCAGTACTGACAAGACCATCAACACATGC AAGATTGACCAATGCCATGCTGCCGTACCAGCCATGACAAATG GCAATTTACCTCTCCATTTGTTCCAGGGCTGATCAGACAGCTAG GAAAGGCAAGGTACACGTTCCGTTCCCTCTGACTAACGTCACCT GCCGAGTGCCGTTGGCTCGAGCGCCGGATGCCACCTATGGTAAG AAGGAGGTGACCTGAGATTACACCCAGATCATCCGACGCTCTT CTCCTATAGGAGTTTAGGAGCCGAACCGCACCCGTCACGAGGAAT GGGTTGACAAGTTCTCTGAGCGCATCATCCAGTGACGGAAGAA GGGATTGAGTACCAGTGGGGCAACAACCCGCGGCTGCTGCTGTG GGCGCAACTGACGACCGAGGGCAAACCCCATGGCTGGCCACATG AAATCATTAGTACTATTATGGACTATACCCCGCCGCACTATTG CCGACGTATCCGGGGCGAGTCTGATGGCCCTCCTAACTCTGGCG GCCACATGCTGCATGCTGGCCACCGCGAGGAGAAAGTGCCTAAC ACCGTACGCCCTGACGCCAGGAGCGGTGGTACCGTTGACACTGG GGCTGCTTTGCTGCGCACCGAGGGCGAATGCA</p>	10
65	エンペロープ; MLV 10A1	<p>ATGGAAGGTCCAGCGTTCTCAAACCCCTTAAAGATAAGATTAA CCCCTGGAAGTCCTTAATGGTCATGGGGGTCTATTTAAGAGTAG GGATGGCAGAGAGCCCCATCAGGTCTTTAATGTAACCTGGAGA GTCACCAACCTGATGACTGGGCGTACCGCAATGCCACCTCCCTT TTAGGAACTGTACAAGATGCCTTCCCAAGATTATATTTTGATCTA TGTGATCTGGTCGGAGAAGAGTGGGACCCTTCAGACCAGGAACC ATATGTCGGGTATGGCTGCAAATACCCCGGAGGGAGAAAGCGGA CCCGGACTTTTGACTTTTACGTGTGCCCTGGGCATACCGTAAAT CGGGGTGTGGGGGGCAAGAGAGGGCTACTGTGGTGAATGGGG TTGTGAAACCACCGGACAGGCTTACTGGAAGCCACATCATCAT GGGACCTAATCTCCCTTAAGCGCGGTAACACCCCTGGGACACG GGATGCTCCAAAATGGCTTGTGGCCCTGCTACGACCTCTCCAAA GTATCCAATTCTTCCAAGGGGCTACTCGAGGGGGCAGATGCAA CCCTCTAGTCCTAGAATTCAGTGCAGGAAAAAAGGCTAATT GGGACGGGCCCAAATCGTGGGACTGAGACTGTACCGGACAGG AACAGATCCTATTACCATGTTCTCCCTGACCCGCCAGGTCCTCAA TATAGGGCCCCGCATCCCCATTGGGCCATAATCCCGTGATCACTGG TCAACTACCCCTCCCGACCCGTGCAGATCAGGCTCCCGAGGCC TCCTCAGCCTCCTCCTACAGGCGCAGCCTCTATAGTCCCTGAGAC TGCCCCACCTTCTCAACAACCTGGGACGGGAGACAGGCTGCTAA ACCTGGTAGAAGGAGCCTATCAGGCGCTTAACCTCACCAATCCC GACAAGACCCAAGAATGTTGGCTGTGCTTAGTGTGCGGACCTCC TTATTACGAAGGAGTAGCGGTCTGTTGGGCACTTATACCAATCATT TACCGCCCCGGCCAGCTGTACGGCCACTTCCCAACATAAGCTTAC CCTATCTGAAGTGACAGGACAGGGCCTATGCATGGGAGCACTAC CTAAAACCTACCAGGCCTTATGTAACACCACCCAAAGTGCCGGC TCAGGATCCTACTACCTTGCAGCACCCGCTGGAACAATGTGGGC TTGTAGCACTGGATTGACTCCCTGCTTGTCCACCACGATGCTCAA TCTAACACAGACTATTGTGTATTAGTTGAGCTCTGGCCAGAAT AATTTACCACTCCCCGATTATATGTATGGTCAGCTTGAACAGCG TACCAAATATAAGAGGGAGCCAGTATCGTTGACCTGGCCCTTC TGCTAGGAGGATTAACCATGGGAGGGATTGCAGCTGGAATAGGG ACGGGGACCACTGCCCTAATCAAACCCAGCAGTTTGAGCAGCT TCACGCCGCTATCCAGACAGACCTCAACGAAGTCGAAAAATCAA TTACCAACCTAGAAAAGTCACTGACCTCGTTGTCTGAAGTAGTCC</p>	20 30 40

【表 4 - 18】

		GCAGTTATCGCTTTATTCTGTATATGCAAATTTGCTTTTTAG	
67	短鎖 WPRE 配列	AATCAACCTCTGGATTACAAAATTTGTGAAAGATTGACTGATATT CTTAACTATGTTGCTCCTTTTACGCTGTGTGGATATGCTGCTTTAA TGCCCTCTGTATCATGCTATTGCTTCCCGTACGGCTTTCGTTTTCTC CTCCTTGTATAAAATCCTGGTTGCTGTCTCTTTATGAGGAGTTGTG GCCCGTTGTCCGTCAACGTGGCGTGGTGTGCTCTGTGTTTGCTGA CGCAACCCCACTGGCTGGGGCATTGCCACCACCTGTCAACTCCT TTCTGGGACTTTCGCTTTCCCCCTCCCGATCGCCACGGCAGAACT CATCGCCGCTGCCTTGCCCGCTGCTGGACAGGGGCTAGGTTGCT GGGCACTGATAATCCCGTGGTGTGTC	10
68	ヘルパープラスミド フォワードプライマー	TAAGCAGAATTCATGAATTTGCCAGGAAGAT	
69	ヘルパープラスミド リバースプライマー	CCATACAATGAATGGACACTAGGCGGCCGCACGAAT	
70	Gag, Pol, インテグラーゼ 断片	GAATTCATGAATTTGCCAGGAAGATGGAAACCAAAAATGATAGG GGGAATTGGAGGTTTTATCAAAGTAAGACAGTATGATCAGATAC TCATAGAAATCTGCGGACATAAAGCTATAGGTACAGTATTAGTA GGACCTACACCTGTCAACATAATTGGAAGAAATCTGTTGACTCA GATTGGCTGCACCTTAAATTTTCCATTAGTCCTATTGAGACTGT ACCAGTAAAATTAAGCCAGGAATGGATGGCCAAAAGTTAAAC AATGGCCATTGACAGAAGAAAAAATAAAGCATTAGTAGAAATT TGTACAGAAATGGAAAAGGAAGAAAAATTTCAAAAATTGGGC CTGAAAATCCATACAATACTCCAGTATTTGCCATAAAGAAAAAA GACAGTACTAAATGGAGAAAATTAGTAGATTTTCAGAGAACTTAA TAAGAGAACTCAAGATTTCTGGGAAGTTCAATTAGGAATACCAC ATCCTGCAGGGTTAAAACAGAAAAAATCAGTAACAGTACTGGAT GTGGGCGATGCATATTTTTTCAGTTCCCTTAGATAAAGACTTCAGG AAGTATACTGCATTTACCATACCTAGTATAAACAATGAGACACC AGGGATTAGATATCAGTACAATGTGCTTCCACAGGGATGGAAAG GATCACCAGCAATATCCAGTGTAGCATGACAAAAATCTTAGAG CCTTTTAGAAAACAAAATCCAGACATAGTCATCTATCAATACAT GGATGATTTGTATGTAGGATCTGACTTAGAAATAGGGCAGCATA GAACAAAAATAGAGGAAGTGGAGACAACATCTGTTGAGGTGGGG ATTTACCACACCAGACAAAAACATCAGAAAGAACCCTCATTCC TTTGGATGGGTTATGAACTCCATCCTGATAAATGGACAGTACAG CCTATAGTGCTGCCAGAAAAGGACAGCTGGACTGTCAATGACAT ACAGAAATTAGTGGGAAAATTGAATTGGGCAAGTCAGATTTATG CAGGGATTAAGTAAGGCAATTATGTAACTTCTTAGGGGAACC AAAGCACTAACAGAAGTAGTACCACTAACAGAAGAAGCAGAGC TAGAACTGGCAGAAAACAGGGAGATTCTAAAAGAACCGGTACA TGGAGTGTATTATGACCCATCAAAGACTTAATAGCAGAAATAC AGAAGCAGGGGCAAGGCCAATGGACATATCAAATTTATCAAGA GCCATTTAAAAATCTGAAAACAGGAAAGTATGCAAGAATGAAG GGTGCCCACTAATGATGTGAAACAATTAACAGAGGCAGTACA AAAAATAGCCACAGAAAGCATAGTAATATGGGGAAAGACTCCT AAATTTAAATTACCATACAAAAGGAAACATGGGAAGCATGGTG GACAGAGTATTGGCAAGCCACCTGGATTCTGAGTGGGAGTTTG TCAATACCCCTCCCTTAGTGAAGTTATGGTACCAGTTAGAGAAA GAACCCATAATAGGAGCAGAAACTTTCTATGTAGATGGGGCAGC CAATAGGGAAACTAAATTAGGAAAAGCAGGATATGTAAGTAC AGAGGAAGACAAAAGTTGTCCCTAACGGACACAACAATC AGAAGACTGAGTTACAAGCAATTCATCTAGCTTTGCAGGATTTCG GGATTAGAAGTAAACATAGTGACAGACTCACAATATGCATTGGG	20 30 40

【表 4 - 19】

		<p>AATCATTCAAGCACACCAGATAAGAGTGAATCAGAGTTAGTCA GTCAAATAATAGAGCAGTTAATAAAAAAGGAAAAAGTCTACCTG GCATGGGTACCAGCACACAAAGGAATTGGAGGAAATGAACAAG TAGATAAATTGGTCAGTGCTGGAATCAGGAAAGTACTATTTTAA GATGGAATAGATAAGGCCCAAGAAGAACATGAGAAAATATCACA GTAATTGGAGAGCAATGGCTAGTGATTTTAACTACCACCTGTA GTAGCAAAAGAAATAGTAGCCAGCTGTGATAAATGTCAGCTAAA AGGGGAAGCCATGCATGGACAAGTAGACTGTAGCCCAGGAATAT GGCAGCTAGATTGTACACATTTAGAAGGAAAAGTTATCTTGGTA GCAGTTCATGTAGCCAGTGGATATATAGAAGCAGAAGTAATTCC AGCAGAGACAGGGCAAGAAACAGCATACTTCCTCTTAAAATTAG CAGGAAGATGGCCAGTAAAAACAGTACATACAGACAATGGCAG CAATTTACCAGTACTACAGTTAAGGCCGCCTGTTGGTGGGCGG GGATCAAGCAGGAATTTGGCATTCCCTACAATCCCCAAAGTCAA GGAGTAATAGAATCTATGAATAAAGAATTAAGAAAATTATAGG ACAGGTAAGAGATCAGGCTGAACATCTTAAGACAGCAGTACAAA TGGCAGTATTCATCCACAATTTTAAAAGAAAAGGGGGGATTGGG GGGTACAGTGCAGGGGAAAGAATAGTAGACATAATAGCAACAG ACATACAAACTAAAGAATTACAAAAACAATTACAAAAATTCAA AATTTTCGGGTTTATTACAGGGACAGCAGAGATCCAGTTTGGAA AGGACCAGCAAAGCTCCTCTGGAAAGGTGAAGGGCAGTAGTA ATACAAGATAATAGTGACATAAAAGTAGTGCCAAGAAGAAAAG CAAAGATCATCAGGGATTATGGAAAACAGATGGCAGGTGATGAT TGTGTGGCAAGTAGACAGGATGAGGATTA</p>	<p>10 20</p>
71	Rev. RRE、およ びウサギベータ グロビンポリAを 含有するDNA 断片	<p>TCTAGAATGGCAGGAAGAAGCGGAGACAGCGACGAAGAGCTCA TCAGAACAGTCAGACTCATCAAGCTTCTCTATCAAAGCAACCCA CCTCCCAATCCCGAGGGGACCCGACAGGCCCGAAGGAATAGAA GAAGAAGGTGGAGAGAGAGACAGAGACAGATCCATTTCGATTAG TGAACGGATCCTTGGCACTTATCTGGGACGATCTGCGGAGCCTGT GCCTCTTCAGCTACCACCGCTTGAGAGACTTACTCTTGATTGTAA CGAGGATTGTGGAACCTTCTGGGACGCAGGGGGTGGGAAGCCCTC AAATATTGGTGGAACTCCTACAATATTGGAGTCAGGAGCTAAA GAATAGAGGAGCTTTGTTCTTGGGTTCTTGGGAGCAGCAGGAA GCACTATGGGCGCAGCGTCAATGACGCTGACGGTACAGGCCAGA CAATTATTGTCTGGTATAGTGCAGCAGCAGAACAATTTGCTGAG GGCTATTGAGGCGCAACAGCATCTGTTGCAACTCACAGTCTGGG GCATCAAGCAGCTCCAGGCAAGAATCCTGGCTGTGGAAAGATAC CTAAAGGATCAACAGCTCCTAGATCTTTTTCCCTCTGCCAAAAT TATGGGGACATCATGAAGCCCCTTGAGCATCTGACTTCTGGCTAA TAAAGGAAATTTATTTTCATTGCAATAGTGTGTTGGAATTTTTTG TGTCTCTCACTCGGAAGGACATATGGGAGGGCAAATCATTAAA ACATCAGAATGAGTATTTGGTTTTAGAGTTTGGCAACATATGCCAT ATGCTGGCTGCCATGAACAAAGGTGGCTATAAAGAGGTCATCAG TATATGAAACAGCCCCCTGCTGTCCATTCTTATTCCATAGAAAA GCCTTGACTTGAGGTTAGATTTTTTTTATATTTTGTGTTGTTAT TTTTTCTTTAACATCCCTAAAATTTTCTTACATGTTTTACTAGC CAGATTTTTCTCCTCTCCTGACTACTCCAGTCATAGCTGTCCCT CTTCTCTTATGAAGATCCCTCGACCTGCAGCCAAGCTTGGCGTA ATCATGGTCATAGCTGTTTCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCAC AATCCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAGCCT GGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCT CACTGCCCCGCTTTCCAGTCGGGAAACCTGTCGTGCCAGCGGATCC GCATCTCAATTAGTCAGCAACCATAGTCCCGCCCCTAACTCCGCC CATCCCGCCCCTAACCTCCGCCAGTTCGCCCCATTCTCCGCCCA</p>	<p>30 40</p>

【表 4 - 2 1】

		<p>TCACAGTTCATCAACGGAAAATGCAGCAATTACATATGCCCCAC TGTCCATAA ACTCTACAACCTGGCATTCTGACTATAAGGTCAAAGG GCTATGTGATTCTAACCTCATTTCATGGACATCACCTTCTTCTCA GAGGACGGAGAGCTATCATCCCTGGGAAAGGAGGGCACAGGGT TCAGAAGTA ACTACTTTGCTTATGAAACTGGAGGCAAGGCCTGC AAAATGCAATACTGCAAGCATTGGGGAGTCAGACTCCCATCAGG TGTCTGGTTCGAGATGGCTGATAAGGATCTCTTTGCTGCAGCCAG ATTCCCTGAATGCCAGAAGGGTCAAGTATCTCTGCTCCATCTCA GACCTCAGTGGATGTAAGTCTAATTCAGGACGTTGAGAGGATCT TGGATTATTCCCTCTGCCAAGAAACCTGGAGCAAAATCAGAGCG GGTCTTCCAATCTCTCCAGTGGATCTCAGCTATCTTGCTCCTAAA AACCCAGGAACCGGTCTGCTTTCACCATAATCAATGGTACCCTA AAATACTTTGAGACCAGATACATCAGAGTCGATATTGCTGCTCC AATCCTCTCAAGAATGGTCGGAATGATCAGTGGAACTACCACAG AAAGGGAACTGTGGGATGACTGGGCACCATATGAAGACGTGGA AATTGGACCCAATGGAGTTCTGAGGACCAGTTCAGGATATAAGT TTCCTTTATACATGATTGGACATGGTATGTTGGACTCCGATCTTC ATCTTAGCTCAAAGGCTCAGGTGTTCGAACATCCTCACATTCAAG ACGCTGCTTCGCAACTTCCTGATGATGAGAGTTTATTTTTTGGTG ATACTGGGCTATCCAAAATCCAATCGAGCTTGTAGAAGGTTGG TTCAGTAGTTGGAAAAGCTCTATTGCCTCTTTTTTCTTTATCATAG GGTTAATCATTGGACTATTCTTGGTCTCCGAGTTGGTATCCATC TTTGCATTAATAAAGCACACCAAGAAAAGACAGATTTATACA GACATAGAGATGAGAATTC</p>	<p>10 20</p>
74	RREおよびウサギベータグロビンポリAを含むヘルパープラスミド	<p>TCTAGAAGGAGCTTTGTTTCCTGGGTTCTTGGGAGCAGCAGGAA GCACTATGGGCGCAGCGTCAATGACGCTGACGGTACAGGCCAGA CAATTATTGCTGGTATAGTGCAGCAGCAGAACAATTTGCTGAG GGCTATTGAGGCGCAACAGCATCTGTTGCAACTCACAGTCTGGG GCATCAAGCAGCTCCAGGCAAGAATCCTGGCTGTGGAAAGATAC CTAAAGGATCAACAGCTCCTAGATCTTTTTCCCTCTGCCAAAAT TATGGGGACATCATGAAGCCCCTTGAGCATCTGACTTCTGGCTAA TAAAGGAAATTTATTTTCATTGCAATAGTGTGTTGGAATTTTTTG TGTCTCTCACTCGGAAGGACATATGGGAGGGCAAATCATTAAA ACATCAGAATGAGTATTTGGTTTAGAGTTTGGCAACATATGCCAT ATGCTGGCTGCCATGAACAAAGGTGGCTATAAAGAGGTCATCAG TATATGAAACAGCCCCCTGCTGTCCATTCTTATCCATAGAAAA GCCTTGACTTGAGGTTAGATTTTTTTTATATTTTGTGTTTAT TTTTTTCTTAAACATCCCTAAAATTTTCCTTACATGTTTTACTAGC CAGATTTTTCTCCTCTCCTGACTACTCCAGTCATAGCTGTCCCT CTTCTCTTATGAAGATCCCTCGACCTGCAGCCCAAGCTTGGCGTA ATCATGGTCATAGCTGTTTCCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCAC AATTCCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAGCCT GGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTACATTAATTGCGTTGCGCT CACTGCCCCTTTCCAGTCGGGAAACCTGTCGTGCCAGCGGATCC GCATCTCAATTAGTCAGCAACCATAGTCCCGCCCCTAACTCCGCC CATCCCGCCCCTAACTCCGCCAGTTCGCCCCATTCTCCGCCCA TGGCTGACTAATTTTTTTTATTTATGCAGAGGCCGAGGCCGCTC GGCCTCTGAGCTATTCCAGAAGTAGTGAGGAGGCTTTTTTGGAG GCCTAGGCTTTTGCAAAAAGCTAACTTGTTTATTGCAGCTTATAA TGGTTACAAATAAAGCAATAGCATCACAATTTACAAATAAAG CATTTTTTCACTGCATTCTAGTTGTGGTTTGTCCAACTCATCAA TGTATCTTATCACCCGGG</p>	<p>30 40</p>
75	RSVプロモーター	<p>CAATTGCGATGTACGGGCCAGATATACGCGTATCTGAGGGGACT AGGGTGTGTTTAGGCCAAAAGCGGGGCTTCGGTTGTACGCGGTT</p>	

【表 4 - 2 2】

	ターおよび HIV Rev	AGGAGTCCCCTCAGGATATAGTAGTTTCGCTTTTGCATAGGGAG GGGGAAATGTAGTCTTATGCAATACACTTGTAGTCTTGCAACATG GTAACGATGAGTTAGCAACATGCCTTACAAGGAGAGAAAAAGC ACCGTGCATGCCGATTGGTGGAAGTAAGGTGGTACGATCGTGCC TTATTAGGAAGGCAACAGACAGGTCTGACATGGATTGGACGAAC CACTGAATTCCGCATTGCAGAGATAATTGTATTTAAGTGCCTAGC TCGATAACAATAAACGCCATTTGACCATTACCACATTGGTGTGCA CCTCCAAGCTCGAGCTCGTTTGTAGTGAACCGTCAGATCGCCTGGA GACGCCATCCACGCTGTTTTGACCTCCATAGAAGACACCGGGAC CGATCCAGCCTCCCCTCGAAGCTAGCGATTAGGCATCTCCTATGG CAGGAAGAAGCGGAGACAGCGACGAAGAACTCCTCAAGGCAGT CAGACTCATCAAGTTTCTCTATCAAAGCAACCCACCTCCCAATCC CGAGGGGACCCGACAGGCCCGAAGGAATAGAAGAAGAAGGTGG AGAGAGAGACAGAGACAGATCCATTTCGATTAGTGAACGGATCCT TAGCACTTATCTGGGACGATCTGCGGAGCCTGTGCCTTTCAGCT ACCACCGCTTGAGAGACTTACTCTTGATTGTAACGAGGATTGTGG AACTTCTGGGACGCAGGGGGTGGGAAGCCCTCAAATATTGGTGG AATCTCCTACAATATTGGAGTCAGGAGCTAAAGAATAGTCTAGA	10
76	Rev/Tat shRNA 標的配列 #2	ATGGCAGGAAGAAGCGGAG	
77	Rev/Tat shRNA コード配列 #2	ATGGCAGGAAGAAGCGGAGTTCAAGAGACTCCGCTTCTTCCTGC CATTTTTT	20
78	H1プロモータ ーおよびshRT 配列	GAACGCTGACGTCATCAACCCGCTCCAAGGAATCGCGGGCCAG TGTCACTAGGCGGGAACACCCAGCGCGCGTGCGCCCTGGCAGGA AGATGGCTGTGAGGGACAGGGGAGTGGCGCCCTGCAATATTTGC ATGTCGCTATGTGTTCTGGGAAATCACCATAAACGTGAAATGTCT TTGGATTTGGGAATCTTATAAGTTCTGTATGAGACCACTTGGATC CGCGGAGACAGCGACGAAGAGCTTCAAGAGAGCTCTTCGTCGCT GTCTCCGCTTTTT	
79	H1 CCR5 配列	GAACGCTGACGTCATCAACCCGCTCCAAGGAATCGCGGGCCAG TGTCACTAGGCGGGAACACCCAGCGCGCGTGCGCCCTGGCAGGA AGATGGCTGTGAGGGACAGGGGAGTGGCGCCCTGCAATATTTGC ATGTCGCTATGTGTTCTGGGAAATCACCATAAACGTGAAATGTCT TTGGATTTGGGAATCTTATAAGTTCTGTATGAGACCACTTGGATC CGTGTCAAGTCCAATCTATGTTCAAGAGACATAGATTGGACTTG ACACTTTTT	30
80	CAG プロモーター	TAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCAATTAGTTCATAGCCC ATATATGGAGTTCCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCC TGGCTGACCGCCCAACGACCCCGCCATTGACGTCAATAATGA CGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTC AATGGGTGGACTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACAT CAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGAC GGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCCAGTACATGACCTTATG GGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTAT TACCATGGGTTCGAGGTGAGCCCCACGTTCTGCTTCACTCTCCCCA TCTCCCCCCCCCTCCCCACCCCAATTTTGTATTTATTTATTTTAA ATTATTTTGTGCAGCGATGGGGGCGGGGGGGGGGGGGGGCGCGCG CCAGGCGGGGGCGGGGCGGGGCGAGGGGCGGGGCGGGGCGAGGC GGAGAGGTGCGGCGGCAGCCAATCAGAGCGGCGCGCTCCGAAA GTTTCCTTTTATGGCGAGGCGGCGGGCGGGCGGCCCTATAAAA AGCGAAGCGCGCGGGCGGGCG	40

【表 4 - 2 3】

81	pRSV Rev	AGCGCCAATACGCAAACCGCCTCTCCCCGCGCGTGGCCGATT CATTAATGCAGCTGGCACGACAGGTTTCCCGACTGGAAGCGGG CAGTGAGCGCAACGCAATTAATGTGAGTTAGCTACTCATTAGG CACCCAGGCTTTACACTTTATGCTTCCGGCTCGTATGTTGTGTG GAATTGTGAGCGGATAACAATTTACACAGGAAACAGCTATGAC CATGATTACGAATTCGATGTACGGGCCAGATATACGCGTATCTG AGGGGACTAGGGTGTGTTTAGGCGAAAAGCGGGGCTTCGGTTGT ACGCGGTTAGGAGTCCCCTCAGGATATAGTAGTTTCGCTTTTGCA TAGGGAGGGGGAAATGTAGTCTTATGCAATACACTTGTAGTCTT GCAACATGGTAACGATGAGTTAGCAACATGCCTTACAAGGAGAG AAAAAGCACCGTGCATGCCGATTGGTGGAAAGTAAGGTGGTACGA TCGTGCCTTATTAGGAAGGCAACAGACAGGTCTGACATGGATTG GACGAACCACTGAATTCGCGATTGCAGAGATAAATTGTATTTAAG TGCTAGCTCGATAACAATAAACGCCATTTGACCATTACCACATT GGTGTGCACCTCCAAGCTCGAGCTCGTTTAGTGAACCGTCAGATC GCCTGGAGACGCCATCCACGCTGTTTTGACCTCCATAGAAGACA CCGGGACCGATCCAGCCTCCCCTCGAAGCTAGTCGATTAGGCAT CTCCTATGGCAGGAAGAAGCGGAGACAGCGACGAAGACCTCCTC AAGGCAGTCAGACTCATCAAGTTTCTCTATCAAAGCAACCCACC TCCAATCCCGAGGGGACCCGACAGGCCCGAAGGAATAGAAGA AGAAGGTGGAGAGAGAGACAGAGACAGATCCATTTCGATTAGTG AACGGATCCTTAGCACTTATCTGGGACGATCTGCGGAGCCTGTG CCTCTCAGCTACCACCGCTTGAGAGACTTACTCTTGATTGTAAC GAGGATTGTGGAACCTCTGGGACGCAGGGGGTGGGAAGCCCTCA AATATTGGTGGAATCTCCTACAATATTGGAGTCAGGAGCTAAAG AATAGTGCTGTTAGCTTGCTCAATGCCACAGCTATAGCAGTAGCT GAGGGGACAGATAGGGTTATAGAAGTAGTACAAGAAGCTTGGC ACTGGCCGTCGTTTTACATGATCTGAGCCTGGGAGATCTCTGGCT AACTAGGGAACCCACTGCTTAAGCCTCAATAAAGCTTGCTTGA GTGCTTCAAGTAGTGTGTGCCCGTCTGTTGTGTGACTCTGGTAAC TAGAGATCACAAGCAACCATAGTACGCGCCCTGTAGCGGCGCA TTAAGCGCGGCGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTAC ACTTGCCAGCGCCCTAGCGCCCGCTCCTTTTCGCTTTCTTCCCTTCC TTTCTCGCCACGTTTCGCCGGCTTTCCCCGTC AAGCTCTAAATCGG GGGCTCCCTTTAGGGTTCCGATTTAGTGCTTTACGGCACCTCGAC CCAAAAA ACTTGATTTGGGTGATGGTTCACGTAGTGGGCCATC GCCCTGATAGACGGTTTTTTCGCCCTTGACGTTGGAGTCCACGTT CTTTAATAGTGGACTCTTGTTCCAACTGGAACAACACTCAACC TATCTCGGGCTATTCTTTGATTTATAAGGGATTTTGCCGATTCG GCCTATTGGTTAAAAATGAGCTGATTTAACAAAAATTTAACGC GAATTTTAAACAAAATATTAACGTTTACAATTTTATGGTGCCTCT CAGTACAATCTGCTCTGATGCCGCATAGTTAAGCCAGCCCCGAC ACCCGCCAACACCCGCTGACGCGCCCTGACGGGCTTGTCTGCTCC CGGCATCCGCTTACAGACAAGCTGTGACCGTCTCCGGGAGCTGC ATGTGTCAGAGGTTTTACCGTTCATACCGAAACGCGCGAGACG AAAGGGCTCGTGATACGCCTATTTTATAGGTTAATGTCATGAT AATAATGGTTTCTTAGACGTCAGGTGGCACTTTTCGGGGAAATGT GCGCGGAACCCCTATTTGTTATTTTCTAAATACATTCAAATAT GTATCCGCTCATGAGACAATAACCCTGATAAATGCTTCAATAAT ATTGAAAAGGAAGAGTATGAGTATTCAACATTTCCGTGTCGCC CTTATTCCTTTTTTTCGCGCATTTTGCTTCCCTGTTTTTGTCCACC AGAAACGCTGGTGAAAGTAAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTG CACGAGTGGGTTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAAGATC CTTGAGAGTTTTTCGCCCGAAGAACGTTTTTCCAATGATGAGCACT
----	----------	--

10

20

30

40

【表 4 - 2 5】

	<p>CTTTCTTTTTTCGCTATTGTA AAAATTCATGTTATATGGAGGGGGCA AAGTTTTTCAGGGTGTGTTTAGAATGGGAAGATGTCCCTTGTATC ACCATGGACCCTCATGATAATTTTGTTCCTTTCACCTTCTACTCTG TTGACAACCATTGTCTCCTCTTATTTTCTTTTCATTTTCTGTAACCTT TTTCGTTAAACTTTAGCTTGCATTTGTAACGAATTTTAAATTCAC TTTTGTTTATTTGTGAGATTGTAAGTACTTTCTCTAATCACTTTTT TTTCAAGGCAATCAGGGTATATTATATTGTACTTCAGCACAGTTT TAGAGAACAATTGTTATAATTAATGATAAGGTAGAAATATTTCT GCATATAAATTCTGGCTGGCGTGGAAATATTCTTATTGGTAGAAA CAACTACACCCTGGTCATCATCCTGCCTTTCTCTTTATGGTTACA ATGATATACACTGTTTGAGATGAGGATAAAAATACTCTGAGTCCA AACCGGGCCCCTCTGCTAACCATGTTTCATGCCTTCTTCTTTTCT ACAGCTCCTGGGCAACGTGCTGGTTGTTGTGCTGTCTCATCATTT TGGCAAAGAATTCTCGACGGATCCGCCATGAAGTGCCTTTTGTGA CTTAGCCTTTTTATTCAATTGGGGTGAATTGCAAGTTCACCATAGT TTTTCCACACAACCAAAAAGGAAACTGGAAAAATGTTCTTCTA ATTACCATTATTGCCCGTCAAGCTCAGATTTAAATTGGCATAATG ACTTAATAGGCACAGCCTTACAAGTCAAAATGCCCAAGAGTCAC AAGGCTATTCAAGCAGACGGTTGGATGTGTCATGCTTCCAATG GGTCACTACTTGTGATTTCCGCTGGTATGGACCGAAGTATATAAC ACATTCCATCCGATCCTTCACTCCATCTGTAGAACAATGCAAGGA AAGCATTGAACAAACGAAACAAGGAACTTGGCTGAATCCAGGCT TCCCTCTCAAAGTTGTGGATATGCAACTGTGACGGATGCCGAA GCAGTGATTGTCCAGGTGACTCCTCACCATGTGCTGGTTGATGAA TACACAGGAGAATGGGTTGATTCACAGTTCATCAACGGAAAATG CAGCAATTACATATGCCCCACTGTCCATAACTCTACAACCTGGCA TTCTGACTATAAGGTCAAAGGGCTATGTGATTCTAACCTCATTTC CATGGACATCACCTTCTTCTCAGAGGACGGAGAGCTATCATCCCT GGGAAAGGAGGGCACAGGGTTCAGAAGTAACTACTTTGCTTATG AAACTGGAGGCAAGGCCTGCAAAATGCAATACTGCAAGCATTGG GGAGTCAGACTCCCATCAGGTGTCTGGTTCGAGATGGCTGATAA GGATCTCTTGTGCTGCAGCCAGATTCCCTGAATGCCCAGAAGGGTC AAGTATCTCTGCTCCATCTCAGACCTCAGTGGATGTAAGTCTAAT TCAGGACGTTGAGAGGATCTTGGATTATTCCCTCTGCCAAGAAA CCTGGAGCAAATCAGAGCGGGTCTTCCAATCTCTCCAGTGGAT CTCAGCTATCTTGCTCCTAAAAACCCAGGAACCGGTCTGCTTTC ACCATAATCAATGGTACCCTAAAATACTTTGAGACCAGATACAT CAGAGTCGATATTGCTGCTCCAATCCTCTCAAGAATGGTCGGAAT GATCAGTGGAACCTACCACAGAAAGGGAAGTGTGGGATGACTGG GCACCATATGAAGACGTGGAAATTGGACCCAATGGAGTTCTGAG GACCAGTTCAGGATATAAGTTTCCTTTATACATGATTGGACATGG TATGTTGGACTCCGATCTTCATCTTAGCTCAAAGGCTCAGGTGTT CGAACATCCTCACATTCAAGACGCTGCTTCGCAACTTCTGATGA TGAGAGTTTATTTTTTGGTGATACTGGGCTATCCAAAAATCCAAT CGAGCTTGTAAGGTTGGTTCAGTAGTTGGAAAAGCTCTATTG CCTCTTTTTTCTTTATCATAGGGTTAATCATTGGACTATTCTTGGT TCTCCGAGTTGGTATCCATCTTTGCATTAATTAAGCACACCAA GAAAAGACAGATTTATACAGACATAGAGATGAACCGACTTGGA AGTGATAAGGATCCGTCGAGGAATTCCTCCTCAGGTGCAGGCT GCCTATCAGAAGGTGGTGGCTGGTGTGGCCAATGCCCTGGCTCA CAAATACCACTGAGATCTTTTTCCCTCTGCCAAAAATTATGGGGA CATCATGAAGCCCCTTGAGCATCTGACTTCTGGCTAATAAAGGA AATTTATTTTCATTGCAATAGTGTGTTGGAATTTTTTGTGCTCTC ACTCGGAAGGACATATGGGAGGGCAAATCATTAAACATCAGA</p>	<p>10</p> <p>20</p> <p>30</p> <p>40</p>
--	---	---

【表 4 - 2 6】

	<p>ATGAGTATTTGGTTT TAGAGTTTGGCAACATATGCCCATATGCTGG CTGCCATGAACAAAGGTTGGCTATAAAGAGGTCATCAGTATATG AAACAGCCCCCTGCTGTCCATTCCCTTATTCCATAGAAAAGCCTTG ACTTGAGGTTAGATTTTTTTTTATATTTTGTGTTTGTGTTATTTTTTC TTTAAACATCCCTAAAATTTTCCTTACATGTTTTACTAGCCAGATTT TTCTCCTCCTCCTGACTACTCCCAGTCATAGCTGTCCCTCTTCTCT TATGGAGATCCCTCGACGGATCGGCCGCAATTTCGTAATCATGTC ATAGCTGTTTCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAATTCACA CAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAGCCTGGGGTGCCT AATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCCG CTTTCCAGTCGGGAAACCTGTCGTGCCAGCTGCATTAATGAATCG GCCAACGCGCGGGGAGAGGGCGGTTTTCGCTATTGGGCGCTCTTCC GCTTCCCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTCGTTTCGGCTGCGG CGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCAC AGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAAGGC CAGCAAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTT TTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAAATCGAC GCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATAC CAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCGCTCTCCTGTTCCG ACCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCCTTTCTCCCTTCGGGA AGCGTGGCGCTTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTTCG GTGTAGGTCGTTTCGCTCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCC GTTCAGCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAG TCCAACCCGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCAC TGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAG AGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGAACA GTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGAAAA AGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACCACCGCTGGTAG CGGTGGTTTTTTTGTGTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAA AAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACG CTCAGTGGAACGAAAACCTCACGTTAAGGGATTTTGGTTCATGAGA TTATCAAAAAGGATCTTACCTAGATCCTTTTAAATTAATAAATGA AGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAACTTGGTCTGAC AGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGT CTATTTTCGTTTCCATAGTTGCTGACTCCCCGTCGTGTAGATA ACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGCTGCAAT GATACCGCGAGACCCACGCTCACCGGCTCCAGATTTATCAGCAA TAAACCAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCTGCTG AACTTTATCCGCCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGCCGGGAAGC TAGAGTAAAGTAGTTCGCCAGTTAATAGTTTTCGCAACGTTGTTGC CATTGCTACAGGCATCGTGGTGTACGCTCGTCGTTTGGTATGGC TTCATTGCTCAGCTCCGGTTCCCAACGATCAAGGCGAGTTACATGATC CCCCATGTTGTGCAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGGTCTCCTCGAT CGTTGTCAGAAGTAAGTTGGCCGCAAGTGTATCACTCATGGTTAT GGCAGCACTGCATAATTCTCTTACTGTCATGCCATCCGTAAGATG CTTTTCTGTGACTGGTGAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATA GTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTGCCCCGGCGTCAATACGGG ATAATACCGCGCCACATAGCAGAACTTTAAAAGTGCTCATCATT GGAAAACGTTCTTCGGGGCGAAAACCTCTCAAGGATCTTACCGCT GTTGAGATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGTGCACCCAACTGATC TTCAGCATCTTTTACTTTTACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAAC AGGAAGGCAAAAATGCCGCAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGG AAATGTTGAATACTCATACTCTTCTTTTCAATATTATTGAAGC ATTTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGT</p>	<p>10</p> <p>20</p> <p>30</p> <p>40</p>
--	--	---

【表 4 - 27】

		<p>ATTTAGAAAAATAAACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCCG AAAAGTGCCACCTAAATTGTAAGCGTTAATATTTTGTAAAATTC GCGTTAAATTTTTGTAAATCAGCTCATTTTTTAACCAATAGGCC GAAATCGGCAAAATCCCTTATAAATCAAAGAATAGACCGAGAT AGGGTTGAGTGTGTTCCAGTTTGAACAAGAGTCCACTATTA AGAACGTGGACTCCAACGTCAAAGGGGCGAAAAACCGTCTATCAG GGCGATGGCCACTACGTGAACCATCACCTAATCAAGTTTTTTG GGGTCGAGGTGCCGTAAAGCACTAAATCGGAACCTAAAGGGA GCCCCGATTTAGAGCTTGACGGGGAAAGCCGGCGAACGTGGCG AGAAAGGAAGGGAAGAAAGCGAAAGGAGCGGGCGCTAGGGCG CTGGCAAGTGTAGCGGTCACGCTGCGCGTAACCACCACCCCGC CGCGCTTAATGCGCCGCTACAGGGCGCGTCCCATTGCCATTCAG GCTGCGCAACTGTTGGGAAGGGCGATCGGTGCGGGCCTCTTCGC TATTACGCCAGCTGGCGAAAGGGGGATGTGCTGCAAGGCGATTA AGTTGGGTAACGCCAGGGTTTTCCAGTCACGACGTTGAAAAC GACGGCCAGTGAGCGCGCGTAATACGACTACTATAGGGCGAAT TGGAGCTCCACCGCGGTGGCGGCCGCTCTAGA</p>	10
83	PSPAX2 デルタ Rev	<p>GTCGACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGG GGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCCGCGTTACATAAC TTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCGC CCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATA GGGACTTTCATTGACGTCAATGGGTGGACTATTTACGGTAAACT GCCCCTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCC CCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGC CCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTA CGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGGTGCGAGGTGAGCCCCACGT TCTGCTTCACTCTCCCCATCTCCCCCCCCCTCCCCACCCCAATTT GTATTTATTTATTTTTTAATTATTTTGTGCAGCGATGGGGGCGGG GGGGGGGGGGGCGCGCGCCAGGCGGGGCGGGGCGGGGCGAGGG GCGGGGCGGGGCGAGGCGGAGAGGTGCGGCGGCAGCCAATCAG AGCGGCGCGCTCCGAAAGTTTCTTTTATGGCGAGGCGGCGGCG GCGGCGGCCCTATAAAAAGCGAAGCGCGCGGGCGGGGAGTC GCTGCGTTGCCTTCGCCCCGTGCCCCGCTCCGCGCCGCTCGCGC CGCCCCCGGCTCTGACTGACCGCGTTACTCCCACAGGTGAG CGGGCGGGACGGCCCTTCTCCTCCGGGCTGTAATTAGCGCTTGGT TTAATGACGGCTCGTTTCTTTTCTGTGGCTGCGTGAAAGCCTTAA AGGGCTCCGGGAGGGCCCTTTGTGCGGGGGGAGCGGCTCGGGG GGTGCGTGCCTGTGTGTGTGCGTGGGGAGCGCCGCGTGCGGCCC GCGCTGCCCGGCGGCTGTGAGCGCTGCGGGCGCGGCGCGGGGCT TTGTGCGCTCCGCGTGTGCGCGAGGGGAGCGCGGCCGGGGGCGG TGCCCCGCGGTGCGGGGGGGCTGCGAGGGGAACAAAGGCTGCG TGCGGGGTGTGTGCGTGGGGGGGTGAGCAGGGGGTGTGGGCGC GGCGGTGCGGCTGTAACCCCCCTGCACCCCCCTCCCCAGTTG CTGAGCACGGCCCGGCTTCGGGTGCGGGGCTCCGTGCGGGGCGT GGCGCGGGGCTCGCCGTGCCGGGCGGGGGGTGGCGGCAGGTGG GGGTGCCGGGCGGGGCGGGGCGCCCTCGGGCCGGGGAGGGCTC GGGGAGGGGCGCGGCGGCCCGGAGCGCCGGCGGCTGTGAG GCGCGGCGAGCCGAGCCATTGCCTTTTATGGTAATCGTGCGAG AGGGCGCAGGGACTTCTTTTGTCCCAAATCTGGCGGAGCCGAA TCTGGGAGGCGCCGCGCACCCCTCTAGCGGGCGCGGGCGAAG CGGTGCGGCGCCGCGAGGAAGGAAATGGGCGGGGAGGGCCTTC GTGCGTCCCGCGCCGCGGCTCCCTTCTCCATCTCCAGCCTCGGG GCTGCCGCGAGGGGACGGCTGCCTTCGGGGGGGACGGGGCAGG GCGGGGTTCCGGCTTCTGGCGTGTGACCGGCGGCTCTAGAGCCTCT</p>	20
			30
			40

【表 4 - 2 8】

	<p>GCTAACCATGTTTCATGCCTTCTTCTTTTTCTACAGCTCCTGGGCA ACGTGCTGGTTATTGTGCTGTCTCATCATTTTTGGCAAAGAATTCG GGCCGGCCGCGTTGACGCGCACGGCAAGAGGGCGAGGGGGCGGCG ACTGGTGAGAGATGGGTGCGAGAGCGTCAGTATTAAGCGGGGG AGAATTAGATCGATGGGAAAAAATTCGGTTAAGGCCAGGGGGA AAGAAAAAATATAAATTAACATATAGTATGGGCAAGCAGGG AGCTAGAACGATTTCGCAGTTAATCCTGGCCTGTTAGAAACATCA GAAGGCTGTAGACAAATACTGGGACAGCTACAACCATCCCTTCA GACAGGATCAGAAGAACTTAGATCATTATATAATACAGTAGCAA CCCTCTATTGTGTGCATCAAAGGATAGAGATAAAAGACACCAAG GAAGCTTTAGACAAGATAGAGGAAGAGCAAAACAAAAGTAAGA AAAAAGCACAGCAAGCAGCAGCTGACACAGGACACAGCAATCA GGTCAGCCAAAATTACCCTATAGTGCAGAACATCCAGGGGCAAA TGGTACATCAGGCCATATCACCTAGAACTTTAAATGCATGGGTA AAAGTAGTAGAAGAGAAGGCTTTCAGCCAGAAGTGATACCCAT GTTTTCAGCATTATCAGAAGGAGCCACCCACAAGATTTAAACA CCATGCTAAACACAGTGGGGGGACATCAAGCAGCCATGCAAATG TAAAAGAGACCATCAATGAGGAAGCTGCAGAATGGGATAGAG TGCATCCAGTGCATGCAGGGCCTATTGCACCAGGCCAGATGAGA GAACCAAGGGGAAGTGACATAGCAGGAACTACTAGTACCCTTCA GGAACAAATAGGATGGATGACACATAATCCACCTATCCCAGTAG GAGAAATCTATAAAAGATGGATAATCCTGGGATTAATAAAATA GTAAGAATGTATAGCCCTACCAGCATTCTGGACATAAGACAAGG ACCAAAGGAACCCTTTAGAGACTATGTAGACCGATTCTATAAAA CTCTAAGAGCCGAGCAAGCTTACAAGAGGTAAAAAATTGGATG ACAGAAACCTTGTGGTCCAAAATGCGAACCAGATTGTAAGAC TATTTTAAAAGCATTGGGACCAGGAGCGACACTAGAAGAAATGA TGACAGCATGTCAGGGAGTGGGGGGACCCGGCCATAAAGCAAG AGTTTTGGCTGAAGCAATGAGCCAAGTAACAAATCCAGCTACCA TAATGATACAGAAAGGCAATTTTAGGAACCAAAGAAAGACTGTT AAGTGTTC AATTGTGGCAAAGAAGGGCACATAGCCAAAATTG CAGGGCCCCTAGGAAAAAGGGCTGTTGGAAATGTGGAAAGGAA GGACACCAAATGAAAGATTGTAAGTACTGAGAGACAGGCTAATTTTT AGGGAAGATCTGGCCTTCCCACAAGGGAAGGCCAGGGAATTTTC TTCAGAGCAGACCAGAGCCAACAGCCCACCAGAAGAGAGCTTC AGGTTTGGGGAAGAGACAACAACCTCCCTCTCAGAAGCAGGAGCC GATAGACAAGGAACTGTATCCTTTAGCTTCCCTCAGATCACTCTT TGGCAGCGACCCCTCGTCAATAAAGATAGGGGGGCAATTA GGAAGCTCTATTAGATACAGGAGCAGATGATACAGTATTAGAAG AAATGAATTTGCCAGGAAGATGGAAACCAAAAATGATAGGGGG AATTGGAGGTTTTATCAAAGTAGGACAGTATGATCAGATACTCA TAGAAATCTGCGGACATAAAGCTATAGGTACAGTATTAGTAGGA CCTACACCTGTCAACATAATTGGAAGAAATCTGTTGACTCAGATT GGCTGCACTTTAAATTTCCATTAGTCCTATTGAGACTGTACCA GTAAAATTAAGCCAGGAATGGATGGCCAAAAGTTAAACAATG GCCATTGACAGAAGAAAAATAAAAGCATTAGTAGAAATTTGTA CAGAAATGGAAAAGGAAGGAAAAATTTCAAAAATTGGGCCTGA AAATCCATACAATACTCCAGTATTTGCCATAAAGAAAAAAGACA GTAATAATGGAGAAAATTAGTAGATTTAGAGAACTTAATAAG AGAACTCAAGATTTCTGGGAAGTTCAATTAGGAATACCACATCC TGCAGGGTTAAAACAGAAAAAATCAGTAACAGTACTGGATGTGG GCGATGCATATTTTTAGTTCCCTTAGATAAAGACTTCAGGAAGT ATACTGCATTTACCATACCTAGTATAAACAATGAGACACCAGGG ATTAGATATCAGTACAATGTGCTTCCACAGGGATGGAAAGGATC</p>
--	--

10

20

30

40

【表 4 - 2 9】

	<p>ACCAGCAATATTCCAGTGTAGCATGACAAAAATCTTAGAGCCTT TTAGAAAACAAAATCCAGACATAGTCATCTATCAATACATGGAT GATTTGTATGTAGGATCTGACTTAGAAATAGGGCAGCATAGAAC AAAAATAGAGGAACTGAGACAACATCTGTTGAGGTGGGGATTTA CCACACCAGACAAAAACATCAGAAAGAACCCTCATTCTTTGG ATGGGTTATGAACTCCATCCTGATAAATGGACAGTACAGCCTAT AGTGCTGCCAGAAAAGGACAGCTGGACTGTCAATGACATACAGA AATTAGTGGGAAAATTGAATTGGGCAAGTCAGATTTATGCAGGG ATTAAGTAAGGCAATTATGTAACTTCTTAGGGGAACCAAAGC ACTAACAGAAGTAGTACCACTAACAGAAGAAGCAGAGCTAGAA CTGGCAGAAAACAGGGAGATTCTAAAAGAACCGGTACATGGAG TGTATTATGACCCATCAAAGACTTAATAGCAGAAATACAGAAG CAGGGGCAAGGCCAATGGACATATCAAATTTATCAAGAGCCATT TAAAAATCTGAAAACAGGAAAATATGCAAGAATGAAGGGTGCC CACACTAATGATGTGAAACAATTAACAGAGGCAGTACAAAAAAT AGCCACAGAAAGCATAGTAATATGGGGAAAGACTCCTAAATTTA AATTACCATACAAAGGAAACATGGGAAGCATGGTGGACAGA GTATTGGCAAGCCACCTGGATTCTGAGTGGGAGTTTGTCAATAC CCCTCCCTTAGTGAAGTTATGGTACCAGTTAGAGAAAGAACCCA TAATAGGAGCAGAACTTTCTATGTAGATGGGGCAGCCAATAGG GAACTAAATTAGGAAAAGCAGGATATGTAAGTACAGAGGAA GACAAAAGTTGTCCCCTAACGGACACAACAATCAGAAGACT GAGTTACAAGCAATTCATCTAGCTTTGCAGGATTCGGGATTAGA AGTAAACATAGTGACAGACTCACAATATGCATTGGGAATCATT AAGCACAACCAGATAAGAGTGAATCAGAGTTAGTCAGTCAAATA ATAGAGCAGTTAATAAAAAAGGAAAAGTCTACCTGGCATGGGT ACCAGCACACAAAGGAATTGGAGGAAATGAACAAGTAGATGGG TTGGTCAGTGCTGGAATCAGGAAAGTACTATTTTTAGATGGAAT AGATAAGGCCCAAGAAGAACATGAGAAATATCACAGTAATTGG AGAGCAATGGCTAGTGATTTAACCTACCACCTGTAGTAGCAA AGAAATAGTAGCCAGCTGTGATAAATGTCAGCTAAAAGGGGAA GCCATGCATGGACAAGTAGACTGTAGCCAGGAATATGGCAGCT AGATTGTACACATTTAGAAGGAAAAGTTATCTTGGTAGCAGTTC ATGTAGCCAGTGGATATATAGAAGCAGAAGTAATTCCAGCAGAG ACAGGGCAAGAAACAGCATACTTCCTCTTAAAATTAGCAGGAAG ATGGCCAGTAAAACAGTACATACAGACAATGGCAGCAATTTCA CCAGTACTACAGTTAAGGCCGCTGTTGGTGGGCGGGGATCAAG CAGGAATTTGGCATTCCCTACAATCCCCAAAGTCAAGGAGTAAT AGAATCTATGAATAAAGAATTAAGAAAATTATAGGACAGGTAA GAGATCAGGCTGAACATCTTAAGACAGCAGTACAAATGGCAGTA TTCATCCACAATTTTAAAAGAAAAGGGGGGATTGGGGGGTACAG TGCAGGGGAAAGAATAGTAGACATAATAGCAACAGACATACAA ACTAAAGAATTACAAAACAAATTACAAAATTCAAAATTTTCG GGTTTATTACAGGGACAGCAGAGATCCAGTTTGGAAAGGACCAG CAAAGCTCCTCTGGAAAGGTGAAGGGGCAGTAGTAATACAAGAT AATAGTGACATAAAAGTAGTGCCAAGAAGAAAAGCAAAGATCA TCAGGGATTATGGAAAACAGATGGCAGGTGATGATTGTGTGGCA AGTAGACAGGATGAGGATTAACACATGGAATTCTGCAACAACCTG CTGTTTATCCATTTTCAAGAAATTGGAGGAGCTTTGTTCCCTGGGTTCT TGGGAGCAGCAGGAAGCACTATGGGCGCAGCGTCAATGACGCTG ACGGTACAGGCCAGACAATTATTGTCTGGTATAGTGCAGCAGCA GAACAATTTGCTGAGGGCTATTGAGGCGCAACAGCATCTGTTGC AACTCACAGTCTGGGGCATCAAGCAGCTCCAGGCAAGAATCCTG GCTGTGGAAAGATACCTAAAGGATCAACAGCTCCTGGGGATTTG</p>
--	--

10

20

30

40

【表 4 - 3 0】

	<p>GGGTTGCTCTGGAAAACATCTTGCACCACTGCTGTGCCTTGGAA TGCTAGTTGGAGTAATAAATCTCTGGAACAGATTTGGAATCACA CGACCTGGATGGAGTGGGACAGAGAAATTAACAATTACACAAGC TTGCTAGCAGATCTTTTTCCCTCTGCCAAAAATTATGGGGACATC ATGAAGCCCCCTGAGCATCTGACTTCTGGCTAATAAAGGAAATTT ATTTTCATTGCAATAGTGTGTTGGAATTTTTTGTGTCTCTCACTCG GAAGGACATATGGGAGGGCAAATCATTTAAAACATCAGAATGA GTATTTGGTTTAGAGTTTGGCAACATATGCCATATGCTGGCTGCC ATGAACAAAGGTGGCTATAAAGAGGGTCATCAGTATATGAAACAG CCCCCTGCTGTCCATTCCCTTATTCCATAGAAAAGCCTTGACTTGA GGTTAGATTTTTTTTATATTTTGTGTTATTTTTTTCTTTAAC ATCCCTAAAATTTTCCTTACATGTTTTACTAGCCAGATTTTTCTC CTCTCCTGACTACTCCCAGTCATAGCTGTCCCTCTTCTCTTATGAA GATCCCTCGACCTGCAGCCCAAGCTTGGCGTAATCATGGTCATA GCTGTTTCCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAAATCCACACAA CATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAGCCTGGGGTGCCTAAT GAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCCGCTT TCCAGTCGGGAAACCTGTGCGGCCAGCGGATCCGCATCTCAATT AGTCAGCAACCATAGTCCCGCCCCCTAACTCCGCCCATCCCGCCCC TAACTCCGCCCAGTTCCGCCCATTCTCCGCCCCATGGCTGACTAA TTTTTTTTATTTATGCAGAGGCCGAGGCCGCTCGGCCTCTGAGC TATTCCAGAAGTAGTGAGGAGGCTTTTTTGGAGGCCTAGGCTTTT GCAAAAAGCTAACTTGTTTATTGCAGCTTATAATGGTTACAAATA AAGCAATAGCATCACAAATTCACAAATAAAGCATTTTTTTTCACT GCATTCTAGTTGTGGTTTGTCCAAACTCATCAATGTATCTTATCA TGTCTGGATCCGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAG AGGCGGTTTGCATTTGGGCGCTCTTCCGCTTCTCGCTCACTGA CTCGCTGCGCTCGGTCGTTCCGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCA CTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACG CAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAAGGCCAGCAAAAAGGCCAGGAA CCGTAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCC CCCTGACGAGCATCACAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGC GAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCCTGGA AGCTCCCTCGTGCGCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGCTTACCGGA TACCTGTCCGCTTTCCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCCTAA TGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTGCTTCCGCTCC AAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCCGTTCAGCCCGACCGCTG CGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACA CGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCA GAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCCTGAAGTGGTGG CCTAACTACGGCTACACTAGAAGGACAGTATTTGGTATCTGCGCT CTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTG ATCCGGCAAACAACACCAGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTTGTTG CAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGAT CCTTTGATCTTTTCTACGGGTCTGACGCTCAGTGAACGAAAAC TCACGTTAAGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTC ACCTAGATCCTTTTAAATTAATAAATGAAGTTTTAAATCAATCTAA AGTATATATGAGTAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATC AGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTTCGTTCCATCCATA GTTGCCTGACTCCCCGTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGG CTTACCATCTGGCCCCAGTGCTGCAATGATACCGCGAGACCCAC GCTCACCGGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACCAGCCAGCCGGA AGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCTGCAACTTTATCCGCCTCCAT CCAGTCTATTAATTGTTGCCGGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCCGC</p>
--	---

10

20

30

40

【表 4 - 3 1】

		AGTTAATAGTTTGCGCAACGTTGTTGCCATTGCTACAGGCATCGT GGTGTACGCTCGTCGTTTGGTATGGCTTCATTCAGCTCCGGTTC CCAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCCATGTTGTGCAAAA AAGCGGTTAGCTCCTTCGGTCTCCGATCGTTGTCAGAAGTAAGT TGGCCGACAGTGTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATT CTCTTACTGTCATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGGTG AGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGTATGCGGCGACCG AGTTGCTCTTGCCCGGCGTCAATACGGGATAATACCGCGCCACA TAGCAGAACTTTAAAAGTGCTCATCATTGGAAAACGTTCTTCGG GGCGAAAACCTCAAGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTTCG ATGTAACCCACTCGTGCACCCAACTGATCTTCAGCATCTTTTACT TTCACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAAATGC CGCAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGGAAATGTTGAATACTC ATACTCTTCCTTTTTCAATATTATTGAAGCATTATCAGGGTTATT GTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAA CAAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCCGAAAAGTGCCACCTG	10
84	Vif miRNA 標的配列	AAGTTCAGAAGTACACATCCC	
85	Tat miRNA 標的配列	CTATGGCAGGAAGAAGCGGA	
86	3'制限認識部位 を有する伸長 因子1-アルファ (EF1-アルファ) プロモーター	CCGGTGCCTAGAGAAGGTGGCGCGGGGTAAACTGGGAAAGTGA TGTCGTGTACTGGCTCCGCCTTTTTCCCGAGGGTGGGGGAGAACC GTATATAAGTGCAGTAGTCGCCGTGAACGTTCTTTTTCGCAACGG GTTTGCCGCCAGAACACAGGTAAGTGCCGTGTGTGGTTCCCGCG GGCCTGGCCTCTTACGGGTTATGGCCCTTGCCTGCCTTGAATTA CTTCCACGCCCTGGCTGCAGTACGTGATTCTTGATCCCGAGCTT CGGGTTGGAAGTGGGTGGGAGAGTTCGAGGCCTTGCCTTAAGG AGCCCCCTCGCTCGTGTGAGTTGAGGCCTGGCCTGGGCGCTG GGGCCGCCGCGTGCGAATCTGGTGGCACCTTCGCGCCTGTCTCG TGCTTTCGATAAGTCTCTAGCCATTTAAAATTTTTGATGACCTGC TGCGACGCTTTTTTCTGGCAAGATAGTCTTGTAATGCGGGCCA AGATCTGCACACTGGTATTTTCGGTTTTTGGGGCCGCGGGCGGCG ACGGGGCCCCGTGCGTCCCAGCGCACATGTTTCGGCGAGGCGGGGC CTGCGAGCGCGGCCACCGAGAATCGGACGGGGGTAGTCTCAAGC TGGCCGGCCTGCTCTGGTGCCTGGCCTCGCGCCGCCGTGTATCGC CCCGCCCTGGGCGGCAAGGCTGGCCCCGGTCGGCACCAAGTTGCGT GAGCGGAAAGATGGCCGCTTCCCGGCCCTGCTGCAGGGAGCTCA AAATGGAGGACGCGGCGCTCGGGAGAGCGGGCGGGTGAGTCAC CCACACAAAGGAAAAGGGCCTTTCCGTCCTCAGCCGTCGCTTCA TGTGACTCCACGGAGTACCGGGCGCCGTCCAGGCACCTCGATTA GTTCTCGAGCTTTTGGAGTACGTCGTCTTTAGGTTGGGGGGAGGG GTTTTATGCGATGGAGTTTCCCCACACTGAGTGGGTGGAGACTG AAGTTAGGCCAGCTTGGCACTTGTATGTAATTCTCCTTGGAAATTTG CCTTTTTGGAGTTTGGATCTTGGTTCATTCTCAAGCCTCAGACAG TGGTTCAAAGTTTTTTTTCTTCCATTTCAAGGTGTCGTGATGTACA	20 30 40
87	5'および3'制限 認識部位を 有する miR30 CCR5 コード配列	TGTACAAGGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCGACTGTAAACTGA GCTTGCTCTACTGTGAAGCCACAGATGGGTAGAGCAAGCACAGT TTACCGCTGCCTACTGCCTCGGACTTCAAGGGGCTTGCTAGC	

【表 4 - 3 2】

88	5'制限認識部位を有するmiR21 Vifコード配列	CCCGGGCATCTCCATGGCTGTACCACCTTGTCTGGGGGATGTGTACTTCTGAACTTGTGTTGAATCTCATGGAGTTCAGAAGAACACATCCGCACTGACATTTTGGTATCTTTCATCTGACCA
89	5'および3'制限認識部位を有するmiR185 Tatコード配列	GCTAGCGGGCCTGGCTCGAGCAGGGGGCGAGGGATTCCGCTTCTTCCTGCCATAGCGTGGTCCCCCTCCCCTATGGCAGGCAGAAGCGGCACCTTCCCCTCCCAATGACCGCGTCTTCGTCCCCGGG

【 0 3 2 0】

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

【 図 1】

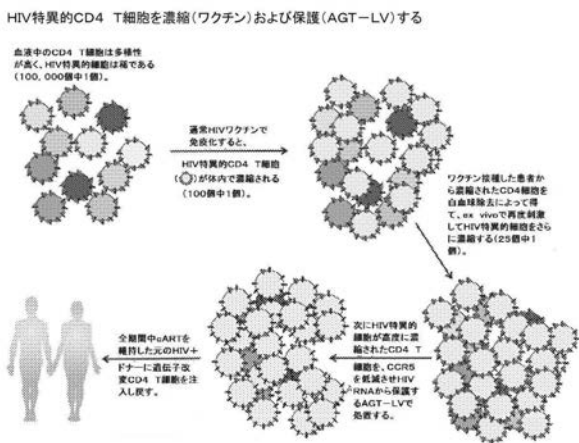


Figure 1

【 図 2】

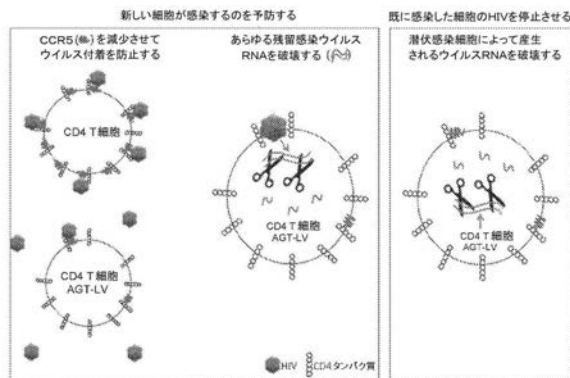


Figure 2

【 図 3 】

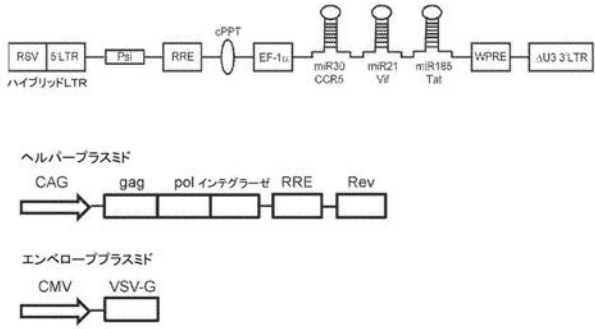


Figure 3

【 図 4 】

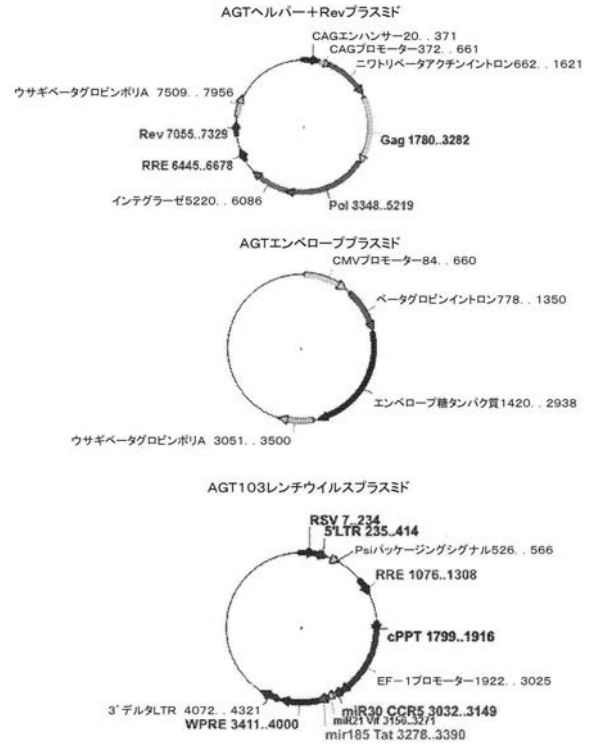


Figure 4

【 図 5 】

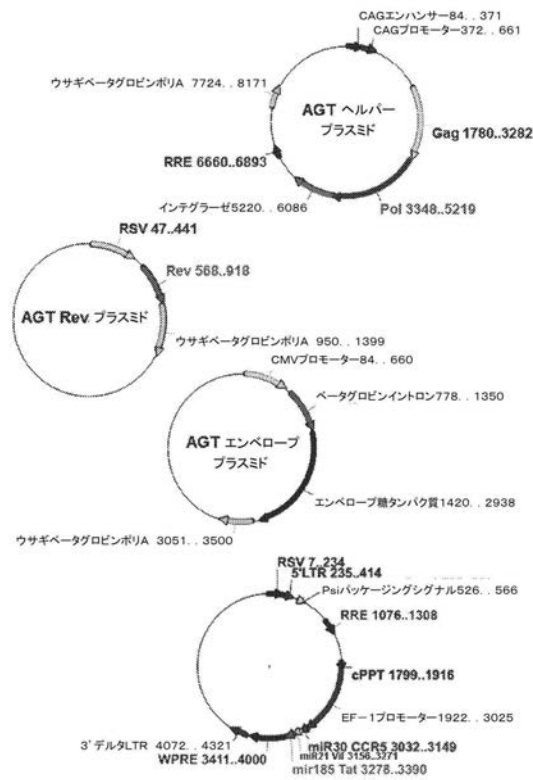


Figure 5

【 図 6 】

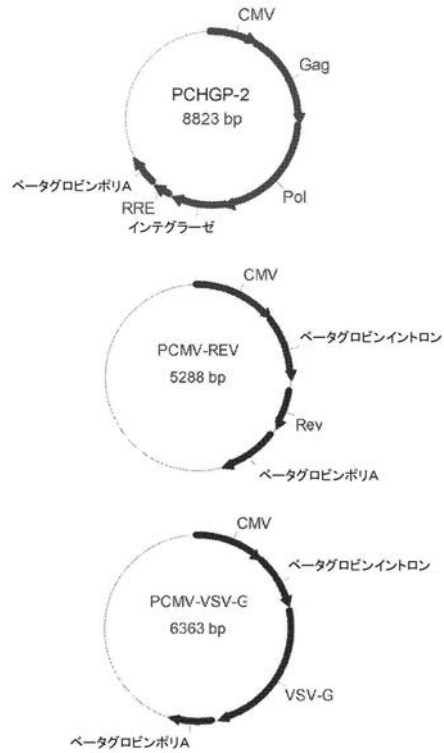


Figure 6

【 図 1 1 】

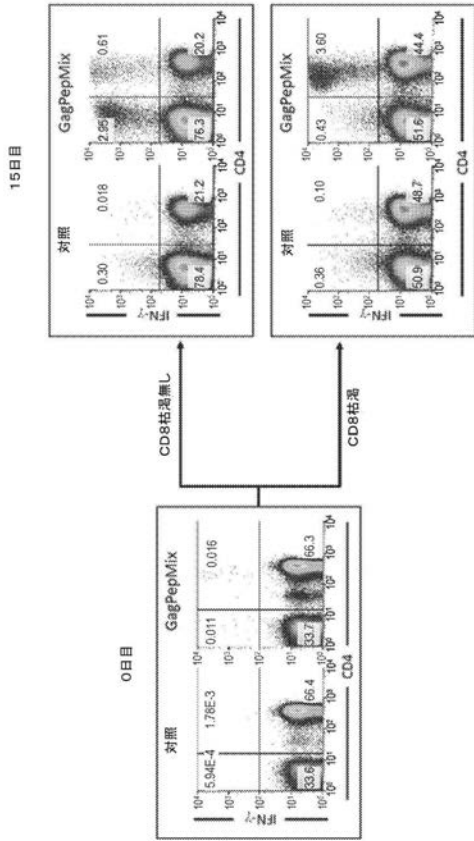


Figure 11

【 図 1 2 】

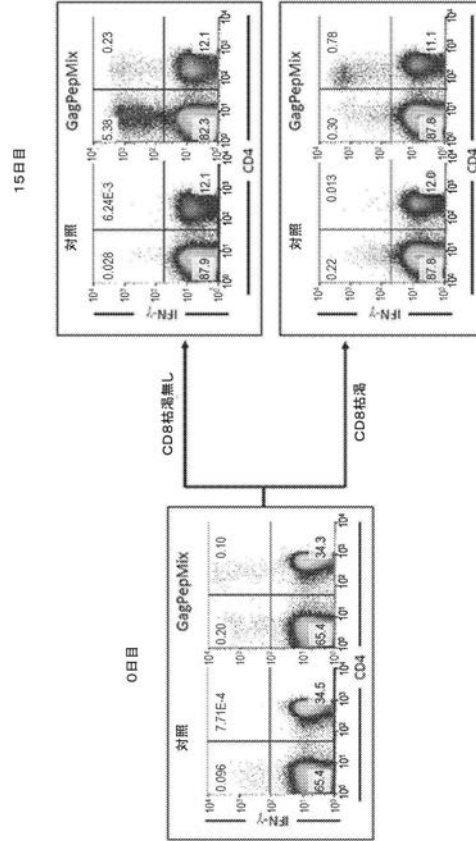


Figure 12

【 図 1 3 】

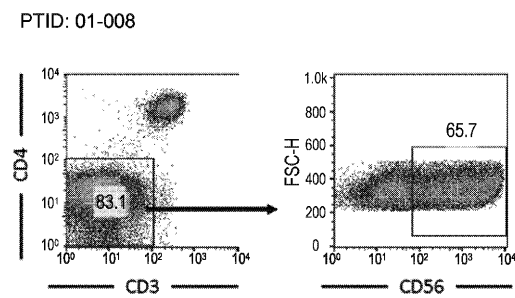


Figure 13

【 図 1 4 】

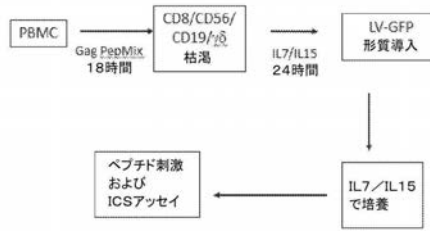
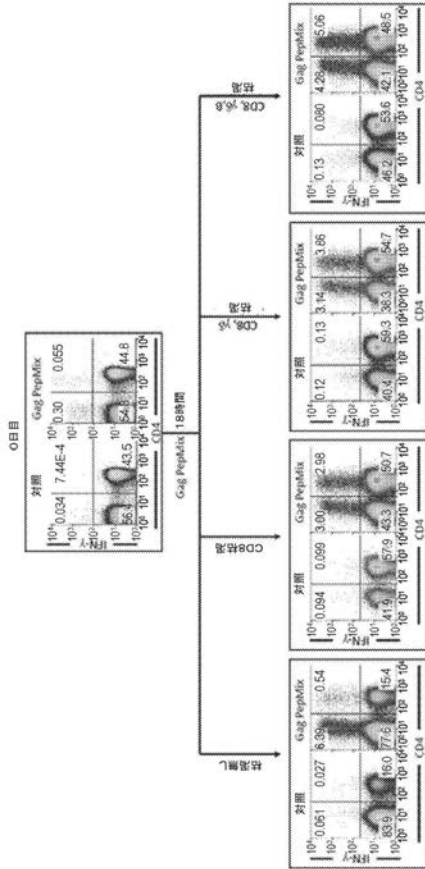


Figure 14

【 図 1 5 】

PTID: 医薬11677の精度



【 図 1 7 】

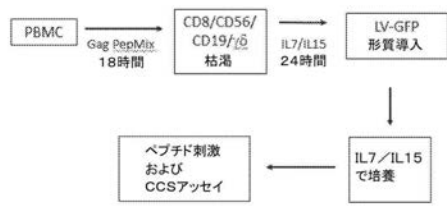


Figure 17

【 図 1 6 】

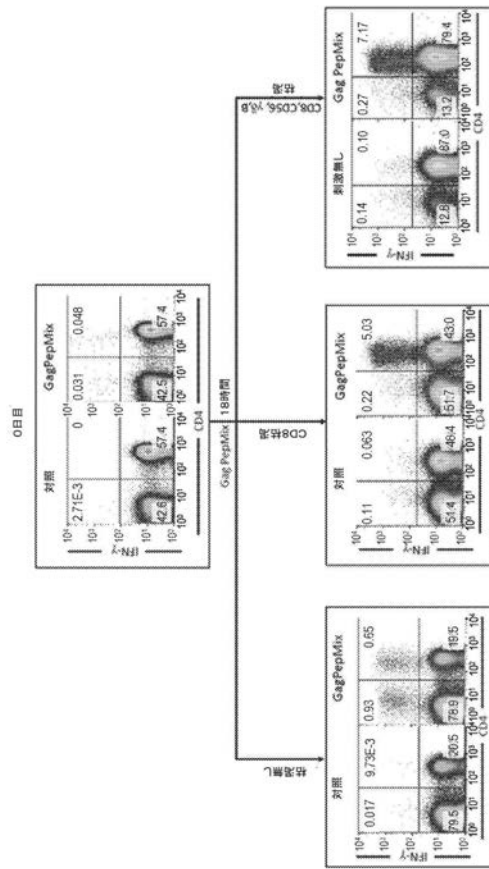


Figure 16

【 図 1 8 】

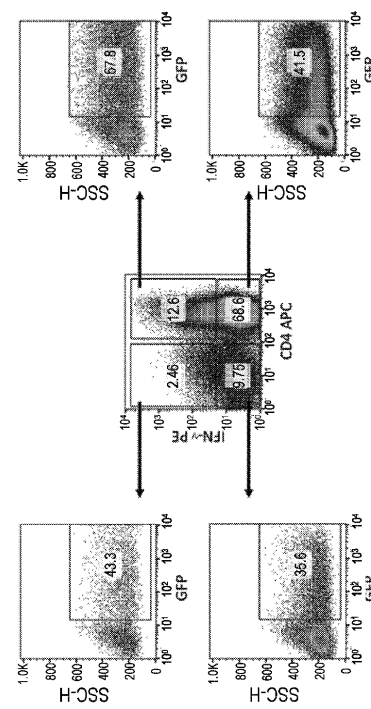


Figure 18

【配列表】

2021519069000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2019/024410

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8) - A61K 35/12; A61K 35/15; A61K 35/17; A61K 39/21; C07K 14/155; C12N 5/0783 (2019.01) CPC - A61K 35/17; A61K 39/12; A61K 39/21; A61K 2035/124; A61K 2039/5156; C12N 15/1132; C12N 15/1138; C12N 2310/141; C12N 2740/16011 (2019.05)		
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) See Search History document		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched USPC - 424/188.1; 424/208.1; 435/375; 514/44A; 514/3.8; 536/24.5 (keyword delimited)		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) See Search History document		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2017/139065 A1 (AMERICAN GENE TECHNOLOGIES INTERNATIONAL INC.) 17 August 2017 (17.08.2017) entire document	11-13
Y		1-10, 14-17
Y	US 2017/0037369 A1 (JUNO THERAPEUTICS, INC.) 09 February 2017 (09.02.2017) entire document	1-10, 14-17
Y	WO 2016/189159 A1 (GE HEALTHCARE BIO-SCIENCES AB) 01 December 2016 (01.12.2016) entire document	2
A	WO 2017/139065 A1 (AMERICAN GENE TECHNOLOGIES INTERNATIONAL INC.) 17 August 2017 (17.08.2017) entire document	1-17
A	WO 2017/007994 A1 (AMERICAN GENE TECHNOLOGIES INTERNATIONAL INC.) 12 January 2017 (12.01.2017) entire document	1-17
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> 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 09 July 2019		Date of mailing of the international search report 22 JUL 2019
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300		Authorized officer Blaine R. Copenheaver PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (January 2015)

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 35/17 (2015.01)	C 1 2 N 5/0783	
A 6 1 P 31/18 (2006.01)	A 6 1 K 35/17	
	A 6 1 P 31/18	

(81) 指定国・地域 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, RO, 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, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, 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

(74) 代理人 230113332
 弁護士 山本 健策

(72) 発明者 リ, ハイシャン
 アメリカ合衆国 メリーランド 20850, ロックビル, メディカル センター ドライブ
 9640

(72) 発明者 パウザ, チャールズ デイビッド
 アメリカ合衆国 メリーランド 20850, ロックビル, メディカル センター ドライブ
 9640

F ターム(参考) 4B065 AA93X AA93Y AA94X AA94Y AA97Y AB01 AC14 BA02 CA23 CA44
 CA45
 4C087 AA01 AA02 BB43 BB65 NA14 ZB33
 4H045 AA10 AA30 BA10 CA05 DA50 DA86 EA20