

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7153332号
(P7153332)

(45)発行日 令和4年10月14日(2022.10.14)

(24)登録日 令和4年10月5日(2022.10.5)

(51)国際特許分類

F I

C 1 2 N 5/10 (2006.01)

C 1 2 N 5/10

Z N A

C 1 2 N 15/113 (2010.01)

C 1 2 N 15/113

1 0 2 Z

A 6 1 K 35/15 (2015.01)

C 1 2 N 15/113

1 4 0 Z

A 6 1 K 48/00 (2006.01)

A 6 1 K 35/15

Z

A 6 1 K 31/7105(2006.01)

A 6 1 K 48/00

請求項の数 22 (全163頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2018-541270(P2018-541270)

(86)(22)出願日 平成29年1月11日(2017.1.11)

(65)公表番号 特表2019-509029(P2019-509029
A)

(43)公表日 平成31年4月4日(2019.4.4)

(86)国際出願番号 PCT/US2017/013024

(87)国際公開番号 WO2017/139065

(87)国際公開日 平成29年8月17日(2017.8.17)

審査請求日 令和2年1月9日(2020.1.9)

(31)優先権主張番号 62/292,748

(32)優先日 平成28年2月8日(2016.2.8)

(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

前置審査

(73)特許権者 517428713

アメリカン ジーン テクノロジーズ イ
ンターナショナル インコーポレイテッド
アメリカ合衆国 メリーランド 2085
0, ロックビル, キー ウェスト アベ
ニュー 9713, フィフス フロア

(74)代理人 100078282

弁理士 山本 秀策

(74)代理人 100113413

弁理士 森下 夏樹

(74)代理人 100181674

弁理士 飯田 貴敏

(74)代理人 100181641

弁理士 石川 大輔

(74)代理人 230113332

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 HIVワクチン接種および免疫療法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

HIV感染に耐性の細胞を産生するための ex vivo の方法であって、

(a) HIV陰性の対象から単離された末梢血単核細胞(PBMC)を、治療有効量の刺激性作用剤と接触させるステップであって、前記接触が ex vivo で実施され、前記刺激性作用剤が、免疫応答を刺激することができるペプチドまたはペプチド混合物を含む、ステップ；

(b) ex vivo において、少なくとも1つの遺伝的エレメントをコードするウイルス送達システムを用いて前記PBMCに形質導入するステップであって、前記少なくとも1つのコードされる遺伝的エレメントが、

配列番号31と少なくとも90%の配列同一性を有する配列；または

配列番号2と少なくとも90%の配列同一性を含む配列、および配列番号108と少なくとも90%の配列同一性を含む配列を含む、

前記少なくとも1つの遺伝的エレメントは、発現した場合に、HIV RNA配列を標的とすることができ、および／または、ケモカイン受容体CCR5の産生を阻害することができ、前記HIV RNA配列がVif配列またはTat配列である、ステップ；および

(c) 形質導入された前記PBMCを、少なくとも1日間培養するステップを含む、方法。

【請求項2】

形質導入された前記 P B M C が、約 1 日から約 3 5 日まで培養される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記刺激性作用剤が g a g ペプチドを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

前記刺激性作用剤が H I V ワクチンを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

前記 H I V ワクチンが、M V A / H I V 6 2 B ワクチンを含む、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 6】

前記ウイルス送達システムが、レンチウイルス粒子を含む、請求項 1 に記載の方法。

10

【請求項 7】

前記少なくとも 1 つの遺伝的エレメントが、配列番号 3 1 を含む場合、前記少なくとも 1 つの遺伝的エレメントが、発現した場合にケモカイン受容体 C C R 5 の産生を阻害することもできる、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 8】

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

【請求項 9】

前記少なくとも 1 つの遺伝的エレメントが、マイクロ R N A クラスターを含む、請求項 8 に記載の方法。

20

【請求項 10】

前記マイクロ R N A クラスターが、
配列番号 3 1 ; または
配列番号 2 および配列番号 1 0 8
を含む、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】

H I V 陰性対象の H I V 感染を予防するための方法において使用するための、形質導入された末梢血単核細胞 (P B M C) を含む組成物であって、前記方法は、

(a) 前記対象から白血球を取り出すステップであって、前記対象が、治療有効量の第 1 の刺激性作用剤で免疫化されている、ステップ ;

30

(b) e x v i v o において、前記白血球から P B M C を精製するステップ ;

(c) e x v i v o において、前記 P B M C を治療有効量の第 2 の刺激性作用剤と接触させるステップ ;

(d) e x v i v o において、少なくとも 1 つの遺伝的エレメントをコードするウイルス送達システムを用いて前記 P B M C に形質導入するステップであって、前記少なくとも 1 つの遺伝的エレメントが、

配列番号 3 1 と少なくとも 9 0 % の配列同一性を有する配列 ; または
配列番号 2 と少なくとも 9 0 % の配列同一性を有する配列、および配列番号 1 0 8 と少なくとも 9 0 % の配列同一性を有する配列
を含む、

40

前記少なくとも 1 つの遺伝的エレメントは、発現した場合に、H I V R N A 配列を標的とすることができ、および / または、ケモカイン受容体 C C R 5 の産生を阻害することができ、前記 H I V R N A 配列が V i f 配列または T a t 配列である、ステップ ;

(e) 形質導入された前記 P B M C を、少なくとも 1 日間培養するステップ ; および

(f) 形質導入された前記 P B M C を前記対象に注入するステップ
を含み、前記第 1 の刺激性作用剤および前記第 2 の刺激性作用剤の少なくとも一方が、免疫応答を刺激することができるペプチドまたはペプチド混合物を含む、組成物。

【請求項 12】

形質導入された前記 P B M C が、約 1 日から約 3 5 日まで培養される、請求項 1 1 に記載の組成物。

50

【請求項 13】

前記対象がヒトである、請求項 11 または 12 に記載の組成物。

【請求項 14】

前記第 1 の刺激性作用剤および前記第 2 の刺激性作用剤の少なくとも 1 つが gap ペプチドを含む、請求項 11 に記載の組成物。

【請求項 15】

前記第 1 の刺激性作用剤および前記第 2 の刺激性作用剤の少なくとも 1 つが HIV ワクチンを含む、請求項 11 に記載の組成物。

【請求項 16】

前記 HIV ワクチンが、MVA / HIV 62B ワクチンを含む、請求項 15 に記載の組成物。

10

【請求項 17】

前記第 1 の刺激性作用剤および前記第 2 の刺激性作用剤が同じである、請求項 11 に記載の組成物。

【請求項 18】

前記ウイルス送達システムが、レンチウイルス粒子を含む、請求項 11 に記載の組成物。

【請求項 19】

前記少なくとも 1 つの遺伝的エレメントが、配列番号 31 を含み、前記少なくとも 1 つの遺伝的エレメントが、ケモカイン受容体 CCR5 の産生を阻害することができるスモール RNA も含む、請求項 11 に記載の組成物。

20

【請求項 20】

前記少なくとも 1 つの遺伝的エレメントが、マイクロ RNA または shRNA を含む、請求項 11 または 19 に記載の組成物。

【請求項 21】

前記少なくとも 1 つの遺伝的エレメントが、マイクロ RNA クラスターを含む、請求項 20 に記載の組成物。

【請求項 22】

前記マイクロ RNA クラスターが、
配列番号 31；または
配列番号 2 および配列番号 108
を含む、請求項 21 に記載の組成物。

30

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本願は、2016 年 7 月 8 日に出願され、「HIV VACCINATION AND IMMUNOTHERAPY」と題された米国仮特許出願第 62 / 292, 748 号（その開示は、参照によって本明細書に組み込まれる）に対する優先権を主張する。

【0002】

本発明は、一般に、HIV を予防するためのワクチン接種および免疫療法の分野に関する。特に、開示された予防方法は、ウイルスベクターの投与および遺伝子を送達するためのシステム、ならびに他の療法用、診断用、または研究用の使用に関する。

40

【背景技術】

【0003】

広範な実験研究および臨床研究にもかかわらず、疾患に対する持続的な防御を示す HIV ワクチンの生成は成功に至っていない。これらの研究の過程で、抗体および細胞溶解性 T 細胞応答を含む、ウイルス免疫の局面はほぼすべてが研究されており、防御のためのメカニズムに関連付けられている。防御メカニズムの幅広さは、HIV の重要な影響、および HIV が免疫システムを回避して持続感染の確立を可能にするためのメカニズムが、主にウイルス特異的 CD4 + ヘルパー T 細胞の破壊に焦点を合わせていることを示唆する。

50

【0004】

HIVに曝露されると、ウイルス特異的ヘルパーT細胞は、HIVに由来するペプチドを認識し、これらの細胞は高度に活性化され、増殖を開始する。病原体の存在に応答した活性化状態は、HIV付着および侵入に対して、CD4 T細胞を特に感受性にする。活性化されたT細胞は、感染後に最も高いレベルのウイルスを産生し、体内でのウイルス増殖および播種の主な促進因子となる。HIVが、ウイルス特異的細胞を死滅させ、その過程で宿主免疫を無効にしつつ、CD4 T細胞活性化を引き起こし、かつその応答から利益を得る能力は、重要な疾患メカニズムである。

【0005】

ワクチン接種は、疾患の大流行、汎流行、および流行を予防するための重要な公衆衛生ツールである。HIV予防ワクチンに注力する国際的努力が相当程度なされているが、この努力は、これまでのところ、集団免疫化プログラムを正当化するほど十分に強力な産物の発見に成功していない。これまでで最も成功した研究では（「Thai治験」として公知である）、複数の注射を必要とする複合ワクチンが、HIV感染に対して、あるレベルの一時的防御を提供した。このワクチンは集団使用に適切ではなかったが、臨床試験が成功したことにより、予防的HIVワクチンの生成が実現可能であることが実証された。最も重要なことには、Thai治験は、産生された抗体のタイプを含むワクチン応答の質的特徴が、産物の成功の期待内にあることを明らかにした。しかしながら、防御の持続性は、実用には短すぎた。

【0006】

ワクチン接種の背後にある概念は、宿主の免疫システムが、既に十分な数のウイルス特異的細胞、特にCD4 T細胞を有し、曝露が生じれば直ぐに応答する準備ができているため、感染性病原体に対して宿主が優位性を獲得するということである。ウイルス、この場合はHIVが、ウイルス特異的CD4 T細胞を攻撃し、そのレベルを減少させることができる場合、ワクチン接種の優位性は、急速に失われ、感染は予防されない。

【0007】

特定のウイルスエンベロープー宿主細胞受容体相互作用および遺伝子発現についてのウイルス機構の故に、標的細胞に遺伝子を形質導入するためにウイルスベクターを使用することができる。結果として、ウイルスベクターは、全T細胞または他の免疫細胞ならびに胚、受精卵、単離された組織試料、*in situ*の組織標的、および培養細胞を含む多くの異なる細胞型への遺伝子の移入のためのビヒクルとして使用されてきている。細胞内に外来遺伝子または改変遺伝子を導入および発現する能力は、遺伝子治療、誘導多能性幹細胞の体細胞再プログラミング、および様々な型の免疫療法のような療法介入に有用である。

【0008】

遺伝子治療は、ウイルスベクターの使用を含み得る新しい療法を作出する可能性を有する生物医学研究の最も成熟した領域の1つである。療法に利用可能な幅広い種類の潜在的な遺伝子を考慮すると、感染性疾患および非感染性疾患を治療する手段としての遺伝子治療の将来性を実現するためには、これらの遺伝子を送達する効率的な手段が必要である。マウスレトロウイルス、アデノウイルス、パルボウイルス（アデノ随伴ウイルス）、ワクシニアウイルス、およびヘルペスウイルスを含むいくつかのウイルスシステムが療法用遺伝子移入ベクターとして提案されている。

【0009】

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

【0010】

したがって、毒性および安全性は、対象の治療のために*in vivo*で使用されるウ

10

20

30

40

50

イルスベクターにとって克服されなければならない重要なハードルである。遺伝子送達ビヒクルまたは療法用遺伝子産物に対する宿主免疫応答に関連する問題を抱えた、ヒトにおける遺伝子治療応用の数多くの歴史的例が存在する。1つまたは複数の療法遺伝子と共にいくつかのウイルス遺伝子を同時形質導入するウイルスベクター（例えばアデノウイルス）は特に問題である。

【0011】

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

【0012】

レンチウイルスベクターの使用に関する他の重要な問題は、いくつかの細胞傷害性ウイルスタンパク質への曝露の際に起こり得る細胞病原性の問題である。特定のHIV-1タンパク質への曝露は、細胞死またはT細胞における機能不応答性を誘導するかもしれない。同様に、組換えによる複製コンピテントな毒性ウイルスを生成する可能性が、しばしば問題となる。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0013】

明らかに、当技術分野には、遺伝子治療および免疫療法によるHIVに対するワクチン防御の効力および持続性の改善が必要とされており、本開示は、免疫化を遺伝子治療剤と組み合わせ、それによりHIVに対するワクチンの防御効果を改善して、ウイルス特異的CD4⁺T細胞の急速な枯渇を防止することによって、この必要性を満たす。

【0014】

一態様では、HIV陰性対象のHIV感染を予防するための方法が開示される。方法は、有効量の第1の刺激性作用剤で対象を免疫化するステップ；対象から白血球を取り出し、末梢血単核細胞（PBMC）を得るステップを含む。方法は、*ex vivo*において、PBMCを、治療有効量の第2の刺激性作用剤と接触させるステップ；*ex vivo*において、少なくとも1つの遺伝的エレメントをコードするウイルス送達システムを用いてPBMCに形質導入するステップ；形質導入されたPBMCを適度な形質導入を保証する十分な期間にわたって培養するステップ；および形質導入されたPBMCを対象に注入するステップをさらに含む。実施形態では、形質導入されたPBMCを、約1日から約35日まで培養してもよい。対象は、ヒトであってもよい。第1および第2の刺激性作用剤は、同じであってもよく、または異なってもよい。刺激性作用剤としては、対象でのT細胞応答を刺激するのに適切な任意の作用剤を挙げることができる。実施形態では、第1および第2の刺激性作用剤の少なくとも1つは、ペプチドまたはペプチドの混合物である。実施形態では、第1および第2の刺激性作用剤の少なくとも1つは、gagペプチドを含む。また、実施形態では、第1および第2の刺激性作用剤の少なくとも1つは、ワクチンを含む。ワクチンは、HIVワクチンであってもよく、実施形態では、HIVワクチンは、MVA/HIV62Bワクチンまたはその改変体である。実施形態では、ウイルス送達システムは、レンチウイルス粒子を含む。実施形態では、少なくとも1つの遺伝的エレメントは、ケモカイン受容体CCR5の産生を阻害することができるスモールRNAを含む。さらなる実施形態では、少なくとも1つの遺伝的エレメントは、HIV RNA配列を標的とすることができる少なくとも1つのスモールRNAを含む。さらなる実施形態では、少なくとも1つの遺伝的エレメントは、ケモカイン受容体CCR5の産生を阻害することができるスモールRNA、およびHIV RNA配列を標的とすることができる少なくとも1つのスモールRNAを含んでいてもよい。HIV RNA配列は、ウイルス送

10

20

30

40

50

達システムによる標的化に適切な任意のHIV配列を含む。実施形態では、HIV RNA配列は、HIV Vif配列、HIV Tat配列、またはそれらの改変体の1つまたは複数を含む。少なくとも1つの遺伝的エレメントとしては、ウイルス送達システムにより発現され得る任意の遺伝的エレメントが挙げられる。実施形態では、少なくとも1つの遺伝的エレメントは、マイクロRNAまたはshRNAを含む。さらなる実施形態では、少なくとも1つの遺伝的エレメントは、マイクロRNAクラスターを含む。

【0015】

別の態様では、少なくとも1つの遺伝的エレメントは、

【化1】

AGGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCGACTGTAACTGAGCTTGCTCTACTGTGAAG
CCACAGATGGGTAGAGCAAGCACAGTTTACCGCTGCCTACTGCCTCGGACTTCAA
GGGGCTT (配列番号 1)

10

と少なくとも80%、または少なくとも85%、または少なくとも90%、または少なくとも95%の同一性パーセントを有するマイクロRNAを含む。好ましい実施形態では、少なくとも1つの遺伝的エレメントは、

【化2】

AGGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCGACTGTAACTGAGCTTGCTCTACTGTGAAG
CCACAGATGGGTAGAGCAAGCACAGTTTACCGCTGCCTACTGCCTCGGACTTCAA
GGGGCTT (配列番号 1)

20

を含む。

【0016】

別の態様では、少なくとも1つの遺伝的エレメントは、

【化3】

CATCTCCATGGCTGTACCACCTTGTCTGGGGGATGTGTACTTCTGAACTTGTGTTGA
ATCTCATGGAGTTCAGAAGAACACATCCGCACTGACATTTTGGTATCTTTCATCTG
ACCA (配列番号 2);

30

と少なくとも80%、もしくは少なくとも85%、もしくは少なくとも90%、もしくは少なくとも95%の同一性パーセントを有するか、または

【化4】

GGGCCTGGCTCGAGCAGGGGGCGAGGGATTCCGCTTCTTCCTGCCATAGCGTGG
TCCCCTCCCCTATGGCAGGCAGAAGCGGCACCTTCCCTCCCAATGACCGCGTCTTC
GTCG (配列番号 3)

40

と少なくとも80%、もしくは少なくとも85%、もしくは少なくとも90%、もしくは少なくとも95%の同一性パーセントを有するマイクロRNAを含む。好ましい実施形態では、少なくとも1つの遺伝的エレメントは、

【化 5】

CATCTCCATGGCTGTACCACCTTGTCTGGGGGATGTGTACTTCTGAACTTGTGTTGA
ATCTCATGGAGTTCAGAAGAACACATCCGCACTGACATTTTGGTATCTTTCATCTG
ACCA (配列番号 2); または
GGGCCTGGCTCGAGCAGGGGGCGAGGGATTCCGCTTCTTC
CTGCCATAGCGTGGTCCCCTCCCCTATGGCAGGCAGAAGCGGCACCTTCCCTCCCA
ATGACCGCGTCTTCGTCG (配列番号 3)

10

を含む。

【0017】

別の態様では、マイクロRNAクラスターは、

【化 6】

AGGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCGACTGTAACTGAGCTTGCTCTACTGTGAAG
CCACAGATGGGTAGAGCAAGCACAGTTTACCGCTGCCTACTGCCTCGGACTTCAA
GGGGCTTCCCGGGCATCTCCATGGCTGTACCACCTTGTCTGGGGGATGTGTACTTCT
GAACTTGTGTTGAATCTCATGGAGTTCAGAAGAACACATCCGCACTGACATTTTGG
TATCTTTCATCTGACCAGCTAGCGGGCCTGGCTCGAGCAGGGGGCGAGGGATTCC
GCTTCTTCCCTGCCATAGCGTGGTCCCCTCCCCTATGGCAGGCAGAAGCGGCACCTT
CCCTCCCAATGACCGCGTCTTCGTC (配列番号 31)

20

と少なくとも80%、または少なくとも85%、または少なくとも90%、または少なくとも95%の同一性パーセントを有する配列を含む。好ましい実施形態では、マイクロRNAクラスターは、

【化 7】

AGGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCGACTGTAACTGAGCTTGCTCT
ACTGTGAAGCCACAGATGGGTAGAGCAAGCACAGTTTACCGCTGCCTACTGCCTC
GGACTTCAAGGGGCTTCCCGGGCATCTCCATGGCTGTACCACCTTGTCTGGGGGATG
TGTACTTCTGAACTTGTGTTGAATCTCATGGAGTTCAGAAGAACACATCCGCACTG
ACATTTTGGTATCTTTCATCTGACCAGCTAGCGGGCCTGGCTCGAGCAGGGGGCGA
GGGATTCCGCTTCTTCCCTGCCATAGCGTGGTCCCCTCCCCTATGGCAGGCAGAAGC
GGCACCTTCCCTCCCAATGACCGCGTCTTCGTC (配列番号 31)

30

を含む。

【0018】

別の態様では、HIVに耐性の細胞を産生するための方法が提供される。方法は、HIV陰性の対象から単離された末梢血単核細胞(PBMC)を、治療有効量の刺激性作用剤と接触させるステップであって、接触が、*ex vivo*で実施されるステップ; *ex vivo*において、少なくとも1つの遺伝的エレメントをコードするウイルス送達システムを用いてPBMCに形質導入するステップ; および形質導入されたPBMCを、適度な形質導入を保証する十分な期間にわたって培養するステップを、様々に含む。実施形態では、形質導入されたPBMCを、約1日~約35日まで培養してもよい。方法は、形質導入されたPBMCを対象に注入するステップをさらに含んでもよい。対象は、ヒトであってもよい。刺激性作用剤は、ペプチドまたはペプチドの混合物を含んでもよく、実施形態では、*gag* ペプチドを含む。刺激性作用剤は、ワクチンを含んでもよい。ワ

40

50

クチンは、H I V ワクチンであってもよく、実施形態では、H I V ワクチンは、M V A / H I V 6 2 B ワクチンまたはその改変体である。実施形態では、ウイルス送達システムは、レンチウイルス粒子を含む。実施形態では、少なくとも1つの遺伝的エレメントは、ケモカイン受容体 C C R 5 の産生を阻害することができるスモールRNA、またはH I V RNA 配列を標的とすることができる少なくとも1つのスモールRNAを含んでいてもよい。実施形態では、少なくとも1つの遺伝的エレメントは、ケモカイン受容体 C C R 5 の産生を阻害することができるスモールRNAを含む。実施形態では、少なくとも1つの遺伝的エレメントは、H I V RNA 配列を標的とすることができる少なくとも1つのスモールRNAを含む。H I V RNA 配列は、H I V V i f 配列、H I V T a t 配列、またはそれらの改変体を含んでいてもよい。少なくとも1つの遺伝的エレメントは、マイクロRNAまたはs h RNAを含んでいてもよい。好ましい実施形態では、少なくとも1つの遺伝的エレメントは、マイクロRNAクラスターを含む。

10

【0019】

別の態様では、少なくとも1つの遺伝的エレメントは、

【化8】

AGGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCGACTGTAACTGAGCTTGCTCTACTGTGAAG
CCACAGATGGGTAGAGCAAGCACAGTTTACCGCTGCCTACTGCCTCGGACTTCAA
GGGGCTT (配列番号 1)

20

と少なくとも80%、または少なくとも85%、または少なくとも90%、または少なくとも95%の同一性パーセントを有するマイクロRNAを含む。好ましい実施形態では、少なくとも1つの遺伝的エレメントは、

【化9】

AGGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCGACTGTAACTGAGCTTGCTCTACTGTGAAG
CCACAGATGGGTAGAGCAAGCACAGTTTACCGCTGCCTACTGCCTCGGACTTCAA
GGGGCTT (配列番号 1)

を含む。

30

【0020】

別の態様では、少なくとも1つの遺伝的エレメントは、

【化10】

CATCTCCATGGCTGTACACCTTGTCGGGGGATGTGTACTTCTGAACTTGTGTTGA
ATCTCATGGAGTTCAGAAGAACACATCCGCACTGACATTTTGGTATCTTTCATCTG
ACCA (配列番号 2);

と少なくとも80%、もしくは少なくとも85%、もしくは少なくとも90%、もしくは少なくとも95%の同一性パーセントを有するか、または

40

【化11】

GGGCCTGGCTCGAGCAGGGGGCGAGGGATTCCGCTTCTTCCTGCCATAGCGTGG
TCCCCTCCCCTATGGCAGGCAGAAGCGGCACCTTCCCTCCCAATGACCGCGTCTTC
GTCG (配列番号 3)

と少なくとも80%、もしくは少なくとも85%、もしくは少なくとも90%、もしくは少なくとも95%の同一性パーセントを有するマイクロRNAを含む。好ましい実施形態では、少なくとも1つの遺伝的エレメントは、

50

【化 1 2】

CATCTCCATGGCTGTACCACCTTGTTCGGGGGATGTGTACTTCTGAACCTTGTGTTGA
ATCTCATGGAGTTCAGAAGAACACATCCGCACTGACATTTTGGTATCTTTCATCTG
ACCA (配列番号 2); または
GGGCCTGGCTCGAGCAGGGGGCGAGGGATTCCGCTTCTTC
CTGCCATAGCGTGGTCCCCTCCCCTATGGCAGGCAGAAGCGGCACCTTCCCCTCCCA
ATGACCGCGTCTTCGTCG (配列番号 3)

10

を含む。

【0 0 2 1】

別の態様では、マイクロRNAクラスターは、

【化 1 3】

AGGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCGACTGTAAACTGAGCTTGCTCTACTGTGAAG
CCACAGATGGGTAGAGCAAGCACAGTTTACCGCTGCCTACTGCCTCGGACTTCAA
GGGGCTTCCCGGGCATCTCCATGGCTGTACCACCTTGTTCGGGGGATGTGTACTTCT
GAACCTTGTGTTGAATCTCATGGAGTTCAGAAGAACACATCCGCACTGACATTTTGG
TATCTTTCATCTGACCAGCTAGCGGGCCTGGCTCGAGCAGGGGGCGAGGGATTCC
GCTTCTTCCCTGCCATAGCGTGGTCCCCTCCCCTATGGCAGGCAGAAGCGGCACCTT
CCCTCCCAATGACCGCGTCTTCGTC (配列番号 31)

20

と少なくとも80%、または少なくとも85%、または少なくとも90%、または少なくとも95%の同一性パーセントを有する配列を含む。好ましい実施形態では、マイクロRNAクラスターは、

【化 1 4】

AGGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCGACTGTAAACTGAGCTTGCTCT
ACTGTGAAGCCACAGATGGGTAGAGCAAGCACAGTTTACCGCTGCCTACTGCCTC
GGACTTCAAGGGGCTTCCCGGGCATCTCCATGGCTGTACCACCTTGTTCGGGGGATG
TGTACTTCTGAACCTTGTGTTGAATCTCATGGAGTTCAGAAGAACACATCCGCACTG
ACATTTTGGTATCTTTCATCTGACCAGCTAGCGGGCCTGGCTCGAGCAGGGGGCGA
GGGATTCCGCTTCTTCCCTGCCATAGCGTGGTCCCCTCCCCTATGGCAGGCAGAAGC
GGCACCTTCCCCTCCCAATGACCGCGTCTTCGTC (配列番号 31)

30

を含む。

【0 0 2 2】

別の態様では、レンチウイルスベクターが開示される。レンチウイルスベクターは、少なくとも1つのコードされた遺伝的エレメントを含み、少なくとも1つのコードされた遺伝的エレメントは、ケモカイン受容体CCR5の産生を阻害することができるスモールRNAを含む。また、少なくとも1つのコードされた遺伝的エレメントは、HIV RNA配列を標的とすることができる少なくとも1つのスモールRNAを含んでいてもよい。別の態様では、少なくとも1つのコードされた遺伝的エレメントは、ケモカイン受容体CCR5の産生を阻害することができるスモールRNA、およびHIV RNA配列を標的とすることができる少なくとも1つのスモールRNAを含む。HIV RNA配列は、HIV Vif配列、HIV Tat配列、またはそれらの改変体を含んでいてもよい。少なくとも1つのコードされた遺伝的エレメントは、マイクロRNAまたはshRNAを含んでい

40

50

てもよい。少なくとも1つのコードされた遺伝的エレメントは、マイクロRNAクラスターを含んでいてもよい。

【0023】

別の態様では、少なくとも1つの遺伝的エレメントは、

【化15】

AGGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCGACTGTAACTGAGCTTGCTCTACTGTGAAG
CCACAGATGGGTAGAGCAAGCACAGTTTACCGCTGCCTACTGCCTCGGACTTCAA
GGGGCTT (配列番号 1)

10

と少なくとも80%、または少なくとも85%、または少なくとも90%、または少なくとも95%の同一性パーセントを有するマイクロRNAを含む。好ましい実施形態では、少なくとも1つの遺伝的エレメントは、

【化16】

AGGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCGACTGTAACTGAGCTTGCTCTACTGTGAAG
CCACAGATGGGTAGAGCAAGCACAGTTTACCGCTGCCTACTGCCTCGGACTTCAA
GGGGCTT (配列番号 1)

を含む。

20

【0024】

別の態様では、少なくとも1つの遺伝的エレメントは、

【化17】

CATCTCCATGGCTGTACCACCTTGTCGGGGGATGTGTACTTCTGAACTTGTGTTGA
ATCTCATGGAGTTCAGAAGAACACATCCGCACTGACATTTTGGTATCTTTCATCTG
ACCA (配列番号 2);

と少なくとも80%、もしくは少なくとも85%、もしくは少なくとも90%、もしくは少なくとも95%の同一性パーセントを有するか、または

30

【化18】

GGGCCTGGCTCGAGCAGGGGGCGAGGGATTCCGCTTCTTCCTGCCATAGCGTGG
TCCCCTCCCCTATGGCAGGCAGAAGCGGCACCTTCCCTCCCAATGACCGCGTCTTC
GTCG (配列番号 3)

と少なくとも80%、もしくは少なくとも85%、もしくは少なくとも90%、もしくは少なくとも95%の同一性パーセントを有するマイクロRNAを含む。好ましい実施形態では、少なくとも1つの遺伝的エレメントは、

【化19】

40

CATCTCCATGGCTGTACCACCTTGTCGGGGGATGTGTACTTCTGAACTTGTGTTGA
ATCTCATGGAGTTCAGAAGAACACATCCGCACTGACATTTTGGTATCTTTCATCTG
ACCA (配列番号 2); または
GGGCCTGGCTCGAGCAGGGGGCGAGGGATTCCGCTTCTTC
CTGCCATAGCGTGGTCCCCTCCCCTATGGCAGGCAGAAGCGGCACCTTCCCTCCCA
ATGACCGCGTCTTCGTCG (配列番号 3)

を含む。

50

【0025】

別の態様では、マイクロRNAクラスターは、

【化20】

AGGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCGACTGTAAACTGAGCTTGCTCTACTGTGAAG
CCACAGATGGGTAGAGCAAGCACAGTTTACCGCTGCCTACTGCCTCGGACTTCAA
GGGGCTTCCCGGGCATCTCCATGGCTGTACCACCTTGTCGGGGGATGTGTACTTCT
GAACTTGTGTTGAATCTCATGGAGTTCAGAAGAACACATCCGCACTGACATTTTGG
TATCTTTCATCTGACCAGCTAGCGGGCCTGGCTCGAGCAGGGGGCGAGGGATTCC
GCTTCTTCTGCCATAGCGTGGTCCCCTCCCCTATGGCAGGCAGAAAGCGGCACCTT
CCCTCCCAATGACCGCGTCTTCGTC (配列番号 31)

10

と少なくとも80%、または少なくとも85%、または少なくとも90%、または少なくとも95%の同一性パーセントを有する配列を含む。好ましい実施形態では、マイクロRNAクラスターは、

【化21】

AGGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCGACTGTAAACTGAGCTTGCTCT
ACTGTGAAGCCACAGATGGGTAGAGCAAGCACAGTTTACCGCTGCCTACTGCCTC
GGACTTCAAGGGGCTTCCCGGGCATCTCCATGGCTGTACCACCTTGTCGGGGGATG
TGTAATTCTGAACTTGTGTTGAATCTCATGGAGTTCAGAAGAACACATCCGCACTG
ACATTTTGGTATCTTTCATCTGACCAGCTAGCGGGCCTGGCTCGAGCAGGGGGCGA
GGGATTCCGCTTCTTCTGCCATAGCGTGGTCCCCTCCCCTATGGCAGGCAGAAAGC
GGCACCTTCCCCTCCCAATGACCGCGTCTTCGTC (配列番号 31)

20

を含む。

【0026】

別の態様では、レンチウイルス粒子を発現するためのレンチウイルスベクターシステムが開示される。システムは、本明細書に記載のようなレンチウイルスベクター、好ましくは細胞に感染するために最適化されているエンベロープタンパク質を発現するためのエンベローププラスミド、および目的の遺伝子を発現するための少なくとも1つのヘルパープラスミドを含む。実施形態では、目的の遺伝子は、gag、pol、およびrev遺伝子の1つまたは複数を含む。実施形態では、レンチウイルスベクター、エンベローププラスミド、および少なくとも1つのヘルパープラスミドは、パッケージング細胞株にトランスフェクトされる。さらなる実施形態では、レンチウイルス粒子は、パッケージング細胞株により産生される。実施形態では、レンチウイルス粒子は、目的の標的の産生をモジュレーションすることができる。実施形態では、目的の標的は、ケモカイン受容体CCR5またはHIV RNA配列のいずれかである。システムは、第1のヘルパープラスミドおよび第2のヘルパープラスミドをさらに含んでもよい。実施形態では、第1のヘルパープラスミドは、gagおよびpol遺伝子を発現し、第2のヘルパープラスミドは、rev遺伝子を発現する。

30

40

【0027】

別の態様では、細胞に感染することができるレンチウイルス粒子が提供される。レンチウイルス粒子は、好ましくは細胞に感染するために最適化されたエンベロープタンパク質、および本明細書に記載のようなレンチウイルスベクターを含む。実施形態では、エンベロープタンパク質は、T細胞に感染するために最適化されていてもよい。好ましい実施形態では、エンベロープタンパク質は、CD4+ T細胞に感染するために最適化されている。

50

【0028】

別の態様では、改変細胞が提供される。改変細胞は、本態様および実施形態に従って使用するためのレンチウイルスベクターシステムに感染させることができる任意の細胞を含む。実施形態では、細胞は、レンチウイルス粒子に感染するCD4+ T細胞である。また、実施形態では、CD4+ T細胞は、HIV抗原を認識するように選択されている。実施形態では、HIV抗原は、gag抗原を含む。実施形態では、CD4+ T細胞は、レンチウイルス粒子による感染後に、減少したレベルのCCR5を発現する。

【0029】

別の態様では、療法的治療レジメン用に対象を選択するための方法が提供される。方法は、有効量の第1の刺激性作用剤で対象を免疫化するステップ；対象から白血球を取り出し、末梢血単核細胞（PBMC）を精製し、PBMCに関連する少なくとも1つの因子に関連する第1の定量化可能な測定値を決定するステップ；*ex vivo*において、PBMCを治療有効量の第2の刺激性作用剤と接触させ、PBMCに関連する少なくとも1つの因子に関連する第2の測定値を決定するステップを様々に含み、第2の定量化可能な測定値が、第1の定量化可能な測定値よりも高い場合、対象が、治療レジメン用を選択される。任意選択で、治療レジメンは、予防的治療レジメンである。少なくとも1つの因子は、T細胞増殖またはIFNガンマ産生のいずれかを含んでいてもよい。

【0030】

前述の一般的な記載ならびに以下の図面の簡単な説明および発明を実施するための形態は、例示的かつ説明的であり、特許請求する本発明のさらなる説明を提供することを意図している。他の目的、利点、および新規な特徴は、以下の図面の簡単な説明および発明を実施するための形態から当業者に容易に明らかになるであろう。

【図面の簡単な説明】

【0031】

【図1】図1は、本開示の*ex vivo*治療法のフローダイアグラムを示す。

【0032】

【図2】図2は、本開示によるCD4+ T細胞の変更および新しい感染の予防を示す。

【0033】

【図3】図3は、療法用ベクター、ヘルパープラスミド、およびエンベローププラスミドで構成されている例示的なレンチウイルスベクターシステムを示す。ここに示されている療法用ベクターは、本明細書ではAGT103とも呼ばれ、miR30CCR5-miR21Vif-miR185-Tatを含む、好ましい療法用ベクターである。

【0034】

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

【0035】

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

【0036】

【図6】図6は、例示的なベクター配列を示す。プロモーターおよびmiRクラスターのプラス（つまり、ゲノム）鎖配列は、CCR5指向性HIV株の拡散を阻害するために開発された。下線で示されていない配列は、このmiRクラスターの好ましいプロモーターであるとして選択されたEF-1アルファ転写プロモーター（配列番号105）を含む。下線で示した配列は、miR30CCR5（配列番号1）、miR21Vif（配列番号2）、およびmiR185Tat（配列番号108）からなるmiRクラスターを示す（配列番号33にまとめて示されている）。

【0037】

【図7】図7は、本開示の種々の態様による例示的なレンチウイルスベクター構築物を示す。

【0038】

【図8】図8は、実験ベクターによりCCR5がノックダウンされたこと、およびそれに対応して、AGTc120細胞でのR5指向性HIV感染が予防されたことを示す。(A)は、AGT103レンチウイルスベクターを含むか、または含まないAGTc120細胞におけるCCR5発現を示す。(B)は、HIVのNef遺伝子に融合した緑色蛍光タンパク質(GFP)を発現するHIV BaLウイルスストックによる感染に対する形質導入されたAGTc120細胞の感受性を示す。

【0039】

【図9】図9は、本開示のレンチウイルスベクターのshRNA阻害剤配列によって、CCR5発現が調節されたことを実証するデータを示す。(A)潜在的な候補のスクリーニングデータが示されている。(B)CCR5 shRNA-1(配列番号16)を形質導入した後のCCR5ノックダウンデータが示されている。

10

【0040】

【図10】図10は、本開示のレンチウイルスベクターのshRNA阻害剤配列によって、HIV成分が調節されたことを実証するデータを示す。(A)rev/tat標的遺伝子のノックダウンデータが示されている。(B)gag標的遺伝子のノックダウンデータが示されている。

【0041】

【図11】図11は、AGT103が、本明細書に記載のように、HIV発現プラスミドをトランスフェクトした細胞においてTatタンパク質の発現を低減させることを実証するデータを示す。

20

【0042】

【図12】図12は、本開示のレンチウイルスベクターの合成マイクロRNA配列によって、HIV成分が調節されたことを実証するデータを示す。(A)Tatノックダウンデータが示されている。(B)Vifノックダウンデータが示されている。

【0043】

【図13】図13は、本開示のレンチウイルスベクターの合成マイクロRNA配列によって、CCR5発現が調節されたことを実証するデータを示す。

【0044】

【図14】図14は、長鎖または短鎖WP RE配列を含む本開示のレンチウイルスベクターの合成マイクロRNA配列によって、CCR5発現が調節されたことを実証するデータを示す。

30

【0045】

【図15】図15は、WP RE配列を含むまたは含まない本開示のレンチウイルスベクターの合成マイクロRNA配列によって、CCR5の発現が調節されたことを実証するデータを示す。

【0046】

【図16】図16は、本開示のレンチウイルスベクターのCD4プロモーター調節性合成マイクロRNA配列によって、CCR5発現が調節されたことを実証するデータを示す。

【0047】

【図17】図17は、HIV Gag特異的CD4 T細胞の検出を実証するデータを示す。

40

【0048】

【図18】図18は、HIV特異的CD4 T細胞の増殖およびレンチウイルス形質導入を実証するデータを示す。(A)例示的な治療スケジュールが示されている。(B)CD4でゲートしたT細胞でのIFN-ガンマ産生が、本明細書に記載されているように示されている。(C)CD4でゲートしたT細胞でのIFN-ガンマ産生およびGFP発現が、本明細書に記載されているように示されている。(D)本明細書に記載されているような、HIV特異的CD4+ T細胞の頻度が示されている。(E)ワクチン接種後のPBMCからのIFN-ガンマ産生が、本明細書に記載されているように示されている。

【0049】

【図19】図19は、AGT103-GFPを増加させた際の用量応答およびCCR5発

50

現の阻害に関する機能アッセイを実証するデータを示す。(A) A G T 1 0 3 - G F P の量を増加させた際の用量応答データが示されている。(B) C C R 5 発現の点で正規分布した集団が示されている。(C) A G T 1 0 3 - G F P の用量を増加させた際の C C R 5 発現の阻害パーセンテージが示されている。

【0050】

【図20】図20は、初代ヒト C D 4 + T 細胞の A G T 1 0 3 形質導入効率を実証するデータを示す。(A) 形質導入された細胞 (G F P 陽性) の頻度が、本明細書に記載されているように、F A C S により示されている。(B) 細胞あたりのベクターコピー数が、本明細書に記載されているように示されている。

【0051】

【図21】図21は、初代 C D 4 + T 細胞における H I V 複製の A G T 1 0 3 阻害を実証するデータが、本明細書に記載されているように示されている。

【0052】

【図22】図22は、H I V 誘導性枯渇からの初代ヒト C D 4 + T 細胞の A G T 1 0 3 防御を実証するデータを示す。

【0053】

【図23-1】図23は、H I V 特異的 A G T 1 0 3 形質導入 C D 4 T 細胞が高度に濃縮された C D 4 + T 細胞集団の生成を実証するデータを示す。(A) は、細胞集団の C D 4 および C D 8 発現プロファイルを、本明細書に記載されているように示す。(B) は、細胞集団の C D 4 および C D 8 発現プロファイルを、本明細書に記載されているように示す。(C) は、細胞集団の I F N - ガンマおよび C D 4 発現プロファイルを、本明細書に記載されているように示す。(D) は、細胞集団の I F N - ガンマおよび G F P 発現プロファイルを、本明細書に記載されているように示す。

【図23-2】図23は、H I V 特異的 A G T 1 0 3 形質導入 C D 4 T 細胞が高度に濃縮された C D 4 + T 細胞集団の生成を実証するデータを示す。(A) は、細胞集団の C D 4 および C D 8 発現プロファイルを、本明細書に記載されているように示す。(B) は、細胞集団の C D 4 および C D 8 発現プロファイルを、本明細書に記載されているように示す。(C) は、細胞集団の I F N - ガンマおよび C D 4 発現プロファイルを、本明細書に記載されているように示す。(D) は、細胞集団の I F N - ガンマおよび G F P 発現プロファイルを、本明細書に記載されているように示す。

【0054】

【図24】図24は、A G T - L V - H I V 1 . 0 (これら図中では L V - R 5 T a t V i f) が、潜伏性の誘導可能な H I V の細胞モデル (J 1 . 1) 中で H I V 複製を阻害することを実証するデータを示す。

【発明を実施するための形態】

【0055】

概要

機能的治癒を達成するためにヒト免疫不全ウイルス (H I V) 疾患を予防するための方法および組成物が、本明細書において開示される。本方法および組成物には、以下に記載される組み込みレンチウイルス、非組み込みレンチウイルス、および関連ウイルスベクター技術が含まれる。

【0056】

療法用ウイルスベクター (例えば、レンチウイルスベクター)、免疫療法、および H I V 感染を治療または予防するためにそれらを使用するための方法が、本明細書において開示される。本明細書の図1に示されているように、種々の態様および実施形態は、第1の刺激事象、例えば、例えば H A A R T の毎日の投与によるウイルス血症の安定な抑制を有する H I V 感染患者における H I V に対する強力な免疫応答を生成することを意図したワクチンによる最初の療法的免疫化を含む。実施形態では、第1の刺激事象は、H I V 特異的 C D 4 T 細胞の画分を濃縮する。(1) 末梢白血球を白血球アフェレーシスによって単離するか、または P B M C を静脈血から精製するステップ、(2) 第2の刺激事象、例

10

20

30

40

50

例えば *ex vivo* において、任意のワクチンまたはタンパク質、例えば HIV または HIV 関連ペプチドなどの適切な刺激性作用剤で、CD4⁺ T 細胞を再刺激するステップ、
(3) 療法用レンチウイルス形質導入、*ex vivo* において、T 細胞培養を行うステップ、および (4) 元の患者へ再注入し戻すステップが、これに続く。上述の戦略は、HIV を予防するためのワクチンまたは予防的効果を提供するために、HIV 陰性患者にも使用することができる。

【0057】

種々の方法および組成物を使用して、CD4⁺ T 細胞などの新しい細胞が、HIV に感染することを予防することができる。例えば、図 2 に例示されているように、新しい細胞の感染を予防するために、CCR5 発現を標的としてウイルス付着を防止することができる。さらに、あらゆる残存感染性ウイルス RNA の破壊も標的とすることができる。前述の記載に鑑み、本明細書の図 2 を参照すると、既に HIV に感染している細胞での HIV ウイルスサイクルを停止させるための組成物および方法が提供される。HIV ウイルスサイクルを停止させるために、潜伏感染 CD4⁺ T 細胞などの潜伏感染細胞によって産生されるウイルス RNA が標的とされる。

【0058】

特に、防御的遺伝子改変を有する十分な数の HIV 特異的 CD4⁺ T 細胞を得ることができなかったために、HIV の治療を達成するためのこれまでの努力が及ばなかった。この数が臨界閾値を下回ると、本明細書に記載されているような機能的治療は達成されない。例えば、抗レトロウイルス療法を中止すると、一般に、HIV 再出現が起こる。その後、患者は、HIV 特異的 CD4⁺ T 細胞の急速な破壊を経験することが多く、以前の遺伝子治療にもかかわらず、疾患の進行に戻ってしまうことが多い。本明細書に記載の組成物および方法による療法的免疫化を使用することにより、種々の実施形態では機能的治療を含む、新しい HIV 治療レジメンを開発した。

【0059】

定義および解釈

本明細書中で別様に定義されていない限り、本開示に関して使用される科学用語および専門用語は、当業者により一般に理解される意味を有するものとする。さらに、状況により別様に求められない限り、単数形の用語は複数を含み、複数形の用語は単数を含むものとする。一般に、本明細書に記載されている細胞および組織培養、分子生物学、免疫学、微生物学、遺伝学、ならびにタンパク質および核酸化学、ならびにハイブリダイゼーションに関して使用される命名法および技術は、周知であり、当技術分野で一般に使用されているものである。本開示の方法および技術は、別様の指定がない限り、一般に、当技術分野で周知の従来法により、本明細書の全体にわたって引用および考察されている種々の一般的なおよびより専門的な参考文献に記載されているように実施される。例えば、Sambrook J. および Russell D. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 第 3 版、Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (2000 年) ; Ausubel ら、*Short Protocols in Molecular Biology: A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology*, Wiley, John & Sons, Inc. (2002 年) ; Harlow および Lane、*Using Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1998 年) ; ならびに Coligan ら、*Short Protocols in Protein Science*, Wiley, John & Sons, Inc. (2003 年) を参照されたい。任意の酵素反応または精製技術は、製造業者の仕様に従って、当技術分野で一般に達成されるように、または本明細書に記載されているように実施される。本明細書に記載されている分析化学、合成有機化学、ならびに医学および医薬化学に関して使用される命名法、実験手順、および技術は、周知であり、当技術分野で一般に使用されているものである。

【0060】

本明細書で使用される場合、「約」という用語は、当業者によって理解され、使用される文脈に依存してある程度変化するであろう。使用される文脈を考慮しても、当業者に明

10

20

30

40

50

白ではない用語の使用がある場合には、「約」は特定の用語のプラスまたはマイナス10%を意味するであろう。

【0061】

本明細書で使用される場合、活性剤の「投与」または「投与する」という用語は、本発明の活性剤を、治療の必要な対象に療法上有用な形態で治療有効量をその個体の体内に導入することができる形態で、提供することを意味する。

【0062】

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

【0063】

本明細書で使用される場合、「AGT103T」という用語は、AGT103レンチウイルスベクターを含むレンチウイルスを用いて形質導入した細胞を指す。

【0064】

本明細書および特許請求の範囲の全体にわたって、「含む(comprise)」という単語、または「含む(comprises)」もしくは「含むこと(comprising)」などの活用形は、記載されている整数または整数の群を含むが、任意の他の整数または整数の群を除外しないことを示唆すると理解されるであろう。さらに、本明細書で使用される場合、「含む(includes)」という用語は、含むが限定ではないことを意味する。

【0065】

本明細書で使用される場合、「移植」という用語は、当業者が、細胞供給源を注入した後の対象において持続した移植の定量的レベルを決定することができることを指す(例えば、Rosenbergら、N. Engl. J. Med. 323巻:570~578頁(1990年); Dudleyら、J. Immunother. 24巻:363~373頁(2001年); Yeeら、Curr. Opin. Immunol. 13巻:141~146頁(2001年); Rooneyら、Blood 92巻:1549~1555頁(1998年)を参照)。

【0066】

「発現」、「発現した」、または「コードする」という用語は、ポリヌクレオチドがmRNAに転写されるプロセスおよび/または転写されたmRNAが続いてペプチド、ポリペプチド、もしくはタンパク質に翻訳されるプロセスを指す。発現には、真核細胞におけるmRNAのスプライシング、または他の形態の転写後修飾もしくは翻訳後修飾を含み得る。

【0067】

「機能的治癒」という用語は、上記で参照されているように、および本明細書でさらに定義されているように、以前にcARTまたはHAARTなどの継続中のHIV療法を必要としていたHIV+個体が、そのようなHIV療法のより低い用量、断続的用量または投薬中止を使用して、ウイルス複製が低いまたは検出不可能な形で生存することができる状況または状態を指す。個体は、低いレベルのウイルス複製を維持し疾患の進行を遅くするかまたは排除するための補助療法を依然として必要としていても、「機能的に治癒した」と言われ得る。機能的治癒の可能性がある結果としては、特定の時間枠内、例えば、1か月、3か月、6か月、1年、3年、および5年、ならびに規定することができるすべての他の時間枠内で再発が検出されないような、すべてのまたは事実上すべてのHIVの最終的な根絶がある。

【0068】

「HIVワクチン」という用語は、HIV特異的免疫応答を誘発することを意図した免疫原とアジュバントを包含する。「HIVワクチン」という用語は、本明細書に記載の「刺激性作用剤」という用語の意味内にある。「HIVワクチン」は、HIVであってもよい精製された不活化ウイルス粒子もしくは不活化ウイルス粒子全体、またはHIVタンパク質、タンパク質断片もしくはペプチド、糖タンパク質断片もしくは糖ペプチ

10

20

30

40

50

ドを発現することができる組換えウイルスベクターを、特定の免疫を誘発することができるHIVタンパク質、糖タンパク質またはタンパク質断片を産生するように細胞を誘導することができる組換え細菌ベクター、プラスミドDNAまたはRNAに加えて含んでもよい。代替的には、形質導入の前にHIV特異的CD4⁺T細胞を濃縮する目的のために、または、レンチウイルス形質導入CD4⁺T細胞の*in vitro*アッセイのために、抗CD3/CD28ビーズ、T細胞受容体特異的抗体、分裂促進因子、スーパー抗原、および他の化学的または生物学的刺激を含む免疫刺激のための特定の方法を使用して、樹状、TもしくはB細胞を活性化することができる。活性化物質は、可溶性、ポリマー性集合体、リポソームまたはエンドソームベースであり得るかまたはビーズに連結され得る。インターロイキン-2、6、7、12、15、23または他を含むサイトカインを添加して、刺激に対する細胞応答を改善し、ならびに／または培養および形質導入間隔を通じてCD4⁺T細胞の生存を改善することができる。代替的には、前述のいずれにも限定されず、「HIVワクチン」という用語は、MVA/HIV62Bワクチンおよびその改変体を包含する。MVA/HIV62Bワクチンは、公知の高度に弱毒化された二重組換えMVAワクチンである。MVA/HIV62Bワクチンは、HIV-1 gag-polおよびenv配列を公知のMVAベクターに挿入することにより構築された（例えば、Goepfertら（2014年）J. Infect. Dis. 210巻（1号）：99～110頁を参照、および国際公開第2006026667号を参照。両文献は、参照により本明細書に組み込まれる）。また、「HIVワクチン」という用語は、以下の表1に提供されている任意の1つまたは複数のワクチンを含む。

10

20

30

40

50

【表 1 - 1】

表 1

IAVI 臨床試験 ID*	プライム**
HVTN 704 AMP	VRC-HIVMAB060-00-AB
VAC89220HPX2004	Ad26.Mos.HIV 三価
01-I-0079	VRC4302
04/400-003-04	APL 400-003 GENEVAX-HIV
10-1074	10-1074
87 I-114	gp160 ワクチン (Immuno-AG)
96-I-0050	APL 400-003 GENEVAX-HIV
ACTG 326; PACTG 326	ALVAC vCP1452
Ad26.ENVA.01	Ad26.EnvA-01
Ad26.ENVA.01 粘膜 /IPCAVD003	Ad26.EnvA-01
Ad5HVR48.ENVA.01	Ad5HVR48.ENVA.01
ANRS VAC 01	ALVAC vCP125
ANRS VAC 02	rgp 160 + ペプチド V3 ANRS VAC 02
ANRS VAC 03	ALVAC-HIV MN120TMG 株 (vCP205)
ANRS VAC 04	LIPO-6
ANRS VAC 04 bis	LIPO-6
ANRS VAC 05	ALVAC vCP125
ANRS VAC 06	ALVAC vCP125
ANRS VAC 07	ALVAC vCP300

10

20

30

40

50

【表 1 - 2】

ANRS VAC 08	ALVAC-HIV MN120TMG 株 (vCP205)
ANRS VAC 09	ALVAC-HIV MN120TMG 株 (vCP205)
ANRS VAC 09 bis	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
AVEG 002A	HIVAC-1e
AVEG 002B	HIVAC-1e
AVEG 003	VaxSyn gp160 ワクチン (MicroGeneSys)
AVEG 003A	VaxSyn gp160 ワクチン (MicroGeneSys)
AVEG 003B	VaxSyn gp160 ワクチン (MicroGeneSys)
AVEG 004	gp160 ワクチン (Immuno-AG)
AVEG 004A	gp160 ワクチン (Immuno-AG)
AVEG 004B	gp160 ワクチン (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

10

20

30

40

50

【表 1 - 3】

AVEG 008	HIVAC-1e
AVEG 009	MN rgp120
AVEG 010	HIVAC-1e
AVEG 011	UBI HIV-1 ペプチド免疫原、多価
AVEG 012A/B	ALVAC vCP125
AVEG 013A	gp160 ワクチン (Immuno-AG)
AVEG 013B	gp160 ワクチン (Immuno-AG)
AVEG 014A/B	TBC-3B
AVEG 014C	TBC-3B
AVEG 015	rgp120/HIV-1 SF-2
AVEG 016	MN rgp120
AVEG 016A	MN rgp120
AVEG 016B	MN rgp120
AVEG 017	UBI HIV-1 ペプチドワクチン、微粒子 一価
AVEG 018	UBI HIV-1 ペプチドワクチン、微粒子 一価
AVEG 019	p17/p24:Ty- VLP
AVEG 020	gp120 C4-V3
AVEG 021	P3C541b リポペプチド
AVEG 022	ALVAC-HIV MN120TMG 株 (vCP205)
AVEG 022A	ALVAC-HIV MN120TMG 株 (vCP205)
AVEG 023	UBI HIV-1 ペプチド免疫原、多価
AVEG 024	rgp120/HIV-1 SF-2
AVEG 026	ALVAC vCP300
AVEG 027	ALVAC-HIV MN120TMG 株 (vCP205)

10

20

30

40

50

【表 1 - 4】

AVEG 028	Salmonella typhi CVD 908-HIV-1 LAI gp 120
AVEG 029	ALVAC-HIV MN120TMG 株 (vCP205)
AVEG 031	APL 400-047
AVEG 032	ALVAC-HIV MN120TMG 株 (vCP205)
AVEG 033	ALVAC-HIV MN120TMG 株 (vCP205)
AVEG 034/034A	ALVAC vCP1433
AVEG 036	MN rgp120
AVEG 038	ALVAC-HIV MN120TMG 株 (vCP205)
AVEG 201	rgp120/HIV-1 SF-2
AVEG 202/HIVNET 014	ALVAC-HIV MN120TMG 株 (vCP205)
C060301	GTU-MultiHIV
C86P1	HIV gp140 ZM96
頸腔部 CN54gp140-hsp70 コンジュゲートワクチン (TL01)	CN54gp140
CM235 および SF2gp120	CM235 (ThaiE) gp120 と SF2(B) gp120
CM235gp120 および SF2gp120	CM235 (ThaiE) gp120 と 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

10

20

30

40

50

【表 1 - 5】

EnvDNA	EnvDNA
EnvPro	EnvPro
EuroNeut41	EN41-FPA2
EV01	NYVAC-C
EV02 (EuroVacc 02)	DNA-C
EV03/ANRSVAC20	DNA-C
Extention HVTN 073E/SAAVI 102	Sub C gp140
F4/AS01	F4/AS01
FIT Biotech	GTU-Nef
Guangxi CDC DNA ワクチン	チャイニーズ DNA
HGP-30 メモリ応答	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 株 (vCP205)
HIVNET 026	ALVAC vCP1452
HPTN 027	ALVAC-HIV vCP1521
HVRF-380-131004	Vichrepol
HVTN 039	ALVAC vCP1452

10

20

30

40

50

【表 1 - 6】

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 および Env DNA/PLG 微粒子
HVTN 050/Merck 018	MRKAd5 HIV-1 gag
HVTN 052	VRC-HIVDNA009-00-VP
HVTN 054	VRC-HIVADV014-00-VP
HVTN 055	TBC-M335
HVTN 056	MEP
HVTN 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

10

20

30

40

50

【表 1 - 7】

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
HVTN 086, SAAVI 103	SAAVI MVA-C
HVTN 087	HIV-MAG
HVTN 088	オリゴマー gp140/MF59
HVTN 090	VSV-Indiana HIV gag ワクチン
HVTN 092	DNA-HIV-PT123
HVTN 094	GEO-D03
HVTN 096	DNA-HIV-PT123
HVTN 097	ALVAC-HIV vCP1521
HVTN 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

10

20

30

40

50

【表 1 - 8】

HVTN 110	Ad4-mgag
HVTN 112	HIV-1 nef/tat/vif, env pDNA ワクチン
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 (Step 研究)	MRKAd5 HIV-1 gag/pol/nef
HVTN 503 (Phambili)	MRKAd5 HIV-1 gag/pol/nef
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

10

20

30

40

50

【表 1 - 9】

IAVI A001	tgAAC09
IAVI A002	tgAAC09
IAVI A003	AAV1-PG9
IAVI B001	Ad35-GRIN/ENV
IAVI B002	アジュバントGSK研究用 HIVワクチン製剤I
IAVI B003	Ad26.EnvA-01
IAVI B004	HIV-MAG
IAVI C001	ADVAX
IAVI C002	ADMVA
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	全長単鎖 (FLSC)
IMPAACT P1112	VRC-HIVMAB060-00-AB
IPCAVD006	MVA モザイク
IPCAVD008	三量体 gp140

10

20

30

40

50

【表 1 - 10】

IPCAVD009	Ad26.Mos.HIV 三価
IPCAVD010	Ad26.Mos.HIV 三価
ISS P-001	Tat ワクチン
ISS P-002	Tat ワクチン
LFn-p24 ワクチン	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)
MRKAd5 + ALVAC	MRKAd5 HIV-1 gag
Mucovac2	CN54gp140
MV1-F4	麻疹ベクター - GSK
MYM-V101	ピロソーム -Gp41
NCHECR-AE1	pHIS-HIV-AE
PACTG 230	AIDSVAX B/E
PAVE100	VRC-HIVDNA016-00-VP
PEACHI-04	ChAdV63.HIVconsv
PedVacc001 & PedVacc002	MVA.HIVA
ポリ Env1	ポリ Env1
PXVX-HIV-100-001	Ad4-mgag
RISVAC02	MVA-B
RisVac02 プースト	MVA-B
RV 124	ALVAC-HIV MN120TMG 株 (vCP205)
RV 132	ALVAC-HIV vCP1521

10

20

30

40

50

【表 1 - 1 1】

RV 135	ALVAC-HIV vCP1521
RV 138; B011	ALVAC-HIV MN120TMG 株 (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
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
Tiantan ワクシニアHIVワクチン	チャイニーズ DNA
Tiantan ワクシニアHIVワクチンおよびDNA	チャイニーズ DNA
TMB-108	イバリズマブ
UBI HIV-1 MN China	UBI HIV-1 ペプチド免疫原、多価
UBI HIV-1MN 八量体-オーストラリア研究	UBI HIV-1 ペプチド免疫原、多価
UBI V106	UBI HIV-1 ペプチドワクチン、微粒子 一価
UCLA MIG-001	TBC-3B

10

20

30

40

50

【表 1 - 1 2】

UCLA MIG-003	ALVAC-HIV MN120TMG 株 (vCP205)
UKHVCSpoke003	DNA - CN54ENV および ZM96GPN
V24P1	HIV p24/MF59 ワクチン
V3-MAPS	V3-MAPS
V520-016	MRKAd5 HIV-1 gag/pol/nef
V520-027	MRKAd5 HIV-1 gag/pol/nef
V526-001 MRKAd5 および MRKAd6 HIV-1 三遺伝子ワクチン	MRKAd5 HIV-1 gag/pol/nef
VAX 002	AIDSVAX B/B
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

【表 1 - 1 3】

X001	CN54gp140
------	-----------

*IAVIは、国際エイズワクチン推進構想であり、その臨床試験データベースは、<http://www.iavi.org/trials-database/trials>で公的に入手可能である。

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

【0069】

「*in vivo*」という用語は、生きている生物で生じるプロセスを指す。「*ex vivo*」という用語は、生きている生物の外部で生じるプロセスを指す。例えば、*in vivo*治療は、患者の体内で生じる治療を指し、*ex vivo*治療は、患者の体外で生じるが、その患者に由来する組織を使用するか、または組織に接近するか、または組織と相互作用する治療を指す。その後、*ex vivo*治療ステップは、引き続き*in vivo*治療ステップを含む場合がある。

【0070】

「*miRNA*」という用語は、マイクロRNAを指し、本明細書では「*miR*」と呼ばれる場合もある。「マイクロRNAクラスター」という用語は、ベクター中で互いに近傍に位置し、同時発現される少なくとも2つのマイクロRNAを指す。

【0071】

「パッケージング細胞株」という用語は、レンチウイルス粒子を発現するために使用することができるあらゆる細胞株を指す。

【0072】

2つまたはそれよりも多くの核酸配列またはポリペプチド配列の文脈における「同一性パーセント」という用語は、最大一致で比較および整列した場合に、下に記載されている配列比較アルゴリズム（例えば、BLASTPおよびBLASTN、または当業者に利用可能な他のアルゴリズム）の1つを使用してまたは目視検査によって測定される、同じヌクレオチドまたはアミノ酸残基の指定のパーセンテージを示す2つまたはそれよりも多くの配列または部分配列を指す。「同一性パーセント」は、適用に応じて、比較されている配列の領域にわたって、例えば機能的ドメインにわたって存在してもよく、または代替的には、比較される2つの配列の全長にわたって存在してもよい。配列比較の場合、典型的には、1つの配列は、試験配列をそれに対して比較する参照配列としての役目を果たす。配列比較アルゴリズムを使用する場合、試験配列および参照配列をコンピュータに入力し、必要に応じて部分配列座標を指定し、配列アルゴリズムプログラムパラメータを指定する。その後、配列比較アルゴリズムにより、指定されているプログラムパラメータに基づいて、参照配列に対する試験配列の配列同一性パーセントが計算される。

【0073】

比較するための最適な配列アラインメントは、例えば、SmithおよびWaterman、Adv. Appl. Math. 2巻：482頁（1981年）の局所相同性アルゴリズムにより、NeedlemanおよびWunsch、J. Mol. Biol. 48巻：443頁（1970年）の相同性アラインメントアルゴリズムにより、PearsonおよびLipman、Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 85巻：2444頁（1988年）の類似性探索法（search for similarity method）により、これらのアルゴリズムのコンピュータ実装により（Wisconsin Genetics Software Package、Genetics Computer Group、575 Science Dr.、Madison、Wis. のGAP、BESTFIT、FASTA、およびTFASTA）、または目視検査により（一般に、Ausubelら、上記を参照）実施することができる。

【0074】

配列同一性パーセントおよび配列類似性パーセントを決定するのに適切なアルゴリズムの一例は、BLASTアルゴリズムであり、これは、Altschulら、J. Mol. Biol. 215巻：403～410頁（1990年）に記載されている。BLAST分析を実施するためのソフトウェアは、国立生物工学情報センターのウェブサイトから公的に利用可能である。

【0075】

2つのヌクレオチド配列間の同一性パーセントは、NWSgapdna.CMPマトリクス、ならびに40、50、60、70、または80のギャップ重みおよび1、2、3、4、5、または6の長さ重みを使用するGCGソフトウェアパッケージ（<http://www.gcg.com>から入手可能）のGAPプログラムを使用して決定することができる。また、2つのヌクレオチド配列またはアミノ酸配列間の同一性パーセントは、PAM120重み残基表、ギャップ長ペナルティ12、およびギャップペナルティ4を使用す

10

20

30

40

50

るALIGNプログラム（バージョン2.0）に組み込まれているE. MeyersおよびW. Miller（CABIOS、4巻：11～17頁（1989年））のアルゴリズムを使用して、決定することができる。加えて、2つのアミノ酸配列間の同一性パーセントは、Blossum 62マトリクスまたはPAM 250マトリクスのいずれか、ならびに16、14、12、10、8、6、または4のギャップ重みおよび1、2、3、4、5、または6の長さ重みを使用するGCGソフトウェアパッケージ（<http://www.gcg.com>から入手可能）のGAPプログラムに組み込まれているNeedlemanおよびWunsch（J. Mol. Biol.（48巻）：444～453頁（1970年））のアルゴリズムを使用して決定することができる。

【0076】

さらに、本開示の核酸配列およびタンパク質配列を、公開データベースの検索を実施するための「クエリー配列」として使用して、例えば、関連配列を特定することができる。そのような検索は、Altschulら（1990年）J. Mol. Biol. 215巻：403～10頁のNBLASTおよびXBLASTプログラム（バージョン2.0）を使用して実施することができる。NBLASTプログラムをスコア＝100、ワード長＝12で用いて、BLASTヌクレオチド検索を実施して、本発明の核酸分子に相同なヌクレオチド配列を得ることができる。XBLASTプログラムをスコア＝50、ワード長＝3で用いて、BLASTタンパク質検索を実施して、本発明のタンパク質分子に相同なアミノ配列を得ることができる。比較目的のギャップ付きアラインメントを得るためには、Gapped BLASTを、Altschulら（1997年）Nucleic Acids Res. 25巻（17号）：3389～3402頁に記載のように利用してもよい。BLASTプログラムおよびギャップ付きBLASTプログラムを利用する場合、それぞれのプログラム（例えば、XBLASTおよびNBLAST）の初期設定パラメータを使用してもよい。<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>を参照されたい。

【0077】

本明細書で使用される場合、「薬学的に許容される」は、健全な医学的判断の範囲内で、過度の毒性、刺激、アレルギー応答、または合理的なベネフィット／リスク比と釣り合う他の問題もしくは合併症を起こさず、ヒトおよび動物の組織、器官、および／または体液と接触させて使用するために適切である化合物、材料、組成物、および／または剤形を指す。

【0078】

本明細書で使用される場合、「薬学的に許容される担体」は、生理学的に適合するありとあらゆる溶媒、分散媒、コーティング、抗菌剤および抗真菌剤、ならびに等張剤および吸収遅延剤などを指し、それらを含む。組成物としては、薬学的に許容される塩、例えば、酸付加塩または塩基付加塩を挙げることができる（例えば、Bergeら（1977年）J Pharm Sci 66巻：1～19頁を参照）。

【0079】

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

【0080】

本明細書で使用される場合、「スモールRNA」とは、一般に長さ約200ヌクレオチド未満またはそれ未満であり、サイレンシング（silencing）または干渉機能を持つ非コーディングRNAのことを指す。他の実施形態では、スモールRNAは、長さ約175ヌクレオチドもしくはそれ未満、約150ヌクレオチドもしくはそれ未満、約125ヌクレオチドもしくはそれ未満、約100ヌクレオチドもしくはそれ未満、または約75ヌクレオチドもしくはそれ未満である。そのようなRNAには、マイクロRNA（miRNA）、低分子干渉RNA（siRNA）、二本鎖RNA（dsRNA）、および短鎖ヘアピンRNA（shRNA）が含まれる。本開示の「スモールRNA」は、例えば、標的遺伝子mRNAの破壊をもたらす経路を介して、標的遺伝子の遺伝子発現を阻害またはノックダウンすることが可能であるべきである。

【0081】

本明細書で使用される場合、「刺激性作用剤」という用語は、免疫応答を刺激するために使用することができ、限定ではないが、ワクチン、HIVワクチン、およびHIVまたはHIV関連ペプチドを含む、あらゆる外因性作用剤を意味する。刺激性作用剤は、好ましくは、T細胞応答を刺激することができる。

【0082】

本明細書で使用される場合、「対象」という用語は、ヒト患者を含むだけでなく、他の哺乳動物も含む。「対象」、「個体」、「宿主」、および「患者」という用語は、本明細書では交換可能に使用することができる。

【0083】

「治療有効量」という用語は、所定の不快、傷害、疾患、または状態に苦しんでいる患者に見られる症状、進行、または合併症の発症を治療または予防するのに適切な組成物における、および適切な剤形における、本発明の活性剤の十分な量を指す。治療有効量は、患者の状態またはその重篤度、および治療される対象の年齢、体重などに依存して変化するであろう。治療有効量は、例えば、投与経路、対象の状態、ならびに当業者によって理解される他の要因を含む、多くの要因のいずれかに依存して変化し得る。

【0084】

本明細書で使用される場合、「療法用ベクター」という用語は、AGT103ベクターなどのレンチウイルスベクターと同義である。

【0085】

「治療」または「治療する」という用語は、一般に、治療される対象の自然経過を変える試みにおける介入のことを指し、予防のためにかまたは臨床病理の経過の間のいずれかに実施することができる。望ましい効果は、疾患の発生または再発を予防すること、症状を緩和すること、疾患の任意の直接的もしくは間接的な病理学的帰結を抑制、減少、または阻害すること、疾患状態を改善または軽減すること、および寛解または予後の向上を引き起こすことを含むが、これらに限定されない。

【0086】

「ワクチン」という用語は、「療法用ワクチン」という用語と交換可能に使用され、個体に免疫応答を誘発することができる外因性作用剤を指し、限定ではないが、精製タンパク質、不活化ウイルス、ウイルスベクター化タンパク質 (virally vectored protein)、細菌性ベクター化タンパク質 (bacterially vectored protein)、ペプチドもしくはペプチド断片、またはウイルス様粒子 (VLP) を含む。

【0087】

本開示の態様の説明

本明細書に詳述されているように、一態様では、HIV感染に耐性の細胞を産生するための方法が提供される。方法は、一般に、HIV陰性対象から単離された末梢血単核細胞 (PBMC) を、治療有効量の刺激性作用剤と接触させるステップであって、接触ステップが、*ex vivo*で実施されるステップ；*ex vivo*において、少なくとも1つの遺伝的エレメントをコードするウイルス送達システムを用いてPBMCに形質導入するステップ；および形質導入されたPBMCをそのような形質導入を達成するのに十分な期間にわたって培養するステップを含む。実施形態では、形質導入されたPBMCは、約1日～約35日まで培養される。方法は、形質導入されたPBMCを対象に注入するステップをさらに含んでもよい。対象は、ヒトであってもよい。刺激性作用剤は、ペプチドまたはペプチドの混合物を含んでもよく、好ましい実施形態では、gagペプチドを含む。刺激性作用剤は、ワクチンを含んでもよい。ワクチンは、HIVワクチンであってもよく、好ましい実施形態では、HIVワクチンは、MVA/HIV62Bワクチンまたはその改変体である。実施形態では、ウイルス送達システムは、レンチウイルス粒子を含む。実施形態では、少なくとも1つの遺伝的エレメントは、ケモカイン受容体CCR5の産生を阻害することができるスモールRNAを含んでもよい。実施形態では、少なくとも1つの遺伝的エレメントは、HIV RNA配列を標的とすることができる少なく

10

20

30

40

50

とも1つのスモールRNAを含む。他の実施形態では、少なくとも1つの遺伝的エレメントは、ケモカイン受容体CCR5の産生を阻害することができるスモールRNA、およびHIV RNA配列を標的とすることができる少なくとも1つのスモールRNAを含む。HIV RNA配列は、HIV Vif配列、HIV Tat配列、またはそれらの改変体を含んでいてもよい。少なくとも1つの遺伝的エレメントは、マイクロRNAまたはshRNAを含んでいてもよい。好ましい実施形態では、少なくとも1つの遺伝的エレメントは、マイクロRNAクラスターを含む。

【0088】

別の態様では、少なくとも1つの遺伝的エレメントは、

【化22】

AGGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCGACTGTAACTGAGCTTGCTCTACTGTGAAG
CCACAGATGGGTAGAGCAAGCACAGTTTACCGCTGCCTACTGCCTCGGACTTCAA
GGGGCTT (配列番号 1)

10

と少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、またはそれよりも高い同一性パーセントを有するマイクロRNAを含む。好ましい実施形態では、少なくとも1つの遺伝的エレメントは、

20

【化23】

AGGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCGACTGTAACTGAGCTTGCTCTACTGTGAAG
CCACAGATGGGTAGAGCAAGCACAGTTTACCGCTGCCTACTGCCTCGGACTTCAA
GGGGCTT (配列番号 1)

を含む。

【0089】

別の態様では、少なくとも1つの遺伝的エレメントは、

【化24】

CATCTCCATGGCTGTACCACCTTGTGCGGGGATGTGTACTTCTGAACTTGTGTTGA
ATCTCATGGAGTTCAGAAGAACACATCCGCACTGACATTTTGGTATCTTTCATCTG
ACCA (配列番号 2);

30

と少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、もしくはそれよりも高い同一性パーセントを有するか、または

40

【化25】

GGGCCTGGCTCGAGCAGGGGGCGAGGGATTCCGCTTCTTCCTGCCATAGCGTGG
TCCCCTCCCCTATGGCAGGCAGAAGCGGCACCTTCCCTCCCAATGACCGCGTCTTC
GTCG (配列番号 3)

と少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少な

50

くとも 93%、少なくとも 94%、少なくとも 95%、もしくはそれよりも高い同一性パーセントを有するマイクロ RNA を含む。好ましい実施形態では、少なくとも 1 つの遺伝的エレメントは、

【化 26】

CATCTCCATGGCTGTACCACCTTGTCTGGGGGATGTGTACTTCTGAACTTGTGTTGA
ATCTCATGGAGTTCAGAAGAACACATCCGCACTGACATTTTGGTATCTTTCATCTG
ACCA (配列番号 2); または
GGGCCTGGCTCGAGCAGGGGGCGAGGGATTCCGCTTCTTC
CTGCCATAGCGTGGTCCCCTCCCCTATGGCAGGCAGAAGCGGCACCTTCCCCTCCCA
ATGACCGCGTCTTCGTCG (配列番号 3)

10

を含む。

【0090】

別の態様では、マイクロ RNA クラスタは、

【化 27】

AGGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCGACTGTAAACTGAGCTTGCTCTACTGTGAAG
CCACAGATGGGTAGAGCAAGCACAGTTTACCGCTGCCTACTGCCTCGGACTTCAA
GGGGCTTCCCGGGCATCTCCATGGCTGTACCACCTTGTCTGGGGGATGTGTACTTCT
GAACTTGTGTTGAATCTCATGGAGTTCAGAAGAACACATCCGCACTGACATTTTGG
TATCTTTCATCTGACCAGCTAGCGGGCCTGGCTCGAGCAGGGGGCGAGGGATTCC
GCTTCTTCCCTGCCATAGCGTGGTCCCCTCCCCTATGGCAGGCAGAAGCGGCACCTT
CCCTCCCAATGACCGCGTCTTCGTC (配列番号 31)

20

と少なくとも 80%、少なくとも 81%、少なくとも 82%、少なくとも 83%、少なくとも 84%、少なくとも 85%、少なくとも 86%、少なくとも 87%、少なくとも 88%、少なくとも 89%、少なくとも 90%、少なくとも 91%、少なくとも 92%、少なくとも 93%、少なくとも 94%、少なくとも 95%、またはそれよりも高い同一性パーセントを有する配列を含む。好ましい実施形態では、マイクロ RNA クラスタは、

30

【化 28】

AGGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCGACTGTAAACTGAGCTTGCTCT
ACTGTGAAGCCACAGATGGGTAGAGCAAGCACAGTTTACCGCTGCCTACTGCCTC
GGACTTCAAGGGGCTTCCCGGGCATCTCCATGGCTGTACCACCTTGTCTGGGGGATG
TGTACTTCTGAACTTGTGTTGAATCTCATGGAGTTCAGAAGAACACATCCGCACTG
ACATTTTGGTATCTTTCATCTGACCAGCTAGCGGGCCTGGCTCGAGCAGGGGGCGA
GGGATTCCGCTTCTTCCCTGCCATAGCGTGGTCCCCTCCCCTATGGCAGGCAGAAGC
GGCACCTTCCCCTCCCAATGACCGCGTCTTCGTC (配列番号 31)

40

を含む。

【0091】

別の態様では、HIV 陰性対象の HIV 感染を予防するための方法が開示される。方法は、一般に、有効量の第 1 の刺激性作用剤で対象を免疫化するステップ；対象から白血球を取り出し、末梢血単核細胞 (PBM C) を精製するステップを含む。方法は、*ex vivo* において、PBM C を治療有効量の第 2 の刺激性作用剤と接触させるステップ；*ex vivo* において、少なくとも 1 つの遺伝的エレメントをコードするウイルス送達シ

50

システムを用いてP B M Cに形質導入するステップ；および形質導入されたP B M Cを、形質導入を達成するのに十分な期間にわたって培養するステップをさらに含む。方法は、例えば、好ましくはC D 4 + T細胞についてP B M Cを濃縮することにより、P B M Cをさらに濃縮するステップをさらに含んでもよい。実施形態では、形質導入されたP B M Cは、約1日から約35日まで培養される。方法は、形質導入されたP B M Cを対象に注入するステップをさらに含んでもよい。対象は、ヒトであってもよい。第1および第2の刺激性作用剤は、同じであってもよく、または互いに異なってもよい。第1および第2の刺激性作用剤の少なくとも1つは、ペプチドまたはペプチドの混合物を含んでもよい。実施形態では、第1および第2の刺激性作用剤の少なくとも1つは、g a g ペプチドを含む。第1および第2の刺激性作用剤の少なくとも1つは、ワクチンを含んでもよい。ワクチンは、H I Vワクチンであってもよく、好ましい実施形態では、H I Vワクチンは、M V A / H I V 6 2 Bワクチンまたはその改変体である。実施形態では、第1の刺激性作用剤は、H I Vワクチンであり、第2の刺激性作用剤は、g a g ペプチドである。

【0092】

実施形態では、ウイルス送達システムは、レンチウイルス粒子を含む。実施形態では、少なくとも1つの遺伝的エレメントは、ケモカイン受容体C C R 5の産生を阻害することができるスモールRNAを含む。実施形態では、少なくとも1つの遺伝的エレメントは、H I V RNA配列を標的とすることができる少なくとも1つのスモールRNAを含む。実施形態では、少なくとも1つの遺伝的エレメントは、ケモカイン受容体C C R 5の産生を阻害することができるスモールRNA、およびH I V RNA配列を標的とすることができる少なくとも1つのスモールRNAを含む。H I V RNA配列は、H I V V i f配列、H I V T a t配列、またはそれらの改変体を含んでもよい。少なくとも1つの遺伝的エレメントは、マイクロRNAもしくはs h RNAまたはそれらのクラスターを含んでもよい。好ましい実施形態では、少なくとも1つの遺伝的エレメントは、マイクロRNAクラスターを含む。

【0093】

別の態様では、少なくとも1つの遺伝的エレメントは、

【化29】

AGGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCGACTGTAACTGAGCTTGCTCTACTGTGAAG
CCACAGATGGGTAGAGCAAGCACAGTTTACCGCTGCCTACTGCCTCGGACTTCAA
GGGGCTT (配列番号 1)

と少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、またはそれよりも高い同一性パーセントを有するマイクロRNAを含む。好ましい実施形態では、少なくとも1つの遺伝的エレメントは、

【化30】

AGGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCGACTGTAACTGAGCTTGCTCTACTGTGAAG
CCACAGATGGGTAGAGCAAGCACAGTTTACCGCTGCCTACTGCCTCGGACTTCAA
GGGGCTT (配列番号 1)

を含む。

【0094】

別の態様では、少なくとも1つの遺伝的エレメントは、

【化 3 1】

CATCTCCATGGCTGTACCACCTTGTCGGGGGATGTGTACTTCTGAACTTGTGTTGA
ATCTCATGGAGTTCAGAAGAACACATCCGCACTGACATTTTGGTATCTTTTCATCTG
ACCA (配列番号 2);

と少なくとも 80%、もしくは少なくとも 85%、もしくは少なくとも 90%、もしくは
少なくとも 95%の同一性パーセントを有するか、または

【化 3 2】

GGGCCTGGCTCGAGCAGGGGGCGAGGGATTCCGCTTCTTCCTGCCATAGCGTGG
TCCCCTCCCCTATGGCAGGCAGAAGCGGCACCTTCCCCTCCCAATGACCGCGTCTTC
GTCG (配列番号 3)

10

と少なくとも 80%、少なくとも 81%、少なくとも 82%、少なくとも 83%、少なく
とも 84%、少なくとも 85%、少なくとも 86%、少なくとも 87%、少なくとも 88
%、少なくとも 89%、少なくとも 90%、少なくとも 91%、少なくとも 92%、少な
くとも 93%、少なくとも 94%、少なくとも 95%、もしくはそれよりも高い同一性パ
ーセントを有するマイクロRNAを含む。好ましい実施形態では、少なくとも1つの遺伝
的エレメントは、

20

【化 3 3】

CATCTCCATGGCTGTACCACCTTGTCGGGGGATGTGTACTTCTGAACTTGTGTTGA
ATCTCATGGAGTTCAGAAGAACACATCCGCACTGACATTTTGGTATCTTTTCATCTG
ACCA (配列番号 2); または
GGGCCTGGCTCGAGCAGGGGGCGAGGGATTCCGCTTCTTC
CTGCCATAGCGTGGTCCCCTCCCCTATGGCAGGCAGAAGCGGCACCTTCCCCTCCCA
ATGACCGCGTCTTCGTCG (配列番号 3)

30

を含む。

【0095】

別の態様では、マイクロRNAクラスターは、

【化 3 4】

AGGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCGACTGTAACTGAGCTTGCTCTACTGTGAAG
CCACAGATGGGTAGAGCAAGCACAGTTTACCGCTGCCTACTGCCTCGGACTTCAA
GGGGCTTCCCGGGCATCTCCATGGCTGTACCACCTTGTCGGGGGATGTGTACTTCT
GAACTTGTGTTGAATCTCATGGAGTTCAGAAGAACACATCCGCACTGACATTTTGG
TATCTTTTCATCTGACCAGCTAGCGGGCCTGGCTCGAGCAGGGGGCGAGGGATTCC
GCTTCTTCCTGCCATAGCGTGGTCCCCTCCCCTATGGCAGGCAGAAGCGGCACCTT
CCCCTCCCAATGACCGCGTCTTCGTC (配列番号 31)

40

と少なくとも 80%、少なくとも 81%、少なくとも 82%、少なくとも 83%、少なく
とも 84%、少なくとも 85%、少なくとも 86%、少なくとも 87%、少なくとも 88
%、少なくとも 89%、少なくとも 90%、少なくとも 91%、少なくとも 92%、少な
くとも 93%、少なくとも 94%、少なくとも 95%、またはそれよりも高い同一性パ
ーセントを有する配列を含む。好ましい実施形態では、マイクロRNAクラスターは、

50

【化 3 5】

AGGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCGACTGTAAACTGAGCTTGCTCT
ACTGTGAAGCCACAGATGGGTAGAGCAAGCACAGTTTACCGCTGCCTACTGCCTC
GGACTTCAAGGGGCTTCCCGGGCATCTCCATGGCTGTACCACCTTGTCGGGGGATG
TGTACTTCTGAACTTGTGTTGAATCTCATGGAGTTCAGAAGAACACATCCGCACTG
ACATTTTGGTATCTTTCATCTGACCAGCTAGCGGGCCTGGCTCGAGCAGGGGGCGA
GGGATTCCGCTTCTTCCTGCCATAGCGTGGTCCCCTCCCCTATGGCAGGCAGAAGC
GGCACCTTCCCTCCCAATGACCGCGTCTTCGTC (配列番号 31)

10

を含む。

【0096】

別の態様では、レンチウイルスベクターが開示される。レンチウイルスベクターは、少なくとも1つのコードされた遺伝的エレメントを含み、少なくとも1つのコードされた遺伝的エレメントは、ケモカイン受容体CCR5の産生を阻害することができるスモールRNA、またはHIV RNA配列を標的とすることができる少なくとも1つのスモールRNAを含む。別の態様では、少なくとも1つのコードされた遺伝的エレメントが、ケモカイン受容体CCR5の産生を阻害することができるスモールRNA、およびHIV RNA配列を標的とすることができる少なくとも1つのスモールRNAを含む、レンチウイルスベクターが開示される。HIV RNA配列は、HIV Vif配列、HIV Tat配列、またはそれらの改変体を含んでいてもよい。少なくとも1つのコードされた遺伝的エレメントは、マイクロRNAまたはshRNAを含んでいてもよい。少なくとも1つのコードされた遺伝的エレメントは、マイクロRNAクラスターを含んでいてもよい。

20

【0097】

別の態様では、少なくとも1つの遺伝的エレメントは、

【化 3 6】

AGGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCGACTGTAAACTGAGCTTGCTCTACTGTGAAG
CCACAGATGGGTAGAGCAAGCACAGTTTACCGCTGCCTACTGCCTCGGACTTCAA
GGGGCTT (配列番号 1)

30

と少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、またはそれよりも高い同一性パーセントを有するマイクロRNAを含む。好ましい実施形態では、少なくとも1つの遺伝的エレメントは、

【化 3 7】

AGGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCGACTGTAAACTGAGCTTGCTCTACTGTGAAG
CCACAGATGGGTAGAGCAAGCACAGTTTACCGCTGCCTACTGCCTCGGACTTCAA
GGGGCTT (配列番号 1)

40

を含む。

【0098】

別の態様では、少なくとも1つの遺伝的エレメントは、

50

【化 3 8】

CATCTCCATGGCTGTACCACCTTGTCTGGGGGATGTGTACTTCTGAACTTGTGTTGA
ATCTCATGGAGTTCAGAAGAACACATCCGCACTGACATTTTGGTATCTTTCATCTG
ACCA (配列番号 2);

と少なくとも 80 %、少なくとも 81 %、少なくとも 82 %、少なくとも 83 %、少なく
とも 84 %、少なくとも 85 %、少なくとも 86 %、少なくとも 87 %、少なくとも 88
%、少なくとも 89 %、少なくとも 90 %、少なくとも 91 %、少なくとも 92 %、少な
くとも 93 %、少なくとも 94 %、少なくとも 95 %、もしくはそれよりも高い同一性パ
ーセントを有するか、または

10

【化 3 9】

GGGCCTGGCTCGAGCAGGGGGCGAGGGATTCCGCTTCTTCCTGCCATAGCGTGG
TCCCCTCCCCTATGGCAGGCAGAAGCGGCACCTTCCCTCCCAATGACCGCGTCTTC
GTCG (配列番号 3)

と少なくとも 80 %、少なくとも 81 %、少なくとも 82 %、少なくとも 83 %、少なく
とも 84 %、少なくとも 85 %、少なくとも 86 %、少なくとも 87 %、少なくとも 88
%、少なくとも 89 %、少なくとも 90 %、少なくとも 91 %、少なくとも 92 %、少な
くとも 93 %、少なくとも 94 %、少なくとも 95 %、もしくはそれよりも高い同一性パ
ーセントを有するマイクロ RNA を含む。好ましい実施形態では、少なくとも 1 つの遺伝
的エレメントは、

20

【化 4 0】

CATCTCCATGGCTGTACCACCTTGTCTGGGGGATGTGTACTTCTGAACTTGTGTTGA
ATCTCATGGAGTTCAGAAGAACACATCCGCACTGACATTTTGGTATCTTTCATCTG
ACCA (配列番号 2); または
GGGCCTGGCTCGAGCAGGGGGCGAGGGATTCCGCTTCTTC
CTGCCATAGCGTGGTCCCCTCCCCTATGGCAGGCAGAAGCGGCACCTTCCCTCCCA
ATGACCGCGTCTTCGTCG (配列番号 3)

30

を含む。

【0099】

別の態様では、マイクロ RNA クラスターは、

【化 4 1】

AGGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCGACTGTAACTGAGCTTGCTCTACTGTGAAG
CCACAGATGGGTAGAGCAAGCACAGTTTACCGCTGCCTACTGCCTCGGACTTCAA
GGGGCTTCCCGGGCATCTCCATGGCTGTACCACCTTGTCTGGGGGATGTGTACTTCT
GAACTTGTGTTGAATCTCATGGAGTTCAGAAGAACACATCCGCACTGACATTTTGG
TATCTTTCATCTGACCAGCTAGCGGGCCTGGCTCGAGCAGGGGGCGAGGGATTCC
GCTTCTTCCTGCCATAGCGTGGTCCCCTCCCCTATGGCAGGCAGAAGCGGCACCTT
CCCTCCCAATGACCGCGTCTTCGTC (配列番号 31)

40

と少なくとも 80 %、少なくとも 81 %、少なくとも 82 %、少なくとも 83 %、少なく
とも 84 %、少なくとも 85 %、少なくとも 86 %、少なくとも 87 %、少なくとも 88
%、少なくとも 89 %、少なくとも 90 %、少なくとも 91 %、少なくとも 92 %、少な

50

くとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、またはそれよりも高い同一性パーセントを有する配列を含む。好ましい実施形態では、マイクロRNAクラスターは、

【化42】

```
AGGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCGACTGTAAACTGAGCTTGCTCT
ACTGTGAAGCCACAGATGGGTAGAGCAAGCACAGTTTACCGCTGCCTACTGCCTC
GGACTTCAAGGGGCTTCCCGGGCATCTCCATGGCTGTACCACCTTGTCGGGGGATG
TGTACTTCTGAACTTGTGTTGAATCTCATGGAGTTCAGAAGAACACATCCGCACTG
ACATTTTGGTATCTTTTCATCTGACCAGCTAGCGGGCCTGGCTCGAGCAGGGGGCGA
GGGATTCCGCTTCTTCTGCCATAGCGTGGTCCCCTCCCCTATGGCAGGCAGAAGC
GGCACCTTCCCCTCCCAATGACCGCGTCTTCGTC ( 配列番号 31)
```

10

を含む。

【0100】

別の態様では、レンチウイルス粒子を発現するためのレンチウイルスベクターシステムが提供される。システムは、本明細書に記載のようなレンチウイルスベクター；好ましくは細胞に感染するために最適化されているエンベロープタンパク質を発現するための少なくとも1つのエンベローププラスミド；ならびに目的の遺伝子、例えば、*gag*、*pol*、および*rev*遺伝子のいずれかを発現するための少なくとも1つのヘルパープラスミドを含み、レンチウイルスベクター、少なくとも1つのエンベローププラスミド、および少なくとも1つのヘルパープラスミドが、パッケージング細胞にトランスフェクトされると、パッケージング細胞によってレンチウイルス粒子が産生され、レンチウイルス粒子は、目的の標的配列をモジュレーションすることができ、例えば、ケモカイン受容体CCR5の産生を阻害することができるかまたはHIV RNA配列を標的とすることができる。

20

【0101】

別の態様では、細胞に感染することができるレンチウイルス粒子が開示される。レンチウイルス粒子は、好ましくは細胞に感染するために最適化された少なくとも1つのエンベロープタンパク質、および本明細書に記載のようなレンチウイルスベクターを含む。エンベロープタンパク質は、T細胞に感染するために最適化されていてもよい。好ましい実施形態では、エンベロープタンパク質は、CD4+ T細胞に感染するために最適化されている。

30

【0102】

別の態様では、改変細胞が開示される。実施形態では、改変細胞はCD4+ T細胞である。実施形態では、CD4+ T細胞を、本明細書に記載のようなレンチウイルス粒子に感染させる。また、実施形態では、CD4+ T細胞は、刺激性作用剤による以前の免疫化に基づいて、HIV抗原を認識するように選択されている。さらに好ましい実施形態では、CD4+ T細胞により認識されるHIV抗原は、*gag*抗原を含む。さらに好ましい実施形態では、CD4+ T細胞は、レンチウイルス粒子による感染後に、減少したレベルのCCR5を発現する。

40

【0103】

別の態様では、療法的治療レジメン用に対象を選択するための方法が開示される。方法は、一般に、有効量の第1の刺激性作用剤で対象を免疫化するステップ；対象から白血球を取り出し、末梢血単核細胞(PBMC)を精製し、PBMCに関連する少なくとも1つの因子に関連する第1の定量化可能な測定値を決定するステップ；*ex vivo*において、PBMCを、治療有効量の第2の刺激性作用剤と接触させ、PBMCに関連する少なくとも1つの因子に関連する第2の測定値を決定するステップを含み、第2の定量化可能な測定値が、第1の定量化可能な測定値と異なる（例えば、より高い）場合、対象が、治療レジメン用を選択される。少なくとも1つの因子は、T細胞増殖またはIFNガンマ産生であってもよい。

50

【0104】

ヒト免疫不全ウイルス（HIV）

一般に「HIV」とも呼ばれるヒト免疫不全ウイルスは、ヒトにおいて後天性免疫不全症候群（AIDS）を引き起こすレトロウイルスである。AIDSは、免疫システムの進行性の不全により、生命を脅かす日和見感染症およびがんが猛威を振るう状態である。治療なくしては、HIV感染後の平均生存期間は、HIVサブタイプに依存して9～11年と推測される。HIV感染は、血液、精液、膿液、前射精液、唾液、涙液、リンパ液もしくは脳脊髄液、または母乳を含むがそれらに限定されない体液の移入によって起きる。HIVは、感染した個体内に、遊離ウイルス粒子および感染した免疫細胞内の両方として、存在し得る。

10

【0105】

HIVは、ヘルパーT細胞のようなヒト免疫システムの生体細胞に感染するが、指向性はHIVサブタイプ内で様々である可能性がある。HIV感染に特異的に感受性であり得る免疫細胞には、CD4+ T細胞、マクロファージ、および樹状細胞が含まれるが、これらに限定されない。HIV感染は、未感染バイズタンダー細胞のアポトーシス、感染細胞の直接的なウイルス死滅、および感染細胞を認識するCD8細胞傷害性リンパ球による感染CD4+ T細胞の死滅を含むが、これに限定されない数多くのメカニズムにより、CD4+ T細胞のレベルの低下をもたらす。CD4+ T細胞数が臨界レベル以下に低下すると、細胞性免疫が失われ、身体が日和見感染症およびがん、進行性で、より感受性となる。

20

【0106】

構造的に、HIVは他の多くのレトロウイルスとは異なる。RNAゲノムは、19個のタンパク質をコードする、少なくとも7つの構造的ランドマーク（LTR、TAR、RRE、PE、SLIP、CRS、およびINS）および少なくとも9つの遺伝子（gag、pol、env、tat、rev、nef、vif、vpr、vpu、時にはtat、env、およびrevの融合物である10番目のtev）からなる。これらの遺伝子の3つのgag、pol、およびenvには、新しいウイルス粒子の構造タンパク質を作るために必要な情報が含まれている。

【0107】

HIVは主にCD4+ T細胞において複製し、宿主免疫を低下させる細胞破壊または調節不全を引き起こす。HIVは、組み込まれたプロウイルスとして感染を確立し、特定の細胞におけるウイルス発現が、その細胞に影響を及ぼす細胞病理のレベルまたは宿主免疫システムによる検出のレベル未満にまで低下する、潜伏状態に移行する可能性があるため、HIVは治療が困難であり、長期間の高活性抗レトロウイルス療法（HAART）の後でさえも根絶されていない。また、HIVは、HIV陰性個体での予防が困難である。生存期間はHAARTによって延長される場合があるが、ほとんどの場合、HIV感染は致命的な疾患を引き起こす。

30

【0108】

HIVとの戦いにおける主な目標は、この疾患を治療および／または予防するための戦略を開発することである。延長されたHAARTはこの目標の達成には至っていないので、研究者は代替手順に目を向けている。（例えば、感染が起きた後にワクチンを使用する）療法的免疫化による宿主免疫を改善するための初期の努力は、わずかな影響しかないか影響がなかった。同様に、治療の強化は中程度の影響を有したかまたは影響がなかった。

40

【0109】

遺伝子治療を用いることで、いくつかの進歩がみられたが、ポジティブな結果は孤発性であり、宿主細胞のウイルス浸透に重要な役割を果たすCCR5（ケモカイン受容体）をコードする遺伝子の1つまたは両方の対立遺伝子に欠損を有するまれなヒトの間でのみ見出された。しかしながら、多くの研究者は、遺伝子治療が最終的にHIV治療を達成するための最高の将来性を持っていると楽観的である。

【0110】

50

本明細書に開示されるように、本開示の方法および組成物は、身体からのすべてのHIVの完全な根絶を含んでも、または含まなくてもよい機能的治癒を達成することができる。上記で言及されているように、機能的治癒は、以前にHAARTを必要としていたHIV+個体が、低いまたは検出不可能なウイルス複製とともに生存し、より低いまたは断続的な用量のHAARTを使用しているか、または潜在的にHAARTを完全に中止することができる、状況または状態として定義される。本明細書で使用されるように、機能的治癒は、低レベルのウイルス複製を維持し、疾患の進行を遅らせるかまたは排除するために、補助療法を必要とする可能性がなお、あるかもしれない。機能的治癒の可能な予後は、すべての再発の可能性を防ぐためのHIVの最終的な根絶である。さらに、本開示の方法および組成物は、HIV陰性個体のHIV感染を予防することができる。

10

【0111】

機能的治癒を達成するための主な障害は、HIV自体の基本的な生物学にある。ウイルス感染は、ほぼすべての免疫機能にとって重要なCD4 T細胞を欠失させる。最も重要なことに、HIV感染およびCD4 T細胞の枯渇は、個々の細胞の活性化を必要とする。活性化とは、再編成されたT細胞受容体を使用して病原体または他の分子を認識する個々のCD4 T細胞クローンに特異的な機構である。

【0112】

HIVの場合、感染は、ウイルスにそれほど特異的でない他のT細胞の前に、HIVに特異的なT細胞の集団を活性化させ、結果的に枯渇させ、ウイルスに対する免疫システムの防御を効率的に無能化する。HIV特異的T細胞応答の能力は、長期間のHAART中に再構築される；しかしながら、HAARTが中断されると、反復性ウイルス感染はプロセスを反復し、再びウイルス特異的細胞を欠失させ、疾患の進行の時計をリセットする。

20

【0113】

明らかに、機能的治癒は、十分なHIV特異的CD4 T細胞が保護されて、HAARTが中断されても宿主の自然免疫がHIVに対抗して制御するようになる場合にのみ可能である。同様に、ワクチンまたは予防戦略の成功には、HIV陰性個体が最初にウイルスに遭遇した際に、HIVに対抗してHIVを死滅させるのに十分なHIV特異的CD4 T細胞が存在することも必要である。一実施形態では、本開示は、HIV疾患の機能的治癒を提供するための遺伝子治療の有効性を改善するための方法および組成物を提供する。別の実施形態では、本開示は、機能的治癒を提供するために、HIVに対する宿主免疫を増強するための方法および組成物を提供する。さらに別の実施形態では、本開示は、機能的治癒を達成するために、患者のHIV特異的CD4 T細胞を濃縮するための方法および組成物を提供する。

30

【0114】

一実施形態では、治療は、対象のHIV特異的CD4 T細胞を、約100%、約200%、約300%、約400%、約500%、約600%、約700%、約800%、約900%、または約1000%濃縮する結果となる。

【0115】

遺伝子治療

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

40

【0116】

遺伝子構築物は、機能的遺伝子または既存の欠陥を修正または補完する遺伝子の一部、調節タンパク質をコードするDNA配列、アンチセンス、短いホモロジーRNA、長い非コードRNA、低分子干渉RNAまたはその他を含む調節RNA分子をコードするDNA配列、および疾患状態を変化させるために重要な細胞因子について競合するように設計されたRNAまたはタンパク質のいずれかをコードするデコイ配列を含むことができるが、それらに限定されない。遺伝子治療は、特定の疾患の治療または緩和を提供するために、これらの療法用遺伝子構築物を標的細胞に送達することを含む。

【0117】

50

H I V 疾患の治療において遺伝子治療を利用する努力は複数行われてきているが、これまでのところ、結果は貧弱である。C C R 5 遺伝子の自発的欠失 (C C R 5 d e l t a 3 2 として公知である対立遺伝子) を有するまれな H I V 患者において、少数の治療成功が得られた。

【0118】

レンチウイルスにより送達されたヌクレアーゼまたは遺伝子欠失／修飾のための他の機構を使用して、C C R 5 の全体的発現を低下させ、および／または H I V 複製を低下させるのを助けることができる。レンチウイルスが C C R 5 d e l t a 3 2 の遺伝的背景を有する患者に投与された場合にこの疾患の治療に成功したことを報じる研究が、少なくとも 1 つある。しかしながら、これは成功のわずか一例に過ぎず、C C R 5 d e l t a 3 2 遺伝子型を持たない多くの他の患者はうまく治療されていない。その結果、個々のウイルスベクター構築物の性能および機能的 H I V 治療を達成するための戦略によるベクターの使用の改善の両方の点で、H I V に対するウイルス遺伝子治療の性能を改善する実質的な必要性がある。

【0119】

例えば、いくつかの既存の療法は、細胞を H I V 感染に対して抵抗性にする試みにおいて、ジンクフィンガーヌクレアーゼに依存して、C C R 5 の一部を欠失させる。しかしながら、最適な治療の後でさえも、T 細胞の 3 0 % だけがヌクレアーゼによって改変されるのみであり、改変されたもののうち、全 C D 4 T 細胞集団のわずか 1 0 % が H I V 感染を予防するように改変されただけであった。対照的に、開示された方法は、レンチウイルス導入遺伝子を保有する実質的にすべての細胞で、H I V 感染を可能にするのに必要なレベル未満まで C C R 5 発現が減少する結果となる。

【0120】

開示される方法の目的のために、遺伝子治療には、親和性が増強された T 細胞受容体、C D 4 T 細胞上の (または代替的に C D 8 T 細胞上の) キメラ抗原受容体、ウイルスタンパク質により引き起こされる細胞死を避けるためのシグナル伝達経路の改変、T R E X、S A M H D 1、M x A または M x B タンパク質、A P O B E C 複合体、T R I M 5 - アルファ複合体、テザリン (tetherin ; B S T 2)、および哺乳動物細胞における H I V 複製を減少させることができるものと識別された類似のタンパク質を含む H I V 制限エレメントの発現の増加を含むことができるが、それらに限定されない。

【0121】

免疫療法

歴史的に、ワクチンは、天然痘、ポリオ、麻疹、黄熱病を含む、致命的な感染性疾患に対する頼りになる武器であった。残念ながら、現在のところ、H I V については承認されているワクチンはない。H I V ウイルスは、免疫システムを回避する独特の手段を持っており、人体はそれに対して有効な免疫応答を実装することができないようである。その結果、科学者は H I V に対する保護を提供するために何が必要であるかを明確に把握していない。

【0122】

しかしながら、免疫療法は、従来のワクチン接種アプローチによっては以前に対処できなかった解決法を提供し得る。生物学的療法とも呼ばれる免疫療法は、感染症またはがんと戦うための身体の自然防御を強化するために設計された治療の一型である。それは、免疫システムの機能を改善、標的化、または回復させるために、身体あるいは実験室のいずれかにおいて作られた材料を使用する。

【0123】

本開示の一部の実施形態では、宿主の抗 H I V 免疫を増加させる目的で、H I V 特異的 C D 4 T 細胞の集団を濃縮するために、免疫療法アプローチを使用することができる。これは、H I V 陰性個体および H I V 陽性個体の両方にとって有益である。本開示の一部の実施形態では、宿主の抗 H I V 免疫を増加させる目的で、宿主の免疫細胞に形質導入するために、組み込みまたは非組み込みのレンチウイルスベクターを使用することができる

。本開示のさらに別の実施形態では、宿主の免疫応答を増加させるための適切なビヒクルおよび／または生物学的もしくは化学的アジュバントと組み合わせた、死滅粒子、ウイルス様粒子、HIVペプチドまたはペプチド断片、組換えウイルスベクター、組換え細菌ベクター、精製サブユニットまたはプラスミドDNAを含むがこれらに限定されないHIVタンパク質を含むワクチンは、ウイルス特異的T細胞または抗体の集団を濃縮するために使用することができ、ならびにこれらの方法は、レンチウイルスまたは他のウイルスベクターを使用したHIV標的化遺伝子治療の使用によってさらに増強され得る。

【0124】

方法

一態様では、本開示は、HIV疾患の機能的治癒を達成するためにウイルスベクターを使用する方法を提供する。この方法は、一般に、HIV特異的CD4⁺T細胞の割合を濃縮させるための免疫療法、続く、必要に応じてHIVおよびCCR5およびCXCR4の阻害剤を送達するためのレンチウイルス形質導入を含む。これらの方法は、HIV陰性個体およびHIV陽性個体の両方に関連して使用することができる。

【0125】

一実施形態では、方法は、HIV特異的CD4⁺T細胞の割合を濃縮させるための第1の刺激事象を含む。第1の刺激は、ワクチンを含むがこれに限定されない、患者のHIV特異的CD4⁺T細胞の濃縮に適切な任意の作用剤の1つまたは複数を投与することを含んでいてもよい。

【0126】

療法用ワクチンは、治療が行われている地理的領域の支配的なウイルス型を表すタンパク質配列を有する1つまたは複数のHIVタンパク質を含むことができる。療法的ワクチンには、精製タンパク質、不活化ウイルス、ウイルスベクター化タンパク質、細菌性ベクター化タンパク質、ペプチドまたはペプチド断片、ウイルス様粒子(VLP)、サイトカインおよび／もしくはケモカインを含む生物学的または化学的アジュバント、ビヒクル、ならびに免疫化のための方法が含まれ得る。ワクチン接種は、当該分野で公知の標準的な方法に従って投与することができ、HIV患者は、免疫化の期間およびその後のレンチウイルス形質導入を含むex vivoリンパ球培養の間に抗レトロウイルス療法を続けることができる。

【0127】

一部の実施形態では、HIV⁻またはHIV⁺患者をHIVワクチンで免疫化して、HIV特異的CD4⁺T細胞の頻度を、約2、約25、約250、約500、約750、約1000、約1250、または約1500倍（またはこれらの値の間の任意の量）増加させる。ワクチンは、ワクチン送達システムとして使用される、開示されたレンチウイルス、他のウイルスベクターまたは他の細菌ベクターを含む、臨床的に利用されるかまたは実験的なHIVワクチンであってもよい。別の実施形態では、ベクターは、中和抗体のより高い力価を誘導するためにウイルス様粒子(VLP)をコードする。別の実施形態では、ベクターは、gag、pol、およびenv、tat、rev、nef、vif、vpr、vpu、およびtevならびにLTR、TAR、RRE、PE、SLIP、CRS、およびINSを含むがこれらに限定されないHIVに関連するペプチドまたはペプチド断片をコードする。代替的には、開示された方法で使用されるHIVワクチンは、精製タンパク質、不活化ウイルス、ウイルスベクター化タンパク質、細菌性ベクター化タンパク質、ペプチドまたはペプチド断片、ウイルス様粒子(VLP)、またはサイトカインおよび／もしくはケモカインを含む生物学的または化学的アジュバントを含んでもよい。

【0128】

一実施形態では、本方法は、精製タンパク質、不活化ウイルス、ウイルスベクター化タンパク質、細菌性ベクター化タンパク質、サイトカインおよび／もしくはケモカインを含む生物学的または化学的アジュバント、ビヒクル、および再刺激のための方法を使用して、療法ワクチン接種により以前に免疫化された人または患者からのCD4⁺T細胞のex vivo再刺激を含む。ex vivo再刺激は、in vivo免疫化のために使用され

10

20

30

40

50

るものと同じワクチンまたは免疫刺激化合物を使用して実施され得るか、または *in vivo* 免疫化のために使用されるものとは異なるワクチンまたは免疫刺激化合物を使用して実施され得る。さらに、一部の実施形態では、個体が HIV タンパク質に対して十分に高い抗原特異的 CD4 T 細胞応答を有する場合、患者は、以前の療法ワクチン接種または CD4 T 細胞の再刺激を必要としない。これらの実施形態では、そのような患者は、機能的治癒を達成するために、開示されたウイルスベクターの投与のみを必要とすることがある。

【0129】

実施形態では、末梢血単核細胞 (PBMC) は白血球アフェレーシスによって得られ、*ex vivo* で処理され、約 1×10^{10} 個の CD4 T 細胞を得、その約 0.1%、約 1%、約 5%、または約 10%、または約 30% は、抗原応答の点で HIV 特異的であり、かつ開示されたレンチウイルスベクターによって送達される療法用導入遺伝子を有することにより HIV 耐性である。代替的には、約 1×10^7 、約 1×10^8 、約 1×10^9 、約 1×10^{10} 、約 1×10^{11} 、または約 1×10^{12} 個の CD4 T 細胞を再刺激のために単離することができる。重要なことに、*ex vivo* における再刺激のために、任意の適切な量の CD4 T 細胞が単離される。

【0130】

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

【0131】

PBMC 画分は、*in vivo* 免疫化のために以前に使用されたワクチンの成分と一致または相補的な HIV タンパク質と細胞を接触させることによって、HIV 特異的 CD4 T 細胞について濃縮され得る。*ex vivo* 再刺激は、HIV 特異的 CD4 T 細胞の相対頻度を約 5、約 10、約 25、約 50、約 75、約 100、約 125、約 150、約 175、または約 200 倍増加させることができる。

【0132】

本方法はさらに、*in vivo* での療法的免疫化と *ex vivo* でのレンチウイルス形質導入および培養を用いた *ex vivo* での CD4 T 細胞の再刺激とを組み合わせることを含む。本明細書に詳述されているように、これらの方法は、HIV 陰性個体にワクチン接種するためにまたは予防的（つまり、予防用）治療を提供するために使用することができる。

【0133】

したがって、一実施形態では、HIV 特異的 CD4 T 細胞について濃縮された再刺激された PBMC 画分は、療法用抗 HIV レンチウイルスまたは他のベクターを用いて形質導入され得、そのような形質導入に十分な期間にわたって、最大約 35 日を含む、例えば、約 1～約 21 日まで、培養物中に維持され得る。代替的には、細胞は、約 1～約 18 日間、約 1～約 15 日間、約 1～約 12 日間、約 1～約 9 日間、または約 3～約 7 日間培養され得る。したがって、形質導入された細胞は、約 1、約 2、約 3、約 4、約 5、約 6、約 7、約 8、約 9、約 10、約 11、約 12、約 13、約 14、約 15、約 16、約 17、約 18、約 19、約 20、約 21、約 22、約 23、約 24、約 25、約 26、約 27、約 28、約 29、約 30、約 31、約 32、約 33、約 34、または約 35 日間、培養されてもよい。

【0134】

さらなる実施形態では、形質導入された細胞が十分な期間にわたって培養されると、形

10

20

30

40

50

質導入されたCD4 T細胞が元の患者に注入し、戻される。注入は、当該技術分野において公知の様々なデバイスおよび方法を使用して実施することができる。一部の実施形態では、注入には、再移植の効率を高めるために、シクロホスファミドまたは同様の化合物での事前治療を伴ってもよい。再移植された細胞は、HIV陰性であるが、その後将来的にHIVウイルスに遭遇する対象にとって有効な予防的免疫応答を提供することができる。

【0135】

一部の実施形態では、CCR5標的療法は、治療プロセスを通して継続して、対象の抗レトロウイルス療法レジメンに加えられてもよい。CCR5標的療法の例としては、マラビロク（Maraviroc；CCR5アンタゴニスト）またはラパマイシン（Rapamycin；CCR5を低下させる免疫抑制剤）が挙げられるが、これらに限定されない。一部の実施形態では、抗レトロウイルス療法は中止され、対象はウイルスのリバウンドについて試験されることができる。リバウンドが起こらない場合、アジュバント療法もまた取り除くことができ、対象はウイルスのリバウンドについて再び試験されることができる。

【0136】

種々の実施形態では、約26週間にわたり、cARTまたはHAARTを含めた抗レトロウイルス療法を減少させたか、または伴わず、かつアジュバント療法を減少させたか、または伴わない継続的なウイルス抑制は、HIVの機能的治癒と考えることができる。機能的治癒の他の定義は、本明細書に記載されている。

【0137】

開示された方法で使用するレンチウイルスベクターおよび他のベクターは、少なくとも1つ、少なくとも2つ、少なくとも3つ、少なくとも4つ、もしくは少なくとも5つの目的の遺伝子、または少なくとも6つの目的の遺伝子、または少なくとも7つの目的の遺伝子、または少なくとも8つの目的の遺伝子、または少なくとも9つの目的の遺伝子、または少なくとも10個の目的の遺伝子、または少なくとも11個の目的の遺伝子、または少なくとも12個の目的の遺伝子をコードし得る。HIV標的化遺伝子治療の多様性および治療可能性を考慮すると、本発明のウイルスベクターは、(i) 感染性疾患に関連する抗原または感染性病原体により産生された毒素に対する抗体、(ii) 免疫細胞の増殖または機能に必要で、HIVおよび他の慢性または急性のヒトウイルスまたは細菌病原体で遭遇する免疫調節不全のための療法であり得る、インターロイキンを含むサイトカイン、(iii) CD8抑制因子を含むin vivoにおいてHIVの増殖を抑制する因子、(iv) ケモカイン受容体CCR5の変異もしくは欠失、ケモカイン受容体CXCR4の変異もしくは欠失、またはケモカイン受容体CXCR5の変異もしくは欠失、(v) HIVに関連する特異的受容体もしくはペプチドまたはHIVに関連する宿主タンパク質に対するアンチセンスDNAまたはRNA、(vi) HIVに関連する特異的受容体もしくはペプチドまたはHIVに関連する宿主タンパク質に対する低分子干渉RNA、または(vii) HIVまたはAIDSを治療するために使用され得る様々な他の療法的に有用な配列を含むがそれらに限定されない遺伝子または核酸配列をコードしてもよい。

【0138】

開示された方法において使用することができるHIV標的化遺伝子治療のさらなる例は、親和性が増強されたT細胞受容体、CD4 T細胞上の（または代替的にはCD8 T細胞上の）キメラ抗原受容体、ウイルスタンパク質により引き起こされる細胞死を避けるためのシグナル伝達経路の改変、TREX、SAMHD1、MxAまたはMxBタンパク質、APOBEC複合体、TRIM5-アルファ複合体、テザリン（BST2）、および哺乳動物細胞におけるHIV複製を減少させることができるものと識別された類似のタンパク質を含むHIV制限エレメントの発現の増加を含むことができるが、それらに限定されない。

【0139】

一部の実施形態では、患者は、本発明の方法に従って治療されている間と同時にcARTまたはHAARTを受けていてもよい。他の実施形態では、患者は、本発明の方法に従って治療される前または後に、cARTまたはHAARTを受けてもよい。一部の実施形

態では、cARTまたはHAARTは、本発明の方法に従った治療を通して維持され、患者は血液中のHIVウイルス負荷についておよび血液中のレンチウイルス形質導入CD4 T細胞の頻度についてモニターされてもよい。好ましくは、本発明の方法に従って治療される前にcARTまたはHAARTを受けている患者は、本発明の方法に従った治療の後にcARTまたはHAARTを中止または減少することができる。他の実施形態では、患者は、HIV陰性であり、HIVウイルスにまだ遭遇していない。

【0140】

有効性の目的のために、遺伝子治療効果についての新規の代用マーカーである形質導入されたHIV特異的CD4 T細胞の頻度を、本明細書でより詳細に議論されているように決定してもよい。

【0141】

組成物

種々の態様では、本開示は、感受性細胞のHIV侵入を阻害するために遺伝子構築物を送達することができるレンチウイルスベクターを提供する。例えば、本明細書による1つの作用メカニズムは、感受性細胞へのウイルス進入の速度を減少させるために、CCR5および／またはCXCR4ケモカイン受容体のmRNAレベルを減少させることである。

【0142】

代替的には、開示されるレンチウイルスベクターは、入ってくるHIVゲノムRNAの安定性を減少させることによって、HIV感染細胞の形成を阻害することができる。さらに別の実施形態では、開示されたレンチウイルスベクターは、潜伏感染細胞からのHIV産生を防止することができ、その作用メカニズムは、短い相同性、低分子干渉性、または他の調節RNA種を含む阻害性RNAの作用により、ウイルスRNA配列の不安定性を引き起こすことである。

【0143】

開示される療法用レンチウイルスは、一般に、2つの型の遺伝子カーゴ(genetic cargo)のうちの少なくとも1つを含む。第1に、レンチウイルスは、感受性細胞のHIV侵入にとって重要なケモカイン受容体CCR5および／またはCXCR4の産生を阻害することができるスモールRNAの発現を導く遺伝的エレメントをコードしてもよい。第2の型の遺伝子カーゴは、逆転写、RNAスプライシング、タンパク質を産生するRNA翻訳、または粒子産生および感染蔓延のためのウイルスゲノムRNAのパッケージングを防止する目的で、HIV RNA配列を標的とするスモールRNA分子を発現することができる構築物を含む。例示的な構造を図3に図示する。

【0144】

図3に示すように(上パネル)、例示的な構築物は、多数のセクションまたは構成要素を含むことができる。例えば、一実施形態では、例示的なLV構築物は、以下のセクションまたは構成要素を含み得る：

- ・RSV — ラウス肉腫ウイルス(Rous Sarcoma virus)末端反復配列；
- ・5'LTR — 染色体組み込み後にベクターの複製を阻止するために切断され得るHIV末端反復配列の一部；
- ・Psi — パッケージング中にベクターRNAゲノムをウイルス粒子に取り込むことを可能にするパッケージングシグナル；
- ・RRE — Rev反応性エレメントは、RNAを核から細胞の細胞質に移動することによって導入遺伝子からの発現を改善するために添加することができる；
- ・cPPT — 宿主細胞の染色体に導入遺伝子を組み込む前に、第2鎖DNA合成を促進するポリプリントラクト(poly purine tract)；
- ・プロモーター — プロモーターとは、マイクロRNAクラスター(または構築物の他の遺伝子エレメント)を発現するために、組み込まれた導入遺伝子からRNA転写を開始するものであり、一部の実施形態では、ベクターはEF-1プロモーターを使用してもよい；
- ・Anti-CCR5 — 宿主細胞因子CCR5のメッセンジャーRNAを標的とし

10

20

30

40

50

て、細胞表面上の発現を減少させるマイクロRNA；

・Ant i-Rev/Tat — HIV Revコーディング領域とTatコーディング領域の間の接合部にあるHIVゲノムRNAまたはメッセンジャーRNAを標的とするマイクロRNAであり、時にはmiRNA Tatと称されるか、またはこの出願において同様の記載が与えられる；

・Ant i-Vif — Vifコーディング領域内のHIVゲノムRNAまたはメッセンジャーRNAを標的とするマイクロRNA；

・WPRE — ウッドチャック肝炎ウイルス転写後調節エレメント (woodchuckhepatitis virus post-transcriptional regulatory element) は、核のRNA輸送を促進するために使用することができる追加のベクター構成成分である；および

・deltaU3 3'LTR — ベクターの安全性を改善するためにU3領域の一部が欠失している、HIV 3'末端反復配列の改変バージョン。

【0145】

当業者であれば、上記の構成成分は単なる例であり、そのような構成成分は、構築物がHIV遺伝子の発現を阻止し、感染の蔓延を減少させることができる限り、他のエレメントで再編成され、置換され、さもなければ改変され得ることを、認識し得る。

【0146】

本発明のベクターは、上に議論した遺伝子カーゴの型（すなわち、遺伝子の発現を導く遺伝子エレメントまたは翻訳もしくは転写を阻止することができるsiRNA、shRNAもしくはmiRNAのようなスモールRNA）の一方または両方を含んでもよく、本発明のベクターはまた、HIVの治療または診断の目的のためにさらなる有用な産物をコードしてもよい。例えば、一部の実施形態では、これらのベクターはまた、in vivoで遺伝子改変細胞を選択的に維持する目的で、ベクターまたは抗生物質耐性遺伝子を追跡する目的で、緑色蛍光タンパク質 (GFP) をコードしてもよい。

【0147】

開示されるベクターに組み込まれる遺伝的エレメントの組合せは、特に限定されない。例えば、本明細書のベクターは、1個のスモールRNA、2個のスモールRNA、3個のスモールRNA、4個のスモールRNA、5個のスモールRNA、6個のスモールRNA、7個のスモールRNA、8個のスモールRNA、9個のスモールRNA、または10個のスモールRNA、または11個のスモールRNA、または12個のスモールRNAをコードしてもよい。そのようなベクターは、HIVの発現および感染を阻止するために、スモールRNAと協調して機能する他の遺伝的エレメントを、さらにコードしてもよい。

【0148】

当業者は、療法用レンチウイルスが、プロモーター領域、調節RNAの標的化、および調節RNAの型に対して代替配列を置換し得ることを理解し得る。さらに、本開示の療法用レンチウイルスは、レンチウイルス粒子をパッケージングするために使用されるプラスミド内に改変を含んでもよい；これらの改変は、in vitroにおける産生のレベルを増加させるために必要となる。

【0149】

レンチウイルスベクターシステム

本明細書の種々の態様および実施形態によるレンチウイルスビリオン（粒子）は、ビリオン（ウイルス粒子）の産生に必要なウイルスタンパク質をコードするベクターシステムによって発現される。種々の実施形態では、レンチウイルスpolタンパク質をコードする核酸配列を含む1つのベクターが、逆転写および組み込みのために提供されており、プロモーターに作動可能に連結されている。別の実施形態では、polタンパク質は、複数のベクターによって発現される。他の実施形態では、ウイルスカプシドを形成するためのレンチウイルスgagタンパク質をコードし、プロモーターに作動可能に連結した核酸配列を含むベクターが提供される。実施形態では、このgag核酸配列は、pol核酸配列の少なくともいくつかとは別個のベクターに存在する。他の実施形態では、gag核酸は、polタンパク質をコードする全てのpol核酸配列とは別個のベクターに存在する。

【0150】

本明細書のベクターには、多数の改変を施すことができる。そうした改変は、野生型復帰変異体を得る可能性がさらに最小限に抑えられた粒子を作出するために使用される。それらには、LTRのU3領域の欠失、tat欠失、およびマトリクス(MA)欠失が含まれるが、これらに限定されない。

【0151】

実施形態では、gag、pol、およびenvベクターは、レンチウイルスパッケージング配列と呼ばれる、レンチウイルスRNAをパッケージングするレンチウイルスゲノム由来ヌクレオチドを含んでいない。

【0152】

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

【0153】

別の実施形態では、エンベロープタンパク質は、レンチウイルスではなく、異なるウイルスに由来する。その結果生じる粒子は、偽型粒子と呼ばれる。エンベロープを適切に選択することにより、事実上あらゆる細胞に「感染」させることができる。例えば、インフルエンザウイルス、VSV-G、アルファウイルス(セムリキ森林熱ウイルス、シンドビスウイルス)、アレナウイルス(リンパ球脈絡髄膜炎ウイルス)、フラビウイルス(ダニ媒介性脳炎ウイルス、デング熱ウイルス、C型肝炎ウイルス、GBウイルス)、ラブドウイルス(水疱性口内炎ウイルス、狂犬病ウイルス)、パラミクソウイルス(流行性耳下腺炎または麻疹)、およびオルトミクソウイルス(インフルエンザウイルス)のものなどの、エンドサイトーシス性区画(endocytic compartment)を標的とするエンベロープタンパク質をコードするenv遺伝子を使用することができる。好ましく使用することができる他のエンベロープには、MLV-E、MLV-A、およびGALVなどの、モロニー白血病ウイルスに由来するものが含まれる。これら後者のエンベロープは、宿主細胞が初代細胞である場合、特に好ましい。所望の宿主細胞に応じて、他のエンベロープタンパク質を選択してもよい。例えば、脳送達には、ドーパミン受容体などの標的化特異的受容体を使用することができる。別の標的は、血管内皮であってもよい。これら細胞は、フィロウイルスエンベロープを使用して標的とすることができる。例えば、転写後修飾によりGPおよびGP₂糖タンパク質になるエボラのGP。別の実施形態では、偽型エンベロープを有する様々なレンチウイルスカプシドを使用することができる(例えば、FIVまたはSHIV[米国特許第5,654,195号])。SHIV偽型ベクターは、サルなどの動物モデルで容易に使用することができる。

【0154】

本明細書に提供されているようなレンチウイルスベクターシステムは、典型的には、gag、pol、またはrev遺伝子の少なくとも1つを含む少なくとも1つのヘルパープラスミドを含む。gag、pol、rev遺伝子の各々は、個々のプラスミドに提供されていてもよく、または1つもしくは複数の遺伝子が、同じプラスミドと一緒に提供されていてもよい。一実施形態では、gag、pol、およびrev遺伝子は、同じプラスミドに提供されている(例えば、図4)。別の実施形態では、gagおよびpol遺伝子は、第1のプラスミドに提供されており、rev遺伝子は、第2のプラスミドに提供されている(例えば、図5)。したがって、3ベクターシステムおよび4ベクターシステムは両方とも、本明細書に記載のようなレンチウイルスを産生するために使用することができる。実施形態では、療法用ベクター、少なくとも1つのエンベローププラスミド、および少なくとも1つのヘルパープラスミドは、パッケージング細胞、例えばパッケージング細胞株にトランスフェクトされる。パッケージング細胞株の非限定的な例は、293T/17HEK細胞株である。療法用ベクター、エンベローププラスミド、および少なくとも1つ

10

20

30

40

50

のヘルパープラスミドが、パッケージング細胞株にトランスフェクトされると、最終的にレンチウイルス粒子が産生される。

【0155】

別の態様では、レンチウイルス粒子を発現するためのレンチウイルスベクターシステムが開示される。システムは、本明細書に記載のようなレンチウイルスベクター；細胞に感染するために最適化されているエンベロープタンパク質を発現するためのエンベローププラスミド；および *gag*、*pol*、および *rev* 遺伝子を発現するための少なくとも1つのヘルパープラスミドを含み、レンチウイルスベクター、エンベローププラスミド、および少なくとも1つのヘルパープラスミドが、パッケージング細胞株にトランスフェクトされると、パッケージング細胞株によってレンチウイルス粒子が産生され、レンチウイルス粒子は、ケモカイン受容体 *CCR5* の産生を阻害することができるかまたは *HIV RNA* 配列を標的とすることができる。

10

【0156】

別の態様では、本明細書では療法用ベクターとも呼ばれるレンチウイルスベクターは、以下のエレメントを含む：ハイブリッド 5' 末端反復配列 (*RSV/5'LTR*) (配列番号34~35)、*Psi* 配列 (*RNA* パッケージング部位) (配列番号36)、*RRE* (*Rev* 応答エレメント) (配列番号37)、*cPPT* (ポリプリントラクト) (配列番号38)、*EF-1 α* プロモーター (配列番号4)、*miR30CCR5* (配列番号1)、*miR21Vif* (配列番号2)、*miR185Tat* (配列番号3)、ウッドチャック転写後調節エレメント (*WPRE*) (配列番号32または80)、および $\Delta U3$ 3' *LTR* (配列番号39)。別の態様では、置換、欠失、付加、または変異による配列改変を使用して、参照されている配列を改変することができる。

20

【0157】

別の態様では、ヘルパープラスミドは、以下のエレメントを含むように設計されている：*CAG* プロモーター (配列番号41)；*HIV* 成分 *gag* (配列番号43)；*HIV* 成分 *pol* (配列番号44)；*HIV Int* (配列番号45)；*HIV RRE* (配列番号46)；および *HIV Rev* (配列番号47)。別の態様では、ヘルパープラスミドは、*gag* および *pol* 遺伝子を発現するための第1のヘルパープラスミド、ならびに *rev* 遺伝子を発現するための第2の別のプラスミドを含むように改変されていてもよい。別の態様では、置換、欠失、付加、または変異による配列改変を使用して、参照されている配列を改変することができる。

30

【0158】

別の態様では、エンベローププラスミドは、以下のエレメントを含む：*RNA* ポリメラーゼ *II* プロモーター (*CMV*) (配列番号60) および水疱性口内炎ウイルス *G* 糖タンパク質 (*VSV-G*) (配列番号62)。別の態様では、置換、欠失、付加、または変異による配列改変を使用して、参照されている配列を改変することができる。

【0159】

種々の態様では、レンチウイルスパッケージングに使用されるプラスミドは、ベクター機能を喪失させずに、種々のエレメントの置換、付加、差引き (*subtraction*)、または変異により改変されている。例えば、限定ではないが、パッケージングシステムを含むプラスミドの類似エレメントの代わりに、以下のエレメントを使用することができる：伸長因子-1 (*EF-1*)、ホスホグリセリン酸キナーゼ (*PGK*)、およびユビキチン *C* (*UbC*) プロモーターを、*CMV* または *CAG* プロモーターの代わりに使用することができる。*SV40* ポリ *A* および *bGH* ポリ *A* を、ウサギベータグロビンポリ *A* の代わりに使用することができる。ヘルパープラスミドの *HIV* 配列は、異なる *HIV* 株またはクレードから構築されていてもよい。*VSV-G* 糖タンパク質を、ネコ内在性ウイルス (*RD114*)、テナガザル類人猿白血病ウイルス (*GALV*)、狂犬病 (*FUG*)、リンパ球脈絡髄膜炎ウイルス (*LCMV*)、インフルエンザ *A* 型家禽ペストウイルス (*FPV*)、ロスリバーアルファウイルス (*RRV*)、マウス白血病ウイルス *10A1* (*MLV*)、またはエボラウイルス (*EboV*) に由来する膜糖タンパク質と置換することができる。

40

50

【0160】

種々のレンチウイルスパッケージングシステムは、商業的に入手することができ（例えば、OriGene Technologies, Inc.、Rockville, MDのLenti-vpakパッケージングキット）、本明細書に記載のように設計することもできる。さらに、レンチウイルス粒子の産生効率を含む任意の数の関連要因を改善するために、レンチウイルスパッケージングシステムの態様を置換または改変することは、当業者の技術範囲にある。

【0161】

バイオアッセイ

種々の態様では、本発明は、機能的治癒を達成するためのHIV治療の成功を決定するためのバイオアッセイを含む。これらのアッセイは、患者における形質導入されたHIV特異的CD4 T細胞の頻度を測定することによって、開示された免疫化および治療の方法の有効性を測定するための方法を提供する。HIV特異的CD4 T細胞は、特に、増殖し、細胞表面マーカーの組成を改変させて、リン酸化を含むシグナル伝達経路および／または核成分を誘導するため、認識できる。特異的応答性CD4 T細胞は、例えば、またはフローサイトメトリー選別、磁気ビーズ分離または抗原特異的CD4 T細胞単離についての他の認識されている方法を使用して、HIV特異的細胞の選別を可能にする、標識モノクローナル抗体またはmRNA配列の特異的in situ増幅を使用して、認識される。単離したCD4 T細胞を試験して、組み込まれた療法用レンチウイルスを有する細胞の頻度を決定する。HIVに対する応答性および組み込まれた療法用レンチウイルスの存在を確認するための質量分析法、PCR、ELISA、または抗体染色と組み合わせた、個々の細胞のマイクロ流体分離を含む、単一細胞試験法もまた、使用してもよい。

【0162】

したがって、種々の実施形態では、本発明による治療（例えば、（a）免疫化、（b）ex vivo白血球／リンパ球培養；（c）精製タンパク質、不活化ウイルス、ウイルスベクター化タンパク質、細菌性ベクター化タンパク質、サイトカインおよび／またはケモカインを含む生物学的または化学的アジュバント、ビヒクルによる再刺激；および（d）濃縮され形質導入されたT細胞の注入）の適用の後、治療の有効性を決定するために患者を次いで、アッセイしてもよい。体内の標的T細胞の閾値は、機能的治癒を測定するために、所定の値に、例えば、約 1×10^8 個の、療法用レンチウイルスによる遺伝子改変を有するHIV特異的CD4 T細胞として確立してもよい。代替的には、閾値は、患者の体内において、約 1×10^5 、約 1×10^6 、約 1×10^7 、約 1×10^8 、約 1×10^9 、または約 1×10^{10} 個のCD4 T細胞であってもよい。

【0163】

療法用レンチウイルスによる遺伝子改変を有するHIV特異的CD4 T細胞は、例えば、ただし限定されることのない、フローサイトメトリー、細胞選別、FACS分析、DNAクローニング、PCR、RT-PCRもしくはQ-PCR、ELISA、FISH、ウェスタンブロットティング、サザンブロットティング、ハイスループット配列決定、RNA配列決定、オリゴヌクレオチドプライマー伸長、または当該技術分野で公知の他の方法のような任意の適切な方法を使用して決定することができる。

【0164】

遺伝子改変を有する抗原特異的T細胞を規定するための方法は、当該技術分野において公知であるが、有効性の標準的な尺度として、HIV特異的T細胞の同定を、組み込まれたまたは組み込まれていない遺伝子治療構築物と組み合わせるこのような方法を利用することは、本明細書で様々に記載されているように、HIV治療の分野における新規の概念である。

【0165】

用量および剤形

開示された方法および組成物は、疾患の様々な段階の間にHIV+患者を治療するために使用することができる。したがって、投薬レジメンは、患者の状態および投与の方法に

10

20

30

40

50

基づいて変化し得る。

【0166】

様々な実施形態では、最初の *in vivo* 免疫化のための HIV 特異的ワクチンは、様々な用量で、必要とする対象に投与される。一般に、筋肉内注射によって送達されるワクチンは、約 $10\ \mu\text{g}$ ～ 約 $300\ \mu\text{g}$ 、約 $25\ \mu\text{g}$ ～ 約 $275\ \mu\text{g}$ 、約 $50\ \mu\text{g}$ ～ 約 $250\ \mu\text{g}$ 、約 $75\ \mu\text{g}$ ～ 約 225 、または約 $100\ \mu\text{g}$ ～ 約 $200\ \mu\text{g}$ の HIV タンパク質、あるいは不活化されたウイルス粒子、ウイルス様粒子、もしくは組換えシステムからの精製ウイルスタンパク質から調製されたか、またはウイルス調製物から精製された全ウイルスタンパク質を含む。組換えウイルスまたは細菌ベクターは、記載されたいかなるルートによって投与されてもよい。筋肉内ワクチンは、約 $1\ \mu\text{g}$ ～ 約 $100\ \mu\text{g}$ 、約 $10\ \mu\text{g}$ ～ 約 $90\ \mu\text{g}$ 、約 $20\ \mu\text{g}$ ～ 約 $80\ \mu\text{g}$ 、約 $30\ \mu\text{g}$ ～ 約 $70\ \mu\text{g}$ 、約 $40\ \mu\text{g}$ ～ 約 $60\ \mu\text{g}$ または約 $50\ \mu\text{g}$ の適切なアジュバント分子を含み、注射用量あたり $0.1 \sim 5\ \text{ml}$ の容量の油、生理食塩水、緩衝液または水に懸濁され、可溶性またはエマルション調製物であってもよい。いくつかのウイルスベクター化または細菌性ベクター化ワクチン、融合タンパク質、リポソーム製剤または同様の調製物を含む、口腔、直腸、頬、生殖器粘膜または鼻腔内に送達されるワクチンは、より多量のウイルスタンパク質およびアジュバントを含んでもよい。経皮、真皮下または皮下ワクチンは、経口、直腸または鼻腔内送達ワクチンにより類似したタンパク質およびアジュバントの量を利用する。最初の免疫化に対する応答に依存して、ワクチン接種は、送達のための同じまたは代替的なルートを使用して、 $1 \sim 5$ 回繰り返してもよい。間隔は、免疫化間で $2 \sim 24$ 週間であってもよい。ワクチン接種に対する免疫応答は、血清、血漿、腔分泌物、直腸分泌物、唾液または気管支肺胞洗浄液中の HIV 特異的抗体を、ELISA または同様の方法を使用して試験することによって測定される。細胞性免疫応答は、ワクチン抗原を用いた *in vitro* 刺激、続いて細胞内サイトカイン蓄積の染色、次いで、フローサイトメトリーまたはリンパ球増殖、リン酸化シグナル伝達タンパク質の発現または細胞表面活性化マーカーの変化を含む同様の方法によって試験される。投薬の上限は、個々の患者に基づいて決定されてもよく、個々の製品または製品ロットの毒性／安全性プロファイルに依存し得る。

【0167】

免疫化は、1回、2回、3回、または繰り返して行われてもよい。例えば、HIV 免疫化のための薬剤は、週1回、隔週に1回、3週間に1回、1ヶ月に1回、隔月に1回、3ヶ月に1回、6ヶ月に1回、9ヶ月に1回、1年に1回、18ヶ月に1回、2年に1回、36ヶ月に1回、または3年に1回、必要な対象に投与されてもよい。

【0168】

免疫化は、一般に、CD4⁺ T細胞の *ex vivo* での増殖および濃縮の前に、少なくとも1回行われるであろうし、*ex vivo* でのリンパ球の培養／再刺激および注入後は、1回、2回、3回、またはそれよりも多くの回数で、免疫化を行ってもよい。

【0169】

一実施形態では、免疫化のための HIV ワクチンは、医薬組成物として投与される。一実施形態では、HIV ワクチンを含む医薬組成物は、臨床応用のための幅広く様々な経鼻、経肺、経口、局所、または非経口剤形で製剤化される。各々の剤形は、様々な崩壊剤、界面活性剤、充填剤、増粘剤、結合剤、湿潤剤のような希釈剤または他の薬学的に許容される賦形剤を含むことができる。HIV ワクチンを含む医薬組成物はまた、注射用に製剤化することもできる。

【0170】

免疫化の目的のための HIV ワクチン組成物は、鼻腔内、頬側、舌下、経口、直腸、眼、非経口（静脈内、皮内、筋肉内、皮下、大槽内、腹腔内）、肺内、腔内、部位的投与、局所投与、乱刺後の局所投与、粘膜投与、エアロゾルを介して、または頬側もしくは鼻スプレー製剤を介してなどの任意の薬学的に許容される方法を使用して投与することができる。

【0171】

さらに、H I Vワクチン組成物は、固体剤形、錠剤、丸薬、ロゼンジ、カプセル、液体分散液、ゲル、エアロゾル、肺エアロゾル、鼻エアロゾル、軟膏、クリーム、半固体剤形、および懸濁液などの、任意の薬学的に許容される剤形に製剤化されることができる。さらに、組成物は、制御放出製剤、持続放出製剤、即時放出製剤、またはそれらの任意の組合せであってもよい。さらに、組成物は、経皮送達システムであってもよい。

【0172】

別の実施形態では、H I Vワクチンを含む医薬組成物は、経口投与のための固体剤形で製剤化され、固体剤形は、散剤、顆粒剤、カプセル剤、錠剤または丸薬であり得る。さらに別の実施形態では、固体剤形は、炭酸カルシウム、デンプン、スクロース、乳糖、微結晶セルロースまたはゼラチンのような、1つまたは複数の賦形剤を含む。さらに、固体剤形は、賦形剤に加えて、タルクまたはステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤を含むことができる。一部の実施形態では、経口剤形は、即時放出または改変放出形態である。改変放出剤形には、制御放出または持続放出、腸内放出などが含まれる。改変放出剤形において使用される賦形剤は、当業者に一般的に公知である。

10

【0173】

さらなる実施形態では、H I Vワクチンを含む医薬的組成物は、舌下または頬側の剤形として製剤化される。そのような剤形は、頬と歯茎との間に位置した舌下および頬側錠剤の下で投与される、舌下錠剤または溶液組成物を含む。

【0174】

なおさらなる実施形態では、H I Vワクチンを含む医薬組成物は、鼻用剤形として製剤化される。そのような本発明の剤形は、経鼻送達のための溶液、懸濁液およびゲル組成物を含む。

20

【0175】

一実施形態では、医薬組成物は、懸濁液、エマルションまたはシロップのような経口投与用の液体剤形で製剤化される。他の実施形態では、液体剤形は、水および流動パラフィンのような一般的に使用される単純希釈剤に加えて、保湿剤、甘味料、芳香剤または防腐剤のような様々な賦形剤を含むことができる。特定の実施形態では、H I Vワクチンを含む組成物またはその薬学的に許容される塩は、小児患者への投与に適するように製剤化される。

【0176】

一実施形態では、医薬組成物は、滅菌水溶液、懸濁液、エマルション、非水性溶液または坐剤などの非経口投与のための剤形で製剤化される。他の実施形態では、非水性溶液または懸濁液は、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、オリーブ油のような植物油、またはオレイン酸エチルのような注射可能なエステルを含む。坐剤のベースとして、ウィテプソール (witepsol)、マクロゴール (macrogol)、ツイーン 61 (tween 61)、カカオ油、ラウリン油またはグリセリン化ゼラチンを使用することができる。

30

【0177】

医薬組成物の投与量は、患者の体重、年齢、性別、投与の時間および形態、排泄速度、および疾患の重篤度に依存して変化し得る。

【0178】

再刺激の目的のために、一般に、リンパ球、P B M C、および／またはC D 4⁺ T細胞を患者から取り出し、再刺激および培養のために単離する。単離された細胞は、免疫化に使用されたものと同じH I Vワクチンもしくは活性化剤または異なるH I Vワクチンもしくは活性化剤と接触させてもよい。一実施形態では、単離された細胞は、培養物中の約 10^6 個の細胞あたり約 10 ng ～ $5\text{ }\mu\text{g}$ （または任意の他の適切な量）のH I Vワクチンまたは活性化剤と接触される。より具体的には、単離された細胞は、培養物中の約 10^6 個の細胞あたり、約 50 ng 、約 100 ng 、約 200 ng 、約 300 ng 、約 400 ng 、約 500 ng 、約 600 ng 、約 700 ng 、約 800 ng 、約 900 ng 、約 $1\text{ }\mu\text{g}$ 、約 $1.5\text{ }\mu\text{g}$ 、約 $2\text{ }\mu\text{g}$ 、約 $2.5\text{ }\mu\text{g}$ 、約 $3\text{ }\mu\text{g}$ 、約 $3.5\text{ }\mu\text{g}$ 、約 $4\text{ }\mu\text{g}$ 、約 $4.5\text{ }\mu\text{g}$ 、または約 $5\text{ }\mu\text{g}$ のH I Vワクチンまたは活性化剤と接触させてもよい。

40

50

【0179】

活性化剤またはワクチンは、一般に、各々の *in vitro* 細胞培養に1回使用されるが、約15～約35日の間隔の後に繰り返してもよい。例えば、繰り返しの投薬は、約15、約16、約17、約18、約19、約20、約21、約22、約23、約24、約25、約26、約27、約28、約29、約30、約31、約32、約33、約34、または約35日で行ってもよい。

【0180】

濃縮され、再刺激された細胞の形質導入のために、細胞は、レンチウイルスベクターまたは例えば図4に開示される他の公知のベクターシステムを用いて形質導入されてもよい。形質導入される細胞は、培養中の標的細胞あたり、（レンチウイルスベクターを含む培養液のRT-PCRアッセイにより測定された）約1～1,000個（または任意の他の適切な量）のウィルスゲノムと接触させてもよい。レンチウイルスの形質導入は、培養物中の標的細胞あたり1～1,000個のウィルスゲノムの同じ範囲を使用して、1～5回繰り返してもよい。

【0181】

細胞濃縮

種々の実施形態では、T細胞などの細胞をHIV感染患者から得て、培養する。培養は、マルチウェルプレートの、順化培地（「CM」）を含む培養培地中で行ってもよい。上清p24g/g（「p24」）のレベルおよびウィルスRNAレベルは、標準的手段によって評価することができる。そのCM培養細胞が1ng/ml未満のピークp24上清レベルを有する患者は、さらなる抗ウィルス剤を使用してまたは使用せずにCM中での大規模なT細胞増殖のために適切な患者であってもよい。加えて、異なる目的の薬物または目的の薬物の組合せを、異なるウェルに添加し、試料中のウィルスレベルに対する影響を、標準的手段によって評価してもよい。適度なウィルス抑制を提供する薬物の組合せは、治療上有益な組合せである。特定の対象に関して何が適度なウィルス抑制を構成するかを決定するのは、適格な技術者の能力内にある。目的の薬物がウィルス増殖を制限する有効性を試験するために、抗CD3抗体などのさらなる因子を培養物に添加して、ウィルス産生を刺激してもよい。HIV感染細胞試料のための、当技術分野で公知の培養方法とは異なり、CMは、2か月間よりも長期間にわたってT細胞の培養を可能にし、それにより、長期的な薬物有効性をアッセイするための有効なシステムを提供する。

【0182】

このアプローチは、CMを含む培地で細胞を培養することにより、細胞集団においてHIVLTRプロモーター領域によって駆動される遺伝子発現の阻害を可能にする。CM4中での培養は、転写媒介性タンパク質とHIV遺伝子発現調節エレメントとの間の1つまたは複数の相互作用を変更することによって、HIVLTR駆動性遺伝子発現を阻害する可能性が高い。目的の転写媒介性タンパク質には、AP-1、NFκB、NFAT、IRF、LEF-1、およびSp1などの宿主細胞にコードされているタンパク質、ならびにHIVにコードされているタンパク質Tatが含まれる。目的のHIV遺伝子発現調節エレメントには、AP-1、NFκB、NFAT、IRF、LEF-1、およびSp1の結合部位、ならびにTatと相互作用するトランス作用性応答エレメント（「TAR」）が含まれる。

【0183】

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

【0184】

T細胞を濃縮する別の方法では、免疫親和性に基づく選択が利用される。この方法は、CD4+およびCD8+細胞集団などの第1および第2の細胞集団を、同時に濃縮または選択することを含む。初代ヒトT細胞を含む細胞を、CD4に特異的に結合する第1の免

10

20

30

40

50

疫親和性試薬およびCD8に特異的に結合する第2の免疫親和性試薬と、インキュベーション組成物中に、免疫親和性試薬が試料中の細胞の表面にあるCD4およびCD8分子にそれぞれ特異的に結合する条件下で接触させる。第1および／または第2の免疫親和性試薬と結合した細胞を回収し、それにより、CD4＋細胞およびCD8＋細胞を含む濃縮された組成物を生成する。このアプローチは、組成物を、最適未満の収量濃度である濃度の第1および／または第2の免疫親和性試薬と共にインキュベーションすることを含んでいてもよい。特筆すべきことには、一部の実施形態では、形質導入された細胞は、混合T細胞集団であり、他の実施形態では、形質導入された細胞は、混合T細胞集団ではない。

【0185】

一部の実施形態では、固体支持体が、マイクロビーズまたはナノビーズなどのビーズなどの球体である、免疫親和性に基づく選択が使用される。他の実施形態では、ビーズは、磁気ビーズであってもよい。別の実施形態では、抗体は、球体またはクロマトグラフィーマトリクスなどの固体表面に固定化されている結合試薬と可逆的結合を形成し、抗体を固体表面に可逆的に固定化することができる1つまたは複数の結合パートナーを含む。一部の実施形態では、前記固体表面の抗体が結合する細胞表面マーカーを発現する細胞を、結合試薬と結合パートナーとの可逆的結合を壊すことによって、マトリクスから回収することができる。一部の実施形態では、結合試薬は、ストレプトアビジン、またはストレプトアビジン類似体もしくは変異体である。

【0186】

造血系および／または造血幹細胞の初代細胞の安定形質導入は、細胞の表面と、レンチウイルスベクターおよび細胞表面に結合する少なくとも1つの分子の両方と、*in vivo*または*ex vivo*で接触させることにより得ることができる。細胞は、成長および／または増殖を促す条件下で、2つまたはそれよりも多くの層を含む換気容器中で培養してもよい。一部の実施形態では、このアプローチは、非CD4＋T細胞枯渇および／または広域ポリクローナル増殖(broad polyclonal expansion)と共に使用することができる。

【0187】

T細胞濃縮の別のアプローチでは、PBMCをペプチドで刺激し、インターフェロングammaなどのサイトカインを分泌する細胞について濃縮する。このアプローチは、一般に、T細胞を含む細胞の混合物を抗原で刺激するステップ、産物で標識される度合いに応じて、抗原で刺激された細胞の分離を達成するステップを含む。抗原刺激は、少なくとも1つのT細胞の抗原特異的刺激を誘発するのに有効な条件下で、細胞を、少なくとも1つの抗原に曝露することにより達成される。産物による標識化は、少なくとも1つの捕捉部分を含むように細胞の表面を修飾し、産物が分泌され、放出され、前記捕捉部分に特異的に結合する(「捕捉される」または「捕獲される」)条件下で細胞を培養し、捕捉された産物を標識部分で標識することにより達成され、ここで、標識された細胞は、標識手順の一部としても分離手順の一部としても溶解されない。捕捉部分には、濃縮ステップを精緻化し、一般には抗原特異的T細胞の、特にCD4＋T細胞の割合を増加させるために、細胞表面糖タンパク質CD3またはCD4の検出が組み込まれていてもよい。

【0188】

以下の実施例は、本発明の態様を例示するために示されている。しかしながら、本発明は、これらの実施例において記載された特定の条件または詳細に限定されるものではないことが理解されるべきである。本明細書で参照されている刊行物は全て、参照により具体的に組み込まれる。

【実施例】

【0189】

(実施例1：レンチウイルスベクターシステムの開発)

レンチウイルスベクターシステムを、図3(線形形態)および図4(環状化形態)に要約されているように開発した。まず図3の上段部分を参照すると、代表的な療法用ベクターを、以下のエレメントを左から右に向かって有するように設計および生成した：ハイブ

10

20

30

40

50

リッド5'末端反復配列(RSV/5'LTR)(配列番号34~35)、Psi配列(RNAパッケージング部位)(配列番号36)、RRE(Rev応答エレメント)(配列番号37)、cPPT(ポリプリントラクト)(配列番号38)、EF-1 α プロモーター(配列番号4)、miR30CCR5(配列番号1)、miR21Vif(配列番号2)、miR185Tat(配列番号3)、ウッドチャック転写後調節エレメント(WPRE)(配列番号32または80)、および Δ U3 3'LTR(配列番号39)。図3に詳述されている療法用ベクターは、本明細書ではAGT103とも呼ばれる。

【0190】

次に、図3の中段部分を参照すると、ヘルパープラスミドを、左から右に向かって以下のエレメントを有するように設計および生成した：CAGプロモーター(配列番号41)；HIV成分gag(配列番号43)；HIV成分pol(配列番号44)；HIV Int(配列番号45)；HIV RRE(配列番号46)；およびHIV Rev(配列番号47)。

【0191】

次に、図3の下段部分を参照すると、エンベローププラスミドを、左から右に向かって以下のエレメントを有するように設計および生成した：RNAポリメラーゼIIプロモーター(CMV)(配列番号60)および水疱性口内炎ウイルスG糖タンパク質(VSV-G)(配列番号62)。

【0192】

レンチウイルス粒子を、293T/17 HEK細胞(American Type Culture Collection、Manassas、VAから購入)で産生し、その後、療法用ベクター、エンベローププラスミド、およびヘルパープラスミド(図3に示されているような)をトランスフェクションした。機能的ウイルス粒子を産生した293T/17 HEK細胞のトランスフェクションでは、試薬ポリ(エチレンジイミン)(PEI)を使用して、プラスミドDNA取り込みの効率を増加させた。最初に、プラスミドおよびDNAを、無血清培養培地に3:1の比率(PEI対DNAの質量比)で別々に添加した。2~3日後、細胞培地を集め、レンチウイルス粒子を、高速遠心分離および/または濾過してから、陰イオン交換クロマトグラフィーによって精製した。レンチウイルス粒子の濃度は、形質導入単位/ml(TU/ml)で表すことができる。TUの決定は、培養液中のHIV p24レベルを測定し(p24タンパク質は、レンチウイルス粒子に組み込まれている)、定量PCRで細胞あたりのウイルスDNAコピー数を測定することにより、または細胞を感染させ、光を使用することにより(ベクターがルシフェラーゼまたは蛍光タンパク質マーカーをコードしている場合)達成した。

【0193】

上記で言及されているように、3ベクターシステム(つまり、2ベクターレンチウイルスパッケージングシステム)を、レンチウイルス粒子の産生用に設計した。3ベクターシステムの模式図は、図4に示されている。図4の模式図は、図3で上述した線形システムの環状化バージョンである。手短に言えば、図4を参照すると、最上段のベクターは、ヘルパープラスミドであり、この場合は、Revを含む。図4の中段に現れるベクターは、エンベローププラスミドである。最下段のベクターは、上述した療法用ベクターである。

【0194】

図4をより詳しく参照すると、ヘルパー+Revプラスミドは、CAGエンハンサー(配列番号40)；CAGプロモーター(配列番号41)；ニフトリベータアクチンイントロン(配列番号42)；HIV gag(配列番号43)；HIV Pol(配列番号44)；HIV Int(配列番号45)；HIV RRE(配列番号46)；HIV Rev(配列番号47)；およびウサギベータグロビンポリA(配列番号48)を含む。

【0195】

エンベローププラスミドは、CMVプロモーター(配列番号60)；ベータグロビンイントロン(配列番号61)；VSV-G(配列番号62)；およびウサギベータグロビンポリA(配列番号63)を含む。

【0196】

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

材料および方法：

ヘルパープラスミドの構築：ヘルパープラスミドは、Gag、Pol、およびインテグラーゼ遺伝子を含むpNL4-3 HIVプラスミド(NIH AIDS試薬プログラム)に由来するDNA断片の最初のPCR増幅により構築した。プライマーは、pCDNA3プラスミド(Invitrogen)の同じ部位に挿入するために使用することができるEcoRIおよびNotI制限部位を有する断片を増幅するように設計した。フォワードプライマーは、(5'-TAAGCAGAATTTCATGAATTTTGCCAGGAAGAT-3') (配列番号81)であり、リバースプライマーは、(5'-CCATACAATGAATGGACACTAGGCGGCCGACGAAT-3') (配列番号82)であった。Gag、Pol、インテグラーゼ断片の配列は以下の通りであった：

【化43-1】

```
GAATTCATGAATTTGCCAGGAAGATGGAAACCAAAAATGATAGGGGGAATTGGA
GGTTTTATCAAAGTAAGACAGTATGATCAGATACTCATAGAAATCTGCGGACATA
AAGCTATAGGTACAGTATTAGTAGGACCTACACCTGTCAACATAATTGGAAGAAA
TCTGTTGACTCAGATTGGCTGCACCTTAAATTTCCCATTAGTCCTATTGAGACTGT
ACCAAGTAAAATTAAAGCCAGGAATGGATGGCCCAAAAGTTAAACAATGGCCATTG
ACAGAAGAAAAAATAAAAGCATTAGTAGAAATTTGTACAGAAATGGAAAAGGAA
GGAAAAATTTCAAAAATTGGGCCTGAAAATCCATACAATACTCCAGTATTTGCCAT
AAAGAAAAAAGACAGTACTAAATGGAGAAAATTAGTAGATTTTCAGAGAACTTAAT
AAGAGAACTCAAGATTTCTGGGAAGTTCAATTAGGAATACCACATCCTGCAGGGT
TAAAACAGAAAAAATCAGTAACAGTACTGGATGTGGGCGATGCATATTTTTTCAGT
TCCCTTAGATAAAGACTTCAGGAAGTATACTGCATTTACCATACCTAGTATAAACA
ATGAGACACCAGGGATTAGATATCAGTACAATGTGCTTCCACAGGGATGGAAAGG
ATCACCAGCAATATTCCAGTGTAGCATGACAAAAATCTTAGAGCCTTTTAGAAAA
CAAAATCCAGACATAGTCATCTATCAATACATGGATGATTTGTATGTAGGATCTGA
CTTAGAAATAGGGCAGCATAGAACAAAAATAGAGGAACTGAGACAACATCTGTTG
AGGTGGGGATTTACCACACCAGACAAAAAACATCAGAAAGAACCTCCATTCCTTT
GGATGGGTATGAACTCCATCCTGATAAATGGACAGTACAGCCTATAGTGCTGCC
AGAAAAGGACAGCTGGACTGTCAATGACATACAGAAATTAGTGGGAAAATTGAAT
TGGGCAAGTCAGATTTATGCAGGGATTAAAGTAAGGCAATTATGTAAACTTCTTA
GGGGAACCAAGCACTAACAGAAGTAGTACCACTAACAGAAGAAGCAGAGCTAG
AACTGGCAGAAAACAGGGAGATTCTAAAAGAACCGGTACATGGAGTGTATTATGA
CCCATCAAAAGACTTAATAGCAGAAATACAGAAGCAGGGGCAAGGCCAATGGAC
ATATCAAATTTATCAAGAGCCATTTAAAAATCTGAAAACAGGAAAGTATGCAAGA
ATGAAGGGTGCCCACTAATGATGTGAAACAATTAACAGAGGCAGTACAAAAA
ATAGCCACAGAAAGCATAGTAATATGGGGAAAGACTCCTAAATTTAAATTACCCA
TACAAAAGGAAACATGGGAAGCATGGTGGACAGAGTATTGGCAAGCCACCTGGA
```

10

20

30

40

50

【化 4 3 - 2】

TTCCTGAGTGGGAGTTTGTCAATACCCCTCCCTTAGTGAAGTTATGGTACCAGTTA
GAGAAAGAACCCATAATAGGAGCAGAACTTTCTATGTAGATGGGGCAGCCAATA
GGGAAACTAAATTAGGAAAAGCAGGATATGTAACTGACAGAGGAAGACAAAAAG
TTGTCCCCCTAACGGACACAACAAATCAGAAGACTGAGTTACAAGCAATTCATCT
AGCTTTGCAGGATTCGGGATTAGAAGTAAACATAGTGACAGACTCACAATATGCA
TTGGGAATCATTCAAGCACAAACCAGATAAGAGTGAATCAGAGTTAGTCAGTCAAA
TAATAGAGCAGTTAATAAAAAAGGAAAAAGTCTACCTGGCATGGGTACCAGCACA
CAAAGGAATTGGAGGAAATGAACAAGTAGATAAATTGGTCAGTGCTGGAATCAG
GAAAGTACTATTTTTAGATGGAATAGATAAGGCCCAAGAAGAACATGAGAAATAT
CACAGTAATTGGAGAGCAATGGCTAGTGATTTTAACCTACCACCTGTAGTAGCAA
AAGAAATAGTAGCCAGCTGTGATAAATGTCAGCTAAAAGGGGAAGCCATGCATGG
ACAAGTAGACTGTAGCCCAGGAATATGGCAGCTAGATTGTACACATTTAGAAGGA
AAAGTTATCTTGGTAGCAGTTCATGTAGCCAGTGGATATATAGAAGCAGAAGTAA
TTCCAGCAGAGACAGGGCAAGAAACAGCATACTTCCTCTTAAAATTAGCAGGAAG
ATGGCCAGTAAAAACAGTACATACAGACAATGGCAGCAATTTACCAGTACTACA
GTTAAGGCCGCCTGTTGGTGGGCGGGGATCAAGCAGGAATTTGGCATTCCCTACA
ATCCCCAAAGTCAAGGAGTAATAGAATCTATGAATAAAGAATTAAAGAAAATTAT
AGGACAGGTAAGAGATCAGGCTGAACATCTTAAGACAGCAGTACAAATGGCAGT
ATTCATCCACAATTTTAAAAGAAAAGGGGGGATTGGGGGGTACAGTGCAGGGGAA
AGAATAGTAGACATAATAGCAACAGACATACAACTAAAGAATTACAAAAACAA
ATTACAAAAATTCAAATTTTCGGGTTTATTACAGGGACAGCAGAGATCCAGTTTG
GAAAGGACCAGCAAAGCTCCTCTGGAAAGGTGAAGGGGCAGTAGTAATACAAGA
TAATAGTGACATAAAAGTAGTGCCAAGAAGAAAAGCAAAGATCATCAGGGATTAT
GGAAAACAGATGGCAGGTGATGATTGTGTGGCAAGTAGACAGGATGAGGATTAA
(配列番号 83)

【0197】

次に、Rev、RRE、およびウサギベータグロビンポリA配列を含み、XbaIおよびXmaI隣接制限部位を有するDNA断片が、MWG Operonによって合成された。その後、DNA断片を、プラスミドのXbaIおよびXmaI制限部位に挿入した。DNA配列は、以下の通りであった：

10

20

30

40

50

【化 4 4】

TCTAGAATGGCAGGAAGAAGCGGAGACAGCGACGAAGAGCTCATCAGAACAGTC
AGACTCATCAAGCTTCTCTATCAAAGCAACCCACCTCCCAATCCCGAGGGGACCC
GACAGGCCCCGAAGGAATAGAAGAAGAAGGTGGAGAGAGAGACAGAGACAGATC
CATTCGATTAGTGAACGGATCCTTGGCACTTATCTGGGACGATCTGCGGAGCCTGT
GCCTCTTCAGCTACCACCGCTTGAGAGACTTACTCTTGATTGTAACGAGGATTGTG
GAACTTCTGGGACGCAGGGGGTGGGAAGCCCTCAAATATTGGTGGAATCTCCTAC
AATATTGGAGTCAGGAGCTAAAGAATAGAGGAGCTTTGTTCTTGGGTTCTTGGG
AGCAGCAGGAAGCACTATGGGCGCAGCGTCAATGACGCTGACGGTACAGGCCAG
ACAATTATTGTCTGGTATAGTGCAGCAGCAGAACAATTTGCTGAGGGCTATTGAG
GCGCAACAGCATCTGTTGCAACTCACAGTCTGGGGCATCAAGCAGCTCCAGGCAA
GAATCCTGGCTGTGGAAAGATACCTAAAGGATCAACAGCTCCTAGATCTTTTTCCC
TCTGCCAAAAATTATGGGGACATCATGAAGCCCCCTTGAGCATCTGACTTCTGGCTA
ATAAAGGAAATTTATTTTCATTGCAATAGTGTGTTGGAATTTTTTGTGTCTCTCACT
CGGAAGGACATATGGGAGGGCAAATCATTTAAACATCAGAATGAGTATTTGGTT
TAGAGTTTGGCAACATATGCCATATGCTGGCTGCCATGAACAAAGGTGGCTATAA
AGAGGTCATCAGTATATGAAACAGCCCCCTGCTGTCCATTCCCTTATCCATAGAAA
AGCCTTGACTTGAGGTTAGATTTTTTTTATATTTTGTGTTATTTTTTTCTTTA
ACATCCCTAAAATTTTCCTTACATGTTTTACTAGCCAGATTTTTCCTCCTCTCCTGA
CTACTCCCAGTCATAGCTGTCCCTCTTCTCTTATGAAGATCCCTCGACCTGCAGCCC
AAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCA
CAATTCCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAGCCTGGGGTGCCTA
ATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCGCTTTCAGTCGG
GAAACCTGTCGTGCCAGCGGATCCGCATCTCAATTAGTCAGCAACCATAGTCCCGC
CCCTAACTCCGCCCATCCCGCCCCCTAACTCCGCCCAGTTCCGCCCATTCTCCGCCCC
ATGGCTGACTAATTTTTTTTATTTATGCAGAGGCCGAGGCCGCCTCGGCCTCTGAG
CTATTCCAGAAGTAGTGAGGAGGCTTTTTTGGAGGCCTAGGCTTTTGCAAAAAGCT
AACTTGTTTATTGCAGCTTATAATGGTTACAAATAAAGCAATAGCATCACAAATTT
CACAAATAAAGCATTTTTTTTCACTGCATTCTAGTTGTGGTTTGTCCAACTCATCAA
TGTATCTTATCAGCGGCCGCCCCGGG (配列番号 84)

10

20

30

40

【0198】

最後に、pCDNA3.1のCMVプロモーターを、CAGエンハンサー／プロモーター+ニワトリベータアクチンイントロン配列と置換した。CAGエンハンサー／プロモーター／イントロン配列を含み、MluIおよびEcoRI隣接制限部位を有するDNA断片が、MWG Operonによって合成された。その後、DNA断片を、プラスミドのMluIおよびEcoRI制限部位に挿入した。DNA配列は以下の通りであった：

50

【化 4 5】

ACGCGTTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATA
 TGGAGTTCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCCGCCTGGCTGACCGCCCAAC
 GACCCCCGCCCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGG
 GACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGACTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAG
 TACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAA
 TGGCCCCGCCTGGCATTATGCCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCA
 GTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGGTGCGAGGTGAGCCCCACGTTT
 TGCTTCACTCTCCCCATCTCCCCCCCCCTCCCCACCCCCAATTTTGTATTTATTTATTT
 TTTAATTATTTTGTGTCAGCGATGGGGGCGGGGGGGGGGGGGGGGGCGCGCGCCAGGCG
 GGGCGGGGCGGGGCGAGGGGCGGGGCGGGGCGAGGCGGAGAGGTGCGGCGGCA
 GCCAATCAGAGCGGCGCGCTCCGAAAGTTTCTTTTATGGCGAGGCGGCGGCGGC
 GCGGGCCCTATAAAAAGCGAAGCGCGCGGGCGGGCGGGAGTCGCTGCGTTGCCTTC
 GCCCCGTGCCCCGCTCCGCGCCGCTCGCGCCGCCCGCCCCGGCTCTGACTGACCG
 CGTTACTCCCACAGGTGAGCGGGCGGGACGGCCCTTCTCCTCCGGGCTGTAATTAG
 CGCTTGGTTTAATGACGGCTCGTTTCTTTTCTGTGGCTGCGTGAAAGCCTTAAAGG
 GCTCCGGGAGGGCCCTTTGTGCGGGGGGAGCGGCTCGGGGGGTGCGTGCGTGTG
 TGTGTGCGTGGGGAGCGCCGCGTGCGGCCCCGCGCTGCCCGGCGGGCTGTGAGCGCT
 GCGGGCGCGGCGCGGGGCTTTGTGCGCTCCGCGTGTGCGCGAGGGGAGCGCGGCC
 GGGGGCGGTGCCCCGCGGTGCGGGGGGGGCTGCGAGGGGAACAAAGGCTGCGTGC
 GGGGTGTGTGCGTGGGGGGGTGAGCAGGGGGTGTGGGCGCGGCGGTCGGGCTGT
 AACCCCCCCTGCACCCCCCTCCCCAGTTGCTGAGCACGGCCCGGCTTCGGGTGC
 GGGGCTCCGTGCGGGGCGTGCGCGGGGCTCGCCGTGCCGGGCGGGGGGTGGCG
 GCAGGTGGGGGTGCCGGGCGGGGCGGGGCCGCTCGGGCCGGGGAGGGCTCGGG
 GGAGGGGCGCGGCGGCCCGGAGCGCCGGCGGCTGTGAGGCGCGGCGAGCCGC
 AGCCATTGCCTTTTATGGTAATCGTGCGAGAGGGCGCAGGGACTTCCTTTGTCCCA
 AATCTGGCGGAGCCGAAATCTGGGAGGCGCCGCGCACCCCCCTCTAGCGGGCGCG
 GGCGAAGCGGTGCGGCGCCGGCAGGAAGGAAATGGGCGGGGAGGGCCTTCGTGC
 GTCGCCGCGCCGCGCTCCCCTTCTCCATCTCCAGCCTCGGGGCTGCCGAGGGGGA
 CGGCTGCCTTCGGGGGGGACGGGGCAGGGCGGGGTTCGGCTTCTGGCGTGTGACC
 GGCGGGAATTC (配列番号 85)

10

20

30

40

【0199】

VSV-Gエンベローププラスミドの構築：

隣接するEcoRI制限部位を有する水疱性口内炎インディアンウイルス糖タンパク質
 (VSV-G)配列が、MWG Operonによって合成された。その後、DNA断片
 を、pCDNA3.1プラスミド(Invitrogen)のEcoRI制限部位に挿入
 し、CMV特異的プライマーを使用して配列決定することにより、配向性が正しいことを
 決定した。DNA配列は以下の通りであった：

50

【化 4 6】

GAATTCATGAAGTGCCTTTTGTACTTAGCCTTTTATTCATTGGGGTGAATTGCAAG
 TTCACCATAGTTTTTCCACACAACCAAAAAGGAAACTGGAAAAATGTTCTTCTAA
 TTACCATTATTGCCCCGTCAAGCTCAGATTTAAATTGGCATAATGACTTAATAGGCA
 CAGCCTTACAAGTCAAAATGCCCAAGAGTCACAAGGCTATTCAAGCAGACGGTTG
 GATGTGTCATGCTTCCAAATGGGTCACTACTTGTGATTTCCGCTGGTATGGACCGA
 AGTATATAACACATTCCATCCGATCCTTCACTCCATCTGTAGAACAATGCAAGGAA
 AGCATTGAACAAACGAAACAAGGAACCTTGGCTGAATCCAGGCTTCCCTCCTCAA
 GTTGTGGATATGCAACTGTGACGGATGCCGAAGCAGTGATTGTCCAGGTGACTCCT
 CACCATGTGCTGGTTGATGAATACACAGGAGAATGGGTTGATTCACAGTTCATCA
 ACGGAAAATGCAGCAATTACATATGCCCCACTGTCCATAACTCTACAACCTGGCAT
 TCTGACTATAAGGTCAAAGGGCTATGTGATTCTAACCTCATTTCCATGGACATCAC
 CTTCTTCTCAGAGGACGGAGAGCTATCATCCCTGGGAAAGGAGGGCACAGGGTTC
 AGAAGTAACTACTTTGCTTATGAAACTGGAGGCAAGGCCTGCAAAATGCAATACT
 GCAAGCATTGGGGAGTCAGACTCCCATCAGGTGTCTGGTTCGAGATGGCTGATAA
 GGATCTCTTTGCTGCAGCCAGATTCCCTGAATGCCCAGAAGGGTCAAGTATCTCTG
 CTCCATCTCAGACCTCAGTGGATGTAAGTCTAATTCAGGACGTTGAGAGGATCTTG
 GATTATTCCTCTGCCAAGAAACCTGGAGCAAAATCAGAGCGGGTCTTCCAATCTC
 TCCAGTGGATCTCAGCTATCTTGCTCCTAAAAACCCAGGAACCGGTCTGCTTTCA
 CCATAATCAATGGTACCCTAAAATACTTTGAGACCAGATACATCAGAGTCGATATT
 GCTGCTCCAATCCTCTCAAGAATGGTCGGAATGATCAGTGGAACCTACCACAGAAA
 GGGAACTGTGGGATGACTGGGCACCATATGAAGACGTGGAAATTGGACCCAATGG
 AGTTCTGAGGACCAGTTCAGGATATAAGTTTCCTTTATACATGATTGGACATGGTA
 TGTGTTGACTCCGATCTTCATCTTAGCTCAAAGGCTCAGGTGTTTGAACATCCTCAC
 ATTCAAGACGCTGCTTCGCAACTTCCTGATGATGAGAGTTTATTTTTTGGTGATACT
 GGGCTATCCAAAAATCCAATCGAGCTTGTAGAAGGTTGGTTCAGTAGTTGGAAAA
 GCTCTATTGCCTCTTTTTTCTTTATCATAGGGTTAATCATTGGACTATTCTTGGTTCT
 CCGAGTTGGTATCCATCTTTGCATTAAATTAAGCACACCAAGAAAAGACAGATTT
 ATACAGACATAGAGATGAGAATTC (配列番号 86)

10

20

30

【0200】

また、4ベクターシステム（つまり、3ベクターレンチウイルスパッケージングシステム）を、本明細書に記載されている方法および材料を使用して設計および生成した。4ベクターシステムの模式図は、図5に示されている。図5を参照して手短かに言えば、最上段のベクターは、ヘルパープラスミドであり、この場合は、Revを含んでいない。最上段から2つ目のベクターは、別のRevプラスミドである。最下段から2つ目のベクターは、エンベローププラスミドである。最下段のベクターは、上述した療法用ベクターである。

【0201】

部分的に図5を参照して、ヘルパープラスミドは、CAGエンハンサー（配列番号49）；CAGプロモーター（配列番号50）；ニワトリベータアクチンイントロン（配列番号51）；HIV gag（配列番号52）；HIV Pol（配列番号53）；HIV

40

50

I n t（配列番号 5 4）；**H I V R R E**（配列番号 5 5）；およびウサギベータグロビンポリ A（配列番号 5 6）を含む。

【 0 2 0 2 】

R e v プラスミドは、**R S V** プロモーター（配列番号 5 7）；**H I V R e v**（配列番号 5 8）；およびウサギベータグロビンポリ A（配列番号 5 9）を含む。

【 0 2 0 3 】

エンベローププラスミドは、**C M V** プロモーター（配列番号 6 0）；ベータグロビンイントロン（配列番号 6 1）；**V S V - G**（配列番号 6 2）；およびウサギベータグロビンポリ A（配列番号 6 3）を含む。

【 0 2 0 4 】

ヘルパー、**R e v**、およびエンベローププラスミドを含む 3 ベクターレンチウイルスパッケージングシステムの合成。

材料および方法：

R e v を含まないヘルパープラスミドの構築：

R e v を含まないヘルパープラスミドを、**R R E** およびウサギベータグロビンポリ A 配列を含む DNA 断片を挿入することにより構築した。隣接する **X b a I** および **X m a I** 制限部位を有するこの配列は、**M W G O p e r o n** によって合成された。その後、**R R E** / ウサギポリ A ベータグロビン配列を、ヘルパープラスミドの **X b a I** および **X m a I** 制限部位に挿入した。DNA 配列は以下の通りである：

10

20

30

40

50

【化 4 7】

TCTAGAAGGAGCTTTGTTCCCTTGGGTTCTTGGGAGCAGCAGGAAGCACTATGGGC
GCAGCGTCAATGACGCTGACGGTACAGGCCAGACAATTATTGTCTGGTATAGTGC
AGCAGCAGAACAATTTGCTGAGGGCTATTGAGGCGCAACAGCATCTGTTGCAACT
CACAGTCTGGGGCATCAAGCAGCTCCAGGCAAGAATCCTGGCTGTGGAAAGATAC
CTAAAGGATCAACAGCTCCTAGATCTTTTTCCCTCTGCCAAAAATTATGGGGACAT
CATGAAGCCCCTTGAGCATCTGACTTCTGGCTAATAAAGGAAATTTATTTTCATTG
CAATAGTGTGTTGGAATTTTTTGTGTCTCTCACTCGGAAGGACATATGGGAGGGCA
AATCATTTAAACATCAGAATGAGTATTTGGTTTAGAGTTTGGCAACATATGCCAT
ATGCTGGCTGCCATGAACAAAGGTGGCTATAAAGAGGTCATCAGTATATGAAACA
GCCCCCTGCTGTCCATTCCCTTATCCATAGAAAAGCCTTGACTTGAGGTTAGATTTT
TTTTATATTTTGTGTTTGTGTTATTTTTTTCTTTAACATCCCTAAAATTTTCCTTACAT
GTTTTACTAGCCAGATTTTTCTCCTCTCCTGACTACTCCCAGTCATAGCTGTCCCT
CTTCTCTTATGAAGATCCCTCGACCTGCAGCCCAAGCTTGGCGTAATCATGGTCAT
AGCTGTTTCCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAATTCCACACAACATACGAGCC
GGAAGCATAAAGTGTAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAA
TTGCGTTGCGCTCACTGCCCCGCTTTCCAGTCGGGAAACCTGTCGTGCCAGCGGATC
CGCATCTCAATTAGTCAGCAACCATAGTCCCGCCCCTAACTCCGCCCATCCCGCCC
CTAACTCCGCCCAGTTCCGCCCATTCTCCGCCCCATGGCTGACTAATTTTTTTTATT
TATGCAGAGGCCGAGGCCGCTCGGCCTCTGAGCTATTCCAGAAGTAGTGAGGAG
GCTTTTTTGGAGGCCTAGGCTTTTGCAAAAAGCTAACTTGTTTATTGCAGCTTATA
ATGGTTACAAATAAAGCAATAGCATCACAAATTTACAAATAAAGCATTTTTTTTCA
CTGCATTCTAGTTGTGGTTTGTCCAACTCATCAATGTATCTTATCACCCGGG (30
配列番号87)

【0205】

Revプラスミドの構築：

RSVプロモーターおよびHIV Rev配列が、隣接するMfeIおよびXbaI制限部位を有する単一DNA断片として、MWG Operonによって合成された。その後、DNA断片を、CMVプロモーターがRSVプロモーターに置換されているpCDNA3.1プラスミド (Invitrogen) のMfeIおよびXbaI制限部位に挿入した。DNA配列は以下の通りであった：

10

20

30

40

50

【化 4 8】

CAATTGCGATGTACGGGCCAGATATACGCGTATCTGAGGGGACTAGGGTGTGTTT
 AGGCGAAAAGCGGGGCTTCGGTTGTACGCGGTTAGGAGTCCCCTCAGGATATAGT
 AGTTTCGCTTTTGCATAGGGAGGGGGAAATGTAGTCTTATGCAATACACTTGTAGT
 CTTGCAACATGGTAACGATGAGTTAGCAACATGCCTTACAAGGAGAGAAAAAGCA
 CCGTGCATGCCGATTGGTGGAAAGTAAGGTGGTACGATCGTGCCTTATTAGGAAGG
 CAACAGACAGGTCTGACATGGATTGGACGAACCACTGAATTCCGCATTGCAGAGA
 TAATTGTATTTAAGTGCCTAGCTCGATACAATAAACGCCATTTGACCATTACACCAC
 ATTGGTGTGCACCTCCAAGCTCGAGCTCGTTTAGTGAACCGTCAGATCGCCTGGAG
 ACGCCATCCACGCTGTTTTGACCTCCATAGAAGACACCGGGACCGATCCAGCCTCC
 CCTCGAAGCTAGCGATTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAGCGGAGACAGCGAC
 GAAGAACTCCTCAAGGCAGTCAGACTCATCAAGTTTCTCTATCAAAGCAACCCAC
 CTCCCAATCCCGAGGGGACCCGACAGGCCCGAAGGAATAGAAGAAGAAGGTGGA
 GAGAGAGACAGAGACAGATCCATTGATTAGTGAACGGATCCTTAGCACTTATCT
 GGGACGATCTGCGGAGCCTGTGCCTCTTCAGCTACCACCGCTTGAGAGACTTACTC
 TTGATTGTAACGAGGATTGTGGAACCTTCTGGGACGCAGGGGGTGGGAAGCCCTCA
 AATATTGGTGGAAATCTCCTACAATATTGGAGTCAGGAGCTAAAGAATAGTCTAGA
 (配列番号 88)

10

20

【0206】

2ベクターおよび3ベクターパッケージングシステムのプラスミドを、類似のエレメントで改変し、ベクター機能を喪失させずにイントロン配列を潜在的に除去することができる。例えば、以下のエレメントを、2ベクターおよび3ベクターパッケージングシステムの類似エレメントの代わりに使用することができる可能性がある。

30

【0207】

プロモーター：伸長因子-1 (EF-1) (配列番号64)、ホスホグリセリン酸キナーゼ (PGK) (配列番号65)、およびユビキチンC (UbC) (配列番号66) を、CMV (配列番号60) またはCAGプロモーター (配列番号100) の代わりに使用することができる。

【0208】

ポリA配列：SV40ポリA (配列番号67) およびbGHポリA (配列番号68) を、ウサギベータグロビンポリA (配列番号48) の代わりに使用することができる。

【0209】

HIV Gag、Pol、およびインテグラーゼ配列：ヘルパープラスミド中のHIV配列は、異なるHIV株またはクレードから構築することができる。例えば、Bal株に由来するHIV Gag (配列番号69) ; HIV Pol (配列番号70) ; およびHIV Int (配列番号71) を、本明細書で概説されているようなヘルパー／ヘルパー+Revプラスミドに含まれているgag、pol、およびint配列と交換することができる。

40

【0210】

エンベロープ：VSV-G糖タンパク質は、ネコ内在性ウイルス (RD114) (配列番号72)、テナガザル類人猿白血病ウイルス (GALV) (配列番号73)、狂犬病 (FUG) (配列番号74)、リンパ球脈絡髄膜炎ウイルス (LCMV) (配列番号75)、インフルエンザA型家禽ペストウイルス (FPV) (配列番号76)、ロスリバーアル

50

ファウウイルス（RRV）（配列番号77）、マウス白血病ウイルス10A1（MLV）（配列番号78）、またはエボラウイルス（EbV）（配列番号79）に由来する膜糖タンパク質と置換することができる。これらのエンベロープの配列は、本明細書中の配列部分で特定されている。

【0211】

要約すると、3ベクターシステム対4ベクターシステムは、部分的には、以下のように比較および対比させることができる。3ベクターレンチウイルスベクターシステムは、以下のものを含む：1．ヘルパープラスミド：HIV Gag、Pol、インテグラーゼ、およびRev/Tat；2．エンベローププラスミド：VSV-G/FUGエンベロープ；および3．療法用ベクター：RSV 5'LTR、Psiパッケージングシグナル、Gag断片、RRE、Env断片、cPPT、WPRE、および3'デルタLTR。4ベクターレンチウイルスベクターシステムは、以下のものを含む：1．ヘルパープラスミド：HIV Gag、Pol、およびインテグラーゼ；2．Revプラスミド：Rev；3．エンベローププラスミド：VSV-G/FUGエンベロープ；および4．療法用ベクター：RSV 5'LTR、Psiパッケージングシグナル、Gag断片、RRE、Env断片、cPPT、WPRE、および3'デルタLTR。上記の元素に対応する配列は、本明細書の配列表部分で特定されている。

【0212】

（実施例2：抗HIVレンチウイルスベクターの開発）

この実施例の目的は、抗HIVレンチウイルスベクターを開発することであった。

【0213】

阻害性RNA設計。ホモ・サピエンス（Homo sapiens）ケモカインC-Cモチーフ受容体5（CCR5）（GC03P046377）mRNAの配列を使用して、ヒト細胞のCCR5レベルをノックダウンする潜在的なsiRNAまたはshRNA候補を探索した。潜在的RNA干渉配列は、Broad InstituteからなどのsiRNAまたはshRNA設計プログラムまたはThermo ScientificからのBLOCK-iT RNAi Designerによって選択された候補から選んだ。shRNA発現を調節するために、H1、U6、または7SKのようなRNAポリメラーゼIIプロモーターのすぐ3'側へ、個々の選択したshRNA配列をレンチウイルスベクターに挿入した。これらのレンチウイルス-shRNA構築物を使用して、細胞に形質導入し、特異的mRNAレベルの変化を測定した。mRNAレベルを減少させるために最も強力なshRNAは、CMVまたはEF-1アルファRNAポリメラーゼIIプロモーターのいずれかによる発現を可能にするために、マイクロRNA骨格内に個々に埋め込んだ。マイクロRNA骨格はmirbase.org/から選択された。RNA配列はまた、合成siRNAオリゴヌクレオチドとして合成され、レンチウイルスベクターを使用せずに直接細胞内に導入された。

【0214】

ヒト免疫不全ウイルス1型（HIV-1 85US__BaL、受託番号AY713409）のBaL株のゲノム配列を使用して、ヒト細胞におけるHIV複製レベルをノックダウンする潜在的なsiRNAまたはshRNA候補を探索した。配列相溶性および経験に基づいて、HIVのTatおよびVif遺伝子の領域に探索の焦点を合わせたが、当業者はこれらの領域の使用が非限定的であり、他の潜在的な標的が選択され得ることを理解し得る。重要なことに、gagまたはpol遺伝子の高保存領域は、これらの同配列がベクター製造に必要なパッケージングシステム相補性プラスミドに存在したため、shRNAによって標的化することができなかった。CCR5（NM_000579.3、NM_001100168.1特異的RNA）と同様に、潜在的なHIV特異的RNA干渉配列は、Broad Institute（broadinstitute.org/mai/public）が主催するGene-EソフトウェアスイートからなどのsiRNAまたはshRNA設計プログラムまたはThermo ScientificからのBLOCK-iT RNAi Designer（rnadesigner.thermofisher.com/rnaiexpress/setOption.do?designOption=

10

20

30

40

50

shrna&pid=6712627360706061801) によって選択された候補から選択された。shRNA発現を調節するために、H1、U6、または7SKのようなRNAポリメラーゼIIプロモーターのすぐ3'側へ、個々の選択したshRNA配列をレンチウイルスベクターに挿入した。これらのレンチウイルス-shRNA構築物を使用して、細胞に形質導入し、特異的mRNAレベルの変化を測定した。mRNAレベルを減少させるために最も強力なshRNAは、CMVまたはEF-1アルファRNAポリメラーゼIIプロモーターのいずれかによる発現を可能にするために、マイクロRNA骨格内に個々に埋め込んだ。

【0215】

ベクター構築。CCR5、TatまたはVif shRNAについて、BamHIおよびEcoRI制限部位を含むオリゴヌクレオチド配列が、Eurofins MWG Operon, LLCによって合成された。オーバーラップするセンスおよびアンチセンスオリゴヌクレオチド配列を混合し、70℃から室温まで冷却する間にアニールさせた。レンチウイルスベクターを制限酵素BamHIおよびEcoRIで、37℃で1時間、消化した。消化したレンチウイルスベクターをアガロースゲル電気泳動で精製し、InvitrogenのDNAゲル抽出キットを使用してゲルから抽出した。DNA濃度を決定し、ベクター対オリゴ(3:1の比)を混合し、アニールさせ、ライゲーションした。ライゲーション反応はT4 DNAリガーゼを用いて室温で30分間実施した。2.5マイクロリットルのライゲーションミックスを25マイクロリットルのSTBL3コンピテント細菌細胞に添加した。形質転換は、42℃でのヒートショック後に達成された。アンピシリンを含有する寒天プレート上に細菌細胞を広げ、薬物耐性コロニー(アンピシリン耐性プラスミドの存在を示す)を回収し、精製し、LBブロスで増殖させた。オリゴ配列の挿入をチェックするために、Invitrogen DNAミニプレップキットを用いて、収穫した細菌培養物からプラスミドDNAを抽出した。レンチウイルスベクター中のshRNA配列の挿入を、shRNA発現を調節するために使用されるプロモーターのための特異的プライマーを使用したDNA配列決定によって確認した。HIV複製を制限することが決定された例示的なベクター配列は、図6に見出すことができる。その後、例えば、CCR5、Tat、またはVif遺伝子発現に対して最も高い活性を有するshRNA配列を、EF-1アルファプロモーター制御下のマイクロRNA(miR)クラスターに組み立てた。プロモーターおよびmiRの配列を図6に示す。

【0216】

さらに、標準的な分子生物学技術(例えば、Sambrook; Molecular Cloning: A Laboratory Manual、第4版)ならびに本明細書に記載されている技術を使用して、本明細書の図7に示されているように、一連のレンチウイルスベクターを開発した。

【0217】

ベクター1を開発した。ベクター1は、左から右に向かって以下のものを含む: 末端反復配列(LTR)部分(配列番号35); H1エレメント(配列番号101); shCCR5(配列番号16、18、20、22、または24-Y); ウッドチャック肝炎ウイルスの転写後調節エレメント(WPRE)(配列番号32、80); および末端反復配列部分(配列番号102)。

【0218】

ベクター2を開発した。ベクター2は、左から右に向かって以下のものを含む: 末端反復配列(LTR)部分(配列番号35); H1エレメント(配列番号101); shRev/Tat(配列番号10); H1エレメント(配列番号101); shCCR5(配列番号16、18、20、22、または24); ウッドチャック肝炎ウイルスの転写後調節エレメント(WPRE)(配列番号32、80); および末端反復配列部分(配列番号102)。

【0219】

ベクター3を開発した。ベクター3は、左から右に向かって以下のものを含む: 末端反復配列(LTR)部分(配列番号35); H1エレメント(配列番号101); shGag(配列番号12); H1エレメント(配列番号101); shCCR5(配列番号16

、18、20、22、または24)；ウッドチャック肝炎ウイルスの転写後調節エレメント(WPRE)(配列番号32、80)；および末端反復配列部分(配列番号102)。

【0220】

ベクター4を開発した。ベクター4は、左から右に向かって以下のものを含む：末端反復配列(LTR)部分(配列番号35)；7SKエレメント(配列番号103)；shRev/Tat(配列番号10)；H1エレメント(配列番号101)；shCCR5(配列番号16、18、20、22、または24)；ウッドチャック肝炎ウイルスの転写後調節エレメント(WPRE)(配列番号32、80)；および末端反復配列部分(配列番号102)。

【0221】

ベクター5を開発した。ベクター5は、左から右に向かって以下のものを含む：末端反復配列(LTR)部分(配列番号35)；EF1エレメント(配列番号4)；miR30CCR5(配列番号1)；MiR21Vif(配列番号2)；miR185Tat(配列番号3)；ウッドチャック肝炎ウイルスの転写後調節エレメント(WPRE)(配列番号32、80)；および末端反復配列部分(配列番号102)。

【0222】

ベクター6を開発した。ベクター6は、左から右に向かって以下のものを含む：末端反復配列(LTR)部分(配列番号35)；EF1エレメント(配列番号4)；miR30CCR5(配列番号1)；MiR21Vif(配列番号2)；miR155Tat(配列番号104)；ウッドチャック肝炎ウイルスの転写後調節エレメント(WPRE)(配列番号32、80)；および末端反復配列部分(配列番号102)。

【0223】

ベクター7を開発した。ベクター7は、左から右に向かって以下のものを含む：末端反復配列(LTR)部分(配列番号35)；EF1エレメント(配列番号4)；miR30CCR5(配列番号1)；MiR21Vif(配列番号2)；miR185Tat(配列番号3)；ウッドチャック肝炎ウイルスの転写後調節エレメント(WPRE)(配列番号32、80)；および末端反復配列部分(配列番号102)。

【0224】

ベクター8を開発した。ベクター8は、左から右に向かって以下のものを含む：末端反復配列(LTR)部分(配列番号35)；EF1エレメント(配列番号4)；miR30CCR5(配列番号1)；MiR21Vif(配列番号2)；miR185Tat(配列番号3)；および末端反復配列部分(配列番号102)。

【0225】

ベクター9を開発した。ベクター9は、左から右に向かって以下のものを含む：末端反復配列(LTR)部分(配列番号35)；CD4エレメント(配列番号30)；miR30CCR5(配列番号1)；miR21Vif(配列番号2)；miR185Tat(配列番号3)；ウッドチャック肝炎ウイルスの転写後調節エレメント(WPRE)(配列番号32、80)；および末端反復配列部分(配列番号102)。

【0226】

ベクターの開発

これらの実験のために開発されたベクターが必ずしもすべて予想通りに機能した訳ではなかったことに留意すべきである。より具体的には、HIVに対するレンチウイルスベクターは、3つの主要成分を含んでもよい：1)標的細胞表面のHIV結合タンパク質(受容体)のレベルを低減させて、初期ウイルス付着および侵入を遮断するための阻害性RNA；2)ウイルスTatタンパク質を隔離し、ウイルス遺伝子発現をトランス活性化その能力を減少させることになるHIV TAR配列の過剰発現；および3)HIVゲノム内の重要な保存配列を攻撃する阻害性RNA。

【0227】

上記の第1の点に関して、重要な細胞表面HIV結合タンパク質は、ケモカイン受容体CCR5である。HIV粒子は、CD4およびCCR5細胞表面タンパク質に結合するこ

10

20

30

40

50

とにより、感受性T細胞に付着する。CD4は、T細胞の免疫学的機能に重要である必須細胞表面糖タンパク質であるため、その発現レベルを操作する標的としては選択しなかった。しかしながら、CCR5遺伝子のヌル変異が生まれながらにホモ接合性であり、受容体発現が完全に欠如している人々は、少数の感染性疾患に対する感受性が増強されること、および希に自己免疫を発症する可能性があることを除けば、正常な生活を送る。したがって、CCR5のモジュレーションは、比較的安全なアプローチであると決定し、抗HIVレンチウイルスベクターの開発における主要な標的とした。

【0228】

上記の第2の点に関して、ウイルスTAR配列は、ウイルスTatタンパク質に強固に結合する、HIVゲノムRNAの高度構造化領域である。Tat:TAR複合体は、ウイルスRNAの効率的な生成に重要である。TAR領域の過剰発現は、Tatタンパク質を隔離し、ウイルスRNAのレベルを減少させる可能性があるデコイ分子として企図されている。しかしながら、TARは、レンチウイルス粒子を製造するために使用される細胞を含むほとんどの哺乳動物細胞に対して毒性であることが証明された。さらに、TARは、他の実験室ではウイルス遺伝子発現の阻害が非効率的であり、HIV遺伝子治療における実行可能な成分としては放棄されている。

【0229】

種々の実施形態では、以下の3つの基準を満たすウイルス遺伝子配列を特定した：i) 一連のHIV単離株にわたって適度に保存されている配列が、目的の地理的領域の流行を代表するものであること；ii) ウイルスベクター中の阻害性RNAの活性によるRNAレベルの低減が、HIV複製を有意に低減させるのに十分な量だけ、対応するタンパク質レベルを低減させることになること；およびiii) 阻害性RNAによって標的とされるウイルス遺伝子配列が、製造中にウイルスベクター粒子をパッケージングおよび組み立てるのに必要な遺伝子中に存在しないこと。種々の実施形態では、HIV Tat+Rev遺伝子の接合部の配列、およびHIV Vif遺伝子内の第2の配列を、阻害性RNAによる標的とした。Tat/Rev標的化は、この領域が、HIVゲノムのエンベロープ遺伝子と重複するため、HIVエンベロープ糖タンパク質発現を低減するというさらなる利益を有する。

【0230】

ベクターを開発および試験するための種々の方法は、まず、適切な標的を特定し（本明細書に記載のように）、その後、細胞モデルにおいて試験するための個々のまたは複数の阻害性RNA種を発現するプラスミドDNAを構築し、最終的には、実証済みの抗HIV機能を有する阻害性RNAを含むレンチウイルスベクターを構築することに依存する。レンチウイルスベクターを、毒性、in vitro産生中の収量、およびCCR5発現レベルを低減させるかまたはウイルス遺伝子産物を低下させてウイルス複製を阻害する点におけるHIVに対する有効性について試験する。

【0231】

以下の表2には、複数のバージョンの阻害性構築物を経て臨床候補に到着するまでの進行が実証されている。まず、shRNA（短い相同性RNA）分子を設計し、プラスミドDNA構築物から発現させた。

【0232】

以下の表2に詳述されているプラスミド1～4で、HIVのGag、Pol、およびRT遺伝子に対するshRNA配列を試験した。各shRNAは、細胞モデルにおいてウイルスタンパク質発現の抑制に活性であったが、さらなる開発を妨げた2つの重要な問題があった。第1に、それら配列は、北米および欧州で現在循環しているクレードB HIV株を代表しないHIVの実験室単離株を標的としていた。第2に、これらのshRNAは、レンチウイルスベクターパッケージングシステムの重要な成分を標的としていたため、製造中にベクター収量を著しく低減することになるであろう。表2に詳述されているプラスミド5は、CCR5を標的とするように選択され、リード候補配列を提供した。表2に詳述されているプラスミド6、7、8、9、10、および11は、TAR配列を組み込ん

10

20

30

40

50

であり、レンチウイルスベクター製造に使用される細胞を含む哺乳動物細胞に対して許容できない毒性をもたらしたことが見出された。表 2 に詳述されているプラスミド 2 では、Tat RNA 発現を低減することができるリード shRNA 配列が特定された。表 2 に詳述されているプラスミド 12 は、レンチウイルスベクターのマイクロ RNA (miR) として発現された shCCR5 の有効性を実証し、それが最終産物内にあるべきことが確認された。表 2 に詳述されているプラスミド 13 は、レンチウイルスベクターのマイクロ RNA (miR) として発現された shVif の有効性を実証し、それが最終産物内にあるべきことが確認された。表 2 に詳述されているプラスミド 14 は、レンチウイルスベクターのマイクロ RNA (miR) として発現された shTat の有効性を実証し、それが最終産物内にあるべきことが確認された。表 2 に詳述されているプラスミド 15 は、miR CCR5、miR Tat、および miR Vif を、単一プロモーターから発現される miR クラスターの形態で含んでいた。これらの miR は、レンチウイルスベクターパッケージングシステムの重要な成分を標的とせず、哺乳動物細胞に対する毒性が無視できる程度であることが証明された。クラスター内の miR は、以前に試験された個々の miR と同等に有効であった。全体的な影響は、CCR5 指向性 HIV BaL 株の複製の大幅な低減であった。

10

20

30

40

50

【表 2 - 1】

表2:HIVベクターの開発

	内部コード	材料	説明	備考	決定
1	SIH-H1-shRT-1,3	レンチウイルスベクター	LAI 株の RT 用の shRNA 構築物	間違った標的、実験用ウイルス、ウイルス試験無し	放棄
2	SIH-H1-shRT43 (Tat/Rev NL4-3)	レンチウイルスベクター	HI プロモーター-shRNA Tat/Rev オーバーラップ	Tat タンパク質ノックダウン>90%	リード
ベクター構築: Rev/Tat(RT)shRNA について、BamHI および EcoRI 制限部位を含むオリゴヌクレオチド配列が、MWG Operon によって合成された。2 つの異なる Rev/Tat 標的配列を、Tat mRNA 発現を減少させるそれらの能力に関して試験した。RT1,3 標的配列は、(5'-ATGGCAGGAAGAAGCGGAG-3')(配列番号 89)であり、shRNA 配列は、(5'-ATGGCAGGAAGAAGCGGAGTTCAAGAGACTCCGCTTCTTCTGCCATTTTTT-3')(配列番号 90)である。RT43 配列は、(5'-GCGGAGACAGCGACGAAGAGC-3')(配列番号 9)であり、shRNA 配列は、(5'-GCGGAGACAGCGACGAAGAGCTTCAAGAGAGCTCTTCGTCGCTGTCTCCGCTTTTT-3')(配列番号 10)である。オリゴヌクレオチド配列を、pSIH レンチウイルスベクター (System Biosciences)に挿入した。 Rev/Tat に対する shRNA の機能試験: ベクターが Tat 発現を低減する能力を、3'-UTR(mRNA の非翻訳領域)に挿入された Rev/Tat 標的配列を含むルシフェラーゼレポータープラスミドを使用して試験した。shRT1,3 または shRT43 プラスミドのいずれかを、ルシフェラーゼおよび Rev/Tar 標的配列を含むプラスミドと共に同時トランスフェクトした。shRT43 shRNA 配列では発光が 90%低減し、その機能が強力であることが示されたが、shRT1,3 プラスミドでは 10%未満であった。 結論: SIH-H1-shRT43 は、ルシフェラーゼアッセイシステムでの mRNA レベルを低減させた点で、SIH-H1-shRT-1,3 よりも優れていた。これは、shRT43 配列の阻害活性が強力であること示す。shRT43 配列を、さらなる開発のリード候補として選択した。					
3	SIH-H1-shGag-1	レンチウイルスベクター	LAI Gag の shRNA 構築物	Gag 発現を阻害するが、パッケージングを阻害することになる	放棄

10

20

30

40

50

【表 2 - 2】

ベクター構築: Gag shRNA について、BamHI および EcoRI 制限部位を含むオリゴヌクレオチド配列が、MWG Operon によって合成された。Gag 標的配列を、Gag mRNA 発現を減少させるそれらの能力に関して試験した。Gag 標的配列は、(5'-GAAGAAATGATGACAGCAT-3')(配列番号 11)であり、shRNA 配列は、(5'-GAAGAAATGATGACAGCATTCAAGAGAATGCTGTCATCATTTCTTCTTTT-3')(配列番号 12)である。オリゴヌクレオチド配列を、pSIH レンチウイルスベクター(System Biosciences)に挿入した。					
Gag に対する shRNA の機能試験:ベクターが Gag 発現を低減する能力を、3'-UTR(mRNA の非翻訳領域)に挿入された Gag 標的配列を含むルシフェラーゼレポータープラスミドを使用して試験した。Gag プラスミドを、ルシフェラーゼをおよび Gag 標的配列を含むプラスミドと共に同時トランスフェクトした。発光がほぼ 90%低減され、shGag shRNA 配列の効果が強力であることが示された。					
結論:この shRNA 配列は、HIV Gag 発現に対して強力だが、放棄した。レンチウイルスパッケージングシステムは、ヘルパープラスミドからの Gag 産生を必要とし、Gag の shRNA 阻害は、レンチウイルスベクター収量を低減させることになる。この shRNA 配列は、HIV のオリゴヌクレオチド阻害剤として使用することができるか、または異なるベクターゲノムが使用されているかもしくはこの shRNA による阻害に抵抗するように改変されている代替的ウイルスベクターパッケージングシステムに組み込んでもよい。					
4	SIH-H1-shPol-1	レンチウイルスベクター	Pol の shRNA 構築物	Pol 発現を阻害するが、パッケージングを阻害することになる	放棄
ベクター構築: MWG Operon によって合成された、BamHI および EcoRI 制限部位を含むオリゴヌクレオチド配列を有する Pol shRNA を構築した。Pol 標的配列を、Pol mRNA 発現を減少させるその能力に関して試験した。Pol 標的配列は、(5'-CAGGAGCAGATGATACAG-3')(配列番号 13)であり、shRNA 配列は、(5'-CAGGAGATGATACAGTTCAAGAGACTGTATCATCTGCTCCTGTTTTT-3')(配列番号 14)である。オリゴヌクレオチド配列を、pSIH レンチウイルスベクター(System Biosciences)に挿入した。					
HIV Pol に対する shRNA の機能試験:ベクターが Pol 発現を低減する能力を、3'-UTR(mRNA の非翻訳領域)に挿入された Pol 標的配列を含むルシフェラーゼレポーター					

【表 2 - 3】

ラスミドを使用して試験した。Pol プラスミドを、ルシフェラーゼおよび Pol 標的配列を含むプラスミドと共に同時トランスフェクトした。発光が 60%低減され、shPol shRNA 配列の効果が強力であることが示された。

結論この shRNA 配列は、HIV Pol 発現に対して強力だが、放棄した。レンチウイルスパッケージングシステムは、ヘルパープラスミドからの Pol 産生を必要とし、Pol の shRNA 阻害は、レンチウイルスベクター収量を低減させることになる。この shRNA 配列は、HIV のオリゴヌクレオチド阻害剤として使用することができるか、または異なるベクターゲノムが使用されているかもしくはこの shRNA による阻害に抵抗するように改変されている代替のウイルスベクターパッケージングシステムに組み込んでもよい。

5	SIH-H1-shCCR5-1	レンチウイルスベクター	CCR5 の shRNA 構築物	5 候補中で最良、細胞外 CCR5 タンパク質低減>90%	リード
ベクター構築: MWG Operon によって合成された、BamHI および EcoRI 制限部位を含むオリゴヌクレオチド配列を有する CCR5 shRNA を構築した。オリゴヌクレオチド配列を、pSIH レンチウイルスベクター(System Biosciences)に挿入した。CCR5 遺伝子配列 1(配列番号 25)に着目する CCR5 標的配列#1 は、(5'-GTGTCAAGTCCAATCTATG-3')(配列番号 15)であり、shRNA 配列は、(5'-GTGTCAAGTCCAATCTATGTTCAAGAGACATAGATTGGACTTGACACTTTTT-3')(配列番号 16)である。CCR5 遺伝子配列 2(配列番号 26)に着目する CCR5 標的配列#2 は、(5'-GAGCATGACTGACATCTAC-3')(配列番号 17)であり、shRNA 配列は、(5'-GAGCATGACTGACATCTACTTCAAGAGAGTAGATGTCAGTCATGCTCTTTTT-3')(配列番号 18)である。CCR5 遺伝子配列 3(配列番号 27)に着目する CCR5 標的配列#3 は、(5'-GTAGCTCTAACAGGTTGGA-3')(配列番号 19)であり、shRNA 配列は、(5'-GTAGCTCTAACAGGTTGGATTCAAGAGATCCAACCTGTTAGAGCTACTTTTT-3')(配列番号 20)である。CCR5 遺伝子配列 4(配列番号 28)に着目する CCR5 標的配列#4 は、(5'-GTTTCAGAACTACCTCTTA-3')(配列番号 21)であり、shRNA 配列は、(5'-GTTTCAGAACTACCTCTTATTCAAGAGATAAGAGGTAGTTTCTGAACTTTTT-3')(配列番号 22)である。CCR5 遺伝子配列 5(配列番号 29)に着目する CCR5 標的配列#5 は、(5'-GAGCAAGCTCAGTTTACACC-3')(配列番号 23)であり、shRNA 配列は、(5'-GAGCAAGCTCAGTTTACACCTTCAAGAGAGGTGTAACTGAGCTTGCTCTTTTT-3')(配列番号 24)である。 CCR5 に対する shRNA の機能試験: CCR5 shRNA 配列が、CCR5 RNA 発現をノックダウ					

10

20

30

40

50

【表 2 - 4】

ンする能力を、まず、5つの CCR5 標的配列の1つを含むレンチウイルスプラスミドの各々を、各プラスミド毎に別の実験で、ヒト CCR5 遺伝子を発現するプラスミドと共に同時トランスフェクトすることにより試験した。次に、CCR5 mRNA 発現を、CCR5 特異的プライマーを使用して qPCR 分析によって評価した。 結論: CCR5 mRNA レベルの低減に基づき、shRNACCR5-1 が、CCR5 遺伝子発現の低減に最も強力であった。この shRNA をリード候補として選択した。					
6	SIH-U6-TAR	レンチウイルスベクター	U6 プロモーター-TAR	細胞に対して毒性	放棄
7	SIH-U6-TAR-H1-shCCR5	レンチウイルスベクター	U6 プロモーター-TAR-H1-shCCR5	細胞に対して毒性	放棄
8	U6-TAR-H1-shRT	レンチウイルスベクター	U6 プロモーター-TAR-H1-RT	HIV を抑制、細胞に対して毒性、パッケージングが不良	放棄
9	U6-TAR-7SK-shRT	レンチウイルスベクター	shRNA プロモーターを 7SK に変更	毒性、パッケージングが不良	放棄
10	U6-TAR-H1-shRT-H1-shCCR5	レンチウイルスベクター	U6 プロモーター-TAR-H1-RT-H1-shCCR5	毒性、パッケージングが不良、H1 が反復	放棄
11	U6-TAR-7SK-shRT-H1-CCR5	レンチウイルスベクター	shRNA プロモーターを 7SK に変更	毒性、パッケージングが不良	放棄
ベクター構築: 隣接する KpnI 制限部位を含む TAR デコイ配列が、MWG オペロンによって合成され、pSIH レンチウイルスベクター(System Biosciences)の KpnI 部位に挿入された。このベクターでは、TAR 発現は、U6 プロモーターによって調節される。TAR デコイ配列は、(5'-CTTGCAATGATGTCGTAATTTGCGTCTTACCTCGTTCTCGACAGCGACCAGATCTGAGCCTGGGAGCTCTCTGGCTGTCAGTAAGCTGGTACAGAAGGTTGACGAAAATTCTTACTGAGCAAGAAA-3')(配列番号 8)である。TAR デコイ配列の発現を、TAR 配列に対					

10

20

30

40

50

【表 2 - 5】

して特異的なプライマーを使用して qPCR 分析によって決定した。TAR 配列も含むさらなるベクターを構築した。H1 プロモーターおよび shRT 配列を、このベクターの XhoI 部位に挿入した。H1 shRT 配列は、(5'- GAACGCTGACGTCATCAACCCGCTCCAAGGAATCGCGGGCCCAGTGTCAGTACTAGGCGGGAACACCCAGCGCGCGTGCGCCCTGGCAGGAAGATGGCTGTGAGGGACAGGGGAGTGCGCGCCCTGCAATATTTGCATGTCGCTATGTGTTCTGGGAAATCACCATAAACGTGAAATGTCTTTGGATTTGGGAATCTTATAAGTTCTGTATGAGACCACTTGGATCCGCGGAGACAGCGACGAAGAGCTTCAAGAGAGCTCTTCGTCGCTGTCTCCGCTTTTT-3')(配列番号 91)である。このベクターは、TAR を発現し、RT をノックダウンすることができた。また、7SK プロモーターを H1 プロモーターの代わりに使用して、shRT 発現を調節した。U6 TAR、H1 shRT、および H1 shCCR5 を含む別のベクターを構築した。H1 shCCR5 配列を、U6 TAR および H1 shRT を含むプラスミドの SpeI 部位に挿入した。H1 CCR5 配列は、(5'- GAACGCTGACGTCATCAACCCGCTCCAAGGAATCGCGGGCCCAGTGTCAGTACTAGGCGGGAACACCCAGCGCGCGTGCGCCCTGGCAGGAAGATGGCTGTGAGGGACAGGGGAGTGCGCGCCCTGCAATATTTGCATGTCGCTATGTGTTCTGGGAAATCACCATAAACGTGAAATGTCTTTGGATTTGGGAATCTTATAAGTTCTGTATGAGACCACTTGGATCCGTGTCAAGTCCAATCTATGTTCAAGAGACATAGATTGGACTTGACACTTTTT-3')(配列番号 92)である。また、7SK プロモーターを H1 プロモーターの代わりに使用して、shRT 発現を調節した。 TAR デコイ活性の機能試験:本発明者らは、パッケージング効率に対する SIH-U6-TAR の効果を試験した。TAR 配列が含まれていた場合、SIH パッケージングシステムでのベクター収量は、実質的に低減された。 結論: TAR デコイ配列を発現するレンチウイルスベクターは、ベクター収量が低いため、商業的開発には適さない。これらの構築物は放棄した。					
12	shCCR5	レンチウイルスベクター	マイクロ RNA 配列	細胞外 CCR5 タンパク質低減>90%	リード
ベクター構築: MWG Operon によって合成された、BsrGI および NotI 制限部位を含むオリゴヌクレオチド配列を有する CCR5 マイクロ RNA を構築した。オリゴヌクレオチド配列を、pCDH レンチウイルスベクター(System Biosciences)に挿入した。EF-1 プロモーターを、プラスミド構築物試験材料 5 で使用した CMV プロモーターの代わりに使用した。隣接する ClaI および BsrGI 制限部位を含む EF-1 プロモーターが、MWG Operon によ					

10

20

30

40

50

【表 2 - 6】

て合成され、shCCR5-1 を含む pCDH ベクターに挿入された。EF-1 プロモーター配列は、(5'-

CCGGTGCCTAGAGAAGGTGGCGCGGGGTAACTGGGAAAGTGATGTCGTGTACTG
GCTCCGCCTTTTTCCCGAGGGTGGGGGAGAACCGTATATAAGTGCAGTAGTCGCCG
TGAACGTTCTTTTTCGCAACGGGTTTGCCGCCAGAACACAGGTAAGTGCCGTGTGT
GGTTCGCGCGGGCCTGGCCTCTTTACGGGTTATGGCCCTTGCCTGCCTTGAATTACT
TCCACGCCCCCTGGCTGCAGTACGTGATTCTTGATCCCGAGCTTCGGGTTGGAAGTG
GGTGGGAGAGTTCGAGGCCTTGCCTTAAGGAGCCCCCTTCGCCTCGTGCTTGAGTT
GAGGCCTGGCCTGGGCGCTGGGGCCGCCGCTGCGAATCTGGTGGCACCTTCGCGC
CTGTCTCGCTGCTTTTCGATAAGTCTCTAGCCATTTAAAAATTTTGATGACCTGCTGC
GACGCTTTTTTCTGGCAAGATAGTCTTGTAATGCGGGCCAAGATCTGCACACTG
GTATTTCCGTTTGTGGGGCCGCGGGCGGCGACGGGGCCCGTGCCTCCAGCGCACACA
TGTTCCGCGAGGCGGGGCTGCGAGCGCGGCCACCGAGAATCGGACGGGGGTAGT
CTCAAGCTGGCCGGCCTGCTCTGGTGCCTGGCCTCGCGCCCGCTGTATCGCCCCG
CCTGGGCGGCAAGGCTGGCCCGGTCGGCACCAGTTGCGTGAGCGGAAAGATGGCC
GCTTCCCGGCCCTGCTGCAGGGAGCTCAAAATGGAGGACGCGGCGCTCGGGAGAG
CGGGCGGGTGAGTACCCACACAAAGGAAAAGGGCCTTCCGTCCTCAGCCGTCGC
TTCATGTGACTCCACGGAGTACCGGGCGCCGTCCAGGCACCTCGATTAGTTCTCGA
GCTTTTGGAGTACGTCGCTTTAGGTTGGGGGGAGGGGTTTTATGCGATGGAGTTTC
CCCACACTGAGTGGGTGGAGACTGAAGTTAGGCCAGCTTGGCACTTGATGTAATTC
TCCTTGGAATTTGCCCTTTTTGAGTTTGGATCTTGGTTTATTCTCAAGCCTCAGACA
GTGGTTCAAAGTTTTTTCTTCCATTTAGGTGTCGTGA-3')(配列番号 4)である。

レンチウイルス *CDH-shCCR5-1* の機能試験: miR CCR5 配列が、CCR5 発現をノックダウンする能力を、CEM-CCR5 T 細胞への形質導入を行い、CCR5 に対する蛍光標識モノクローナル抗体で染色し、染色の強度を測定した後、細胞表面 CCR5 発現を測定することによって決定した。染色の強度は、分析フローサイトメトリーによる細胞表面 CCR5 分子の数と正比例する。CCR5 の標的化に最も有効な shRNA 配列は、CCR5 shRNA 配列#1 であった。しかしながら、合成マイクロ RNA 配列の構築に最も有効な CCR5 標的化配列は、CCR5 配列#5 とオーバーラップしていた。この結論は、配列アラインメントおよび miRNA 構築の経験に基づいていた。最後に、miR30 ヘアピン配列を使用して、合成 miR30 CCR5 配列を構築した。合成 miR30 CCR5 配列は、(5'-

AGGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCGACTGTAACTGAGCTTGCTCTACTGTGAAG
CCACAGATGGGTAGAGCAAGCACAGTTTACCGCTGCCTACTGCCTCGGACTTCAAG
GGGCTT-3')(配列番号 1)である。miR CCR5 標的配列は、(5'-
GAGCAAGCTCAGTTTACA-3')(配列番号 5)である。5 に等しい感染多重度では、細胞あ

10

20

30

40

50

【表 2 - 7】

たり平均で 1.25 ゲノムコピーの組み込みレンチウイルスが生成され、CCR5 発現レベルは、$\geq 90\%$低減された。これは、レンチウイルスベクターの miR30CCR5 マイクロ RNA 構築物によって、CCR5 mRNA が強力に阻害されたことを示す。 結論: miR30CCR5 構築物は、CCR5 細胞表面発現の低減に強力であり、HIV の療法用レンチウイルスのリード候補である。					
13	shVif	レンチウイルスベクター	マイクロ RNA 配列	Vif タンパク質低減>80%	リード
ベクター構築: MWG Operon によって合成された、BsrGI および NotI 制限部位を含むオリゴヌクレオチド配列を有する Vif マイクロ RNA を構築した。オリゴヌクレオチド配列を、EF-1 プロモーターを含む pCDH レンチウイルスベクター(System Biosciences)に挿入した。配列アラインメントおよび合成 miRNA 構築の経験に基づき、miR21 ヘアピン配列を使用して、合成 miR21 Vif 配列を構築した。合成 miR21 Vif 配列は、(5'-CATCTCCATGGCTGTACCACCTTGTCGGGGGATGTGTACTTCTGAACTTGTGTTGAA TCTCATGGAGTTCAGAAGAACACATCCGCACTGACATTTTGGTATCTTTCATCTGAC CA-3')(配列番号 2)である。miR Vif 標的配列は、(5'-GGGATGTGTACTTCTGAACTT-3')(配列番号 6)である。 miR21Vif の効力の機能試験: miR Vif 配列が Vif 発現をノックダウンする能力を、Vif タンパク質を特定するために抗 Vif モノクローナル抗体を使用したイムノブロット分析により Vif タンパク質発現を測定することによって決定した。 結論: イムノブロットデータの定量的画像分析によって決定したところ、miR21Vif は、Vif タンパク質発現を 1/10 以下に低減した。これは、本発明者らの療法用レンチウイルスのリード候補として、miR21Vif が妥当であることを証明するのに十分であった。					
14	shTat	レンチウイルスベクター	マイクロ RNA 配列	Tat RNA 低減 >80%	リード
ベクター構築: MWG Operon によって合成された、BsrGI および NotI 制限部位を含むオリゴヌクレオチド配列を有する Tat マイクロ RNA を構築した。マイクロ RNA クラスター					

10

20

30

40

50

【表 2 - 8】

一を、EF-1 プロモーターを含む pCDH レンチウイルスベクター(System Biosciences)に挿入した。配列アラインメントおよび合成 miRNA 構築の経験に基づき、miR185 ヘアピン配列を、合成 miR185 Tat 配列を構築するために選択した。合成 miR185 Tat 配列は、(5'-GGGCCTGGCTCGAGCAGGGGGCGAGGGATTCCGCTTCTTCCTGCCATAGCGTGGTC CCCTCCCCTATGGCAGGCAGAAGCGGCACCTTCCCTCCCAATGACCGCGTCTTCGTC G-3')である。miR Tat 標的配列は、(5'-TCCGCTTCTTCCTGCCATAG-3')(配列番号 3)である。

miR185 Tat の効力の機能試験: miR Tat が Tat 発現をノックダウンする能力を、Tat 特異的プライマーを使用した RT-PCR 分析により Tat mRNA 発現を測定することによって決定した。本発明者らは、miR185Tat (配列番号108)を、Tat mRNA の相対的レベルの低減に基づき、類似の miR155Tat と比較した。

結論: miR185Tat (配列番号108) は、miR155Tat と比較して、Tat mRNA の低減に関しておよそ 2 倍強力であった。miR185Tat を、本発明者らの療法用レンチウイルスのリード候補として選択した。

15	shCCR5-shVif-shTat	レンチウイルスベクター	マイクロ RNA クラスター配列	CCR5 低減>90%、Vif タンパク質低減>80%、Tat RNA 低減>80%、HIV 複製の>95%阻害	候補
----	--------------------	-------------	------------------	--	----

ベクター構築: MWG Operon によって合成された、BsrGI および NotI 制限部位を含む合成 DNA 断片を有する miR30CCR5 miR21Vif miR185Tat マイクロ RNA クラスター配列を構築した。DNA 断片を、EF-1 プロモーターを含む pCDH レンチウイルスベクター(System Biosciences)に挿入した。miR クラスター配列は、(5'-AGGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCGACTGTAACTGAGCTTGCTCTACTGTGAAG CCACAGATGGGTAGAGCAAGCACAGTTTACCGCTGCCTACTGCCTCGGACTTCAAG GGGCTTCCCGGGCATCTCCATGGCTGTACCACCTTGTGCGGGGGATGTGTACTTCTGA ACTTGTGTTGAATCTCATGGAGTTCAGAAGAACACATCCGCACTGACATTTTGGTAT CTTTCATCTGACCAGCTAGCGGGCCTGGCTCGAGCAGGGGGCGAGGGATTCCGCTT CTTCTGCCATAGCGTGGTCCCCCTCCCCTATGGCAGGCAGAAGCGGCACCTTCCCTC CCAATGACCGCGTCTTCGTC-3')(配列番号 31)であり、試験材料 12、試験材料 13、および試験材料 14 が、EF-1 プロモーターの制御下で発現させることができる単一クラスター

10

20

30

40

50

【表 2 - 9】

に組み込まれている。

miR30CCR5、*miR21Vif*、および*miR185Tat* のマイクロ RNA クラスターを含むレンチウイルスベクター *AGT103* の効力の機能試験: *AGT103* ベクターを、細胞表面 CCR5 発現における低減のためのアッセイを使用して、CCR5 に対する効力に関して試験した(試験材料 12)。 *AGT103* ベクターを、細胞表面 Vif 発現における低減のためのアッセイを使用して、Vif に対する効力に関して試験した(試験材料 13)。 *AGT103* ベクターを、細胞表面 Tat 発現における低減のためのアッセイを使用して、Tat に対する効力に関して試験した(試験材料 14)。

結論: miRNA クラスターによる CCR5 発現低減の効力は、*miR30CCR5* のみの場合に観察された効力と同様であった。 miRNA クラスターによる Vif 発現低減の効力は、*miR21Vif* のみの場合に観察された効力と同様であった。 miRNA クラスターによる Tat 発現低減の効力は、*miR185Tat* のみの場合に観察された効力と同様であった。 miRNA クラスターは、細胞表面 CCR5 レベルの低減、および 2 つの HIV 遺伝子の阻害に関して強力である。したがって、この miRNA クラスターを含む *AGT103* を、本発明者らの HIV 機能的治癒プログラムの療法用ベクター構築物として選択した。

【0233】

機能アッセイ。 C C R 5、T a t または V i f s h R N A 配列を含み、実験目的のために、C M V 即時型初期プロモーター (C M V I m m e d i a t e E a r l y P r o m o t e r) の制御下で緑色蛍光タンパク質 (G F P) を発現し、A G T 1 0 3 / C M V - G F P と命名された個々のレンチウイルスベクターを、C C R 5、T a t または V i f 発現をノックダウンする能力について試験した。ポリブレンの存在下または非存在下で、レンチウイルス粒子を哺乳動物細胞に形質導入した。細胞を 2 ~ 4 日後に集めた; タンパク質および RNA を C C R 5、T a t または V i f 発現について分析した。ウェスタンブロットアッセイまたは細胞を特異的蛍光抗体で標識すること (C C R 5 アッセイ) によって、続いて C C R 5 特異的抗体またはアイソタイプ対照抗体のいずれかを使用して改変および非改変細胞の蛍光を比較する分析フローサイトメトリーによって、タンパク質レベルを試験した。

【0234】

レンチウイルスの試験の開始。 1 0 % F B S および 1 % ペニシリン-ストレプトマイシンを補充した R P M I 1 6 4 0 を使用して、T 細胞培養培地を作製した。 I L 2 1 0 , 0 0 0 ユニット / m l、I L - 1 2 1 μ g / m l、I L - 7 1 μ g / m l、I L - 1 5 1 μ g / m l のサイトカインストックもまた、前もって調製した。

【0235】

レンチウイルスの形質導入の前に、感染性ウイルス力価を決定し、適切な感染多重度 (M O I) のために加えるウイルス量を計算するために使用した。

【0236】

0 ~ 1 2 日目: 抗原特異的濃縮: 0 日目に、凍結保存した P B M C を解凍し、3 7 ° C の培地 1 0 m l で 1 2 0 0 r p m にて 1 0 分間洗浄し、3 7 ° C の培地中で 2×10^6 個 / m

の濃度で再懸濁した。37℃で5%CO₂中に、24ウェルプレート内で0.5ml/ウェルで細胞を培養した。最適刺激条件を定義するために、以下の表3に列挙される試薬の組合せで細胞を刺激した：

【表3-1】

表3

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

10

【0237】

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

【0238】

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

【0239】

12～24日目：非特異的な増殖およびレンチウイルスの形質導入。12日目に、刺激された細胞をピペットでプレートから取り出し、新鮮なT細胞培地に1×10⁶個/mlの濃度で再懸濁した。再懸濁した細胞をT25培養フラスコに移し、製造業者の取扱説明書に従ってDYNABEADS（登録商標）Human T-Activator CD3/CD28および上に列挙したサイトカインで刺激した；フラスコを垂直位置でインキュベートした。

20

【0240】

14日目に、AGT103/CMV-GFPをMOI 20で加え、培養物をインキュベーターに2日間で戻した。この時点で、細胞をピペッティングにより回収し、1300rpmで10分間の遠心分離によって集め、同じ容量の新鮮な培地に再懸濁し、再び遠心分離して緩やかな細胞ペレットを形成した。その細胞ペレットを、前のステップで使ったのと同じサイトカインを含む新鮮な培地に、1mlあたり0.5×10⁶個の生存可能な細胞で再懸濁した。

30

【0241】

14～23日目まで、2日ごとに細胞の数を評価し、細胞を新鮮な培地で0.5×10⁶個/mlに希釈した。サイトカインは毎回、添加された。

【0242】

24日目に細胞を集め、ビーズを細胞から除去した。ビーズを除去するために、細胞を適切なチューブに移し、選別マグネット（sorting magnet）中に2分間置いた。細胞を含む上清を新しいチューブに移した。その後、新鮮な培地中で1日間、1×10⁶個/mlで細胞を培養した。抗原特異的T細胞およびレンチウイルス形質導入細胞の頻度を決定するためにアッセイを実施した。

40

【0243】

起こり得るウイルスの増殖を阻止するために、刺激の初日および培養中の隔日にアンプレナビル（amprenavir；0.5ng/ml）を培養物に添加した。

【0244】

IFN-ガンマについての細胞内サイトカイン染色により抗原特異的T細胞を調べる。ペプチド刺激後または1×10⁶細胞/mlでのレンチウイルス形質導入後の培養細胞を培地単独（陰性対照）、Gagペプチド（5μg/mlの個々のペプチド）、またはPHA（5μg/ml、陽性対照）で刺激した。4時間後、BD GolgiPlug（商標）（1：1000、BD Biosciences）を添加して、ゴルジ輸送を遮断した

50

。8時間後、細胞を洗浄し、製造業者の取扱説明書に従ってBD Cytotfix/Cytoperm（商標）キットを用いて、細胞外（CD3、CD4またはCD8；BD Biosciences）抗体および細胞内（IFN-γ；BD Biosciences）抗体で染色した。試料をBD FACSCalibur（商標）フローサイトメーターで分析した。適切なアイソタイプ適合抗体で標識された対照試料を各々の実験に含めた。データは、Flowjoソフトウェアを使用して分析した。

【0245】

レンチウイルスの形質導入率は、GFP+細胞の頻度によって決定した。形質導入された抗原特異的T細胞は、CD3+CD4+GFP+IFN-γ+細胞の頻度によって決定される；CD3+CD8+GFP+IFN-γ+細胞の試験は対照として含まれる。

10

【0246】

これらの結果は、標的T細胞集団であるCD4⁺T細胞に、HIV特異的タンパク質の発現を特異的にノックダウンするように設計されたレンチウイルスを用いて形質導入することができ、したがって、ウイルスに対して免疫性であるT細胞の増殖可能な集団を生成することを示す。この実施例は、HIV患者において機能的治癒を生じさせるために、開示されたレンチウイルス構築物をワクチン接種と組み合わせて使用することができ、またHIV陰性対象を予防的に治療するために使用することができることを示す概念の証明となる。

【0247】

（実施例4：実験的ベクターでのCCR5ノックダウン）

20

AGTc120は、大量のCD4およびCCR5を安定して発現するHeLa細胞株である。LV-CMV-mCherry（CMV即時型初期プロモーターの制御下で発現される赤色蛍光タンパク質mCherry）またはAGT103/CMV-mCherryを用いて、または用いずに、AGTc120を用いて形質導入した。mCherry蛍光タンパク質の遺伝子発現は、CMV（サイトメガロウイルス即時型初期プロモーター）発現カセットによって制御された。AGT103/CMV-mCherryがCCR5、VifおよびTatに対する療法用miRNAを発現した一方で、LV-CMV-mCherryベクターはマイクロRNAクラスターを欠いていた。

【0248】

図8Aに示すように、形質導入効率は>90%であった。7日後、細胞を集め、CCR5に対する蛍光モノクローナル抗体で染色し、分析フローサイトメトリーに供した。CCR5 APCの平均蛍光強度（x軸）に対してモードについて規格化した細胞数（y軸）をプロットしたこれらのヒストグラムにおいて、アイソタイプ対照を灰色で示す。細胞表面CCR5の染色後、レンチウイルス無しまたは対照レンチウイルス（mCherryマーカーのみを発現する）で処理した細胞は、CCR5密度の変化を示さなかった一方で、AGT103（右側のセクション）はCCR5染色強度をほぼアイソタイプ対照のレベルまで低下させた。7日後、細胞をR5指向性HIVレポーターウイルスBaL-GFPを用いてまたは用いずに感染させた。3日後、細胞を集め、フローサイトメトリーにより分析した。90%を超える細胞が形質導入された。AGT103-CMV/CMVmCherryは、形質導入されたAGTc120細胞におけるCCR5発現を低下させ、対照ベクターで処理した細胞と比較してR5指向性HIV感染を遮断した。

30

40

【0249】

図8Bは、HIVの感染に対してのトランスフェクトされたAGTc120細胞の相対非感受性を示す。上のように、レンチウイルスベクターはmCherryタンパク質を発現し、またHIVに感染した形質導入細胞（GFPを発現する）は、偽色フローサイトメトリードットプロットの右上の象限に二重陽性細胞として現れる。HIVが存在しない場合（上パネル）、いかなる条件下においてもGFP+細胞は存在しなかった。HIV感染後（下パネル）、レンチウイルス形質導入の非存在下では56%の細胞が感染し、LV-CMV-mCherryを用いて形質導入されたAGTc120細胞では53.6%の細胞が感染した。療法用AGT103/CMV-mCherryベクターを用いて細胞に形

50

質導入した場合、0.83%の細胞のみが二重陽性の象限に現れ、このことはそれらが形質導入され、感染したことを示している。

【0250】

53.62 (対照ベクターとの二重陽性細胞の割合) を0.83 (療服用ベクターとの二重陽性細胞の割合) で割ると、AGT103がこの実験システムにおいてHIVに対して65倍を超える防御を提供したことが示される。

【0251】

(実施例5：レンチウイルスベクターのshRNA阻害剤配列によるCCR5発現の調節)

阻害性RNA設計。ホモ・サピエンス (Homo sapiens) ケモカイン受容体 CCR5 (CCR5、NC000003.12) の配列を使用して、ヒト細胞のCCR5レベルをノックダウンするための潜在的なsiRNAまたはshRNA候補を探索した。潜在的RNA干渉配列は、Broad InstituteからなどのsiRNAまたはshRNA設計プログラムまたはThermo ScientificからのBLOCK-IT RNA iDesignerによって選択された候補から選択した。shRNA配列は、shRNA発現を調節するために、H1、U6、または7SKなどの、プラスミドのRNAポリメラーゼIIプロモーターの直後に挿入してもよい。また、shRNA配列は、類似のプロモーターが使用されているレンチウイルスベクターに挿入してもよく、またはCMVもしくはEF-1アルファなどのRNAポリメラーゼIIプロモーターによる発現を可能にするために、マイクロRNA骨格内に埋め込んでもよい。RNA配列はまた、siRNAオリゴヌクレオチドとして合成され、プラスミドまたはレンチウイルスベクターとは独立して利用されてもよい。

【0252】

プラスミド構築。CCR5 shRNAについて、BamHIおよびEcoRI制限部位を含むオリゴヌクレオチド配列が、MWG Operonによって合成された。オリゴヌクレオチド配列を、70℃でインキュベーションすることによってアニールさせ、その後室温に冷却した。アニールさせたオリゴヌクレオチドを、制限酵素BamHIおよびEcoRIで、37℃で1時間、消化し、その後、酵素を70℃で20分間不活化した。並行して、プラスミドDNAを、37℃で1時間、制限酵素BamHIおよびEcoRIで消化した。消化したプラスミドDNAをアガロースゲル電気泳動で精製し、InvitrogenのDNAゲル抽出キットを使用してゲルから抽出した。DNA濃度を決定し、血漿 (plasma) をオリゴヌクレオチド配列に、3:1のインサート対ベクター比でライゲーションした。ライゲーション反応はT4 DNAリガーゼを用いて室温で30分間実施した。2.5 µLのライゲーションミックスを25 µLのSTBL3コンピテント細菌細胞に添加した。形質転換には、42℃でのヒートショックが必要であった。アンピシリンを含有する寒天プレート上に細菌細胞を広げ、コロニーを、LBブロスで増殖させた。オリゴ配列の挿入をチェックするために、Invitrogen DNAミニプレップキットを使用して、収穫した細菌培養物からプラスミドDNAを抽出し、制限酵素消化で試験した。プラスミドへのshRNA配列の挿入は、shRNA発現を調節するために使用されるプロモーターに特異的なプライマーを使用してDNA配列決定によって確認した。

【0253】

CCR5 mRNA低減の機能アッセイ：CCR5発現阻害のアッセイには、2つのプラスミドの同時トランスフェクションが必要であった。第1のプラスミドは、CCR5 mRNAに対して指向される5つの異なるshRNA配列の1つを含む。第2のプラスミドは、ヒトCCR5遺伝子のcDNA配列を含む。プラスミドを、293T細胞に同時トランスフェクトした。48時間後に細胞を溶解し、QiagenのRNeasyキットを使用してRNAを抽出した。InvitrogenのSuper Scriptキットを使用して、RNAからcDNAを合成した。その後、Applied Biosystems Step One PCR機械を使用して、定量的RT-PCRによって試料を分析した。CCR5発現は、ポリメラーゼ連鎖反応分析の標準的条件で、フォワードプライマ

10

20

30

40

50

ー (5' - AGGAATTGATGGCGAGAAGG - 3') (配列番号 93) およびリバースプライマー (5' - CCCCCAAAGAAGGTCAAGGTAATCA - 3') (配列番号 94) を使用して、Invitrogen の SYBR グリーンを用いて検出した。試料は、ポリメラーゼ連鎖反応分析の標準的条件で、フォワードプライマー (5' - AGCGCGGCTACAGCTTCA - 3') (配列番号 95) およびリバースプライマー (5' - GCGCAGCTAGCACAGCTTCTP - 3') (配列番号 96) を使用して、ベータアクチン遺伝子発現の mRNA に対して正規化した。CCR5 mRNA の相対的発現は、各試料のアクチンメッセンジャー RNA のレベルに対して正規化されたその Ct 値によって決定した。結果は、図 9 に示されている。

【0254】

図 9A に示されているように、CCR5 shRNA 構築物および CCR5 発現プラスミドの同時トランスフェクションによって、CCR5 ノックダウンを 293T 細胞で試験した。対照試料に、いかなるヒト遺伝子も標的としないスクランブル shRNA 配列および CCR5 発現プラスミドをトランスフェクトした。トランスフェクションの 60 時間後、試料を収穫し、CCR5 mRNA レベルを定量的 PCR によって測定した。さらに、図 9B に示されているように、CCR5 shRNA-1 (配列番号 16) を発現するレンチウイルスを用いて形質導入した後、CCR5 はノックダウンされた。

【0255】

(実施例 6: レンチウイルスベクターの shRNA 阻害剤配列による HIV 成分の調節) 阻害性 RNA 設計。

HIV 1 型 Rev/Tat (5' - GCGGAGACAGCGACGAAGAGC - 3') (配列番号 9) および Gag (5' - GAAGAAATGATGACAGCAT - 3') (配列番号 11) の配列を使用して、

【化 49】

Rev/Tat:

(5'GCGGAGACAGCGACGAAGAGCTTCAAGAGAGCTCTTCGTCGCTGTCTCCGCTTTT-3') (配列番号 10) および

Gag:

(5'GAAGAAATGATGACAGCATTTCAAGAGAATGCTGTCATCATTTCTTCTTTT-3')

(配列番号 12)

shRNA を設計し、それらを合成し、上記に記載のようにプラスミドにクローニングした。

【0256】

プラスミド構築。Rev/Tat または Gag 標的配列を、細胞または組織における遺伝子発現のレポーターとして一般に使用されるホタルルシフェラーゼ遺伝子の 3' UTR (非翻訳領域) に挿入した。加えて、1つのプラスミドを、Rev/Tat shRNA を発現するように構築し、第 2 のプラスミドを、Gag shRNA を発現するように構築した。プラスミド構築は、上記に記載されている通りであった。

【0257】

Rev/Tat または Gag mRNA の shRNA 標的化の機能アッセイ: プラスミド同時トランスフェクションを使用して、本発明者らは、shRNA プラスミドがルシフェラーゼメッセンジャー RNA を分解することができるか否か、および同時トランスフェクトされた細胞の発光の強度を減少させることができるか否かを試験した。shRNA 対照 (スクランブル配列) を使用して、ルシフェラーゼをトランスフェクトした細胞からの光の最大発生量を確立した。3' - UTR (mRNA の非翻訳領域) に挿入された Rev/Tat 標的配列を含むルシフェラーゼ構築物を、Rev/Tat shRNA 配列と共に同時トランスフェクトした場合、発光のほぼ 90% 低減がもたらされ、shRNA 配列の

機能が強力であることが示された。3' - UTR に G a g 標的配列を含むルシフェラーゼ構築物を、G a g s h R N A 配列と同時にトランスフェクトした場合も、同様の結果が得られた。これらの結果は、s h R N A 配列の活性が強力であることを示す。

【0258】

図10Aに示されているように、R e v / T a t 標的遺伝子のノックダウンを、293 T細胞の一過性トランスフェクションにより、3' UTRの標的mRNA配列と融合されていたルシフェラーゼの活性の低減によって測定した。図10Bに示されているように、ルシフェラーゼ遺伝子と融合されていたG a g 標的遺伝子配列がノックダウンされた。結果は、各々三連での3回の独立したトランスフェクション実験の平均±SDとして表示されている。

【0259】

(実施例7：A G T 1 0 3 は、T a t および V i f の発現を減少させる)

例示的ベクターA G T 1 0 3 / C M V - G F P を細胞にトランスフェクトした。A G T 1 0 3 および他の例示的ベクターは、以下の表3に定義される。

【表3-2】

表 3

ベクター名	組成
AGT103	EF1-miR30CCR5-miR21Vif-miR185-Tat-WPRE
対照-mCherry	CMV-mCherry
AGT103/CMV-mCherry	CMV-mCherry-EF1-miR30CCR5-miR21Vif-miR185-Tat-WPRE-
対照-GFP	CMV-mCherry
AGT103/CMV-GFP	CMV-GFP-EF1-miR30CCR5-miR21Vif-miR185-Tat-WPRE-
略語:	
EF-1:伸長因子1転写プロモーター	
miR30CCR5 – 細胞表面のCCR5タンパク質を低減させることができる合成マイクロRNA	
miR21Vif – HIV RNA および Vif タンパク質発現のレベルを低減させることができる合成マイクロRNA	
miR185Tat – HIV RNA および Tat タンパク質発現のレベルを低減させることができる合成マイクロRNA	
CMV – ヒトサイトメガロウイルス由来の即時型初期転写プロモーター	
mCherry – mCherry 赤色蛍光タンパク質のコーディング領域	
GFP – 緑色蛍光タンパク質のコーディング領域	
WPRE – ウッドチャック肝炎ウイルス転写後調節エレメント	

【0260】

Tリンパ芽球様細胞株 (C E M ; C C R F - C E M ; アメリカ合衆国培養細胞系統保存機関カタログ番号C C L 1 1 9) にA G T 1 0 3 / C M V - G F P を用いて形質導入した。48時間後、ウイルス配列全体をコードするHIV発現プラスミドを細胞にトランスフェクトした。24時間後、RNAを細胞から抽出し、逆転写酵素ポリメラーゼ連鎖反応を使用してインタクトなT a t 配列のレベルについて試験した。インタクトなT a t R N

Aの相対発現レベルは、図11に示すように、対照レンチウイルスベクターの存在下でのおよそ850から、AGT103／CMV-GFPの存在下でのおよそ200に減少し、>4倍減少した。

【0261】

(実施例8：レンチウイルスベクターの合成マイクロRNA配列によるHIV成分の調節)

阻害性RNA設計。HIV-1 TatおよびVif遺伝子の配列を使用して、ヒト細胞においてTatまたはVifレベルをノックダウンする潜在的siRNAまたはshRNA候補を探索した。潜在的RNA干渉配列は、Broad InstituteからなどのsiRNAまたはshRNA設計プログラムまたはThermo ScientificからのBLOCK-IT RNA iDesignerによって選択された候補から選んだ。TatまたはVifノックダウンが最も強力な、選択されたshRNA配列を、CMVまたはEF-1アルファなどのRNAポリメラーゼIIプロモーターによる発現が可能になるように、マイクロRNA骨格内に埋め込んだ。また、RNA配列を、siRNAオリゴヌクレオチドとして合成し、プラスミドまたはレンチウイルスベクターとは独立して使用してもよい。

【0262】

プラスミド構築。Tat標的配列(5'-TCCGCTTCTTCCTGCCATAG-3') (配列番号7)をmiR185骨格に組み込んで、Tat miRNA

【化50】

(5'-

GGGCCTGGCTCGAGCAGGGGGCGAGGGATTCCGCTTCTTCCTGCCATAGCGTGGT
CCCCTCCCCTATGGCAGGCAGAAGCGGCACCTTCCCTCCCAATGACCGCGTCTTCG
TCG-3') (配列番号 3)

を作出し、それをレンチウイルスベクターに挿入し、EF-1アルファプロモーターの制御下で発現させた。同様に、Vif標的配列(5'-GGGATGTGTACTTCTGA
ACTT-3') (配列番号6)をmiR21骨格に組み込んで、Vif miRNA

【化51】

(5'-

CATCTCCATGGCTGTACCACCTTGTGCGGGGGATGTGTACTTCTGAACTTGTGTTGA
ATCTCATGGAGTTCAGAAGAACACATCCGCACTGACATTTTGGTATCTTTCATCTG
ACCA-3') (配列番号 2)

を作出し、それをレンチウイルスベクターに挿入し、EF-1アルファプロモーターの制御下で発現させた。得られたVif／Tat miRNA発現レンチウイルスベクターを、レンチウイルスベクターパッケージングシステムを使用して293T細胞中で産生させた。VifおよびTat miRNAは、すべてEF-1プロモーターの制御下で発現されるmiR CCR5、miR Vif、およびmiR Tatで構成されるマイクロRNAクラスターに埋め込まれていた。

【0263】

Tat mRNA蓄積のmiR185 Tat阻害の機能アッセイ。miR185 Tatを発現するレンチウイルスベクター(LV-EF1-miR-CCR5-Vif-Tat)を、5と等しい感染多重度で使用して293T細胞に形質導入した。形質導入の24時間後、細胞に、Lipofectamine 2000を標準的条件下で使用して、HIV株NL4-3(pNL4-3)を発現するプラスミドをトランスフェクトした。24時間後、RNAを抽出し、TatメッセンジャーRNAのレベルを、Tat特異的プライマーを使用してRT-PCRによって試験し、対照のアクチンmRNAレベルと比較した。

【0264】

Vifタンパク質蓄積のmiR21 Vif阻害の機能アッセイ。miR21 Vifを発現するレンチウイルスベクター（LV-EF1-miR-CCR5-Vif-Tat）を、5と等しい感染多重度で使用して、293T細胞に形質導入した。形質導入の24時間後、Lipofectamine 2000を使用して、HIV株NL4-3（pNL4-3）を発現するプラスミドを細胞にトランスフェクトした。24時間後、細胞を溶解し、全可溶性タンパク質を試験して、Vifタンパク質の含有量を測定した。細胞溶解物を、確立されている技術に従ってSDS-PAGEによって分離した。分離されたタンパク質を、ナイロン膜に転写し、Vif特異的モノクローナル抗体またはアクチン対照抗体を用いてプローブした。

10

【0265】

図12Aに示されているように、Tatノックダウンを、対照レンチウイルスベクター、または合成miR185 TatもしくはmiR155 TatマイクロRNAのいずれかを発現するレンチウイルスベクターのいずれかを形質導入した293T細胞中で試験した。24時間後、HIVベクターpNL4-3を、Lipofectamine 2000を用いて24時間にわたってトランスフェクトし、その後、Tat用のプライマーを用いてqPCR分析するためにRNAを抽出した。図12Bに示されているように、Vifノックダウンを、対照レンチウイルスベクター、または合成miR21 VifマイクロRNAを発現するレンチウイルスベクターのいずれかを形質導入した293T細胞中で試験した。24時間後、HIVベクターpNL4-3を、Lipofectamine 2000を用いて24時間にわたってトランスフェクトし、その後、HIV Vifに対する抗体を用いてイムノブロット分析するためにタンパク質を抽出した。

20

【0266】

（実施例9：レンチウイルスベクターの合成マイクロRNA配列によるCCR5発現の調節）

CEM-CCR5細胞に、CCR5の合成miR30配列を含むレンチウイルスベクター（AGT103：TGTA AACTGAGCTTGCTCTA（配列番号97）、AGT103-R5-1：TGTA AACTGAGCTTGCTCGC（配列番号98）、またはAGT103-R5-2：CATAGATTGGACTTGACAC（配列番号99））を形質導入した。6日後、CCR5発現を、APCコンジュゲートCCR5抗体でのFACS分析によって決定し、平均蛍光強度（MFI）によって定量化した。CCR5レベルは、LV-対照を100%とした場合のCCR5の%として表した。AGT103およびAGT103-R5-1の標的配列は、CCR5標的配列#5と同じ領域にある。AGT103-R5-2の標的配列は、CCR5標的配列#1と同じである。AGT103（全CCR5の2%）は、AGT103-R5-1（全CCR5の39%）、およびCCR5レベルを低減させなかったAGT103-R5-2と比較して、CCR5レベルの低減に最も有効である。データは、本明細書の図13に実証されている。

30

【0267】

（実施例10：長鎖または短鎖WPRE配列のいずれかを含有するレンチウイルスベクターの合成マイクロRNA配列によるCCR5発現の調節。）

40

ベクター構築。レンチウイルスベクターは、治療用遺伝子または遺伝子構築物を最適に発現させるためのRNA調節エレメントを必要とすることが多い。一般的な選択は、ウッドチャック肝炎ウイルス転写後調節エレメント（WPRE）を使用することである。本発明者らは、全長WPRE：

50

【化 5 2】

(5'AATCAACCTCTGATTACAAAATTTGTGAAAGATTGACTGGTATTCTTAACTATG
 TTGCTCCTTTTACGCTATGTGGATACGCTGCTTTAATGCCTTTGTATCATGCTATTG
 CTTCCCGTATGGCTTTCATTTTCTCCTCCTTGTATAAAATCCTGGTTGCTGTCTCTTTA
 TGAGGAGTTGTGGCCCGTTGTCAGGCAACGTGGCGTGGTGTGCACTGTGTTTGCTG
 ACGCAACCCCCACTGGTTGGGGCATTGCCACCACCTGTCAGCTCCTTTCCGGGACT
 TTCGCTTTCCCCCTCCCTATTGCCACGGCGGAACTCATCGCCGCCTGCCTTGCCCGC
 TGCTGGACAGGGGCTCGGCTGTTGGGCACTGACAATTCCGTGGTGTGTCGGGGA
 AATCATCGTCCTTTTCTTGGCTGCTCGCCTGTGTTGCCACCTGGATTCTGCGCGGGA
 CGTCCTTCTGCTACGTCCCTTCGGCCCTCAATCCAGCGGACCTTCCTTCCCGCGGCC
 TGCTGCCGGCTCTGCGGCCTCTTCCGCGTCTTCGCCTTCGCCCTCAGACGAGTCGG
 ATCTCCCTTTGGGCCGCCTCCCCGCCT-3') (配列番号 32)

10

を含む A G T 1 0 3 を、短縮された W P R E エlement

【化 5 3】

(5'AATCAACCTCTGGATTACAAAATTTGTGAAAGATTGACTGATATTCTTAACTAT
 GTTGCTCCTTTTACGCTGTGTGGATATGCTGCTTTAATGCCTCTGTATCATGCTATT
 GCTTCCCGTACGGCTTTCGTTTCTCCTCCTTGTATAAAATCCTGGTTGCTGTCTCTTT
 ATGAGGAGTTGTGGCCCGTTGTCCGTCAACGTGGCGTGGTGTGCTCTGTGTTTGCT
 GACGCAACCCCCACTGGCTGGGGCATTGCCACCACCTGTCAACTCCTTTCTGGGAC
 TTTTCGCTTTCCCCCTCCCGATCGCCACGGCAGAACTCATCGCCGCCTGCCTTGCCC
 GCTGCTGGACAGGGGCTAGGTTGCTGGGCACTGATAATTCCGTGGTGTGTC-3')

20

(配列番号 80)

30

を含む改変 A G T 1 0 3 ベクターと比較した。

【0 2 6 8】

ベクター配列内の長鎖 W P R E エlement 対 短鎖 W P R E エlement の関数としての、細胞表面 C C R 5 発現モジュレーションの機能アッセイ。長鎖または短鎖 W P R E エlement を含む A G T 1 0 3 を、5 と等しい感染多重度で C E M - C C R 5 T 細胞に形質導入するために使用した。形質導入の 6 日後、細胞を集め、細胞表面 C C R 5 タンパク質を検出することができるモノクローナル抗体で染色した。抗体は、蛍光マーカーにコンジュゲートされていた。染色強度は、細胞表面の C C R 5 のレベルに正比例する。対照レンチウイルスは、細胞表面 C C R 5 レベルに影響を及ぼさず、73.6 単位の平均蛍光強度を有する単一集団をもたらした。長鎖 W P R E エlement を有する従来の A G T 1 0 3 は、C C R 5 発現を 11 単位の平均蛍光強度レベルに低減させた。短鎖 W P R E エlement を組み込むように改変された A G T 1 0 3 は、13 単位の平均蛍光強度を有する細胞の単一集団をもたらした。したがって、短鎖 W P R E エlement の置換は、A G T 1 0 3 が細胞表面 C C R 5 の発現を低減させる能力にほとんどまたはまったく影響を及ぼさなかった。

40

【0 2 6 9】

図 1 4 に示されているように、C E M - C C R 5 細胞に、長鎖または短鎖 W P R E 配列のいずれかを A G T 1 0 3 を形質導入した。6 日後、C C R 5 発現を、A P C コンジュゲート C C R 5 抗体を用いた F A C S 分析によって決定し、平均蛍光強度 (M F I) として定量化した。C C R 5 レベルは、L V - 対照を 100 % とした場合の C C R 5 の % として表した。C C R 5 レベルの低減は、短鎖 (全 C C R 5 の 5.5 %) または長鎖 (全 C

50

CCR5の2.3%) WPRE配列のいずれかを有するAGT103について類似していた。
【0270】

(実施例11: WPRE配列を含むまたは含まないレンチウイルスベクターの合成マイクロRNA配列によるCCR5発現の調節)

ベクター構築。CCR5発現のAGT103下方調節にWPREが必要か否かを試験するために、本発明者らは、WPREエレメント配列を含まない改変ベクターを構築した。

【0271】

AGT103ベクターに長鎖WPREエレメントを含む場合またはそれを含まない場合の関数としての、細胞表面CCR5発現モジュレーションの機能アッセイ。CCR5発現レベルのAGT103モジュレーションにWPREが必要であるか否かを試験するために、本発明者らは、5と等しい感染多重度を使用して、AGT103またはWPREを欠如する改変ベクターを用いてCEM-CCR5 T細胞に形質導入した。形質導入の6日後、細胞を集め、細胞表面CCR5タンパク質を認識することができるモノクローナル抗体で染色した。モノクローナル抗体は、蛍光マーカーに直接コンジュゲートされていた。染色強度は、細胞表面あたりのCCR5分子の数に正比例する。レンチウイルス対照ベクターは、細胞表面CCR5レベルに影響を及ぼさず、164の平均蛍光強度を有する均一な集団をもたらした。レンチウイルスベクター(長鎖WPREを有し、さらにGFPマーカータンパク質を発現するAGT103)、GFPを欠如するが、長鎖WPREエレメントを含むAGT103、またはGFPおよびWPREを両方とも欠如するAGT103はすべて、細胞表面CCR5発現モジュレーションに同様に有効であった。GFPを除去した後では、WPREエレメントを含むまたは含まないAGT103は、細胞表面CCR5発現をモジュレーションするそれらの能力の点からは識別不能であった。

【0272】

CEM-CCR5細胞に、GFPおよびWPREを含むまたは含まないAGT103を形質導入した。6日後、CCR5発現を、APCコンジュゲートCCR5抗体を用いたFACS分析によって決定し、平均蛍光強度(MFI)として定量化した。CCR5レベルは、LV-対照を100%とした場合のCCR5の%として表した。CCR5レベルの低減は、WPRE配列を含む(全CCR5の0%)または含まない(全CCR5の0%) AGT103について類似していた。データは、図15に実証されている。

【0273】

(実施例12: レンチウイルスベクターのCD4プロモーター調節性合成マイクロRNA配列によるCCR5発現の調節)

ベクター構築。改変バージョンのAGT103を構築して、CCR5、Vif、およびTat遺伝子発現を抑制するマイクロRNAクラスターを発現するために、代替的プロモーターを代用した場合の効果を試験した。本発明者らは、通常のEF-1プロモーターの代わりに、以下の配列を使用して、CD4糖タンパク質を発現させるためのT細胞特異的プロモーターを代用した:

10

20

30

40

50

【化 5 4】

(5'TGTTGGGGTTCAAATTTGAGCCCCAGCTGTTAGCCCTCTGCAAAGAAAAAAAAA
 AAAAAAAAAAGAACAAAGGGCCTAGATTTCCCTTCTGAGCCCCACCCTAAGATGAA
 GCCTCTTCTTTCAAGGGAGTGGGGTTGGGGTGGAGGCGGATCCTGTCAGCTTTGCT
 CTCTCTGTGGCTGGCAGTTTCTCCAAAGGGTAACAGGTGTCAGCTGGCTGAGCCTA
 GGCTGAACCCTGAGACATGCTACCTCTGTCTTCTCATGGCTGGAGGCAGCCTTTGT
 AAGTCACAGAAAGTAGCTGAGGGGCTCTGGAAAAAGACAGCCAGGGTGGAGGT
 AGATTGGTCTTTGACTCCTGATTTAAGCCTGATTCTGCTTAACCTTTTTCCCTTGACT
 TTGGCATTTCACCTTTGACATGTTCCCTGAGAGCCTGGGGGGTGGGGAACCCAGCT
 CCAGCTGGTGACGTTTGGGGCCGGCCCAGGCCTAGGGTGTGGAGGAGCCTTGCCA
 TCGGGCTTCCTGTCTCTCTTCATTTAAGCACGACTCTGCAGA-3') (配列番号 30)

10

【 0 2 7 4】

細胞表面 C C R 5 タンパク質発現を低減するための効力の点で、E F - 1 および C D 4 遺伝子プロモーターを比較する機能アッセイ。通常の E F - 1 プロモーターの代わりに C D 4 遺伝子プロモーターを使用することによって改変された A G T 1 0 3 を、C E M - C C R 5 T 細胞の形質導入に使用した。形質導入の 6 日後、細胞を集め、細胞表面 C C R 5 タンパク質を認識することができるモノクローナル抗体で染色した。モノクローナル抗体は、蛍光マーカーにコンジュゲートされていた。染色強度は、細胞表面 C C R 5 タンパク質のレベルに正比例する。対照レンチウイルス形質導入は、C C R 5 特異的モノクローナル抗体で染色され、8 1 . 7 単位の平均蛍光強度を示した C E M - C C R 5 T 細胞の集団をもたらした。マイクロ RNA を発現するために E F - 1 プロモーターの代わりに C D 4 遺伝子プロモーターが使用された改変 A G T 1 0 3 は、幅広い染色分布を示し、平均蛍光強度はおおよそ 1 7 . 3 単位と等しかった。この結果に基づくと、E F - 1 プロモーターは、マイクロ RNA 発現用の C D 4 遺伝子プロモーターと少なくとも同様であり、それよりも優れている可能性がある。所望の標的細胞集団にもよるが、E F - 1 プロモーターは、すべての細胞タイプで普遍的に活性であり、C D 4 プロモーターは、T リンパ球でしか活性ではない。

20

30

【 0 2 7 5】

C E M - C C R 5 細胞に、C C R 5、V i f、および T a t に対する合成マイクロ RNA 配列を調節する C D 4 プロモーターを含むレンチウイルスベクター (A G T 1 0 3) を形質導入した。6 日後、C C R 5 発現を、A P C コンジュゲート C C R 5 抗体を用いた F A C S 分析によって決定し、平均蛍光強度 (M F I) として定量化した。C C R 5 レベルは、L V - 対照を 1 0 0 % とした場合の C C R 5 の % として表した。L V - C D 4 - A G T 1 0 3 を形質導入した細胞では、C C R 5 レベルは全 C C R 5 の 1 1 % であった。これは、E F 1 プロモーターを含む L V - A G T 1 0 3 で観察されたものと同等である。このデータは、図 1 6 に実証されている。

40

【 0 2 7 6】

(実施例 1 3 : H I V G a g 特異的 C D 4 T 細胞の検出)

細胞および試薬。生存凍結末梢血単核細胞 (P B M C) を、ワクチン会社から得た。データは、候補 H I V 療用法用ワクチンを試験する初期段階臨床試験 (試験登録 : c l i n i c a l t r i a l s . g o v N C T 0 1 3 7 8 1 5 6) に登録されている H I V + 個体に由来する代表的な検体を用いて得られた。「ワクチン接種前」および「ワクチン接種後」研究用に、2 つの検体を得た。細胞培養産物、補充物、およびサイトカインは、商業的供給業者からのものであった。細胞を、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, および H. L. Robinson

50

(2016年)。「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巻(10号): e0163164頁に記載されているように、Geovax Corporationの組換え改変Vaccinia Ankara 63Bに対する応答について試験した。HIV-1 Gagポリタンパク質全体を表す合成ペプチドを、GeoVaxから得た。または、HIV (GAG) Ultraペプチドセットを、JPT Peptide Technologies GmbH (www.jpt.com)、Berlin、Germanyから得た。HIV (GAG) Ultraは、各々長さが15アミノ酸であり、11個アミノ酸が重複している150個のペプチドを含む。それらは、化学的に合成された後、精製され、液体クロマトグラフィー質量分析によって分析されていた。一緒にすると、これらのペプチドは、HIV Gagポリタンパク質の主要な免疫原領域を表し、公知HIV株の間での57.8%の平均カバレッジ (average coverage) のために設計されている。ペプチド配列は、ロスアラモス国立研究所 (<http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/NEWALIGN/align.html>) のHIV配列データベースに基づく。ペプチドは、ペプチドあたり25マイクログラムの乾燥トリフルオロ酢酸塩として提供されている。それを、およそ40マイクロリットルのDMSOに溶解し、PBSで終濃度に希釈する。CD4および細胞質IFN-γを検出するためのモノクローナル抗体を商業的供給源から得た。細胞内染色は、インターフェロン-γ用のBD Pharmingen細胞内染色キットで実施した。ペプチドを、DMSOに再懸濁した。本発明者らは、DMSOのみの対照条件を含める。

【0277】

HIV特異的CD4+ T細胞を検出するための機能アッセイ。凍結PBMCを解凍し、洗浄し、10%ウシ胎仔血清、補充物、およびサイトカインを含むRPMI培地に再懸濁した。ワクチン接種前または接種後に集めた培養PBMCを、DMSO対照、MVA GeoVax (細胞あたり1ブランク形成単位と等しい感染多重度)、ペプチドGeoVax (1マイクログラム/ml)、またはHIV (GAG) Ultraペプチド混合物 (1マイクログラム/ml) で、Golgi Stop試薬の存在下にて20時間処理した。細胞を集め、洗浄し、固定し、透過化し、細胞表面CD4または細胞内インターフェロン-γに特異的なモノクローナル抗体で染色した。染色した細胞を、FACSCalibur分析用フローサイトメーターで分析した。データは、CD4+ T細胞サブセットをゲートしたものであった。四角で囲まれている領域内の強調されている細胞は、二重陽性であり、MVAまたはペプチド刺激後のインターフェロン-γ発現に基づき、HIV特異的CD4+ T細胞であると指定した。四角で囲まれている領域内の数値は、HIV特異的であると特定された全CD4のパーセンテージを示す。本発明者らは、DMSOまたはMVAに対する強い応答を検出しなかった。GeoVaxのペプチドは、JPTのHIV (GAG) Ultraペプチド混合物と比較して、より少ない応答性細胞を誘発したが、違いは小さく、有意ではなかった。

【0278】

図17に示されているように、ワクチン接種前または接種後のHIV陽性患者に由来するPBMCを、DMSO (対照)、GeoVaxのHIV Gagを発現する組換えMVA (MVA GeoVax)、GeoVaxのGagペプチド (Pep GeoVax、本明細書ではGagペプチドプール1とも呼ばれる) またはJPTのGagペプチド (HIV (GAG) Ultraペプチド混合物、本明細書ではGagペプチドプール2とも呼ばれる) で20時間にわたって刺激した。IFNγ産生を、標準的プロトコールを使用した細胞内染色およびフローサイトメトリーによって検出した。フローサイトメトリーデータは、CD4+ T細胞をゲートしたものである。四角内に表示されている数値は、抗原特異的刺激に対するサイトカイン応答に基づき、「HIV特異的」と指定された全CD4+ T細胞のパーセンテージである。

【0279】

(実施例14：HIV特異的CD4 T細胞増殖およびレンチウイルス形質導入)

PBMCを濃縮してHIV特異的CD4 T細胞の割合を増加させ、それらの細胞にAGT103を形質導入して細胞産物AGT103Tを産生するための方法の設計および試験。療法用HIVワクチンを受けたHIV陽性患者に由来するPBMC（末梢血単核細胞）をex vivo培養するためのプロトコールを設計した。この実施例では、療法用ワクチンは、HIV Gag、Pol、およびEnv遺伝子を発現する3用量のプラスミドDNA、その後の、同じHIV Gag、Pol、およびEnv遺伝子を発現する2用量のMVA 62-B（改変vaccinia Ankaraナンバー62-B）で構成されていた。プロトコールは、ワクチン産物に特定されず、免疫化後に十分なレベルのHIV特異的CD4+ T細胞を必要とするに過ぎない。静脈血を集め、PBMCを、Ficoll-Paque密度勾配遠心分離によって精製した。代替的には、PBMCまたは規定された細胞トラクション（traction）は、抗体カクテルおよび蛍光活性化または磁気ビーズ選別を使用して、ポジティブまたはネガティブ選択法によって調製してもよい。精製したPBMCを、洗浄し、補充物、抗生物質、およびウシ胎仔血清を含む標準的培地中で培養する。これらの培養物に、HIV Gagポリタンパク質内の考え得るT細胞エピトープを表す合成ペプチドのプールを添加した。インターロイキン-2およびインターロイキン-12、インターロイキン2およびインターロイキン-7、インターロイキン-2およびインターロイキン-15の組合せを試験した後で選択したサイトカイン、インターロイキン2およびインターロイキン-12を添加することにより培養物を補充する。ペプチド刺激を行い、その後およそ12日間の培養を行う。12日間の培養中、新鮮な培地および新鮮なサイトカイン補充物を、およそ4日に1回添加した。

【0280】

ペプチド刺激間隔は、PBMC培養物中のHIV特異的CD4 T細胞の頻度を増加させるように設計されている。これらのHIV特異的CD4 T細胞は、以前の療法的免疫化によって活性化された。それらは、合成ペプチド曝露によって再刺激し、増殖させることができる。本発明者らの目標は、ペプチド刺激培養期間の終了時まで、HIVに特異的な全CD4 T細胞が1%よりも多いかまたは1%と等しくなることを達成することである。

【0281】

培養のおよそ12日目に、細胞を洗浄して残留物質を除去し、その後、CD4 T細胞表面タンパク質CD3およびCD28に対する抗体で修飾されている合成ビーズで刺激する。T細胞をポリクローナル刺激するためのこの十分に確立されている方法は、細胞を再活性化し、それらをAGT103レンチウイルス形質導入に対してより感受性にするであろう。培養のおよそ13日目に、1～5の感染多重度を使用して、レンチウイルス形質導入を実施する。形質導入後、細胞を洗浄して残留レンチウイルスベクターを除去し、インターロイキン-2およびインターロイキン-12を含む培地中で培養し、培養のおよそ24日目までおよそ4日に1回、新鮮な培地およびサイトカインを添加する。

【0282】

培養間隔の全体にわたって、抗レトロウイルス薬サキナビルを、およそ100nMの濃度で添加して、可能性のあるHIVのあらゆる増殖を抑制する。

【0283】

培養のおよそ24日目に、細胞を収穫し、洗浄し、効力およびリリースアッセイ用の試料を確保し、次に残りの細胞を凍結保存培地に懸濁してから、AGT103が形質移入されているおよそ 1×10^8 個のHIV特異的CD4 T細胞が含まれることになる用量あたりおよそ 1×10^{10} 細胞の単一アリコートとして凍結する。

【0284】

細胞産物（AGT103T）の効力を、2つの代替的効力アッセイの1つで試験する。効力アッセイ1では、CD4 T細胞あたりの平均ゲノムコピー数（組み込みAGT103ベクター配列）が試験される。産物をリリースするための最低限の効力は、CD4 T

10

20

30

40

50

細胞あたりおよそ0.5のゲノムコピーである。このアッセイは、磁気ビーズ標識モノクローナル抗体を使用してCD3陽性／CD4陽性T細胞をポジティブ選択し、全細胞DNAを抽出し、定量的PCR反応を使用してAGT103ベクターに固有な配列を検出することによって実施する。効力アッセイ2では、HIV特異的CD4 T細胞の亜集団内の組み込みAGT103の平均ゲノムコピー数が試験される。このアッセイ (essay) は、まず、HIV Gagタンパク質を表す合成ペプチドのプールでPBMCを刺激することによって達成される。その後、細胞を、CD4 T細胞に結合することができ、分泌されたインターフェロン-ガンマサイトカインを補捉することもできる特異的抗体試薬で染色する。CD4陽性／インターフェロン-ガンマ陽性細胞を、磁気ビーズ選択によって捕捉し、全細胞DNAを調製し、細胞あたりのAGT103のゲノムコピー数を、定量的PCR反応で決定する。アッセイ2を使用した効力に基づくリリース基準は、HIV特異的CD4 T細胞あたり0.5よりも多いかまたはそれと等しいゲノムコピーが、AGT103細胞産物中に存在することを必要とする。

【0285】

療法用HIVワクチンを受けたHIV陽性患者のPBMCに由来するHIV特異的CD4 T細胞の濃縮および形質導入の機能試験。HIV特異的CD4 T細胞の頻度に対する療法用ワクチン接種の影響を、ペプチド刺激アッセイで試験した(図14パネルB)。ワクチン接種前のHIV特異的CD4 T細胞の頻度は、この代表的な個体では0.036%であった。ワクチン接種後のHIV特異的CD4 T細胞の頻度は、およそ2倍の値である0.076%に増加した。細胞質インターフェロン-ガンマの蓄積によって特定された応答性細胞(HIV特異的)は、特異的ペプチド刺激後にのみ検出された。

【0286】

また、本発明者らは、ペプチド刺激してHIV特異的CD4 T細胞を濃縮し、その後AGT103を形質導入することにより、培養物中の全CD4 T細胞のおよそ1%の、HIV特異的であり、かつAGT103が形質導入されているCD4 T細胞を生成するという本発明者らの目標が達成されるか否かを試験した。この場合、本発明者らは、緑色蛍光タンパク質を発現する実験バージョンのAGT103を使用した(GFPを参照)。図14のパネルCでは、ペプチド刺激(HIV(GAG)Ultra)およびAGT103形質導入後のワクチン接種後培養物は、全CD4 T細胞の1.11%が、HIV特異的であり(ペプチド刺激に応答してインターフェロン-ガンマを発現することに基づく)、かつAGT103が形質導入されていた(GFPの発現に基づく)ことが実証された。

【0287】

療法用HIVワクチン研究の数人の患者を試験して、ペプチド刺激に対する応答の範囲を評価し、将来のヒト臨床試験の遺伝子治療アームに参加させるための適格性基準の規定を開始した。図18のパネルDは、4人のワクチン試験参加者のHIV特異的CD4 T細胞の頻度を示し、ワクチン接種前および接種後の検体が比較されている。3つの症例で、ワクチン接種後検体は、全CD4 T細胞の0.076%よりも高いかまたはそれと等しいHIV特異的CD4 T細胞の値を示す。この値に到達する能力は、ワクチン接種前の検体によっては予測されなかった。なぜなら、患者001-004および患者001-006は両者とも、開始時にはHIV特異的CD4 T細胞のワクチン接種前値が0.02%であったが、1人が最終的には0.12%のHIV特異的CD4 T細胞のワクチン接種後値に達したのに対し、他方の個体はワクチン接種後にこの値を増加させることができていないためである。また、ワクチンに良好に応答した同じ3人の患者は、HIV特異的CD4 T細胞の頻度を増加させるという点では、ペプチド刺激および培養後にHIV特異的CD4 T細胞の実質的な濃縮を示した。図18のパネルEに示されている3つの症例では、ペプチド刺激およびその後の培養により、それぞれ全CD4 T細胞の2.07%、0.72%、または1.54%が、HIVに特異的であった試料が生成された。これらの値は、全CD4 T細胞のおよそ1%の、HIVに特異的であり、最終細胞産物にAGT103が形質導入されているCD4 T細胞を得るという本発明者らの目標を可能にするために、療法用HIVワクチンに応答する大半の個体が、ペプチド刺激に対する十

分に大きな *ex vivo* 応答を有することになることを示す。

【0288】

図18に示されているように、パネルAは、治療のスケジュールを説明する。パネルBは、PBMCを、GagペプチドまたはDMSO対照で20時間にわたって刺激したことを実証する。IFNガンマ産生を、細胞内染色によって、FACSによって検出した。分析のためにCD4⁺ T細胞をゲート制御した。パネルCは、パネルAに示されているような方法を使用してCD4⁺ T細胞を増殖し、AGT103-GFPを形質導入したことを実証する。増殖したCD4⁺ T細胞を、サイトカインを一切含まない新鮮な培地で2日間休息させ、GagペプチドまたはDMSO対照で20時間再刺激した。IFNガンマ産生およびGFP発現をFACSによって検出した。分析のためにCD4⁺ T細胞をゲート制御した。パネルDは、HIV特異的CD4⁺ T細胞の頻度（IFNガンマ陽性、ワクチン接種前および接種後）を、4人の患者から検出したことを実証する。パネルEは、4人の患者に由来するワクチン接種後PBMCを増殖させ、HIV特異的CD4⁺ T細胞を検査したことを実証する。

10

【0289】

（実施例15：用量応答）

ベクター構築。改変バージョンのAGT103を構築して、AGT103を増加させた際の用量応答、および細胞表面CCR5レベルに対するその効果を試験した。AGT103を、CMVプロモーターの制御下に緑色蛍光タンパク質（GFP）発現カセットを含むように改変した。形質導入された細胞は、miR30CCR5 miR21Vif miR185 TatマイクロRNAクラスターを発現し、GFP発現による緑色光を放つ。

20

【0290】

AGT103-GFPを増加させた際の用量応答およびCCR5発現の阻害に関する機能アッセイ。細胞あたりの0から5までの感染多重度を使用して、CEM-CCR5 T細胞にAGT103-GFPを形質導入した。形質導入された細胞を、細胞表面CCR5に特異的な蛍光コンジュゲート（APC）モノクローナル抗体で染色した。染色強度は、細胞表面あたりのCCR5分子の数に比例する。緑色蛍光の強度は、細胞あたりの組み込まれたAGT103-GFPコピー数に比例する。

【0291】

図19に示されているように、パネルAは、AGT103-GFPを増加させた際の用量応答、および細胞表面CCR5発現に対するその効果を実証する。0.4と等しい感染多重度では、1.04%の細胞のみが、緑色（形質導入を示す）であり、かつCCR5発現の著しい低減を示す。1と等しい感染多重度では、低CCR5、GFP+細胞の数は68.1%に、5と等しい感染多重度では、低CCR5、GFP+細胞の数は95.7%に増加した。これらのデータは、図19のパネルBではヒストグラム形態で提示されており、CCR5染色の点で正規分布した集団が、AGT103-GFP用量の増加と共により低い平均蛍光強度に向かって移動したことを示す。AGT103-GFPの効力は、図19のパネルCではグラフ形態で提示されており、AGT103-GFPの用量を増加させた際のCCR5発現の阻害パーセンテージが示されている。5と等しい感染多重度では、99%よりも高いCCR5発現レベルの低減があった。

30

40

【0292】

（実施例16：AGT103は、初代ヒトCD4⁺ T細胞に効率的に形質導入する）

AGT103レンチウイルスベクターの初代CD4⁺ T細胞への形質導入。緑色蛍光タンパク質マーカー（GFP）を含む改変AGT103ベクターを0.2～5の感染多重度で使用して、精製された初代ヒトCD4⁺ T細胞に形質導入した。

【0293】

初代ヒトCD4⁺ T細胞へのAGT103の形質導入効率の機能アッセイ。CD4⁺ T細胞を、磁気ビーズ標識抗体および標準的手順を使用して、ヒトPBMC（HIV陰性ドナー）から単離した。精製したCD4⁺ T細胞をCD3/CD28ビーズで*ex vivo* 刺激し、AGT103形質導入前に、インターロイキン-2を含む培地中で1日間培養した

50

。レンチウイルスベクター用量（感染多重度）と形質導入効率との関係が、図20のパネルAに実証されており、0.2と等しい感染多重度では、9.27%のAGT103が形質導入されたCD4陽性T細胞がもたらされ、5と等しい感染多重度では、AGT103が形質導入されたCD4陽性T細胞のこの値は、63.1%に増加したことが示されている。初代CD4陽性T細胞の効率的形質導入の達成に加えて、細胞あたりのゲノムコピー数を定量化することも必要である。図20のパネルBでは、いくつかの感染多重度で形質導入された初代ヒトCD4 T細胞に由来する全細胞DNAを定量的PCRで試験して、細胞あたりのゲノムコピー数を決定した。0.2と等しい感染多重度では、本発明者らは、細胞あたり0.096のゲノムコピーを測定した。これは、パネルAの9.27%のGFP陽性CD4 T細胞と良好に一致した。1と等しい感染多重度では、細胞あたり0.691のゲノムコピーが生成され、5と等しい感染多重度では、細胞あたり1.245のゲノムコピーが生成された。

【0294】

図20に示されているように、PBMCから単離されたCD4⁺ T細胞を、CD3／CD28ビーズとIL-2で1日間刺激し、種々の濃度のAGT103を形質導入した。2日後、ビーズを取り出し、CD4⁺ T細胞を集めた。パネルAに示されているように、形質導入された細胞（GFP陽性）の頻度を、FACSで検出した。パネルBに示されているように、細胞あたりのベクターコピー数を、qPCRで決定した。5の感染多重度（MOI）では、63%のCD4⁺ T細胞に、細胞あたり平均1ベクターコピーが形質導入された。

【0295】

（実施例17：AGT103は、初代CD4⁺ T細胞でのHIV複製を阻害する）

細胞にAGT103を形質導入することによる、初代ヒトCD4陽性T細胞のHIV感染からの保護。療法用レンチウイルスAGT103を、細胞あたり0.2～5の感染多重度で使用して、初代ヒトCD4陽性T細胞に形質導入した。その後、形質導入された細胞に、侵入に細胞表面CCR5を必要としないCXCR4指向性HIV株NL4.3をチャレンジした。このアッセイでは、HIVのVifおよびTat遺伝子に対するマイクロRNAの効力が、初代CD4陽性T細胞における増殖性感染の予防の点で試験されるが、感染した初代ヒトCD4 T細胞から放出されるHIVの量を検出する間接法が使用される。

【0296】

初代ヒトCD4陽性T細胞のCXCR4指向性HIV感染に対するAGT103保護の機能アッセイ。CD4 T細胞を、磁気ビーズ標識抗体および標準的手順を使用して、ヒトPBMC（HIV陰性ドナー）から単離した。精製したCD4 T細胞をCD3／CD28ビーズでex vivo刺激し、インターロイキン-2を含む培地で1日間培養してから、0.2～5の感染多重度を使用してAGT103を形質導入した。形質導入の2日後、CD4陽性T細胞培養物に、緑色蛍光タンパク質（GFP）を発現するように操作されたHIV株NL4.3をチャレンジした。形質導入されHIVに曝露された初代CD4 T細胞培養物を7日間維持してから、HIVを含む無細胞培養液を集めた。無細胞培養液を使用して、高度に許容性のT細胞株C8166に2日間感染させた。HIVに感染したC8166細胞の割合を、GFP蛍光を検出するフローサイトメトリーによって決定した。模擬レンチウイルス感染の場合、NL4.3 HIVについての0.1の感染多重度の用量は、15.4%のC8166 T細胞で増殖性感染を確立することを可能にした量の培養液へ放出されたHIVをもたらし、0.2感染多重度のAGT103の用量では、C8166細胞のHIV感染に関するこの値は、5.3%に低減され、1と等しい感染多重度のAGT103では、3.19%のC8166 T細胞しかHIVに感染しなかった。C8166感染は、5と等しい感染多重度を使用したAGT103形質導入後、0.62%にさらに低減された。形質導入に使用したAGT103の量と、培養培地に放出されたHIVの量との間には明らかな用量応答関係性が存在する。

【0297】

図21に示されているように、PBMCから単離されたCD4⁺ T細胞を、CD3／

CD28ビーズとIL-2で1日間刺激し、種々の濃度(MOI)のAGT103を形質導入した。2日後、ビーズを取り出し、CD4⁺ T細胞に、0.1MOIのHIV NL4.3-GFPを感染させた。24時間後、細胞をPBSで3回洗浄し、IL-2(30 U/ml)と共に7日間培養した。培養の終了時に、上清を集めて、HIV許容性細胞株C8166に2日間感染させた。HIVに感染したC8166細胞(GFP陽性)を、FACSで検出した。C8166細胞のより少ない感染により観察されるように、AGT103の感染多重度が増加すると共に生存可能なHIVが低減された(MOI 0.2=65.6%、MOI 1=79.3%、およびMOI 5=96%)。

【0298】

(実施例18: AGT103は、HIV誘導性枯渇から初代ヒトCD4⁺ T細胞を保護する)

HIV媒介性細胞病理および細胞枯渇から保護するための初代ヒトCD4⁺ T細胞のAGT103形質導入。PBMCを、健康なHIV陰性ドナーから取得し、CD3/CD28ビーズで刺激し、その後、インターロイキン-2を含む培地で1日間培養してから、0.2~5の感染多重度を使用してAGT103を形質導入した。

【0299】

HIV媒介性細胞病理からの初代ヒトCD4⁺ T細胞のAGT103保護の機能アッセイ。AGT103を形質導入した初代ヒトCD4⁺ T細胞に、細胞進入にCCR5を必要としないHIV NL4.3株(CXCR4指向性)を感染させた。CXCR4指向性NL4.3を使用する場合、HIV複製に対するVifおよびtatマイクロRNAの効果のみを試験する。HIV NL4.3の用量は、0.1の感染多重度であった。HIV感染の1日後、細胞を洗浄して残留ウイルスを除去し、培地とインターロイキン-2中で培養した。14日間の培養中、細胞を3日毎に集め、その後、CD4に特異的であり、蛍光マーカーに直接コンジュゲートされているモノクローナル抗体で染色して、PBMC中のCD4陽性T細胞の割合の測定を可能にした。未処理CD4⁺ T細胞、または対照レンチウイルスベクターを用いて形質導入したCD4⁺ T細胞は、HIVチャレンジに高度に感受性であり、PBMC中のCD4陽性T細胞の割合は、培養14日目までに10%未満に低下した。対照的に、AGT103は、HIVチャレンジによる細胞枯渇の防止に対して用量依存的効果を示した。0.2の感染多重度のAGT103用量では、PBMCの20%超が、培養の14日目までにCD4⁺ T細胞であり、5と等しい感染多重度のAGT103用量では、培養の14日目までにCD4陽性T細胞になったPBMCは、50%よりも高い値に増加した。この場合も、AGT103は、ヒトPBMCのHIV細胞病原性に対して明らかな用量応答効果を示した。

【0300】

図22に示されているように、PBMCを、CD3/CD28ビーズとIL-2で1日間刺激し、種々の濃度(MOI)のAGT103を形質導入した。2日後、ビーズを取り出し、細胞に0.1MOIのHIV NL4.3を感染させた。24時間後、細胞をPBSで3回洗浄し、IL-2(30 U/ml)と共に培養した。細胞を、3日毎に集め、CD4⁺ T細胞の頻度を、FACSで分析した。HIVに曝露した14日間後、LV-対照を形質導入したCD4⁺ T細胞は87%低減され、AGT103 MOI 0.2では60%低減され、AGT103 MOI 1では37%低減され、AGT103 MOI 5では17%低減された。

【0301】

(実施例19: HIV特異性について濃縮され、AGT103/CMV-GFPを用いて形質導入されたCD4⁺ T細胞の集団の生成)

HIVに対する療法用ワクチン接種は、CD4⁺、CD8⁺、およびCD4⁺/CD8⁺ T細胞の分布に最小限の影響しか及ぼさなかった。図23Aに示されるように、CD4 T細胞集団は、分析フローサイトメトリドットプロットの左上の象限に示され、ワクチン接種系列後、全T細胞の52%から57%に変化する。これらは代表的なデータである。

【0302】

10

20

30

40

50

H I V 療法用ワクチン試験における参加者からの末梢血単核細胞を、培地＋／－インターロイキン－２／インターロイキン－１２または＋／－インターロイキン－７／インターロイキン－１５で１２日間培養した。Ｔ細胞刺激のためのエピトープペプチドの供給源として、H I V－１の全 p 5 5 G a g タンパク質（H I V（G A G）U l t r a ペプチド混合物）を表す重複ペプチドで、いくつかの培養物を刺激した。これらのペプチドは、長さが１０～２０アミノ酸であり、その長さの２０～５０％が重複しており、H I V－１ B a L 株由来の G a g 前駆体タンパク質（p 5 5）全体を表す。個々のペプチドの組成および配列は、主な循環 H I V 配列の領域変動を補償するために、または詳細な配列情報がこの療法を受けている個々の患者に利用可能である場合に、調整することができる。培養終了時に、細胞を回収し、抗 C D 4 または抗 C D 8 モノクローナル抗体で染色し、C D 3＋集団をゲートし、ここに表示した。ワクチン接種前または接種後のいずれかの試料についての H I V（G A G）U l t r a ペプチド混合物刺激は培地対照と同様であり、このことは、H I V（G A G）U l t r a ペプチド混合物が細胞に対して毒性ではなく、ポリクローナル分裂促進因子としては作用しなかったことを示している。この分析の結果は、図 2 3 B に見出すことができる。

【 0 3 0 3 】

H I V（G A G）U l t r a ペプチド混合物およびインターロイキン－２／インターロイキン－１２は、抗原特異的 C D 4 T 細胞の最適な増殖のために提供された。図 2 3 C の上のパネルに示されるように、H I V（G A G）U l t r a ペプチド混合物に曝露されたワクチン接種後検体において、サイトカイン（インターフェロン－ガンマ）分泌細胞の増加があった。ワクチン接種前の試料において、抗原性ペプチドへの曝露の結果として、サイトカイン分泌細胞が 0.43 から 0.69％まで増加した。対照的に、ワクチン接種後の試料は、ペプチド刺激の結果として、全 C D 4 T 細胞の 0.62 から 1.76％までのサイトカイン分泌細胞の増加を示した。これらのデータは、H I V 抗原に対する C D 4 T 細胞応答におけるワクチン接種の強い影響を実証する。

【 0 3 0 4 】

最後に、抗原増殖した C D 4 T 細胞の A G T 1 0 3／C M V－G F P 形質導入は、H I V に対する機能的治癒の一部として患者に注入するために必要とされる H I V 特異的および H I V 耐性ヘルパー C D 4 T 細胞を産生した（他の様々な態様および実施形態に応じて、A G T 1 0 3 は単独で使用され、例えば、臨床実施形態は C M V－G F P セグメントを含まなくてもよい）。図 2 3 C の上のパネルは、培養物中の C D 4＋T 細胞集団を分析した結果を示す。図 2 3 C の x 軸は、緑色蛍光タンパク質（G F P）放出を示しており、このことは、個々の細胞に A G T 1 0 3／C M V－G F P が形質導入されたことを示している。ワクチン接種後の試料において、いずれもサイトカインを分泌する全 C D 4 T 細胞の 1.11％が回収され、このことは、細胞が H I V 抗原に特異的に応答し、これらの細胞に A G T 1 0 3／C M V－G F P が形質導入されることを示している。これは、H I V の注入および機能的治癒を意図した標的細胞集団および臨床産物である。e x v i v o 培養の抗原刺激およびその後のポリクローナル増殖期の間の細胞増殖の効率で、 4×10^8 個の抗原特異的な、レンチウイルス形質導入 C D 4 T 細胞を産生することができる。これは、細胞産生の標的を 4 倍超えており、およそ 40 細胞／マイクロリットルの血液または全循環 C D 4 T 細胞のおよそ 5.7％の、抗原特異的および H I V 耐性 C D 4 T 細胞の数を達成することができるであろう。

【 0 3 0 5 】

下の表 4 は、開示されたベクターおよび方法を使用した、H I V 特異的および H I V 耐性 C D 4 T 細胞の e x v i v o における産生の結果を示す。

10

20

30

40

50

【表 4】

表 4			
材料/操作	全 CD4 T 細胞	HIV 特異的パーセンテージ	HIV 特異的および HIV 耐性パーセンテージ
HIV+患者からの白血球アフェレーシスパック	約 7×10^8	約 0.12	N/A
ex vivo でのペプチド増殖	約 8×10^8	約 2.4	N/A
分裂促進因子増殖	約 1.5×10^{10}	約 2.4	N/A
レンチウイルス形質導入	約 1.5×10^{10}	約 2.4	約 1.6

【0306】

（実施例 20：HIV 陰性個体の予防的治療の臨床研究）

AGT103T は、AGT103 レンチウイルスベクターを用いてさらに形質導入されている $> 5 \times 10^7$ 個の HIV 特異的 CD4⁺ T 細胞を含む遺伝子改変自己由来 PBMC である。

【0307】

第 I 相臨床試験では、HIV 陰性成人研究参加者への ex vivo 改変自己由来 CD4⁺ T 細胞（AGT103T）注入の安全性および実施可能性が試験されることになる。最大 40 人の研究参加者が、特定の産物について確立された用量、経路、および製剤に従って、HIV 予防ワクチン候補を受ける。ワクチンは、HIV Gag ポリタンパク質を含み、HIV 特異的 CD4⁺ T 細胞を誘発することができなければならない。例えば、ワクチンは、エレクトロポレーションによる 3 用量のプラスミド DNA であって、HIV Gag、Pol、および Env タンパク質の発現をコードするプラスミドで構成されていてもよい。続いて、HIV Gag、Pol、および Env をコードする 2 用量の組換え MVA（rMVA）が、筋肉内免疫化で送達される。第 2 の rMVA 免疫化の 7～10 日後、HIV-1 Gag ポリタンパク質を表す重複した合成ペプチドのプールによる刺激に応答する CD4⁺ T 細胞の頻度を測定するための in vitro 試験のために、血液試料が集められる。強力な HIV 特異的 CD4⁺ T 細胞応答を生じる対象が、AGT103T 細胞療法を受けるのに適格である。AGT103T を受ける基準は、in vitro でペプチド刺激し、インターフェロン-γ サイトカイン発現を細胞内染色することにより測定して、HIV 特異的 CD4⁺ T 細胞頻度が、免疫化後の全 CD4⁺ T 細胞の $\geq 0.065\%$ であることである。試験参加者は白血球アフェレーシスを受け、その後 PBMC が精製され（フィコール密度勾配遠心分離または抗体によるネガティブ選択を使用して）、PBMC は、ex vivo で培養され、HIV Gag ペプチドとインターロイキン-2 およびインターロイキン-12 で 12 日間刺激され、その後、CD3/CD28 二重特異性抗体で修飾されているビーズで再び刺激される。CD3/CD28 刺激の 1 日後、細胞に、1～10 の感染多重度でレンチウイルスベクター AGT103（LV-EF-1-miRCCR5-miRVif-miRTatt）が形質導入される。形質導入された細胞は、さらに 7～14 日間培養され、その間に、形質導入された細胞は、ポリクローナル

増殖によって増殖する。収穫することにより培養期間を終了させ、細胞を洗浄し、効力および安全性リリースアッセイのためにアリコートを取って置き、残りの細胞を、凍結保存培地に再懸濁する。単一用量は、 $\leq 1 \times 10^{10}$ 個の自己由来 P B M C である。効力アッセイでは、ペプチド刺激に応答する C D 4 T 細胞の頻度が、インターフェロン-ガンマの発現によって測定される。他のリリース基準としては、産物が、A G T 1 0 3 をさらに形質導入した $\geq 0.5 \times 10^7$ 個の H I V 特異的 C D 4 T 細胞を含んでいなければならないことが挙げられる。別のリリース基準は、細胞あたりの A G T 1 0 3 ゲノムコピー数が、3 を超過してはならないということである。A G T 1 0 3 T を注入する 5 日前に、対象は、1 用量のブスルフラム (busulfuram) (またはシトキサン) 条件付けレジメンを受け、その後、遺伝子改変 C D 4 T 細胞を含む $\leq 1 \times 10^{10}$ 個の P B M C が注入される。

10

【0308】

患者選択

組み入れ基準：

- ・年齢が 18 ～ 60 歳であること。
 - ・研究登録前の 1 週間以内に血清学およびウイルス R N A アッセイにより H I V 陰性であることが実証されていること。
 - ・過去 25 年以内に M V A または他の天然痘ワクチンを用いた免疫化を先に受けていないこと。
 - ・研究で義務付けられている評価に応じる意思があり、研究期間中は H I V の曝露前予防措置を使用しないことに合意しなければならない。
 - ・C D 4 + T 細胞数が、立方ミリメートルあたり > 600 個 (細胞/mm³) であること
- 除外基準：

20

- ・あらゆるウイルス性肝炎
- ・H I V 感染
- ・少なくとも 5 年間寛解していないがんまたは悪性疾患、ただし治療に成功した皮膚の基底細胞癌は除く
- ・N Y H A グレード 3 または 4 のうっ血性心不全またはコントロールされていない狭心症もしくは不整脈と現在診断されていること

30

- ・出血障害の病歴
- ・過去 30 日の慢性ステロイドの使用
- ・妊娠または授乳
- ・活性薬物またはアルコール乱用
- ・過去 30 日の重度疾病
- ・別の臨床試験に現在参加しているか、またはあらゆる以前の遺伝子治療

安全性評価

- ・急性注入反応
 - ・注入後の安全性追跡調査
- 有効性評価－第 I 相
- ・改変 C D 4 T 細胞の数および頻度。
 - ・改変 C D 4 T 細胞の持続性。
 - ・メモリー T 細胞機能の尺度としての G a g ペプチド再刺激に対する *i n v i t r o* 応答 (I C S アッセイ)。
 - ・A G T 1 0 3 T に関する自己免疫または慢性炎症状態の欠如。
 - ・ワクチンに対する抗体応答に変化も改善もないこと。

40

【0309】

ワクチンに対する C D 8 細胞障害性 T 細胞応答に変化も改善もないこと。

【0310】

A G T 1 0 3 T は、A G T 1 0 3 レンチウイルスベクターを用いてさらに形質導入した $\geq 5 \times 10^7$ 個の H I V 特異的 C D 4 T 細胞を含む最大 1×10^{10} 個の遺伝子改変自己

50

由来CD4+ T細胞で構成される。第Ⅰ相臨床試験では、HIV陰性成人研究参加者へのex vivo改変自己由来CD4 T細胞(AGT103T)注入の安全性および実施可能性が試験されることになる。最大40人の研究参加者が、特定の産物について確立された用量、経路、および製剤に従ってHIV予防ワクチン候補を受ける。ワクチンは、HIV Gagポリタンパク質を含み、HIV特異的CD4+ T細胞を誘発することができなければならない。例えば、ワクチンは、エレクトロポレーションによる3用量のプラスミドDNAであって、HIV Gag、Pol、およびEnvタンパク質の発現をコードするプラスミドで構成されていてもよい。続いて、HIV Gag、Pol、およびEnvをコードする2用量の組換えMVA(rMVA)が、筋肉内免疫化で送達される。第2のrMVA免疫化の7~10日後、HIV-1 Gagポリタンパク質を表す重複した合成ペプチドのプールによる刺激に応答するCD4+ T細胞の頻度を測定するためのinvitro試験のために、血液試料が集められる。強力なHIV特異的CD4 T細胞応答を生じる対象が、AGT103T細胞療法を受けるのに適格である。AGT103Tを受ける基準は、invitroでペプチド刺激し、インターフェロン-ガンマサイトカイン発現を細胞内染色することにより測定して、HIV特異的CD4+ T細胞頻度が、免疫化後の全CD4 T細胞の $\geq 0.065\%$ であることである。試験参加者は、白血球アフェレーシスを受け、その後PBMCが精製され(フィコール密度勾配遠心分離または抗体によるネガティブ選択を使用して)、抗体に基づくネガティブ選択によってCD4+ T細胞が濃縮される。濃縮されたCD4+ T細胞は、10:1でCD4陰性画分と混合され(抗原提示細胞を提供するため)、ex vivoで培養され、HIV Gagペプチドとインターロイキン-2およびインターロイキン-12で12日間刺激され、その後、CD3/CD28二重特異性抗体で修飾されているビーズで再び刺激される。CD3/CD28刺激の1日後、細胞に、1~10の感染多重度でレンチウイルスベクターAGT103(LV-EF-1-miRCCR5-miRVif-miRTat)が形質導入される。形質導入された細胞は、さらに7~14日間培養され、その間に、形質導入された細胞は、ポリクロナル増殖によって増殖する。収穫することにより培養期間を終了させ、細胞を洗浄し、効力および安全性リリースアッセイのためにアリコートを取って置き、残りの細胞を、凍結保存培地に再懸濁する。単一用量は、 $\leq 1 \times 10^{10}$ 個の自己由来CD4+ T細胞である。効力アッセイでは、ペプチド刺激に応答するCD4 T細胞の頻度が、インターフェロン-ガンマの発現によって測定される。他のリリース基準としては、産物が、AGT103をさらに形質導入した $\geq 0.5 \times 10^7$ 個のHIV特異的CD4 T細胞を含んでいなければならないことが挙げられる。別のリリース基準は、細胞あたりのAGT103ゲノムコピー数が、3を超過してはならないということである。AGT103Tを注入する5日前に、対象は、1用量のブスルファミン(またはシトキサン)条件付けレジメンを受け、その後、遺伝子改変CD4 T細胞を含む $\leq 1 \times 10^{10}$ 個のPBMCが注入される。

【0311】

(実施例21: AGT-LV-HIV1.0は、潜伏性の誘導可能なHIVの細胞モデル(J1.1)においてHIV複製を効率的に阻害する)

J1.1細胞は、HIVプロウイルスDNAのサイレントコピーを有し、サイトカインTNF- α による処理によって活性化されると、非常に大量の無細胞HIVを産生する。図24のパネル(A)は、形質導入した細胞の $> 99\%$ で緑色蛍光として見られる、AGT-T-HIV1.0-GFP(別名LV-R5TatVif)またはGFPを有する対照レンチウイルスベクターを用いて形質導入されたJ1.1細胞を示す。図24のパネル(B)は、HIV産生を誘導するために、形質導入した細胞をTNF- α (50 ng/ml)で処理したことを示す。7日後に上清を集め、精製されたPHA/IL2刺激扁桃CD4 T細胞に感染させるために使用した。HIV感染を、細胞内p24染色(KC57-RD1、Beckman Coulter)およびフローサイトメトリーアッセイによって検出した。ベクターAGT-LV-HIV1.0は、活性化されたJ1.1細胞によるHIV産生を著しく低減した。このアッセイは、ウイルス産生および感染

性にとって不可欠なHIV遺伝子TatおよびVifに対するmiRNAの活性を検証する。

【0312】

配列

以下の配列が、本明細書で言及されている：

【表6-1】

配列番号	説明	配列
1	miR30 CCR5	AGGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCGACTGTAAACT GAGCTTGCTCTACTGTGAAGCCACAGATGGGTAGA GCAAGCACAGTTTACCGCTGCCTACTGCCTCGGACT TCAAGGGGCTT
2	miR21 Vif	CATCTCCATGGCTGTACCACCTTGTCGGGGGATGTG TACTTCTGAACTTGTGTTGAATCTCATGGAGTTCAG AAGAACACATCCGCACTGACATTTTGGTATCTTTCA TCTGACCA
3	miR185 Tat	GGGCCTGGCTCGAGCAGGGGGCGAGGGATTCCGCT TCTTCCTGCCATAGCGTGG

10

20

30

40

50

【表 6 - 2】

		TCCCCTCCCCTATGGCAGGCAGAAGCGGCACCTTCC CTCCCAATGACCGCGTCTTCGTCTG
4	伸長因子-1アルファ (EF1-アルファ) プロモーター	CCGGTGCCTAGAGAAGGTGGCGCGGGGTAAACTGG GAAAGTGATGTCGTGTACTGGCTCCGCCCTTTTCCC GAGGGTGGGGGAGAACCGTATATAAGTGCAGTAGT CGCCGTGAACGTTCTTTTTCGCAACGGGTTTGCCGC CAGAACACAGGTAAGTGCCGTGTGTGGTTCCCGCG GGCCTGGCCTCTTTACGGGTTATGGCCCTTGCGTGC CTTGAATTACTTCCACGCCCCTGGCTGCAGTACGTG ATTCTTGATCCCGAGCTTCGGGTTGGAAGTGGGTGG GAGAGTTCGAGGCCCTTGCGCTTAAGGAGCCCCTTCG CCTCGTGCTTGAGTTGAGGCCTGGCCTGGGCGCTGG GGCCGCCGCGTGCGAATCTGGTGGCACCTTCGCGCC TGTCTCGCTGCTTTCGATAAGTCTCTAGCCATTTAAA ATTTTGTATGACCTGCTGCGACGCTTTTTTCTGGCA AGATAGTCTTGTAATGCGGGCCAAGATCTGCACAC TGGTATTTTCGGTTTTTGGGGCCGCGGGCGGCGACGG GGCCCGTGCGTCCCAGCGCACATGTTTCGGCGAGGC GGGGCCTGCGAGCGCGGCCACCGAGAATCGGACGG GGGTAGTCTCAAGCTGGCCGGCCTGCTCTGGTGCCT GGCCTCGCGCCGCGGTGTATCGCCCCGCCCTGGGCG GCAAGGCTGGCCCGGTTCGGCACCAAGTTGCGTGAGC GGAAAGATGGCCGCTTCCCGGCCCTGCTGCAGGGA GCTCAAAATGGAGGACGCGGCGCTCGGGAGAGCGG GCGGGTGAGTCACCCACACAAAGGAAAAGGGCCTT TCCGTCCTCAGCCGTCGCTTCATGTGACTCCACGGA GTACCGGGCGCCGTCCAGGCACCTCGATTAGTTCTC GAGCTTTTGGAGTACGTCTTTAGGTTGGGGGGA GGGGTTTTATGCGATGGAGTTTCCCCACACTGAGTG GGTGGAGACTGAAGTTAGGCCAGCTTGGCACTTGAT GTAATTCTCCTTGGAATTTGCCCTTTTGTAGTTTGGA TCTTGGTTCATTCTCAAGCCTCAGACAGTGGTTCAA

10

20

30

40

50

【表 6 - 3】

		AGTTTTTTTCTTCCATTTTCAGGTGTCGTGA
5	CCR5 標的配列	GAGCAAGCTCAGTTTACA
6	Vif 標的配列	GGGATGTGTACTTCTGAACTT
7	Tat 標的配列	TCCGCTTCTTCCTGCCATAG
8	TAR デコイ配列	CTTGCAATGATGTCGTAATTTGCGTCTTACCTCGTTC TCGACAGCGACCAGATCTGAGCCTGGGAGCTCTCTG GCTGTCAGTAAGCTGGTACAGAAGGTTGACGAAAA TTCTTACTGAGCAAGAAA
9	Rev/Tat 標的配列	GCGGAGACAGCGACGAAGAGC
10	Rev/Tat shRNA 配列	GCGGAGACAGCGACGAAGAGCTTCAAGAGAGCTCT TCGTCGCTGTCTCCGCTTTTT
11	Gag 標的配列	GAAGAAATGATGACAGCAT
12	Gag shRNA 配列	GAAGAAATGATGACAGCATTTCAGAGAATGCTGT CATCATTTCTTCTTTTT
13	Pol 標的配列	CAGGAGCAGATGATACAG
14	Pol shRNA 配列	CAGGAGATGATACAGTTCAAGAGACTGTATCATCTG CTCCTGTTTTT
15	CCR5 標的配列 #1	GTGTCAAGTCCAATCTATG
16	CCR5 shRNA 配列 #1	GTGTCAAGTCCAATCTATGTTCAAGAGACATAGATT GGACTTGACACTTTTT
17	CCR5 target 配列 #2	GAGCATGACTGACATCTAC
18	CCR5 shRNA 配列 #2	GAGCATGACTGACATCTACTTCAAGAGAGTAGATGT CAGTCATGCTCTTTTT
19	CCR5 標的	GTAGCTCTAACAGGTTGGA

10

20

30

40

50

【表 6 - 4】

	配列 #3	
20	CCR5 shRNA 配列 #3	GTAGCTCTAACAGGTTGGATTCAAGAGATCCAACCT GTTAGAGCTACTTTTT
21	CCR5 標的配列 #4	G TTCAGAAACTACCTCTTA
22	CCR5 shRNA 配列 #4	G TTCAGAAACTACCTCTTATTCAAGAGATAAGAGGT AGTTTCTGAACTTTTT
23	CCR5 標的配列 #5	GAGCAAGCTCAGTTTACACC
24	CCR5 shRNA 配列 #5	GAGCAAGCTCAGTTTACACCTTCAAGAGAGGTGTA AACTGAGCTTGCTCTTTTT
25	ホモ・サピエンス CCR5 遺伝子、 配列 1	ATGGATTATCAAGTGTCAAGTCCAATCTATGACATC AATTATTATACATCGGAGCCCTGCCAAAAAATCAAT GTGAAGCAAATCGCAGCCCGCCTCCTGCCTCCGCTC TACTCACTGGTGTTCATCTTTGGTTTTGTGGGC
26	ホモ・サピエンス CCR5 遺伝子、 配列 2	AACATGCTGGTCATCCTCATCCTGATAAACTGCAAA AGGCTGAAGAGCATGACTGACATCTACCTGCTCAAC CTGGCCATCTCTGACCTGTTTTTCCTTCTTACTGTCC CCTTCTGGGCTCACTATGCTGCCGCCAGTGGGACT TTGGAAATACAATGTGTCAACTCTTGACAGGGCTCT ATTTTATAGGCTTCTTCTCTGGAATCTTCTTCATCAT CCTCCTGACAATCGATAGGTACCTGGCTGTCTGTTCA TGCTGTGTTTGCTTTAAAGCCAGGACGGTCACCTT TGGGGTGGTGACAAGTGTGATCACTTGGGTGGTGGC TGTGTTTGCGTCTCTCCCAGGAATCATCTTTACCAG ATCTCAAAAAGAAGGTCTTCATTACACCTGCAGCTC TCATTTTCCATACAGTCAGTATCAATTCTGGAAGAA TTTCCAGACATTAAAGATAGTCATCTTGGGGCTGGT CCTGCCGCTGCTTGTTCATGGTCATCTGCTACTCGGG AATCCTAAAACTCTGCTTCGGTGTGCGAAATGAGAA GAAGAGGCACAGGGCTGTGAGGCTTATCTTACCAT CATGATTGTTTATTTTCTTCTGCGGCTCCCTACAAC

10

20

30

40

50

【表 6 - 5】

		ATTGTCCTTCTCCTGAAC
27	ホモ・サピエンス CCR5 遺伝子、 配列 3	ACCTTCCAGGAATTCTTTGGCCTGAATAATTGCAGT AGCTCTAACAGGTTGGACCAAGCTATGCAGGTGA
28	ホモ・サピエンス CCR5 遺伝子、 配列 4	CAGAGACTCTTGGGATGACGCACTGCTGCATCAACC CCATCATCTATGCCTTTGTCTGGGGAGAAGTTCAGAA ACTACCTCTTAGTCTTCTTCCAAAAGCACATTGCCA AACGCTTCTGCAAATGCTGTTCTATTTTCCAG
29	ホモ・サピエンス CCR5 遺伝子、 配列 5	CAAGAGGCTCCCGAGCGAGCAAGCTCAGTTTACAC CCGATCCACTGGGGAGCAGGAAATATCTGTGGGCTT GTGA
30	CD4 プロモーター配列	TGTTGGGGTTCAAATTTGAGCCCCAGCTGTTAGCCC TCTGCAAAGAAAAAAAAAAAAAAAAAAGAACAAA GGGCCTAGATTTCCCTTCTGAGCCCCACCCTAAGAT GAAGCCTCTTCTTTCAAGGGAGTGGGGTTGGGGTGG AGGCGGATCCTGTCAGCTTTGCTCTCTCTGTGGCTG GCAGTTTCTCCAAAGGGTAACAGGTGTCAGCTGGCT GAGCCTAGGCTGAACCCTGAGACATGCTACCTCTGT CTTCTCATGGCTGGAGGCAGCCTTTGTAAGTCACAG AAAGTAGCTGAGGGGCTCTGGAAAAAGACAGCCA GGGTGGAGGTAGATTGGTCTTTGACTCCTGATTAA GCCTGATTCTGCTTAACTTTTTCCCTTGACTTTGGCA TTTTCACTTTGACATGTTCCCTGAGAGCCTGGGGGG TGGGGAACCCAGCTCCAGCTGGTGACGTTTGGGGCC GGCCCAGGCCTAGGGTGTGGAGGAGCCTTGCCATC GGGCTTCCTGTCTCTCTTCATTTAAGCACGACTCTGC AGA
31	miR30- CCR5/miR21- Vif/miR185 Tat マイクロRNA クラスター配列	AGGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCGACTGTAAACT GAGCTTGCTCTACTGTGAAGCCACAGATGGGTAGA GCAAGCACAGTTTACCGCTGCCTACTGCCTCGGACT TCAAGGGGCTTCCCGGGCATCTCCATGGCTGTACCA CCTTGTCGGGGGATGTGTACTTCTGAACTTGTGTTG

10

20

30

40

50

【表 6 - 6】

		AATCTCATGGAGTTCAGAAGAACACATCCGCACTG ACATTTTGGTATCTTTCATCTGACCAGCTAGCGGGC CTGGCTCGAGCAGGGGGCGAGGGATTCCGCTTCTTC CTGCCATAGCGTGGTCCCCTCCCCTATGGCAGGCAG AAGCGGCACCTTCCCTCCCAATGACCGCGTCTTCGT C
32	長鎖WPRE配列	AATCAACCTCTGATTACAAAATTTGTGAAAGATTGA CTGGTATTCTTAACTATGTTGCTCCTTTTACGCTATG TGGATACGCTGCTTTAATGCCTTTGTATCATGCTATT GCTTCCCGTATGGCTTTCATTTTCTCCTCCTTGTATA AATCCTGGTTGCTGTCTCTTTATGAGGAGTTGTGGC CCGTTGTACAGCAACGTGGCGTGGTGTGCACTGTGT TTGCTGACGCAACCCCCACTGGTTGGGGCATTGCCA CCACCTGTCAGCTCCTTTCCGGGACTTTCGCTTTCCC CCTCCCTATTGCCACGGCGGAACATCGCCGCCTG CCTTGCCCGCTGCTGGACAGGGGCTCGGCTGTTGGG CACTGACAATTCCGTGGTGTGTGCGGGGAAATCATC GTCCTTTCCTTGGCTGCTCGCCTGTGTTGCCACCTGG ATTCTGCGCGGGACGTCCTTCTGCTACGTCCCTTCG GCCCTCAATCCAGCGGACCTTCCCTCCCGCGGCCTG CTGCCGGCTCTGCGGCCTCTTCCGCGTCTTCGCTTC GCCCTCAGACGAGTCGGATCTCCCTTTGGGCCGCCT CCCCGCCT
33	伸長因子-1アルファ (EF1-アルファ) プロモーター； miR30CCR5; miR21Vif; miR185 Tat	CCGGTGCCTAGAGAAGGTGGCGCGGGGTAAACTGG GAAAGTGATGTCGTGTACTGGCTCCGCCTTTTCCC GAGGGTGGGGGAGAACCGTATATAAGTGCAGTAGT CGCCGTGAACGTTCTTTTTCGCAACGGGTTTGCCGC CAGAACACAGGTAAGTGCCGTGTGTGGTTCCTCGC GGCCTGGCCTCTTACGGGTTATGGCCCTTGCGTGC CTTGAATTACTTCCACGCCCCCTGGCTGCAGTACGTG ATTCTTGATCCCGAGCTTCGGGTTGGAAGTGGGTGG GAGAGTTCGAGGCCTTGCCTTAAGGAGCCCCCTTCG

10

20

30

40

50

【表 6 - 7】

	CCTCGTGCTTGAGTTGAGGCCTGGCCTGGGCGCTGG GGCCGCCGCGTGCGAATCTGGTGGCACCTTCGCGCC TGTCTCGCTGCTTTCGATAAGTCTCTAGCCATTTAAA ATTTTTGATGACCTGCTGCGACGCTTTTTTCTGGCA AGATAGTCTTGTAATGCGGGCCAAGATCTGCACAC TGGTATTTTCGGTTTTTGGGGCCGCGGGCGGCGACGG GGCCCGTGCGTCCCAGCGCACATGTTCCGGCGAGGC GGGGCCTGCGAGCGCGGCCACCGAGAATCGGACGG GGGTAGTCTCAAGCTGGCCGGCCTGCTCTGGTGCCT GGCCTCGCGCCCGCGTGTATCGCCCCGCCCTGGGCG GCAAGGCTGGCCCGGTCCGGCACCAAGTTGCGTGAGC GGAAAGATGGCCGCTTCCCGGCCCTGCTGCAGGGA GCTCAAAATGGAGGACGCGGCGCTCGGGAGAGCGG GCGGGTGAGTCACCCACACAAAGGAAAAGGGCCTT TCCGTCCTCAGCCGTCGCTTCATGTGACTCCACGGA GTACCGGGCGCCGTCCAGGCACCTCGATTAGTTCTC GAGCTTTTGGAGTACGTCGTCTTTAGGTTGGGGGA GGGGTTTTATGCGATGGAGTTTCCCCACACTGAGTG GGTGGAGACTGAAGTTAGGCCAGCTTGGCACTTGAT GTAATTCTCCTTGGAATTTGCCCTTTTTGAGTTTGGA TCTTGGTTCATTCTCAAGCCTCAGACAGTGTTCAA AGTTTTTTTCTTCCATTTCAGGTGTCGTGATGTACA <u>AGGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCGACTGTAAACT</u> <u>GAGCTTGCTCTACTGTGAAGCCACAGATGGGTAGA</u> <u>GCAAGCACAGTTTACCGCTGCCTACTGCCTCGGACT</u> <u>TCAAGGGGCTTCCCGGGCATCTCCATGGCTGTACCA</u> <u>CCTTGTCGGGGGATGTGTACTTCTGAACTTGTTG</u> <u>AATCTCATGGAGTTCAGAAGAACACATCCGCACTG</u> <u>ACATTTTGGTATCTTTCATCTGACCAGCTAGCGGGC</u> <u>CTGGCTCGAGCAGGGGGCGAGGGATTCCGCTTCTTC</u> <u>CTGCCATAGCGTGGTCCCCTCCCCTATGGCAGGCAG</u> <u>AAGCGGCACCTTCCCTCCCAATGACCGCGTCTTCGT</u>
--	---

10

20

30

40

50

【表 6 - 8】

		<u>C</u>
34	ラウス肉腫ウイルス (RSV)プロモーター	GTAGTCTTATGCAATACTCTTGTAGTCTTGCAACAT GGTAACGATGAGTTAGCAACATGCCTTACAAGGAG AGAAAAAGCACCGTGCATGCCGATTGGTGGAAGTA AGGTGGTACGATCGTGCCTTATTAGGAAGGCAACA GACGGGTCTGACATGGATTGGACGAACCACTGAAT TGCCGCATTGCAGAGATATTGTATTTAAGTGCCTAG CTCGATAACAATAAACG
35	5' 末端反復配列	GGTCTCTCTGGTTAGACCAGATCTGAGCCTGGGAGC TCTCTGGCTAACTAGGGAACCCACTGCTTAAGCCTC AATAAAGCTTGCCTTGAGTGCTTCAAGTAGTGTGTG CCCGTCTGTTGTGTGACTCTGGTAACTAGAGATCCC TCAGACCCTTTTAGTCAGTGTGGAAAATCTCTAGCA
36	Psi パッケージングシグナル	TACGCCAAAAATTTTACTAGCGGAGGCTAGAAGG AGAGAG
37	Rev 応答エレメント (RRE)	AGGAGCTTTGTTCCTTGGGTTCTTGGGAGCAGCAGG AAGCACTATGGGCGCAGCCTCAATGACGCTGACGG TACAGGCCAGACAATTATTGTCTGGTATAGTGCAGC AGCAGAACAAATTTGCTGAGGGCTATTGAGGGCGCAA CAGCATCTGTTGCAACTCACAGTCTGGGGCATCAAG CAGCTCCAGGCAAGAATCCTGGCTGTGGAAAGATA CCTAAAGGATCAACAGCTCC
38	中央ポリプリントラクト (cPPT)	TTTTAAAAGAAAAGGGGGGATTGGGGGGTACAGTG CAGGGGAAAGAATAGTAGACATAATAGCAACAGAC ATACAAACTAAAGAATTACAAAAACAAATTACAAA ATTCAAAATTTTA
39	3' デルタ LTR	TGGAAGGGCTAATTCCTCCCAACGAAGATAAGAT CTGCTTTTTGCTTGTACTGGGTCTCTCTGGTTAGACC AGATCTGAGCCTGGGAGCTCTCTGGCTAACTAGGGA ACCCACTGCTTAAGCCTCAATAAAGCTTGCCCTTGAG TGCTTCAAGTAGTGTGTGCCCCGTCTGTTGTGTGACT CTGGTAACTAGAGATCCCTCAGACCCTTTTAGTCAG

10

20

30

40

50

【表 6 - 9】

		TGTGGAAAATCTCTAGCAGTAGTAGTTCATGTCA
40	ヘルパー/Rev; CMV 初期(CAG) エンハンサー; 転写を増強する	TAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGT TCATAGCCCATATATGGAGTTCGCGTTACATAACT TACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACG ACCCCGCCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTC CCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTC AATGGGTGGACTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGG CAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCC CTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGC ATTATGCCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTA CTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATC
41	ヘルパー/Rev; ニワトリパータクチン (CAG) プロモーター; 転写	GCTATTACCATGGGTGCGAGGTGAGCCCCACGTTCTG CTTCACTCTCCCCATCTCCCCCCCCCTCCCCACCCCA ATTTTGTATTTATTTATTTTAAATTATTTGTGCAGC GATGGGGGCGGGGGGGGGGGGGGCGCGGCCAGG CGGGGCGGGGCGGGGCGAGGGGCGGGGCGGGGCG AGGCGGAGAGGTGCGGCGGCAGCCAATCAGAGCGG CGCGCTCCGAAAGTTTCCTTTTATGGCGAGGCGGCG GCGGCGGGCGGCCCTATAAAAAGCGAAGCGCGCGGC GGGCG
42	ヘルパー/Rev; ニワトリパータクチンイ ントロン; 遺伝子発現を増強する	GGAGTCGCTGCGTTGCCTTCGCCCCGTGCCCCGCTC CGCGCCGCTCGCGCCGCCCGCCCCGGCTCTGACTG ACCGCGTTACTCCACAGGTGAGCGGGCGGGACGG CCCTTCTCCTCCGGGCTGTAATTAGCGCTTGGTTTAA TGACGGCTCGTTTCTTTTCTGTGGCTGCGTGAAAGC CTTAAAGGGCTCCGGGAGGGCCCTTTGTGCGGGGG GGAGCGGCTCGGGGGGTGCGTGCGTGTGTGTGTGC GTGGGGAGCGCCGCGTGCGGCGCGCTGCCCGGC GGCTGTGAGCGCTGCGGGCGCGGCGGGGCTTTG TGCGCTCCGCGTGTGCGCGAGGGGAGCGCGGCCGG GGGCGGTGCCCCGCGGTGCGGGGGGGCTGCGAGGG GAACAAAGGCTGCGTGCGGGGTGTGTGCGTGGGGG

10

20

30

40

50

【表 6 - 1 0】

		GGTGAGCAGGGGGTGTGGGCGCGGCGGTTCGGGCTG TAACCCCCCTGCACCCCCCTCCCCGAGTTGCTGA GCACGGCCCCGGCTTCGGGTGCGGGGCTCCGTGCGG GGCGTGGCGCGGGGCTCGCCGTGCCGGGCGGGGGG TGGCGGCAGGTGGGGGTGCCGGGCGGGGCGGGGCC GCCTCGGGCCGGGAGGGCTCGGGGAGGGGCGCG GCGGCCCCGGAGCGCCGGCGGTGTGAGGCGCGG CGAGCCGCAGCCATTGCCTTTTATGGTAATCGTGCG AGAGGGCGCAGGGAATTCCTTTGTCCCAAATCTGGC GGAGCCGAAATCTGGGAGGCGCCGCCGCACCCCCT CTAGCGGGCGCGGGCGAAGCGGTGCGGCGCCGGCA GGAAGGAAATGGGCGGGAGGGCCTTCGTGCGTCG CCGCGCCCGCTCCCTTCTCCATCTCCAGCCTCGG GGCTGCCGCAGGGGGACGGCTGCCTTCGGGGGGGA CGGGGCAGGGCGGGGTTGCGCTTCTGGCGTGTGAC CGGCGG
43	ヘルパー/Rev; HIV Gag; ウイルスカプシド	ATGGGTGCGAGAGCGTCAGTATTAAGCGGGGGAGA ATTAGATCGATGGGAAAAAATTCGGTTAAGGCCAG GGGGAAGAAAAAATATAAATTAACATATAGTA TGGGCAAGCAGGGAGCTAGAACGATTCGCAGTTAA TCCTGGCCTGTTAGAAACATCAGAAGGCTGTAGACA AATACTGGGACAGCTACAACCATCCCTTCAGACAG GATCAGAAGAACTTAGATCATTATATAATACAGTAG CAACCCTCTATTGTGTGCATCAAAGGATAGAGATAA AAGACACCAAGGAAGCTTTAGACAAGATAGAGGAA GAGCAAAACAAAAGTAAGAAAAAAGCACAGCAAG CAGCAGCTGACACAGGACACAGCAATCAGGTCAGC CAAAATTACCTATAGTGCAGAACATCCAGGGGCA AATGGTACATCAGGCCATATCACCTAGAACTTTAAA TGCATGGGTAAAAGTAGTAGAAGAGAAGGCTTTCA GCCCAGAAGTGATACCCATGTTTTTCAGCATTATCAG AAGGAGCCACCCACAAGATTTAAACACCATGCTA

10

20

30

40

50

【表 6 - 1 1】

		AACACAGTGGGGGGACATCAAGCAGCCATGCAAAT GTAAAAAGAGACCATCAATGAGGAAGCTGCAGAAT GGGATAGAGTGCATCCAGTGCATGCAGGGCCTATT GCACCAGGCCAGATGAGAGAACCAAGGGGAAGTGA CATAGCAGGAACTACTAGTACCCCTTCAGGAACAAA TAGGATGGATGACACATAATCCACCTATCCCAGTAG GAGAAATCTATAAAAAGATGGATAATCCTGGGATTA AATAAAATAGTAAGAATGTATAGCCCTACCAGCATT CTGGACATAAGACAAGGACCAAAGGAACCCCTTAG AGACTATGTAGACCGATTCTATAAACTCTAAGAGC CGAGCAAGCTTCACAAGAGGTAAAAAATTGGATGA CAGAAACCTTGTGGTCCAAAATGCGAACCCAGATT GTAAGACTATTTTAAAAGCATTGGGACCAGGAGCG ACACTAGAAGAAATGATGACAGCATGTCAGGGAGT GGGGGGACCCGGCCATAAAGCAAGAGTTTTGGCTG AAGCAATGAGCCAAGTAACAAATCCAGCTACCATA ATGATACAGAAAGGCAATTTTAGGAACCAAAGAAA GACTGTAAAGTGTTCATTGTGGCAAAGAAGGGCA CATAGCCAAAAATTGCAGGGCCCCTAGGAAAAAGG GCTGTTGGAAATGTGGAAAGGAAGGACACCAAATG AAAGATTGTACTGAGAGACAGGCTAATTTTTTAGGG AAGATCTGGCCTTCCCACAAGGGAAGGCCAGGGAA TTTTCTTCAGAGCAGACCAGAGCCAACAGCCCCACC AGAAGAGAGCTTCAGGTTTGGGGAAGAGACAACAA CTCCCTCTCAGAAGCAGGAGCCGATAGACAAGGAA CTGTATCCTTTAGCTTCCCTCAGATCACTCTTTGGCA GCGACCCCTCGTCACAATAA
44	ヘルパー/Rev; HIV Pol; プロテアーゼおよび 逆転写酵素	ATGAATTTGCCAGGAAGATGGAAACCAAAAATGAT AGGGGGAATTGGAGGTTTTATCAAAGTAGGACAGT ATGATCAGATACTCATAGAAATCTGCGGACATAAA GCTATAGGTACAGTATTAGTAGGACCTACACCTGTC AACATAATTGGAAGAAATCTGTTGACTCAGATTGGC

10

20

30

40

50

【表 6 - 1 2】

	TGCAC TTTAAATTTTCCCATTAGTCCTATTGAGACTG TACCAGTAAAATTAAGCCAGGAATGGATGGCCCA AAAGTTAAACAATGGCCATTGACAGAAGAAAAAAT AAAAGCATTAGTAGAAATTTGTACAGAAATGGAAA AGGAAGGAAAAATTTCAAAAATTGGGCCTGAAAAT CCATACAATACTCCAGTATTTGCCATAAAGAAAAAA GACAGTACTAAATGGAGAAAATTAGTAGATTTTCAG AGAACTTAATAAGAGAACTCAAGATTTCTGGGAAG TTCAATTAGGAATACCACATCCTGCAGGGTTAAAC AGAAAAAATCAGTAACAGTACTGGATGTGGGCGAT GCATATTTTTTCAGTTCCTTAGATAAAGACTTCAGG AAGTATACTGCATTTACCATACCTAGTATAACAAT GAGACACCAGGGATTAGATATCAGTACAATGTGCTT CCACAGGGATGGAAAGGATCACCAGCAATATTCCA GTGTAGCATGACAAAAATCTTAGAGCCTTTTAGAAA ACAAAATCCAGACATAGTCATCTATCAATACATGGA TGATTTGTATGTAGGATCTGACTTAGAAATAGGGCA GCATAGAACAAAAATAGAGGAACTGAGACAACATC TGTTGAGGTGGGGATTTACCACACCAGACAAAAAA CATCAGAAAGAACCTCCATTTCCTTTGGATGGGTTAT GAACTCCATCCTGATAAATGGACAGTACAGCCTATA GTGCTGCCAGAAAAGGACAGCTGGACTGTCAATGA CATACAGAAATTAGTGGGAAAATTGAATTGGGCAA GTCAGATTTATGCAGGGATTAAAGTAAGGCAATTAT GTAAACTTCTTAGGGGAACCAAAGCACTAACAGAA GTAGTACCACTAACAGAAGAAGCAGAGCTAGAACT GGCAGAAAACAGGGAGATTCTAAAAGAACCGGTAC ATGGAGTGTATTATGACCCATCAAAAGACTTAATAG CAGAAATACAGAAGCAGGGGCAAGGCCAATGGACA TATCAAATTTATCAAGAGCCATTTAAAAATCTGAAA ACAGGAAAATATGCAAGAATGAAGGGTGCCACAC TAATGATGTGAAACAATTAACAGAGGCAGTACAAA
--	---

10

20

30

40

50

【表 6 - 1 3】

		AAATAGCCACAGAAAGCATAGTAATATGGGGAAAG ACTCCTAAATTTAAATTACCCATACAAAAGGAAACA TGGGAAGCATGGTGGACAGAGTATTGGCAAGCCAC CTGGATTCTGAGTGGGAGTTTGTCAATACCCCTCC CTTAGTGAAGTTATGGTACCAGTTAGAGAAAGAAC CCATAATAGGAGCAGAACTTTCTATGTAGATGGG GCAGCCAATAGGGAAACTAAATTAGGAAAAGCAGG ATATGTAACTGACAGAGGAAGACAAAAAGTTGTCC CCCTAACGGACACAACAAATCAGAAGACTGAGTTA CAAGCAATTCATCTAGCTTTGCAGGATTCGGGATTA GAAGTAAACATAGTGACAGACTCACAATATGCATT GGGAATCATTCAAGCACAACCAGATAAGAGTGAAT CAGAGTTAGTCAGTCAAATAATAGAGCAGTTAATA AAAAAGGAAAAAGTCTACCTGGCATGGGTACCAGC ACACAAAGGAATTGGAGGAAATGAACAAGTAGATG GGTTGGTCAGTGCTGGAATCAGGAAAGTACTA
45	ヘルパーRev; HIVインテグラーゼ; ウイルスRNAの組み込み	TTTTTAGATGGAATAGATAAGGCCCAAGAAGAACA TGAGAAATATCACAGTAATTGGAGAGCAATGGCTA GTGATTTTAACCTACCACCTGTAGTAGCAAAAGAAA TAGTAGCCAGCTGTGATAAATGTCAGCTAAAAGGG GAAGCCATGCATGGACAAGTAGACTGTAGCCCAGG AATATGGCAGCTAGATTGTACACATTTAGAAGGAA AAGTTATCTTGGTAGCAGTTCATGTAGCCAGTGGAT ATATAGAAGCAGAAGTAATTCCAGCAGAGACAGGG CAAGAAACAGCATACTTCCTCTTAAAATTAGCAGGA AGATGGCCAGTAAAAACAGTACATACAGACAATGG CAGCAATTTACCCAGTACTACAGTTAAGGCCGCCTG TTGGTGGGCGGGGATCAAGCAGGAATTTGGCATTCC CTACAATCCCCAAAGTCAAGGAGTAATAGAATCTAT GAATAAAGAATTAAAGAAAATTATAGGACAGGTAA GAGATCAGGCTGAACATCTTAAGACAGCAGTACAA ATGGCAGTATTCATCCACAATTTTAAAAGAAAAGG

10

20

30

40

50

【表 6 - 1 4】

		GGGGATTGGGGGGTACAGTGCAGGGGAAAGAATAG TAGACATAATAGCAACAGACATACAACTAAAGAA TTACAAAAACAAATTACAAAAATTCAAAATTTTCGG GTTTATTACAGGGACAGCAGAGATCCAGTTTGGAA AGGACCAGCAAAGCTCCTCTGGAAAGGTGAAGGGG CAGTAGTAATACAAGATAATAGTGACATAAAAGTA GTGCCAAGAAGAAAAGCAAAGATCATCAGGGATTA TGGAACACAGATGGCAGGTGATGATTGTGTGGCAA GTAGACAGGATGAGGATTAA	10
46	ヘルパー/Rev; HIV RRE; Revエレメントに結合する	AGGAGCTTTGTTTCCTTGGGTTCTTGGGAGCAGCAGG AAGCACTATGGGCGCAGCGTCAATGACGCTGACGG TACAGGCCAGACAATTATTGTCTGGTATAGTGCAGC AGCAGAACAATTTGCTGAGGGCTATTGAGGCGCAA CAGCATCTGTTGCAACTCACAGTCTGGGGCATCAAG CAGCTCCAGGCAAGAATCCTGGCTGTGGAAAGATA CCTAAAGGATCAACAGCTCCT	20
47	ヘルパー/Rev; HIV Rev; 核外輸送および ウイルスmRNAを 安定化する	ATGGCAGGAAGAAGCGGAGACAGCGACGAAGAAC TCCTCAAGGCAGTCAGACTCATCAAGTTTCTCTATC AAAGCAACCCACCTCCCAATCCCGAGGGGACCCGA CAGGCCCCGAAGGAATAGAAGAAGAAGGTGGAGAG AGAGACAGAGACAGATCCATTTCGATTAGTGAACGG ATCCTTAGCACTTATCTGGGACGATCTGCGGAGCCT GTGCCTCTTCAGCTACCACCGCTTGAGAGACTTACT CTTGATTGTAACGAGGATTGTGGAACCTTCTGGGACG CAGGGGGTGGGAAGCCCTCAAATATTGGTGGAAATC TCCTACAATATTGGAGTCAGGAGCTAAAGAATAG	30
48	ヘルパー/Rev; ウサギベータグロビン ポリA; RNA安定性	AGATCTTTTTCCCTCTGCCAAAAATTATGGGGACAT CATGAAGCCCCTTGAGCATCTGACTTCTGGCTAATA AAGGAAATTTATTTTCATTGCAATAGTGTGTTGGAA TTTTTGTGTCTCTCACTCGGAAGGACATATGGGAG GGCAAATCATTTAAAACATCAGAATGAGTATTTGGT TTAGAGTTTGGCAACATATGCCATATGCTGGCTGCC	40

10

20

30

40

50

【表 6 - 1 5】

		ATGAACAAAGGTGGCTATAAAGAGGTCATCAGTAT ATGAAACAGCCCCCTGCTGTCCATTCTTATTCCAT AGAAAAGCCTTGACTTGAGGTTAGATTTTTTTTATA TTTTGTTTTGTGTTATTTTTTTCTTTAACATCCCTAAA ATTTTCCTTACATGTTTTACTAGCCAGATTTTCTC CTCTCCTGACTACTCCCAGTCATAGCTGTCCCTCTTC TCTTATGAAGATC
49	ヘルパー;CMV初期 (CAG)エンハンサー; 転写を増強する	TAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGT TCATAGCCCATATATGGAGTTCGCGTTACATAACT TACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACG ACCCCGCCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTT CCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTC AATGGGTGGACTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGG CAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCC CTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGC ATTATGCCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTA CTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATC
50	ヘルパー; ニワトリベータアクチン (CAG)プロモーター; 転写	GCTATTACCATGGGTGAGGTGAGCCCCACGTTCTG CTTCACTCTCCCCATCTCCCCCCCCCTCCCCACCCCCA ATTTTGTATTTATTTATTTTTTAATTATTTTGTGCAGC GATGGGGGCGGGGGGGGGGGGGGCGCGGCCAGG CGGGGCGGGGCGGGGCGAGGGGCGGGGCGGGGCG AGGCGGAGAGGTGCGGCGGCAGCCAATCAGAGCGG CGCGCTCCGAAAGTTTCTTTTATGGCGAGGCGGCG GCGGCGGCGGCCCTATAAAAAGCGAAGCGCGCGGC GGGCG
51	ヘルパー; ニワトリベータアクチン イントロン; 遺伝子発現を増強する	GGAGTCGCTGCGTTGCCTTCGCCCCGTGCCCCGCTC CGCGCCGCTCGCGCCGCCCGCCCCGCTCTGACTG ACCGCGTTACTCCCACAGGTGAGCGGGCGGGACGG CCCTTCTCCTCCGGGCTGTAATTAGCGCTTGGTTAA TGACGGCTCGTTTCTTTTCTGTGGCTGCGTGAAAGC CTTAAAGGGCTCCGGGAGGGCCCTTTGTGCGGGGG

10

20

30

40

50

【表 6 - 1 6】

		GGAGCGGCTCGGGGGGTGCGTGCGTGTGTGTGTGC GTGGGGAGCGCCGCGTGCGGCCCCGCGTGCCCGGC GGCTGTGAGCGCTGCGGGCGCGGCGCGGGGCTTTG TGCGCTCCGCGTGTGCGCGAGGGGAGCGCGGCCGG GGGCGGTGCCCCGCGGTGCGGGGGGGCTGCGAGGG GAACAAAGGCTGCGTGCGGGGTGTGTGCGTGGGGG GGTGAGCAGGGGGTGTGGGCGCGGCGGTGCGGGCTG TAACCCCCCTGCACCCCCCTCCCCGAGTTGCTGA GCACGGCCCCGGCTTCGGGTGCGGGGCTCCGTGCGG GGCGTGGCGCGGGGCTCGCCGTGCCGGGCGGGGGG TGCGGGCAGGTGGGGGTGCCGGGCGGGGCGGGGCC GCCTCGGGCCGGGGAGGGCTCGGGGGAGGGGCGCG GCGGCCCCGGAGCGCCGGCGGCTGTGAGGCGCGG CGAGCCGCAGCCATTGCCTTTTATGGTAATCGTGCG AGAGGGCGCAGGGACTTCCTTTGTCCCAAATCTGGC GGAGCCGAAATCTGGGAGGCGCCGCCGCACCCCCT CTAGCGGGCGCGGGCGAAGCGGTGCGGCGCCGGCA GGAAGGAAATGGGCGGGGAGGGCCTTCGTGCGTCG CCGCGCCCGCGTCCCCTTCTCCATCTCCAGCCTCGG GGCTGCCGCAGGGGACGGCTGCCTTCGGGGGGGA CGGGGCAGGGCGGGGTTCGGCTTCTGGCGTGTGAC CGGCGG
52	ヘルパー; HIV Gag; ウイルスカプシド	ATGGGTGCGAGAGCGTCAGTATTAAGCGGGGGAGA ATTAGATCGATGGGAAAAAATTCGGTTAAGGCCAG GGGGAAAGAAAAAATATAAATTAACATATAGTA TGGGCAAGCAGGGAGCTAGAACGATTTCGAGTTAA TCCTGGCCTGTTAGAAACATCAGAAGGCTGTAGACA AATACTGGGACAGCTACAACCATCCCTTCAGACAG GATCAGAAGAACTTAGATCATTATATAATACAGTAG CAACCCTCTATTGTGTGCATCAAAGGATAGAGATAA AAGACACCAAGGAAGCTTTAGACAAGATAGAGGAA GAGCAAAACAAAAGTAAGAAAAAAGCACAGCAAG

10

20

30

40

50

		CAGCAGCTGACAGACAGAGCAATCAGGTCAGC CAAAATTACCCTATAGTGCAGAACATCCAGGGGCA AATGGTACATCAGGCCATATCACCTAGAACTTTAAA TGCATGGGTAAAAGTAGTAGAAGAGAAGGCTTTCA GCCCAGAAGTGATACCCATGTTTTTCAGCATTATCAG AAGGAGCCACCCCACAAGATTTAAACACCATGCTA AACACAGTGGGGGGACATCAAGCAGCCATGCAAAT GTAAAAAGAGACCATCAATGAGGAAGCTGCAGAAT GGGATAGAGTGCATCCAGTGCATGCAGGGCCTATT GCACCAGGCCAGATGAGAGAACCAAGGGGAAGTGA CATAGCAGGAACTACTAGTACCCTTCAGGAACAAA TAGGATGGATGACACATAATCCACCTATCCAGTAG GAGAAATCTATAAAAGATGGATAATCCTGGGATTA AATAAAATAGTAAGAATGTATAGCCCTACCAGCATT CTGGACATAAGACAAGGACCAAGGAACCCCTTTAG AGACTATGTAGACCGATTCTATAAACTCTAAGAGC CGAGCAAGCTTCACAAGAGGTAAAAAATTGGATGA CAGAAACCTTGTTGGTCCAAAATGCGAACCCAGATT GTAAGACTATTTTAAAAGCATTGGGACCAGGAGCG ACACTAGAAGAAATGATGACAGCATGTCAGGGAGT GGGGGGACCCGGCCATAAAGCAAGAGTTTTGGCTG AAGCAATGAGCCAAGTAACAAATCCAGCTACCATA ATGATACAGAAAGGCAATTTTAGGAACCAAAGAAA GACTGTTAAGTGTTTCAATTGTGGCAAAGAAGGGCA CATAGCCAAAAATTGCAGGGCCCCTAGGAAAAAGG GCTGTTGGAAATGTGGAAAGGAAGGACACCAAATG AAAGATTGTACTGAGAGACAGGCTAATTTTTTAGGG AAGATCTGGCCTTCCCACAAGGGAAGGCCAGGGAA TTTTCTTCAGAGCAGACCAGAGCCAACAGCCCCACC AGAAGAGAGCTTCAGGTTTGGGGAAGAGACAACAA CTCCCTCTCAGAAGCAGGAGCCGATAGACAAGGAA CTGTATCCTTTAGCTTCCCTCAGATCACTCTTTGGCA
--	--	---

40

【表 6 - 18】

		GCGACCCCTCGTCACAATAA
53	ヘルパー; HIV Pol; プロテアーゼおよび 逆転写酵素	ATGAATTTGCCAGGAAGATGGAAACCAAAAATGAT AGGGGGAATTGGAGGTTTTATCAAAGTAGGACAGT ATGATCAGATACTCATAGAAATCTGCGGACATAAA GCTATAGGTACAGTATTAGTAGGACCTACACCTGTC AACATAATTGGAAGAAATCTGTTGACTCAGATTGGC TGCACTTTAAATTTTCCCATTAGTCCTATTGAGACTG TACCAGTAAAATTAAAGCCAGGAATGGATGGCCCA AAAGTTAAACAATGGCCATTGACAGAAGAAAAAAT AAAAGCATTAGTAGAAATTTGTACAGAAATGGAAA AGGAAGGAAAAATTTCAAAAATTGGGCCTGAAAAT CCATACAATACTCCAGTATTTGCCATAAAGAAAAAA GACAGTACTAAATGGAGAAAATTAGTAGATTTTCAG AGAACTTAATAAGAGAACTCAAGATTTCTGGGAAG TTCAATTAGGAATACCACATCCTGCAGGGTTAAAC AGAAAAAATCAGTAACAGTACTGGATGTGGGCGAT GCATATTTTTTCAGTTCCCTTAGATAAAGACTTCAGG AAGTATACTGCATTTACCATACCTAGTATAAACAAT GAGACACCAGGGATTAGATATCAGTACAATGTGCTT CCACAGGGATGGAAAGGATCACCAGCAATATTCCA GTGTAGCATGACAAAAATCTTAGAGCCTTTTAGAAA ACAAAATCCAGACATAGTCATCTATCAATACATGGA TGATTTGTATGTAGGATCTGACTTAGAAATAGGGCA GCATAGAACAAAAATAGAGGAACTGAGACAACATC TGTTGAGGTGGGGATTTACCACACCAGACAAAAAA CATCAGAAAGAACCTCCATTCTTTGGATGGGTTAT GAACTCCATCCTGATAAATGGACAGTACAGCCTATA GTGCTGCCAGAAAAGGACAGCTGGACTGTCAATGA CATACAGAAATTAGTGGGAAAATTGAATTGGGCAA GTCAGATTTATGCAGGGATTAAAGTAAGGCAATTAT GTAAACTTCTTAGGGGAACCAAGCACTAACAGAA GTAGTACCACTAACAGAAGAAGCAGAGCTAGAACT

10

20

30

40

50

【表 6 - 1 9】

		GGCAGAAAACAGGGAGATTCTAAAAGAACCGGTAC ATGGAGTGTATTATGACCCATCAAAGACTTAATAG CAGAAATACAGAAGCAGGGGCAAGGCCAATGGACA TATCAAATTTATCAAGAGCCATTTAAAAATCTGAAA ACAGGAAAATATGCAAGAATGAAGGGTGCCACAC TAATGATGTGAAACAATTAACAGAGGCAGTACAAA AAATAGCCACAGAAAGCATAGTAATATGGGGAAAG ACTCCTAAATTTAAATTACCCATACAAAAGGAAACA TGGGAAGCATGGTGGACAGAGTATTGGCAAGCCAC CTGGATTCTGAGTGGGAGTTTGTCAATACCCCTCC CTTAGTGAAGTTATGGTACCAGTTAGAGAAAGAAC CCATAATAGGAGCAGAACTTTCTATGTAGATGGG GCAGCCAATAGGGAACTAAATTAGGAAAAGCAGG ATATGTAAGTGACAGAGGAAGACAAAAAGTTGTCC CCCTAACGGACACAACAAATCAGAAGACTGAGTTA CAAGCAATTCATCTAGCTTTGCAGGATTCGGGATTA GAAGTAAACATAGTGACAGACTCACAAATATGCATT GGGAATCATTCAAGCACACCAGATAAGAGTGAAT CAGAGTTAGTCAGTCAAATAATAGAGCAGTTAATA AAAAAGGAAAAAGTCTACCTGGCATGGGTACCAGC ACACAAAGGAATTGGAGGAAATGAACAAGTAGATG GGTTGGTCAGTGCTGGAATCAGGAAAGTACTA
54	ヘルパー; HIVインテグラーゼ; ウイルスRNAの組み込み	TTTTTAGATGGAATAGATAAGGCCCAAGAAGAACA TGAGAAATATCACAGTAATTGGAGAGCAATGGCTA GTGATTTTAACCTACCACCTGTAGTAGCAAAAGAAA TAGTAGCCAGCTGTGATAAATGTCAGCTAAAAGGG GAAGCCATGCATGGACAAGTAGACTGTAGCCCAGG AATATGGCAGCTAGATTGTACACATTTAGAAGGAA AAGTTATCTTGGTAGCAGTTCATGTAGCCAGTGGAT ATATAGAAGCAGAAGTAATTCCAGCAGAGACAGGG CAAGAAACAGCATACTTCCTCTTAAAATTAGCAGGA AGATGGCCAGTAAAAACAGTACATACAGACAATGG

10

20

30

40

50

【表 6 - 2 0】

		CAGCAATTTCCAGTACTACAGTTAAGGCCGCCTG TTGGTGGGCGGGGATCAAGCAGGAATTTGGCATTCC CTACAATCCCCAAAGTCAAGGAGTAATAGAATCTAT GAATAAAGAATTAAAGAAAATTATAGGACAGGTAA GAGATCAGGCTGAACATCTTAAGACAGCAGTACAA ATGGCAGTATTCATCCACAATTTTAAAAGAAAAGG GGGGATTGGGGGTACAGTGCAGGGGAAAGAATAG TAGACATAATAGCAACAGACATACAACTAAAGAA TTACAAAAACAAATTACAAAAATTCAAAATTTTCGG GTTTATTACAGGGACAGCAGAGATCCAGTTTGGA AGGACCAGCAAAGCTCCTCTGGAAAGGTGAAGGGG CAGTAGTAATACAAGATAATAGTGACATAAAAGTA GTGCCAAGAAGAAAAGCAAAGATCATCAGGGATTA TGGAACACAGATGGCAGGTGATGATTGTGTGGCAA GTAGACAGGATGAGGATTAA
55	ヘルパー; HIV RRE; Revエレメントに 結合する	AGGAGCTTTGTTCTTGGGTTCTTGGGAGCAGCAGG AAGCACTATGGGCGCAGCGTCAATGACGCTGACGG TACAGGCCAGACAATTATTGTCTGGTATAGTGCAGC AGCAGAACAATTTGCTGAGGGCTATTGAGGCGCAA CAGCATCTGTTGCAACTCACAGTCTGGGGCATCAAG CAGCTCCAGGCAAGAATCCTGGCTGTGGAAAGATA CCTAAAGGATCAACAGCTCCT
56	ヘルパー; ウサギベータグロビン ポリA; RNA安定性	AGATCTTTTTCCCTCTGCCAAAAATTATGGGGACAT CATGAAGCCCCTTGAGCATCTGACTTCTGGCTAATA AAGGAAATTTATTTTCATTGCAATAGTGTGTTGGAA TTTTTTGTGTCTCTCACTCGGAAGGACATATGGGAG GGCAAATCATTTAAACATCAGAATGAGTATTTGGT TTAGAGTTTGGCAACATATGCCATATGCTGGCTGCC ATGAACAAAGGTGGCTATAAAGAGGTCATCAGTAT ATGAAACAGCCCCCTGCTGTCCATTCCCTTATTCCAT AGAAAAGCCTTGACTTGAGGTTAGATTTTTTTTATA TTTTGTTTTGTGTTATTTTTTTCTTTAACATCCCTAAA

10

20

30

40

50

【表 6 - 2 1】

		ATTTTCCTTACATGTTTTACTAGCCAGATTTTTCCTC CTCTCCTGACTACTCCCAGTCATAGCTGTCCCTCTTC TCTTATGAAGATC
57	Rev; RSVプロモーター; 転写	ATGGCAGGAAGAAGCGGAGACAGCGACGAAGAAC TCCTCAAGGCAGTCAGACTCATCAAGTTTCTCTATC AAAGCAACCCACCTCCCAATCCCGAGGGGACCCGA CAGGCCCCGAAGGAATAGAAGAAGAAGGTGGAGAG AGAGACAGAGACAGATCCATTTCGATTAGTGAACGG ATCCTTAGCACTTATCTGGGACGATCTGCGGAGCCT GTGCCTCTTCAGCTACCACCGCTTGAGAGACTTACT CTTGATTGTAACGAGGATTGTGGAACCTTCTGGGACG CAGGGGGTGGGAAGCCCTCAAATATTGGTGAATC TCCTACAATATTGGAGTCAGGAGCTAAAGAATAG
58	Rev; HIV Rev; 核外輸送および ウイルスmRNAを 安定化する	ATGGCAGGAAGAAGCGGAGACAGCGACGAAGAAC TCCTCAAGGCAGTCAGACTCATCAAGTTTCTCTATC AAAGCAACCCACCTCCCAATCCCGAGGGGACCCGA CAGGCCCCGAAGGAATAGAAGAAGAAGGTGGAGAG AGAGACAGAGACAGATCCATTTCGATTAGTGAACGG ATCCTTAGCACTTATCTGGGACGATCTGCGGAGCCT GTGCCTCTTCAGCTACCACCGCTTGAGAGACTTACT CTTGATTGTAACGAGGATTGTGGAACCTTCTGGGACG CAGGGGGTGGGAAGCCCTCAAATATTGGTGAATC TCCTACAATATTGGAGTCAGGAGCTAAAGAATAG
59	Rev; ウサギベータグロビン ポリA; RNA安定性	AGATCTTTTTCCCTCTGCCAAAAATTATGGGGACAT CATGAAGCCCCCTTGAGCATCTGACTTCTGGCTAATA AAGGAAATTTATTTTCATTGCAATAGTGTGTTGGAA TTTTTTGTGTCTCTCACTCGGAAGGACATATGGGAG GGCAAATCATTAAAAACATCAGAATGAGTATTTGGT TTAGAGTTTGGCAACATATGCCCATATGCTGGCTGC CATGAACAAAGGTTGGCTATAAAGAGGTCATCAGT ATATGAAACAGCCCCCTGCTGTCCATTCCTTATTC ATAGAAAAGCCTTGACTTGAGGTTAGATTTTTTTTA

10

20

30

40

50

【表 6 - 2 2】

		TATTTTGTGTTTGTGTTATTTTTTCTTTAACATCCCTA AAATTTTCCTTACATGTTTTACTAGCCAGATTTTTCC TCCTCTCCTGACTACTCCCAGTCATAGCTGTCCCTCT TCTCTTATGGAGATC
60	エンベロープ; CMVプロモーター; 転写	ACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATCAAT TACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTT CCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGG CTGACCGCCCAACGACCCCGCCCATTGACGTCAAT AATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGAC TTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTA AACTGCCCCTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATAT GCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAA ATGGCCCGCCTGGCATTATGCCCAGTACATGACCTT ATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATT AGTCATCGCTATTACCATGGTGATGCGGTTTTGGCA GTACATCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTGACTCACG GGGATTTCCAAGTCTCCACCCCATGACGTCAATGG GAGTTTGTTTTGGCACCAAAATCAACGGGACTTTCC AAAATGTCGTAACAACCTCCGCCCCATTGACGCAAT GGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAA GC
61	エンベロープ; ベータグロビンイントロン; 遺伝子発現を増強する	GTGAGTTTGGGGACCCCTTGATTGTTCTTTCTTTTTTCG CTATTGTAAAATTCATGTTATATGGAGGGGGCAAAG TTTTCAGGGTGTTGTTTAGAATGGGAAGATGTCCCT TGTATCACCATGGACCCTCATGATAATTTTGTTCCTT TCACTTCTACTCTGTTGACAACCATTGTCTCCTCTT ATTTTCTTTTCATTTTCTGTAACTTTTTCGTAAACTT TAGCTTGCATTTGTAAACGAATTTTAAATTCACTTTT GTTTATTTGTCAGATTGTAAGTACTTTCTCTAATCAC TTTTTTTTCAAGGCAATCAGGGTATATTATATTGTAC TTCAGCACAGTTTTAGAGAACAATTGTTATAATTAA ATGATAAGGTAGAATATTTCTGCATATAAATTCTGG

10

20

30

40

50

【表 6 - 2 3】

		CTGGCGTGGAATATTCTTATTGGTAGAAACAACACTA CACCCCTGGTCATCATCCTGCCTTTCTCTTTATGGTTA CAATGATATACACTGTTTGAGATGAGGATAAAATAC TCTGAGTCCAAACCGGGCCCCCTCTGCTAACCATGTT CATGCCTTCTTCTCTTTCCTACAG
62	エンベロープ: VSV-G; 糖タンパク質 エンベロープ-細胞進入	ATGAAGTGCCTTTTGTACTTAGCCTTTTATTCATTG GGGTGAATTGCAAGTTCACCATAGTTTTCCACACA ACCAAAAAGGAAACTGGAAAAATGTTCTTCTAATT ACCATTATTGCCCCGTCAAGCTCAGATTTAAATTGGC ATAATGACTTAATAGGCACAGCCTTACAAGTCAAA ATGCCCAAGAGTCACAAGGCTATTCAAGCAGACGG TTGGATGTGTCATGCTTCCAAATGGGTCACTACTTG TGATTTCCGCTGGTATGGACCGAAGTATATAACACA TTCCATCCGATCCTTCACTCCATCTGTAGAACAAATG CAAGGAAAGCATTGAACAAACGAAACAAGGAACTT GGCTGAATCCAGGCTTCCCTCCTCAAAGTTGTGGAT ATGCAACTGTGACGGATGCCGAAGCAGTGATTGTCC AGGTGACTCCTCACCATGTGCTGGTTGATGAATACA CAGGAGAATGGGTTGATTACAGTTCATCAACGGA AAATGCAGCAATTACATATGCCCCACTGTCCATAAC TCTACAACCTGGCATTCTGACTATAAGGTCAAAGGG CTATGTGATTCTAACCTCATTTCATGGACATCACCT TCTTCTCAGAGGACGGAGAGCTATCATCCCTGGGAA AGGAGGGCACAGGGTTCAGAAGTAACTACTTTGCTT ATGAAACTGGAGGCAAGGCCTGCAAAATGCAATAC TGCAAGCATTGGGGAGTCAGACTCCCATCAGGTGTC TGGTTCGAGATGGCTGATAAGGATCTCTTTGCTGCA GCCAGATTCCCTGAATGCCCAGAAGGGTCAAGTATC TCTGCTCCATCTCAGACCTCAGTGGATGTAAGTCTA ATTCAGGACGTTGAGAGGATCTTGGATTATCCCTC TGCCAAGAAACCTGGAGCAAAATCAGAGCGGGTCT TCCAATCTCTCCAGTGGATCTCAGCTATCTTGCTCCT

10

20

30

40

50

【表 6 - 2 4】

		AAAAACCCAGGAACCGGTCCTGCTTTCACCATAATC AATGGTACCCTAAAATACTTTGAGACCAGATACATC AGAGTCGATATTGCTGCTCCAATCCTCTCAAGAATG GTCGGAATGATCAGTGGAACCTACCACAGAAAGGGA ACTGTGGGATGACTGGGCACCATATGAAGACGTGG AAATTGGACCCAATGGAGTTCTGAGGACCAGTTCA GGATATAAGTTTCCTTTATACATGATTGGACATGGT ATGTTGGACTCCGATCTTCATCTTAGCTCAAAGGCT CAGGTGTTCGAACATCCTCACATTCAAGACGCTGCT TCGCAACTTCCTGATGATGAGAGTTTATTTTTTGGTG ATACTGGGCTATCCAAAAATCCAATCGAGCTTGTAG AAGGTTGGTTCAGTAGTTGGAAAAGCTCTATTGCCT CTTTTTCTTTATCATAGGGTTAATCATTGGACTATT CTTGGTTCTCCGAGTTGGTATCCATCTTTGCATTAAA TTAAAGCACACCAAGAAAAGACAGATTTATACAGA CATAGAGATGA	10
63	エンベロープ; ウサギベータグロビン ポリA; RNA安定性	AGATCTTTTTCCCTCTGCCAAAAATTATGGGGACAT CATGAAGCCCCTTGAGCATCTGACTTCTGGCTAATA AAGGAAATTTATTTTCATTGCAATAGTGTGTTGGAA TTTTTTGTGTCTCTCACTCGGAAGGACATATGGGAG GGCAAATCATTTAAACATCAGAATGAGTATTTGGT TTAGAGTTTGGCAACATATGCCCATATGCTGGCTGC CATGAACAAAGGTTGGCTATAAAGAGGTCATCAGT ATATGAAACAGCCCCCTGCTGTCCATTCTTATTCC ATAGAAAAGCCTTGACTTGAGGTTAGATTTTTTTTA TATTTTGTGTTGTGTTATTTTTTCTTTAACATCCCTA AAATTTTCCTTACATGTTTTACTAGCCAGATTTTCC TCCTCTCCTGACTACTCCAGTCATAGCTGTCCCTCT TCTCTTATGGAGATC	30
64	プロモーター ; EF-1	CCGGTGCCTAGAGAAGGTGGCGCGGGGTAAACTGG GAAAGTGATGTCGTGTACTGGCTCCGCCTTTTTCCC GAGGGTGGGGGAGAACCGTATATAAGTGCAGTAGT	40

10

20

30

40

50

【表 6 - 2 5】

		CGCCGTGAACGTTCTTTTTTCGCAACGGGTTTGCCGC CAGAACACAGGTAAGTGCCGTGTGTGGTCCCCGCG GGCCTGGCCTCTTTACGGGTTATGGCCCTTGCGTGC CTTGAATTACTTCCACGCCCCCTGGCTGCAGTACGTG ATTCTTGATCCCGAGCTTCGGGTTGGAAGTGGGTGG GAGAGTTCGAGGCCTTGCGCTTAAGGAGCCCCCTTCG CCTCGTGCTTGAGTTGAGGCCTGGCCTGGGCGCTGG GGCCGCCGCGTGCGAATCTGGTGGCACCTTCGCGCC TGTCTCGCTGCTTTCGATAAGTCTCTAGCCATTTAAA ATTTTTGATGACCTGCTGCGACGCTTTTTTCTGGCA AGATAGTCTTGTAATGCGGGCCAAGATCTGCACAC TGGTATTTTCGGTTTTTGGGGCCGCGGGCGGCGACGG GGCCCGTGCCTCCAGCGCACATGTTCCGCGAGGC GGGGCCTGCGAGCGCGGCCACCGAGAATCGGACGG GGGTAGTCTCAAGCTGGCCGGCCTGCTCTGGTGCCT GGCCTCGCGCCGCGGTGTATCGCCCCGCCCTGGGCG GCAAGGCTGGCCCGGTCGGCACCAAGTTGCGTGAGC GGAAAGATGGCCGCTTCCCGGCCCTGCTGCAGGGA GCTCAAAATGGAGGACGCGGCGCTCGGGAGAGCGG GCGGGTGAGTCAACCCACACAAAGGAAAAGGGCCTT TCCGTCCTCAGCCGTCGCTTCATGTGACTCCACGGA GTACCGGGCGCCGTCAGGCACCTCGATTAGTTCTC GAGCTTTTGGAGTACGTCGCTTTAGGTTGGGGGGA GGGGTTTTATGCGATGGAGTTTCCCCACACTGAGTG GGTGGAGACTGAAGTTAGGCCAGCTTGGCACTTGAT GTAATTCTCCTTGGAATTTGCCCTTTTTGAGTTTGGA TCTTGGTTCATTCTCAAGCCTCAGACAGTGGTTCAA AGTTTTTTTCTTCCATTTCAGGTGTCGTGA	10
65	プロモーター ; PGK	GGGGTTGGGGTTGCGCCTTTTCCAAGGCAGCCCTGG GTTTGCGCAGGGACGCGGCTGCTCTGGGCGTGGTTC CGGGAAACGCAGCGGCGCCGACCCTGGGTCTCGCA CATTCTTCACGTCCGTTTCGACGCTCACCCGGATCT	20
			30
			40

10

20

30

40

50

【表 6 - 2 6】

		TCGCCGCTACCCTTGTGGGCCCCCGGCGACGCTTC CTGCTCCGCCCCCTAAGTCGGGAAGGTTCTTGCGGT TCGCGGCGTGCCGGACGTGACAAACGGAAGCCGCA CGTCTCACTAGTACCCTCGCAGACGGACAGCGCCAG GGAGCAATGGCAGCGCGCCGACCGCGATGGGCTGT GGCCAATAGCGGCTGCTCAGCAGGGCGCGCCGAGA GCAGCGGCCGGGAAGGGGCGGTGCGGGAGGCGGG GTGTGGGGCGGTAGTGTGGGCCCTGTTCTTGCCCGC GCGGTGTTCCGCATTCTGCAAGCCTCCGGAGCGCAC GTCGGCAGTCGGCTCCCTCGTTGACCGAATCACCGA CCTCTCTCCCCAG	10
66	プロモーター ; UbiC	GCGCCGGGTTTTGGCGCCTCCCGCGGGCGCCCCCT CCTCACGGCGAGCGCTGCCACGTCAGACGAAGGGC GCAGGAGCGTTCCTGATCCTTCCGCCCCGACGCTCA GGACAGCGGCCCGCTGCTCATAAGACTCGGCCTTAG AACCCCAAGTATCAGCAGAAGGACATTTTAGGACGG GACTTGGGTGACTCTAGGGCACTGGTTTTCTTTCCA GAGAGCGGAACAGGCGAGGAAAAGTAGTCCCTTCT CGGCGATTCTGCGGAGGGATCTCCGTGGGGCGGTG AACGCCGATGATTATATAAGGACGCGCCGGGTGTG GCACAGCTAGTTCCGTCGCAGCCGGGATTGTTGGGTG CGGTTCTTGTTTGTTGGATCGCTGTGATCGTCACTTGG TGAGTTGCGGGCTGCTGGGCTGGCCGGGGCTTTCGT GGCCGCCGGGCGCTCGGTGGGACGGAAGCGTGTG GAGAGACCGCCAAGGGCTGTAGTCTGGGTCCGCGA GCAAGGTTGCCCTGAACTGGGGGTTGGGGGGAGCG CACAAAATGGCGGCTGTTCCCGAGTCTTGAATGGAA GACGCTTGTAAGGCGGGCTGTGAGGTCGTTGAAAC AAGGTGGGGGGCATGGTGGGCGGCAAGAACCCAAG GTCTTGAGGCCCTTCGCTAATGCGGGAAGCTCTTAT TCGGGTGAGATGGGCTGGGGCACCATCTGGGGACC CTGACGTGAAGTTTGTCAGTACTGGAGAACTCGGG	20 30 40

10

20

30

40

50

【表 6 - 2 7】

		TTTGTCGTCTGGTTGCGGGGGCGGCAGTTATGCGGT GCCGTTGGGCAGTGCACCCGTACCTTTGGGAGCGCG CGCCTCGTCGTGTCGTGACGTCACCCGTTCTGTTGG CTTATAATGCAGGGTGGGGCCACCTGCCGGTAGGTG TGCGGTAGGCTTTTCTCCGTCGCAGGACGCAGGGTT CGGGCCTAGGGTAGGCTCTCCTGAATCGACAGGCG CCGGACCTCTGGTGAGGGGAGGGATAAGTGAGGCG TCAGTTTCTTTGGTCGGTTTTATGTACCTATCTTCTT AAGTAGCTGAAGCTCCGGTTTTGAACTATGCGCTCG GGGTGGCGAGTGTGTTTTGTGAAGTTTTTAGGCA CCTTTTGAAATGTAATCATTTGGGTCAATATGTAAT TTTCAGTGTTAGACTAGTAAA	10
67	ポリ A; SV40	GTTTATTGCAGCTTATAATGGTTACAAATAAAGCAA TAGCATCACAAATTTACAAATAAAGCATTTTTTTC ACTGCATTCTAGTTGTGGTTTGTCCAACTCATCAA TGTATCTTATCA	20
68	ポリ A; bGH	GACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGC CCCTCCCCCGTGCCTTCCTTGACCCTGGAAGGTGCC ACTCCCCTGTCTTTCCTAATAAAATGAGGAAATT GCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTG GGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGG ATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCG GTGGGCTCTATGG	30
69	HIV Gag; Bal	ATGGGTGCGAGAGCGTCAGTATTAAGCGGGGGAGA ATTAGATAGGTGGGAAAAAATTCGGTTAAGGCCAG GGGGAAAGAAAAAATATAGATTAACATATAGTA TGGGCAAGCAGGGAAGTAGAAAGATTGCGAGTCAA TCCTGGCCTGTTAGAAACATCAGAAGGCTGCAGAC AAATACTGGGACAGCTACAACCATCCCTTCAGACA GGATCAGAAGAAGTTAGATCATTATATAATACAGTA GCAACCCTCTATTGTGTACATCAAAAGATAGAGGTA AAAGACACCAAGGAAGCTTTAGACAAAATAGAGGA	40

10

20

30

40

50

【表 6 - 2 8】

	AGAGCAAAACAAATGTAAGAAAAAGGCACAGCAA GCAGCAGCTGACACAGGAAACAGCGGTCAGGTCAG CCAAAATTTCCCTATAGTGCAGAACCTCCAGGGGCA AATGGTACATCAGGCCATATCACCTAGAACTTTAAA TGCATGGGTAAAAGTAATAGAAGAGAAAGCTTTCA GCCCAGAAGTAATACCCATGTTTTTCAGCATTATCAG AAGGAGCCACCCCAAGATTTAAACACCATGCTA AACACAGTGGGGGGACATCAAGCAGCCATGCAAAT GTAAAAGAACCCATCAATGAGGAAGCTGCAAGAT GGGATAGATTGCATCCCGTGCAGGCAGGGCCTGTTG CACCAGGCCAGATAAGAGATCCAAGGGGAAGTGAC ATAGCAGGAACTACCAGTACCCTTCAGGAACAAAT AGGATGGATGACAAGTAATCCACCTATCCCAGTAG GAGAAATCTATAAAAGATGGATAATCCTGGGATTA AATAAAATAGTAAGGATGTATAGCCCTACCAGCATT TTGGACATAAGACAAGGACCAAGGAACCCCTTAG AGACTATGTAGACCGGTTCTATAAACTCTAAGAGC CGAGCAAGCTTCACAGGAGGTAAAAAATTGGATGA CAGAAACCTTGTTGGTCCAAAATGCGAACCCAGATT GTAAGACTATTTTAAAAGCATTGGGACCAGCAGCTA CACTAGAAGAAATGATGACAGCATGTCAGGGAGTG GGAGGACCCAGCCATAAAGCAAGAATTTTGGCAGA AGCAATGAGCCAAGTAACAAATTCAGCTACCATAA TGATGCAGAAAGGCAATTTTAGGAACCAAGAAAG ATTGTTAAATGTTTCAATTGTGGCAAAGAAGGGCAC ATAGCCAGAACTGCAGGGCCCCTAGGAAAAGGGG CTGTTGGAAATGTGGAAAGGAAGGACACCAAATGA AAGACTGTACTGAGAGACAGGCTAATTTTTTAGGGA AAATCTGGCCTTCCCACAAAGGAAGGCCAGGGAAT TTCTTCAGAGCAGACCAGAGCCAACAGCCCCACC AGCCCCACCAGAAGAGAGCTTCAGGTTTGGGGAAG AGACAACAACCTCCCTCTCAGAAGCAGGAGCTGATA
--	---

10

20

30

40

50

【表 6 - 2 9】

		GACAAGGAACTGTATCCTTTAGCTTCCCTCAGATCA CTCTTTGGCAACGACCCCTCGTCACAATAA
70	HIV Pol; Bal	ATGAATTTGCCAGGAAGATGGAAACCAAAAATGAT AGGGGGAATTGGAGGTTTTATCAAAGTAAGACAGT ATGATCAGATACTCATAGAAATCTGTGGACATAAA GCTATAGGTACAGTATTAATAGGACCTACACCTGTC AACATAATTGGAAGAAATCTGTTGACTCAGATTGGT TGCACTTTAAATTTTCCCATTAGTCCTATTGAAACTG TACCAGTAAAATTAACCAGGAATGGATGGCCCA AAAGTTAAACAATGGCCACTGACAGAAGAAAAAAT AAAAGCATTAAATGGAAATCTGTACAGAAATGGAAA AGGAAGGGAAAATTTCAAAAATTGGGCCTGAAAAT CCATACAATACTCCAGTATTTGCCATAAAGAAAAAA GACAGTACTAAATGGAGAAAATTAGTAGATTTTCTAG AGAACTTAATAAGAAAATCAAGACTTCTGGGAAG TACAATTAGGAATACACATCCCGCAGGGGTAAAA AAGAAAAAATCAGTAACAGTACTGGATGTGGGTGA TGCATATTTTTCAGTTCCCTTAGATAAAGAATTCAG GAAGTATACTGCATTTACCATACCTAGTATAAACAA TGAAACACCAGGGATCAGATATCAGTACAATGTAC TTCCACAGGGATGGAAAGGATCACCAGCAATATTTT AAAGTAGCATGACAAGAATCTTAGAGCCTTTTGA AAACAAAATCCAGAAATAGTGATCTATCAATACAT GGATGATTTGTATGTAGGATCTGACTTAGAAATAGG GCAGCATAGAACAAAAATAGAGGAACTGAGACAAC ATCTGTTGAGGTGGGGATTTACCACACCAGACAAA AAACATCAGAAAGAACCTCCATTCTTTGGATGGGT TATGAACTCCATCCTGATAAATGGACAGTACAGCCT ATAGTGCTGCCAGAAAAAGACAGCTGGACTGTCAA TGACATACAGAAGTTAGTGGGAAAATTGAATTGGG CAAGTCAGATTTACCCAGGAATTAAAGTAAAGCAA TTATGTAGGCTCCTTAGGGGAACCAAGGCATTAACA

10

20

30

40

50

【表 6 - 3 0】

		GAAGTAATACCACTAACAAAAGAAACAGAGCTAGA ACTGGCAGAGAACAGGGAAATTCTAAAAGAACCAG TACATGGGGTGTATTATGACCCATCAAAAGACTTAA TAGCAGAAATACAGAAGCAGGGGCAAGGCCAATGG ACATATCAAATTTATCAAGAGCCATTTAAAAATCTG AAAACAGGAAAATATGCAAGAATGAGGGGTGCCCA CACTAATGATGTAAAACAATTAACAGAGGCAGTGC AAAAAATAACCACAGAAAGCATAGTAATATGGGGA AAGACTCCTAAATTTAAACTACCCATACAAAAAGA AACATGGGAAACATGGTGGACAGAGTATTGGCAAG CCACCTGGATTCCTGAGTGGGAGTTTGTCAATACCC CTCCCTTAGTGAAATTATGGTACCAGTTAGAGAAAG AACCCATAATAGGAGCAGAAACATTCTATGTAGAT GGAGCAGCTAACCGGGAGACTAAATTAGGAAAAGC AGGATATGTTACTAACAGAGGAAGACAAAAAGTTG TCTCCCTAACTGACACAACAAATCAGAAGACTGAGT TACAAGCAATTCATCTAGCTTTACAAGATTCAGGAT TAGAAGTAAACATAGTAACAGACTCACAATATGCA TTAGGAATCATTCAAGCACAACCAGATAAAAGTGA ATCAGAGTTAGTCAGTCAAATAATAGAACAGTTAAT AAAAAAGGAAAAGGTCTACCTGGCATGGGTACCAG CGCACAAAGGAATTGGAGGAAATGAACAAGTAGAT AAATTAGTCAGTACTGGAATCAGGAAAGTACTA	10
71	HIV インテグラーゼ; Bal	TTTTTAGATGGAATAGATATAGCCCAAGAAGAACAT GAGAAATATCACAGTAATTGGAGAGCAATGGCTAG TGATTTTAACCTGCCACCTGTGGTAGCAAAAGAAAT AGTAGCCAGCTGTGATAAATGTCAGCTAAAAGGAG AAGCCATGCATGGACAAGTAGACTGTAGTCCAGGA ATATGGCAACTAGATTGTACACATTTAGAAGGAAA AATTATCCTGGTAGCAGTTCATGTAGCCAGTGGATA TATAGAAGCAGAAGTTATTCCAGCAGAGACAGGGC AGGAAACAGCATACTTTCTCTTAAAATTAGCAGGAA	30
			40

【表 6 - 3 1】

		GATGGCCAGTAAAAACAATACATACAGACAATGGC AGCAATTTCACTAGTACTACAGTCAAGGCCGCCTGT TGGTGGGCGGGGATCAAGCAGGAATTTGGCATTCC CTACAATCCCCAAAGTCAGGGAGTAGTAGAATCTAT AAATAAAGAATTAAAGAAAATTATAGGACAGGTAA GAGATCAGGCTGAACATCTTAAAACAGCAGTACAA ATGGCAGTATTCATCCACAATTTTAAAAGAAAAGG GGGGATTGGGGGGTATAGTGCAGGGGAAAGAATAG TAGACATAATAGCAACAGACATACAACTAAAGAA TTACAAAAACAATTACAAAAATTCAAAATTTTCGG GTTTATTACAGGGACAGCAGAGATCCACTTTGGA GGACCAGCAAAGCTTCTCTGGAAAGGTGAAGGGGC AGTAGTAATACAAGATAATAGTGACATAAAAGTAG TACCAAGAAGAAAAGCAAAGATCATTAGGGATTAT GGAAAACAGATGGCAGGTGATGATTGTGTGGCAAG TAGACAGGATGAGGATTAG
72	エンベロープ; RD114	ATGAAACTCCCAACAGGAATGGTCATTTTATGTAGC CTAATAATAGTTCGGGCAGGGTTTGACGACCCCCGC AAGGCTATCGCATTAGTACAAAAACAACATGGTAA ACCATGCGAATGCAGCGGAGGGCAGGTATCCGAGG CCCCACCGAACTCCATCCAACAGGTAACCTTGCCAG GCAAGACGGCCTACTTAATGACCAACCAAAAATGG AAATGCAGAGTCACTCCAAAAAATCTCACCCCTAGC GGGGGAGAACTCCAGAACTGCCCCTGTAACACTTTC CAGGACTCGATGCACAGTTCTTGTTATACTGAATAC CGGCAATGCAGGGCGAATAATAAGACATACTACAC GGCCACCTTGCTTAAAATACGGTCTGGGAGCCTCAA CGAGGTACAGATATTACAAAACCCCAATCAGCTCCT ACAGTCCCCTTGTAGGGGCTCTATAAATCAGCCCGT TTGCTGGAGTGCCACAGCCCCCATCCATATCTCCGA TGGTGGAGGACCCCTCGATACTAAGAGAGTGTGGA CAGTCCAAAAAAGGCTAGAACAAATTCATAAGGCT

10

20

30

40

50

【表 6 - 3 2】

	ATGCATCCTGAACTTCAATACCACCCCTTAGCCCTG CCCAAAGTCAGAGATGACCTTAGCCTTGATGCACGG ACTTTTGATATCCTGAATACCACTTTTAGGTTACTCC AGATGTCCAATTTTAGCCTTGCCCAAGATTGTTGGC TCTGTTTAAACTAGGTACCCCTACCCCTCTTGCGA TACCCACTCCCTCTTTAACCTACTCCCTAGCAGACTC CCTAGCGAATGCCTCCTGTCAGATTATACCTCCCCT CTTGGTTCAACCGATGCAGTTCTCCAACCTCGTCCTG TTTATCTTCCCCTTTCATTAACGATACGGAACAAAT AGACTTAGGTGCAGTCACCTTTACTAACTGCACCTC TGTAGCCAATGTCAGTAGTCCTTTATGTGCCCTAAA CGGGTCAGTCTTCCTCTGTGGAAATAACATGGCATA CACCTATTTACCCCAAACTGGACAGGACTTTGCGT CCAAGCCTCCCTCCTCCCCGACATTGACATCATCCC GGGGGATGAGCCAGTCCCCATTCTGCCATTGATCA TTATATACATAGACCTAAACGAGCTGTACAGTTCAT CCCTTTACTAGCTGGACTGGGAATCACCGCAGCATT CACCACCGGAGCTACAGGCCTAGGTGTCTCCGTCAC CCAGTATACAAAATTATCCCATCAGTTAATATCTGA TGTCCAAGTCTTATCCGGTACCATAACAAGATTTACA AGACCAGGTAGACTCGTTAGCTGAAGTAGTTCTCCA AAATAGGAGGGGACTGGACCTACTAACGGCAGAAC AAGGAGGAATTTGTTTAGCCTTACAAGAAAAATGCT GTTTTTATGCTAACAAGTCAGGAATTGTGAGAAACA AAATAAGAACCCTACAAGAAGAATTACAAAAACGC AGGGAAAGCCTGGCATCCAACCCTCTCTGGACCGG GCTGCAGGGCTTTCTTCCGTACCTCCTACCTCTCCTG GGACCCCTACTCACCCCTCCTACTCATACTAACCATT GGGCCATGCGTTTTCAATCGATTGGTCCAATTTGTT AAAGACAGGATCTCAGTGGTCCAGGCTCTGGTTTTG ACTCAGCAATATCACCAGCTAAAACCCATAGAGTA CGAGCCATGA
--	---

10

20

30

40

50

【表 6 - 3 3】

73	エンベロープ; GALV	ATGCTTCTCACCTCAAGCCCGCACACCTTCGGGCAC CAGATGAGTCCTGGGAGCTGGAAAAGACTGATCAT CCTCTTAAGCTGCGTATTCGGAGACGGCAAAACGA GTCTGCAGAATAAGAACCCCCACCAGCCTGTGACCC TCACCTGGCAGGTAAGTGTCCCAAAGTGGGGACGTTG TCTGGGACAAAAAGGCAGTCCAGCCCCCTTTGGACTT GGTGGCCCTCTCTTACACCTGATGTATGTGCCCTGG CGGCCGGTCTTGAGTCCTGGGATATCCCGGGATCCG ATGTATCGTCCTCTAAAAGAGTTAGACCTCCTGATT CAGACTATACTGCCGCTTATAAGCAAATCACCTGGG GAGCCATAGGGTGCAGCTACCCTCGGGCTAGGACC AGGATGGCAAATTCCCCCTTCTACGTGTGTCCCCGA GCTGGCCGAACCCATTGAGAAGCTAGGAGGTGTGG GGGGCTAGAATCCCTATACTGTAAAGAATGGAGTT GTGAGACCACGGGTACCGTTTATTGGCAACCCAAGT CCTCATGGGACCTCATAACTGTAAAATGGGACCAA AATGTGAAATGGGAGCAAAAATTTCAAAAGTGTGA ACAAACCGGCTGGTGTAAACCCCTCAAGATAGACTT CACAGAAAAAGGAAAACCTCTCCAGAGATTGGATAA CGGAAAAAACCTGGGAATTAAGGTTCTATGTATATG GACACCCAGGCATACAGTTGACTATCCGCTTAGAGG TCACTAACATGCCGTTGTGGCAGTGGGCCAGACC CTGTCCCTTGCAGAACAGGGACCTCCTAGCAAGCCCC TCACTCTCCCTCTCTCCCCACGGAAAGCGCCGCCCA CCCCCTTACCCCCGGCGGCTAGTGAGCAAACCCCTG CGGTGCATGGAGAACTGTTACCCTAACTCTCCGC CTCCCACAGTGGCGACCGACTCTTTGGCCTTGTGC AGGGGGCCTTCCTAACCTTGAATGCTACCAACCCAG GGGCCACTAAGTCTTGCTGGCTCTGTTTGGGCATGA GCCCCCTTATTATGAAGGGATAGCCTCTTCAGGAG AGGTCGCTTATACCTCCAACCATAACCCGATGCCACT GGGGGGCCCAAGGAAAGCTTACCCTCACTGAGGTC
----	-----------------	--

10

20

30

40

50

【表 6 - 3 4】

		TCCGGACTCGGGTCATGCATAGGGAAGGTGCCTCTT ACCCATCAACATCTTTGCAACCAGACCTTACCCATC AATTCCTCTAAAAACCATCAGTATCTGCTCCCCCTCA AACCATAGCTGGTGGGCCTGCAGCACTGGCCTCACC CCCTGCCTCTCCACCTCAGTTTTTAATCAGTCTAAAG ACTTCTGTGTCCAGGTCCAGCTGATCCCCCGCATCT ATTACCATTCTGAAGAAACCTTGTTACAAGCCTATG ACAAATCACCCCCCAGGTTTAAAAGAGAGCCTGCCT CACTTACCCTAGCTGTCTTCCTGGGGTTAGGGATTG CGGCAGGTATAGGTACTGGCTCAACCGCCCTAATTA AAGGGCCCATAGACCTCCAGCAAGGCCTAACCAGC CTCCAAATCGCCATTGACGCTGACCTCCGGGCCCTT CAGGACTCAATCAGCAAGCTAGAGGACTCACTGAC TTCCCTATCTGAGGTAGTACTCCAAAATAGGAGAGG CCTTGACTTACTATTCTTAAAGAAGGAGGCCCTCTG CGCGGCCCTAAAAGAAGAGTGCTGTTTTTATGTAGA CCACTCAGGTGCAGTACGAGACTCCATGAAAAAAC TTAAAGAAAGACTAGATAAAAGACAGTTAGAGCGC CAGAAAAACCAAACTGGTATGAAGGGTGGTTCAA TAACTCCCCTTGTTTTACTACCCTACTATCAACCATC GCTGGGCCCTATTGCTCCTCCTTTTGTTACTCACTC TTGGGCCCTGCATCATCAATAAATTAATCCAATTCA TCAATGATAGGATAAGTGCAGTCAAAATTTTAGTCC TTAGACAGAAATATCAGACCCTAGATAACGAGGAA AACCTTTAA	10
74	エンペローフ ; FUG	ATGGTTCCGCAGGTTCTTTTGTGTGTTACTCCTTCTGG GTTTTTCGTTGTGTTTCGGGAAGTTCCCCATTTACAC GATACCAGACGAACCTGGTCCCTGGAGCCCTATTGA CATACACCATCTCAGCTGTCCAAATAACCTGGTTGT GGAGGATGAAGGATGTACCAACCTGTCCGAGTTCTC CTACATGGAAC TCAAAGTGGGATACATCTCAGCCAT CAAAGTGAACGGGTTCACTTGCACAGGTGTTGTGAC	20
			30
			40

10

20

30

40

50

【表 6 - 3 5】

	AGAGGCAGAGACCTACACCAACTTTGTTGGTTATGT CACAACCACATTCAAGAGAAAGCATTTCGCCCCAC CCCAGACGCATGTAGAGCCGCGTATAACTGGAAGA TGGCCGGTGACCCCAGATATGAAGAGTCCCTACAC AATCCATACCCCGACTACCACTGGCTTCGAACTGTA AGAACCACCAAAGAGTCCCTCATTATCATATCCCCA AGTGTGACAGATTTGGACCCATATGACAAATCCCTT CACTCAAGGGTCTTCCCTGGCGGAAAGTGCTCAGGA ATAACGGTGTCTCTACCTACTGCTCAACTAACCAT GATTACACCATTTGGATGCCCCGAGAATCCGAGACCA AGGACACCTTGTGACATTTTTACCAATAGCAGAGGG AAGAGAGCATCCAACGGGAACAAGACTTGCGGCTT TGTGGATGAAAGAGGCCTGTATAAGTCTCTAAAAG GAGCATGCAGGCTCAAGTTATGTGGAGTTCTTGGAC TTAGACTTATGGATGGAACATGGGTGCGGATGCAA ACATCAGATGAGACCAAATGGTGCCCTCCAGATCA GTTGGTGAATTTGCACGACTTTCGCTCAGACGAGAT CGAGCATCTCGTTGTGGAGGAGTTAGTTAAGAAAA GAGAGGAATGTCTGGATGCATTAGAGTCCATCATG ACCACCAAGTCAGTAAGTTTCAGACGTCTCAGTCAC CTGAGAAAACCTTGTCCTCAGGGTTTGGAAAAGCATAT ACCATATTCAACAAAACCTTGATGGAGGCTGATGCT CACTACAAGTCAGTCCGGACCTGGAATGAGATCATC CCCTCAAAGGGTGTTTGAAAGTTGGAGGAAGGTG CCATCCTCATGTGAACGGGGTGTTTTTCAATGGTAT AATATTAGGGCCTGACGACCATGTCCTAATCCCAGA GATGCAATCATCCCTCCTCCAGCAACATATGGAGTT GTTGGAATCTTCAGTTATCCCCCTGATGCACCCCT GGCAGACCCTTCTACAGTTTTCAAAGAAGGTGATGA GGCTGAGGATTTTGTGAAGTTCACCTCCCCGATGT GTACAAACAGATCTCAGGGGTTGACCTGGGTCTCCC GAACTGGGGAAAGTATGTATTGATGACTGCAGGGG
--	--

10

20

30

40

50

【表 6 - 3 6】

		CCATGATTGGCCTGGTGTGATATTTCCCTAATGA CATGGTGCAGAGTTGGTATCCATCTTGCATTAAAT TAAAGCACACCAAGAAAAGACAGATTTATACAGAC ATAGAGATGAACCGACTTGGAAGTAA
75	エンペロープ; LCMV	ATGGGTCAGATTGTGACAATGTTTGAGGCTCTGCCT CACATCATCGATGAGGTGATCAACATTGTCATTATT GTGCTTATCGTGATCACGGGTATCAAGGCTGTCTAC AATTTGCCACCTGTGGGATATTCGCATTGATCAGT TTCCTACTTCTGGCTGGCAGGTCCTGTGGCATGTAC GGTCTTAAGGGACCCGACATTTACAAAGGAGTTTAC CAATTTAAGTCAGTGGAGTTTGATATGTCACATCTG AACCTGACCATGCCCAACGCATGTTACGCCAACAAC TCCCACCATTACATCAGTATGGGGACTTCTGGACTA GAATTGACCTTCACCAATGATTCCATCATCAGTCAC AACTTTTGCAATCTGACCTCTGCCTTCAACAAAAG ACCTTTGACCACACACTCATGAGTATAGTTTCGAGC CTACACCTCAGTATCAGAGGGAACCTCCAACATAAG GCAGTATCCTGCGACTTCAACAATGGCATAACCATC CAATACAACCTGACATTCTCAGATCGACAAAGTGCT CAGAGCCAGTGTAGAACCTTCAGAGGTAGAGTCCT AGATATGTTTAGAACTGCCTTCGGGGGGAAATACAT GAGGAGTGGCTGGGGCTGGACAGGCTCAGATGGCA AGACCACCTGGTGTAGCCAGACGAGTTACCAATAC CTGATTATACAAAATAGAACCTGGGAAAACCACTG CACATATGCAGGTCCTTTTGGGATGTCCAGGATTCT CCTTTCCCAAGAGAAGACTAAGTTCTTCACTAGGAG ACTAGCGGGCACATTCACCTGGACTTTGTCAGACTC TTCAGGGGTGGAGAATCCAGGTGGTTATTGCCTGAC CAAATGGATGATTCTTGCTGCAGAGCTTAAGTGTTT CGGGAACACAGCAGTTGCGAAATGCAATGTAAATC ATGATGCCGAATTCTGTGACATGCTGCGACTAATTG ACTACAACAAGGCTGCTTTGAGTAAGTTCAAAGAG

10

20

30

40

50

【表 6 - 3 7】

		GACGTAGAATCTGCCTTGCACTTATTCAAAACAACA GTGAATTCTTTGATTTTCAGATCAACTACTGATGAGG AACCACCTTGAGAGATCTGATGGGGGTGCCATATTGC AATTACTCAAAGTTTTGGTACCTAGAACATGCAAAG ACCGGCGAAACTAGTGTCCCCAAGTGCTGGCTTGTC ACCAATGGTTCCTTACTTAAATGAGACCCACTTCAGT GATCAAATCGAACAGGAAGCCGATAACATGATTAC AGAGATGTTGAGGAAGGATTACATAAAGAGGGCAGG GGAGTACCCCCCTAGCATTGATGGACCTTCTGATGT TTTCCACATCTGCATATCTAGTCAGCATCTTCCTGCA CCTTGTCAAAATACCAACACACAGGCACATAAAAG GTGGCTCATGTCCAAAGCCACACCGATTAACCAACA AAGGAATTTGTAGTTGTGGTGCATTTAAGGTGCCTG GTGTA AAAACCGTCTGGAAAAGACGCTGA	10
76	エンベロープ ; FPV	ATGAACACTCAAATCCTGGTTTTCGCCCTTGTTGGCA GTCATCCCCACAAATGCAGACAAAATTTGTCTTGGA CATCATGCTGTATCAAATGGCACCAAAGTAAACAC ACTCACTGAGAGAGGAGTAGAAGTTGTCAATGCAA CGGAAACAGTGGAGCGGACAAACATCCCCAAAATT TGCTCAAAAAGGGAAAAGAACCACTGATCTTGGCCA ATGCGGACTGTTAGGGACCATTACCGGACCACCTCA ATGCGACCAATTTCTAGAATTTTCAGCTGATCTAAT AATCGAGAGACGAGAAGGAAATGATGTTTGTACC CGGGGAAGTTTGTTAATGAAGAGGCATTGCGACAA ATCCTCAGAGGATCAGGTGGGATTGACAAAGAAAC AATGGGATTACATATAGTGAATAAGGACCAACG GAACAAC TAGTG CATGTAGAAGATCAGGGTCTTCAT TCTATGCAGAAATGGAGTGGCTCCTGTCAAATACAG ACAATGCTGCTTTCCACAAATGACAAAATCATACA AAAACACAAGGAGAGAATCAGCTCTGATAGTCTGG GGAATCCACCATTCAGGATCAACCACCGAACAGAC CAA ACTATATGGGAGTGGAAATAAACTGATAACAG	20 30 40

10

20

30

40

50

【表 6 - 3 8】

		TCGGGAGTTCCAAATATCATCAATCTTTTGTGCCGA GTCCAGGAACACGACCGCAGATAAATGGCCAGTCC GGACGGATTGATTTTCATTGGTTGATCTTGATCCC AATGATACAGTTACTTTTAGTTTCAATGGGGCTTTC ATAGCTCCAAATCGTGCCAGCTTCTTGAGGGGAAAG TCCATGGGGATCCAGAGCGATGTGCAGGTTGATGCC AATTGCGAAGGGGAATGCTACCACAGTGGAGGGAC TATAACAAGCAGATTGCCTTTTCAAACATCAATAG CAGAGCAGTTGGCAAATGCCCAAGATATGTAAAAC AGGAAAGTTTATTATTGGCAACTGGGATGAAGAAC GTTCCCGAACCTTCCAAAAAAGGAAAAAAGAGG CCTGTTTGGCGCTATAGCAGGGTTTATTGAAAATGG TTGGGAAGGTCTGGTCGACGGGTGGTACGGTTTCAG GCATCAGAATGCACAAGGAGAAGGAACTGCAGCAG ACTACAAAAGCACCCAATCGGCAATTGATCAGATA ACCGGAAAGTTAAATAGACTCATTGAGAAAACCAA CCAGCAATTTGAGCTAATAGATAATGAATTCCTGA GGTGGAAAAGCAGATTGGCAATTTAATTAAGTGA CCAAAGACTCCATCACAGAAGTATGGTCTTACAATG CTGAACCTTCTTGTGGCAATGGAAAACCAGCACACTA TTGATTTGGCTGATTGAGAGATGAACAAGCTGTATG AGCGAGTGAGGAAACAATTAAGGGAAAATGCTGAA GAGGATGGCACTGGTTGCTTTGAAATTTTTCATAAA TGTGACGATGATTGTATGGCTAGTATAAGGAACAAT ACTTATGATCACAGCAAATACAGAGAAGAAGCGAT GCAAAATAGAATACAAATTGACCCAGTCAAATTGA GTAGTGGCTACAAAGATGTGATACTTTGGTTTAGCT TCGGGGCATCATGCTTTTTGCTTCTTGCCATTGCAAT GGGCCTTGTTTTTCATATGTGTGAAGAACGGAAACAT GCGGTGCACTATTTGTATATAA
77	エンペロープ ; RRV	AGTGTAACAGAGCACTTTAATGTGTATAAGGCTACT AGACCATACCTAGCACATTGCGCCGATTGCGGGGA

10

20

30

40

50

【表 6 - 3 9】

	CGGGTACTTCTGCTATAGCCCAGTTGCTATCGAGGA GATCCGAGATGAGGCGTCTGATGGCATGCTTAAGAT CCAAGTCTCCGCCCAAATAGGTCTGGACAAGGCAG GCACCCACGCCCACACGAAGCTCCGATATATGGCTG GTCATGATGTTTCAGGAATCTAAGAGAGATTCTTGA GGGTGTACACGTCCGCAGCGTGCTCCATACATGGGA CGATGGGACACTTCATCGTCGCACACTGTCCACCAG GCGACTACCTCAAGGTTTCGTTTCGAGGACGCAGATT CGCACGTGAAGGCATGTAAGGTCCAATACAAGCAC AATCCATTGCCGGTGGGTAGAGAGAAGTTCTGTGGTT AGACCACACTTTGGCGTAGAGCTGCCATGCACCTCA TACCAGCTGACAACGGCTCCCACCGACGAGGAGAT TGACATGCATACACCGCCAGATATACCGGATCGCAC CCTGCTATCACAGACGGCGGGCAACGTCAAAATAA CAGCAGGCGGCAGGACTATCAGGTACAACGTGTACC TGCGGCCGTGACAACGTAGGCACTACCAGTACTGA CAAGACCATCAACACATGCAAGATTGACCAATGCC ATGCTGCCGTCACCAGCCATGACAAATGGCAATTTA CCTCTCCATTTGTTCCCAGGGCTGATCAGACAGCTA GGAAAGGCAAGGTACACGTTCCGTTCCCTCTGACTA ACGTACCTGCCGAGTGCCGTTGGCTCGAGCGCCGG ATGCCACCTATGGTAAGAAGGAGGTGACCCTGAGA TTACACCCAGATCATCCGACGCTCTTCTCCTATAGG AGTTTAGGAGCCGAACCGCACCCGTACGAGGAATG GGTTGACAAGTTCTCTGAGCGCATCATCCCAGTGAC GGAAGAAGGGATTGAGTACCAGTGGGGCAACAACC CGCCGGTCTGCCTGTGGGCGCAACTGACGACCGAG GGCAAACCCCATGGCTGGCCACATGAAATCATTCA GTACTATTATGGACTATACCCCGCCGCGCACTATTGC CGCAGTATCCGGGGCGAGTCTGATGGCCCTCCTAAC TCTGGCGGCCACATGCTGCATGCTGGCCACCGCGAG GAGAAAGTGCCTAACACCGTACGCCCTGACGCCAG	10 20 30 40
--	---	---

【表 6 - 4 0】

		GAGCGGTGGTACCGTTGACACTGGGGCTGCTTTGCT GCGCACCGAGGGCGAATGCA
78	エンベロープ; MLV 10A1	AGTGTAACAGAGCACTTTAATGTGTATAAGGCTACT AGACCATACCTAGCACATTGCGCCGATTGCGGGGA CGGGTACTTCTGCTATAGCCCAGTTGCTATCGAGGA GATCCGAGATGAGGCGTCTGATGGCATGCTTAAGAT CCAAGTCTCCGCCCCAAATAGGTCTGGACAAGGCAG GCACCCACGCCCACACGAAGCTCCGATATATGGCTG GTCATGATGTTTCAAGGAATCTAAGAGAGATTCTTGA GGGTGTACACGTCCGCAGCGTGCTCCATACATGGGA CGATGGGACACTTCATCGTCGCACACTGTCCACCAG GCGACTACCTCAAGGTTTCGTTTCGAGGACGCAGATT CGCACGTGAAGGCATGTAAGGTCCAATACAAGCAC AATCCATTGCCGGTGGGTAGAGAGAAGTTCGTGGTT AGACCACACTTTGGCGTAGAGCTGCCATGCACCTCA TACCAGCTGACAACGGCTCCCACCGACGAGGAGAT TGACATGCATACACCGCCAGATATACCGGATCGCAC CCTGCTATCACAGACGGCGGGCAACGTCAAATAA CAGCAGGCGGCAGGACTATCAGGTACAACGTGACC TGCGGCCGTGACAACGTAGGCACTACCAGTACTGA CAAGACCATCAACACATGCAAGATTGACCAATGCC ATGCTGCCGTCACCAGCCATGACAAATGGCAATTTA CCTCTCCATTTGTTCCCAGGGCTGATCAGACAGCTA GGAAAGGCAAGGTACACGTTCCGTTCCCTCTGACTA ACGTCACCTGCCGAGTGCCGTTGGCTCGAGCGCCGG ATGCCACCTATGGTAAGAAGGAGGTGACCCTGAGA TTACACCCAGATCATCCGACGCTCTTCTCCTATAGG AGTTTAGGAGCCGAACCGCACCCGTACGAGGAATG GGTTGACAAGTTCTCTGAGCGCATCATCCCAGTGAC GGAAGAAGGGATTGAGTACCAGTGGGGCAACAACC CGCCGGTCTGCCTGTGGGCGCAACTGACGACCGAG GGCAAACCCCATGGCTGGCCACATGAAATCATTCA

10

20

30

40

50

【表 6 - 4 1】

		GTACTATTATGGACTATACCCCGCCGCCACTATTGC CGCAGTATCCGGGGCGAGTCTGATGGCCCTCCTAAC TCTGGCGGCCACATGCTGCATGCTGGCCACCGCGAG GAGAAAGTGCCTAACACCGTACGCCCTGACGCCAG GAGCGGTGGTACCGTTGACACTGGGGCTGCTTTGCT GCGCACCGAGGGCGAATGCA
79	エンベロープ: エボラ	ATGGGTGTTACAGGAATATTGCAGTTACCTCGTGAT CGATTCAAGAGGACATCATTCTTTCTTTGGGTAATT ATCCTTTTCCAAAGAACATTTTCCATCCCACCTTGGA GTCATCCACAATAGCACATTACAGGTTAGTGATGTC GACAACTGGTTTGCCGTGACAACTGTCATCCACA AATCAATTGAGATCAGTTGGACTGAATCTCGAAGG GAATGGAGTGGCAACTGACGTGCCATCTGCAACTA AAAGATGGGGCTTCAGGTCCGGTGTCCACCAAAG GTGGTCAATTATGAAGCTGGTGAATGGGCTGAAAA CTGCTACAATCTTGAAATCAAAAAACCTGACGGGA GTGAGTGTCTACCAGCAGCGCCAGACGGGATTTCGG GGCTTCCCCCGGTGCCGGTATGTGCACAAAGTATCA GGAACGGGACCGTGTGCCGGAGACTTTGCCTTCCAC AAAGAGGGTGCTTTCTTCCTGTATGACCGACTTGCT TCCACAGTTATCTACCGAGGAACGACTTTTCGTGAA GGTGTCGTTGCATTTCTGATACTGCCCCAAGCTAAG AAGGACTTCTTCAGCTCACACCCCTTGAGAGAGCCG GTCAATGCAACGGAGGACCCGTCTAGTGGCTACTAT TCTACCACAATTAGATATCAAGCTACCGGTTTTGGA ACCAATGAGACAGAGTATTTGTTTCGAGGTTGACAAT TTGACCTACGTCCAACCTTGAATCAAGATTACACCA CAGTTTCTGCTCCAGCTGAATGAGACAATATATACA AGTGGGAAAAGGAGCAATACCACGGGAAAACCTAAT TTGGAAGGTCAACCCCGAAATTGATACAACAATCG GGGAGTGGGCCTTCTGGGAAACTAAAAAACCTCA CTAGAAAAATTCGCAGTGAAGAGTTGTCTTTCACAG

10

20

30

40

50

【表 6 - 4 2】

		CTGTATCAAACAGAGCCAAAAACATCAGTGGTCAG AGTCCGGCGCGAACTTCTTCCGACCCAGGGACCAAC ACAACAACCTGAAGACCACAAAATCATGGCTTCAGA AAATTCCTCTGCAATGGTTCAAGTGCACAGTCAAGG AAGGGAAGCTGCAGTGTGCGCATCTGACAACCCTTGC CACAATCTCCACGAGTCCTCAACCCCCCACAACCAA ACCAGGTCCGGACAACAGCACCCACAATACACCCG TGTATAAACTTGACATCTCTGAGGCAACTCAAGTTG AACAACATCACCGCAGAACAGACAACGACAGCACA GCCTCCGACACTCCCCCGCCACGACCGCAGCCGGA CCCCTAAAAGCAGAGAACACCAACACGAGCAAGGG TACCGACCTCCTGGACCCCGCCACCACAACAAGTCC CCAAAACCACAGCGAGACCGCTGGCAACAACAACA CTCATCACCAAGATACCGGAGAAGAGAGTGCCAGC AGCGGGAAGCTAGGCTTAATTACCAATACTATTGCT GGAGTCGCAGGACTGATCACAGGCGGGAGGAGAGC TCGAAGAGAAGCAATTGTCAATGCTCAACCCAAAT GCAACCCTAATTTACATTACTGGACTACTCAGGATG AAGGTGCTGCAATCGGACTGGCCTGGATACCATATT TCGGGCCAGCAGCCGAGGGAATTTACATAGAGGGG CTGATGCACAATCAAGATGGTTTAATCTGTGGGTTG AGACAGCTGGCCAACGAGACGACTCAAGCTCTTCA ACTGTTCTGAGAGCCACAACCGAGCTACGCACCTT TTCAATCCTCAACCGTAAGGCAATTGATTTCTTGCT GCAGCGATGGGGCGGCACATGCCACATTTTGGGAC CGGACTGCTGTATCGAACCACATGATTGGACCAAG AACATAACAGACAAAATTGATCAGATTATTCATGAT TTTGTGATAAAACCCTTCCGACCCAGGGGGACAAT GACAATTGGTGGACAGGATGGAGACAATGGATACC GGCAGGTATTGGAGTTACAGGCGTTATAATTGCAGT TATCGCTTTATTCTGTATATGCAAATTTGTCCTTTAG
80	短鎖 WPRE	AATCAACCTCTGGATTACAAAATTTGTGAAAGATTG

10

20

30

40

50

【表 6 - 4 3】

	配列	ACTGATATTCTTAACTATGTTGCTCCTTTTACGCTGT GTGGATATGCTGCTTTAATGCCTCTGTATCATGCTAT TGCTTCCCGTACGGCTTTTCGTTTTCTCCTCCTTGTAT AAATCCTGGTTGCTGTCTCTTTATGAGGAGTTGTGG CCCGTTGTCCGTCAACGTGGCGTGGTGTGCTCTGTG TTTGCTGACGCAACCCCCACTGGCTGGGGCATTGCC ACCACCTGTCAACTCCTTTCTGGGACTTTCGCTTTCC CCCTCCCGATCGCCACGGCAGAACTCATCGCCGCCT GCCTTGCCCCGTGCTGGACAGGGGCTAGGTTGCTGG GCACTGATAATTCCGTGGTGTGTC
81	プライマー	TAAGCAGAATTC ATGAATTTGCCAGGAAGAT
82	プライマー	CCATACAATGAATGGACACTAGGCGGCCGCACGAA T
83	Gag、Pol、 インテグラーゼ断片	GAATTCATGAATTTGCCAGGAAGATGGAAACCAAA AATGATAGGGGGAATTGGAGGTTTTATCAAAGTAA GACAGTATGATCAGATACTCATAGAAATCTGCGGA CATAAAGCTATAGGTACAGTATTAGTAGGACCTACA CCTGTCAACATAATTGGAAGAAATCTGTTGACTCAG ATTGGCTGCACTTTAAATTTCCCATTAGTCCTATTG AGACTGTACCAGTAAAATTAAGCCAGGAATGGAT GGCCCAAAAGTTAAACAATGGCCATTGACAGAAGA AAAAATAAAAGCATTAGTAGAAATTTGTACAGAAA TGGAAAAGGAAGGAAAAATTTCAAAAATTGGGCCT GAAAATCCATACAATACTCCAGTATTTGCCATAAAG AAAAAAGACAGTACTAAATGGAGAAAATTAGTAGA TTTCAGAGAACTTAATAAGAGAACTCAAGATTTCTG GGAAGTTCAATTAGGAATACCACATCCTGCAGGGTT AAAACAGAAAAAATCAGTAACAGTACTGGATGTGG GCGATGCATATTTTTCAGTTCCCTTAGATAAAGACT TCAGGAAGTATACTGCATTTACCATACCTAGTATAA ACAATGAGACACCAGGGATTAGATATCAGTACAAT GTGCTTCCACAGGGATGGAAAGGATCACCAGCAAT

10

20

30

40

50

【表 6 - 4 4】

	ATTCCAGTGTAGCATGACAAAAATCTTAGAGCCTTT TAGAAAACAAAATCCAGACATAGTCATCTATCAAT ACATGGATGATTTGTATGTAGGATCTGACTTAGAAA TAGGGCAGCATAGAACAAAAATAGAGGAACTGAGA CAACATCTGTTGAGGTGGGGATTTACCACACCAGAC AAAAAACATCAGAAAGAACCTCCATTCTTTGGATG GGTATGAACTCCATCCTGATAAATGGACAGTACAG CCTATAGTGCTGCCAGAAAAGGACAGCTGGACTGT CAATGACATACAGAAATTAGTGGGAAAATTGAATT GGGCAAGTCAGATTTATGCAGGGATTAAAGTAAGG CAATTATGTAACTTCTTAGGGGAACCAAAGCACTA ACAGAAGTAGTACCACTAACAGAAGAAGCAGAGCT AGAACTGGCAGAAAACAGGGAGATTCTAAAAGAAC CGGTACATGGAGTGTATTATGACCCATCAAAAGACT TAATAGCAGAAATACAGAAGCAGGGGCAAGGCCAA TGGACATATCAAATTTATCAAGAGCCATTTAAAAAT CTGAAAACAGGAAAGTATGCAAGAATGAAGGGTGC CCACACTAATGATGTGAAACAATTAACAGAGGCAG TACAAAAAATAGCCACAGAAAGCATAGTAATATGG GGAAAGACTCCTAAATTTAAATTACCCATACAAAA GGAAACATGGGAAGCATGGTGGACAGAGTATTGGC AAGCCACCTGGATTCTGAGTGGGAGTTTGTCAATA CCCCTCCCTTAGTGAAGTTATGGTACCAGTTAGAGA AAGAACCCATAATAGGAGCAGAACTTTCTATGTA GATGGGGCAGCCAATAGGGAACTAAATTAGGAAA AGCAGGATATGTAAGTACAGAGGAAGACAAAAAG TTGTCCCCCTAACGGACACAACAAATCAGAAGACT GAGTTACAAGCAATTCATCTAGCTTTGCAGGATTCTG GGATTAGAAGTAAACATAGTGACAGACTCACATA TGCATTGGGAATCATTCAGCACAACCAGATAAGA GTGAATCAGAGTTAGTCAGTCAAATAATAGAGCAG TTAATAAAAAAGGAAAAAGTCTACCTGGCATGGGT
--	---

10

20

30

40

50

【表 6 - 4 5】

		ACCAGCACACAAAGGAATTGGAGGAAATGAACAAG TAGATAAATTGGTCAGTGCTGGAATCAGGAAAGTA CTATTTTATAGATGGAATAGATAAGGCCCAAGAAGA ACATGAGAAATATCACAGTAATTGGAGAGCAATGG CTAGTGATTTTAACCTACCACCTGTAGTAGCAAAAG AAATAGTAGCCAGCTGTGATAAATGTCAGCTAAAA GGGGAAGCCATGCATGGACAAGTAGACTGTAGCCC AGGAATATGGCAGCTAGATTGTACACATTTAGAAG GAAAAGTTATCTTGGTAGCAGTTCATGTAGCCAGTG GATATATAGAAGCAGAAGTAATTCCAGCAGAGACA GGGCAAGAAACAGCATACTTCCTCTTAAAATTAGCA GGAAGATGGCCAGTAAAAACAGTACATACAGACAA TGGCAGCAATTTACCAGTACTACAGTTAAGGCCGC CTGTTGGTGGGCGGGGATCAAGCAGGAATTTGGCA TTCCCTACAATCCCCAAAGTCAAGGAGTAATAGAAT CTATGAATAAAGAATTAAAGAAAATTATAGGACAG GTAAGAGATCAGGCTGAACATCTTAAGACAGCAGT ACAAATGGCAGTATTCATCCACAATTTTAAAAGAAA AGGGGGGATTGGGGGGTACAGTGCAGGGGAAAGA ATAGTAGACATAATAGCAACAGACATACAACTAA AGAATTACAAAAACAAATTACAAAAATTCAAAATT TTCGGGTTTATTACAGGGACAGCAGAGATCCAGTTT GGAAAGGACCAGCAAAGCTCCTCTGGAAAGGTGAA GGGGCAGTAGTAATACAAGATAATAGTGACATAAA AGTAGTGCCAAGAAGAAAAGCAAAGATCATCAGGG ATTATGGAAAACAGATGGCAGGTGATGATTGTGTG GCAAGTAGACAGGATGAGGATTAA	10
84	Rev、RRE、および ウサギベータグロビン ポリAを含むDNA断片	TCTAGAATGGCAGGAAGAAGCGGAGACAGCGACGA AGAGCTCATCAGAACAGTCAGACTCATCAAGCTTCT CTATCAAAGCAACCCACCTCCCAATCCCGAGGGGA CCCGACAGGCCCGAAGGAATAGAAGAAGAAGGTGG AGAGAGAGACAGAGACAGATCCATTCGATTAGTGA	20
			30
			40

10

20

30

40

50

【表 6 - 4 6】

	ACGGATCCTTGGCACTTATCTGGGACGATCTGCGGA GCCTGTGCCTCTTCAGCTACCACCGCTTGAGAGACT TACTCTTGATTGTAACGAGGATTGTGGAACCTTCTGG GACGCAGGGGGTGGGAAGCCCTCAAATATTGGTGG AATCTCCTACAATATTGGAGTCAGGAGCTAAAGAAT AGAGGAGCTTTGTTCCCTTGGGTTCTTGGGAGCAGCA GGAAGCACTATGGGCGCAGCGTCAATGACGCTGAC GGTACAGGCCAGACAATTATTGTCTGGTATAGTGCA GCAGCAGAACAAATTTGCTGAGGGCTATTGAGGCGC AACAGCATCTGTTGCAACTCACAGTCTGGGGCATCA AGCAGCTCCAGGCAAGAATCCTGGCTGTGGAAGA TACCTAAAGGATCAACAGCTCCTAGATCTTTTTCCC TCTGCCAAAAATTATGGGGACATCATGAAGCCCCTT GAGCATCTGACTTCTGGCTAATAAAGGAAATTTATT TTCATTGCAATAGTGTGTTGGAATTTTTTGTGTCTCT CACTCGGAAGGACATATGGGAGGGCAAATCATTTA AAACATCAGAATGAGTATTTGGTTTAGAGTTTGGCA ACATATGCCATATGCTGGCTGCCATGAACAAAGGTG GCTATAAAGAGGTCATCAGTATATGAAACAGCCCC CTGCTGTCCATTCCCTATTCCATAGAAAAGCCTTGA CTTGAGGTTAGATTTTTTTTATATTTTGTTTTGTGTT ATTTTTTTCTTTAACATCCCTAAAATTTTCCTTACAT GTTTTACTAGCCAGATTTTTCTCCTCTCCTGACTAC TCCCAGTCATAGCTGTCCCTCTTCTCTTATGAAGATC CCTCGACCTGCAGCCCAAGCTTGGCGTAATCATGGT CATAGCTGTTTCCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCAC AATTCCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGT GTAAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTC ACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCCGCTTTCCAG TCGGGAAACCTGTCGTGCCAGCGGATCCGCATCTCA ATTAGTCAGCAACCATAGTCCCGCCCCCTAACTCCGC CCATCCCGCCCCCTAACTCCGCCCAGTTCCGCCCATT
--	--

10

20

30

40

50

【表 6-47】

		CTCCGCCCCATGGCTGACTAATTTTTTTTATTTATGCTAGAGGCCGAGGCCGCCTCGGCCTCTGAGCTATTCCAGAAGTAGTGAGGAGGCTTTTTTTGGAGGCCTAGGCTTTTGCAAAAAGCTAACTTGTTTATTGCAGCTTATAATGGTTACAAATAAAGCAATAGCATCACAAATTTTCACAAATAAAGCATTTTTTTTTCACTGCATTCTAGTTGTGGTTGTCCAAACTCATCAATGTATCTTATCAGCGGCCGCCCCGGG
85	CAGエンハンサー/ プロモーター/ イントロン配列を含む DNA断片	ACGCGTTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCTATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCCGCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCCGCCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGACTATTTACGGTAAACTGCCCCCTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCCGCTGGCATTATGCCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGGTCGAGGTGAGCCCCACGTTCTGCTCACTCTCCCCATCTCCCCCCCCCTCCCCACCCCCAATTTTGTATTTATTTATTTTTTAATTATTTTGTGCAGCGATGGGGGCGGGGGGGGGGGGGGGCGCGCGCCAGGCGGGGCGGGGCGGGGCGAGGGGCGGGGCGGGGCGAGGGCGGGAGAGGTGCGGCGGCAGCCAATCAGAGCGGGCGCGCTCCGAAAGTTTCCTTTTATGGCGAGGCGGGCGCGGCGGCGGCCCTATAAAAAGCGAAGCGCGCGGGCGGGGAGTCGCTGCGTTGCCTTCGCCCCGTGCCCCGCTCCGCGCCGCTCGCGCCGCCCGCCCCGGCTCTGACTGACCGCGTTACTCCACAGGTGAGCGGGCGGGACGGCCCTTCTCCTCCGGGCTGTAATTAGCGCTTGGTTAATGACGGCTCGTTTCTTTTCTGTGGCTGCGTGAAGCCTTAAAGGGCTCCGGGAGGGCCCTTTGTGCG

10

20

30

40

【表 6 - 4 8】

		GGGGGGAGCGGCTCGGGGGGTGCGTGCGTGTGTGT GTGCGTGGGGAGCGCCGCGTGCGGCCCCGCGCTGCC CGGCGGCTGTGAGCGCTGCGGGCGCGGCGCGGGGC TTTGTGCGCTCCGCGTGTCGCGAGGGGAGCGCGGC CGGGGGCGGTGCCCCGCGGTGCGGGGGGGCTGCGA GGGGAACAAAGGCTGCGTGCGGGGTGTGTGCGTGG GGGGGTGAGCAGGGGGTGTGGGCGCGGCGGTGCGG CTGTAACCCCCCTGCACCCCCCTCCCCGAGTTGC TGAGCACGGCCCCGGCTTCGGGTGCGGGGCTCCGTGC GGGGCGTGCGCGGGGCTCGCCGTGCCGGGCGGGG GGTGGCGGCAGGTGGGGGTGCCGGGCGGGGCGGGG CCGCCTCGGGCCGGGGAGGGCTCGGGGGAGGGGCG CGGCGGCCCCGGAGCGCCGGCGGCTGTGAGGCGC GGCGAGCCGCAGCCATTGCCTTTTATGGTAATCGTG CGAGAGGGGCGCAGGGACTTCCTTTGTCCCAAATCTG GCGGAGCCGAAATCTGGGAGGCGCCGCCGACCCC CTCTAGCGGGCGCGGGCGAAGCGGTGCGGCGCCGG CAGGAAGGAAATGGGCGGGGAGGGCCTTCGTGCGT CGCCGCGCCGCGTCCCCCTTCTCCATCTCCAGCCTC GGGGCTGCCGCAGGGGGACGGCTGCCTTCGGGGGG GACGGGGCAGGGCGGGGTTCGGCTTCTGGCGTGTG ACCGGCGGGAATTC	10
86	VSV-Gを含む DNA断片	GAATTCATGAAGTGCCTTTTGTACTTAGCCTTTTAT TCATTGGGGTGAATTGCAAGTTCACCATAGTTTTTC CACACAACCAAAAAGGAAACTGGAAAAATGTTCTT TCTAATTACCATTATTGCCCGTCAAGCTCAGATTTA AATTGGCATAATGACTTAATAGGCACAGCCTTACAA GTCAAAATGCCCAAGAGTCACAAGGCTATTCAAGC AGACGGTTGGATGTGTCATGCTTCCAAATGGGTCAC TACTTGTGATTTCCGCTGGTATGGACCGAAGTATAT AACACATTCATCCGATCCTTCACTCCATCTGTAGA ACAATGCAAGGAAAGCATTGAACAAACGAAACAAG	30
			40

【表 6 - 4 9】

	GAAC TTGGCTGAATCCAGGCTTCCCTCCTCAAAGTT GTGGATATGCAACTGTGACGGATGCCGAAGCAGTG ATTGTCCAGGTGACTCCTCACCATGTGCTGGTTGAT GAATACACAGGAGAATGGGTTGATTCACAGTTCATC AACGGAAAATGCAGCAATTACATATGCCCCACTGTC CATAACTCTACAACCTGGCATTCTGACTATAAGGTC AAAGGGCTATGTGATTCTAACCTCATTTCCATGGAC ATCACCTTCTTCTCAGAGGACGGAGAGCTATCATCC CTGGGAAAGGAGGGCACAGGGTTCAGAAGTAACTA CTTTGCTTATGAAACTGGAGGCAAGGCCCTGCAAAAT GCAATACTGCAAGCATTGGGGAGTCAGACTCCCATC AGGTGTCTGGTTCGAGATGGCTGATAAGGATCTCTT TGCTGCAGCCAGATTCCCTGAATGCCCAGAAGGGTC AAGTATCTCTGCTCCATCTCAGACCTCAGTGGATGT AAGTCTAATTCAGGACGTTGAGAGGATCTTGGATTA TTCCCTCTGCCAAGAAACCTGGAGCAAAATCAGAG CGGGTCTTCCAATCTCTCCAGTGGATCTCAGCTATC TTGCTCCTAAAAACCCAGGAACCGGTCCTGCTTTCA CCATAATCAATGGTACCCTAAAATACTTTGAGACCA GATACATCAGAGTCGATATTGCTGCTCCAATCCTCT CAAGAATGGTCGGAATGATCAGTGGAACCTACCACA GAAAGGGAACCTGTGGGATGACTGGGCACCATATGA AGACGTGGAAATTGGACCCAATGGAGTTCTGAGGA CCAGTTCAGGATATAAGTTTCCTTTATACATGATTG GACATGGTATGTTGGACTCCGATCTTCATCTTAGCT CAAAGGCTCAGGTGTTTGAACATCCTCACATTCAAG ACGCTGCTTCGCAACTTCCTGATGATGAGAGTTTAT TTTTTGGTGATACTGGGCTATCCAAAAATCCAATCG AGCTTG TAGAAGGTTGGTTCAGTAGTTGGAAAAGCT CTATTGCCTCTTTTTTCTTTATCATAGGGTTAATCAT TGGACTATTCTTGGTTCTCCGAGTTGGTATCCATCTT TGCATTAAATTAAGCACACCAAGAAAAGACAGAT
--	---

10

20

30

40

50

【表 6 - 5 0】

		TTATACAGACATAGAGATGAGAATTC
87	RREおよび ウサギベータグロビン ポリAを含む ヘルパープラスミド	TCTAGAAGGAGCTTTGTTCCCTTGGGTTCTTGGGAGC AGCAGGAAGCACTATGGGCGCAGCGTCAATGACGC TGACGGTACAGGCCAGACAATTATTGTCTGGTATAG TGCAGCAGCAGAACAATTTGCTGAGGGCTATTGAG GCGCAACAGCATCTGTTGCAACTCACAGTCTGGGGC ATCAAGCAGCTCCAGGCAAGAATCCTGGCTGTGGA AAGATACCTAAAGGATCAACAGCTCCTAGATCTTTT TCCCTCTGCCAAAAATTATGGGGACATCATGAAGCC CCTTGAGCATCTGACTTCTGGCTAATAAAGGAAATT TATTTTCATTGCAATAGTGTGTTGGAATTTTTTGTGT CTCTCACTCGGAAGGACATATGGGAGGGCAAATCA TTTAAACATCAGAATGAGTATTTGGTTTAGAGTTT GGCAACATATGCCATATGCTGGCTGCCATGAACAA AGGTGGCTATAAAGAGGTCATCAGTATATGAAACA GCCCCCTGCTGTCCATTCTTATTCCATAGAAAAGC CTTGACTTGAGGTTAGATTTTTTTTTATATTTGTTTT GTGTTATTTTTTTCTTTAACATCCCTAAAATTTTCCT TACATGTTTTACTAGCCAGATTTTTCTCCTCTCCTG ACTACTCCCAGTCATAGCTGTCCCTCTTCTCTTATGA AGATCCCTCGACCTGCAGCCCAAGCTTGGCGTAATC ATGGTCATAGCTGTTTCCTGTGTGAAATTGTTATCC GCTCACAATTCCACACAACATACGAGCCGGAAGCA TAAAGTGTAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGC TAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCCGCT TTCCAGTCGGGAAACCTGTCGTGCCAGCGGATCCGC ATCTCAATTAGTCAGCAACCATAGTCCCGCCCCCTAA CTCCGCCCATCCCGCCCCCTAACTCCGCCCAGTCCG CCCATTCTCCGCCCCATGGCTGACTAATTTTTTTTAT TTATGCAGAGGCCGAGGCCGCCTCGGCCCTCTGAGCT ATTCCAGAAGTAGTGAGGAGGCTTTTTTGGAGGCCT AGGCTTTTGCAAAAAGCTAACTTGTTTATTGCAGCT

10

20

30

40

50

【表 6 - 5 1】

		TATAATGGTTACAAATAAAGCAATAGCATCACAAA TTTCACAAATAAAGCATTTTTTTTCACTGCATTCTAGT TGTGGTTTGTCCAAACTCATCAATGTATCTTATCACC CGGG
88	RSVプロモーターおよび HIV Rev	CAATTGCGATGTACGGGCCAGATATACGCGTATCTG AGGGGACTAGGGTGTGTTTAGGCGAAAAGCGGGGC TTCGGTTGTACGCGGTTAGGAGTCCCCTCAGGATAT AGTAGTTTCGCTTTTGCATAGGGAGGGGAAATGTA GTCCTTATGCAATACACTTGTAGTCTTGCAACATGGT AACGATGAGTTAGCAACATGCCTTACAAGGAGAGA AAAAGCACCGTGCATGCCGATTGGTGGAAGTAAGG TGGTACGATCGTGCCTTATTAGGAAGGCAACAGAC AGGTCTGACATGGATTGGACGAACCACTGAATTCCG CATTGCAGAGATAATTGTATTTAAGTGCCTAGCTCG ATACAATAAACGCCATTTGACCATTACACCATTTGG TGTGCACCTCCAAGCTCGAGCTCGTTTAGTGAACCG TCAGATCGCCTGGAGACGCCATCCACGCTGTTTTGA CCTCCATAGAAGACACCGGGACCGATCCAGCCTCCC CTCGAAGCTAGCGATTAGGCATCTCCTATGGCAGGA AGAAGCGGAGACAGCGACGAAGAACTCCTCAAGGC AGTCAGACTCATCAAGTTTCTCTATCAAAGCAACCC ACCTCCCAATCCCGAGGGGACCCGACAGGCCCGAA GGAATAGAAGAAGAAGGTGGAGAGAGAGACAGAG ACAGATCCATTGATTAGTGAACGGATCCTTAGCAC TTATCTGGGACGATCTGCGGAGCCTGTGCCTCTTCA GCTACCACCGCTTGAGAGACTTACTCTTGATTGTAA CGAGGATTGTGGAACCTTCTGGGACGCAGGGGGTGG GAAGCCCTCAAATATTGGTGGAATCTCCTACAATAT TGGAGTCAGGAGCTAAAGAATAGTCTAGA
89	標的配列	ATGGCAGGAAGAAGCGGAG
90	shRNA 配列	ATGGCAGGAAGAAGCGGAGTTCAAGAGACTCCGCT TCTTCCTGCCATTTTTT

10

20

30

40

50

【表 6 - 5 2】

91	H1プロモーターおよび shRT配列	GAACGCTGACGTCATCAACCCGCTCCAAGGAATCG CGGGCCCAGTGTCACTAGGCGGGAACACCCAGCGC GCGTGCGCCCTGGCAGGAAGATGGCTGTGAGGGAC AGGGGAGTGGCGCCCTGCAATATTTGCATGTCGCTA TGTGTTCTGGGAAATCACCATAAACGTGAAATGTCT TTGGATTTGGGAATCTTATAAGTTCTGTATGAGACC ACTTGATCCGCGGAGACAGCGACGAAGAGCTTCA AGAGAGCTCTTCGTCGCTGTCTCCGCTTTTT
92	H1 CCR5 配列	GAACGCTGACGTCATCAACCCGCTCCAAGGAATCG CGGGCCCAGTGTCACTAGGCGGGAACACCCAGCGC GCGTGCGCCCTGGCAGGAAGATGGCTGTGAGGGAC AGGGGAGTGGCGCCCTGCAATATTTGCATGTCGCTA TGTGTTCTGGGAAATCACCATAAACGTGAAATGTCT TTGGATTTGGGAATCTTATAAGTTCTGTATGAGACC ACTTGATCCGCTGTCAAGTCCAATCTATGTTCAAGA GACATAGATTGGACTTGACACTTTTT
93	プライマー	AGGAATTGATGGCGAGAAGG
94	プライマー	CCCCAAAGAAGGTCAAGGTAATCA
95	プライマー	AGCGCGGCTACAGCTTCA
96	プライマー	GGCGACGTAGCACAGCTTCP
97	AGT103 CCR5 miR30	TGTAAACTGAGCTTGCTCTA
98	AGT103-R5-1	TGTAAACTGAGCTTGCTCGC
99	AGT103-R5-2	CATAGATTGGACTTGACAC
100	CAG プロモーター	TAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGT TCATAGCCCATATATGGAGTTCCGCGTTACATAACT TACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACG ACCCCCGCCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTT CCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTC AATGGGTGGACTATTTACGGTAAACTGCCCCACTTGG CAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCC CTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGC

10

20

30

40

50

【表 6 - 5 3】

		ATTATGCCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCTTA CTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTA CCATGGGTGCGAGGTGAGCCCCACGTTCTGCTTCACT CTCCCCATCTCCCCCCCCCTCCCCACCCCAATTTTGT ATTTATTTATTTTTTAATTATTTTGTGCAGCGATGGG GGCGGGGGGGGGGGGGGGCGCGCGCCAGGCGGGGC GGGGCGGGGCGAGGGGCGGGGCGGGGCGAGGCGG AGAGGTGCGGCGGCAGCCAATCAGAGCGGCGCGCT CCGAAAGTTTCCTTTTATGGCGAGGCGGCGGCGGCG GCGGCCCTATAAAAAGCGAAGCGCGCGGCGGGCG
101	H1 エlement	GAACGCTGACGTCATCAACCCGCTCCAAGGAATCG CGGGCCCAGTGTCAGTAGGCGGGAACACCCAGCGC GCGTGCGCCCTGGCAGGAAGATGGCTGTGAGGGAC AGGGGAGTGGCGCCCTGCAATATTTGCATGTCGCTA TGTGTTCTGGGAAATCACCATAAACGTGAAATGTCT TTGGATTTGGGAATCTTATAAGTTCTGTATGAGACC ACTT
102	3' LTR	TGGAAGGGCTAATTCAGTCCCAACGAAGATAAGAT CTGCTTTTTGCTTGTACTGGGTCTCTCTGGTTAGACC AGATCTGAGCCTGGGAGCTCTCTGGCTAACTAGGGA ACCCACTGCTTAAGCCTCAATAAAGCTTGCTTGGAG TGCTTCAAGTAGTGTGTGCCCGTCTGTTGTGTGACT CTGGTAACTAGAGATCCCTCAGACCCTTTTAGTCAG TGTGGAAAATCTCTAGCAGTAGTAGTTCATGTCA
103	7SK プロモーター	CTGCAGTATTTAGCATGCCCCACCCATCTGCAAGGC ATTCTGGATAGTGTCAAACAGCCGGAAATCAAGT CCGTTTATCTCAAACTTTAGCATTTTGGGAATAAAT GATATTTGCTATGCTGGTTAAATTAGATTTTAGTTA AATTTCCTGCTGAAGCTCTAGTACGATAAGCAACTT GACCTAAGTGTAAGTTGAGATTTTCCTTCAGGTTTA TATAGCTTGTGCGCCGCTGGCTACCTC
104	miR155 Tat	CTGGAGGCTTGCTGAAGGCTGTATGCTGTCCGCTTC

10

20

30

40

50

【表 6 - 5 4】

		TTCCTGCCATAGGGTTTTGGCCACTGACTGACCCTA TGGGGAAGAAGCGGACAGGACACAAGGCCTGTTAC TAGCACTCACATGGAACAAATGGCC
105	伸長因子-1アルファ (EF1-アルファ) プロモーター	CCGGTGCCTA GAGAAGGTGG CGCGGGGTAA ACTGGGAAAAG TGATGTCGTG TACTGGCTCC GCCTTTTTCC CGAGGGTGGG GGAGAACCGT ATATAAGTGC AGTAGTCGCC GTGAACGTTC TTTTTCGCAA CGGGTTTGCC GCCAGAACAC AGGTAAGTGC CGTGTGTGGT TCCCGCGGGC CTGGCCTCTT TACGGGTTAT GGCCCTTGCG TGCCTGAAT TACTTCCACG CCCCTGGCTG CAGTACGTGA TTCTTGATCC CGAGCTTCGG GTTGGAAAGT GGTGGGAGAG TTCGAGGCCT TCGCTTAAG GAGCCCTTC GCCTCGTGCT TGAGTTGAGG CCTGGCCTGG GCGCTGGGGC CGCCGCGTGC GAATCTGGTG GCACCTTCGC GCCTGTCTCG CTGCTTTTGA TAAGTCTCTA GCCATTTAAA ATTTTGTATG ACCTGCTGCG ACGCTTTTTT TCTGGCAAGA TAGTCTTGTA AATGCGGGCC AAGATCTGCA CACTGGTATT TCGGTTTTTG GGCCGCGGG CGGCGACGGG GCGCGTGGT CCCAGCGCAC ATGTTCCGGC AGGCGGGGCC TGCGAGCGCG GCCACCGAGA ATCGGACGGG GGTAGTCTCA AGCTGGCCGG CCTGCTCTGG TGCTTGGCT CGCGCGCGCG TGTATCGCC CGCCCTGGGC GGCAAGGCTG GCGCGTGG CACCAGTTGC GTGAGCGGAA AGATGGCCGC TTCCCGGCC TGCTGCAGG AGCTCAAAT GGAGGACCG GCGCTCGGA GAGCGGGCG GTGAGTACC CACACAAAG AAAAGGGCCT TTCCGTCCTC AGCCGTGCT TCATGTGACT CCACGGAGTA CCGGGCGCG TCCAGGCACC TCGATTAGT CTCGAGCTTT TGGAGTACGT CGTCTTAGG TTGGGGGAG GGGTTTTATG CGATGGAGTT TCCCACACT GAGTGGGTGG AGACTGAAGT TAGGCCAGCT TGGCACTGA TGTAATTCTC CTTGGAATTT GCCCTTTTTG AGTTTGGATC TTGGTTTATT CTCAAGCCTC AGACAGTGGT TCAAAGTTTT TTCTTCCAT TTCAGGTGTC GTGATGTACA
106	5'制限認識部位を 伴うmiR21 Vif コーディング配列	CCCGGGCATCTCCATGGCTGTACCACCTTGTCGGGG GATGTGTA CTCTGA ACTTGTGTTGAATCTCATGGA GTTTCAAGAAGACACATCCGCACTGACATTTTGGTAT CTTTCATCTGACCA
107	5'制限認識部位を 伴うmiR185 Tat コーディング配列	GCTAGCGGGCTGGCTCGAGCAGGGGGCGAGGGAT TCCGCTTCTTCTGCCATAGCGTGGTCCCCTCCCCTA TGGCAGGCAGAAGCGGCACCTTCCCTCCCAATGACC GCGTCTTCGTC
108	miR185 Tat コーディング配列	GGGCTGGCTCGAGCAGGGGGCGAGGGATTCCGCT TCTTCTGCCATAGCGTGGTCCCCTCCCCTATGGCA GGCAGAAGCGGCACCTTCCCTCCCAATGACCGCGTC TTCGTC

【0313】

上に本発明の好ましい実施形態についていくつか説明し、具体的に例示してきたが、本発明はそのような実施形態に限定されることを意図していない。本発明の範囲および精神から逸脱することなく、様々な改変をそこに施してもよい。

特定の実施形態では、例えば以下の項目が提供される。

(項目1)

HIV感染に耐性の細胞を産生するための方法であって、

(a) HIV陰性の対象から単離された末梢血単核細胞(PBMC)を、治療有効量の刺激性作用剤と接触させるステップであって、前記接触がex vivoで実施される、

10

20

30

40

50

ステップ；

(b) *ex vivo*において、少なくとも1つの遺伝的エレメントをコードするウイルス送達システムを用いて前記P BMCに形質導入するステップであって、前記少なくとも1つの遺伝的エレメントが、ケモカイン受容体CCR5の産生を阻害することができるスモールRNA、またはHIV RNA配列を標的とすることができる少なくとも1つのスモールRNAを含む、ステップ；および

(c) 形質導入された前記P BMCを、少なくとも1日間培養するステップを含む、方法。

(項目2)

形質導入された前記P BMCを対象に注入するステップをさらに含む、項目1に記載の方法。

(項目3)

前記対象がヒトである、項目2に記載の方法。

(項目4)

前記刺激性作用剤がペプチドを含む、項目1に記載の方法。

(項目5)

前記ペプチドが、gagペプチドを含む、項目4に記載の方法。

(項目6)

前記刺激性作用剤がワクチンを含む、項目1に記載の方法。

(項目7)

前記ワクチンが、HIVワクチンを含む、項目6に記載の方法。

(項目8)

前記HIVワクチンが、MVA/HIV62Bワクチンまたはその改変体を含む、項目7に記載の方法。

(項目9)

前記ウイルス送達システムが、レンチウイルス粒子を含む、項目1に記載の方法。

(項目10)

前記少なくとも1つの遺伝的エレメントが、ケモカイン受容体CCR5の産生を阻害することができるスモールRNA、およびHIV RNA配列を標的とすることができる少なくとも1つのスモールRNAを含む、項目1に記載の方法。

(項目11)

前記HIV RNA配列が、HIV Vif配列、HIV Tat配列、またはそれらの改変体を含む、項目1または10に記載の方法。

(項目12)

前記少なくとも1つの遺伝的エレメントが、マイクロRNAまたはshRNAを含む、項目1または10に記載の方法。

(項目13)

前記少なくとも1つの遺伝的エレメントが、マイクロRNAクラスターを含む、項目12に記載の方法。

(項目14)

前記少なくとも1つの遺伝的エレメントが、

【化55】

AGGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCGACTGTAACTGAGCTTGCTCTACTGT
GAAGCCACAGATGGGTAGAGCAAGCACAGTTTACCGCTGCCTACTGCCTCG
GACTTCAAGGGGCTT (配列番号 1)

と少なくとも80%、または少なくとも85%、または少なくとも90%、または少なくとも95%の同一性パーセントを有するマイクロRNAを含む、項目12に記載の方法。

(項目15)

前記少なくとも1つの遺伝的エレメントが、
【化56】

AGGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCGACTGTAAACTGAGCTTGCTCTACTGT
GAAGCCACAGATGGGTAGAGCAAGCACAGTTTACCGCTGCCTACTGCCTCG
GACTTCAAGGGGCTT (配列番号 1)

を含む、項目12に記載の方法。
(項目16)

前記少なくとも1つの遺伝的エレメントが、
【化57】

CATCTCCATGGCTGTACCACCTTGTCGGGGGATGTGTACTTCTGAACTTGTG
TTGAATCTCATGGAGTTCAGAAGAACACATCCGCACTGACATTTTGGTATCT
TTCATCTGACCA (配列番号 2);

10

と少なくとも80%、もしくは少なくとも85%、もしくは少なくとも90%、もしくは
少なくとも95%の同一性パーセントを有するか、または
【化58】

GGGCCTGGCTCGAGCAGGGGGCGAGGGATTCCGCTTCTTCCTGCCATAGCG
TGGTCCCCTCCCCTATGGCAGGCAGAAGCGGCACCTTCCCTCCCAATGACC
GCGTCTTCGTCG (配列番号 3)

20

と少なくとも80%、もしくは少なくとも85%、もしくは少なくとも90%、もしくは
少なくとも95%の同一性パーセントを有するマイクロRNAを含む、項目12に記載の
方法。

(項目17)
前記少なくとも1つの遺伝的エレメントが、
【化59】

CATCTCCATGGCTGTACCACCTTGTCGGGGGATGTGTACTTCTGAACTTGTG
TTGAATCTCATGGAGTTCAGAAGAACACATCCGCACTGACATTTTGGTATCT
TTCATCTGACCA (配列番号 2); または
GGGCCTGGCTCGAGCAGGGGGCGAGGGATTCCGCTTCTTCCTGCCATAGCG
TGGTCCCCTCCCCTATGGCAGGCAGAAGCGGCACCTTCCCTCCCAATGACC
GCGTCTTCGTCG (配列番号 3)

30

を含む、項目12に記載の方法。
(項目18)

前記マイクロRNAクラスターが、

40

【化 6 0】

AGGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCGACTGTAAACTGAGCTTGCTCTACTGT
 GAAGCCACAGATGGGTAGAGCAAGCACAGTTTACCGCTGCCTACTGCCTCG
 GACTTCAAGGGGCTTCCCGGGCATCTCCATGGCTGTACCACCTTGTCGGGG
 GATGTGTAAGTTCTGAACTTGTGTTGAATCTCATGGAGTTCAGAAGAACACA
 TCCGCACTGACATTTTGGTATCTTTCATCTGACCAGCTAGCGGGCCTGGCTC
 GAGCAGGGGGCGAGGGATTCCGCTTCTTCCTGCCATAGCGTGGTCCCCTCC
 CCTATGGCAGGCAGAAGCGGCACCTTCCCTCCCAATGACCGCGTCTTCGTC
 (配列番号 31)

10

と少なくとも 80 %、または少なくとも 85 %、または少なくとも 90 %、または少なくとも 95 %の同一性パーセントを有する配列を含む、項目 13 に記載の方法。

(項目 19)

前記マイクロRNAクラスターが、

【化 6 1】

AGGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCGACTGTAAACTGAGCTTGCTCTACTGT
 GAAGCCACAGATGGGTAGAGCAAGCACAGTTTACCGCTGCCTACTGCCTCG
 GACTTCAAGGGGCTTCCCGGGCATCTCCATGGCTGTACCACCTTGTCGGGG
 GATGTGTAAGTTCTGAACTTGTGTTGAATCTCATGGAGTTCAGAAGAACACA
 TCCGCACTGACATTTTGGTATCTTTCATCTGACCAGCTAGCGGGCCTGGCTC
 GAGCAGGGGGCGAGGGATTCCGCTTCTTCCTGCCATAGCGTGGTCCCCTCC
 CCTATGGCAGGCAGAAGCGGCACCTTCCCTCCCAATGACCGCGTCTTCGTC
 (配列番号 31)

20

を含む、項目 13 に記載の方法。

(項目 20)

30

HIV 陰性対象の HIV 感染を予防するための方法であって、

(a) 有効量の第 1 の刺激性作用剤で前記対象を免疫化するステップ；

(b) 前記対象から白血球を取り出し、末梢血単核細胞 (PBM C) を精製するステップ；

(c) ex vivo において、前記 PBM C を治療有効量の第 2 の刺激性作用剤と接触させるステップ；

(d) ex vivo において、少なくとも 1 つの遺伝的エレメントをコードするウイルス送達システムを用いて前記 PBM C に形質導入するステップ；

(e) 形質導入された前記 PBM C を、少なくとも 1 日間培養するステップ；および

(f) 形質導入された前記 PBM C を前記対象に注入するステップ

40

を含む、方法。

(項目 21)

前記第 1 の刺激性作用剤および前記第 2 の刺激性作用剤のうちの少なくとも 1 つが、gag ペプチドを含む、項目 20 に記載の方法。

(項目 22)

前記第 1 の刺激性作用剤および前記第 2 の刺激性作用剤のうちの少なくとも 1 つが、HIV ワクチンを含む、項目 20 に記載の方法。

(項目 23)

前記 HIV ワクチンが、MVA / HIV 62 B ワクチンまたはその改変体を含む、項目 23 に記載の方法。

50

(項目 2 4)

前記少なくとも1つの遺伝的エレメントが、ケモカイン受容体CCR5の産生を阻害することができるスモールRNA、またはHIV RNA配列を標的とすることができる少なくとも1つのスモールRNAを含む、項目20に記載の方法。

(項目 2 5)

前記少なくとも1つの遺伝的エレメントが、ケモカイン受容体CCR5の産生を阻害することができるスモールRNA、およびHIV RNA配列を標的とすることができる少なくとも1つのスモールRNAを含む、項目20に記載の方法。

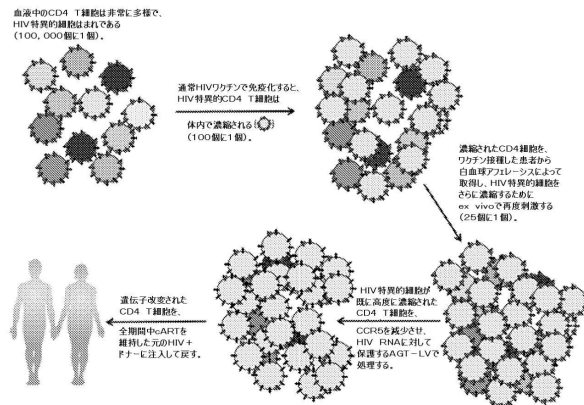
【図面】**【図 1】**

Figure 1

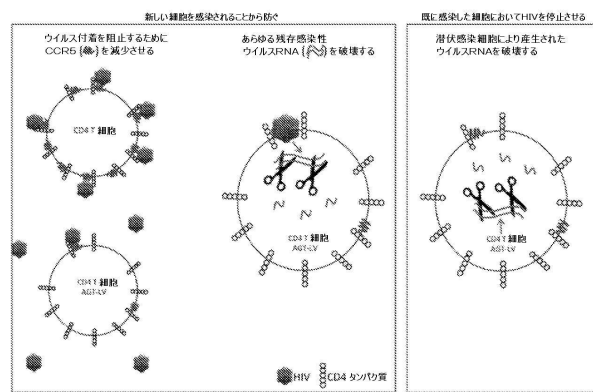
【図 2】

Figure 2

10

20

30

40

50

【図 3】

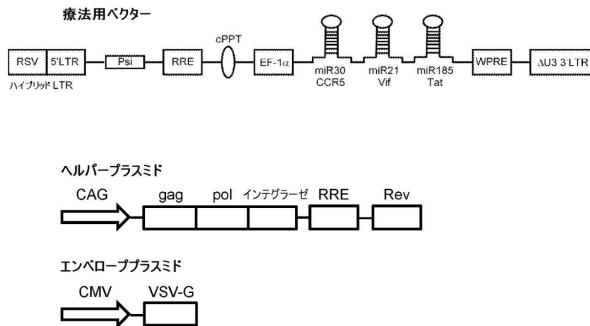


Figure 3

【図 4】

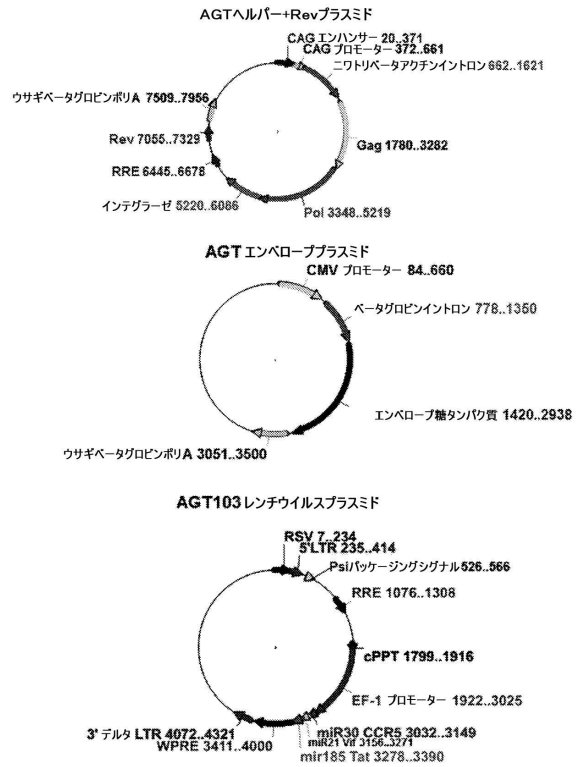


Figure 4

【図 5】

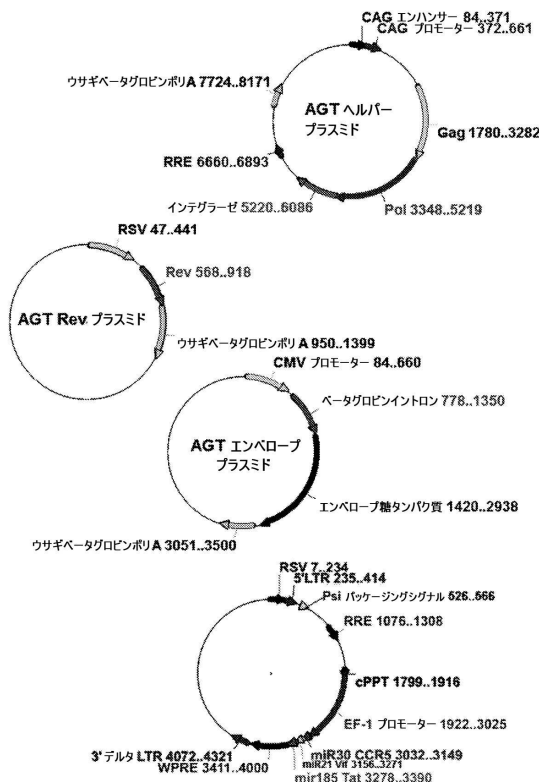


Figure 5

【図 6】

伸長因子-1アルファ(EF1-α)プロモーター (配列番号105)

CCGGTGCCTAGAGAAGGTGGCGCGGGTAACTGGGAAAGTGATGCTGCTACTGGCTCCGCCTT
TTTCCCGAGGGTGGGGGAGAACCGGTATATAAGTGCAGTAGTCGCCGTGAACGTTCTTTTCGCAA
CGGGTTTCCCGCCAGAACAGGTAAGTGCCGTGTGTTCCCGCGGGCCTGGCCTCTTTACGG
GTTATGGCCCTTCGGTGCCTTGAATTACTTCCACGCCCTGGCTGCAGTACGTGATTCTTGATCC
CGAGCTTCGGGTTGGAAGTGGGTGGGAGAGTTCGAGGCCCTTGGCTTAAGGAGCCCTTCGCCTC
GTGCTTGAGTTGAGGCTGGCCTGGGCGCTGGGCGCCCGCTGCGAATCTGTTGGCACCTTCGC
GCCTGCTCCTGCTTTTCGATAAGTCTTAGCCATTAAATTTTGTGACCTGCTGCGACGCT
TTTTTCTGCGAAGATAGTCTTGAATGCGGGCCAAAGATCTGCACACTGTTATTCGGTTTTTG
GGGCGCGGGCGGCGACGGGGCCCGTGCCTCCAGCGCACATGTTCCGCGAGGGCGGGCGCTGCGA
CGCGCGCCACCGAATCGGACGGGGTAGTCTCAAGCTGGCGGCTGCTCTGTTGCTGGCCT
CGCGCGCCGTGTATCGCCCGCCTGGGCGGCAAGGCTGGCCGGTCCGACCACTGCTGCTGAG
CGGAAGATGGCGCTTCCCGCCCTGCTGCAGGAGCTCAAAATGAGGACGCGCGCTCGGA
GAGCGGGCGGGTGAAGTACCCACACAAGGAAAGGCGCTTCCCTCCTCAGCGCTGCTTCATG
TGACTCCAGGAGTACCGGGCGCGCTCCAGGCACCTCGATTAGTTCTCGAGCTTTTGGAGTACGT
CGTCTTTAGGTTGGGGGAGGGGTTTATGCGATGGAGTTTCCACACTGAGTGGGTGGAGCT
GAAGTTAGGCGAGCTTGGCACTTGATGAATTCCTTGGAAATTTGCCCTTTTGGATTGGATC
TTGGTTTCATCTCAAGCCTCAGACAGTGGTTCAAAGTTTTTCTTCCATTTTCAGGTGCTGAT
GTACA

miR30 CCR5 (配列番号1)

AGGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCGACTGTAACTGAGCTTGCTCTACTGTGAAGCCACAGATG
GGTAGAGCAAGCACAGTTTACCGTGCCTACTGCCTCGGACTTCAAGGGGCTT

miR21 Vif (配列番号106)

CCCGGGCATCTCCATGGCTGTACCACTTGTCCGGGGATGTGTACTTCTGAACCTTGTGTGAATC
TCATGGAGTTTCAAGAAGACATCCGCACTGACATTTTGGTATCTTTCATCTGACCA

miR185 Tat (配列番号107;配列番号108(下線部分))

GCTAGCGGGCTGGCTCGAGCAGGGGGCGAGGGATTCCGCTTCTTCTGCCATAGCGTGGTCCCC
TCCCCATGCGCAGGCGAAGCGGCACTTCCCTCCCAATGACCGGCTCTCGTC

Figure 6

10

20

30

40

50

【図 7】

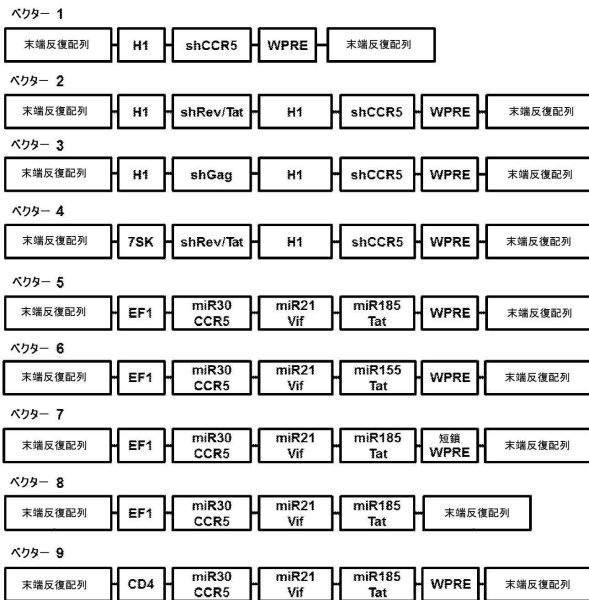


Figure 7

【図 8】

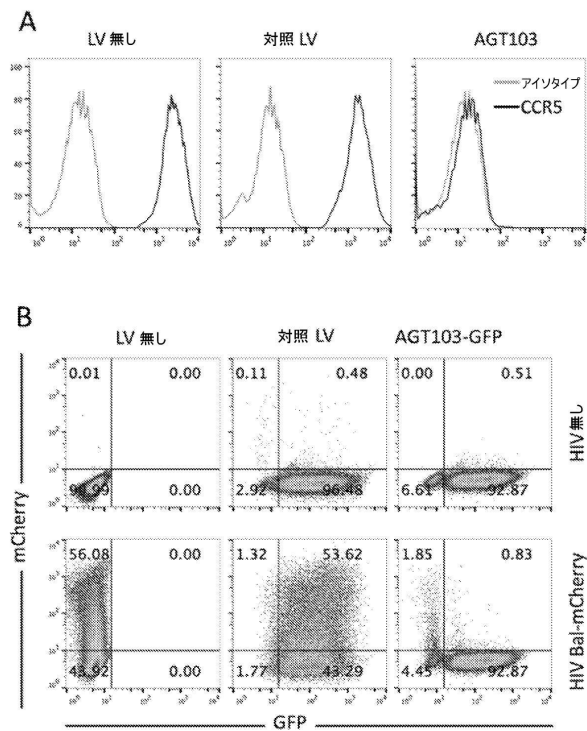
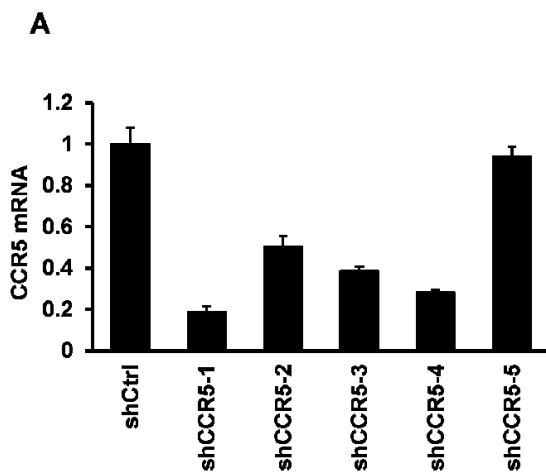
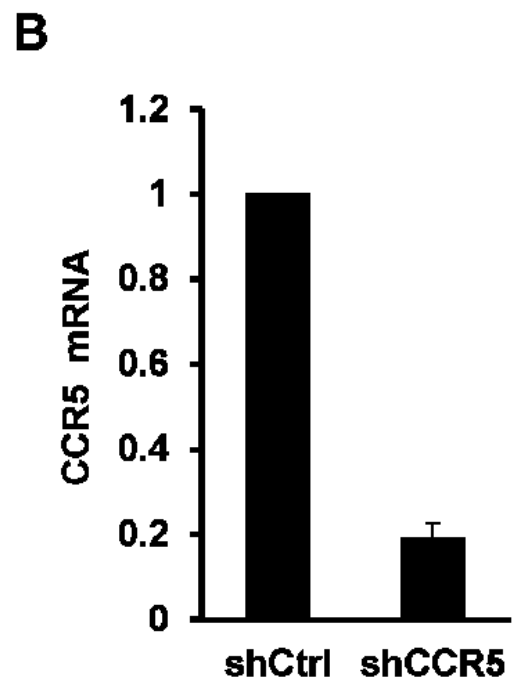


Figure 8

【図 9 A】



【図 9 B】



10

20

30

40

50

【図 10】

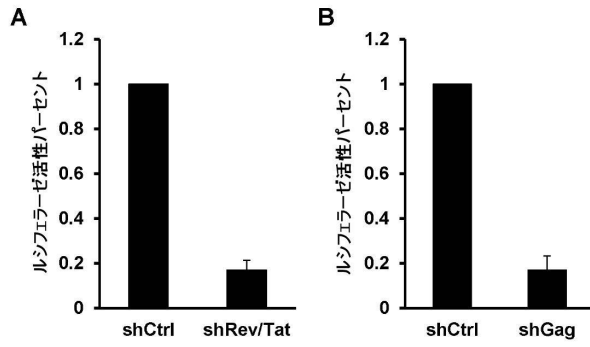


Figure 10

【図 11】

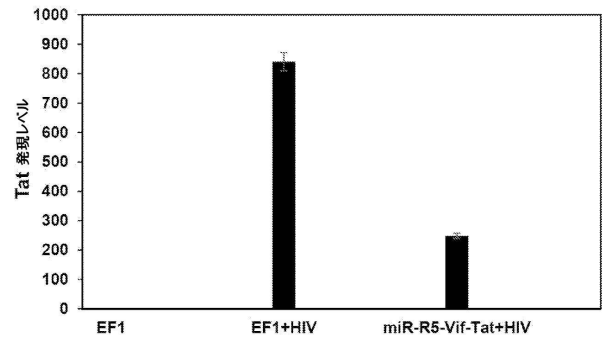


Figure 11

【図 12】

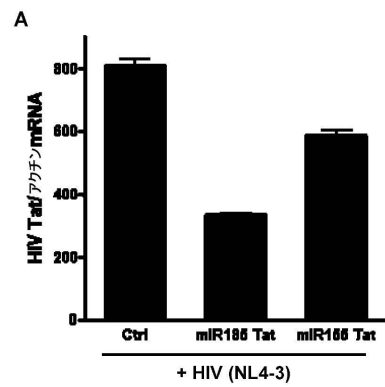


Figure 12

【図 13】

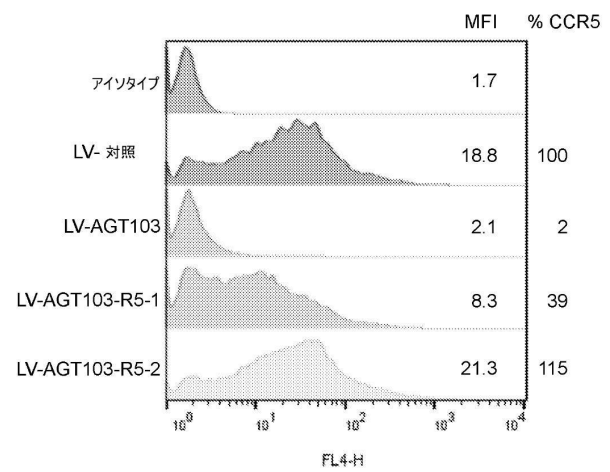


Figure 13

10

20

30

40

50

【図 1 4】

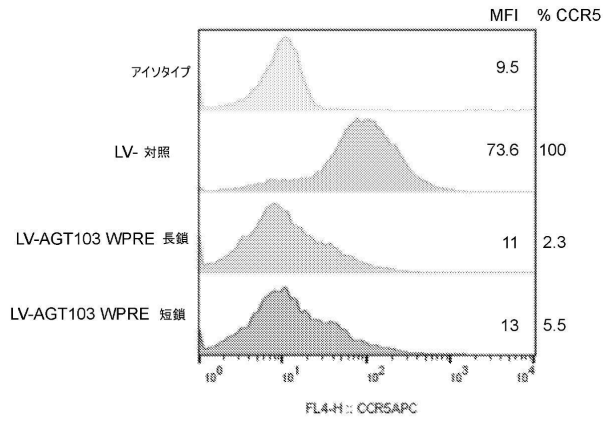


Figure 14

【図 1 5】

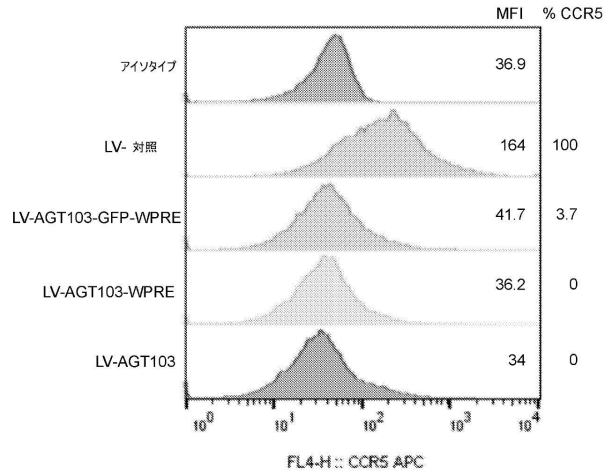


Figure 15

【図 1 6】

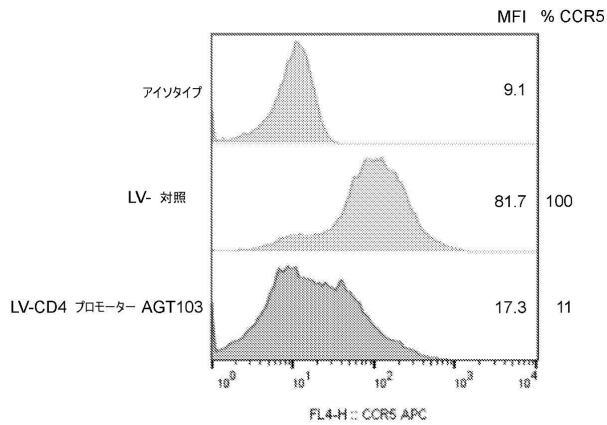


Figure 16

【図 1 7】

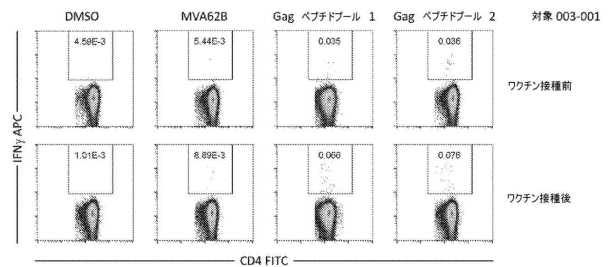


Figure 17

10

20

30

40

50

【図 18】

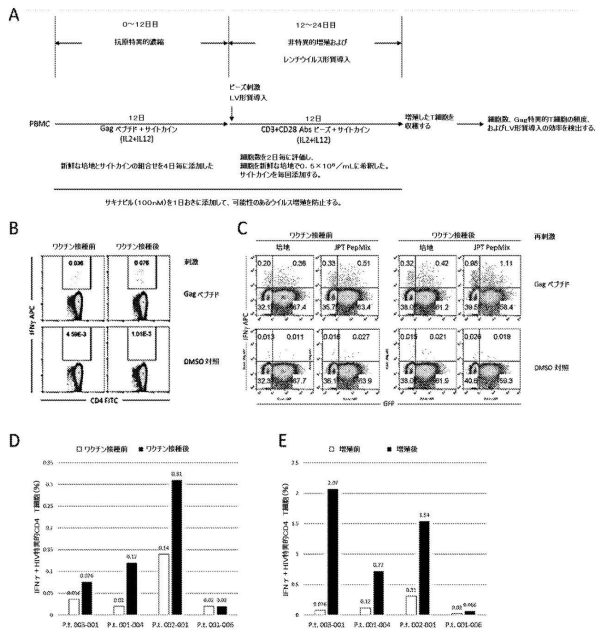


Figure 18

【図 19】

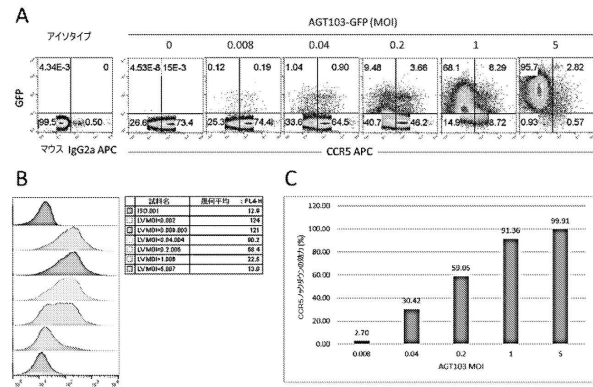


Figure 19

【図 20】

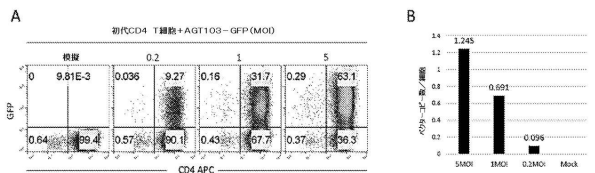


Figure 20

【図 21】

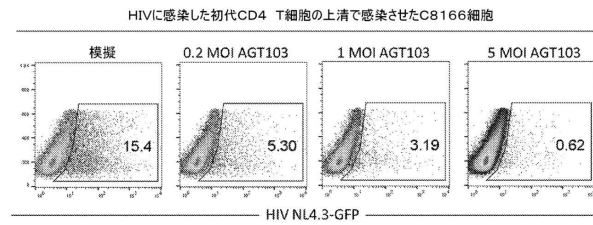


Figure 21

10

20

30

40

50

【図 2 2】

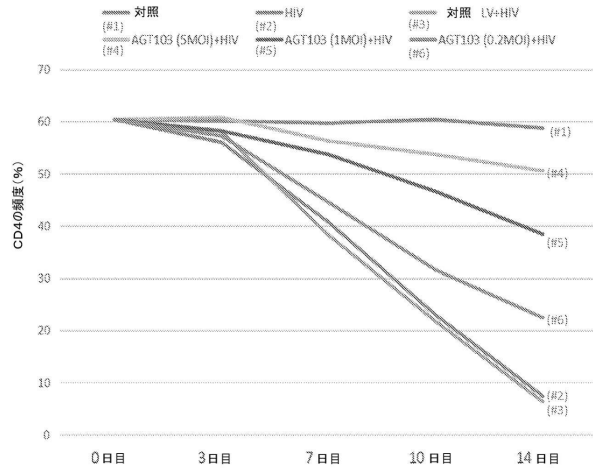


Figure 22

【図 2 3 - 1】

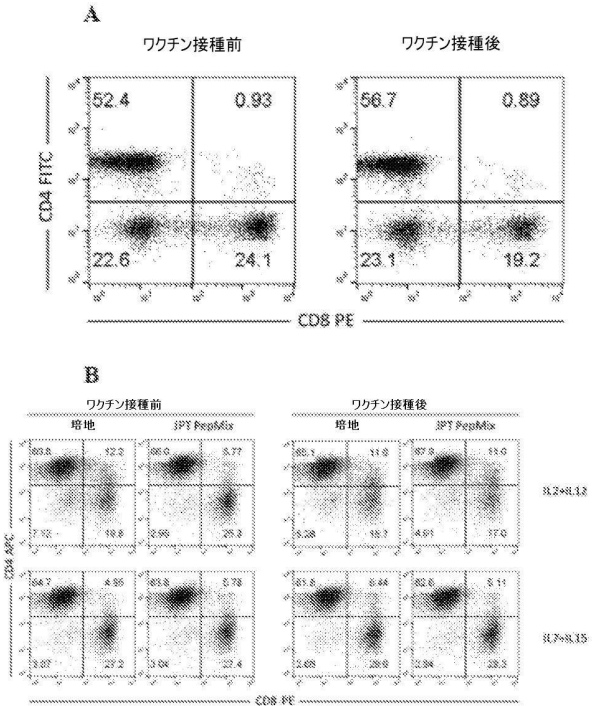


Figure 23

【図 2 3 - 2】

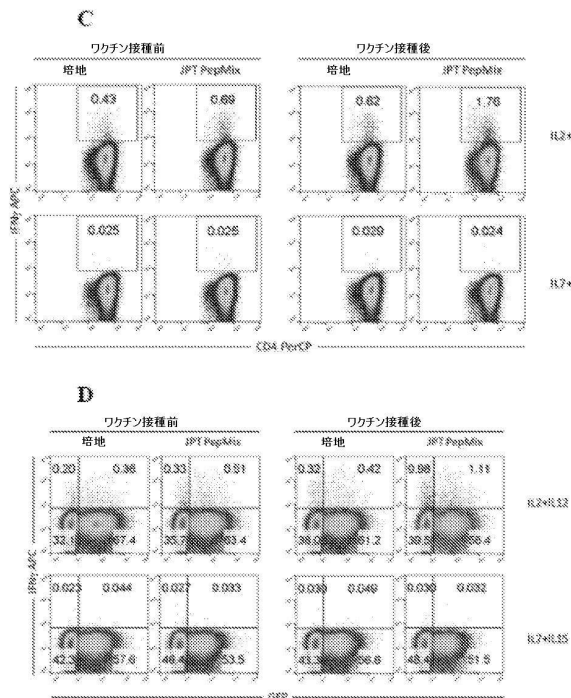


Figure 23 続き

【図 2 4】

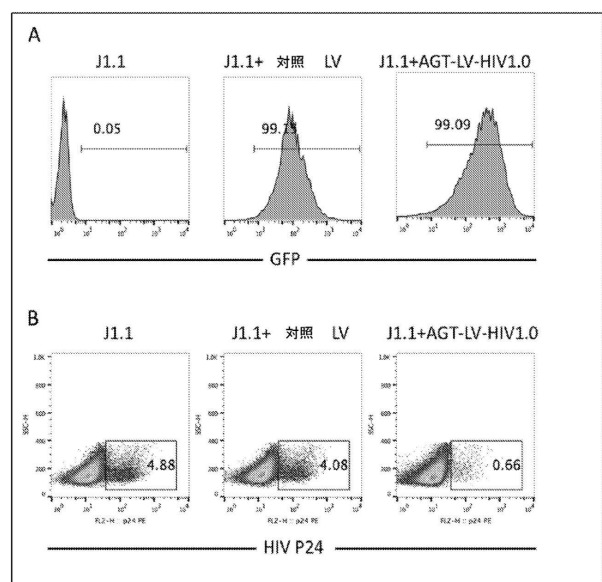


Figure 24

10

20

30

40

50

【配列表】
0007153332000001.app

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

A 6 1 P	31/18	(2006.01)	A 6 1 K	31/7105	
A 6 1 P	43/00	(2006.01)	A 6 1 P	31/18	
C 0 7 K	14/16	(2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 0 5
C 1 2 N	7/01	(2006.01)	C 0 7 K	14/16	
			C 1 2 N	7/01	

弁護士 山本 健策

(72)発明者 パウザ, チャールズ デイビッド

アメリカ合衆国 メリーランド 20850, ロックビル, メディカル センター ドライブ 9640, アメリカン ジーン テクノロジーズ インターナショナル インコーポレイテッド 気付

(72)発明者 ハイシャン, リ

アメリカ合衆国 メリーランド 20850, ロックビル, メディカル センター ドライブ 9640, アメリカン ジーン テクノロジーズ インターナショナル インコーポレイテッド 気付

(72)発明者 ラフーゼン, テイラー

アメリカ合衆国 メリーランド 20850, ロックビル, メディカル センター ドライブ 9640, アメリカン ジーン テクノロジーズ インターナショナル インコーポレイテッド 気付

審査官 鈴木 崇之

(56)参考文献

特表2010-520757 (JP, A)

特表2012-533299 (JP, A)

国際公開第2010/127166 (WO, A2)

国際公開第2015/042308 (WO, A2)

国際公開第2010/117974 (WO, A2)

中国特許出願公開第103184224 (CN, A)

Molecular Therapy, 2015年, Vol. 23, No. 2, pp. 310-320

The Journal of Infectious Diseases, 2014年, Vol. 210, pp. 99-110

AIDS Res Hum Retroviruses, 2000年, Vol. 16, No. 3, pp. 259-271

CLINICAL AND VACCINE IMMUNOLOGY, 2007年, Vol. 14, No. 9, pp. 1196-1202

ウイルス, 第55巻, 第1号, pp. 1-8

(58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)

C12N 15/00-15/90

C12N 1/00-7/08

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)

CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)

PubMed