



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0104586
(43) 공개일자 2019년09월10일

- | | |
|--|--|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
 <i>A61K 39/21</i> (2006.01) <i>A61K 31/713</i> (2006.01)
 <i>A61K 35/14</i> (2015.01) <i>A61K 39/00</i> (2006.01)
 <i>A61P 31/18</i> (2006.01) <i>C07K 14/005</i> (2006.01)
 <i>C12N 15/86</i> (2006.01) <i>C12N 5/078</i> (2010.01)</p> <p>(52) CPC특허분류
 <i>A61K 39/21</i> (2013.01)
 <i>A61K 31/713</i> (2013.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2019-7023287
 (22) 출원일자(국제) 2018년01월09일
 심사청구일자 없음
 (85) 번역문제출일자 2019년08월07일
 (86) 국제출원번호 PCT/US2018/012998
 (87) 국제공개번호 WO 2018/129540
 국제공개일자 2018년07월12일</p> <p>(30) 우선권주장
 62/444,147 2017년01월09일 미국(US)</p> | <p>(71) 출원인
 아메리칸 진 테크놀로지스 인터내셔널 인코포레이티드
 미국 20850 메릴랜드주 록빌 메디컬 센터 드라이브 9640</p> <p>(72) 발명자
 리 하이산
 미국 20850 메릴랜드주 록빌 메디컬 센터 드라이브 9640
 라후젠 타일러
 미국 20850 메릴랜드주 록빌 메디컬 센터 드라이브 9640
 (뒷면에 계속)</p> <p>(74) 대리인
 특허법인코리아나</p> |
|--|--|

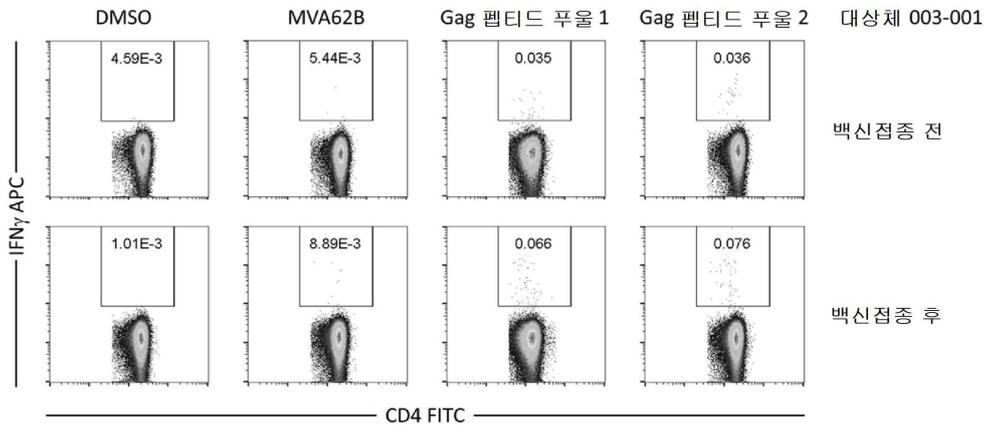
전체 청구항 수 : 총 73 항

(54) 발명의 명칭 예비-면역화 단계가 없는 HIV 면역요법

(57) 요약

본 발명은 일반적으로 HIV 의 치료 및 예방을 위한 면역요법에 관한 것이다. 특히, 본 공개는 예비-면역화 단계 없이 HIV 를 치료하는데 최적화되는 렌티바이러스 벡터 및 관련되는 방법을 제공한다.

대표도



(52) CPC특허분류

A61K 35/14 (2013.01)
A61P 31/18 (2018.01)
C07K 14/005 (2013.01)
C12N 15/86 (2013.01)
C12N 5/0634 (2013.01)
A61K 2039/5154 (2013.01)
A61K 2039/5156 (2013.01)
C12N 2710/24143 (2013.01)
C12N 2740/16034 (2013.01)

(72) 발명자

샤오 링지

미국 20850 메릴랜드주 록빌 메디컬 센터 드라이브
9640

파우자 찰스 데이비드

미국 20850 메릴랜드주 록빌 메디컬 센터 드라이브
9640

명세서

청구범위

청구항 1

HIV 로 감염된 세포를 치료하는 방법으로서, 하기 단계를 포함하는 방법:

(a) HIV 로 감염된 대상체로부터 단리된 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC) 를 치료적 유효량의 자극제와 접촉시키는 단계로서, 접촉이 생체외에서 (*ex vivo*) 수행되는 단계;

(b) PBMC 를 생체외에서 적어도 하나의 유전적 요소를 인코딩하는 바이러스 전달 시스템으로 형질도입하는 단계; 및

(c) 형질도입된 PBMC 를 적어도 1 일 동안 배양하는 단계.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 형질도입된 PBMC 가 약 1 내지 약 35 일 배양되는 치료 방법.

청구항 3

제 1 항에 있어서, 형질도입된 PBMC 를 대상체 내로 주입하는 단계를 추가로 포함하는 치료 방법.

청구항 4

제 3 항에 있어서, 대상체가 인간인 치료 방법.

청구항 5

제 1 항에 있어서, 자극제가 펩티드를 포함하는 치료 방법.

청구항 6

제 5 항에 있어서, 펩티드가 gag 펩티드를 포함하는 치료 방법.

청구항 7

제 1 항에 있어서, 자극제가 백신을 포함하는 치료 방법.

청구항 8

제 7 항에 있어서, 백신이 HIV 백신을 포함하는 치료 방법.

청구항 9

제 8 항에 있어서, HIV 백신이 MVA/HIV62B 백신 또는 그의 변이체를 포함하는 치료 방법.

청구항 10

제 1 항에 있어서, 바이러스 전달 시스템이 렌티바이러스 입자를 포함하는 치료 방법.

청구항 11

제 1 항에 있어서, 적어도 하나의 유전적 요소가 케모카인 수용체 CCR5 의 생산을 저해할 수 있는 소형 RNA 또는 HIV RNA 서열을 표적화할 수 있는 적어도 하나의 소형 RNA 를 포함하는 치료 방법.

청구항 12

제 1 항에 있어서, 적어도 하나의 유전적 요소가 케모카인 수용체 CCR5 의 생산을 저해할 수 있는 소형 RNA 및 HIV RNA 서열을 표적화할 수 있는 적어도 하나의 소형 RNA 를 포함하는 치료 방법.

청구항 13

제 11 항 또는 제 12 항에 있어서, HIV RNA 서열이 HIV Vif 서열, HIV Tat 서열, 또는 그의 변이체를 포함하는 치료 방법.

청구항 14

제 11 항 또는 제 12 항에 있어서, 적어도 하나의 유전적 요소가 microRNA 또는 shRNA 를 포함하는 치료 방법.

청구항 15

제 14 항에 있어서, 적어도 하나의 유전적 요소가 microRNA 클러스터를 포함하는 치료 방법.

청구항 16

제 14 항에 있어서, 적어도 하나의 유전적 요소가

AGGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCGACTGTAAACTGAGCTTGCTCTACTGT
GAAGCCACAGATGGGTAGAGCAAGCACAGTTTACCGCTGCCTACTGCCTCG
GACTTCAAGGGGCTT (SEQ ID NO: 1)

와 적어도 80%, 또는 적어도 85%, 또는 적어도 90%, 또는 적어도 95% 동일성을 갖는 microRNA 를 포함하는 치료 방법.

청구항 17

제 14 항에 있어서, 적어도 하나의 유전적 요소가 하기를 포함하는 치료 방법:

AGGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCGACTGTAAACTGAGCTTGCTCTACTGT
GAAGCCACAGATGGGTAGAGCAAGCACAGTTTACCGCTGCCTACTGCCTCG
GACTTCAAGGGGCTT (SEQ ID NO: 1).

청구항 18

제 14 항에 있어서, 적어도 하나의 유전적 요소가 하기를 갖는 microRNA 를 포함하는 치료 방법:

a.

CATCTCCATGGCTGTACCACCTTGTCGGGGGATGTGTACTTCTGAAC
TTGTGTTGAATCTCATGGAGTTCAGAAGAACACATCCGCACTGACAT
TTTGGTATCTTTCATCTGACCA (SEQ ID NO: 2)

와 적어도 80%, 또는 적어도 85%, 또는 적어도 90%, 또는 적어도 95% 동일성; 또는

b.

GGGCCTGGCTCGAGCAGGGGGCGAGGGATTCCGCTTCTTCCTGCCAT
AGCGTGGTCCCCTCCCCTATGGCAGGCAGAAGCGGCACCTTCCCTCC
CAATGACCGCGTCTTCGTCTCG (SEQ ID NO: 3)

와 적어도 80%, 또는 적어도 85%, 또는 적어도 90%, 또는 적어도 95% 동일성.

청구항 19

제 14 항에 있어서, 적어도 하나의 유전적 요소가 하기를 포함하는 치료 방법:

a.

CATCTCCATGGCTGTACCACCTTGTCGGGGGATGTGTACTTCTGAAC
TTGTGTTGAATCTCATGGAGTTCAGAAGAACACATCCGCACTGACAT
TTTGGTATCTTTCATCTGACCA (SEQ ID NO: 2); 또는

b.

GGGCCTGGCTCGAGCAGGGGGCGAGGGATTCCGCTTCTTCCTGCCAT
AGCGTGGTCCCCTCCCCTATGGCAGGCAGAAGCGGCACCTTCCCCTCC
CAATGACCGCGTCTTCGTCG (SEQ ID NO: 3).

청구항 20

제 15 항에 있어서, microRNA 클러스터가

AGGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCGACTGTAAACTGAGCTTGCTCTACTGT
GAAGCCACAGATGGGTAGAGCAAGCACAGTTTACCGCTGCCTACTGCCTCG
GACTTCAAGGGGCTTCCCGGCATCTCCATGGCTGTACCACCTTGTCTGGGG
GATGTGTACTTCTGAACTTGTGTTGAATCTCATGGAGTTCAGAAGAACACA
TCCGCACTGACATTTTGGTATCTTTCATCTGACCAGCTAGCGGGCCTGGCTC
GAGCAGGGGGCGAGGGATTCCGCTTCTTCCTGCCATAGCGTGGTCCCCTCC
CCTATGGCAGGCAGAAGCGGCACCTTCCCCTCCAATGACCGCGTCTTCGTC
(SEQ ID NO: 31)

와 적어도 80%, 또는 적어도 85%, 또는 적어도 90%, 또는 적어도 95% 동일성을 갖는 서열을 포함하는 치료 방법.

청구항 21

제 15 항에 있어서, microRNA 클러스터가 하기를 포함하는 치료 방법:

AGGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCGACTGTAAACTGAGCTTGCTCTACTGT
GAAGCCACAGATGGGTAGAGCAAGCACAGTTTACCGCTGCCTACTGCCTCG
GACTTCAAGGGGCTTCCCGGCATCTCCATGGCTGTACCACCTTGTCTGGGG
GATGTGTACTTCTGAACTTGTGTTGAATCTCATGGAGTTCAGAAGAACACA
TCCGCACTGACATTTTGGTATCTTTCATCTGACCAGCTAGCGGGCCTGGCTC
GAGCAGGGGGCGAGGGATTCCGCTTCTTCCTGCCATAGCGTGGTCCCCTCC
CCTATGGCAGGCAGAAGCGGCACCTTCCCCTCCAATGACCGCGTCTTCGTC
(SEQ ID NO: 31).

청구항 22

대상체에서의 HIV 감염을 치료하는 방법으로서, 하기 단계를 포함하는 방법:

- (a) 백혈구를 대상체로부터 제거하고, 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC) 를 정제하는 단계;
- (b) PBMC 를 생체외에서 치료적 유효량의 자극제와 접촉시키는 단계;
- (c) PBMC 를 생체외에서 적어도 하나의 유전적 요소를 인코딩하는 바이러스 전달 시스템으로 형질도입하는 단계; 및
- (d) 형질도입된 PBMC 를 적어도 1 일 동안 배양하는 단계.

청구항 23

제 22 항에 있어서, 형질도입된 PBMC 가 약 1 내지 약 35 일 배양되는 치료 방법.

청구항 24

제 22 항에 있어서, 형질도입된 PBMC 를 대상체 내로 주입하는 단계를 추가로 포함하는 치료 방법.

청구항 25

제 22 항 내지 제 24 항 중 어느 한 항에 있어서, 대상체가 인간인 치료 방법.

청구항 26

제 22 항에 있어서, 자극제가 펩티드를 포함하는 치료 방법.

청구항 27

제 26 항에 있어서, 자극제가 gag 펩티드를 포함하는 치료 방법.

청구항 28

제 22 항에 있어서, 자극제가 백신을 포함하는 치료 방법.

청구항 29

제 28 항에 있어서, 백신이 HIV 백신을 포함하는 치료 방법.

청구항 30

제 29 항에 있어서, HIV 백신이 MVA/HIV62B 백신 또는 그의 변이체를 포함하는 치료 방법.

청구항 31

제 22 항에 있어서, 바이러스 전달 시스템이 렌티바이러스 입자를 포함하는 치료 방법.

청구항 32

제 22 항에 있어서, 적어도 하나의 유전적 요소가 케모카인 수용체 CCR5 의 생산을 저해할 수 있는 소형 RNA 또는 HIV RNA 서열을 표적화할 수 있는 적어도 하나의 소형 RNA 를 포함하는 치료 방법.

청구항 33

제 22 항에 있어서, 적어도 하나의 유전적 요소는 케모카인 수용체 CCR5 의 생산을 저해할 수 있는 소형 RNA 및 HIV RNA 서열을 표적화할 수 있는 적어도 하나의 소형 RNA 를 포함하는 치료 방법.

청구항 34

제 32 항 또는 제 33 항에 있어서, HIV RNA 서열이 HIV Vif 서열, HIV Tat 서열, 또는 그의 변이체를 포함하는 치료 방법.

청구항 35

제 32 항 또는 제 33 항에 있어서, 적어도 하나의 유전적 요소가 microRNA 또는 shRNA 를 포함하는 치료 방법.

청구항 36

제 35 항에 있어서, 적어도 하나의 유전적 요소가 microRNA 클러스터를 포함하는 치료 방법.

청구항 37

제 35 항에 있어서, 적어도 하나의 유전적 요소가 하기를 갖는 microRNA 를 포함하는 치료 방법:

a.

AGGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCGACTGTAAACTGAGCTTGCTCT
ACTGTGAAGCCACAGATGGGTAGAGCAAGCACAGTTTACCGCTGCC
TACTGCCTCGGACTTCAAGGGGCTT (SEQ ID NO: 1)

와 적어도 80%, 또는 적어도 85%, 또는 적어도 90%, 또는 적어도 95% 동일성.

청구항 38

제 35 항에 있어서, 적어도 하나의 유전적 요소가 하기를 포함하는 치료 방법:

AGGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCGACTGTAAACTGAGCTTGCTCTACTGT
GAAGCCACAGATGGGTAGAGCAAGCACAGTTTACCGCTGCCTACTGCCTCG
GACTTCAAGGGGCTT (SEQ ID NO: 1).

청구항 39

제 35 항에 있어서, 적어도 하나의 유전적 요소가 하기를 갖는 microRNA 를 포함하는 치료 방법:

a.

CATCTCCATGGCTGTACCACCTTGTCGGGGGATGTGTACTTCTGAAC
TTGTGTTGAATCTCATGGAGTTCAGAAGAACACATCCGCACTGACAT
TTTGGTATCTTTCATCTGACCA (SEQ ID NO: 2)

와 적어도 80%, 또는 적어도 85%, 또는 적어도 90%, 또는 적어도 95% 동일성; 또는

b.

GGGCCTGGCTCGAGCAGGGGGCGAGGGATTCCGCTTCTTCCTGCCAT
AGCGTGGTCCCCTCCCCTATGGCAGGCAGAAGCGGCACCTTCCCCTCC
CAATGACCGCGTCTTCGTCG (SEQ ID NO: 3)

와 적어도 80%, 또는 적어도 85%, 또는 적어도 90%, 또는 적어도 95% 동일성.

청구항 40

제 35 항에 있어서, 적어도 하나의 유전적 요소가 하기를 포함하는 치료 방법:

a.

CATCTCCATGGCTGTACCACCTTGTCGGGGGATGTGTACTTCTGAAC
TTGTGTTGAATCTCATGGAGTTCAGAAGAACACATCCGCACTGACAT
TTTGGTATCTTTCATCTGACCA (SEQ ID NO: 2); 또는

b.

GGGCCTGGCTCGAGCAGGGGGCGAGGGATTCCGCTTCTTCCTGCCAT
AGCGTGGTCCCCTCCCCTATGGCAGGCAGAAGCGGCACCTTCCCCTCC
CAATGACCGCGTCTTCGTCG (SEQ ID NO: 3).

청구항 41

제 36 항에 있어서, microRNA 클러스터가 하기와 적어도 80%, 또는 적어도 85%, 또는 적어도 90%, 또는 적어도 95% 동일성을 갖는 서열을 포함하는 치료 방법:

AGGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCGACTGTAAACTGAGCTTGCTCTACTGT
 GAAGCCACAGATGGGTAGAGCAAGCACAGTTTACCGCTGCCTACTGCCTCG
 GACTTCAAGGGGCTTCCCGGGCATCTCCATGGCTGTACCACCTTGTCTGGGG
 GATGTGTACTTCTGAACTTGTGTTGAATCTCATGGAGTTCAGAAGAACA
 TCCGCACTGACATTTTGGTATCTTTCATCTGACCAGCTAGCGGGCCTGGCTC
 GAGCAGGGGGCGAGGGATTCCGCTTCTTCCTGCCATAGCGTGGTCCCCTCC
 CCTATGGCAGGCAGAAGCGGCACCTTCCCTCCCAATGACCGCGTCTTCGTC
 (SEQ ID NO: 31).

청구항 42

제 36 항에 있어서, microRNA 클러스터가 하기를 포함하는 치료 방법:

AGGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCGACTGTAAACTGAGCTTGCTCTACTGT
 GAAGCCACAGATGGGTAGAGCAAGCACAGTTTACCGCTGCCTACTGCCTCG
 GACTTCAAGGGGCTTCCCGGGCATCTCCATGGCTGTACCACCTTGTCTGGGG
 GATGTGTACTTCTGAACTTGTGTTGAATCTCATGGAGTTCAGAAGAACA
 TCCGCACTGACATTTTGGTATCTTTCATCTGACCAGCTAGCGGGCCTGGCTC
 GAGCAGGGGGCGAGGGATTCCGCTTCTTCCTGCCATAGCGTGGTCCCCTCC
 CCTATGGCAGGCAGAAGCGGCACCTTCCCTCCCAATGACCGCGTCTTCGTC
 (SEQ ID NO: 31).

청구항 43

적어도 하나의 인코딩된 유전적 요소를 포함하는 렌티바이러스 벡터로서, 적어도 하나의 인코딩된 유전적 요소가 케모카인 수용체 CCR5의 생산을 저해할 수 있는 소형 RNA 또는 HIV RNA 서열을 표적화할 수 있는 적어도 하나의 소형 RNA를 포함하며, HIV RNA 서열이 HIV Vif 서열, HIV Tat 서열, 또는 그의 변이체를 포함하는 렌티바이러스 벡터.

청구항 44

적어도 하나의 인코딩된 유전적 요소를 포함하는 렌티바이러스 벡터로서, 적어도 하나의 인코딩된 유전적 요소가 케모카인 수용체 CCR5의 생산을 저해할 수 있는 소형 RNA 및 HIV RNA 서열을 표적화할 수 있는 적어도 하나의 소형 RNA를 포함하며, HIV RNA 서열이 HIV Vif 서열, HIV Tat 서열, 또는 그의 변이체를 포함하는 렌티바이러스 벡터.

청구항 45

제 43 항 또는 제 44 항에 있어서, 적어도 하나의 인코딩된 유전적 요소가 microRNA 또는 shRNA를 포함하는 렌티바이러스 벡터.

청구항 46

제 45 항에 있어서, 적어도 하나의 인코딩된 유전적 요소가 microRNA 클러스터를 포함하는 렌티바이러스 벡터.

청구항 47

제 45 항에 있어서, 적어도 하나의 인코딩된 유전적 요소가 하기를 갖는 microRNA를 포함하는 렌티바이러스 벡터:

a.

AGGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCGACTGTAAACTGAGCTTGCTCT
 ACTGTGAAGCCACAGATGGGTAGAGCAAGCACAGTTTACCGCTGCC
 TACTGCCTCGGACTTCAAGGGGCTT (SEQ ID NO: 1)

와 적어도 80%, 또는 적어도 85%, 또는 적어도 90%, 또는 적어도 95% 동일성.

청구항 48

제 47 항에 있어서, 적어도 하나의 인코딩된 유전적 요소가 하기를 포함하는 렌티바이러스 벡터:

AGGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCGACTGTAAACTGAGCTTGCTCTACTGT
GAAGCCACAGATGGGTAGAGCAAGCACAGTTTACCGCTGCCTACTGCCTCG
GACTTCAAGGGGCTT (SEQ ID NO: 1).

청구항 49

제 45 항에 있어서, 적어도 하나의 인코딩된 유전적 요소가 하기를 갖는 microRNA 를 포함하는 렌티바이러스 벡터:

a.

CATCTCCATGGCTGTACCACCTTGTCGGGGGATGTGTACTTCTGAAC
TTGTGTTGAATCTCATGGAGTTCAGAAGAACACATCCGCACTGACAT
TTTGGTATCTTTCATCTGACCA (SEQ ID NO: 2)

와 적어도 80%, 또는 적어도 85%, 또는 적어도 90%, 또는 적어도 95% 동일성; 또는

b.

GGGCCTGGCTCGAGCAGGGGGCGAGGGATTCCGCTTCTTCCTGCCAT
AGCGTGGTCCCCTCCCCTATGGCAGGCAGAAGCGGCACCTTCCCTCC
CAATGACCGCGTCTTCGTCG (SEQ ID NO: 3)

와 적어도 80%, 또는 적어도 85%, 또는 적어도 90%, 또는 적어도 95% 동일성.

청구항 50

제 45 항에 있어서, 적어도 하나의 인코딩된 유전적 요소가 하기를 포함하는 렌티바이러스 벡터:

a.

CATCTCCATGGCTGTACCACCTTGTCGGGGGATGTGTACTTCTGAAC
TTGTGTTGAATCTCATGGAGTTCAGAAGAACACATCCGCACTGACAT
TTTGGTATCTTTCATCTGACCA (SEQ ID NO: 2); 또는

b.

GGGCCTGGCTCGAGCAGGGGGCGAGGGATTCCGCTTCTTCCTGCCAT
AGCGTGGTCCCCTCCCCTATGGCAGGCAGAAGCGGCACCTTCCCTCC
CAATGACCGCGTCTTCGTCG (SEQ ID NO: 3).

청구항 51

제 46 항에 있어서, microRNA 클러스터가 하기와 적어도 80%, 또는 적어도 85%, 또는 적어도 90%, 또는 적어도 95% 동일성을 갖는 서열을 포함하는 렌티바이러스 벡터:

AGGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCGACTGTAAACTGAGCTTGCTCTACTGT
 GAAGCCACAGATGGGTAGAGCAAGCACAGTTTACCGCTGCCTACTGCCTCG
 GACTTCAAGGGGCTTCCCGGGCATCTCCATGGCTGTACCACCTTGTCGGGG
 GATGTGTACTTCTGAACTTGTGTTGAATCTCATGGAGTTCAGAAGAACA
 TCCGCACTGACATTTTGGTATCTTTCATCTGACCAGCTAGCGGGCCTGGCTC
 GAGCAGGGGGCGAGGGATTCCGCTTCTTCCCTGCCATAGCGTGGTCCCCTCC
 CCTATGGCAGGCAGAAGCGGCACCTTCCCTCCCAATGACCGCGTCTTCGTC
 (SEQ ID NO: 31).

청구항 52

제 46 항에 있어서, microRNA 클러스터가 하기를 포함하는 렌티바이러스 벡터:

AGGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCGACTGTAAACTGAGCTTGCTCTACTGT
 GAAGCCACAGATGGGTAGAGCAAGCACAGTTTACCGCTGCCTACTGCCTCG
 GACTTCAAGGGGCTTCCCGGGCATCTCCATGGCTGTACCACCTTGTCGGGG
 GATGTGTACTTCTGAACTTGTGTTGAATCTCATGGAGTTCAGAAGAACA
 TCCGCACTGACATTTTGGTATCTTTCATCTGACCAGCTAGCGGGCCTGGCTC
 GAGCAGGGGGCGAGGGATTCCGCTTCTTCCCTGCCATAGCGTGGTCCCCTCC
 CCTATGGCAGGCAGAAGCGGCACCTTCCCTCCCAATGACCGCGTCTTCGTC
 (SEQ ID NO: 31).

청구항 53

렌티바이러스 입자를 발현시키기 위한 렌티바이러스 벡터 시스템으로서, 하기를 포함하는 시스템:

- a. 제 43 항 내지 제 52 항 중 어느 한 항에 따른 렌티바이러스 벡터;
- b. 세포를 감염시키기 위해 최적화된 외피 단백질을 발현시키기 위한 외피 플라스미드; 및
- c. gag, pol, 및 rev 유전자를 발현시키기 위한 적어도 하나의 헬퍼 플라스미드,

여기에서 렌티바이러스 벡터, 외피 플라스미드, 및 적어도 하나의 헬퍼 플라스미드가 패키징 세포주 내로 트랜스펙션될 때, 렌티바이러스 입자가 패키징 세포주에 의해 생산되며, 렌티바이러스 입자는 케모카인 수용체 CCR5의 생산을 저해하거나 또는 HIV RNA 서열을 표적화할 수 있음.

청구항 54

제 53 항에 있어서, 시스템이 gag 및 pol 유전자를 발현시키기 위한 제 1 헬퍼 플라스미드, 및 rev 유전자를 발현시키기 위한 제 2 플라스미드를 포함하는 렌티바이러스 벡터 시스템.

청구항 55

세포를 감염시킬 수 있는 렌티바이러스 입자로서, 세포를 감염시키기 위해 최적화된 외피 단백질, 및 제 43 항 내지 제 52 항 중 어느 한 항에 따른 렌티바이러스 벡터를 포함하는 렌티바이러스 입자.

청구항 56

제 55 항에 있어서, 외피 단백질이 T 세포를 감염시키기 위해 최적화되어 있는 렌티바이러스 입자.

청구항 57

제 56 항에 있어서, 외피 단백질이 CD4+ T 세포를 감염시키기 위해 최적화되어 있는 렌티바이러스 입자.

청구항 58

CD4+ T 세포를 포함하는 변형된 세포로서, CD4+ T 세포가 제 55 항 내지 제 57 항 중 어느 한 항에 따른 렌티바

이러스 입자로 감염된 변형된 세포.

청구항 59

제 58 항에 있어서, CD4+ T 세포가 HIV 항원을 또한 인지하는 변형된 세포.

청구항 60

제 59 항에 있어서, HIV 항원이 gag 항원을 포함하는 변형된 세포.

청구항 61

제 58 항에 있어서, 렌티바이러스 입자로 감염 후에 CD4+ T 세포가 감소된 수준의 CCR5 를 발현하는 변형된 세포.

청구항 62

대상체를 치료적 처리 섭생법을 위해 선별하는 방법으로서, 하기 단계를 포함하는 방법:

(a) 백혈구를 대상체로부터 제거하고, 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC) 를 정제하고, PBMC 와 연관되는 적어도 하나의 인자와 연관되는 제 1 정량화가능한 측정값을 확인하는 단계; 및

(b) PBMC 를 생체의에서 치료적 유효량의 제 2 자극제와 접촉시키고, PBMC 와 연관되는 적어도 하나의 인자와 연관되는 제 2 정량화가능한 측정값을 확인하여,

제 2 정량화가능한 측정값이 제 1 정량화가능한 측정값보다 더 높을 때, 대상체가 처리 섭생법을 위해 선별되는 단계.

청구항 63

제 62 항에 있어서, PBMC 와 연관되는 적어도 하나의 인자가 T 세포 증식인 선별 방법.

청구항 64

제 62 항에 있어서, 적어도 하나의 인자가 IFN 감마 생산인 선별 방법.

청구항 65

제 1 항에 있어서, PBMC 로부터 세포의 적어도 하나의 부분집합을 고갈시키는 단계를 추가로 포함하며, 세포의 적어도 하나의 부분집합은 CD8+ T 세포, $\gamma \delta$ 세포, NK 세포, B 세포, 호중구, 호염기구, 호산구, T 조절 세포, NKT 세포, 및 적혈구 중 임의의 하나 이상을 포함하는 치료 방법.

청구항 66

제 65 항에 있어서, 고갈이 백혈구 제거 후에 일어나는 치료 방법.

청구항 67

제 65 항에 있어서, 고갈이 백혈구 제거와 동시에 일어나는 치료 방법.

청구항 68

제 22 항에 있어서, PBMC 로부터 세포의 적어도 하나의 부분집합을 고갈시키는 단계를 추가로 포함하며, 세포의 적어도 하나의 부분집합이 CD8+ T 세포, $\gamma \delta$ 세포, NK 세포, B 세포, 호중구, 호염기구, 호산구, T 조절 세포, NKT 세포, 및 적혈구 중 임의의 하나 이상을 포함하는 치료 방법.

청구항 69

제 68 항에 있어서, 고갈이 백혈구 제거 후에 일어나는 치료 방법.

청구항 70

제 68 항에 있어서, 고갈이 백혈구 제거와 동시에 일어나는 치료 방법.

청구항 71

제 62 항에 있어서, PBMC 로부터 세포의 적어도 하나의 부분집합을 고갈시키는 단계를 추가로 포함하며, 세포의 적어도 하나의 부분집합이 CD8+ T 세포, γ δ 세포, NK 세포, B 세포, 호중구, 호염기구, 호산구, T 조절 세포, NKT 세포, 및 적혈구 중 임의의 하나 이상을 포함하는 선별 방법.

청구항 72

제 71 항에 있어서, 고갈이 백혈구 제거 후에 일어나는 선별 방법.

청구항 73

제 71 항에 있어서, 고갈이 백혈구 제거와 동시에 일어나는 선별 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] **관련 출원의 상호참조**

[0002] 이 출원은 2017 년 1 월 9 일에 제출된 명칭 "에비-면역화 단계가 없는 HIV 면역요법" 의 미국 특허 출원 제 62/444,147 호에 대한 우선권을 주장하며, 상기의 공개는 본원에 참조로 포함된다.

[0003] **발명의 분야**

[0004] 본 발명은 일반적으로 HIV 의 치료 및 예방을 위한 면역요법의 분야에 관한 것이다. 특히, 개시된 치료 및 예방 방법은 에비-면역화 단계가 없는 유전자의 전달을 위한 바이러스 벡터 및 시스템의 투여 및 기타 치료적, 진단적, 또는 연구 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0005] 조합 항레트로바이러스 요법 (cART) (또한 고도 활성 항레트로바이러스 요법 또는 HAART 로서 알려짐) 은 HIV-1 복제를 제한하고 질환 진행을 지체시키지만, 약물 독성 및 약물-저항성 바이러스의 출현은 HIV-감염된 사람에서 장기간 제어에 관한 도전이다. 부가적으로는, 전통적 항-레트로바이러스 요법은, AIDS 의 발병 또는 사망을 지연시키는데에는 성공적이지만, 아직 기능적 치유를 제공하지는 않았다. 대안적 치료 전략이 필요하다.

[0006] HIV 감염에 관한 면역요법에 대한 강렬한 관심은 면역계가 HIV 복제를 제한함에 있어서, 비록 통상적으로는 불충분할지라도, 주요한 역할을 한다는 점을 시사하는 새로 나타나는 데이터에 의해 촉발되었다. 세포용해 T 세포 (CTL) 기능의 유지에 결정적인, 바이러스-특이적 T-헬퍼 세포가 아마도 일정한 역할을 수행할 것이다. 바이러스혈증은 또한 중화 항체에 의해 영향을 받지만, 그들은 일반적으로는 HIV 감염에서 규모가 낮고, 생체 내에서 (*in vivo*) 진화하는 바이러스 변이체를 따라잡지 못한다.

[0007] 이들 데이터는 함께 HIV-특이적 세포성 면역 응답의 강도 및 너비를 증가시키는 것이 소위 HIV 면역요법을 통한 임상적 유익을 가질 것이라는 점을 시사한다. 일부 연구는 HIV 에 대항하는 백신을 시험했으나, 현재까지 성공은 제한적이었다. 부가적으로는, 유전자 요법 기술을 활용함으로써 HIV 면역요법을 증가시키는 것에 대한 관심이 있어왔지만, 다른 면역요법 접근법에서와 같이, 성공은 제한적이었다.

[0008] 바이러스 벡터는 특이적 바이러스 외피-숙주 세포 수용체 상호작용 및 유전자 발현을 위한 바이러스 메카니즘 덕분에 표적 세포 내로 유전자를 형질도입하는데 사용될 수 있다. 그 결과, 바이러스 벡터는 전체 T 세포 또는 기타 면역 세포 뿐만 아니라 배아, 수정란, 단리된 조직 샘플, 인 시츄 (*in situ*) 조직 표적 및 배양되는 세포를 포함하는 많은 상이한 세포 유형 내로 유전자의 전달을 위한 비히클로서 사용되어 왔다. 세포에서 외래 또는 변경된 유전자를 도입하고 발현하는 능력은 치료적 개입 예컨대 유전자 요법, 유도된 다능성 줄기 세포의 체세포 재프로그래밍, 및 다양한 유형의 면역요법에 유용하다.

[0009] 유전자 요법은 바이러스 벡터의 사용을 수반할 수 있는 새로운 치료법을 창조하는 잠재성을 갖는 생체의학 연구의 가장 적합한 분야 중 하나이다. 요법에 이용가능한 매우 다양한 잠재적 유전자에 비추어, 감염성 및 비-감염성 질환을 치료하는 수단으로서의 유전자 요법의 가능성을 충족시키기 위해 이들 유전자를 전달하는 효율적

수단이 필요하다. 뮤린 레트로바이러스, 아데노바이러스, 파르보바이러스 (아데노-관련 바이러스), 백시니아 바이러스, 및 헤르페스 바이러스를 포함하는 여러 바이러스 시스템이 치료적 유전자 전달 벡터로서 개발되어 왔다.

[0010] 조직 향성, 바이러스 제제의 안정성, 발현의 안정성 및 제어, 게놈 패키징 (packaging) 능력, 및 구축물-의존적 벡터 안정성을 포함하는, 바이러스 벡터를 개발할 때 고려되어야 하는 많은 인자가 존재한다. 게다가, 바이러스 벡터의 생체내 적용은 종종 바이러스 구조적 단백질 및/또는 형질도입된 유전자 산물에 대항하는 숙주 면역 응답에 의해 제한된다.

[0011] 따라서, 독성 및 안전성은 대상체의 치료를 위해 생체내에서 사용될 바이러스 벡터에 관해 극복되어야 하는 핵심 장애물이다. 유전자 전달 비히클 또는 치료적 유전자 산물에 대항하는 숙주 면역 응답과 관련된 문제에 봉착한 인간에서의 유전자 요법 적용의 수많은 역사적 예가 존재한다. 여러 바이러스 유전자를 하나 이상의 치료적 유전자(들)와 함께 동시-형질도입하는 바이러스 벡터 (예를 들어, 아데노바이러스) 가 특히 문제가 많다.

[0012] 렌티바이러스 벡터는 일반적으로 세포독성을 유도하지 않고 강한 숙주 면역 응답을 유발하지 않지만, 여러 면역자극성 유전자 산물을 운반하는, 일부 렌티바이러스 벡터 예컨대 HIV-1 은 세포독성을 야기하고 강한 면역 응답을 생체내에서 유도하는 잠재성을 갖는다. 그러나, 이는 형질도입 후에 다수의 바이러스 유전자를 인코딩하지 않는 렌티바이러스 유래 형질도입 벡터에 관한 문제는 아닐 수 있다. 물론, 항상 그렇지는 않으며, 때때로 벡터의 목적은 임상적으로 유용한 면역 응답을 유발할 단백질을 인코딩하는 것이기 때문이다.

[0013] 렌티바이러스 벡터의 사용과 관련된 또다른 중요한 문제는 일부 세포독성 바이러스 단백질에 노출시 가능한 세포병원성의 문제이다. 특정 HIV-1 단백질에의 노출은 세포 사망 또는 기능적 무응답을 T 세포에서 유도할 수 있다. 마찬가지로, 재조합에 의해 복제-적격, 병독성 바이러스를 생성하는 가능성이 종종 문제이다. 따라서, HIV 의 개선된 치료법에 대한 필요가 남아 있다.

발명의 내용

[0014] 본 공개의 하나의 양상에서, 대상체에서의 HIV 감염을 치료하는 방법이 개시된다. 방법은 백혈구를 대상체로부터 제거하고, 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC) 를 정제하는 단계를 포함한다. 방법은 PBMC 를 생체외에서 (ex vivo) 치료적 유효량의 자극제와 접촉시키는 단계; PBMC 를 생체외에서 적어도 하나의 유전적 요소를 인코딩하는 바이러스 전달 시스템으로 형질도입하는 단계; 및 형질도입된 PBMC 를 적어도 1 일 동안 배양하는 단계를 추가로 포함한다. 형질도입된 PBMC 는 약 1 내지 약 35 일 배양될 수 있다. 방법은 형질도입된 PBMC 를 대상체 내로 주입하는 단계를 추가로 수반할 수 있다. 대상체는 인간일 수 있다. 자극제는 펩티드 또는 펩티드의 혼합물을 포함할 수 있다. 바람직한 구현예에서, 자극제는 gag 펩티드를 포함한다. 자극제는 백신을 포함할 수 있다. 백신은 HIV 백신일 수 있고, 바람직한 구현예에서, HIV 백신은 MVA/HIV62B 백신 또는 그의 변이체이다. 바람직한 구현예에서, 바이러스 전달 시스템은 렌티바이러스 입자를 포함한다.

하나의 구현예에서, 적어도 하나의 유전적 요소는 케모카인 수용체 CCR5 의 생산을 저해할 수 있는 소형 RNA 또는 HIV RNA 서열을 표적화할 수 있는 적어도 하나의 소형 RNA 를 포함할 수 있다. 또다른 구현예에서, 적어도 하나의 유전적 요소는 케모카인 수용체 CCR5 의 생산을 저해할 수 있는 소형 RNA 및 HIV RNA 서열을 표적화할 수 있는 적어도 하나의 소형 RNA 를 포함할 수 있다. HIV RNA 서열은 HIV Vif 서열, HIV Tat 서열, 또는 그의 변이체를 포함할 수 있다. 적어도 하나의 유전적 요소는 microRNA 또는 shRNA 를 포함할 수 있다. 바람직한 구현예에서, 적어도 하나의 유전적 요소는 microRNA 클러스터를 포함한다.

[0015] 또다른 양상에서, 적어도 하나의 유전적 요소는

```
AGGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCGACTGTAACTGAGCTTGCTCTACTGTGAAG
CCACAGATGGGTAGAGCAAGCACAGTTTACCGCTGCCTACTGCCTCGGACTTCAA
GGGGCTT (SEQ ID NO: 1)
```

[0016]

[0017] 와 적어도 80%, 또는 적어도 85%, 또는 적어도 90%, 또는 적어도 95% 동일성을 갖는 microRNA 를 포함한다. 바람직한 구현예에서, 적어도 하나의 유전적 요소는 하기를 포함한다:

AGGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCGACTGTAAACTGAGCTTGCTCTACTGTGAAG
 CCACAGATGGGTAGAGCAAGCACAGTTTACCGCTGCCTACTGCCTCGGACTTCAA
 GGGGCTT (SEQ ID NO: 1).

[0018]

또다른 양상에서, 적어도 하나의 유전적 요소는

[0019]

CATCTCCATGGCTGTACCACCTTGTCTGGGGGATGTGTACTTCTGAACTTGTGTTGA
 ATTCATGGAGTTCAGAAGAACACATCCGCACTGACATTTTGGTATCTTTCATCTG
 ACCA (SEQ ID NO: 2)

[0020]

와 적어도 80%, 또는 적어도 85%, 또는 적어도 90%, 또는 적어도 95% 동일성; 또는

[0021]

GGGCCTGGCTCGAGCAGGGGGCGAGGGATTCCGCTTCTTCCTGCCATAGCGTGG
 TCCCCTCCCCTATGGCAGGCAGAAGCGGCACCTTCCCTCCCAATGACCGCGTCTTC
 GTCG (SEQ ID NO: 3)

[0022]

와 적어도 80%, 또는 적어도 85%, 또는 적어도 90%, 또는 적어도 95% 동일성을 갖는 microRNA 를 포함한다.
 바람직한 구현예에서, 적어도 하나의 유전적 요소는 하기를 포함한다:

[0023]

CATCTCCATGGCTGTACCACCTTGTCTGGGGGATGTGTACTTCTGAACTTGTGTTGA
 ATTCATGGAGTTCAGAAGAACACATCCGCACTGACATTTTGGTATCTTTCATCTG
 ACCA (SEQ ID NO: 2), 또는
 GGGCCTGGCTCGAGCAGGGGGCGAGGGATTCCGCTTCTTC
 CTGCCATAGCGTGGTCCCCTCCCCTATGGCAGGCAGAAGCGGCACCTTCCCTCCCA
 ATGACCGCGTCTTCGTCG (SEQ ID NO: 3).

[0024]

또다른 양상에서, microRNA 클러스터는

[0025]

AGGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCGACTGTAAACTGAGCTTGCTCTACTGTGAAG
 CCACAGATGGGTAGAGCAAGCACAGTTTACCGCTGCCTACTGCCTCGGACTTCAA
 GGGGCTTCCCGGGCATCTCCATGGCTGTACCACCTTGTCTGGGGGATGTGTACTTCT
 GAACTTGTGTTGAATCTCATGGAGTTCAGAAGAACACATCCGCACTGACATTTTGG
 TATCTTTCATCTGACCAGCTAGCGGGCCTGGCTCGAGCAGGGGGCGAGGGATTCC
 GCTTCTTCCTGCCATAGCGTGGTCCCCTCCCCTATGGCAGGCAGAAGCGGCACCTT
 CCCTCCCAATGACCGCGTCTTCGTC (SEQ ID NO: 31)

[0026]

와 적어도 80%, 또는 적어도 85%, 또는 적어도 90%, 또는 적어도 95% 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 바람
 직한 구현예에서, microRNA 클러스터는 하기를 포함한다:

[0027]

AGGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCGACTGTAAACTGAGCTTGCTCT
 ACTGTGAAGCCACAGATGGGTAGAGCAAGCACAGTTTACCGCTGCCTACTGCCTC
 GGACTTCAAGGGGCTTCCCGGGCATCTCCATGGCTGTACCACCTTGTCTGGGGGATG
 TGTACTTCTGAACTTGTGTTGAATCTCATGGAGTTCAGAAGAACACATCCGCACTG
 ACATTTTGGTATCTTTCATCTGACCAGCTAGCGGGCCTGGCTCGAGCAGGGGGCGA
 GGGATTCCGCTTCTTCCTGCCATAGCGTGGTCCCCTCCCCTATGGCAGGCAGAAGC
 GGCACCTTCCCTCCCAATGACCGCGTCTTCGTC (SEQ ID NO: 31).

[0028]

또다른 양상에서, HIV 로 감염된 세포를 치료하는 방법이 제공된다. 방법은 HIV 로 감염된 대상체로부터 단
 리된 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC) 를 치료적 유효량의 자극제와 접촉시키는 단계로서, 접촉이 생체외에서 수행
 되는 단계; PBMC 를 생체외에서 적어도 하나의 유전적 요소를 인코딩하는 바이러스 전달 시스템으로 형질도입하
 는 단계; 및 형질도입된 PBMC 를 적어도 1 일 동안 배양하는 단계를 포함한다. 형질도입된 PBMC 는 약 1 내
 지 약 35 일 배양될 수 있다. 방법은 형질도입된 PBMC 를 대상체 내로 주입하는 단계를 추가로 수반할 수
 있다. 대상체는 인간일 수 있다. 자극제는 펩티드 또는 펩티드의 혼합물을 포함할 수 있고, 바람직한

[0029]

구현예에서 gag 펩티드를 포함한다. 자극제는 백신을 포함할 수 있다. 백신은 HIV 백신일 수 있고, 바람직한 구현예에서, HIV 백신은 MVA/HIV62B 백신 또는 그의 변이체이다. 바람직한 구현예에서, 바이러스 전달 시스템은 렌티바이러스 입자를 포함한다. 하나의 구현예에서, 적어도 하나의 유전적 요소는 케모카인 수용체 CCR5 의 생산을 저해할 수 있는 소형 RNA 또는 HIV RNA 서열을 표적화할 수 있는 적어도 하나의 소형 RNA 를 포함할 수 있다. 또다른 구현예에서, 적어도 하나의 유전적 요소는 케모카인 수용체 CCR5 의 생산을 저해할 수 있는 소형 RNA 및 HIV RNA 서열을 표적화할 수 있는 적어도 하나의 소형 RNA 를 포함할 수 있다. HIV RNA 서열은 HIV Vif 서열, HIV Tat 서열, 또는 그의 변이체를 포함할 수 있다. 적어도 하나의 유전적 요소는 microRNA 또는 shRNA 를 포함할 수 있다. 바람직한 구현예에서, 적어도 하나의 유전적 요소는 microRNA 클러스터를 포함한다.

[0030]

또다른 양상에서, 적어도 하나의 유전적 요소는

AGGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCGACTGTAAACTGAGCTTGCTCTACTGTGAAG
CCACAGATGGGTAGAGCAAGCACAGTTTACCGCTGCCTACTGCCTCGGACTTCAA
GGGGCTT (SEQ ID NO: 1)

[0031]

[0032]

와 적어도 80%, 또는 적어도 85%, 또는 적어도 90%, 또는 적어도 95% 동일성을 갖는 microRNA 를 포함한다. 바람직한 구현예에서, 적어도 하나의 유전적 요소는 하기를 포함한다:

AGGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCGACTGTAAACTGAGCTTGCTCTACTGTGAAG
CCACAGATGGGTAGAGCAAGCACAGTTTACCGCTGCCTACTGCCTCGGACTTCAA
GGGGCTT (SEQ ID NO: 1).

[0033]

[0034]

또다른 양상에서, 적어도 하나의 유전적 요소는

CATCTCCATGGCTGTACCACCTTGTCGGGGGATGTGTACTTCTGAACTTGTGTTGA
ATTCATGGAGTTCAGAAGAACACATCCGCACTGACATTTTGGTATCTTTCATCTG
ACCA (SEQ ID NO: 2)

[0035]

[0036]

와 적어도 80%, 또는 적어도 85%, 또는 적어도 90%, 또는 적어도 95% 동일성; 또는

GGGCCTGGCTCGAGCAGGGGGCGAGGGATTCCGCTTCTTCCTGCCATAGCGTGG
TCCCCTCCCCTATGGCAGGCAGAAGCGGCACCTTCCCTCCCAATGACCGCGTCTTC
GTCG (SEQ ID NO: 3)

[0037]

[0038]

와 적어도 80%, 또는 적어도 85%, 또는 적어도 90%, 또는 적어도 95% 동일성을 갖는 microRNA 를 포함한다. 바람직한 구현예에서, 적어도 하나의 유전적 요소는 하기를 포함한다:

CATCTCCATGGCTGTACCACCTTGTCGGGGGATGTGTACTTCTGAACTTGTGTTGA
ATTCATGGAGTTCAGAAGAACACATCCGCACTGACATTTTGGTATCTTTCATCTG
ACCA (SEQ ID NO: 2); 또는
GGGCCTGGCTCGAGCAGGGGGCGAGGGATTCCGCTTCTTC
CTGCCATAGCGTGGTCCCCTCCCCTATGGCAGGCAGAAGCGGCACCTTCCCCTCCCA
ATGACCGCGTCTTCGTCG (SEQ ID NO: 3).

[0039]

[0040]

또다른 양상에서, microRNA 클러스터는

AGGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCGACTGTAAACTGAGCTTGCTCTACTGTGAAG
CCACAGATGGGTAGAGCAAGCACAGTTTACCGCTGCCTACTGCCTCGGACTTCAA
GGGGCTTCCCAGGCATCTCCATGGCTGTACCACCTTGTCGGGGGATGTGTACTTCT
GAACTTGTGTTGAATCTCATGGAGTTCAGAAGAACACATCCGCACTGACATTTTGG
TATCTTTCATCTGACCAGCTAGCGGGCCTGGCTCGAGCAGGGGGCGAGGGATTCC
GCTTCTTCCTGCCATAGCGTGGTCCCCTCCCCTATGGCAGGCAGAAGCGGCACCTT
CCCCTCCCAATGACCGCGTCTTCGTC (SEQ ID NO: 31)

[0041]

[0042] 와 적어도 80%, 또는 적어도 85%, 또는 적어도 90%, 또는 적어도 95% 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 바람직한 구현예에서, microRNA 클러스터는 하기를 포함한다:

AGGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCGACTGTAAACTGAGCTTGCTCT
 ACTGTGAAGCCACAGATGGGTAGAGCAAGCACAGTTTACCGCTGCCTACTGCCTC
 GGACTTCAAGGGGCTTCCCGGGCATCTCCATGGCTGTACCACCTTGTCGGGGGATG
 TGTACTTCTGAACTTGTGTTGAATCTCATGGAGTTCAGAAGAACACATCCGCACTG
 ACATTTTGGTATCTTTCATCTGACCAGCTAGCGGGCCTGGCTCGAGCAGGGGGCGA
 GGGATCCGCTTCTTCCCTGCCATAGCGTGGTCCCCTCCCCTATGGCAGGCAGAAGC
 GGCACCTTCCCTCCCAATGACCGCGTCTTCGTC (SEQ ID NO: 31).

[0043]

[0044] 또다른 양상에서, 렌티바이러스 벡터가 개시된다. 렌티바이러스 벡터는 적어도 하나의 인코딩된 유전적 요소를 포함하며, 적어도 하나의 인코딩된 유전적 요소는 케모카인 수용체 CCR5의 생산을 저해할 수 있는 소형 RNA 또는 HIV RNA 서열을 표적화할 수 있는 적어도 하나의 소형 RNA를 포함한다. 또다른 양상에서, 적어도 하나의 인코딩된 유전적 요소는 케모카인 수용체 CCR5의 생산을 저해할 수 있는 소형 RNA 및 HIV RNA 서열을 표적화할 수 있는 적어도 하나의 소형 RNA를 포함한다. HIV RNA 서열은 HIV Vif 서열, HIV Tat 서열, 또는 그의 변이체를 포함할 수 있다. 적어도 하나의 인코딩된 유전적 요소는 microRNA 또는 shRNA를 포함할 수 있다. 적어도 하나의 인코딩된 유전적 요소는 microRNA 클러스터를 포함할 수 있다.

[0045]

또다른 양상에서, 적어도 하나의 유전적 요소는

AGGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCGACTGTAAACTGAGCTTGCTCTACTGTGAAG
 CCACAGATGGGTAGAGCAAGCACAGTTTACCGCTGCCTACTGCCTCGGACTTCAA
 GGGGCTT (SEQ ID NO: 1)

[0046]

[0047] 와 적어도 80%, 또는 적어도 85%, 또는 적어도 90%, 또는 적어도 95% 동일성을 갖는 microRNA를 포함한다. 바람직한 구현예에서, 적어도 하나의 유전적 요소는 하기를 포함한다:

AGGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCGACTGTAAACTGAGCTTGCTCTACTGTGAAG
 CCACAGATGGGTAGAGCAAGCACAGTTTACCGCTGCCTACTGCCTCGGACTTCAA
 GGGGCTT (SEQ ID NO: 1).

[0048]

[0049] 또다른 양상에서, 적어도 하나의 유전적 요소는

CATCTCCATGGCTGTACCACCTTGTCGGGGGATGTGTACTTCTGAACTTGTGTTGA
 ATCTCATGGAGTTCAGAAGAACACATCCGCACTGACATTTTGGTATCTTTCATCTG
 ACCA (SEQ ID NO: 2)

[0050]

[0051] 와 적어도 80%, 또는 적어도 85%, 또는 적어도 90%, 또는 적어도 95% 동일성; 또는

GGGCCTGGCTCGAGCAGGGGGCGAGGGATTCCGCTTCTTCCCTGCCATAGCGTGG
 TCCCCTCCCCTATGGCAGGCAGAAGCGGCACCTTCCCTCCCAATGACCGCGTCTTC
 GTCG (SEQ ID NO: 3)

[0052]

[0053] 와 적어도 80%, 또는 적어도 85%, 또는 적어도 90%, 또는 적어도 95% 동일성을 갖는 microRNA를 포함한다. 바람직한 구현예에서, 적어도 하나의 유전적 요소는 하기를 포함한다:

CATCTCCATGGCTGTACCACCTTGTCGGGGGATGTGTACTTCTGAACTTGTGTTGA
 ATCTCATGGAGTTCAGAAGAACACATCCGCACTGACATTTTGGTATCTTTCATCTG
 ACCA (SEQ ID NO: 2); 또는
 GGGCCTGGCTCGAGCAGGGGGCGAGGGATTCCGCTTCTTC
 CTGCCATAGCGTGGTCCCCTCCCCTATGGCAGGCAGAAGCGGCACCTTCCCCTCCA
 ATGACCGCGTCTTCGTCG (SEQ ID NO: 3).

[0054]

- [0055] 또다른 양상에서, microRNA 클러스터는
 AGGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCGACTGTAAACTGAGCTTGCTCTACTGTGAAG
 CCACAGATGGGTAGAGCAAGCACAGTTTACCGCTGCCTACTGCCTCGGACTTCAA
 GGGGCTTCCCGGGCATCTCCATGGCTGTACCACCTTGTCGGGGGATGTGTACTTCT
 GAACTTGTGTTGAATCTCATGGAGTTCAGAAGAACACATCCGCACTGACATTTTGG
 TATCTTTTCATCTGACCAGCTAGCGGGCCTGGCTCGAGCAGGGGGCGAGGGATTCC
 GCTTCTTCTGCCATAGCGTGGTCCCCTCCCCTATGGCAGGCAGAAGCGGCACCTT
 CCCTCCCAATGACCGCGTCTTCGTC (SEQ ID NO: 31)
- [0056] 와 적어도 80%, 또는 적어도 85%, 또는 적어도 90%, 또는 적어도 95% 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 바람직한 구현예에서, microRNA 클러스터는 하기를 포함한다:
- [0057] AGGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCGACTGTAAACTGAGCTTGCTCT
 ACTGTGAAGCCACAGATGGGTAGAGCAAGCACAGTTTACCGCTGCCTACTGCCTC
 GGACTTCAAGGGGCTTCCCGGGCATCTCCATGGCTGTACCACCTTGTCGGGGGATG
 TGTACTTCTGAACTTGTGTTGAATCTCATGGAGTTCAGAAGAACACATCCGCACTG
 ACATTTTGGTATCTTTCATCTGACCAGCTAGCGGGCCTGGCTCGAGCAGGGGGCGA
 GGGATTCCGCTTCTTCTGCCATAGCGTGGTCCCCTCCCCTATGGCAGGCAGAAGC
 GGCACCTTCCCTCCCAATGACCGCGTCTTCGTC (SEQ ID NO: 31).
- [0058] 또다른 양상에서, 렌티바이러스 입자를 발현시키기 위한 렌티바이러스 벡터 시스템이 개시된다. 시스템은 본원에 기재된 바와 같은 렌티바이러스 벡터; 세포를 감염시키기 위해 최적화된 외피 단백질을 발현시키기 위한 외피 플라스미드; 및 gag, pol, 및 rev 유전자를 발현시키기 위한 적어도 하나의 헬퍼 플라스미드를 포함하며, 렌티바이러스 벡터, 외피 플라스미드, 및 적어도 하나의 헬퍼 플라스미드가 패키징 세포주 내로 트랜스펙션될 때, 렌티바이러스 입자가 패키징 세포주에 의해 생산되며, 렌티바이러스 입자는 케모카인 수용체 CCR5 의 생산을 저해하거나 또는 HIV RNA 서열을 표적화할 수 있다. 시스템은 gag 및 pol 유전자를 발현시키기 위한 제 1 헬퍼 플라스미드, 및 rev 유전자를 발현시키기 위한 제 2 플라스미드를 추가로 포함할 수 있다.
- [0059] 또다른 양상에서, 세포를 감염시킬 수 있는 렌티바이러스 입자가 개시된다. 렌티바이러스 입자는 세포를 감염시키기 위해 최적화된 외피 단백질, 및 본원에 기재된 바와 같은 렌티바이러스 벡터를 포함한다. 외피 단백질은 T 세포를 감염시키기 위해 최적화될 수 있다. 바람직한 구현예에서, 외피 단백질은 CD4+ T 세포를 감염시키기 위해 최적화된다.
- [0060] 또다른 양상에서, 변형된 세포가 개시된다. 변형된 세포는 CD4+ T 세포를 포함하며, CD4+ T 세포는 본원에 기재된 바와 같은 렌티바이러스 입자로 감염되었다. 바람직한 구현예에서, CD4+ T 세포는 HIV 항원을 또한 인지한다. 추가로 바람직한 구현예에서, HIV 항원은 gag 항원을 포함한다. 추가로 바람직한 구현예에서, 렌티바이러스 입자로 감염 후에 CD4+ T 세포는 감소된 수준의 CCR5 를 발현한다.
- [0061] 또다른 양상에서, 대상체를 치료적 처리 섭생법을 위해 선별하는 방법이 개시된다. 방법은 백혈구를 대상체로부터 제거하고, 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC) 를 정제하고, PBMC 와 연관되는 적어도 하나의 인자와 연관되는 제 1 정량화가능한 측정값을 확인하는 단계; PBMC 를 생체외에서 치료적 유효량의 제 2 자극제와 접촉시키고, PBMC 와 연관되는 적어도 하나의 인자와 연관되는 제 2 정량화가능한 측정값을 확인하여, 제 2 정량화가능한 측정값이 제 1 정량화가능한 측정값보다 더 높을 때, 대상체가 처리 섭생법을 위해 선별되는 단계를 포함한다. 적어도 하나의 인자는 T 세포 증식 또는 IFN 감마 생산일 수 있다.
- [0062] 또다른 양상에서, 본원에 개시된 방법은 PBMC 로부터의 세포의 적어도 하나의 부분집합을 고갈시키는 단계를 포함한다. 방법은 PBMC 로부터의 세포의 적어도 하나의 부분집합을 고갈시키는 단계를 포함하며, 세포의 적어도 하나의 부분집합은 CD8+ T 세포, γ δ 세포, NK 세포, B 세포, 호중구, 호염기구, 호산구, T 조절 세포, NKT 세포, 및 적혈구 중 임의의 하나 이상을 포함한다. 구현예에서, 고갈은 백혈구 제거 후에 일어난다. 구현예에서, 고갈은 백혈구 제거와 동시에 일어난다.
- [0063] 상술된 일반적 설명 및 하기 도면의 간단한 설명 및 상세한 설명은 예시적 및 설명적이고, 청구되는 본 발명의 추가의 설명을 제공하기 위한 것이다. 기타 목적, 이점, 및 신규한 특색은 하기 도면의 간단한 설명 및 본

발명의 상세한 설명으로부터 당업자에게 쉽게 명백할 것이다.

도면의 간단한 설명

[0065]

도 1 은 특정 임상 요법 전략의 순서도 도해를 나타낸다.

도 2 는 다른 세포가 감염되는 것을 방지 및/또는 바이러스 복제를 방지하기 위해 유전자 요법을 사용하여 CD4+ T 세포가 어떻게 변경될 수 있는지를 도해로 나타낸다.

도 3 은 치료적 벡터, 헬퍼 플라스미드, 및 외피 플라스미드로 구성되는 예시적 렌티바이러스 벡터 시스템을 나타낸다. 여기에서 보여지는 치료적 벡터는 본원에서 또한 AGT103 로서 언급되는 바람직한 치료적 벡터이고, miR30CCR5-miR21Vif-miR185-Tat 를 함유한다.

도 4 는 환화 형태의 예시적 3-벡터 렌티바이러스 벡터 시스템을 나타낸다.

도 5 는 환화 형태의 예시적 4-벡터 렌티바이러스 벡터 시스템을 나타낸다.

도 6 은 예시적 벡터 서열을 나타낸다. CCR5-항성 HIV 균주의 확산을 저해하기 위해 프로모터 및 miR 클러스터의 양성 (계능) 가닥 서열이 개발되었다. 밑줄 치지 않은 서열은 이러한 miR 클러스터에 최선으로 선택된 전사의 EF-1알파 프로모터를 포함한다. 밑줄 친 서열은 miR30 CCR5 (CCR5 mRNA 에 전용되는 천연 인간 miR30 의 변형), miR21 Vif (Vif RNA 서열에 전용됨) 및 miR185 Tat (Tat RNA 서열에 전용됨) (집합적으로 SEQ ID NO: 33 에 제시됨) 로 이루어지는 miR 클러스터를 보여준다.

도 7 은 본 공개의 양상에 따른 예시적 렌티바이러스 벡터 구축물을 나타낸다.

도 8 은 실험 벡터에 의한 CCR5 의 녹다운이 AGTc120 세포에서 R5-항성 HIV 감염을 예방한다는 것을 보여준다.

(A) 는 AGT103 렌티바이러스 벡터를 함유하거나 함유하지 않는 AGTc120 세포에서의 CCR5 발현을 보여준다.

(B) 는 HIV 의 Nef 유전자에 융합된 녹색 형광 단백질 (GFP) 을 발현하는 HIV BaL 바이러스 스톱에 의한 감염에 대한 형질도입된 AGTc120 세포의 민감성을 보여준다.

도 9 는 렌티바이러스 벡터 내 shRNA 저해인자 서열에 의한 CCR5 발현의 조절을 입증하는 데이터를 나타낸다.

(A) 잠재적 후보물에 관한 스크리닝 데이터가 보여진다. (B) CCR5 shRNA-1 (SEQ ID NO: 16) 에 의한 형질도입 후의 CCR5 녹아웃 데이터가 보여진다.

도 10 은 렌티바이러스 벡터 내 shRNA 저해인자 서열에 의한 HIV 성분의 조절을 입증하는 데이터를 나타낸다.

(A) Rev/Tat 표적 유전자에 관한 녹아웃 데이터가 보여진다. (B) Gag 표적 유전자에 관한 녹아웃 데이터가 보여진다.

도 11 은 본원에 기재된 바와 같은, HIV 발현 플라스미드로 트랜스펙션된 세포에서 AGT103 이 Tat 단백질 발현을 감소시키는 것을 입증하는 데이터를 나타낸다.

도 12 는 렌티바이러스 벡터 내 합성 microRNA 서열에 의한 HIV 성분의 조절을 입증하는 데이터를 나타낸다.

(A) Tat 녹아웃 데이터가 보여진다. (B) Vif 녹아웃 데이터가 보여진다.

도 13 은 렌티바이러스 벡터 내 합성 microRNA 서열에 의한 CCR5 발현의 조절을 입증하는 데이터를 나타낸다.

도 14 는 장 (long) 또는 단 (short) WPRE 서열을 함유하는 렌티바이러스 벡터 내 합성 microRNA 서열에 의한 CCR5 발현의 조절을 입증하는 데이터를 나타낸다.

도 15 는 WPRE 서열을 함유하거나 함유하지 않는 렌티바이러스 벡터 내 합성 microRNA 서열에 의한 CCR5 발현의 조절을 입증하는 데이터를 나타낸다.

도 16 은 렌티바이러스 벡터 내 CD4 프로모터 조절 합성 microRNA 서열에 의한 CCR5 발현의 조절을 입증하는 데이터를 나타낸다.

도 17 은 HIV Gag-특이적 CD4 T 세포의 검출을 입증하는 데이터를 나타낸다.

도 18 은 HIV-특이적 CD4 T 세포 증식 및 렌티바이러스 형질도입을 입증하는 데이터를 나타낸다. (A) 치료의 스케줄이 보여진다. (B) 본원에 기재된 바와 같은, CD4-게이트드 (gated) T 세포에서의 IFN-감마 생산이 보여진다. (C) 본원에 기재된 바와 같은, CD4-게이트드 T 세포에서의 IFN-감마 생산 및 GFP 발현이 보여진다. (D) 본원에 기재된 바와 같은, 및 중요하게, 백신접종 전 및 후의, HIV-특이적 CD4+ T 세포의 빈도가

보여진다. (E) 본원에 기재된 바와 같은, 백신접종 후 PBMCs로부터의 IFN-감마 생산이 보여진다.

도 19 는 증가하는 AGT103-GFP 의 용량 응답 및 CCR5 발현의 저해에 관한 기능적 어세이를 입증하는 데이터를 나타낸다. (A) 증가하는 양의 AGT103-GFP 에 관한 용량 응답 데이터가 보여진다. (B) CCR5 발현의 면에서 정상 분포 집단이 보여진다. (C) 증가하는 용량의 AGT103-GFP 에 의한 CCR5 발현의 백분율 저해가 보여진다.

도 20 은 AGT103 이 일차 인간 CD4+ T 세포를 효율적으로 형질도입하는 것을 입증하는 데이터를 나타낸다. (A) 본원에 기재된 바와 같은, FACS 에 의한 형질도입된 세포 (GFP-양성) 의 빈도가 보여진다. (B) 본원에 기재된 바와 같은, 세포 당 백터 카피의 수가 보여진다.

도 21 은 본원에 기재된 바와 같은, 일차 CD4+ T 세포에서 AGT103 이 HIV 복제를 저해하는 것을 입증하는 데이터를 나타낸다.

도 22 는 AGT103 이 일차 인간 CD4⁺ T 세포를 HIV-유도되는 고갈로부터 보호하는 것을 입증하는 데이터를 나타낸다.

도 23 은 HIV-특이적, AGT103-형질도입된 CD4 T 세포에 관하여 고도로 농축된 (enriched) CD4+ T 세포 집단의 생성을 입증하는 데이터를 나타낸다. (A) 는, 본원에 기재된 바와 같은, 세포 집단에 관한 CD4 및 CD8 발현 프로파일을 보여준다. (B) 는, 본원에 기재된 바와 같은, 세포 집단에 관한 CD4 및 CD8 발현 프로파일을 보여준다. (C) 는, 본원에 기재된 바와 같은, 세포 집단에 관한 IFN-감마 및 CD4 발현 프로파일을 보여준다. (D) 는, 본원에 기재된 바와 같은, 세포 집단에 관한 IFN-감마 및 GFP 발현 프로파일을 보여준다.

도 24 는 CD8 고갈 프로토콜의 도해를 나타낸다.

도 25 는 펩티드 자극, CD8 고갈 및 IL-7/IL-15 인큐베이션에 의한 Gag-특이적 T 세포의 증식을 나타낸다. (A), (B), 및 (C) 는 CD8+ 세포의 고갈 후에 유의하게 개선된 CD4+ T 세포 증식을 보여주는 흐름 세포측정 데이터를 나타낸다. 개선된 CD4+ T 세포 증식에 더하여, 또한 (A) V δ 1 T 세포의 과도성장 및 (C) NK 세포의 과도성장이 존재했다.

도 26 은 CD8/CD56/CD19/ γ δ 고갈 프로토콜의 도해를 나타낸다.

도 27 은 펩티드 자극, CD8/ γ δ /NK/B 세포 고갈 및 IL-7/IL-15 인큐베이션에 의한 Gag-특이적 T 세포의 증식을 나타낸다. (A)-(B) 는 CD8+, γ δ , 또는 NK 세포의 과도성장이 CD4+ T 세포 성장을 저해하거나 또는 렌티바이러스-형질도입된 항원-특이적 CD4+ T 세포를 살해하는 것을 보여주는 흐름 세포측정 데이터를 나타낸다. CD8+ 의 고갈 후에, γ δ , 또는 NK 세포, CD4+ T 세포가 증식되었다.

도 28 은 펩티드 자극, CD8/ γ δ /NK/B 세포 고갈 및 IL-7/IL-15 인큐베이션에 의한 Gag-특이적 T 세포의 증식 및 형질도입을 나타낸다. IFN- γ 양성, 항원-특이적 CD4+ T 세포는 배양물 내의 다른 부분집합과 비교할 때 더 양호한 형질도입 효율을 초래했다.

도 29 는 형질도입된 세포의 백분율과 백터 카피수 사이의 관계를 나타낸다. (A) 는 형질도입된 세포의 백분율이 증가함에 따라, 백터 카피수가 또한 증가하는 것을 보여주는 표를 나타낸다 (n=4). (B) 는 형질도입된 세포의 백분율과 백터 카피수 사이의 양성 상관관계를 보여주는 표에 나타난 동일한 샘플의 회귀 분석을 보여준다 (n=4).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0066]

상세한 설명

[0067]

개요

[0068]

기능적 치유를 달성하는 인간 면역결핍 바이러스 (HIV) 질환을 치료 및/또는 예방하기 위한 방법 및 조성물이 본원에 개시된다. 기능적 치유는 cART 에 대한 필요를 감소 또는 제거하고 지지 아주만트 요법을 요구할 수 있거나 요구하지 않을 수 있는 개시된 처리 및 방법으로부터 초래되는 상태로서 정의된다. 본 발명의 방법은 통합 렌티바이러스, 비-통합 렌티바이러스, 및 아래 기재된 바와 같은 관련 바이러스 백터 기술에 의한 유전자 전달을 포함한다.

[0069]

치료적 바이러스 백터 (예를 들어, 렌티바이러스 백터), 면역요법, 및 HIV 감염에 관한 기능적 치유를 달성하는

전략에서의 그것의 사용 방법이 본원에서 개시된다. 본원에서 도 1에 나타낸 바와 같이, HIV를 치료하기 위한 전략은 HIV-특이적 CD4 T 세포의 분획을 농축시키려는 목적을 위한 HAART의 매일 투여로 인한 바이러스혈증의 안정적 억제와 HIV-감염된 환자에서 HIV에 대항하는 강한 면역 응답을 생성하는 것이 의도되는 백신에 의한 제 1 치료적 면역화를 포함한다. 그러나, 본원에서 설명되는 바와 같이, 제 1 치료적 면역화는 필수적이지 않을 수 있다. 이 후에 뒤따르는 것은 (1) 백혈구성분채집술에 의해 말초 백혈구를 단리하거나 또는 정맥 혈액으로부터 PBMC를 정제하는 것, (2) CD4 T 세포를 생체외에서 HIV 백신 단백질로 재자극하는 것, (3) T 세포 배양물 생체외에서 치료적 렌티바이러스 형질도입을 수행하는 것, 및 (4) 원래의 공여자 내로 다시 재주입하는 것이다.

[0070] 상술된 것에 관하여, 그리고 본원의 도 2를 참조하여, 방법은 새로운 세포, 예컨대 CD4+ T 세포가, HIV로 감염되는 것을 방지하기 위해 사용될 수 있다. 새로운 세포가 감염되는 것을 방지하기 위해, 바이러스 부착을 방지하도록 CCR5 발현이 표적화될 수 있다. 추가로, 임의의 잔류 감염 바이러스 RNA의 파괴가 또한 표적화될 수 있다. 상술된 것에 관하여, 그리고 본원의 도 2를 참조하여, 방법은 또한 이미 HIV로 감염된 세포에서 HIV 바이러스 주기를 중단시키기 위해 사용될 수 있다. HIV 바이러스 주기를 중단시키기 위해, 잠복성으로-감염된 세포, 예컨대 잠복성으로-감염된 CD4+ T 세포에 의해 생산된 바이러스 RNA가 표적화될 수 있다.

[0071] HIV를 저해할 수 있는 고도로 효과적인 치료적 렌티바이러스를 제공함으로써, HIV의 기능적 치유를 달성하기 위한 새로운 전략이 개발되었다.

[0072] **정의 및 해석**

[0073] 본원에서 다르게 정의되지 않으면, 본 공개과 관련하여 사용되는 과학 및 기술 용어는 당업자에 의해 통상적으로 이해되는 의미를 가질 것이다. 추가로, 문맥에 의해 다르게 요구되지 않으면, 단수형 용어는 복수형을 포함할 것이고, 복수형 용어는 단수형을 포함할 것이다. 일반적으로, 본원에 기재된 세포 및 조직 배양, 분자 생물학, 면역학, 미생물학, 유전학 및 단백질 및 핵산 화학 및 하이브리드화와 관련하여 사용되는 명명법, 및 그의 기술은 당업계에서 잘 알려져 있고 통상적으로 사용되는 것이다. 본 공개의 방법 및 기술은 일반적으로 다르게 명시되지 않으면 당업계에서 잘 알려진 및 본 명세서 전체에서 언급 및 논의되는 다양한 일반적 및 더욱 구체적 참고문헌에서 기재된 바와 같은 종래의 방법에 따라 수행된다. 참고, 예를 들어: Sambrook J. & Russell D. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (2000); Ausubel et al., Short Protocols in Molecular Biology: A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology, Wiley, John & Sons, Inc. (2002); Harlow and Lane Using Antibodies: A Laboratory Manual; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1998); and Coligan et al., Short Protocols in Protein Science, Wiley, John & Sons, Inc. (2003). 임의의 효소적 반응 또는 정제 기술은 제조자의 명세서에 따라, 당업계에서 통상적으로 달성되는 바와 같이 또는 본원에 기재된 바와 같이 수행된다. 본원에 기재된 분석 화학, 합성 유기 화학, 및 의약 및 약학 화학과 관련하여 사용되는 명명법, 및 그의 실험 절차 및 기술은 당업계에 잘 알려져 있고 통상적으로 사용된다.

[0074] 본원에서 사용되는 바와 같은, 용어 "약"은 당업자에 의해 이해될 것이고, 그것이 사용되는 문맥에 따라 어느 정도 다를 수 있다. 그것이 사용되는 문맥을 고려할 때 당업자에게 분명하지 않은 용어의 사용이 존재하는 경우에, "약"은 특정 용어의 플러스 또는 마이너스 10%까지 의미할 것이다.

[0075] 본원에서 사용되는 바와 같은, 용어 활성제 "의 투여" 또는 "를 투여하는 것"은 본 발명의 활성제를 치료를 필요로 하는 대상체에게 개체의 신체 내로 도입될 수 있는 형태로 치료적으로 유용한 형태 및 치료적 유효량으로 제공하는 것을 의미한다.

[0076] 본원에서 사용되는 바와 같은, 용어 "AGT103"은, 본원에서 설명되는 바와 같은, miR30-CCR5/miR21-Vif/miR185-Tat microRNA 클러스터 서열을 함유하는 렌티바이러스 벡터의 특정 구현예를 나타낸다.

[0077] 본원에서 사용되는 바와 같은, 용어 "AGT103T"은 AGT103 렌티바이러스 벡터를 함유하는 렌티바이러스 또는 렌티바이러스 입자로 형질도입된 세포를 나타낸다.

[0078] 본 명세서 및 청구범위 전체에서, 단어 "포함한다", 또는 변이형 예컨대 "포함한다" 또는 "포함하는"은 언급된 정수 또는 정수의 균의 포함 (그러나 임의의 다른 정수 또는 정수의 균의 배제는 아님)을 시사하는 것으로 이해될 것이다. 추가로, 본원에서 사용되는 바와 같은, 용어 "포함한다"는 제한 없이 포함하는 것을 의미한다.

[0079] 용어 "접목"은 세포성 공급원의 주입 후에 대상체에서 지속된 접목의 정량적 수준을 확인하는 당업자의 능력을

나타낸다 (참고, 예를 들어: Rosenberg et al., *N. Engl. J. Med.* 323:570-578 (1990); Dudley et al., *J. Immunother.* 24:363-373 (2001); Yee et al., *Curr. Opin. Immunol.* 13:141-146 (2001); Rooney et al., *Blood* 92:1549-1555 (1998)).

[0080] 용어, "발현", "발현된다", 또는 "인코딩한다" 는 폴리뉴클레오티드가 mRNA 로 전사되는 과정 및/또는 전사된 mRNA 가 후속적으로 펩티드, 폴리펩티드, 또는 단백질로 번역되는 과정을 나타낸다. 발현은 진핵 세포에서의 mRNA 의 스플라이싱 또는 다른 형태의 전사후 수식 또는 번역후 수식을 포함할 수 있다.

[0081] 용어 "기능적 치유" 는 이전에 cART 또는 HAART 를 요구했던 HIV+ 개체가 cART 또는 HAART 의 더 낮은 용량, 간헐적 용량, 또는 중단된 투약을 사용하여 생존할 수 있는 바이러스 복제가 낮은 또는 검출불가능한 상태 또는 병태를 나타낸다. 낮은 수준 바이러스 복제를 유지하고 질환 진행을 둔화 또는 제거하기 위한 보조 요법을 여전히 요구하는 동안에도 개체는 "기능적으로 치유되었다" 고 여겨질 수 있다. 기능적 치유의 가능한 결과는 모든 재발 가능성을 방지하는 HIV 의 궁극적 박멸이다.

[0082] 용어 "HIV 백신" 은 HIV-특이적 면역 응답을 유발하는 것이 의도되는 면역원 플러스 비히클 플러스 아주반트를 망라한다. "HIV 백신" 은 세포가 특이적 면역력을 유발할 수 있는 HIV 단백질, 당단백질 또는 단백질 단편을 생산하는 것을 유도할 수 있는 재조합 박테리아 벡터, 플라스미드 DNA 또는 RNA 에 더하여, HIV 일 수 있는 정제된 또는 전체 불활성화된 바이러스 입자 또는 HIV 단백질, 단백질 단편 또는 펩티드, 당단백질 단편 또는 글리코펩티드를 발현할 수 있는 재조합 바이러스 벡터를 포함할 수 있다. 대안적으로는, 항-CD3/CD28 비드, T 세포 수용체-특이적 항체, 미토겐, 슈퍼항원 및 다른 화학적 또는 생물학적 자극을 포함하는 특정 면역 자극 방법을 사용하여, HIV-특이적 CD4 T 세포를 형질도입 전에 농축시키려는 목적으로 또는 렌티바이러스-형질도입된 CD4 T 세포의 시험관내 (*in vitro*) 어세이를 위해 수지상, T 또는 B 세포를 활성화시킬 수 있다. 활성화 물질은 가용성, 중합체성 조립체, 리포솜 또는 엔도솜-기반 또는 비드에 연결될 수 있다. 인터류킨-2, 6, 7, 12, 15, 23 또는 기타를 포함하는 사이토카인이 첨가되어 배양 및 형질도입 간격 전체에서 자극에 대한 세포성 응답을 개선 및/또는 CD4 T 세포의 생존을 개선할 수 있다. 대안적으로는, 그리고 상술된 것 중 임의의 것을 제한하지 않으면서, 용어 "HIV 백신" 은 MVA/HIV62B 백신 및 그의 변이체를 망라한다. MVA/HIV62B 백신은 알려진 고도로 약독화된 이중 재조합 MVA 백신이다. MVA/HIV62B 백신은 알려진 MVA 벡터 내로 HIV-1 gag-pol 및 env 서열의 삽입을 통해 구축되었다 (참고: 예를 들어: Goepfert et al. (2014) *J. Infect. Dis.* 210(1): 99-110, 및 W02006026667 참고, 둘 모두 본원에 참조로 포함됨). 용어 "HIV 백신" 은 또한 아래 표 1 에 제공된 임의의 하나 이상의 백신을 포함한다.

[0083] 표 1

IAVI 임상 시험 ID*	프라임**
HVTN 704 AMP	VRC-HIVMAB060-00-AB
VAC89220HPX2004	Ad26.Mos.HIV 삽가
01-I-0079	VRC4302
04/400-003-04	APL 400-003 GENEVAX-HIV
10-1074	10-1074
87 I-114	gp160 백신 (Immuno-AG)

[0084]

96-I-0050	APL 400-003 GENEVAX-HIV
ACTG 326; PACTG 326	ALVAC vCP1452
Ad26.ENVA.01	Ad26.EnvA-01
Ad26.ENVA.01 접막/PCAVD003	Ad26.EnvA-01
Ad5HVR48.ENVA.01	Ad5HVR48.ENVA.01
ANRS VAC 01	ALVAC vCP125
ANRS VAC 02	rgp 160 + 펩티드 V3 ANRS VAC 02
ANRS VAC 03	ALVAC-HIV MN120TMG 균주 (vCP205)
ANRS VAC 04	LIPO-6
ANRS VAC 04 비스	LIPO-6
ANRS VAC 05	ALVAC vCP125
ANRS VAC 06	ALVAC vCP125
ANRS VAC 07	ALVAC vCP300
ANRS VAC 08	ALVAC-HIV MN120TMG 균주 (vCP205)
ANRS VAC 09	ALVAC-HIV MN120TMG 균주 (vCP205)
ANRS VAC 09 비스	LIPO-6
ANRS VAC 10	ALVAC vCP1452
ANRS VAC 12	LPHIV1
ANRS VAC 14	gp160 MN/LAI
ANRS VAC 16	LPHIV1
ANRS VAC 17	LIPO-6
ANRS VAC 18	LIPO-5
APL 400-003RX101	APL 400-003 GENEVAX-HIV
AVEG 002	HIVAC-1e

[0085]

AVEG 002A	HIVAC-1e
AVEG 002B	HIVAC-1e
AVEG 003	VaxSyn gp160 백신 (MicroGeneSys)
AVEG 003A	VaxSyn gp160 백신 (MicroGeneSys)
AVEG 003B	VaxSyn gp160 백신 (MicroGeneSys)
AVEG 004	gp160 백신 (Immuno-AG)
AVEG 004A	gp160 백신 (Immuno-AG)
AVEG 004B	gp160 백신 (Immuno-AG)
AVEG 005A/B	Env 2-3
AVEG 005C	Env 2-3
AVEG 006X; VEU 006	MN rgp120
AVEG 007A/B	rgp120/HIV-1 SF-2
AVEG 007C	rgp120/HIV-1 SF-2
AVEG 008	HIVAC-1e
AVEG 009	MN rgp120
AVEG 010	HIVAC-1e
AVEG 011	UBI HIV-1 펩티드 면역원, 다가
AVEG 012A/B	ALVAC vCP125
AVEG 013A	gp160 백신 (Immuno-AG)
AVEG 013B	gp160 백신 (Immuno-AG)
AVEG 014A/B	TBC-3B
AVEG 014C	TBC-3B
AVEG 015	rgp120/HIV-1 SF-2
AVEG 016	MN rgp120

[0086]

AVEG 016A	MN rgp120
AVEG 016B	MN rgp120
AVEG 017	UBI HIV-1 펩티드 백신, 미세미립자 일가
AVEG 018	UBI HIV-1 펩티드 백신, 미세미립자 일가
AVEG 019	p17/p24:Ty- VLP
AVEG 020	gp120 C4-V3
AVEG 021	P3C541b 리포펩티드
AVEG 022	ALVAC-HIV MN120TMG 균주 (vCP205)
AVEG 022A	ALVAC-HIV MN120TMG 균주 (vCP205)
AVEG 023	UBI HIV-1 펩티드 면역원, 다가
AVEG 024	rgp120/HIV-1 SF-2
AVEG 026	ALVAC vCP300
AVEG 027	ALVAC-HIV MN120TMG 균주 (vCP205)
AVEG 028	장티푸스균 CVD 908-HIV-1 LAI gp 120
AVEG 029	ALVAC-HIV MN120TMG 균주 (vCP205)
AVEG 031	APL 400-047
AVEG 032	ALVAC-HIV MN120TMG 균주 (vCP205)
AVEG 033	ALVAC-HIV MN120TMG 균주 (vCP205)
AVEG 034/034A	ALVAC vCP1433
AVEG 036	MN rgp120
AVEG 038	ALVAC-HIV MN120TMG 균주 (vCP205)
AVEG 201	rgp120/HIV-1 SF-2
AVEG 202/HIVNET 014	ALVAC-HIV MN120TMG 균주 (vCP205)

[0087]

C060301	GTU-MultiHIV
C86P1	HIV gp140 ZM96
자궁경-질 CN54gp140-hsp70 접합 백신 (TL01)	CN54gp140
CM235 및 SF2gp120	CM235 (ThaiE) gp120 플러스 SF2(B) gp120
CM235gp120 및 SF2gp120	CM235 (ThaiE) gp120 플러스 SF2(B) gp120
CombiHIVvac (KombiVIChvak)	CombiHIVvac
CRC282	P2G12
CRO2049/ CUT*HIVAC001	GTU-MultiHIV
CUTHIVAC002	DNA-C CN54ENV
DCVax-001	DCVax-001
DNA-4	DNA-4
DP6?001	DP6?001 DNA
DVP-1	EnvDNA
EN41-UGR7C	EN41-UGR7C
EnvDNA	EnvDNA
EnvPro	EnvPro
EuroNeut41	EN41-FPA2
EV01	NYVAC-C
EV02 (EuroVacc 02)	DNA-C
EV03/ANRSVAC20	DNA-C
확장 HVTN 073E/SAAVI 102	Sub C gp140
F4/AS01	F4/AS01
FIT Biotech	GTU-Nef

[0088]

광시 CDC DNA 백신	중국 DNA
HGP-30 기억 응답	HGP-30
HIV-CORE002	ChAdV63.HIVconsv
HIV-POL-001	MVA-mBN32
HIVIS 01	HIVIS-DNA
HIVIS 02	MVA-CMDR
HIVIS 03	HIVIS-DNA
HIVIS 05	HIVIS-DNA
HIVIS06	HIVIS-DNA
HIVIS07	HIVIS-DNA
HIVNET 007	ALVAC-HIV MN120TMG 균주 (vCP205)
HIVNET 026	ALVAC vCP1452
HPTN 027	ALVAC-HIV vCP1521
HVRF-380-131004	비흐레폴 (Vichrepol)
HVTN 039	ALVAC vCP1452
HVTN 040	AVX101
HVTN 041	rgp120w61d
HVTN 042 / ANRS VAC 19	ALVAC vCP1452
HVTN 044	VRC-HIVDNA009-00-VP
HVTN 045	pGA2/JS7 DNA
HVTN 048	EP HIV-1090
HVTN 049	Gag 및 Env DNA/PLG 미세입자
HVTN 050/Merck 018	MRKAd5 HIV-1 gag
HVTN 052	VRC-HIVDNA009-00-VP

[0089]

HVTN 054	VRC-HIVADV014-00-VP
HVTN 055	TBC-M335
HVTN 056	MEP
HVTN 057	VRC-HIVDNA009-00-VP
HVTN 059	AVX101
HVTN 060	HIV-1 gag DNA
HVTN 063	HIV-1 gag DNA
HVTN 064	EP HIV-1043
HVTN 065	pGA2/JS7 DNA
HVTN 067	EP-1233
HVTN 068	VRC-HIVADV014-00-VP
HVTN 069	VRC-HIVDNA009-00-VP
HVTN 070	PENNVAX-B
HVTN 071	MRKAd5 HIV-1 gag
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 080	PENNVAX-B
HVTN 082	VRC-HIVDNA016-00-VP
HVTN 083	VRC-HIVADV038-00-VP
HVTN 084	VRC-HIVADV054-00-VP
HVTN 085	VRC-HIVADV014-00-VP

[0090]

HVTN 086, SAAVI 103	SAAVI MVA-C
HVTN 087	HIV-MAG
HVTN 088	올리고머 gp140/MF59
HVTN 090	VSV-인디아나 HIV gag 백신
HVTN 092	DNA-HIV-PT123
HVTN 094	GEO-D03
HVTN 096	DNA-HIV-PT123
HVTN 097	ALVAC-HIV vCP1521
HVTN 098	PENNVAX-GP
HVTN 100	ALVAC-HIV-C (vCP2438)
HVTN 101	DNA-HIV-PT123
HVTN 102	DNA-HIV-PT123
HVTN 104	VRC-HIVMAB060-00-AB
HVTN 105	AIDSVAX B/E
HVTN 106	DNA Nat-B env
HVTN 110	Ad4-mgag
HVTN 112	HIV-1 nef/tat/vif, env pDNA 백신
HVTN 114; GOVX-B11	AIDSVAX B/E
HVTN 116	VRC-HIVMAB060-00-AB
HVTN 203	ALVAC vCP1452
HVTN 204	VRC-HIVDNA016-00-VP
HVTN 205	pGA2/JS7 DNA
HVTN 502/Merck 023 (단계 연구)	MRKAd5 HIV-1 gag/pol/nef
HVTN 503 (팜빌리 (Phambili))	MRKAd5 HIV-1 gag/pol/nef

[0091]

HVTN 505	VRC-HIVDNA016-00-VP
HVTN 702	ALVAC-HIV-C (vCP2438)
HVTN 703 AMP	VRC-HIVMAB060-00-AB
HVTN 908	pGA2/JS7 DNA
IAVI 001	DNA.HIVA
IAVI 002	DNA.HIVA
IAVI 003	MVA.HIVA
IAVI 004	MVA.HIVA
IAVI 005	DNA.HIVA
IAVI 006	DNA.HIVA
IAVI 008	MVA.HIVA
IAVI 009	DNA.HIVA
IAVI 010	DNA.HIVA
IAVI 011	MVA.HIVA
IAVI 016	MVA.HIVA
IAVI A001	tgAAC09
IAVI A002	tgAAC09
IAVI A003	AAV1-PG9
IAVI B001	Ad35-GRIN/ENV
IAVI B002	보강제 함유 GSK 시험용 HIV 백신 제형 1
IAVI B003	Ad26.EnvA-01
IAVI B004	HIV-MAG
IAVI C001	ADVAX
IAVI C002	ADMVA

[0092]

IAVI C003	ADMVA
IAVI C004/DHO-614	ADVAX
IAVI D001	TBC-M4
IAVI N004 HIV-CORE 004	Ad35-GRIN
IAVI P001	ADVAX
IAVI P002	ADVAX
IAVI R001	rcAd26.MOS1.HIVEnv
IAVI S001	SeV-G
IAVI V001	VRC-HIVDNA016-00-VP
IAVI V002	VRC-HIVDNA016-00-VP
IDEA EV06	DNA-HIV-PT123
IHV01	전장 단일 사슬 (FLSC)
IMPAACT P1112	VRC-HIVMAB060-00-AB
IPCAVD006	MVA 모자이크
IPCAVD008	삼량체 gp140
IPCAVD009	Ad26.Mos.HIV 삼가
IPCAVD010	Ad26.Mos.HIV 삼가
ISS P-001	Tat 백신
ISS P-002	Tat 백신
LFn-p24 백신	LFn-p24
MCA-0835	3BNC117
Merck V520-007	Ad-5 HIV-1 gag (Merck)
MRC V001	rgp120w61d
MRK Ad5	Ad-5 HIV-1 gag (Merck)

[0093]

MRKAd5 + ALVAC	MRKAd5 HIV-1 gag
Mucovac2	CN54gp140
MV1-F4	홍역 백터 - GSK
MYM-V101	비로솜-Gp41
NCHECR-AE1	pHIS-HIV-AE
PACTG 230	AIDSVAX B/E
PAVE100	VRC-HIVDNA016-00-VP
PEACHI-04	ChAdV63.HIVconsv
PedVacc001 & PedVacc002	MVA.HIVA
PolyEnv1	PolyEnv1
PXVX-HIV-100-001	Ad4-mgag
RISVAC02	MVA-B
RisVac02 부스트	MVA-B
RV 124	ALVAC-HIV MN120TMG 균주 (vCP205)
RV 132	ALVAC-HIV vCP1521
RV 135	ALVAC-HIV vCP1521
RV 138; B011	ALVAC-HIV MN120TMG 균주 (vCP205)
RV 144	ALVAC-HIV vCP1521
RV 151 / WRAIR 984	LFn-p24
RV 156	VRC-HIVDNA009-00-VP
RV 156A	VRC-HIVDNA009-00-VP
RV 158	MVA-CMDR
RV 172	VRC-HIVDNA016-00-VP
RV 305	ALVAC-HIV vCP1521

[0094]

RV 306	ALVAC-HIV vCP1521
RV 328	AIDSVAX B/E
RV 365	MVA-CMDR
RV262	Pennvax-G
SG06RS02	HIV gp140 ZM96
TAB9	TAB9
TaMoVac II	HIVIS-DNA
TAMOVAC-01-MZ	HIVIS-DNA
텐탕 백시니아 HIV 백신	중국 DNA
텐탕 백시니아 HIV 백신 및 DNA	중국 DNA
TMB-108	이발리주맙
UBI HIV-1 MN 중국	UBI HIV-1 펩티드 면역원, 다가
UBI HIV-1MN 팔랑체 - 호주 연구	UBI HIV-1 펩티드 면역원, 다가
UBI V106	UBI HIV-1 펩티드 백신, 미세미립자 일가
UCLA MIG-001	TBC-3B
UCLA MIG-003	ALVAC-HIV MN120TMG 균주 (vCP205)
UKHVCSpoke003	DNA - CN54ENV 및 ZM96GPN
V24P1	HIV p24/MF59 백신
V3-MAPS	V3-MAPS
V520-016	MRKAd5 HIV-1 gag/pol/nef
V520-027	MRKAd5 HIV-1 gag/pol/nef
V526-001 MRKAd5 및 MRKAd6 HIV-1 트리젠 (Trigene) 백신	MRKAd5 HIV-1 gag/pol/nef
VAX 002	AIDSVAX B/B

[0095]

VAX 003	AIDSVAX B/E
VAX 004	AIDSVAX B/B
VRC 004 (03-I-0022)	VRC-HIVDNA009-00-VP
VRC 006 (04-I-0172)	VRC-HIVADV014-00-VP
VRC 007 (04-I-0254)	VRC-HIVDNA016-00-VP
VRC 008 (05-I-0148)	VRC-HIVDNA016-00-VP
VRC 009 (05-I-0081)	VRC-HIVDNA009-00-VP
VRC 010 (05-I-0140)	VRC-HIVADV014-00-VP
VRC 011(06-I-0149)	VRC-HIVDNA016-00-VP
VRC 012 (07-I-0167)	VRC-HIVADV027-00-VP
VRC 015 (08-I-0171)	VRC-HIVADV014-00-VP
VRC 016	VRC-HIVDNA016-00-VP
VRC 602	VRC-HIVMAB060-00-AB
VRC 607	VRCHIVMAB080-00-AB
VRC01LS	VRCHIVMAB080-00-AB
VRI01	MVA-B
X001	CN54gp140

[0096]

[0097]

*IAVI 는 국제 AIDS 백신 계획이며, 그의 임상 시험 데이터베이스는 <http://www.iavi.org/trials-database/trials> 에서 공개적으로 이용가능하다.

[0098]

** 본원에서 사용되는 바와 같은, 용어 "프라임" 은 본원에서 표 1 에서 참조되는 제시된 임상 시험에서 번역학 적 집중물로서 초기에 사용된 조성물을 나타낸다.

[0099]

용어 "생체내에서" 는 살아 있는 유기체에서 일어나는 과정을 나타낸다. 용어 "생체외에서" 는 살아 있는 유기체의 외부에서 일어나는 과정을 나타낸다.

[0100]

용어 "miRNA" 는 microRNA 를 나타낼 수 있고, 또한 "miR" 로서 언급될 수 있다.

[0101]

용어 "패키징 세포주" 는 렌티바이러스 입자를 발현하는데 사용될 수 있는 임의의 세포주를 나타낸다.

[0102]

용어 "동일성" 은, 둘 이상의 핵산 또는 폴리펩티드 서열의 문맥에서, 아래 기재된 서열 비교 알고리즘 (예를 들어, BLASTP 및 BLASTN 또는 당업자에게 입수가 가능한 기타 알고리즘) 중 하나를 사용하여 또는 시각적 검사에 의해 측정되는, 최대 대응에 관해 비교 및 정렬될 때, 동일한 뉴클레오티드 또는 아미노산 잔기의 명시된 백분율을 갖는 둘 이상의 서열 또는 부분서열을 나타낸다. 응용물에 따라, "동일성" 은 비교되고 있는 서열의 영역에 걸쳐, 예를 들어, 기능적 도메인에 걸쳐 존재하거나, 또는, 대안적으로, 비교될 두 서열의 전체 길이에 걸쳐 존재할 수 있다. 서열 비교를 위해, 전형적으로는 하나의 서열은 시험 서열이 비교되는 대상인 기준 서열로서의 역할을 한다. 서열 비교 알고리즘을 사용할 때, 시험 및 기준 서열이 컴퓨터에 입력되고, 필요한 경우에, 부분서열 좌표가 지정되고, 서열 알고리즘 프로그램 파라미터가 지정된다. 서열 비교 알고리즘은 그 후, 지정된 프로그램 파라미터에 기초하여, 기준 서열에 상대적인 시험 서열(들)에 관한 퍼센트 서열 동일성을 계산한다.

[0103]

비교를 위한 서열의 최적 정렬은, 예를 들어, Smith & Waterman, Adv. Appl. Math. 2:482 (1981) 의 국부 상동성 알고리즘에 의해, Needleman & Wunsch, J. Mol. Biol. 48:443 (1970) 의 상동성 정렬 알고리즘에 의해, Pearson & Lipman, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 85:2444 (1988) 의 유사성 방법에 관한 검색에 의해, 이들 알고리즘의 컴퓨터화된 구현에 의해 (Wisconsin Genetics 소프트웨어 패키지 내의 GAP, BESTFIT, FASTA, 및

TFASTA, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, Wis.), 또는 시각적 검사에 의해 (참고, 일반적으로 Ausubel *et al.*, 하기) 수행될 수 있다.

- [0104] 퍼센트 서열 동일성 및 서열 유사성을 확인하는데 적합한 알고리즘의 하나의 예는 BLAST 알고리즘이며, 이것은 Altschul *et al.*, *J. Mol. Biol.* 215:403-410 (1990) 에 기재되어 있다. BLAST 분석을 수행하기 위한 소프트웨어는 National Center for Biotechnology Information 웹사이트를 통해 공개적으로 입수가 가능하다.
- [0105] 두 뉴클레오티드 서열 사이의 동일성은 GCG 소프트웨어 패키지 (<http://www.gcg.com> 에서 입수가 가능) 내 갭 프로그램을 사용하여, NWSgapdna.CMP 매트릭스 및 갭 웨이트 40, 50, 60, 70, 또는 80 및 길이 웨이트 1, 2, 3, 4, 5, 또는 6 을 사용하여 확인될 수 있다. 두 뉴클레오티드 또는 아미노산 서열 사이의 동일성은 또한 ALIGN 프로그램 (버전 2.0) 내로 통합된 E. Meyers and W. Miller (CABIOS, 4:11-17 (1989)) 의 알고리즘을 사용하여, PAM120 웨이트 잔기 표, 갭 길이 페널티 12 및 갭 페널티 4 를 사용하여 확인될 수 있다. 게다가, 두 아미노산 서열 사이의 동일성은 GCG 소프트웨어 패키지 (<http://www.gcg.com> 에서 입수가 가능) 내 갭 프로그램 내로 통합된 Needleman and Wunsch (*J. Mol. Biol.* (48):444-453 (1970)) 알고리즘을 사용하여, Blossum 62 매트릭스 또는 PAM250 매트릭스, 및 갭 웨이트 16, 14, 12, 10, 8, 6, 또는 4 및 길이 웨이트 1, 2, 3, 4, 5, 또는 6 을 사용하여 확인될 수 있다.
- [0106] 본 공개의 핵산 및 단백질 서열은 추가로 공용 데이터베이스에 대해 검색을 수행하기 위한 "문의 서열" 로서 사용되어, 예를 들어, 관련 서열을 동정할 수 있다. 그러한 검색은 Altschul, *et al.* (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403-10 의 NBLAST 및 XBLAST 프로그램 (버전 2.0) 을 사용하여 수행될 수 있다. BLAST 뉴클레오티드 검색은 NBLAST 프로그램, 점수 = 100, 단어길이 = 12 를 사용하여 수행되어 본 발명의 핵산 분자에 상동인 뉴클레오티드 서열이 수득될 수 있다. BLAST 단백질 검색은 XBLAST 프로그램, 점수 = 50, 단어길이 = 3 을 사용하여 수행되어 본 발명의 단백질 분자에 상동인 아미노산 서열이 수득될 수 있다. 비교 목적으로 갭이 있는 (gapped) 정렬을 수득하기 위해, Gapped BLAST 가 Altschul *et al.*, (1997) *Nucleic Acids Res.* 25(17):3389-3402 에 기재된 바와 같이 활용될 수 있다. BLAST 및 Gapped BLAST 프로그램을 활용할 때, 해당 프로그램 (예를 들어, XBLAST 및 NBLAST) 의 디폴트 파라미터가 사용될 수 있다. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> 참고.
- [0107] 본원에서 사용되는 바와 같은, "약학적으로 허용가능한" 은, 타당한 의학적 판단의 범위 내에서, 합리적인 이익/위험 비에 비례하는 과도한 독성, 자극, 알레르기 응답, 또는 기타 문제 또는 합병증 없이 인간 및 동물의 조직, 기관, 및/또는 체액과 접촉되어 사용하는데 적합한 화합물, 물질, 조성물, 및/또는 투여 형태를 나타낸다.
- [0108] 본원에서 사용되는 바와 같은, "약학적으로 허용가능한 담체" 는 생리적으로 상용성인 임의의 및 모든 용매, 분산 매질, 코팅, 향균 및 항진균제, 등장성 및 흡수 지연제 등을 나타내고, 포함한다. 조성물은 약학적으로 허용가능한 염, 예를 들어, 산 부가 염 또는 염기 부가 염을 포함할 수 있다 (참고, 예를 들어, Berge *et al.* (1977) *J Pharm Sci* 66:1-19).
- [0109] 본원에서 사용되는 바와 같은, 용어 "SEQ ID NO" 는 용어 "서열 ID No" 과 동의어이다.
- [0110] 본원에서 사용되는 바와 같은, "소형 RNA" 는 일반적으로 길이가 약 200 뉴클레오티드 이하이고 침묵 또는 간섭 기능을 보유하는 비-코딩 RNA 를 나타낸다. 기타 구현예에서, 소형 RNA 는 길이가 약 175 뉴클레오티드 이하, 약 150 뉴클레오티드 이하, 약 125 뉴클레오티드 이하, 약 100 뉴클레오티드 이하, 또는 약 75 뉴클레오티드 이하이다. 그러한 RNA 는 microRNA (miRNA), 소 간섭 RNA (siRNA), 이중 가닥 RNA (dsRNA), 및 짧은 헤어핀 RNA (shRNA) 를 포함한다. 본 공개의 "소형 RNA" 는, 일반적으로 표적 유전자 mRNA 의 파괴를 초래하는 경로를 통해, 표적 유전자의 유전자 발현을 저해 또는 녹-다운할 수 있을 것이다.
- [0111] 본원에서 사용되는 바와 같은, 용어 "자극제" 는 백혈구를 자극할 수 있는 임의의 외생 체제를 나타낸다.
- [0112] 본원에서 사용되는 바와 같은, 용어 "대상체" 는 인간 환자를 포함할 뿐만 아니라 기타 포유동물을 포함한다. 용어 "대상체", "개체", "숙주", 및 "환자" 는 본원에서 호환되게 사용될 수 있다.
- [0113] 본원에서 사용되는 바와 같은, 용어 "표적 세포" 는 일반적으로 HIV 유전자 서열을 나타내는 단백질 또는 펩티드 단편에 의한 자극에 응답하는 CD4+ T 세포를 나타내고, 그것을 HIV 에 덜 민감하게 만드 본원에 기재된 렌티바이러스 벡터로 형질도입된 CD4+ T 세포를 포함한다.
- [0114] 용어 "치료적 유효량" 은 제시된 가벼운 병, 부상, 질환, 또는 병태로 고생하는 환자에서 보이는 증상, 진행, 또는 합병증의 발생을 치료 또는 예방하기 위한, 적합한 조성물 중, 및 적합한 투여 형태 중 본 발명의 활성제

의 충분한 양을 나타낸다. 치료적 유효량은 환자의 병태의 상태 또는 그것의 중증도, 및 치료될 대상체의 연령, 체중 등에 따라 다를 수 있다. 치료적 유효량은, 예를 들어, 투여 경로, 대상체의 병태, 뿐만 아니라 담당자에 의해 이해되는 기타 인자를 포함하는 다수의 인자 중 임의의 것에 따라 다를 수 있다.

[0115] 본원에서 사용되는 바와 같은, 용어 "치료적 벡터" 는 렌티바이러스 벡터 예컨대 AGT103 벡터와 동의어이다.

[0116] 용어 "치료" 또는 "치료하는" 은 일반적으로 치료되는 대상체의 자연적 과정을 변경하려는 시도의 개입을 나타내고, 예방을 위해 또는 임상 병리학의 과정 동안 수행될 수 있다. 바람직한 효과는 질환의 발생 또는 재발의 예방, 증상의 경감, 질환의 임의의 직접 또는 간접 병리학적 결과의 어게, 감소 또는 저해, 질환 상태의 개선 또는 완화, 및 차도 또는 개선된 예후의 야기를 포함하나, 그에 제한되지 않는다.

[0117] **본 공개의 양상의 설명**

[0118] 본원에서 설명되는 바와 같이, 하나의 양상에서, 대상체에서의 HIV 감염을 치료하는 방법이 개시된다. 방법은 백혈구를 대상체로부터 제거하고, 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC) 를 정제하는 단계를 포함한다. 방법은 PBMC 를 생체외에서 치료적 유효량의 자극제와 접촉시키는 단계; PBMC 를 생체외에서 적어도 하나의 유전적 요소를 인코딩하는 바이러스 전달 시스템으로 형질도입하는 단계; 및 형질도입된 PBMC 를 적어도 1 일 동안 배양하는 단계를 추가로 포함한다. 방법은, 예를 들어, 바람직하게는 PBMC 를 CD4+ T 세포에 관해 농축시키는 것에 의하는, PBMC 의 추가의 농축을 추가로 포함할 수 있다. 형질도입된 PBMC 는 약 1 내지 약 35 일 배양될 수 있다. 방법은 형질도입된 PBMC 를 대상체 내로 주입하는 단계를 추가로 수반할 수 있다. 대상체는 인간일 수 있다. 자극제는 펩티드 또는 펩티드의 혼합물을 포함할 수 있다. 바람직한 구현예에서, 자극제는 gag 펩티드를 포함한다. 자극제는 백신을 포함할 수 있다. 백신은 HIV 백신일 수 있고, 바람직한 구현예에서, HIV 백신은 MVA/HIV62B 백신 또는 그의 변이체이다. 바람직한 구현예에서, 바이러스 전달 시스템은 렌티바이러스 입자를 포함한다. 하나의 구현예에서, 적어도 하나의 유전적 요소는 케모카인 수용체 CCR5 의 생산을 저해할 수 있는 소형 RNA 또는 HIV RNA 서열을 표적화할 수 있는 적어도 하나의 소형 RNA 를 포함할 수 있다. 또다른 구현예에서, 적어도 하나의 유전적 요소는 케모카인 수용체 CCR5 의 생산을 저해할 수 있는 소형 RNA 및 HIV RNA 서열을 표적화할 수 있는 적어도 하나의 소형 RNA 를 포함할 수 있다. HIV RNA 서열은 HIV Vif 서열, HIV Tat 서열, 또는 그의 변이체를 포함할 수 있다. 적어도 하나의 유전적 요소는 microRNA 또는 shRNA 를 포함할 수 있다. 바람직한 구현예에서, 적어도 하나의 유전적 요소는 microRNA 클러스터를 포함한다.

[0119] 또다른 양상에서, 적어도 하나의 유전적 요소는

AGGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCGACTGTAACTGAGCTTGCTCTACTGTGAAG
CCACAGATGGGTAGAGCAAGCACAGTTTACCGCTGCCTACTGCCTCGGACTTCAA
GGGGCTT (SEQ ID NO: 1)

[0121] 와 적어도 80%, 적어도 81%, 적어도 82%, 적어도 83%, 적어도 84%, 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 87%, 적어도 88%, 적어도 89%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95% 또는 그 이상 동일성을 갖는 microRNA 를 포함한다. 바람직한 구현예에서, 적어도 하나의 유전적 요소는 하기를 포함한다:

AGGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCGACTGTAACTGAGCTTGCTCTACTGTGAAG
CCACAGATGGGTAGAGCAAGCACAGTTTACCGCTGCCTACTGCCTCGGACTTCAA
GGGGCTT (SEQ ID NO: 1).

[0123] 또다른 양상에서, 적어도 하나의 유전적 요소는

CATCTCCATGGCTGTACCACCTTGTCGGGGGATGTGTACTTCTGAACTTGTGTTGA
ATCTCATGGAGTTCAGAAGAACACATCCGCACTGACATTTTGGTATCTTTCATCTG
ACCA (SEQ ID NO: 2)

- [0125] 와 적어도 80%, 또는 적어도 85%, 또는 적어도 90%, 또는 적어도 95% 동일성; 또는
 GGGCCTGGCTCGAGCAGGGGGCGAGGGATTCCGCTTCTTCCTGCCATAGCGTGG
 TCCCCTCCCCTATGGCAGGCAGAAGCGGCACCTTCCCCTCCCAATGACCGCGTCTTC
 GTCG (SEQ ID NO: 3)
- [0126] 와 적어도 80%, 적어도 81%, 적어도 82%, 적어도 83%, 적어도 84%, 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 87%, 적어도 88%, 적어도 89%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95% 또는 그 이상 동일성을 갖는 microRNA 를 포함한다. 바람직한 구현예에서, 적어도 하나의 유전적 요소는 하기를 포함한다:
 CATCTCCATGGCTGTACCACCTTGTTCGGGGGATGTGTACTTCTGAACTTGTGTTGA
 ATCTCATGGAGTTCAGAAGAACACATCCGCACTGACATTTTGGTATCTTTCATCTG
 ACCA (SEQ ID NO: 2); 또는
 GGGCCTGGCTCGAGCAGGGGGCGAGGGATTCCGCTTCTTC
 CTGCCATAGCGTGGTCCCCTCCCCTATGGCAGGCAGAAGCGGCACCTTCCCCTCCCA
 ATGACCGCGTCTTCGTCG (SEQ ID NO: 3).
- [0128] 또다른 양상에서, microRNA 클러스터는
 AGGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCGACTGTAAACTGAGCTTGCTCTACTGTGAAG
 CCACAGATGGGTAGAGCAAGCACAGTTTACCGCTGCCTACTGCCTCGGACTTCAA
 GGGGCTTCCCGGGCATCTCCATGGCTGTACCACCTTGTTCGGGGGATGTGTACTTCT
 GAACTTGTGTTGAATCTCATGGAGTTCAGAAGAACACATCCGCACTGACATTTTGG
 TATCTTTCATCTGACCAGCTAGCGGGCCTGGCTCGAGCAGGGGGCGAGGGATTCC
 GCTTCTTCCCTGCCATAGCGTGGTCCCCTCCCCTATGGCAGGCAGAAGCGGCACCTT
 CCCCTCCCAATGACCGCGTCTTCGTC (SEQ ID NO: 31)
- [0130] 와 적어도 80%, 적어도 81%, 적어도 82%, 적어도 83%, 적어도 84%, 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 87%, 적어도 88%, 적어도 89%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95% 또는 그 이상 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 바람직한 구현예에서, microRNA 클러스터는 하기를 포함한다:
 AGGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCGACTGTAAACTGAGCTTGCTCT
 ACTGTGAAGCCACAGATGGGTAGAGCAAGCACAGTTTACCGCTGCCTACTGCCTC
 GGACTTCAAGGGGCTTCCCGGGCATCTCCATGGCTGTACCACCTTGTTCGGGGGATG
 TGTACTTCTGAACTTGTGTTGAATCTCATGGAGTTCAGAAGAACACATCCGCACTG
 ACATTTTGGTATCTTTCATCTGACCAGCTAGCGGGCCTGGCTCGAGCAGGGGGCGA
 GGGATTCCGCTTCTTCCCTGCCATAGCGTGGTCCCCTCCCCTATGGCAGGCAGAAGC
 GGCACCTTCCCCTCCCAATGACCGCGTCTTCGTC (SEQ ID NO: 31).
- [0132] 또다른 양상에서, HIV 로 감염된 세포를 치료하는 방법이 제공된다. 방법은 HIV 로 감염된 대상체로부터 단 리된 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC) 를 치료적 유효량의 자극제와 접촉시키는 단계로서, 접촉이 생체외에서 수행 되는 단계; PBMC 를 생체외에서 적어도 하나의 유전적 요소를 인코딩하는 바이러스 전달 시스템으로 형질도입하 는 단계; 및 형질도입된 PBMC 를 적어도 1 일 동안 배양하는 단계를 포함한다. 형질도입된 PBMC 는 약 1 내 지 약 35 일 배양될 수 있다. 방법은 형질도입된 PBMC 를 대상체 내로 주입하는 단계를 추가로 수반할 수 있다. 대상체는 인간일 수 있다. 자극제는 펩티드 또는 펩티드의 혼합물을 포함할 수 있고, 바람직한 구현예에서 gag 펩티드를 포함한다. 자극제는 백신을 포함할 수 있다. 백신은 HIV 백신일 수 있고, 바 람직한 구현예에서, HIV 백신은 MVA/HIV62B 백신 또는 그의 변이체이다. 바람직한 구현예에서, 바이러스 전 달 시스템은 렌티바이러스 입자를 포함한다. 하나의 구현예에서, 적어도 하나의 유전적 요소는 케모카인 수 용체 CCR5 의 생산을 저해할 수 있는 소형 RNA 또는 HIV RNA 서열을 표적화할 수 있는 적어도 하나의 소형 RNA 를 포함할 수 있다. 또다른 구현예에서, 적어도 하나의 유전적 요소는 케모카인 수용체 CCR5 의 생산을 저 해할 수 있는 소형 RNA 및 HIV RNA 서열을 표적화할 수 있는 적어도 하나의 소형 RNA 를 포함할 수 있다.

HIV RNA 서열은 HIV Vif 서열, HIV Tat 서열, 또는 그의 변이체를 포함할 수 있다. 적어도 하나의 유전적 요소는 microRNA 또는 shRNA 를 포함할 수 있다. 바람직한 구현예에서, 적어도 하나의 유전적 요소는 microRNA 클러스터를 포함한다.

[0134] 또다른 양상에서, 적어도 하나의 유전적 요소는

AGGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCGACTGTAAACTGAGCTTGCTCTACTGTGAAG
CCACAGATGGGTAGAGCAAGCACAGTTTACCGCTGCCTACTGCCTCGGACTTCAA
GGGGCTT (SEQ ID NO: 1)

[0135]

와 적어도 80%, 적어도 81%, 적어도 82%, 적어도 83%, 적어도 84%, 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 87%, 적어도 88%, 적어도 89%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95% 또는 그 이상 동일성을 갖는 microRNA 를 포함한다. 바람직한 구현예에서, 적어도 하나의 유전적 요소는 하기를 포함한다:

AGGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCGACTGTAAACTGAGCTTGCTCTACTGTGAAG
CCACAGATGGGTAGAGCAAGCACAGTTTACCGCTGCCTACTGCCTCGGACTTCAA
GGGGCTT (SEQ ID NO: 1).

[0137]

[0138] 또다른 양상에서, 적어도 하나의 유전적 요소는

CATCTCCATGGCTGTACCACCTTGTCGGGGGATGTGTACTTCTGAACTTGTGTTGA
ATCTCATGGAGTTCAGAAGAACACATCCGCACTGACATTTTGGTATCTTTCATCTG
ACCA (SEQ ID NO: 2)

[0139]

[0140] 와 적어도 80%, 적어도 81%, 적어도 82%, 적어도 83%, 적어도 84%, 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 87%, 적어도 88%, 적어도 89%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95% 또는 그 이상 동일성; 또는

GGGCCTGGCTCGAGCAGGGGGCGAGGGATTCCGCTTCTTCCTGCCATAGCGTGG
TCCCCTCCCCTATGGCAGGCAGAAGCGGCACCTTCCCCTCCAATGACCGCGTCTTC
GTCG (SEQ ID NO: 3)

[0141]

[0142] 와 적어도 80%, 적어도 81%, 적어도 82%, 적어도 83%, 적어도 84%, 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 87%, 적어도 88%, 적어도 89%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95% 또는 그 이상 동일성을 갖는 microRNA 를 포함한다. 바람직한 구현예에서, 적어도 하나의 유전적 요소는 하기를 포함한다:

CATCTCCATGGCTGTACCACCTTGTCGGGGGATGTGTACTTCTGAACTTGTGTTGA
ATCTCATGGAGTTCAGAAGAACACATCCGCACTGACATTTTGGTATCTTTCATCTG
ACCA (SEQ ID NO: 2); 또는
GGGCCTGGCTCGAGCAGGGGGCGAGGGATTCCGCTTCTTC
CTGCCATAGCGTGGTCCCCTCCCCTATGGCAGGCAGAAGCGGCACCTTCCCCTCCCA
ATGACCGCGTCTTCGTCG (SEQ ID NO: 3).

[0143]

[0144] 또다른 양상에서, microRNA 클러스터는

AGGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCGACTGTAAACTGAGCTTGCTCTACTGTGAAG
CCACAGATGGGTAGAGCAAGCACAGTTTACCGCTGCCTACTGCCTCGGACTTCAA
GGGGCTTCCCGGCATCTCCATGGCTGTACCACCTTGTCGGGGGATGTGTACTTCT
GAACTTGTGTTGAATCTCATGGAGTTCAGAAGAACACATCCGCACTGACATTTTGG
TATCTTTCATCTGACCAGCTAGCGGGCCTGGCTCGAGCAGGGGGCGAGGGATTCC
GCTTCTTCCTGCCATAGCGTGGTCCCCTCCCCTATGGCAGGCAGAAGCGGCACCTT
CCCTCCCAATGACCGCGTCTTCGTC (SEQ ID NO: 31)

[0145]

[0146] 와 적어도 80%, 적어도 81%, 적어도 82%, 적어도 83%, 적어도 84%, 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 87%, 적어도 88%, 적어도 89%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95% 또는 그 이상 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 바람직한 구현예에서, microRNA 클러스터는 하기를 포함한다:

AGGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCGACTGTAAACTGAGCTTGCTCT
 ACTGTGAAGCCACAGATGGGTAGAGCAAGCACAGTTTACCGCTGCCTACTGCCTC
 GGACTTCAAGGGGCTTCCCGGGCATCTCCATGGCTGTACCACCTTGTCGGGGGATG
 TGTACTTCTGAACTTGTGTTGAATCTCATGGAGTTCAGAAGAACACATCCGCACTG
 ACATTTTGGTATCTTTCATCTGACCAGCTAGCGGGCTGGCTCGAGCAGGGGGCGA
 GGGATCCGCTTCTTCCTGCCATAGCGTGGTCCCCTCCCCTATGGCAGGCAGAAGC
 GGCACCTTCCCTCCCAATGACCGCGTCTTCGTC (SEQ ID NO: 31).

[0147]

[0148] 또다른 양상에서, 렌티바이러스 벡터가 개시된다. 렌티바이러스 벡터는 적어도 하나의 인코딩된 유전적 요소를 포함하며, 적어도 하나의 인코딩된 유전적 요소는 케모카인 수용체 CCR5의 생산을 저해할 수 있는 소형 RNA 또는 HIV RNA 서열을 표적화할 수 있는 적어도 하나의 소형 RNA를 포함한다. 또다른 양상에서 적어도 하나의 인코딩된 유전적 요소가 케모카인 수용체 CCR5의 생산을 저해할 수 있는 소형 RNA 및 HIV RNA 서열을 표적화할 수 있는 적어도 하나의 소형 RNA를 포함하는 렌티바이러스 벡터가 개시된다. HIV RNA 서열은 HIV Vif 서열, HIV Tat 서열, 또는 그의 변이체를 포함할 수 있다. 적어도 하나의 인코딩된 유전적 요소는 microRNA 또는 shRNA를 포함할 수 있다. 적어도 하나의 인코딩된 유전적 요소는 microRNA 클러스터를 포함할 수 있다.

[0149] 또다른 양상에서, 적어도 하나의 유전적 요소는

AGGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCGACTGTAAACTGAGCTTGCTCTACTGTGAAG
 CCACAGATGGGTAGAGCAAGCACAGTTTACCGCTGCCTACTGCCTCGGACTTCAA
 GGGGCTT (SEQ ID NO: 1)

[0150]

[0151] 와 적어도 80%, 적어도 81%, 적어도 82%, 적어도 83%, 적어도 84%, 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 87%, 적어도 88%, 적어도 89%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95% 또는 그 이상 동일성을 갖는 microRNA를 포함한다. 바람직한 구현예에서, 적어도 하나의 유전적 요소는 하기를 포함한다:

AGGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCGACTGTAAACTGAGCTTGCTCTACTGTGAAG
 CCACAGATGGGTAGAGCAAGCACAGTTTACCGCTGCCTACTGCCTCGGACTTCAA
 GGGGCTT (SEQ ID NO: 1).

[0152]

[0153] 또다른 양상에서, 적어도 하나의 유전적 요소는

CATCTCCATGGCTGTACCACCTTGTCGGGGGATGTGTACTTCTGAACTTGTGTTGA
 ATCTCATGGAGTTCAGAAGAACACATCCGCACTGACATTTTGGTATCTTTCATCTG
 ACCA (SEQ ID NO: 2)

[0154]

[0155] 와 적어도 80%, 적어도 81%, 적어도 82%, 적어도 83%, 적어도 84%, 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 87%, 적어도 88%, 적어도 89%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95% 또는 그 이상 동일성; 또는

GGGCTGGCTCGAGCAGGGGGCGAGGGATTCCGCTTCTTCCTGCCATAGCGTGG
 TCCCCTCCCCTATGGCAGGCAGAAGCGGCACCTTCCCTCCCAATGACCGCGTCTTC
 GTCG (SEQ ID NO: 3)

[0156]

[0157] 와 적어도 80%, 적어도 81%, 적어도 82%, 적어도 83%, 적어도 84%, 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 87%, 적어도 88%, 적어도 89%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95% 또는 그 이상 동일성을 갖는 microRNA를 포함한다. 바람직한 구현예에서, 적어도 하나의 유전적 요소는 하기를 포함한다:

CATCTCCATGGCTGTACCACCTTGTCGGGGGATGTGTACTTCTGAACTTGTGTTGA
 ATCTCATGGAGTTCAGAAGAACACATCCGCACTGACATTTTGGTATCTTTCATCTG
 ACCA (SEQ ID NO: 2); 또는
 GGGCCTGGCTCGAGCAGGGGGCGAGGGATTCCGCTTCTTC
 CTGCCATAGCGTGGTCCCCTCCCCTATGGCAGGCAGAAGCGGCACCTTCCCTCCCA
 ATGACCGCGTCTTCGTCG (SEQ ID NO: 3).

[0158]

[0159]

또다른 양상에서, microRNA 클러스터는

AGGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCGACTGTAAACTGAGCTTGCTCTACTGTGAAG
 CCACAGATGGGTAGAGCAAGCACAGTTTACCGCTGCCTACTGCCTCGGACTTCAA
 GGGGCTTCCCGGGCATCTCCATGGCTGTACCACCTTGTCGGGGGATGTGTACTTCT
 GAACTTGTGTTGAATCTCATGGAGTTCAGAAGAACACATCCGCACTGACATTTTGG
 TATCTTTCATCTGACCAGCTAGCGGGCCTGGCTCGAGCAGGGGGCGAGGGATTCC
 GCTTCTTCTGCCATAGCGTGGTCCCCTCCCCTATGGCAGGCAGAAGCGGCACCTT
 CCCTCCCAATGACCGCGTCTTCGTC (SEQ ID NO: 31)

[0160]

[0161]

와 적어도 80%, 적어도 81%, 적어도 82%, 적어도 83%, 적어도 84%, 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 87%, 적어도 88%, 적어도 89%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95% 또는 그 이상 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 바람직한 구현예에서, microRNA 클러스터는 하기를 포함한다:

AGGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCGACTGTAAACTGAGCTTGCTCT
 ACTGTGAAGCCACAGATGGGTAGAGCAAGCACAGTTTACCGCTGCCTACTGCCTC
 GGACTTCAAGGGGCTTCCCGGGCATCTCCATGGCTGTACCACCTTGTCGGGGGATG
 TGTACTTCTGAACTTGTGTTGAATCTCATGGAGTTCAGAAGAACACATCCGCACTG
 ACATTTTGGTATCTTTCATCTGACCAGCTAGCGGGCCTGGCTCGAGCAGGGGGCGA
 GGGATTCCGCTTCTTCTGCCATAGCGTGGTCCCCTCCCCTATGGCAGGCAGAAGC
 GGCACCTTCCCTCCCAATGACCGCGTCTTCGTC (SEQ ID NO: 31).

[0162]

[0163]

또다른 양상에서, 렌티바이러스 입자를 발현시키기 위한 렌티바이러스 벡터 시스템이 개시된다. 시스템은 본원에 기재된 바와 같은 렌티바이러스 벡터; 세포를 감염시키기 위해 최적화된 외피 단백질을 발현시키기 위한 외피 플라스미드; 및 gag, pol, 및 rev 유전자를 발현시키기 위한 적어도 하나의 헬퍼 플라스미드를 포함하며, 렌티바이러스 벡터, 외피 플라스미드, 및 적어도 하나의 헬퍼 플라스미드가 패키징 세포주 내로 트랜스펙션될 때, 렌티바이러스 입자가 패키징 세포주에 의해 생산되며, 렌티바이러스 입자는 케모카인 수용체 CCR5 의 생산을 저해하거나 또는 HIV RNA 서열을 표적화할 수 있다.

[0164]

또다른 양상에서, 세포를 감염시킬 수 있는 렌티바이러스 입자가 개시된다. 렌티바이러스 입자는 세포를 감염시키기 위해 최적화된 외피 단백질, 및 본원에 기재된 바와 같은 렌티바이러스 벡터를 포함한다. 외피 단백질은 T 세포를 감염시키기 위해 최적화될 수 있다. 바람직한 구현예에서, 외피 단백질은 CD4+ T 세포를 감염시키기 위해 최적화된다.

[0165]

또다른 양상에서, 변형된 세포가 개시된다. 변형된 세포는 CD4+ T 세포를 포함하며, CD4+ T 세포는 본원에 기재된 바와 같은 렌티바이러스 입자로 감염되었다. 바람직한 구현예에서, CD4+ T 세포는 HIV 항원을 또한 인지한다. 추가로 바람직한 구현예에서, HIV 항원은 gag 항원을 포함한다. 추가로 바람직한 구현예에서, 렌티바이러스 입자로 감염 후에 CD4+ T 세포는 감소된 수준의 CCR5 를 발현한다.

[0166]

또다른 양상에서, 대상체를 치료적 처리 섭생법을 위해 선별하는 방법이 개시된다. 방법은 백혈구를 대상체로부터 제거하고, 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC) 를 정제하고, PBMC 와 연관되는 적어도 하나의 인자와 연관되는 제 1 정량화가능한 측정값을 확인하는 단계; PBMC 를 생체외에서 치료적 유효량의 제 2 자극제와 접촉시키고, PBMC 와 연관되는 적어도 하나의 인자와 연관되는 제 2 정량화가능한 측정값을 확인하여, 제 2 정량화가능한 측정값이 제 1 정량화가능한 측정값보다 더 높을 때, 대상체가 치료 섭생법을 위해 선별되는 단계를 포함한다. 적어도 하나의 인자는 T 세포 증식 또는 IFN 감마 생산일 수 있다.

- [0167] 또다른 양상에서, 본원에 기재된 HIV 로 감염된 세포를 처리하는 것을 포함하는 임의의 방법은 PBMC 로부터의 세포의 적어도 하나의 부분집합을 고갈시키는 단계를 추가로 포함한다. 구현예에서, 방법은 PBMC 로부터의 세포의 적어도 하나의 부분집합을 고갈시키는 단계를 포함하며, 세포의 적어도 하나의 부분집합은 CD8+ T 세포, γ δ 세포, NK 세포, B 세포, 호중구, 호염기구, 호산구, T 조절 세포, NKT 세포, 및 적혈구 중 임의의 하나 이상을 포함한다. 구현예에서, 고갈은 백혈구 제거 후에 일어난다. 구현예에서, 고갈은 백혈구 제거와 동시에 일어난다.
- [0168] 다른 양상에서, 본원에 기재된 대상체에서 HIV 를 처리하는 것을 포함하는 임의의 방법은 PBMC 로부터의 세포의 적어도 하나의 부분집합을 고갈시키는 단계를 추가로 포함한다. 구현예에서, 방법은 PBMC 로부터의 세포의 적어도 하나의 부분집합을 고갈시키는 단계를 포함하며, 세포의 적어도 하나의 부분집합은 CD8+ T 세포, γ δ 세포, NK 세포, B 세포, 호중구, 호염기구, 호산구, T 조절 세포, NKT 세포, 및 적혈구 중 임의의 하나 이상을 포함한다. 구현예에서, 고갈은 백혈구 제거 후에 일어난다. 구현예에서, 고갈은 백혈구 제거와 동시에 일어난다.
- [0169] 또다른 양상에서, 본원에 기재된 치료적 섭생법을 위해 대상체를 선별하는 것을 포함하는 임의의 방법은 PBMC 로부터의 세포의 적어도 하나의 부분집합을 고갈시키는 단계를 추가로 포함한다. 구현예에서, 방법은 PBMC 로부터의 세포의 적어도 하나의 부분집합을 고갈시키는 단계를 포함하며, 세포의 적어도 하나의 부분집합은 CD8+ T 세포, γ δ 세포, NK 세포, B 세포, 호중구, 호염기구, 호산구, T 조절 세포, NKT 세포, 및 적혈구 중 임의의 하나 이상을 포함한다. 구현예에서, 고갈은 백혈구 제거 후에 일어난다. 구현예에서, 고갈은 백혈구 제거와 동시에 일어난다.
- [0170] 또다른 양상에서, 본원에 기재된 임의의 방법은 면역 세포의 적어도 하나의 부분집합을 PBMC 로부터 고갈시키는 단계를 추가로 포함하며, 세포의 적어도 하나의 부분집합은 CD8+ T 세포, γ δ 세포, NK 세포, B 세포, 호중구, 호염기구, 호산구, T 조절 세포, NKT 세포, 및 적혈구 중 임의의 하나 이상을 포함한다. 구현예에서, PBMC 로부터 고갈된 세포는 CD8+ T 세포이다. 구현예에서, PBMC 로부터 고갈된 세포는 γ δ 세포이다. 구현예에서, PBMC 로부터 고갈된 세포는 NK 세포이다. 구현예에서, PBMC 로부터 고갈된 세포는 B 세포이다. 구현예에서, PBMC 로부터 고갈된 세포는 T 조절 세포이다. 구현예에서, PBMC 로부터 고갈된 세포는 NKT 세포이다. 구현예에서, PBMC 로부터 고갈된 세포는 적혈구이다. 구현예에서, PBMC 로부터 고갈된 세포는 CD8+ T 세포, γ δ 세포, 및 NK 세포이다. 구현예에서, PBMC 로부터 고갈된 세포는 CD8+ T 세포, γ δ 세포, NK 세포, 및 B 세포이다. 구현예에서, PBMC 로부터 고갈된 세포는 CD8+ T 세포, γ δ 세포, NK 세포, B 세포, 및 T 조절 세포이다. 구현예에서, PBMC 로부터 고갈된 세포는 CD8+ T 세포, γ δ 세포, NK 세포, B 세포, T 조절 세포, 및 NKT 세포이다. 구현예에서, PBMC 로부터 고갈된 세포는 CD8+ T 세포, γ δ 세포, NK 세포, B 세포, T 조절 세포, NKT 세포, 및 적혈구이다. 구현예에서, PBMC 로부터 고갈된 세포는 CD8+ T 세포, γ δ 세포, NK 세포, B 세포, T 조절 세포, NKT 세포, 및 적혈구이다. 구현예에서, PBMC 로부터 고갈된 세포는 γ δ 세포, NK 세포, B 세포, 및 T 조절 세포이다. 구현예에서, PBMC 로부터 고갈된 세포는 γ δ 세포, NK 세포, B 세포, T 조절 세포, 및 NKT 세포이다. 구현예에서, PBMC 로부터 고갈된 세포는 γ δ 세포, NK 세포, B 세포, T 조절 세포, NKT 세포, 및 적혈구이다. 구현예에서, PBMC 로부터 고갈된 세포는 NK 세포, B 세포, 및 T 조절 세포이다. 구현예에서, PBMC 로부터 고갈된 세포는 NK 세포, B 세포, T 조절 세포, NKT 세포, 및 적혈구이다. 구현예에서, PBMC 로부터 고갈된 세포는 B 세포 및 T 조절 세포이다. 구현예에서, PBMC 로부터 고갈된 세포는 B 세포, T 조절 세포, NKT 세포, 및 적혈구이다. 구현예에서, PBMC 로부터 고갈된 세포는 T 조절 세포 및 NKT 세포이다. 구현예에서, PBMC 로부터 고갈된 세포는 T 조절 세포, NKT 세포, 및 적혈구이다. 구현예에서, PBMC 로부터 고갈된 세포는 NKT 세포 및 적혈구이다. 구현예에서, PBMC 로부터 고갈된 세포는 CD8+ T 세포 및 NK 세포이다. 구현예에서, PBMC 로부터 고갈된 세포는 CD8+ T 세포, NK 세포, B 세포, 및 T 조절 세포이다. 구현예에서, PBMC 로부터 고갈된 세포는 CD8+ T 세포, NK 세포, B 세포, T 조절 세포, 및 NKT 세포이다. 구현예에서, PBMC 로부터 고갈된 세포는 CD8+ T 세포, NK 세포, B 세포, T 조절 세포, NKT 세포, 및 적혈구이다. 구현예에서, PBMC 로부터 고갈된 세포는 γ δ 및 B 세포이다. 구현예에서, PBMC 로부터 고갈된 세포는 γ δ , B 세포, 및 T 조절 세포이다. 구현예에서, PBMC 로부터 고갈된 세포는 γ δ , B 세포, T 조절 세포, 및 NKT 세포이다. 구현예에서, PBMC 로부터

고갈된 세포는 $\gamma \delta$, B 세포, T 조절 세포, NKT 세포, 및 적혈구이다. 구현예에서, PBMC로부터 고갈된 세포는 NK 세포 및 T 조절 세포이다. 구현예에서, PBMC로부터 고갈된 세포는 NK 세포, T 조절 세포, 및 NKT 세포이다. 구현예에서, PBMC로부터 고갈된 세포는 NK 세포, T 조절 세포, NKT 세포, 및 적혈구이다. 구현예에서, PBMC로부터 고갈된 세포는 B 세포 및 NKT 세포이다. 구현예에서, PBMC로부터 고갈된 세포는 B 세포, NKT 세포, 및 적혈구이다. 구현예에서, PBMC로부터 고갈된 세포는 T 조절 세포 및 적혈구이다. 구현예에서, 본원에 기재된 바와 같은, PBMC로부터 고갈된 세포는 호중구, 호염기구, 및 호산구 중 임의의 하나 또는 이들의 임의의 조합을 포함한다.

[0171] 또다른 양상에서, CD8+ T 세포는 세포 증식의 시작시에 고갈되어 CD4+ T 세포 증식을 개선한다. 구현예에서, 세포 고갈은 펩티드 자극 후에 및 렌티바이러스 형질도입 전에, 세포가 기계적 응력을 더 잘 견딜 수 있을 때 수행된다. 구현예에서, CD8+ T 세포 고갈 후에, 세포는 배양 배지에 대략 24 시간 동안 배치된다. 구현예에서, CD8+ T 세포 고갈 후에, 세포는 배지에 24 시간 미만, 예를 들어, 20 시간 미만, 16 시간 미만, 8 시간 미만, 또는 4 시간 미만 동안 배치된다. 구현예에서, CD8+ T 세포 고갈 후에, 세포는 배지에 24 시간 초과, 예를 들어, 30 시간 초과, 36 시간 초과, 42 시간 초과, 또는 48 시간 초과 동안 배치된다. 구현예에서, 배양 배지는 IL-7 를 포함한다. 구현예에서, 배양 배지는 IL-15 를 포함한다. 구현예에서, 배양 배지는 IL-7 및 IL-15 를 포함한다. 구현예에서, 세포 고갈은 펩티드 자극 전에 수행된다. 구현예에서, gag 단백질이 펩티드 자극을 야기하는데 사용된다. 구현예에서, HIV 백신이 펩티드 자극을 야기하는데 사용된다. 구현예에서, 백신은 MVA/HIV62B 백신이며, 이것이 펩티드 자극을 야기하는데 사용된다. 구현예에서, CD8+ T 세포는 PE 항-인간 CD8 항체 및 항-PE 마이크로비드로 고갈된다. 구현예에서, CD8 항체는 항-랫트 항체이다. 구현예에서, CD8 항체는 항-마우스 항체이다. 구현예에서, CD8 항체는 항-토끼 항체이다. 구현예에서, CD8 항체는 항-염소 항체이다. 구현예에서, 세포 고갈 및 펩티드 자극 후에, 세포는 형질도입된다. 구현예에서, 세포는 렌티바이러스로 형질도입된다. 구현예에서, 렌티바이러스는 GFP 를 운반한다. 구현예에서, 렌티바이러스는 RFP 를 운반한다. 구현예에서, 렌티바이러스는 EGFP 를 운반한다. 구현예에서, 세포는 형질도입 후에 배지에 배치된다. 구현예에서, 배양 배지는 IL-7 을 포함한다. 구현예에서, 배양 배지는 IL-15 를 포함한다. 구현예에서, 배양 배지는 IL-7 및 IL-15 를 포함한다. 구현예에서, 세포는 대략 2 일 동안 배양되어 CD4+ T 세포 증식을 허용한다. 구현예에서, 세포는 대략 3 일 배양되어 CD4+ T 세포 증식을 허용한다. 구현예에서, 세포는 2 일 미만, 예를 들어, 42 시간 미만, 36 시간 미만, 30 시간 미만, 24 시간 미만, 18 시간 미만, 12 시간 미만, 또는 6 시간 미만 동안 배양된다. 구현예에서, 세포는 3 일 초과, 예를 들어, 4 일 초과, 5 일 초과, 6 일 초과, 7 일 초과, 8 일 초과, 9 일 초과, 또는 10 일 초과 동안 배양된다. 구현예에서, 세포는 2 내지 3 일, 예를 들어, 대략 30 시간, 대략 36 시간, 또는 대략 42 시간 배양된다.

[0172] 또다른 양상에서, CD8+, $\gamma \delta$, NK, 또는 B 세포가 고갈되어 CD4+ T 세포 증식을 개선한다. 구현예에서, CD8+, $\gamma \delta$, NK, 및 B 세포 중 임의의 둘 이상이 고갈되어 CD4+ T 세포 증식을 개선한다. 구현예에서, CD8+, $\gamma \delta$, NK, B, T 조절, NKT, 또는 적혈구 세포가 고갈되어 CD4+ T 세포 증식을 개선한다. 구현예에서, CD8+, $\gamma \delta$, NK, B, T 조절, NKT, 및 적혈구 세포 중 임의의 둘 이상이 고갈되어 CD4+ T 세포 증식을 개선한다. 구현예에서, 세포 고갈은 펩티드 자극 후에 및 렌티바이러스 형질도입 전에 수행된다. 구현예에서, 세포 고갈 후에, 세포는 ~24 시간 동안 배양 배지에 배치된다. 구현예에서, 세포 고갈 후에, 세포는 24 시간 미만, 예를 들어, 20 시간 미만, 16 시간 미만, 8 시간 미만, 또는 4 시간 미만 동안 배지에 배치된다. 구현예에서, CD8+ T 세포 고갈 후에, 세포는 24 시간 초과, 예를 들어, 30 시간 초과, 36 시간 초과, 42 시간 초과, 또는 48 시간 초과 동안 배지에 배치된다. 구현예에서, 배양 배지는 IL-7 을 포함한다. 구현예에서, 배양 배지는 IL-15 를 포함한다. 구현예에서, 배양 배지는 IL-7 및 IL-15 를 포함한다. 구현예에서, 세포 고갈은 펩티드 자극 전에 수행된다. 구현예에서, gag 단백질이 펩티드 자극을 야기하는데 사용된다. 구현예에서, HIV 백신이 펩티드 자극을 야기하는데 사용된다. 구현예에서, MVA/HIV62B 백신이 펩티드 자극을 야기하는데 사용된다. 구현예에서, CD8+ T, $\gamma \delta$, NK, 및/또는 B 세포는 PE 표지된 특이적 항체 및 항-PE 마이크로비드로 고갈된다. 구현예에서, 사용되는 항체는 항-인간 항체이다. 구현예에서, 사용되는 항체는 항-랫트 항체이다. 구현예에서, 사용되는 항체는 항-마우스 항체이다. 구현예에서, 사용되는 항체는 항-염소 항체이다. 구현예에서, 세포 고갈 및 펩티드 자극 후에, 세포는 형질도입된다. 구현예에서, 세포는 렌티바이러스로 형질도입된다. 구현예에서, 렌티바이러스는 GFP 를 운반한다. 구현예에서, 렌티바이러스는 RFP 를 운반한다. 구현예에서, 렌티바이러스는 EGFP 를 운반한다. 구현예에서, 세포는 형질도입 후에 배지에 배치된다. 구현예에서, 배양 배지는 IL-7 을 포함한다. 구현예에서, 배양 배지는 IL-15 를 포함한다. 구현예에서, 배양 배지를 포함한다 IL-7 및 IL-15 를 포함한다. 구현예에서, 세포는 대

략 2 일 동안 배양되어 CD4+ T 세포 증식을 허용한다. 구현예에서, 세포는 ~3 일 배양되어 CD4+ T 세포 증식을 허용한다. 구현예에서, 세포는 2 일 미만, 예를 들어, 42 시간 미만, 36 시간 미만, 30 시간 미만, 24 시간 미만, 18 시간 미만, 12 시간 미만, 또는 6 시간 미만 동안 배양된다. 구현예에서, 세포는 3 일 초과, 예를 들어, 4 일 초과, 5 일 초과, 6 일 초과, 7 일 초과, 8 일 초과, 9 일 초과, 또는 10 일 초과 동안 배양된다. 구현예에서, 세포는 2 내지 3 일, 예를 들어, ~30 시간, ~36 시간, 또는 ~42 시간 배양된다.

[0173] 또다른 양상에서, 렌티바이러스는 GFP 를 포함하며, 이것이 형질도입 효율을 측정하는데 사용된다. 구현예에서, 렌티바이러스는 RFP 를 포함한다. 구현예에서, 렌티바이러스는 EGFP 를 운반한다. 구현예에서, GFP 양성 세포로 항원-특이적 CD4+ T 세포를 동정하기 위해 사이토카인 포획 시스템이 사용된다. 구현예에서, 형질도입된 세포 부분집합을 동정하기 위해 GFP 가 사용된다. 구현예에서, 형질도입된 세포 부분집합을 동정하기 위해 RFP 가 사용된다. 구현예에서, 형질도입된 세포 부분집합을 동정하기 위해 EGFP 가 사용된다. 구현예에서, 형질도입 효율을 측정하기 위해 본원에 기재된 임의의 형질도입 방법이 사용될 수 있다. 구현예에서, 렌티바이러스 형질도입 전에, CD8+ T, $\gamma \delta$, NK, B, 호중구, 호염기구, 호산구, T 조절, NKT, 및 적혈구 세포 중 임의의 하나 이상을 고갈시키기 위해 본원에 기재된 임의의 고갈 방법이 사용될 수 있다.

[0174] 다른 양상에서, 형질도입 효율은 qPCR 에 의해 벡터 카피수 (VCN) 를 검출함으로써 측정된다. 구현예에서, 최종 세포 산물 중 VCN 에 기초하는 형질도입된 세포의 백분율은 형질도입된 세포와 VCN 사이의 관계를 확립함으로써 추정될 수 있다. 구현예에서, 형질도입된 세포의 백분율을 확인하기 위해 GFP 를 운반하는 렌티바이러스가 사용된다. 구현예에서, 형질도입된 세포의 백분율을 확인하기 위해 RFP 를 운반하는 렌티바이러스가 사용된다. 구현예에서, 형질도입된 세포의 백분율을 확인하기 위해 EGFP 를 운반하는 렌티바이러스가 사용된다. 구현예에서, 형질도입 효율을 측정하기 위해 본원에 기재된 임의의 형질도입 방법이 사용될 수 있다. 구현예에서, 렌티바이러스 형질도입 전에, CD8+ T, $\gamma \delta$, NK, B 세포 중 임의의 하나 이상을 고갈시키기 위해 본원에 기재된 임의의 고갈 방법이 사용될 수 있다.

[0175] **인간 면역결핍 바이러스 (HIV)**

[0176] 인간 면역결핍 바이러스는, 또한 통상 "HIV" 로서 언급되며, 인간에서 후천성 면역결핍 증후군 (AIDS) 을 야기하는 레트로바이러스이다. AIDS 는 면역계의 진행되는 실패가 생명을 위협하는 기회감염성 감염 및 암이 자라는 것을 허용하는 병태이다. 치료가 없으면, HIV 에 의한 감염 후에 평균 생존 시간은 HIV 아형에 따라 9 내지 11 년인 것으로 추정된다. HIV 에 의한 감염은 혈액, 정액, 질액, 쿠퍼액, 타액, 누액, 림프 또는 뇌척수액, 또는 모유를 포함하나 그에 제한되지 않는 체액의 전달에 의해 일어난다. HIV 는 감염된 개체에 자유 바이러스 입자로서 및 감염된 면역 세포 내에 둘 모두 존재할 수 있다.

[0177] HIV 는 인간 면역계에서 활력 세포 예컨대 헬퍼 T 세포를 감염시키지만, 항성은 HIV 아형에 따라 다를 수 있다. HIV 감염에 특이적으로 감수성일 수 있는 면역 세포는 CD4+ T 세포, 마크로파지, 및 수지상 세포를 포함하나 그에 제한되지 않는다. HIV 감염은 감염되지 않은 방관자 세포의 세포자멸사, 감염된 세포의 직접 바이러스 살해 살해, 및 감염된 세포를 인지하는 CD8 세포독성 림프구에 의한 감염된 CD4+ T 세포의 살해를 포함하나 그에 제한되지 않는 다수의 메커니즘을 통해 CD4+ T 세포의 낮은 수준을 초래한다. CD4+ T 세포 수가 임계 수준 미만으로 하강할 때, 세포-매개되는 면역력이 상실되고, 신체는 기회감염성 감염 및 암에 진행적으로 더욱 감수성이 된다.

[0178] 구조적으로, HIV 는 많은 기타 레트로바이러스와 구별된다. RNA 게놈은 적어도 일곱 개의 구조적 랜드마크 (LTR, TAR, RRE, PE, SLIP, CRS, 및 INS), 및 19 개의 단백질을 인코딩하는 적어도 아홉 개의 유전자 (gag, pol, env, tat, rev, nef, vif, vpr, vpu, 및 때때로 열번째 tev (이것은 tat, env 및 rev 의 융합체임)) 로 이루어진다. 이들 유전자 중 셋, gag, pol, 및 env 는 새로운 바이러스 입자를 위한 구조적 단백질을 만드는데 필요한 정보를 함유한다.

[0179] HIV 는 일차적으로 CD4 T 세포에서 복제하고, 세포성 파괴 또는 이상조절을 야기하여 숙주 면역력을 감소시킨다. HIV 는 통합된 프로바이러스로서 감염을 확립하고 특정 세포에서의 바이러스 발현이 세포를 병나게 하는 세포병리학 또는 숙주 면역계에 의한 검출에 관한 수준 미만으로 감소하는 잠복 상태에 들어갈 수 있기 때문에, HIV 는 치료하기 어렵고 연장된 간격의 고도 활성 항레트로바이러스 요법 (HAART) 후에도 박멸되지 않았다. 대부분의 경우에, HIV 감염은 치명적 질환을 야기하지만 생존은 HAART 에 의해 연장될 수 있다.

[0180] HIV 에 대항하는 싸움에서 주된 목적은 질환을 치유하기 위한 전략을 개발하는 것이다. 연장된 HAART 은 이

러한 목적을 달성하지 않았으므로, 연구자들은 대안적 절차로 눈을 돌렸다. 치료적 면역화 (감염이 일어난 후에 백신을 사용) 에 의해 숙주 면역력을 개선하려는 초기 노력은 영향이 없거나 미미했다. 마찬가지로, 치료 농축은 영향이 없거나 보통이었다.

[0181] 유전적 요법을 사용하여 일부 진척이 있었지만, 긍정적 결과는 산발적이고 오직 숙주 세포의 바이러스 침투에서 결정적 역할을 하는 CCR5 (케모카인 수용체) 를 인코딩하는 유전자의 대립형질 하나 또는 둘 모두에서 결함을 보유하는 드문 인간 중에서만 발견된다. 그러나, 많은 연구자들은 유전적 요법이 궁극적으로 HIV 치유를 달성하는 것에 매우 유망하다는 것에 낙관적이다.

[0182] 본원에서 공개되는 바와 같은, 본 발명의 방법 및 조성물은 신체로부터 모든 HIV 의 완전한 박멸을 포함하거나 포함하지 않을 수 있는 기능적 치유를 달성할 수 있다. 위에서 언급된 바와 같이, 기능적 치유는 이전에 HAART 을 요구했던 HIV+ 개체가, 낮은 또는 검출불가능한 바이러스 복제로 더 낮은 또는 간헐적 용량의 HAART 을 사용하여 생존할 수 있거나, 또는 잠재적으로 HAART 를 함께 중단할 수 있는 상태 또는 병태로서 정의된다. 본원에서 사용되는 바와 같은, 기능적 치유는 아마도 낮은 수준 바이러스 복제를 유지하고 질환 진행을 둔화 또는 제거하는 보조 요법을 여전히 요구할 수 있다. 기능적 치유의 가능한 결과는 모든 재발 가능성을 방지하는 HIV 의 궁극적 박멸이다.

[0183] 기능적 치유의 달성에 대한 일차 장애물은 HIV 자체의 기초 생물학에 있다. 바이러스 감염은 거의 모든 면역 기능에 결정적인 CD4 T 세포를 제거한다. 가장 중요하게, CD4 T 세포의 HIV 감염 및 고갈은 개별 세포의 활성화를 요구한다. 활성화는 재배열된 T 세포 수용체를 사용하여 병원체 또는 기타 분자를 인지하는 개별 CD4 T 세포 클론에 대한 특이적 메카니즘이다.

[0184] HIV 의 경우에, 감염은 감염되고 결과적으로 바이러스에 덜 특이적인 다른 T 세포 전에 고갈되는 HIV-특이적 T 세포의 집단을 활성화시키며, 이는 바이러스에 대항하는 면역계의 방어를 효과적으로 무기력하게 만든다. HIV-특이적 T 세포 응답에 관한 능력은 연장된 HAART 동안 재건된다; 그러나, HAART 이 중단될 때 반등하는 바이러스 감염은 과정을 반복하고 다시 바이러스-특이적 세포를 제거하여, 질환 진행의 시계를 재설정한다.

[0185] 명백히, 기능적 치유는 오직 HAART 이 중단된 후에 숙주의 선천 면역력이 HIV 에 맞서 제어하는 것을 허용하기에 충분한 HIV-특이적 CD4 T 세포가 보호되는 경우에만 가능하다. 하나의 구현예에서, 본 공개의 양상은 사전 면역화에 대한 필요 없이 기능적 치유를 제공하는 HIV 에 대항하는 숙주 면역력을 향상시키기 위한 방법 및 조성물을 제공한다.

[0186] **유전자 요법**

[0187] 바이러스 벡터는 질환 치료 또는 예방의 목적으로 유전적 구축물을 숙주 세포에 전달하는데 사용된다.

[0188] 유전적 구축물은 기존 결함을 수정 또는 보완하는 기능적 유전자 또는 유전자의 부분, 조절 단백질을 인코딩하는 DNA 서열, 안티센스, 단 상동성 RNA, 장 비-코딩 RNA, 소 간섭 RNA 또는 기타를 포함하는 조절 RNA 분자를 인코딩하는 DNA 서열, 및 질환 상태를 변경하는 결정적 세포성 인자에 관해 경쟁하도록 디자인된 RNA 또는 단백질을 인코딩하는 테코이 서열을 포함할 수 있으나, 그에 제한되지 않는다. 유전자 요법은 특정 질환의 치료 또는 완화를 제공하는 이들 치료적 유전적 구축물을 표적 세포에 전달하는 것을 수반한다.

[0189] HIV 질환의 치료에서 유전적 요법을 이용하려는 노력이 다수 진행중이지만, 지금까지는, 결과는 불량했다. CCR5 유전자 (CCR5delta32 로서 알려진 대립형질) 의 자발적 결실을 보유하는 드문 HIV 환자에서 소수의 치료 성공이 수득되었다.

[0190] 렌티바이러스-전달되는 뉴클레아제 또는 유전자 결실/변형을 위한 기타 메카니즘이 사용되어 CCR5 의 전체적 발현을 저하시키고/저하시키거나 HIV 복제를 저하시키는 것을 도울 수 있다. 적어도 하나의 연구는 렌티바이러스가 CCR5delta32 의 유전적 배경을 갖는 환자에서 투여되었을 때 질환을 치료하는데 성공했다고 보고되었다. 그러나, 이것은 성공의 오직 하나의 예이고, CCR5delta32 유전자형을 갖지 않는 많은 다른 환자는 그렇게 성공적으로 치료되지 않았다. 결과적으로, 기능적 HIV 치유를 달성하기 위한 전략을 통한 벡터의 개선된 사용에 관한 및 개별 바이러스 벡터 구축물에 관한 성능의 면에서 둘다 HIV 에 대항하는 바이러스 유전적 요법의 성능을 개선할 실질적 필요가 존재한다.

[0191] 예를 들어, 일부 기존 요법은 세포를 HIV 감염에 저항성으로 만들려는 시도에서 CCR5 의 부분을 결실시키는 징크 핑거 뉴클레아제에 의존한다. 그러나, 최적 처리 후에도, T 세포의 오직 30% 만이 뉴클레아제에 의해 변형되었고, 변형된 것들 중에서, 총 CD4 T 세포 집단의 오직 10% 만이 HIV 감염을 예방하는 방식으로

변형되었다. 이와 대조적으로, 개시된 방법은 렌티바이러스 이식유전자를 보유하는 거의 모든 세포에서 CCR5 발현이 HIV 감염을 허용하는데 필요한 수준 미만으로 감소하는 것을 초래한다. 이는 초기 CD4+ T 세포 풀의 수를 증가시키는 사전 면역화 단계 없이도 HIV의 성공적 치료를 초래할 수 있다.

[0192] 개시된 방법의 목적을 위해, 유전자 요법은 친화도-향상된 T 세포 수용체, CD4 T 세포 상의 (또는 대안적으로 CD8 T 세포 상의) 키메라 항원 수용체, 바이러스 단백질에 의해 야기되는 세포 사멸을 회피하는 신호 형질도입 경로의 변경, TREX, SAMHD1, MxA 또는 MxB 단백질, APOBEC 복합체, TRIM5-알파 복합체, 테더린 (BST2), 및 포유류 세포에서 HIV 복제를 감소시킬 수 있는 것으로 확인된 유사한 단백질을 포함하는 HIV 제한 요소의 증가된 발현을 포함할 수 있으나, 그에 제한되지 않는다.

[0193] **면역요법**

[0194] 역사적으로, 백신은 천연두, 소아마비, 홍역, 및 황열병을 포함하는 치명적인 감염성 질환에 대항하는 믿음직한 무기였다. 불행하게도, HIV에 관해 현재 승인된 백신은 없다. HIV 바이러스는 면역계를 피하는 독특한 방식을 갖고, 인간 신체는 그것에 대항하여 효과적인 면역 응답을 증가시킬 수 없는 것으로 보인다. 그 결과, 과학자들은 HIV에 대항하는 보호를 제공하는데 필요한 것의 선명한 사진을 갖지 않는다.

[0195] 그러나, 면역요법은 이전에 종래의 백신 접근법에 의해 다루어지지 않았던 해법을 제공할 수 있다. 면역요법은, 또한 생물학적 요법으로 호칭되며, 감염 또는 암과 싸우는 신체의 자연적 방어를 부스트하도록 디자인된 치료의 유형이다. 면역요법은 신체에 의해 또는 실험실에서 면역계 기능을 개선, 표적화, 또는 회복시키기 위해서 만들어지는 물질을 사용한다.

[0196] 본 공개의 특정 양상에서, 숙주의 항-HIV 면역력을 증가시키려는 목적으로 HIV-특이적 CD4 T 세포의 집단을 농축시키기 위해 면역치료적 접근법을 사용할 수 있다. 개시된 발명의 다른 양상에서, 숙주의 항-HIV 면역력을 증가시키려는 목적으로 숙주의 면역 세포를 형질도입하기 위해 통합 또는 비-통합 렌티바이러스 벡터가 사용될 수 있다. 본 공개의 다른 양상에서, 바이러스-특이적 T 세포 또는 항체의 집단을 농축시키기 위해 숙주의 면역 응답을 증가시키는 적합한 비히클 및/또는 생물학적 또는 화학적 아주반트와 조합된 사멸된 입자, 바이러스-유사 입자, HIV 펩티드 또는 펩티드 단편을 포함하나 그에 제한되지 않는 HIV 단백질, 재조합 바이러스 벡터, 재조합 박테리아 벡터, 정제된 서브유닛 또는 플라스미드 DNA를 포함하는 백신이 사용될 수 있고, 이들 방법은 렌티바이러스 또는 기타 바이러스 벡터를 사용하는 HIV-표적화되는 유전적 요법의 사용을 통해 추가로 향상될 수 있다.

[0197] **방법**

[0198] 하나의 양상에서, 본 공개는 바이러스 벡터를 사용하여 HIV 질환의 기능적 치유를 달성하는 방법을 제공한다. 방법은 HIV-특이적 CD4 T 세포의 비율을 농축시키는 면역요법, 그에 뒤이어 HIV 및 필요에 따라 CCR5 및 CXCR4의 저해인자를 전달하는 렌티바이러스 형질도입을 포함할 수 있다. 중요하게, HIV-특이적 CD4 T 세포의 농축 및 렌티바이러스 형질도입은 사전 면역화 단계 없이도 효과적일 수 있다.

[0199] 구현예에서, 방법은 HIV-특이적 CD4 T 세포의 비율을 농축시키는 방법으로서 치료적 면역화를 포함하며, 면역화는 대상체 내로 자극된 세포의 주입과 동시에 또는 그 후에 일어난다. 치료적 면역화는 정제된 단백질, 불활성화된 바이러스, 바이러스 벡터화 단백질, 박테리아 벡터화 단백질, 펩티드 또는 펩티드 단편, 바이러스-유사 입자 (VLPs), 사이토카인 및/또는 케모카인을 포함하는 생물학적 또는 화학적 아주반트, 비히클, 및 면역화 방법을 포함할 수 있다.

[0200] 치료적 백신은 치료가 일어나는 지리적 영역의 우세한 바이러스 유형을 대표하는 단백질 서열을 갖는 하나 이상의 HIV 단백질을 포함할 수 있다. 치료적 백신은 정제된 단백질, 불활성화된 바이러스, 바이러스 벡터화 단백질, 박테리아 벡터화 단백질, 펩티드 또는 펩티드 단편, 바이러스-유사 입자 (VLPs), 사이토카인 및/또는 케모카인을 포함하는 생물학적 또는 화학적 아주반트, 비히클, 및 면역화 방법을 포함할 것이다. 백신접종은 당업계에 알려진 표준 방법에 따라 투여될 수 있고, HIV 환자는 면역화 및 렌티바이러스 형질도입을 포함하는 후속적 생체의 림프구 배양의 간격 동안 항레트로바이러스 요법을 지속할 수 있다.

[0201] 특정 구현예에서, HIV+ 환자는 HIV 백신으로 면역화되어, HIV-특이적 CD4 T 세포의 빈도가 약 2, 약 25, 약 250, 약 500, 약 750, 약 1000, 약 1250, 또는 약 1500-배 (또는 이들 값 사이의 임의의 양) 만큼 증가할 수 있다. 백신은 개시된 렌티바이러스 또는 기타 바이러스 벡터 또는 백신 전달 시스템으로서 사용되는 기타 박테리아 벡터를 포함하는 임의의 임상적으로 이용되는 또는 실험용 HIV 백신일 수 있다. 또다른 구현예에서, 벡터는 중화 항체의 더 높은 역가 및 더 강한 HIV-특이적 T 세포 응답을 유도하는 바이러스-유사 입자

(VLPs) 를 인코딩할 수 있다. 또다른 구현예에서, 벡터는 gag, pol, 및 env, tat, rev, nef, vif, vpr, vpu, 및 tev, 뿐만 아니라 LTR, TAR, RRE, PE, SLIP, CRS, 및 INS 를 포함하나 그에 제한되지 않는 HIV 와 관련된 펩티드 또는 펩티드 단편을 인코딩할 수 있다. 대안적으로, 개시된 방법에서 사용되는 HIV 백신은 정제된 단백질, 불활성화된 바이러스, 바이러스 벡터화 단백질, 박테리아 벡터화 단백질, 펩티드 또는 펩티드 단편, 바이러스-유사 입자 (VLPs), 또는 사이토카인 및/또는 케모카인을 포함하는 생물학적 또는 화학적 아주반트를 포함할 수 있다.

[0202] 예를 들어, 말초 혈액 단핵 세포 (PBMCs) 가 백혈구성분채집술에 의해 획득되고 생체외에서 처리되어 약 1×10^{10} CD4 T 세포가 획득될 수 있으며, 그 중에서 약 0.1%, 약 1%, 약 5% 또는 약 10% 또는 약 30% 는 항원 응답의 면에서 HIV-특이적이고, 또한 개시된 렌티바이러스 벡터에 의해 전달되는 치료적 이식유전자를 운반하는 덕분에 HIV-저항성이다. 대안적으로, 약 1×10^7 , 약 1×10^8 , 약 1×10^9 , 약 1×10^{10} , 약 1×10^{11} , 또는 약 1×10^{12} CD4 T 세포가 재-자극을 위해 단리될 수 있다. 중요하게, 임의의 적합한 양의 CD4 T 세포가 생체외 재-자극을 위해 단리될 수 있다.

[0203] 단리된 CD4 T 세포는 사전 치료적 백신접종에 존재하는 항원을 포함하거나 포함하지 않을 수 있는 HIV 백신 항원에 의한 재-자극 동안 적당한 배지에서 배양될 수 있다. 역전사효소, 프로테아제 또는 인테그라아제의 저해인자를 포함하는 항레트로바이러스 치료적 약물이 첨가되어 연장된 생체외 배양 동안 바이러스 재출현을 방지할 수 있다. CD4 T 세포 재-자극이 사용되어 배양물 중 HIV-특이적 CD4 T 세포의 비율을 농축시킬 수 있다. 동일한 절차가 또한 분석적 목적을 위해 사용될 수 있으며, 여기에서 HIV-특이적 T 세포를 식별하고 이러한 하위집단의 빈도를 측정하는데 정제에 의해 획득된 말초 혈액 단핵 세포의 더 작은 혈액 부피가 사용된다.

[0204] PBMC 분획은 세포를 이전에 생체내 면역화에 사용된 백신의 성분에 매칭하는 또는 상보적인 HIV 단백질과 접촉 시킴으로써 HIV-특이적 CD4 T 세포에 관해 농축될 수 있다. 생체외 재-자극은 HIV-특이적 CD4 T 세포의 상대 빈도를 약 5, 약 10, 약 25, 약 50, 약 75, 약 100, 약 125, 약 150, 약 175, 또는 약 200-배 만큼 증가시킬 수 있다. 생체외 재-자극은 예비-면역화 단계가 존재했는지 여부와 무관하게 HIV-특이적 CD4 T 세포의 상대 빈도를 증가시킬 수 있다.

[0205] 본원에 기재된 방법은 생체외 렌티바이러스 형질도입 및 배양에 의한 CD4 T 세포의 생체외 재-자극을 포함할 수 있다. 본원에 기재된 방법은 또한 예비-면역화 단계 없이 생체외 렌티바이러스 형질도입 및 배양에 의한 CD4 T 세포의 생체외 재-자극을 포함할 수 있다.

[0206] 따라서, 하나의 구현예에서, HIV-특이적 CD4 T 세포에 관해 농축된 재-자극된 PBMC 분획은 치료적 항-HIV 렌티바이러스 또는 기타 벡터로 형질도입되고 배양물에서 약 1 내지 약 21 일 또는 ~ 약 35 일 유지될 수 있다. 대안적으로, 세포는 약 1 - 약 18 일, 약 1 - 약 15 일, 약 1 - 약 12 일, 약 1 - 약 9 일, 또는 약 3 - 약 7 일 동안 배양될 수 있다. 따라서, 형질도입된 세포는 약 1, 약 2, 약 3, 약 4, 약 5, 약 6, 약 7, 약 8, 약 9, 약 10, 약 11, 약 12, 약 13, 약 14, 약 15, 약 16, 약 17, 약 18, 약 19, 약 20, 약 21, 약 22, 약 23, 약 24, 약 25, 약 26, 약 27, 약 28, 약 29, 약 30, 약 31, 약 32, 약 33, 약 34, 또는 약 35 일 동안 배양될 수 있다.

[0207] 형질도입된 세포가 충분히 배양된 후에, 형질도입된 CD4 T 세포는 다시 원래의 환자 내로 주입된다. 주입은 당업계에서 알려진 다양한 기계 및 방법을 사용하여 수행될 수 있다. 일부 구현예에서, 주입은 시클로포스파미드 또는 유사한 화합물을 이용하는 전처리에 의해 달성되어 재접목의 효율을 증가시킬 수 있다.

[0208] 일부 구현예에서, 처리 과정 전체 동안 지속되는 대상체의 항레트로바이러스 요법 섭생법에 CCR5-표적화되는 요법이 추가될 수 있다. CCR5-표적화되는 요법의 예는 마라비록 (CCR5 안타고니스트) 또는 라파마이신 (CCR5 를 저하시키는 면역억제제) 을 포함하나 그에 제한되지 않는다. 일부 구현예에서, 항레트로바이러스 요법이 중단될 수 있고, 대상체는 바이러스 반등에 관해 시험될 수 있다. 재반등이 발생하는 경우에, 아주반트 요법이 또한 제거될 수 있고, 대상체는 다시 바이러스 반등에 관해 시험될 수 있다.

[0209] 약 26 주 동안 cART 또는 HAART 를 포함하는 항레트로바이러스 요법이 감소된 또는 부재하는, 및 아주반트 요법이 감소된 또는 부재하는 지속된 바이러스 억제 HIV 의 기능적 치유로 여겨질 수 있다. 기능적 치유의 기타 정의는 본원에 기재되어 있다.

[0210] 개시된 방법에서 사용되는 렌티바이러스 및 기타 벡터는 적어도 1, 적어도 2, 적어도 3, 적어도 4, 또는 적어도 5 개 유전자, 또는 적어도 6 개 유전자, 또는 적어도 7 개 유전자, 또는 적어도 8 개 유전자, 또는 적어도 9 개

유전자, 또는 적어도 10 개 유전자, 또는 적어도 11 개 유전자, 또는 적어도 12 개 관심 대상의 유전자를 인코딩할 수 있다. HIV-표적화되는 유전자 요법의 다능성 및 치료적 잠재력을 고려하면, 본 발명의 바이러스 벡터는 하기를 포함하나 그에 제한되지 않는 유전자 또는 핵산 서열을 인코딩할 수 있다: (i) 감염성 질환과 관련된 항원 또는 감염성 병원체에 의해 생산되는 독소로 지향되는 항체, (ii) 면역 세포 성장 또는 기능에 요구되고 HIV 및 기타 만성 또는 급성 인간 바이러스 또는 박테리아 병원체에서 마주치는 면역 이상조절에 치료적일 수 있는 인터루킨을 포함하는 사이토카인, (iii) CD8 억제인자 인자를 포함하는 생체내에서 HIV의 성장을 억제하는 인자, (iv) 케모카인 수용체 CCR5의 돌연변이 또는 결실, 케모카인 수용체 CXCR4의 돌연변이 또는 결실, 또는 케모카인 수용체 CXCR5의 돌연변이 또는 결실, (v) HIV와 관련된 특이적 수용체 또는 펩티드 또는 HIV와 관련된 숙주 단백질에 대항하는 안티센스 DNA 또는 RNA, (vi) HIV와 관련된 특이적 수용체 또는 펩티드 또는 HIV와 관련된 숙주 단백질에 대항하는 소간섭 RNA, 또는 (vii) HIV 또는 AIDS를 치료하는데 사용될 수 있는 여러 가지 기타 치료적으로 유용한 서열.

[0211] 개시된 방법에서 사용될 수 있는 HIV-표적화되는 유전자 요법의 부가적 예는 친화도-향상된 T 세포 수용체, CD4 T 세포 상의 (또는 대안적으로 CD8 T 세포 상의) 키메라 항원 수용체, 바이러스 단백질에 의해 야기되는 세포 사멸을 회피하는 신호 형질도입 경로의 변경, TREX, SAMHD1, MxA 또는 MxB 단백질, APOBEC 복합체, TRIM5-알파 복합체, 테더린 (BST2), 및 포유류 세포에서 HIV 복제를 감소시킬 수 있는 것으로 확인된 유사한 단백질을 포함하는 HIV 제한 요소의 증가된 발현을 포함할 수 있으나, 그에 제한되지 않는다.

[0212] 일부 구현예에서, 환자는 본 발명의 방법에 따라 치료되는 동안에 동시에 cART 또는 HAART을 받을 수 있다. 기타 구현예에서, 환자는 본 발명의 방법에 따라 치료되기 전에 또는 후에 cART 또는 HAART을 받을 수 있다. 일부 구현예에서, cART 또는 HAART은 본 발명의 방법에 따른 처리 동안 유지되고, 환자는 혈액 중 HIV 바이러스 부하 및 혈액 중 렌티바이러스-형질도입된 CD4 T 세포의 빈도에 관해 모니터링될 수 있다. 바람직하게는, 본 발명의 방법에 따라 처리되기 전에 cART 또는 HAART을 받는 환자는 본 발명의 방법에 따른 처리 후에 cART 또는 HAART을 중단 또는 감소시킬 수 있다.

[0213] 효능을 평가하려는 목적으로, 유전자 요법 효과에 관한 신규한 대리 마커인 형질도입된, HIV-특이적 CD4 T 세포의 빈도가 확인될 수 있으며, 이는 본원에서 더욱 상세히 논의된다.

[0214] **조성물**

[0215] 하나의 양상에서, 개시된 발명은 감수성 세포의 HIV 침투를 저해하는 유전적 구축물을 전달할 수 있는 렌티바이러스 벡터를 제공한다. 예를 들어, 하나의 작용 메카니즘은 CCR5 및/또는 CXCR4 케모카인 수용체에 관한 mRNA 수준을 감소시키고 그에 따라 감수성 세포 내로의 바이러스 진입에 관한 속도를 감소시키는 것이다.

[0216] 대안적으로, 개시된 렌티바이러스 벡터는 들어오는 HIV 게놈 RNA의 안정성을 감소시킴으로써 HIV-감염된 세포의 형성을 저해할 수 있다. 그리고 또다른 구현예에서, 개시된 렌티바이러스 벡터는 잠복성으로 감염된 세포로부터 HIV 생산을 방지할 수 있으며, 여기에서 작용 메카니즘은 단-상동성, 소-간섭 또는 기타 조절 RNA 중을 포함하는 저해성 RNA의 작용을 통해 바이러스 RNA 서열의 불안정성을 야기하는 것이다.

[0217] 이 출원에서 개시되는 치료적 렌티바이러스는 일반적으로 유전적 화물 (cargo)의 두 가지 유형 중 적어도 하나를 포함한다. 첫째로, 렌티바이러스는 감수성 세포의 HIV 침투에 중요한 케모카인 수용체 CCR5 및/또는 CXCR4의 생산을 저해할 수 있는 소형 RNA의 발현을 지도하는 유전적 요소를 인코딩할 수 있다. 두번째 유형의 유전적 화물은 역전사, RNA 스플라이싱, RNA 번역에 따른 단백질의 생산, 또는 입자 생산을 위한 바이러스 게놈 RNA의 패키징 및 확산 감염을 방지하려는 목적으로 HIV RNA 서열을 표적화하는 소형 RNA 분자를 발현할 수 있는 구축물을 포함한다. 예시적 구조가 도 3에서 도해된다.

[0218] 도 3 (상부 패널)에서 보여지는 바와 같이, 예시적 구축물은 수많은 구역 또는 성분을 포함할 수 있다. 예를 들어, 하나의 구현예에서, 예시적 LV 구축물은 하기 구역 또는 성분을 포함할 수 있다:

- [0219] · RSV - 라우스 육종 바이러스 장 말단 리피트;
- [0220] · 5'LTR - 염색체 통합 후에 벡터의 복제를 방지하도록 절두될 수 있는 HIV 장 말단 리피트의 부분;
- [0221] · Psi - 패키징 동안 바이러스 입자 내로 벡터 RNA 게놈의 통합을 허용하는 패키징 신호;
- [0222] · RRE - Rev 응답 요소가 부가되어 핵 외부로 및 세포의 세포질 내로 RNA를 동원함으로써 이식유전자로부터의 발현을 개선할 수 있다;

- [0223] · cPPT - 숙주 세포 염색체 내로 이식유전자의 통합 전에 제 2 가닥 DNA 합성을 촉진하는 폴리 퓨린 지역;
- [0224] · 프로모터 - 프로모터는 통합된 이식유전자로부터 RNA 전사를 개시하여 micro-RNA 클러스터 (또는 구축물의 기타 유전적 요소) 를 발현하고, 일부 구현예에서, 벡터는 EF-1 프로모터를 사용할 수 있다;
- [0225] · 항-CCR5 - 숙주 세포 인자 CCR5 에 관한 메신저 RNA 를 표적화하여 세포 표면 상에서의 그것의 발현을 감소시키는 microRNA;
- [0226] · 항-Rev/Tat - HIV Rev 및 Tat 코딩 영역 사이의 접합부에서 HIV 게놈 또는 메신저 RNA 를 표적화하는 microRNA, 이것은 때때로 miRNA Tat 로 지명되거나 또는 이 출원에서 유사한 서술이 제공됨;
- [0227] · 항-Vif - Vif 코딩 영역 내의 HIV 게놈 또는 메신저 RNA 를 표적화하는 microRNA;
- [0228] · WPRE - 우드척 (Woodchuck) 간염 바이러스 전사후 조절 요소는 핵의 RNA 수송을 촉진하는데 사용될 수 있는 부가적 벡터 성분이다; 및
- [0229] · deltaU3 3'LTR - U3 영역의 부분이 결실되어 벡터의 안전성이 개선된 HIV 3' 장 말단 리피트의 변형된 버전.
- [0230] 당업자는 상기 성분이 단지 예라는 것, 및 구축물이 HIV 유전자의 발현을 방지하고 감염의 확산을 감소시킬 수 있는 한, 그러한 성분이 재배열되거나, 다른 요소로 치환되거나, 또는 아니면, 이에 제한되는 것은 아니나 뉴클레오티드 치환, 결실, 부가, 또는 돌연변이의 생성을 포함하여, 변화될 수 있다는 것을 이해할 것이다.
- [0231] 본 발명의 벡터는 위에서 논의된 유전적 화물 (즉, 번역 또는 전사를 방지할 수 있는 유전자 또는 소형 RNAs, 예컨대 siRNA, shRNA, 또는 miRNA 의 발현을 유도하는 유전적 요소) 의 유형 중 하나 또는 둘 모두를 포함할 수 있고, 본 발명의 벡터는 HIV 의 치료 또는 진단의 목적을 위해 또한 부가적으로는 유용한 산물을 인코딩할 수 있다. 예를 들어, 일부 구현예에서, 이들 벡터는 또한 벡터를 추적하려는 목적을 위한 녹색 형광 단백질 (GFP) 또는 생체내에서 유전적으로 변형된 세포를 선택적으로 유지하려는 목적을 위한 항생제 내성 유전자를 인코딩할 수 있다.
- [0232] 개시된 벡터 내로 통합되는 유전적 요소의 조합은 특별히 제한되지 않는다. 예를 들어, 벡터는 단일 소형 RNA, 2 개의 소형 RNAs, 3 개의 소형 RNA, 4 개의 소형 RNAs, 5 개의 소형 RNAs, 6 개의 소형 RNAs, 7 개의 소형 RNAs, 8 개의 소형 RNAs, 9 개의 소형 RNAs, 또는 10 개의 소형 RNAs, 또는 11 개의 소형 RNAs, 또는 12 개의 소형 RNAs 를 인코딩할 수 있다. 그러한 벡터는 소형 RNAs 와 협력하여 기능하여 HIV 의 발현 및 감염을 방지하는 기타 유전적 요소를 부가적으로 인코딩할 수 있다.
- [0233] 당업자는 치료적 렌티바이러스가 프로모터 영역을 위한 대체 서열, 조절 RNA 의 표적화, 및 조절 RNA 의 유형을 치환할 수 있다는 것을 이해할 것이다. 추가로, 본 공개의 치료적 렌티바이러스는 렌티바이러스 입자의 패키징에 사용되는 플라스미드에 변화를 포함할 수 있다; 이들 변화는 시험관내에서 생산 수준을 증가시키는데 요구된다.
- [0234] **렌티바이러스 벡터 시스템**
- [0235] 렌티바이러스 비리온 (입자) 은 비리온 (바이러스 입자) 를 생산하는데 필수적인 바이러스 단백질을 인코딩하는 벡터 시스템에 의해 발현된다. 프로모터에 작동가능하게 연결된, 역전사 및 통합에 필수적인 렌티바이러스 pol 단백질질을 인코딩하는 핵산 서열을 함유하는 적어도 하나의 벡터가 존재한다. 또다른 구현예에서, pol 단백질은 복수의 벡터에 의해 발현된다. 또한 프로모터에 작동가능하게 연결된 바이러스 캡시드를 형성하는데 필수적인 렌티바이러스 gag 단백질을 인코딩하는 핵산 서열을 함유하는 벡터가 존재한다. 하나의 구현예에서, 이러한 gag 핵산 서열은 pol 핵산 서열의 적어도 일부와는 별개의 벡터 상에 있다. 또다른 구현예에서, gag 핵산은 pol 단백질을 인코딩하는 모든 pol 핵산 서열과는 별개의 벡터 상에 있다.
- [0236] 야생형 복귀 돌연변이체를 수득할 가능성을 추가로 최소화하기 위해 입자를 생성하는데 사용되는, 벡터에 수많은 변형이 만들어질 수 있다. 이들은 LTR 의 U3 영역의 결실, tat 결실 및 매트릭스 (MA) 결실을 포함하나, 그에 제한되지 않는다.
- [0237] gag, pol 및 env 벡터(들)은 렌티바이러스 패키징 서열로서 언급되는 렌티바이러스 RNA 를 패키징하는 렌티바이러스 게놈으로부터의 뉴클레오티드를 함유하지 않는다.
- [0238] 입자를 형성하는 벡터(들)은 바람직하게는 외피 단백질을 발현하는 렌티바이러스 게놈으로부터의 핵산 서열을 함유하지 않는다. 바람직하게는, 프로모터에 작동가능하게 연결된 외피 단백질을 인코딩하는 핵산 서열을

함유하는 별개의 벡터가 사용된다. 이러한 env 벡터는 또한 렌티바이러스 패키징 서열을 함유하지 않는다. 하나의 구현예에서 env 핵산 서열은 렌티바이러스 외피 단백질을 인코딩한다.

[0239] 또다른 구현예에서 외피 단백질은 렌티바이러스로부터의 것이 아니라, 상이한 바이러스로부터의 것이다. 결과적인 입자는 위형 (pseudotyped) 입자로서 언급된다. 외피의 적절한 선택에 의해 사실상 모든 세포를 "감염"시킬 수 있다. 예를 들어, 인플루엔자 바이러스, VSV-G, 알파 바이러스 (셈리키 삼립 바이러스, 신드비스 바이러스), 아레나바이러스 (림프구성 맥락수막염 바이러스), 플라비바이러스 (진드기 매개 뇌염 바이러스, 땡기열 바이러스, 간염 C 바이러스, GB 바이러스), 램도바이러스 (수포성 구내염 바이러스, 광견병 바이러스), 파라믹소바이러스 (볼거리 또는 홍역) 및 오르토믹소바이러스 (인플루엔자 바이러스) 와 같은 식균작용 구획을 표적화하는 외피 단백질을 인코딩하는 env 유전자를 사용할 수 있다. 바람직하게 사용될 수 있는 기타 외피는 모로니 백혈병 바이러스 예컨대 MLV-E, MLV-A 및 GALV 로부터의 것을 포함한다. 이들 후자의 외피는 숙주 세포가 일차 세포인 경우에 특히 바람직하다. 기타 외피 단백질은 원하는 숙주 세포에 따라 선택될 수 있다. 예를 들어, 특이적 수용체 예컨대 도파민 수용체의 표적화가 뇌 전달에 사용될 수 있다. 또다른 표적은 관 내피일 수 있다. 이들 세포는 필로바이러스 외피를 사용하여 표적화될 수 있다. 예를 들어, 전사후 수식에 의해 GP 가 되는, 에볼라의 GP 및 GP₂ 당단백질. 또다른 구현예에서, 위형 외피를 갖는 상이한 렌티바이러스 캡시드를 사용할 수 있다. 예를 들어, FIV 또는 SHIV [미국 특허 제 5,654,195 호]. SHIV 위형 벡터는 동물 모델 예컨대 원숭이에서 쉽게 사용될 수 있다.

[0240] 본원에서 설명되는 바와 같이, 렌티바이러스 벡터 시스템은 전형적으로는 gag, pol, 또는 rev 유전자 중 적어도 하나를 포함하는 적어도 하나의 헬퍼 플라스미드를 포함한다. gag, pol 및 rev 유전자의 각각은 개별 플라스미드 상에 제공될 수 있거나, 또는 하나 이상의 유전자가 동일한 플라스미드 상에 함께 제공될 수 있다. 하나의 구현예에서, gag, pol, 및 rev 유전자는 동일한 플라스미드 상에 제공된다 (예를 들어, 도 4). 또다른 구현예에서, gag 및 pol 유전자는 제 1 플라스미드 상에 제공되고, rev 유전자는 제 2 플라스미드 상에 제공된다 (예를 들어, 도 5). 따라서, 실시예 섹션 및 본원의 다른 곳에서 기재된 바와 같은 렌티바이러스를 생산하기 위해서 3-벡터 및 4-벡터 시스템 둘 모두가 사용될 수 있다. 치료적 벡터, 외피 플라스미드 및 적어도 하나의 헬퍼 플라스미드는 패키징 세포주 내로 트랜스펙션된다. 패키징 세포주의 비-제한적 예는 293T/17 HEK 세포주이다. 치료적 벡터, 외피 플라스미드, 및 적어도 하나의 헬퍼 플라스미드가 패키징 세포주 내로 트랜스펙션될 때, 렌티바이러스 입자가 궁극적으로 생산된다.

[0241] 또다른 양상에서, 렌티바이러스 입자를 발현시키기 위한 렌티바이러스 벡터 시스템이 개시된다. 시스템은 본원에 기재된 바와 같은 렌티바이러스 벡터; 세포를 감염시키기 위해 최적화된 외피 단백질을 발현시키기 위한 외피 플라스미드; 및 gag, pol, 및 rev 유전자를 발현시키기 위한 적어도 하나의 헬퍼 플라스미드를 포함하며, 렌티바이러스 벡터, 외피 플라스미드, 및 적어도 하나의 헬퍼 플라스미드가 패키징 세포주 내로 트랜스펙션될 때, 렌티바이러스 입자가 패키징 세포주에 의해 생산되며, 렌티바이러스 입자는 케모카인 수용체 CCR5 의 생산을 저해하거나 또는 HIV RNA 서열을 표적화할 수 있다.

[0242] 또다른 양상에서, 및 본원에서 설명되는 바와 같이, 렌티바이러스 벡터는, 또한 본원에서 치료적 벡터로서 언급되며, 하기 요소를 포함할 수 있다: 하이브리드 5' 장 말단 리피트 (RSV/5' LTR) (SEQ ID NOS: 34-35), Psi 서열 (RNA 패키징 자리) (SEQ ID NO: 36), RRE (Rev-응답 요소) (SEQ ID NO: 37), cPPT (폴리퓨린 지역) (SEQ ID NO: 38), EF-1 α 프로모터 (SEQ ID NO: 4), miR30CCR5 (SEQ ID NO: 1), miR21Vif (SEQ ID NO: 2), miR185Tat (SEQ ID NO: 3), 우드척 전사후 조절 요소 (WPPE) (SEQ ID NOS: 32 또는 80), 및 Δ U3 3' LTR (SEQ ID NO: 39). 또다른 양상에서, 위에서 언급된 서열을 변형하기 위해서 치환, 결실, 또는 부가에 의한 서열 변이가 사용될 수 있다.

[0243] 또다른 양상에서, 및 본원에서 설명되는 바와 같이, 헬퍼 플라스미드는 하기 요소를 포함하도록 디자인되었다: CAG 프로모터 (SEQ ID NO: 41); HIV 성분 gag (SEQ ID NO: 43); HIV 성분 pol (SEQ ID NO: 44); HIV Int (SEQ ID NO: 45); HIV RRE (SEQ ID NO: 46); 및 HIV Rev (SEQ ID NO: 47). 또다른 양상에서, 헬퍼 플라스미드는 gag 및 pol 유전자를 발현시키기 위한 제 1 헬퍼 플라스미드, 및 rev 유전자를 발현시키기 위한 제 2 및 별개의 플라스미드를 포함하도록 변형될 수 있다. 또다른 양상에서, 위에서 언급된 서열을 변형하기 위해 치환, 결실, 또는 부가에 의한 서열 변이가 사용될 수 있다.

[0244] 또다른 양상에서, 및 본원에서 설명되는 바와 같이, 외피 플라스미드는 하기 요소를 왼쪽으로부터 오른쪽으로 포함하도록 디자인되었다: RNA 폴리머라아제 II 프로모터 (CMV) (SEQ ID NO: 60) 및 수포성 구내염 바이러스 G 당단백질 (VSV-G) (SEQ ID NO: 62). 또다른 양상에서, 위에서 언급된 서열을 변형하기 위해 치환, 결실, 또

는 부가에 의한 서열 변이가 사용될 수 있다.

[0245] 또다른 양상에서, 렌티바이러스 패키징에 사용되는 플라스미드는 유사한 요소로 변형될 수 있고, 벡터 기능의 상실 없이 인트론 서열이 잠재적으로 제거될 수 있다. 예를 들어, 하기 요소는 패키징 시스템을 포함하는 플라스미드 내 유사한 요소를 대체할 수 있다: 신장 인자-1 (EF-1), 포스포글리세레이트 키나아제 (PGK), 및 유비퀴틴 C (Ubc) 프로모터는 CMV 또는 CAG 프로모터를 대체할 수 있다. SV40 poly A 및 bGH poly A 는 토끼 베타 글로빈 poly A 를 대체할 수 있다. 헬퍼 플라스미드 내 HIV 서열은 상이한 HIV 균주 또는 분기균으로부터 구축될 수 있다. VSV-G 당단백질은 고양이 내생성 바이러스 (RD114), 긴팔 원숭이 백혈병 바이러스 (GALV), 광견병 (FUG), 림프구성 맥락수막염 바이러스 (LCMV), 인플루엔자 A 가금 흑사병 바이러스 (FPV), 로스강 알파바이러스 (RRV), 뮌헨 백혈병 바이러스 10A1 (MLV), 또는 에볼라 바이러스 (EboV) 로부터의 막 당단백질로 치환될 수 있다.

[0246] 중요하게, 렌티바이러스 패키징 시스템은 상업적으로 획득될 수 있고 (예를 들어, OriGene Technologies, Inc., Rockville, MD 로부터의 Lenti-vpak 패키징 키트), 또한 본원에 기재된 바와 같이 디자인될 수 있다. 더욱이, 렌티바이러스 입자의 생산 효율을 포함하는, 임의의 수의 관련 인자를 개선하기 위해 렌티바이러스 패키징 시스템의 양상을 치환 또는 변형하는 것은 당업자의 기술에 속한다.

[0247] **생물어세이**

[0248] 하나의 양상에서, 본 발명은 기능적 치유를 달성하기 위한 HIV 처리의 성공을 확인하기 위한 생물어세이를 포함한다. 이들 어세이는 환자 내의 형질도입된, HIV 특이적 CD4 T 세포의 빈도를 측정함으로써 개시된 방법의 효능을 측정하기 위한 방법을 제공할 것이다. HIV-특이적 CD4 T 세포는 인지가 가능하며, 그 이유는 그것이 증식하거나, 세포 표면 마커의 조성을 변화시키거나, 인산화를 포함하는 신호전달 경로를 유도하거나, 또는 사이토카인, 케모카인, 카스파아제, 인산화된 신호전달 분자 또는 기타 세포질 및/또는 핵 성분일 수 있는 특이적 마커 단백질을 발현하기 때문이다. 특이적 응답성 CD4 T 세포는 예를 들어, 표지된 모노클로날 항체 또는 흐름 세포측정 분류, 자기 비드 분리 또는 항원-특이적 CD4 T 세포 단리를 위한 기타 알려진 방법을 사용하여 HIV-특이적 세포의 분류를 허용하는 특이적 mRNA 서열의 인 시츄 증폭을 사용하여 인지된다. 단리된 CD4 T 세포는 통합된 치료적 렌티바이러스를 보유하는 세포의 빈도를 확인하기 위해 시험된다. HIV 의 응답성 및 통합된 치료적 렌티바이러스의 존재를 확인하기 위한 질량 분광분석법, PCR, ELISA 또는 항체 염색과 커플링되는 개별 세포의 미소유체 분리를 포함하는 단일 세포 시험 방법이 또한 사용될 수 있다.

[0249] 따라서, 특정 구현예에서, 본 발명에 따른 처리 (예를 들어, (a) 면역화 없음, (b) 생체의 림프구 배양; (c) 정제된 단백질, 불활성화된 바이러스, 바이러스 벡터화 단백질, 박테리아 벡터화 단백질, 사이토카인 및/또는 케모카인을 포함하는 생물학적 또는 화학적 아주반트, 비히클에 의한 제-자극; 및 (d) 농축된, 형질도입된 T 세포의 주입) 의 적용 후에, 환자는 후속적으로 처리의 효능을 확인하기 위해 어세이될 수 있다. 주입을 위한 세포 산물 중 표적 T 세포의 역치 값은 기능적 치유를 측정하여, 예를 들어, 치료적 렌티바이러스로부터의 유전적 변형을 보유하는 약 1×10^8 HIV-특이적 CD4 T 세포에서 확립될 수 있다. 대안적으로, 역치 값은 환자의 신체 중 약 1×10^5 , 약 1×10^6 , 약 1×10^7 , 약 1×10^8 , 약 1×10^9 , 또는 약 1×10^{10} CD4 T 세포일 수 있다.

[0250] 치료적 렌티바이러스로부터의 유전적 변형을 보유하는 HIV-특이적 CD4 T 세포는 임의의 적합한 방법, 예컨대 이에 제한되는 것은 아니나 흐름 세포측정, 세포 분류, FACS 분석, DNA 클로닝, PCR, RT-PCR 또는 Q-PCR, ELISA, FISH, 웨스턴 블롯팅, 서던 블롯팅, 고처리율 서열분석, RNA 서열분석, 올리고뉴클레오티드 프라이머 확장, 또는 당업계에 알려진 기타 방법을 사용하여 확인될 수 있다.

[0251] 유전적 변형을 보유하는 항원 특이적 T 세포를 정의하는 방법은 당업계에 알려져 있다. 그러나, 그러한 방법을 이용하여 HIV-특이적 T 세포의 식별을 효능에 관한 표준 척도로서 통합된 또는 비-통합된 유전자 요법 구축물과 조합하는 것은 HIV 처리의 분야에서 새로운 개념이다.

[0252] **용량 및 투여 형태**

[0253] 공개된 방법 및 조성물은 HIV+ 환자를 그들의 질환의 다양한 시기 동안 치료하기 위해 사용될 수 있다. 따라서, 투약 섭생법은 환자의 상태 및 투여 방법에 기초하여 다를 수 있다.

[0254] 하나의 양상에서, HIV-특이적 백신은 대상체 내로 자극된 세포의 주입과 동시에 또는 주입 후에 투여될 수 있다. 하나의 구현예에서, HIV-특이적 백신은 필요로 하는 대상체에게 다양한 용량으로 투여될 수 있다. 일반적으로, 근육내 주사에 의해 전달되는 백신은 약 10 μ g 내지 약 300 μ g, 약 25 μ g 내지 약 275 μ g, 약 50

μg 내지 약 250 μg, 약 75 μg 내지 약 225, 또는 약 100 μg 내지 약 200 μg 의 HIV 단백질 (불활성화된 바이러스 입자, 바이러스-유사 입자로부터 제조된 총 바이러스 단백질 또는 재조합 시스템으로부터 정제된 또는 바이러스 제제로부터 정제된 바이러스 단백질) 을 포함한다. 재조합 바이러스 또는 박테리아 벡터는 기재된 임의의 모든 경로에 의해 투여될 수 있다. 근육내 백신은 약 1 μg 내지 약 100 μg, 약 10 μg 내지 약 90 μg, 약 20 μg 내지 약 80 μg, 약 30 μg 내지 약 70 μg, 약 40 μg 내지 약 60 μg, 또는 약 50 μg 의 적합한 아주반트 분자를 포함하고, 오일, 염분, 완충제 또는 물에 주사 투여물 당 0.1 내지 5 ml 부피로 현탁될 것이고, 가용성 또는 에멀션 제제일 수 있다. 일부 바이러스-벡터화 또는 박테리아-벡터화 백신, 융합 단백질, 리포솜 제형 또는 유사한 제제를 포함하는, 경구, 직장으로, 구강으로, 생식기 점막에서 또는 비강내 전달되는 백신은 더 많은 양의 바이러스 단백질 및 아주반트를 함유할 수 있다. 진피, 피하 또는 피하 백신은 경구, 직장 또는 비강내-전달되는 백신과 더욱 유사한 단백질 및 아주반트 양을 이용한다. 초기 면역화에 대한 응답에 따라, 백신접종은 동일한 또는 대안적인 전달 경로를 사용하여 1-5 회 반복될 수 있다. 간격은 면역화 사이에 2-24 주일 수 있다. 백신접종에 대한 면역 응답은 ELISA 또는 유사한 방법을 사용하여 혈청, 혈장, 질 분비, 직장 분비, 타액 또는 기관지 폐포 세척액 중 HIV-특이적 항체를 시험함으로써 측정된다. 세포성 면역 응답은 백신 항원에 의한 시험관내 자극, 그에 뒤이어 세포내 사이토카인 측정에 관한 염색, 그에 뒤이어 흐름 세포 측정 또는 림프증식, 인산화된 신호전달 단백질의 발현 또는 세포 표면 활성화 마커의 변화를 포함하는 유사한 방법에 의해 시험된다. 투여의 상한은 개별 환자에 기초하여 확인될 수 있고, 각각의 개별 제품 또는 제품 로트에 관한 독성/안전성 프로파일에 따라 좌우될 것이다.

- [0255] 면역화는 1 회, 2 회, 3 회, 또는 반복적으로 일어날 수 있다. 예를 들어, HIV 면역화를 위한 작용제는 필요로 하는 대상체에게 1 주에 1 회, 2 주에 1 회, 3 주에 1 회, 1 개월에 1 회, 2 개월에 1 회, 3 개월에 1 회, 6 개월에 1 회, 9 개월에 1 회, 1 년에 1 회, 18 개월에 1 회, 2 년에 1 회, 36 개월에 1 회, 또는 3 년에 1 회 투여될 수 있다.
- [0256] CD4 T 세포의 생체의 증식 및 농축 후에, 면역화는 생체의 림프구 배양/재-자극 및 주입 후에 1 회, 2 회, 3 회, 또는 그 이상 일어날 수 있다.
- [0257] 하나의 구현예에서, 면역화를 위한 HIV-백신은 약학적 조성물로서 투여된다. 하나의 구현예에서, HIV 백신을 포함하는 약학적 조성물은 임상 적용을 위한 매우 다양한 비강, 폐, 경구, 국소, 또는 비경구 투여 형태로 제형화될 수 있다. 각각의 투여 형태는 다양한 봉쇄제, 계면활성제, 충전제, 증점제, 결합제, 희석제 예컨대 습윤제 또는 기타 약학적으로 허용가능한 부형제를 포함할 수 있다. HIV 백신을 포함하는 약학적 조성물은 또한 주사를 위해 제형화될 수 있다.
- [0258] 면역화의 목적을 위한 HIV 백신 조성물은 임의의 약학적으로 허용가능한 방법을 사용하여 투여될 수 있으며, 예컨대 비강내, 구강, 설하, 경구, 직장, 안구, 비경구 (정맥내, 진피내, 근육내, 피하, 낭내, 복강내), 폐, 질내, 국부 투여, 국소 투여, 난절법 후에 국소 투여, 에어로졸을 통해, 또는 구강 또는 비강 스프레이 제형을 통해 점막 투여된다.
- [0259] 추가로, HIV 백신 조성물은 임의의 약학적으로 허용가능한 투여 형태, 예컨대 고체 투여 형태, 정제, 환제, 로젠지, 캡슐, 액체 분산물, 겔, 에어로졸, 폐 에어로졸, 비강 에어로졸, 연고, 크림, 반고체 투여 형태, 및 현탁액으로 제형화될 수 있다. 추가로, 조성물은 제어 방출 제형, 지속 방출 제형, 즉시 방출 제형, 또는 그의 임의의 조합일 수 있다. 추가로, 조성물은 경피 전달 시스템일 수 있다.
- [0260] 또다른 구현예에서, HIV 백신을 포함하는 약학적 조성물은 경구 투여를 위한 고체 투여 형태로 제형화될 수 있고, 고체 투여 형태는 분제, 과립, 캡슐, 정제 또는 환제일 수 있다. 또다른 구현예에서, 고체 투여 형태는 하나 이상의 부형제 예컨대 칼슘 카르보네이트, 전분, 수크로오스, 락토오스, 미세결정질 셀룰로오스 또는 겔라틴을 포함할 수 있다. 게다가, 고체 투여 형태는, 부형제에 더하여, 윤활제 예컨대 탈크 또는 마그네슘 스테아레이트를 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 경구 투여 형태는 즉시 방출 또는 변형 방출 형태일 수 있다. 변형 방출 투여 형태는 제어 또는 연장 방출, 장내 방출 등을 포함한다. 변형 방출 투여 형태에서 사용되는 부형제는 당업자에게 흔히 알려져 있다.
- [0261] 추가의 구현예에서, HIV 백신을 포함하는 약학적 조성물은 설하 또는 구강 투여 형태로서 제형화될 수 있다. 그러한 투여 형태는 혀 아래에 투여되는 설하 정제 또는 용액 조성물 및 볼과 잇몸 사이에 배치되는 구강 정제를 포함한다.
- [0262] 추가의 구현예에서, HIV 백신을 포함하는 약학적 조성물은 비강 투여 형태로서 제형화될 수 있다. 그러한

본 발명의 투여 형태는 비강 전달을 위한 용액, 현탁액, 및 겔 조성물을 포함한다.

- [0263] 하나의 구현예에서, 약학적 조성물은 경구 투여를 위한 액체 투여 형태, 예컨대 현탁액, 에멀션 또는 시럽으로 제형화될 수 있다. 기타 구현예에서, 액체 투여 형태는, 흔히 사용되는 단순 희석제 예컨대 물 및 액체 파라핀에 더하여, 다양한 부형제 예컨대 보습제, 감미료, 향료 또는 보존제를 포함할 수 있다. 특정 구현예에서, HIV 백신 또는 그의 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는 조성물은 소아과 환자에 대한 투여에 적합하게 제형화될 수 있다.
- [0264] 하나의 구현예에서, 약학적 조성물은 비경구 투여를 위한 투여 형태, 예컨대 멸균 수성 용액, 현탁액, 에멀션, 비-수성 용액 또는 좌제로 제형화될 수 있다. 기타 구현예에서, 비-수성 용액 또는 현탁액은 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌글리콜, 식물성 오일 예컨대 올리브 오일 또는 주사가능한 에스테르 예컨대 에틸 올레아트를 포함할 수 있다. 좌제를 위한 베이스로서, 와이트프솔 (witepsol), 마크로골 (macrogol), 트윈 (tween) 61, 카카오 오일, 라우린 오일 또는 글리세린화된 젤라틴이 사용될 수 있다.
- [0265] 약학적 조성물의 투여량은 환자의 체중, 연령, 성별, 투여 시간 및 방식, 배출 속도, 및 질환의 중증도에 따라 다를 수 있다.
- [0266] 제-자극의 목적을 위해, 림프구, PBMC, 및/또는 CD4 T 세포가 환자로부터 제거되고, 자극 및 배양을 위해 단리된다. 단리된 세포는 면역화에 사용된 것과 동일한 HIV 백신 또는 활성화제 또는 상이한 HIV 백신 또는 활성화제와 접촉될 수 있다. 하나의 구현예에서, 단리된 세포는 배양물 중 약 10^6 개 세포 당 약 10 ng 내지 5 μg 의 HIV 백신 또는 활성화제 (또는 임의의 기타 적합한 양) 와 접촉된다. 더욱 구체적으로, 단리된 세포는 배양물 중 약 10^6 개 세포 당 약 50 ng, 약 100 ng, 약 200 ng, 약 300 ng, 약 400 ng, 약 500 ng, 약 600 ng, 약 700 ng, 약 800 ng, 약 900 ng, 약 1 μg , 약 1.5 μg , 약 2 μg , 약 2.5 μg , 약 3 μg , 약 3.5 μg , 약 4 μg , 약 4.5 μg , 또는 약 5 μg 의 HIV 백신 또는 활성화제와 접촉될 수 있다.
- [0267] 활성화제 또는 백신은 일반적으로 각각의 시험관내 세포 배양에서 1 회 사용되지만, 약 15 내지 약 35 일의 간격 후에 반복될 수 있다. 예를 들어, 약 15, 약 16, 약 17, 약 18, 약 19, 약 20, 약 21, 약 22, 약 23, 약 24, 약 25, 약 26, 약 27, 약 28, 약 29, 약 30, 약 31, 약 32, 약 33, 약 34, 또는 약 35 일에 반복 투여가 있을 수 있다.
- [0268] 농축된, 제-자극된 세포의 형질도입을 위해, 세포는 렌티바이러스 벡터로 또는 본원에서 공개되는 바와 같은 기타 알려진 벡터 시스템으로 형질도입될 수 있다. 형질도입되는 세포는 배양물 중 표적 세포 당 약 1-1,000 개 바이러스 게놈 (렌티바이러스 벡터를 함유하는 배양액의 RT-PCR 어세이에 의해 측정됨) (또는 임의의 기타 적합한 양) 과 접촉될 수 있다. 렌티바이러스 형질도입은 배양물 중 표적 세포 당 1-1,000 개 바이러스 게놈의 동일한 범위를 사용하여 1-5 회 반복될 수 있다.
- [0269] **세포 농축**
- [0270] 하나의 접근법에서, 세포 예컨대 T 세포가 HIV 감염된 환자로부터 수득되고 멀티웰 플레이트에서 조정 배지 ("CM") 를 포함하는 배양 배지에서 배양될 수 있다. 상청액 p24^{ant} ("p24") 의 수준 및 바이러스 RNA 수준이 표준 수단에 의해 평가될 수 있다. CM-배양된 세포가 1 ng/ml 미만의 피크 p24 상청액 수준을 갖는 환자는 부가적 항-바이러스제의 사용의 존재 또는 부재 하의 CM 에서의 대규모 T-세포 증식에 적합한 환자일 수 있다. 부가적으로는, 관심 대상의 상이한 약물 또는 약물 조합이 상이한 웰에 첨가될 수 있고, 샘플 중 바이러스 수준에 대한 영향이 표준 수단에 의해 평가될 수 있다. 적절한 바이러스 억제제를 제공하는 약물 조합이 치료적으로 유용한 조합이다. 특정 대상체에 관하여 적절한 바이러스 억제제를 구성하는 것을 확인하는 것은 능숙한 기술자의 능력에 속한다. 바이러스 증식을 제한함에 있어서의 관심 대상의 약물의 효과를 시험하기 위해서, 부가적 인자 예컨대 항-CD3 항체가 배양물에 첨가되어 바이러스 생산을 자극할 수 있다. 당업계에 알려진 HIV 감염된 세포 샘플의 배양 방법과는 다르게, CM 는 2 개월 초과 기간 동안 T 세포의 배양을 허용하며, 그에 의해 장기간 약물 효과를 어세이하기 위한 효과적 시스템을 제공한다.
- [0271] 이러한 접근법은 CM 를 포함하는 배지에서의 세포의 배양에 의해 세포 집단에서 HIV LTR 프로모터 영역에 의해 추진되는 유전자 발현의 저해를 허용한다. CM4 에서의 배양은 전사 매개 단백질과 HIV 유전자 발현 조절 요소 사이의 하나 이상의 상호작용을 변경함으로써 HIV LTR 추진되는 유전자 발현을 저해할 것 같다. 관심 대상의 전사-매개 단백질은 숙주 세포 인코딩되는 단백질 예컨대 AP-1, NFkappaB, NF-AT, IRF, LEF-1 및 Sp1, 및 HIV 인코딩되는 단백질 Tat 를 포함한다. 관심 대상의 HIV 유전자 발현 조절 요소는 AP-1, NFkappaB, NF-

AT, IRF, LEF-1 및 Sp1, 뿐만 아니라 Tat 와 상호작용하는 원격작용 응답 요소 (transacting responsive element) ("TAR") 에 대한 결합 자리를 포함한다.

[0272] 바람직한 구현예에서, HIV 감염된 세포는 감수성 전사 매개 단백질 서열 및 감수성 HIV 조절 요소 서열을 갖는 대상체로부터 획득된다. 더욱 바람직한 구현예에서, HIV 감염된 세포는 야생형 전사-매개 단백질 서열 및 야생형 HIV 조절 서열을 갖는 대상체로부터 획득된다.

[0273] 또다른 T 세포 농축 방법은 면역친화도-기반 선별을 이용한다. 이러한 접근법은 세포의 제 1 및 제 2 집단, 예컨대 CD4+ 및 CD8+ 세포 집단의 동시 농축 또는 선별을 수반할 수 있다. 일차 인간 T 세포를 함유하는 세포는 면역친화도 시약이 샘플 중 세포의 표면 상의 CD4 및 CD8 분자에, 각각, 특이적으로 결합하는 조건 하에, 인큐베이션 조성물 중 CD4 에 특이적으로 결합하는 제 1 면역친화도 시약 및 CD8 에 특이적으로 결합하는 제 2 면역친화도 시약과 접촉된다. 제 1 및/또는 제 2 면역친화도 시약에 결합된 세포가 회수되고, 그에 의해 CD4+ 세포 및 CD8+ 세포를 포함하는 농축된 조성물을 생성한다. 이러한 접근법은 준최적 수율 농도에 있는 농도의 제 1 및/또는 제 2 면역친화도 시약과 조성물의 인큐베이션을 포함할 수 있다. 특히, 일부 구현예에서, 형질도입된 세포는 혼합된 T 세포 집단이고, 다른 구현예에서 형질도입된 세포는 혼합된 T 세포 집단이 아니다.

[0274] 일부 구현예에서, 면역친화도-기반 선별은 고체 지지체가 구체, 예컨대 비드, 예컨대 마이크로비드 또는 나노비드인 경우에 사용된다. 기타 구현예에서, 비드는 자기 비드일 수 있다. 또다른 구현예에서, 항체는 고체 표면, 예컨대 구체 또는 크로마토그래피 매트릭스 상에 부동화된 결합 시약과 가역 결합을 형성할 수 있는 하나 이상의 결합 상대를 함유하며, 여기에서 항체는 고체 표면 상에 가역적으로 부동화된다. 일부 구현예에서, 상기 고체 표면 상의 항체에 의해 결합되는 세포 표면 마커를 발현하는 세포는 결합 시약과 결합 상대 사이의 가역 결합의 파괴에 의해 매트릭스로부터 회수될 수 있다. 일부 구현예에서, 결합 시약은 스트렙타비딘이거나 또는 스트렙타비딘 유사체 또는 돌연변이체이다.

[0275] 조혈 시스템의 일차 세포 및/또는 조혈 줄기 세포의 안정적 형질도입은, 시험관내 또는 생체외에서, 세포의 표면을 렌티바이러스 벡터 및 세포 표면에 결합하는 적어도 하나의 분자 둘 모두와 접촉시킴으로써 획득될 수 있다. 세포는 둘 이상의 층을 포함하는 통풍되는 용기에서 성장 및/또는 증식에 도움이 되는 조건 하에 배양될 수 있다. 일부 구현예에서, 이러한 접근법은 비-CD4+ T 세포 고갈 및/또는 광범위한 폴리클로날 증식과 함께 사용될 수 있다.

[0276] T 세포 농축에 대한 또다른 접근법에서, PBMC 는 펩티드로 자극되고, 사이토카인, 예컨대 인터페론-감마를 분비하는 세포에 대해 농축된다. 이러한 접근법은 일반적으로 T 세포를 함유하는 세포의 혼합물을 항원으로 자극하고, 항원-자극된 세포를 생성물로 표지되는 정도에 따라 분리하는 것을 실행하는 것을 수반한다. 항원 자극은 세포를 적어도 하나의 T 세포의 항원-특이적 자극을 유발하는데 효과적인 조건 하에 적어도 하나의 항원에 노출시킴으로써 달성된다. 생성물에 의한 표지는 세포의 표면을 적어도 하나의 포획 모이어티를 함유하도록 개질하고, 세포를 생성물이 분리되고, 방출되고, 상기 포획 모이어티에 특이적으로 결합되는 ("포획되는" 또는 "포착되는") 조건 하에 배양하고; 포획된 생성물을 표지 모이어티로 표지하여 (이 때 표지된 세포는 표지 절차의 일부로서 또는 분리 절차의 일부로서 용해되지 않는다) 달성된다. 포획 모이어티는 세포 표면 당단백질 CD3 또는 CD4 의 검출을 포함하여, 농축 단계를 개량하고, 일반적으로 항원-특이적 T 세포, 구체적으로 CD4+ T 세포의 비율을 증가시킬 수 있다.

[0277] 하기 실시예는 본 발명의 양상을 예시하기 위해 제공된다. 그러나, 본 발명은 이들 실시예에 기재된 특정 조건 또는 세부사항에 제한되지 않는다고 이해될 것이다. 본원에서 언급된 모든 출판된 문헌은 참조에 의해 구체적으로 포함된다.

[0278] **실시예**

[0279] **실시예 1: 렌티바이러스 벡터 시스템의 개발**

[0280] 렌티바이러스 벡터 시스템을 도 3 (선형 형태) 및 도 4 (환형 형태) 에 요약된 바와 같이 개발했다. 먼저 도 3 의 맨 윗 부분을 참조하여, 대표적 치료적 벡터를 하기 요소를 왼쪽으로부터 오른쪽으로 포함하도록 디자인 및 생산했다: 하이브리드 5' 장 말단 리퍼트 (RSV/5' LTR) (SEQ ID NOS: 34-35), Psi 서열 (RNA 패키징 자리) (SEQ ID NO: 36), RRE (Rev-응답 요소) (SEQ ID NO: 37), cPPT (폴리퓨린 지역) (SEQ ID NO: 38), EF-1 α 프로모터 (SEQ ID NO: 4), miR30CCR5 (SEQ ID NO: 1), miR21Vif (SEQ ID NO: 2), miR185Tat (SEQ ID NO: 3), 우드척 전사후 조절 요소 (WPRE) (SEQ ID NOS: 32 또는 80), 및 Δ U3 3' LTR (SEQ ID NO: 39). 도 3 에

설명된 치료적 벡터는 또한 본원에서 AGT103 로서 언급된다.

- [0281] 다음으로 도 3 의 중간 부분을 참조하여, 헬퍼 플라스미드를 하기 요소를 왼쪽으로부터 오른쪽으로 포함하도록 디자인 및 생산했다: CAG 프로모터 (SEQ ID NO: 41); HIV 성분 gag (SEQ ID NO: 43); HIV 성분 pol (SEQ ID NO: 44); HIV Int (SEQ ID NO: 45); HIV RRE (SEQ ID NO: 46); 및 HIV Rev (SEQ ID NO: 47).
- [0282] 다음으로 도 3 의 아래 부분을 참조하여, 외피 플라스미드를 하기 요소를 왼쪽으로부터 오른쪽으로 포함하도록 디자인 및 생산했다: RNA 폴리머라아제 II 프로모터 (CMV) (SEQ ID NO: 60) 및 수포성 구내염 바이러스 G 당단백질 (VSV-G) (SEQ ID NO: 62).
- [0283] 293T/17 HEK 세포 (American Type Culture Collection, Manassas, VA 로부터 구입) 에서 치료적 벡터, 외피 플라스미드, 및 헬퍼 플라스미드 (도 3 에서 보여짐) 로 트랜스펙션 후에 렌티바이러스 입자가 생산되었다. 기능적 바이러스 입자를 생산한, 293T/17 HEK 세포의 트랜스펙션은 시약 폴리 (에틸렌이민) (PEI) 을 이용하여 플라스미드 DNA 흡수의 효율을 증가시켰다. 플라스미드 및 DNA 를 초기에 별개로 혈청을 함유하지 않는 배양 배지에 3:1 (PEI 대 DNA 의 질량비) 의 비로 첨가했다. 2-3 일 후에, 세포 배지를 수집하고, 렌티바이러스 입자를 고속 원심분리 및/또는 여과 그에 뒤이어 음이온-교환 크로마토그래피에 의해 정제했다. 렌티바이러스 입자의 농도는 형질도입 단위/ml (TU/ml) 의 면에서 표현될 수 있다. TU 의 확인을 배양액 중 HIV p24 수준을 측정하거나 (p24 단백질은 렌티바이러스 입자 내로 통합됨), 정량적 PCR 에 의해 세포 당 바이러스 DNA 카피의 수를 측정하거나, 또는 세포를 감염시키고 빛을 사용함으로써 (벡터가 루시페라아제 또는 형광 단백질 마커를 인코딩하는 경우에) 달성했다.
- [0284] 위에서 언급된 바와 같이, 3-벡터 시스템 (즉, 2-벡터 렌티바이러스 패키징 시스템) 을 렌티바이러스 입자의 생산을 위해 디자인했다. 3-벡터 시스템의 도해는 도 4 에서 보여진다. 도 4 의 도해는 이전에 도 3 에 기재된 선형 시스템의 환화 버전이다. 간략히, 도 4 를 참조하여, 가장 위의 벡터는 헬퍼 플라스미드 (이는, 이 경우에, Rev 를 포함한다) 이다. 도 4 의 중간에 보이는 벡터는 외피 플라스미드이다. 가장 아래의 벡터는 이전에 기재된 치료적 벡터이다.
- [0285] 더욱 구체적으로 도 4 를 참조하면, 헬퍼 플러스 Rev 플라스미드는 CAG 인핸서 (SEQ ID NO: 40); CAG 프로모터 (SEQ ID NO: 41); 닭 베타 액틴 인트론 (SEQ ID NO: 42); HIV gag (SEQ ID NO: 43); HIV Pol (SEQ ID NO: 44); HIV Int (SEQ ID NO: 45); HIV RRE (SEQ ID NO: 46); HIV Rev (SEQ ID NO: 47); 및 토끼 베타 글로빈 poly A (SEQ ID NO: 48) 를 포함한다.
- [0286] 외피 플라스미드는 CMV 프로모터 (SEQ ID NO: 60); 베타 글로빈 인트론 (SEQ ID NO: 61); VSV-G (SEQ ID NO: 62); 및 토끼 베타 글로빈 poly A (SEQ ID NO: 63) 를 포함한다.
- [0287] 헬퍼 (플러스 Rev) 및 외피 플라스미드를 포함하는 2-벡터 렌티바이러스 패키징 시스템의 합성.
- [0288] 물질 및 방법:
- [0289] 헬퍼 플라스미드의 구축: 헬퍼 플라스미드를 Gag, Pol, 및 인테그라아제 유전자를 함유하는 pNL4-3 HIV 플라스미드 (NIH 보조 시약 프로그램) 로부터 DNA 단편의 초기 PCR 증폭에 의해 구축했다. 프라이머를 pCDNA3 플라스미드 (Invitrogen) 내 동일한 자리에서 삽입하는데 사용될 수 있는 EcoRI 및 NotI 제한 자리를 갖는 단편을 증폭시키도록 디자인했다. 정방향 프라이머는 (5'-TAAGCAGAATTCATGAATTTGCCAGGAAGAT-3') (SEQ ID NO: 81) 였고, 역방향 프라이머는 (5'-CCATACAATGAATGGACACTAGGCGGCCGCACGAAT-3') (SEQ ID NO: 82) 였다. Gag, Pol, 인테그라아제 단편에 관한 서열은 다음과 같았다:

GAATTCATGAATTTGCCAGGAAGATGGAAACCAAAAATGATAGGGGGAATTGGA
GGTTTTATCAAAGTAAGACAGTATGATCAGATACTCATAGAAATCTGCGGACATA
AAGCTATAGGTACAGTATTAGTAGGACCTACACCTGTCAACATAAATTGGAAGAAA
TCTGTTGACTCAGATTGGCTGCACCTTTAAATTTCCATTAGTCCTATTGAGACTGT
ACCAGTAAAATTAAGCCAGGAATGGATGGCCCAAAAAGTTAAACAATGGCCATTG
ACAGAAGAAAAATAAAAGCATTAGTAGAAATTTGTACAGAAATGGAAAAGGAA
GGAAAAATTTCAAAAATTGGGCCTGAAAATCCATAACAATACTCCAGTATTTGCCAT
AAAGAAAAAAGACAGTACTAAATGGAGAAAATTAGTAGATTTTCAGAGAACTTAAT
AAGAGAACTCAAGATTTCTGGGAAGTTCAATTAGGAATACCACATCCTGCAGGGT
TAAAACAGAAAAAATCAGTAACAGTACTGGATGTGGGCGATGCATATTTTTTCAGT
TCCCTTAGATAAAGACTTCAGGAAGTATACTGCATTTACCATACCTAGTATAAACA
ATGAGACACCAGGGATTAGATATCAGTACAATGTGCTTCCACAGGGATGGAAAGG
ATCACCAGCAATATTCCAGTGTAGCATGACAAAAATCTTAGAGCCTTTTAGAAAA
CAAAATCCAGACATAGTCATCTATCAATACATGGATGATTTGTATGTAGGATCTGA
CTTAGAAATAGGGCAGCATAGAACAAAAATAGAGGAACTGAGACAACATCTGTTG
AGGTGGGGATTTACCACACCAGACAAAAACATCAGAAAGAACCTCCATTCCTTT
GGATGGGTTATGAACTCCATCCTGATAAATGGACAGTACAGCCTATAGTGCTGCC
AGAAAAGGACAGCTGGACTGTCAATGACATACAGAAATTAGTGGGAAAATTGAAT
TGGGCAAGTCAGATTTATGCAGGGATTAAGTAAGGCAATTATGTAAACTTCTTA
GGGGAACCAAAGCACTAACAGAAGTAGTACCACTAACAGAAGAAGCAGAGCTAG
AACTGGCAGAAAACAGGGAGATTCTAAAAGAACCGGTACATGGAGTGTATTATGA
CCCATCAAAAGACTTAATAGCAGAAATACAGAAGCAGGGGCAAGGCCAATGGAC
ATATCAAATTTATCAAGAGCCATTTAAAAATCTGAAAACAGGAAAGTATGCAAGA
ATGAAGGGTGCCACACTAATGATGTGAAACAATTAACAGAGGCAGTACAAAAA
ATAGCCACAGAAAGCATAGTAATATGGGGAAAGACTCCTAAATTTAAATTACCCA

[0290]

TACAAAAGGAAACATGGGAAGCATGGTGGACAGAGTATTGGCAAGCCACCTGGA
 TTCCTGAGTGGGAGTTTGTCAATACCCCTCCCTTAGTGAAGTTATGGTACCAGTTA
 GAGAAAGAACCCATAATAGGAGCAGAACTTTCTATGTAGATGGGGCAGCCAATA
 GGGAAACTAAATTAGGAAAAGCAGGATATGTAAGTACAGAGGAAGACAAAAAG
 TTGTCCCCTAACGGACACAACAATCAGAAGACTGAGTTACAAGCAATTCATCT
 AGCTTTCAGGATTCGGGATTAGAAGTAAACATAGTGACAGACTCACAATATGCA
 TTGGGAATCATTCAAGCACAACCAGATAAGAGTGAATCAGAGTTAGTCAGTCAAA
 TAATAGAGCAGTTAATAAAAAAGGAAAAAGTCTACCTGGCATGGGTACCAGCACA
 CAAAGGAATTGGAGGAAATGAACAAGTAGATAAATTGGTCAGTGCTGGAATCAG
 GAAAGTACTATTTTTAGATGGAATAGATAAGGCCCAAGAAGAACATGAGAAATAT
 CACAGTAATTGGAGAGCAATGGCTAGTGATTTTAACCTACCACCTGTAGTAGCAA
 AAGAAATAGTAGCCAGCTGTGATAAATGTCAGCTAAAAGGGGAAGCCATGCATGG
 ACAAGTAGACTGTAGCCAGGAATATGGCAGCTAGATTGTACACATTTAGAAGGA
 AAAGTTATCTTGGTAGCAGTTCATGTAGCCAGTGGATATATAGAAGCAGAAGTAA
 TTCCAGCAGAGACAGGGCAAGAAACAGCATACTTCCTCTTAAAATTAGCAGGAAG
 ATGGCCAGTAAAACAGTACATACAGACAATGGCAGCAATTCACCAGTACTACA
 GTTAAGGCCGCTGTTGGTGGGCGGGGATCAAGCAGGAATTTGGCATTCCCTACA
 ATCCCCAAAGTCAAGGAGTAATAGAATCTATGAATAAAGAATTAAAGAAAATTAT
 AGGACAGGTAAGAGATCAGGCTGAACATCTTAAGACAGCAGTACAAATGGCAGT
 ATTCATCCACAATTTTAAAAGAAAAGGGGGGATTGGGGGGTACAGTGCAGGGGAA
 AGAATAGTAGACATAATAGCAACAGACATACAACTAAAGAATTACAAAAACAA
 ATTACAAAATTCAAAATTTTCGGGTTTATTACAGGGACAGCAGAGATCCAGTTTG
 GAAAGGACCAGCAAAGCTCCTCTGGAAAGGTGAAGGGGCAGTAGTAATACAAGA
 TAATAGTGACATAAAAGTAGTGCCAAGAAGAAAAGCAAAGATCATCAGGGATTAT
 GGAAAACAGATGGCAGGTGATGATTGTGTGGCAAGTAGACAGGATGAGGATTAA
 (SEQ ID NO: 83).

[0291]

[0292]

다음으로, XbaI 및 XmaI 측면 제한 자리가 있는 Rev, RRE, 및 토끼 베타 글로빈 poly A 서열을 함유하는 DNA 단편을 MWG Operon 에 의해 합성했다. DNA 단편을 그 후 플라스미드 내로 XbaI 및 XmaI 제한 자리에서 삽입했다. DNA 서열은 다음과 같았다:

TCTAGAATGGCAGGAAGAAGCGGAGACAGCGACGAAGAGCTCATCAGAACAGTC
 AGACTCATCAAGCTTCTCTATCAAAGCAACCCACCTCCCAATCCCGAGGGGACCC
 GACAGGCCCGAAGGAATAGAAGAAGAAGGTGGAGAGAGAGACAGAGACAGATC
 CATTTCGATTAGTGAACGGATCCTTGGCACTTATCTGGGACGATCTGCGGAGCCTGT
 GCCTCTTCAGCTACCACCGCTTGAGAGACTTACTCTTGATTGTAACGAGGATTGTG
 GAACTTCTGGGACGCAGGGGGTGGGAAGCCCTCAAATATTGGTGGAATCTCCTAC
 AATATTGGAGTCAGGAGCTAAAGAATAGAGGAGCTTTGTTCCCTTGGGTCTTGGG
 AGCAGCAGGAAGCACTATGGGCGCAGCGTCAATGACGCTGACGGTACAGGCCAG
 ACAATTATTGTCTGGTATAGTGCAGCAGCAGAACAATTTGCTGAGGGCTATTGAG
 GCGCAACAGCATCTGTTGCAACTCACAGTCTGGGGCATCAAGCAGCTCCAGGCAA
 GAATCCTGGCTGTGGAAAAGATACCTAAAGGATCAACAGCTCCTAGATCTTTTTCCC
 TCTGCCAAAAATTATGGGGACATCATGAAGCCCCTTGAGCATCTGACTTCTGGCTA
 ATAAAGGAAATTTATTTTCATTGCAATAGTGTGTTGGAATTTTTTGTGTCTCTCACT
 CGGAAGGACATATGGGAGGGCAAATCATTTAAAACATCAGAATGAGTATTTGGTT
 TAGAGTTTGGCAACATATGCCATATGCTGGCTGCCATGAACAAAGGTGGCTATAA
 AGAGGTCATCAGTATATGAAACAGCCCCCTGCTGTCCATTCCTTATCCATAGAAA
 AGCCTTGACTTGAGGTTAGATTTTTTTATATTTTGTGTTATTTTTTTCTTTA
 ACATCCCTAAAATTTCCCTTACATGTTTTACTAGCCAGATTTTTCCCTCCTCCTGA
 CTACTIONCAGTCATAGCTGTCCCTCTTCTTATGAAGATCCCTCGACCTGCAGCCC
 AAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCCCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCA
 CAATTCCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAGCCTGGGGTGCCTA
 ATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCCTTTCCAGTCGG
 GAAACCTGTGCTGCCAGCGGATCCGCATCTCAATTAGTCAGCAACCATAGTCCCGC
 CCTAACTCCGCCCATCCCGCCCTAACTCCGCCAGTTCGCCCATTTCTCCGCCCC
 ATGGCTGACTAATTTTTTTTATTTATGCAGAGGCCGAGGCCGCCTCGGCCTCTGAG
 CTATTCCAGAAGTAGTGAGGAGGCTTTTTTGGAGGCCTAGGCTTTTGCAAAAAGCT
 AACTTGTTTTATTGCAGCTTATAATGGTTACAAATAAAGCAATAGCATCACAAATTT
 CACAAATAAAGCATTTTTTTTACTGCATTCTAGTTGTGGTTTGTCCAAACTCATCAA
 TGTATCTTATCAGCGGCCGCCCGGG (SEQ ID NO: 84)

[0293]

[0294]

마지막으로, pCDNA3.1 의 CMV 프로모터를 CAG 인핸서/프로모터 플러스 닭 베타 액틴 인트론 서열로 대체했다. MluI 및 EcoRI 측면 제한 자리가 있는 CAG 인핸서/프로모터/인트론 서열을 함유하는 DNA 단편을 MWG Operon 에 의해 합성했다. DNA 단편을 그 후 플라스미드 내로 MluI 및 EcoRI 제한 자리에서 삽입했다. DNA 서열은 다음과 같았다:

ACGCGTTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATA
 TGGAGTTCGCGGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCCGCTGGCTGACCGCCAAC
 GACCCCCGCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGG
 GACTTTCATTGACGTCAATGGGTGGACTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAG
 TACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAA
 TGGCCCCGCTGGCATTATGCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCA
 GTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGGTCGAGGTGAGCCCCACGTTT
 TGCTTCACTCTCCCCATCTCCCCCCCCCTCCCCACCCCAATTTTGTATTTATTTATTT
 TTTAATTATTTTGTGCAGCGATGGGGGCGGGGGGGGGGGGGGGCGCGCCAGGCG
 GGGCGGGGCGGGGCGAGGGGCGGGGCGGGGCGAGGCGGAGAGGTGCGGCGGCA
 GCCAATCAGAGCGGCGCGCTCCGAAAGTTTCCTTTTATGGCGAGGCGGCGGCGGC
 GCGGCCCTATAAAAAGCGAAGCGCGCGGGCGGGGAGTCGCTGCGTTGCCTTC
 GCCCGTGCCCCGCTCCGCGCCGCTCGCGCCGCCCGCCCCGGCTCTGACTGACCG
 CGTACTCCCACAGGTGAGCGGGCGGGACGGCCCTTCTCCTCCGGGCTGTAATTAG
 CGTTGGTTAATGACGGCTCGTTTCTTTTCTGTGGCTGCGTAAAGCCTTAAAGG
 GCTCCGGGAGGGCCCTTTGTGCGGGGGGAGCGGCTCGGGGGGTGCGTGCCTGTG
 TGTGTGCGTGGGGAGCGCCGCGTGCGGCCCGCGCTGCCCGGCGGCTGTGAGCGCT
 GCGGGCGCGGCGCGGGGCTTTGTGCGCTCCGCGTGTGCGCGAGGGGAGCGCGGCC
 GGGGGCGGTGCCCGCGGTGCGGGGGGGCTGCGAGGGGAACAAAGGCTGCGTGC
 GGGGTGTGTGCGTGGGGGGGTGAGCAGGGGGTGTGGGCGCGGCGGTGCGGCTGT
 AACCCCCCTGCACCCCCCTCCCCGAGTTGCTGAGCACGGCCCGGCTTCGGGTGC
 GGGGCTCCGTGCGGGGCGTGGCGCGGGGCTCGCCGTGCCGGGCGGGGGGTGGCG
 GCAGGTGGGGGTGCCGGGCGGGGCGGGGCCGCTCGGGCCGGGAGGGCTCGGG
 GGAGGGGCGCGGCGGCCCGGAGCGCCGGCGGCTGTGAGGCGCGGCGAGCCGC
 AGCCATTGCCTTTTATGGTAATCGTGCAGAGGGGCGCAGGGACTTCCTTTGTCCCA
 AATCTGGCGGAGCCGAAATCTGGGAGGCGCCCGCCGACCCCCCTAGCGGGCGCG
 GGCGAAGCGGTGCGGCGCCGGCAGGAAGGAAATGGGCGGGGAGGGCCTTCGTGC
 GTCGCCGCGCCGCGTCCCTTCTCCATCTCCAGCCTCGGGGCTGCCGAGGGGGA
 CGGCTGCCTTCGGGGGGACGGGGCAGGGCGGGGTTGCGCTTCTGGCGTGTGACC
 GCGGGAATTC (SEQ ID NO: 85)

[0295]

[0296] *VSV-G* 외피 플라스미드의 구축:

[0297] 수포성 구내염 인디애나 바이러스 당단백질 (VSV-G) 서열을 측면 EcoRI 제한 자리가 있는 MWG Operon 에 의해 합성했다. DNA 단편을 그 후 pCDNA3.1 플라스미드 (Invitrogen) 내로 EcoRI 제한 자리에서 삽입하고, 정확한 배향을 CMV 특이적 프라이머를 사용하여 서열분석에 의해 확인했다. DNA 서열은 다음과 같았다:

GAATTCATGAAGTGCCTTTTGTACTTAGCCTTTTTATTTCATTGGGGTGAATTGCAAG
 TTCACCATAGTTTTTCCACACAACCAAAAAGGAACTGGAAAAATGTTCTTCTAA
 TTACCATTATTGCCCGTCAAGCTCAGATTTAAATTGGCATAATGACTTAATAGGCA
 CAGCCTTACAAGTCAAATGCCCAAGAGTCACAAGGCTATTCAAGCAGACGGTTG
 GATGTGTCATGCTTCCAAATGGGTCACTACTTGTGATTTCCGCTGGTATGGACCGA
 AGTATATAACACATTCCATCCGATCCTTCACTCCATCTGTAGAACAATGCAAGGAA
 AGCATTGAACAAACGAAACAAGGAACTTGGCTGAATCCAGGCTTCCCTCCTCAA
 GTTGTGGATATGCAACTGTGACGGATGCCGAAGCAGTGATTGTCCAGGTGACTCCT
 CACCATGTGCTGGTTGATGAATACACAGGAGAATGGGTTGATTCACAGTTCATCA
 ACGGAAAATGCAGCAATTACATATGCCCCACTGTCCATAACTCTACAACCTGGCAT
 TCTGACTATAAGGTCAAAGGGCTATGTGATTCTAACCTCATTTCCATGGACATCAC
 CTCTTCTCAGAGGACGGAGAGCTATCATCCCTGGGAAAGGAGGGCACAGGGTTC
 AGAAGTAACTACTTTGCTTATGAACTGGAGGCAAGGCCTGCAAAATGCAATACT
 GCAAGCATTGGGGAGTCAGACTCCCATCAGGTGTCTGGTTCGAGATGGCTGATAA
 GGATCTCTTTGCTGCAGCCAGATTCCCTGAATGCCAGAAGGGTCAAGTATCTCTG
 CTCCATCTCAGACCTCAGTGGATGTAAGTCTAATTCAGGACGTTGAGAGGATCTTG
 GATTATCCCTCTGCCAAGAAACCTGGAGCAAAATCAGAGCGGGTCTTCCAATCTC
 TCCAGTGGATCTCAGCTATCTTGCTCCTAAAAACCCAGGAACCGGTCTGCTTTCA
 CCATAATCAATGGTACCCTAAAATACTTTGAGACCAGATACATCAGAGTCGATATT
 GCTGCTCCAATCCTCTCAAGAATGGTCGGAATGATCAGTGGAACCTACCACAGAAA
 GGGAACTGTGGGATGACTGGGCACCATATGAAGACGTGGAAATTGGACCCAATGG
 AGTTCAGAGGACCAGTTCAGGATATAAGTTTCCTTTATACATGATTGGACATGGTA
 TGTGGACTCCGATCTTCATCTTAGCTCAAAGGCTCAGGTGTTGGAACATCCTCAC
 ATTCAAGACGCTGCTTCGCAACTTCTGATGATGAGAGTTTATTTTTTGGTGATACT
 GGGCTATCCAAAAATCCAATCGAGCTTGTAGAAGGTTGGTTCAGTAGTTGGAAAA
 GCTCTATTGCCTCTTTTTTCTTTATCATAGGGTTAATCATTGGACTATTCTTGGTCT
 CCGAGTTGGTATCCATCTTTGCATTAATTAAGCACACCAAGAAAAGACAGATTT
 ATACAGACATAGAGATGAGAATTC (SEQ ID NO: 86)

[0298]

[0299]

4-백터 시스템 (즉, 3-백터 렌티바이러스 패키징 시스템) 을 또한 디자인하고 본원에 기재된 방법 및 물질을 사용하여 생산했다. 4-백터 시스템의 도해가 도 5 에서 보여진다. 간략히, 및 도 5 를 참조하여, 제일 위에 있는 백터는 헬퍼 플라스미드이며, 이것은, 이 경우에, Rev 를 포함하지 않는다. 위에서 두번째 백터는 별개의 Rev 플라스미드이다. 아래에서 두번째 백터는 외피 플라스미드이다. 제일 아래에 있는 백터는 이전에 기재된 치료적 백터이다.

[0300]

부분적으로, 도 5 를 참조하여, 헬퍼 플라스미드는 CAG 인핸서 (SEQ ID NO: 49); CAG 프로모터 (SEQ ID NO: 50); 닭 베타 액틴 인트론 (SEQ ID NO: 51); HIV gag (SEQ ID NO: 52); HIV Pol (SEQ ID NO: 53); HIV Int (SEQ ID NO: 54); HIV RRE (SEQ ID NO: 55); 및 토끼 베타 글로빈 poly A (SEQ ID NO: 56) 를 포함한다.

[0301]

Rev 플라스미드는 RSV 프로모터 (SEQ ID NO: 57); HIV Rev (SEQ ID NO: 58); 및 토끼 베타 글로빈 poly A (SEQ ID NO: 59) 를 포함한다.

[0302]

외피 플라스미드는 CMV 프로모터 (SEQ ID NO: 60); 베타 글로빈 인트론 (SEQ ID NO: 61); VSV-G (SEQ ID NO: 62); 및 토끼 베타 글로빈 poly A (SEQ ID NO: 63) 를 포함한다.

[0303]

헬퍼, Rev, 및 외피 플라스미드를 포함하는 3-백터 렌티바이러스 패키징 시스템의 합성.

[0304]

물질 및 방법:

[0305]

Rev 가 없는 헬퍼 플라스미드의 구축:

[0306] RRE 및 토끼 베타 글로빈 poly A 서열을 함유하는 DNA 단편을 삽입함으로써 Rev 가 없는 헬퍼 플라스미드를 구축했다. 이 서열을 측면 XbaI 및 XmaI 제한 자리가 있는 MWG Operon 에 의해 합성했다 RRE/토끼 poly A 베타 글로빈 서열을 그 후 헬퍼 플라스미드 내로 XbaI 및 XmaI 제한 자리에서 삽입했다. DNA 서열은 다음과 같다:

TCTAGAAGGAGCTTTGTTCCCTTGGGTTCTTGGGAGCAGCAGGAAGCACTATGGGC
 GCAGCGTCAATGACGCTGACGGTACAGGCCAGACAATTATTGTCTGGTATAGTGC
 AGCAGCAGAACAATTTGCTGAGGGCTATTGAGGCGCAACAGCATCTGTTGCAACT
 CACAGTCTGGGGCATCAAGCAGCTCCAGGCAAGAATCCTGGCTGTGGAAAGATAC
 CTAAGGATCAACAGCTCCTAGATCTTTTTCCCTCTGCCAAAAATTATGGGGACAT
 CATGAAGCCCCTTGAGCATCTGACTTCTGGCTAATAAAGGAAATTTATTTTCATTG
 CAATAGTGTGTTGGAATTTTTGTGTCTCTCACTCGGAAGGACATATGGGAGGGCA
 AATCATTTAAAACATCAGAATGAGTATTTGGTTTAGAGTTTGGCAACATATGCCAT
 ATGCTGGCTGCCATGAACAAAGGTGGCTATAAAGAGGTCATCAGTATATGAAACA
 GCCCCCTGCTGTCCATTCCCTTATTCCATAGAAAAGCCTTGACTTGAGGTTAGATTTT
 TTTTATATTTTGTGTTATTTTTTCTTTAACATCCCTAAAATTTTCCTTACAT
 GTTTTACTAGCCAGATTTTCCCTCCTCCTGACTACTCCAGTCATAGCTGTCCCT
 CTTCTCTTATGAAGATCCCTCGACCTGCAGCCCAAGCTTGGCGTAATCATGGTCAT
 AGCTGTTTCCCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAATTCCACACAACATACGAGCC
 GGAAGCATAAAGTGTAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAA
 TTGCGTTGCGCTCACTGCCCCGCTTTCCAGTCGGGAAACCTGTGCTGCCAGCGGATC
 CGCATCTCAATTAGTCAGCAACCATAGTCCCGCCCTAACTCCGCCATCCCGCC
 CTAACCTCCGCCAGTTCGCCCATTTCTCCGCCCATGGCTGACTAATTTTTTTTATT
 TATGCAGAGGCCGAGGCCGCTCGGCCTCTGAGCTATTCCAGAAGTAGTGAGGAG
 GCTTTTTTGGAGGCCTAGGCTTTTGCAAAAGCTAACTTGTTTATTGCAGCTTATA
 ATGGTTACAAATAAAGCAATAGCATCACAAATTTACAAATAAAGCATTTTTTTTCA
 CTGCATTCTAGTTGTGGTTTGTCCAAACTCATCAATGTATCTTATCACCCGGG (SEQ
 ID NO: 87)

[0307]

Rev 플라스미드의 구축:

[0308]

[0309]

RSV 프로모터 및 HIV Rev 서열을 측면 MfeI 및 XbaI 제한 자리가 있는 MWG Operon 에 의해 단일 DNA 단편으로 합성했다. DNA 단편을 그 후 CMV 프로모터가 RSV 프로모터로 대체되어 있는 pCDNA3.1 플라스미드 (Invitrogen) 내로 MfeI 및 XbaI 제한 자리에서 삽입했다. DNA 서열은 다음과 같았다:

CAATTGCGATGTACGGGCCAGATATACGCGTATCTGAGGGGACTAGGGTGTGTTT
 AGGCGAAAAGCGGGGCTTCGGTTGTACGCGGTTAGGAGTCCCCTCAGGATATAGT
 AGTTTCGCTTTTGCATAGGGAGGGGAAATGTAGTCTTATGCAATACACTTGTAGT
 CTTGCAACATGGTAACGATGAGTTAGCAACATGCCTTACAAGGAGAGAAAAGCA
 CCGTGCATGCCGATTGGTGGAAAGTAAGGTGGTACGATCGTGCCTTATTAGGAAGG
 CAACAGACAGGTCTGACATGGATTGGACGAACCACTGAATTCCGCATTGCAGAGA
 TAATTGTATTTAAGTGCCTAGCTCGATACAATAAACGCCATTTGACCATTACCAC
 ATTTGGTGTGCACCTCCAAGCTCGAGCTCGTTTAGTGAACCGTCAGATCGCCTGGAG
 ACGCCATCCACGCTGTTTTGACCTCCATAGAAGACACCGGGACCGATCCAGCCTCC
 CCTCGAAGCTAGCGATTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAGCGGAGACAGCGAC
 GAAGAACTCCTCAAGGCAGTCAGACTCATCAAGTTTCTCTATCAAAGCAACCCAC
 CTCCCAATCCCGAGGGGACCCGACAGGCCCGAAGGAATAGAAGAAGAAGGTGGA
 GAGAGAGACAGAGACAGATCCATTGATTAGTGAACGGATCCTTAGCACTTATCT
 GGGACGATCTGCGGAGCCTGTGCCTCTTCAGCTACCACCGCTTGAGAGACTTACTC
 TTGATTGTAACGAGGATTGTGGAACCTTCTGGGACGCAGGGGGTGGGAAGCCCTCA
 AATATTGGTGGAAATCTCCTACAATATTGGAGTCAGGAGCTAAAGAATAGTCTAGA

(SEQ ID NO: 88)

[0310]

[0311]

2-백터 및 3-백터 패키징 시스템을 위한 플라스미드는 유사한 요소로 변형될 수 있고, 백터 기능의 상실 없이 인트론 서열이 잠재적으로 제거될 수 있었다. 예를 들어, 하기 요소는 2-백터 및 3-백터 패키징 시스템 내 유사한 요소를 대체할 수 있었다:

[0312]

프로모터: 신장 인자-1 (EF-1) (SEQ ID NO: 64), 포스포글리세레이트 키나아제 (PGK) (SEQ ID NO: 65), 및 유비퀴틴 C (Ubc) (SEQ ID NO: 66) 는 CMV (SEQ ID NO: 60) 또는 CAG 프로모터 (SEQ ID NO: 100) 를 대체할 수 있다.

[0313]

Poly A 서열: SV40 poly A (SEQ ID NO: 67) 및 bGH poly A (SEQ ID NO: 68) 는 토끼 베타 글로빈 poly A (SEQ ID NO: 48) 를 대체할 수 있다.

[0314]

HIV Gag, Pol, 및 인테그라아제 서열: 헬퍼 플라스미드 내 HIV 서열은 상이한 HIV 균주 또는 분기균으로부터 구축될 수 있다. 예를 들어, Bal 균주로부터의 HIV Gag (SEQ ID NO: 69); HIV Pol (SEQ ID NO: 70); 및 HIV Int (SEQ ID NO: 71) 는 본원에 개요사술된 바와 같은 헬퍼/헬퍼 플러스 Rev 플라스미드에 함유된 gag, pol, 및 int 서열로 교환될 수 있다.

[0315]

외피: The VSV-G 당단백질은 고양이 내생성 바이러스 (RD114) (SEQ ID NO: 72), 긴팔 원숭이 백혈병 바이러스 (GALV) (SEQ ID NO: 73), 광견병 (FUG) (SEQ ID NO: 74), 림프구성 맥락수막염 바이러스 (LCMV) (SEQ ID NO: 75), 인플루엔자 A 가금 흑사병 바이러스 (FPV) (SEQ ID NO: 76), 로스강 알파바이러스 (RRV) (SEQ ID NO: 77), 뮤린 백혈병 바이러스 10A1 (MLV) (SEQ ID NO: 78), 또는 에볼라 바이러스 (EboV) (SEQ ID NO: 79) 로부터의 막 당단백질로 치환될 수 있다. 이들 외피에 관한 서열은 본원의 서열 부분에서 확인된다.

[0316]

요약하면, 3-백터 시스템과 4-백터 시스템이 비교되고 다음과 같이 구축될 수 있다. 3-백터 렌티바이러스 벡터 시스템은 하기를 함유한다: 1. 헬퍼 플라스미드: HIV Gag, Pol, 인테그라아제, 및 Rev/Tat; 2. 외피 플라스미드: VSV-G/FUG 외피; 및 3. 치료적 벡터: RSV 5'LTR, Psi 패키징 신호, Gag 단편, RRE, Env 단편, cPPT, WPRE, 및 3'델타 LTR. 4-백터 렌티바이러스 벡터 시스템은 하기를 함유한다: 1. 헬퍼 플라스미드: HIV Gag, Pol, 및 인테그라아제; 2. Rev 플라스미드: Rev; 3. 외피 플라스미드: VSV-G/FUG 외피; 및 4. 치료적 벡터: RSV 5'LTR, Psi 패키징 신호, Gag 단편, RRE, Env 단편, cPPT, WPRE, 및 3'델타 LTR. 상기 요소에 상응하는 서열은 본원의 서열 목록 부분에서 확인된다.

[0317]

실시예 2: 항-HIV 렌티바이러스 벡터의 개발

[0318]

이 실시예의 목적은 항-HIV 렌티바이러스 벡터를 개발하는 것이었다.

[0319]

저해성 RNA 디자인. 인류 케모카인 C-C 모티프 수용체 5 (CCR5) (GC03P046377) mRNA 의 서열을 사용하여 인간 세포에서 CCR5 수준을 녹다운시키는 잠재적 siRNA 또는 shRNA 후보물에 대해 검색했다. 잠재적 RNA 간

섭 서열을 예컨대 Broad Institute 로부터의 siRNA 또는 shRNA 디자인 프로그램 또는 Thermo Scientific 로부터의 BLOCK-iT RNAi 디자이너에 의해 선별된 후보물로부터 선택했다. shRNA 서열로부터 선별된 개체를 렌티 바이러스 벡터 내로 shRNA 발현을 조절하기 위해 RNA 폴리머라아제 III 프로모터 예컨대 H1, U6, 또는 7SK 의 바로 3' 에 삽입했다. 이들 렌티바이러스-shRNA 구축물을 사용하여 세포를 형질도입하고 특이적 mRNA 수준의 변화를 측정했다. mRNA 수준을 감소시키는데 가장 강력한 shRNA 를 CMV 또는 EF-1알과 RNA 폴리머라아제 II 프로모터에 의한 발현을 허용하기 위해 microRNA 백본 내에 개별적으로 내포시켰다. microRNA 백본을 mirbase.org 로부터 선별했다. RNA 서열을 또한 합성 siRNA 올리고뉴클레오티드로서 합성하고, 렌티바이러스 벡터를 사용하지 않고 세포 내로 직접 도입했다.

[0320] 인간 면역결핍 바이러스 유형 1 (HIV-1 85US_BaL, 수탁 번호 AY713409) 의 BaI 균주의 게놈 서열을 사용하여 인간 세포에서 HIV 복제 수준을 낮추는 잠재적 siRNA 또는 shRNA 후보물에 대해 검색했다. 서열 상동성 및 실험에 기초하여, 검색은 HIV 의 Tat 및 Vif 유전자의 영역에 초점을 맞추었지만, 당업자는 이들 영역의 사용이 비-제한적이고 기타 잠재적 표적이 선별될 수 있다는 것을 이해할 것이다. 중요하게, Gag 또는 폴리머라아제 유전자의 고도로 보존된 영역은 shRNA 에 의해 표적화될 수 없었으며, 그 이유는 이들 동일한 서열이 벡터 제조에 필요한 패키징 시스템 보완 플라스미드에 존재했기 때문이다. CCR5 (NM 000579.3, NM 001100168.1-특이적) RNAs 와 같이, 잠재적 HIV-특이적 RNA 간섭 서열을 예컨대 Broad Institute (broadinstitute.org/mai/public) 에 의해 관리되는 Gene-E 소프트웨어 묶음으로부터의 siRNA 또는 shRNA 디자인 프로그램 또는 Thermo Scientific (rnadesigner.thermofisher.com/rnaiexpress/setOption.do?designOption=shrna&pid=6712627360706061801) 로부터의 BLOCK-iT RNAi 디자이너에 의해 선별된 후보물로부터 선택했다. 개별 선별된 shRNA 서열을 렌티 바이러스 벡터 내로 shRNA 발현을 조절하기 위해서 RNA 폴리머라아제 III 프로모터 예컨대 H1, U6, 또는 7SK 의 바로 3' 에 삽입했다. 이들 렌티바이러스-shRNA 구축물을 사용하여 세포를 형질도입하고 특이적 mRNA 수준의 변화를 측정했다. mRNA 수준을 감소시키는데 가장 강력한 shRNA 를 CMV 또는 EF-1알과 RNA 폴리머라아제 II 프로모터에 의한 발현을 허용하기 위해 microRNA 백본 내에 개별적으로 내포시켰다.

[0321] 벡터 구축. CCR5, Tat 또는 Vif shRNA 에 관해, BamHI 및 EcoRI 제한 자리를 함유하는 올리고뉴클레오티드 서열을 Eurofins MWG Operon, LLC 에 의해 합성했다. 오버랩 센스 및 안티센스 올리고뉴클레오티드 서열을 혼합하고, 70 °C 로부터 실온으로 냉각 동안 어닐링했다. 렌티바이러스 벡터를 제한 효소 BamHI 및 EcoRI 로 1 시간 동안 37 °C 에서 소화시켰다. 소화된 렌티바이러스 벡터를 아가로스 겔 전기영동에 의해 정제하고, Invitrogen 으로부터의 DNA 겔 추출 키트를 사용하여 추출했다. DNA 농도를 확인하고, 벡터 대 올리고 (3:1 비) 를 혼합하고, 어닐링되게 하고, 결합시켰다. 결합 반응을 T4 DNA 리가아제로 30 분 동안 실온에서 수행했다. 2.5 µl 의 결합 믹스를 25 µl 의 STBL3 적격 박테리아 세포에 첨가했다. 42 °C 에서 열 충격에 의해 형질전환을 달성했다. 박테리아 세포를 암피실린을 함유하는 아가 플레이트 상에 바르고, 약물-저항성 콜로니 (암피실린-내성 플라스미드의 존재를 나타냄) 를 회수하고, 정제하고, LB 브로쓰에서 증식시켰다. 올리고 서열의 삽입을 점검하기 위해서, 플라스미드 DNA 를 수확된 박테리아 배양물로부터 Invitrogen DNA 미니 프랩 키트를 사용하여 추출했다. 렌티바이러스 벡터 내 shRNA 서열의 삽입을 shRNA 발현을 조절하는데 사용되는 프로모터에 대한 특이적 프라이머를 사용하여 DNA 서열분석에 의해 확인했다. HIV 복제를 제한하기 위해 확인된 예시적 벡터 서열이 도 6 에 제시되어 있다. 예를 들어, CCR5, Tat 또는 Vif 유전자 발현에 최고 활성을 갖는 shRNA 서열을 그 후 microRNA (miR) 클러스터 내로 EF-1알과 프로모터의 제어 하에 조립했다. 프로모터 및 miR 서열이 도 6 에 제시되어 있다.

[0322] 추가로, 및 표준 분자 생물학 기술 (예를 들어, Sambrook; Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 4th Ed.) 뿐만 아니라 본원에 기재된 기술을 사용하여, 일련의 렌티바이러스 벡터를 본원의 도 7 에 도시된 바와 같이 개발했다.

[0323] 벡터 1 을 개발했고, 왼쪽으로부터 오른쪽으로, 하기를 함유한다: 장 말단 리피트 (LTR) 부분 (SEQ ID NO: 35); H1 요소 (SEQ ID NO: 101); shCCR5 (SEQ ID NOS: 16, 18, 20, 22, 또는 24); 우드척 간염 바이러스의 전사후 조절 요소 (WPPE) (SEQ ID NOS: 32, 80); 및 장 말단 리피트 부분 (SEQ ID NO: 102).

[0324] 벡터 2 를 개발했고, 왼쪽으로부터 오른쪽으로, 하기를 함유한다: 장 말단 리피트 (LTR) 부분 (SEQ ID NO: 35); H1 요소 (SEQ ID NO: 101); shRev/Tat (SEQ ID NO: 10); H1 요소 (SEQ ID NO: 101); shCCR5 (SEQ ID NOS: 16, 18, 20, 22, 또는 24); 우드척 간염 바이러스의 전사후 조절 요소 (WPPE) (SEQ ID NOS: 32, 80); 및 장 말단 리피트 부분 (SEQ ID NO: 102).

- [0325] 벡터 3 을 개발했고, 왼쪽으로부터 오른쪽으로, 하기를 함유한다: 장 말단 리피트 (LTR) 부분 (SEQ ID NO: 35); H1 요소 (SEQ ID NO: 101); shGag (SEQ ID NO: 12); H1 요소 (SEQ ID NO: 101); shCCR5 (SEQ ID NOS: 16, 18, 20, 22, 또는 24); 우드척 간염 바이러스의 전사후 조절 요소 (WPRE) (SEQ ID NOS: 32, 80); 및 장 말단 리피트 부분 (SEQ ID NO: 102).
- [0326] 벡터 4 를 개발했고, 왼쪽으로부터 오른쪽으로, 하기를 함유한다: 장 말단 리피트 (LTR) 부분 (SEQ ID NO: 35); 7SK 요소 (SEQ ID NO: 103); shRev/Tat (SEQ ID NO: 10); H1 요소 (SEQ ID NO: 101); shCCR5 (SEQ ID NOS: 16, 18, 20, 22, 또는 24); 우드척 간염 바이러스의 전사후 조절 요소 (WPRE) (SEQ ID NOS: 32, 80); 및 장 말단 리피트 부분 (SEQ ID NO: 102).
- [0327] 벡터 5 를 개발했고, 왼쪽으로부터 오른쪽으로, 하기를 함유한다: 장 말단 리피트 (LTR) 부분 (SEQ ID NO: 35); EF1 요소 (SEQ ID NO: 4); miR30CCR5 (SEQ ID NO: 1); MiR21Vif (SEQ ID NO: 2); miR185Tat (SEQ ID NO: 3); 우드척 간염 바이러스의 전사후 조절 요소 (WPRE) (SEQ ID NOS: 32, 80); 및 장 말단 리피트 부분 (SEQ ID NO: 102).
- [0328] 벡터 6 을 개발했고, 왼쪽으로부터 오른쪽으로, 하기를 함유한다: 장 말단 리피트 (LTR) 부분 (SEQ ID NO: 35); EF1 요소 (SEQ ID NO: 4); miR30CCR5 (SEQ ID NO: 1); MiR21Vif (SEQ ID NO: 2); miR155Tat (SEQ ID NO: 104); 우드척 간염 바이러스의 전사후 조절 요소 (WPRE) (SEQ ID NOS: 32, 80); 및 장 말단 리피트 부분 (SEQ ID NO: 102).
- [0329] 벡터 7 을 개발했고, 왼쪽으로부터 오른쪽으로, 하기를 함유한다: 장 말단 리피트 (LTR) 부분 (SEQ ID NO: 35); EF1 요소 (SEQ ID NO: 4); miR30CCR5 (SEQ ID NO: 1); MiR21Vif (SEQ ID NO: 2); miR185Tat (SEQ ID NO: 3); 우드척 간염 바이러스의 전사후 조절 요소 (WPRE) (SEQ ID NOS: 32, 80); 및 장 말단 리피트 부분 (SEQ ID NO: 102).
- [0330] 벡터 8 을 개발했고, 왼쪽으로부터 오른쪽으로, 하기를 함유한다: 장 말단 리피트 (LTR) 부분 (SEQ ID NO: 35); EF1 요소 (SEQ ID NO: 4); miR30CCR5 (SEQ ID NO: 1); MiR21Vif (SEQ ID NO: 2); miR185Tat (SEQ ID NO: 3); 및 장 말단 리피트 부분 (SEQ ID NO: 102).
- [0331] 벡터 9 를 개발했고, 왼쪽으로부터 오른쪽으로, 하기를 함유한다: 장 말단 리피트 (LTR) 부분 (SEQ ID NO: 35); CD4 요소 (SEQ ID NO: 30); miR30CCR5 (SEQ ID NO: 1); MiR21Vif (SEQ ID NO: 2); miR185Tat (SEQ ID NO: 3); 우드척 간염 바이러스의 전사후 조절 요소 (WPRE) (SEQ ID NOS: 32, 80); 및 장 말단 리피트 부분 (SEQ ID NO: 102).
- [0332] *벡터의 개발*
- [0333] 이들 실험을 위해 개발된 모든 벡터가 반드시 계획된 대로 기능하지는 않았다는 점에 유의해야 한다. 더욱 구체적으로, HIV 에 대항하는 렌티바이러스 벡터는 하기 세 가지 주요 성분을 포함할 것이다: 1) 초기 바이러스 부착 및 침투를 차단하는 표적 세포 표면 상의 HIV 결합 단백질 (수용체) 의 수준을 감소시키는 저해성 RNA; 2) 바이러스 Tat 단백질을 봉쇄하고 바이러스 유전자 발현을 원격활성화 (transactivate) 시키는 그것의 능력을 감소시키는 HIV TAR 서열의 과발현; 및 3) HIV 게놈 내의 중요한 보존된 서열을 공격하는 저해성 RNA.
- [0334] 상기 첫번째 포인트와 관련하여, 핵심 세포 표면 HIV 결합 단백질은 케모카인 수용체 CCR5 이다. HIV 입자는 CD4 및 CCR5 세포 표면 단백질에 대한 결합에 의해 감수성 T 세포에 부착한다. CD4 는 T 세포의 면역학적 기능에 중요한 세포 표면 상의 본질적 당단백질이기에 때문에, 이는 그것의 발현 수준을 조작하기 위한 표적으로서 선택되지 않았다. 그러나, CCR5 유전자 내 삭제 돌연변이에 대해 동형접합성으로 태어나고 수용체 발현을 완전히 결여하는 사람들은, 몇몇 감염성 질환에 대한 향상된 취약성 및 드문 자가면역력을 발달시킬 가능성을 제외하고는 정상적인 삶을 영위한다. 이 실시예에서 안전성이 향상되며, 그 이유는 총 신체 CD4+ T 세포 중 비교적 적은 수가 유전적으로 변형되어 CCR5 발현이 감소되었고, 병원체 면역력 또는 자가면역력의 제어에 필요한 CD4+ T 세포는 아마도 변형된 세포 중에 있을 것 같지 않기 때문이다. 따라서, CCR5 의 조정은 비교적 안전한 접근법인 것으로 확인되었고, 항-HIV 렌티바이러스 벡터의 개발에서 일차 표적이었다.
- [0335] 상기 두번째 포인트와 관련하여, 바이러스 TAR 서열은 바이러스 Tat 단백질에 단단히 결합하는 HIV 게놈 RNA 의 고도로 구조화된 영역이다. Tat:TAR 복합체는 바이러스 RNA 의 효율적 생성에 중요하다. TAR 영역의 과발현은 Tat 단백질을 봉쇄하고 바이러스 RNA 의 수준을 감소시키는 데코이 분자로서 구상되었다. 그러나, TAR 은 렌티바이러스 입자를 제조하는데 사용되는 세포를 포함하는 대부분의 포유류 세포에 독성인 것으로 증명

되었다. 추가로, TAR 은 다른 실험실에서 바이러스 유전자 발현을 저해하는데 비효율적이었고, HIV 유전자 요법에서 실행가능한 성분으로서 폐기되었다.

[0336] 상기 세번째 포인트와 관련하여, 바이러스 유전자 서열은 다음의 3 가지 기준을 충족하는 것으로 확인되었다: i) 서열이 관심 대상의 지리학적 영역에서 전염병을 대표하는 다양한 HIV 단리물에 걸쳐 상당히 보존됨; ii) 바이러스 벡터에서의 저해성 RNA 의 활성으로 인한 RNA 수준 감소가, 상응하는 단백질 수준을 HIV 복제를 의미있게 감소시키기에 충분한 양까지 감소시킬 것임; 및 iii) 저해성 RNA 에 의해 표적화된 바이러스 유전자 서열(들)은 제조 동안 패키징 및 바이러스 벡터 입자 어셈블링에 요구되는 유전자에 존재하지 않는다. 바이러스 입자 자체의 효과적인 기능에 필요한 유전자를 표적화하는 저해성 RNA 를 갖는 것이 완전히 불리할 수 있으므로, 마지막 포인트가 중요하다. 본 구현예에서, HIV Tat 및 Rev 유전자의 접합부에서의 서열 및 HIV Vif 유전자 내의 제 2 서열은 저해성 RNA 에 의해 표적화되었다. 이러한 영역이 HIV 게놈에서의 외피 유전자와 오버랩되므로, Tat/Rev 표적화는 HIV 외피 당단백질 발현을 감소시키는 추가적인 이득을 갖는다.

[0337] 벡터 개발을 위한 전략 및 시험은 먼저 적합한 표적 (본원에서 기재한 바와 같음) 을 식별한 후, 세포 모델에서의 시험을 위한 개별적 또는 다수의 저해성 RNA 종류를 발현하는 플라스미드 DNA 를 구축하고, 마지막으로 증명된 항-HIV 기능을 갖는 저해성 RNA 를 포함하는 렌티바이러스 벡터를 구축하는 것에 의존한다. 렌티바이러스 벡터를 독성, 시험관내 생산 동안의 수율, 및 CCR5 발현 수준 감소 또는 바이러스 복제를 저해하기 위한 바이러스 유전자 생성물 저하 면에 있어서 HIV 에 대한 유효성에 대해 시험한다.

[0338] 하기 표 2 는 임상적 후보물에 이르기까지 저해성 구축물의 다수 형태를 통한 진전을 입증한다. 처음에, shRNA (짧은 상동 RNA) 분자를 디자인하고 플라스미드 DNA 구축물로부터 발현시켰다.

[0339] 하기 표 2 에서 상세히 나타낸 바와 같은 플라스미드 1-4 를, HIV 의 Gag, Pol 및 RT 유전자에 대한 shRNA 서열을 시험하였다. 각각의 shRNA 가 세포 모델에서 바이러스 단백질 발현을 억제하기 위해 활성이었으나, 추가의 개발을 방지한 2 가지 중요한 문제점이 존재하였다. 먼저, 서열이 현재 북미 및 유럽에서 유포되고 있는 클레이드 B HIV 균주를 대표하지 않는 HIV 의 실험실 단리물에 대해 표적화되었다. 두 번째로, 이들 shRNA 가 렌티바이러스 벡터 패키징 시스템에서의 중요한 구성성분들을 표적화하였으며 제조 동안 벡터 수율을 심각하게 감소시켰다. 표 2 에서 상세히 나타낸 바와 같은 플라스미드 5 를, CCR5 를 표적화하기 위해 선택하고 리드 (lead) 후보물 서열을 제공하였다. 표 2 에서 상세히 나타낸 바와 같은 플라스미드 6, 7, 8, 9, 10 및 11 는 TAR 서열을 통합하였으며, 렌티바이러스 벡터 제조에 사용한 세포를 포함하는 포유류 세포에 대해 허용가능하지 않은 독성을 생성하는 것이 발견되었다. 표 2 에서 상세히 나타낸 바와 같은 플라스미드 2 는 Tat RNA 발현을 감소시킬 수 있는 리드 shRNA 서열을 식별하였다. 표 2 에서 상세히 나타낸 바와 같은 플라스미드 12 는 렌티바이러스 벡터에서 microRNA (miR) 로서 발현된 shCCR5 의 유효성을 입증하였으며 이것이 최종 생성물에 있어야 한다는 것을 확인시켰다. 표 2 에서 상세히 나타낸 바와 같은 플라스미드 13 은 렌티바이러스 벡터에서 microRNA (miR) 로서 발현된 shVif 의 유효성을 입증하였으며 이것이 최종 생성물에 있어야 한다는 것을 확인시켰다. 표 2 에서 상세히 나타낸 바와 같은 플라스미드 14 는 렌티바이러스 벡터에서 microRNA (miR) 로서 발현된 shTat 의 유효성을 입증하였으며 이것이 최종 생성물에 있어야 한다는 것을 확인시켰다. 표 2 에서 상세히 나타낸 바와 같은 플라스미드 15 는 단일 프로모터로부터 발현된 miR 클러스터의 형태로 miR CCR5, miR Tat 및 miR Vif 를 포함하였다. 이들 miR 은 렌티바이러스 벡터 패키징 시스템에서의 중요한 구성성분들을 표적화하지 않으며 포유류 세포에 대해 무시해도 될 정도의 독성을 갖는 것으로 증명되었다. 클러스터 내의 miR 은 이전에 시험한 개별적인 miR 과 동등하게 효과적이었으며, 전체 영향은 CCR5-향성 HIV BaL 균주 복제에서의 실질적 감소였다.

[0340] 표 2: HIV 벡터의 개발

	내부 코드	물질	설명	언급	결정
1	SIH-H1-shRT-1,3	렌티바이러스 벡터	LAI 균주의 RT 에 대한 shRNA 구축물	잘못된 표적, 실험실 바이러스, 무-바이러스 시험	포기
2	SIH-H1-shRT43	렌티바이러스 벡터	H1 프로모터 shRNA	Tat 단백질 녹다운 >90%	리드

[0341]

	(Tat/Rev NL4-3)		Tat/Rev 오버랩		
<p><i>벡터 구축:</i> Rev/Tat (RT) shRNA 에 대해, BamHI 및 EcoRI 제한 자리를 포함하는 올리고뉴클레오티드 서열을 MWG Operon 에 의해 합성하였다. 2 개 상이한 Rev/Tat 표적 서열을, Tat mRNA 발현을 감소시키는 그의 능력에 대해 시험하였다. RT1,3 표적 서열은 (5'-ATGGCAGGAAGAAGCGGAG-3') (SEQ ID NO: 89) 이고 shRNA 서열은 (5'-ATGGCAGGAAGAAGCGGAGTTCAAGAGACTCCGCTTCTTCCTGCCATTTTTT-3') (SEQ ID NO: 90) 이다. RT43 서열은 (5'-GCGGAGACAGCGACGAAGAGC-3') (SEQ ID NO: 9) 이고 shRNA 서열은 (5'-GCGGAGACAGCGACGAAGAGCTTCAAGAGAGCTTTCGTCGCTGTCTCCGCTTTTT-3') (SEQ ID NO: 10) 이다. 올리고뉴클레오티드 서열을 pSIH 렌티바이러스 벡터 (System Biosciences) 에 삽입하였다.</p> <p><i>Rev/Tat 에 대한 shRNA 의 기능적 시험:</i> Tat 발현을 감소시키는 벡터의 능력을, 3'-UTR (mRNA 의 미번역 영역) 에 삽입된 Rev/Tat 표적 서열을 포함한 루시페라아제 리포터 플라스미드를 사용하여 시험하였다. shRT1,3 또는 shRT43 플라스미드를 루시페라아제 및 Rev/Tar 표적 서열을 포함하는 플라스미드로 동시-트랜스펙션하였다. shRT43 shRNA 서열의 강한 기능을 나타내는 광 방사에 있어서 90% 감소가 있었으나 shRT1,3 플라스미드로는 10% 미만이었다.</p> <p><i>결론:</i> SIH-H1-shRT43 은 루시페라아제 어세이 시스템에서의 mRNA 수준 감소 면에 있어서 SIH-H1-shRT-1,3 보다 우수하였다. 이는 shRT43 서열의 강력한 저해 활성을 나타내고, 추가 개발을 위한 리드 후보물로서 선택되었다.</p>					
3	SIH-H1-shGag-1	렌티바이러스 벡터	LAI Gag 에 대한 shRNA 구축물	Gag 발현을 저해하나 패키징을 저해할 것임	포기
<p><i>벡터 구축:</i> Gag shRNA 에 대해, BamHI 및 EcoRI 제한 자리를 포함하는 올리고뉴클레오티드 서열을 MWG Operon 에 의해 합성하였다. Gag 표적 서열을, Gag mRNA 발현을 감소시키는 그의 능력에 대해 시험하였다. Gag 표적 서열은 (5'-</p>					

[0342]

<p>GAAGAAATGATGACAGCAT -3') (SEQ ID NO: 11) 이고 shRNA 서열은 (5'-GAAGAAATGATGACAGCATTTC AAGAGAATGCTGTCATCATTCTCTTTT-3') (SEQ ID NO: 12) 이다. 올리고뉴클레오티드 서열을 pSIH 렌티바이러스 벡터 (System Biosciences) 에 삽입하였다.</p> <p><i>Gag</i> 에 대한 shRNA 의 기능적 시험: Gag 발현을 감소시키는 벡터의 능력을, 3'-UTR (mRNA 의 미번역 영역) 에 삽입된 Gag 표적 서열을 포함한 루시페라아제 리포터 플라스미드를 사용하여 시험하였다. Gag 플라스미드를 루시페라아제 및 Gag 표적 서열을 포함하는 플라스미드로 동시-트랜스펙션하였다. shGag shRNA 서열의 강한 효과를 나타내는 광 방사에 있어서 거의 90% 감소가 있었다.</p> <p>결론: 이러한 shRNA 서열은 HIV Gag 발현에 대하여 강력하지만 포기되었다. 렌티바이러스 패키징 시스템은 헬퍼 플라스미드로부터의 Gag 의 생산을 필요로 하며 Gag 의 shRNA 저해는 렌티바이러스 벡터 수율을 감소시킬 것이다. 이러한 shRNA 서열은 HIV 의 올리고뉴클레오티드 저해제로서 사용될 수 있거나, 상이한 벡터 계통을 사용하거나 이러한 shRNA 에 의한 저해에 저항하기 위해 변형되는 대안적 바이러스 벡터 패키징 시스템에 통합될 수 있다.</p>					
4	SIH-H1-shPol-1	렌티바이러스 벡터	Pol 에 대한 shRNA 구축물	Pol 발현을 저해하나 패키징을 저해할 것임	포기
<p><i>벡터 구축</i>: Pol shRNA 를, MWG Operon 에 의해 합성된 BamHI 및 EcoRI 제한 자리를 포함하는 올리고뉴클레오티드 서열로 구축하였다. Pol 표적 서열을, Pol mRNA 발현을 감소시키는 그의 능력에 대해 시험하였다. Pol 표적 서열은 (5'-CAGGAGCAGATGATACAG -3') (SEQ ID NO: 13) 이고 shRNA 서열은 (5'-CAGGAGATGATACAGTTCAAGAGACTGTATCATCTGCTCCTGTTTTT-3') (SEQ ID NO: 14) 이다. 올리고뉴클레오티드 서열을 pSIH 렌티바이러스 벡터 (System Biosciences) 에 삽입하였다.</p> <p><i>HIV Pol 에 대한 shRNA 의 기능적 시험</i>: Pol 발현을 감소시키는 벡터의 능력을, 3'-UTR</p>					

[0343]

(mRNA 의 미번역 영역) 에 삽입된 Pol 표적 서열을 포함한 루시페라아제 리포터 플라스미드를 사용하여 시험하였다. Pol 플라스미드를 루시페라아제 및 Pol 표적 서열을 포함하는 플라스미드로 동시-트랜스펙션하였다. shPol shRNA 서열의 강한 효과를 나타내는 광 방사에 있어서 60% 감소가 있었다.

결론: 이러한 shRNA 서열은 HIV Pol 발현에 대하여 강력하지만 포기되었다. 렌티바이러스 패키징 시스템은 헬퍼 플라스미드로부터의 Pol 의 생산을 필요로 하며 Pol 의 shRNA 저해는 렌티바이러스 벡터 수율을 감소시킬 것이다. 이러한 shRNA 서열은 HIV 의 올리고뉴클레오티드 저해제로서 사용될 수 있거나, 상이한 벡터 계통을 사용하거나 이러한 shRNA 에 의한 저해에 저항하기 위해 변형되는 대안적 바이러스 벡터 패키징 시스템에 통합될 수 있다.

5	SIH-HI-shCCR5-1	렌티바이러스 벡터	CCR5 에 대한 shRNA 구축물	5 개 후보물 중 최상, 세포외 CCR5 단백질 감소 >90%	리드
---	-----------------	-----------	---------------------	------------------------------------	----

벡터 구축: CCR5 shRNA 를, MWG Operon 에 의해 합성된 BamHI 및 EcoRI 제한 자리를 포함하는 올리고뉴클레오티드 서열로 구축하였다. 올리고뉴클레오티드 서열을 pSIH 렌티바이러스 벡터 (System Biosciences) 에 삽입하였다. CCR5 유전자 서열 1 (SEQ ID NO: 25) 에 초점을 맞추는 CCR5 표적 서열 #1 은 (5'-GTGTCAAGTCCAATCTATG-3') (SEQ ID NO: 15) 이고 shRNA 서열은 (5'-GTGTCAAGTCCAATCTATGTTCAAGAGACATAGATTGGACTTGACACTTTTT-3') (SEQ ID NO: 16) 이다. CCR5 유전자 서열 2 (SEQ ID NO: 26) 에 초점을 맞추는 CCR5 표적 서열 #2 는 (5'-GAGCATGACTGACATCTAC-3') (SEQ ID NO: 17) 이고 shRNA 서열은 (5'-GAGCATGACTGACATCTACTTCAAGAGAGTAGATGTCAGTCATGCTCTTTTT-3') (SEQ ID NO: 18) 이다. CCR5 유전자 서열 3 (SEQ ID NO: 27) 에 초점을 맞추는 CCR5 표적 서열 #3 은 (5'-GTAGCTCTAACAGGTTGGA-3') (SEQ ID NO: 19) 이고 shRNA 서열은 (5'-GTAGCTCTAACAGGTTGGATTCAAGAGATCCAACCTGTTAGAGCTACTTTTT-3')

[0344]

(SEQ ID NO: 20) 이다. CCR5 유전자 서열 4 (SEQ ID NO: 28) 에 초점을 맞추는 CCR5 표적 서열 #4 는 (5'-GTTTCAGAAACTACCTCTTA-3') (SEQ ID NO: 21) 이고 shRNA 서열은 (5'-GTTTCAGAAACTACCTCTTATTCAAGAGATAAGAGGTAGTTTCTGAACTTTTT-3') (SEQ ID NO: 22) 이다. CCR5 유전자 서열 5 (SEQ ID NO: 29) 에 초점을 맞추는 CCR5 표적 서열 #5 는 (5'-GAGCAAGCTCAGTTTACACC-3') (SEQ ID NO: 23) 이고 shRNA 서열은 (5'-GAGCAAGCTCAGTTTACACCTTCAAGAGAGGTGTAAACTGAGCTTGCTCTTTTT-3') (SEQ ID NO: 24) 이다.

CCR5 에 대한 shRNA 의 기능적 시험: CCR5 RNA 발현을 녹다운시키는 CCR5 shRNA 서열의 능력을, 인간 CCR5 유전자를 발현하는 플라스미드와 5 개 CCR5 표적 서열 중 1 개를 포함하는 각각의 플라스미드에 대한 별개 실험에서, 각각의 렌티바이러스 플라스미드를 동시-트랜스펙션시킴으로써 초기에 시험하였다. 그런 다음, CCR5 mRNA 발현을 CCR5-특이적 프라이머를 사용하여 qPCR 분석에 의해 평가하였다.

결론: CCR5 mRNA 수준 감소를 기반으로 하여 shRNACCR5-1 은 CCR5 유전자 발현을 감소시키기 위해 가장 강력하였다. 이러한 shRNA 를 리드 후보물로서 선택하였다.

6	SIH-U6-TAR	렌티바이러스 벡터	U6 프로모터-TAR	세포에 독성	포기
7	SIH-U6-TAR-H1-shCCR5	렌티바이러스 벡터	U6 프로모터-TAR-H1-shCCR5	세포에 독성	포기
8	U6-TAR-H1-shRT	렌티바이러스 벡터	U6 프로모터-TAR-H1-RT	HIV 를 억제, 세포에 독성, 불량한 패키징	포기
9	U6-TAR-7SK-shRT	렌티바이러스 벡터	shRNA 프로모터를 7SK 로 변화	독성, 불량한 패키징	포기

[0345]

10	U6-TAR-H1-shRT-H1-shCCR5	렌티바이러스 벡터	U6 프로모터-TAR-H1-RT-H1-shCCR5	독성, 불량한 패키징, H1 반복물	포기
11	U6-TAR-7SK-shRT-H1-CCR5	렌티바이러스 벡터	shRNA 프로모터를 7SK 로 변화	독성, 불량한 패키징	포기

벡터 구축: 측면위치 KpnI 제한 자리를 포함하는 TAR 테코이 서열을, MWG Operon 에 의해 합성하고 KpnI 자리에서 pSIH 렌티바이러스 벡터 (System Biosciences) 에 삽입하였다. 이러한 벡터에서, TAR 발현은 U6 프로모터에 의해 조절된다. TAR 테코이 서열은 (5'-

CTTGCAATGATGTCGTAATTTGCGTCTTACCTCGTTCTCGACAGCGACCAGATCTGAGCCTGGGAGCTCTCTGGCTGTCAGTAAGCTGGTACAGAAGTTGACGAAAATCTTACTGAGCAAGAAA-3') (SEQ ID NO: 8) 이다. TAR 테코이 서열의 발현을 TAR 서열에 대한 특이적 프라이머를 사용하여 qPCR 분석에 의해 측정하였다. TAR 서열을 또한 포함하는 추가적인 벡터를 구축하였다. H1 프로모터 및 shRT 서열을 XhoI 자리에서 이 벡터에 삽입하였다. H1 shRT 서열은 (5'-

GAACGCTGACGTCATCAACCCGCTCCAAGGAATCGCGGGCCAGTGTCACTAGGCGGGAACACCCAGCGCGCGTGCGCCCTGGCAGGAAGATGGCTGTGAGGGACAGGGAGTGCGGCCCTGCAATATTTGCATGTCGCTATGTGTTCTGGGAAATCACCATAAACGTGAAATGTCTTTGGATTTGGGAATCTTATAAGTTCTGTATGAGACCACTTGGATCCGCGGAGACAGCGACGAAGAGCTTCAAGAGAGCTCTTCGTCGCTGTCTCCGCTTTT-3') (SEQ ID NO: 91) 이다. 이러한 벡터는 TAR 및 녹다운 RT 를 발현할 수 있었다. shRT 발현을 조절하기 위해 H1 프로모터 대신 7SK 프로모터를 또한 사용하였다. U6 TAR, H1 shRT 및 H1 shCCR5 를 포함하는 또다른 벡터를 구축하였다. H1 shCCR5 서열을, U6 TAR 및 H1 shRT 를 포함하는 플라스미드의 SpeI 자리에 삽입하였다. H1 CCR5 서열은 (5'-

GAACGCTGACGTCATCAACCCGCTCCAAGGAATCGCGGGCCAGTGTCACTAGGCGGGAACACCCAGCGCGCGTGCGCCCTGGCAGGAAGATGGCTGTGAGGGACAGGGAGTGCGGCCCTGCAATATTTGCATGTCGCTATGTGTTCTGGGAAATCACCATAAACGTGAAATGTCTTTGGATTTGGGAATCTTATAAGTTCTGTATGAGACCACTTGGAT

[0346]

CCGTGTCAAGTCCAATCTATGTTCAAGAGACATAGATTGGACTTGACACTTTTT-3') (SEQ ID NO: 92) 이다. shRT 발현을 조절하기 위해 H1 프로모터 대신 7SK 프로모터를 또한 사용하였다.

TAR 테코이 활성의 기능적 시험: 패키징 효율에 대한 SIH-U6-TAR 의 영향을 시험하였다. TAR 서열이 포함된 경우, SIH 패키징 시스템에서의 벡터의 수율은 실질적으로 감소되었다.

결론: TAR 테코이 서열을 발현하는 렌티바이러스 벡터는 낮은 벡터 수율로 인해 상업적 개발을 위해서는 적합하지 않다. 이들 구축물은 포기되었다.

12	shCCR5	렌티바이러스 벡터	microRNA 서열	세포외 CCR5 단백질 감소 >90%	리드
----	--------	-----------	-------------	----------------------	----

벡터 구축: CCR5 microRNA 를, MWG Operon 에 의해 합성된 BsrGI 및 NotI 제한 자리를 포함하는 올리고뉴클레오티드 서열로 구축하였다. 올리고뉴클레오티드 서열을 pCDH 렌티바이러스 벡터 (System Biosciences) 에 삽입하였다. 플라스미드 구축물 시험 물질 5 에서 사용한 CMV 프로모터 대신 EF-1 프로모터를 사용하였다. EF-1 프로모터를 측면위치 ClaI 및 BsrGI 제한 자리를 포함하는 MWG Operon 에 의해 합성하고, shCCR5-1 을 포함하는 pCDH 벡터에 삽입하였다. EF-1 프로모터 서열은 (5'-

```
CCGGTGCCTAGAGAAGGTGGCGCGGGGTAAACTGGGAAAGTGATGTCGTGTA
GCTCCGCCTTTTCCCGAGGGTGGGGGAGAACCGTATATAAGTGCAGTAGTCGCC
GTGAACGTTCTTTTTCGCAACGGGTTTGCCGCCAGAACACAGGTAAGTGCCGTGTG
TGGTTCGCGGGCCTGGCCTCTTACGGGTTATGGCCCTTGCCTGCCTTGAATTA
CTTCCACGCCCTGGCTGCAGTACGTGATTCTTGATCCCGAGCTTCGGGTTGGAAG
TGGGTGGGAGAGTTTCGAGGCCCTTGCCTTAAGGAGCCCTTCGCTCGTGCCTTGA
TTGAGGCCCTGGCCTGGGCGCTGGGGCCGCCGCGTGCGAATCTGGTGGCACCTTCG
CGCCTGTCTCGCTGCTTTCGATAAGTCTCTAGCCATTTAAAATTTTTGATGACCTGC
TGCGACGCTTTTTTCTGGCAAGATAGTCTTGTAAATGCGGGCCAAGATCTGCACA
CTGGTATTTTCGGTTTTTGGGGCCGCGGGCGGCGACGGGGCCCGTGCCTCCAGCGC
ACATGTTTCGGCGAGGCGGGCCTGCGAGCGCGGCCACCGAGAATCGGACGGGGG
```

[0347]

TAGTCTCAAGCTGGCCGCGCTGCTCTGGTGCCTGGCCTCGCGCCGCGTGTATCGC
 CCCGCCCTGGGCGCAAGGCTGGCCCGGTCCGGCACCAGTTGCGTGAGCGAAAGA
 TGGCCGCTTCCCGGCCCTGCTGCAGGGAGCTCAAAATGGAGGACGCGGCGCTCGG
 GAGAGCGGGCGGGTGAGTCACCCACACAAAGGAAAAGGGCCTTCCGTCCTCAGC
 CGTCGCTTCATGTGACTCCACGGAGTACCGGGCGCCGTCCAGGCACCTCGATTAGT
 TCTCGAGCTTTTGGAGTACGTCGCTTTTAGGTTGGGGGAGGGGTTTATGCGATG
 GAGTTTCCCCACACTGAGTGGGTGGAGACTGAAGTTAGGCCAGCTTGGCACTTGA
 TGTAAATTCTCCTTGAATTTGCCCTTTTTGAGTTTGGATCTTGGTTCATTCTCAAGC
 CTCAGACAGTGGTTCAAAGTTTTTTTCTTCCATTTCAAGGTGTCGTA-3') (SEQ ID
 NO: 4) 이다.

렌티바이러스 CDH-shCCR5-1 의 기능적 시험: CCR5 발현을 녹다운시키는 miR CCR5 서열의 능력을, CEM-CCR5 T 세포를 형질도입하고, CCR5 에 대한 형광-표지 모노클로날 항체로 염색 및 분석적 유세포 분석기에 의해 염색 세기 측정 후 (세포 표면 CCR5 분자의 수에 정비례함), 세포 표면 CCR5 발현을 측정함으로써 결정하였다. CCR5 를 표적화하기 위한 가장 효과적인 shRNA 서열은 CCR5 shRNA 서열 #1 이었다. 그러나, 합성 microRNA 서열을 구축하기 위한 가장 효과적인 CCR5 표적화 서열은 CCR5서열 #5와 오버랩되었고; 이러한 결론은 서열 정렬 및 miRNA 구축의 경험을 기반으로 하였다. 최종적으로, miR30 헤어핀 서열을 사용하여, (5'-

AGGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCGACTGTAAACTGAGCTTGCTCTACTGTGAAG
 CCACAGATGGGTAGAGCAAGCACAGTTTACCGCTGCCTACTGCCTCGGACTTCAA
 GGGG CTT-3') (SEQ ID NO: 1) 인 합성 miR30 CCR5 서열을 구축하였다. miR CCR5 표적 서열은 (5'-GAGCAAGCTCAGTTTACA-3') (SEQ ID NO: 5) 이다. 5 의 감염 다중도에서, 세포 당 통합된 렌티바이러스의 평균 1.25 개놈 카피가 생성되어, CCR5 발현 수준이 $\geq 90\%$ 로 감소되었는데, 렌티바이러스 벡터에서의 miR30CCR5 micro RNA 구축물에 의한 CCR5 mRNA 의 강력한 저해를 나타낸다.

결론: miR30CCR5 구축물은 CCR5 세포 표면 발현을 감소시키기 위해 강력하며 HIV 를 위한 치료적 렌티바이러스에 대한 리드 후보물이다.

[0348]

13	shVif	렌티바이러스 벡터	microRNA 서열	Vif 단백질 감소>80%	리드
<p><i>벡터 구축:</i> Vif microRNA 를, MWG Operon 에 의해 합성된 BsrGI 및 NotI 제한 자리를 포함하는 올리고뉴클레오티드 서열로 구축하였다. 올리고뉴클레오티드 서열을, EF-1 프로모터를 포함하는 pCDH 렌티바이러스 벡터 (System Biosciences) 에 삽입하였다. 서열 정렬 및 합성 miRNA 구축의 경험을 기반으로 하여, miR21 헤어핀 서열을 사용하여, (5'-CATCTCCATGGCTGTACCACCTTGTCGGGGGATGTGTACTTCTGAACTTGTGTTGATCTCATGGAGTTCAGAAGAACACATCCGCACTGACATTTTGGTATCTTTCATCTGACCA-3') (SEQ ID NO: 2) 인 합성 miR21 Vif 서열을 구축하였다. miR Vif 표적 서열은 (5'-GGGATGTGTACTTCTGAACTT-3') (SEQ ID NO: 6) 이다.</p> <p><i>miR21Vif 역가의 기능적 시험:</i> Vif 발현을 녹다운시키는 miR Vif 서열의 능력을, Vif 단백질을 식별하기 위해 항-Vif 모노클로날 항체를 사용하여 면역블롯 분석에 의해 Vif 단백질 발현을 측정함으로써 결정하였다.</p> <p><i>결론:</i> miR21Vif 는 면역블롯 데이터의 정량적 이미지 분석에 의해 측정된 바와 같이, ≥ 10-배로 Vif 단백질 발현을 감소시켰다. 이는 본 치료적 렌티바이러스에 대한 리드 후보물로서 miR21Vif 를 정당화시키기에 충분하였다.</p>					
14	shTat	렌티바이러스 벡터	microRNA 서열	Tat RNA 감소>80%	리드
<p><i>벡터 구축:</i> Tat microRNA 를, MWG Operon 에 의해 합성된 BsrGI 및 NotI 제한 자리를 포함하는 올리고뉴클레오티드 서열로 구축하였다. microRNA 클러스터를 EF-1 프로모터를 포함하는 pCDH 렌티바이러스 벡터 (System Biosciences) 에 삽입하였다. 서열 정렬 및 합성 miRNA 구축의 경험을 기반으로 하여, miR185 헤어핀 서열을, (5'-GGGCCTGGCTCGAGCAGGGGCGAGGGATTCCGCTTCTTCCTGCCATAGCGTGGTCCCCTCCCCTATGGCAGGCAGAAGCGGCACCTTCCCTCCCAATGACCGCGTCTTCGTCG-3') (SEQ ID NO: 3) 인 합성 miR185 Tat 서열을 구축하기 위해 선택하였다. miR Tat 표적 서열은 (5'-TCCGCTTCTTCCTGCCATAG-3') (SEQ ID NO: 7) 이다.</p>					

[0349]

miR185Tat 역가의 기능적 시험: Tat 발현을 녹다운시키는 miR Tat 의 능력을, Tat 특이적 프라이머를 사용하여 RT-PCR 분석에 의해 Tat mRNA 발현을 측정함으로써 결정하였다. Tat mRNA 의 상대적 수준을 감소시키는 것에 근거하여, miR185Tat 를 유사한 miR155Tat 와 비교하였다.

결론: miR185Tat 는 miR155Tat 와 비교하여 Tat mRNA 를 감소시키기 위해 대략 2 배 강력하였고, 본 치료적 렌티바이러스에 대한 리드 후보물질로서 선택되었다.

15	shCCR5-shVif-shTat	렌티바이러스 벡터	microRNA 클러스터 서열	CCR5 감소>90%, Vif 단백질 감소>80%, Tat RNA 감소>80%, HIV 복제의 >95% 저해	후보물질
----	--------------------	-----------	------------------	--	------

벡터 구축: miR30CCR5 miR21Vif miR185Tat microRNA 클러스터 서열을, MWG Operon 에 의해 합성된 BsrGI 및 NotI 제한 자리를 포함하는 합성 DNA 단편으로 구축하였다. DNA 단편을, EF-1 프로모터를 포함하는 pCDH 렌티바이러스 벡터 (System Biosciences) 에 삽입하였다. miR 클러스터 서열은 (5'-AGGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCGACTGTAAACTGAGCTTGCTCTACTGTGAAGCCACAGATGGGTAGAGCAAGCACAGTTTACCGCTGCCTACTGCCTCGGACTTCAAGGGGCTTCCCGGCATCTCCATGGCTGTACCACCTTGTCGGGGGATGTGTACTTCTGAACCTGTGTTGAATCTCATGGAGTTCAGAAGAACACATCCGCACTGACATTTTGGTATCTTTCATCTGACCAGCTAGCGGGCCTGGCTCGAGCAGGGGGCGAGGGATCCGCTTCTTCTGCCATAGCGTGGTCCCCTCCCCTATGGCAGGCAGAAGCGGCACCTTCCCTCCAATGACCGCTCTTCGTC-3') (SEQ ID NO: 31) 이며, 시험 물질 12, 시험 물질 13 및 시험 물질 14 를 EF-1 프로모터의 제어 하에 발현될 수 있는 단일 클러스터에 통합시킨다.

miR30CCR5, miR21Vif 및 *miR185Tat* 의 microRNA 클러스터를 포함하는 렌티바이러스

[0350]

백터 AGT103 역가의 기능적 시험: AGT103 백터를, 세포 표면 CCR5 발현 감소에 대한 어세이를 사용하여 CCR5에 대한 역가에 대해 시험하였다 (시험 물질 12). AGT103 백터를, 세포 표면 Vif 발현 감소에 대한 어세이를 사용하여 Vif에 대한 역가에 대해 시험하였다 (시험 물질 13). AGT103 백터를, 세포 표면 Tat 발현 감소에 대한 어세이를 사용하여 Tat에 대한 역가에 대해 시험하였다 (시험 물질 14).

결론: miRNA 클러스터에 의한 CCR5 발현 감소에 대한 역가는 miR30CCR5 단독에 대해 관찰된 역가와 유사하였다. miRNA 클러스터에 의한 Vif 발현 감소에 대한 역가는 miR21Vif 단독에 대해 관찰된 역가와 유사하였다. miRNA 클러스터에 의한 Tat 발현 감소에 대한 역가는 miR185Tat 단독에 대해 관찰된 역가와 유사하였다. miRNA 클러스터는 세포 표면 CCR5 수준을 감소시키고 2 개의 HIV 유전자를 저해하기 위해 강력하다. 따라서, 이러한 miRNA 클러스터를 포함하는 AGT103 을, 본 HIV 기능적 치유 프로그램에 대한 치료적 백터 구축물로서 선택하였다.

[0351]

[0352] **기능적 어세이.** CCR5, Tat 또는 Vif shRNA 서열을 포함하고 실험 목적을 위해 녹색 형광 단백질 (GFP) 을 CMV 즉시 초기 프로모터의 제어 하에 발현하며 AGT103/CMV-GFP 로 지정된 개별적인 렌티바이러스 백터를, CCR5, Tat 또는 Vif 발현을 녹다운시키는 그의 능력에 대해 시험하였다. 포유류 세포를 폴리브렌의 존재 하 또는 부재 하에 렌티바이러스 입자로 형질도입하였다. 세포를 2-4 일 후 수집하였고; 단백질 및 RNA 를 CCR5, Tat 또는 Vif 발현에 대해 분석하였다. 단백질 수준을 웨스턴 블롯 어세이에 의해, 또는 특이적 형광 항체 로의 세포 표지 (CCR5 어세이) 에 의해, 이후 CCR5-특이적 또는 동형 대조군 항체를 사용하여 변형된 및 비변형 된 세포 형광을 비교하는 분석적 유세포 분석법에 의해 시험하였다.

[0353] **렌티바이러스의 출발 시험.** T 세포 배양 배지를, 10% FBS 및 1% 페니실린-스트렙토마이신이 보충된 RPMI 1640 을 사용하여 제조하였다. IL2 10,000 유닛/ml, IL-12 1 µg/ml, IL-7 1 µg/ml, IL-15 1 µg/ml 의 사이토 카인 스톱을 또한 미리 제조하였다.

[0354] 렌티바이러스로의 형질도입 전에, 감염성 바이러스 역가를 측정하고, 적절한 감염 다중도 (MOI) 를 위한 바이러스 첨가량을 계산하는데 사용하였다.

[0355] **제 0-12 일: 항원-특이적 강화.** 제 0 일에, 동결보존된 PBMC 를 해동하고, 1200 rpm 에서 10 분 동안 10 ml 37°C 배지로 세척하고, 37°C 배지에서 2x10⁶/ml 의 농도로 재현탁하였다. 세포를 37°C 에서 5% CO₂ 에서 24-웰 플레이트에 0.5 ml/웰로 배양하였다. 최적 자극 조건을 규정하기 위해, 세포를 하기 표 3 에서 열거 한 바와 같은 시약의 조합으로 자극하였다:

[0356] **표 3**

1	2	3	4	5	6
IL-2+IL-12	IL-7+IL-15	펩티드+ IL-2+IL-12	펩티드+ IL-7+IL-15	MVA+ IL-2+IL-12	MVA+ IL-7+IL-15

[0357]

[0358] 최종 농도: IL-2=20 유닛/ml, IL-12=10 ng/ml, IL-7=10 ng/ml, IL-15=10 ng/ml, 펩티드=5 µg/ml 개별적 펩티드, MVA MOI=1.

[0359] 제 4 일 및 제 8 일에, 0.5 ml 신선한 배지 및 사이토카인을 열거된 농도로 (모든 농도는 배양물에서의 최종 농도를 나타냄), 자극된 세포에 첨가하였다.

[0360] **제 12-24 일: 비-특이적 팽창 및 렌티바이러스 형질도입.** 제 12 일에, 자극된 세포를 피펫팅에 의해 플레이 트로부터 제거하고, 신선한 T 세포 배양 배지에 1x10⁶/ml 의 농도로 재현탁하였다. 재현탁된 세포를 T25 배 양 플라스크에 옮기고, 제조사의 지시사항에 따라 DYNABEADS® 인간 T-활성제 CD3/CD28 + 사이토카인으로 상거 열거한 바와 같이 자극하고; 플라스크를 수직 위치에서 인큐베이션하였다.

- [0361] 제 14 일에, AGT103/CMV-GFP 를 MOI 20 에서 첨가하고, 배양물을 2 일 동안 인큐베이터에 복귀시켰다. 이때, 세포를 피펫팅에 의해 회수하고, 1300 rpm 에서 10 분 동안 원심분리하여 수집하고, 동일 부피의 신선한 배지에 재현탁하고, 다시 원심분리하여 루스 (loose) 세포 펠렛을 형성시켰다. 이러한 세포 펠렛을 이전 단계에서 사용한 동일한 사이토카인과, 1 ml 당 0.5×10^6 생존가능 세포에서의 세포와, 신선한 배지에서 재현탁하였다.
- [0362] 제 14 일 내지 제 23 일에, 세포의 수를 2 일마다 평가하고, 세포를 신선한 배지로 0.5×10^6 /ml 로 희석하였다. 사이토카인을 매 시간 첨가하였다.
- [0363] 제 24 일에, 세포를 수집하고 비드를 세포로부터 제거하였다. 비드를 제거하기 위해, 2 분 동안 분류 마그넷에 넣은 적합한 튜브에 세포를 옮겼다. 세포 함유 상청액을 새로운 튜브에 옮겼다. 그런 다음, 세포를 신선한 배지에서 1×10^6 /ml 로 1 일 동안 배양하였다. 어세이를 수행하여 항원-특이적 T 세포 및 렌티바이러스 형질도입된 세포의 빈도를 측정하였다.
- [0364] 가능한 바이러스 성장을 방지하기 위해, 암프레나비르 (0.5 ng/ml) 또는 사퀴나비르 (0.5 ng/ml) 또는 또다른 적합한 프로테아제 또는 인테그라아제 저해제를 자극의 제 1 일에, 그리고 배양 동안 격일로 배양물에 첨가하였다.
- [0365] *IFN-감마에 대한 세포내 사이토카인 염색에 의한 항원-특이적 T 세포 검사.* 펩티드 자극 후 또는 1×10^6 세포/ml 에서의 렌티바이러스 형질도입 후 배양된 세포를 배지 단독 (음성 대조군), Gag 펩티드 ($5 \mu\text{g/ml}$ 개별적 펩티드) 또는 PHA ($5 \mu\text{g/ml}$, 양성 대조군) 으로 자극하였다. 4 시간 후, BD GolgiPlug™ (1:1000, BD Biosciences) 을 첨가하여 골지 이동을 차단하였다. 8 시간 후, 세포를 세척하고, 제조사의 지시사항에 따라 BD Cytotfix/Cytoperm™ 키트를 사용하여 세포외 (CD3, CD4 또는 CD8; BD Biosciences) 및 세포내 (IFN-감마; BD Biosciences) 항체로 염색하였다. BD FACSCalibur™ Flow Cytometer 에서 샘플을 분석하였다. 적절한 동형-매치된 항체로 표지된 대조군 샘플을 각각의 실험에 포함시켰다. 데이터를 Flowjo 소프트웨어를 사용하여 분석하였다.
- [0366] 렌티바이러스 형질도입율을 GFP+ 세포의 빈도에 의해 측정하였다. 형질도입된 항원-특이적 T 세포를 CD3+CD4+GFP+IFN 감마 + 세포의 빈도에 의해 측정하고; CD3+CD8+GFP+IFN 감마 + 세포에 대한 시험을 대조군으로서 포함시킨다.
- [0367] 이러한 결과는 CD4 T 세포, 표적 T 세포 집단이, HIV-특이적 단백질의 발현을 특이적으로 녹다운시키는 것으로 디자인된 렌티바이러스로 형질도입될 수 있어, 따라서 바이러스에 대해 면역이 생긴 T 세포의 팽창가능 집단을 생성시킨다는 것을 나타낸다. 이 실시예는 개시된 렌티바이러스 구축물이 HIV 환자에서의 기능적 치유를 생성시키는데 사용될 수 있다는 것을 나타내는 개념의 증거로서 역할한다.
- [0368] **실시예 4: 실험적 벡터로의 CCR5 녹다운**
- [0369] AGTc120 은 다량의 CD4 및 CCR5 를 안정적으로 발현하는 Hela 세포주이다. AGTc120 을 LV-CMV-mCherry (CMV 즉시 초기 프로모터의 제어 하에 발현된 적색 형광 단백질 mCherry) 또는 AGT103/CMV-mCherry 의 존재 하 또는 부재 하에 형질도입하였다. mCherry 형광 단백질의 유전자 발현을 CMV (거대세포바이러스 즉시 초기 프로모터) 발현 카세트에 의해 제어하였다. LV-CMV-mCherry 벡터는 microRNA 클러스터가 결핍된 한편, AGT103/CMV-mCherry 는 CCR5, Vif 및 Tat 에 대한 치료적 miRNA 를 발현하였다.
- [0370] 도 8A 에서 나타낸 바와 같이, 형질도입 효율은 >90% 였다. 7 일 후, 세포를 수집하고 CCR5 에 대한 형광 모노클로날 항체로 염색하고, 분석적 유세포 분석 처리하였다. 동형 대조군을, CCR5 APC 의 평균 형광 세기 (x 축) 대 모드에 대해 정규화된 세포 수 (y 축) 를 플로팅하는 이들 히스토그램에서 회색으로 나타낸다. 세포 표면 CCR5 에 대한 염색 후, 무-렌티바이러스 또는 대조군 렌티바이러스 (mCherry 마커만을 발현함) 로 처리한 세포는 CCR5 밀도에서 변화를 나타내지 않는 한편, AGT103 (우측 색선) 은 CCR5 염색 세기를 거의 동형 대조군의 수준으로 감소시켰다. 7 일 후, 세포를 R5-항성 HIV 리포터 바이러스 Bal-GFP 의 존재 하 또는 부재 하에 감염시켰다. 3 일 후, 세포를 수집하고 유세포 분석에 의해 분석하였다. 90% 초과와 세포가 형질도입되었다. AGT103-CMV/CMVmCherry 는 대조군 벡터로 처리한 세포와 비교하여, 형질도입된 AGTc120 세포에서 CCR5 발현을 감소시켰으며 R5-항성 HIV 감염을 차단하였다.
- [0371] 도 8B 는 HIV 로의 감염에 대한 트랜스펙션된 AGTc120 세포의 상대적 불감성을 보여준다. 상기와 같이, 렌

티바이러스 벡터는 mCherry 단백질을 발현하며, HIV (GFP 를 발현) 로 또한 감염된 형질도입된 세포가 거짓 (false) 색 유세포 분석 도트 플롯의 상부 우측 사분면에서 이중 양성 세포로서 나타났다. HIV (상부 패널) 의 부재 하에, 어떠한 조건 하에서도 GFP+ 세포가 없다. HIV 감염 후 (하부 패널), 56% 의 세포가 렌티바이러스 형질도입의 부재 하에 감염되었으며 53.6% 의 세포가 LV-CMV-mCherry 로 형질도입된 AGTc120 세포에서 감염되었다. 세포가 치료적 AGT103/CMV-mCherry 벡터로 형질도입된 경우, 오직 0.83% 의 세포만이 이중 양성 사분면에서 나타났으며, 이는 이들이 형질도입되었고 감염되었음을 나타낸다.

[0372] 53.62 (대조군 벡터를 갖는 이중 양성 세포의 비율) 를 0.83 (치료적 벡터를 갖는 이중 양성 세포의 비율) 으로 나누면, AGT103 이 이러한 실험적 시스템에서 HIV 에 대한 65-배 초과 보호를 제공하였음이 나타난다.

[0373] **실시예 5: 렌티바이러스 벡터에서 shRNA 저해제 서열에 의한 CCR5 발현의 조절**

[0374] *저해성 RNA 디자인.* 호모 사피엔스 케모카인 수용체 CCR5 의 서열 (CCR5, NC 000003.12) 을 사용하여, 인간 세포에서 CCR5 수준을 낮추는 잠재적 siRNA 또는 shRNA 후보물을 탐색하였다. 잠재적 RNA 간섭 서열을, Broad Institute 로부터의 또는 BLOCK-IT RNA iDesigner (Thermo Scientific) 와 같은 siRNA 또는 shRNA 디자인 프로그램에 의해 선택된 후보물로부터 선택하였다. shRNA 서열은 shRNA 발현이 제어되도록 H1, U6 또는 7SK 와 같은 RNA 중합효소 III 프로모터 직후에 플라스미드에 삽입될 수 있다. shRNA 서열은 또한 유사한 프로모터를 사용하여 렌티바이러스 벡터에 삽입되거나, microRNA 백본 내에 포매되어 CMV 또는 EF-1 알파 와 같은 RNA 중합효소 II 프로모터에 의한 발현을 허용할 수 있다. RNA 서열은 또한 siRNA 올리고뉴클레오티드로서 합성되고 플라스미드 또는 렌티바이러스 벡터와 별도로 이용될 수 있다.

[0375] *플라스미드 구축.* CCR5 shRNA 에 대해, BamHI 및 EcoRI 제한 자리를 포함하는 올리고뉴클레오티드 서열을 MWG Operon 에 의해 합성하였다. 올리고뉴클레오티드 서열을, 70°C 에서 인큐베이션한 후 실온으로 냉각시킴으로써 어닐링하였다. 어닐링된 올리고뉴클레오티드를 제한 효소 BamHI 및 EcoRI 로 1 시간 동안 37°C 에서 소화시킨 후, 효소를 70°C 에서 20 분 동안 불활성화시켰다. 동시에, 플라스미드 DNA 를 제한 효소 BamHI 및 EcoRI 으로 1 시간 동안 37°C 에서 소화시켰다. 소화된 플라스미드 DNA 를 아가로스 겔 전기영동에 의해 정제하고 DNA 겔 추출 키트 (Invitrogen) 를 사용하여 겔로부터 추출하였다. DNA 농도를 측정하고, 혈장 대 올리고뉴클레오티드 서열을 3:1 삽입물 대 벡터의 비로 결정하였다. 결정 반응을 T4 DNA 리가아제 30 분 동안 실온에서 수행하였다. 2.5 µL 의 결정 믹스를 25 µL 의 STBL3 적격 박테리아 세포에 첨가하였다. 형질전환은 42°C 에서 열 충격을 필요로 하였다. 박테리아 세포를 암피실린 함유 아가 플레이트에 스프레딩하고, 콜로니를 L 브로쓰에서 팽창시켰다. 올리고 서열의 삽입을 확인하기 위해, Invitrogen DNA Miniprep 키트를 사용하여 플라스미드 DNA 를 수확한 박테리아 배양물로부터 추출하고, 제한 효소 소화에 의해 시험하였다. shRNA 서열의 플라스미드로의 삽입을, shRNA 발현 조절에 사용한 프로모터에 특이적인 프라이머를 사용하여 DNA 서열분석에 의해 확인하였다.

[0376] *CCR5 mRNA 감소의 기능적 어세이:* CCR5 발현 저해의 어세이는 2 개 플라스미드의 동시-트랜스펙션을 필요로 하였다. 제 1 플라스미드는 CCR5 mRNA 에 대해 유도된 5 개 상이한 shRNA 서열 중 1 개를 포함한다. 제 2 플라스미드는 인간 CCR5 유전자에 대한 cDNA 서열을 포함한다. 플라스미드를 293T 세포에 동시-트랜스펙션하였다. 48 시간 후, 세포를 용해하고 RNA 를 RNeasy 키트 (Qiagen) 를 사용하여 추출하였다. cDNA 를, Super Script 키트 (Invitrogen) 를 사용하여 RNA 로부터 합성하였다. 그런 다음, 샘플을 Applied Biosystems Step One PCR 기기를 사용하여 정량적 RT-PCR 에 의해 분석하였다. CCR5 발현을, 중합효소 연쇄 반응 분석에 대한 표준 조건으로 정방향 프라이머 (5'-AGGAATTGATGGCGAGAAGG-3') (SEQ ID NO: 93) 및 역방향 프라이머 (5'-CCCCAAGAAGGTCAAGGTAATCA-3') (SEQ ID NO: 94) 를 사용하여 SYBR Green (Invitrogen) 으로 검출하였다. 샘플을, 중합효소 연쇄 반응 분석에 대한 표준 조건으로 정방향 프라이머 (5'-AGCGGGCTACAGCTTCA-3') (SEQ ID NO: 95) 및 역방향 프라이머 (5'-GGCGACGTAGCACAGCTTCT-3') (SEQ ID NO: 96) 를 사용하여 베타 액틴 유전자 발현을 위한 mRNA 에 대해 정규화하였다. CCR5 mRNA 의 상대적 발현을 각 샘플에 대해 액틴 메신저 RNA 의 수준에 대하여 정규화시킨 그의 Ct 값에 의해 측정하였다. 결과를 도 9 에 나타낸다.

[0377] 도 9A 에서 나타낸 바와 같이, CCR5 녹다운을 CCR5 shRNA 구축물 및 CCR5-발현 플라스미드의 동시-트랜스펙션에 의해 293T 세포에서 시험하였다. 대조군 샘플을 CCR5-발현 플라스미드 및 임의의 인간 유전자를 표적화하지 않은 스크램블된 shRNA 서열로 트랜스펙션하였다. 트랜스펙션 60 시간 후, 샘플을 수확하고정량적 PCR 에 의해 CCR5 mRNA 수준을 측정하였다. 또한, 도 9B 에서 나타낸 바와 같이, 렌티바이러스로의 형질도입 후 CCR5 녹다운은 CCR5 shRNA-1 (SEQ ID NO: 16) 을 발현시킨다.

- [0378] 실시예 6: 렌티바이러스 벡터에서의 shRNA 저해제 서열에 의한 HIV 구성성분의 조절
- [0379] 저해성 RNA 디자인.
- [0380] HIV 유형 1 Rev/Tat (5'-GCGGAGACAGCGACGAAGAGC-3') (SEQ ID NO: 9) 및 Gag (5'-GAAGAAATGATGACAGCAT-3') (SEQ ID NO: 11) 의 서열을 하기의 디자인에 사용하였다:
- [0381] Rev/Tat :
- (5'GCGGAGACAGCGACGAAGAGCTTCAAGAGAGCTCTTCGTCGCTGTCTCCGCTTT
TT-3') (SEQ ID NO: 10)
- [0382]
- [0383] 및
- [0384] Gag:
- (5'GAAGAAATGATGACAGCATTTCGAAGAGAATGCTGTCATCATTCTCTTTTT-3')
(SEQ ID NO: 12)
- [0385]
- [0386] shRNA (상기 기재한 바와 같이 합성하고 플라스미드에 클로닝함).
- [0387] 플라스미드 구축. Rev/Tat 또는 Gag 표적 서열을 세포 또는 조직에서 유전자 발현의 리포터로서 흔히 사용되는 반딧불이 루시페라아제 유전자의 3'UTR (미번역 영역) 에 삽입하였다. 추가적으로, 하나의 플라스미드를 Rev/Tat shRNA 를 발현하도록 구축하고, 제 2 플라스미드를 Gag shRNA 를 발현하도록 구축하였다. 플라스미드 구축은 상기 기재한 바와 같았다.
- [0388] Rev/Tat 또는 Gag mRNA 의 shRNA 표적화의 기능적 어셈블리: 플라스미드 동시-트랜스펙션을 사용하여, shRNA 플라스미드가 루시페라아제 메신저 RNA 를 분해하고 동시-트랜스펙션된 세포에서 광 방사 세기를 감소시킬 수 있었는지의 여부를 시험하였다. shRNA 대조군 (스크램블된 서열) 을, 루시페라아제 트랜스펙션된 세포로부터의 광의 최대 수율을 확립하는데 사용하였다. 3'-UTR (mRNA 의 미번역 영역) 에 삽입된 Rev/Tat 표적 서열을 포함하는 루시페라아제 구축물을 Rev/Tat shRNA 서열로 동시-트랜스펙션한 경우, 광 방사에 있어서 거의 90% 감소가 있었으며 이는 shRNA 서열의 강한 기능을 나타낸다. 3'-UTR 에서 Gag 표적 서열을 포함하는 루시페라아제 구축물을 Gag shRNA 서열로 동시-트랜스펙션한 경우, 유사한 결과를 획득하였다. 이러한 결과는 shRNA 서열의 강력한 활성을 나타낸다.
- [0389] 도 10A 에서 나타낸 바와 같이, Rev/Tat 표적 유전자의 녹다운을, 293T 세포에서 일시적 트랜스펙션에 의해 3'UTR 에서 표적 mRNA 서열과 융합된 루시페라아제 활성의 감소에 의해 측정하였다. 도 10B 에서 나타낸 바와 같이, 루시페라아제 유전자와 융합된 Gag 표적 유전자 서열이 녹다운되었다. 결과는 각각 삼반복으로 수행한, 3 회 독립적 트랜스펙션 실험의 평균 \pm SD 로서 나타낸다.
- [0390] 실시예 7: AGT103 은 Tat 및 Vif 의 발현을 감소시킴
- [0391] 세포를 예시적 벡터 AGT103/CMV-GFP 로 트랜스펙션하였다. AGT103 및 다른 예시적 벡터를 하기 표 3 에서 정의한다.

[0392] 표 3

백터 지정	조성
AGT103	EF1-miR30CCR5-miR21Vif-miR185-Tat-WPRE
대조군-mCherry	CMV-mCherry
AGT103/CMV-mCherry	CMV-mCherry-EF1-miR30CCR5-miR21Vif-miR185-Tat-WPRE-mCherry
대조군-GFP	CMV-mCherry
AGT103/CMV-GFP	CMV-GFP-EF1-miR30CCR5-miR21Vif-miR185-Tat-WPRE-
약어: EF-1: 신장 인자 1 전사 프로모터 miR30CCR5 – 세포 표면 상의 CCR5 단백질을 감소시킬 수 있는 합성 microRNA miR21Vif – HIV RNA 및 Vif 단백질 발현의 수준을 감소시킬 수 있는 합성 microRNA miR185Tat – HIV RNA 및 Tat 단백질 발현의 수준을 감소시킬 수 있는 합성 micro RNA CMV – 인간 거대세포바이러스로부터의 즉시 초기 전사 프로모터 mCherry – mCherry 적색 형광 단백질에 대한 코딩 영역 GFP – 녹색 형광 단백질에 대한 코딩 영역 WPRE – 우드칩 간염 바이러스 전사후 조절 요소	

[0393]

[0394]

T 림프아구성 세포주 (CEM; CCRF-CEM; 미국 생물자원 센터 (American Type Culture Collection) 카탈로그 번호 CCL119) 를 AGT103/CMV-GFP 로 형질도입하였다. 48 시간 이후, 세포를 전체 바이러스 서열을 인코딩하는 HIV 발현 플라스미드로 트랜스펙션하였다. 24 시간 후, RNA 를 세포로부터 추출하고, 역전사효소 증합효소 연쇄 반응을 사용하여 미손상 (intact) Tat 서열의 수준을 시험하였다. 미손상 Tat RNA 에 대한 상대적 발현 수준은 도 11 에서 나타낸 바와 같이, > 4 배의 총 감소로, 대조군 렌티바이러스 백터의 존재 하에 대략 850 으로부터, AGT103/CMV-GFP 의 존재 하에 대략 200 으로 감소하였다.

[0395]

실시예 8: 렌티바이러스 백터에서의 합성 MicroRNA 서열에 의한 HIV 구성성분의 조절

[0396]

저해성 RNA 디자인. HIV-1 Tat 및 Vif 유전자의 서열을, 인간 세포에서의 Tat 또는 Vif 수준을 녹다운시키는 잠재적 siRNA 또는 shRNA 후보를 탐색에 사용하였다. 잠재적 RNA 간섭 서열을 Broad Institute 로부터 의 또는 BLOCK-IT RNA iDesigner (Thermo Scientific) 과 같은 siRNA 또는 shRNA 디자인 프로그램에 의해 선정된 후보물로부터 선택하였다. Tat 또는 Vif 녹다운을 위해 가장 강력한 선택된 shRNA 서열은 microRNA 백본 내에 포매되어, CMV 또는 EF-1 알파와 같은 RNA 증합효소 II 프로모터에 의한 발현을 허용시켰다. RNA 서열은 또한 siRNA 올리고뉴클레오티드로서 합성되고 플라스미드 또는 렌티바이러스 백터와 관계없이 사용될 수 있다.

[0397]

플라스미드 구축. Tat 표적 서열 (5'-TCGCTTCTCTCCATAG-3') (SEQ ID NO: 7) 을 miR185 백본에 통합시켜, 렌티바이러스 백터에 삽입되고 EF-1 알파 프로모터의 제어 하에 발현되는 Tat miRNA

5'-

GGGCTGGCTCGAGCAGGGGCGAGGGATTCCGCTTCTTCCTGCCATAGCGTGGT
 CCCCTCCCCTATGGCAGGCAGAAGCGGCACCTTCCCTCCAATGACCGCGTCTTCG
 (TCG-3'

[0398]

(SEQ ID NO: 3) 를 생성시켰다. 유사하게, Vif 표적 서열 (5'-GGGATGTGACTTCTGAACTT-3') (SEQ ID NO: 6) 을 miR21 백본에 통합시켜, 렌티바이러스 백터에 삽입되고 EF-1 알파 프로모터의 제어 하에 발현되는 Vif miRNA

CATCTCCATGGCTGTACCACCTTGTCTGGGGGATGTGTACTTCTGAACTTGTGTTGA
 ATCTCATGGAGTTCAGAAGAACACATCCGCACTGACATTTTGGTATCTTTTCATCTG
 (ACCA-3') (SEQ ID NO: 2) 를

생성시켰다. 그로 인해 발생한 Vif/Tat miRNA-발현 렌티바이러스 벡터를 렌티바이러스 벡터 패키징 시스템을 사용하여 293T 세포에서 생성시켰다. Vif 및 Tat miRNA 를, 모두 EF-1 프로모터의 제어 하에 발현되는 miR CCR5, miR Vif 및 miR Tat 으로 이루어지는 microRNA 클러스터에 포매하였다.

[0399] *Tat mRNA 축적의 miR185Tat 저해에 대한 기능적 어세이.* miR185 Tat 을 발현하는 렌티바이러스 벡터 (LV-EF1-miR-CCR5-Vif-Tat) 를, 293T 세포를 형질도입하기 위해 5 의 감염 다중도에서 사용하였다. 형질도입 24 시간 후, 세포를 표준 조건 하에 Lipofectamine2000 을 사용하여 HIV 균주 NL4-3 (pNL4-3) 을 발현하는 플라스미드로 트랜스펙션하였다. 24 시간 이후, RNA 를 추출하고, Tat-특이적 프라이머를 사용하여 RT-PCR 에 의해 Tat 메신저 RNA 의 수준을 시험하고, 대조군에 대한 액틴 mRNA 수준과 비교하였다.

[0400] *Vif 단백질 축적의 miR21 Vif 저해에 대한 기능적 어세이.* miR21 Vif 를 발현하는 렌티바이러스 벡터 (LV-EF1-miR-CCR5-Vif-Tat) 를, 293T 세포를 형질도입하기 위해 5 의 감염 다중도에서 사용하였다. 형질도입 24 시간 후, 세포를 Lipofectamine2000 을 사용하여 HIV 균주 NL4-3 (pNL4-3) 을 발현하는 플라스미드로 트랜스펙션하였다. 24 시간 이후, 세포를 용해하고 총 가용성 단백질을 시험하여 Vif 단백질의 함량을 측정하였다. 세포 용해물을 확립된 기법에 따라 SDS-PAGE 에 의해 분리하였다. 분리된 단백질을 나일론 멤브레인에 옮기고 Vif-특이적 모노클로날 항체 또는 액틴 대조군 항체로 프로브처리하였다.

[0401] 도 12A 에서 나타낸 바와 같이, Tat 녹다운을, 합성 miR185 Tat 또는 miR155 Tat microRNA 를 발현하는 렌티바이러스 벡터 또는 대조군 렌티바이러스 벡터로 형질도입된 293T 세포에서 시험하였다. 24 시간 후, HIV 벡터 pNL4-3 을 24 시간 동안 Lipofectamine2000 으로 트랜스펙션한 다음, RNA 를 Tat 에 대한 프라이머를 사용하는 qPCR 분석을 위해 추출하였다. 도 12B 에서 나타낸 바와 같이, Vif 녹다운을, 합성 miR21 Vif microRNA 를 발현하는 렌티바이러스 벡터 또는 대조군 렌티바이러스 벡터로 형질도입된 293T 세포에서 시험하였다. 24 시간 후, HIV 벡터 pNL4-3 을 24 시간 동안 Lipofectamine2000 으로 트랜스펙션한 다음, 단백질을 HIV Vif 에 대한 항체를 사용하는 면역블롯 분석을 위해 추출하였다.

[0402] **실시예 9: 렌티바이러스 벡터에서의 합성 microRNA 서열에 의한 CCR5 발현의 조절**

[0403] CEM-CCR5 세포를 CCR5 에 대한 합성 miR30 서열 (AGT103: TGTAAGCTGAGCTTGCTCTA (SEQ ID NO: 97), AGT103-R5-1: TGTAAGCTGAGCTTGCTCGC (SEQ ID NO: 98) 또는 AGT103-R5-2: CATAGATTGGACTTGACAC (SEQ ID NO: 99)) 을 함유하는 렌티바이러스 벡터로 형질도입하였다. 6 일 후, CCR5 발현을 APC-컨쥬게이션된 CCR5 항체를 사용하여 FACS 분석에 의해 측정하고, 평균 형광 세기 (MFI) 에 의해 정량화하였다. LV-대조군을 100% 에서 설정하여, CCR5 % 로서 CCR5 수준을 표시하였다. AGT103 및 AGT103-R5-1 의 표적 서열은 CCR5 표적 서열 #5 와 동일한 영역 내에 있다. AGT103-R5-2 의 표적 서열은 CCR5 표적 서열 #1 과 동일하다. AGT103 (총 CCR5 의 2%) 은 AGT103-R5-1 (총 CCR5 의 39%) 및 AGT103-R5-2 (CCR5 수준을 감소시키지 않음) 와 비교하여 CCR5 수준을 감소시키는데 있어서 가장 효과적이다. 데이터를 본원에서 도 13 에서 입증한다.

[0404] **실시예 10: 긴 또는 짧은 WPRE 서열을 포함하는 렌티바이러스 벡터에서의 합성 microRNA 서열에 의한 CCR5 발현의 조절.**

[0405] *벡터 구축.* 렌티바이러스 벡터는 치료적 유전자 또는 유전적 구축물의 최적 발현을 위한 RNA 조절 요소를 종종 필요로 한다. 혼한 선택은 우드척 감염 바이러스 전사후 조절 요소 (WPRE) 를 사용하는 것이다. 전장 WPRE:

(5'AATCAACCTCTGATTACAAAATTTGTGAAAGATTGACTGGTATTCTTAACTATG
 TTGCTCCTTTTACGCTATGTGGATACGCTGCTTTAATGCCTTTGTATCATGCTATTG
 CTTCCCGTATGGCTTTTCATTTTCTCCTCCTTGTATAAATCCTGGTTGCTGTCTCTTTA
 TGAGGAGTTGTGGCCCGTTGTCAGGCAACGTGGCGTGGTGTGCACTGTGTTTGCTG
 ACGCAACCCCCACTGGTTGGGGCATTGCCACCACCTGTCAGCTCCTTTCCGGGACT
 TTCGCTTTCCCCCTCCCTATTGCCACGGCGGAACATCGCCGCTGCCTTGCCCCG
 TGCTGGACAGGGGCTCGGCTGTTGGGCACTGACAATTCCGTGGTGTGTCGGGGA
 AATCATCGTCCTTTCTTGGCTGCTCGCCTGTGTTGCCACCTGGATTCTGCGCGGGA
 CGTCCTTCTGCTACGTCCCTTCGGCCCTCAATCCAGCGGACCTTCCTTCCCGCGGCC
 TGCTGCCGGCTCTGCGGCCTCTTCCGCGTCTTCGCCCTTCGCCCTCAGACGAGTCGG
 ATCTCCCTTTGGGCCGCCTCCCCGCCT-3') (SEQ ID NO: 32)

[0406]

[0407]

[0408]

를 포함하는 AGT103 을, 단축 WPRE 요소

(5'AATCAACCTCTGGATTACAAAATTTGTGAAAGATTGACTGATATTCTTAACTAT
 GTTGCTCCTTTTACGCTGTGTGGATATGCTGCTTTAATGCCTCTGTATCATGCTATT
 GCTTCCCGTACGGCTTTTCGTTTCTCCTCCTTGTATAAATCCTGGTTGCTGTCTCTTT
 ATGAGGAGTTGTGGCCCGTTGTCGTC AACGTGGCGTGGTGTGCTCTGTGTTTGCT
 GACGCAACCCCCACTGGCTGGGGCATTGCCACCACCTGTCAACTCCTTTCTGGGAC
 TTTCGCTTTCCCCCTCCCGATCGCCACGGCAGAACTCATCGCCGCTGCCTTGCCC
 GCTGCTGGACAGGGGCTAGGTTGCTGGGCACTGATAATTCCGTGGTGTGTC-3')
 (SEQ ID NO: 80)

[0409]

[0410]

를 포함하는 변형된 AGT103 벡터와 비교하였다.

[0411]

벡터 서열에서 긴 WPRE 요소 대 짧은 WPRE 요소에 따라 세포 표면 CCR5 발현을 조정하기 위한 기능적 어셈블리. 긴 또는 짧은 WPRE 요소를 포함하는 AGT103 을 5 의 감염 다중도에서 CEM-CCR5 T 세포를 형질전환하는데 사용하였다. 형질도입 6 일 후 세포를 수집하고 세포 표면 CCR5 단백질을 검출할 수 있는 모노클로날 항체로 염색하였다. 항체를 형광 마커에 컨쥬레이션하였고, 염색 세기는 세포 표면 상의 CCR5 의 수준과 정비례한다. 대조군 렌티바이러스는 세포 표면 CCR5 수준에 영향을 갖지 않아, 73.6 유닛의 평균 형광 세기를 갖는 단일한 집단을 초래한다. 긴 WPRE 요소를 갖는 종래의 AGT103 은 CCR5 발현을 11 유닛의 평균 형광 세기 수준으로 감소시켰다. 짧은 WPRE 요소를 통합하도록 변형된 AGT103 은 13 유닛의 평균 형광 세기를 갖는 세포의 단일한 집단을 초래하였다. 따라서, 짧은 WPRE 요소를 대체하는 것은 세포 표면 CCR5 발현을 감소시키기 위한 AGT103 의 능력에 대해 적은 영향을 갖거나 영향을 갖지 않았다.

[0412]

도 14 에서 나타낸 바와 같이, CEM-CCR5 세포를 긴 또는 짧은 WPRE 서열을 포함하는 AGT103 으로 형질도입하였다. 6 일 후, CCR5 발현을 APC-컨쥬레이션된 CCR5 항체를 사용하여 FACS 분석에 의해 측정하고, 평균 형광 세기 (MFI) 로서 정량화하였다. LV-대조군을 100% 에서 설정하여, CCR5 % 로서 CCR5 수준을 표시하였다. CCR5 수준의 감소는 짧은 (총 CCR5 의 5.5%) 또는 긴 (총 CCR5 의 2.3%) WPRE 서열을 갖는 AGT103 과 유사하였다.

[0413]

실시예 11: WPRE 서열의 존재 또는 부재 하의 렌티바이러스 벡터에서의 합성 microRNA 서열에 의한 CCR5 발현의 조절

[0414]

벡터 구축. WPRE 가 CCR5 발현의 AGT103 하향 조절에 필요한지 여부를 시험하기 위해, WPRE 요소 서열이 부재하는 변형된 벡터를 구축하였다.

[0415]

AGT103 벡터에서 긴 WPRE 요소를 포함하거나 포함하지 않음에 따라 세포 표면 CCR5 발현을 조정하기 위한 기능적 어셈블리. WPRE 가 CCR5 발현 수준의 AGT103 조절에 필요한지 여부를 시험하기 위해, CEM-CCR5 T 세포를 AGT103 또는 WPRE 가 결핍된 변형 벡터로, 5 의 감염 다중도를 사용하여 형질도입하였다. 형질도입 6 일 후 에 세포를 수집하고, 세포 표면 CCR5 단백질을 인지할 수 있는 모노클로날 항체로 염색하였다. 모노클로날

항체를 형광 마커에 직접 컨쥬게이션하였고, 염색 세기는 세포 표면 당 CCR5 분자의 수에 정비례한다. 렌티 바이러스 대조군 벡터는 세포 표면 CCR5 수준에 대해 영향을 갖지 않아, 164 유닛의 평균 형광 세기를 갖는 동일한 집단을 초래한다. 렌티바이러스 벡터 (긴 WPRE 를 가지며 또한 GFP 마커 단백질을 발현하는 AGT103), GFP 가 결핍되어 있으나 긴 WPRE 요소를 포함하는 AGT103, 또는 GFP 및 WPRE 둘 모두가 결핍되어 있는 AGT103 모두는 세포 표면 CCR5 발현을 조정하기 위해 유사하게 효과적이었다. GFP 제거 후, WPRE 요소가 존재 또는 부재하는 AGT103 은 세포 표면 CCR5 발현을 조정하는 그의 능력 면에 있어서 구별할 수 없었다.

[0416] CEM-CCR5 세포를, GFP 및 WPRE 의 존재 하 또는 부재 하의 AGT103 으로 형질도입하였다. 6 일 후, CCR5 발현을 APC-컨쥬게이션된 CCR5 항체를 사용하여 FACS 분석에 의해 측정하고, 평균 형광 세기 (MFI) 로서 정량화하였다. LV-대조군을 100% 에서 설정하여, CCR5 % 로서 CCR5 수준을 표시하였다. CCR5 수준의 감소는 WPRE 서열이 존재하거나 (총 CCR5 의 0%) 부재하는 (총 CCR5 의 0%) AGT103 에 대하여 유사하였다. 이러한 데이터를 도 15 에서 입증한다.

[0417] **실시예 12: 렌티바이러스 벡터에서의 합성 microRNA 서열을 조절하는 CD4 프로모터에 의한 CCR5 발현의 조절.**

[0418] **벡터 구축.** AGT103 의 변형된 형태를 구축하여, CCR5, Vif 및 Tat 유전자 발현을 억제하는 microRNA 클러스터를 발현하기 위한 대안적 프로모터의 대체 효과를 시험하였다. 보통의 EF-1 프로모터 대신에, 하기 서열을 사용하는 CD4 당단백질 발현을 위해 T 세포-특이적 프로모터를 대신 사용하였다:

```
(5'TGTTGGGGTTCAAATTTGAGCCCCAGCTGTTAGCCCTCTGCAAAGAAAAAAAAA
AAAAAAAAAGAACAAGGGCCTAGATTTCCCTTCTGAGCCCCACCTAAGATGAA
GCCTCTTCTTTCAAGGGAGTGGGGTGGGGTGGAGGCGGATCCTGTCAGCTTTGCT
CTCTCTGTGGCTGGCAGTTTCTCAAAGGGTAACAGGTGTCAGCTGGCTGAGCCTA
GGCTGAACCCTGAGACATGCTACCTCTGTCTTCTCATGGCTGGAGGCAGCCTTTGT
AAGTCACAGAAAGTAGCTGAGGGCTCTGGAAAAAGACAGCCAGGGTGGAGGT
AGATTGGTCTTTGACTCCTGATTTAAGCCTGATTCTGCTTAACCTTTTTCCCTTACT
TTGGCATTTCACCTTTGACATGTTCCCTGAGAGCCTGGGGGGTGGGGAACCCAGCT
CCAGCTGGTGACGTTTGGGGCCGGCCAGGCCTAGGGTGTGGAGGAGCCTTGCCA
TCGGGCTTCTGTCTCTTTCATTTAAGCACGACTCTGCAGA-3')
```

[0419]

[0420] **세포 표면 CCR5 단백질 발현 감소를 위한 역가 면에서 EF-1 및 CD4 유전자 프로모터를 비교하는 기능적 어세이.**

보통의 EF-1 프로모터에 대해 CD4 유전자 프로모터를 대체함으로써 변형된 AGT103 을, CEM-CCR5 T 세포를 형질도입하는데 사용하였다. 형질도입 6 일 후, 세포를 수집하고, 세포 표면 CCR5 단백질을 인지할 수 있는 모노클로날 항체로 염색하였다. 모노클로날 항체를 형광 마커에 컨쥬게이션하였고, 염색 세기는 세포 표면 CCR5 단백질의 수준에 정비례한다. 대조군 렌티바이러스 형질도입은 CCR5-특이적 모노클로날 항체로 염색한 CEM-CCR5 T 세포의 집단을 초래하였으며 81.7 유닛의 평균 형광 세기를 생성하였다. microRNA 을 발현하기 위해 EF-1 프로모터 대신에 CD4 유전자 프로모터를 사용하여 변형된 AGT103 은, 거의 17.3 유닛의 평균 형광 세기를 갖는 염색의 넓은 분포를 나타내었다. 이러한 결과를 기반으로 하여, EF-1 프로모터는 microRNA 발현을 위해 CD4 유전자 프로모터와 적어도 유사하거나 더 우수하다. 원하는 표적 세포 집단에 따라, EF-1 프로모터는 모든 세포 유형에서 보편적으로 활성이며 CD4 프로모터는 T-림프구에서만 활성이다.

[0421] CEM-CCR5 세포를 CCR5, Vif 및 Tat 에 대한 합성 microRNA 서열을 조절하는 CD4 프로모터를 포함하는 렌티 바이러스 벡터 (AGT103) 로 형질도입하였다. 6 일 후, CCR5 발현을 APC-컨쥬게이션된 CCR5 항체를 사용하여 FACS 분석에 의해 측정하고, 평균 형광 세기 (MFI) 로서 정량화하였다. LV-대조군을 100% 에서 설정하여, CCR5 % 로서 CCR5 수준을 표시하였다. LV-CD4-AGT103 으로 형질도입된 세포에서, CCR5 수준은 총 CCR5 의 11% 였다. 이는 EF1 프로모터를 포함하는 LV-AGT103 에 대해 관찰된 것과 비슷하다. 이러한 데이터를 도 16 에서 입증한다.

[0422] **실시예 13: HIV Gag-특이적 CD4 T 세포 검출**

[0423] **세포 및 시약.** 생존가능 동결 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC) 를 백신 회사로부터 입수하였다. 후보물 HIV 치료적 백신을 시험하는 초기 단계 임상 시험 (TRIAL REGISTRATION: clinicaltrials.gov NCT01378156) 에 등록된 HIV+ 개인으로부터의 대표적 표본으로 데이터를 획득하였다. 2 개 표본을 "백신접종 전 (Before

vaccination)" 및 "백신접종 후 (After vaccination)" 연구를 위해 수득하였다. 세포 배양 생성물, 보충물 및 사이토카인은 상업적 공급자로부터의 것이었다. 세포를 [Thompson, M., S. L. Heath, B. Sweeton, K. Williams, P. Cunningham, B. F. Keele, S. Sen, B. E. Palmer, N. Chomont, Y. Xu, R. Basu, M. S. Hellerstein, S. Kwa and H. L. Robinson (2016). "DNA/MVA Vaccination of HIV-1 Infected Participants with Viral Suppression on Antiretroviral Therapy, followed by Treatment Interruption: Elicitation of Immune Responses without Control of Re-Emergent Virus." *PLoS One* 11(10): e0163164] 에서 기재된 바와 같은 Geovax Corporation 로부터의 재조합 변형 백신시아 앙카라 (Modified Vaccinia Ankara) 62B 에 대한 반응에 대하여 시험하였다. 전체 HIV-1 Gag 폴리단백질을 나타내는 합성 펩티드를 GeoVax 로부터 입수하거나, HIV (GAG) Ultra 펩티드 세트를 JPT Peptide Technologies GmbH (www.jpt.com), Berlin, Germany 로부터 입수하였다. HIV (GAG) Ultra 는 각각 15 개 아미노산 길이며 11 개 아미노산에 의해 오버랩되는 150 개의 펩티드를 포함한다. 이들을 화학적으로 합성한 후, 액체 크로마토그래피 - 질량 분석법에 의해 정제하고 분석하였다. 집합적으로 이러한 펩티드는 HIV Gag 폴리단백질의 주요 면역원성 영역을 나타내며 공지된 HIV 균주 중 57.8% 의 평균 커버리지를 위해 디자인된다. 펩티드 서열은 로스 앨러모스 국립연구소로부터의 HIV 서열 데이터베이스를 기반으로 한다 (Los Alamos National Laboratory) (<http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/NEWALIGN/align.html>). 펩티드를 펩티드 당 25 μ g 의 건조된 트리플루오로아세트산 염으로서 제공하고, 대략 40 μ l 의 DMSO 에 용해한 다음, PBS 를 사용하여 최종 농도로 희석한다. CD4 및 세포질 IFN- γ 검출을 위한 모노클로날 항체를 상업적 공급원으로부터 입수하고, 인터페론- γ 에 대한 BD Pharmingen 세포내 염색 키트로 세포내 염색을 수행하였다. 펩티드를 DMSO 에 재현탁하였고, DMSO 는 대조군 조건에만 포함시킨다.

[0424] HIV-특이적 CD4+ T 세포 검출을 위한 기능적 어세이. 동결된 PBMC 를 해동하고, 세척하고 10% 소 태아 혈청, 보충물 및 사이토카인 함유 RPMI 배지에 재현탁하였다. 백신접종 전 또는 후에 수집한 배양된 PBMC 를 DMSO 대조군, MVA GeoVax (세포 당 1 플라크 형성 단위의 감염 다중도), 펩티드 GeoVax (1 μ g/ml) 또는 HIV (GAG) Ultra 펩티드 혼합물 (1 μ g/ml) 로, Golgi Stop 시약의 존재 하에 20 시간 동안 처리하였다. 세포를 수집하고, 세척하고, 고정시키고, 투과화시키고, 세포 표면 CD4 또는 세포내 인터페론- γ 에 대해 특이적인 모노클로날 항체로 염색하였다. 염색한 세포를 FACSCalibur 분석적 유세포 분석기로 분석하고, 데이터를 CD4+ T 세포 부분집합에 대해 게이팅하였다. 박스화된 영역 내에 하이라이트된 세포는 이중 양성이며 MVA 또는 펩티드 자극 후 인터페론- γ 발현에 근거하여 지정된 HIV-특이적 CD4 T 세포이다. 박스화된 영역 내의 숫자는 HIV-특이적인 것으로 식별된 총 CD4 의 백분율을 나타낸다. DMSO 또는 MVA 에 대해 강한 응답은 검출되지 않았다. GeoVax 로부터의 펩티드는 JPT 로부터의 HIV (GAG) Ultra 펩티드 혼합물과 비교하여 더 적은 응답 세포를 이끌어내었으나 차이는 작았고 유의하지 않았다.

[0425] 도 17 에서 나타낸 바와 같이, 백신접종 전 또는 후 HIV-양성 환자로부터의 PBMC 를 DMSO (대조군), GeoVax 로부터의 HIV Gag 를 발현하는 재조합 MVA (MVA GeoVax), GeoVax 로부터의 Gag 펩티드 (Pep GeoVax, 또한 본원에서 Gag 펩티드 풀 1 로 나타냄) 또는 JPT 로부터의 Gag 펩티드 (HIV (GAG) Ultra 펩티드 혼합물, 또한 본원에서 Gag 펩티드 풀 2 로 나타냄) 로, 20 시간 동안 자극하였다. IFN γ 생산을, 표준 프로토콜을 사용하여 세포내 염색 및 유세포 분석에 의해 검출하였다. 유세포 분석 데이터를 CD4 T 세포에 게이팅하였다. 박스 내 캡처된 숫자는 항원-특이적 자극에 대한 사이토카인 응답에 근거하여 "HIV-특이적" 인 것으로 지정된 총 CD4 T 세포의 백분율이다.

[0426] 실시예 14: HIV-특이적 CD4 T 세포 팽창 및 렌티바이러스 형질도입

[0427] HIV-특이적 CD4 T 세포의 비율이 증가되도록 PBMC 를 강화시키고 세포 생성물 AGT103T 가 생성되도록 이들 세포를 AGT103 로 형질도입하기 위한 디자인 및 시험 방법. 치료적 HIV 백신을 받은 HIV-양성 환자로부터의 PBMC (말초 혈액 단핵 세포) 의 생체외 배양에 대해 프로토콜을 디자인하였다. 이 실시예에서, 치료적 백신은 HIV Gag, Pol 및 Env 유전자를 발현하는 플라스미드 DNA 의 3 용량, 이후 동일한 HIV Gag, Pol 및 Env 유전자를 발현하는 MVA 62-B (변형된 백신시아 앙카라 번호 62-B) 의 2 용량으로 이루어졌다. 프로토콜은 백신 생성물에 대해 특이적이지 않으며 면역화 후 HIV-특이적 CD4+ T 세포의 충분한 수준만을 필요로 한다. 정맥혈을 수집하고, Ficoll-Paque 밀도 구배 원심분리에 의해 PBMC 를 정제하였다. 대안적으로는, PBMC 또는 규정된 세포 분획을 항체 각테일 및 형광 활성화 또는 자기 비드 분류를 사용하여 양성 또는 음성 선택 방법에 의해 제조할 수 있다. 정제한 PBMC 를 세척하고, 보충물, 항생제 및 소 태아 혈청을 함유하는 표준 배지에서 배양한다. 이러한 배양물에, 합성 펩티드 풀을 첨가하여 HIV Gag 폴리단백질 내 가능한 T 세포 에피토프를 표시한다. 인터류킨-2 및 인터류킨-12, 인터류킨-2 및 인터류킨-7, 인터류킨-2 및 인터류킨-15 의 조합

시험 후 선택된 사이토카인 인터류킨-2 및 인터류킨-12 를 첨가함으로써 배양물을 보충시킨다. 펩티드 자극 이후에는 대략 12 일의 배양 간격이 이어진다. 12 일 배양 동안, 신선한 배지 및 신선한 사이토카인 보충물을 대략 4 일에 1 회 첨가하였다.

- [0428] 펩티드 자극 간격은 PBMC 배양물에서 HIV-특이적 CD4 T 세포의 빈도를 증가시키도록 디자인된다. 이러한 HIV-특이적 CD4 T 세포는 사전 치료적 면역화에 의해 활성화되었으며, 재자극되고 합성 펩티드 노출에 의한 증식을 초래할 수 있다. 총 CD4 T 세포의 1% 이상이 펩티드 자극 배양 기간 말까지 HIV-특이적이도록 하는 것이 목표이다.
- [0429] 대략 배양 제 12 일에, 세포를 세척하여 잔여 물질을 제거한 다음, CD4 T 세포 표면 단백질 CD3 및 CD28 에 대한 항체를 갖는 합성 비드로 자극하였다. T 세포의 폴리클로날 자극을 위한 이러한 널리 확립된 방법은 세포를 재활성화시키고 이를 AGT103 렌티바이러스 형질도입에 보다 민감하게 만들 것이다. 렌티바이러스 형질도입을 대략 배양 제 13 일에 수행하고, 1 내지 5 의 감염 다중도를 사용한다. 형질도입 후, 세포를 세척하여 잔여 렌티바이러스 벡터를 제거하고, 신선한 배지 및 사이토카인을 대략 배양 제 24 일까지 대략 4 일에 1 회 첨가하면서, 인터류킨-2 및 인터류킨-12 를 함유하는 배지에서 배양한다.
- [0430] 배양 간격 전체에 걸쳐 항레트로바이러스 약물 사퀴나비르 (Saquinavir) 를 대략 100 nM 의 농도로 첨가하여, HIV 의 임의의 가능한 성장을 억제한다.
- [0431] 대략 배양 제 24 일에 세포를 수확하고, 세척하고, 역가 및 방출 어세이를 위해 샘플을 확보한 다음, 남아 있는 세포를 용량 당 대략 1×10^{10} 세포의 단일 분취액 중 동결하기 전에, 동결보존 배지에 현탁하는데, 이는 AGT103 으로 형질도입되는 대략 1×10^8 HIV-특이적 CD4 T 세포를 함유할 것이다.
- [0432] 세포 생성물 (AGT103T) 의 역가를 2 가지 대안적 역가 어세이 중 하나에서 시험한다. 역가 어세이 1 은 CD4 T 세포 당 계놈 카피 (통합된 AGT103 벡터 서열) 의 평균수를 시험한다. 최소 역가는 생성물 방출을 위해 CD4 T 세포 당 대략 0.5 계놈이다. 자기 비드 표지 모노클로날 항체를 사용하여 CD3 양성/CD4 양성 T 세포의 양성 선택에 의해 어세이를 수행하고, 총 세포 DNA 를 추출하고, 정량적 PCR 반응을 사용하여 AGT103 벡터에 고유한 서열을 검출한다. 역가 어세이 2 는 HIV-특이적 CD4 T 세포의 하위집단 내 통합된 AGT103 의 계놈 카피의 평균수를 시험한다. 이 어세이는 먼저 PBMC 를 HIV Gag 단백질을 나타내는 합성 펩티드 푸올로 자극하여 달성된다. 그런 다음, 세포를 CD4 T 세포에 결합할 수 있으며 또한 분비된 인터페론-감마 사이토카인을 포획할 수 있는 특이적 항체 시약으로 염색한다. CD4 양성/인터페론-감마 양성 세포를 자기 비드 선택에 의해 포획하고, 총 세포 DNA 를 제조하고, 세포 당 AGT103 의 계놈 카피 수를 정량적 PCR 반응으로 측정한다. 어세이 2 를 사용하는 역가 기반의 방출 기준은 HIV-특이적 CD4 T-세포 당 0.5 이상의 계놈 카피가 AGT103 세포 생성물에 존재하는 것을 요구한다.
- [0433] 치료적 HIV 백신을 받은 HIV-양성 환자의 PBMC 로부터의 HIV-특이적 CD4 T 세포를 강화하고 형질도입하기 위한 기능적 시험. HIV-특이적 CD4 T 세포의 빈도에 대한 치료적 백신접종의 영향을 펩티드 자극 어세이에 의해 시험하였다 (도 14 패널 B). 백신접종 전 HIV-특이적 CD4 T 세포의 빈도는 이러한 대표 개체에서 0.036% 였다. 백신접종 후, HIV-특이적 CD4 T 세포의 빈도는 0.076% 의 값으로 대략 2-배 증가하였다. 세포질 인터페론-감마의 축적에 의해 식별된 반응 세포 (HIV-특이적) 는, 특이적 펩티드 자극 후에만 검출되었다.
- [0434] HIV-특이적 CD4 T 세포를 강화시키기 위한 펩티드 자극 이후 AGT103 형질도입이, HIV-특이적이며 AGT103 에 의해 형질도입된 배양물 중 총 CD4 T 세포의 대략 1% 를 생성시키는 목표에 도달했는지 여부를 또한 시험하였다. 이러한 경우, 녹색 형광 단백질 (GFP 참조) 을 발현하는 AGT103 의 실험적 형태를 사용하였다. 도 14, 패널 C 에서 펩티드 자극 (HIV (GAG) Ultra) 및 AGT103 형질도입 이후의 백신접종 후 배양은, 총 CD4 T 세포의 1.11% 가 HIV-특이적 (펩티드 자극에 반응하여 인터페론-감마를 발현하는 것을 기반으로 함) 이며 AGT103 형질도입 (GFP 의 발현을 기반으로 함) 되었음을 입증하였다.
- [0435] 치료적 HIV 백신 연구로부터의 여러 환자를 시험하여, 펩티드 자극에 대한 응답 범위를 평가하고 향후 인간 임상 시험에서 유전자 요법 부문 (arm) 에 도입하기 위한 적격성 기준을 규정하기 시작하였다. 도 18 패널 D 는 4 명의 백신 시험 참여자에서 HIV-특이적 CD4 T 세포의 빈도를, 그의 백신접종 전 및 백신접종 후 표본과 비교하여 나타낸다. 중요하게는, 3 경우에서, 백신접종 후 표본은 총 CD4 T 세포의 0.076% 이상인 HIV-특이적 CD4 T 세포의 값을 나타낸다. 이 값에 이르기 위한 능력은, 환자 001-004 및 환자 001-006 모두가 0.02% HIV-특이적 CD4 T 세포의 백신접종 전 값으로 출발하였으나, 한 개체는 0.12% HIV-특이적 CD4 T 세포의 궁극적 백신접종 후 값에 도달한 한편 다른 개체는 백신접종 이후 이 값을 증가시키는데 실패한 바에 따라, 백신접종

전 표본에 의해 예측되지 않았다. HIV-특이적 CD4 T 세포의 빈도 증가 면에 있어서 백신에 잘 반응한 동일한 3 명의 환자는 또한 펩티드 자극 및 배양 후 HIV-특이적 CD4 T 세포의 실질적 강화를 나타내었다. 도 18 패널 E 에서 나타난 3 가지 경우에서, 펩티드 자극 및 후속 배양으로, 각각 총 CD4 T 세포의 2.07%, 0.72% 또는 1.54% 가 HIV-특이적인, 샘플이 생성되었다. 이러한 값은, 다수의 개체가 치료적 HIV 백신에 반응하는 다수의 개체가 펩티드 자극에 대해 충분히 큰 생체의 응답을 가져, 최종 세포 생성물에서 HIV-특이적이고 AGT103 으로 형질도입되는 총 CD4 T 세포의 대략 1% 를 달성하는 목표를 가능하게 할 것임을 나타낸다.

[0436] 도 18 에서 나타낸 바와 같이, 패널 A 는 치료 스케줄을 설명한다. 패널 B 는 PBMC 가 Gag 펩티드 또는 DMSO 대조군으로 20 시간 동안 자극되었음을 보여준다. IFN 감마 생산은 FACS 에 의한 세포내 염색에 의해 검출되었다. CD4⁺ T 세포를 분석을 위해 게이팅하였다. 패널 C 는 CD4⁺ T 세포가 팽창되었으며 패널 A 에서 나타낸 바와 같은 방법을 사용하여 AGT103-GFP 로 형질도입되었음을 보여준다. 팽창된 CD4⁺ T 세포를 어떠한 사이토카인도 갖지 않는 신선한 배지에서 2 일 동안 휴지시키고 Gag 펩티드 또는 DMSO 대조군으로 20 시간 동안 재-자극하였다. IFN 감마 생산 및 GFP 발현을 FACS 에 의해 검출하였다. CD4⁺ T 세포를 분석을 위해 게이팅하였다. 패널 D 는 HIV-특이적 CD4⁺ T 세포 (IFN 감마 양성, 백신접종 전 및 후) 의 빈도가 본원에서 토의한 바와 같이 4 명의 환자로부터 검출되었음을 보여준다. 패널 E 는 4 명의 환자로부터의 백신 접종 후 PBMC 가 팽창되었으며 HIV-특이적 CD4⁺ T 세포가 검사되었음을 보여준다.

[0437] **실시예 15: 용량 응답**

[0438] *벡터 구축.* AGT103 의 변형된 형태를 구축하여, AGT103 을 증가시키기 위한 용량 응답 및 세포 표면 CCR5 수준에 대한 그의 효과를 시험하였다. AGT103 을 CMV 프로모터의 제어 하 녹색 형광 단백질 (GFP) 발현 카세트가 포함되도록 변형하였다. 형질도입된 세포는 miR30CCR5 miR21Vif miR185Tat micro RNA 클러스터를 발현하며 GFP 발현으로 인해 녹색 광을 방사한다.

[0439] *AGT103-GFP 를 증가시키는 용량 반응 및 CCR5 발현 저해에 대한 기능적 어세이.* CEM-CCR5 T 세포를 0 내지 5 의 감염 다중도를 사용하여 AGT103-GFP 로 형질도입하였다. 형질도입된 세포를 세포 표면 CCR5 에 특이적인 형광 컨쥬게이션된 (APC) 모노클로날 항체로 염색하였다. 염색 세기는 세포 표면 당 CCR5 분자의 수에 비례한다. 녹색 형광의 세기는 세포 당 통합된 AGT103-GFP 카피의 수에 비례한다.

[0440] 도 19 에서 나타낸 바와 같이, 패널 A 는 AGT103-GFP 를 증가시키기 위한 용량 응답 및 세포 표면 CCR5 발현에 대한 그의 효과를 보여준다. 0.4 의 감염 다중도에서 오직 1.04% 의 세포가 모두 녹색 (형질도입을 나타냄) 이며 상당히 감소된 CCR5 발현을 나타낸다. 1 의 감염 다중도에서 CCR5^{low}, GFP⁺ 세포의 수는 68.1% 로 증가한다. 5 의 감염 다중도에서 CCR5^{low}, GFP⁺ 세포의 수는 95.7% 로 증가하였다. 이러한 데이터를 AGT103-GFP 의 용량 증가와 함께 더 낮은 평균 형광 세기로 이동하는, CCR5 염색 면에 있어서 보통의 분포 집단을 보여주는 도 19, 패널 B 에서의 히스토그램 형태로 제시한다. AGT103-GFP 의 역가를 도 19 에서 그래프 형태로 제시하며, 패널 C 는 AGT103-GFP 의 용량 증가와 함께 CCR5 발현의 저해 백분율을 보여준다. 5 의 감염 다중도에서, CCR5 발현 수준에 있어서 99% 초과 감소가 있었다.

[0441] **실시예 16: AGT103 은 1 차 인간 CD4⁺ T 세포를 효율적으로 형질도입함**

[0442] *AGT103 렌티바이러스 벡터로의 1 차 CD4 T 세포의 형질도입.* 녹색 형광 단백질 마커 (GFP) 를 포함하는 변형된 AGT103 벡터를, 정제된, 1 차 인간 CD4 T 세포를 형질도입하기 위해 0.2 내지 5 의 감염 다중도에서 사용하였다.

[0443] *1 차 인간 CD4 T 세포에서의 AGT103 의 형질도입 효율에 대한 기능적 어세이.* CD4 T 세포를, 자기 비드 표지 항체 및 표준 절차를 사용하여 인간 PBMC (HIV-음성 공여자) 로부터 단리하였다. 정제된 CD4 T 세포를 CD3/CD28 비드로 생체의 자극하고, AGT103 형질도입 전 1 일 동안 인터류킨-2 함유 배지에서 배양하였다. 렌티바이러스 벡터 용량 (감염 다중도) 과 형질도입 효율 사이의 관계를 도 20 에서 보여주며, 패널 A 는 0.2 의 감염 다중도로, AGT103 에 의해 형질도입되는 9.27% 의 CD4 양성 T 세포가 초대되며 이 값이 5 의 감염 다중도로 AGT103 에 의해 형질도입되는 63.1% 의 CD4 양성 T 세포로 증가하였다는 것을 나타낸다. 1 차 CD4 양성 T 세포의 효율적인 형질도입을 달성하는데 추가로, 세포 당 계놈 카피의 수를 정량화하는 것이 또한 필요하다. 도 20, 패널 B 에서 여러 다중 감염도에서 형질도입된 1 차 인간 CD4 T 세포로부터의 총 세포 DNA 를 정량적 PCR 에 의해 시험하여, 세포 당 계놈 카피의 수를 측정하였다. 0.2 의 감염 다중도에서, 패널 A 에

서의 9.27% GFP 양성 CD4 T 세포와 잘 일치한 세포 당 0.096 게놈 카피가 측정되었다. 1의 감염 다중도는 세포 당 0.691 게놈 카피를 생성하였고, 5의 감염 다중도는 세포 당 1.245 게놈 카피를 생성하였다.

[0444] 도 20에서 나타낸 바와 같이, PBMC로부터 단리된 CD4⁺ T 세포를 CD3/CD28 비드 + IL-2로 1일 동안 자극하고, 다양한 농도에서 AGT103으로 형질도입하였다. 2일 후, 비드를 제거하고 CD4⁺ T 세포를 수집하였다. 패널 A에서 나타낸 바와 같이, 형질도입된 세포 (GFP 양성)의 빈도를 FACS에 의해 검출하였다. 패널 B에서 나타낸 바와 같이, 세포 당 벡터 카피의 수를 qPCR에 의해 측정하였다. 5의 감염 다중도 (MOI)에서, 63%의 CD4⁺ T 세포가 세포 당 평균 1 벡터 카피로 형질도입되었다.

[0445] **실시예 17: AGT103은 1차 CD4⁺ T 세포에서의 HIV 복제를 저해함**

[0446] AGT103으로 세포를 형질전환함에 의한 HIV 감염으로부터의 1차 인간 CD4 양성 T 세포의 보호. 치료적 렌티바이러스 AGT103을 세포 당 0.2 내지 5의 감염 다중도에서 1차 인간 CD4 양성 T 세포를 형질도입하는데 사용하였다. 그런 다음, 형질도입된 세포를, 투과를 위해 세포 표면 CCR5를 필요로 하지 않는 CXCR4-향성 HIV 균주 NL4.3으로 챌린지하였다. 이 어세이는 1차 CD4 양성 T 세포에서의 증식성 감염을 예방하는 면에 있어서 HIV의 Vif 및 Tat 유전자에 대한 microRNA의 역할을 시험하지만, 감염된, 1차 인간 CD4 T 세포로부터 방출된 HIV의 양을 검출하기 위한 간접적인 방법을 사용한다.

[0447] 1차 인간 CD4 양성 T 세포의 CXCR4-향성 HIV 감염에 대한 AGT103 보호의 기능적 어세이. CD4 T 세포를 자기 비드 표지 항체 및 표준 절차를 사용하여 인간 PBMC (HIV-음성 공여자)로부터 단리하였다. 정제한 CD4 T 세포를 CD3/CD28 비드로 생체의 자극하고, 0.2 내지 5의 감염 다중도를 사용하여 AGT103 형질도입 전 1일 동안 인터류킨-2 함유 배지에서 배양하였다. 형질도입 2일 후, CD4 양성 T 세포 배양물을, 녹색 형광 단백질 (GFP)을 발현하도록 조작된 HIV 균주 NL4.3으로 챌린지하였다. 형질도입된 및 HIV-노출된 1차 CD4 T 세포 배양물을, HIV를 함유하는 무-세포 배양액 수집 전에 7일 동안 유지시켰다. 무-세포 배양액을 2일 동안 고도 허용성 T 세포주 C8166을 감염시키는데 사용하였다. HIV-감염된 C8166 세포의 비율을, GFP 형광을 검출하는 유세포 분석에 의해 측정하였다. 모의 (mock) 렌티바이러스 감염으로는, NL4.3 HIV에 대한 0.1 감염 다중도 용량이 15.4%의 C8166 T 세포에서 증식성 감염을 확립시킬 수 있는 배양액에 상당량의 HIV가 방출되게 하였다. AGT103에 대한 0.2 감염 다중도의 용량으로는, C8166 세포의 HIV 감염에 대한 이 값이 5.3%로 감소되고, AGT103에 대한 1 감염 다중도는 3.19%의 C8166 T 세포만이 HIV에 의해 감염되게 하였다. C8166 감염은 5의 감염 다중도를 사용하는 AGT103 형질도입 후, 0.62%로 더 감소되었다. 형질도입에 사용한 AGT103의 양과 배양 배지에 방출된 HIV의 양 사이에 명백한 용량 응답 관계가 존재한다.

[0448] 도 21에서 나타낸 바와 같이, PBMC로부터 단리된 CD4⁺ T 세포를 CD3/CD28 비드 + IL-2로 1일 동안 자극하고, 다양한 농도 (MOI)에서 AGT103으로 형질도입하였다. 2일 후, 비드를 제거하고 CD4⁺ T 세포를 0.1 MOI의 HIV NL4.3-GFP로 감염시켰다. 24시간 이후, 세포를 PBS로 3회 세척하고 7일 동안 IL-2 (30U/ml)와 함께 배양하였다. 배양 말미에, 상청액을 수집하여 2일 동안 HIV 허용성 세포주 C8166을 감염시켰다. HIV-감염된 C8166 세포 (GFP 양성)를 FACS에 의해 검출하였다. C8166 세포의 덜한 감염에 의해 관찰되는 바와 같이, AGT103의 감염 다중도가 증가하면서, 생존가능 HIV에 감소가 있었다 (MOI 0.2=65.6%, MOI 1= 79.3%, 및 MOI 5=96%).

[0449] **실시예 18: AGT103은 HIV-유도된 고갈로부터 1차 인간 CD4⁺ T 세포를 보호함**

[0450] HIV-매개 세포병리 및 세포 고갈에 대하여 보호하기 위한 1차 인간 CD4 T 세포의 AGT103 형질도입. PBMC를 건강한, HIV-음성 공여자로부터 입수하고, CD3/CD28 비드로 자극한 후, 0.2 내지 5의 감염 다중도를 사용하는 AGT103 형질도입 전에, 인터류킨-2 함유 배지에서 1일 동안 배양하였다.

[0451] HIV-매개 세포병리에 대하여 1차 인간 CD4 T 세포의 AGT103 보호의 기능적 어세이. AGT103-형질도입된 1차 인간 CD4 T 세포를, 세포 유입을 위해 CCR5를 요구하지 않는 HIV NL 4.3 균주 (CXCR4-향성)로 감염시켰다. CXCR4-향성 NL 4.3을 사용하는 경우, HIV 복제에 대한 Vif 및 Tat microRNA의 효과만을 시험한다. HIV NL 4.3의 용량은 0.1 감염 다중도였다. HIV 감염 1일 후, 세포를 세척하여 잔여 바이러스를 제거하고, 배지 + 인터류킨-2 중에서 배양하였다. 14일 배양 동안 3일마다 세포를 수집한 다음, CD4에 대해 특이적이며 PBMC 중 CD4 양성 T 세포의 비율이 측정될 수 있도록 형광 마커에 직접 컨주게이션된 모노클로날 항체로 염색하였다. 미처리된 CD4 T 세포, 또는 대조군 렌티바이러스 벡터로 형질도입된 CD4 T 세포는

HIV 켈린지에 매우 민감하였으며 PBMC 중 CD4 양성 T 세포의 비율은 제 14 일 배양까지 10% 미만으로 감소하였다. 반대로, HIV 켈린지에 의한 세포 고갈 예방에 대해, AGT103 의 용량-의존적 효과가 존재하였다. 0.2 감염 다중도의 AGT103 용량으로는 20% 초과와 PBMC 가 제 14 일의 배양까지 CD4 T 세포였으며, 이 값은 5 의 감염 다중도의 AGT103 용량으로의 제 14 일 배양까지 CD4 양성 T 세포인 50% 초과와 PBMC 로 증가하였다. 다시금, 인간 PBMC 에서의 HIV 세포병원성에 대한 AGT103 의 명백한 용량 응답 효과가 있었다.

[0452] 도 22 에서 나타낸 바와 같이, PBMC 를 1 일 동안 CD3/CD28 비드 + IL-2 로 자극하고, 다양한 농도 (MOI) 에서 AGT103 으로 형질도입하였다. 2 일 후, 비드를 제거하고 세포를 0.1 MOI 의 HIV NL4.3 으로 감염시켰다. 24 시간 이후, 세포를 PBS 로 3 회 세척하고, IL-2 (30U/ml) 와 함께 배양하였다. 세포를 3 일마다 수집하고, CD4⁺ T 세포의 빈도를 FACS 에 의해 분석하였다. HIV 에 대한 노출 14 일 후, LV-대조군으로 형질도입된 CD4⁺ T 세포에서 87% 감소가 있었고, AGT103 MOI 0.2 로는 60% 감소가 있었고, AGT103 MOI 1 로는 37% 감소가 있었으며, AGT103 MOI 5 로는 17% 감소가 있었다.

[0453] **실시예 19: HIV-특이성을 위해 강화되고 AGT103/CMV-GFP 로 형질도입된 CD4+ T 세포 집단의 생성**

[0454] HIV 에 대한 치료적 백신접종은 CD4+, CD8+ 및 CD4+/CD8+ T 세포의 분포에 대해 최소의 효과를 가졌다. 도 23A 에서 나타낸 바와 같이, CD4 T 세포 집단을 분석적 유세포 분석 도트 플롯의 상부 좌측 사분면에서 나타내며, 연속 백신접종 이후 총 T 세포의 52% 에서 57% 로 변화한다. 이들은 대표 데이터이다.

[0455] HIV 치료적 백신 시험에서의 참여자로부터의 말초 혈액 단핵 세포를 +/- 인터류킨-2/인터류킨-12 또는 +/- 인터류킨-7/인터류킨-15 인 배지에서 12 일 동안 배양하였다. 일부 배양물을, T 세포 자극을 위한 에피토프 펩티드의 공급원으로서 HIV-1 의 전체 p55 Gag 단백질 (HIV (GAG) Ultra 펩티드 혼합물) 을 나타내는 오버랩 펩티드로 자극하였다. 이들 펩티드는 10-20 아미노산 길이며, 그의 길이의 20-50% 가 오버랩되어 HIV-1 BaL 균주로부터의 전체 Gag 전구체 단백질 (p55) 을 나타낸다. 우세한 순환 HIV 서열에서의 국지적 변이를 보완하기 위해, 또는 상세한 서열 정보가 이러한 요법을 받는 개별 환자에게 이용가능한 경우, 개별 펩티드의 조성 및 서열을 조정할 수 있다. 배양 말미에, 세포를 회수하고 항-CD4 또는 항-CD8 모노클로날 항체로 염색하고, CD3+ 집단을 게이팅하고 디스플레이하였다. 백신접종 전 또는 후 샘플에 대한 HIV (GAG) Ultra 펩티드 혼합물 자극은 배지 대조군과 유사하였는데, 이는 HIV (GAG) Ultra 펩티드 혼합물이 세포에 독성이 아니며 폴리클로날 미토겐으로 작용하지 않았다는 것을 나타낸다. 이 분석의 결과를 도 23B 에서 발견할 수 있다.

[0456] HIV (GAG) Ultra 펩티드 혼합물 및 인터류킨-2/인터류킨-12 는 항원-특이적 CD4 T 세포의 최적 팽창을 제공하였다. 도 23C 의 상부 패널에서 나타낸 바와 같이, HIV (GAG) Ultra 펩티드 혼합물에 노출된 백신접종 후 표본에서 사이토카인 (인터페론-감마) 분비 세포에 있어서 증가가 있었다. 백신접종 전 샘플에서, 사이토카인 분비 세포는 항원성 펩티드에 대한 노출의 결과로서 0.43% 에서 0.69% 로 증가하였다. 반대로, 백신접종 후 샘플은 펩티드 자극의 결과로서 총 CD4 T 세포의 0.62% 에서 1.76% 로 사이토카인 분비 세포 증가를 나타내었다. 이러한 데이터는 HIV 항원에 대한 CD4 T 세포 응답에 대한 백신접종의 강한 영향을 입증한다.

[0457] 마지막으로, 항원-팽창된 CD4 T 세포의 AGT103/CMV-GFP 형질도입은 HIV 에 대한 기능적 치유의 일부로서 환자에 투입에 필요한 HIV-특이적 및 HIV-저항성 헬퍼 CD4 T 세포를 생성하였다 (다른 다양한 양상 및 구현예에 따라서, AGT103 단독이 사용되고; 예를 들어, 임상적 구현예는 CMV-GFP 세그먼트를 포함하지 않을 수 있음). 도 23C 의 상부 패널은 배양물 중 CD4+ T 세포 집단을 분석하는 결과를 나타낸다. 도 23C 의 x 축은, 개별 세포가 AGT103/CMV-GFP 로 형질도입된 것을 표시하는 녹색 형광 단백질 (GFP) 방출을 나타낸다. 백신접종 후 샘플에서 모두 사이토카인 분비인 총 CD4 T 세포의 1.11% 가 회수되었는데, 이는 세포가 HIV 항원에 특이적으로 반응하며, AGT103/CMV-GFP 로 형질도입된다는 것을 나타낸다. 이는 표적 세포 집단이며, HIV 의 투입과 기능적 치유를 위해 의도된 임상적 생성물이다. 항원 자극 및 생체의 배양의 후속 폴리클로날 팽창 단계 동안 세포 팽창의 효율로, 4×10^8 항원-특이적, 렌티바이러스 형질도입된 CD4 T 세포를 생성할 수 있다. 이는 세포 생산을 위해 4-배로 표적을 초과하며, 대략 40 세포/ μ l (혈액) 의 항원-특이적 및 HIV-저항성 CD4 T 세포의 수 또는 총 순환 CD4 T 세포의 약 5.7% 를 달성하게 할 것이다.

[0458] 하기 표 4 는 개시된 벡터 및 방법을 사용하여 HIV-특이적 및 HIV-저항성 CD4 T 세포의 생체의 생산의 결과를 나타낸다.

표 4			
물질/조작	총 CD4 T 세포	HIV-특이적 백분율	HIV-특이적 및 HIV-저항성 백분율
HIV+ 환자로 부터의 백혈구성분채집술 액	~7x10 ⁸	~0.12	N/A
생체의 펩티드 팽창	~8x10 ⁸	~2.4	N/A
미토겐 팽창	~1.5x10 ¹⁰	~2.4	N/A
렌티바이러스 형질도입	~1.5x10 ¹⁰	~2.4	~1.6

[0459]

[0460] 실시예 20: 면역화를 갖지 않는 HIV-양성 대상체의 치료를 위한 임상적 연구

[0461] AGT103T 은, AGT103 렌티바이러스 벡터로 또한 형질도입된 $\geq 5 \times 10^7$ HIV-특이적 CD4 T 세포를 함유하는 유전적으로 변형된 자가유래 PBMC 이다.

[0462] I 상 임상 시험은, 확인된 HIV 감염을 갖고, 혈액 mm³ 당 CD4+ T-세포 수 >600 세포 및 cART 에 있으면서 혈장 ml 당 200 카피 미만의 안정한 바이러스 억제력을 갖는 성인 연구 참여자에서의 생체의 변형된 자가유래 CD4 T 세포 (AGT103T) 의 안전성 및 투입 실행가능성을 시험할 것이다. 모든 연구 참여자는 I 상 임상 시험 전체에 걸쳐 그의 표준 항레트로바이러스 약물을 지속적으로 받을 것이다. 연구 참여자는 HIV-1 Gag 폴리단백질을 나타내는 오버랩, 합성 펩티드의 푸울로의 자극에 반응하는 CD4+ T-세포의 빈도를 측정하기 위한 시험관내 시험을 위해 혈액을 제출함으로써 스크리닝된다. Gag-특이적 CD4 T 세포로서 지정된 총 CD4 T 세포의 $\geq 0.065\%$ 를 갖는 대상체를 유전자 요법 연구에 등록시키고 백혈구성분채집술을 거친 후, PBMC 를 정제하여 (Ficoll 밀도 구배 원심분리 또는 항체로의 음성 선택 사용) 이를 생체의 배양하고 HIV Gag 펩티드 + 인터류킨-2 및 인터류킨-12 로 12 일 동안 자극한 다음, CD3/CD28 이중특이적 항체를 갖는 비드로 다시 자극한다. 항레트로바이러스 약물 사퀴나비르를 100 nM 에서 포함시켜, 생체의 배양 동안 자가유래 HIV 의 출현을 예방한다. CD3/CD28 자극 1 일 후에 세포를 1 내지 10 의 감염 다중도에서 AGT103 로 형질도입한다. 형질도입된 세포를 추가 7-14 일 동안 배양하며, 이 기간 동안 세포는 폴리클로날 증식에 의해 팽창된다. 배양 기간을 세포를 수확 및 세척하여 종로시키고, 역가 및 안전성 방출 어세이를 위해 분취액을 확보하고, 남아 있는 세포를 동결보존 배지에 재현탁한다. 단일 용량은 $\leq 1 \times 10^{10}$ 자가유래 PBMC 이다. 역가 어세이는 인터페론-감마를 발현함으로써 펩티드 자극에 반응하는 CD4 T 세포의 빈도를 측정한다. 다른 방출 기준은, 생성물이 AGT103 으로 또한 형질도입되는 $\geq 0.5 \times 10^7$ HIV-특이적 CD4 T 세포를 포함해야 한다는 것을 포함한다. 또다른 방출 기준은 세포 당 AGT103 게놈 카피의 수가 3 을 초과해서는 안된다는 것이다. AGT103T 으로의 투입 5 일 전에 대상체는 부숄푸람 (또는 사이톡산 또는 플루다라빈 또는 적합한 약물 조합) 전처치 (conditioning regimen) 의 1 용량, 이후 유전적으로 변형된 CD4 T 세포를 함유하는 $\leq 1 \times 10^{10}$ PBMC 의 투입을 받는다.

[0463] II 상 연구는 AGT103T 세포 요법의 효능을 평가할 것이다. II 상 연구 참여자는, 유전적으로 변형된, 자가유래, HIV-특이적 CD4 T 세포의 성공적이고 안정한 이식 및 효능 평가 (1.3.) 에서 기재된 바와 같이 모니터링된 매개변수에 있어서 긍정적 변화로서 정의된 임상적 응답을 갖는 것으로 판단된 I 상 연구에 사전에 등록된 개인을 포함한다. 연구 참여자는 그의 현존 항레트로바이러스 약물 치료계획에 마라비록 (Maraviroc) 을 추가할 것을 요청받을 것이다. 마라비록은 CCR5 수준을 감소시키는 것으로 유도된 유전적 요법의 유효성을 강화시킬 CCR5 안타고니스트이다. 마라비록 치료계획이 준비가 되면, 대상체는 이전의 항레트로바이러스 약물 치료계획을 중단하고 마라비록 단일요법만을 28 일 동안, 또는 혈장 바이러스 RNA 수준이 2 회 순차적 매주 채혈에서 1 ml 당 10,000 를 초과할 때까지 유지할 것을 요청받을 것이다. 꾸준히 높은 바이러스혈증은, 참여자가 HIV 치료의 권고에 따라 마라비록이 존재하거나 부재하는 그의 본래 항레트로바이러스 약물 치료계획으로 되돌아가는 것을 요구한다.

[0464] 마라비록 단일요법에서 >28 일 동안 참여자가 HIV 억제된 채 남아 있는 경우 (혈장 1 ml 당 2,000 vRNA 카피 미만), 이들은 4 주의 기간에 걸쳐 마라비록 투여를 서서히 감소시킨 후 추가 28 일 동안 집중적 모니터링을 실시

하도록 요청받을 것이다. 마라비록 단일요법으로 HIV 억제가 유지된 대상체는 기능적 치유를 갖는 것으로 간주된다. 마라비록 철회 후에도 HIV 억제를 유지하는 대상체는 또한 기능적 치유를 갖는다. 6 개월 동안 매달 모니터링 후 덜 집중적인 모니터링으로, 기능적 치유의 지속성이 확립될 것이다.

[0465] **1.1 환자 선택**

[0466] **포함 기준:**

- [0467] · 18 세 내지 60 세의 연령.
- [0468] · 연구 참가 이전에 문서화된 HIV 감염.
- [0469] · 연구 기간 동안 (의학상으로 표시되어 있지 않은 한) 그의 항레트로바이러스 치료계획을 변화시키지 않는 것을 포함하여; 연구-규정된 평가를 준수하고자 하는 의향이 있어야 함.
- [0470] · CD4+ T-세포 수 세제곱 밀리리터 당 > 600 세포 (세포/mm³)
- [0471] · CD4+ T-세포 최하점 > 400 세포/mm³
- [0472] · HIV 바이러스 부하 밀리리터 (mL) 당 > 1,000 카피

[0473] **배제 기준:**

- [0474] · 임의의 간염 바이러스
- [0475] · 급성 HIV 감염
- [0476] · HIV 바이러스 부하 > 1,000,000 카피/mL
- [0477] · 활성 또는 최근의 (6 개월 전) AIDS 규정 합병증
- [0478] · 연구 진입 12 주 내에 HIV 약물 변화
- [0479] · 성공적으로 치료된 피부의 기저 세포 암종을 제외하고 적어도 5 년 동안 차도가 없는 암 또는 악성 종양
- [0480] · NYHA 등급 3 또는 4 울혈성 심부전 또는 제어되지 않는 협심증 또는 부정맥의 현재 진단
- [0481] · 출혈 문제의 이력
- [0482] · 지난 30 일 내에 만성적인 스테로이드 사용
- [0483] · 임신 또는 모유 수유
- [0484] · 활성 약물 또는 알코올 남용
- [0485] · 지난 30 일 내에 심각한 질병
- [0486] · 또다른 임상 시험 또는 임의의 사전 유전자 요법에 현재 참여 중

[0487] **1.2 안전성 평가**

- [0488] · 급성 투입 반응
- [0489] · 투입후 안전성 추적 (follow-up)

[0490] **1.3 효능 평가 - I 상**

- [0491] · 변형된 CD4 T 세포의 수 및 빈도.
- [0492] · 변형된 CD4 T 세포의 지속성.
- [0493] · 메모리 T 세포 기능에 대한 측정으로서 Gag 펩티드 재자극에 대한 시험관내 응답 (ICS 어세이).
- [0494] · 백신접종 전 및 후 시점과 비교하여 다기능성 항-HIV CD8 T 세포 응답.
- [0495] · 시험관내 자극 후 이중 스플라이싱된 HIV mRNA 를 생성하는 CD4 T 세포의 빈도.

[0496] **1.4 효능 평가 - II 상**

- [0497] · 유전적으로 변형된 CD4 T 세포의 수 및 빈도.

- [0498] ·마라비록 단일요법으로의 바이러스 억제 유지 (1 ml 당 < 2,000 vRNA 카피이지만 1 ml 당 5×10^4 vRNA 카피를 초과하지 않는 2 회 연속 매주 도출이 허용됨).
- [0499] ·마라비록 철회 동안 또는 이후에 지속된 바이러스 억제.
- [0500] ·안정한 CD4 T 세포 수.
- [0501] **실시예 21: 펩티드 자극 전 CD8+ T 세포의 고갈을 통한 CD4+ T 세포 집단의 생성**
- [0502] CD8+ T 세포 과도성장이 표적 CD4+ T 세포의 팽창에 상당히 영향을 주었으므로, CD8+ T 세포는 CD4+ T 세포 팽창을 개선시켰는지 여부를 결정하기 위해 세포 팽창 초반에 고갈되었다. 현재 CD8+ T 세포 고갈 방법은 세포가 자기 컬럼을 통과하는 것을 요구한다. 항원 제시 세포 및 CD4+ T 세포에 대한 상기 절차의 가능한 영향을 방지하기 위해, 세포 고갈을 펩티드 자극 후 및 렌티바이러스 형질도입 전 (세포가 기계적 응력을 보다 더 양호하게 견딜 수 있는 경우) 수행하였다.
- [0503] 보다 특히, HIV 양성 인간 말초 혈액을 수득하였다. PBMC 를 Ficoll-Paque PLUS (GE Healthcare, Cat: 17-1440-02) 로 분리하였다. 새로이 분리된 PBMC (1×10^7) 를 18 시간 동안 24-웰 플레이트에서의 1 mL 배지 중 PepMix™ HIV (GAG) Ultra (Cat: PM-HIV-GAG, JPT Peptide Technologies, Berlin, Germany) 로 자극하였다. CD8+ T 세포를 PE 항-인간 CD8 항체 및 항-PE 마이크로비드로 고갈시켰다. 음성적으로 선택된 세포를 IL-7 (170-076-111, Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Germany), IL-15 (170-076-114, Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Germany) 및 사쿠나비르 (Cat: 4658, NIH AIDS Reagent Program, Germantown, MD) 를 함유하는 TexMACS GMP 배지 (Cat: 170-076-309, Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Germany) 에서 2×10^6 /mL 로 배양하였다. 렌티바이러스 AGT103 을 24 시간 이후에 MOI 5 에서 첨가하였다. IL-7, IL-15 및 사쿠나비르를 함유하는 신선한 배지를 팽창 동안 2-3 일마다 첨가하였다. IL-7/IL-15 의 최종 농도는 10 ng/mL 였다. 사쿠나비르의 최종 농도는 100 nM 였다. 제 12-16 일에서, $2-3 \times 10^6$ 세포를 펩티드 재자극 및 세포내 사이토카인 염색 (ICS) 분석을 위해 수집하였다. 이러한 고갈 프로토콜의 도식을 도 24 에 나타낸다.
- [0504] CD8+ T 세포가 고갈된 경우, HIV-특이적 CD4 T 세포 팽창은 상당히 개선되었다 (도 25A-C). 그러나, Vδ1 T 세포 (PTID 01-006) (도 25A) 및 NK 세포 (PTID 01-008) (도 25C) 에 의한 과도성장이 관찰되었다.
- [0505] 도 25A 를 참조하여, 제 0 일에, 대조군의 하부 좌측 사분면, 하부 우측 사분면, 상부 좌측 사분면 및 상부 우측 사분면은 각각 44.5%, 55.5%, 0.032% 및 0% 의 형광 세기를 가졌다. 제 0 일에, GagPepMix 의 하부 좌측 사분면, 하부 우측 사분면, 상부 좌측 사분면 및 상부 우측 사분면은 각각 44.2%, 55.3%, 0.48% 및 0.053% 의 형광 세기를 가졌다. 제 12 일에, CD8 고갈 없이, 대조군의 하부 좌측 사분면, 하부 우측 사분면, 상부 좌측 사분면 및 상부 우측 사분면은 각각 79.8%, 20.1%, 0.12% 및 0.018% 의 형광 세기를 가졌다. 제 12 일에, CD8 고갈 없이, GagPepMix 의 하부 좌측 사분면, 하부 우측 사분면, 상부 좌측 사분면 및 상부 우측 사분면은 각각 58.9%, 19.2%, 21.2% 및 0.69% 의 형광 세기를 가졌다. 제 12 일에, CD8 고갈 존재 하, 대조군의 하부 좌측 사분면, 하부 우측 사분면, 상부 좌측 사분면 및 상부 우측 사분면은 각각 64.4%, 35.0%, 0.44% 및 0.14% 의 형광 세기를 가졌다. 제 12 일에, CD8 고갈 존재 하, GagPepMix 의 하부 좌측 사분면, 하부 우측 사분면, 상부 좌측 사분면 및 상부 우측 사분면은 각각 61.9%, 32.9%, 3.47% 및 1.70% 의 형광 세기를 가졌다.
- [0506] 제 12 일에, CD8 고갈 존재 하, 변수로서 CD4 및 CD8 을 사용하여 게이팅 데이터를 또한 생성하였다. 하부 좌측 사분면, 하부 우측 사분면, 상부 좌측 사분면 및 상부 우측 사분면은 각각 45.5%/45.3%, 44.9%, 9.26% 및 0.35% 의 형광 세기를 가졌다. 추가로, 변수로서 Vδ1 및 Vδ2 를 사용하여 게이팅 데이터를 생성하였다. 하부 좌측 사분면, 하부 우측 사분면, 상부 좌측 사분면 및 상부 우측 사분면은 각각 16.9%, 82.8%, 0.14% 및 0.12% 의 형광 세기를 가졌다.
- [0507] 도 25B 를 참조하여, 제 0 일에, 대조군의 하부 좌측 사분면, 하부 우측 사분면, 상부 좌측 사분면 및 상부 우측 사분면은 각각 33.6%, 66.4%, 5.9×10^{-4} 및 1.78×10^{-3} 의 형광 세기를 가졌다. 제 0 일에, GagPepMix 의 하부 좌측 사분면, 하부 우측 사분면, 상부 좌측 사분면 및 상부 우측 사분면은 각각 33.7%, 66.3%, 0.011% 및 0.016% 의 형광 세기를 가졌다. 제 16 일에, CD8 고갈 없이, 대조군의 하부 좌측 사분면, 하부 우측 사분면, 상부 좌측 사분면 및 상부 우측 사분면은 각각 78.4%, 21.2%, 0.30% 및 0.018% 의 형광 세기를 가졌다.

제 16 일에, CD8 고갈 없이, GagPepMix 의 하부 좌측 사분면, 하부 우측 사분면, 상부 좌측 사분면 및 상부 우측 사분면은 각각 76.3%, 20.2%, 2.95% 및 0.61% 의 형광 세기를 가졌다. 제 16 일에, CD8 고갈의 존재 하, 대조군의 하부 좌측 사분면, 하부 우측 사분면, 상부 좌측 사분면 및 상부 우측 사분면은 각각 50.9%, 48.7%, 0.36% 및 0.10% 의 형광 세기를 가졌다. 제 16 일에, CD8 고갈의 존재 하, GagPepMix 의 하부 좌측 사분면, 하부 우측 사분면, 상부 좌측 사분면 및 상부 우측 사분면은 각각 51.6%, 44.4%, 0.43% 및 3.60% 의 형광 세기를 가졌다.

[0508] 도 25C 를 참조하여, 제 0 일에, 대조군의 하부 좌측 사분면, 하부 우측 사분면, 상부 좌측 사분면 및 상부 우측 사분면은 각각 65.4%, 34.5%, 0.096% 및 7.71E-4% 의 형광 세기를 가졌다. 제 0 일에, GagPepMix 의 하부 좌측 사분면, 하부 우측 사분면, 상부 좌측 사분면 및 상부 우측 사분면은 각각 65.4%, 34.3%, 0.20% 및 0.10% 의 형광 세기를 가졌다. 제 16 일에, CD8 고갈 없이, 대조군의 하부 좌측 사분면, 하부 우측 사분면, 상부 좌측 사분면 및 상부 우측 사분면은 각각 87.9%, 12.1%, 0.028% 및 6.24E-3% 의 형광 세기를 가졌다. 제 16 일에, CD8 고갈 없이, GagPepMix 의 하부 좌측 사분면, 하부 우측 사분면, 상부 좌측 사분면 및 상부 우측 사분면은 각각 82.3%, 12.1%, 5.38% 및 0.23% 의 형광 세기를 가졌다. 제 16 일에, CD8 고갈의 존재 하, 대조군의 하부 좌측 사분면, 하부 우측 사분면, 상부 좌측 사분면 및 상부 우측 사분면은 각각 87.8%, 12.0%, 0.22% 및 0.013% 의 형광 세기를 가졌다. 제 16 일에, CD8 고갈의 존재 하, GagPepMix 의 하부 좌측 사분면, 하부 우측 사분면, 상부 좌측 사분면 및 상부 우측 사분면은 각각 87.8%, 11.1%, 0.30% 및 0.78% 의 형광 세기를 가졌다.

[0509] 제 16 일에, CD8 고갈의 존재 하, 변수 CD3 및 CD4 를 사용하여 게이팅 데이터를 또한 생성하였는데, 이는 표시한 영역에서 83.1% 의 형광 세기를 나타내었다. 추가로, CD56 및 CD4 를 사용하여 게이팅 데이터를 생성하였는데, 이는 표시한 영역에서 65.7% 의 형광 세기를 나타내었다.

[0510] **실시예 22: 펩티드 자극 전 CD8+, γ δ , NK 및 B 세포의 고갈을 통한 CD4+ T 세포 집단의 생성**

[0511] CD8+ T 세포가 고갈되었을 때, γ δ 또는 NK 세포 과도성장이 다수의 환자에서 관찰되었다. 그 결과, CD8, γ δ , NK 또는 B 세포는 CD4+ T 세포 팽창을 개선시켰는지 여부를 시험하기 위해 고갈되었다. 세포 고갈을 펩티드 자극 후 및 렌티바이러스 형질도입 전에 수행하였다.

[0512] HIV 양성 인간 말초 혈액을 수득하였다. PBMC 를 Ficoll-Paque PLUS (GE Healthcare, Cat: 17-1440-02) 로 분리하였다. 새로이 분리된 PBMC (1×10^7) 를 18 시간 동안 24-웰 플레이트에서 1 mL 배지 중 PepMix™ HIV (GAG) Ultra (Cat: PM-HIV-GAG, JPT 펩티드 Technologies, Berlin, Germany) 로 자극하였다. CD8+ T, γ δ , NK 또는 B 세포를 PE 표지된 특이적 항체 및 항-PE 마이크로비드로 고갈시켰다. 음성 선택된 세포를 IL-7 (170-076-111, Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Germany), IL-15 (170-076-114, Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Germany) 및 사쿠나비르 (Cat: 4658, NIH AIDS Reagent Program, Germantown, MD) 를 함유하는 TexMACS GMP 배지 (Cat: 170-076-309, Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Germany) 에서 2×10^6 /mL 로 배양하였다. 렌티바이러스 AGT103 을 24 시간 이후에 MOI 5 에서 첨가하였다. IL-7, IL-15 및 사쿠나비르를 함유하는 신선한 배지를 팽창 동안 2-3 일마다 첨가하였다. IL-7/IL-15 의 최종 농도는 10 ng/mL 였다. 제 12-16 일에, $2-3 \times 10^6$ 세포를 펩티드 제자극 및 세포내 사이토카인 염색 (ICS) 분석을 위해 수집하였다. 이러한 고갈 프로토콜의 도식을 도 26 에 나타낸다.

[0513] 추가적인 세포 부분집합이 고갈되었을 때, HIV Gag-특이적 CD4 T 세포는 더 높은 수준으로 팽창되었다 (도 27A-B). CD8, γ δ 또는 NK 세포의 과도성장이 나타나, CD4 T 세포 성장을 저해하거나 렌티바이러스-형질도입된 항원-특이적 CD4 T 세포를 사멸시킨다. 이러한 최적화된 프로토콜은 규모 증대 (scale-up) 및 세포 생산에 적합하다.

[0514] 도 27A 를 참조하여, 제 0 일에, 대조군의 하부 좌측 사분면, 하부 우측 사분면, 상부 좌측 사분면 및 상부 우측 사분면은 각각 56.4%, 43.5%, 0.034% 및 7.44E-4% 의 형광 세기를 가졌다. 제 0 일에, GagPepMix 의 하부 좌측 사분면, 하부 우측 사분면, 상부 좌측 사분면 및 상부 우측 사분면은 각각 54.8%, 44.8%, 0.30% 및 0.055% 의 형광 세기를 가졌다. 고갈 없이 18 시간 후, 대조군의 하부 좌측 사분면, 하부 우측 사분면, 상부 좌측 사분면 및 상부 우측 사분면은 각각 83.9%, 16.0%, 0.061% 및 0.027% 의 형광 세기를 가졌다. 고갈 없이 18 시간 후, GagPepMix 의 하부 좌측 사분면, 하부 우측 사분면, 상부 좌측 사분면 및 상부 우측 사분면은 각각 77.6%, 15.4%, 6.39% 및 0.54% 의 형광 세기를 가졌다. CD8 고갈의 존재 하 18 시간 후, 대조군의 하부 좌측 사분면, 하부 우측 사분면, 상부 좌측 사분면 및 상부 우측 사분면은 각각 41.9%, 57.9%, 0.094%

및 0.099%의 형광 세기를 가졌다. CD8 고갈의 존재 하 18 시간 후, GagPepMix의 하부 좌측 사분면, 하부 우측 사분면, 상부 좌측 사분면 및 상부 우측 사분면은 각각 43.3%, 50.7%, 3.00% 및 2.98%의 형광 세기를 가졌다. CD8 및 $\gamma\delta$ 고갈의 존재 하 18 시간 후, 대조군의 하부 좌측 사분면, 하부 우측 사분면, 상부 좌측 사분면 및 상부 우측 사분면은 각각 40.4%, 59.3%, 0.12% 및 0.13%의 형광 세기를 가졌다. CD8 및 $\gamma\delta$ 고갈의 존재 하 18 시간 후, GagPepMix의 하부 좌측 사분면, 하부 우측 사분면, 상부 좌측 사분면 및 상부 우측 사분면은 각각 38.3%, 54.7%, 3.14% 및 3.86%의 형광 세기를 가졌다. CD8, $\gamma\delta$ 및 B 고갈의 존재 하 18 시간 후, 대조군의 하부 좌측 사분면, 하부 우측 사분면, 상부 좌측 사분면 및 상부 우측 사분면은 각각 46.2%, 53.6%, 0.13% 및 0.080%의 형광 세기를 가졌다. CD8, $\gamma\delta$ 및 B 고갈의 존재 하 18 시간 후, GagPepMix의 하부 좌측 사분면, 하부 우측 사분면, 상부 좌측 사분면 및 상부 우측 사분면은 각각 42.1%, 48.5%, 4.28% 및 5.06%의 형광 세기를 가졌다.

[0515] 도 27B를 참조하여, 제 0일에, 대조군의 하부 좌측 사분면, 하부 우측 사분면, 상부 좌측 사분면 및 상부 우측 사분면은 각각 42.6%, 57.4%, 2.71E-3% 및 0.0%의 형광 세기를 가졌다. 제 0일에, GagPepMix의 하부 좌측 사분면, 하부 우측 사분면, 상부 좌측 사분면 및 상부 우측 사분면은 각각 42.5%, 57.4%, 0.031% 및 0.048%의 형광 세기를 가졌다. 고갈 없이 18 시간 후, 대조군의 하부 좌측 사분면, 하부 우측 사분면, 상부 좌측 사분면 및 상부 우측 사분면은 각각 79.5%, 20.5%, 0.017% 및 9.73E-3%의 형광 세기를 가졌다. 고갈 없이 18 시간 후, GagPepMix의 하부 좌측 사분면, 하부 우측 사분면, 상부 좌측 사분면 및 상부 우측 사분면은 각각 78.9%, 19.5%, 0.93% 및 0.65%의 형광 세기를 가졌다. CD8 고갈의 존재 하 18 시간 후, 대조군의 하부 좌측 사분면, 하부 우측 사분면, 상부 좌측 사분면 및 상부 우측 사분면은 각각 51.4%, 48.4%, 0.11% 및 0.063%의 형광 세기를 가졌다. CD8 고갈의 존재 하 18 시간 후, GagPepMix의 하부 좌측 사분면, 하부 우측 사분면, 상부 좌측 사분면 및 상부 우측 사분면은 각각 51.7%, 43.0%, 0.22% 및 5.03%의 형광 세기를 가졌다. CD8, CD56, $\gamma\delta$ 및 B 고갈의 존재 하 18 시간 후, 자극을 갖지 않은 세포의 하부 좌측 사분면, 하부 우측 사분면, 상부 좌측 사분면 및 상부 우측 사분면은 각각 12.8%, 87.0%, 0.14% 및 0.10%의 형광 세기를 가졌다. CD8, CD56, $\gamma\delta$ 및 B 고갈의 존재 하 18 시간 후, GagPepMix의 하부 좌측 사분면, 하부 우측 사분면, 상부 좌측 사분면 및 상부 우측 사분면은 각각 13.2%, 79.4%, 0.27% 및 7.17%의 형광 세기를 가졌다.

[0516] 실시예 23: AGT103 렌티바이러스의 형질도입 효율 측정 방법

[0517] CD4+ T 세포의 팽창을 개선시키기 위해, 표적 세포는 렌티바이러스 AGT103-형질도입된, 항원-특이적 CD4+ T 세포이다. GFP를 가지는 렌티바이러스를 사용하여 형질도입 효율을 측정하였다. 세포내 염색이 상당한 GFP 신호 손실을 일으키므로, CCS를 사용하여 항원-특이적 CD4+ T 세포를 식별하고, GFP 양성 세포를 사용하여 형질도입된 세포 부분집합을 식별하였다.

[0518] HIV 양성 환자로부터의 1×10^7 PBMC를 18 시간 동안 24-웰 플레이트에서 1 mL 배지 중 PepMix™ HIV (GAG) Ultra (Cat: PM-HIV-GAG, JPT 랩티드 Technologies, Berlin, Germany)로 자극하였다. CD8, $\gamma\delta$, NK 또는 B 세포를 PE 표지된 특이적 항체 및 항-PE 마이크로비드로 고갈시켰다. 음성 선택된 세포를 IL-7 (170-076-111, Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Germany), IL-15 (170-076-114, Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Germany) 및 사쿠나비르 (Cat: 4658, NIH AIDS Reagent Program, Germantown, MD)를 함유하는 TexMACS GMP 배지 (Cat: 170-076-309, Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Germany)에서 2×10^6 /mL로 배양하였다. GFP를 가지는 렌티바이러스를 24 시간 이후에 MOI 5에서 첨가하였다. IL-7, IL-15 및 사쿠나비르를 함유하는 신선한 배지를 팽창 동안 3일마다 첨가하였다. IL-7/IL-15의 최종 농도는 10 ng/mL였다. 제 12-16일에, $2-3 \times 10^6$ 세포를 수집하였다. 랩티드 제자극 및 CCS 어세이를 수행하여 IFN- γ -양성 항원-특이적 CD4+ T 세포를 평가하고 GFP 신호전달로 형질도입 효율을 평가하였다. 모든 실험은 제조사의 지시사항에 따라 수행하였다.

[0519] IFN- γ 양성, 항원-특이적 CD4+ T 세포는 배양물에서의 다른 세포 부분집합과 비교하여 훨씬 더 양호한 형질도입 효율을 나타내었다 (도 28). 항원-특이적 CD4+ T 세포가 TCR 자극을 받은 것을 고려하면, 더 빠르게 증식되고, 렌티바이러스에 의해 보다 용이하게 감염된 것이 타당하다. 도 28에서 나타난 바와 같이, 하부 우측 사분면 (68.6% 형광) 및 상부 우측 사분면 (12.6% 형광)은 각각 41.5% 및 67.8%의 GFP 형질도입 효율을 가졌다. 이는 각각 35.6% 및 43.3%의 GFP 형질도입 효율을 갖는 하부 좌측 사분면 (9.75% 형광) 및 상부 좌측 사분면 (2.46% 형광)과 대조적이다.

[0520] 실시예 24: 형질도입된 세포 백분율과 벡터 카피 수 사이의 관계 측정 방법

[0521] 표적 세포가 AGT103 렌티바이러스 형질도입된, HIV-특이적 CD4 T 세포이므로, 얼마나 많은 표적 세포가 최종 세포 생성물에 포함되는지를 아는 것이 중요하다. 그러나, 임상 등급 AGT103 렌티바이러스에는 검출가능한 마커가 포함되지 않는다. 결과적으로, 형질도입 효율을 qPCR 에 의해 벡터 카피 수 (VCN) 를 검출함으로써 측정하였다. 형질도입된 세포 백분율과 VCN 사이의 관계를 GFP 를 가지는 렌티바이러스를 사용하여 확립함으로써, 최종 세포 생성물 중 VCN 기반의 형질도입된 세포 백분율을 추정할 수 있다.

[0522] HIV 양성 환자로부터의 1×10^7 PBMC 를 18 시간 동안 24-웰 플레이트에서 1 mL 배지 중 PepMix™ HIV (GAG) Ultra (Cat: PM-HIV-GAG, JPT 펩티드 Technologies, Berlin, Germany) 로 자극하였다. CD8, $\gamma \delta$, NK 또는 B 세포를 PE 표지된 특이적 항체 및 항-PE 마이크로비드로 고갈시켰다. 음성 선택된 세포를 IL-7 (170-076-111, Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Germany), IL-15 (170-076-114, Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Germany) 및 사쿠나비르 (Cat: 4658, NIH AIDS Reagent Program, Germantown, MD) 를 함유하는 TexMACS GMP 배지 (Cat: 170-076-309, Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Germany) 에서 2×10^6 /mL 로 배양하였다. GFP 를 가지는 렌티바이러스를 24 시간 이후에 MOI 5 에서 첨가하였다. IL-7, IL-15 및 사쿠나비르를 함유하는 신선한 배지를 팽창 동안 3 일마다 첨가하였다. IL-7/IL-15 의 최종 농도는 10 ng/mL 였다. 사쿠나비르의 최종 농도는 100 nM 였다. 제 12-16 일에, $2-3 \times 10^6$ 세포를 수집하였다. 펩티드 재자극 및 CCS 어세이를 수행하여 항원-특이적 CD4+ T 세포를 평가하고 GFP 신호전달로 형질도입 효율을 평가하였다. QPCR 을 수행하여 벡터 카피 수를 검출하였다. 모든 실험은 제조사의 지시사항에 따라 수행하였다.

[0523] 4 개 샘플 시험 후, 형질도입된 세포 백분율과 벡터 카피 수 사이에 긍정적 상호관계가 관찰되었다 (도 29).

[0524] **서열**

[0525] 하기 서열이 본원에서 언급된다:

SEQ ID NO:	설명	서열
1	miR30 CCR5	AGGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCGACTGTAAACT GAGCTTGCTCTACTGTGAAGCCACAGATGGGTAGA GCAAGCACAGTTTACCGCTGCCTACTGCCTCGGACT TCAAGGGGCTT
2	miR21 Vif	CATCTCCATGGCTGTACCACCTTGTCGGGGGATGTG TACTTCTGAACCTGTGTTGAATCTCATGGAGTTCAG AAGAACACATCCGCACTGACATTTTGGTATCTTTCA TCTGACCA

[0526]

3	miR185 Tat	GGGCCTGGCTCGAGCAGGGGGCGAGGGATTCCGCT TCTTCCTGCCATAGCGTGG TCCCCTCCCCTATGGCAGGCAGAAGCGGCACCTTCC CTCCCAATGACCGCGTCTTCGTCTCG
4, 64	신장 인자-1 알파 (EF1-알파) 프로모터	CCGGTGCCTAGAGAAGGTGGCGCGGGGTAAACTGG GAAAGTGATGTCGTGTACTGGCTCCGCCTTTTTCC GAGGGTGGGGGAGAACCCTATATAAGTGCAGTAGT CGCCGTGAACGTTCTTTTTCGCAACGGGTTTGCCGC CAGAACACAGGTAAGTGCCGTGTGTGGTTCCCGCG GGCCTGGCCTCTTTACGGGTTATGGCCCTTGCCTGC CTTGAATTACTTCCACGCCCTGGCTGCAGTACGTG ATTCTTGATCCCAGCTTCGGGTTGGAAGTGGGTGG GAGAGTTCGAGGCCTTGCCTTAAGGAGCCCCTTCG CCTCGTGCTTGAGTTGAGGCCTGGCCTGGGCGCTGG GGCCGCCGCGTGCGAATCTGGTGGCACCTTCGCGCC TGTCTCGCTGCTTTCGATAAGTCTCTAGCCATTTAAA ATTTTTGATGACCTGCTGCGACGCTTTTTTTCTGGCA AGATAGTCTTGTAATGCGGGCCAAGATCTGCACAC TGGTATTTTCGGTTTTTTGGGGCCGCGGGCGGCACGG GGCCCGTGCGTCCCAGCGCACATGTTTCGGCGAGGC GGGGCCTGCGAGCGCGGCCACCGAGAATCGGACGG GGGTAGTCTCAAGCTGGCCGGCCTGCTCTGGTGCCT GGCCTCGCGCCGCCGTGTATCGCCCCGCCCTGGGCG GCAAGGCTGGCCCGGTGCGCACCAAGTTGCGTGAGC GGAAAGATGGCCGCTTCCCAGCCCTGCTGCAGGGA GCTCAAAAATGGAGGACGCGGCGCTCGGGAGAGCGG GCGGGTGAGTACCCACACAAAAGGAAAAGGGCCTT TCCGTCCTCAGCCGTCGCTTCATGTGACTCCACGGA GTACCGGGCGCCGTCAGGCACCTCGATTAGTTCTC GAGCTTTTTGGAGTACGTCGTCTTAGGTTGGGGGA GGGGTTTTATGCGATGGAGTTTCCCACACTGAGTG GGTGGAGACTGAAGTTAGGCCAGCTTGGCACTTGAT

[0527]

		GTAATTCTCCTTGGAATTTGCCCTTTTTGAGTTTGGA TCTTGTTTCATTCTCAAGCCTCAGACAGTGGTCAA AGTTTTTTCTTCCATTTTCAGGTGTCGTGA
5	CCR5 표적 서열	GAGCAAGCTCAGTTTACA
6	Vif 표적 서열	GGGATGTGTA CTCTGAACTT
7	Tat 표적 서열	TCCGCTTCTTCCTGCCATAG
8	TAR 테코이 서열	CTTGCAATGATGTCGTAATTTGCGTCTTACCTCGTTC TCGACAGCGACCAGATCTGAGCCTGGGAGCTCTCTG GCTGTCAGTAAGCTGGTACAGAAGGTTGACGAAAA TTCTTACTGAGCAAGAAA
9	Rev/Tat 표적 서열	GCGGAGACAGCGACGAAGAGC
10	Rev/Tat shRNA 서열	GCGGAGACAGCGACGAAGAGCTTCAAGAGAGCTCT TCGTCGCTGTCTCCGCTTTTT
11	Gag 표적 서열	GAAGAAATGATGACAGCAT
12	Gag shRNA 서열	GAAGAAATGATGACAGCATTTCAAGAGAATGCTGT CATCATTTCTTCTTTTT
13	Pol 표적 서열	CAGGAGCAGATGATACAG
14	Pol shRNA 서열	CAGGAGATGATACAGTTCAAGAGACTGTATCATCTG CTCCTGTTTT
15	CCR5 표적 서열 #1	GTGTCAAGTCCAATCTATG
16	CCR5 shRNA 서열 #1	GTGTCAAGTCCAATCTATGTTCAAGAGACATAGATT GGACTTGACACTTTTT
17	CCR5 표적 서열 #2	GAGCATGACTGACATCTAC
18	CCR5 shRNA 서열 #2	GAGCATGACTGACATCTACTTCAAGAGAGTAGATGT CAGTCATGCTTTTT
19	CCR5 표적	GTAGCTCTAACAGGTTGGA

[0528]

	서열 #3	
20	CCR5 shRNA 서열 #3	GTAGCTCTAACAGGTTGGATTCAAGAGATCCAACCT GTTAGAGCTACTTTTT
21	CCR5 표적 서열 #4	G TTCAGAAACTACCTCTTA
22	CCR5 shRNA 서열 #4	G TTCAGAAACTACCTCTTATTCAAGAGATAAGAGGT AGTTTCTGAACTTTTT
23	CCR5 표적 서열 #5	GAGCAAGCTCAGTTTACACC
24	CCR5 shRNA 서열 #5	GAGCAAGCTCAGTTTACACCTTCAAGAGAGGTGTA AACTGAGCTTGCTCTTTTT
25	호모 사피엔스 CCR5 유전자, 서열 1	ATGGATTATCAAGTGTCAAGTCCAATCTATGACATC AATTATTATACATCGGAGCCCTGCCAAAAATCAAT GTGAAGCAAATCGCAGCCCCTCTGCTCCGCTC TACTCACTGGTGTTCATCTTTGGTTTTGTGGGC
26	호모 사피엔스 CCR5 유전자, 서열 2	AACATGCTGGTCATCCTCATCCTGATAAACTGCAAA AGGCTGAAGAGCATGACTGACATCTACCTGCTCAAC CTGGCCATCTCTGACCTGTTTTTCCTTCTTACTGTCC CCTTCTGGGCTCACTATGCTGCCGCCAGTGGGACT TTGAAAATACAATGTGTCAACTCTTGACAGGGCTCT ATTTTATAGGCTTCTTCTCTGGAATCTTCTTCATCAT CCTCCTGACAATCGATAGGTACCTGGCTGTCGTCCA TGCTGTGTTTGCTTTAAAAGCCAGGACGGTCACCTT TGGGGTGGTGACAAGTGTGATCACTTGGGTGGTGGC TGTGTTTGCGTCTCTCCCAGGAATCATCTTACCAG ATCTCAAAAAGAAGGTCTTCATTACACCTGCAGCTC TCATTTCCATACAGTCAGTATCAATTCTGGAAGAA TTCCAGACATTAAGATAGTCATCTTGGGGCTGGT CCTGCCGCTGCTTGTTCATGGTCATCTGCTACTCGGG AATCCTAAAAACTCTGCTTCGGTGTCAAATGAGAA GAAGAGGCACAGGGCTGTGAGGCTTATCTTCACCAT

[0529]

		CATGATTGTTTATTTTCTCTTCTGGGCTCCCTACAAC ATTGTCCTTCTCCTGAAC
27	호모 사피엔스 CCR5 유전자, 서열 3	ACCTTCCAGGAATTCTTTGGCCTGAATAATTGCAGT AGCTCTAACAGGTTGGACCAAGCTATGCAGGTGA
28	호모 사피엔스 CCR5 유전자, 서열 4	CAGAGACTCTTGGGATGACGCACTGCTGCATCAACC CCATCATCTATGCCTTTGTTCGGGGAGAAGTTCAGAA ACTACCTCTTAGTCTTCTTCCAAAAGCACATTGCCA AACGCTTCTGCAAATGCTGTTCTATTTTCCAG
29	호모 사피엔스 CCR5 유전자, 서열 5	CAAGAGGCTCCCGAGCGAGCAAGCTCAGTTTACAC CCGATCCACTGGGGAGCAGGAAATATCTGTGGGCTT GTGA
30	CD4 프로모터 서열	TGTTGGGGTTCAAATTTGAGCCCCAGCTGTTAGCCC TCTGCAAAGAAAAAAAAAAAAAAAAAAGAACAAA GGGCCTAGATTTCCCTTCTGAGCCCCACCCTAAGAT GAAGCCTCTCTTTCAAGGGAGTGGGGTTGGGGTGG AGGCGGATCCTGTCAGCTTTGCTCTCTCTGTGGCTG GCAGTTTCTCCAAAGGGTAACAGGTGTCAGCTGGCT GAGCCTAGGCTGAACCCTGAGACATGCTACCTCTGT CTTCTCATGGCTGGAGGCAGCCTTTGTAAGTCACAG AAAGTAGCTGAGGGGCTCTGGAAAAAGACAGCCA GGGTGGAGGTAGATTGGTCTTTGACTCCTGATTTAA GCCIGATTCTGCTTAACTTTTTCCCTTGACTTTGGCA TTTTCACTTTGACATGTTCCCTGAGAGCCTGGGGGG TGGGAACCCAGCTCCAGCTGGTGACGTTTGGGGCC GGCCAGGCCTAGGGTGTGGAGGAGCCTTGCCATC GGGCTTCCTGTCTCTCTTCATTTAAGCACGACTCTGC AGA
31	miR30- CCR5/miR21- Vif/miR185 Tat	AGGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCGACTGTAAACT GAGCTTGCTCTACTGTGAAGCCACAGATGGGTAGA GCAAGCACAGTTTACCGCTGCCTACTGCCTCGGACT

[0530]

	microRNA 클러스터 서열	TCAAGGGGCTTCCCGGGCATCTCCATGGCTGTACCA CCTTGTTCGGGGGATGTGTACTTCTGAACTTGTGTTG AATTCATGGAGTTCAGAAGAACACATCCGCACTG ACATTTTGGTATCTTTCATCTGACCAGCTAGCGGGC CTGGCTCGAGCAGGGGGCGAGGGATTCCGCTTCTTC CTGCCATAGCGTGGTCCCCTCCCCTATGGCAGGCAG AAGCGGCACCTTCCCTCCCAATGACCGCGTCTTCGT C
32	장 WPRE 서열	AATCAACCTCTGATTACAAAATTTGTGAAAGATTGA CTGGTATTCTTAACTATGTTGCTCCTTTTACGCTATG TGGATACGCTGCTTTAATGCCTTTGTATCATGCTATT GCTTCCCGTATGGCTTTCATTTTCTCCTCCTTGTATA AATCCTGGTTGCTGCTCTTTATGAGGAGTTGTGGC CCGTTGTCAGGCAACGTGGCGTGGTGTGCACTGTGT TTGCTGACGCAACCCCACTGGTTGGGGCATTGCCA CCACCTGTCAGCTCCTTTCGGGACTTTCGCTTTC CCTCCCTATTGCCACGGCGGAACATCGCCGCCTG CCTTGCCCGCTGCTGGACAGGGGCTCGGCTGTTGGG CACTGACAATCCGTGGTGTGTCGGGGAAATCATC GTCCTTTCCTTGGCTGCTCGCCTGTGTTGCCACCTGG ATTCTGCGCGGGACGTCCTTCTGCTACGTCCCTTCG GCCCTCAATCCAGCGGACCTTCCCTCCCGCGGCCTG CTGCCGGCTCTGCGGCCTTCCCGCTTTCGCCTTC GCCCTCAGACGAGTCGGATCTCCCTTGGGCCGCT CCCCGCCT
33	신장 인자-1 알파 (EF1-알파) 프로모터; miR30CCR5; miR21Vif; miR185 Tat	CCGGTGCCTAGAGAAGGTGGCGCGGGTAAACTGG GAAAGTGATGTCGTGTAAGTGGCTCCGCCTTTTCCC GAGGGTGGGGGAGAACCCTATATAAGTGCAGTAGT CGCCGTGAACGTTCTTTTCGCAACGGGTTTGCCGC CAGAACACAGGTAAGTGCCGTGTGTGGTTCCCGCG GGCCTGGCCTCTTACGGTTATGGCCCTTGCCTGC CTTGAATTACTTCCACGCCCTGGCTGCAGTACGTG

[0531]

		<p> ATTCTTGATCCCGAGCTTCGGGTTGGAAGTGGGTGG GAGAGTTCGAGGCCTTGCGCTTAAGGAGCCCCTTCG CCTCGTGCTTGAGTTGAGGCCTGGCCTGGGCGCTGG GGCCGCCGCGTGCGAATCTGGTGGCACCTTCGCGCC TGTCTCGCTGCTTTCGATAAGTCTCTAGCCATTTAAA ATTTTTGATGACCTGCTGCGACGCTTTTTTTCTGGCA AGATAGTCTTGTAATGCGGGCCAAGATCTGCACAC TGGTATTTTCGGTTTTTTGGGGCCGCGGGCGGCGACGG GGCCCGTGCCTCCAGCGCACATGTTTCGGCGAGGC GGGGCCTGCGAGCGCGGCCACCGAGAATCGGACGG GGGTAGTCTCAAGCTGGCCGGCCTGCTCTGGTGCCT GGCTCGCGCCGCCGTGTATCGCCCCGCCCTGGGCG GCAAGGCTGGCCCCGGTCGGCACCAGTTGCGTGAGC GGAAAGATGGCCGCTTCCCAGCCCTGCTGCAGGGA GCTCAAAATGGAGGACGCGGCGCTCGGGAGAGCGG GCGGGTGAGTCACCCACACAAAGGAAAAGGGCCTT TCCGTCCTCAGCCGTCGCTTCATGTGACTCCACGGA GTACCGGGCGCCGTCAGGCACCTCGATTAGTTCTC GAGCTTTTGGAGTACGTCGCTTTAGGTTGGGGGGA GGGGTTTTATGCGATGGAGTTTCCCACACTGAGTG GGTGGAGACTGAAGTTAGGCCAGCTTGGCACTTGAT GTAATCTCCTTGGAATTTGCCCTTTTTGAGTTTGA TCTTGGTTCATTCTCAAGCCTCAGACAGTGGTTCAA AGTTTTTTCTTCCATTTTCAGGTGTCGTGATGTACA <u>AGGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCGACTGTAAACT</u> <u>GAGCTTGCTCTACTGTGAAGCCACAGATGGGTAGA</u> <u>GCAAGCACAGTTTACCGCTGCCTACTGCCTCGGACT</u> <u>TCAAGGGGCTTCCCAGGCATCTCCATGGCTGTACCA</u> <u>CCTTGTCGGGGGATGTGTACTTCTGAACTTGTGTTG</u> <u>AATTCATGGAGTTCAGAAGAACACATCCGCACTG</u> <u>ACATTTTGGTATCTTTCATCTGACCAGCTAGCGGGC</u> <u>CTGGCTCGAGCAGGGGGCGAGGGATTCCGCTTCTTC</u> </p>
--	--	---

[0532]

		CTGCCATAGCGTGGTCCCCTCCCCTATGGCAGGCAG AAGCGGCACCTTCCCTCCCAATGACCGCGTCTTCGT C
34	라우스 육종 바이러스 (RSV) 프로모터	GTAGTCTTATGCAATACTCTTGTAGTCTTGCAACAT GGTAACGATGAGTTAGCAACATGCCTTACAAGGAG AGAAAAAGCACCGTGCATGCCGATTGGTGGAAGTA AGGTGGTACGATCGTGCCTTATTAGGAAGGCAACA GACGGGTCTGACATGGATTGGACGAACCACTGAAT TGCCGCATTGCAGAGATATTGTATTTAAGTGCCTAG CTCGATAACAATAAACG
35	5' 장 말단 반복체 (LTR)	GGTCTCTCTGGTTAGACCAGATCTGAGCCTGGGAGC TCTCTGGCTAACTAGGGAACCCACTGCTTAAGCCTC AATAAAGCTTGCCTTGAGTGCTTCAAGTAGTGTGTG CCCGTCTGTTGTGTGACTCTGGTAACTAGAGATCCC TCAGACCCCTTTTAGTCAGTGTGAAAATCTCTAGCA
36	Psi 패키징 신호	TACGCCAAAAATTTTACTAGCGGAGGCTAGAAGG AGAGAG
37	Rev 응답 요소 (RRE)	AGGAGCTTTGTTCCCTTGGGTCTTGGGAGCAGCAGG AAGCACTATGGGCGCAGCCTCAATGACGCTGACGG TACAGGCCAGACAATTATTGTCTGGTATAGTGCAGC AGCAGAACAATTTGCTGAGGGCTATTGAGGCGCAA CAGCATCTGTTGCAACTCACAGTCTGGGGCATCAAG CAGCTCCAGGCAAGAATCCTGGCTGTGGAAAGATA CCTAAAGGATCAACAGCTCC
38	중심 폴리퓨린 지역 (cPPT)	TTTTAAAAGAAAAGGGGGGATTGGGGGGTACAGTG CAGGGGAAAGAATAGTAGACATAATAGCAACAGAC ATACAAACTAAAGAATTACAAAAACAAATTACAAA ATTCAAAATTTTA
39, 102	3' 델타 LTR	TGGAAGGGCTAATTCCTCCCAACGAAGATAAGAT CTGCTTTTTGCTTGTACTGGGTCTCTCTGGTTAGACC AGATCTGAGCCTGGGAGCTCTCTGGCTAACTAGGGA ACCCACTGCTTAAGCCTCAATAAAGCTTGCCTTGAG

[0533]

		TGCTTCAAGTAGTGTGTGCCCGTCTGTTGTGTGACT CTGGTAACTAGAGATCCCTCAGACCCCTTTTAGTCAG TGTGGAAAATCTCTAGCAGTAGTAGTTCATGTCA
40, 49	헬퍼/Rev; CMV 조기 (CAG) 인핸서; 전사를 향상시킴	TAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGT TCATAGCCCATATATGGAGTTCGCGTTACATAACT TACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACG ACCCCGCCCATGACGTCAATAATGACGTATGTTC CCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTC AATGGGTGGACTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGG CAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCC CTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGC ATTATGCCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTA CTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATC
41, 50	헬퍼/Rev; 닭 베타 액틴 (CAG) 프로모터; 전사	GCTATTACCATGGGTCGAGGTGAGCCCCACGTTCTG CTTCACTCTCCCCATCTCCCCCCCCCTCCCCACCCCCA ATTTTGTATTTATTTATTTTAAATTATTTTGTGCAGC GATGGGGGCGGGGGGGGGGGGGCGCGGCCAGG CGGGGCGGGGCGGGGCGAGGGGCGGGGCGGGGCG AGGCGGAGAGGTGCGGCGGCAGCCAATCAGAGCGG CGCGCTCCGAAAGTTTCCTTTTATGGCGAGGCGGCG GCGGCGGCGGCCCTATAAAAAGCGAAGCGCGCGGC GGCG
42, 51	헬퍼/Rev; 닭 베타 액틴 인트론; 유전자 발현을 향상시킴	GGAGTCGCTGCGTTGCCTTCGCCCCGTGCCCGCTC CGCGCCGCTCGCGCCGCCCGCCCCGGCTCTGACTG ACCGCGTACTCCCACAGGTGAGCGGGCGGGACGG CCCTTCTCCTCCGGGCTGTAATTAGCGCTTGGTTTAA TGACGGCTCGTTCTTTCTGTGGCTGCGTGAAAGC CTTAAAGGGCTCCGGGAGGGCCCTTTGTGCGGGGG GGAGCGGCTCGGGGGGTGCGTGCGTGTGTGTGTGC GTGGGAGCGCCGCGTGCGCCCGCGCTGCCCGGC GGCTGTGAGCGCTGCGGGCGCGGCGCGGGGCTTTG TGCGCTCCGCGTGTGCGCGAGGGGAGCGCGGCCGG

[0534]

		<p>GGGCGGTGCCCCGCGGTGCGGGGGGGCTGCGAGGG GAACAAAGGCTGCGTGCGGGGTGTGTGCGTGGGGG GGTGAGCAGGGGTGTGGGCGCGGCGGTGCGGGCTG TAACCCCCCTGCACCCCCCTCCCCGAGTTGCTGA GCACGGCCCCGGCTTCGGGTGCGGGGCTCCGTGCGG GGCGTGCGCGGGGCTCGCCGTGCCGGGCGGGGGG TGCGGCAGGTGGGGGTGCCGGGCGGGGCGGGGCC GCCTCGGGCCGGGGAGGGCTCGGGGAGGGGCGCG GCGGCCCGGAGCGCCGGCGGCTGTCGAGGCGCGG CGAGCCGCAGCCATTGCCTTTTATGGTAATCGTGCG AGAGGGCGCAGGGACTTCCTTTGTCCCAAATCTGGC GGAGCCGAAATCTGGGAGGCGCCGCCGCACCCCCT CTAGCGGGCGCGGGCGAAGCGGTGCGGGCGCCGGCA GGAAGGAAATGGGCGGGGAGGGCCTTCGTGCGTCCG CCGCGCCCGCTCCCCTTCTCCATCTCCAGCCTCGG GGCTGCCGCAGGGGACGGCTGCCTTCGGGGGGGA CGGGGCAGGGCGGGGTTTCGGCTTCTGGCGTGTGAC CGGCGG</p>
43, 52	<p>헬퍼/Rev; HIV Gag; 바이러스 캡시드</p>	<p>ATGGGTGCGAGAGCGTCAGTATTAAGCGGGGAGA ATTAGATCGATGGGAAAAAATTCGGTTAAGGCCAG GGGAAAGAAAAAATATAAATTAACATATAGTA TGGGCAAGCAGGGAGCTAGAACGATTCGCAGTTAA TCCTGGCCTGTTAGAAACATCAGAAGGCTGTAGACA AATACTGGGACAGCTACAACCATCCCTTCAGACAG GATCAGAAGAACTTAGATCATTATATAATACAGTAG CAACCTCTATTGTGTGCATCAAAGGATAGAGATAA AAGACACCAAGGAAGCTTTAGACAAGATAGAGGAA GAGCAAAACAAAAGTAAGAAAAAAGCACAGCAAG CAGCAGCTGACACAGGACACAGCAATCAGGTCAGC CAAAATTACCCTATAGTGCAGAACATCCAGGGGCA AATGGTACATCAGGCCATATCACCTAGAACTTTAAA TGCATGGGTAAAAGTAGTAGAAGAGAAGGCTTTCA</p>

[0535]

		<p>GCCCAGAAGTGATACCCATGTTTTTCAGCATTATCAG AAGGAGCCACCCCAAGATTTAAACACCATGCTA AACACAGTGGGGGGACATCAAGCAGCCATGCAAAT GTTAAAAGAGACCATCAATGAGGAAGCTGCAGAAT GGGATAGAGTGCATCCAGTGCATGCAGGGCCTATT GCACCAGGCCAGATGAGAGAACCAAGGGGAAGTGA CATAGCAGGAACTACTAGTACCCTTCAGGAACAAA TAGGATGGATGACACATAATCCACCTATCCCAGTAG GAGAAATCTATAAAAGATGGATAATCCTGGGATTA AATAAAATAGTAAGAATGTATAGCCCTACCAGCATT CTGGACATAAGACAAGGACCAAAGGAACCCTTTAG AGACTATGTAGACCGATTCTATAAAACTCTAAGAGC CGAGCAAGCTTCACAAGAGGTAAAAAATTGGATGA CAGAAACCTTGTTGGTCCAAAATGCGAACCAGATT GTAAGACTATTTAAAAGCATTGGGACCAGGAGCG ACACTAGAAGAAATGATGACAGCATGTCAGGGAGT GGGGGGACCCGGCCATAAAGCAAGAGTTTTGGCTG AAGCAATGAGCCAAGTAACAAATCCAGCTACCATA ATGATACAGAAAGGCAATTTTAGGAACCAAAGAAA GACTGTTAAGTGTTCATTGTGGCAAAGAAGGGCA CATAGCCAAAAATTGCAGGGCCCCTAGGAAAAAGG GCTGTTGGAAATGTGGAAAGGAAGGACACCAAATG AAAGATTGTAAGTACTGAGAGACAGGCTAATTTTTAGGG AAGATCTGGCCTCCCACAAGGGAAGGCCAGGGAA TTTTCTCAGAGCAGACCAGAGCCAACAGCCCCACC AGAAGAGAGCTTCAGGTTTGGGGAAGAGACAACAA CTCCCTCTCAGAAGCAGGAGCCGATAGACAAGGAA CTGTATCCTTTAGCTTCCCTCAGATCACTCTTTGGCA GCGACCCCTCGTCACAATAA</p>
44, 53	<p>헬퍼/Rev; HIV Pol; 프로테아제 및 역전사효소</p>	<p>ATGAATTTGCCAGGAAGATGGAAACCAAAAATGAT AGGGGGAATTGGAGGTTTATCAAAGTAGGACAGT ATGATCAGATACTCATAGAAATCTGCGGACATAAA</p>

[0536]

	<p>GCTATAGGTACAGTATTAGTAGGACCTACACCTGTC AACATAATTGGAAGAAATCTGTTGACTCAGATTGGC TGCACTTTAAATTTTCCCATTAGTCTATTGAGACTG TACCAGTAAAATTAAGCCAGGAATGGATGGCCCA AAAGTTAAACAATGGCCATTGACAGAAGAAAAAAT AAAAGCATTAGTAGAAATTTGTACAGAAATGGAAA AGGAAGGAAAAATTTCAAAAATTGGGCCTGAAAAT CCATACAATACTCCAGTATTTGCCATAAAGAAAAAA GACAGTACTAAATGGAGAAAAATTAGTAGATTTGAG AGAACTTAATAAGAGAACTCAAGATTTCTGGGAAG TTCAATTAGGAATACCACATCCTGCAGGGTTAAAAAC AGAAAAAATCAGTAACAGTACTGGATGTGGGCGAT GCATATTTTTCAGTTCCCTTAGATAAAGACTTCAGG AAGTATACTGCATTTACCATACCTAGTATAAACAAT GAGACACCAGGGATTAGATATCAGTACAATGTGCTT CCACAGGGATGGAAAGGATCACCAGCAATATTCCA GTGTAGCATGACAAAAATCTTAGAGCCTTTTAGAAA ACAAAATCCAGACATAGTCATCTATCAATACATGGA TGATTTGTATGTAGGATCTGACTTAGAAATAGGGCA GCATAGAACAAAAATAGAGGAACTGAGACAACATC TGTTGAGGTGGGGATTTACCACACCAGACAAAAAA CATCAGAAAGAACCTCCATTCCCTTTGGATGGGTTAT GAACTCCATCCTGATAAATGGACAGTACAGCCTATA GTGCTGCCAGAAAAGGACAGCTGGACTGTCAATGA CATACAGAAATTAGTGGGAAAATTGAATTGGGCAA GTCAGATTTATGCAGGGATTAAGTAAGGCAATTAT GTAAACTTCTTAGGGGAACCAAAGCACTAACAGAA GTAGTACCACTAACAGAAGAAGCAGAGCTAGAACT GGCAGAAAACAGGGAGATTCTAAAAGAACCGGTAC ATGGAGTGTATTATGACCCATCAAAGACTTAATAG CAGAAATACAGAAGCAGGGGCAAGGCCAATGGACA TATCAAATTTATCAAGAGCCATTTAAAAATCTGAAA</p>
--	---

[0537]

		<p>ACAGGAAAATATGCAAGAATGAAGGGTGCCACAC TAATGATGTGAAACAATTAACAGAGGCAGTACAAA AAATAGCCACAGAAAGCATAAGTAATATGGGGAAAG ACTCCTAAATTTAAATTACCCATACAAAAGGAAACA TGGGAAGCATGGTGGACAGAGTATTGGCAAGCCAC CTGGATTCTGAGTGGGAGTTTGTCAATACCCCTCC CTTAGTGAAGTTATGGTACCAGTTAGAGAAAAGAAC CCATAATAGGAGCAGAACTTTCTATGTAGATGGG GCAGCCAATAGGGAACTAAATTAGGAAAAGCAGG ATATGTAAGTACAGAGGAAGACAAAAAGTTGTCC CCCTAACGGACACAACAAATCAGAAGACTGAGTTA CAAGCAATTCATCTAGCTTTCAGGATTCCGGGATTA GAAGTAAACATAGTGACAGACTCACAATATGCATT GGAATCATTCAAGCACAACCAGATAAGAGTGAAT CAGAGTTAGTCAGTCAAATAATAGAGCAGTTAATA AAAAAGGAAAAAGTCTACCTGGCATGGGTACCAGC ACACAAAGGAATTGGAGGAAATGAACAAGTAGATG GGTTGGTCAGTGCTGGAATCAGGAAAGTACTA</p>
45, 54	<p>헬퍼 Rev; HIV 인테그라아제; 바이러스 RNA 의 통합</p>	<p>TTTTTAGATGGAATAGATAAGGCCCAAGAAGAACA TGAGAAATATCACAGTAATTGGAGAGCAATGGCTA GTGATTTTAACTACCACCTGTAGTAGCAAAAAGAAA TAGTAGCCAGCTGTGATAAATGTCAGCTAAAAGGG GAAGCCATGCATGGACAAGTAGACTGTAGCCCAGG AATATGGCAGCTAGATTGTACACATTTAGAAGGAA AAGTTATCTTGGTAGCAGTTCATGTAGCCAGTGGAT ATATAGAAGCAGAAGTAATCCAGCAGAGACAGGG CAAGAAACAGCATACTTCTCTTAAAATTAGCAGGA AGATGGCCAGTAAAAACAGTACATACAGACAATGG CAGCAATTCACCAGTACTACAGTTAAGGCCGCCTG TTGGTGGGCGGGGATCAAGCAGGAATTTGGCATTCC CTACAATCCCCAAAGTCAAGGAGTAATAGAATCTAT GAATAAAGAATTAAGAAAATTATAGGACAGGTAA</p>

[0538]

		GAGATCAGGCTGAACATCTTAAGACAGCAGTACAA ATGGCAGTATTCATCCACAATTTTAAAAGAAAAGG GGGGATTGGGGGTACAGTGCAGGGGAAAGAATAG TAGACATAATAGCAACAGACATACAAATAAAGAA TTACAAAAACAAATTACAAAAATTCAAAATTTTCGG GTTTATTACAGGGACAGCAGAGATCCAGTTTGGAA AGGACCAGCAAAGCTCCTCTGGAAAGGTGAAGGGG CAGTAGTAATACAAGATAATAGTGACATAAAAGTA GTGCCAAGAAGAAAAGCAAAGATCATCAGGGATTA TGGAAAACAGATGGCAGGTGATGATTGTGTGGCAA GTAGACAGGATGAGGATTAA
46, 55	헬퍼/Rev; HIV RRE; Rev 요소에 결합함	AGGAGCTTTGTTCCCTTGGGTTCTTGGGAGCAGCAGG AAGCACTATGGGCGCAGCGTCAATGACGCTGACGG TACAGGCCAGACAATTATTGTCTGGTATAGTGCAGC AGCAGAACAATTTGCTGAGGGCTATTGAGGCGCAA CAGCATCTGTTGCAACTCACAGTCTGGGGCATCAAG CAGCTCCAGGCAAGAATCCTGGCTGTGGAAAGATA CCTAAAGGATCAACAGCTCCT
47, 57, 58	헬퍼/Rev; HIV Rev; 바이러스 mRNA 를 핵 수송 및 안정화시킴	ATGGCAGGAAGAAGCGGAGACAGCGACGAAGAAC TCCTCAAGGCAGTCAGACTCATCAAGTTTCTCTATC AAAGCAACCCACCTCCCAATCCCCGAGGGGACCCGA CAGGCCCGAAGGAATAGAAGAAGAAGGTGGAGAG AGAGACAGAGACAGATCCATTCGATTAGTGAACGG ATCCTTAGCACTTATCTGGGACGATCTGCGGAGCCT GTGCCTCTTCAGCTACCACCGCTTGAGAGACTTACT CTTGATTGTAACGAGGATTGTGGAACCTTCTGGGACG CAGGGGGTGGGAAGCCCTCAAATATTGGTGGAAATC TCCTACAATATTGGAGTCAGGAGCTAAAGAATAG
48, 56	헬퍼/Rev; 토끼 베타 글로빈 poly A; RNA 안정성	AGATCTTTTTCCCTCTGCCAAAAATTATGGGGACAT CATGAAGCCCCTTGAGCATCTGACTTCTGGCTAATA AAGGAAATTTATTTTCATTGCAATAGTGTGTTGGAA TTTTTGTGTCTCTCACTCGGAAGGACATATGGGAG

[0539]

		GGCAAATCATTTAAAACATCAGAATGAGTATTTGGT TTAGAGTTTGGCAACATATGCCATATGCTGGCTGCC ATGAACAAAGGTGGCTATAAAGAGGTCATCAGTAT ATGAAACAGCCCCCTGCTGTCCATTCCATTCCAT AGAAAAGCCTTGACTTGAGGTTAGATTTTTTTTATA TTTTGTTTTGTGTTATTTTTTTCTTTAACATCCCTAAA ATTTTCCTTACATGTTTTACTAGCCAGATTTTTCCCTC CTCTCCTGACTACTCCCAGTCATAGCTGTCCCTCTTC TCTTATGAAGATC
59, 63	Rev; 토끼 베타 글로빈 poly A; RNA 안정성	AGATCTTTTTCCCTCTGCCAAAAATTATGGGGACAT CATGAAGCCCCTTGAGCATCTGACTTCTGGCTAATA AAGGAAATTTATTTTCATTGCAATAGTGTGTTGGAA TTTTTGTGTCTCTCACTCGGAAGGACATATGGGAG GGCAAATCATTTAAAACATCAGAATGAGTATTTGGT TTAGAGTTTGGCAACATATGCCATATGCTGGCTGC CATGAACAAAGGTTGGCTATAAAGAGGTCATCAGT ATATGAAACAGCCCCCTGCTGTCCATTCCATTCC ATAGAAAAGCCTTGACTTGAGGTTAGATTTTTTTTA TATTTTGTGTTATTTTTTTCTTTAACATCCCTA AAATTTTCCTTACATGTTTTACTAGCCAGATTTTTCC TCCTCTCCTGACTACTCCCAGTCATAGCTGTCCCTCT TCTCTTATGGAGATC
60	외피; CMV 프로모터; 전사	ACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATCAAT TACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTT CCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCCGCTGG CTGACCGCCCAACGACCCCCGCCATTGACGTCAAT AATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGAC TTTCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTA AACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATAT GCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAA ATGGCCCCGCTGGCATTATGCCCAGTACATGACCTT ATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATT

[0540]

		AGTCATCGCTATTACCATGGTGATGCGGTTTTGGCA GTACATCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTGACTCACG GGGATTTCCAAGTCTCCACCCCATTGACGTCAATGG GAGTTTGTGTTTGGCACCAAAATCAACGGGACTTTCC AAAATGTCGTAACAACCTCCGCCCATTTGACGCAAAAT GGGCGGTAGGCGGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAA GC
61	외피; 베타 글로빈 인트론; 유전자 발현을 향상시킴	GTGAGTTTGGGGACCCTTGATTGTTCTTTCTTTTTTCG CTATTGTAATAATTCATGTTATATGGAGGGGGCAAAG TTTTCAGGGTGTGTTTAGAATGGGAAGATGTCCCT TGTATCACCATGGACCCTCATGATAATTTGTGTTCTT TCACTTTCTACTCTGTTGACAACCATTGTCTCCTCTT ATTTTCTTTTCATTTTCTGTAACTTTTTCGTTAAACTT TAGCTTGCATTTGTAACGAATTTTTAAATTCACTTTT GTTTATTTGTCAGATTGTAAGTACTTTCTCTAATCAC TTTTTTTTCAAGGCAATCAGGGTATATTATATTGTAC TTCAGCACAGTTTTAGAGAACAATTGTTATAATTAA ATGATAAGGTAGAATATTTCTGCATATAAAATTCTGG CTGGCGTGGAATATTCTTATTGGTAGAAAACAATA CACCTGGTCATCATCCTGCCTTTCTCTTTATGGTTA CAATGATATACACTGTTTGAGATGAGGATAAAAATAC TCTGAGTCCAAACCGGGCCCTCTGCTAACCATGTT CATGCCTTCTTCTTTTCCTACAG
62	외피; VSV-G; 당단백질 외피- 세포 진입	ATGAAGTGCCTTTTGTACTTAGCCTTTTTATTTCATTG GGGTGAATTGCAAGTTCACCATAGTTTTTCCACACA ACCAAAAAGGAAACTGGAAAAATGTTCCCTTCTAATT ACCATTATTGCCCGTCAAGCTCAGATTTAAATTGGC ATAATGACTTAATAGGCACAGCCTTACAAGTCAAAA ATGCCCAAGAGTCACAAGGCTATTCAAGCAGACGG TTGGATGTGTCATGCTTCCAAATGGGTCACTACTTG TGATTTCCGCTGGTATGGACCGAAGTATATAACACA TTCCATCCGATCCTTCACTCCATCTGTAGAACAATG

[0541]

		<p>CAAGGAAAGCATTGAACAAACGAAACAAGGAACTT GGCTGAATCCAGGCTTCCCTCCTCAAAGTTGTGGAT ATGCAACTGTGACGGATGCCGAAGCAGTGATTGTCC AGGTGACTCCTCACCATGTGCTGGTTGATGAATACA CAGGAGAATGGGTTGATTCACAGTTCATCAACGGA AAATGCAGCAATTACATATGCCCCACTGTCCATAAC TCTACAACCTGGCATTCTGACTATAAGGTCAAAGGG CTATGTGATTCTAACCTCATTTCCATGGACATCACCT TCTTCTCAGAGGACGGAGAGCTATCATCCCTGGGAA AGGAGGGCACAGGGTTCAGAAGTAACTACTTTGCTT ATGAAACTGGAGGCAAGGCCTGCAAAATGCAATAC TGCAAGCATTGGGGAGTCAGACTCCCATCAGGTGTC TGGTTCGAGATGGCTGATAAGGATCTCTTTGCTGCA GCCAGATTCCCTGAATGCCCAGAAGGGTCAAGTATC TCTGCTCCATCTCAGACCTCAGTGGATGTAAGTCTA ATTACAGGACGTTGAGAGGATCTTGGATTATTCCTC TGCCAAGAAACCTGGAGCAAAATCAGAGCGGGTCT TCCAATCTCTCCAGTGGATCTCAGCTATCTTGCTCCT AAAAACCCAGGAACCGGTCCTGCTTTCACCATAATC AATGGTACCCTAAAATACTTTGAGACCAGATACATC AGAGTCGATATTGCTGCTCCAATCCTCTCAAGAATG GTCGGAATGATCAGTGGAACTACCACAGAAAGGGA ACTGTGGGATGACTGGGCACCATATGAAGACGTGG AAATTGGACCCAATGGAGTTCTGAGGACCAGTTCA GGATATAAGTTTCCTTTATACATGATTGGACATGGT ATGTTGGACTCCGATCTTCATCTTAGCTCAAAGGCT CAGGTGTTCGAACATCCTCACATTCAAGACGCTGCT TCGCAACTTCCTGATGATGAGAGTTTATTTTTGGTG ATACTGGGCTATCCAAAAATCCAATCGAGCTTGTAG AAGGTTGGTTCAGTAGTTGGAAAAGCTCTATTGCTT CTTTTTCTTTATCATAGGGTTAATCATTGGACTATT CTTGTTCTCCGAGTTGGTATCCATCTTTGCATTAAA</p>
--	--	--

[0542]

		TTAAAGCACACCAAGAAAAGACAGATTTATACAGACATAGAGATGA
65	프로모터; PGK	GGGGTTGGGGTTGCGCCTTTTCCAAGGCAGCCCTGG GTTTGCAGGGACGCGGCTGCTCTGGGCGTGGTTC CGGAAACGCAGCGCGCCGACCCTGGGTCTCGCA CATTCTTACGTCCGTTTCGAGCGTCACCCGGATCT TCGCCGCTACCCTTGTGGGCCCCCGGCGACGCTTC CTGCTCCGCCCTAAGTCGGGAAGGTTCTTGCGGT TCGCGGCGTGCCGGACGTGACAAACGGAAGCCGCA CGTCTACTAGTACCCTCGCAGACGACAGCGCCAG GGAGCAATGGCAGCGCGCCGACC GCGATGGGCTGT GGCCAATAGCGGCTGCTCAGCAGGGCGCGCCGAGA GCAGCGGCCGGGAAGGGGCGGTGCGGGAGGCGGG GTGTGGGGCGGTAGTGTGGGCCCTGTTCTGCCCGC GCGGTGTTCCGCATTCTGCAAGCCTCCGGAGCGCAC GTCGGCAGTCGGCTCCCTCGTTGACCGAATCACCGA CCTCTCTCCCCAG
66	프로모터; Ubc	GCGCCGGGTTTTGGCGCCTCCCGCGGGCGCCCCCT CCTCACGGCGAGCGCTGCCACGTCAGACGAAGGGC GCAGGAGCGTTCCTGATCCTTCCGCCCGGACGCTCA GGACAGCGGCCCGCTGCTCATAAGACTCGGCCTTAG AACCCAGTATCAGCAGAAGGACATTTTAGGACGG GACTTGGGTGACTCTAGGGCACTGGTTTTCTTTCCA GAGAGCGGAACAGGCGAGGAAAAGTAGTCCCTTCT CGGCGATTCTGCGGAGGGATCTCCGTGGGGCGGTG AACGCCGATGATTATATAAGGACGCGCCGGGTGTG GCACAGCTAGTTCCGTCGCAGCCGGGATTTGGGTGCG CGGTCTTGTGTTGTGGATCGCTGTGATCGTCACTTGG TGAGTTGCGGGCTGCTGGGCTGGCCGGGGCTTTCGT GGCCGCCGGCCGCTCGGTGGGACGGAAGCGTGTG GAGAGACCGCAAGGGCTGTAGTCTGGGTCCGCGA GCAAGGTTGCCCTGAACTGGGGGTGGGGGGAGCG

[0543]

		<p>CACAAAATGGCGGCTGTTCCCGAGTCTTGAATGGAA GACGCTTGTAAGGCGGGCTGTGAGGTCGTTGAAAC AAGGTGGGGGGCATGGTGGGCGCAAGAACCCAAG GTCTTGAGGCCTTCGCTAATGCGGGAAAGCTCTTAT TCGGGTGAGATGGGCTGGGGCACCATCTGGGGACC CTGACGTGAAGTTTGTCACTGACTGGAGAACTCGGG TTTGTCTGCTGGTTGCGGGGGCGGCAGTTATGCGGT GCCGTTGGGCAGTGCACCCGTACCTTTGGGAGCGCG CGCCTCGTCTGTGTCGTGACGTCACCCGTTCTGTTGG CTTATAATGCAGGGTGGGGCCACCTGCCGGTAGGTG TGCGGTAGGCTTTTCTCCGTCGCAGGACGCAGGGTT CGGGCCTAGGGTAGGCTCTCCTGAATCGACAGGCG CCGGACCTCTGGTGAGGGGAGGGATAAGTGAGGCG TCAGTTTCTTTGGTCGGTTTTATGTACCTATCTTCTT AAGTAGCTGAAGCTCCGGTTTTGAACTATGCGCTCG GGGTTGGCGAGTGTGTTTTGTGAAGTTTTTAGGCA CCTTTTGAAATGTAATCATTGGGTCAATATGTAAT TTTCAGTGTTAGACTAGTAAA</p>
67	Poly A; SV40	<p>GTTTATTGCAGCTTATAATGGTTACAAATAAAGCAA TAGCATCACAAATTCACAAATAAAGCATTTTTTTC ACTGCATTCTAGTTGTGGTTTTGTCCAAACTCATCAA TGTATCTTATCA</p>
68	Poly A; bGH	<p>GACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGC CCCTCCCCCGTGCCTTCCCTTGACCCTGGAAGGTGCC ACTCCCACTGTCCTTTCCTAATAAAAATGAGGAAATT GCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTG GGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGG ATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCG GTGGGCTCTATGG</p>
69	HIV Gag; Bal	<p>ATGGGTGCGAGAGCGTCAGTATTAAGCGGGGAGA ATTAGATAGGTGGGAAAAAATTCGGTTAAGGCCAG GGGGAAAGAAAAAATATAGATTAACATATAGTA</p>

[0544]

	<p>TGGGCAAGCAGGGAAGCTAGAAAAGATTCGCAGTCAA TCCTGGCCTGTTAGAAAACATCAGAAGGCTGCAGAC AAATACTGGGACAGCTACAACCATCCCTTCAGACA GGATCAGAAGAACTTAGATCATTATATAATACAGTA GCAACCCTCTATTGTGTACATCAAAAGATAGAGGTA AAAGACACCAAGGAAGCTTTAGACAAAATAGAGGA AGAGCAAAACAAATGTAAGAAAAAGGCACAGCAA GCAGCAGCTGACACAGGAAACAGCGGTCAGGTCAG CCAAAATTTCCCTATAGTGCAGAACCTCCAGGGCA AATGGTACATCAGGCCATATCACCTAGAACTTTAAA TGCATGGGTAAAAGTAATAGAAGAGAAAGCTTTCA GCCCAGAAGTAATACCCATGTTTTTCAGCATTATCAG AAGGAGCCACCCCAAGATTTAAACACCATGCTA AACACAGTGGGGGGACATCAAGCAGCCATGCAAAAT GTTAAAAGAACCCATCAATGAGGAAGCTGCAAGAT GGGATAGATTGCATCCCGTGCAGGCAGGGCCTGTTG CACCAGGCCAGATAAGAGATCCAAGGGGAAGTGAC ATAGCAGGAAGTACCAGTACCCCTCAGGAACAAAT AGGATGGATGACAAGTAATCCACCTATCCCAGTAG GAGAAATCTATAAAAAGATGGATAATCCTGGGATTA AATAAAATAGTAAGGATGTATAGCCCTACCAGCATT TTGGACATAAGACAAGGACCAAAGGAACCCTTTAG AGACTATGTAGACCGGTTCTATAAAACTCTAAGAGC CGAGCAAGCTTCACAGGAGGTAAAAAATTGGATGA CAGAAACCTTGTTGGTCCAAAATGCGAACCCAGATT GTAAGACTATTTTAAAAGCATTGGGACCAGCAGCTA CACTAGAAGAAATGATGACAGCATGTCAGGGAGTG GGAGGACCCAGCCATAAAGCAAGAATTTTGGCAGA AGCAATGAGCCAAGTAACAAATTCAGCTACCATAA TGATGCAGAAAGGCAATTTTAGGAACCAAAGAAAG ATTGTTAAATGTTTCAATTGTGGCAAAGAAGGGCAC ATAGCCAGAAACTGCAGGGCCCTAGGAAAAGGGG</p>
--	---

[0545]

		<p>CTGTTGGAAATGTGGAAAGGAAGGACACCAAATGA AAGACTGTACTGAGAGACAGGCTAATTTTTTAGGGA AAATCTGGCCTTCCCACAAAGGAAGGCCAGGGAAT TTCCTTCAGAGCAGACCAGAGCCAACAGCCCCACC AGCCCCACCAGAAGAGAGCTTCAGGTTTGGGGAAG AGACAACAACCTCCCTCTCAGAAGCAGGAGCTGATA GACAAGGAACTGTATCCTTTAGCTTCCCTCAGATCA CTCTTTGGCAACGACCCCTCGTCACAATAA</p>
70	HIV Pol; Bal	<p>ATGAATTTGCCAGGAAGATGGAAACCAAAAATGAT AGGGGGAATTGGAGGTTTTATCAAAGTAAGACAGT ATGATCAGATACTCATAGAAATCTGTGGACATAAA GCTATAGGTACAGTATTAATAGGACCTACACCTGTC AACATAATTGGAAGAAATCTGTTGACTCAGATTGGT TGCACTTTAAATTTCCATTAGTCCTATTGAAACTG TACCAGTAAAATTTAAACCAGGAATGGATGGCCCA AAAGTTAAACAATGGCCACTGACAGAAGAAAAAAT AAAAGCATTAAATGGAAATCTGTACAGAAATGGAAA AGGAAGGGAAAAATTTCAAAAATTGGGCCTGAAAAT CCATACAATACTCCAGTATTTGCCATAAAGAAAAAA GACAGTACTAAATGGAGAAAATTAGTAGATTTTCAG AGAACTTAATAAGAAAACTCAAGACTTCTGGGAAG TACAATTAGGAATACACATCCCGCAGGGGTAAAA AAGAAAAATCAGTAACAGTACTGGATGTGGGTGA TGCATATTTTTCAGTTCCCTTAGATAAAGAATTCAG GAAGTATACTGCATTTACCATACCTAGTATAAACAA TGAAACACCAGGGATCAGATATCAGTACAATGTAC TTCCACAGGGATGGAAAGGATCACCAGCAATATTC AAAGTAGCATGACAAGAATCTTAGAGCCTTTTAGA AAACAAAATCCAGAAATAGTGATCTATCAATACAT GGATGATTTGTATGTAGGATCTGACTTAGAAATAGG GCAGCATAGAACAAAAATAGAGGAACTGAGACAAC ATCTGTTGAGGTGGGGATTTACCACACCAGACAAA</p>

[0546]

		AAACATCAGAAAGAACCTCCATTCCCTTTGGATGGGT TATGAACTCCATCCTGATAAATGGACAGTACAGCCT ATAGTGCTGCCAGAAAAAGACAGCTGGACTGTCAA TGACATACAGAAGTTAGTGGGAAAATTGAATTGGG CAAGTCAGATTTACCCAGGAATTAAGTAAAGCAA TTATGTAGGCTCCTTAGGGGAACCAAGGCATTAACA GAAGTAATACCACTAACAAAAGAAACAGAGCTAGA ACTGGCAGAGAACAGGGAAATTCTAAAAGAACCAG TACATGGGGTGTATTATGACCCATCAAAAGACTTAA TAGCAGAAATACAGAAGCAGGGGCAAGGCCAATGG ACATATCAAATTTATCAAGAGCCATTTAAAAATCTG AAAACAGGAAAATATGCAAGAATGAGGGGTGCCCCA CACTAATGATGTAAAACAATTAACAGAGGCAGTGC AAAAAATAACCACAGAAAGCATAGTAATATGGGGA AAGACTCCTAAATTTAAACTACCCATACAAAAAGA AACATGGGAAACATGGTGGACAGAGTATTGGCAAG CCACCTGGATTCCCTGAGTGGGAGTTTGTCAATACCC CTCCCTTAGTGAAATTATGGTACCAGTTAGAGAAAG AACCCATAATAGGAGCAGAAACATTCTATGTAGAT GGAGCAGCTAACCGGGAGACTAAATTAGGAAAAGC AGGATATGTTACTAACAGAGGAAGACAAAAAGTTG TCTCCCTAACTGACACAACAAATCAGAAGACTGAGT TACAAGCAATTCATCTAGCTTTACAAGATTCAGGAT TAGAAGTAAACATAGTAACAGACTCACAATATGCA TTAGGAATCATTCAAGCACAACCAGATAAAAGTGA ATCAGAGTTAGTCAGTCAAATAATAGAACAGTTAAT AAAAAAGGAAAAGGTCTACCTGGCATGGGTACCAG CGCACAAAGGAATTGGAGGAAATGAACAAGTAGAT AAATTAGTCAGTACTGGAATCAGGAAAAGTACTA
71	HIV 인테그라아제; Bal	TTTTATAGATGGAATAGATATAGCCCAAGAAGAACAT GAGAAATATCACAGTAATTGGAGAGCAATGGCTAG TGATTTAACCTGCCACCTGTGGTAGCAAAAGAAAT

[0547]

		<p>AGTAGCCAGCTGTGATAAATGTCAGCTAAAAGGAG AAGCCATGCATGGACAAGTAGACTGTAGTCCAGGA ATATGGCAACTAGATTGTACACATTTAGAAGGAAA AATTATCCTGGTAGCAGTTCATGTAGCCAGTGGATA TATAGAAGCAGAAGTTATTCCAGCAGAGACAGGGC AGGAAACAGCATACTTTCTCTTAAAATTAGCAGGAA GATGGCCAGTAAAAACAATACATACAGACAATGGC AGCAATTTCACTAGTACTACAGTCAAGGCCGCTGT TGGTGGGCGGGGATCAAGCAGGAATTTGGCATTCC CTACAATCCCCAAAAGTCAGGGAGTAGTAGAATCTAT AAATAAAGAATTAAGAAAATTATAGGACAGGTAA GAGATCAGGCTGAACATCTTAAAACAGCAGTACAA ATGGCAGTATTCATCCACAATTTTAAAAGAAAAGG GGGGATTGGGGGTATAGTGCAGGGGAAAGAATAG TAGACATAATAGCAACAGACATACAAACTAAAGAA TTACAAAAACAAATTACAAAAATTCAAAATTTTCGG GTTTATTACAGGGACAGCAGAGATCCACTTTGGAAA GGACCAGCAAAGCTTCTCTGGAAAGGTGAAGGGGC AGTAGTAATACAAGATAATAGTGACATAAAAGTAG TACCAAGAAGAAAAGCAAAGATCATTAGGGATTAT GGAAAACAGATGGCAGGTGATGATTGTGTGGCAAG TAGACAGGATGAGGATTAG</p>
72	외)표; RD114	<p>ATGAAACTCCCAACAGGAATGGTCATTTTATGTAGC CTAATAATAGTTCGGGCAGGGTTTGACGACCCCCGC AAGGCTATCGCATTAGTACAAAAACAACATGGTAA ACCATGCGAATGCAGCGGAGGGCAGGTATCCGAGG CCCCACCGAACTCCATCCAACAGGTAACCTTGCCCAG GCAAGACGGCCTACTTAATGACCAACCAAAAATGG AAATGCAGAGTCACTCCAAAAAATCTCACCCCTAGC GGGGGAGAACTCCAGAACTGCCCTGTAACTTTC CAGGACTCGATGCACAGTTCTTGTTATACTGAATAC CGGCAATGCAGGGCGAATAATAAGACATACTACAC</p>

[0548]

	<p>GGCCACCTTGCTTAAAATACGGTCTGGGAGCCTCAA CGAGGTACAGATATTACAAAACCCCAATCAGCTCCT ACAGTCCCCTTGTAGGGGCTCTATAAATCAGCCCGT TTGCTGGAGTGCCACAGCCCCATCCATATCTCCGA TGGTGGAGGACCCCTCGATACTAAGAGAGTGTGGA CAGTCCAAAAAAGGCTAGAACAAATTCATAAGGCT ATGCATCCTGAACTTCAATACCACCCCTTAGCCCTG CCCAAAGTCAGAGATGACCTTAGCCTTGATGCACGG ACTTTTGATATCCTGAATACCACTTTTAGGTTACTCC AGATGTCCAATTTTAGCCTTGCCCAAGATTGTTGGC TCTGTTTAAACTAGGTACCCCTACCCCTCTTGCGA TACCCACTCCCTCTTTAACCTACTCCCTAGCAGACTC CCTAGCGAATGCCTCCTGTCAGATTATACCTCCCT CTTGTTCAACCGATGCAGTTCTCCAACCGTCCTG TTTATCTTCCCCTTTCATTAACGATACGGAACAAAT AGACTTAGGTGCAGTCACCTTTACTAACTGCACCTC TGTAGCCAATGTCAGTAGTCCTTTATGTGCCCTAAA CGGGTCAGTCTTCTCTGTGGAAATAACATGGCATA CACCTATTTACCCCAAAACTGGACAGGACTTTGCGT CCAAGCCTCCCTCCTCCCGACATTGACATCATCCC GGGGGATGAGCCAGTCCCATTCTGCCATTGATCA TTATATACATAGACCTAAACGAGCTGTACAGTTCAT CCCTTTACTAGCTGGACTGGGAATCACCGCAGCATT CACCACCGGAGCTACAGGCCTAGGTGTCTCCGTCAC CCAGTATACAAAATTATCCCATCAGTTAATATCTGA TGTCCAAGTCTTATCCGGTACCATACAAGATTTACA AGACCAGGTAGACTCGTTAGCTGAAGTAGTTCTCCA AAATAGGAGGGGACTGGACCTACTAACGGCAGAAC AAGGAGGAATTTGTTTAGCCTTACAAGAAAAATGCT GTTTTTATGCTAACAAGTCAGGAATTGTGAGAAACA AAATAAGAACCCTACAAGAAGAATTACAAAAACGC AGGGAAAGCCTGGCATCCAACCCTCTCTGGACCGG</p>
--	---

[0549]

		<p>GCTGCAGGGCTTTCTTCCGTACCTCCTACCTCTCCTG GGACCCCTACTCACCCTCCTACTCATACTAACCATT GGGCCATGCGTTTTCAATCGATTGGTCCAATTTGTT AAAGACAGGATCTCAGTGGTCCAGGCTCTGGTTTTG ACTCAGCAATATCACCAGCTAAAACCCATAGAGTA CGAGCCATGA</p>
73	외피; GALV	<p>ATGCTTCTCACCTCAAGCCCGCACCACCTTCGGCAC CAGATGAGTCCTGGGAGCTGGAAAAGACTGATCAT CCTCTTAAGCTGCGTATTCGGAGACGGCAAAACGA GTCTGCAGAATAAGAACCCCCACCAGCCTGTGACCC TCACCTGGCAGGTAAGTGTCCCAAAGTGGGGACGTTG TCTGGGACAAAAGGCAGTCCAGCCCCTTTGGACTT GGTGGCCCTCTCTTACACCTGATGTATGTGCCCTGG CGGCCGGTCTTGAGTCCTGGGATATCCCAGGATCCG ATGTATCGTCCTCTAAAAGAGTTAGACCTCCTGATT CAGACTATACTGCCGCTTATAAGCAAATCACCTGGG GAGCCATAGGGTGCAGCTACCCTCGGGCTAGGACC AGGATGGCAAATCCCCCTTCTACGTGTGTCCCCGA GCTGGCCGAACCCATTGAGAAGCTAGGAGGTGTGG GGGGCTAGAATCCCTATACTGTAAAGAATGGAGTT GTGAGACCACGGGTACCGTTTATTGGCAACCCAAGT CCTCATGGGACCTCATAACTGTAAAATGGGACCAA AATGTGAAATGGGAGCAAAAATTTCAAAAAGTGTGA ACAAACCGGCTGGTGTAAACCCCTCAAGATAGACTT CACAGAAAAAGGAAAACCTCTCCAGAGATTGGATAA CGGAAAAAACCTGGGAATTAAGGTTCTATGTATATG GACACCAGGCATACAGTTGACTATCCGCTTAGAGG TCACTAACATGCCGGTTGTGGCAGTGGGCCAGACC CTGTCCCTTGCAGAACAGGGACCTCCTAGCAAGCCCC TCACTCTCCCTCTCTCCCCACGGAAAGCGCCGCCCA CCCCCTACCCCCGGCGGCTAGTGAGCAAACCCCTG CGGTGCATGGAGAAACTGTTACCCTAAACTCTCCCGC</p>

[0550]

		<p>CTCCCACCAGTGGCGACCGACTCTTTGGCCTTGTGC AGGGGGCCTTCCTAACCTTGAATGCTACCAACCCAG GGGCCACTAAGTCTTGCTGGCTCTGTTGGGCATGA GCCCCCTTATTATGAAGGGATAGCCTCTTCAGGAG AGGTCGCTTATACCTCCAACCATACCCGATGCCACT GGGGGGCCCAAGGAAAGCTTACCCTCACTGAGGTC TCCGGACTCGGGTCATGCATAGGGAAGGTGCCTCTT ACCCATCAACATCTTTGCAACCAGACCTTACCCATC AATTCTCTAAAAACCATCAGTATCTGCTCCCCTCA AACCATAGCTGGTGGGCCTGCAGCACTGGCCTCACC CCCTGCCTCTCCACCTCAGTTTTTAATCAGICTAAAG ACTTCTGTGTCCAGGTCCAGCTGATCCCCGCATCT ATTACCATTCTGAAGAAACCTTGTTACAAGCCTATG ACAAATCACCCCCCAGGTTTAAAAGAGAGCCTGCCT CACTTACCCTAGCTGTCTTCCCTGGGGTTAGGGATTG CGGCAGGTATAGGTACTGGCTCAACCGCCCTAATTA AAGGGCCCATAGACCTCCAGCAAGGCCTAACCAGC CTCCAAATCGCCATTGACGCTGACCTCCGGGCCCTT CAGGACTCAATCAGCAAGCTAGAGGACTCACTGAC TTCCCTATCTGAGGTAGTACTCCAAAATAGGAGAGG CCTTGACTTACTATTCCTTAAAGAAGGAGGCCTCTG CGCGGCCCTAAAAGAAGAGTGCTGTTTTTATGTAGA CCACTCAGGTGCAGTACGAGACTCCATGAAAAAAC TTAAAGAAAGACTAGATAAAAAGACAGTTAGAGCGC CAGAAAAACCAAACTGGTATGAAGGGTGGTTCAA TAACTCCCCTTGGTTTACTACCCTACTATCAACCATC GCTGGGCCCTATTGCTCCTCCTTTTGTACTCACTC TTGGGCCCTGCATCATCAATAAATTAATCCAATTCA TCAATGATAGGATAAGTGCAGTCAAAATTTTAGTCC TTAGACAGAAATATCAGACCCTAGATAACGAGGAA AACCTTAA</p>
74	외표; FUG	ATGGTCCGCAGGTTCTTTTGTGTTGACTCCTTCTGG

[0551]

		<p>GTTTTTCGTTGTGTTTCGGGAAGTTCCCCATTTACAC GATACCAGACGAACTTGGTCCCTGGAGCCCTATTGA CATACACCATCTCAGCTGTCCAAATAACCTGGTTGT GGAGGATGAAGGATGTACCAACCTGTCCGAGTTCTC CTACATGGAACCTCAAAGTGGGATACATCTCAGCCAT CAAAGTGAACGGGTTCACTTGCACAGGTGTTGTGAC AGAGGCAGAGACCTACACCAACTTTGTTGGTTATGT CACAACCACATTCAAGAGAAAGCATTTCGCCCCAC CCCAGACGCATGTAGAGCCGCGTATAACTGGAAGA TGGCCGGTGACCCAGATATGAAGAGTCCCTACAC AATCCATACCCCGACTACCACTGGCTTCGAACTGTA AGAACCACCAAAGAGTCCCTCATTATCATATCCCCA AGTGTGACAGATTTGGACCCATATGACAAATCCCTT CACTCAAGGGTCTTCCCTGGCGGAAAGTGCTCAGGA ATAACGGTGTCTCTACCTACTGCTCAACTAACCAT GATTACACCATTTGGATGCCCGAGAATCCGAGACCA AGGACACCTTGTGACATTTTACCAATAGCAGAGGG AAGAGAGCATCCAACGGGAACAAGACTTGCGGCTT TGTGGATGAAAGAGGCCTGTATAAGTCTCTAAAAG GAGCATGCAGGCTCAAGTTATGTGGAGTTCTTGGAC TTAGACTTATGGATGGAACATGGGTCGCGATGCAA ACATCAGATGAGACCAAATGGTGCCCTCCAGATCA GTTGGTGAATTTGCACGACTTTCGCTCAGACGAGAT CGAGCATCTCGTTGTGGAGGAGTTAGTTAAGAAAA GAGAGGAATGTCTGGATGCATTAGAGTCCATCATG ACCACCAAGTCAGTAAGTTTCAGACGTCTCAGTCAC CTGAGAAAACCTGTCCCAGGGTTTGAAAAGCATAT ACCATATTCAACAAAACCTTGATGGAGGCTGATGCT CACTACAAGTCAGTCCGACCTGGAATGAGATCATC CCCTCAAAAAGGGTGTGTTGAAAAGTTGGAGGAAGGTG CCATCCTCATGTGAACGGGGTGTGTTTCAATGGTAT AATATTAGGGCTGACGACCATGTCCTAATCCCAGA</p>
--	--	--

[0552]

		<p>GATGCAATCATCCCTCCTCCAGCAACATATGGAGTT GTTGGAATCTTCAGTTATCCCCCTGATGCACCCCCT GGCAGACCCTTCTACAGTTTTCAAAGAAGGTGATGA GGCTGAGGATTTTGTGAAGTTCACCTCCCCGATGT GTACAAACAGATCTCAGGGGTTGACCTGGGTCTCCC GAACTGGGGAAAGTATGTATTGATGACTGCAGGGG CCATGATTGGCCTGGTGTGATATTTCCCTAATGA CATGGTGCAGAGTTGGTATCCATCTTTCATTAAT TAAAGCACACCAAGAAAAGACAGATTTATACAGAC ATAGAGATGAACCGACTTGGAAAGTAA</p>
75	외피; LCMV	<p>ATGGGTCAGATTGTGACAATGTTTGAGGCTCTGCCT CACATCATCGATGAGGTGATCAACATTGTCATTATT GTGCTTATCGTGATCACGGGTATCAAGGCTGTCTAC AATTTTGCCACCTGTGGGATATTCGCATTGATCAGT TTCCTACTTCTGGCTGGCAGGTCCTGTGGCATGTAC GGICTTAAGGGACCCGACATTTACAAAGGAGTTTAC CAATTTAAGTCAGTGGAGTTTGATATGTCACATCTG AACCTGACCATGCCAACGCATGTTTCAGCCAACAAC TCCCACCATTACATCAGTATGGGGACTTCTGGACTA GAATTGACCTTCACCAATGATTCCATCATCAGTCAC AACTTTTGCAATCTGACCTCTGCCTTCAACAAAAAG ACCTTTGACCACACTCATGAGTATAGTTTCGAGC CTACACCTCAGTATCAGAGGGAACCTCCAACATAAG GCAGTATCCTGCGACTTCAACAATGGCATAACCATC CAATACAACCTGACATTCTCAGATCGACAAAGTGCT CAGAGCCAGTGTAGAACCTTCAGAGGTAGAGTCCT AGATATGTTTAGAAGTGCCTTCGGGGGGAAATACAT GAGGAGTGGCTGGGGCTGGACAGGCTCAGATGGCA AGACCACCTGGTGTAGCCAGACGAGTTACCAATAC CTGATTATACAAAATAGAACCTGGGAAAACCACTG CACATATGCAGGTCCTTTTGGGATGTCCAGGATTCT CCTTCCCAAGAGAAGACTAAGTTCTTCACTAGGAG</p>

[0553]

		<p>ACTAGCGGGCACATTCACCTGGACTTTGTCAGACTC TTCAGGGGTGGAGAATCCAGGTGGTTATTGCCTGAC CAAATGGATGATTCTTGCTGCAGAGCTTAAGTGTTT CGGGAACACAGCAGTTGCGAAATGCAATGTAAATC ATGATGCCGAATCTGTGACATGCTGCGACTAATTG ACTACAACAAGGCTGCTTTGAGTAAGTTCAAAGAG GACGTAGAATCTGCCTTGCCTTATTCAAAACAACA GTGAATTCTTTGATTTTCAGATCAACTACTGATGAGG AACCCTTGAGAGATCTGATGGGGGTGCCATATTGC AATTACTCAAAGTTTTGGTACCTAGAACATGCAAAG ACCGGCGAAACTAGTGTCCCAAGTGTGGCTTGTC ACCAATGGTTCTTACTTAAATGAGACCCACTTCAGT GATCAAATCGAACAGGAAGCCGATAACATGATTAC AGAGATGTTGAGGAAGGATTACATAAAGAGGCAGG GGAGTACCCCCCTAGCATTGATGGACCTTCTGATGT TTCCACATCTGCATATCTAGTCAGCATCTTCTGCA CCTTGTCAAATACCAACACACAGGCACATAAAAG GTGGCTCATGTCCAAAGCCACACCGATTAACCAACA AAGGAATTTGTAGTTGTGGTGCATTTAAGGTGCCTG GTGTA AAAACCGTCTGGAAAAGACGCTGA</p>
76	외; FPV	<p>ATGAACACTCAAATCCTGGTTTTCGCCCTTGTGGCA GTCATCCCCACAAATGCAGACAAAATTTGTCTTGGA CATCATGCTGTATCAAATGGCACCAAAGTAAACAC ACTCACTGAGAGAGGAGTAGAAGTTGTCAATGCAA CGGAAACAGTGGAGCGGACAAACATCCCCAAAATT TGCTCAAAGGGAAAAGAACCACTGATCTTGGCCA ATGCGGACTGTTAGGGACCATTACCGGACCACCTCA ATGCGACCAATTTCTAGAATTTTCAGCTGATCTAAT AATCGAGAGACGAGAAGGAAATGATGTTTGTACC CGGGGAAGTTTGTAAATGAAGAGGCATTGCGACAA ATCCTCAGAGGATCAGGTGGGATTGACAAAGAAAC AATGGGATTCACATATAGTGGAATAAGGACCAACG</p>

[0554]

		<p>GAACAAC TAGTGCATGTAGAAGATCAGGGTCTTCAT TCTATGCAGAAATGGAGTGGCTCCTGTCAAATACAG ACAATGCTGCTTTCCACAAATGACAAAATCATAACA AAAACACAAGGAGAGAATCAGCTCTGATAGTCTGG GGAATCCACCATTTCAGGATCAACCACCGAACAGAC CAAAC TATATGGGAGTGGAAATAAACTGATAACAG TCGGGAGTTCCAAATATCATCAATCTTTTGTGCCGA GTCCAGGAACACGACCGCAGATAAATGGCCAGTCC GGACGGATTGATTTTCATTGGTTGATCTTGGATCCC AATGATACAGTTACTTTTAGTTTCAATGGGGCTTTC ATAGCTCCAAATCGTGCCAGCTTCTTGAGGGGAAAAG TCCATGGGGATCCAGAGCGATGTGCAGGTTGATGCC AATTGCGAAGGGGAATGCTACCACAGTGGAGGGAC TATAACAAGCAGATTGCCTTTTCAAACATCAATAG CAGAGCAGTTGGCAAATGCCCAAGATATGTAAAAC AGGAAAGTTTATTATTGGCAACTGGGATGAAGAAC GTTCCCGAACCTTCCAAAAAAGGAAAAAAGAGG CCTGTTTGGCGCTATAGCAGGGTTTATTGAAAATGG TTGGGAAGGTCTGGTCGACGGGTGGTACGGTTTCAG GCATCAGAATGCACAAGGAGAAGGAACTGCAGCAG ACTACAAAAGCACCCAATCGGCAATTGATCAGATA ACCGGAAAGTTAAATAGACTCATTGAGAAAACCAA CCAGCAATTTGAGCTAATAGATAATGAATTCACTGA GGTGAAAAGCAGATTGGCAATTTAATTA ACTGGA CCAAAGACTCCATCACAGAAGTATGGTCTTACAATG CTGAACTTCTTGTGGCAATGGAAAACCAGCACACTA TTGATTTGGCTGATTCAGAGATGAACAAGCTGTATG AGCGAGTGAGGAAACAATTAAGGGAAAATGCTGAA GAGGATGGCACTGGTTGCTTTGAAATTTTTCATAAA TGTGACGATGATTGTATGGCTAGTATAAGGAACAAT ACTTATGATCACAGCAAATACAGAGAAGAAGCGAT GCAAAAATAGAATACAAATTGACCCAGTCAAATTGA</p>
--	--	--

[0555]

		<p>GTAGTGGCTACAAAGATGTGATACTTTGGTTTAGCT TCGGGGCATCATGCTTTTTGCTTCTTGCCATTGCAAT GGGCCTTGTTTTTCATATGTGTGAAGAACGGAAACAT GCGGTGCACTATTTGTATATAA</p>
77, 78	외) 피; RRV	<p>AGTGTAACAGAGCACTTTAATGTGTATAAGGCTACT AGACCATACCTAGCACATTGCGCCGATTGCGGGGA CGGGTACTTCTGCTATAGCCCAGTTGCTATCGAGGA GATCCGAGATGAGGCGTCTGATGGCATGCTTAAGAT CCAAGTCTCCGCCAAATAGGTCTGGACAAGGCAG GCACCCACGCCACACGAAGCTCCGATATATGGCTG GTCATGATGTTTCAGGAATCTAAGAGAGATTCTTGA GGGTGTACACGTCCGCAGCGTGCTCCATACATGGGA CGATGGGACACTTCATCGTCGCACACTGTCCACCAG GCGACTACCTCAAGGTTTCGTTTCGAGGACGCAGATT CGCACGTGAAGGCATGTAAGGTCCAATACAAGCAC AATCCATTGCCGGTGGGTAGAGAGAAGTTCGTGGTT AGACCACACTTTGGCGTAGAGCTGCCATGCACCTCA TACCAGCTGACAACGGCTCCCACCGACGAGGAGAT TGACATGCATACACCGCCAGATATACCGGATCGCAC CCTGCTATCACAGACGGCGGGCAACGTCAAAATAA CAGCAGGCGGCAGGACTATCAGGTACAACGTACC TCGCGCCGTGACAACGTAGGCACTACCAGTACTGA CAAGACCATCAACACATGCAAGATTGACCAATGCC ATGCTGCCGTCACCAGCCATGACAAATGGCAATTTA CCTCTCCATTTGTTCCAGGGCTGATCAGACAGCTA GGAAAGGCAAGGTACACGTTCCGTTCCCTCTGACTA ACGTCACCTGCCGAGTGCCGTTGGCTCGAGCGCCGG ATGCCACCTATGGTAAGAAGGAGGTGACCCTGAGA TTACACCCAGATCATCCGACGCTTCTCTCTATAGG AGTTTAGGAGCCGAACCGCACCCGTACGAGGAATG GGTGACAAGTTCTCTGAGCGCATCATCCCAGTGAC GGAAGAAGGGATTGAGTACCAGTGGGGCAACAACC</p>

[0556]

		<p>CGCCGGTCTGCCTGTGGGCGCAACTGACGACCGAG GGCAAACCCCATGGCTGGCCACATGAAATCATTCA GTACTATTATGGACTATACCCCGCCGCCACTATTGC CGCAGTATCCGGGGCGAGTCTGATGGCCCTCCTAAC TCTGGCGGCCACATGCTGCATGCTGGCCACCGCGAG GAGAAAGTGCCTAACACCGTACGCCCTGACGCCAG GAGCGGTGGTACCGTTGACACTGGGGCTGCTTTGCT GCGCACCGAGGGCGAATGCA</p>
79	외피; 에볼라	<p>ATGGGTGTTACAGGAATATTGCAGTTACCTCGTGAT CGATTCAAGAGGACATCATTCTTTCTTTGGGTAATT ATCCTTTTCCAAAGAACATTTTCCATCCCCTTGGA GTCATCCACAATAGCACATTACAGGTTAGTGATGTC GACAAACTGGTTTGCCGTGACAAACTGTCATCCACA AATCAATTGAGATCAGTTGGACTGAATCTCGAAGG GAATGGAGTGGCAACTGACGTGCCATCTGCAACTA AAAGATGGGGCTTCAGGTCCGGTGTCCACCAAAG GTGGTCAATTATGAAGCTGGTGAATGGGCTGAAAA CTGCTACAATCTTGAAATCAAAAAACCTGACGGGA GTGAGTGTCTACCAGCAGCGCCAGACGGGATTCGG GGCTTCCCCCGGTGCCGGTATGTGCACAAAGTATCA GGAACGGGACCGTGTGCCGGAGACTTTGCCTTCCAC AAAGAGGGTGTCTTCTCCTGTATGACCGACTTGCT TCCACAGTTATCTACCGAGGAACGACTTTCGCTGAA GGTGTGCTTGCATTTCTGATACTGCCCAAGCTAAG AAGGACTTCTTCAGCTCACACCCCTTGAGAGAGCCG GTCAATGCAACGGAGGACCCGTCTAGTGGCTACTAT TCTACCACAATTAGATATCAAGCTACCGTTTTGGA ACCAATGAGACAGAGTATTTGTTTCGAGGTTGACAAT TTGACCTACGTCCAACCTGAATCAAGATTCACACCA CAGTTTCTGCTCCAGCTGAATGAGACAATATATACA AGTGGGAAAAGGAGCAATACCACGGGAAAATAAT TTGGAAGGTCAACCCCGAAATTGATACAACAATCG</p>

[0557]

	<p>GGGAGTGGGCCTTCTGGGAAACTAAAAAACCTCA CTAGAAAAATTCGCAGTGAAGAGTTGTCTTTCACAG CTGTATCAAACAGAGCCAAAAACATCAGTGGTCAG AGTCCGGCGCGAACTTCTCCGACCCAGGGACCAAC ACAACAACCTGAAGACCACAAAATCATGGCTTCAGA AAATTCCTCTGCAATGGTTCAAGTGCACAGTCAAGG AAGGGAAGCTGCAGTGTGCGCATCTGACAACCCTTGC CACAATCTCCACGAGTCTCAACCCCCACAACCAA ACCAGGTCCGGACAACAGCACCCACAATACACCCG TGTATAAACTTGACATCTCTGAGGCAACTCAAGTTG AACAAATCACCAGCAGAACAGACAACGACAGCACA GCCTCCGACACTCCCCCGCCACGACCCGAGCCGGA CCCCAAAAGCAGAGAACACCAACACGAGCAAGGG TACCGACCTCCTGGACCCCGCCACCACAACAAGTCC CCAAAACCACAGCGAGACCGCTGGCAACAACAACA CTCATCACCAAGATACCGGAGAAGAGAGTGCCAGC AGCGGGAAGCTAGGCTTAATTACCAATACTATTGCT GGAGTCGCAGGACTGATCACAGGCGGGAGGAGAGC TCGAAGAGAAGCAATTGTCAATGCTCAACCCAAAT GCAACCCTAATTTACATTACTGGACTACTCAGGATG AAGGTGCTGCAATCGGACTGGCCTGGATACCATATT TCGGGCCAGCAGCCGAGGGAATTTACATAGAGGGG CTGATGCACAATCAAGATGGTTTAATCTGTGGGTTG AGACAGCTGGCCAACGAGACGACTCAAGCTCTTCA ACTGTTCTGAGAGCCACAACCGAGCTACGCACCTT TTCAATCCTCAACCGTAAGGCAATTGATTTCTTGCT GCAGCGATGGGGCGGCACATGCCACATTTTGGGAC CGGACTGCTGTATCGAACCACATGATTGGACCAAG AACATAACAGACAAAATTGATCAGATTATTCATGAT TTTGTTGATAAAACCCTTCCGGACCAGGGGGACAAT GACAATTGGTGGACAGGATGGAGACAATGGATAACC GGCAGGTATTGGAGTTACAGGCGTTATAATTGCAGT</p>
--	--

[0558]

		TATCGCTTTATTCTGTATATGCAAATTTGTCTTTTAG
80	단 WPRE 서열	AATCAACCTCTGGATTACAAAATTTGTGAAAGATTG ACTGATATTCTTAACTATGTTGCTCCTTTTACGCTGT GTGGATATGCTGCTTTAATGCCTCTGTATCATGCTAT TGCTTCCCGTACGGCTTTCGTTTTCTCCTCCTTGTAT AAATCCTGGTTGCTGTCTCTTTATGAGGAGTTGTGG CCCGTTGTCCGTCAACGTGGCGTGGTGTGCTCTGTG TTTGCTGACGCAACCCCACTGGCTGGGGCATTGCC ACCACCTGTCAACTCCTTTCTGGGACTTTCGCTTTCC CCCTCCCGATCGCCACGGCAGAACTCATCGCCGCCT GCCTTGCCCGCTGCTGGACAGGGGCTAGGTTGCTGG GCACTGATAATTCCGTGGTGTGTGC
81	프라이머	TAAGCAGAATTC ATGAATTTGCCAGGAAGAT
82	프라이머	CCATACAATGAATGGACACTAGGCGGCCGCACGAA T
83	Gag, Pol, 인테그라아제 단편	GAATTCATGAATTTGCCAGGAAGATGGAAACAAA AATGATAGGGGGAATTGGAGGTTTTATCAAAGTAA GACAGTATGATCAGATACTCATAGAAATCTGCGGA CATAAAGCTATAGGTACAGTATTAGTAGGACCTACA CCTGTCAACATAATTGGAAGAAATCTGTTGACTCAG ATTGGCTGCACCTTTAAATTTCCCATTAGTCCTATTG AGACTGTACCAGTAAAATTAAGCCAGGAATGGAT GGCCAAAAGTTAAACAATGGCCATTGACAGAAGA AAAAATAAAAGCATTAGTAGAAATTTGTACAGAAA TGGAAAAGGAAGGAAAAATTTCAAAAATTGGGCCT GAAAATCCATACAATACTCCAGTATTTGCCATAAAG AAAAAGACAGTACTAAATGGAGAAAATTAGTAGA TTTCAGAGAACTTAATAAGAGAACTCAAGATTTCTG GGAAGTTCAATTAGGAATACCACATCCTGCAGGGTT AAAACAGAAAAAATCAGTAACAGTACTGGATGTGG GCGATGCATATTTTTCAGTTCCTTAGATAAAGACT TCAGGAAGTATACTGCATTTACCATACCTAGTATAA

[0559]

		<p>ACAATGAGACACCAGGGATTAGATATCAGTACAAT GTGCTTCCACAGGGATGGAAAGGATCACCAGCAAT ATTCCAGTGTAGCATGACAAAAATCTTAGAGCCTTT TAGAAAACAAAATCCAGACATAGTCATCTATCAAT ACATGGATGATTTGTATGTAGGATCTGACTTAGAAA TAGGGCAGCATAGAACAAAAATAGAGGAACTGAGA CAACATCTGTTGAGGTGGGGATTTACCACACCAGAC AAAAAACATCAGAAAGAACCTCCATTCCTTTGGATG GGTTATGAACTCCATCCTGATAAATGGACAGTACAG CCTATAGTGCTGCCAGAAAAGGACAGCTGGACTGT CAATGACATACAGAAATTAGTGGGAAAATTGAATT GGGCAAGTCAGATTTATGCAGGGATTAAGTAAGG CAATTATGTAAACTTCTTAGGGGAACCAAAGCACTA ACAGAAGTAGTACCACTAACAGAAGAAGCAGAGCT AGAACTGGCAGAAAACAGGGAGATTCTAAAAGAAC CGGTACATGGAGTGTATTATGACCCATCAAAGACT TAATAGCAGAAATACAGAAGCAGGGGCAAGGCCAA TGGACATATCAAATTTATCAAGAGCCATTTAAAAAT CTGAAAACAGGAAAGTATGCAAGAATGAAGGGTGC CCACACTAATGATGTGAAACAATTAACAGAGGCAG TACAAAAAATAGCCACAGAAAGCATAGTAATATGG GGAAAGACTCCTAAATTTAAATTACCCATACAAAA GGAAACATGGGAAGCATGGTGGACAGAGTATTGGC AAGCCACCTGGATTCCTGAGTGGGAGTTTGTCAATA CCCCTCCCTTAGTGAAGTTATGGTACCAGTTAGAGA AAGAACCATAATAGGAGCAGAACTTTCTATGTA GATGGGGCAGCCAATAGGGAACTAAATTAGGAAA AGCAGGATATGTAAGTACAGAGGAAGACAAAAAG TTGTCCCCTAACGGACACAACAAATCAGAAGACT GAGTTACAAGCAATTCATCTAGCTTTGCAGGATTCG GGATTAGAAGTAAACATAGTGACAGACTCACAAATA TGCATTGGGAATCATTCAAGCACAACCAGATAAGA</p>
--	--	--

[0560]

		<p>GTGAATCAGAGTTAGTCAGTCAAATAATAGAGCAG TTAATAAAAAAGGAAAAAGTCTACCTGGCATGGGT ACCAGCACACAAAGGAATTGGAGGAAATGAACAAG TAGATAAATTGGTCAGTGCTGGAATCAGGAAAGTA CTATTTTATAGATGGAATAGATAAGGCCCAAGAAGA ACATGAGAAATATCACAGTAATTGGAGAGCAATGG CTAGTGATTTTAACTACCACCTGTAGTAGCAAAAG AAATAGTAGCCAGCTGTGATAAATGTCAGCTAAAA GGGGAAGCCATGCATGGACAAGTAGACTGTAGCCC AGGAATATGGCAGCTAGATTGTACACATTTAGAAG GAAAAGTTATCTTGGTAGCAGTTCATGTAGCCAGTG GATATATAGAAGCAGAAGTAATCCAGCAGAGACA GGGCAAGAAACAGCATACTTCTCTTAAAATTAGCA GGAAGATGGCCAGTAAAAACAGTACATACAGACAA TGGCAGCAATTCACCAGTACTACAGTTAAGGCCGC CTGTTGGTGGGCGGGGATCAAGCAGGAATTTGGCA TTCCCTACAATCCCCAAAGTCAAGGAGTAATAGAAT CTATGAATAAAGAATTAAGAAAATTATAGGACAG GTAAGAGATCAGGCTGAACATCTTAAGACAGCAGT ACAAATGGCAGTATTCATCCACAATTTTAAAAGAAA AGGGGGGATTGGGGGGTACAGTGCAGGGGAAAGA ATAGTAGACATAATAGCAACAGACATACAACTAA AGAATTACAAAAACAAATTACAAAAATTCAAATT TTCGGGTTTATTACAGGGACAGCAGAGATCCAGTTT GGAAAGGACCAGCAAAGCTCCTCTGGAAAGGTGAA GGGGCAGTAGTAATACAAGATAATAGTGACATAAA AGTAGTGCCAAGAAGAAAAGCAAAGATCATCAGGG ATTATGGAAAACAGATGGCAGGTGATGATTGTGTG GCAAGTAGACAGGATGAGGATTAA</p>
84	Rev, RRE 및 토끼 베타 클로빈 poly A	<p>TCTAGAATGGCAGGAAGAAGCGGAGACAGCGACGA AGAGCTCATCAGAACAGTCAGACTCATCAAGCTTCT CTATCAAAGCAACCCACCTCCAATCCCGAGGGGA</p>

[0561]

<p>를 함유하는 DNA 단편</p>	<p>CCCGACAGGCCCGAAGGAATAGAAGAAGAAGGTGG AGAGAGAGACAGAGACAGATCCATTTCGATTAGTGA ACGGATCCTTGGCACTTATCTGGGACGATCTGCGGA GCCTGTGCCTCTTCAGCTACCACCGCTTGAGAGACT TACTCTTGATTGTAACGAGGATTGTGGAACCTCTGG GACGCAGGGGGTGGGAAGCCCTCAAATATTGGTGG AATCTCCTACAATATTGGAGTCAGGAGCTAAAGAAT AGAGGAGCTTTGTTCCCTTGGGTTCTTGGGAGCAGCA GGAAGCACTATGGGCGCAGCGTCAATGACGCTGAC GGTACAGGCCAGACAATTATTGTCTGGTATAGTGCA GCAGCAGAACAATTTGCTGAGGGCTATTGAGGCGC AACAGCATCTGTTGCAACTCACAGTCTGGGGCATCA AGCAGCTCCAGGCAAGAATCCTGGCTGTGGAAAGA TACCTAAAGGATCAACAGCTCCTAGATCTTTTTCCC TCTGCCAAAATTATGGGGACATCATGAAGCCCCTT GAGCATCTGACTTCTGGCTAATAAAGGAAATTTATT TTCATTGCAATAGTGTGTTGGAATTTTTTGTGTCTCT CACTCGGAAGGACATATGGGAGGGCAAATCATTTA AAACATCAGAATGAGTATTTGGTTTAGAGTTTGGA ACATATGCCATATGCTGGCTGCCATGAACAAAGGTG GCTATAAAGAGGTCATCAGTATATGAAACAGCCCC CTGCTGTCCATTCTTATTCCATAGAAAAGCCTTGA CTTGAGGTTAGATTTTTTTTATATTTTGTTTGTGTT ATTTTTTCTTTAACATCCCTAAAATTTTCCTTACAT GTTTTACTAGCCAGATTTTCTCCTCTCCTGACTAC TCCCAGTCATAGCTGTCCCTCTTCTTATGAAGATC CCTCGACCTGCAGCCCAAGCTTGGCGTAATCATGGT CATAGCTGTTTCTGTGTGAAATIGTTATCCGCTCAC AATTCCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGT GTAAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTC ACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCGCTTCCAG TCGGGAAACCTGTCGTGCCAGCGGATCCGCATCTCA</p>
--------------------------	--

[0562]

		<p>ATTAGTCAGCAACCATAGTCCCGCCCCTAACTCCGC CCATCCCGCCCCTAACTCCGCCAGTTCCGCCATT CTCCGCCCATGGCTGACTAATTTTTTTTATTTATGC AGAGGCCGAGGCCGCCTCGGCCTCTGAGCTATTCCA GAAGTAGTGAGGAGGCTTTTTTGGAGGCCTAGGCTT TTGCAAAAAGCTAACTTGTTTATTGCAGCTTATAAT GGTTACAAATAAAGCAATAGCATCACAAATTCAC AAATAAAGCATTTTTTTCACCTGCATTCTAGTTGTGGT TTGTCCAAACTCATCAATGTATCTTATCAGCGGCCG CCCC</p>
85	<p>CAG 인핸서/프로모 터/인트론 서열을 함유하는 DNA 단편</p>	<p>ACGCGTTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTC ATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCCGCGTTAC ATAACTTACGGTAAATGGCCCCGCCTGGCTGACCGCC CAACGACCCCCGCCATTGACGTCAATAATGACGTA TGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCATTG ACGTCAATGGGTGGACTATTTACGGTAAACTGCCCA CTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTAC GCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCCG CTGGCATTATGCCAGTACATGACCTTATGGGACTT TCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGC TATTACCATGGGTCGAGGTGAGCCCCACGTTCTGCT TCACTCTCCCCATCTCCCCCCCCCTCCCCACCCCAAT TTTGTATTTATTTATTTTAAATTATTTTGTGCAGCG ATGGGGGCGGGGGGGGGGGGGGGCGCGCGCCAGGC GGGGCGGGGCGGGGCGAGGGGCGGGGCGGGGCGA GGCGGAGAGGTGCGGCGGCAGCCAATCAGAGCGGC GCGTCCGAAAGTTTCCTTTTATGGCGAGGCGGCGG CGGCGGCGGCCCTATAAAAAGCGAAGCGCGCGGCG GCGGGAGTCGCTGCGTTGCCTTCGCCCCGTGCCCC GCTCCGCGCCGCTCGCGCCCGCCCGCCCGGCTCTG ACTGACCGGTTACTCCCACAGGTGAGCGGGCGGG ACGGCCCTTCTCCTCCGGGCTGTAATTAGCGCTTGG</p>

[0563]

		<p>TTAATGACGGCTCGTTTCTTTCTGTGGCTGCGTGA AAGCCTTAAAGGGCTCCGGGAGGGCCCTTTGTGCG GGGGGAGCGGCTCGGGGGTTCGTGCGTGTGTGT GTGCGTGGGGAGCGCCGCGTGC GGCCCGCGTGCC CGGCGGCTGTGAGCGCTGCGGGCGGGCGGGGGC TTTGTGCGCTCCGCGTGTGCGCGAGGGGAGCGCGGC CGGGGGCGGTGCCCGCGGTGCGGGGGGGCTGCGA GGGAACAAAGGCTGCGTGC GGGGTGTGTGCGTGG GGGGTGAGCAGGGGGTGTGGGCGGGCGGTGCGGG CTGTAACCCCCCTGCACCCCCCTCCCGAGTTGC TGAGCACGGCCCGGCTTCGGGTGCGGGGCTCCGTGC GGGGCGTGGCGCGGGGCTCGCCGTGCCGGGCGGGG GGTGGCGGCAGGTGGGGGTGCCGGGCGGGGCGGGG CCGCCTCGGGCCGGGGAGGGCTCGGGGGAGGGGCG CGGCGGCCCGGAGCGCCGGCGGCTGTCGAGGCGC GGCGAGCCGCAGCCATTGCCTTTTATGGTAATCGTG CGAGAGGGCGCAGGGACTTCCTTTGTCCCAAATCTG GCGGAGCCGAAATCTGGGAGGCGCCCGCCGACCCC CTCTAGCGGGCGCGGGCGAAGCGGTGCGGCGCCGG CAGGAAGGAAATGGGCGGGGAGGGCCTTCGTGCGT CGCCGCGCCCGCTCCCCCTTCTCCATCTCCAGCCTC GGGGCTGCCGACGGGGGACGGCTGCCTTCGGGGGG GACGGGGCAGGGCGGGGTTCGGCTTCTGGCGTGTG ACCGGCGGGAATTC</p>
86	VSV-G 를 함유하는 DNA 단편	<p>GAATTCATGAAGTGCCTTTTGTACTTAGCCTTTTAT TCATTGGGGTGAATTGCAAGTTCACCATAGTTTTTC CACACAACCAAAAAGGAAACTGGAAAAATGTTCTT TCTAATTACCATTATTGCCCGTCAAGCTCAGATTTA AATTGGCATAATGACTTAATAGGCACAGCCTTACAA GTCAAAAATGCCCAAGAGTCACAAGGCTATTCAAGC AGACGGTTGGATGTGTCATGCTTCCAAATGGGTCAC TACTTGTGATTTCCGCTGGTATGGACCGAAGTATAT</p>

[0564]

	<p>AACACATTCCATCCGATCCTTCACTCCATCTGTAGA ACAATGCAAGGAAAGCATTGAACAAACGAAACAAG GAACTTGGCTGAATCCAGGCTTCCCTCCTCAAAGTT GTGGATATGCAACTGTGACGGATGCCGAAGCAGTG ATTGTCCAGGTGACTCCTCACCATGTGCTGGTTGAT GAATACACAGGAGAATGGGTTGATTCACAGTTCATC AACGGAAAATGCAGCAATTACATATGCCCCACTGTC CATAACTCTACAACCTGGCATTCTGACTATAAGGTC AAAGGGCTATGTGATTCTAACCTCATTTCCATGGAC ATCACCTTCTTCTCAGAGGACGGAGAGCTATCATCC CTGGGAAAGGAGGGCACAGGGTTCAGAAGTAACTA CTTTGCTTATGAAACTGGAGGCAAGGCCTGCAAAAT GCAATACTGCAAGCATTGGGGAGTCAGACTCCCATC AGGTGTCTGGTTCGAGATGGCTGATAAGGATCTCTT TGCTGCAGCCAGATTCCCTGAATGCCCAGAAGGGTC AAGTATCTCTGCTCCATCTCAGACCTCAGTGGATGT AAGTCTAATTCAGGACGTTGAGAGGATCTTGGATTA TTCCCTCTGCCAAGAAACCTGGAGCAAAAATCAGAG CGGGTCTTCCAATCTCTCCAGTGGATCTCAGCTATC TTGCTCCTAAAAACCCAGGAACCGGTCCTGCTTTCA CCATAATCAATGGTACCCTAAAATACTTTGAGACCA GATACATCAGAGTCGATATTGCTGCTCCAATCCTCT CAAGAATGGTCGGAATGATCAGTGGAACCTACCACA GAAAGGGAACCTGTGGGATGACTGGGCACCATATGA AGACGTGGAAATTGGACCCAATGGAGTTCTGAGGA CCAGTTCAGGATATAAGTTTCTTTATACATGATTG GACATGGTATGTTGGACTCCGATCTTCATCTTAGCT CAAAGGCTCAGGTGTTTGAACATCCTCACATTCAAG ACGCTGCTTCGCAACTTCCTGATGATGAGAGTTTAT TTTTGGTGATACTGGGCTATCCAAAAATCCAATCG AGCTTGTAGAAGGTTGGTTCAGTAGTTGGAAAAGCT CTATTGCCCTTTTTTTCTTTATCATAGGGTTAATCAT</p>
--	--

[0565]

		TGGACTATTCTTGGTTCTCCGAGTTGGTATCCATCTT TGCATTAATAATTAAAGCACACCAAGAAAAGACAGAT TTATACAGACATAGAGATGAGAATTC
87	RRE 및 토끼 베타 글로빈 poly A 를 함유하는 헬퍼 플라스미드	TCTAGAAGGAGCTTTGTTCCCTGGGTTCTTGGGAGC AGCAGGAAGCACTATGGGCGCAGCGTCAATGACGC TGACGGTACAGGCCAGACAATTATTGTCTGGTATAG TGCAGCAGCAGAACAATTTGCTGAGGGCTATTGAG GCGCAACAGCATCTGTTGCAACTCACAGTCTGGGGC ATCAAGCAGCTCCAGGCAAGAATCCTGGCTGTGGA AAGATACCTAAAGGATCAACAGCTCCTAGATCTTTT TCCCTCTGCCAAAAATTATGGGGACATCATGAAGCC CCTTGAGCATCTGACTTCTGGCTAATAAAGGAAATT TATTTTCATTGCAATAGTGTGTTGGAATTTTTTGTGT CTCTCACTCGGAAGGACATATGGGAGGGCAAATCA TTTAAAACATCAGAATGAGTATTTGGTTTAGAGTTT GGCAACATATGCCATATGCTGGCTGCCATGAACAA AGGTGGCTATAAAGAGGTCATCAGTATATGAAACA GCCCCCTGCTGTCCATTCCTTATCCATAGAAAAGC CTTGACTTGAGGTTAGATTTTTTTTATATTTTGT GTGTTATTTTTTCTTAAACATCCCTAAAATTTTCCT TACATGTTTTACTAGCCAGATTTTTCTCCTCTCCTG ACTACTCCAGTCATAGCTGTCCCTCTTCTCTTATGA AGATCCCTCGACCTGCAGCCCAAGCTTGGCGTAATC ATGGTCATAGCTGTTTCTGTGTGAAATTGTTATCC GCTCACAATTCCACACAACATACGAGCCGGAAGCA TAAAGTGTAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGC TAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCGCT TTCCAGTCGGGAAACCTGTCGTGCCAGCGGATCCGC ATCTCAATTAGTCAGCAACCATAGTCCCGCCCCTAA CTCCGCCCATCCCGCCCCTAACTCCGCCAGTTCCG CCCATTCTCCGCCCATGGCTGACTAATTTTTTTAT TTATGCAGAGGCCGAGGCCGCCTCGGCCTCTGAGCT

[0566]

		ATTCCAGAAGTAGTGAGGAGGCTTTTTTGGAGGCCT AGGCTTTTGCAAAAAGCTAACTTGTTTATTGCAGCT TATAATGGTTACAAATAAAGCAATAGCATCACAAA TTTCACAAATAAAGCATTTTTTTCACTGCATTCTAGT TGTGGTTTGTCCAAACTCATCAATGTATCTTATCACC CGGG
88	RSV 프로모터 및 HIV Rev	CAATTGCGATGTACGGGCCAGATATACGCGTATCTG AGGGGACTAGGGTGTGTTTAGGGCAAAAGCGGGGC TTCGGTTGTACGCGGTTAGGAGTCCCCTCAGGATAT AGTAGTTTCGCTTTTGCATAGGGAGGGGGAAATGTA GTCTTATGCAATACACTTGTAGTCTTGCAACATGGT AACGATGAGTTAGCAACATGCCTTACAAGGAGAGA AAAAGCACCGTGCATGCCGATTGGTGGAAGTAAGG TGGTACGATCGTGCCTTATTAGGAAGGCAACAGAC AGGTCGACATGGATTGGACGAACCACTGAATTCCG CATTGCAGAGATAATTGTATTTAAGTGCCTAGCTCG ATACAATAAACGCCATTTGACCATTACCACATTGG TGTGCACCTCCAAGCTCGAGCTCGTTTAGTGAACCG TCAGATCGCCTGGAGACGCCATCCACGCTGTTTTGA CCTCCATAGAAGACACCGGGACCGATCCAGCCTCCC CTCGAAGCTAGCGATTAGGCATCTCCTATGGCAGGA AGAAGCGGAGACAGCGACGAAGAACTCCTCAAGGC AGTCAGACTCATCAAGTTTCTCTATCAAAGCAACCC ACCTCCCAATCCCGAGGGGACCCGACAGGCCCGAA GGAATAGAAGAAGAAGGTGGAGAGAGAGACAGAG ACAGATCCATTTCGATTAGTGAACGGATCCTTAGCAC TTATCTGGGACGATCTGCGGAGCCTGTGCCTCTTCA GCTACCACCGCTTGAGAGACTTACTCTTGATTGTAA CGAGGATTGTGGA ACTTCTGGGACGCAGGGGGTGG GAAGCCCTCAAATATTGGTGGAATCTCCTACAATAT TGGAGTCAGGAGCTAAAGAATAGTCTAGA
89	표적 서열	ATGGCAGGAAGAAGCGGAG

[0567]

90	shRNA 서열	ATGGCAGGAAGAAGCGGAGTTCAAGAGACTCCGCT TCTTCCTGCCATTTTTT
91	H1 프로모터 및 shRT 서열	GAACGCTGACGTCATCAACCCGCTCCAAGGAATCG CGGGCCCAGTGTCAGTACTAGGCGGGAACACCCAGCGC GCGTGCGCCCTGGCAGGAAGATGGCTGTGAGGGAC AGGGGAGTGGCGCCCTGCAATATTTGCATGTCGCTA TGTGTTCTGGGAAATCACCATAAACGTGAAATGTCT TTGGATTTGGGAATCTTATAAGTTCTGTATGAGACC ACTTGATCCGCGGAGACAGCGACGAAGAGCTTCA AGAGAGCTCTTCGTCGCTGTCTCCGCTTTTT
92	H1 CCR5 서열	GAACGCTGACGTCATCAACCCGCTCCAAGGAATCG CGGGCCCAGTGTCAGTACTAGGCGGGAACACCCAGCGC GCGTGCGCCCTGGCAGGAAGATGGCTGTGAGGGAC AGGGGAGTGGCGCCCTGCAATATTTGCATGTCGCTA TGTGTTCTGGGAAATCACCATAAACGTGAAATGTCT TTGGATTTGGGAATCTTATAAGTTCTGTATGAGACC ACTTGATCCGCGTCAAGTCCAATCTATGTTCAAGA GACATAGATTGGACTTGACACTTTTT
93	CCR5 정방향 프라이머	AGGAATTGATGGCGAGAAGG
94	CCR5 역방향 프라이머	CCCCAAAGAAGGTCAAGGTAATCA
95	액틴 정방향 프라이머	AGCGCGGCTACAGCTTCA
96	액틴 역방향 프라이머	GGCGACGTAGCACAGCTTCT
97	AGT103 CCR5 miR30	TGTAAACTGAGCTTGCTCTA
98	AGT103-R5-1	TGTAAACTGAGCTTGCTCGC
99	AGT103-R5-2	CATAGATTGGACTTGACAC
100	CAG 프로모터	TAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGT

[0568]

		TCATAGCCCATATATGGAGTTCCGCGTTACATAACT TACGGTAAATGGCCCCGCTGGCTGACCGCCAACG ACCCCCGCCCATTTGACGTCAATAATGACGTATGTT CCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTC AATGGGTGGACTATTTACGGTAAACTGCCCACTGG CAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCC CTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCCGCTGGC ATTATGCCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCTTA CTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTA CCATGGGTGAGGTTGAGCCCCACGTTCTGCTTCACT CTCCCCATCTCCCCCCCCCTCCCCACCCCAATTTTGT ATTTATTTATTTTTTAATTATTTTGTGCAGCGATGGG GGCGGGGGGGGGGGGGGGCGCGGCCAGGCGGGGGC GGGGCGGGGCGAGGGGCGGGGCGGGGCGAGGCGG AGAGGTGCGGCGGCAGCCAATCAGAGCGGCGCGCT CCGAAAGTTTCCTTTTATGGCGAGGCGGCGGCGGCG GCGGCCCTATAAAAAGCGAAGCGCGGCGGGGCG
101	HI 요소	GAACGCTGACGTCAACCCGCTCCAAGGAATCG CGGGCCCAGTGTCACTAGGCGGGAACACCCAGCGC GCGTGCGCCCTGGCAGGAAGATGGCTGTGAGGGAC AGGGGAGTGGCGCCCTGCAATATTTGCATGTCGCTA TGTGTTCTGGGAAATCACCATAAACGTGAAATGTCT TTGGATTTGGGAATCTTATAAGTTCTGTATGAGACC ACTT
103	7SK 프로모터	CTGCAGTATTTAGCATGCCCCACCCATCTGCAAGGC ATTCTGGATAGTGTCAAACAGCCGAAATCAAGT CCGTTTATCTCAAACCTTAGCATTTTGGGAATAAAT GATATTTGCTATGCTGGTTAAATTAGATTTTAGTTA AATTTCTGCTGAAAGCTCTAGTACGATAAGCAACTT GACCTAAGTGTAAAGTTGAGATTTCTTCAGGTTTA TATAGCTTGTGCGCCGCCTGGCTACCTC
104	miR155 Tat	CTGGAGGCTTGCTGAAGGCTGTATGCTGTCCGCTTC

[0569]

		TTCCTGCCATAGGGTTTTGGCCACTGACTGACCCTA TGGGAAGAAGCGGACAGGACACAAGGCCTGTTAC TAGCACTCACATGGAACAAATGGCC
--	--	---

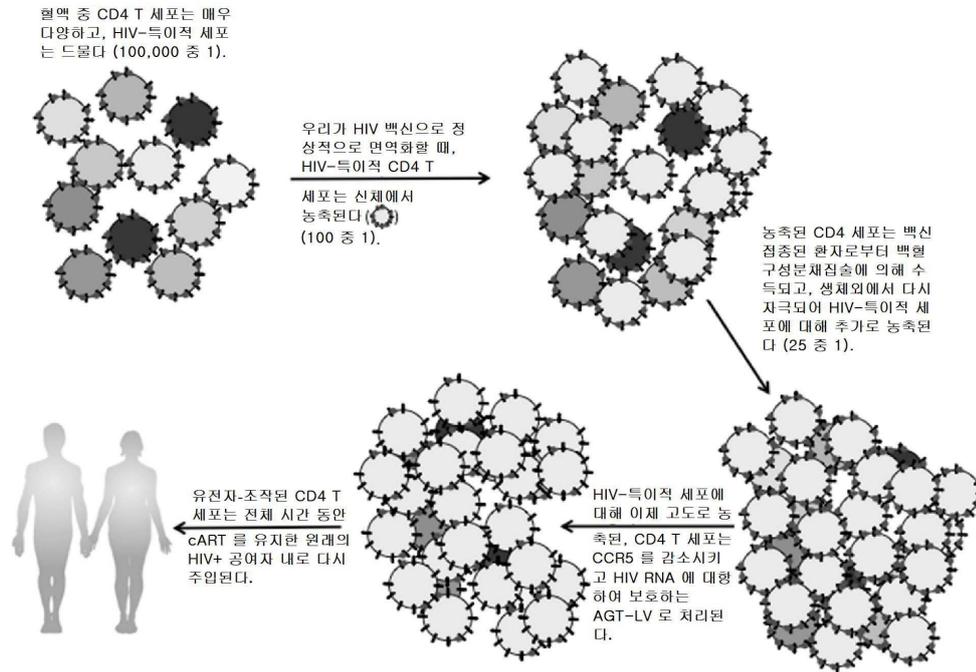
[0570]

[0571]

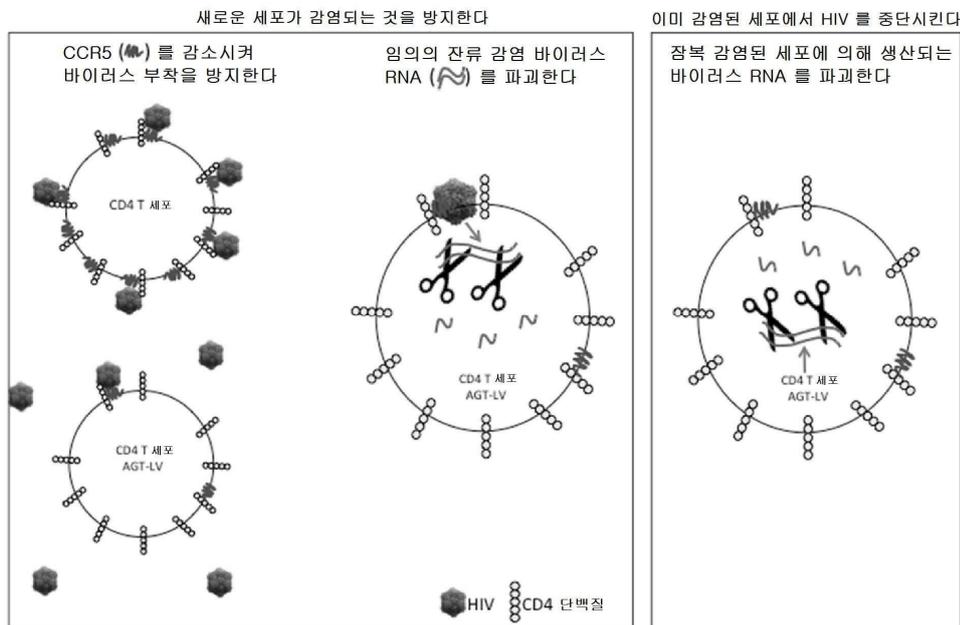
본 발명의 특정 바람직한 구현예가 위에서 기재되고 구체적으로 예시되었지만, 본 발명이 그러한 구현예에 제한되는 것이 의도되지 않는다. 본 발명의 범위 및 주제에서 벗어나지 않으면서 거기에 다양한 변형이 가해질 수 있다.

도면

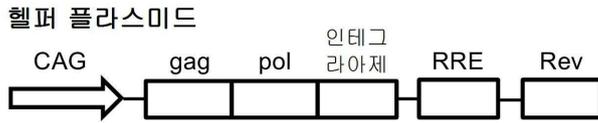
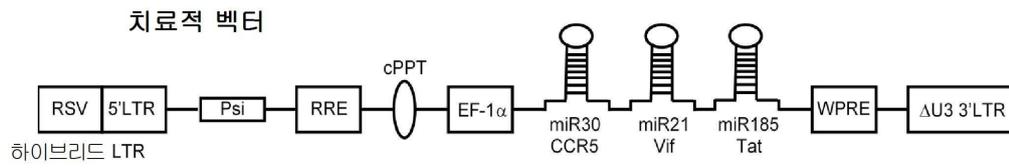
도면1



도면2

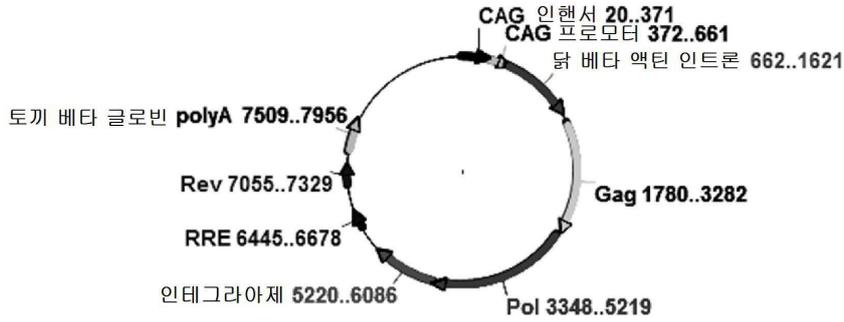


도면3

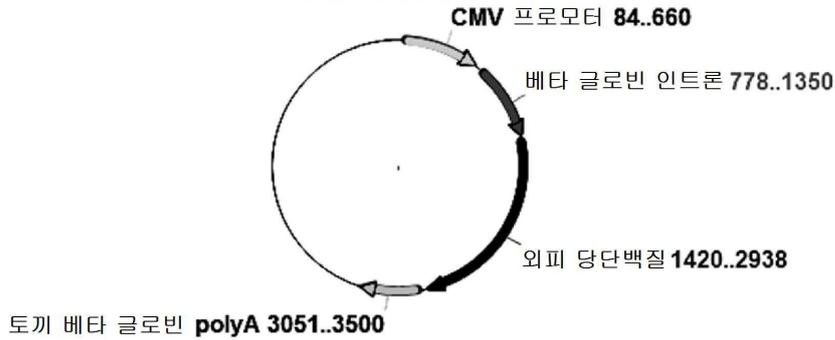


도면4

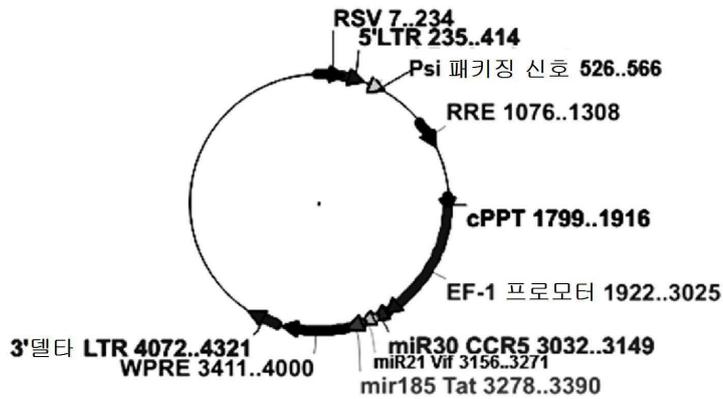
AGT 헬퍼 플러스 Rev 플라스미드



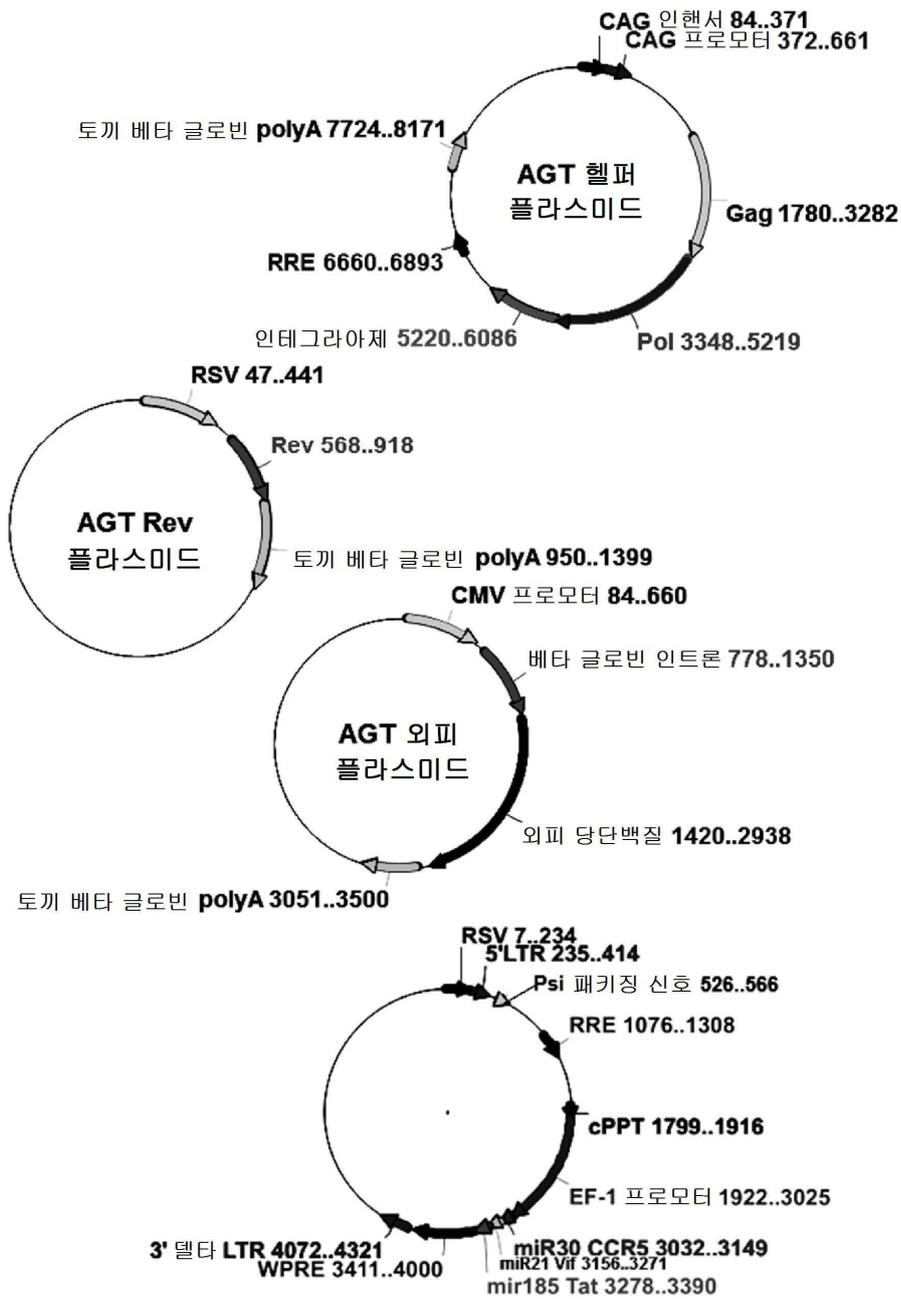
AGT 외피 플라스미드



AGT103 렌티바이러스 플라스미드



도면5



도면6

신장 인자-1 알파 (EF1-알파) 프로모터

CCGGTGCCTAGAGAAGGTGGCGCGGGGTAAACTGGGAAAGTGATGTCGTGTACTGGCTCCGCCTT
 TTTCCCGAGGGTGGGGGAGAACCGTATATAAGTGCAGTAGTCGCCGTGAACGTTCTTTTTCGCAA
 CGGGTTTGCCGCCAGAACACAGGTAAGTGCCGTGTGTGGTTCCCGCGGGCCTGGCCTCTTTACGG
 GTTATGGCCCTTGCGTGCCTTGAATTACTTCCACGCCCTGGCTGCAGTACGTGATTCTTGATCC
 CGAGCTTCGGGTTGGAAGTGGGTGGGAGAGTTCGAGGCCTTGCCTTAAGGAGCCCTTCGCCCTC
 GTGCTTGAGTTGAGGCCTGGCCTGGGCGCTGGGGCCGCCGCGTGCGAATCTGGTGGCACCTTCGC
 GCCTGTCTCGCTGCTTTTCGATAAGTCTCTAGCCATTTAAAATTTTTGATGACCTGCTGCGACGCT
 TTTTTCTGGCAAGATAGTCTTGTAAATGCGGGCCAAGATCTGCACACTGGTATTTTCGGTTTTTG
 GGGCCCGGGCGGCGACGGGGCCCGTCCGCTCCAGCGCACATGTTCCGCGAGGCGGGGCCTGCCA
 GCGCGCCACCCGAGAATCGGACGGGGTAGTCTCAAGCTGGCCGGCCTGCTCTGGTGCCTGGCCT
 CGCGCCCGCGTGTATCGCCCCGCCCTGGGCGGCAAGGCTGGCCCGGTGGCACCAGTTGCGTGAG
 CGGAAAGATGGCCGCTTCCCGGCCCTGCTGCAGGGAGCTCAAAATGGAGGACGCGGCGCTCGGGA
 GAGCGGGCGGGTGAGTACCCACACAAAAGGAAAAGGGCCTTCCGTCCTCAGCCGTCGTTTCATG
 TGACTCCACGGAGTACCGGGCGCCGTCAGGCACCTCGATTAGTTCTCGAGCTTTTGGAGTACGT
 CGTCTTTAGGTTGGGGGAGGGTTTTATGCGATGGAGTTTCCCACACTGAGTGGGTGGAGACT
 GAAGTTAGGCCAGCTTGGCACTTGATGTAATTCTCTTGGAAATTTGCCCTTTTGGAGTTGGATC
 TTGGTTCATTCTCAAGCCTCAGACAGTGGTTCAAAGTTTTTTCTCCATTTTCAGGTGTCGTGAT
 GTACA

miR30 CCR5

AGGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCGACTGTAAACTGAGCTTGCTCTACTGTGAAGCCACAGATG
GGTAGAGCAAGCACAGTTTACCCTGCCTACTGCCTCGGACTTCAAGGGCTT

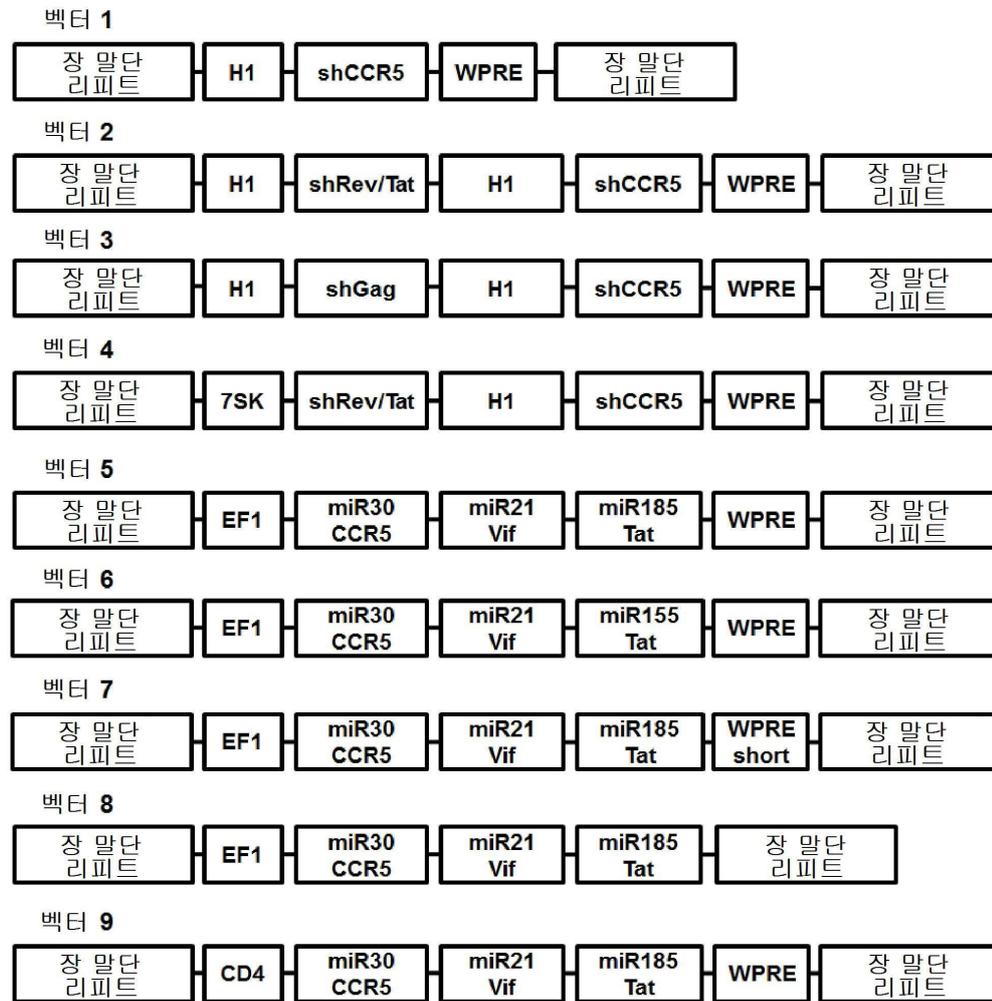
miR21 Vif

CCCGGGCATCTCCATGGCTGTACCACCTTGTGGGGGATGTGTACTTCTGAACTTGTGTTGAATC
TCATGGAGTTCAGAAGAACACATCCGCACTGACATTTTGGTATCTTTCATCTGACCA

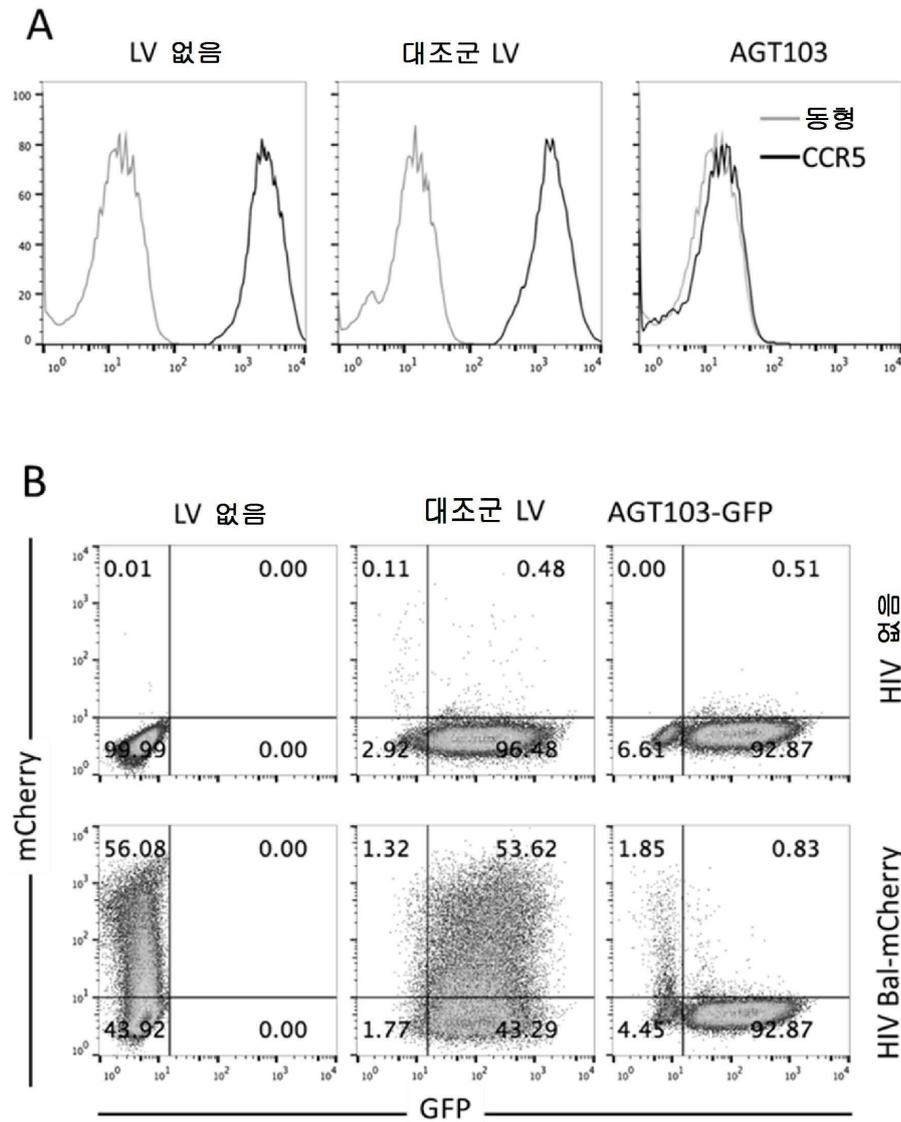
miR185 Tat

GCTAGCGGGCCTGGCTCGAGCAGGGGGCGAGGGATTCCGCTTCTTCTGCCATAGCGTGGTCCCC
TCCCCTATGGCAGGCAGAAGCGGCACCTTCCCTCCCAATGACCGCGTCTTCGTC

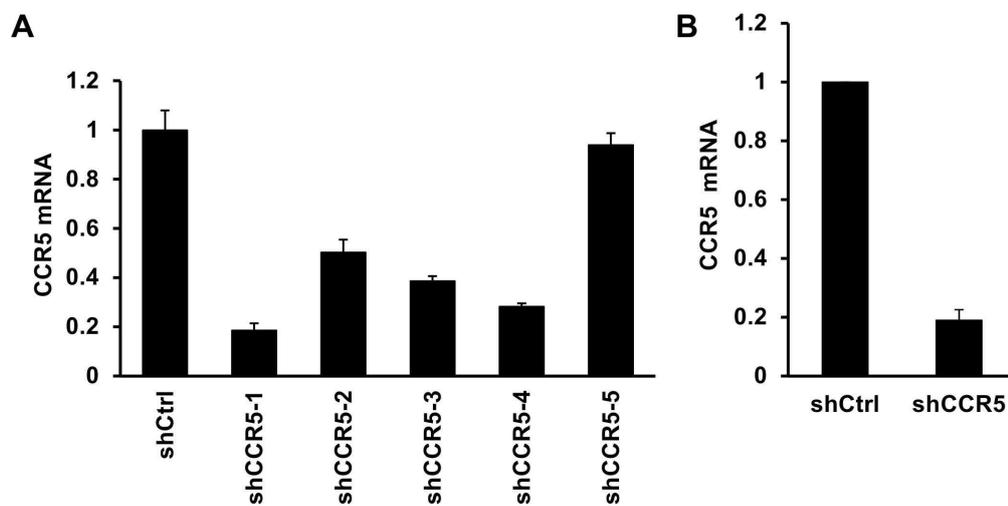
도면7



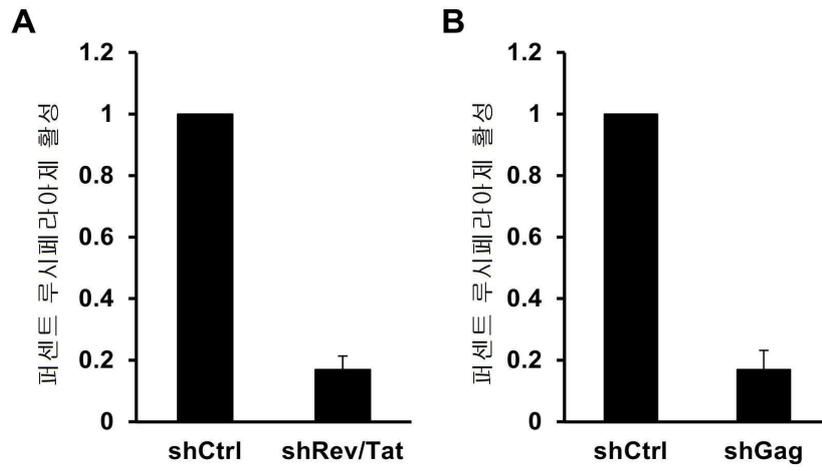
도면8



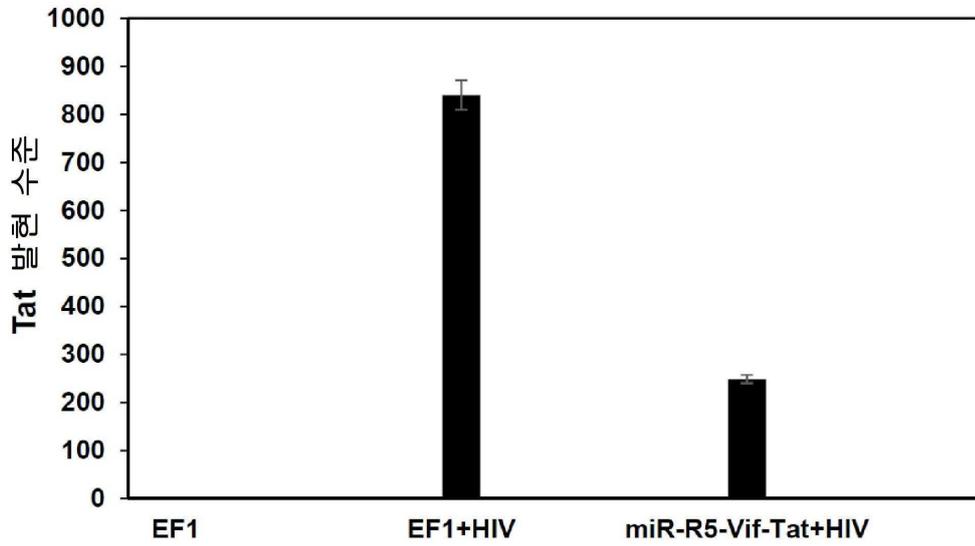
도면9



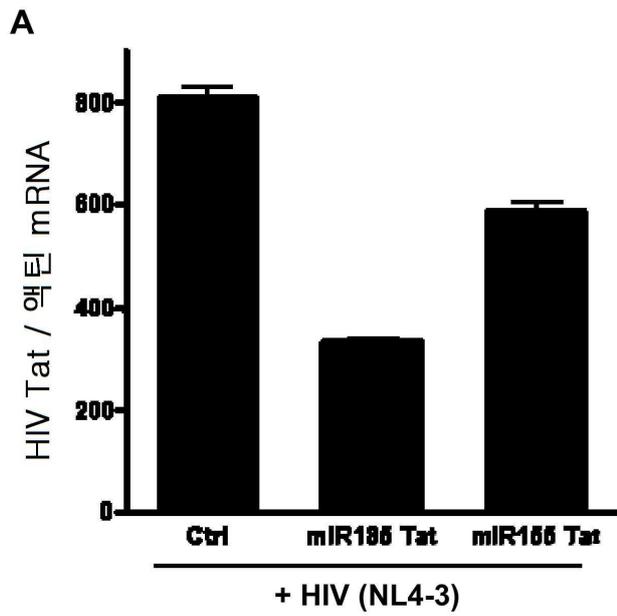
도면10



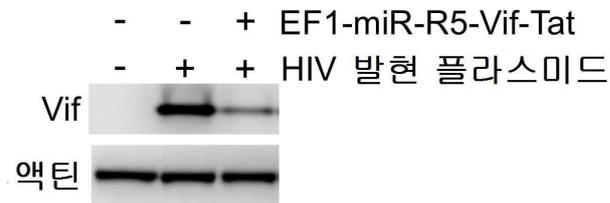
도면11



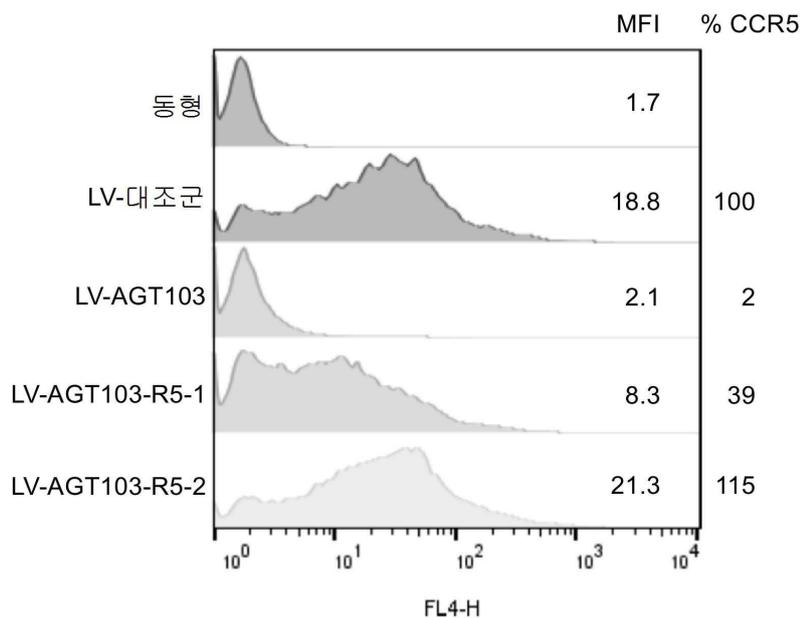
도면12



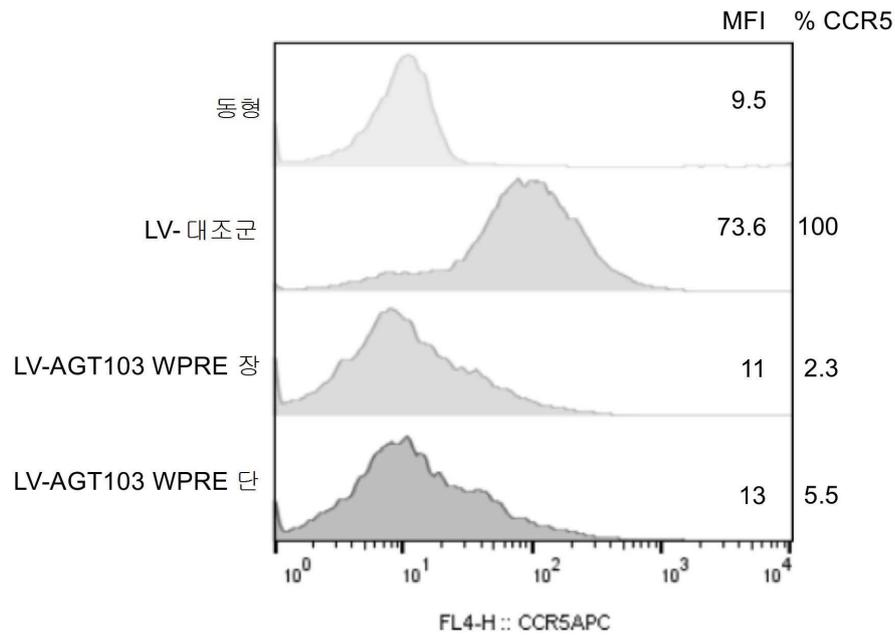
B



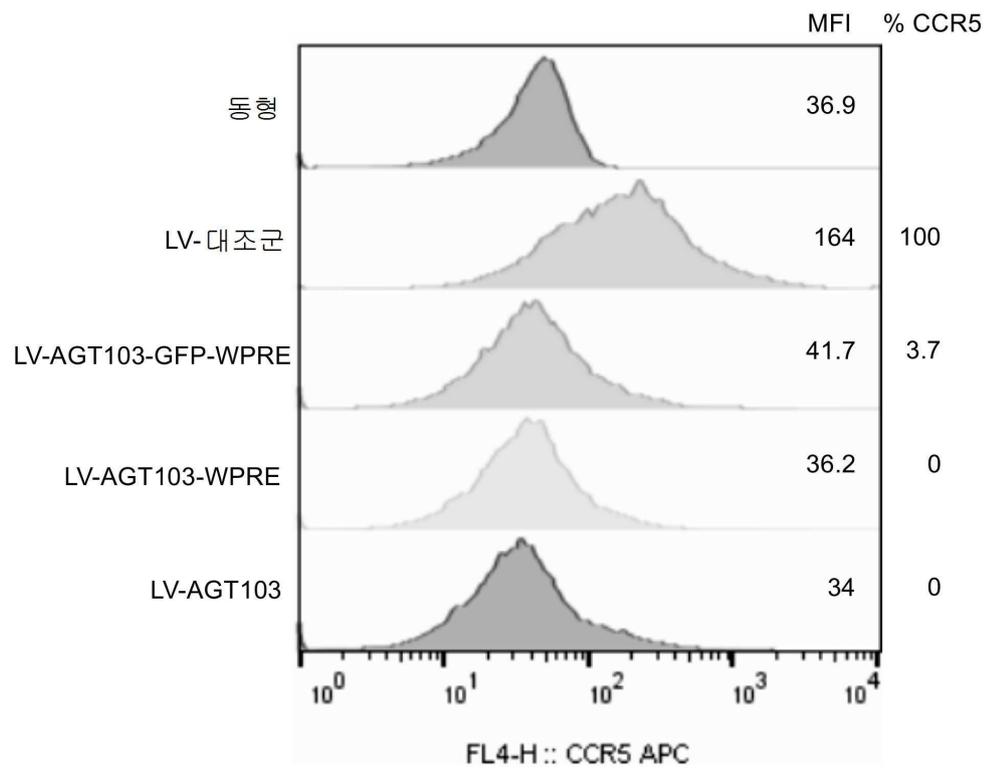
도면13



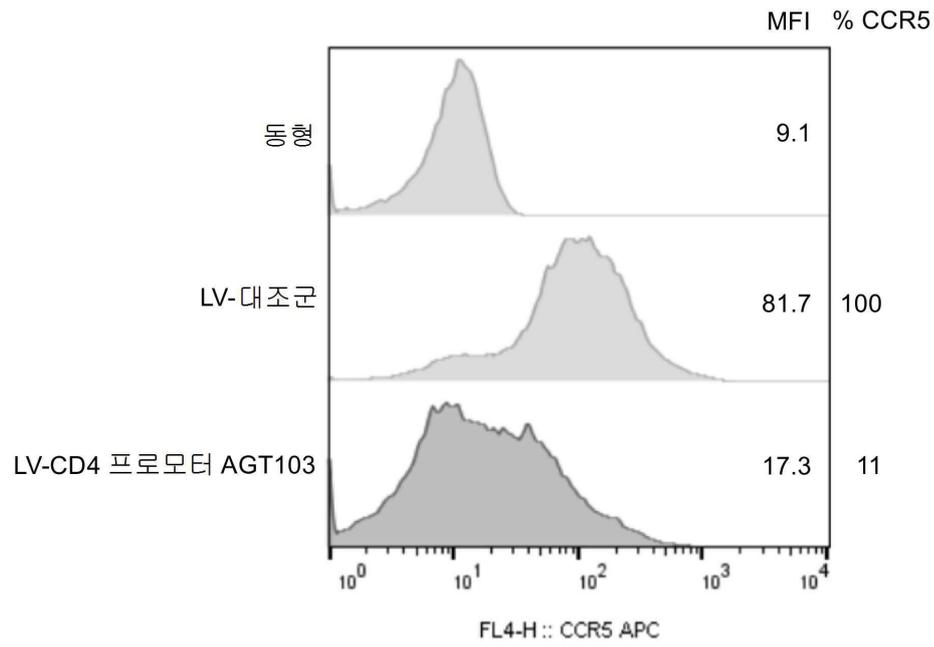
도면14



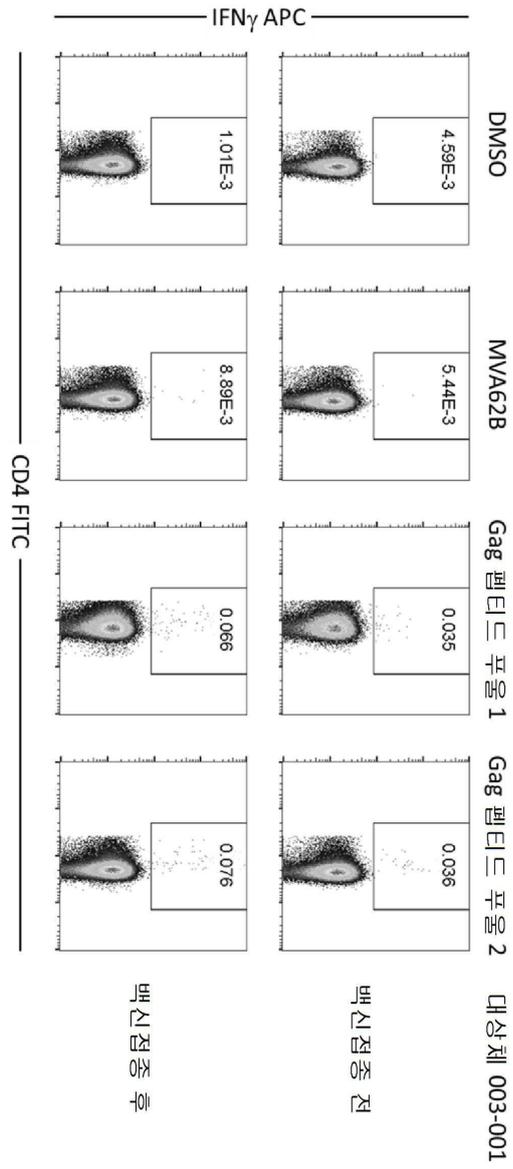
도면15



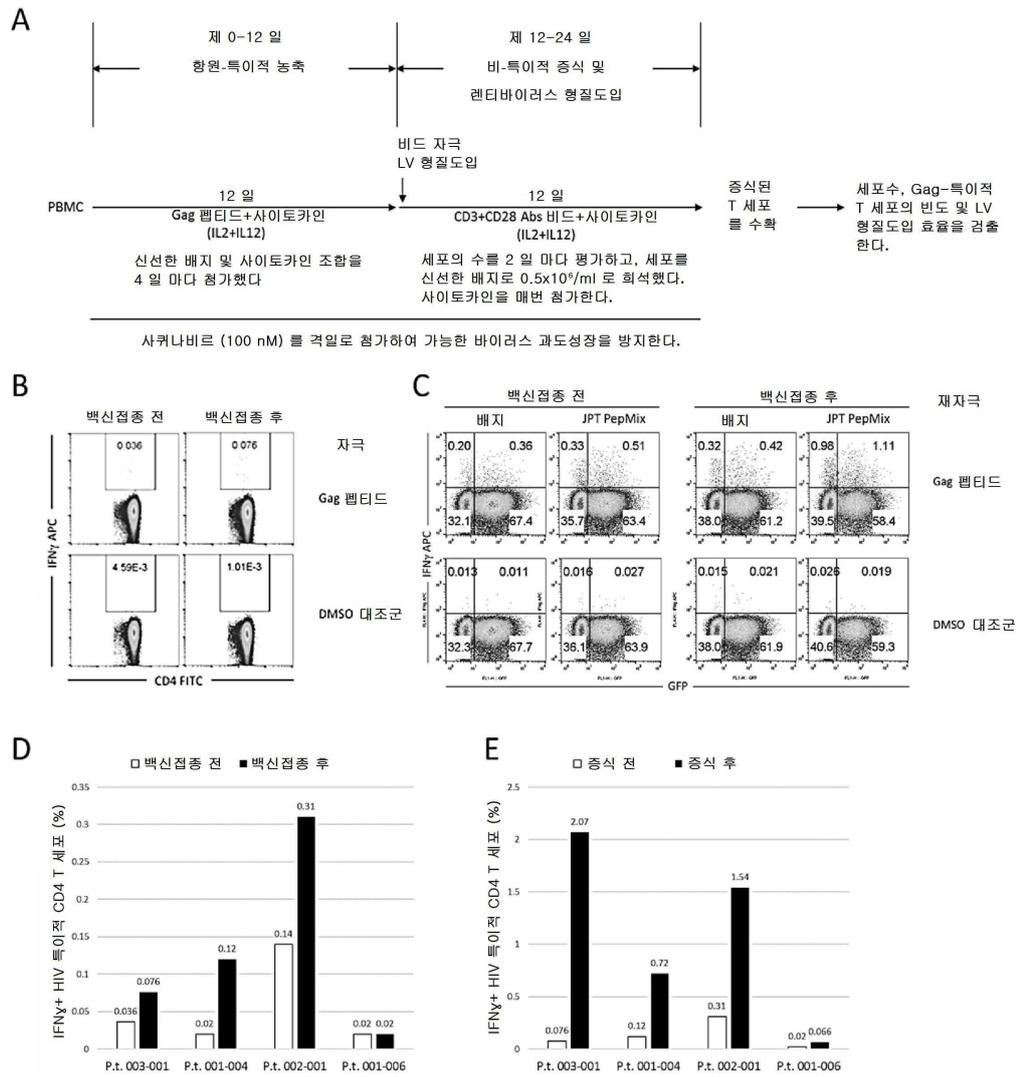
도면16



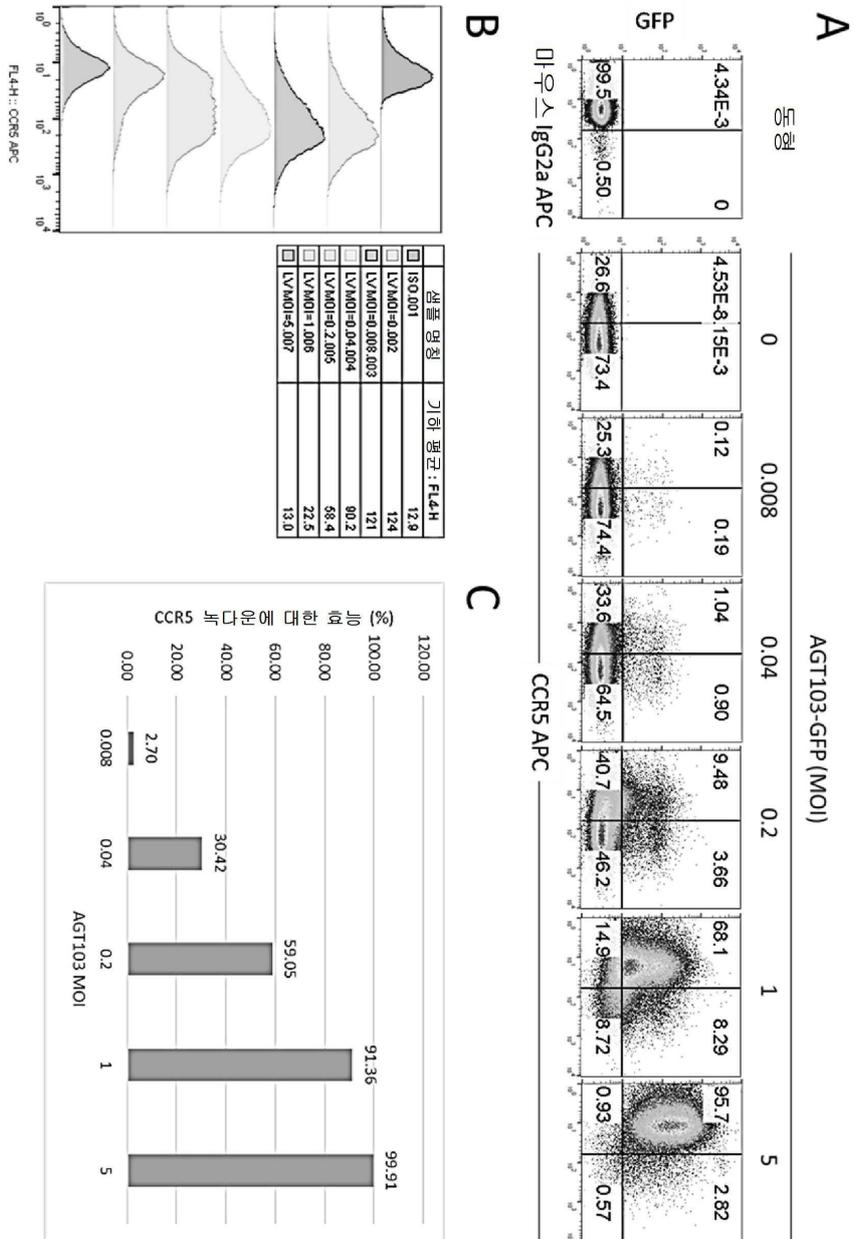
도면17



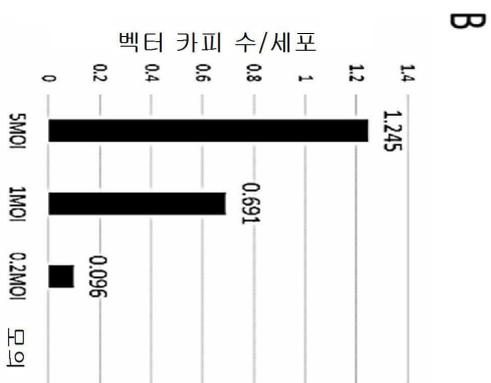
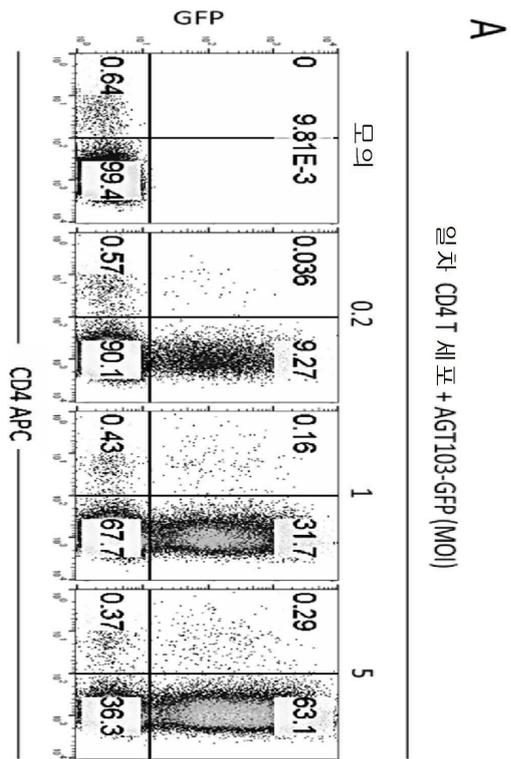
도면18



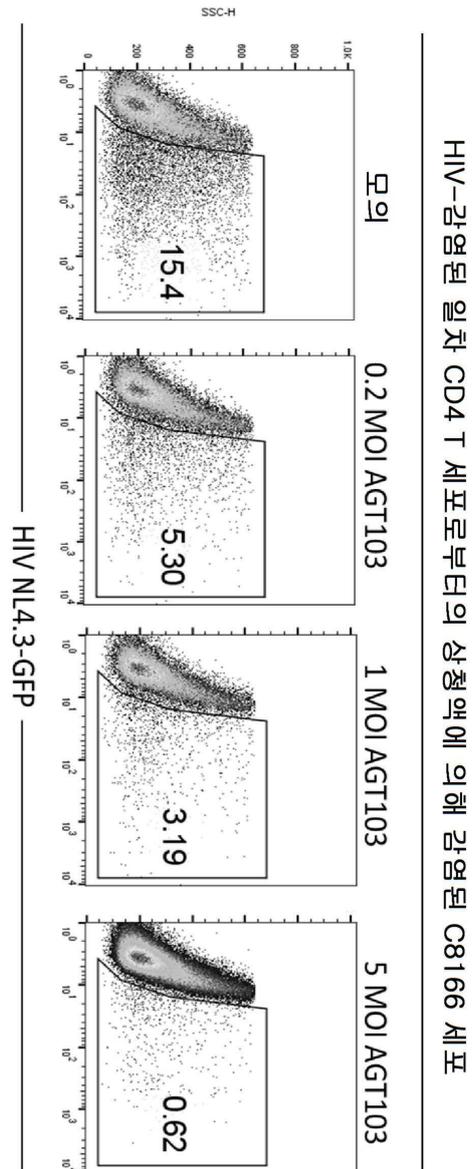
도면19



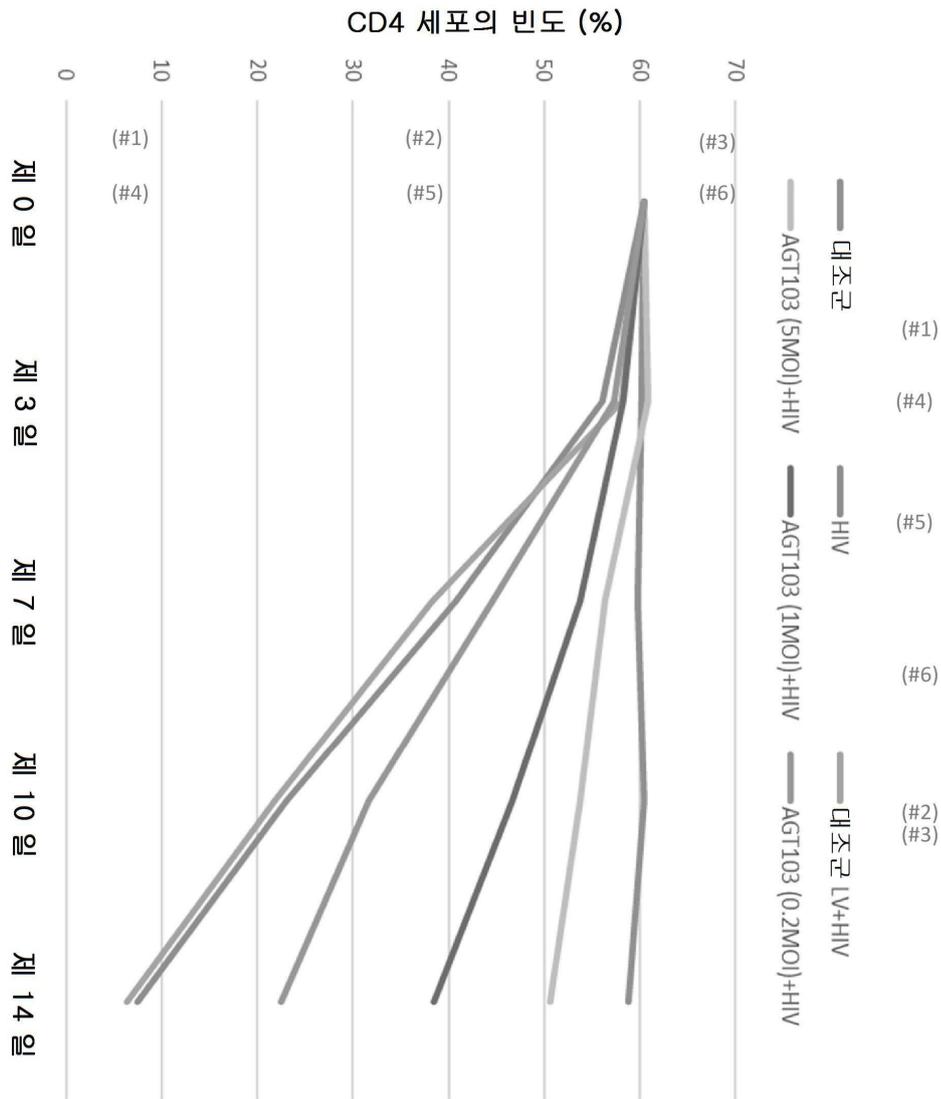
도면20



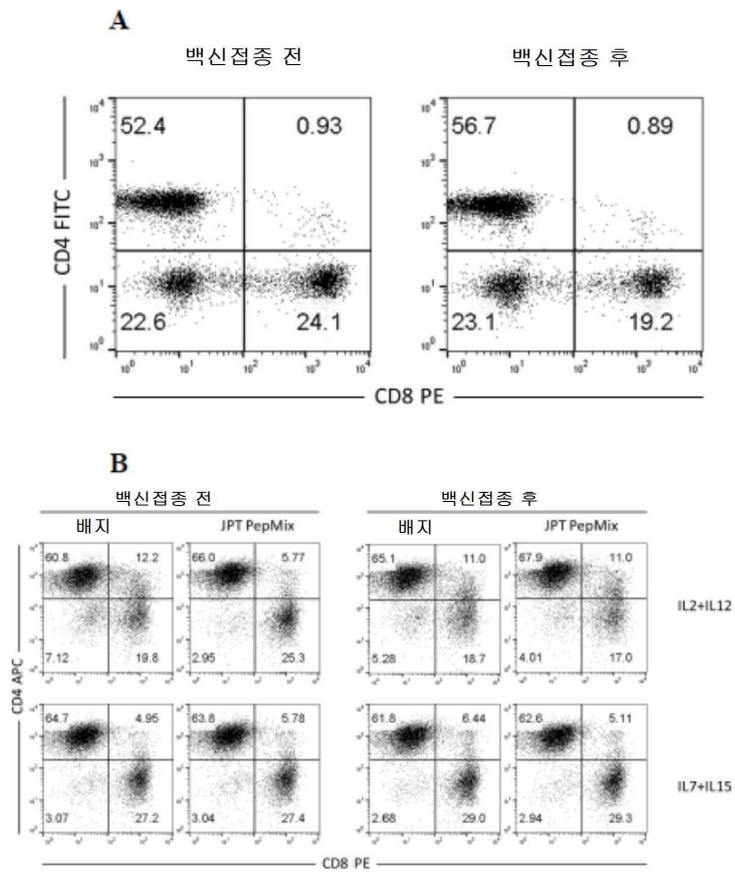
도면21



도면22

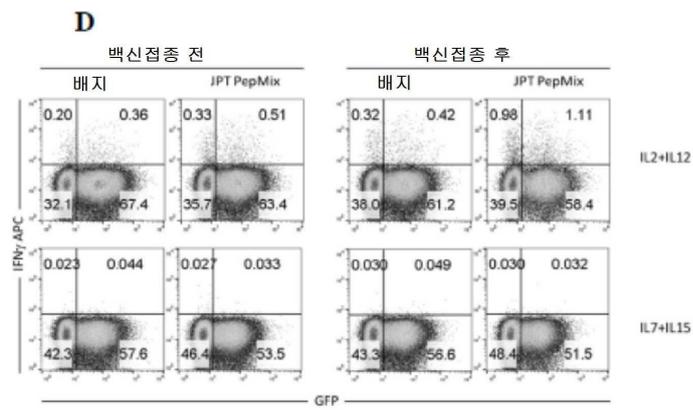
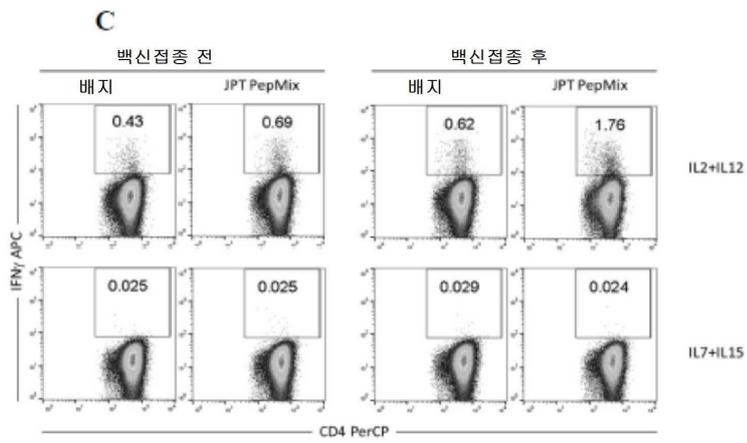


도면23a



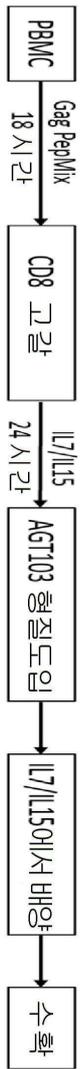
도 23

도면23b

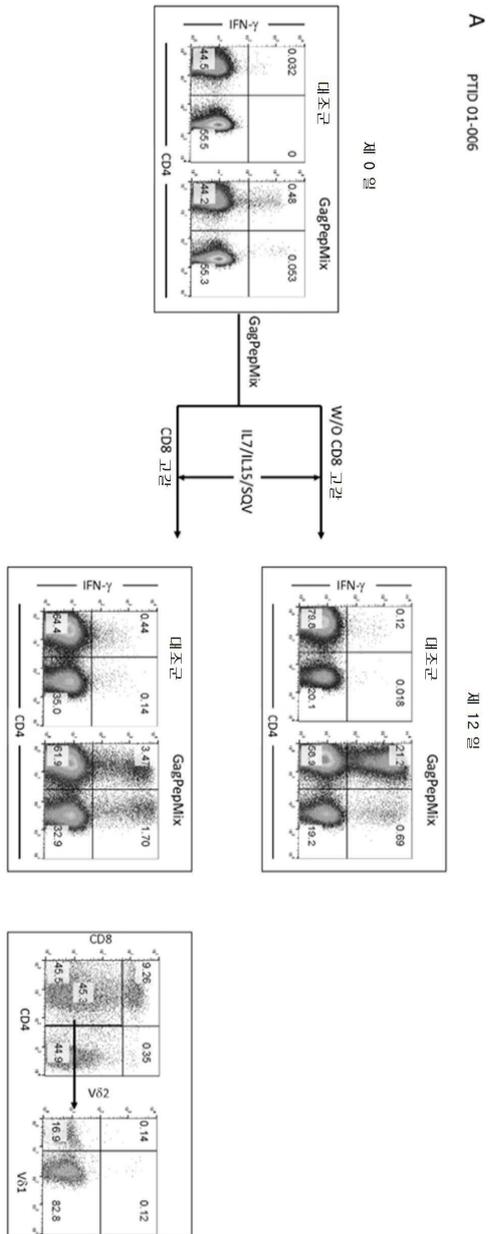


도 23 계속

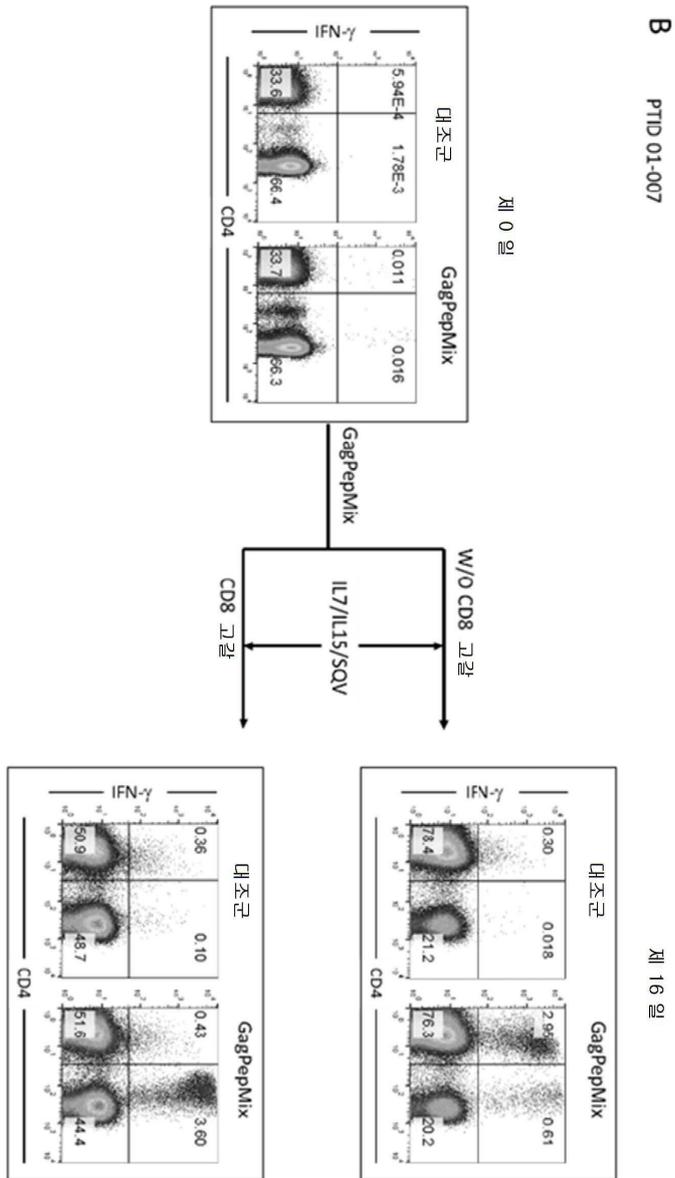
도면24



도면25a

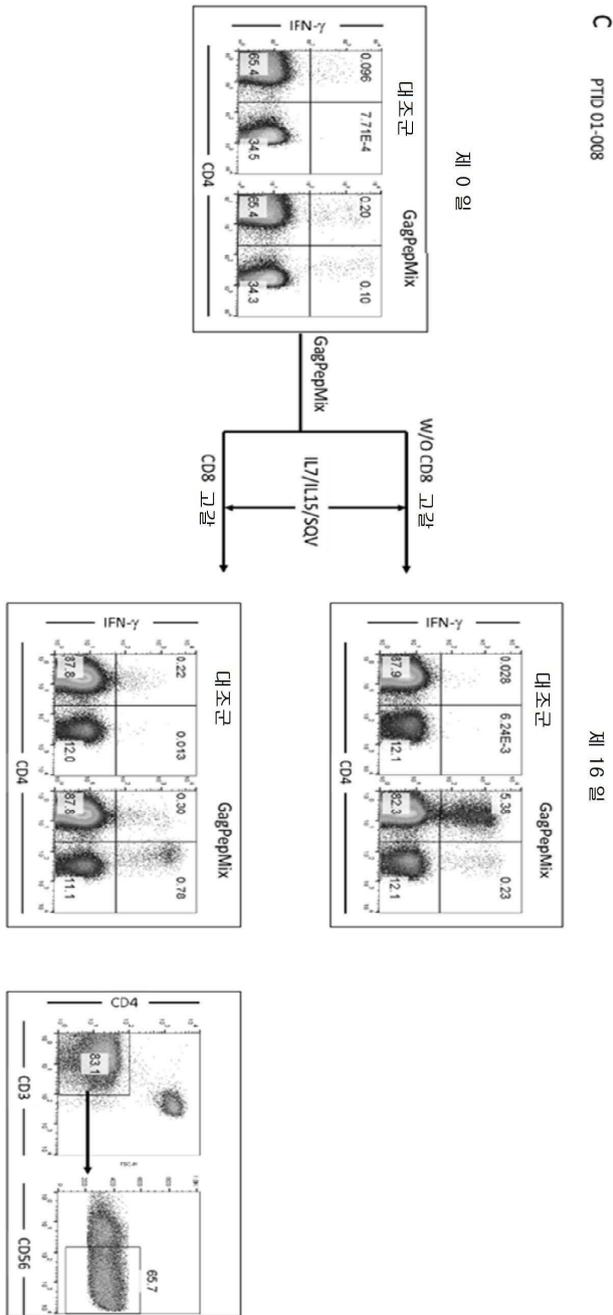


도면25b



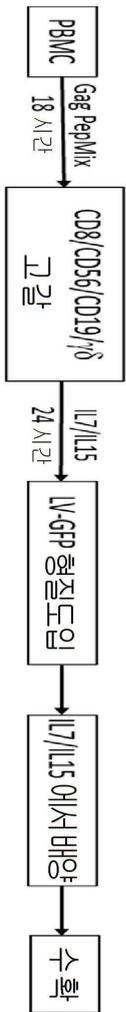
도 25 계속

도면25c

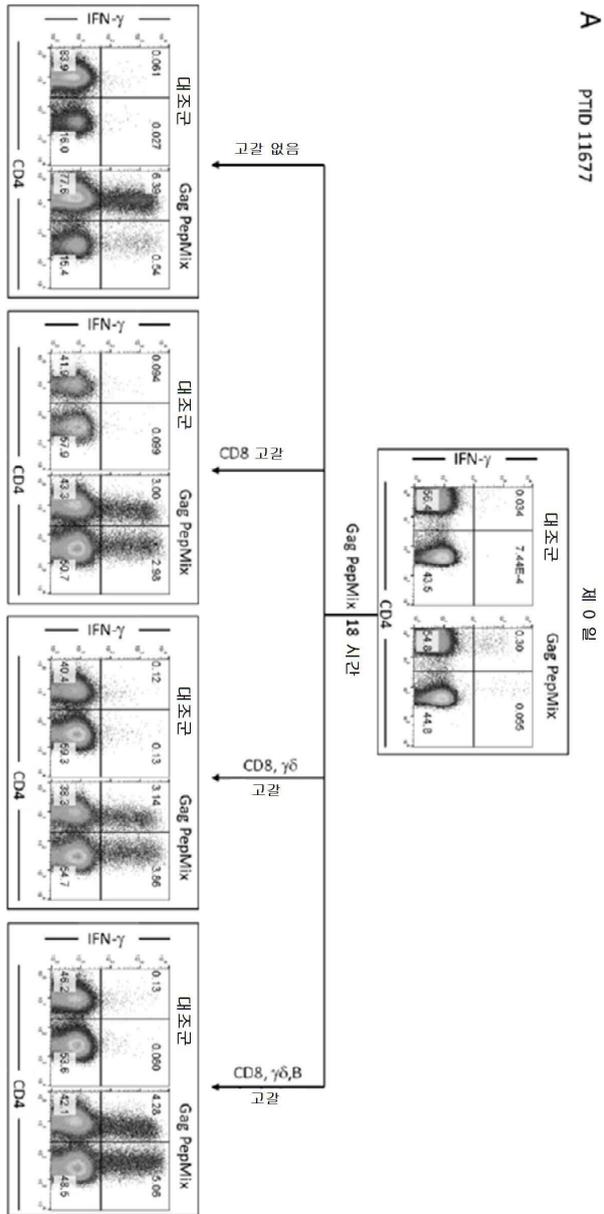


도 25 계속

도면26

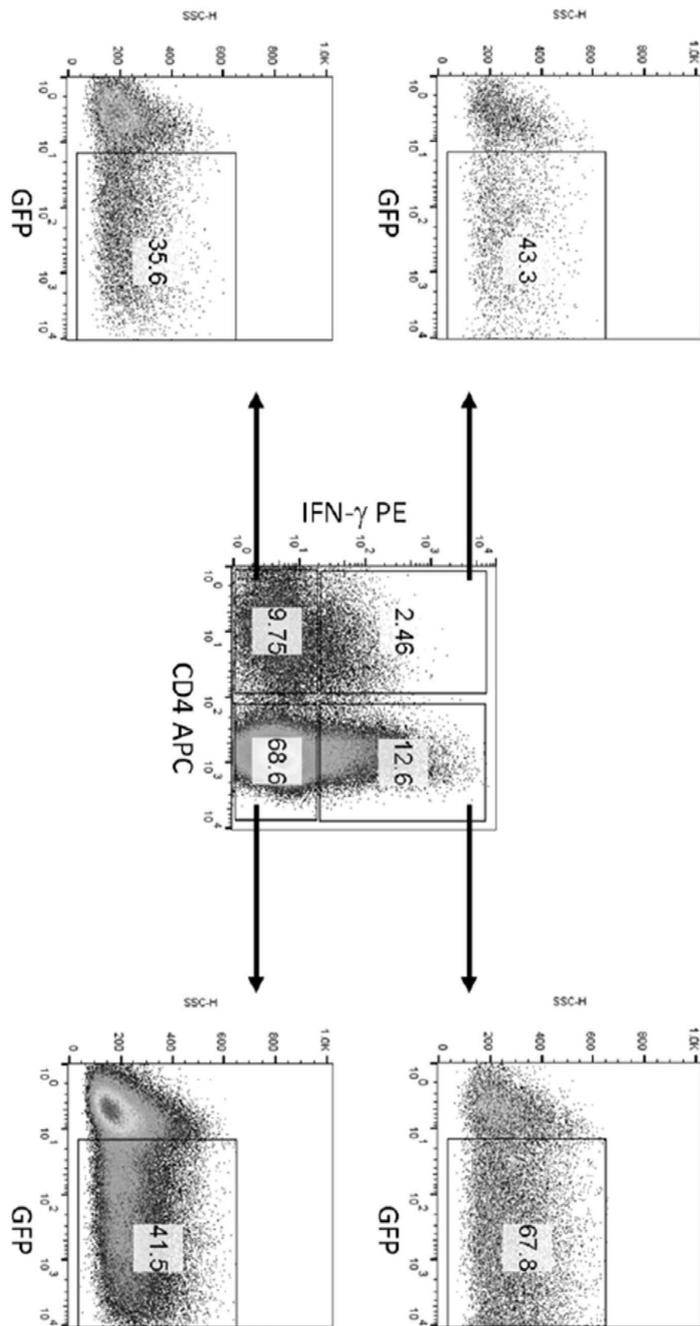


도면27a



도 27

도면28

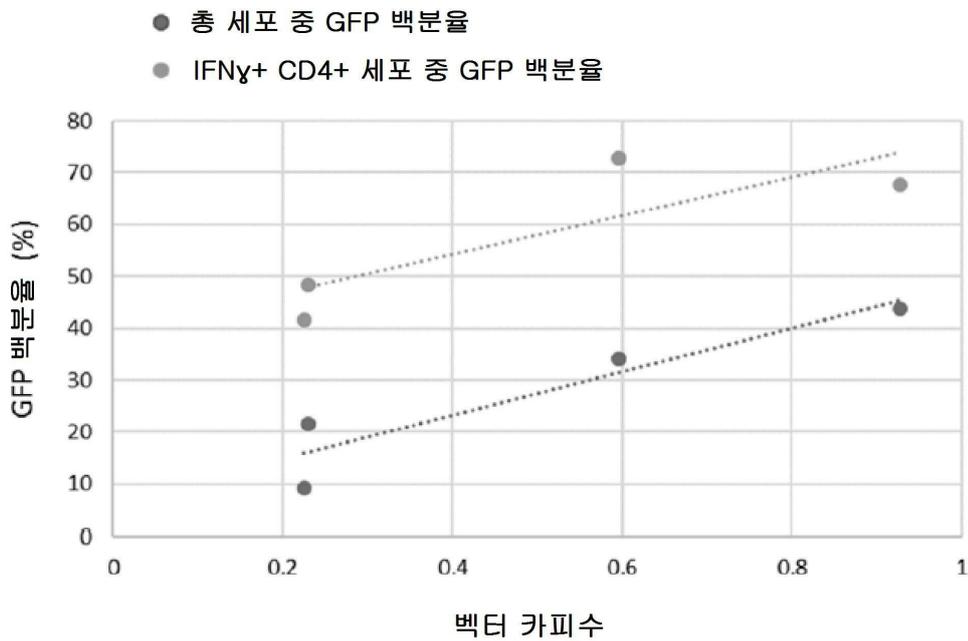


도면29

A

PTID	백터 카피수-NC의 평균	ACH2를 1로서 사용	총 세포 중 GFP 백분율 (%)	IFN γ + CD4+ 세포 중 GFP 백분율 (%)
01-006	0.225	0.139	9.17	41.7
01-007	0.23	0.142	21.6	48.4
01-009	0.596	0.368	34	72.8
01-009-2	0.927	0.572	43.8	67.8

B



서열목록

- <110> American Gene Technologies International Inc.
- <120> HIV IMMUNOTHERAPY WITH NO PRE-IMMUNIZATION STEP
- <130> 70612.01516
- <140> WO PCT/2018/12998
- <141> 2018-01-09
- <150> US 62/444,147
- <151> 2017-01-09
- <160> 104
- <170> NotePad
- <210> 1
- <211> 118
- <212> DNA

<213> Artificial Sequence
 <220><223> miR30 CCR5
 <400> 1
 aggtatattg ctgttgacag tgagcgactg taaactgagc ttgctctact gigaagccac 60
 agatgggtag agcaagcaca gtttaccgct gcctactgcc tcggacttca aggggctt 118

<210> 2
 <211> 116
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> miR21 Vif
 <400> 2
 catctccatg gctgtaccac cttgtcgggg gatgtgtact tctgaacttg tgttgaatct 60
 catggagttc agaagaacac atccgcactg acattttggt atctttcadc tgacca 116

<210> 3
 <211> 114
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> miR185 Tat
 <400> 3
 gggcctggct cgagcagggg gcgagggatt ccgcttcttc ctgcatagc gtggtcacct 60
 cccctatggc aggcagaagc ggcaccttcc ctcccaatga ccgcgtcttc gtcg 114

<210> 4
 <211> 1194
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Elongation Factor-1 alpha (EF1-alpha) promoter
 <400> 4
 ccggtgccta gagaaggtgg gcggggtaa actgggaaag tgatgtcgtg tactggctcc 60
 gcctttttcc cgaggggtggg ggagaaccgt atataagtgc agtagtcgcc gtgaacgttc 120
 tttttcgcaa cgggtttgcc gccagaacac aggtaagtgc cgtgtgtggt tcccgcgggc 180
 ctggcctctt tacgggttat ggcccttgcg tgccttgaat tacttccacg ccctggctg 240
 cagtactgta ttcttgatcc cgagcttcgg gttggaagtg ggtgggagag ttcgaggcct 300

tgcgcttaag gagcccccttc gcctcgtgct tgagttgagg cctggcctgg gcgctggggc 360
 cgcccgctgc gaatctggtg gcaccttcgc gcctgtctcg ctgctttcga taagtctcta 420
 gccatttaaa atttttgatg acctgctgcg acgctttttt tctggcaaga tagtcttgta 480
 aatgcggggc aagatctgca cactggtatt tcggtttttg gggcccgggg cggcgacggg 540
 gccctgctgt cccagcgcac atgttcggcg aggcggggcc tgcgagcgcg gccaccgaga 600
 atcggacggg ggtagtctca agctggcccg cctgctctgg tgcttggcct cgcgcgcgcg 660
 tgtatcgccc cgcctggggc ggcaaggctg gcccggtcgg caccagttgc gtgagcggaa 720

agatggccgc ttcccgccc tgctgcaggg agctcaaat ggaggacgcg gcgctcggga 780
 gagcggggcg gtgagtcacc cacacaaagg aaaaggcct ttccgtctc agccgtcgt 840
 tcatgtgact ccacggagta ccgggcgccc tccaggcacc tcgattagtt ctcgagcttt 900
 tggagtacgt cgtctttagg ttggggggag gggttttatg cgatggagtt tccccacact 960
 gagtgggtgg agactgaagt taggccagct tggcacttga tgtaattctc cttggaattt 1020
 gccctttttg agtttgatc ttggttcatt ctcaagctc agacagtgg tcaaagtttt 1080
 tttcttccat ttcaggtgtc gtgagccctt tttgagttg gatcttggtt cattctcaag 1140

cctcagacag tggttcaaag ttttttctt ccatttcagg tgctgtgatg taca 1194

<210> 5

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CCR5 target sequence

<400> 5

gagcaagctc agtttaca 18

<210> 6

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Vif target sequence

<400> 6

gggatgtgta cttctgaact t 21

<210> 7

<211> 20

<212>

> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Tat target sequence

<400> 7

tccgcttctt cctgccatag 20

<210> 8

<211> 126

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> TAR decoy sequence

<400> 8

cttgcaatga tgcgtaatt tgcgtcttac ctggttctcg acagcgacca gatctgagcc 60

tgggagctct ctggctgtca gtaagctggt acagaagggt gacgaaaatt ctactgagc 120

aagaaa 126

<210> 9

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Rev/Tat target sequence

<400> 9

gcggagacag cgacgaagag c 21

<210> 10

<211> 56

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Rev/Tat shRNA sequence

<400> 10

gcggagacag cgacgaagag cttcaagaga gctcttcgtc gctgtctccg cttttt 56

<210> 11

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Gag target sequence

<400> 11

gaagaaatga tgacagcat	19
<210> 12	
<211> 52	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Gag shRNA sequence	
<400> 12	
gaagaaatga tgacagcatt tcaagagaat gctgtcatca tttcttcttt tt	52
<210> 13	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Pol target sequence	
<400> 13	
caggagcaga tgatacag	18
<210> 14	
<	
211> 47	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Pol shRNA sequence	
<400> 14	
caggagatga tacagttcaa gagactgtat catctgctcc tgttttt	47
<210> 15	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> CCR5 target sequence #1	
<400> 15	
gtgtcaagtc caatctatg	19
<210> 16	
<211> 52	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> CCR5 shRNA sequence #1	

<400> 16

gigtcaagtc caatctatgt tcaagagaca tagattggac ttgacacttt tt 52

<210> 17

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CCR5 target sequence #2

<400> 17

gagcatgact gacatctac 19

<210> 18

<211> 52

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CCR5 shRNA sequence #2

<400> 18

gagcatgact gacatctact tcaagagagt agatgtcagt catgctcttt tt 52

<210> 19

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CCR5 target sequence #3

<400> 19

gtagctctaa caggttgga 19

<210> 20

<211> 52

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CCR5 shRNA sequence #3

<400> 20

gtagctctaa caggttggat tcaagagatc caacctgtta gagctacttt tt 52

<210> 21

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence
 <220><223> CCR5 target sequence #4
 <400> 21

gttcagaaac tacctctta 19
 <210> 22
 <211> 52
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> CCR5 shRNA sequence #4
 <400> 22

gttcagaaac tacctcttat tcaagagata agaggtagtt tctgaacttt tt 52
 <210> 23
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> CCR5 target sequence #5
 <400> 23

gagcaagctc agtttacacc 20
 <210> 24
 <211> 54

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> CCR5 shRNA sequence #5
 <400> 24

gagcaagctc agtttacacc ttcaagagag ggtgtaaactg agcttgctct tttt 54
 <210> 25
 <211> 141
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Homo sapiens CCR5 gene, sequence 1
 <400> 25

atggattatc aagtgtcaag tccaatctat gacatcaatt attatacatc ggagccctgc 60
 caaaaaatca atgtgaagca aatcgcagcc cgcctcctgc ctccgctcta ctcactggtg 120

ttcacatctttg gttttgtggg c 141

<210> 26
 <211> 633
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Homo sapiens CCR5 gene, sequence 2
 <400> 26

aacatgctgg tcactctcat cctgataaac tgcaaaaggc tgaagagcat gactgacatc 60
 tacctgctca acctggccat ctctgacctg tttttccttc ttactgtccc cttctgggct 120
 cactatgctg ccgcccagtg ggactttgga aatacaatgt gtcaactctt gacagggctc 180
 tattttatag gcttcttctc tggaatcttc ttcacatcc tctgacaat cgataggtac 240
 ctggctgtcg tccatgctgt gtttgcttta aaagccagga cggtcacctt tggggtggtg 300

acaagtgtga tcaactgggt ggtggctgtg tttgcgtctc tcccaggaat catctttacc 360
 agatctcaaa aagaaggctc tcattacacc tgcagctctc atttccata cagtcagtat 420
 caattctgga agaattcca gacattaaag atagtcactt tggggctggt cctgccgctg 480
 cttgtcatgg tcactgctca ctcggaatc ctaaaaactc tgcttcggtg tcgaaatgag 540
 aagaagagge acagggtggt gaggettatc ttcacatca tgattgttta ttttctcttc 600
 tgggctccct acaacattgt ctttctctg aac 633

<210> 27
 <211> 70
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence
 <220><223> Homo sapiens CCR5 gene, sequence 3
 <400> 27

accttccagg aattctttgg cctgaataat tgcagtagct ctaacaggtt ggaccaagct 60
 atgcaggtga 70

<210> 28
 <211> 140
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Homo sapiens CCR5 gene, sequence 4
 <400> 28

cagagactct tgggatgacg cactgctgca tcaaccccat catctatgcc ttgtcgggg 60
 agaagttcag aaactacctc ttagctttct tccaaaagca cattgccaaa cgcttctgca 120

aatgctgttc tattttccag 140

<210> 29
 <211> 75
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Homo sapiens CCR5 gene, sequence 5
 <400> 29

caagaggctc ccgagcgagc aagctcagtt tacaccgat ccactgggga gcaggaata 60
 tctgtgggct tgtga 75

<210> 30
 <211> 541
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> CD4 promoter sequence
 <400> 30

tgttggggtt caaattgag cccagctgt tagccctctg caaagaaaa aaaaaaaaaa 60

aaagaacaaa gggcctagat ttcccttctg agccccacc taagatgaag cctcttcttt 120
 caagggagtg gggttggggt ggaggcggat cctgtcagct ttgctctctc tgtggctggc 180
 agtttctcca aaggtaaca ggtgtcagct ggctgagcct aggctgaacc ctgagacatg 240
 ctacctctgt cttctcatgg ctggaggcag cttttgtaag tcacagaaag tagctgaggg 300
 gctctggaaa aaagacagcc aggggtggagg tagattggtc ttgactcct gatttaagcc 360
 tgattctgct taacttttct cttgacttt ggcattttca ctttgacatg ttcctgaga 420
 gcctgggggg tggggaacct agctccagct ggtgacgttt ggggccggcc caggcctagg 480

gtgtggagga gccttgccat cgggcttctt gtctctcttc atttaagcac gactctgcag 540
 a 541

<210> 31
 <211> 359
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> miR30-CCR5/miR21-Vif/miR185 Tat microRNA cluster sequence

<400> 31
 aggtatattg ctgttgacag tgagcgactg taaactgagc ttgctctact gtgaagccac 60
 agatgggtag agcaagcaca gtttaccgct gcctactgcc tcggacttca aggggcttcc 120
 cgggcatctc catggctgta ccaccttgtc gggggatgtg tacttctgaa cttgtgttga 180

atctcatgga gttcagaaga acacatccgc actgacattt tggatcttt catctgacca 240
 gctagcgggc ctggctcgag cagggggcga gggattccgc ttcttctgc catagcgtgg 300
 tccccctccc tatggcaggc agaagcggca ccttccctcc caatgaccgc gtcttcgtc 359

<210> 32
 <211> 590
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Long WPRE sequence

<400> 32
 aatcaacctc tgattacaaa attttgaaa gattgactgg tattctaac tatgttgctc 60
 cttttacgct atgtggatac gctgctttaa tgcctttgta tcatgctatt gcttcccgta 120

tggctttcat tttctctcc ttgtataaat cctggttget gtctctttat gaggagtgt 180
 ggcccgttgt caggcaactg ggcgtggtgt gcactgtgtt tgcagcga acccccactg 240
 gttggggcat tgccaccacc tgcagctcc tttccgggac tttcgttcc ccctcccta 300
 ttgccacggc ggaactcacc gccgctgcc ttccccctg ctggacaggg gctcggctgt 360
 tgggcactga caattccgtg gtgttgcgg ggaatcacc gtcctttcct tggctgctcg 420
 cctgtgttc cacctggatt ctgcgcggga cgtcctctg ctacgtccct tcggccctca 480
 atccacggga cttctctcc cgcggcctgc tgcggctct gggcctctt ccgcgtcttc 540

gccttcgcc tcagacgagt cggatctccc tttgggccgc ctccccgcct 590

<210> 33
 <211> 1469
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Elongation Factor?1 alpha (EF1?alpha) promoter; miR30CCR5;
 miR21Vif; miR185 Tat

<400> 33
 ccggtgccta gagaaggtag cgccgggtaa actgggaaag tgatgctgt tactggctcc 60
 gcctttttcc cgagggtggg ggagaaccgt atataagtgc agtagtccc gtgaacgttc 120

tttttcgcaa cgggtttgcc gccagaacac aggtaagtgc cgtgtgtggt tccccgggc 180

 ctggcctctt tacgggttat ggcccttgcg tgccttgaat tacttccacg cccttggtg 240
 cagtacgtga ttcttgatcc cgagcttcgg gttggaagtg ggtgggagag ttcgaggcct 300
 tgcgcttaag gagccccttc gcctcgtgct tgagttgagg cctggcctgg gcgctggggc 360
 cgccgctgc gaatctggtg gcaccttcgc gcctgtctcg ctgctttcga taagtctcta 420
 gccatttaaa atttttgatg acctgctgcg acgctttttt tctggcaaga tagtcttga 480
 aatgcgggcc aagatctgca cactggtatt tcggtttttg gggccgcggg cggcgacggg 540
 gcccgtcgt cccagcgcac atgttcggcg aggcggggcc tgcgagcgcg gccaccgaga 600

 atcggacggg ggiagtctca agctggccgg cctgctctgg tgcctggcct cgcgccccg 660
 tgtatgccc cgcctgggc ggcaaggctg gcccggtcgg caccagttgc gtgagcggaa 720
 agatggccgc ttccccgcc tgctgcaggg agctcaaaat ggaggacgcg gcgctcggga 780
 gagcggcgg gtgagtcacc cacacaaagg aaaaggcct ttccgtcctc agccgtcgt 840
 tcatgtgact ccacggagta ccgggcgcg tccaggcacc tcgattagtt ctcgagcttt 900
 tggagtacgt cgtcttttag ttggggggag gggttttatg cgatggagtt tcccacact 960
 gagtgggtgg agactgaagt taggccagct tggcacttga tgtaattctc cttggaattt 1020

 gccctttttg agtttggatc ttggttcatt ctcaagctc agacagtgt tcaaagtttt 1080
 tttcttccat ttcagggtgc gtgatgtaca aggtatattg ctgttgacag tgagcgactg 1140
 taaactgagc ttgctctact gtgaagccac agatgggtag agcaagcaca gtttaccgt 1200
 gcctactgcc tcggacttca aggggcttcc cgggcctcct catggctgta ccacctgtc 1260
 ggggatgtg tacttctgaa cttgtgttga atctcatgga gttcagaaga acacatccgc 1320
 actgacattt tggatcttt catctgacca gctagcgggc ctggctcgag cagggggcga 1380
 gggattccgc ttcttctgc catagcgtgg tcccctccc tatggcaggc agaagcggca 1440

 ccttcctcc caatgaccgc gtcttctc 1469

 <210> 34
 <211> 228
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Rous Sarcoma virus (RSV) promoter
 <400> 34
 gtagtcttat gcaatactt tgtagtcttg caacatggta acgatgagtt agcaacatgc 60
 cttacaagga gagaaaaagc accgtgcatg ccgattggtg gaagtaaggt ggtacgatcg 120

tgccattatta ggaaggcaac agacgggtct gacatggatt ggacgaacca ctgaattgcc 180
 gcattgcaga gatattgtat ttaagtcct agctcgatac aataaacg 228

<210> 35
 <211> 180
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> 5' Long terminal repeat (LTR)

<400> 35
 ggtctctctg gttagaccag atctgagcct gggagctctc tggctaacta gggaaccac 60
 tgcttaagcc tcaataaagc ttgccttgag tgcttcaagt agtgtgtgcc cgtctgttgt 120
 gtgactctgg taactagaga tccctcagac ccttttagtc agtgtggaaa atctctagca 180
 180

<210> 36
 <211> 41
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Psi Packaging signal

<400> 36
 tagcctcaaaa attttgacta gcggaggcta gaaggagaga g 41

<210> 37
 <211> 233
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Rev response element (RRE)

<400> 37
 aggagctttg ttcttgggt tcttgggagc agcaggaagc actatgggcg cagcctcaat 60
 gacgctgacg gtacaggcca gacaattatt gtctggtata gtcagcagc agaacaattt 120
 getgagggct attgaggcgc aacagcatct gttgcaactc acagtctggg gcatcaagca 180
 gctccaggca agaatcctgg ctgtggaaag atacctaaag gatcaacagc tcc 233

<210> 38
 <211> 118
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Central polypurine tract (cPPT)

<400> 38

ttttaaaaga aaagggggga ttggggggta cagtgcaggg gaaagaatag tagacataat 60

agcaacagac atacaaacta aagaattaca aaaacaatt acaaaattca aaatttta 118

<210> 39

<211> 250

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 3' delta LTR

<400> 39

tggaagggt aattcactcc caacgaagat aagatctgct ttttgcttgt actgggtctc 60

tctgggttaga ccagatctga gcctgggagc tctctggcta actaggaac cactgctta 120

agcctcaata aagcttgect tgagtgttc aagtagtgg tgcccgtctg ttgtgtgact 180

ctggtaacta gagatccctc agaccctttt agtcagtgtg gaaaatctct agcagtagta 240

gttcatgtca 250

<210> 40

<211> 352

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Helper/Rev; CMV early (CAG) enhancer; Enhance Transcription

<400> 40

tagttattaa tagtaatcaa ttacggggtc attagttcat agcccatata tggagttccg 60

cgttacataa cttacggtaa atggcccgcc tggtgaccg cccaacgacc cccgccatt 120

gacgtcaata atgacgtatg ttccatagt aacccaata gggactttcc attgacgtca 180

atgggtggac tatttacggg aaactgccca cttggcagta catcaagtgt atcatatgcc 240

aagtacgcc cctattgacg tcaatgacgg taaatggccc gcctggcatt atgccagta 300

catgacctta tgggacttcc ctacttggca gtacatctac gtattagtca tc 352

<210> 41

<211> 290

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Helper/Rev; Chicken beta actin (CAG) promoter; Transcription

<400> 41
gctattacca tgggtcgagg tgagccccac gttctgcttc actctcccca tctcccccc 60

ctccccacce ccaatthttgt atthttattht thtttaatta thttgtgcag cgatgggggc 120
gggggggggg ggggcgcgcg ccaggcgggg cggggcgggg cgaggggcgg ggcggggcga 180
ggcggagagg tgcggcgcca gccaatcaga gcggcgcgct ccgaaagtht cthtttatgg 240
cgaggcggcg gggcggcggg ccctataaaa agcgaagcgc gcggcgggcg 290

<210> 42
<211> 960
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Helper/Rev; Chicken beta actin intron; Enhance gene expression

<400> 42
ggagtcgctg cgttgccttc gccccgtgcc ccgctccgcg ccgctcgcg ccgcccccc 60

cgctctgac tgaccgcgtht actcccacag gtgagcgggc gggacggccc thctctcctg 120
ggctgtaatt agcgtthgt thaatgacgg ctgthttctt thctgtggct gcgtgaaagc 180
ctthaaagggc tccgggaggg cctthtgcg gggggggagc ggctcggggg gtgcgtgcgt 240
gtgtgtgtgc gtggggagcg ccgctgcgcg ccgctgcgcg ccggcggctg tgagcgtgc 300
gggcgcggcg cggggcttht tgcgctccgc gtgtgcgca ggggagcgcg gccgggggcg 360
gtgccccgcg gtgcgggggg gctgcgaggg gaacaaagc tgcgtgcggg gtgtgtgcgt 420
gggggggtga gcagggggtg tgggcgcggc ggtcgggctg thaccccccc ctgaccccc 480

ctccccagtht tctgagcac ggccccgctt cgggtgcggg gctccgtgcg gggcgtggcg 540
cgggctcgc cgtgccgggc ggggggtggc ggcaggtggg ggtgccgggc ggggcggggc 600
cgcctcgggc cggggagggc tcgggggagg ggcgcggcgg ccccgagcgc ccggcggctg 660
tcgaggcgcg gcgagccga gccattgcct thtatgthaa tctgtcgaga gggcgcaggg 720
acttcttht thccaaatct ggcggagccg aaatctggga ggcgccgcg cacccctct 780
agcgggcgcg ggcgaagcgg tgcggcgcg gcaggaagga aatgggcggg gagggccttc 840
gtgcgtgcg gcgcccgct cctctctcc atctccagcc tcggggctgc cgcaggggga 900

cgctgcctt cgggggggac ggggcagggc ggggttcggc thctggcgtg tgaccggcgg 960
960

<210> 43
<211> 1503

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Helper/Rev; HIV Gag; Viral capsid

<400> 43

atgggtgcga gacgctcagt attaagcggg ggagaattag atcgatggga aaaaattcgg 60

ttaagccag ggggaaagaa aaaatataaa ttaaacata tagtatgggc aagcagggag 120

ctagaacgat tcgcagttaa tcctggcctg ttagaaacat cagaaggctg tagacaaata 180

ctgggacagc tacaaccatc ccttcagaca ggatcagaag aacttagatc attatataat 240

acagtagcaa ccctctattg tgtgcatcaa aggatagaga taaaagacac caaggaagct 300

ttagacaaga tagaggaaga gcaaaacaaa agtaagaaaa aagcacagca agcagcagct 360

gacacaggac acagcaatca ggtcagccaa aattacccta tagtcagaa catccagggg 420

caaatggtac atcaggccat atcacctaga actttaaatg catgggtaaa agtagtagaa 480

gagaaggctt tcagcccaga agtgatacc atgttttcag cattatcaga aggagccacc 540

ccacaagatt taaacacat gctaaacaca gtggggggac atcaagcagc catgcaaatg 600

ttaaagaga ccatcaatga ggaagctgca gaatgggata gagtgcattc agtgcattgca 660

gggcctattg caccaggcca gatgagagaa ccaaggggaa gtgacatagc aggaactact 720

agtacccttc aggaacaaat aggatggatg acacataatc cacctatccc agtaggagaa 780

atctataaaa gatggataat cctgggatta aataaaatag taagaatgta tagccctacc 840

agcattctgg acataagaca aggaccaaag gaacccttta gagactatgt agaccgattc 900

tataaaactc taagagccga gcaagcttca caagaggtaa aaaattggat gacagaaacc 960

ttgttggctc aaaaatgcgaa cccagattgt aagactatct taaaagcatt gggaccagga 1020

gcgacactag aagaaatgat gacagcatgt cagggagtgg ggggacccgg ccataaagca 1080

agagttttgg ctgaagcaat gagccaagta acaaatccag ctaccataat gatacagaaa 1140

ggcaatttta ggaaccaag aaagactgtt aagtgtttca attgtggcaa agaagggcac 1200

atagccaaaa attgcagggc ccctaggaaa aagggctgtt ggaaatgtgg aaaggaagga 1260

caccaaataa aagattgtac tgagagacag gctaattttt tagggaagat ctggccttcc 1320

cacaagggaa ggccagggaa ttttcttcag agcagaccag agccaacagc cccaccagaa 1380

gagagcttca ggtttgggga agagacaaca actccctctc agaagcagga gccgatagac 1440

aaggaactgt atcctttagc ttcctcaga tcaacttttg gcagcgacc ctcgtcacia 1500

taa 1503

<210> 44

<211> 1872
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Helper/Rev; HIV Pol; Protease and reverse transcriptase
 <400> 44

atgaatttgc caggaagatg gaaacaaaa atgatagggg gaattggagg ttttatcaaa 60
 gtaggacagt atgatcagat actcatagaa atctgctggac ataaagctat aggtacagta 120
 ttagtaggac ctacacctgt caacataatt ggaagaaatc tgttgactca gattggctgc 180

actttaaatt ttccattag tcctattgag actgtaccag taaaattaa gccaggaatg 240
 gatggcccaa aagttaaaca atggccattg acagaagaaa aaataaaagc attagtagaa 300
 atttgtacag aaatgaaaaa ggaaggaaaa atttcaaaaa ttgggcctga aaatccatac 360
 aatactccag tatttgccat aaagaaaaaa gacagtacta aatggagaaa attagtagat 420
 ttcagagaac ttaataagag aactcaagat ttctgggaag ttcaattagg aataccacat 480
 cctgcagggt taaaacagaa aaaatcagta acagtactgg atgtgggcga tgcataatgtt 540
 tcagttccct tagataaaga cttcaggaag tatactgcat ttaccatacc tagtataaac 600

aatgagacac cagggattag atatcagtac aatgtgcttc cacagggatg gaaaggatca 660
 ccagcaatat tcagtgtag catgacaaaa atcttagagc ctttagaaa acaaaatcca 720
 gacatagtca tctatcaata catggatgat ttgtatgtag gatctgactt agaaataggg 780
 cagcatagaa caaaaataga ggaactgaga caacatctgt tgaggtagggg atttaccaca 840
 ccagacaaaa aacatcagaa agaactcca ttcccttggg tgggttatga actccatcct 900
 gataaatgga cagtacagcc tatagtctg ccagaaaagg acagctggac tgtcaatgac 960
 atacagaaat tagtgggaaa attgaattgg gcaagtcaga tttatgcagg gattaaagta 1020

aggcaattat gtaaacttct taggggaacc aaagcactaa cagaagtagt accactaaca 1080
 gaagaagcag agctagaact ggcagaaaaac agggagattc taaaagaacc ggtacatgga 1140
 gtgtattatg acccatcaaa agacttaata gcagaaatac agaagcaggg gcaaggccaa 1200
 tggacatata aaatttatca agagccattt aaaaatctga aaacaggaaa atatgcaaga 1260
 atgaagggtg cccacactaa tgatgtgaaa caattaacag aggcagtaca aaaaatagcc 1320
 acagaaagca tagtaatatg gggaaagact cctaaattta aattacccat acaaaaggaa 1380
 acatgggaag catggtggac agagtattgg caagccacct ggattcctga gtgggagttt 1440

gtcaatacce ctcccttagt gaagttatgg taccagttag agaaagaacc cataatagga 1500
 gcagaaactt tctatgtaga tggggcagcc aatagggaaa ctaaattagg aaaagcagga 1560

tatgtaactg acagaggaag acaaaaagt gtccccctaa cggacacaac aaatcagaag 1620
 actgagttac aagcaattca tctagctttg caggattcgg gattagaagt aaacatagtg 1680
 acagactcac aatatgcatt gggaatcatt caagcacaac cagataagag tgaatcagag 1740
 ttagtcagtc aaataataga gcagttaata aaaaaggaaa aagcttacct ggcatgggta 1800
 ccagcacaca aaggaattgg aggaaatgaa caagtagatg ggttggtcag tgctggaatc 1860

aggaaagtac ta 1872

<210> 45

<211> 867

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Helper Rev; HIV Integrase; Integration of viral RNA

<400> 45

tttttagatg gaatagataa ggccaagaa gaacatgaga aatcacag taattggaga 60
 gcaatggcta gtgattttaa cctaccacct gtagtagcaa aagaaatagt agccagctgt 120
 gataaatgtc agctaaaagg ggaagccatg catggacaag tagactgtag cccaggaata 180
 tggcagctag attgtacaca tttagaagga aaagtatct tggtagcagt tcatgtagcc 240

agtggatata tagaagcaga agtaattcca gcagagacag ggcaagaaac agcatacttc 300
 ctcttaaat tagcaggaag atggccagta aaaacagtac atacagaca tggcagcaat 360
 ttcaccagta ctacagttaa ggccgcctgt tggtagggcg ggatcaagca ggaatttggc 420
 attccctaca atcccaaaag tcaaggagta atagaatcta tgaataaaga attaaagaaa 480
 attataggac aggtaagaga tcaggctgaa catcttaaga cagcagtaca aatggcagta 540
 ttcattccaca attttaaaag aaaagggggg attggggggg acagtgcagg ggaaagaata 600
 gtagacataa tagcaacaga catacaaaact aaagaattac aaaaacaat tacaaaaatt 660

caaaatttcc gggtttatta caggacagc agagatccag tttggaaagg accagcaaag 720
 ctctctgga aaggtgaagg ggcagtagta atacaagata atagtgcacat aaaagtagtg 780
 ccaagaagaa aagcaaagat catcagggat tatggaaaac agatggcagg tgatgattgt 840
 gtggcaagta gacaggatga ggattaa 867

<210> 46

<211> 234

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Helper/Rev; HIV RRE; Binds Rev element

<400> 46
 aggagctttg ttccttgggt tcttgggagc agcaggaagc actatgggcg cagcgtcaat 60

 gagcgtgacg gtacaggcca gacaattatt gtctggtata gtgcagcagc agaacaattt 120
 gctgagggct attgaggcgc aacagcatct gttgcaactc acagtctggg gcatcaagca 180
 gctccaggca agaatcctgg ctgtggaaag atacctaaag gatcaacagc tcct 234
 <210> 47
 <211> 351
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Helper/Rev; HIV Rev; Nuclear export and stabilize viral mRNA
 <400> 47
 atggcaggaa gaagcggaga cagcgacgaa gaactcctca aggcagtcag actcatcaag 60
 tttctctatc aaagcaacc accctccaat cccgagggga cccgacagc ccgaaggaat 120

 agaagaagaa ggtggagaga gagacagaga cagatccatt cgattagtga acggatcctt 180
 agcacttate tgggacgac tgcggagcct gtgcctcttc agtaccacc gcttgagaga 240
 cttactcttg attgtaacga ggattgtgga acttctggga cgcagggggg ggaagccct 300
 caaatattgg tggaatctcc tacaatattg gagtccaggag ctaaagaata g 351
 <210> 48
 <211> 448
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Helper/Rev; Rabbit beta globin poly A; RNA stability
 <400> 48
 agatcttttt ccctctgcca aaaattatgg ggacatcatg aagccccttg agcatctgac 60

 ttctggctaa taaaggaaat ttattttcat tgcaatagtg tgttgaatt ttttgtgtct 120
 ctcaactcga aggacatatg ggagggcaaa tcatttaaaa catcagaatg agtatttgg 180
 ttagagtttg gcaacatatg ccatatgctg gctgccaatga acaaaggtgg ctataaagag 240
 gtcacagta tatgaaacag cccctgctg tccattcctt attccataga aaagccttga 300
 cttgaggta gatttttttt atattttgtt ttgtgttatt ttttcttta acatccctaa 360
 aattttcctt acatgtttta ctageccagat ttttctcct ctctgacta ctcccagtea 420
 tagctgtccc tcttctctta tgaagatc 448

<210> 49
 <211> 352
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Helper/Rev; CMV early (CAG) enhancer; Enhance Transcription
 <400> 49
 tagttattaa tagtaatcaa ttacggggtc attagtccat agcccatata tggagttccg 60
 cgttacataa cttacggtaa atggcccgcc tggctgaccg cccaacgacc cccgcccatt 120
 gacgtcaata atgacgtatg ttcccatagt aacgccaata gggactttcc attgacgtca 180
 atgggtggac tatttacggt aaactgccca cttggcagta catcaagtgt atcatatgcc 240
 aagtacgcc cctattgacg tcaatgacgg taaatggccc gcctggcatt atgccagta 300

 catgacctta tgggactttc ctacttggca gtacatctac gtattagtca tc 352
 <210> 50
 <211> 290
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Helper/Rev; Chicken beta actin (CAG) promoter; Transcription
 <400> 50
 gctattacca tgggtcgagg tgagccccac gttctgcttc actctcccca tctcccccc 60
 ctccccacc ccaattttgt atttatztat tttttaatta ttttgtgcag cgatgggggc 120
 gggggggggg ggggcgcgcg ccaggcgggg cggggcgggg cgaggggcgg ggcggggcga 180
 ggcggagagg tgcggcgca gccaatcaga gcggcgcgct ccgaaagttt ccttttatgg 240

 cgagggcgcg gcggcgcgcc ccctataaaa agcgaagcgc gcggcgggcg 290
 <210> 51
 <211> 960
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Helper/Rev; Chicken beta actin intron; Enhance gene expression
 <400> 51
 ggagtcgctg cgttgcttc gccccgtgcc ccgctccgcg ccgctcgcg ccgccgccc 60
 cggctctgac tgaccgcgtt actcccacag gtgagcgggc gggacggccc ttctctcgg 120
 ggctgtaatt agcgttggg ttaatgacgg ctcgtttctt ttctgtggct gcgtgaaagc 180

cttaaagggc tccgggaggg ccctttgtgc gggggggagc ggctcggggg gtgcgtgcgt 240

gtgtgtgtgc gtggggagcg ccgcgtgcgg cccgcgtgc ccggcggctg tgagcgtgc 300

gggcgcggcg cggggctttg tgcgtccgc gtgtgcgca ggggagcgc gccggggcg 360

gtcccccgcg gtgcgggggg gctgcgaggg gaacaaagc tgcgtgcggg gtgtgtgcgt 420

gggggggtga gcagggggtg tgggcgcggc ggtcggctg taaccccc ctgcacccc 480

ctccccgagt tgetgagcac ggcccggctt cgggtgcggg gctccgtgc gggcgtggcg 540

cgggctcgc cgtgccggc ggggggtggc ggcaggtggg ggtgccggc ggggcggggc 600

cgctcgggc cggggagggc tcgggggagg ggcgcggcgg ccccggagcg ccggcggctg 660

tcgaggcgcg gcgagccca gccattgcct tttatgtaa tcgtgcgaga gggcgcaggg 720

acttcctttg tccaaaatct ggcggagccg aaatctggga ggcgcccg caccctct 780

agcgggcgcg ggcgaagcgg tgcggcggc gcaggaagga aatgggcggg gagggccttc 840

gtgcgtgcc gcgcccgct ccccttctc atctccagc tcggggctgc cgcaggggga 900

cggctgcctt cgggggggac ggggcagggc ggggttcggc ttctggcgtg tgaccggcgg 960

<210> 52

<211> 1503

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Helper/Rev; HIV Gag; Viral capsid

<400> 52

atgggtgcga gacgtcagt attaagcggg ggagaattag atcgatggga aaaaattcgg 60

ttaagccag ggggaaagaa aaaatataaa ttaaacata tagtatgggc aagcaggag 120

ctagaacgat tcgcagttaa tcttggcctg ttagaacat cagaaggctg tagacaaata 180

ctgggacagc tacaaccatc ccttcagaca ggatcagaag aacttagatc attatataat 240

acagtagcaa cctctattg tgtgcatcaa aggatagaga taaaagacac caaggaagct 300

ttagacaaga tagaggaaga gcaaaacaaa agtaagaaaa aagcacagca agcagcagct 360

gacacaggac acagcaatca ggtcagccaa aattacccta tagtcagaa catccagggg 420

caaatggtac atcaggccat atcacctaga actttaaatg catgggtaaa agtagtagaa 480

gagaaggctt tcagcccaga agtgataccc atgttttcag cattatcaga aggagccacc 540

ccacaagatt taacacatc gctaaacaca gtggggggac atcaagcagc catgcaaatg 600

ttaaaagaga ccatcaatga ggaagctgca gaatgggata gagtgcattc agtgcattgca 660

gggcctattg caccaggcca gatgagagaa ccaaggggaa gtgacatagc aggaactact 720
 agtaccttc aggaacaaat aggatggatg acacataatc cacctatccc agtaggagaa 780

atctataaaa gatggataat cctgggatta aataaaatag taagaatgta tagccctacc 840
 agcattctgg acataagaca aggaccaaag gaacccttta gagactatgt agaccgattc 900
 tataaaaactc taagagccga gcaagcttca caagaggtaa aaaattggat gacagaaacc 960
 ttgttggctc aaaaatgcgaa cccagattgt aagactatgt taaaagcatt gggaccagga 1020
 gcgacactag aagaaatgat gacagcatgt caggagtggt ggggacccgg ccataaagca 1080
 agagttttgg ctgaagcaat gagccaagta acaaatccag ctaccataat gatacagaaa 1140
 ggcaatttta ggaaccaaag aaagactgtt aagtgtttca attgtggcaa agaaggcac 1200

atagccaaaa attgcagggc ccctaggaaa aaggctgtt ggaaatgtgg aaaggaagga 1260
 caccaaatga aagattgtac tgagagacag gctaattttt tagggaagat ctggccttcc 1320
 cacaagggaa ggccagggaa ttttcttcag agcagaccag agccaacagc cccaccagaa 1380
 gagagcttca ggtttgggga agagacaaca actccctctc agaagcagga gccgatagac 1440
 aaggaactgt atccttttagc ttccctcaga tcaacttttg gcagcgacce ctctcaciaa 1500
 taa 1503

<210> 53
 <211> 1872
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Helper/Rev; HIV Pol; Protease and reverse transcriptase

<400> 53

atgaatttgc caggaagatg gaaacaaaa atgatagggg gaattggagg ttttatcaaa 60
 gtaggacagt atgatcagat actcatagaa atctgaggac ataaagctat aggtacagta 120
 ttagtaggac ctacacctgt caacataatt ggaagaaatc tgttgactca gattggctgc 180
 actttaaat ttccattag tcctattgag actgtaccag taaaattaaa gccaggaatg 240
 gatggcccaa aagttaaca atggcattg acagaagaaa aaataaaagc attagtagaa 300
 atttgtacag aaatggaaaa ggaaggaaaa atttcaaaaa ttgggcctga aatccatac 360

aatactccag tatttgccat aaagaaaaaa gacagtacta aatggagaaa attagtagat 420
 ttcagagaac ttaataagag aactcaagat ttctgggaag ttcaattagg aataccacat 480
 cctgcagggt taaaacagaa aaaatcagta acagtactgg atgtggcgca tgcataatgt 540
 tcagttccct tagataaaga cttcaggaag tatactgcat ttaccatacc tagtataaac 600

aatgagacac cagggattag atatcagtac aatgtgcttc cacagggatg gaaaggatca 660
ccagcaatat tccagtgtag catgacaaaa atcttagagc ctttagaaa acaaaatcca 720
gacatagtca tctatcaata catggatgat ttgtatgtag gatctgactt agaaataggg 780

cagcatagaa caaaaataga ggaactgaga caacatctgt tgaggtgggg atttaccaca 840
ccagacaaaa aacatcagaa agaacctcca ttcctttgga tgggttatga actccatcct 900
gataaatgga cagtacagcc tatagtgtctg ccagaaaagg acagctggac tgtcaatgac 960
atacagaaat tagtgggaaa attgaattgg gcaagtcaga tttatgcagg gattaaagta 1020
aggcaattat gtaaacttct taggggaacc aaagcactaa cagaagtagt accactaaca 1080
gaagaagcag agctagaact ggcagaaaaac agggagattc taaaagaacc ggtacatgga 1140
gtgtattatg acccatcaaa agacttaata gcagaaatac agaagcaggg gcaaggccaa 1200

tggacatate aaatztatca agagccattt aaaaatctga aaacaggaaa atatgcaaga 1260
atgaagggtg cccacactaa tgatgtgaaa caattaacag aggcagtaca aaaaatagcc 1320
acagaaagca tagtaatatg gggaaagact ctaaattta aattacccat acaaaaggaa 1380
acatgggaag catggtggag agagtattgg caagccacct ggattcctga gtgggagttt 1440
gtcaatacce ctccttagt gaagttagtaccagttag agaaagaacc cataatagga 1500
gcagaaactt tctatgtaga tggggcagcc aatagggaaa ctaaattagg aaaagcagga 1560
tatgtaactg acagaggaag acaaaaagt tccccctaa cggacacaac aatcagaag 1620

actgagttac aagcaattca tctagctttg caggattcgg gattagaagt aaacatagtg 1680
acagactcac aatatgcatt gggaatcatt caagcacaac cagataagag tgaatcagag 1740
ttagtcagtc aaataataga gcagttaata aaaaaggaaa aagctacct ggcattggta 1800
ccagcacaca aaggaattgg aggaaatgaa caagtagatg ggttggtcag tgctggaatc 1860
aggaaagtac ta 1872

<210> 54
<211> 867
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Helper Rev; HIV Integrase; Integration of viral RNA

<400> 54
tttttagatg gaatagataa ggccaagaa gaacatgaga aatatcacag taattggaga 60
gcaatggcta gtgattttaa cctaccacct gtagtagcaa aagaaatagt agccagctgt 120
gataaatgtc agctaaaagg ggaagccatg catggacaag tagactgtag cccaggaata 180

tggcagctag attgtacaca tttagaagga aaagttatct tggtagcagt tcatgtagcc 240
 agtggatata tagaagcaga agtaattcca gcagagacag ggcaagaaac agcatacttc 300
 ctcttaaaat tagcaggaag atggccagta aaaacagtac atacagacaa tggcagcaat 360
 ttcaccagta ctacagttaa ggccgcctgt tggtaggcgg ggatcaagca ggaatttggc 420

attcctaca atccccaag tcaaggagta atagaatcta tgaataaaga attaaagaaa 480
 attataggac aggtaagaga tcaggctgaa catcttaaga cagcagtaca aatggcagta 540
 ttcacccaca attttaaaag aaaagggggg attggggggg acagtgacagg gaaagaata 600
 gtagacataa tagcaacaga catacaaaact aaagaattac aaaaacaaat tacaaaaatt 660
 caaaattttc gggtttatta caggacagc agagatccag tttggaaagg accagcaaag 720
 ctctctgga aaggtaagg ggcagtagta atacaagata atagtgacat aaaagtagtg 780
 ccaagaagaa aagcaaagat catcagggat tatggaaaac agatggcagg tgatgattgt 840

gtggcaagta gacaggatga ggattaa 867

<210> 55

<211> 234

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Helper/Rev; HIV RRE; Binds Rev element

<400> 55

aggagctttg ttccttgggt tcttgggagc agcaggaagc actatgggagc cagcgtcaat 60
 gacgctgacg gtacaggcca gacaattatt gtctggtata gtgcagcagc agaacaattt 120
 gctgagggct attgaggcgc aacagcatct gttgcaactc acagtctggg gcatcaagca 180
 gctccaggca agaatcctgg ctgtggaaag atacctaaag gatcaacagc tcct 234

<210> 56

<211> 448

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Helper/Rev; Rabbit beta globin poly A; RNA stability

<400> 56

agatctttt ccctctgcca aaaattatgg ggacatcatg aagccccttg agcatctgac 60
 ttctggctaa taaaggaat ttattttcat tgcaatagtg tgttgaatt ttttgtgtct 120
 ctcaactcggaggacatag ggagggcaaa tcatttaaaa catcagaatg agtatttggg 180
 ttagagtttg gcaacatag ccatatgctg gctgcatga acaaaggtgg ctataaagag 240

gtcatcagta taigaaacag cccctgctg tccattcctt attccataga aaagccttga 300

cttgaggtta gatttttttt atattttgtt ttgtgttatt tttttcttta acatccctaa 360

aattttcctt acatgtttta ctageccagat ttttctcct ctcctgacta ctcccagtea 420

tagctgtccc tcttctctta tgaagatc 448

<210> 57

<211> 351

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Helper/Rev; HIV Rev; Nuclear export and stabilize viral mRNA

<400> 57

atggcaggaa gaagcggaga cagcgacgaa gaactcctca aggcagtcag actcatcaag 60

tttctctatc aaagcaacc acctccaat cccgagggga cccgacagc cccaaggaat 120

agaagaagaa ggtggagaga gagacagaga cagatccatt cgattagtga acggatcctt 180

agcacttate tgggacgac tgcggagcct gtgcctcttc agtaccacc gcttgagaga 240

cttactcttg attgtaacga ggattgtgga acttctggga cgcaggggggt gggaagccct 300

caaatattgg tggaatctcc tacaatattg gagtcaggag ctaaagaata g 351

<210> 58

<211> 351

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Helper/Rev; HIV Rev; Nuclear export and stabilize viral mRNA

<400> 58

atggcaggaa gaagcggaga cagcgacgaa gaactcctca aggcagtcag actcatcaag 60

tttctctatc aaagcaacc acctccaat cccgagggga cccgacagc cccaaggaat 120

agaagaagaa ggtggagaga gagacagaga cagatccatt cgattagtga acggatcctt 180

agcacttate tgggacgac tgcggagcct gtgcctcttc agtaccacc gcttgagaga 240

cttactcttg attgtaacga ggattgtgga acttctggga cgcaggggggt gggaagccct 300

caaatattgg tggaatctcc tacaatattg gagtcaggag ctaaagaata g 351

<210> 59

<211> 450

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Rev; Rabbit beta globin poly A; RNA stability

<400> 59

agatcttttt cctctgccca aaaattatgg ggacatcatg aagccccttg agcatctgac 60
 ttctggctaa taaaggaat ttattttcat tgcaatagtg tgttgaatt ttttgtct 120
 ctcaactgga aggacatag ggagggcaaa tcatthaaaa catcagaatg agtatttgg 180
 ttagagtttg gcaacatag cccatagct ggctgccatg aacaagggtt ggctataaag 240
 aggtcatcag tatatgaac agcccctgc tgcattcc ttattccata gaaaagcctt 300
 gacttgaggt tagatTTTTT ttatattttg ttttgtgta ttttttctt taacatcct 360
 aaaattttcc ttacatgttt tactagccag attttctc ctctctgac tactccagt 420

 catagctgtc cctcttctt tatggagatc 450

<210> 60

<211> 577

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Envelope; CMV promoter; Transcription

<400> 60

acattgatta ttgactagt attaatagta atcaattacg gggtcattag ttcatagccc 60
 atatatggag ttccgcgta cataacttac ggtaaatggc ccgcctggct gaccgccaa 120
 cgacccccgc ccattgacgt caataatgac gtatgttccc atagtaacgc caataggac 180
 tttccattga cgicaatggg tggagtattt acggtaaact gccacttgg cagtacatca 240

 agtgtatcat atgccaagta cgccccctat tgacgtcaat gacggtaaat ggccccctg 300
 gcattatgcc cagtacatga cttatggga ctttctact tggcagtaca tetacgtatt 360
 agtcatcgt attaccatgg tgatgcggtt ttggcagtac atcaatgggc gtggatagc 420
 gtttgactca cggggatttc caagtctcca cccattgac gtcaatggga gtttgtttg 480
 gcacaaaaat caacgggact ttcaaaaatg tcgtaacaac tccgccccat tgacgcaaat 540
 gggcggtagg cgtgtacggt gggaggtcta tataagc 577

<210> 61

<211> 573

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Envelope; Beta globin intron; Enhance gene expression

<400> 61
 gtgagtttgg ggacccttga ttgttctttc tttttcgcta ttgtaaaatt catgttatat 60
 ggagggggca aagttttcag ggtgttgttt agaatgggaa gatgtccctt gtatcaccat 120
 ggaccctcat gataattttg tttctttcac tttctactct gttgacaacc attgtctcct 180
 cttattttct tttcattttc tgtaactttt tctgtaaaact ttagcttgca ttgtaacga 240
 atttttaaat tcaacttttg ttatttgtca gattgtaagt actttcteta atcacttttt 300
 tttcaaggca atcagggtat attatattgt acttcagcac agttttagag aacaattggt 360

 ataattaaat gataaggtag aatattttctg catataaatt ctggctggcg tggaaatatt 420
 cttattggta gaaacaacta caccctggtc atcatctgc ctttctcttt atggttacaa 480
 tgatatacac tgttgagat gaggataaaa tactctgagt ccaaaccggg ccctctgct 540
 aacctgttc atgccttctt ctctttcteta cag 573

 <210> 62
 <211> 1519
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Envelope; VSV-G; Glycoprotein envelope-cell entry
 <400> 62
 atgaagtgcc ttttgtactt agccttttta ttcattgggg tgaattgcaa gttcaccata 60

 gtttttccac acaacaaaaa aggaaactgg aaaaatgttc cttctaatta ccattattgc 120
 ccgtcaagct cagatttaaa ttggcataat gacttaatag gcacagcctt acaagtcaaa 180
 atgccaaga gtcacaaggc tattcaagca gacggttga tgtgtcatgc ttccaaatgg 240
 gtcaactact gtgatttccg ctggtatgga ccgaagtata taacacattc catccgatcc 300
 ttcactccat ctgtagaaca atgcaaggaa agcattgaac aaacgaaaca aggaacttgg 360
 ctgaatccag gcttccctcc tcaaagttgt ggatatgcaa ctgtgacgga tgccgaagca 420
 gtgattgtcc aggtgactcc tcacatgtg ctggttgatg aatacacagg agaatgggtt 480

 gattcacagt tcatcaacgg aaaatgcagc aattacatat gccccactgt ccataactct 540
 acaacctgge attctgacta taaggtcaaa gggctatgtg attctaacct catttccatg 600
 gacatcacct tcttctcaga ggacggagag ctatcatccc tgggaaagga gggcacaggg 660
 ttcagaagta actactttgc ttatgaaact ggaggcaagg cctgcaaaat gcaatactgc 720
 aagcattggg gactcagact cccatcaggt gtctggttcg agatggctga taaggatctc 780
 tttgctgcag ccagattccc tgaatgccca gaagggtcaa gtatctctgc tccatctcag 840

acctcagtg atgtaagtct aattcaggac gttgagagga tcttggatta tccctctgc 900

caagaaacct ggagcaaat cagagcgggt cttccaatct ctccagtga tctcagctat 960

cttgcctcta aaaaccagg aaccggctct gctttcacca taatcaatgg taccctaaaa 1020

tactttgaga ccagatacat cagagtcgat attgctgctc caatcctctc aagaatggtc 1080

ggaatgatca gtggaactac cacagaaagg gaactgtggg atgactgggc accatatgaa 1140

gacgtggaaa ttggaccaa tggagtcttg aggaccagtt caggatataa gtttcttta 1200

tacatgattg gacatggtat gttggactcc gatcttcac ttagctcaa ggctcaggtg 1260

ttcgaacatc ctcacattca agacgtgct tcgcaacttc ctgatgatga gagtatttt 1320

tttggtgata ctgggctatc caaaaatcca atcgagcttg tagaaggtg gttcagtagt 1380

tggaaaagct ctattgcctc tttttcttt atcatagggt taatcattgg actattcttg 1440

gttctccgag ttggtatcca tctttgcatt aaattaaagc acaccaagaa aagacagatt 1500

tatacagaca tagagatga 1519

<210> 63

<211> 450

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Rev; Rabbit beta globin poly A; RNA stability

<400> 63

agatctttt cctctgcca aaaattatgg ggacatcatg aagccccttg agcatctgac 60

ttctggctaa taaaggaat ttattttcat tgcaatagtg tgttggatt ttttgtctt 120

ctcactcgga aggacatgat ggagggcaaa tcatttaaaa catcagaatg agtatttgg 180

ttagagtttg gcaacatgat cccatgatct ggtgccaatg aacaagggtt ggctataaag 240

aggatcatcag tatatgaac agccccctgc tgcattcc ttattccata gaaaagcctt 300

gacttgaggt tagatTTTTT ttatattttg ttttgttta ttttttctt taacatcct 360

aaaattttcc ttacatgttt tactagccag attttctc ctcctctgac tacteccagt 420

catagctgtc cctcttctt tatggagatc 450

<210> 64

<211> 1104

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Elongation Factor-1 alpha (EF1-alpha) promoter

<400> 64

ccggtgccta gagaaggtgg cgcggggtaa actgggaaag tgatgtcgtg tactggctcc 60
 gcctttttcc cgagggtggg ggagaaccgt atataagtgc agtagtcgcc gtgaacgttc 120
 tttttcgcaa cgggtttgcc gccagaacac aggtaagtgc cgtgtgtggt tcccgcgggc 180
 ctggcctctt tacgggttat ggcccttgcg tgccttgaat tacttccacg cccttggtg 240
 cagtacgtga ttcttgatcc cgagcttcgg gttggaagtg ggtgggagag ttcgaggcct 300

 tgcgcttaag gagccccttc gcctcgtgct tgagttgagg cctggcctgg gcgctggggc 360
 cgcccgctgc gaatctggtg gcaccttcgc gcctgtctcg ctgctttcga taagtctcta 420
 gccatttaaa atttttgatg acctgctgcg acgctttttt tctggcaaga tagtcttgta 480
 aatgcgggcc aagatctgca cactggtatt tcggtttttg gggccgcggg cggcgacggg 540
 gcccgtcgtt cccagcgcac atgttcggcg aggcggggcc tgcgagcgcg gccaccgaga 600
 atcggacggg ggiagtctca agctggccgg cctgctctgg tgcctggcct cgcgccccg 660
 tgtatcgccc cgcctgggc ggcaaggctg gcccggtcgg caccagttgc gtgagcggaa 720

 agatggccgc ttcccggccc tgctgcaggg agctcaaaat ggaggacgcg gcgctcgga 780
 gagcggcggt gtgagtcacc cacacaaagg aaaaggcct ttccgtcctc agccgtcgt 840
 tcatgtgact ccacggagta cgggcgcgcg tccaggcacc tcgattagtt ctcgagcttt 900
 tggagtacgt cgtctttagg ttggggggag gggttttatg cgatggagtt tcccacact 960
 gagtgggtgg agactgaagt taggccagct tggcacttga tgtaattctc cttggaattt 1020
 gccctttttg agtttggatc ttggttcatt ctcaagctc agacagtgtt tcaaagtttt 1080
 tttcttccat ttcaggtgtc gtga 1104

<210> 65

<211> 511

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Promoter; PGK

<400> 65

ggggttgggg ttgcgccttt tccaaggcag ccctgggttt ggcagggac gcggtgctc 60
 tggcggtggt tccgggaaac gcagcggcgc cgaccctggg tctcgacat tcttcacgtc 120
 cgttcgcagc gtcaccggga tcttcgccgc tacccttggt ggccccccgg cgacgttcc 180
 tgctccgcc ctaagtccgg aaggttctt gcggttcgcg gcgtgccgga cgtgacaaac 240
 ggaagccgca cgictcacta gtaccctcgc agacggacag cgccaggag caatggcagc 300

gcgccgaccg cgatgggctg tggccaatag cggctgctca gcagggcgcg ccgagagcag 360
 cggccgggaa ggggcggtgc gggaggcggg gtgtggggcg gtagtgtggg ccctgttctt 420
 gcccgcgagg tgttccgcat tctgcaagcc tccggagcgc acgtcggcag tgggtccct 480
 cgttgaccga atcaccgacc tctctcccca g 511

- <210> 66
- <211> 1162
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> Promoter; UbC
- <400> 66

gcgccgggtt ttggcgcctc ccgaggcgc cccctctc acggcgagcg ctgccacgtc 60

 agacgaaggg cgcaggagcg ttctgatcc ttccgcccgg acgctcagga cagcggcccc 120
 ctgctcataa gactcggcct tagaaccca gtatcagcag aaggacattt taggacggga 180
 ctgggtgac tctaggcacc tggttttctt tccagagagc ggaacaggcg aggaaaagta 240
 gtcccttctc ggcgattctg cggagggatc tccgtggggc ggtgaacgcc gatgattata 300
 taaggacgcg ccgggtgigg cacagctagt tccgtcgcag ccgggatttg ggtcgcggtt 360
 cttgtttgtg gatcgtctgt atcgtcactt ggtgagttgc gggctgctgg gctggccggg 420
 gctttcgtgg ccgccgggcc gctcgtggg acggaagcgt gtggagagac cgccaagggc 480

tgtagtctgg gtccgcgagc aaggttgccc tgaactgggg gttgggggga gcgcacaaaa 540
 tggcggctgt tcccagict tgaatggaag acgctttaa ggccggctgt gagtctgtt 600
 aaacaaggtg ggggcatgg tggcggcaa gaaccaagg tcttaggcc ttcgctaatg 660
 cgggaaagct cttattcggg tgagatgggc tggggcacca tctggggacc ctgacgtgaa 720
 gtttgcact gactggagaa ctcgggtttg tcgtctggtt gcggggcgcg cagttatgcg 780
 gtgccgttgg gcagtgcacc cgtacctttg ggagcgcgcg cctcgtctg tcgtgacgtc 840
 acccgttctg ttggcttata atgcagggtg ggccacctg ccggtaggtg tgcggtaggc 900

ttttctccgt cgcaggacgc agggttcggg cctagggtag gctctcctga atcgacaggc 960
 gccggacctc tggtagggg agggataagt gaggcgtcag tttctttggt cggttttatg 1020
 tacctatctt cttaaagtagc tgaagctccg gttttgaact atgcgctcgg ggttggcgag 1080
 tgtgttttgt gaagttttt aggcacctt tgaatgtaa tcatttgggt caatatgtaa 1140
 ttttcagtgt tagactagta aa 1162

- <210> 67
- <211> 120

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Poly A; SV40
 <400> 67

gtttattgca gcttataatg gttacaaata aagcaatagc atcacaaatt tcacaaataa 60
 agcatttttt tcaactgcatt ctagtgtggg ttgtgccaaa ctcacatg tatcttata 120
 120

<210> 68
 <211> 227
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Poly A; bGH
 <400> 68

gactgtgctt tctagttgcc agccatctgt tgtttgcccc tccccctgc ctctcttgac 60
 cctggaaggt gccactccca ctgtcctttc ctaataaaat gaggaattg catcgattg 120
 tctgagtagg tgtcattcta ttctgggggg tggggtgggg caggacagca agggggagga 180

ttgggaagac aatagcaggc atgctgggga tgcggtgggc tctatgg 227

<210> 69
 <211> 1512
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> HIV Gag; Bal
 <400> 69

atgggtgcga gacgctcagt attaagcggg ggagaattag ataggtggga aaaaattcgg 60
 ttaaggccag ggggaaagaa aaaatataga ttaaaacata tagtatgggc aagcagggaa 120
 ctagaaagat tcgcagtcaa tcctggcctg ttagaaacat cagaaggctg cagacaaata 180
 ctgggacagc tacaaccatc ccttcagaca ggatcagaag aacttagatc attatataat 240

acagtagcaa ccctctattg tgtacatcaa aagatagagg taaaagacac caaggaagct 300
 ttagacaaaa tagaggaaga gcaaaacaaa tgtaagaaaa aggcacagca agcagcagct 360
 gacacaggaa acagcggta ggtcagccaa aatttcctta tagtcagaa cctccagggg 420
 caaatggtac atcaggccat atcacctaga actttaaatg catgggtaaa agtaatagaa 480
 gagaaagctt tcagcccaga agtaataacc atgttttcag cattatcaga aggagccacc 540

ccacaagatt taaacacat gctaaacaca gtggggggac atcaagcagc catgcaaatg 600
 ttaaaagaac ccatcaatga ggaagctgca agatgggata gattgcatcc cgtgcaggca 660

gggcctgttg caccaggcca gataagagat ccaaggggaa gtgacatagc aggaactacc 720
 agtacccctc aggaacaaat aggatggatg acaagtaatc cacctatccc agtaggagaa 780
 atctataaaa gatggataat cctgggatta aataaaatag taaggatgta tagccctacc 840
 agcattttgg acataagaca aggaccaaag gaacccttta gagactatgt agaccggttc 900
 tataaaactc taagagccga gcaagcttca caggaggtaa aaaattggat gacagaaacc 960
 ttgttggtec aaaaatgcgaa cccagattgt aagactatct taaaagcatt gggaccagca 1020
 gctacactag aagaaatgat gacagcatgt cagggagtgg gaggaccag ccataaagca 1080

agaatthttg cagaagcaat gagccaagta acaaatcag ctaccataat gatgcagaaa 1140
 ggcaatthta ggaaccaaaag aaagattgtt aatgtttca attgtggcaa agaagggcac 1200
 atagccagaa actgcagggc ccctaggaaa aggggctgtt ggaaatgtgg aaaggaagga 1260
 caccaaatga aagactgtac tgagagacag gctaathttt tagggaaaat ctggccttcc 1320
 cacaaaggaa ggccagggaa tttccttcag agcagaccag ageccaacagc cccaccagcc 1380
 ccaccagaag agagcttcag gtttggggaa gagacaacaa ctccctctca gaagcaggag 1440
 ctgatagaca aggaactgta tcctttagct tcctcagat cactctttgg caacgacccc 1500

tcgtcacaat aa 1512

<210> 70
 <211> 1872
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> HIV Pol; Bal
 <400> 70

atgaatthtc caggaagatg gaaacaaaa atgatagggg gaattggagg ttttatcaaa 60
 gtaagacagt atgatcagat actcatagaa atctgtggac ataaagctat aggtacagta 120
 ttaataggac ctacacctgt caacataat ggaagaaatc tgttgactca gattggttgc 180
 actthaaatt ttccattag tcctattgaa actgtaccag taaaattaaa accaggaatg 240

gatggcccaa aagttaaca atggccactg acagaagaaa aaataaaagc attaatggaa 300
 atctgtacag aaatggaaaa ggaagggaaa atttcaaaaa ttggcctga aaatccatac 360
 aatactccag tatttgccat aaagaaaaaa gacagtacta aatggagaaa attagtagat 420
 ttcagagaac ttaataagaa aactcaagac ttctgggaag tacaattagg aatacacatc 480

ccgcaggggt taaaaaagaa aaaatcagta acagtactgg atgtgggtga tgcataat
540
tcagttccct tagataaaga attcaggaag tatactgcat ttaccatacc tagtataaac
600
aatgaaacac cagggatcag atatcagtac aatgtacttc cacagggatg gaaaggatca
660

ccagcaatat ttcaaagtag catgacaaga atcttagagc ctttagaaa acaaaatcca
720
gaaatagtga tctatcaata catggatgat ttgtatgtag gatctgactt agaaataggg
780
cagcatagaa caaaaataga ggaactgaga caacatctgt tgagggtggg atttaccaca
840
ccagacaaaa aacatcagaa agaactcca ttctttgga tgggttatga actccatcct
900
gataaatgga cagtacagcc tatagtctg ccagaaaaag acagctggac tgtcaatgac
960
atacagaagt tagtgggaaa attgaattgg gcaagtcaga tttaccagg aattaaagta
1020
aagcaattat gtaggctcct taggggaacc aaggcattaa cagaagtaat accactaaca
1080

aaagaaacag agctagaact ggcagagaac agggaaattc taaaagaacc agtacatggg
1140
gtgtattatg acccatcaaa agacttaata gcagaaatac agaagcaggg gcaaggccaa
1200
tggacatate aaatttatca agagccattt aaaaatctga aaacaggaaa atatgcaaga
1260
atgaggggtg cccacactaa tgatgtaaaa caattaacag aggcagtgca aaaaataacc
1320
acagaaagca tagtaatatg gggaaagact cctaaattta aactacccat acaaaaagaa
1380
acatgggaaa catggtggac agagtattgg caagccacct ggattcctga gtgggagttt
1440
gtcaatacce ctcccttagt gaaattatgg taccagttag agaaagaacc cataatagga
1500

gcagaaacat tctatgtaga tggagcagct aaccgggaga ctaaattagg aaaagcagga
1560
tatgttacta acagaggaag acaaaaagt gtctccctaa ctgacacaac aatcagaag
1620
actgagttac aagcaattca tctagcttta caagattcag gattagaagt aaacatagta
1680
acagactcac aatatgcatt aggaatcatt caagcacaac cagataaaag tgaatcagag
1740
ttagtcagtc aaataataga acagttaata aaaaaggaaa aggtctacct ggcattggta
1800
ccagcgaca aaggaattgg aggaaatgaa caagtagata aattagtcag tactggaatc
1860
aggaaagtac ta
1872

- <210> 71
- <211> 867
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> HIV Integrase; Bal
- <400> 71

tttttagatg gaatagatat agcccaagaa gaacatgaga aatatcacag taattggaga
60

gcaatggcta gtgattttaa cctgccacct gtggtagcaa aagaaatagt agccagctgt 120
gataaatgtc agctaaaagg agaagccatg catggacaag tagactgtag tccaggaata 180
tggaactag attgtacaca tttagaagga aaaattatcc tggtagcagt tcatgtagcc 240
agtggatata tagaagcaga agttattcca gcagagacag ggcaggaaac agcatacttt 300

ctcttaaaat tagcaggaag atggccagta aaaacaatac atacagacaa tggcagcaat 360
ttcactagta ctacagtcaa ggccgcctgt tggtagggcg ggatcaagca ggaatttggc 420
attccctaca atccccaag tcagggagta gtagaatcta taaataaaga attaaagaaa 480
attataggac aggtaagaga tcaggctgaa catcttaaaa cagcagtaca aatggcagta 540
ttcatccaca attttaaaag aaaagggggg attggggggt atagtgcagg ggaaagaata 600
gtagacataa tagcaacaga catacaact aaagaattac aaaaacaaat tacaaaaatt 660
caaaattttc gggtttatta cagggacagc agagatccac tttggaaagg accagcaaag 720

cttctctgga aaggtgaagg ggcagtagta atacaagata atagtacat aaaagtagta 780
ccaagaagaa aagcaaagat cattagggat tatggaaaac agatggcagg tgatgattgt 840
gtggcaagta gacaggatga ggattag 867

<210> 72
<211> 1695
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Envelope; RD114
<400> 72

atgaaactcc caacaggaat ggtcatttta tgtagcctaa taatagttcg ggcagggttt 60
gacgaccccc gcaaggctat cgcattagta caaaaacaac atggtaaacc atgcgaatgc 120

agcggagggc aggtatccga ggccccaccg aactccatcc aacaggtaac ttgccaggc 180
aagacggcct acttaatgac caaccaaaaa tggaaatgca gagtactcc aaaaaatctc 240
accctagcg ggggagaact ccagaactgc cctgtaca ctttccagga ctcgatgcac 300
agttcttgtt atactgaata ccggcaatgc agggcgaata ataagacata ctacacggcc 360
accttgctta aaatacggtc tgggagcctc aacgaggtac agatattaca aaaccccaat 420
cagctectac agtccccctg taggggctct ataaatcagc ccgtttgctg gagtgcacaca 480
gcccccatcc atatctccga tggtaggagga ccctcgata ctaagagagt gtggacagtc 540

caaaaaagge tagaacaat tcataagct atgcactctg aacttcaata ccaccctta 600
gccctgccca aagtcagaga tgaccttagc cttgatgcac ggacttttga tatcctgaat 660

accactttta ggttactcca gatgtccaat tttagccttg cccaagattg ttggctctgt 720
 ttaaaactag gtaccctac ccctcttgcg ataccactc cctctttaac ctactcccta 780
 gcagactccc tagcgaatgc ctctgtcag attatactc ccctcttggg tcaaccgatg 840
 cagttctcca actcgtcctg tttatcttc cctttcatta acgatacga acaaatagac 900
 ttaggtgcag tcacctttac taactgcacc tctgtagcca atgtcagtag tcctttatgt 960

gccttaaagc ggtcagtctt cctctgtgga aataacatgg catacaccta tttaccccaa 1020
 aactggacag gactttgcgt ccaagcctcc ctctccccg acattgacat catcccgggg 1080
 gatgagccag tcccattcc tgccattgat cattatatac atagacctaa acgagctgta 1140
 cagttcatcc ctttactagc tggactggga atcaccgag cattcaccac cggagctaca 1200
 ggcttaggtg tctccgtcac ccagtataca aaattatccc atcagttaat atctgatgtc 1260
 caagtcttat ccggtaccat acaagattta caagaccagg tagactcgtt agctgaagta 1320
 gtctcctaaa ataggagggg actggacctt ctaacggcag aacaaggagg aatttgttta 1380

gccttacaag aaaaatgctg tttttatgct aacaagtcag gaattgtgag aaacaaaata 1440
 agaaccctac aagaagaatt acaaaaacgc agggaaagcc tggcatccaa ccctctctgg 1500
 accgggctgc agggctttct tccgtacctc ctacctctcc tgggaccctc actcacctc 1560
 ctactcatac taaccattgg gccatgcgtt ttcaatcgat tggccaatt tgtaaagac 1620
 aggatctcag tggccaggc tctggttttg actcagcaat atcaccagct aaaaccata 1680
 gagtacgagc catga 1695

<210> 73
 <211> 2013
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Envelope; GALV

<400> 73

atgcttctca cctcaagccc gcaccacctt cggcaccaga tgagtcttgg gagctggaaa 60
 agactgatca tcctcttaag ctgctgattc ggagacggca aaacgagtct gcagaataag 120
 aacccccacc agcctgtgac cctcacctgg caggtactgt cccaaactgg ggacgttgtc 180
 tgggacaaaa aggcagtcca gcccttttgg acttgggtgc cctctcttac acctgatgta 240
 tgtgcccttg cggccggtct tgagtcttgg gatatcccgg gatccgatgt atcgtcctct 300
 aaaagagtta gacctctga ttcagactat actgccgctt ataagcaaat cacctgggga 360
 gccatagggt gcagctaccc tcgggctagg accaggatgg caaattcccc cttctactgt 420

tgtccccgag ctggccgaac ccattcagaa gctaggaggt gtggggggct agaatcccta 480
 tactgtaaag aatggagttg tgagaccacg ggtaccgttt attggcaacc caagtctca 540
 tgggacctca taactgtaaa atgggaccaa aatgtgaaat gggagcaaaa atttcaaaag 600
 tgtgaacaaa ccggctggtg taaccacctc aagatagact tcacagaaaa aggaaaactc 660
 tccagagatt ggataacgga aaaaacctgg gaattaaggt tctatgtata tggacacca 720
 ggcatacagt tgactatccg cttagaggtc actaacatgc cggttgtggc agtgggcca 780

 gacctgtcc ttgcggaaca gggacctcct agcaagcccc tactctccc tctctccca 840
 cggaaagcgc cgecccccc tctaccccc gcggctagtg agcaaacccc tgcggtgcat 900
 ggagaaactg ttaccctaaa ctctccgctt cccaccagtg gcgaccgact ctttgcctt 960
 gtgcaggggg ccttctaac cttgaatgct accaacccag gggccactaa gtcttctgg 1020
 ctctgtttgg gcatgagccc cccttattat gaagggatag cctcttcagg agaggtcgt 1080
 tatactcca accatacccg atgccactgg ggggccaag gaaagcttac cctcactgag 1140
 gtctccggac tcgggtcatg cataggaag gtgcctctta cccatcaaca tctttgcaac 1200

 cagaccttac ceatcaatc ctctaaaaac catcagtatc tgetccctc aaacctatgc 1260
 tggtaggctt gcagcactgg cctcaccccc tgcctctcca cctcagtttt taatcagtct 1320
 aaagacttct gtgtccaggt ccagctgatc ccccgcattt attacattc tgaagaaacc 1380
 ttgttacaag cctatgaaa atcaccccc aggtttaaaa gagagcctgc ctcaattacc 1440
 ctactgtctt tcttggggtt agggattgcg gcaggtatag gtactggctc aaccgccta 1500
 attaaagggc ccatagacct ccagcaaggc ctaaccagcc tccaatcgc cattgacgct 1560
 gacctccggg cccttcagga ctcaatcagc aagctagagg actcactgac ttcctatct 1620

 gaggtagtac tccaaaatag gagaggcctt gacttactat tccttaaaga aggaggcctc 1680
 tgcgcggccc taaaagaaga gtgctgtttt tatgtagacc actcaggtgc agtacgagac 1740
 tccatgaaaa aacttaaaga aagactagat aaaagacagt tagagcgcca gaaaaacaa 1800
 aactggtatg aagggtggtt caataactcc ccttggttta ctacctact atcaaccatc 1860
 gctgggcccc tattgtcctt ccttttgttt ctactcttg ggcctgcat catcaataaa 1920
 ttaatccaat tcatcaatga taggataagt gcagtcaaaa ttttagtcct tagacagaaa 1980
 tatcagacc tagataacga ggaaaacctt taa 2013

- <210> 74
- <211> 1530
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence

<220><223> Envelope; FUG

<400> 74

atggttccgc aggttctttt gtttgtactc cttctgggtt tttcgttgtg tttcgggaag 60
 ttccccattt acacgatacc agacgaactt ggtccctgga gccctattga catacaccat 120
 ctgagctgtc caaataacct ggttgtggag gatgaaggat gtaccaacct gtccgagttc 180
 tcctacatgg aactcaaagt gggatacatc tcagccatca aagtgaacgg gttcacttgc 240
 acaggtgttg tgacagaggc agagacctac accaactttg ttggttatgt cacaaccaca 300

 ttcaagagaa agcatttccg cccccccca gacgcatgta gagccgcgta taactggaag 360
 atggccggtg accccagata tgaagagtcc ctacacaatc cataccccga ctaccactgg 420
 cttcgaactg taagaaccac caaagagtcc ctattatca tatccccaaag tgtgacagat 480
 ttggacccat atgacaaatc ccttcactca agggctcttc ctggcggaaa gtgctcagga 540
 ataacggtgt ccctaceta ctgctcaact aaccatgatt acaccatttg gatgcccgag 600
 aatccgagac caaggacacc ttgtgacatt tttaccaata gcagaggaa gagagcatcc 660
 aacgggaaca agacttgcgg ctttgtggat gaaagaggcc tgtataagtc tctaaaagga 720

 gcatgcaggc tcaagttatg tggagtctt ggacttagac ttatggatgg aacatgggtc 780
 gcgatgcaaa catcagatga gaccaaattg tgcctccag atcagttggt gaatttgac 840
 gactttcgtc cagacgagat cgagcatctc gttgtggagg agttagttaa gaaaagagag 900
 gaatgtctgg atgcattaga gtccatcatg accaccaagt cagtaagttt cagacgtctc 960
 agtcacctga gaaaacttgt cccagggttt ggaaaagcat ataccatatt caacaaaacc 1020
 ttgatggagg ctgatgctca ctacaagtca gtccggacct ggaatgagat catcccctca 1080
 aaagggtgtt tgaagttgg aggaaggtgc catcctcatg tgaacggggt gtttttcaat 1140

 ggtataatat tagggcctga cgaccatgtc ctaateccag agatgcaatc atccctctc 1200
 cagcaacata tggagttgtt ggaatcttca gttatcccc tgatgcacc cctggcagac 1260
 cttctacag ttttcaaaga aggtgatgag gctgaggatt ttgttgaagt tcacctccc 1320
 gatgtgtaca aacagatctc aggggttgac ctgggtctcc cgaactgggg aaagtatgta 1380
 ttgatgactg caggggcat gattggcctg gtgttgatat tttccctaat gacatggtgc 1440
 agagttgga tccatcttg cattaatta aagcacacca agaaaagaca gatttataca 1500
 gacatagaga tgaaccgact tggaaagtaa 1530

<210> 75

<211> 1497

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Envelope; LCMV

<400> 75

atgggtcaga ttgtgacaat gtttgaggct ctgcctcaca tcatcgatga ggtgatcaac 60
 attgtcatta ttgtgcttat cgtgatcacg ggtatcaagg ctgctctaaa ttttgccacc 120
 tgtgggatat tcgattgat cagtttecta cttctggctg gcaggctctg tggcatgtac 180
 ggtcttaagg gacccgacat ttacaaagga gtttaccat ttaagtcagt ggagtttgat 240
 atgtcacatc tgaacctgac catgcccaac gcatgttcag ccaacaactc ccaccattac 300

atcagtatgg ggacttctgg actagaattg accttcacca atgattccat catcagtcac 360
 aacttttgca atctgacctc tgccttcaac aaaaagacct ttgaccacac actcatgagt 420
 atagtttcca gcctacacct cagtatcaga gggaactcca actataaggc agtatcctgc 480
 gacttcaaca atggcataac catccaatac aacttgacat tctcagatcg acaaagtgct 540
 cagagccagt gtagaacctt cagaggtaga gtcttagata tgtttagaac tgccttcggg 600
 gggaaataca tgaggagtgg ctggggctgg acaggctcag atggcaagac cacctggtgt 660
 agccagacga gttaccaata cctgattata caaaatagaa cctgggaaaa cactgcaca 720

tatgcaggtc cttttgggat gtccaggatt ctctttccc aagagaagac taagttcttc 780
 actaggagac tagcgggcac attcacctgg actttgtcag actcttcagg ggtggagaat 840
 ccaggtggtt attgcctgac caaatggatg attcttctg cagagcttaa gtgtttcggg 900
 aacacagcag ttgcgaaatg caatgtaa at catgatgccg aattctgtga catgctgcga 960
 ctaattgact acaacaaggc tgctttgagt aagttcaaag aggacgtaga atctgccttg 1020
 cacttattca aaacaacagt gaattctttg atttcagatc aactactgat gaggaaccac 1080
 ttgagagatc tgatgggggt gccatattgc aattactcaa agttttgta cctagaacat 1140

gcaaagaccg gcgaaactag tgtccccaag tctggcttg tcaccaatgg ttcttactta 1200
 aatgagacce acttcagtga tcaaatcgaa caggaagccg ataacatgat tacagagatg 1260
 ttgaggaagg attacataaa gaggcagggg agtacccecc tagcattgat ggaccttctg 1320
 atgttttcca catctgcata tctagtcagc atcttctgc acctgtcaa aataccaaca 1380
 cacaggcaca taaaaggtgg ctcatgtcca aagccacacc gattaacca caaaggaatt 1440
 ttagttgtg gtgcatttaa ggtgcctggt gtaaaaaccg tctggaaaag acgctga 1497

<210> 76

<211> 1692

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Envelope; FPV

<400> 76

atgaacactc aaatcctggt tttcgccctt gtggcagtca tccccacaaa tgcagacaaa	60
atgtgtcttg gacatcatgc tgtatcaaat ggcaccaaag taaacacact cactgagaga	120
ggagtagaag ttgtcaatgc aacggaaaca gtggagcgga caaacatccc caaaatttgc	180
tcaaaggga aaagaaccac tgatcttggc caatgctggc tgttagggac cattaccgga	240
ccacctcaat gcgaccaatt tctagaattt tcagctgac taataatcga gagacgagaa	300
ggaaatgatg tttgttacc ggggaagttt gttaatgaag aggcatctgc acaaatcctc	360
agaggatcag gtgggattga caaagaaaca atgggattca catatagtgg aataaggacc	420
aacggaacaa ctagtcatg tagaagatca ggtcttcat tctatgcaga aatggagtgg	480
ctcctgtcaa atacagacaa tgctgctttc ccacaaatga caaaatcata caaaaacaca	540
aggagagaat cagctctgat agtctgggga atccaccatt caggatcaac caccgaacag	600
accaaactat atgggagtgg aaataaactg ataacagtgc ggagtccaa atatcatcaa	660
tcttttgtgc cgagtccagg aacacgaccg cagataaatg gccagtccgg acggattgat	720
tttcattggt tgatcttggga tccaatgat acagttactt ttagtttcaa tggggctttc	780
atagctccaa atcgtgccag cttcttgagg ggaaagtcca tggggatcca gagcgatgtg	840
caggttgatg ccaattgcga aggggaatgc taccacagtg gagggactat aacaagcaga	900
ttgccttttc aaaacatcaa tagcagagca gttggcaaat gcccaagata tgtaaaacag	960
gaaagtttat tattggcaac tgggatgaag aacgttcccg aaccttccaa aaaaaggaaa	1020
aaaagaggcc tgtttggcgc tatagcaggg ttattgaaa atggttggga aggtctggtc	1080
gacgggtggt acggtttcag gcatcagaat gcacaaggag aaggaactgc agcagactac	1140
aaaagcacc aatcggcaat tgatcagata accgaaaagt taaatagact cattgagaaa	1200
accaaccagc aatttgagct aatagataat gaattcactg aggtggaaaa gcagattggc	1260
aatttaatta actggaccaa agactccatc acagaagtat ggtcttaca tgctgaactt	1320
cttgtggcaa tggaaaacca gcacactatt gatttggctg attcagagat gaacaagctg	1380
tatgagcgag tgaggaaaca attaagggaa aatgctgaag aggatggcac tggttgcttt	1440
gaaattttc ataatgtga cgatgattgt atggctagta taaggaacaa tacttatgat	1500
cacagcaaat acagagaaga agcgatgcaa aatagaatac aaattgacc agtcaaattg	1560
agtagtggt acaaagatgt gatactttgg ttagcttcg gggcatcatg ctttttgctt	1620
cttgccattg caatgggct tgttttcata tgtgtgaaga acggaacat gcggtgcact	1680

atttgatat aa 1692
 <210> 77
 <211> 1266
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Envelope; RRV
 <400> 77
 agtgtaacag agcactttaa tgtgtataag gctactagac catacctagc acattgcgcc 60
 gattgcgggg acgggtactt ctgctatagc ccagttgcta tcgaggagat ccgagatgag 120
 gcgtctgatg gcatgcttaa gatccaagtc tccgccaaa taggtctgga caaggcaggc 180

 acccacgccc acacgaagct ccgatatatg gctggctcatg atgttcagga atctaagaga 240
 gattccttga ggggtgtacac gtccgcagcg tctccatac atgggacgat gggacacttc 300
 atcgtcgcac actgtccacc aggcgactac ctcaagttt cgttcgagga cgcagattcg 360
 cacgtgaagg catgtaaggt ccaatacaag cacaatccat tgccgggtggg tagagagaag 420
 ttcgtggtta gaccacactt tggcgtagag ctgccatgca cctcatacca gctgacaacg 480
 gctcccaccg acgaggagat tgacatgcat acaccgccag atataccgga tcgcaccctg 540
 ctatcacaga cggcgggcaa cgtcaaaaata acagcaggcg gcaggactat caggtacaac 600

 tgtacctgcg gccgtgacaa cgtaggcact accagtactg acaagacat caacacatgc 660
 aagattgacc aatgccatgc tgccgtcacc agccatgaca aatggcaatt tacctctcca 720
 tttgttccca gggctgatca gacagctagg aaaggcaagg tacacgttcc gttccctctg 780
 actaacgtca cctgccgagt gccgttggct cgagcgcggg atgccaccta tggtagaag 840
 gaggtgacc tgagattaca cccagatcat ccgacgtct tctcctatag gaggtttagga 900
 gccgaaccgc acccgtacga ggaatgggtt gacaagtct ctgagcgcac catcccagtg 960
 acggaagaag ggattgagta ccagtggggc aacaaccgc cggctctgct gtgggcgcaa 1020

 ctgacgaccg agggcaaacc ccatggctgg ccacatgaaa tcattcagta ctattatgga 1080
 ctataccccg ccgccactat tgccgcagta tccggggcga gtctgatggc cctcctaact 1140
 ctggcggcca catgctgcat gctggccacc gcgaggagaa agtgcctaac accgtacgcc 1200
 ctgacgccag gagcgggtgt accgttgaca ctggggctgc tttgctgcg accgaggcg 1260
 aatgca 1266
 <210> 78
 <211> 1266
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Envelope; RRV

<400> 78

agtgtaacag agcactttaa tgtgtataag gctactagac catacctagc acattgcgcc 60
 gattgcgggg acgggtactt ctgctatagc ccagttgcta tcgaggagat ccgagatgag 120
 gcgtctgatg gcatgcttaa gatecaagtc tccgcccaaa taggtctgga caaggcaggc 180
 acccacgccc acacgaagct ccgatatatg gctggtcacg atgttcagga atctaagaga 240
 gattccttga ggggtgtacac gtccgcagcg tctccatac atgggacgat gggacacttc 300
 atcgtcgcac actgtccacc aggcgactac ctcaagttt cgttcgagga cgcagattcg 360
 cacgtgaagg catgtaaggt ccaatacaag cacaatccat tgccggtggg tagagagaag 420

ttcgtggtta gaccacactt tggcgtagag ctgccatgca cctcatacca getgacaacg 480
 gctcccaccg acgaggagat tgacatgcat acaccgccag atataccgga tcgcaccctg 540
 ctatcacaga cggcgggcaa cgtcaaaata acagcaggcg gcaggactat caggtacaac 600
 tgtacctgcg gccgtgacaa cgtaggcaact accagtactg acaagacat caacacatgc 660
 aagattgacc aatgccatgc tgccgtcacc agccatgaca aatggcaatt tacctctcca 720
 tttgttccca gggctgatca gacagctagg aaaggcaagg tacacgttcc gttccctctg 780
 actaacgtca ctgcccaggt gccgttggtc cgagcggccg atgccaccta tggtaagaag 840

gaggtgacce tgagattaca cccagatcat ccgacgctct tctcctatag gagtttagga 900
 gccgaaccgc acccgtacga ggaatgggtt gacaagtctc ctgagcgcac catcccagtg 960
 acggaagaag ggattgagta ccagtggggc aacaaccgc cggctcgcct gtgggcgcaa 1020
 ctgacgaccg agggcaaac ccattggctgg cccatgaaa tcattcagta ctattatgga 1080
 ctataccccg ccgccaactat tgccgcagta tccggggcga gtctgatgac cctcctaact 1140
 ctggcggcca catgctgcat gctggccacc gcgaggagaa agtgcctaac accgtacgcc 1200
 ctgacgccag gagcgggtgt accgttgaca ctggggctgc tttgctgcgc accgagggcg 1260

aatgca 1266

<210> 79

<211> 2030

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Envelope; Ebola

<400> 79

atgggtgtta caggaatatt gcagttacct cgtgatcgat tcaagaggac atcattcttt 60
 ctttgggtaa ttatcctttt ccaaagaaca ttttccatcc cacttggagt catccacaat 120
 agcacattac aggttagtga tgtcgacaaa ctggtttgcc gtgacaaaact gfcacccaca 180
 aatcaattga gatcagttgg actgaatctc gaagggaatg gagtggcaac tgacgtgcca 240

 tctgcaacta aaagatgggg cttcaggtcc ggtgtccac caaagtggt caattatgaa 300
 gctggtgaat ggctgaaaa ctgctacaat cttgaaatca aaaaacctga cgggagtgag 360
 tgtctaccag cagcgcaga cgggattcgg ggcttcccc ggtgccgta tgtgcacaaa 420
 gtatcaggaa cgggaccgtg tgccggagac tttgccttc acaaagaggg tgctttcttc 480
 ctgtatgacc gacttgcttc cacagttatc taccgaggaa cgactttcgc tgaaggtgtc 540
 gttgcatttc tgatactgcc ccaagctaag aaggacttct tcagctcaca ccccttgaga 600
 gagccggtca atgcaacgga ggaccctct agtggctact attctaccac aattagatat 660

 caagctaccg gttttggaac caatgagaca gagtatttgt tcgaggttga caattgacc 720
 tacgtccaac ttgaatcaag attcacacca cagtttctgc tccagctgaa tgagacaata 780
 tatacaagtg ggaaaaggag caataccacg ggaaaactaa tttggaaggt caaccccga 840
 attgatacaa caatcgggga gtgggccttc tgggaaacta aaaaacctc actagaaaa 900
 ttcgcagtga agagtgtct ttcacagctg tatcaaacag agccaaaaac atcagtgttc 960
 agagtccgga gcaacttct tccgaccag ggaccaacac aacaactgaa gaccacaaaa 1020
 tcatggcttc agaaaattcc tctgcaatgg ttcaagtga cagtcaagga agggaagctg 1080

 cagtgtcgca tctgacaacc cttgccacaa tctccacgag tctcaacce cccacaacca 1140
 aaccaggtcc ggacaacagc acccacaata caccctgta taaacttgac atctctgagg 1200
 caactcaagt tgaacaacat caccgcagaa cagacaacga cagcacagcc tccgacactc 1260
 cccccccac gaccgcagcc ggaccctaa aagcagagaa caccaacacg agcaagggtg 1320
 ccgacctct ggaccccccc accacaacaa gtccccaaaa ccacagcgag accgctggca 1380
 acaacaacac tcataccaa gataccggag aagagagtgc cagcagcggg aagctaggct 1440
 taattaccaa tactattgct ggagtcgcag gactgatcac aggcgggagg agagctcgaa 1500

 gagaagcaat tgtcaatgct caacccaaat gcaaccctaa tttacattac tggactactc 1560
 aggatgaagg tctgcaatc ggactggcct ggataccata tttcgggcca gcagccgagg 1620
 gaatttcat agaggggctg atgcacaatc aagatggttt aatctgtggg ttgagacagc 1680
 tggccaacga gacgactcaa gctcttcaac tgttctgag agccacaacc gagctacgca 1740
 ccttttcaat cctcaaccgt aaggcaattg atttcttct gcagcgatgg ggccgcat 1800
 gccacat ttttggaccggac tgctgtatcg aaccacatga ttggaccaag aacataacag 1860

acaaaattga tcagattatt catgattttg ttgataaac ccttccggac cagggggaca 1920

atgacaattg gtggacagga tggagacaat ggataccggc aggtattgga gttacaggcg 1980

ttataattgc agttatcgct ttattctgta tatgcaaatt tgtcttttag 2030

<210> 80

<211> 389

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Short WPRE sequence

<400> 80

aatcaacctc tggattacaa aatttgtgaa agattgactg atattcttaa ctatgttgct 60

ccttttacgc tgtgtggata tgctgcttta atgctctgt atcatgctat tgcttcccg 120

acggctttcg ttttctctc cttgataaaa tcttgggtgc tgtctcttta tgaggagttg 180

tggcccgttg tccgtcaacg tggcgtggtg tgctctgtgt ttgctgacgc aacccccact 240

ggctggggca ttgccaccac ctgtcaactc ctttctggga ctttcgcttt ccccccccg 300

atgccaccgg cagaactcat cgccgcctgc cttgcccgct gctggacagg ggctaggttg 360

ctgggcactg ataattccgt ggtgttgc 389

<210> 81

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 81

taagcagaat tcatgaattt gccaggaaga t 31

<210> 82

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 82

ccatacaatg aatggacact aggcggccgc acgaat 36

<210> 83

<211> 2745

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Gag, Pol, Integrase fragment

<400> 83

```

gaattcatga atttccagg aagatgaaa ccaaaaatga tagggggaat tggaggtttt      60
atcaaagtaa gacagtatga tcagatactc atagaaatct gcggacataa agctataggt      120
acagtattag taggacctac acctgtcaac ataattggaa gaaatctgtt gactcagatt      180

ggctgcactt taaatthtcc cattagtctt attgagactg taccagtaaa attaaagcca      240
ggaatggatg gcccaaaagt taaacaatgg ccattgacag aagaaaaaat aaaagcatta      300
gtagaaatth gtacagaaat ggaaaaggaa gaaaaaatth caaaaattgg gcctgaaat      360
ccatacaata ctccagtatt tgccataaag aaaaaagaca gtactaaatg gagaaaatta      420
gtagatttca gagaacttaa taagagaact caagatttct gggaagttca attaggaata      480
ccacatcctg cagggttaaa acagaaaaaa tcagtaacag tactggatgt gggcgatgca      540
tatttttcag ttcccttaga taaagacttc aggaagtata ctgcatttac catacctagt      600

ataaacaatg agacaccagg gattagatat cagtacaatg tgcttcaca gggatggaaa      660
ggatcaccag caatattcca gtgtagcatg acaaaaatct tagagccttt tagaaaacaa      720
aatccagaca tagtcatcta tcaatacatg gatgatttgt atgtaggatc tgacttagaa      780
atagggcagc atagaacaaa aatagaggaa ctgagacaac atctgttgag gtggggattt      840
accacaccag acaaaaaaca tcagaaagaa cctccattcc tttggatggg ttatgaactc      900
catcctgata aatggacagt acagcctata gtgctgccag aaaaggacag ctggactgtc      960
aatgacatac agaaattagt gggaaaattg aattgggcaa gtcagattta tgcagggatt      1020

aaagtaagge aattatgtaa acttcttagg ggaaccaaaag cactaacaga agtagtacca      1080
ctaacagaag aagcagagct agaactggca gaaaacaggg agattctaaa agaaccggta      1140
catggagtgt attatgacc atcaaaagac ttaatagcag aaatacagaa gcaggggcaa      1200
ggccaatgga catatcaaat ttatcaagag ccatttaaaa atctgaaaac aggaaagtat      1260
gcaagaatga agggtgccca cactaatgat gtgaaacaat taacagaggc agtacaacaaa      1320
atagccacag aaagcatagt aatatgggga aagactccta aatttaaat accatacaa      1380
aaggaaacat gggaagcatg gtggacagag tattggcaag ccacctggat tctgagtgg      1440

gagtttgta ataccctcc cttagtgaag ttatggtacc agttagagaa agaaccata      1500
ataggagcag aaactttcta tgtagatggg gcagccaata gggaaactaa attagaaaaa      1560
gcaggatatg taactgacag aggaagacaa aaagttgtcc ccctaacgga cacaacaat      1620

```

cagaagactg agttacaagc aattcatctc gctttgcagg attcgggatt agaagtaaac 1680
atagtacag actcacaata tgcattggga atcattcaag cacaaccaga taagagtgaa 1740
tcagagttag tcagtcaaat aatagagcag ttaataaaaa aggaaaaagt ctacctggca 1800
tgggtaccag cacacaaagg aattggagga aatgaacaag tagataaatt ggtcagtgct 1860

ggaatcagga aagtactatt tttagatgga atagataagg cccaagaaga acatgagaaa 1920
tatcacagta attggagagc aatggctagt gattttaacc taccacctgt agtagcaaaa 1980
gaaatagtag ccagctgtga taaatgtcag ctaaaagggg aagccatgca tggacaagta 2040
gactgtagcc caggaatatg gcagctagat tgtacacatt tagaaggaaa agttatcttg 2100
gtagcagttc atgtagccag tggatatata gaagcagaag taattccagc agagacaggg 2160
caagaaacag catacttctt cttaaaatta gcaggaagat ggccagtaaa aacagtacat 2220
acagacaatg gcagcaatct caccagtact acagttaagg cgcctgttg gtgggcgggg 2280

atcaagcagg aatttggcat tcctacaat ccccaaagtc aaggagtaat agaatctatg 2340
aataaagaat taaagaaat tataggacag gtaagagatc aggctgaaca tcttaagaca 2400
gcagtacaaa tggcagtatt catccacaat tttaaaagaa aaggggggat tgggggtac 2460
agtgccaggg aaagaatagt agacataata gcaacagaca taaaactaa agaattaca 2520
aaacaaatta caaaaattca aaattttcgg gtttattaca gggacagcag agatccagtt 2580
tggaaaggac cagcaaaagt cctctggaaa ggtgaagggg cagtagtaat acaagataat 2640
agtgacataa aagtagtgcc aagaagaaaa gcaagatca tcagggatta tggaaaacag 2700

atggcaggtg atgatttgtt ggcaagtaga caggatgagg attaa 2745

<210> 84
<211> 1586
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> DNA Fragment containing Rev, RRE and rabbit beta globin poly A
<400> 84

tctagaatgg caggaagaag cggagacagc gacgaagagc tcatcagaac agtcagactc 60
atcaagcttc tctatcaaaag caaccacact cccaatcccg aggggaccg acaggcccga 120
aggaatagaa gaagaagggtg gagagagaga cagagacaga tccattcgat tagtgaacgg 180
atccttggca cttatctggg acgatctgag gagcctgtgc ctcttcagct accaccgctt 240

gagagactta ctcttgattg taacgaggat tgtggaactt ctgggacgca gggggtggga 300
agccctcaaa tattggtgga atctcctaca atattggagt caggagctaa agaatagagg 360

agctttgttc ctigggttct tgggagcagc aggaagcact atgggcgcag cgtcaatgac 420
 gctgacggta caggccagac aattattgtc tggatatagtg cagcagcaga acaatttgct 480
 gagggctatt gaggcgcaac agcatctgtt gcaactcaca gtctggggca tcaagcagct 540
 ccaggcaaga atcctggctg tggaaagata cctaaaggat caacagctcc tagatctttt 600
 tcctctgccc aaaaattatg gggacatcat gaagcccctt gagcatctga cttctggcta 660

 ataaaggaaa tttattttca ttgcaatagt gtgttggaaat tttttgtgtc tetcaactcgg 720
 aaggacatat gggagggcaa atcatttaa acatcagaat gagtatttgg tttagagttt 780
 ggcaacatat gccatatgct ggctgccatg aacaaagggtg gctataaaga ggtcatcagt 840
 atatgaaca gccccctgct gtccattcct tattccatag aaaagccttg acttgaggtt 900
 agattttttt tatattttgt tttgtgttat tttttcttt aacatcccta aaattttcct 960
 tacatgtttt actagccaga ttttctctcc tctctgact actcccagtc atagctgtcc 1020
 ctcttctctt atgaagatcc ctcgacctgc agcccaagct tggcgtaatc atggcatag 1080

 ctgtttctctg tgtgaaattg ttatccgctc acaattccac acaacatacg agccggaagc 1140
 ataaagtgtg aagcctgggg tgcctaatga gtgagctaac tcacattaat tgcgttgcgc 1200
 tcaactgccc ctttccagtc gggaaacctg tcgtgccagc ggatccgcat ctcaattagt 1260
 cagcaacat agtcccgcct ctaactccgc ccactcccgc cctaactccg cccagttccg 1320
 cccattctcc gccccatggc tgactaattt tttttattta tgcagaggcc gaggeccgct 1380
 cggcctctga gctattccag aagtagtgag gaggcttttt tggaggccta ggcttttgca 1440
 aaaagctaac ttgtttatg cagcttataa tggttacaaa taaagcaata gcatcacaaa 1500

 tttcacaat aaagcatttt tttcactgca ttctagtgtt ggtttgtcca aactcatcaa 1560
 tgtatcttat cagcggccgc cccggg 1586

 <210> 85
 <211> 1614
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> DNA fragment containing the CAG enhancer/promoter/intron sequence
 <400> 85

 acgcgttagt tattaatagt aatcaattac ggggtcatta gttcatagcc catatatgga 60
 gttccgcgtt acataactta cggtaaatgg cccgcctggc tgaccgccca acgacccccg 120
 cccattgacg tcaataatga cgtatgttcc catagtaacg ccaataggga ctttccattg 180

 acgtcaatgg gtggactatt tacggtaaac tgcccacttg gcagtacatc aagtgtatca 240

tatgccaagt acgcccccta ttgacgtcaa tgacggtaaa tggccccct ggcatatgc 300
ccagtacatg accttatggg actttcctac ttggcagtac atctacgtat tagtcatcgc 360
tattaccatg ggtcagagtg agccccacgt tctgcttcac tctccccatc tccccccct 420
ccccacccc aattttgtat ttatttattt ttttaattatt ttgtgcagcg atgggggcgg 480
gggggggggg ggcgcgcgcc aggcggggcg ggcggggcg aggggcgggg cggggcgagg 540
cggagaggtg cggcggcagc caatcagagc ggcgcgctcc gaaagtttcc ttttatggcg 600

aggcggcggc ggcggcggcc ctataaaaag cgaagcgcgc ggcgggcggg agtcgctgcg 660
ttgccttcgc cccgtgcccc gctccgcgcc gcctcgcgcc gcccccccg gctctgactg 720
accgcgttac tcccacaggt gagcgggcgg gacggccctt ctctccggg ctgtaattag 780
cgcttggttt aatgacggct cgtttctttt ctgtggctgc gtgaaagcct taaaggctc 840
cgggagggcc ctttgtgcgg gggggagcgg ctcggggggt gcgtcgtgt gtgtgtcgt 900
ggggagcggc gcgtgcggcc cgcgctgcc ggcggctgtg agcgtgcgg gcgcggcgcg 960
gggctttgtg cgctccgct gtgcgcgagg ggagcgcggc cgggggcggg gcccccggt 1020

gcgggggggc tgcgaggga acaaaggctg cgtcgggggt gtgtcgtgg gggggtgagc 1080
agggggtgtg ggcgcggcgg tcgggctgta accccccct gcacccccct ccccgagttg 1140
ctgagcacgg cccggcttcg ggtgcggggc tccgtgcggg gcgtggcgcg gggctcgcg 1200
tgccggcgg ggggtggcgg caggtggggg tgccggcgg ggcggggcgg cctcgggccc 1260
gggagggtc gggggagggg cgcggcggcc ccggagcgc ggcggctgtc gaggcgcggc 1320
gagccgcagc cattgccttt tatgtaatc gtgcgagagg gcgcaggac ttctttgtc 1380
ccaaatctgg cggagccgaa atctgggagg cgccgccga cccctctag cgggcgcggg 1440

cgaagcggg cgcgcggc aggaaggaaa tggcgggga ggccttcgt gcgtcggc 1500
gccgcgtcc cttctccat ctccagctc ggggctgcc cagggggagc getgccttcg 1560
ggggggacgg ggcagggcgg ggttcggctt ctggcgtgtg accggcggga atc 1614

<210> 86
<211> 1531
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> DNA fragment containing VSV-G
<400> 86

gaattcatga agtgcctttt gtacttagcc tttttattca ttggggtgaa ttgcaagttc 60
accatagttt ttccacacaa ccaaaaagga aactggaaaa atgttccttc taattacat 120

tattgcccg t caagctcaga tttaaattgg cataatgact taataggcac agccttacia 180
gtcaaaatgc ccaagagtca caaggctatt caagcagacg gttggatgtg tcatgcttcc 240
aaatgggtca ctacttgtga tttccgctgg tatggaccga agtatataac acattccatc 300
cgatccttca ctccatctgt agaacaatgc aaggaaagca ttgaacaaac gaacaagga 360
acttggtga atccaggctt ccctcctcaa agttgtggat atgcaactgt gacggatgcc 420
gaagcagtga ttgtccaggt gactcctcac catgtgctgg ttgatgaata cacaggagaa 480
tgggttgatt cacagttcat caacggaaaa tgcagcaatt acatatgccc cactgtccat 540

aactctacia cctggcattc tgactataag gtcaaagggc tatgtgattc taacctcatt 600
tccatggaca tcaccttctt ctcaaggac ggagagctat catccctggg aaaggagggc 660
acagggttca gaagtaacta ctttgcttat gaaactggag gcaaggcctg caaaatgcaa 720
tactgcaagc attggggagt cagactccca tcaggtgtct ggttcgagat ggctgataag 780
gatctctttg ctgcagccag attccctgaa tgcccagaag ggtcaagtat ctctgctcca 840
tctcagacct cagtggatgt aagtctaatt caggacgttg agaggatctt ggattattcc 900
ctctgccaag aaacctggag caaaatcaga gcgggtcttc caatctctcc agtggatctc 960

agctatcttg ctctaataaa cccaggaacc ggtcctgctt tcaccataat caatggtacc 1020
ctaaaatact ttgagaccag atacatcaga gtcgatattg ctgctccaat cctctcaaga 1080
atggtcggaa tgatcagtgg aactaccaca gaaagggaac tgtgggatga ctgggcacca 1140
tatgaagacg tggaaattgg acccaatgga gttctgagga ccagttcagg atataagttt 1200
cctttataca tgattggaca tggatgttg gactccgac ttcattcttag ctcaaaggct 1260
caggtgttcg aacatcctca cattcaagac gctgcttcgc aacttctga tgatgagagt 1320
ttatTTTTTg gtgatactgg gctatccaaa aatccaatcg agctttaga aggttggttc 1380

agtagttgga aaagctctat tgctctttt ttctttatca taggttaat cattggacta 1440
ttcttggttc tccagattgg tatccatctt tgcattaat taaagcacac caagaaaaga 1500
cagatttata cagacataga gatgagaatt c 1531

<210> 87
<211> 1227
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Helper plasmid containing RRE and rabbit beta globin poly A
<400> 87

tctagaagga gctttgttcc ttgggttctt gggagcagca ggaagcacta tgggcgcagc 60

gtcaatgacg ctgacgggtac aggccagaca attattgtct ggtatagtgc agcagcagaa 120

caatttgctg agggctattg aggcgcaaca gcatctgttg caactcacag tctggggcat 180

caagcagctc caggcaagaa tcctggctgt ggaagatac ctaaaggatc aacagctcct 240

agatcttttt ccctctgcca aaaattatgg ggacatcatg aagccccttg agcatctgac 300

ttctggctaa taaaggaat ttattttcat tgcaatagtg tgttgaatt ttttgtgtct 360

ctcactcgga aggacatatg ggagggcaaa tcatttaaaa catcagaatg agtatttggg 420

ttagagtttg gcaacatatg ccatatgctg gctgcatga acaaaggagg ctataagag 480

gtcatcagta tatgaaacag cccctgctg tccattcctt attccataga aaagccttga 540

cttgaggtta gatttttttt atattttgtt ttgtgttatt ttttcttta acatccctaa 600

aattttcctt acatgtttta ctageccagat ttttctcct ctctgacta ctcccagtca 660

tagctgtccc ttttctetta tgaagatecc tgcacctgca gccaagctt ggcgtaatea 720

tggatcatagc tgtttcctgt gtgaaattgt tatccgctca caattccaca caacatagca 780

gccggaagca taaagtgtaa agcctggggg gcctaagtag tgagctaact cacattaatt 840

gcgttgcgct cactgcccgc tttccagtcg ggaacctgt cgtgccagcg gatccgcac 900

tcaattagtc agcaaccata gtcccgcctt taactccgc catcccgcct ctaactccgc 960

ccagttccgc ccattctccg ccccatggct gactaatttt ttttatttat gcagaggccg 1020

aggccgcctc ggctctgag ctattccaga agtagtgagg aggctttttt ggaggcctag 1080

gcttttgcga aaagctaact tgtttattgc agcttataat ggttacaat aaagcaatag 1140

catcacaat ttcaacaata aagcattttt ttcactgcat tctagtttg gtttgcctaa 1200

actcatcaat gtatcttacc acccggg 1227

<210> 88

<211> 884

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> RSV promoter and HIV Rev

<400

> 88

caattgcgat gtacgggcca gatatacgcg tatctgaggg gactagggtg tgtttaggcg 60

aaaagcgggg cticggttgt acgcggttag gactccctc aggatatagt agtttcgctt 120

ttgcataggg agggggaaat gtagtcttat gcaatacact ttagtctttg caacatggta 180

acgatgagtt agcaacatgc cttacaagga gagaaaaagc accgtgcatg ccgattgggtg 240

gaagtaaggt ggtacgatcg tgccttatta ggaaggcaac agacaggtct gacatggatt 300

ggacgaacca ctgaattccg cattgcagag ataattgtat ttaagtgcct agctcgatac 360
aataaacgcc attgacatc tcaccacatt ggtgtgcacc tccaagctcg agctcgttta 420

gtgaaccgtc agatcgctg gagacgceat ccacgctggt ttgacctcca tagaagacac 480
cgggaccgat ccagcctccc ctggaagcta gcgattaggc atctcctatg gcaggaagaa 540
gctggagacag cgacgaagaa ctctcaagg cagtcagact catcaagttt ctctatcaa 600
gcaaccacc tccaatccc gaggggacc gacaggcccg aaggaataga agaagaaggt 660
ggagagagag acagagacag atccattcga ttagtgaacg gatccttagc acttatctgg 720
gacgatctgc ggagcctgtg cctcttcagc taccaccgct tgagagactt actcttgatt 780
gtaacgagga ttgtggaact tctgggacgc agggggtggg aagccctcaa atattggtgg 840

aatctctac aatattggag tcaggagcta aagaatagtc taga 884

<210> 89
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Target sequence
<400> 89
atggcaggaa gaagcggag 19

<210> 90
<211> 52
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> shRNA sequence
<400> 90
atggcaggaa gaagcggagt tcaagagact cgcttcttc ctgccatttt tt 52

<210> 91
<211> 279
<212> DNA

<213> Artificial Sequence
<220><223> H1 promoter and shRT sequence
<400> 91
gaacgctgac gtcatcaacc cgctccaagg aatcgcgggc ccagtgtcac taggcgggaa 60
caccagcgc gcgtgcgcc tggcaggaag atggctgtga gggacagggg agtggcgccc 120

tgcaatattt gcatgtcgct atgtgttctg ggaatcacc ataacgtga aatgtctttg 180
gatttgggaa tcttataagt tctgtatgag accacttga tccgcggaga cagcgacgaa 240
gagcttcaag agagctcttc gtcgtgtct cgcgttttt 279

<210> 92
<211> 275

<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> H1 CCR5 sequence

<400> 92
gaacgctgac gtcatcaacc cgctccaagg aatcgcgggc ccagtgtcac taggcgggaa 60
caccagcgc gcgtgcgcc tggcaggaag atggctgtga gggacagggg agtggcgccc 120
tgcaatattt gcatgtcgct atgtgttctg ggaatcacc ataacgtga aatgtctttg 180
gatttgggaa tcttataagt tctgtatgag accacttga tccgtgtcaa gtccaatcta 240
tgttcaagag acatagattg gacttgacac ttttt 275

<210> 93
<211> 20

<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> CCR5 Forward Primer

<400> 93
aggaattgat ggcgagaagg 20

<210> 94
<211> 24

<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> CCR5 Reverse Primer

<400> 94
ccccaaagaa ggtcaagta atca 24

<210> 95
<211> 18

<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Actin Forward Primer

<400> 95	
agcgcggcta cagcttca	18
<210> 96	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Actin Reverse Primer	
<400> 96	
ggcgacgtag cacagcttct	20
<210> 97	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> AGT103 CCR5 miR30	
<400> 97	
tgtaaactga gcttgctcta	20
<210> 98	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> AGT103-R5-1	
<400> 98	
tgtaaactga gcttgctcgc	20
<210> 99	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> AGT103-R5-2	
<400> 99	
catagattgg acttgacac	19
<210> 100	
<211> 642	
<212> DNA	

<213> Artificial Sequence

<220><223> CAG promoter

<400> 100

tagttattaa tagtaatcaa ttacggggtc attagttcat agcccatata tggagttccg 60

cgttacataa cttacggtaa atggcccgcc tggctgaccg cccaacgacc ccgcccatt 120

gacgtcaata atgacgtatg ttcccatagt aacgccaata gggactttcc attgacgtca 180

atgggtggac tatttacggt aaactgcca cttggcagta catcaagtgt atcatatgcc 240

aagtacgcc cctattgacg tcaatgacgg taaatggccc gcctggcatt atgccagta 300

catgacctta tgggactttc ctacttggca gtacatctac gtattagtca tcgctattac 360

catgggtcga ggtgagcccc acgttctgct tcaactctcc catctcccc cctccccac 420

ccccaatfff gtatttattt attttttaat tttttgtgc agcgatgggg gcgggggggg 480

ggggggcgcg cgccaggcgg ggcggggcgg ggcgaggggc ggggcggggc gaggcggaga 540

ggtgcggcgg cagccaatca gagcggcgcg ctccgaaagt ttccttttat ggcgagggcg 600

cgcgggcgge ggcctataa aaagcgaagc gcgcggcggg cg 642

<210> 101

<211> 217

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> H1 element

<400> 101

gaacgctgac gtcatcaacc cgctccaagg aatcgcgggc ccagtgctac taggcgggaa 60

caccagcgc gcgtgcgcc tggcaggaag atggctgtga gggacagggg agtggcgccc 120

tgcaatattt gcatgtcgt atgtgttctg ggaatcacc ataacgtga aatgtctttg 180

gatttgggaa tcttataagt tctgtatgag accactt 217

<210> 102

<211> 250

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 3' delta LTR

<400> 102

tggaaggct aattcactcc caacgaagat aagatctgct ttttgccttg actgggtctc 60

tctggttaga ccagatctga gcctgggagc tctctggcta actaggaac cactgctta 120

agcctcaata aagcttgect tgagtgcttc aagtagtg tgcccgctctg ttgttgact 180
 ctggtaacta gagatccctc agaccctttt agtcagtg gaaaatctct agcagtagta 240

gttcatgtca 250

<210> 103

<211> 243

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 7SK promoter

<400> 103

ctgcagtatt tagcatgccc caccatctg caaggcattc tggatagtgt caaacagcc 60
 ggaaatcaag tccgtttatc tcaaacttta gcattttggg aataaatgat atttgctatg 120
 ctggttaaat tagatcttag ttaaatttcc tgcgaagct ctagtacgat aagcaacttg 180
 acctaagtgt aaagttgaga tttccttcag gtttatatag cttgtgcgcc gcctggctac 240

ctc 243

<210> 104

<211> 132

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> miR155 Tat

<400> 104

ctggaggctt gctgaaggct gtatgctgtc cgcttcttcc tgccataggg ttttggccac 60
 tgactgacct tatggggaag aagcggacag gacacaagge ctgttactag cactcacatg 120
 gaacaaatgg cc 132